

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

Sergančiųjų sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis antikūnų prieš branduolio antigenus paplitimas

Magistrantė MARGARITA KORENKOVAITĖ

_____ (parašas)

Darbo vadovė

Doc.dr. L. Bagdonaitė

_____ (parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab.dr.prof. Z.A. Kučinskienė

leidžiama ginti

_____ (parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

Vilnius 2010

SANRUMPOS

- ANA** – (angl. *anti nuclear antibodies*) - antikūnai prieš branduolio antigenus
- APL** – antigenus pateikiančios ląstelės
- CRB** – C reaktyvus baltymas
- CTGF** – (angl. *connective tissue growth factor*) jungiamojo audinio augimo faktorius
- ds-DNR** – dvispiralė DNR
- JA** – jungiamasis audinys
- EBV** – Epštein Baro virusas
- ENA** – (angl. *extractable nuclear antibodies*)- antikūnai prieš ekstrahuojamus branduolio antigenus
- ENG** – eritrocitų nusėdimo greitis
- MJAL** – mišri jungiamojo audinio liga
- NIF** – netiesioginė imuninė fluorescencija
- RA** – reumatoidinis artritas
- RF** – reumatoidinis faktorius
- SJAL** – sisteminės jungiamojo audinio ligos
- SS** – sisteminė sklerodermija
- SRV** – sisteminė raudonoji vilkligė
- vs-DNR** – vienspiralė DNR
- ŽLA** – (angl. *HLA – human leukocyte antigens*) žmogaus leukocitų antigenai

TURINYS

ĮVADAS.....	4
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	5
1.LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
1.1. Autoimuninių susirgimų priežastys.....	6
1.2. Antikūnų prieš branduolio antigenus (ANA) ir ekstrahuojamus branduolio antigenus (ENA) charakteristika.....	7
1.3. Su ANA autoantikūnų radimu siejamos sisteminės jungiamojo audinio ligos.....	11
1.3.1. Autoantikūnų diagnostinė reikšmė sergantiesiems SRV.....	11
1.3.2. Autoantikūnų reikšmė Sjogreno sindromo diagnostikoje.....	14
1.3.3. Autoantikūnų reikšmė sisteminės sklerodermijos diagnostikoje.....	15
1.3.4. Autoantikūnų reikšmė MJAL diagnostikoje	16
1.3.5. Autoantikūnų reikšmė polimiozito diagnostikoje.....	17
1.3.6. ANA autoanatikūnai reumatoidinio artrito diagnostikoje.....	18
1.4. Uždegimo žymenys sisteminių jungiamojo audinio ligų diagnostikoje.....	19
2.TYRIMŲ METODIKA.....	21
2.1. Diagnostiniai ANA/ENA tyrimai.....	21
2.1.1. Netiesioginės imunofluorescencijos metodas.....	21
2.1.2. Imunobloto metodas.....	23
2.2. Statistinė analizė.....	24
3.TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	25
3.1. Tyrimo rezultatai.....	25
3.1.1. Pacientų charakteristikos.....	25
3.1.2. ANA ir ENA paplitimas pacientams, sergantiems sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis	26
3.1.3. Uždegiminių žymenų sąsaja su ANA ir ENA.....	30
3.2. Rezultatų aptarimas.....	34
IŠVADOS.....	39
SANTRAUKA.....	40
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	41

ĮVADAS

Autoimunitetas – sąvoka apibūdinanti imuninės sistemos reakciją į nuosavus antigenus. Autoimuninių ligų patogenezei būdingas tolerancijos mechanizmų nepakankamas funkcionavimas, sudarantis sąlygas autoreaktyviems T ir B limfocitų klonams aktyvinti ir ląsteliniam bei humoraliniam imuniam atsakui į nuosavus antigenus susidaryti [1]. Antinukleariniai antikūnai (ANA) prieš ląstelių branduolių antigenines struktūras aptinkami tokių ligų kaip sisteminė raudonoji vilkligė, Sjogreno sindromas, sisteminė sklerodermija, polimiozitas, mišri jungiamojo audinio liga ir kt metu.

Dabar žinomi ir nustatomi antinukleariniai antikūnai padeda reumatinių ligų diferencinei diagnostikai, gali turėti reikšmės prognozuojant ligos eigą ir parenkant gydymo taktiką. Pvz: radus antikūnų prieš branduolio antigenus, galima tikėtis sunkesnės ligos eigos, pasireiškiančios karščiavimu, vidaus organų pažeidimu [14]. Antikūnai prieš ekstrahuojamus branduolio antigenus (ENA) labai svarbūs antigeninių struktūrų ir jų sąlygojamų ligų diferenciacijai. Antikūnai klinikinėje praktikoje naudojami kaip atrankiniai ligų žymenys.

Pastebėtina, kad retais atvejais antinukleariniai antikūnai aptinkami ir sveikiems, ypač vyresnio amžiaus žmonėms, todėl tyrimų rezultatus būtina derinti su klinikiniais ligų požymiais bei anamnezės duomenimis. Paprastai sveikiems asmenims aptikus antinuklearinių antikūnų, stebimas šių antikūnų inicijuojamų ligų išsivystymas kelerių metų laikotarpyje, siekiant laiku diagnozuoti ligą ir sustabdyti jos progresavimą tokius asmenis būtina reguliariai tirti. Dažniausiai stebima teigiama ANA koreliacija su klinikiniu ligos fenotipu ir pažeidimų laipsniškumu. Todėl pacientai, sergantys sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis, turi būti periodiškai tiriami, stebint ligos eigą; sveikimo procesą, ligos recidyvo atvejus bei gydymo efektyvumą.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas - įvertinti antikūnų prieš branduolio antigenus paplitimą bei diagnostinę vertę pacientams, sergantiems autoimunine sisteminė jungiamojo audinio liga. Siekiant įgyvendinti numatytą tikslą, buvo išskelti šie uždaviniai:

1. Įvertinti ANA/ENA paplitimą pacientams, sergantiems sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis.
2. Įvertinti autoantikūnų prieš branduolio antigenus vertę sisteminių jungiamojo audinio ligų diagnostikoje.
3. Įvertinti ANA/ENA sąsają su uždegiminiais rodikliais.

1.LITERATŪROS APŽVALGA

1.1.Autoimuninių susirgimų priežastys

Autoimuninės ligos – dauginės etiologijos ligos, joms atsirasti svarbūs genetiniai, infekciniai ir neinfekciniai pažeidimo veiksniai [16], taip pat imunologiniai, hormoniniai ir aplinkos veiksniai [50]. Mikrobu antigenai gali inicijuoti autoreaktyvius procesus keliais mechanizmais - molekulinės mimikrijos, polikloninės aktyvacijos ar izoliuotų antigenų atpalaidavimo. Infekcija paprastai nulemia pradinę limfocitų aktyvaciją, o antigenas gali palaikyti šią aktyvaciją, kuri persistuoja net ir po infekcinio agento išnaikinimo [16]. Nors nėra įrodyta, jog nespecifinė aktyvacija, kurią skatina infekcija, yra žmogaus autoimuninių ligų priežastis, tačiau yra aišku, jog uždegimas, net ir nesant infekcijos, gali skatinti polikloninę aktyvaciją ir autoreaktyvumą [54]. Kol kas nėra įtikinamų įrodymų, kad daugelio autoimuninių ligų atveju, laboratorinių tyrimų metu, nustatytas kryžminis reaktyvumas antigenams, kliniškai yra reikšmingas [16]. Egzistuoja ryšys tarp EBV infekcijos ir SRV, esant EBV autoimuninis procesas inicijuojamas molekulinės mimikrijos proceso dėka [59]. Citokinai: IL-4, IL-10, TGF- β ir kt., svarbūs uždegiminio imuninio atsako prevencijai, todėl citokinų disreguliacija yra dar vienas mechanizmas aktyvinantis autoimuninį procesą. Dendritinės ląstelės su apoptozės defektu, lemia limfocitų aktyvaciją ir žymų imunologinės tolerancijos sumažėjimą [72]. Dauguma autoimuninių ligų yra multigeninės. Genetiniai pelių tyrimai padėjo nustatyti mažiausiai 25 genus, kurių delecija ar perteklinė ekspresija skatina autoimuninę diatezę [16]. Sisteminės autoimuninės ligos siejamos su genų defektais, reguliuojančiais T ir B limfocitų aktyvaciją, autoreaktyvių limfocitų šalinimo defektais, kurie sukelia jų nepašalinamumą; su atsirandančiomis ląstelių ir jų komponentų modifikacijomis veikiant išoriniams veiksniams ir žūstant ląstelei (vykstant apoptozei ir nekrozei), susidarant ir plintant autoantigenams, su pasigaminusiais įvairiais autoantikūnais ir imuniniais kompleksais; turi ryšį su komplemento ir fagocitų deficitais, šalinant imuninius kompleksus ir žuvusias ląsteles [69]. Svetimkūniai taip pat yra autoimuninį procesą predisponuojantis veiksnys, - manoma, jog silikoniniai implantai yra viena sisteminės sklerodermijos priežasčių [50]. Daugeliu autoimuninių ligų dažniau serga moterys nei vyrai [16]. Moteriška lytis yra vienas SRV predisponuojančių faktorių, kadangi tiek

fiziologinė tiek pataloginė estrogeno koncentracija palengvina humoralinį atsaką, lemiantį B limfocitų proliferaciją ir antikūnų produkciją [49]. Rūkymas skatina antikūnų prieš ds–DNR produkciją, tuo pačiu ir sisteminės raudonosios vilkligės vystymąsi [41]. Vaistai taip pat gali keisti imuninį atsaką. Prokainamidas dažnai sukelia antinuklearinių antikūnų gamybą, o kartais net tampa lupus like sindromo priežastimi. Daugėja įrodymų, jog TNF- α blokada, gali indukuoti antinuklearinių antikūnų ekspresiją ir galbūt net sisteminę raudonąją vilkligę (SRV). Žinoma, jog TNF- α slopina aktyvintas T ląsteles, tačiau koku būdu jis indukuoja antikūnų gamybą, kol kas nėra žinoma [16]. Kol kas nėra duomenų apie imunoreguliacinių ląstelių, tokių kaip NK, reguliacinių T limfocitų poveikį autoimuniteto formavimuisi [72].

Autoimuninių reakcijų išsivystymas yra svarbiausia konkrečios sisteminės jungiamojo audinio ligos patogenezės dalis, siejama su pakenktų organų morfologine ir klinikine išraiška ir šių ligų gydymu [69].

1.2. Antikūnų prieš branduolio antigenus (ANA) ir ekstrahuojamus branduolio antigenus (ENA) charakteristika

Antinukleariniai antikūnai (ANA) – tai IgG ar IgM klasės antikūnai, kurie jungiasi į imuninius kompleksus su ląstelės branduolio komponentais – deoksiribonukleorūgštimi (DNR), ribonukleoproteinais (RNP), histonais, nukleoplazminiais ar branduolėlių antigenais [14].

Epitopų ir jų komponentų išplitimu ant kitų ląstelių, šiuo metu grindžiamas esminis autoimuniteto susiformavimo mechanizmas. Nustatyta, kad pakitę nuosavo organizmo komponentai komunikuodami su sveikomis struktūromis ar jų komponentais plečia pakenkimo lauką, sukeldami imuninių ląstelių tolerancijos defektus ir autoantikūnų gamybą [69]. Antinukleariniai antikūnai atsiranda kuomet apoptozės defektas sutrikdo visišką autoreaktyvių T limfocitų, indukuojančių autoantikūnų gamybą, pašalinimą iš čiobreliaukės, vaikų amžiuje. Užsitęsusi apoptozė, infekcinių ligų metu, vyresniame amžiuje, lemia apoptozinių ląstelių ir autoantigenų koncentracijos didėjimą kraujyje. Savo ruožtu padidėjusi autoantigenų koncentracija cirkuliacijoje, lemia nepakankamą

apoptotinės medžiagos pašalinimą. “Išvalymo” mechanizmo defektai įtakoja autoimunizaciją [58]. Autoantigenai atsipalaidavę iš apoptotinių ląstelių yra labai jautrūs oksidaciniams pokyčiams, sukeliantiems jų modifikacijas, kurios dar labiau didina jų imunogeniškumą [6]. Žuvusių ląstelių produktai, pvz: nukleorūgštys pasižymi imuniniu aktyvumu ir taip skatina antigeno inicijuojamą ANA atsaką (gamybą). ANA gali skatinti priešūždegiminių citokinų gamybą, greitinančių ligos eigą [4]. Antikūnai prieš branduolių antigenines struktūras neabejotinai žaloja audinius [56]. Serumo amiloidas (SAP) jungiasi prie apoptozinių ląstelių chromatinio fragmentų ir prie nekrozės paveiktų ląstelės branduolio fragmentų. Manoma, kad SAP dalyvauja ardant chromatiną negyvoje ląstelėje. Tyrimuose su pelėmis nustatyta, jog esant delecijoms SAP gene, vyksta spontaniškas ANA ekspresija, to pasekoje vystosi sunkus glomerulonefritas [58]. Yra duomenų, jog ANA antikūnai segreguoja su ŽLA haplotipu [66].

ANA – svarbus sisteminių autoimuninių ligų diagnostinis ir prognostinis rodiklis. ANA – bendras antinuklearinių antikūnų grupės pavadinimas, branduolio antigenais gali būti ir ekstrahuojami branduolio baltymai: SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, U1RNP, Scl – 70, Jo -1 ir kiti, bendrai vadinami ekstrahuojamais branduolio antigenais ENA [31]. Rekomenduojama ANA reikšmė: neigiama - esant praskiedimui <1:40. Tyrimas pasižymi dideliu jautrumu pvz: 98%, esant sisteminei raudonajai vilkligei [38]. Sergantiems vyresniems nei 80 metų amžiaus žmonėms, ANA koncentracija paprastai būna sumažėjusi [74]. Nustatyta, jog ANA ir ENA antikūnai žymiai dažniau aptinkami lėtinėmis ligomis sergančių pacientų tarpe [33]. Apytiksliai 1% sveikų žmonių randamas padidėjęs ANA titras [74].

Tyrimo eiliškumas turėtų būti toks: pirmiausia netiesioginės imunofluorescencijos (NIF) būdu nustatoma ar ANA reakcija yra teigiama, po to imunobloto ar imunofermentiniu metodu ieškoma antikūnų prieš konkrečius ekstrahuojamus branduolio antigenus [18,31]. Ekstrahuojamų branduolio antigenų ENA išdiferencijavimas leidžia nustatyti specifinį automuninį susirgimą [18].

ENA yra tirpūs branduolio ir komponentai, kurie yra autoantikūnų taikiniai, šiuo metu žinoma virš 100 tokių antigenų, tačiau dažniausiai tiriami antikūnai prieš šiuos

antigenus: Ro-52, SS-A, SS-B, Sm,U1RNP, Scl-70, Jo -1, ds-DNR, histonus, nukleosomas ir kt [9].

Sm: Sm antigenas sudarytas iš 12 polipeptidų, pvz: BB', D1/D2/D3, E, F,G ir kt. [58], susipakavusių į Sm-snRNP kompleksą. Sm antigenas gali būti aptinkamas ne tik šio komplekso sudėtyje [9]. Tačiau, kadangi Sm ir RNP yra tos pačios molekulės fragmentai, dažniausiai šie antikūnai aptinkami kartu [14]. Sm-snRNP kompleksas yra splaisosomos sudedamoji dalis, palengvinanti subrendusios iRNR produkciją [9]. Anti-Sm taip pat yra naudingas žymuo, suteikiantis papildomos informacijos apie ds-DNR [9].

U1-snRNP: maža branduolio ribonukleoproteinų dalis sudaryta iš keleto polipeptidų, įeinančių į Sm-snRNP kompleksą, kuris, kaip minėta, svarbus iRNR splaisingo pradžia [9].

SS-A (Ro): antigenas sudarytas iš dviejų ribonukleoproteinų 60 kDa (Ro 60) ir 52 kDa (Ro 52), susijungusių su keturiomis Y-RNR, nežinomos funkcijos, molekulėmis [9]. Nustatyta 60 kDa fragmento homologija su svetimais baltymais, lemianti imuninio atsako inicijavimą prieš šiuos baltymus, duodanti postūmį kryžmininei autoimuninei reakcijai prieš nuosavus ląstelės baltymus [46].

SS-B (La): antigenas yra 48 kDa baltymas, asocijuotas su įvairiomis RNR [10], svarbus RNR polimerazės III terminacijai, transkripcijai ir galimai kitoms funkcijoms [9,10].

Scl -70: 70 kDa molekulinio masės antigenas, funkciškai aktyvus topoizomerazės I degradacijos produktas, lokalizuotas nukleoplazmoje ir branduolyje [10]. Topoizomerazė I yra vadinamasis „namų ūkio“ genas. Jis pakeičia skirtingas topologines DNR formas, sukurdamas laikinas įkarpas vienoje iš DNR grandinių [9], jo funkcija yra katalizuoti DNR išsivyniojimą, taip sudarant sąlygas veikti DNR polimerazei [10]. Viso antigeno molekulinė masė yra 110 kDa, tačiau jis degradoja į 100 kDa, 87 kDa ir 70 kDa fragmentus [9].

Jo -1: Jo-1 antikūnai nukreipti prieš histidil tRNR sintetazės 50Da aktyvią sritį [10], tai yra citoplazminis fermentas, galintis sujungti amino rūgštį histidiną, su jam gimininga RNR [9]. Jo-1 veikimas pagrįstas susirišimu su histidil tRNR sintetaze ir jos aktyvumo inhibavimu [19]. Kiti autoantikūnai prieš aminoacil – tRNR sintetazę apima treonil – tRNR sintetazę, alanil tRNR sintetazę ir kt.[9].

Ribosomų P baltymas: antigenas sudarytas iš trijų ribosomų P fosfoproteinų - P0, P1 ir P2, kurių molinės masės yra: 38kDa, 19 kDa ir 17 kDa ir kurie yra aptinkami kitų, 80 baltymų, formuojančių ribosomą, sudėtyje [9]. Tai yra pagrindiniai ribosomų antigeniniai taikiniai, kiti taikiniai yra 28S rRNR, S10, Ja ir kt [10]. Ribosomų baltymai dalyvauja formuojant GTPazės domeną, didžiajame ribosomos subvienete [9].

PCNA: (angl. proliferating cell nuclear antigen). PCNA baltymas yra vienas iš svarbiausių elementų, atsakingas už ląstelės išgyvenamumą arba mirtį, jo veiklai svarbus tumoro supresijos genas p53 [53]. PCNA žinomas kaip ląstelės ciklo žymuo, svarbus DNR replikacijai ir reparacijai, aptinkamas tirpios arba su chromatinu asocijuotos formos, heterogeniškumas ir specifinės modifikacijos matyt yra svarbios daugybinėms antigeno funkcijoms ir gebėjimui sudaryti ryšius su kitais ląstelės elementais [51].

Centromeriniai antigenai: Centromerų baltymai yra vidinėje ir išorinėje kinetochoro pusėje, kuris svarbus mitotinės verpstės veiklai ląstelių dalijimosi metu. Antikūnai atpažįsta keturis baltymus: CENP-B (80kDa), rečiau CENP-A (17kDa), CENP-C (140kDa) ir CENP-D [9]. CENP-C atpažįstamas kaip mažesnis parametras, CENP-D nustatytas tik kelių atveju metu [10].

Ds – DNR: Antikūnų taikiniai yra epitopai esantys ds – DNR molekulėje, sudarytoje iš DNR nukleotidų, esančių tik natyvinėje DNR [9]. DNR jungiasi prie glomerulų bazinės membranos, paskui save pritraukdamos antikūnus, o šie formuoja imuninius kompleksus ir aktyvina komplementą [14]. Lupus antikūnai prieš ds-DNR pasižymi kryžminiu reaktyvumu prieš glutationo-S-transferazę ir bakterijų DNR polimerazę IV [40].

Vs-DNR: Antikūnai prieš vs – DNR reaguoja su purinų ir pirimidinų epitopais, esančiais dvispiralėje DNR [9].

Histonų antigenai: Kiekviena ląstelės nukleosoma sudaryta iš chromatinės DNR, kuri supa šerdyje esantį histoninių baltymų oktamerą, sudarytą iš baltymų dimerų H2A, H2B, H3, H4 ir jungties baltymo H1 [69].

Nukleoliariniai antigenai: tai branduolėlių antigenai [14].

Ku antigenai: Ku yra heteromerinis (Ku70/Ku80) antigenas, dažniausiai aptinkamas branduolyje. Ku dalyvauja DNR taisyme, V(D)J rekombinacijoje, telomerų sutvirtinime,

transkripcijos reguliacijoje, taip pat tarnauja kaip DNR surišantis subvienetas ir kaip nuo DNR priklausantis, alosterinis proteinkinazės reguliatorius. Ku heterodimero perkėlimas į branduolį yra determinuotas pagrindinių branduolio lokalizacijos signalų, esančių kiekviename Ku subvienete ir funkcionuojančių nepriklausomai vienas nuo kito [8]. Antikūnai prieš Ku antigenus dažniausiai aptinkami kartu su anti Ro/SS-A antikūnais [21].

1.3. Su ANA autoantikūnų radimu siejamos sisteminės jungiamojo audinio ligos

1.3.1. ANA diagnostinė reikšmė sergantiesiems SRV

Antikūnai prieš branduolių antigenus ypač būdingi SRV, (iki 95%) ne tik kaip diagnostinis žymuo, bet ir kaip vieni patogeninių veiksnių, ypač svarbūs glomerulonefrito patogenezėje. Pvz: SRV būdingiausi antikūnai prieš ds-DNR yra stipriai susiję su inkstų pažeidimais [56]. Anti ds-DNR ypač gerai koreliuoja su ligos aktyvumu [58]. Antikūnų prieš ds-DNR specifiškumas siekia 95%, bei pasižymi didesniu nei 70% jautrumu [9]. Antikūnai prieš ds-DNR jungiasi prie DNR dalelių, prigludusių prie inkstų pamatinės membranos, per histonus, arba sąveikauja su pridėtiniais glomerulų antigenais, tokiais kaip: nukleosomos, heparin-sulfatas ar lamininas. Antikūnų prieš ds-DNR jungimasis su šiais antigenais, inicijuoja vietinį uždegimą [49]. SRV imuninių kompleksų susidarymas būdingas III tipo hiperjautrumo reakcijai. Nepakankamas serumo komplemento lygis bei nedideli komplemento ir imunoglobulinų depozitai glomeruluose, palengvina imuninio susirgimo formavimąsi [56]. Glomeruluose esančių imuninių kompleksų ir komplemento kaskados aktyvinimas skatina leukocitų infiltraciją ir uždegiminių citokinų išsiskyrimą, to pasekoje žalojamos audinių ląstelės [26]. Inkstų funkcijos sutrikimai pasireiškia 30 – 50% SRV pacientų, lupus nefritas išsivysto audinių žalojimo rezultate. Difuziniam nefritui būdinga ypač didelė anti-ds-DNR koncentracija, žemas komplemento lygis, hematurija, proteinurija ir kt [26]. Histoniniai antikūnai taip pat susiję su lupus nefrito išsivystymu. Ši tyrimą gretinant su komplemento kiekio sumažėjimu, galima užkirsti kelią vystytis proteinurijai ir hematurijai, o kartu išvengti sunkaus inkstų pažeidimo [14]. Tuo tarpu esant antikūnams prieš SS-B antigenus, nefrito

rizika yra maža [56]. Anti-SS-B būdingi 10% SRV atvejų [9]. ŽLA II klasės molekulių ekspresija, sergant SRV, susijusi su autoantikūnais prieš Sm, SS-A, SS-B, RNP ir ds-DNR [49]. Antikūnai prieš ribosominius baltymus siejami su CNS pakenkimu, – psichozėmis [49]. Antikūnai prieš SS-A apytiksliai būdingi 40% pacientų, sergančių SRV, aukštas anti-SS-A titras nėštumo metu gali lemti nėštumo „lupus“ sindromą, dėl kurio kūdikis turės visišką artrioventrikulinę blokadą, tai ypač būdinga, jei besilaukiančios kraujyje aptinkama ir anti-SS-A ir anti-SS-B, tačiau SRV pacientams šie antikūnai nebūtinai aptinkami kartu [9]. Anti-SS-A yra ir odos vilkligės priežastis [49]. Antikūnų prieš Sm randama tik 20% sergančiųjų SRV, tačiau jų buvimas yra svarbus serologinis žymuo [56]. Antikūnai prieš RNP esti maždaug 35% sergančiųjų SRV [9,14]. Sergančioms SRV moterims anti-RNP gali pereiti placentą ir sukelti vaisiaus mirtį ar įgimtą naujagimių SRV. Antikūnų prieš SS-A ir RNP derinys sergančiųjų SRV serume, gali būti žymuo, rodantis avaskulinę kaulo nekrozę [15]. Nustatyta, jog sergant SRV, nukleosomos yra didžiausi aptinkami autoantigenai, o antinukleosominiai antikūnai yra specifiški šiai ligai [11]. IgG3 izotipo antinukleosominiai antikūnai gali būti naudojami kaip atrankinis žymuo esant aktyviai ligos stadijai, taip pat esant lupus nefritui [3]. Nukleosominiai antikūnai susiję su inkstų pakenkimu ir yra naudingi ligos aktyvumo nustatymui, ypač anti ds- DNR neigiamiems pacientams [24]. Sergant SRV, ANA jautrumas siekia 93%, o specifiskumas 57% [63]. Nustatyta, kad audinius žalojantys antikūnai prieš nuosavas antigenines struktūras, produkuojami dėl oligokloninių ląstelių atsako. Iširta, kad lupus pacientų periferinio kraujo T limfocitai indukuoja B limfocitus sekretuoti ds-DNR antikūnus in vitro. Tokie anti-ds-DNR yra katijoniniai ir aptinkami inkstų glomerulų membranose, kadangi atakuoja anijonines glomerulų sritis. Tuo tarpu antikūnai, produkuojami polikloniškai, aktyvuotų B limfocitų yra anijoniniai ir nepatogeniški. Pabrėžtina, jog pirminis veiksnys indukuojantis imuninį atsaką ir autoantikūnų gamybą yra T limfocitai (T helperiai) [56]. T ir B limfocitų aktyvaciją gali sukelti cheminės medžiagos, bakterijų DNR ir kt. Aplinkos ir nuosavi antigenai yra apdorojami APL arba sujungiami su B limfocitų indukuotais paviršiaus antigenais. B limfocitai ir APL „perdirba“ antigeną į peptidą ir pateikia T limfocitams per jų paviršiaus ŽLA molekules. Taip suaktyvinti T limfocitai stimuliuoja B limfocitus autoantikūnų gamybai. IL-10 (Th2) skatina B limfocitų proliferaciją ir diferenciaciją [49].

Yra duomenų, jog nukleosomoms specifiniai T limfocitai, taip pat dalyvauja B limfocitų brendime, bei skatina IgG gamybą [11]. Autoantikūnų sintezė SRV metu, aktyvuojama sąveikos tarp CD⁴⁺ ir CD⁸⁺ T helperių ir B limfocitų [49]. Uždegiminių citokinų IL-12, IL-17 ir IL-18 pagausėjimas gali išprovokuoti uždegiminį procesą vystantis SRV, o citokinų IL-18/IL-4 santykio pokytis, palaiko citokinų pasiskirstymo disbalansą, reikalingą uždegiminių atsakui [73].

Jei pacientas neserga SRV, tačiau jo kraujo serume aptikta antikūnų prieš ds-DNR, įrodyta, jog kliniškai liga gali pasireikšti per 5 metus, nuo pirmojo antikūnų identifikavimo [58]. Klinikinės remisijos metu B limfocitai taip pat gamina autoantikūnus, tačiau autoantikūnų kiekis yra sumažėjęs, palyginus su aktyvia ligos stadija [30]. Tačiau, nustatyta, kad antikūnų prieš branduolio antigenus koncentracija, sergant SRV, nevisuomet koreliuoja su ligos aktyvumu [2]. Autoantikūnų persistencija, SRV sergantiems pacientams, patvirtina autoreaktyvios humoralinės atminties buvimą, tačiau dar nenustatytas autoreaktyvių B limfocitų produkcijos dažnis SRV metu [10]. Nėra įrodymų, kad ANA įeinantys į imuninio komplekso sudėtį gali penetruoti į sveikas ląsteles, bet esant atidengtam branduoliui ANA gali prisijungti prie jo. Audiniuose pažeistų ląstelių branduoliai sąveikauja su ANA, praranda chromatiną, tampa homogeniški ir ima formuotis LE ląstelės [56]. LE ląstelės – tai polimorfonukleariniai leukocitai, fagocitavę kitos ląstelės pakitusį branduolį. Šis tyrimas esti teigiamas 50-70% sergančiųjų SRV, kai ligos stadija vėlyva. Tačiau dėl tyrimo trūkumų, kasdienėje praktikoje jį pakeičia ANA ir ENA tyrimai [5].

1.3.2. ANA antikūnų reikšmė Sjogreno sindromo diagnostikoje

Sjogreno sindromas – tai autoimuninis epitelitas, kuriam būdingas „sausasis“ sindromas bei sisteminis organizmo pažeidimas (pvz: plaučių, inkstų, kraujagyslių) [47]. Sindromas pasireiškia keratokonjuktyvitu bei kserostomija dėl ašarų bei seilių liaukų irimo. Tai sąlygoja limfocitų infiltracija bei fibrozė seilių ir ašarų liaukose. Infiltratą sudaro CD⁴⁺ T limfocitai, nedidelis kiekis B limfocitų, taip pat plazminės ląstelės, vietiškai sekretuojančios antikūnus. ANA, sergant Sjogreno sindromu, aptinkama

50 – 80% pacientų. Patys svarbiausi yra antikūnai prieš nukleoplazminius antigenus: SS-A (Ro) ir SS-B (La), kurie nustatomi daugiau nei 90% atvejų [56]. Apskritai, tiek anti-SS-A tiek anti-SS-B pasižymi bendrais bruožais: fotosensibilizacija yra pats ryškiausias kliniškinis simptomas sietinas su šiais antikūnais, be to gali būti psoriazinis arba žiedinis bėrimas [14]. Seilių liaukų limfoidinių infiltratų tyrimais, nustatyta aktyvi ŽLA-DR ekspresija ascinusų ir latakėlių epitelio ląstelėse, o tai įrodo kad jos gali veikti kaip APL ir sąveikauti su CD⁴⁺ T limfocitais. Ši epitelinių ląstelių ir T limfocitų sąveika turi įtakos tolimesnei citokinų ir chemokinų produkcijai ir B limfocitų proliferacijos stimuliacijai. Kiti autoimuninio uždegimo veiksniai taip pat įsijungia į šį procesą, trikdydami ląstelių funkcijas [68].

Sergant Sjogreno sindromu, bei kartu esant reumatoidiniam artritui ar mišriai jungiamojo audinio ligai, autoantikūnų SS-A (Ro) bei SS-B (La) paplitimo dažnis yra mažesnis. Antikūnų SS-A dažniau randama sergantiems pirminiu Sjogreno sindromu, o antikūnų SS-B nors ir nedideliais kiekiais, randama sergantiesiems kartu ir Sjogreno sindromu ir sisteminė skleroze [47]. Beveik 10% sergančiųjų, antinuklearinių antikūnų tyrimas yra neigiamas, tokiems pacientams būdingas švelnesnis liaukų bei kitų sistemų pažeidimas, gydymui reikalingos mažesnės kortikosteroidų dozės. Ne liaukiniuose audiniuose kitų pokyčių, išskyrus leukopeniją, būdingą tik teigiamam ANA/anti-ENA titrui, nepastebėta [20]. Tuo tarpu autoantikūnų prieš SS-A (Ro) bei prieš SS-B (La) buvimas lemia greitesnį ligos progresavimą, ilgesnį ligos laiką, žymesnį seilių liaukų pažeidimą ir padidėjimą, aktyvesnę limfocitų infiltraciją mažosiose seilių liaukose. Taip pat nustatyti B limfocitų epitopai baltyminėse 60kDa SS-A, 52kDa SS-A, 40kDa SS-B dalyse [43]. Autoantikūnai prieš SS-B (La), besijungiantys su keturiais peptidais, kilusiais iš La sekos, aptinkami pacientų, sergančių pirminiu Sjogreno sindromu, kraujyje. Autoantikūnai prieš SS-B epitopą *p349-364aa* taip pat lemia sunkesnę ligos eigą bei didesnę seilių ir ašarų liaukų destrukciją. Manoma, tai sąlygoja ŽLA-DQ heterodimeras [64]. Dauginiai epitopai lemia antigenų inicijuojamą imuninį atsaką, todėl daroma išvada jog antigenai yra svarbūs autoimuninių reakcijų palaikymui ir inicijavimui [31]. Esant Sjogreno sindromui ANA jautrumas yra 48%, specifiškumas - 52% [63].

1.3.3. ANA antikūnų reikšmė sisteminės sklerodermijos diagnostikoje

Sisteminė sklerodermija (SS) yra heterogeninė autoimuninė reumatinė liga, pasireiškianti odos bei atskirų organų fibroze [52]. Sisteminė sklerodermija gali būti ribota ir gali būti difuzinė. Lietuvoje serga apytiksliai 1 iš 10000 gyventojų [68]. Transformuojantis augimo faktorius – beta (TGF-beta) yra pagrindinis veiksnys, lemiantis įvairius fibrozinius sutrikimus. Jungiamojo audinio augimo faktorius (CTGF) taipogi svarbus sisteminės sklerodermijos patogenezėi; serumo CTGF koncentracija labai koreliuoja su odos skleroze ir plaučių fibroze [34].

Visiems pacientams būdingi antikūnai prieš įvairias branduolio antigenines struktūras, - tačiau būdingiausi antikūnai yra prieš Scl-70, prieš DNR topoizomerazę ir antikūnai prieš centromerų antigenus. Antikūnai prieš Scl-70 būdingi 28–70% pacientų, sergančių difuzine sisteminė sklerodermija. Pacientai, kuriems nustatomi autoantikūnai prieš Scl-70, dažniau serga plautine fibroze ir periferinių kraujagyslių ligomis [56], būdingas ryškesnis raumenų pažeidimas, vaikų amžiuje lengvesnė ligos eiga, o suaugusiems gali būti inkstų pažeidimas [68]. Antikūnai prieš centromerų antigenus, aptinkami 22 – 36% sergančiųjų [56]. Anticentromeriniai antikūnai labiau susiję su ribota SS [25], jie lemia izoliuotą plaučių hipertenziją ribotos SS metu, kartais - virškinimo sistemos pakenkimą [68]. Labai retai šie du antikūnų tipai aptinkami kartu [56]. Antikūnai prieš centromerines struktūras yra ypač būdingi ir CREST sindromui, net 96% ligonių [52]. CREST sindromas pasireiškia kalcinoze, Reino fenomenu, esofagine dismotilija, sklerodaktilija [9]. 25% pacientų būdingi anticentromeriniai antikūnai, sergantiems izoliuotu Reino sindromu [14]. Aukštas anticentromerinių antikūnų titras yra siejamas su CREST sindromu, o konkurencija su kitais ligos žymenimis, lemia ANA sąlygojamų klinikinių požymių vystymąsi, pvz: persidengimo sindromą [48].

Trečdaliui sisteminė sklerodermija sergančių pacientų, būdingi antikūnai prieš RNR polimerazę III [52]. Antikūnai prieš topoizomerazę I, labiau asocijuoti su difuzine sisteminė sklerodermija [25]. Sergant sisteminė sklerodermija ar ligomis, turinčiomis šiai ligai būdingų požymių, aptinkama ir antikūnų prieš nukleolarinius antigenus [14]. Anti-Ku antikūnai plačiai aptinkami sergant jungiamojo audinio ligomis, tame tarpe, sergant persidengimo sindromu su sisteminė sklerodermija ir miozitu.

Reino fenomenas, raumenų bei sąnarių pažeidimai yra dažniausi klinikiniai požymiai, siejami su anti Ku [21]. Antikūnai prieš SS-B būdingi 5% sklerodermija sergančių pacientų [9]. Esant SS, ANA jautrumas yra 85%, specifiškumas 54% [63]. Autoantikūnai gali turėti ir tiesioginį citotoksinį poveikį, nes gali patekti į ląstelės vidų. Antikūnai prieš centromeras, patekę į vidų, gali sutrikdyti mitozę ir sukelti chromosomų aberacijas. SS būdingas ir molekulinės mimikrijos reiškinys, kai antigeno epitopas, esantis taikiniu tam tikriems autoantikūnams, yra panašus su viruso dalelėmis, todėl neatmetama ir virusinė SS kilmė [68]. Oksidacinis stresas taip pat yra svarbus patogenezės veiksnys. Įrodyta, jog RNR polimerazės ir topoizomerazės gali atsirasti dėl sunkių metalų poveikio, jei kartu yra ir tam tikras ŽLA haplotipas, o autoantikūnus gali inicijuoti autoantigeno fragmentacija, veikiama hipoksijos [68].

1.3.4. ANA antikūnai mišrios jungiamojo audinio ligos diagnostikoje

Mišri jungiamojo audinio liga (MJAL) priklauso persidengiančių sindromų grupei. Persidengiantys sindromai suprantami kaip būklės, kai ligos klinikiniame vaizde vyrauja daugiau nei vienai jungiamojo audinio ligai būdingi bruožai [68]. MJAL pasireiškia sklerodermijos, SRV ir polimiozito požymiais [9,14]. Skirtingų ligų klinikiniai simptomai yra ne tik susieti tarpusavyje, bet juos vienija ir tam tikri antikūnai, randami sergančiųjų kraujyje [68]. MJAL metu, vykstant sąveikai tarp įgimtos ir įgytos imuninio atsako sistemų, rezultate išsivysto autoimuninis susirgimas. Antigeninių struktūrų modifikacija apoptozės metu ar nuosavų antigenų pokyčiai lemia autoantigenų inicijuojamą imuninį atsaką ir įgimtos imuninės sistemos suaktyvinimą; IgG klasės imunoglobulinų (autoantikūnų) prieš splaisosomos komponentus gamybą, B limfocitų aktyvaciją, CD⁴⁺ ir CD⁸⁺ T limfocitų pasirodymą [27].

Serologiškai būdingas aukštas antikūnų prieš RNP titras, ypač prieš U1-RNP [56]. Manoma, kad antikūnai U1-RNP dalyvauja MJAL vystymesi ir yra svarbus veiksnys žalojant audinius, kadangi; antigenų sukeltas atsakas susilpnina potencialiai imunogeniškų autoantigenų žūtį. T ir B limfocitai neadekvačiai toleruoja RNR autoantigenus. Atakuojamų ribonukleoproteinų RNP komponentai turi imunogeninių

savybių [23]. Antikūnai prieš RNP yra diagnostinis mišrios jungiamojo audinio ligos kriterijus. Šie antikūnai yra neabejotinai susiję su Reino sindromu [15], ypač antikūnai prieš U1-RNP [22], taip pat su artritu, miozitu bei sklerodaktilija [15]. Kartais kraujyje randami tik autoantikūnai, o ligos klinikinių požymių nebūna. Tačiau pacientai, kuriems randami U1-RNP autoantikūnai, nebūtinai serga šia liga. Maždaug 50% nesuserga jokia autoimunine liga per keliolikos metų stebėjimo laikotarpį, tačiau dideli šių autoantikūnų titrai koreliuoja su didesne tikimybe atsirasti MJAL [68]. Reino fenomenas pasitaiko daugumai sergančiųjų mišria jungiamojo audinio liga, ir dažnai pasireiškia MJAL pradžioje. Reino fenomenas pasireiškia kaip sisteminė vaskulopatija, kuriai būdinga kraujagyslių intimos fibrozė ir sklerozė, iš dalies siejamas su plautine hipertenzija [22]. Esant Reino fenomenui ANA jautrumas siekia 64%, specifškumas - 41% [63]. Kaip jau minėta, MJAL priklauso persidengiančių sindromų grupei, sindromams būdingi specifiniai, su konkrečiu sindromu, susiję antikūnai, kurie leidžia šiuos sindromus traktuoti kaip atskirą reumatinių ligų grupę. Polimiozitu – intersticinei plaučių ligai – Reino fenomenui, būdingi antikūnai prieš Jo- 1. Sisteminei sklerozei – polimiozitu būdingi antikūnai prieš PM-Scl, Ku, U2 RNP [68].

1.3.5. ANA antikūnai polimiozito diagnostikoje

Polimiozitas – tai autoimuninės kilmės reumatinė sisteminė uždegiminė raumenų (skersaruožių, lygiųjų, širdies raumens) liga, sukianti raumenų skaidulų lizę, kurios pasekmė – raumeninio audinio sunykimas ir peraugimas jungiamuoju bei riebaliniu audiniu. Jeigu šalia raumenų destruktijos yra stebimas ir odos pakenkimas, šiai ligai įvardinti yra vartojamas dermatomiozito terminas [68]. Polimiozitu būdingas raumenų silpnumas ir uždegiminis infiltratas raumenyse. Nustatyta, jog polimiozitas yra CD⁸⁺ T ląstelių provokuojamas susirgimas [7]. Polimiozitas diagnozuojamas esant padidėjusiai antikūnų prieš Jo-1 antigenus, koncentracijai [56]. Ištirta, kad sergant miozitu, intersticinės plaučių ligos vystymąsi įtakoja padidėjusi anti-SS-A ir anti-Jo-1 antikūnų koncentracija. Esant teigiamai anti-SS-A koncentracijai didėja ir fibrozės rizika [65]. Antikūnai prieš SS-A nustatomi apytiksliai 5% polimiozito pacientų [15]. Skleroderminio polimiozito (persidengiantis) sindromas yra asocijuotas su autoantikūnų, tokių kaip anti-

PM-Scl, anti-Ku pasirodymu, kurie susiję su vakuolių formavimusi branduoliniuose ir citoplazminiuose raumenų filamentuose [29]. Esant polimiozitiui, ANA jautrumas siekia 61%, specifiškumas - 63% [63].

1.3.6. ANA autoantikūnai reumatoidinio artrito diagnostikoje.

Reumatoidinis artritas (RA) yra autoimuninė liga, susijusi su generalizuotais imuninės sistemos funkcijos sutrikimais. Ligonio, sergančio RA, kraujo serume galima nustatyti plataus spektro laisvai cirkuliuojančių autoantikūnų ir reumatoidinį faktorių (RF) prieš įvairius struktūrinius audinių ląstelių komponentus [37]. Esant RA, ANA jautrumas siekia 41%, o specifiškumas 56% [63]. Sergant RA, aptinkami antikūnai prieš histonų, SS-A, SS-B, ds-DNR antigenus [10]. Anti-Ro nustatomas, ypač jei pacientas paraleliai serga antriniu Sjogreno sindromu [61]. Antikūnai prieš SS-A nustatomi apytiksliai 5% reumatoidinio artrito atvejų [15]. Palyginus anti-Ro teigiamus ir anti-Ro neigiamus reumatoidinio artrito pacientus, žymių skirtumų nebuvo aptikta [57]. Anti-ds-DNR taip pat pasitaiko, nors ir retais atvejais. Įdomu, jog gydant RA infliksimabu, stebimas antinuklearinių antikūnų koncentracijos didėjimas (arba ANA atsiranda naujai), taip pat nustatyta suaktyvėjusi IgM tipo ds-DNR antikūnų produkcija [61]. Remiantis Lietuvos populiacijoje atliktais tyrimais, sergantiems reumatoidiniu artritu, serologiniai žymenys: AKA, ANCA ir IgA RF stipriai koreliavo su ligos aktyvumu ir lėmė tam tikrų funkcijų susilpnėjimą, - tuo tarpu ANA koreliacijos nenustatyta [67].

1.4. Uždegimo žymenys sisteminių jungiamojo audinio ligų diagnostikoje

Ūmios fazės žymenys ENG ir CRP daugelio reumatinių ligų atvejų yra nespecifiški ir mažai jautrūs. Jie naudingi nustatant uždegiminio proceso eigą ir sunkumą, kuris gali lemti tam tikrą sisteminę jungiamojo audinio ligą [13].

ENG: ENG visų pirma taikomas uždegiminių, tame tarpe reumatinių ligų atrankai, ypač kai pacientas turi neaiškių bendro pobūdžio nusiskundimų. Šis tyrimas ypač vertingas reumatoidinio artrito diagnostikai ir aktyvumo vertinimui [42].

Nežymus, saikingas ir žymus ENG kiekio padidėjimas stipriai koreliuoja su SRV aktyvumu. Saikingas ir žymus ENG pokytis taipogi siejamas su didesniais jungiamojo audinio pažeidimais ir labiau koreliuoja su organų ir audinių pažeidimų sunkumu nei anti-ds-DNR antikūnai, sergant SRV [70]. Vienas labiausiai ištirtų ENG padidėjimo mechanizmų – tai ūmios uždegimo fazės baltymų koncentracijos padidėjimas plazmoje. Viena ši procesą sukeliančių priežasčių – autoimuniniai veiksniai, kurių metu vyksta aktyvi fagocitozė, jos metu makrofagai išskiria signalą perduodančias molekules ir citokinus, ypač IL-6, jis kepenų ląstelėse sukelia ūmios fazės baltymų, ypač CRB sintezę, skatina neutrofilų gamybą ir leukocitozę [42]. ENG trūkumas – tas, jog sveikstant šis rodiklis gali būti padidėjęs keletą savaičių po klinikinių tyrimų normalizavimosi [74].

CRB: sintetinamas kepenyse; jo sintezę skatina antigenai, imuniniai kompleksai, bakterijos ir kt. Gerai koreliuoja su ENG, tačiau CRB pokyčiai greitesni. CRB kiekį svarbu nustatyti vertinant RA, SRV, vaskulitų klinikinę eigą. Reumatinių ligų gydyme taikomi steroidiniai ir nesteroidiniai priešuždegiminiai vaistai sumažina CRB koncentraciją. Todėl klinikiniam vertinimui CRB yra vienas tinkamiausių žymenų. Rekomenduojama reikšmė kraujo serume: $\leq 5\text{mg/l}$ [39]. Kuomet SRV yra aktyvioje stadijoje, infekcija yra dažna ligos komplikacija, nes imunosupresinė terapija gydant steroidiniais vaistais, sudaro palankias sąlygas infekcijai. SRV ir infekcija pasireiškia paraleliai, - būtent infekcinio proceso metu CRB padidėja $>60\text{mg/l}$, tuo tarpu esant SRV recidyvui CRB koncentracija yra $<20\text{mg/l}$. Tokiu būdu galima nustatyti aktyvią ligos eigą, diferencijuojant infekciją ir recidyvą [12]. Sergant sisteminė raudonąja vilklige, esant inkstų pažeidimui CRB aptinkamas šlapime, tuo pat metu stebint CRB padidėjimą kraujo serume. SRV pacientams nenustatyta koreliacija tarp serumo CRB ir serumo IL-6 [71]. CRB pokyčiai yra daug ankstyvesni nei ENG: ankstyvos manifestacijos stebimos per pirmas 4 valandas nuo uždegimo (traumos) pradžios, pikas stebimas 24 -72 valandomis [13].

RF: Reumatoidinis faktorius – autoantikūnai nustatyti 1940 metais, reumatoidinio artrito pacientų kraujo serume. RF antikūnai dažniausiai yra IgM klasės, specifiskai besijungiantys prie IgG molekulės Fc fragmento ir aktyvinantys komplementą [35].

B limfocitai (plazminės ląstelės) – uždegiminėje sinovijoje aptinkamos ląstelės, sergant RA, sekretuoja reumatoidinį faktorių RF, kuris formuoja imuninius kompleksus, svarbius

komplemento fiksacijai, neutrofilų aktyvacijai ir uždegimo indukavimui [68]. CD^{4+} T limfocitai yra svarbūs B limfocitui brendimui ir virsmui į plazmines ląsteles, sekretuojančias RF, tačiau CD^{4+} T limfocitai nėra aktyvūs esant įsisenėjusiam RA, tuo tarpu IL-6 yra potencialus stimulus B limfocitams virstant plazminėmis ląstelėmis [60]. RA sergančių pacientų kraujyje RF jungiasi IgG molekulių poklasiais. IgG molekulėje yra pastoviojo regiono domenai Cq1, Cq2, Cq3, iš kurių Cq2, Cq3 domenuose yra mažiausiai septynios sritys, kuriose jungiasi RF [62].

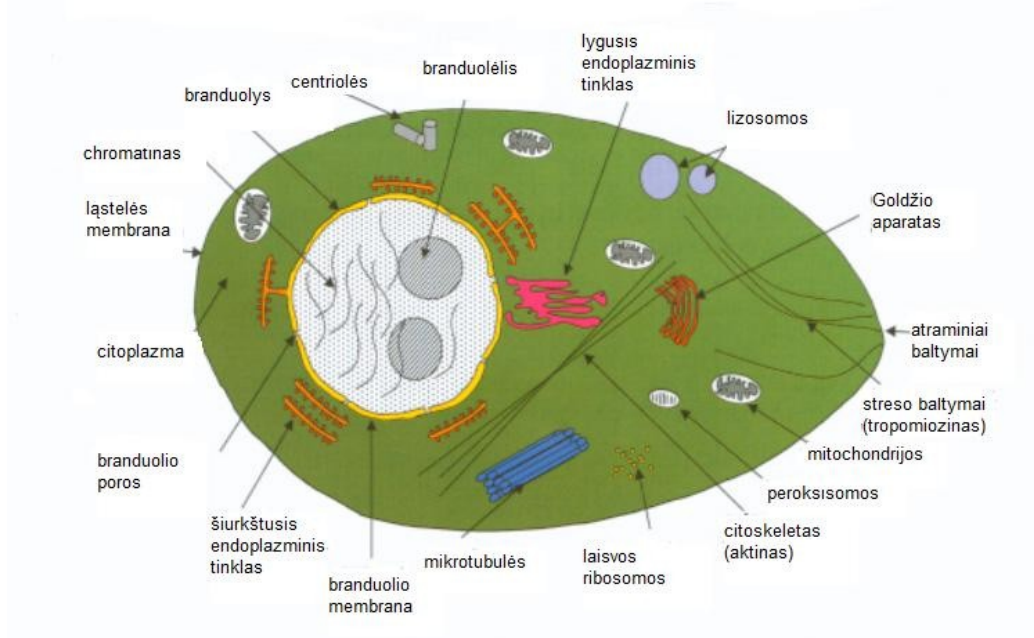
2.TYRIMŲ METODIKA

Tyrimai atlikti Vilniaus Universiteto Santariškių klinikų, Laboratorinės diagnostikos centro, klinikinės imunologijos laboratorijoje, 2008 -2009 metais. Tyrimai siekiant nustatyti antikūnus prieš branduolio ir ekstrahuojamus branduolio antigenus (ANA ir ENA) atlikti pacientams, besigydžiusiems Vilniaus Universiteto Santariškių klinikų reumatologijos skyriuje. Tiriamoji medžiaga - kraujo serumas.

2.1. Diagnostiniai ANA/ENA tyrimai

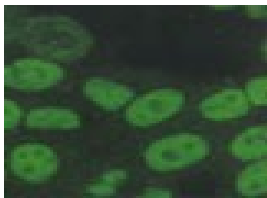
Netiesioginio imunofluorescencijos (NIF) metodo taikymo metu, vyksta reakcija tarp antigenų esančių, substratinėse Hep-2 ląstelėse, kuriomis padengiami tyrimui naudojami objektiniai stikleliai ir tiriamojo kraujo serume esančių, antigenui specifinių antikūnų [6]. Neprisitvirtinę antikūnai yra pašalinami nuskalaujant stiklelį. Prisitvirtinę IgG klasės antikūnai aptinkami pridėdant fluorescenciškai žymėtų monokloninių antikūnų prieš žmogaus imunoglobulinus. Reakcija stebima fluorescenciniu mikroskopu, turinčiu atitinkamus filtrus. Esant teigiamam rezultatui stebimas obuolio žalumo švytėjimas. Titrai nustatomi testuojant serijiniais praskiedimais. NIF tyrime naudojamų substratinių Hep-2 ląstelių branduolio struktūros geriausiai diferencijuojamos interfazės metu, kadangi šioje fazėje ląstelės yra didžiausios, o branduoliai yra labiausiai ryškūs (1pav). Pagal tai, koks antigenas įeina į antigeno - antikūno kompleksą, netiesioginės imunofluorescencijos (NIF) metodu, nustatomi skirtingi švytėjimo tipai – homogeninis, grūdėtasis, nukleoliarinis ir centromerinis. Esant homogeniniam švytėjimo tipui būdingi antikūnai prieš su chromatinu asocijuotus antigenus: denatūruota vienspiralė DNR (vs-DNR) , dvispiralė natyvine DNR (ds-DNR) ir histonus. Grūdėtasis švytėjimo tipas būdingas antikūnais prieš nukleoplazminius antigenus: SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, RNP, Scl – 70. Nukleoliariniam švytėjimo tipui būdingi antikūnai prieš branduolėlių antigenus: nukleolinas, Ku. Centromerinis švytėjimo tipas lemia antikūnus prieš centromerų

antigenus: centromerų baltymus [14]. Kai kuriais atvejais matomas kelių antigenų švytėjimas viename pavyzdyje [9].

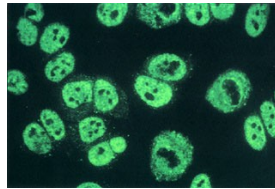


1 pav. ląstelė interfazės metu

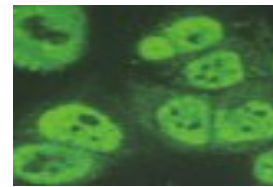
Grūdėtasis švytėjimo tipas: nustatomi autoantikūnai prieš nukleoplazminius antigenus:



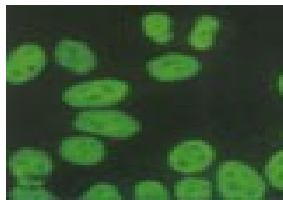
anti - U1-snRNP



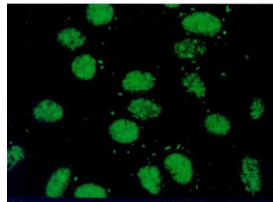
anti - Sm



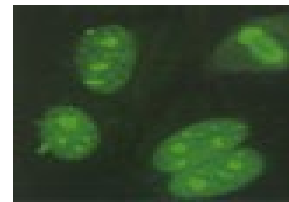
anti - SS-A (Ro)



anti-SS-B (La)

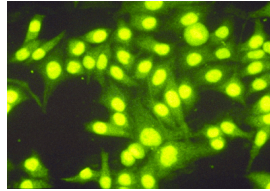


anti- SS-A/SS-B

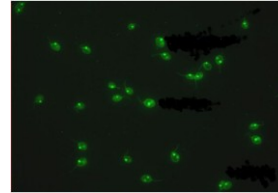


anti- Scl -70

Homogeninis švytėjimo tipas: antikūnai prieš su chromatinu asocijuotus antigenus:

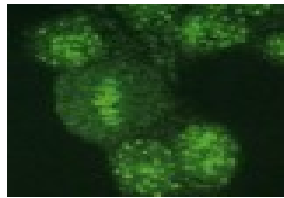


anti - vs -DNR

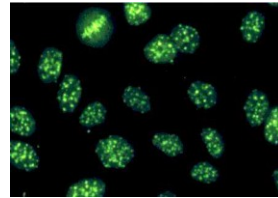


anti - ds -DNR

Centromerinis švytėjimo tipas: antikūnai prieš centromerų antigenus:

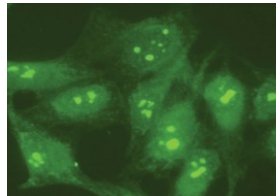


anti - CENP-B



anti - centromeros

Nukleoliarinis švytėjimo tipas: antikūnai prieš branduolėlių antigenus:



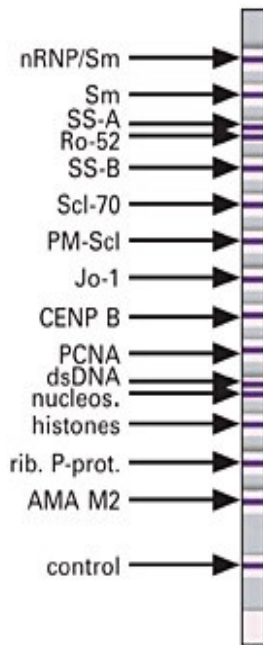
anti – nukleosomos

Pastebėtina, kad tas pats kraujo serumas, skirtingai praskiestas, gali lemti skirtingo tipo švytėjimą, kelios autoantikūnų grupės gali būti tame pačiame kraujo serume, todėl tolimesniam ANA diferencijavimui išlieka svarbūs detalūs imunofermentiniai ar imunobloto metodai [36].

Imunobloto metodas ENA nustatymui. Tyrimo principas: atliekama kokybinė reakcija IgG klasės autoantikūnams aptikti prieš 14 skirtingų autoantigenų: nRNP, Sm, SS-A (SS-A natyviniis ir Ro-52), SS-B, Scl -70, PM-Scl, CENP-B, PCNA, ds-DNR, nukleosomas, histonus, ribosomų P baltymus ir AMA-M2 kraujo serume ar plazmoje. Tyrimui naudojamos juostelės yra padengtos aukšto grynumo antigenų paralelinėmis linijomis, išdiferencijuotomis pagal antigenų molekulinę masę.

Pirmiausiai juostelės yra sudrėkinamos ir pirmame reakcijos etape inkubuojamos su paciento kraujo serumu. Jei mėginiai yra teigiami, tuomet specifiški IgG klasės antikūnai (IgM ir IgA taip pat) susiriša su atitinkamu antigeno laukeliu. Surištų antikūnų aptikimui, antrajame reakcijos etape yra atliekama inkubacija su fermentu žymėtais monokloniniais antikūnais prieš žmogaus imunoglobulinius (fermento konjugatu), tai vėliau sukelia spalvinę reakciją, kurios intensyvumas proporcingas tiriamojo kraujo serume esamų antikūnų kiekiui. Imunobloto tyrimas yra jautrus ir specifiškas tyrimas [36].

2 pav. Imunobloto metodas: antigenų pagal molekulinę masę išdiferencijavimas juostelėje.



2.2 Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta taikant kompiuterinės statistikos SPSS-17 ir Microsoft EXEL 2003 programas. Tolydūs dydžiai išreikšti procentine verte, skaičiuojant vidurkius, medianines reikšmes ir standartinius nuokrypius, o lyginti pagal Studento *t* kriterijų. Skirtumai yra statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

3.TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

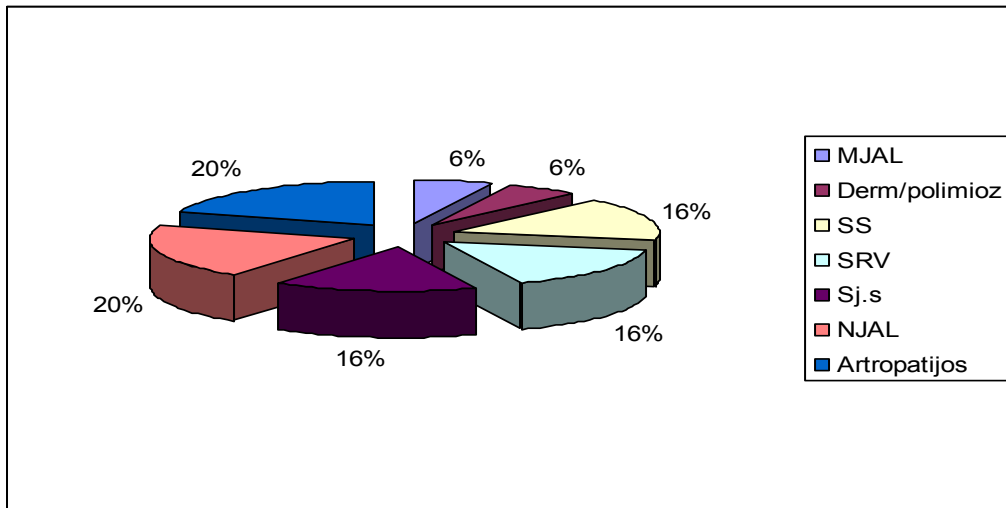
3.1. Tyrimo rezultatai

3.1.1. Pacientų charakteristikos

Tiriamąją grupę sudaro 50 asmenų, 2008 - 2009 metais besigydžių Vilniaus Universiteto ligoninės Santariškių klinikų reumatologijos skyriuje, kurių kraujo serume buvo aptiktas bent vienas antikūnų prieš branduolio antigenus (ANA) ir/ar ekstrahuojamus branduolio antigenus (ENA) žymuo.

Tiriamajoje grupėje buvo 47 (94%) moterys ir 3 vyrai (6%), tiriamųjų amžiaus vidurkis $51,3 \pm 39,1$, [Min/Max 20-82]. Sergantiesiems taip pat buvo tirti uždegiminiai žymenys – (ENG, CRB, RF).

Pacientų pasiskirstymas pagal diagnozę, pavaizduotas 1 paveiksle.



1 pav. Tiriamųjų grupės (n=50), procentinis pasiskirstymas pagal SJAL

MJAL – mišri jungiamojo audinio liga,

Derm/polimioz – dermatomiozitas/polimiozitas

SS – sisteminė sklerodermija,

SRV – sisteminė raudonoji vilkligė,

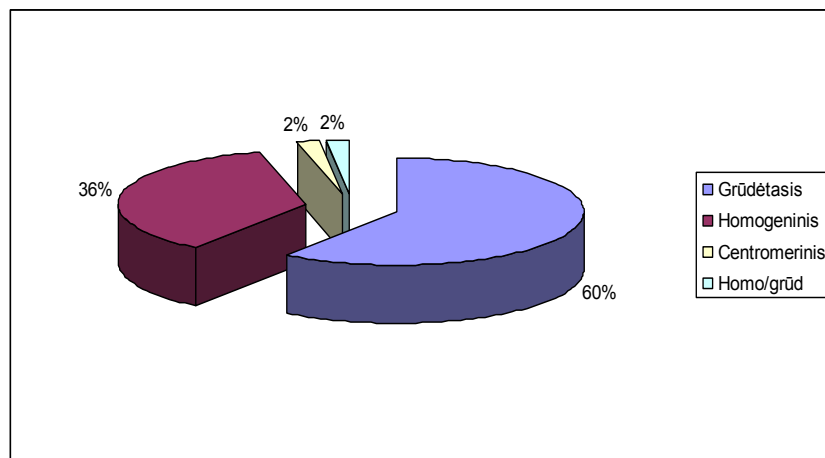
Sj.s. – Sjogreno sindromas,

NJAL – nediferencijuota jungiamojo audinio liga,

Didžiausias grupes sudaro NJAL (n=10) ir artropatijomis (n=10) sergantys pacientai. SRV, sisteminė sklerodermija ir Sjogreno sindromu sergantieji, pasiskirto vienodu pacientų skaičiumi (n=8). MJAL ir dermatomiozitu/polimiozitu serga po 3 pacientus.

3.1.2. ANA ir ENA paplitimas pacientams, sergantiems sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis

Pagal tai koks antigenas įeina į antikūno – antigeno kompleksą, netiesioginės imunofluorescencijos (NIF) metodu visiems pacientams nustatytas ANA antikūnų švytėjimo tipas. 2 paveiksle pavaizduotas procentinis pacientų pasiskirstymas, pagal nustatytą švytėjimo tipą.



2 pav. NIF metodu nustatyto ANA švytėjimo tipo pasiskirstymas (%)

60% (n=30) pacientų nustatytas grūdėtasis švytėjimo tipas, 36% (n=18) pacientų – homogeninis švytėjimo tipas, 2% (n=1) sergančiųjų – centromerinis švytėjimo tipas, bei 2% (n=1) pacientų – grūdėtasis/homogeninis švytėjimo tipas. Tiriamųjų grupėje nukleoliarinis švytėjimo tipas nebuvo nustatytas.

Buvo analizuojamas ANA švytėjimo tipo ir patvirtintos diagnozės ryšys, rezultatai pateikti 1 lentelėje.

1 LENTELĖ: ANA švytėjimo tipo priklausomybė pagal diagnozę

Diagnozė	Homogeninis švytėjimo tipas%	Grūdėtasis švytėjimo tipas%
NJAL	40	50
Artropatijos	60	40
SRV	50	50
SS	12,5	75
Sjogreno sindromas	12,5	75
MJAL	66,6	33,3
Derm/polimiozitas	-	100

Esant homogeniniam švytėjimo tipui, vyraujantis jungiamojo audinio susirgimas yra MJAL, įvairios artropatijos ir SRV. Mažiausiai šiam tipui būdinga sisteminė sklerodermija ir Sjogreno sindromas.

Esant grūdėtajam švytėjimo tipui dominuoja Sjogreno sindromas ir sisteminė sklerodermija. Dermatomiozitas/polimiozitas išimtinai būdingas tik grūdėtajam tipui. Artropatijos ir NJAL vidutiniškai, o MJAL yra mažiausiai būdinga grūdėtajam švytėjimo tipui.

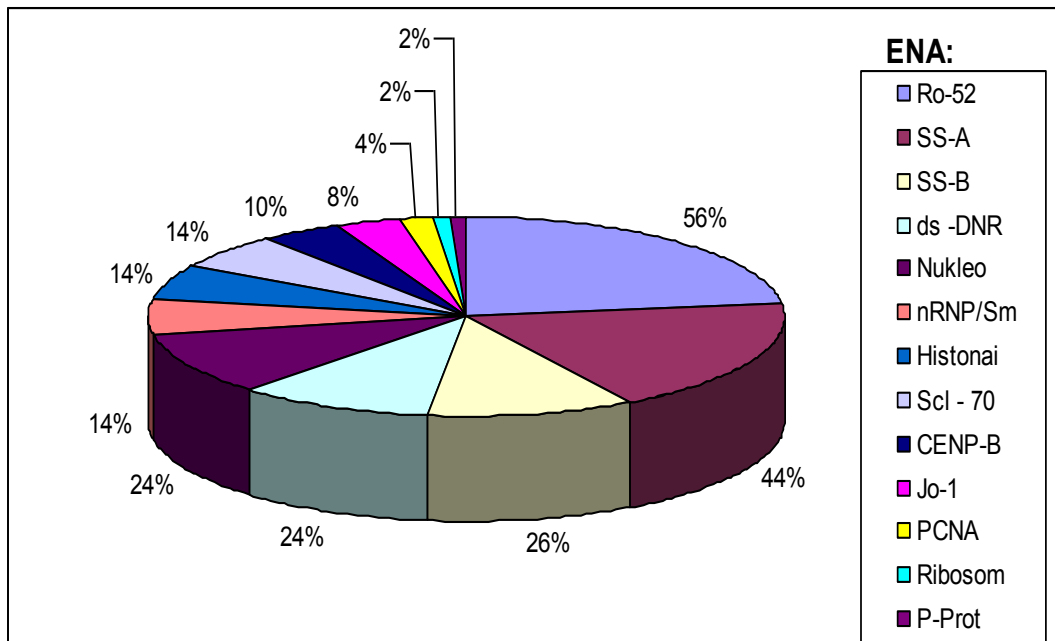
SRV vienodai būdinga tiek homogeniniam, tiek grūdėtajam tipui.

2% centromerinio švytėjimo tipo pacientų patvirtinta NJAL diagnozė ir 2% mišraus – homogeninio/švytėjimo pacientų nustatytas Sjogreno sindromas.

Grūdėtajam švytėjimo tipui būdingi antikūnai prieš Ro-52, SS-A, SS-B, nRNP/Sm, Scl-70 antigenus, o homogeniniam tipui - ds-DNR, histoniniai antikūnai [14]. Tačiau, kadangi netiesioginė imunofluorescencija (NIF) neparodo konkretaus autoantikūno, dalyvaujančio autoimuninėje reakcijoje, o tame pačiame kraujo serume gali būti kelios autoantikūnų grupės, gauti rezultatai visiems pacientams buvo patikslinti imunobloto metodu.

Imunobloto metodu buvo nustatyta 13 skirtingų antikūnų prieš branduolio antigenines struktūras: Ro-52, SS-A, SS-B, ds-DNR, nukleosomas, nRNP/Sm, Scl-70,

histonus, Jo-1, CENP-B, PCNA, P-Prot ir ribosomas. Jų paplitimas sisteminių jungiamojo audinio ligų pacientams, pavaizduotas 3 paveiksle.



3 pav. Antikūnų prieš ekstrahuotus branduolio antigenus paplitimas

Analizuojant 3 paveikslo duomenis matyti, jog dominuojantys antikūnai, sergant sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis yra anti Ro-52 ir anti SS-A. SS-B, ds-DNR ir nukleosominiai antikūnai yra vidutiniškai paplitę. Antikūnai prieš nRNP/Sm, Scl-70 ir histoninius antigenus paplitę vienodu procentu ir yra rečiau aptinkami. Jo-1, CENP-B ir PCNA antikūnai retai aptikti šioje, sisteminėmis jungiamojo audinio ligoms sergančių, pacientų grupėje. Rečiausiai nustatomi ribosominiai ir P-Prot antikūnai. Antikūnai prieš Ku antigenus tiriamiesiems nebuvo aptikti.

Taip pat buvo analizuojamas ir ENA paplitimas atskirose sisteminių jungiamojo audinio ligų grupėse.

ENA pasiskirstymas skirtingų, sisteminių jungiamojo audinio ligų metu, pavaizduotas 2 lentelėje.

2 LENTELĖ: ENA pasiskirstymas (%) sisteminių jungiamojo audinio ligų metu

Diagnozė: Serologinis žymuo	MJAL	Derm/polimiozitas	SS	Sj.s	SRV	NJAL	Artropatijos
Ro-52	66,6	66,6	62,5	62,5	62,5	70	20
SS-A	100	-	50	50	62,5	30	30
SS-B	66,6	-	37,5	37,5	37,5	10	10
ds-DNR	100	-	12,5	12,5	12,5	30	30
Nukleosomos	66,6	-	-	-	37,5	20	50
nRNP/Sm	66,6	-	12,5	12,5	12,5	-	20
Scl-70	33,3	-	50	12,5	-	-	10
Histonai	33,3	-	-	-	50	10	10
Jo-1	-	66,6	-	-	12,5	20	-
CENP-B	-	-	12,5	-	-	30	-
PCNA	-	-	-	-	-	10	10
P-Prot	-	-	-	-	-	-	10
Ribosomos	33,3	-	-	-	-	-	-

Gauti duomenys rodo, jog anti Ro-52 yra vienintelis žymuo aptinkamas visose sisteminių JA ligų grupėse.

SS-A, SS-B, ir ds-DNR antikūnai paplitę visose ligų grupėse išskyrus dermatomiozitu/polimiozitu sergančiuosius.

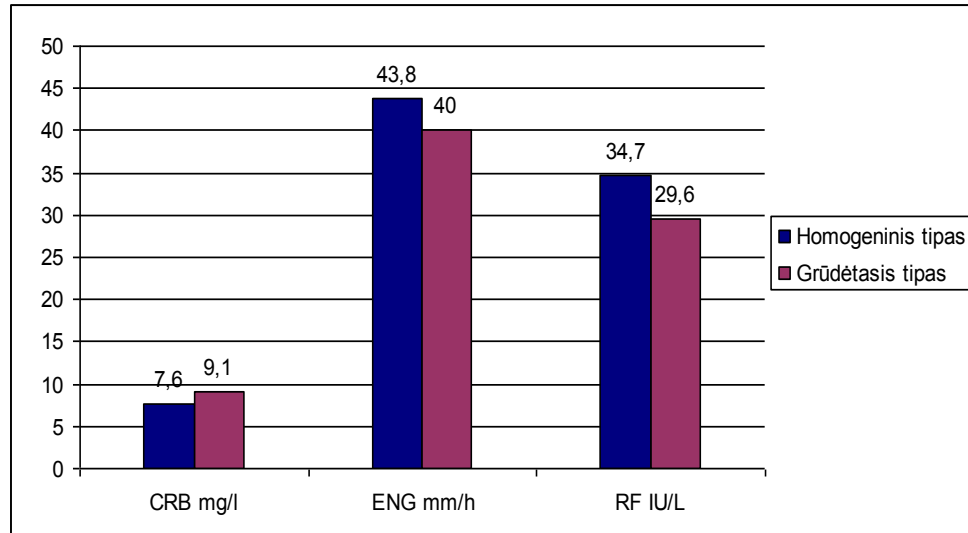
Nukleosominiai, nRNP/Sm, Scl-70 ir histoniniai antikūnai įvairiai paplitę sisteminių JA ligų metu.

Anti Ro-52 ir anti Jo-1 yra vieninteliai imunologiniai ENA žymenys nustatyti dermatomiozitu/polimiozitu sergančiųjų tarpe.

CENP-B, PCNA, P-Prot ir ribosominiai antikūnai mažai paplitę ir būdingi tik pavienėms ligoms.

3.1.3. Uždegiminių žymenų sąsaja su ANA ir ENA

4 paveikslas iliustruoja dažniausiai nustatomų homogeninio ir grūdėtojo švytėjimo tipo ryšį su uždegiminiais žymenimis.



4 pav. Uždegiminių rodiklių sąsaja su ANA

Analizuojant gautus rezultatus matyti, jog uždegiminių žymenų CRB, ENG ir RF koncentracijų pokyčiai esant homogeniniam ir grūdėtajam švytėjimo tipui yra panašūs.

3 LENTELE. Homogeninio ir grūdėtojo tipo sąsajos su uždegiminiais rodikliais, statistinė analizė

Uždegiminiai rodikliai	Švytėjimo tipas				<i>p</i> -reikšmė
	Homogeninis tipas		Grūdėtasis tipas		
	V ± SD	M	V ± SD	M	
CRB mg/l	7,6 ± 7,5	5,8	9,1 ± 13,4	3,2	0,606
ENG mm/h	43,8 ± 27,6	32	40,3 ± 37,4	40,5	0,877
RF IU/L	34,7 ± 27,4	20	29,6 ± 19,4	23,9	0,947

* V – vidurkis, SD – standartinis nuokrypis (deviacija), M - mediana

4 LENTELĖ. Uždegiminių žymenų ryšys su ENA pasiskirstymu

Serologinis žymuo	Uždegiminiai rodikliai:					
	ENG mm/h		CRB mg/l		RF IU/L	
	V ± SD	M	V ± SD	M	V ± SD	M
anti-Ro-52	40,5 ± 26,1	39,5	8,6 ± 10,9	4,4	41,3 ± 27,9	35,9
anti-SS-A	46,5 ± 30,8	42,5	7,2 ± 9,0	3,8	40,5 ± 26,2	34,6
anti-SS-B	48,2 ± 31,2	46	8,9 ± 11,0	4,4	43,8 ± 20,1	44
anti-ds-DNR	55,8 ± 32,7	40	10,8 ± 8,1	9,55	35,9 ± 27,9	27,3
anti-nukleosomos	53,3 ± 28,5	46	9,3 ± 9,0	5,8	37,1 ± 30,2	20
anti-nRNP/Sm	60,6 ± 38,7	46	7,8 ± 7,7	7,2	-	-
anti-Scl-70	54,7 ± 36,5	49	15,6 ± 20,8	6,7	-	-
anti-histonai	47,3 ± 34,4	32	12,3 ± 14,1	6,65	-	-
anti-Jo-1	33,0 ± 13,1	32	13,8 ± 17,6	5,5	-	-
anti-CENP-B	31,8 ± 15,3	38,5	1,5 ± 0,46	1,65	-	-

PCNA, P-Prot ir ribosominių antikūnų bei uždegiminių rodiklių sąsaja neanalizuojama, dėl nepakankamo tiriamųjų skaičiaus.

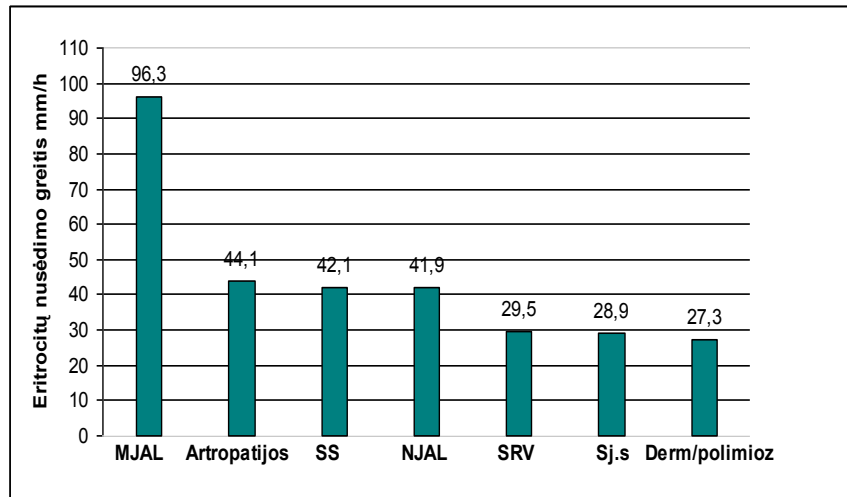
Šios studijos metu pasirinktos tokios uždegiminių žymenų rekomenduojamos reikšmės: ENG <30mm/h, CRB <5mg/l, RF <9,8 IU/L.

Analizuojant gautus duomenis matyti, jog ENG koncentracija viršija nustatytą ribą esant bet kuriam ENA žymeniui. Didžiausia ENG koncentracija yra esant nRNP/Sm antikūnams – 60,6±38,7 mm/h, mažiausiai kinta esant Jo-1 ir CENP-B antikūnams.

Didžiausia CRB koncentracija nustatyta esant antikūnų prieš Scl-70 antigenus – 15,6±20,8mg/l. Esant CENP-B žymeniui CRB koncentracija lieka nepakitusi.

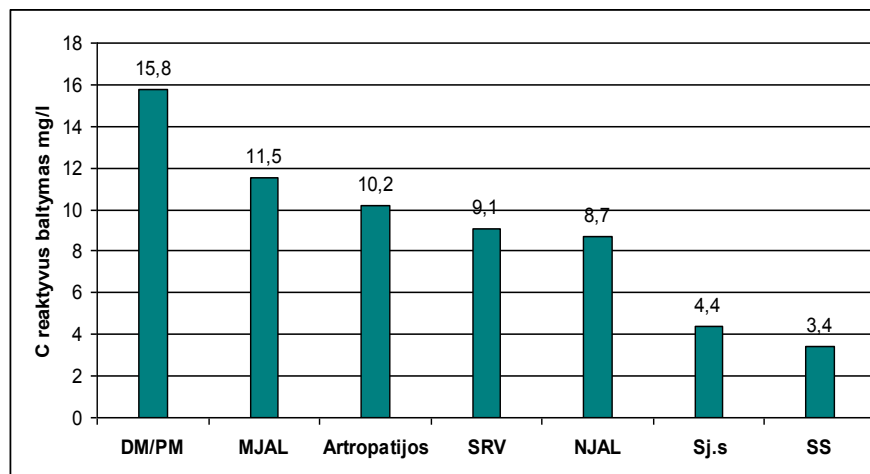
Didžiausia RF koncentracija nustatyta esant SS-B antikūnų - 43,8±20,1 IU/L, esant Ro-52 ir SS-A antikūnams, RF koncentracijos pokytis yra panašus. Mažiausiai koncentracija pakitusi esant ds-DNR antikūnams – 35,9±27,9 IU/L.

Uždegiminių rodiklių (ENG, CRB ir RF) pokyčiai autoimuninių sisteminių jungiamojo audinio ligų metu, pateikti 5,6 ir 7 paveiksluose.



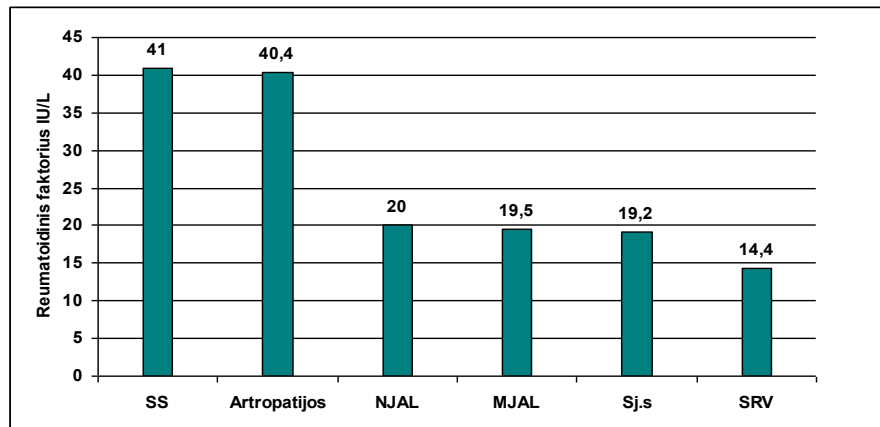
5 pav. ENG ir pokyčiai sisteminių JA ligų metu

Iš pateiktų rezultatų matyti, jog labiausiai padidėjusi ENG koncentracija yra esant MJAL - 96,3 mm/h. Panašiai pakitusi artropatijų, SS ir NJAL metu: 41,9 - 44,1mm/h. SRV, Sjogreno sindromo ir dermatomiozito/polimiozito metu, ENG neviršija rekomenduojamos 30 mm/h reikšmės.



6 pav. CRB pokyčiai sisteminių JA ligų metu

Didžiausia CRB koncentracija nustatyta dermatomiozito/polimiozito pacientams – 15,8 mg/l. Esant MJAL, artropatijoms, SRV ir NJAL, CRB koncentracija kinta 8,7 – 11,5 mg/l intervale. Sergant Sjogreno sindromu ir sistetine sklerodermija, CRB koncentracija lieka nepakitusi.



7 pav. RF pokyčiai sisteminių JA ligų metu

Interpretuojant gautus rezultatus, matome jog didžiausia RF koncentracija yra SS ir artropatijų pacientams. Esant NJAL, MJAL ir Sjogreno sindromui RF koncentracija kinta panašiai. SRV metu reumatoidinio faktoriaus koncentracija yra mažiausiai pakitusi.

5 LENTELE. Uždegiminių rodiklių pokyčių sisteminių JA ligų metu, statistinė analizė

Diagnozė	Uždegiminiai rodikliai:					
	ENG mm/h		CRB mg/l		RF IU/L	
	Min/Max	V ± SD	Min/Max	V ± SD	Min/Max	V ± SD
MJAL	58/120	96,3 ± 33,5	1,6/23,1	11,5 ± 10,8	4,4/34,6	19,5 ± 21,4
Sj.s	2/58	28,9 ± 20,6	0,7/14,9	4,4 ± 5,6	9,8/27,7	19,2 ± 8,9
SRV	2/60	29,5 ± 18,0	0,4/35,6	9,1 ± 13,3	14,4/14,4	14,4 ± 0,0
SS	5/73	42,1 ± 20,2	0,5/7,2	3,4 ± 2,6	20/62	41,0 ± 29,7
NJAL	17/70	41,9 ± 18,7	1/25,1	8,7 ± 8,1	20/20	20,0 ± 0,0
Artropatijos	16/90	44,1 ± 26,9	0,4/54,7	10,2 ± 16,4	9,8/87,2	40,4 ± 33,8
Derm/polimioz	15/51	27,3 ± 20,5	2,6/40,2	15,8 ± 21,2	-	-

*Min/Max – minimali ir maksimali reikšmės

6 LENTELĖ. Uždegiminių rodiklių medianinės reikšmės sisteminių JA ligų metu.

Diagnozė	Uždegiminiai rodikliai		
	ENG mm/h	CRB mg/l	RF IU/L
	Mediana	Mediana	Mediana
MJAL	111	9,9	19,5
Sj.s	30	1,6	20
SRV	20	1,6	14,4
SS	49	2	41
NJAL	48	6,4	20
Artropatijos	25	4,1	20
Derm/polimioz	16	4,6	-

3.2. Rezultatų aptarimas

Šio darbo tikslas - įvertinti ANA/ENA žymenų paplitimą sergant sistemineis jungiamojo audinio ligomis: MJAL, NJAL, SS, Sjogeno sindromu, SRV, artropatijomis ir dermatomiozitu/polimiozitu. Įvertinome ANA švytėjimo tipo ir ENA žymenų sąsają su uždegiminiais rodikliais- (ENG, CRB ir RF) ir šių uždegiminių rodiklių pokyčius sisteminių JA ligų metu.

Tyrimo metu ištirta 50 pacientų. Netiesioginės imunofluorescencijos metodu (NIF) nustatyta, jog 60% pacientų būdingas grūdėtasis švytėjimo tipas (vyraujantys antikūnai prieš Ro-52, SS-A, SS-B, nRNP/Sm, Scl-70), o homogeninis švytėjimo tipas, nustatytas beveik 2 kartus rečiau - 36% sergančiųjų (ds-DNR, histoniniai antikūnai). Dominuojantis grūdėtasis švytėjimo tipas būdingas dermatomiozitu/polimiozitu sergantiems – 100% atveju, 75% sisteminės sklerodermijos ir Sjogreno sindromo atveju, bei 50% SRV ir NJAL atveju.

2% pacientų nustatytas mišrus - grūdėtasis/homogeninis švytėjimas ir 2% - centromerinis švytėjimo tipas. Nukleoliarinis švytėjimo tipas nebuvo nustatytas.

Atlikus antikūnų identifikavimą imunobloto metodu, patvirtinti NIF metodu gauti rezultatai: dominuojančio, grūdėtojo švytėjimo tipo antikūnai aptinkami dažniau, nei homogeniniam švytėjimo tipui būdingi antikūnai. Anti-Ro-52 - 56%, anti-SS-A – 44%, vidutiniškai paplitę - SS-B – (26%), nRNP/Sm ir Scl-70 antikūnai – (14%) sergančiujų. Homogeninio švytėjimo tipo antikūnai paplitę: ds-DNR ir nukleosominiai antikūnai - (24%), antikūnai prieš histoninius antigenus – (14%) pacientų.

Kiti antikūnai yra retai aptinkami ir mažai paplitę. Anti-Jo-1 – (10%) ir anti-CENP-B – (8%) ir anti-PCNA – (4%). Mažiausiai paplitę yra antikūnai prieš ribosmų batymus ir P- Prot antigenus – (2%). Antikūnų prieš Ku antigenus nebuvo nustatyta.

Toliau vertinome kiekvieno ENA žymens paplitimą atskirose ligų grupėse ir vertę sisteminių JA ligų diagnostikoje. Mūsų tyrimo metu buvo nustatyta, jog anti-Ro-52 yra vienintelis žymuo, būdingas absoliučiai visoms ligų grupėms: NJAL – 70% atvejų, vienodai paplitęs MJAL ir dermatomiozito/polimiozito metu (66,6%) bei SRV, SS ir Sjogreno sindromo metu (62,5%), tačiau mažai būdingas esant artropatijoms - (20%). Meyer ir kitų tyrėjų duomenimis, anti-Ro-52 taip pat aptinkamas visose ligų grupėse: MJAL - 19%, miozito – 31%, Sjogeno sindromo metu - 81%, SRV – 38%, SS – 28%, RA-5% atvejų [44]. Procentinio paplitimo skirtumui įtakos galėjo turėti mažesnis mūsų tiriamų pacientų skaičius. Tačiau abiejų studijų metu mažiausias anti-Ro-52 paplitimas, stebimas esant artropatijoms.

Gretinant mūsų ir mokslinių tyrimų duomenis, galima teigti, kad anti-Ro-52 gali būti vertinamas kaip sisteminio autoimuninio susirgimo žymuo.

Mūsų tyrimo duomenimis, SS-A, SS-B ir ds-DNR antikūnai įvairiu dažniu paplitę beveik visose sisteminių JA ligų, išskyrus dermatomiozita/polimiozita, grupėse. Taip pat mažai būdingi NJAL ir artropatijoms.

SS-A antikūnai aptinkami 62,5% esant SRV, 50% - Sjogreno sindromo atvejų. Remiantis skirtingais mokslinės literatūros duomenimis, antikūnai prieš SS-A būdingi 50-95% pirminio Sjogreno sindromo atvejų [10,15], 40% - SRV, 5% - polimiozito ir RA atvejų [15].

Anti-SS-B esant Sjogreno sindromui, SRV ir SS būdingi - 37,5% atvejų. Pasak mokslinės literatūros šaltinių, SS-B antikūnų dažnis esant Sjogreno sindromui siekia

40-80%, SRV - 10%, SS - 5% atvejų [9,10]. SS-B ir SS-A antikūnai dažniausiai aptinkami kartu [9]. Mūsų atveju, SS-A ir SS-B antikūnai aptinkami 60% atvejų kartu. Tripletas SS-A, Ro-52, SS-B nustatytas 24% pacientų, 14% atvejų drauge neaptikti kiti imunologiniai žymenys.

Ds-DNR antikūnai SS, SRV ir Sjogreno sindromo metu buvo mažiausiai paplitę – 12,5% atvejų, mokslinės literatūros duomenimis, ds-DNR antikūnai nustatomi aptinkami 40-80% SRV atvejų [10], jų radimas koreliuoja su sunkaus inkstų pakenkimo tikimybe [68]. Nedidelis, SRV specifinių, ds-DNR antikūnų paplitimas mūsų tyrime, paaiškinamas, jog vyresnio amžiaus pacientams (tiriamųjų amžiaus vidurkis 51,3±39,1), SRV labiau sietina su anti-SS-A/SS-B nei su ds-DNR antikūnais [14].

Nukleosomininiai antikūnai nustatyti 37,5 % SRV pacientų. Mokslinėje literatūroje pateikiama jų sąsaja su inkstų pakenkimu SRV metu, ir nauda ligos aktyvumo nustatymui, ypač anti ds- DNR neigiamiems pacientams [24].

RNP/Sm antikūnai vienodai paplitę SS, Sjogreno sindromo ir SRV pacientams - 12,5% atvejų, mokslinėje literatūroje teigiama, jog anti RNP esti maždaug 35% sergančiųjų SRV [9,14] Anti Sm randamas 20% SRV atvejų [56]. Sm ir ds-DNR antikūnų derinys SRV diagnozę padaro labai tikėtiną [68], mūsų tyrime, toks derinys nustatytas 12,5 % SRV atvejų.

Scl-70 antikūnai nustatyti 50% SS atvejų ir 12,5% Sjogreno sindromo atvejų. Mokslinėje literatūroje nurodoma, jog Scl-70 antikūnai būdingi 28–70% difuzinės SS atvejų [56].

Specifinis polimiozito žymuo Jo-1 nustatytas 66,6 % dermatomiozito/polimiozito pacientų.

CENP-B nustatytas 12,5% SS atvejų, remiantis literatūriniais duomenimis, centromerinės struktūros, aptinkamos 22 – 36% sergančiųjų SS [56].

Minėtieji,- nukleosominiai, nRNP/Sm, Scl-70, Jo-1 ir CENP-B antikūnai taip pat retai aptinkami NJAL ir artropatijų grupėse: 10-30% atvejų.

Įvertinus uždegimių rodiklių – (ENG, CRP ir RF) sąsają, su dažniausiai nustatomais, homogeniniu ir grūdėtuju švytėjimo tipais, nors ENG ir RF rodikliams

esant nežymiai didesniems homogenio švytėjimo metu, o CRB rodikliui esant nežymiai didesniai grūdėtojo švytėjimo tipo metu, statistiškai patikimų skirtumų nenustatyta, atitinkamai; ENG - $43,8 \pm 33,7$ mm/h ir $40,3 \pm 37,4$ mm/h ($p=0,877$), CRB $7,6 \pm 7,5$ mg/l ir $9,1 \pm 13,4$ mg/l ($p=0,606$), RF $34,7 \pm 27,4$ IU/L ir $29,6 \pm 19,4$ IU/L ($p=0,947$).

Vertinant kiekvieno ENA žymens ir uždegiminio rodiklių ryšį nustatyta, jog didžiausia ENG koncentracija yra esant anti nRNP/Sm - $60,6 \pm 38,7$ mm/h. Didžiausia CRB koncentracija nustatyta esant Scl-70 antikūnų - $15,6 \pm 20,8$ mg/l. Gautą rezultatą gali paaiškinti, Scl-70 antikūnų vaidmuo sukuriant laikinas įkarpas DNR grandinėje, dvigubos DNR grandinės išsivyniojimo metu, CRB koncentracija didėja, kadangi viena iš CRB funkcijų, yra pažeistos DNR sujungimas su histonų kompleksu.

Didžiausios RF reikšmės nustatytos esant SS-B - $43,8 \pm 20,1$ IU/L ir Ro-52 antikūnų - $41,3 \pm 27,9$ IU/L. Dugar ir kolegų tyrimo duomenimis, Ro-52 reaktyvumas yra susijęs su teigiamu RF, sergant autoimuninėmis ligomis [17].

Remiantis mokslinės literatūros šaltiniais, ENG tyrimas yra nespecifinis, tačiau naudojamas diferencinėje jungiamojo audinio ligų diagnostikoje, pvz: ypač didelė ENG reikšmė verčia įtarti reumatoidinį artritą [14]. Mūsų atveju, artropatijų metu ENG padidėjęs vidutiniškai – $44,1 \pm 26,9$ mm/h, o didžiausias esant MJAL - $96,3 \pm 33,5$ mm/h, tai paaiškina klinikiniai MJAL simptomai, lemiantys ENG didėjimą: karščiavimas, artralgijos ir artritai, pleuritas ar perikarditas ir kt [68]. Esant SRV, Sjogreno sindromui ir dermatomiozitu/polimiozitu reikšmės neviršija rekomenduojamos 30mm/h reikšmės. Mokslinių šaltinių duomenimis, aktyvios SRV metu, neretai aptinkama normali ENG koncentracija [13], tuo tarpu, 7 iš 10 Sjogreno sindromo pacientų nustatomas padidėjęs ENG [45].

CRB yra gana patikimas rodiklis diferencijuoti SRV ir RA, kuriuo sergant CRB koncentracija padidėja dažniau [14], tą patvirtina ir mūsų gauti rezultatai: artropatijos – $10,2 \pm 16,4$ mg/l, SRV - $9,1 \pm 13,3$ mg/l. Kiti moksliniai šaltiniai teigia, kad aktyvios SRV metu, CRB gali likti nepakitęs [13].

Tuo tarpu RF koncentracija didžiausia sergant sisteminė sklerodermija - $41,0 \pm 29,7$ IU/L ir artropatijomis - $40,4 \pm 33,8$ IU/L. Pasak mokslinės literatūros, RA metu sintezuojamas platus autoantikūnų spektras, bet tipiškiausias yra RF [68], nustatomas

apie 85% sergančių, suaugusių asmenų [32]. Esant MJAL, Sjogreno sindromui, NJAL ir SRV, nustatyta RF koncentracija neviršija 20 IU/L. Remiantis mokslinių tyrimų duomenimis, RF nustatomas 20-30% SS, 50-60% MJAL ir 70-90% Sjogreno sindromo atvejų [55].

IŠVADOS

1. Dažniausiai aptikti antikūnai prieš branduolio antigenus yra anti-Ro-52 ir anti-SS-A, NIF metodu nustatius grūdėtąjį švytėjimo tipą, bei anti-ds-DNR ir anti-nukleosominiai antikūnai, esant homogeniniam švytėjimo tipui.

2. Antikūnai prieš Ro-52 antigeną aptikti visose autoimuninėmis jungiamojo audinio ligomis sergančiųjų grupėse, todėl gali būti vertinami kaip sisteminio autoimuninio susirgimo žymenys.

3. Įvertinus uždegimo žymenų (ENG, CRB, RF) ir autoantikūnų, esant homogeninio švytėjimo tipams (įvertinus NIF metodu), ryšį statistiškai patikimų skirtumų nenustatyta.

SUMMARY

The prevalence of antibodies against nuclear antigens in patients in systemic connective tissue diseases

The aim of this study was to assess the diagnostic value and to determine the frequency of ENA/ANA in systemic connective tissue diseases (SCTD) and to compare the association of these antibodies with following inflammatory markers ESR, CRP and rheumatoid factor (RF).

The analysis involved 50 patients with seven different diagnosis of connective tissue diseases: mixed connective tissue disease (MITD), systemic lupus erythematosus (SLE), Sjogren syndrome, systemic scleroderma, nondifferential connective tissue disease, dermatomyositis/ polymyositis and arthropaties.

Sera from each patient was tested for ANA by indirect immunofluorescence (NIF), we assigned, that speckled pattern is appropriate for 60% and homogenous pattern is appropriate for 36% SCTD patients.

The result was confirmed by immunoblot method, we estimated, that the prevalence of ENA is as follows anti-Ro-52 (56%), anti-SS-A (44%), anti-SS-B (26%), ds-DNA and nucleosomal antibodies (24%), nRNP/Sm, Scl-70 and histone antibodies (14%). Anti-Jo-1 (10%), anti-CENP-B (8%) anti-PCNA (4%). Antibodies to ribosomal and P- Prot antigens (2%). Antibodies to Ku antigens were not detected.

Assessing the value of ENA antibodies in differentiation of SCTD, we defined that antibodies against Ro-52 antigens are the only markers detectable in all disease groups, so it could be appraised as a markers of autoimmune systemic diseases.

In estimation of the relation of ANA/ENA antibodies and inflammatory markers ESR, CRP and rheumatoid factor RF, we discovered, that the highest ESR level was in association with nRNP/Sm antibodies - $60,6 \pm 38,7$ mm/h, highest CRP level is in association with Scl-70 antibodies - $15,6 \pm 20,8$ mg/l. Highest RF level is in conjunction with SS-B antibodies $41,0 \pm 29,7$ IU/L. In comparison of speckled and homogenous pattern, significant difference was not established.

LITERATŪROS SĄRAŠAS:

1. Adomaitienė D, Janulevičiūtė N, Kazakevičius R, Vaičiuvėnas V. Klinikinės imunologijos įvadas. 2001; 253.
2. Agarwal S, Harper J, Kiely P. Concentration of antibodies to extractable nuclear antigens and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009;18(5): 407 - 412.
3. Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, Cacoub P, Amoura I, Musset L, Bach JF, Piette JC Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2000;43(1):76-84.
4. Ardoin SP, Pisetsky DS. Developments in the scientific understanding of lupus. *Arthritis Research and Therapy*. 2008;10(5):218
5. Bagdonaitė L, Kirdaitė G. Sisteminių reumatinių ligų laboratorinė diagnostika. *Laboratorinė medicina* 2003; 3 (19): 32-33
6. Bagdonaitė L. Autoantikūnų klinikinė reikšmė ir nustatymo metodai. Vilniaus universitetas. Vilnius 2008; 10-14.
7. Benveniste O, Chérin P, Maisonobe T, Merat R, Chosidow O, Mouthon L, Guillevin, L Flahault A, Burland MC, Klatzmann D, Herson S, Boyer O. Severe perturbations of the blood T cell repertoire in polymyositis, but not dermatomyositis patients. *Journal of Immunology* 2001;167 (6): 3521 – 3529
8. Bertinato J, Schild-Poulter C, Hache RJ. Nuclear localization of Ku antigen is promoted independently by basic motifs in the Ku70 and Ku80 subunits *Journal of Cell Science* 2001;(114) 1: 89-99.
9. Bradwell P, and others. Atlas of Hep-2 pattern. 1995; 14, 20-24,74-77, 107-117
10. Bradwell P, and others, Atlas of Hep-2 pattern. Second edithion 2003; 46-49, 78, 110-115.

- 11.** Bruns A, Bläss S, Hausdorf G, Burmester GR, Hiepe F. Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2000;43(10): 2307-2315.
- 12.** Cengiđ M, Heljić B, Rasić S, Dilić M. Role of C-reactive protein in systemic lupus erythematosus. *Med Arh.* 2002;56(3):147-149
- 13.** Colglazier, C.L,Sutej, Paul G. Laboratory Testing in the Rheumatic Diseases: A Practical Review. *Southern Medical Journal* 2005; 98 (2) 185-191
- 14.** Dadonienė J, Kirdaitė G, Galuzienė L. Sisteminių reumatinių ligų laboratorinė diagnostika. *Laboratorinė medicina* 1999; 2: 31-34
- 15.** Dadonienė J, Šaulauskienė I, Adomavičiūtė D, Rudavičiūtė R, Kirdaitė G. Antikūnų prieš ribonukleoproteinus svarba sergant reumatinėmis ligomis. *Laboratorinė medicina* 2000; 3 (7): 30-32.
- 16.** Dadonienė J. Autoimuninės ligos. *Gydymo menas* 2004;10:39-42
- 17.** Dugar M, Cox M, Limaye V, Gordon TP, Roberts-Thompson PJ. Diagnostic utility of anti-Ro52 detection in systemic autoimmunity. *Postgrad Med J* 2010;86:79-82
- 18.** Damoiseaux JG, Tervaert JW. From ENA to ANA how to proceed? *Autoimmunity Review* 2006;5(1):10-17.
- 19.** Fischer E, Thiele A, Stierle HE, Lang B. Anti-Jo-1 antibodies: specific autoantibodies for polymyositis with interstitial pulmonary fibrosis. 2 case reports. *Z Rheumatol.* 1995;54(3):171-177.
- 20.** Fossaluzza V, De Vita S. Clinical differences between ANA/anti-ENA positive or negative primary Sjögren's syndrome. *Clinical Rheumatology* 1992;11(3): 385-387
- 21.** Franceschini F, Cavazzana I, Generali D, Quinzanini M, Viardi L, Ghirardello A, Doria A, Cattaneo R. Anti-Ku antibodies in connective tissue diseases: clinical and serological evaluation of 14 patients. *J Rheumatol.* 2002 Jul;29(7):1393-1397.
- 22.** Grader-Beck T, Wigley F. Raynaud's Phenomenon in Mixed Connective Tissue Disease. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 31 (3): 465-481.

- 23.** Greidinger E, Hoffman R. Autoantibodies in the Pathogenesis of Mixed Connective Tissue Disease. *Rheumatic Disease Clinics of North America*.31 (3):437-450.
- 24.** Habash-Bseiso DE, Yale SH, Glurich I, Goldberg JW. Serologic Testing in Connective Tissue Diseases. *Clin Med Res*. 2005; 3(3): 190–193.
- 25.** Hachulla E, Dubucquoi S. Nuclear auto-antibodies: a useful tool for the diagnosis, the classification and the prognosis of systemic sclerosis *Rev Med Interne*. 2004;25(6):442-447
- 26.** Hauses S, Farin SA, Branwald E, Kasper D, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's principle of internal medicine. 17 th Edition. 1787-1788, 2073.
- 27.** Hoffman RW, Maldonado ME. Immune pathogenesis of Mixed Connective Tissue Disease: A short analytical review. *Clinical Immunology* 2008; 128 (1): 8-17
- 28.** www.hopkins-arthritis.org/arthritis.../rheumatoidarthritis/rheum_clin_path.html
- 29.** Yamanishi Y, Maeda H, Katayama S, Ishioka S, Yamakido M. Scleroderma-polymyositis overlap syndrome associated with anti-Ku antibody and rimmed vacuole formation. *The Journal of Rheumatology* 1999; 23 (11): 1991-1994
- 30.** Yurasov S, Tiller T, Tsuiji M, Velinzon K, Pascual V, Wardemann H, Nussenzweig MC. Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *The Journal of Experimental Medicine*. 2006; 203(10):2255-2261.
- 31.** Janulevičiūtė NM, Malickaitė R. Klinikiniai imuniai tyrimai. *Laboratorinė medicina* 1999; 1: 32-34.
- 32.** James N Jarvis Commentary – ordering lab tests for suspected rheumatic disease *Pediatric Rheumatology* 2008, 6:19
- 33.** Juby AG, Davis P, Mcelhaney JE, Gravenstein S. Prevalence of selected autoantibodies in different elderly subpopulations. *Oxford Journals Medicine Rheumatology* 1994;(33)12: 1121-1124
- 34.** Kazuhiko T. Hypothesis: pathogenesis of systemic sclerosis. *The Journal of Rheumatology*, 2003; 30 (4):755-759

35. Kelley WN, Haris ED, Ruddy S, Sledge CB. Ethiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. Textbook of Rheumatology 1993;833-866
36. Kirdaitė G, Bagdonaitė L. Autoimunijų ligų laboratorinės diagnostikos ypatumai ir klinikinė vertė. Laboratorinė medicina. 2007; t9. 4(36).
37. Kirdaitė G, Redaitienė E, Dadonienė J, Stropuvienė S. Anticitrulininiai antikūnai naujas reumatoidinio artrito diagnostinis žymuo. Vilniaus universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institutas. MEDICINA 200; 39 (5): 435 437
38. Kučinskienė Z. Laboratorinių tyrimų žinynas. 2003; 17
39. Kučinskienė Z,A. Klinikinės biochemijos ir laboratorinės diagnostikos pagrindai. 2008; 125
40. Kumar S, Kalsi J, Bunting K, Ravirajan CT, Latchman DS, Pearl LH, Isenberg DA. Fine binding surisantis characteristics of human autoantibodies-partial molecular characterization. Molecular Immunology. 2004; 41(5): 495-510.
41. Klareskog L, Padyukov L, Alfredsson L. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. Current Opinion in Rheumatology 2007; 19 (1):49-54
42. Matuzevičienė R, Eritrocitų nusėdimo greitis 2003; 6-30
43. Mavragani CP, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: autoantibodies to cellular antigens. Clinical and molecular aspects. International Archives of Allergy and Immunology 2000; 123(1):46-57
44. Meyer W, Scheper T, Janssen A, Siegemund M, Kuehn B, Chen S, Rosemann A, Biesen R, Hiepe F, EgererE, Schlumberger W, Yan HP, and Stoecker W. Anti-Ro-52 antibodies are not disease specific: Prevalence in various rheumatic autoimmune diseases, primary biliary liver cirrhosis and autoimmune and infectious hepatitis. Annals of the Rheumatic Diseases 2008; 67(2):146
45. <https://merck.com/mmhe/print/sec05/ch068/ch068d.html> The merck manual of medical information – second home edition. Autoimmune Disorders of Connective Tissue. Sjogren syndrome.

46. McCauliffe DP, Sontheimer RD. Molecular characterization of the Ro/SS-A autoantigens. *J Invest Dermatol.* 1993;100(1):73-79
47. Mieliauskaitė D. Sjogreno sindromas ir sisteminė sklerozė: sausojo sindromo raiška. *Reumatologija* 2008; 2: 18-19.
48. Miyawaki S, Asanuma H, Nishiyama S, Yoshinaga Y. Clinical and serological heterogeneity in patients with anticentromere antibodies. *J Rheumatol.* 2005 Aug;32(8):1488-1494
49. Mok CC, Lau SC. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Pathology.* 2003; 56(7): 481–490.
50. Molina V, Shoenfeld Y. Infection, vaccines and other environmental triggers of autoimmunity. *Autoimmunity* 2005; 38(3):235-245
51. Naryzhny SN. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(23):3789-3808.
52. Parker JC, Burlingame RW, Webb TT, Bunn CC. Anti-RNA Polymerase III Antibodies in Patients With Systemic Sclerosis Detected by Indirect Immunofluorescence and ELISA. *Rheumatology* 2008; 47(7): 976-979.
53. Paunesku T, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, Woloschak GE. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol.* 2001;77(10):1007-1021.
54. Poole BD, Scofield RH, Harley JB, James JA. Epstein-Barr virus and molecular mimicry in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2006; 39(1):63-70
55. Potts J, Interpretation of laboratory tests in rheumatic disease 2005;23(10): 496 -500.
56. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Pathologic basis of disease* 1995; 199-215
57. Schneeberger E, Citera G, Heredia M, Maldonado CJ. Clinical significance of anti-Ro antibodies in rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology* 2008; 27(4): 517-519

- 58.** Smeenk RJT. Antinuclear antibodies: cause of disease or caused by disease? *Rheumatology* 2000; 39: 581-584
- 59.** Scofield RH, Farris AD, Horsfall AC, Harley JB. Fine specificity of the autoimmune response to the Ro/SSA and La/SSB ribonucleoproteins. *Arthritis and Rheumatism*. 1999; 42(2): 199-209.
- 60.** Stites D.P , Fudenberg H.H, Stobo J.D, Wells J.V. *Basic and Clinical Immunology* 6th edicion, 1987; 142-146
- 61.** Steiner G, Smolen J. Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance. *Arthritis Res* 2002, 4(2):1-5
- 62.** Soltys AJ, Axford JS, Button BJ. Reumatoid Factor: where are we now? *Ann Reum Dis* 1997;56:285-286
- 63.** Sutej PG: Laboratory testing in the rheumatic diseases: a practical review. *Southern Medical Journal* 2005; 98(2): 185-191
- 64.** Tzioufas AG, Wassmuth R, Dafni UG, Guialis A, Haga HJ, Isenberg DA, Jonsson R, Kalden JR, Kiener H, Sakarellos C, Smolen JS, Sutcliffe N, Vitali C, Yiannaki E, Moutsopoulos HM. Clinical, immunological, and immunogenetic aspects of autoantibody production against Ro/SSA, La/SSB and their linear epitopes in primary Sjögren's syndrome (pSS): a European multicentre study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2002;61(5): 398-404
- 65.** Vancsa A, Csipo I, Nemeth J, Devenyi K, Gergely L, Danko K. Characteristics of interstitial lung disease in SS-A positive/Jo-1 positive inflammatory myopathy patients. *Rheumatology International*. 2009; 29(9):989-994
- 66.** Valentini G, Importa RDG, Resse M, Migliarest S, Minucci PB, Tirri R, Farzati B, Tirri G. Antinuclear antibodies in first-degree relative of patients with polymyositis – dermatomyositis: analysis of the relationship with HLA haplotypes. *Oxford Journals Medicine Rheumatology* 1991;(30) 6:429-432

67. Vasiliauskiene L, Wiik A, M Høier-Madsen M. Prevalence and clinical significance of antikeratin antibodies and other serological markers in Lithuanian patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2001;60:459-466
68. Venalis A, Kirdaitė ir kt. G.Reumatologija I. Klinikinė, laboratorinė, biofizikinė diagnostika. *Bendrieji gydymo principai*. 2008; 12-27, 34-68, 107-137, 148-155
69. Venalis A, Kirdaitė ir kt. G.Reumatologija II. Klinikinė farmakoterapija, biofizikiniai, reabilitaciniai, chirurginiai gydymo metodai. 2008; 30-31, 39-42
70. Vila L, Alarcón G S, McGwin G, Bastian H M, Fessler BJ, Reveille J.D, LUMINA Study Group. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic cohort (LUMINA): XXIX. Elevation of erythrocyte sedimentation rate is associated with disease activity and damage accrual. *Rheumatology* 2005 32(11):2150-2155
71. Williams RC , Harmon ME, Burlingame R. Studies of serum C-reactive protein in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2005;32(3):454-461.
72. Wikipedia [the free encyclopedia]
73. Wong CK, Ho CY, Li EK, Lam CW Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2000; 9(8):589-93.
74. Zaleckis G. *Pagrindinių laboratorinių tyrimų žinynas*. 2006; 117.

Paveikslėliai:

www.uni-duisburg-essen.de/.../Media/SmANA.jpg

http://www.arotec.co.nz/abode/productResultSplit.do/_siteId__15/resultSetStart__0/resultSetCount__10/method__productResultSplit/_categoryId__1558&displayType=2

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju VU, Medicinos fakulteto, fiziologijos, biochemijos ir laboratorinės medicinos katedros doc. dr. Loretai Bagdonaitei už visapusišką pagalbą ir vertingus patarimus viso darbo metu.

Taip pat esu dėkinga Vilniaus Universiteto Santariškių klinikų, Laboratorinės diagnostikos centro, klinikinės imunologijos laboratorijos laborantei Irenai Šimkovičiūtei už pagalbą įsisavinant tyrimo metodus, taip pat ačiū kitoms laboratorijos darbuotojoms.