



ANTINUKLEUSNA ANTITELA U SERUMIMA BOLESNIKA LEČENIH OD AKTIVNE PLUĆNE TUBERKULOZE

ANTINUCLEAR ANTIBODIES IN PATIENTS TREATED FOR ACTIVE PULMONARY TUBERCULOSIS

Svetlana Kašiković Lečić¹, Aleksandar Kerenji², Slobodan Pavlović¹, Vesna Kuruc¹,
Đurđica Radaković¹, Igor Mitić³, Tanja Ilić³

1 Institut za plućne bolesti, Sremska Kamenica,

2 Institut za onkologiju, Sremska Kamenica,

3 Klinika za imunologiju i nefrologiju, Klinički centar Novi Sad

SAŽETAK

U prospektivnom istraživanju obuhvaćeno je 110 bolesnika lečenih od aktivne plućne tuberkuloze i 60 zdravih osoba, dobrovoljnih davalaca krvi. Tehnikom indirektne imunofluorescencije, uz korišćenje kriostatских isječaka pacovske jetre i kulture ćelija HEp-2 ispitivano je prisustvo antinukleusnih antitela (ANA) u serumima ispitanika tokom lečenja bolesti i posle 5 godina od završenog lečenja. Utvrđeno je da se u serumima dela bolesnika lečenih od aktivne plućne tuberkuloze mogu detektovati ANA u niskom titru, uz prisustvo tačkastog i homogenog tipa jedarne fluorescence, s tim da je dominirao tačkasti tip. Nije utvrđena statistički značajna razlika u prisustvu ANA među polovima. Prisustvo ANA u serumima ispitanika nije bilo praćeno kliničkim znacima autoimunskih bolesti. Ne može se isključiti mogućnost da je prisustvo ANA, bar delimično (pored mogućih mehanizama molekulske mimikrije i poliklonske aktivacije limfocita), posledica primene izonijazida.

Ključne reči: autoimunost, tuberkuloza, antinukleusna antitela, izonijazid

SUMMARY:

This prospective study included 110 patients treated for active pulmonary tuberculosis and the control group of 60 healthy subjects, voluntary blood donors. The presence of antinuclear antibodies (ANA) in the patients' serum was examined in the course of the treatment and five years later, applying the method of indirect immunofluorescence and using cryostat sections of the rat liver and Hep-2 cell cultures. A number of examined patients were presented with the serum ANA of a low titer and the nuclear fluorescence of the dotted and homogenous pattern, the former one predominating. No statistically significant difference in the presence of ANA was registered between the sexes. The patients presented with the serum ANA did not develop the clinical symptoms of an autoimmune disease. The presence of ANA in the patients' serum might, at least partially, be due to the applied isoniazide treatment (besides possibly included mechanisms of molecular mimicry and polyclonal lymphocyte activation).

Key words: autoimmunity, tuberculosis, antinuclear antibodies, isoniazide

Pneumon, 2006; Vol 43

Ass mr. sci. dr Svetlana Kašiković Lečić,
specijalista interne medicine, Klinika za tuberkulozu i granulomatozne bolesti
Institut za plućne bolesti, 21204 Sremska Kamenica

UVOD

Hronične bakterijske infekcije mogu da dovedu do poremećaja imunološke tolerancije na više načina: promenom sopstvenih antigena (antigen-skih determinanti) domaćina i formiranjem novih (kako zbog destrukcije sopstvenih tkiva, tako i zbog uticaja lekova koji se koriste u terapiji), molekulskom mimikrijom između domaćinovih i mikrobnih antigena, poliklonalnom aktivacijom limfocita, pojavom autoreaktivnih klonova na odeljene antigene, poremećajima u sekreciji citokina ili disbalansom u antiidiotipskoj mreži (1-5). Najčešće je za nastanak autoimunosti odgovorno istovremeno dejstvo više mehanizama. Svi ovi fenomeni mogu postojati kod tuberkuloznih bolesnika, ali su relativno neispitani parametri. Zbog toga smo se zainteresovali za ispitivanje prisustva ANA u serumima naših bolesnika lečenih od aktivne plućne tuberkuloze.

Cilj našeg istraživanja je bio da utvrdimo da li se u serumima obolelih i lečenih od aktivne, novootkrivene, plućne tuberkuloze mogu detektovati antinukleusna antitela (ANA), kakva je učestalost njihove pojave, njihov titar i tip jedarne fluorescencije. Interesovalo nas je da li postoji međusobna povezanost pojave ANA u serumima obolelih sa primenjenom terapijom i polom ispitanika.

BOLESNICI, MATERIJAL I METODE

U prospektivnoj kliničkoj studiji ispitano je 110 bolesnika lečenih od aktivne plućne tuberkuloze (18). Bolesnici su podeljeni u dve grupe (grupa A i B).

U grupi A je odabrano 70 bolesnika koji su prvi put hospitalizovani u Institutu za plućne bolesti u Sremskoj Kamenici, zbog aktivne, novootkrivene, BK pozitivne plućne tuberkuloze.

U grupi B je odabrano 40 ispitanika koji su pre 5 godina prvi put lečeni od aktivne, BK pozitivne plućne tuberkuloze u Institutu za plućne bolesti u Sremskoj Kamenici. Posle postizanja negativizacije sputuma, dalje lečenje se sprovodilo u regionalnim dispanzerima za plućne bolesti, gde su obavljane redovne kontrole obolelih do završetka lečenja i povremene kontrole nakon tog perioda. Posle prekida uzimanja antituberkuloznih lekova (ATL), ispitanici ove grupe nisu imali recidive bolesti, a pri našem pregledu su bili dobrog opšteg stanja, bez kliničkih, radioloških i bakterioloških znakova aktivnog oboljenja. Ova grupa je formirana sa ciljem da se ispita prisustvo antinukleusnih antitela u serumima bolesnika, posle višegodišnjeg prekida primene ATL.

Zasejavanjem sputuma na *Löwenstein-Jensenove* podloge, pri prijemu na bolničko lečenje, kod svih ispitanika je izolovan *Mycobacterium tuberculosis* kao uzročnik bolesti.

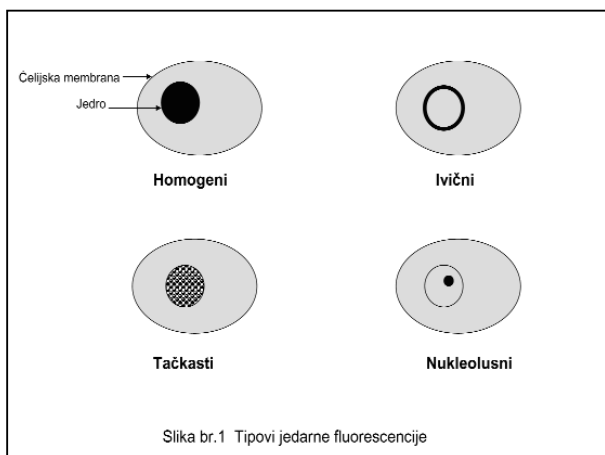
Svi ispitanici su lečeni kombinovanom trojnom antituberkulotskom terapijom (H -izonijazid 5 mg/kg/dan, R-rifampicin 10 mg/kg/dan i Z-pirazinamid 15-30 mg/kg/dan), po šestomesečnom terapijskom režimu (2 HRZ + 4 HR). Tokom lečenja bolesti osim ATL, bolesnici nisu uzimali druge lekove. Kod svih je lečenje bolesti bilo uspešno (poboljšanje opšteg stanja obolelog, postizanje negativizacije sputuma, tj. odsustva *M. tuberculosis* iz sputuma, regresija promena uočenih na radiološkom snimku grudnog koša) i završeno nakon 6 meseci. Na primenjenu terapiju nije došlo do pojave neželjenih efekata (poremećaji funkcije jetre, krvne slike, alergija).

Od svakog ispitanika u grupi A, uzimano je tri puta (kod ispitanika grupe B i kontrolne grupe, samo jedan put) po 5 ml krvi, za imunološke analize i to: u nultom momentu-tj. pre započinjanja lečenja dokazane aktivne plućne tuberkuloze, posle meseca dana od započinjanja terapije, kao i na kraju sprovedenog lečenja (posle 6 meseci). Primenom tehnike indirektno imunofluorescencije (TIIF), ispitivano je prisustvo ANA u serumima bolesnika (6,7,8). Kao antigena podloga za dokazivanje ANA su 4u debeli kriostatski isecci pacovske jetre. Ispitivani serumi su najpre testirani u početnom razblaženju 1:32. Serum bolesnika koji su bili ANA pozitivni u titru 1:32, ispitivani su dalje do razblaženja 1:128. Za ispitivanje prisustva ANA u serumima bolesnika pored tkivnog korišćen je i ćelijski supstrat, tj. kulture HEp-2 ćelija (humane epitelne ćelije karcinoma larinksa) na komercijalnom kitu Quantafluor, firme Kallested iz Pariza. Korišćenjem HEp-2 ćelija mogu se detektovati i antitela protiv onih antigena kojih inače nema na tkivnim supstratima, a koji se mogu zapaziti samo u toku deobe ćelije. U bolesnika koji su imali pozitivan titar ANA vršeno je određivanje i tipa jedarne fluorescencije (slika 1.).

Kontrolnu grupu je sačinjavalo 60 zdravih osoba (30 muškaraca i 30 žena), dobrovoljnih davalaca krvi u Zavodu za transfuziju krvi u Novom Sadu.

Ispitanici su podeljeni na podgrupe sačinjene od muškaraca ili žena da bi se ispitalo da li postoji uticaj pola na rezultate ispitivanih parametara.

Svi ispitanici grupe A i B, kao i ispitanici kontrolne grupe su negirali postojanje neke od autoimunih ili atopijskih bolesti (kako kod njih, tako i kod članova svoje familije), nisu koristili imunosupresivne i dr. lekove, niti primali vakcine i serume u poslednjih godinu dana.



Slika 1. Tipovi jedarne fluorescencije

STATISTIČKE METODE

Za obradu podataka koristili smo t-test. Koristili smo se komercijalnim softverskim paketom EXCEL 5.0 u okviru programa WINDOWS 95. Dobijeni rezultati prikazani su tabelarno.

REZULTATI

U prospektivnom ispitivanju obuhvaćeno je 110 bolesnika lečenih od aktivne plućne tuberkuloze koji su podeljeni u dve grupe: A i B. Kontrolnu grupu je sačinjavalo 60 zdravih osoba.

Na Tabeli 1. je prikazana zastupljenost ispitanika po polu i njihova prosečna starost po ispitivanim grupama.

Tabela 1. Opšte karakteristike bolesnika i njihova prosečna starost po ispitivanim grupama

Grupa	Muški	Prosečna starost (god)	Ženski	Prosečna starost (god)	Ukupno ispitanika
A	49	46,3	21	34,6	70
B	28	44,1	12	36,8	40
Kontrolna	30	44,7	30	35,1	60

Na Tabeli 2. su prikazani rezultati nalaza antinukleusnih antitela u serumima ispitanika.

Tabela 2. Učestalost pojavljivanja ANA u serumima ispitanika

	Ispitanici grupe A						Grupa B	
	Pri prijemu		posle 1 mesec		posle 6 meseci		posle 5 godina	
Auto-At	Broj	%	broj	%	Broj	%	broj	%
ANA	3	4,3	5	7,3	7	14,3	0	0
Br. ispitanika	70		68		49		40	

Primenom tehnike indirektno imunofluorescencije (TIIF) na tkivnom supstratu, utvrđeno je da tokom lečenja antituberkuloticima dolazi do porasta broja bolesnika sa prisutnim ANA u serumu. Nije utvrđena statistički značajna razlika između procenata pozitivnosti ovih autoantitela određivanih tokom lečenja bolesti.

U serumima ispitanika grupe B, kao i u serumima zdravih osoba kontrolne grupe nije utvrđeno prisustvo ANA.

Našim ispitivanjem nije utvrđena statistički značajna razlika u prisustvu ANA među polovima.

Svi serumu su primenom tehnike indirektno imunofluorescencije (TIIF) za određivanje ANA, testirani na tkivnim kriosečcima, u razblaženjima do 1:128. Od ukupno 15 pozitivnih seruma 2 su bila pozitivna do titra od 1:128, a 10 ih je bilo pozitivno do titra 1:64. Tokom lečenja titar antitela se nije menjao, sem kod dva bolesnika na kraju lečenja. Kulturom ćelija HEp-2 potvrđeno je prisustvo ANA u serumima bolesnika kod kojih smo i prethodno na tkivnim kriosečcima uočili njihovo prisustvo. Koristeći kulture ćelija HEp-2 prisustvo ANA je određivano samo u razblaženjima seruma od 1:32, odnosno nisu rađena testiranja seruma u većim razblaženjima (iz finansijskih razloga).

Određivanjem tipova jedarne fluorescencije utvrđeno je da je kod 9 bolesnika postojao tačkasti tip, a kod 6 bolesnika homogeni tip. Ovakav nalaz jedarne fluorescencije je potvrđen i korišćenjem kulture ćelija HEp2.

DISKUSIJA

Infektivni agensi su neki od najvažnijih faktora sredine koji mogu biti povezani sa autoimunošću. Mikroorganizmi kao što su virusi, bakterije i paraziti mogu biti pokretači poremećaja tolerancije i razvoja autoimunske bolesti (1,9). Nizak nivo autoantitela nastaje i kod zdravih osoba tokom imunskog odgovora na strane antigene (10,11). Detekcijom takvih "prirodnih" antitela potvrđuje se ideja da i normalno postoji potencijal za autoreaktivnost. Hronične infekcije mogu biti povezane sa pojavom različitih autoantitela (2). Kod većine osoba, tokom

infekcije, prisustvo autoantitela je asimptomatsko. Po izlečenju infektivne bolesti, autoantitela se brzo gube. U nekim slučajevima su zabeležene autoimunske reakcije od kliničkog značaja (10,12).

Glavni problem kod obolelih od plućne tuberkuloze je u nemogućnosti imunskog odgovora da ispolji baktericidnu funkciju (13). Stoga je sterilizacija lezija zavisna od hemioterapije koja se mora sprovoditi najmanje 6 meseci. Oboleli od plućne tuberkuloze se leče kombinovanom hemioterapijom, koja u većini slučajeva podrazumeva obaveznu primenu izonijazida kao moćnog baktericidnog sredstva (13,14). Poznato je da izonijazid može da indukuje stvaranje ANA kod dela bolesnika koji su ga uzimali tokom lečenja bolesti (15-20). Svi bolesnici obuhvaćeni našim istraživanjem su tokom lečenja plućne tuberkuloze, u sklopu kombinovane terapije lečeni izonijazidom tako da se ne može isključiti mogućnost da je prisustvo ANA, bar delimično (pored mogućih mehanizama molekulske mimikrije i poliklonske aktivacije limfocita), posledica medikacije.

Pojava ANA u serumu bolesnika izazvanih izonijazidom su dokazana, mada u različitim izveštajima sa različitom učestalošću: 4% (21), 10% (22), 11 % (15), 15% (23) 17% (24), 19% (19), 47% (2) i 59% (25). Moguće je da su ove razlike uslovljene razlikama u kriterijumima korišćenim za determinisanje pozitivnosti (15). Istraživanja su pokazala da je incidenca antitela viša među sporim akceleratorima izonijazida, nego među brzim akceleratorima (8,24).

Istraživanjima Cannat-a i Seligmann-a (19) je zaključeno da se ANA pojavljuju kod nekih bolesnika nakon 5 meseci od započinjanja lečenja i iščezavaju 6 meseci po prekidu uzimanja lekova. Ovi rezultati se ne slažu sa našim rezultatima, jer smo ranije utvrdili pojavu ANA u serumima bolesnika. Mirčetić (8) smatra da ANA izazvana lekovima nestaju iz seruma vrlo brzo nakon prekida uzimanja leka koji je indukovao njihovu pojavu u serumu. S obzirom da u grupi bolesnika koji su pre 5 godina lečeni od plućne tuberkuloze (grupa B) nismo utvrdili postojanje ANA u serumima ispitanika, možemo pretpostaviti da su ANA (ukoliko su i postojala kod njih) iščezla, što može biti u saglasnosti sa nalazima spomenutih autora.

Našim ispitivanjem nije utvrđena statistički značajna razlika u prisustvu ANA među polovima. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima pojedinih autora (15), a u suprotnosti sa rezultatima drugih (25) koji nalaze veću prevalencu ANA u žena.

Svi serumi bolesnika su ispitivani na prisustvo ANA u razblaženjima do 1:128. Od ukupno 15 pozitivnih seruma, 2 su bila pozitivna do titra od 1:128, a 10 ih je bilo pozitivno do titra 1:64. Znači, nije dolazilo do porasta titra antitela tokom lečenja bolesti, sem kod dva bolesnika na kraju lečenja. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima

Vasquez-del Mercado (15) koja detektuje ANA u titrovima 1:50 i 1:100 i istraživanjima *Cannat i Seligmann* (19) koji detektuju ANA u serumima bolesnika u titrovima 1:10, 1:50 i 1:100. I u ovim istraživanjima su kod nekih bolesnika titrovi ostali isti, dok je kod drugih došlo do porasta titra. *Dlugovitzky* i saradnici (21) u svojim istraživanjima detektuju ANA u znatno većim titrovima (1:20 do 1:320), što je u suprotnosti sa našim rezultatima.

U našem radu je utvrđeno prisustvo tačkastog i homogenog tipa jedarne fluorescence, s tim da je dominirao tačkasti tip (u odnosu 9:6). Ovakav nalaz jedarne fluorescence je potvrđen i korišćenjem kulture ćelija Hep-2, što je u saglasnosti sa nalazom *Rothfield* i ostalih (18), a u suprotnosti sa nalazima *Dlugovitzky* i saradnika (21) i *Vasquez-del Mercado* (15) kod kojih je dominirao homogeni tip jedarne fluorescence, nad tačkastim tipom.

ZAKLJUČAK

U serumima dela bolesnika lečenih od aktivne plućne tuberkuloze mogu se detektovati ANA u niskom titru. Titar ANA nije rastao tokom lečenja bolesti, sem kod dva bolesnika kod kojih je došlo do porasta titra na kraju lečenja bolesti. Utvrđeno je da tokom lečenja aktivne plućne tuberkuloze dolazi do porasta broja bolesnika sa prisutnim ANA u serumu, ali nije utvrđena statistički značajna razlika između procenata pozitivnosti ovih autoantitela tokom lečenja bolesti. Ispitivanjem ANA u serumima ispitanika utvrđeno je prisustvo tačkastog i homogenog tipa jedarne fluorescence, s tim da je dominirao tačkasti tip. Nije utvrđena statistički značajna razlika u prisustvu ANA među polovima. Nijedan od naših ispitanika sa prisutnim ANA u serumu nije ispoljio kliničke simptome i znake karakteristične za neku od sistemskih bolesti vezivnog tkiva, niti za bolest sličnu lupusu (*lupus like disease*). Ne može se isključiti mogućnost da je prisustvo ANA, bar delimično (pored mogućih mehanizama molekulske mimikrije i poliklonske aktivacije limfocita), posledica primene izonijazida.

LITERATURA

1. Mc Devit HU, Wakeland EK. Autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 647-8.
2. Lindquist KJ, Coleman RE and Osterland CK. Autoantibodies in chronic pulmonary tuberculosis. *J Chronic Dis* 1970; 22: 717.
3. Roitt IM. Autoimmunity and autoimmune disease. In: Roitt IM, Brostoff J and Male DK. *Immunology*. Mosby, London, 1996.

4. Ridgeway WM, Winer HL, Fathman CG. Regulation of autoimmune response. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 946.
5. Falcone M, Sarvetnick N. Cytokine that regulate autoimmune responses. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 670-6.
6. Cavallaro JJ. Laboratory methods for the detection of antinuclear antibodies, a joint effort of the centers for disease control and the arthritis foundation, edited by Cavallaro JJ and Mc Duffe EC Atlanta, Georgia, 1987, 732, 143-84.
7. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J et al. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2000; 124 (1) 71-81.
8. Mirčetić V, Savić-Đurković R, Petrović M, Vukojević P. Antinukleusna antitela. Medicinska knjiga, Beograd, 1995.
9. Shoenfeld Y, Vilner Y, Coates ARM et al. Monoclonal anti-tuberculosis antibodies react with DNA, and monoclonal anti-DNA autoantibodies react with *M. tuberculosis*. *Clin Exp Immunol* 1987; 66: 255-61.
10. Grabar P. Autoantibodies and the physiological role of immunoglobulins. *Immunol Today* 1983; 4:337-40.
11. Stites DR, Terr AI, Parslow TG. B cell development and the humoral immune response. In *Medical Immunology*. Appleton & Lange. Stamford 1993;115-30.
12. Schenfeld Y and Isenberg DA. Mycobacteria and autoimmunity. *Immunol Today* 1988; 9: 178-82.
13. Popovac D. Bolesti pluća. Data Status, Beograd, 1999; 277-350.
14. Pavlović S. Tuberkuloza aktuelni zdravstveni problem. U: Pavlović S. Tuberkuloza u praksi. Institut za plućne bolesti Sremska Kamenica, Novi Sad 1997; 9-13.
15. Vasquez-del Mercado M, Casiano CA, Rubin RL. IgA antihistone antibodies in Isoniazid-treated tuberculosis patients. *Autoimmunity* 1995; 20: 105-11.
16. Sela O, El-Roeiy A, Isenberg DA et al. A common anti-DNA idiotype in sera of patients with active pulmonary tuberculosis. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 50-6.
17. Shoenfeld Y, Isenberg DA, Rauch J et al. Idiotypic cross-reactions of monoclonal human antibodies. *J Exp Med* 1983; 158: 718-30.
18. Rothfield NF, Bierer WF and Garfield JW. Isoniazid induction of antinuclear antibodies. *Ann Intern Med* 1978; 88: 650-2.
19. Cannat A and Seligmann M. Possible induction of antinuclear antibodies by Isoniazid. *Lancet* 1966; 1: 185-87.
20. Demkow U, Zielonka TM, Radomska D et al. Influence of Isoniazid on selected parameters of immunological response. *Pol Merkurisuz Lek* 2000; 7: 27-30.
21. Dlugovitzky D, Torres A, Hourquescos MC et al. Low occurrence of arthritic manifestation in patients with pulmonary tuberculosis. T cell subsets and humoral studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90: 623-8.
22. Siegel M, Lee SL and Peress NS. The epidemiology of drug-induced systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1967; 10: 407-715.
23. Rapoport BL, Morrison RC, Sher R, Dos Santos L. A study of antibodies in chronic mycobacterial infections. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1990; 58: 518-25.
24. Price-Evans DA, Bullen MF, Houston J et al: Antinuclear factors in rapid and slow acetylators patients treated with Isoniazid. *J Med Genet* 1972; 9: 53-6.
25. Alargacon-Segovia D and Fishbein E. Serum immunoglobulins in pulmonary tuberculosis. *Chest* 1971; 60: 133-6.
26. Kašiković-Lečić S. Autoantitela u bolesnika lečenih od aktivne plućne tuberkuloze. Magistarski rad, Medicinski fakultet u Beogradu, 2001.