

LAVORO ORIGINALE

Ruolo degli anticorpi anti-nucleosomi nel lupus eritematoso sistemico. Risultati di uno studio condotto in pazienti con lupus eritematoso sistemico ed altre connettiviti sistemiche

*The role of anti-nucleosome antibodies in systemic lupus erythematosus.
Results of a study of patients with systemic lupus erythematosus
and other connective tissue diseases*

P. Quattrocchi, A. Barrile, D. Bonanno, L. Giannetto, M. Patafi, V. Tigano, B. Ferlazzo

Dipartimento di Patologia Umana, Unità Operativa Complessa di Allergologia e Immunologia Clinica,
Policlinico Universitario "G. Martino", Messina

SUMMARY

Objective: *The aim of our study was to investigate the prevalence and the disease specificity of anti-nucleosome antibodies in systemic lupus erythematosus and their association with disease activity and renal involvement.*

Methods: *Anti-nucleosome antibodies were measured by ELISA in the sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) (47), rheumatoid arthritis (RA) (22), mixed connective tissue disease (MCTD) (19), systemic sclerosis (SSc) (11) and Sjögren's syndrome (SS) (10). Anti-dsDNA antibodies were measured by IIF on Chritidia luciliae. In the patients with SLE serum levels of C3 and C4 complement components were also measured. Sera of 22 healthy individuals were assayed as controls. SLE activity was evaluated by the ECLAM score.*

Results: *Anti-nucleosome antibodies were found in 40 patients with SLE (85.1%), in 10 with RA (45.4%), in 8 with MCTD (42.1%), in 4 with SSc (36.3%), in 1 with SS (10%) and in none of the healthy controls. Anti-dsDNA antibodies were found in 23 patients with SLE and were absent in the patients with other CTD and in controls.*

All the patients with SLE and renal involvement were positive both for anti-dsDNA antibodies and anti-nucleosome antibodies. No significant correlation was observed between anti-nucleosome antibodies and disease activity and renal involvement.

Conclusion: *Anti-nucleosome antibodies are present in a high percentage of the patients with SLE but they don't seem to be specific markers of the disease. Our data don't support a clear correlation between anti-nucleosome antibodies and disease activity and renal involvement.*

Reumatismo, 2005; 57(2):109-113

INTRODUZIONE

Il lupus eritematoso sistemico (LES) è una malattia autoimmune non organo-specifica, caratterizzata dalla presenza, nel siero dei pazienti, di un ampio spettro di autoanticorpi; tra questi gli

anticorpi anti-DNA hanno un ruolo chiave nella diagnosi e nel monitoraggio della malattia in quanto markers specifici della stessa e strettamente correlati con la sua attività e con l'impegno renale (1).

Studi condotti negli anni recenti prospettano la possibilità di attribuire agli anticorpi anti-nucleosomi - anticorpi diretti contro la particella nucleosomica nella sua interezza e non contro singoli componenti quali DNA ed istoni - un ruolo significativo nella diagnosi e nel monitoraggio del LES a motivo della precocità della loro comparsa in circolo e della prevalenza più elevata rispetto ad altri mar-

Indirizzo per la corrispondenza:

Prof. Benito Ferlazzo

UOC di Allergologia e Immunologia Clinica

Policlinico Universitario

Via Consolare Valeria, 98126 Messina

E-mail: benito.ferlazzo@unime.it

catori autoanticorpali specifici, quali anti-DNAN ed anti-istoni (3-6, 14-17, 23).

Obiettivi del nostro studio sono stati:

a) valutare il significato diagnostico e l'eventuale specificità degli anticorpi anti-nucleosomi per il LES prendendo in considerazione la frequenza del loro riscontro nei pazienti affetti dalla malattia e confrontando tale frequenza con quella osservata in altre connettiviti sistemiche (connettivite mista, sclerosi sistemica, sindrome di Sjögren, artrite reumatoide);

b) valutare il rapporto tra positività per anti-nucleosomi ed attività della malattia e particolari aspetti clinici della stessa (impegno renale in primo luogo), confrontando i risultati ottenuti con quanto osservato, nello stesso senso, con gli anticorpi anti-DNAN e con altri markers serologici di attività della malattia, quali i livelli serici delle componenti complementari C3 e C4.

PAZIENTI E METODI

Il nostro studio è stato condotto in 109 pazienti affetti da: LES (47-40 donne, 7 uomini; età media = 37.4 anni, range 10-71 anni), artrite reumatoide (AR) (22-20 donne, 2 uomini, età media = 50.4 anni, range 32-77 anni), connettivite mista (CM) (19 donne; età media = 48.6 anni, range 33-69 anni), sclerosi sistemica (ScS) (11 donne; età media = 57.3 anni, range 41-79 anni), sindrome di Sjögren (SS) (10 donne; età media = 61,5 anni, range 47-76 anni).

I valori evidenziati nei pazienti sono stati confrontati con quelli rilevati in un gruppo di controllo formato da 22 soggetti sani (14 donne, 8 uomini; età media = 35.7 anni, range 29-55 anni).

I pazienti affetti da LES sono stati monitorati per un follow-up della durata media di 2 anni (range 20-28 mesi). La malattia era attiva - con riferimento ai criteri ECLAM (2) - in 25 dei 47 pazienti. Segni di impegno renale erano presenti in 18 pazienti; di

essi 10 erano stati sottoposti a biopsia renale. Nel corso del follow-up il dosaggio degli autoanticorpi è stato praticato su 3 campioni di siero prelevati con intervalli di 6-8 mesi.

Metodi: Gli anticorpi anti-nucleosomi sono stati ricercati con metodica immunoenzimatica (Aeskulisa Nucleo-h; Aesku Diagnostics, Germany). La metodica utilizza nucleosomi umani nativi isolati dalla linea cellulare eucariotica HeLa. I livelli anticorpali sono stati valutati facendo riferimento ad una curva standard; sono stati considerati positivi valori superiori a 15 U/ml.

Gli anticorpi anti-DNAN sono stati ricercati mediante immunofluorescenza indiretta su *Chritidia luciliae*, gli anticorpi anti-nucleo (ANA) mediante immunofluorescenza indiretta su cellule HEP-2. I livelli serici di C3 e C4 sono stati misurati con metodica nefelometrica.

RISULTATI

Positività per anticorpi anti-nucleosomi era presente in 40 dei 47 pazienti affetti da LES (85.1%) con livelli medi = 60 +/- 53,4 U/ml (range 18-250 U/ml), in 10 dei 22 pazienti con AR (45.4%) con livelli medi = 41.3 +/- 32.0 U/ml (range 18-160 U/ml), in 8 delle 19 pazienti con CM (42.1%) con livelli medi = 34.4 +/- 12.8 U/ml (range 22-55 U/ml), in 4 delle 11 pazienti con ScS (36.3%) con livelli medi = 56 +/- 33.0 U/ml (range 20-100 U/ml) ed in 1 delle 10 pazienti con SS (10%) (30 U/ml) (Tab. I).

In nessuno dei soggetti sani di controllo era presente positività per anticorpi anti-nucleosomi. La specificità diagnostica per il LES degli anticorpi anti-nucleosomi era = 72%.

Nei pazienti affetti da LES con nefropatia i livelli medi degli anticorpi anti-nucleosomi erano più elevati rispetto a quelli dei pazienti senza segni di impegno renale - rispettivamente 82.7 ± 74.9 U/ml e 47.7 ± 28.9 U/ml -; la differenza tra i due valori non

Tabella I - Positività per anticorpi anti-nucleo (ANA), anti-DNAN ed anti-nucleosomi nei pazienti ammessi allo studio.

Patologia	N°	ANA+	Anti-DNAN+	Anti-nucleosomi+
LES	47	47 (100%)	23 (48.9%)	40 (85.1%)
Artrite reumatoide	22	19 (86.3%)	0	10 (45.4%)
Connettivite mista	19	17 (89.4%)	0	8 (42.1%)
Sclerosi sistemica	11	8 (72.7 %)	0	4 (36.3%)
Sindrome di Sjögren	10	6 (60%)	0	1 (10 %)

era, però, statisticamente significativa. I livelli medi degli anticorpi anti-nucleosomi evidenziati nei pazienti con LES senza nefropatia non erano significativamente diversi da quelli riscontrati nei pazienti con AR, CM, ScS.

Anticorpi anti-DNAn erano presenti in 23 pazienti affetti da LES (48.9%); 21 di essi erano positivi anche per anticorpi anti-nucleosomi. Tutti e 18 i pazienti con impegno renale erano positivi tanto per anticorpi anti-DNAn quanto per anticorpi anti-nucleosomi.

Non è stato possibile mettere in evidenza, nei pazienti con LES, un rapporto significativo tra positività per anticorpi anti-nucleosomi e (a) attività della malattia e (b) livelli serici di C3 e C4. In particolare, nel corso del follow-up non sono state evidenziate differenze significative dei livelli degli anticorpi anti-nucleosomi nei tre dosaggi effettuati.

DISCUSSIONE

Nella letteratura dell'ultimo decennio sono presenti dati sufficienti per ritenere che nell'animale da esperimento (topo "lupus prone") i nucleosomi sono gli antigeni che guidano la risposta immune e che i complessi immuni nucleosomi-antinucleosomi abbiano un ruolo nella patogenesi della malattia ed in particolare del danno renale ad essa associato. Nel topo "lupus prone" la sintesi degli anticorpi anti-nucleosomi precede quella degli anticorpi anti-DNAn ed anti-istoni (3-6). Il rilascio sistemico dei nucleosomi è verosimilmente il risultato (nel topo, ma anche nell'uomo) di una aberrante apoptosi (7-10). I nucleosomi rilasciati dalle cellule apoptotiche inducono la sintesi (T dipendente) di anticorpi specifici i quali, se non adeguatamente rimossi, precipitano a livello della membrana basale glomerulare innescando la patologia nefritica (5, 11, 12). La reazione nucleosomi-antinucleosomi può, peraltro, avvenire anche in situ. Una conferma indiretta della patogenicità dei complessi nucleosomi-antinucleosomi nel lupus murino viene dalla dimostrazione della loro presenza nell'eluato di rene di ratto lupus prone proteinurico (4, 5) e dalla dimostrazione che l'interazione degli stessi con eparina o derivati eparinici, prevenendone la fissazione alla membrana basale glomerulare, ritarda l'insorgenza della nefropatia (13). Gli studi condotti nell'uomo nell'ultimo decennio hanno messo in evidenza l'occorrenza di una positività per anticorpi anti-nucleosomi, valutati con metodica immunoenzimatica, nel 56-86% dei pa-

zienti con LES (14-19). Nella nostra casistica essi erano presenti nell'85% dei pazienti con LES. L'alta prevalenza, insieme con la precocità della loro sintesi rispetto ad altri marcatori autoimmuni specifici (anticorpi anti-DNAn ed anti-istoni), suggeriscono la possibilità di attribuire agli anticorpi anti-nucleosomi un ruolo significativo nella diagnosi della malattia. La specificità per il LES è, però, messa in dubbio dal loro riscontro (sia pure meno frequente) nel siero di pazienti con altre patologie autoimmuni quali CM (45%) (14), ScS (22.8-45.9%) (14,19), SS (33%) (20), epatite autoimmune (50%) (21), oltre che nel lupus da farmaci (100%) (22). Nel nostro studio anticorpi anti-nucleosomi erano presenti nei pazienti con AR (45.4%), CM (41.1%), ScS (36.3%) e SS (10%). I livelli medi evidenziati in questi pazienti non erano significativamente diversi rispetto a quelli rilevati nei pazienti con LES senza nefropatia, diversamente da quanto riportato da altri Autori (19). Se il valore diagnostico degli anticorpi anti-nucleosomi nel LES appare comunque sufficientemente definito, soprattutto con riferimento ad una diagnosi precoce, i dati presenti in letteratura sul loro significato clinico e prognostico appaiono contraddittori. Un rapporto tra anticorpi anti-nucleosomi ed attività della malattia, segnalato da alcuni Autori (14-16, 22, 23), non è stato confermato da altri (19, 24, 25) e non è stato evidenziato nel nostro studio con riferimento tanto ad aspetti clinici quanto a taluni indici di laboratorio quali i livelli serici di C3 e C4.

Con riferimento, infine, alla correlazione tra anticorpi anti-nucleosomi e nefropatia lupica, i risultati delle indagini condotte nel topo appaiono, come già riportato, indicativi per un loro ruolo nella patogenesi della flogosi renale; i risultati delle indagini condotte nell'uomo non appaiono, invece, concordi sulla esistenza di un sicuro rapporto tra anticorpi anti-nucleosomi e nefropatia lupica e nell'attribuire agli anticorpi anti-nucleosomi un ruolo superiore a quello degli anticorpi anti-DNAn nella diagnosi e nel monitoraggio della stessa (14-16, 19, 24, 26, 27). Nel nostro studio tutti i pazienti con nefropatia lupica erano positivi tanto per anticorpi anti-DNAn quanto per anticorpi anti-nucleosomi; i livelli medi di questi ultimi non erano significativamente più elevati rispetto a quelli evidenziati nei pazienti senza nefropatia. Sotto questo aspetto, comunque, gli anticorpi anti-nucleosomi potrebbero rappresentare un utile marker di riferimento nei pazienti con nefropatia negativi per anticorpi anti-DNAn (16).

CONCLUSIONI

Gli anticorpi anti-nucleosomi sono presenti in una alta percentuale dei pazienti affetti da LES; essi, però, non appaiono specifici per questa malattia potendo essere presenti, sia pure con prevalenza mi-

nore, in altre patologie autoimmuni quali AR, ScS, CM, SS, epatite autoimmune.

Quanto messo in evidenza dal nostro studio non appare indicativo per una significativa correlazione, nei pazienti con LES, tra anticorpi anti-nucleosomi ed attività della malattia ed impegno renale.

RIASSUNTO

Obiettivo: Valutare la prevalenza e la specificità degli anticorpi anti-nucleosomi nel LES e la loro associazione con l'attività della malattia e l'impegno renale. **Metodi:** Gli anticorpi anti-nucleosomi sono stati ricercati, con metodica immunoenzimatica, nel siero di 47 pazienti con lupus eritematoso sistemico (LES), 22 con artrite reumatoide (AR), 19 con connettivite mista (CM), 11 con sclerosi sistemica (ScS) e 10 con sindrome di Sjögren (SS). Gli anticorpi anti-DNA sono stati ricercati mediante IIF su *Crithidia luciliae*. Nei pazienti con LES sono stati, inoltre, misurati i livelli serici di C3 e C4. I sieri di 22 soggetti sani sono stati utilizzati come controllo. L'attività del LES è stata valutata secondo i criteri ECLAM. **Risultati:** Anticorpi anti-nucleosomi erano presenti in 40 pazienti con LES (85.1%), in 10 con AR (45.4%), in 8 con CM (42.1%), in 4 con ScS (36.3%), in 1 con SS (10%) e in nessuno dei controlli sani. Anticorpi anti-DNA erano presenti in 23 pazienti con LES ed erano assenti nei pazienti con altre connettiviti sistemiche e nei controlli. Tutti i pazienti con LES e danno renale erano positivi tanto per anticorpi anti-DNA quanto per anticorpi anti-nucleosomi. Non è stata evidenziata una significativa correlazione tra anticorpi anti-nucleosomi e attività della malattia e danno renale. **Conclusioni:** Gli anticorpi anti-nucleosomi sono presenti in una elevata percentuale dei pazienti con LES ma non sembrano essere markers specifici della malattia. I nostri dati non supportano una chiara correlazione fra anticorpi anti-nucleosomi ed attività della malattia e danno renale.

Parole chiave - Lupus eritematoso sistemico, anticorpi anti-nucleosomi, anticorpi anti-DNA.

Key words - *Systemic lupus erythematosus, anti-nucleosome antibodies, anti-dsDNA antibodies.*

BIBLIOGRAFIA

- Hahn BH, Tsao BP. Antibodies to DNA. In Wallace DJ, Hahn BH: "Dubois lupus erythematosus", Lippincott and Williams Ed.; 2002, pag 425-46.
- Vitali C, Bencivelli W, Isenberg DA, Smolen JS, Snaith ML, Sciuto M, et al. Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. II: Identification of the variables indicative of disease activity and their use in the development of an activity score. *Clin Exp Rheumatol.* 1992; 10:541-7.
- Burlingame RW, Rubin RL, Balderas RS, Theophilopoulos AN. Genesis and evolution of antichromatin antibodies in murine lupus implicates T-dependent immunization with self antigen. *J Clin Invest* 1993; 91:1687-96.
- Amoura Z, Chabre H, Koutouzov S, Lotton C, Cabrespines A, Back JF, et al. Nucleosome-restricted antibodies are detected before anti-dsDNA and/or antihistone antibodies in serum of MRL-Mp lpr/lpr and +/- mice, and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria. *Arthritis Rheum* 1994; 37:1684-8.
- Van Bruggen MC, Kramers C, Hylkema MN, Smeenk RJ, Berden JH. Significance of anti-nuclear and anti-extracellular matrix antibodies for albuminuria in murine lupus nephritis; a longitudinal study on plasma and glomerular eluates in MRL/l mice. *Clin Exp Immunol* 1996; 105:132-9.
- Jovelin F, Mostoslavsky G, Amoura Z, Chabre H, Gilbert D, Eilat D, et al. Early anti-nucleosome autoantibodies from a single MRL+/+ mouse: fine specificity, V gene structure and pathogenicity. *Eur J Immunol* 1998; 28:3411-22.
- Van Houten N, Budd RC. Accelerated programmed cell death of MRL-lpr/lpr T lymphocytes. *J Immunol* 1992; 149:2513-7.
- Emlen W, Neibur J, Kadera R. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1994; 152:3685-92.
- Lorenz HM, Grunke M, Hieronymus T, Herrman M, Kuhnel A, Manger B, et al. In vitro apoptosis and expression of apoptosis-related molecules in lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 1977; 40:306-17.
- Licht R, van Bruggen MC, Oppers-Walgreen R, Rijke TP, Berden JH. Plasma levels of nucleosomes and nucleosome-autoantibody complexes in murine lupus: effects of disease progression and lypopolysaccharide administration. *Arthritis Rheum* 2001; 44:1320-30.
- Kramers C, Hylkema MN, van Bruggen MC, van de Lagemaat R, Dijkman HB, Assman KJ, et al. Antinucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement membrane in vivo. *J Clin Invest* 1994; 94:568-77.
- Berden JH, Licht R, van Bruggen MC, Tax WJ. Role

- of nucleosomes for induction and glomerular binding of autoantibodies in lupus nephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; 8:299-306.
13. van Bruggen MC, Walgreen B, Rijke TP, Corsius MJ, Assmann KJ, Smeenk RJ, et al. Heparin and heparinoids prevent the binding of immune complexes containing nucleosomal antigens to the GBM and delay nephritis in MRL/lpr mice. *Kidney Int* 1996; 50:1555-64.
 14. Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, Cacoub P, Amoura I, Musset L, et al. 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: 76-84.
 15. Bruns A, Blass S, Hausdorf G, Burmester GR, Hiepe F. Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2307-15.
 16. Min DJ, Kim SJ, Park SH, Seo YI, Kang HI, Kim WU, et al. Anti-nucleosome antibody: significance in lupus patients lacking anti-double stranded DNA antibody. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20:13-8.
 17. Goetz J. Les anticorps anti-nucleosome dans le lupus systemique. *Path Biol* 2002; 50:581-3.
 18. Cairns AP, McMillan SA, Crockard AD, Meenagh GK, Duffy EM, Armstrong DJ, et al. Antinucleosome antibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:272-3.
 19. Ghirardello A, Doria A, Zampieri S, Tarricone E, Tozzoli R, Villalta D, et al. Antinucleosome antibodies in SLE: a two year follow-up study of 101 patients. *J Autoimmunity* 2004; 22:235-40.
 20. Lepers S, Hachulla E, Leleux E, Hatron PY, Prin L, Dubucquoi S. Interet de la recherche des anticorps anti-nucleosome par technique ELISA dans la diagnostique de la maladie lupique. Etude comparative de quatre coffrets commerciaux. *Pathologie Biologie* 2002; 50:584-90.
 21. Li L, Chen M, Huang DY, Nishioka M. Frequency and significance of antibodies to chromatin in autoimmune hepatitis type I. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15:1176-82.
 22. Massa M, De Benedetti F, Pignatti P, Albani S, Di Fucina G, Monestier M, et al. Anti-double stranded DNA, anti-histone and anti-nucleosome IgG reactivities in children with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1994; 12:219-25.
 23. Benucci M, Gobbi FL, Del Rosso A, Cesaretti S, Niccoli L, Cantini F. Disease activity and antinucleosome antibodies in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2003; 32:42-5.
 24. Ravirajan CT, Rowse L, McGowan JR, Isenberg DA. An analysis of clinical disease activity and nephritis-associated serum autoantibody profiles in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2001; 40:1405-12.
 25. Horak P, Scudla V, Hermanovo Z, Pospisil Z, Faltynek L, Budikova M, et al. Clinical utility of selected activity markers in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*, 2001; 20:337-44.
 26. Burlingame RW, Boey ML, Tarkebaum G, Rubin RL. The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1994; 94:184-92.
 27. Mohan C, Liu F, Xie C, Williams RC Jr. Anti-subnucleosome reactivities in systemic lupus erythematosus (SLE) patients and their first-degree relatives. *Clin Exp Immunol* 2001; 123:119-26.