

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Mirjana D. Gajić-Veljić

**ANTINEUTROFILNA CITOPLAZMATSKA ANTITELA –
ZNAČAJ ZA DIJAGNOZU I PROCENU AKTIVNOSTI
SISTEMSKOG LUPUSA I LUPUSA INDUKOVANOG
LEKOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Mirjana D. Gajić-Veljić

**ANTI-NEUTROPHIL CYTOPLASMIC ANTIBODIES -
IMPORTANCE FOR THE DIAGNOSIS AND
THE ACTIVITY ASSESSMENT OF SYSTEMIC AND
DRUG-INDUCED LUPUS ERYTHEMATOSUS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentor

Miloš Nikolić, redovni profesor, dermatovenerolog, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komisija

1. **Ljiljana Medenica**, redovni profesor, dermatovenerolog, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

2. **Mirjana Šefik-Bukilica**, docent, internista – reumatolog, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

3. **Dragan Jovanović**, redovni profesor, dermatovenerolog, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Prijatna mi je dužnost i veliko zadovoljstvo, da na kraju višegodišnjeg rada na stvaranju doktorske disertacije, izrazim zahvalnost svojim saradnicima i porodici na pruženoj pomoći i podršci.

Pre svih, zahvaljujem se svom mentoru, prof. dr Milošu Nikoliću, na nesebično prenetom znanju još od studentskih dana, na prijateljskom odnosu i strpljenju, stručnim savetima i sugestijama, na ukazanom poverenju i motivaciji da se opredelim za ovu oblast interesovanja.

Posebno i od srca se zahvaljujem prof. dr Branki Bonači-Nikolić na nesebičnoj pomoći i podršci, pruženoj mogućnosti da se bavim ovom divnom temom i radim sa istinskim naučnikom i osobom koja poseduje ogromno znanje i razumevanje ove oblasti i neverovatnu zainteresovanost i radoznalost koja krase samo najveće stvaraoce.

Od srca se zahvaljujem svom prijatelju i najbližem saradniku u izvođenju ovog istraživanja, dr Branislavu Lekiću, osobi koja je po godinama mlada, ali po znanju predstavlja ozbiljnog stručnjaka na polju patologije, dermatologije i statistike, a po upornosti i istraživačkom duhu pravog naučnika. Hvala mu na velikom strpljenju, prenetom znanju, motivaciji i podršci.

Od srca se zahvaljujem i svom učitelju i prijatelju, prof. dr Ljiljani Medenici, što mi je omogućila uslove za rad, što je uvek bila moj oslonac i podrška. Zahvaljujem joj se na nesebičnoj pomoći, prenetom znanju i iskustvu.

Sa zadovoljstvom se zahvaljujem osoblju Imunološke laboratorije Kliničkog centra Srbije na nesebičnoj spremnosti da mi pomognu, na vremenu i trudu koje su uložili tokom izvođenja ovog istraživanja.

Posebno se zahvaljujem osoblju dečijeg odeljenja na divnoj atmosferi tokom višegodišnjeg zajedničkog rada, na prijateljskom odnosu, nesebičnoj podršci i pomoći.

Zahvaljujem se i svim kolegama sa Klinike za dermatovenerologiju koji su me prijateljski podržavali i stimulisali.

Od srca se zahvaljujem svom sinu, malom detetu, ali osobi velikog strpljenja i razumevanja za moj rad, na neizmernoj ljubavi i pažnji. Bez ljubavi, odricanja, vere i podrške svog supruga, bilo bi nemoguće doći do ostvarenja cilja i završetka ovog rada.

Na kraju, neizmerno se zahvaljujem svojim sestrama, svojoj majci i svom ocu i kolegi, na pozitivnom odnosu prema životu i ličnom primeru kako radi istinski predan lekar, što su uvek bili ponosni na mene, verovali u mene i bili moj najveći oslonac u životu.

ANTINEUTROFILNA CITOPLAZMATSKA ANTITELA – ZNAČAJ ZA DIJAGNOZU I PROCENU AKTIVNOSTI SISTEMSKOG LUPUSA I LUPUSA INDUKOVANOG LEKOM

Rezime

Uvod. Cilj studije je bio da se ispita uloga antineutrofilnih citoplazmatskih antitela (ANCA) i aktivnosti serumske DNaze I kod idiopatskog sistemskog lupus erythematosusa (SLE) i lupus-like sindroma (LLS) indukovano propiltiouracilom (PTU).

Metod. Poređena su 142 pacijenta sa idiopatskim SLE i 17 pacijenata sa LLS indukovanim PTU. Ispitan je ANCA profil (mijeloperoksidaza-MPO, proteinaza 3-PR3, elastaza-El, laktoferin-Lf, katepsin G, BPI-*engl.* bactericidal/permeability increasing protein), serološki parametri (anti-dsDNK, anti-extractable nuclear antigens (ENA), anti-nukleozomalna, anti-histonska, anti-C1q, anti-kardiolipinska antitela, komponente komplementa, krioglobulini) i aktivnost serumske DNaze I kod pacijenata sa SLE i LLS indukovanim PTU. Kontrolne grupe su formirane od zdravih osoba i od pacijenata lečenih PTU ali bez LLS. Klinički i serološki je praćeno 25 ANCA pozitivnih SLE i 12 LLS pacijenata tokom 1.8 ± 0.5 i 4.1 ± 2.0 godina.

Rezultati. ANCA su nađena kod 28% pacijenata sa SLE i kod 100% pacijenata sa LLS izazvanim PTU. Pacijenti sa LLS izazvanim PTU znatno češće su imali kutani vaskulitis, a znatno ređe artritis i zahvaćenost bubrega ($p < 0.01$) u odnosu na pacijente sa SLE. ANCA pozitivni SLE pacijenti su češće imali autoimunske hepatitis ($p < 0.05$) i neurološke/psihijatrijske manifestacije ($p < 0.01$), a značajno ređe su imali kutane manifestacije ($p < 0.05$) u odnosu na ANCA negativne pacijente sa SLE. Učestalost hematoloških, nefroloških i artikularnih manifestacija, kao i polioserozitisa, nije se razlikovala kod ANCA pozitivnih i ANCA negativnih pacijenata sa SLE. ANCA su kod pacijenata sa SLE bila monospecifična (77.5%) i to najčešće anti-Lf (52.5%), anti-MPO (47.5%) ili anti-El (15%). Anti-Lf kod pacijenata sa SLE nisu bila udružena sa prisustvom anti-MPO ($p < 0.01$) i anti-El ($p < 0.05$). Kod pacijenata sa LLS indukovanim PTU nađena su

polispecifična ANCA (82.4%) i to najčešće anti-MPO (100%), anti-El (82.4%) i anti-PR3 (52.9%). Anti-Lf kod pacijenata sa SLE su pozitivno korelirala sa titrom anti-dsDNK antitela i sa indeksom aktivnosti bolesti (SLEDAI-2K) ($p < 0.01$), a negativno su korelirala sa koncentracijom C3 i C4 komponenti komplementa ($p < 0.05$). Anti-Lf su češće bila prisutna kod pacijenata sa bubrežnim manifestacijama i poliserozitisom, anti-MPO su bila udružena sa atralgijama ($p < 0.05$), a anti-El sa autoimunskim hepatitisom ($p < 0.05$). Pacijenti sa težom formom GN češće su imali ANCA, i to monospecifična za Lf, dok su pacijenti sa lakšim formama GN češće imali anti-MPO antitela.

Aktivnost DNaze I kod LLS izazvanim PTU je bila značajno niža nego kod SLE pacijenata i zdravih osoba ($p < 0.01$). Prekid PTU terapije je dovodio do porasta aktivnosti DNaze I, mada aktivnost DNaze I nije dostizala nivo aktivnosti zdravih kontrola. U remisiji LLS indukovano PTU, koncentracija anti-MPO je opadala, ali je anti-MPO pozitivnost perzistirala dugo vremena.

Zaključak. Detekcija prisustva i specifičnosti ANCA pomaže u dijagnostici kliničkih i imunoseroloških fenotipova pacijenata sa SLE. Anti-Lf ANCA mogu biti koristan marker za prepoznavanje autoimunskog hepatitisa, bubrežnih manifestacija i poliserozitisa kod pacijenata sa idiopatskim SLE. Monospecifična ANCA imaju senzitivnost od 78% za idiopatski SLE, dok polispecifična ANCA imaju senzitivnost od 82% za LLS izazvan PTU. Polispecifična ANCA su koristan marker za razlikovanje SLE od LLS indukovano PTU.

PTU, kao triger, i niska aktivnost DNaze I, kao predisponirajući faktor, mogu dovesti do LLS. Niska aktivnost DNaze I i prisustvo polispecifičnih ANCA mogu biti važni prognostičko-dijagnostički biomarkeri za LLS indukovano PTU. Praćenje ANCA i aktivnosti DNaze I može sprečiti dugotrajnu ekspoziciju uzročnom leku, nepotrebnu imunosupresivnu terapiju i teške komplikacije LLS.

Ključne reči: antineutrofilna citoplazmatska antitela, sistemski lupus erythematosus, lupus-like sindrom, propiltiouracil, dezoksiribonukleaza I (DNase I), mijeloperoksidaza, elastaza, laktoferin

Naučna oblast: Dermatovenerologija

ANTI-NEUTROPHIL CYTOPLASMIC ANTIBODIES - IMPORTANCE FOR THE DIAGNOSIS AND THE ACTIVITY ASSESSMENT OF SYSTEMIC AND DRUG-INDUCED LUPUS ERYTHEMATOSUS

Abstract

Objectives. To study the roles of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and DNase I activity in idiopathic systemic lupus erythematosus (SLE) and propylthiouracil (PTU)-induced lupus-like syndrome (LLS).

Methods. We compared 142 SLE patients with 17 PTU-induced LLS patients diagnosed from 2008 to 2015. We studied ANCA profile (myeloperoxidase-MPO, proteinase3-PR3, elastase-El, lactoferrin-Lf, cathepsin G, bactericidal/permeability increasing protein); serological parameters (anti-dsDNA, anti-extractable nuclear antigens/ENA, anti-nucleosome, anti-histone, anti-C1q, anti-cardiolipin antibodies, complement components, cryoglobulins; and serum DNase I activity. Healthy persons and patients without LLS treated with PTU comprised the control groups. Twenty five ANCA positive SLE patients and twelve LLS patients were clinically and serologically followed for 1.8 ± 0.5 and 4.1 ± 2.0 years, respectively.

Results. ANCA were positive in 28% SLE patients and 100% PTU-induced LLS patients. Patients with LLS more frequently had cutaneous vasculitis and less frequently had arthritis and renal involvements ($p<0.01$) compared to SLE patients. ANCA-positive SLE patients more frequently had autoimmune hepatitis ($p<0.05$) and neurological/psychiatric manifestations ($p<0.01$), and less frequently had cutaneous manifestations ($p<0.05$) compared with ANCA-negative SLE patients. The frequency of polyserositis, hematological, renal and articular manifestations were not different in ANCA-positive and ANCA-negative patients with idiopathic SLE. In SLE, ANCA were monospecific (77.5%), mostly anti-Lf (52.5%), anti-MPO (47.5%) or anti-El (15%). In SLE patients, anti-Lf autoantibodies were not associated with the presence of anti-MPO ($p <0.01$) and anti-El ($p <0.05$). In PTU-induced LLS, ANCA were polyspecific (82.4%), most commonly anti-MPO (100%), anti-El

(82.4%) and anti-PR3 (52.9%). In SLE, anti-Lf were in positive correlation with the titer of anti-dsDNA antibodies and the disease activity index (SLEDAI 2K) ($p < 0.01$), and in negative correlation with the concentrations of C3 and C4 complement components ($p < 0.05$). Anti-Lf antibodies were more often present in patients with renal manifestations and polyserositis, anti-MPO were associated with arthralgia ($p < 0.05$), and anti-El with autoimmune hepatitis ($p < 0.05$). Patients with severe forms of GN more frequently had ANCA, mostly monospecific anti-Lf, whereas patients with less severe forms of GN more frequently had anti-MPO. PTU-induced LLS patients had lower DNase I activity than SLE patients and controls ($p < 0.01$). After the discontinuation of PTU, DNase I activity increased, but its levels did not reach the values of controls ($p < 0.01$). After the discontinuation of PTU, anti-MPO gradually decreased ($p < 0.01$), but persisted for a long time.

Conclusion. The detection of the presence and specificity of ANCA helps in the diagnosis of clinical and serological phenotypes of patients with SLE. ANCA, primarily anti-Lf, can be a useful marker for autoimmune hepatitis, renal manifestations and polyserositis in patients with SLE. Monospecific ANCA have a sensitivity of 78% for idiopathic SLE, whereas polyspecific ANCA have a sensitivity of 82% for PTU-induced LLS. Polyspecific ANCA are useful markers to differentiate SLE from PTU-induced LLS.

PTU, as a trigger, and low DNase I activity, as a predisposing factor, may lead to LLS. Low DNase I activity and the presence of polyspecific ANCA might be important prognostic and diagnostic biomarkers for PTU-induced LLS. Monitoring of ANCA and DNase I activity may prevent long-lasting exposure to causal drug, unnecessary immunosuppressive therapy and severe complications of LLS.

Keywords: antineutrophil cytoplasmic antibodies, systemic lupus erythematosus, lupus-like syndrome, propylthiouracil, deoxyribonuclease I (DNase I), myeloperoxidase, elastase, lactoferrin

Dermatovenereology

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 IMUNSKI ODGOVOR.....	1
1.1.1. Tolerancija i autoimunost.....	1
1.1.2. Neutrofilni.....	2
1.1.3. Neutrofilne granule.....	4
1.2. NEUTROFILNE EKSTRACELULARNE ZAMKE.....	6
1.2.1. Struktura NETs.....	7
1.2.2. Proces nastajanja NETs.....	8
1.2.3. Uloga NETs.....	9
1.3. DEZOKSIRIBONUKLEAZA.....	15
1.3.1. Uloga DNaze I u patogenezi SLE.....	15
1.4. ANTINEUTROFILNA CITOPLAZMATSKA ANTITELA.....	17
1.4.1. Istorijat.....	17
1.4.2. Detekcija ANCA.....	18
1.4.3. Patogenetski mehanizmi.....	18
1.4.4. ANCA i infekcija.....	19
1.4.5. ANCA i primarni vaskulitisi.....	19
1.4.6. ANCA kod SLE.....	20
1.5. LUPUS ERYTHEMATOSUS.....	21
1.5.1. Klasifikacija LE.....	21
1.6. SISTEMSKI LUPUS ERYTHEMATOSUS.....	22
1.6.1. Patogeneza SLE.....	22
1.6.2. Autoantitela.....	23
1.6.3. ACR kriterijumi za dijagnozu SLE.....	24
1.6.4. Klinička slika SLE.....	26
1.6.5. Indeksi aktivnosti bolesti i oštećenja tkiva kod SLE.....	32
1.7. LEKOM INDUKOVAN LUPUS-LIKE SINDROM.....	33
1.7.1. Epidemiologija.....	34

1.7.2. Patogeneza.....	34
1.7.3. Genetska predispozicija.....	35
1.7.4. Imunski odgovor kod LLS indukovanog lekom.....	35
1.7.5. Klasifikacija.....	39
1.7.6. Antitela kod LLS indukovanog lekom.....	40
1.8 RADNA HIPOTEZA.....	41
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	42
3. PACIJENTI I METODE.....	43
3.1. SELEKCIJA ISPITANIKA.....	43
3.2. INSTRUMENTI MERENJA.....	45
3.2.1. ANCA profil.....	46
3.2.2. Ostali imunoserološki parametri.....	47
3.2.3. Klinički indeks aktivnosti bolesti - SLEDAI-2K.....	48
3.2.4. Aktivnost DNaze I u serumu.....	48
3.3. STATISTIČKA ANALIZA.....	49
4. REZULTATI.....	51
4.1. DEMOGRAFSKI PODACI, KLINIČKI I IMUNOSEROLOŠKI PARAMETRI PACIJENATA SA IDIOPATSKIM SLE I LEKOM INDUKOVANIM LLS.....	51
4.1.1. Demografski podaci pacijenata sa SLE i PTU-indukovanim LLS.....	51
4.1.2. Kliničke manifestacije pacijenata sa SLE i PTU-indukovanim LLS.....	51
4.1.3. Imunoserološki parametri kod pacijenata sa SLE i PTU-indukovanim LLS	53
4.1.4. ANCA profil kod pacijenata sa SLE i PTU-indukovanim LLS.....	54
4.2. DEMOGRAFSKI PODACI, KLINIČKI I IMUNOSEROLOŠKI PARAMETRI PACIJENATA SA IDIOPATSKIM SLE.....	57
4.2.1 Demografski podaci ANCA pozitivnih i ANCA negativnih SLE pacijenata .	57
4.2.2. Kliničke manifestacije pacijenata sa idiopatskim SLE.....	58
4.2.3. Imunoserološki parametri pacijenata sa idiopatskim SLE.....	59
4.2.4. ANCA profil kod pacijenata sa idiopatskim SLE.....	61
4.2.5. Kliničke, imunoserološke karakteristike i ANCA profil kod novonastalih i prethodno lečenih SLE pacijenata.....	63

4.2.6. Kliničke, imunoserološke karakteristike i ANCA profil kod novonastalih i prethodno lečenih ANCA pozitivnih SLE pacijenata	67
4.2.7. Kliničke, imunoserološke karakteristike i ANCA profil kod anti-MPO pozitivnih i anti-MPO negativnih ANCA pozitivnih SLE pacijenata	69
4.2.8. Kliničke, imunoserološke karakteristike i ANCA profil kod anti-El pozitivnih i anti-El negativnih SLE pacijenata	73
4.2.9. Kliničke, imunoserološke karakteristike i ANCA profil kod anti-Lf pozitivnih i anti-Lf negativnih SLE pacijenata	74
4.2.10. Kliničke manifestacije u odnosu na ANCA profil kod SLE pacijenata	77
4.2.11. Imunoserološki parametri i ANCA profil u odnosu na stepen težine GN. 79	
4.2.12. Imunoserološki parametri i ANCA profil kod 25 ANCA pozitivnih SLE pacijenata u praćenju.....	81
4.2.13. Korelacije imunoseroloških parametara i stepena aktivnosti bolesti	82
4.3. POREĐENJE KLINIČKIH I IMUNOSEROLOŠKIH KARAKTERISTIKE KOD ANCA POZITIVNIH PACIJENATA SA SLE I LLS INDUKOVANIM LEKOM.....	93
4.3.1. Kliničke manifestacije ANCA pozitivnih SLE i LILLS pacijenata	93
4.3.2. Imunoserološk parametri ANCA pozitivnih SLE i LILLS pacijenata.....	94
4.3.3. ANCA profil kod pacijenata sa ANCA pozitivnim SLE i LILLS	95
4.3.4. Imunoserološki parametri aktivnog PTU-indukovanog LLS i LLS u remisiji	98
4.3.5. Senzitivnost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost ANCA	100
4.4. AKTIVNOST DNaze I KOD PACIJENATA SA SLE I PTU-INDUKOVANIM LLS	104
5. DISKUSIJA.....	106
6. ZAKLJUČCI.....	124
7. LITERATURA.....	126

1. UVOD

1.1 IMUNSKI ODGOVOR

Imunski odgovor predstavlja koordiniranu reakciju imunskog sistema protiv infekcije i drugih stranih agenasa. Poremećaj imunskog sistema koji dovodi do defekta imunskog odgovora odgovoran je za osetljivost organizma prema virusima, bakterijama, gljivicama i parazitima. Međutim, imunski odgovor je sposoban da prouzrokuje i oštećenje. Mnoge poznate bolesti su izazvane nekontrolisanim i prekomernim imunskim odgovorom (1).

1.1.1. Tolerancija i autoimunost

Iako je imunski sistem sposoban da prepozna milione stranih antigena, normalno ne reaguje na sopstvene antigene. To se dešava zbog tolerancije sopstvenih antigena (leukociti koji ekspimiraju receptore za sopstvene antigene, nakon prepoznavanja tih antigena bivaju ubijeni ili inaktivisani). Ovaj fenomen naziva se „tolerancija. Kao posledica sloma tolerancije na sopstvene antigene dolazi do razvoja autoimunske bolesti. Autoimunost se odlikuje imunskim odgovorom na sopstvene antigene. Autoimunost se razvija kada antitela i/ili T-limfociti reaguju na sopstvene antigene i napadaju tkiva gde su ti antigeni prisutni. Ako ovi limfociti susretnu sopstvene antigene tokom sazrevanja u kostnoj srži i timusu, tada limfociti koji reaguju na sopstvene antigene bivaju uništeni. Čak i ako limfociti koji reaguju na sopstvene antigene završe sazrevanje, oni se susretnu sa sopstvenim antigenima u perifernim tkivima, što dovodi do njihove smrti ili permanentne inaktivacije. Kolekcija limfocita zdrave individue je „očišćena“ od ćelija koje su sposobne da reaguju na sopstvene antigene. Mnogi tipovi inflamacije su izazvani abnormalnim imunskim odgovorom. Bolesti izazvane abnormalnim imunskim odgovorom, a kod kojih je inflamacija važna komponenta, nazivaju se imunski posredovane inflamatorne bolesti (2).

Međutim, kod pojedinih osoba dolazi do gubitka tolerancije, tako da T- i B-limfociti sposobni da reaguju na sopstvene antigene prežive, bivaju aktivisani i sa svojim produktima (antitelima) napadaju tkiva u kojima su ovi antigeni prisutni. Nije potpuno poznato zašto dolazi do gubitka tolerancije kod ljudi. Verovatno je u osnovi kombinacija naslednog faktora i okidača iz spoljašnje sredine, što dovodi do oslobađanja sopstvenih antigena i aktivacije specifičnih limfocita. Kod autoimunskih bolesti, apoptotski izmenjeni hromatinski antigeni su glavni okidači za gubitak tolerancije (3).

Kliničke studije sugerišu da hronično ili ponavljano izlaganje sopstvenom antigenu u tkivima dovodi do prigušivanja patološkog autoimunskog odgovora, što je način ublažavanja inflamatornog oštećenja i očuvanja funkcije (4).

1.1.2. Neutrofilni

Polimorfonuklearni neutrofilni leukociti (PMN) ili neutrofilni granulociti su terminalno diferentovane ćelije koje predstavljaju važnu komponentu urođenog imuniteta i primarnu odbranu od infekcije. Homeostazu održava njihovo kontinuirano oslobađanje iz kostne srži. Više od 50% kostne srži je angažovano u produkciji neutrofila. Neutrofilni slobodno cirkulišu krvnim sudovima i u toku akutne inflamacije bivaju brzo regrutovani za odbranu na mestu inflamacije, kao odgovor na hemotaksijske faktore oslobođene od strane patogena ili ćelija domaćina. Na mestu inflamacije, aktivisan neutrofil stiče sposobnost da uništi patogeni agens. Kako bi se postigao cilj, neutrofil primenjuje brojne mehanizme, među kojima su najvažniji fagocitoza, oslobađanje litičkih enzima iz granula (degranulacija) i produkcija reaktivnih metabolita kiseonika (5). Pored produkata mikroorganizama, i drugi stimuli (npr. deponovanje imunskih kompleksa u tkivima) mogu indukovati respiratorni prasak, povećavajući inflamaciju i angažovanje inflamatornih ćelija (6).

Imunski odgovor posredovan neutrofilima je multipli proces koji se, inicijalno, karakteriše adhezijom granulocita za zid krvnih sudova, zatim ekstravazacijom i migracijom u inflamirano tkivo, i na kraju, fagocitovanjem i destrukcijom mikroorganizama koji su izvršili napad (7). Tokom migracije ka inflamiranom

tkivu, neutrofilu učestvuju u složenoj dvosmernoj interakciji sa makrofagima, dendritičnim ćelijama (DĆ), ćelijama ubicama (*engl.* natural killer cells) (NK), limfocitima i mezenhimalnim stem ćelijama i tako utiču i na urođeni i na stečeni imunski odgovor. Neutrofil može da modifikuje sazrevanje DĆ i tako utiče na proliferaciju i polarizaciju T limfocita. Takođe, neutrofilu imaju uticaj i na B limfocite preko efekta citokina, uključujući izmenu klase imunoglobulina, utičući na produkciju antitela (1).

Neutrofilu mogu imati i imunoregulatornu ulogu i na periferiji i u limfnom čvoru tako što sintetišu solubilne medijatore i receptore koji igraju ulogu mamaca. Odlaganje apoptotske uloge neutrofila je važan korak u rezoluciji inflamacije (8). Dodatno, oni doprinose kolateralnom tkivnom oštećenju tokom inflamacije. Makrofagi, pored sposobnosti intracelularnog ubijanja mikroorganizama, imaju sposobnost i ekstracelularnog ubijanja inficirane ili izmenjene sopstvene ciljane ćelije. Osim toga, makrofagi doprinose tkivnoj reparaciji i igraju ulogu antigen prezentujućih ćelija, što je potrebno za indukciju specifičnog imunskog odgovora (9).

Neutrofilu čine 50-60% leukocita periferne krvi odrasle jedinke. PMN, pored segmentnog jedra, mogu biti identifikovani i prisustvom antigena CD66 na svojoj površini. Zreo neutrofil je manji od monocita i ima dve jasno definisane morfološke karakteristike: oblik jedra i citoplazmatske granule. Jedro se sastoji od nekoliko segmentata, a svaki segment je povezan hromatinskim filamentima. Karakteristično je prisustvo granula i sekretornih vezikula u citoplazmi, što ih razdvaja od mononuklearnih leukocita ili agranulocita. Granule i sekretorne vezikule su posebna kategorija citoplazmatskih organela koje nastaju tokom diferenciranja i sazrevanja neutrofila. Dobro kontrolisan redosled u mobilizaciji sekretornih vezikula i granula pruža objašnjenje za postepeni prelaz neaktivisanog granulocita periferne krvi u metabolički aktivnu destruktivnu ćeliju na mestu inflamacije (3). Dizbalans u aktivnosti proteaza neutrofila i inhibitora serumskih proteaza, pod imunoregulatornim dejstvom citokina, jedan je od mogućih patogenetskih faktora u razvoju autoimunskih bolesti (10).

Imajući u vidu morfološke i funkcionalne osobine neutrofila, jasno je da njegovu fiziološku zaštitnu ulogu obezbeđuje definisan redosled u aktivaciji. Neadekvatno snažni aktivacioni signali iz sistemske cirkulacije remete intraćelijske regulacione mehanizme neutrofila. Na taj način proteolitički i oksidativni potencijal kojim raspolaže neutrofil čine patogenetsku osnovu mnogih obojenja. Posebno je značajna njihova uloga u patogenezi autoimunskih oboljenja, pre svega vaskulitisa.

1.1.3. Neutrofilne granule

PMN imaju četiri vrste granula: 1) primarne (azurofilne) granule, 2) sekundarne (specifične) granule, 3) tercijarne (gelatinase) i 4) sekretorne vezikule.

Veliki broj stimulusa indukuje degranulaciju neutrofila, uključujući C51 komponentu komplementa, lipopolisaharid, faktor aktivacije trombocita i faktor nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor - TNF). Neutrofili takođe eksprimiraju Toll-like receptore TLR1-TLR10, izuzimajući TLR3, koji im omogućavaju da pokrenu mnoge potencijalno važne imunske odgovore (11).

Primarne granule nastaju u najranijim fazama diferentovanja neutrofila, sadrže niz snažnih antibakterijskih molekula, kao što su katjonski proteini (baktericidni protein koji povećava permeabilnost (*engl.* bactericidal/permeability increasing protein - BPI)) i defenzini koji su sposobni da dovedu do smrti bakterija, zatim proteolitičke enzime kao što su elastaza (El) i katepsin-G (Cat-G), i lizozime koji mogu da oštete zid bakterijskih ćelija. Važna komponenta primarnih granula je i proteinaza 3 (PR3) koja zbog izrazite elastinolitičke sposobnosti može izazvati destrukciju tkiva (12).

Najvažnija komponenta azurofilnih granula je mijeloperoksidaza (MPO) koja je uključena u produkciju baktericidnih jedinjenja. Tokom procesa degranulacije aktivisanog neutrofila oslobađaju se slobodni radikali i litički enzimi koji dovode do indukcije nekroze i apoptoze endotelnih ćelija. MPO je hem protein koji dovodi do stvaranja hipohlorne kiseline (HOCl), veoma toksične supstancije koja je snažan oksidans i moćan antimikrobni agens. MPO sadrži definisanu hem

grupu i koristi vodonik peroksid (H₂O₂) kao akceptor elektrona u katalizi oksidativnih reakcija. Produkcija HOCl utiče na katalitičku aktivaciju MPO tako što dovodi do destrukcije hema, formiranja inaktivnog MPO kompleksa i stvaranja slobodnih radikala. Neravnoteža između slobodnih radikala i sistema antioksidativne zaštite, odnosno oksidativni stres, dovodi do oštećenja molekula. Pod dejstvom slobodnih radikala dolazi do oštećenja na nivou DNK, oksidacije lipida i oksidacije aminokiselina u proteinima (13).

Među molekulima primarnih granula je i grupa alarmina, koji imaju sposobnost da rapidno angažuju antigen prezentujuću ćeliju (APC) i pokrenu urođeni i stečeni imunitet (14). Neutrofilni alarmini obuhvataju brojne humane antimikrobne peptide kao što su α -defenzini i katelicidin. Katelicidin peptid LL-37, nastao proteolitičkim cepanjem C-terminalnog antimikrobnog domena hCAP18 je hemotaksičan za brojne leukocite. Dodatno, neutrofilni sintetišu i eikosoide i brojne inflamatorne citokine (interferon (IFN)-alfa i drugi interferoni tip I) kao odgovor na određene stimulse (faktor stimulacije kolonija granulocita ili putem dsRNK signalnog puta (1, 15).

Sekundarne ili specifične granule koje sekretuju zreli PMN, sadrže niz enzima i proteina među kojima je najvažniji laktoferin (Lf). Lf u mikromolarnim koncentracijama pokazuje mikrobicidnu aktivnost prema bakterijama i gljivicama (16). Vezujući gvožđe, koje je od esencijalne važnosti za ishranu bakterija, Lf sprečava rast bakterija. Pored Lf, sekundarne granule sadrže i lizozim i nikotinamid adenin dinukleotid (NADH), koji su uključeni u stvaranje toksičnih produkata kiseonika. Gvožđe učestvuje u katalizi produkcije hidroksilnih radikala iz superoksida i hidrogen peroksida i tako može izazvati oštećenje endotelijalnih ćelija posle neutrofilne aktivacije. Vezivanje Lf za anti-Lf antitela povećava stepen i dužinu produkcije hidroksilno-kiseoničnih formacija od strane granulocita. Lf je jedan od proteina koji vezuju slobodno gvožđe i na taj način vrše inhibiciju stvaranja opasnih radikala i zaštitu ćelije od oštećenja (17).

U zrelijama odnos sekundarnih u odnosu na primarne granule je 3:1. U uslovima infekcije sa ubrzanim sazrevanjem neutrofila u njihovoj citoplazmi raste broj azurofilnih granula koje se opisuju kao "toksične" granule. Cirkulišući

PNL bivaju aktivisani pod dejstvom hemotaksičnih supstanci i menjaju funkcionalne osobine. Aktivisan neutrofil povećava adhezivnost za endotelne ćelije, dobija sposobnost usmerene migracije (hemotakse), dijapedeze, fagocitoze, degranulacije i produkcije slobodnih radikala.

1.2. NEUTROFILNE EKSTRACELULARNE ZAMKE

Za vreme fagocitoze antimikrobni agensi dobijeni aktivnošću neutrofilnih granula i reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. reactive oxygen species) (ROS) obezbeđuju uslove za uništenje patogena (izlažu ih proteazama, fosfolipazama i katjonskim peptidima) (18). Takođe, neutrofil može da imobilise patogena ekstracelularno oslobađanjem neutrofilnih ekstracelularnih zamki (engl. neutrophil extracellular traps) (NETs). NETs su zamke sačinjene od ekstracelularnih vlakana, u čiji sastav ulazi DNK i brojni baktericidni proteini (MPO, neutrofilna El, histoni). Molekuli koje oslobađaju neutrofili, uključujući i MPO, El i Cat-G, takođe imaju važnu ulogu u aktivaciji urođene imunosti i produkciji inflamatornih citokina. Proces nastajanja NETs je poseban tip ćelijske smrti neutrofila – NETosis (19). Ovaj proces je pokrenut različitim stimulima i karakteriše se aktivnim oslobađanjem hromatinskih vlakana koji sadrže antimikrobne peptide koji mogu zaustaviti i ubiti mikroorganizme. Ovo se postiže translokacijom neutrofilne El iz primarnih granula u nukleus. Tu se parcijalno razgrađuju specifični histoni i zajedno sa MPO i reaktivnim jedinjenjima kiseonika, dovode do dekondezacije hromatina i oslobađanje DNK iz ćelije. Apoptotski izmenjeni hromatinski antigeni su glavni okidač za gubitak tolerancije kod autoimunskih bolesti (3, 20).

NETs stvaraju neutrofili usled kontakta sa brojnim mikroorganizmima (bakterije, virusi, gljivice, paraziti), aktivisanim trombocitima, ili pod uticajem brojnih inflamatornih stimula ili hemijskih jedinjenja (5). Glavna funkcija NETs je zarobljavanje i uništavanje patogenih agenasa. Pri tome, ovaj proces je praćen dramatičnim promenama morfologije ćelija. Glavne komponente NETs, DNK i antimikrobni proteini neutrofilnih granula, određuju njihova antimikrobna

svojstva. Patogeni, zarobljeni u ovim zamkama, bivaju uništeni oksidativnim i neoksidativnim mehanizmima. Takođe, utvrđeno je da hromatin i proteaze oslobođene u cirkulaciju za vreme formiranja NETs, mogu da regulišu prokoagulantne i protrombotičke faktore i na taj način učestvuju u nastanku tromba u krvnim sudovima. Proces nastajanja ovih zamki, nazvan NEToza, predstavlja poseban tip programirane ćelijske smrti, različit od apoptoze i nekroze (21). Apoptoza se karakteriše kondenzacijom nuklearnog hromatina, DNK fragmentacijom bez dezintegracije membrane (22). Nekroza se karakteriše izloženošću fosfatidilserinu tokom rane faze, potom edemom i pucanjem ćelije, oštećenjem i rupturom plazmamembrane bez dezintegracije membrane jedra. Programirana NEToza, sa druge strane, pokazuje dezintegraciju omotača jedra, bez DNK fragmentacije, gubitak unutrašnjih membrana i organela, i potom, mešanje nuklearnih i citoplazmatskih komponenti (22).

1.2.1. Struktura NETs

Najvažnije obeležje specifično za NETs je prisustvo vlakana neutrofilne nuklearne DNK u vanćelijskom prostoru. NETs se sastoje od nuklearne DNK, histona i granularnih proteina. NETs su fragilne kompleksne strukture sastavljene od glatkih niti, prosečno 15-25 nm u prečniku, koje predstavljaju lanac sastavljen od hromatina (23). Visoko rezolutivnom scanning elektronskom mikroskopijom (SEM) niti se sastoje od globula različite debljine od 30 do 50 nm (23). Sastoje se od multiplih katelicidin antimikrobnih proteina koji vode poreklo iz neutrofilnih granula. Po nekoliko niti može biti uvijeno u tzv. „kablove“ dijametra do 100 nm. Ovi kablovi potom formiraju kompleks od trodimenzionalnih struktura koje je, upotrebom SEM, teško razlikovati od mreže fibrina (24). Analizom segmenata NETs pomoću transmisiona elektronske mikroskopije (TEM) vidi se da vlakna nisu okružena membranama (5). Činjenica da su niti lepljive zbog njihovog elektrostatičkog naboja i da se protežu preko područja od nekoliko mikrona, čini ih veoma efikasnim u hvatanju i ubijanju mikroorganizama (25, 26).

Iako je DNK glavna strukturna komponenta NETs, oko 70% NETs čine histoni (27). Histoni jezgra i spojnice mogu biti nađeni u NET (H1, H2A, H2B, H3, H4), mada u enzimski prerađenom obliku. NET globuli sadrže proteine i enzime iz primarnih (azurofilnih) granula (Ei, Cat-G, MPO, BPI), sekundarnih (specifičnih) granula (Lf), i tercijarnih granula neutrofila (želatinaza ili MMP-9, proteini prepoznavanja peptidoglikana (engl. peptidoglycan recognition proteins) (PGRPs) (28, 29). Citoplazmatske komponente, kao što je kalprotektin, retko se nalaze u NETs (27).

Ovi proteini ispoljavaju različite funkcije (30): MPO je odgovorna za stvaranje mikrobicidne HOCl; serin proteaze (Ei, Cat-G, PR3, triptaza, neutrofilna serin proteaza 4 (NSP4) (31) su sposobne da inaktiviraju bakterije cepanjem njihovih faktora virulencije (5); katelicidin LL37, BPI, defenzin i histoni mogu dezintegrirati ćelijsku membranu patogena narušavajući njihovu vitalnost (32, 33); kalprotektin (27, 34), kalgranulin i Lf heliraju jone koji su neophodni za rast mikroorganizama, zajedno čineći NETs efikasnim protiv praktično svih vrsta patogena.

1.2.2. Proces nastajanja NETs

NEToza je kompleksan proces koji se razlikuje u zavisnosti od stimulansa i praćen je značajnim morfološkim promjenama neutrofila koji na kraju dovodi do smrti ćelije (35). Nekoliko faktora je uključeno u proces NEToze. U zavisnosti od momenta formiranja NETs, uloge produkcije ROS i vrste stimulansa, razlikuje se konstrukcija ovih zamki i uloga u ćelijskoj smrti (36).

Ustanovljeni su najvažniji procesi tokom formiranja NETs. Prvo, tokom aktivacije neutrofilni proizvode visok nivo ROS tokom aktivnosti NADPH oksidaze (21). ROS predstavljaju inicijatore stvaranja NETs. ROS nastaju kao prirodni produkt normalnog metabolizma kiseonika. Nivo ROS dramatično raste što može dovesti do oštećenja ćelijske strukture. Kumulativno, ovo je poznato kao oksidativni stres. Da bi došlo do formiranja NETs, aktivirani neutrofilni prolaze kroz dramatične morfološke promjene (37, 38). Ubrzo nakon aktivacije, nukleusi PMN gube svoje lobulose, dolazi do dekondezacije hromatina, unutrašnje i

spoljašnje membrane jedra se progresivno razdvajaju, a istovremeno i dezintegrišu. Potom, nakon jednog sata, zbog dezintegracije omotača jedra, sadržaj jedra, citoplazme i citoplazmatskih granula se slobodno meša. Posle, prosečno oko četiri sata, ćelije se zaokružuju, potom kontrahuju do rupture ćelijske membrane i izbacivanja unutrašnjih komponenti u ekstracelularni prostor (21, 23). U zavisnosti od podsticajnog stimulansa, samo određen procenat aktiviranih neutrofila proizvodi NETs (21).

Drugi važan korak u modifikaciji histona i nastanku NETs je citrulinacija histona posredovana peptidilarginin deiminazom 4 (PAD4). Ovaj enzim je član PAD familije koja se sastoji od 5 izotipova. Samo PAD4 poseduje signal za jedro. Citrulinacija histona H3 igra važnu ulogu u dekondenzaciji hromatina tokom NEToze (38). Nakon stimulacije, hromatin neutrofila podleže dekondenzaciji, što je praćeno mešanjem euhromatina i heterohromatina (21). Kao rezultat svega navedenog, omotač jedra je uništen i integritet ćelijske membrane je izgubljen. Ovo dovodi do rapidnog oslobađanja strukture slične mreži koja sadrži DNK. (38).

Ovaj proces je posredovan enzimima azurofilnih granula neutrofila – neutrofilna El i MPO. El je sposobna da razgrađuje histonske spojnice H1 i histone jezgra, što dovodi do dekondenzacije hromatina, što je potpomognuto MPO i nezavisno od enzimatske aktivnosti drugih enzima (39). Proces pucanja ćelijske membrane i oslobađanje NETs predstavlja novi tip ćelijske smrti neutrofila (37). S obzirom da su drugi tipovi ćelija (mastociti, bazofili, makrofagi) takođe sposobni da formiraju ekstracelularne zamke (engl. extracellular traps (ETs)), ovaj novi odbrambeni mehanizam se generalno naziva EToza i o njemu se još uvek nedovoljno zna (40).

1.2.3. Uloga NETs

Kompleksi DNK i proteina neutrofilnih granula učestvuju u patogenezi brojnih bolesti. Nova istraživanja su pokazala da specifičnom destrukcijom neutrofila nastaju neutrofilne ekstracelularne zamke (engl. neutrophil extracellular traps, NETs) koje imaju centralni značaj u patogenezi hroničnih imunoinflamatornih

oboljenja. NETs su strukture sačinjene od vanćelijskih DNK vlakana prepunih antimikrobnih citoplazmatskih proteina, među kojima je i mijeloperoksidaza. Proces nastajanja NETs je poseban tip ćelijske smrti neutrofila (engl. NETosis) i karakteriše se aktivnim oslobađanjem hromatinskih vlakana koji sadrže antimikrobne peptide. Ovaj proces je urođeni odbrambeni mehanizam u borbi protiv mikroorganizama. Međutim, NETs su detektovani i kod MPA u odsustvu infektivnog agensa (41). Na osnovu svega ovoga, pretpostavlja se da perzistiranje MPO kod PTU-indukovanih protrahovanih NETs može biti prepoznato kao autoantigen od strane imunskog sistema (42). Međutim, većina pacijenata sa MPA razvija bolest bez PTU i drugih srodnih lekova. Znači da postoje mehanizmi, nezavisni od PTU, koji mogu uticati na nastanak i regulaciju NETs.

1.2.3.1. NET antimikrobno dejstvo

NETs su sposobne da zarobe skoro sve tipove patogena, čak i one koji su toliko veliki da ne mogu da budu fagocitovani, kao što su gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, kvasnice, virusi i protozoe (43). Zarobljavanje patogene u DNK vlakna sprečava širenje mikroorganizama i obezbeđuje veću koncentraciju antimikrobnih faktora na mestu infekcije (23). Dolazi do interakcije između površine patogena i komponenti NETs. Antimikrobno dejstvo ispoljavaju proteini obe vrste citoplazmatskih granula, ne samo neutrofilna El, histoni i MPO, već i PR3, Lf, Cat-G, kalprotektin i antimikrobni peptidi kao što su defenzin i LL37 peptid izveden iz katjonskog antimikrobnog proteina (27). Neutrofilna El i PR3 mogu da inaktivišu i unište patogeni agens cepajući njihove faktore virulencije (23). LL37 i histoni mogu da dezintegrišu ćelijsku membranu patogena dovodeći u pitanje njihovu održivost (32). Aktivnost MPO je od esencijalne važnosti za uništenje *Staphylococcus aureus* (36), ali je zato rast gljivica usporen zbog dejstva Lf i kalgranulina (27, 44).

Međutim, NETs nisu savršene i pojedini patogeni su evoluirali i razvili mehanizme da izbegnu ovu vrstu programirane ćelijske smrti. Ovakvi mehanizmi, otkriveni kod infekcije *S. aureus* i *S. pyogenes*, zasnivaju se na

sekreciji endonukleaza koje razaraju DNK (45). Takođe, patogeni mogu izbeći ove zamke menjanjem naelektrisanja njihove površine ili produkcijom kapsule kao kod infekcije *S. pneumoniae* (29).

1.2.3.2. NETs i inflamacija

U toku formiranja NETs, pored antibakterijskog dejstva, dolazi i do patoloških efekata. NETs su detektovane i u toku hroničnih inflamatornih bolesti (ateroskleroza), autoimunskih bolesti (SLE), raznih formi vaskulitisa, tromboze, akutnog respiratornog distres sindroma (ARDS) i sindroma akutnog plućnog oštećenja (engl. acute lung injury, ALI), cistične fibroze i karcinoma. Ove strukture koje sadrže DNK i antimikrobne proteine i proteaze, predstavljaju podlogu za dodatne signale ili interakcije sa komponentama krvi i tkiva. Studije koje su se bavile citotoksičnošću ovih zamki prema endotelnim i epitelnim ćelijama, ukazale su na histone, MPO, El i Cat-G, kao glavne komponente NETs uključene u destrukciju tkiva. Takođe, utvrđeno je da su pluća glavni ciljni organ, s obzirom da neutrofili borave u plućima duže nego u drugim organima (46).

1.2.3.3. NETs i plućne bolesti

Kod AIL/ARDS pokrenutih infekcijom ili kod sterilnog oštećenja pluća dolazi do aktivacije i masivne migracije neutrofila u alveolarni prostor, koje su kontrolisane od strane hemokina elitelnih ćelija, makrofaga i samih neutrofila (47). Visoka koncentracija faktora stimulacije u alveolarnom prostoru podstiče aktivaciju neutrofila i oslobađanje NETs. Takođe, antibakterijsko i proinflamatorno dejstvo NETs dokazano je i kod cistične fibroze. Osim mutacije odgovorne za poremećaj transporta jona Na i Cl kroz epitelne ćelije koji dovodi do dehidracije, porasta viskoziteta mukusa i otežanog odlaganja mukusa iz vazdušnih puteva, za visok viskozitet mukusa odgovorno je i prisustvo DNK u sputumu pacijenata sa CF, koji korelira sa visokom koncentracijom neutrofila i akumulacijom NETs u plućima CF pacijenata. Veliki broj neutrofila dovodi do hronične neutrofilne inflamacije, uglavnom izazvane hroničnom bakterijskom i virusnom infekcijom (48, 49).

1.2.3.4. NETs i autoimunske bolesti

Autoimunske bolesti kao što su vaskulitisi malih krvnih sudova i SLE su primeri patološke strane NET produkcije i njihove neefikasne eliminacije (50). Iako je razvoj autoimunskih bolesti veoma kompleksan proces, proces ekstracelularne prezentacije intracelularnih antigena generalno je prihvaćen kao primarni korak u nastanku autoimunskog odgovora i produkciji autoantitela.

Vaskulitisi malih krvnih sudova (engl. small vessel vasculitis, SVV) su grupa sistemskih autoimunskih bolesti kod kojih postoji hronična inflamacija malih krvnih sudova u plućima, bubrezima ili koži, i prisustvo antineutrofilnih citoplazmatskih antitela (ANCA). Glavni ciljni antigen za ANCA je MPO, što dovodi do razvoja mikroskopskog poliangiitisa (MPA), i PR3, što dovodi do razvoja granulomatoze sa poliangiitisom (GPA) (ranije Wegenerova granulomatoza) (41, 51). Osim toga, ustanovljeno je da vezivanje ANCA za MPO i PR3 dovodi do aktiviranja neutrofila i pokretanja NEToze (41). Uspostavljanje ANCA-MPO kompleksa, takođe, aktivira mijeloidnu dendritičnu ćeliju. Lečenje primenom DNaze, ne samo da inhibiše nastanak NETs, već sprečava inflamaciju krvnih sudova, što potvrđuje učešće NETs u oštećenju malih krvnih sudova i razvoju SVV (50).

1.2.3.5. NETs i SLE

Neutrofilni kod lupusa imaju snižen fagocitni kapacitet. Oni bivaju aktivisani intravaskularno autoantitelima i nukleozomima i ispoljavaju tendenciju da formiraju agregate. Nivo različitih baktericidnih proteina sintetisanih i oslobođenih iz aktivisanih neutrofila je povišen u serumu pacijenata sa lupusom. Kod SLE postoji povećan broj apoptotskih neutrofila koji je povezan sa aktivnošću bolesti i nivoom anti-dsDNK antitela.

I kod SLE dolazi do aktivacije neutrofila i produkcije NETs (37). Ovi rezultati koreliraju sa povišenim nivoom cirkulišuće DNK u plazmi SLE pacijenata, kao i sa prisustvom antitela protiv proteina vezanih za NETs (52). Više od 70% NET komponenti su potentni autoantigeni kod SLE i drugih autoimunskih bolesti (53).

Skorije studije ukazuju na patološke NET formacije, kao i smanjen klirens, odnosno eliminaciju NET materijala kod lupusa (54, 55, 56). Povećanje NET formacija u neutrofilima kod SLE se dešava u odsustvu infekcije (1). Serum kod lupusa sadrži imunske komplekse sastavljene od autoantitela prema antimikrobnim peptidima kao što su LL37, humani neutrofilni peptidi i anti-dsDNK, udružene sa NET. Ovi imunski kompleksi blokiraju razgradnju DNK nukleazama.

Stvaranje NETs zahteva aktivnost NADPH oksidaze (NOX) (21). U toku oslobađanja NETs dolazi do menjanja histona tako što arginin biva zamenjen citrulinom. Na ovaj način nastaje novi autoantigen za imunski sistem (57) koji je dodatno aktivisan prolongiranom ekspozicijom NET proteina. Do prolongiranog izlaganja ovih proteina dolazi zahvaljujući zaštiti DNK od razgradnje inhibitorima DNaze (58). Ovi inhibitorni efekti su rezultat zaštitne uloge antibakterijskog peptida LL-37, koji je takođe komponenta NETs, visokog nivoa anti-NET antitela ili porasta deponovanja proteina komplementa C1q (59).

Poremećaj NEToze, kao esencijalni odbrambeni mehanizam, ima ulogu u patogenezi SLE. I kod SLE, kao i kod MPA, sposobnost razaranja NETs u serumu je značajno niža u odnosu na zdrave kontrole (56). Takođe, aktivnost serumske DNaze I je generalno niska kod SLE, što može dovesti do poremećaja eliminacije apoptotičnih ćelija (60). Iako bi trebalo uzeti u obzir mogućnost da niska aktivnost DNaze I u serumu ovih pacijenata može biti uzrokovana potrošnjom DNaze I koja učestvuje u eliminaciji NETs, ovo je malo verovatno, s obzirom da kod ovih pacijenata aktivnost serumske DNaze I ne korelira sa aktivnošću bolesti. Umesto toga, smatra se da je niska aktivnost serumske DNaze I česta karakteristika kod MPA i SLE. Dodatno, niska aktivnost serumske DNaze I kod SLE i MPA pacijenata može indukovati oštećenje degradacije NETs i kao posledicu, slom tolerancije prema komponentama NETs, što dovodi do produkcije anti-DNK i anti-MPO antitela (MPO-ANCA) (42, 56, 61).

Kod anti-MPO udruženog MPA, anti-NET antitelima smatraju se autoantitela različita od anti-MPO ili anti-DNK antitela. Kod SLE je dokazano prisustvo anti-NET antitela, uključujući i anti-DNK antitela, i ova antitela mogu ometati DNazu I,

kao važnog regulatora NETs (56). I kod SLE i MPA anti-NET antitela doprinose slaboj sposobnosti za degradaciju NETs. Komponente anti-NET antitela, kao što su IgG, treba dodatno da budu ispitane u budućim studijama.

Poremećaj regulacije NETs, što dovodi do prekomernog stvaranja i perzistiranja NETs, može da indukuje proizvođače NETs, uključujući i MPO-ANCA, i inhibitore NET regulacije, uključujući anti-NET antitela. Smatra se da je „začarani krug“ od NETs do anti-MPO ANCA, nazvan „NET-ANCA začarani krug“, od ključne važnosti za patogenezu, pre svega anti-MPO udruženog vaskulitisa, a da ovaj mehanizam ima značaj i za patogenezu SLE (62).

1.2.3.6. Regulacija degradacije NETs

NETosis je regulisana isključivo prisustvom dezoksiribonukleaze I (DNaze I) u serumu, koja sprečava perzistiranje NETs. DNaza I je specifična endonukleaza koja razgrađuje DNK tako što je hidrolizuje na kratke oligonukleotide. Novije studije su pokazale da poremećaj regulacije NETosis može biti uključen u patogenezu autoimunskih bolesti, uključujući lupus erythematosus (LE) (42). Degradacija NETs regulisana je enzimom deoksiribonukleaza I (DNase I) (63, 64). Podgrupa SLE pacijenata slabo razgrađuje NETs zbog niske aktivnosti DNase I (56, 65). Ustanovljena je udruženost poremećaja regulacije nastanka NETs sa autoimunskim bolestima, posebno propiltiouracil indukovanim MPO-ANCA udruženim vaskulitisom (42).

1.3. DEZOKSIRIBONUKLEAZA

DNaza je grupa enzima koji imaju sposobnost da hidrolizuju DNK. Glavna uloga DNaze je upravo da hidrolizuje egzogenu DNK (66). DNaza je otkrivena u bovinom pankreasu 1905. godine (67). DNazu luče žlezde povezane sa digestivnim traktom, prvenstveno parotidna žlezda i pankreas. DNaza I kod sisara postoji u 3 oblika - pankreasni, parotidni i mešoviti (68). Međutim, niska do visoka ekspresija gena za DNazu I registrovana je i u drugim tkivima (submandibularna žlezda, bubreg, digestivni trakt itd) (69). Enzimsku aktivnost DNaze inhibiraju G-aktin, cink i helatori dvovalentnih jona (70, 71, 72). Gen za DNazu I je smešten na hromozomu 20, ima 9 egzona i 8 introna i sadrži 3 kodominatna alela: DNASE*1, DNASE*2, DNASE*3, DNASE*4 (73).

Danas se zna da je DNaza I glavna nukleaza prisutna u serumu i urinu, kao i u semenju tečnosti (68). Aktivnost enzima u urinu je višestruko izraženija nego u serumu (74). DNaza I ima značajnu ulogu u apoptozi (75). Slično apoptozi, dokazana je uloga DNaze i u efikasnom uklanjanju DNK nakon farmakološki izazvane nekroze ćelija (63).

1.3.1. Uloga DNaze I u patogenezi SLE

Smatra se da je DNaza I jedan od ključnih molekula u razvoju SLE (76). Postoji nekoliko razloga za ovu tvrdnju: prvo, dsDNA je predominantan autoantigen kod pacijenata sa SLE (77), drugo, DNaza iz bovinog pankreasa uništava antigenost DNK, i na kraju, aktivnost DNaze I u serumu pacijenata sa SLE je često niska i to sniženje je veće kod pacijenata sa aktivnijim SLE (78).

DNaza I izrazito utiče na razvoj SLE. Dokazano je da deficit DNaze I u vezi sa razvojem sindroma sličnog SLE sa prisutnim antinukleusnim antitelima (ANA), deponovanjem imunskih kompleksa u glomerule bubrega, visokim titrom anti-dsDNA antitela i potpuno razvijenim glomerulonefritisom, u zavisnosti od nivoa DNaze I (79). Pretpostavlja se da smanjena aktivnost DNaze I u urinu dozvoljava većoj količini hromatin-IgG imunskih kompleksa da se zadržava u bubrezima i na

taj način omogućava progresiju bolesti, što korelira sa pojavom anti-dsDNK antitela (80).

Niska aktivnost DNaze I je registrovana i u studijama na pacijentima sa SLE (65, 81, 82, 83, 84). Međutim, u njima nije nađena koherentna korelacija između aktivnosti DNaze I u serumu i stepena aktivnosti SLE, odnosno biomarkera SLE. Škiljević i saradnici su demonstrirali da je aktivnost serumske DNaze kod pacijenata sa SLE niža u odnosu na zdrave osobe. Pokazano je da je aktivnost DNaze u korelaciji sa aktivnošću bolesti, nivoom ANA, anti-dsDNK, anti-nukleozomalnih i anti-histonskih antitela i da može biti značajan marker u praćenju pacijenata sa SLE (65).

Kod pacijenata sa SLE, infekcija je čest okidač ataka bolesti i jedan od glavnih uzroka smrti. U odgovoru na infekciju učestvuju i neutrofilni polimorfonukleari koji stvaraju NETs koje su sačinjene od DNK, histona i proteina neutrofila i imaju antimikrobna svojstva. Uklanjanje ovih zamki može biti ključno za održavanje homeostaze tkiva i izbegavanje prezentacije sopstvenih antigena. DNaza I je najvažniji enzim koji uklanja NETs. Za jedan broj pacijenata sa SLE dokazano je da je ovo uklanjanje poremećeno, i to iz 2 razloga: prisustvo inhibitora DNaze I ili prisustvo anti-NET antitela koja sprečavaju DNazu I da pristupi NETs-u. Poremećaj funkcije DNaze I i poremećaj uklanjanja NETs korelira sa kliničkim manifestacijama SLE, a posebno sa težinom zahvatanja bubrega (56, 85). Dokazano je da je serumski nivo inhibitora DNaze značajno povišen kod pacijenata sa LES, što dovodi do stvaranja anti-NET antitela koja sprečavaju DNazu I da pristupi i uništi NETs (56).

Takođe, sniženje aktivnosti DNaze I je delimično uzrokovano i prisustvom inhibitornih antiDNaza antitela koja prepoznaju konzervisani epitop u blizini katalitičkog centra. U istoj studiji je nađena i pozitivna korelacija između koncentracija anti-DNaza i anti-DNK antitela u serumima pacijenata sa SLE (86). Do publikovanja našeg rada, nije bilo radova koji govore o korelaciji ANCA i aktivnosti DNase I u serumu, odnosno koji se bave uticajem aktivnosti DNaze na prisustvo ANCA.

1.4. ANTINEUTROFILNA CITOPLAZMATSKA ANTITELA

Antineutrofilna citoplazmatska antitela (ANCA) su predominantno antitela IgG klase specifična za proteaze ili katjonske proteine, komponente primarnih neutrofilnih granula i monocitnih lizozoma, kao što su PR3, NE, Cat-G, MPO, Lf, azurocidin, lizozim i katjonski baktericidni protein koji povećava permeabilnost (engl. bactericidal/permeability increasing protein) (BPI) (87). ANCA interaguju sa target antigenima neutrofila aktivisanog citokinima, dovodeći do aktivacije preko nekoliko signalnih puteva i interakcije sa endotelijumom, potom do degranulacije, produkcije citokina i oštećenje tkiva. S obzirom na prisustvo autoantitela, potrebna je pomoć autoreaktivnih T-helper i B ćelija za razvoj bolesti (1).

Poznato je da su ANCA specifična za PR3 i MPO prihvaćeni serološki markeri podgrupe vaskulitisa malih krvnih sudova poznatih kao ANCA udruženi vaskulitisi (granulomatoza sa poliangiitisom i mikroskopski poliangiitis) (87). Detekcija ANCA ima značajnu ulogu u dijagnostici i praćenju pacijenata sa primarnim vaskulitisima. Pored glavnih ciljnih antigena, PR3 i MPO, drugi proteini neutrofilnih granula mogu biti takozvani minor antigeni ANCA, ali njihova uloga i značaj nisu u potpunosti razjašnjeni. Pored vaskulitisa, ANCA su detektovana i u drugim, patogenetski i klinički heterogenim grupama oboljenja: lekom indukovani autoimunski sindromi, inflamatorne bolesti creva i jetre, infekcije, maligniteti i sistemske bolesti vezivnog tkiva (88).

1.4.1. Istorijat

ANCA su prvi put opisana 1982. godine (89). Godine 1988. istraživači su pokazali, koristeći enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tehniku, da je MPO glavni ciljni antigen perinuklearnih ANCA (90), a dve godine kasnije, PR3 je prepoznata kao glavni autoantigen za citoplazmatski tip ANCA kod WG (91, 92). Razumevanje patogenetskih mehanizama ANCA je dovelo i dalje utiče na razvoj i usavršavanje novih terapijskih strategija u lečenju ANCA vaskulitisa.

1.4.2. Detekcija ANCA

Postoje tri osnovna tipa fluorescencije tokom detektovanja ANCA metodom indirektno imunofluorescencije (IIF): c, p i x (atipična) ANCA. Klasična citoplazmatska cANCA imaju centralno pojačanje tačkaste fluorescencije u zoni jedarnih lobusa. Perinuklearni p- tip karakteriše fluorescencija prstenaste zone citoplazme oko jedra koja se jasno razlikuje od cANCA. S obzirom na blizinu jedarne membrane vrlo je teško u rutinskom radu razlikovati ANCA od ANA. Kod ANA pozitivnih pacijenata neophodna je detekcija ANCA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testom na specifične antigene MPO, EL, Lf, Cat-G, PR3 i BPI (87).

1.4.3. Patogenetski mehanizmi

Neutrofil aktivisan od strane citokina ispoljava na membrani, procesom translokacije, antigene sačinjene od proteina azurofilnih granula. ANCA se vezuju preko receptora za Fc fragment imunoglobulina G (FcγR) na aktivisanom neutrofilu. Ovako dobijen signal dovodi do završne faze aktivacije neutrofila koji na površini endotelnih ćelija izazivaju respiratorni prasak, degranulaciju i nastanak vaskulitisa. Perzistentno vezivanje ANCA za neutrofile na površini endotelnih ćelija indukuje produkciju brojnih pro-inflamatornih citokina i hemokina i pojačava vaskularno oštećenje. Oslobađaju se snažni hemotaksični faktori za neutrofile kao što je C5a komponenta komplementa, koja takođe stimuliše neutrofile za interakciju sa ANCA. Tako se uspostavlja amplifikaciona veza za regrutovanje i aktivaciju neutrofila i pojavu nekroze endotelnih ćelija (93). Iako je MPO komponenta intracitoplazmatskih granula, uglavnom neutrofila, može biti sekretovana i preko plazma membrane kada su neutrofili aktivisani proinflamatornim citokinima, kao što je TNF-alfa. Smatra se da se patogena ANCA mogu vezati za MPO na površini proinflamatornim citokinima aktivisanih neutrofila, što dovodi do oštećenja malih krvnih sudova. Ovaj koncept poznat kao teorija ANCA-citokin niza, uglavnom je prihvaćen kao najvažniji deo patogeneze anti-MPO ANCA udruženih vaskulitisa (94). Međutim, zašto se ova patogena anti-MPO autoantitela stvaraju, ostaje nepoznato.

Poliklonalna ANCA mogu pokrenuti oslobađanje mikropartikula neutrofila koji eksprimiraju MPO i PR3 za koje se vezuju i aktiviraju endotelne ćelije. Neutrofilne mikropartikule takođe mogu indukovati stvaranje trombina i posledično tromba (95). ANCA aktivisani neutrofil takođe oslobađaju BlyS, koji može doprineti amplifikaciji ANCA odgovora tako što indukuju opstanak B limfocita i diferencijaciju plazmocita (96).

1.4.4. ANCA i infekcija

Poznato je da infekcija može da bude jedan od faktora nastanka vaskulitisa (97, 98). Udruženost hepatitis B virusne infekcije (HBV) i polyarteritis nodosa ili hepatitis C infekcije (HCV) i krioglobulinemijskog vaskulitisa je dokazana (99, 100). Takođe, bakterijske i virusne infekcije mogu pokrenuti produkciju različitih autoantitela, ANA, antikardiolipinskih antitela (aCL), krioglobulina i ANCA, što nije uvek udruženo sa vaskulitisom (100, 101). Nažalost, pojedine subakutne i hronične infekcije mogu imitirati idiopatske ANCA vaskulitise, pa njihova diferencijalna dijagnoza može biti otežana. Uz to, anti-PR3 i anti-MPO mogu biti detektovana kod bakterijskih (streptokokna, stafilokokna infekcija, tuberkuloza), virusnih (parvovirus B19, HCV), protozoalnih (malarija) i gljivičnih infekcija (100, 102). Među pacijentima sa prolongiranom infekcijom udruženom sa ANCA, 29% je imalo promene na koži (purpura, nekroza, gangrena, erythema nodosum). Identifikacija uzročnog faktora je od esencijalne važnosti za izbor efikasnije i manje toksične terapije za infekcije udružene sa ANCA. Profil autoantitela može pomoći u razgraničavanju infekcije udružene sa anti-PR3 i anti-MPO od primarnih idiopatskih ANCA vaskulitisa (97).

1.4.5. ANCA i primarni vaskulitisi

Primarni vaskulitisi obuhvataju Wegenerovu granulomatozu (WG), preimenovanu 2011. u granulomatozu sa poliangiitisom (GPA) (103), mikroskopski poliangiitis (MPA), izolovani fokalno segmentni nekrotizujući glomerulonefritis (FSNGN) sa polumesecom ili bez polumeseca, i Churg-Straus sindrom (CSS) (93, 104, 105, 106). Ova oboljenja se karakterišu nekrotizujućom

inflamacijom malih krvnih sudova i prisustvom ANCA antitela protiv PR3 ili MPO. Anti-PR3 su uglavnom prisutna kod GPA, dok se anti-MPO predominantno javljaju u ostalim stanjima (93, 107). Studija sprovedena 2005. pokazala je da je senzitivnost anti-PR3 66% kod GPA, a da je manja od 5% kod CSS, dok je senzitivnost anti-MPO 58% kod MPA, 64% kod idiopatskog ascedentnog glomerulonefritisa 64%, odnosno 40% kod CSS. Kod CSS, ANCA su prisutna kod 40% pacijenata i udružena su sa vaskulitisom malih krvnih sudova kao glavnim kliničkim znakom, dok je odsustvo ANCA kod pacijenata sa CSS bilo udruženo sa eozinofilnom infiltracijom tkiva (108).

Najčešća histopatološka slika kod MPA i GPA, a povremeno i kod CSS, je neutrofilni vaskulitis. Neutrofilni ili leukocitoklazijski vaskulitis se katarakteriše prisustvom predominantno neutrofilnog infiltrata mešanog sa nukleusnom prašinom. Pacijenti sa histološki dokazanim neutrofilnim vaskulitisom uglavnom imaju detektovana antitela pozitivna na MPO i imaju zahvaćenost bubrega, dok su pacijenti sa histološkom slikom eozinofilnog vaskulitisa obično negativni na MPO i nemaju renalnu zahvaćenost (109).

ANCA testiranje mora biti pažljivo interpretirano u korelaciji sa drugim laboratorijskim podacima, kao i histološkim i kliničkim nalazima. Ono ima značajnu ulogu u dijagnostici i evaluacionim protokolima pacijenata sa vaskulitisima i agresivnim glomerulonefritisima.

1.4.6. ANCA kod SLE

Glavno obeležje SLE je produkcija anti-nukleozomalnih antitela i imunskih kompleksa sa antigenima koji sadrže DNK. Defekt u raspadu nukleozoma može stimulisati produkciju anti-DNK nukleoproteinskih antitela. U serumima pacijenata sa SLE nađena su brojna autoantitela čiji su ciljni antigeni komponente jedra (double-stranded DNA (dsDNA), Smith (Sm) antigen). Ova antigen specifična ANA imaju važnu ulogu u serološkoj dijagnostici SLE (110). Poslednjih godina, sve više pažnje se poklanja ispitivanju i detektovanju antitela uperenih na komponente citoplazme. Ovi antigeni su proteini primarnih i sekundarnih neutrofilnih granula. ANCA su prisutna kod jednog broja pacijenata

sa SLE. Kod SLE pacijenata čiji su neutrofilni hronično aktivisani autoantitelima, citoplazmatski neutrofilni antigeni posreduju i stimulišu dentritičnu ćeliju da indukuje stvaranje ANCA koja učestvuju u autoimunskom procesu (50).

1.5. LUPUS ERYTHEMATOSUS

Lupus erythematosus (LE) je autoimunska inflamatorna bolest koja se karakteriše slomom tolerancije, produkcijom brojnih autoantitela, deponovanjem imunskih kompleksa u zidovima, predominantno malih krvnih sudova, sa posledičnom aktivacijom sistema komplementa koja dovodi do zapaljenja i oštećenja tkiva (111, 112). Patološki imunski odgovor kod LE pokreću različiti faktori sredine (ultravioletno (UV) zračenje, virusi, lekovi) na terenu genetske konstitucije koju karakteriše poremećaj imunskih regulatornih mehanizama (113).

Prvi opis eritema u vidu leptira dao je Ferdinand von Hebra (seborrhea congestiva, 1866) (114). Moritz Kaposi je prvi opisao sistemske znakove LE (1872) - febrilnost, gubitak težine, anemiju, limfadenopatiju i artritis (115). Jonatan Hutchinson je zaslužan za otkrivanje uticaja fotosenzitivnosti na nastanak eritema u vidu leptira (116).

1.5.1. Klasifikacija LE

Oko 70% pacijenata sa lupusom ima SLE, oko 15% ima isključivo kutane forme, oko 10% pacijenata ima sindrom preklapanja sa drugom reumatskom bolešću (ispunjavaju kriterijume i za SLE i za drugo oboljenje), a 5-10% pacijenata ima lupus indukovan lekovima (117).

1.6. SISTEMSKI LUPUS ERYTHEMATOSUS

Sistemski lupus erythematosus (SLE) je multisistemsko oboljenje čije je glavno obeležje produkcija anti-nukleozomalnih antitela i imunskih kompleksa sa antigenima koji sadrže DNK (113). Uslov za razvoj SLE je postojanje predispozicije za razvoj autoimunosti. Kod malog broja ovih osoba dolazi do stvaranja autoantitela, što mesecima i godinama prethodi kliničkim simptomima (118).

1.6.1. Patogeneza SLE

Prvo dolazi do aktivacije urođene imunosti infekcijom ili sopstvenim antigenima, pomoću DĆ u tkivima koja su u kontaktu sa spoljašnjom sredinom (pluća, creva, koža, periferna limfoidna tkiva) i TLR za molekularne obrasce patogena (engl. pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) koje imaju bakterije i virusi. Vezivanje TLR za DĆ dovodi do oslobađanja IFN-alfa i ostalih citokina, koji omogućavaju sazrevanje nezrelih DĆ i monocita/makrofaga, koji tako postaju moćne APĆ. Aktiviranje T i B limfocita dovodi do povećane sinteze imunoglobulina i prebacivanje na patogene IgG podklase. Na taj način nastaju aktivirane T i B ćelije (od kojih su neke autoreaktivne) koje učestvuju u stečenom imunskom odgovoru. Poremećaj stečenog imuniteta dovodi do stvaranja aktivisanih autorekativnih T i B limfocita. Strani sopstveni antigeni se susreću sa aktivisanim APĆ koje ih preuzimaju, internalizuju i procesiraju, i na kraju prezentuju peptide na površini molekula kompleksa tkivne podudarnosti (engl. major histocompatibility complex, MHC). Za razliku od DĆ koje su glavne APĆ u urođenoj imunosti, u stečenoj imunosti glavne APĆ su B limfociti i monociti/makrofagi. Ovaj proces proizvodnje autoantitela je veoma aktivan kod SLE, dok su sa druge strane oštećeni mnogi regulatorni mehanizmi koji bi trebalo da suprimiraju proizvodnju antitela, kao što je smanjena fagocitoza apoptotičnih ćelija i imunskih kompleksa (119) i proizvodnja regulatornih CD4⁺CD25⁺ i supresorskih CD8⁺ T ćelija (120).

Defekt u raspadu nukleozoma može stimulisati produkciju antitela na nukleoproteine. Moguće da prolongirani opstanak DNK nukleoproteina u ekstracelularnoj tečnosti može biti uključen u produkciju ANA. U serumima pacijenata sa SLE nađena su brojna autoantitela čiji su ciljni antigeni komponente jedra (dsDNK, Smith (Sm) antigen itd). Ova antigen specifična ANA imaju važnu ulogu u serološkoj dijagnostici SLE (110). Poslednjih godina, sve više pažnje se poklanja ispitivanju i detektovanju antitela uperenih na komponente citoplazme. Ovi antigeni su proteini primarnih i sekundarnih neutrofilnih granula. Kod pacijenata sa SLE čiji su neutrofili kontinuirano aktivisani autoantitelima, citoplazmatski neutrofilni antigeni aktiviraju DČ, uz dalju indukciju stvaranja ANCA, čime se inflamacija amplifikuje (50).

UV zraci izazivaju apoptozu keratinocita u koži, što dovodi do oslobađanja nuklearnog materijala, koji se kod pacijenata sa SLE ne eliminiše adekvatno, te stimuliše imunski sistem. Genetski deficit serum amiloida P, c-Mer kinaze, imunoglobulina (Ig) M, komponente komplementa C1q i DNaze, koji su odgovorni za uklanjanje apoptotskih ostataka, dovodi do pojave SLE i kod miševa i kod ljudi (121, 122).

Aktivnost serumske DNaze I kod pacijenata sa LES je niža u odnosu na zdrave osobe. Takođe, serumski nivo inhibitora DNaze I je značajno povišen kod pacijenata sa SLE, što dovodi do stvaranja anti-NET antitela koja sprečavaju DNazu I da razgradi DNK u sklopu NETs (56, 122).

1.6.2. Autoantitela

Iako se u toku SLE stvara veliki broj autoantitela, za samo mali broj je dokazana direktna uloga u oštećenju tkiva, kao što su npr. antitela na ćelije krvi koja uzrokuju citopenije. Tako antitela na T ćelije (CD3 i TCR) suprimiraju proizvodnju IL-2, a anti Ro antitela smanjuju funkciju mišićnih ćelija i sprovodnog sistema i izazivaju kongenitalni blok srca kod neonatalng lupusa (123). Neka antitela na DNK ukršteno reaguju na receptore za N-metil-D-aspartat (NMDARs) u mozgu, što dovodi do neurokognitivnih defekata (124). Antitela na fosfolipide i beta-2 glikoprotein izazivaju tromboze u okviru

antifosfolipidnog sindroma (125). Ona se vezuju i za ćelije trofoblasta placente, aktiviraju komplement i tako dovode do gubitka ploda (126). Koji će organ biti pogođen zavisi i od lokalne produkcije organ-specifičnih molekula kakav je npr. receptor 1 za faktor nekroze tumora (engl. tumor necrosis factor, TNF), koji dovodi do ekspresije kutane bolesti, a sa druge strane štiti bubrege od inflamacije (127).

Kod oko 85% pacijenata sa SLE pojava autoantitela prethodi prvim simptomima bolesti u proseku 2 do 3 godine, a u nekim slučajevima, čak i do 9 godina (111). Ona se javljaju sukcesivno, i to prvo ANA, potom anti-DNK antitela i antifosfolipidna antitela, a na kraju anti SM i anti RNP. Ovi podaci ukazuju da se imunska kontrola potencijalno patogenih autoantiela može održati godinama i da se bolest javlja kod osoba kod kojih se ova regulacija iscrpi (128).

1.6.3. ACR kriterijumi za dijagnozu SLE

S obzirom da je SLE izuzetno pleomorfno oboljenje i da ne postoji klasična klinička slika, dijagnoza se bazira na kriterijumima datim od strane Američkog koledža za Reumatologiju (engl. American College of Rheumatology, ACR) 1982. i revidiranim 1997. godine (129, 130) (tabela 1). Kriterijumi obuhvataju manifestacije zahvaćenosti pojedinačnih organa i karakteristične laboratorijske nalaze. Smatra se da osoba ima SLE ukoliko je ispunjeno 4 ili više od 11 kriterijuma, istovremeno ili jedan za drugim, tokom bilo kog perioda praćenja.

Tabela 1. ACR kriterijumi za SLE (130)

Kriterijum	Definicija
1. Malarni eritem	Fiksiran malarni eritem, u ili iznad nivoa kože, sa poštedom nazolabijalnih brazda
2. Diskoidne lezije	Eritematozni plakovi sa adherentnom skvamom i keratotičnim čepovima, kod starijih lezija može nastati atrofija sa ožiljkom
3. Fotosenzitivnost	Promene na koži nastale kao neuobičajena reakcija na sunce, na osnovu anamneze ili pregleda
4. Oralne ulceracije	Oralne ili nazofaringealne ulceracije, obično bezbolne, dijagnostikovane kliničkim pregledom
5. Artritis	Neerozivni artritis bar 2 periferna zgloba sa bolom, otokom ili efuzijom
6. Serozitis	a. Pleuritis (uverljivi anamnistički podaci o pleuralnom bolu ili auskultacijski nalaz pleuralnog trenja ili prisustvo izliva u pleuri) ILI b. Perikarditis (dokumentovan putem EKG, trenja ili prisustvom izliva u perikardu)
7. Bubrežni poremećaj	a. Perzistentna proteinurija (>0.5 g/d ili >3+) ILI b. Čelijski cilindri bilo kog tipa (eritrociti, hemoglobin, granularni, tubularni, mešoviti)
8. Neurološki poremećaj	a. Konvulzije (u odsustvu drugog uzroka - leka, poznatog metaboličkog poremećaja, npr. uremije, ketoacidoze, ili poremećaja elektrolita) ILI b. Psihoza (u odsustvu drugog uzroka - leka, poznatog metaboličkog poremećaja, npr. uremije, ketoacidoze, ili poremećaja elektrolita)
9. Hematološki poremećaj	a. Hemolitička anemija sa retikulocitozom ILI b. Leukopenija (<4,000/mL u 2 ili više nalaza) ILI c. Limfopenija (<1,500/mL u 2 ili više nalaza) ILI d. Trombocitopenija (<100,000/mL u odsustvu leka kao mogućeg uzročnika)
10. Imunološki poremećaj	a. Anti-ds DNK antitela (engl. anti-double-stranded DNA, anti-dsDNA) u abnormalnom titru ILI b. Anti-Sm antitela ILI c. Pozitivan nalaz antifosfolipidnih antitela na osnovu (1) abnormalnog nivoa IgM ili IgG antikardiolipinskih antitela u serumu, (2) pozitivnog rezultata testa na lupus antikoagulans, standardnom metodom, ili (3) lažno pozitivnog serološkog testa na sifilis u trajanju od minimum 6 meseci i potvrđenim testom imobilizacije <i>Treponema pallidum</i> ili fluorescentnim apsorptionim testom na treponemska antitela
11. Antinukleusna antitela	Abnormalan titar antinukleusnih antitela (ANA) detektovanih imunofluorescencijom ili ekvivalentnim esejom, u odsustvu leka za koji se zna da je povezan sa „sindromom lupusa indukovanim lekovima“

Ig, imunoglobulin

1.6.4. Klinička slika SLE

SLE se klinički može ispoljiti promenama na koži, zglobovima, seroznim membranama, centralnom nervnom sistemu i bubrezima.

1.6.4.1. Promene na koži kod SLE

Promene na koži koje se javljaju u toku SLE dele se na specifične (kutani lupus, promene koje imaju specifičan histološki nalaz) i nespecifične (131), koje se ne javljaju samo kod pacijenata sa lupusom i koje nemaju specifičnu histologiju. Ove lezije su češće kod pacijenata sa SLE od specifičnih i njihovo prisustvo može ukazati na veću aktivnost bolesti (132). Ove promene se dele na one koje služe kao kriterijumi za klasifikaciju SLE (fotosenzitivnost, ulceracije na sluzokožama, alopecija, Raynaudov fenomen), nespecifične kutane vaskularne reakcije (vaskulitis, vaskulopatije, urtikarija, palmarni eritem, periungvalne telangiektazije, eritromelalgija, livedo) i ostale lezije (mucinoza i kalcinoza kože, promene na noktima, stečene bulozne dermatoze povezane sa SLE, kutane manifestacije autoimunskih sindroma preklapanja itd.) (131).

Tipična klinička manifestacija je lokalizovani eritem - malarni raš ili eritem u vidu leptira centralnih partija lica (akutni kutani LE), ili diseminovani/generalizovani eritem (133), koji se još naziva i „fotosenzitivni raš“ (134).

Subakutni kutani lupus erythematosus - javlja se pretežno kod žena bele rase, povezan je sa HLA-DR2 or -DR3, pacijenti imaju preklapajuće manifestacije sa Sjögrenovim sindromom ili visok titar anti-Ro/SSA antitela (135). Lezije kože su inicijalno eritematozne makule i papule koje evoluiraju u papuloskvamozne-psorijaziformne ili anularno-policiklične lezije, sa približno podjednakom učestalošću (135); kod manjeg broja pacijenata se razvijaju obe vrste lezija (136).

Hronični kutani lupus erythematosus - ovoj grupi CLE pripada više entiteta kao što je DLE sa svojim varijantama (hipertrofični/verukozni i telangiektoidni) i ređim tipovima LEP i CHLE. **Diskoidni LE** - tipične DLE lezije se javljaju na početku SLE kod 5-10% pacijenata, a ukupno oko 30% pacijenata sa SLE razvijaju

DLE lezije u toku bolesti, obično diseminovanog tipa (137). **Hipertrofična/verukozna varijanta DLE** je retka manifestacija DLE (oko 2% pacijenata sa DLE) i obično udružena sa prisustvom klasičnih DLE lezija na drugim mestima (138). **Telangiektoidna varijanta DLE** - eritematozni plakovi sa retikularnim telangiektazijama na fotoekspoziranim regijama lica, vrata, ekstremiteta, na dojčkama, kolenima, stopalima čine ovi retku formu DLE (139). **Chilblain lupus erythematosus (CHLE)** - takođe retka manifestacija CLE, jako vezana sa faktorima sredine (137), češće se javlja kod žena. Pacijenti često imaju poliklonsku hipergamaglobulinemiju, povišen nivo imunoglobulina u serumu i pozitivan reumatoidni faktor, često se detektuju i anti-dsDNA antitela i anti-Ro/SSA antitela (140). **Lupus erythematosus profundus (LEP)**, naziva se još i "Kaposi-Irgangova bolest" i "lupus panniculitis". Predstavlja retku varijantu CLE, ima je oko 2-10% pacijenata sa SLE (137). **Lupus erythematosus tumidus** - predstavlja eritematozne eksudativne i infiltrovane necikatricijalne lezije na licu sa minimalnim promenama na površini. Češće se viđa kod muškaraca. **Bulozne lezije kod LE** - Učestalost buloznih lezija kod LE je niska, takođe, javlja se kod manje od 5% pacijenata sa SLE i promenama na koži (141).

1.6.4.2. Promene na bubrezima kod SLE

Lupus nefritis (LN) je snažan prediktor lošeg ishoda pacijenata sa SLE. Kod pacijenata sa SLE oštećenje bubrega se javlja u 60% pacijenata. Kod 10-20% pacijenata sa LN nastaje terminalni stadijum hronične slabosti bubrega (142, 143). Rano otkrivanje SLE i LN omogućava pravovremenu primenu odgovarajuće terapije u cilju sprečavanja progresije bolesti i razvoja terminalnog stadijuma hronične slabosti bubrega, smanjenja morbiditeta i mortaliteta i poboljšanja kvaliteta života ovih pacijenata (142, 143, 144, 145).

Pacijenti sa LN uglavnom imaju anti-dsDNA, anti-Sm i anti-C1q antitela. Cirkulišući imunokompleksi imaju značajnu ulogu u patogenezi SLE i LN. Pored cirkulišućih kompleksa DNK-anti-DNK antitela, stvaraju se i kompleksi in situ. Histoni se vezuju za strukture glomerula i podstiču lokalno stvaranje

imunokompleksa (142, 143, 144, 145). Pored autoantitela u patogenezi LN značajnu ulogu imaju B i T limfociti (146).

1.6.4.2.1. Kliničke manifestacije LN

LN se manifestuje proteinurijom, mikroskopskom hematurijom, prisustvom eritrocitnih cilindara u sedimentu urina, povećanom koncentracijom kreatinina u serumu i smanjenim klirensom endogenog kreatinina. Prisustvo proteina u urinu je glavni laboratorijski pokazatelj zahvaćenosti bubrega kod SLE. Proteinurija nije samo pokazatelj oštećenja bubrega, ona dovodi do oštećenja tubulointersticijuma i progresije hronične slabosti bubrega. Mikrohematurija je često prisutna, a smanjenje jačine glomerulske filtracije se uglavnom javlja kod bolesnika sa akutnom bubrežnom insuficijencijom. Hiperkaliemijska renalna tubulska acidoza takođe može biti manifestacija LN (147, 148, 149).

1.6.4.2.2. Laboratorijska ispitivanja kod pacijenata sa LN

Anti-dsDNK imaju visoku dijagnostičku specifičnost, prisutna su u gotovo 90% pacijenata sa LN i ukazuju na aktivnost bolesti. Anti-Sm antitela su visoko specifična za LN, ali su prisutna samo u 15-50% pacijenata sa LN. Visok titar anti-dsDNK, anti-Sm i anti-C1q sa velikom senzitivnošću i specifičnošću ukazuje na razvoj LN kod pacijenata sa SLE (142, 144, 145). SLE pacijenti sa normalnim nalazom urina i normalnom funkcijom bubrega ne zahtevaju biopsiju bubrega. Indikacije za biopsiju bubrega kod SLE uključuju proteinuriju (novonastala proteinurija, povećanje proteinurije (proteinurija > 1,0 g/24h), teška proteinurija), hematuriju, ćelijske cilindre u sedimentu urina, poremećaj funkcije bubrega (akutna bubrežna insuficijencija, brzo-progresivno opadanje funkcije bubrega), nizak nivo C3 komponente komplementa, kao i potreba za promenom terapije (neadekvatan odgovor na primenjenu terapiju ili relaps posle terapije) (150, 151, 152). Patohistološke promene tkiva bubrega pacijenata sa LN, dobijenog biopsijom bubrega, sastoje se od spektra glomerulskih, vaskularnih i tubulointersticijskih promena. Prema preporukama ISN/RPS 2003 –

(International Society of Nephrology/Renal Pathology Society 2003) u zavisnosti od patohistološkog nalaza razlikujemo šest klasa LN (151) (tabela 2).

Tabela 2. ISN/RPS (International Society of Nephrology/Renal Pathology Society) klasifikacija LN (151)

Klasa GN	Histopatološki nalaz
I	Minimalni mezangijumski LN
II	Mezangijumski proliferativni LN
III	Fokalni proliferativni LN (< 50% od svih glomerula)
IV	Difuzni proliferativni LN (> 50% od svih glomerula)
V	Membranozni LN
VI	Odmakli sklerozirajući LN

1.6.4.3. Ostali klinički znaci SLE

Pored znakova i simptoma koji spadaju u kriterijume, u kliničku sliku SLE spadaju i brojni drugi znakovi i simptomi, kao i laboratorijski poremećaji. U tabeli 2 su prikazani glavni poremećaji koji su registrovani u studijama prilikom postavljanja dijagnoze SLE (153). Iz tabele se vidi da su prvi pogođeni organi koža i zglobovi, a da su inicijalni simptomi najčešće groznica i febrilnost, slabost i malaksalost.

Tabela 3. Prevalencija određenih simptoma, znakova i laboratorijskih poremećaja SLE u nekoliko većih kohortnih studija (153)

Poremećaj	Učestalost (%)	Poremećaj	(%)
Pozitivna ANA	97	Malarni raš	35
Slabost, malaksalost	90	CNS	32
Artralgije, mialgije	90	Povećani gama globulini	32
Fotosenzitivnost i promene na koži	70	Hipertenzija	25
Kognitivna disfunkcija	70	Sjögrenov sindrom	25
Nizak C3 ili C4	61	Diskoidne lezije	20
Febrilnost	57	Vaskulitis CNS-a	15
Artritis	50	Adenopatija	15
Antitela na dsDNA	50	Efuzije pleure	12
Leukopenija	46	Ulceracije na sluznicama (nos, usta)	20
Pleuritis	44	Gubitak u težini	27
Anemija	42	Raynaudov sindrom	25
Alopecija	40	SCLE	10
Antikardiolipinska At	35	Miozitis	10
Nefritis, proteinurija	40	Avaskularna nekroza	10

1.6.4.4. Laboratorijski nalazi od značaja za dijagnozu i praćenje toka - biomarkeri lupusa

Kod lupusa je detektovano više od 100 autoantitela (154), međutim, najveći broj autoantitela predstavljaju samo epifenomen, odnosno, nije dokazano njihovo patogeno dejstvo. ANA predstavljaju pokazatelj prisustva sistemske

bolesti vezivnog tkiva. Za detekciju ANA mogu se koristiti supstrati tkiva glodara (jetra pacova, bubreg miša), kao i supstrati humanih ćelija, od kojih se najviše koriste epitelne ćelije karcinoma larinksa (HEp-2 ćelije) (155). ANA su negativna kod veoma malog broja pacijenata sa SLE, oko 2% na HEp-2 ćelijama, odnosno oko 5% na tkivu glodara. Međutim, kod svih tih pacijenata se ELISA testom detektuju antitela na Ro/La antigen (156).

Antitela na DNK (anti-DNK) su antitela karakteristična za SLE. Visoko aviditetna antitela klase IgG na dvostruko uvijenu DNK (dsDNA) imaju glavnu ulogu u indukovanju nekih manifestacija SLE (posebno nefritisa) i relativno su specifična za SLE, a predstavljaju i dobre markere aktivnosti bolesti (157).

Antitela na histone i antigene povezane sa nukleozomoma - ova antitela mogu formirati imunske komplekse koji se deponuju u glomerulu bubrega i dovode do njegovog oštećenja (158). Anti-histonska antitela se nalaze kod najvećeg broja pacijenata sa lupusom izazvanim lekovima, ali kod ove vrste lupusa njihova patogenost zavisi od klase imunoglobulina i dela histonskog kompleksa protiv koga su usmerena (159).

Anti-Ro i anti-La su važna autoantitela u SLE i javljaju se kod oko 50% i 20% ovih pacijenata, respektivno. Usko su povezana sa određenim kliničkim nalazima (fotosenzitivnost, neonatalni lupus). Antitela na komponente splajsozoma se često viđaju kod SLE i ostalih sistemskih bolesti vezivnog tkiva, naročito anti-Sm i anti-nRNP (160).

U ostale važne serološke abnormalnosti spadaju: lupus antikoagulans i antifosfolipidna antitela, antieritrocitna antitela, trombocitna antitela, antineutrofilna citoplazmatska antitela (ANCA) (87), reumatoidni faktor, krioglobulini.

Brojni su poremećaji ostalih laboratorijskih analiza kod lupusa, kao što su hipalbuminemija, poremećaji serumskih imunoglobulina, paraproteinemija, povišena sedimentacija eritrocita (SE), citopenije, poremećaji sistema komplementa.

1.6.4. Indeksi aktivnosti bolesti i oštećenja tkiva kod SLE

Postoji preko 60 indeksa i indeksnih sistema koji procenjuju aktivnost lupusa. Među njima nema zlatnog standarda, a najčešće su korišćeni British Isles Lupus Assessment Group index (BILAG) (161), Systemic Lupus Activity Measure (SLAM) (162), Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) (163), European Consensus Lupus Activity Measure (ECLAM) (164). Iako je svaki ponaosob specifičan, svi su oni validni i pouzdani i koreliraju međusobno (165).

U poslednje vreme u kliničkim i istraživačkim studijama najviše korišćen indeks je SLEDAI sa svojim modifikacijama, SELENA-SLEDAI (166) i SLEDAI-2K (167). SLEDAI je razvijen 1992. godine na Univerzitetu u Torontu (163), dok su modifikacije napravljene 1998. i 2002. godine i u njima su bodovane nove promene na koži, alopecija, proteinurija i promene na sluznicama.

Oštećenje tkiva predstavlja važnu meru SLE. Za razliku od indeksa aktivnosti koji se odnose samo na aktivan lupus, oštećenje tkiva može biti rezultat kako same bolesti, tako i neželjenih efekata lekova ili prisustva komorbiditeta. Kao mera oštećenja tkiva koristi se Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index, koji je razvijen 1996. godine (168).

U studijama je pokazano da oštećenje tkiva u ranoj fazi lupusa, mereno SLICC/ACR indeksom, ima prognostički značaj. Pacijenti čiji je skor inicijalno ≥ 1 imaju veću stopu mortaliteta i primaju veće doze kortikosteroida u toku prve godine bolesti, koji mogu da doprinesu daljem morbiditetu i mortalitetu (169). U studijama je takođe pokazano da ne postoji korelacija skora aktivnosti bolesti i akumuliranog skora oštećenja, merenih u jednom momentu, pa se smatra da se oba skora moraju meriti kod svakog pacijenta, da bi se analizirala i aktivnost oboljenja i kumulativno oštećenje tkiva (170).

1.7. LEKOM INDUKOVAN LUPUS-LIKE SINDROM

Kolagena bolest slična SLE nastala tokom godinu dana od uvođenja hidralazina prvi put je opisana 1952. godine kod 17 od 211 pacijenata lečenih hidralazinom (171). Ipak, prva definitivna udružnost hidralazina i stanja sličnog SLE pripisana je Dustanu i sar. 1954. godine (172). Važno je razdvojiti lekome indukovani lupus od mnogo češćeg stanja kao što je lekome indukovana autoimunost kod koje dolazi do razvoja autoantitela i drugih laboratorijskih parametara, ali bez kliničkih simptoma (173). Lupus indukovani lekome je entitet koji se karakteriše kliničkim manifestacijama i imunološkim parametrima sličnim kao kod idiopatskog lupusa, ali koji su vremenski povezani sa kontinuiranim uzimanjem određenog leka i povlače se nakon isključenja odgovornog leka (174). I pored značajnog preklapanja kada su u pitanju simptomi i znaci, postoje i razlike između idiopatskog i lekome indukovani lupusa. Značajna razlika je da lekome indukovani lupus obično ima blažu kliničku sliku i da su najteže manifestacije SLE obično odsutne kod lekome indukovane bolesti. S obzirom da ove razlike ukazuju na različite patogene mehanizme i da su genetski faktori rizika različiti, ispravnije je lekome indukovani varijetet simptoma nazvati lekome indukovani lupus-like sindrom (LILLS) (engl. drug-induced lupus-like syndrome (DILLS)).

Lekome idukovani LLS se karakteriše pozitivnim ANA i anti-histonskim antitelima (175) koja predstavljaju tipičan laboratorijski profil kod sistemskog LLS i serumski marker ovog oblika bolesti. LLS je najčešće indukovani hidralazinom, prokainamidom, kinidinom, izoniazidom, minociklinom, inhibitorima TNF-alfa, IFN-alfa, propiltiouracilom (PTU), itd. (174, 176, 177, 178, 179). Poznato je da PTU i minociklin mogu indukovati produkciju pANCA kod LLS pacijenata, ali sa oprečnim rezultatima u vezi sa njihovom patogenetskom ulogom, prevalencijom, ciljnim antigenima i kliničkom udruženošću (178, 180, 181).

1.7.1. Epidemiologija

Incidencija LILLS je nepoznata, mada je u Sjedinjenim američkim državama procenjena na 15 do 20 hiljada novih slučajeva svake godine (182). Međutim, smatra se da je incidencija manja, jer se ovi podaci uglavnom odnose na prokainamid, koji je u međuvremenu uglavnom zamenjen drugim antiaritmikima. U drugim zemljama incidencija je takođe nepoznata, ali se smatra da iznosi oko 10% od slučajeva idiopatskog LLS (183, 184).

Druge epidemiološke karakteristike se takođe razlikuju kod LILLS i idiopatskog SLE. Velika dominacija žena kod idiopatskog SLE (9:1) ne postoji kod LILLS, jer je većina pacijenata lečena lekovima koji indukuju LLS muškog pola. Takođe, za razliku od SLE, učestalost hidralazin- i prokainamid-indukovanog lupusa kod pacijenata crne rase je četiri do šest puta manja nego kod belaca (185). Smatra se da se LILLS javlja kod starijih osoba od pacijenata sa idiopatskim SLE (174). Životna dob pacijenata koji obolevaju od LILLS zavisi od životne dobi populacije koja je lečena odgovornim lekovima. S obzirom da se većina LLS-indukujućih lekova propisuje starijim osobama, uglavnom zbog aritmije i hipertenzije, najčešće obolevaju stariji od 50 godina (173).

1.7.2. Patogeneza

Patogenetski mehanizam LILLS nije potpuno razjašnjen, a dostupni podaci jasno ukazuju da samo jedan mehanizam ne može biti odgovoran za indukciju autoimunosti svim lupus-indukujućim lekovima (174).

LILLS nije tipična lekom indukovana hipersenzitivna reakcija iz nekoliko razloga: ne postoji dokaz o postojanju lek-specifičnih T limfocita ili antitela, a i ciljni autoantigeni nisu direktno pogođeni lekom; potrebni su meseci ili godine ekspozicije pre razvoja LILLS u zavisnosti od kumulativne doze leka; i na kraju, vraćanje simptoma nakon ponovnog uvođenja odgovornog leka obično traje 1 do 2 dana, ukazujući na odsustvo imunske senzibilizacije na lek (174).

1.7.3. Genetska predispozicija

Geni i okruženje igraju važnu ulogu u nastanku lipus-like autoimunosti. LILLS je najbolji primer kako faktori sredine, u ovom sličaju lekovi, kod genetski predisponiranih osoba izazivaju LLS. Najčešće ispitivani lekovi su prokainamid i hidralazin. Imunogenetski faktori u osnovi LLS su veoma značajni, s obzirom da samo mali broj lečenih pacijenata razvije simptome bolesti i da je imunski odgovor ograničen na relativno mali broj autoantigena. Ovo ukazuje na ulogu molekula kompleksa tkivne podudarnosti klase II (engl. major histocompatibility complex, MHC) HLA, koji su potrebni za odgovor antitela zavisano od T ćelija. HLA-DR4, HLA-DR2, HLA-DR3 su faktori rizika za razvoj LILLS (186). Takođe, geni za komplement su deo regiona MHC klase III. Poznato je da C4 nulti geni utiču na povećanu osetljivost za razvoj SLE (187). Međutim, ustanovljeno je i da pojedini pacijenti sa LILLS takođe imaju jedan ili više C4 nulta alela, što ukazuje na genetski defekt u uklanjanju imunskih kompleksa i predispoziciju za DILLS, odnosno da razvoj LLS zavisi od genetski uslovljenog nivoa C4 (188, 189).

Pored ovoga, spori acetilatori su takođe predisponirani za razvoj LILLS. Acetilator fenotip je čak najbolje opisan genetski predisponirajući faktor za LILLS. Spori acetilatori su homozigoti za recesivan gen koji kontroliše aktivnost hepatične acetiltransferaze i imaju prosečno dvostruko viši nivo neacetilovanih lekova u serumu (ordiniranih u ekvivalentno istim terapijskim dozama svim pacijentima). U poređenju sa brzim acetilatorima, antitela i klinički simptomi se razvijaju znatno brže i češći su kod sporih acetilatora tokom lečenja prokainamidom i hidralazinom. Ove studije podržavaju hipotezu da su održavanje koncentracije neacetilovanih lekova i dužina ekspozicije važni faktori u nastanku LLS (190, 191).

1.7.4. Imunski odgovor kod LLS indukovanoog lekom

1.7.4.1. Prokainamid, hidralazin, izonijazid, d-penicilamin

Lekovi koji indukuju LILLS imaju različitou hemijski strukturu i farmakološke osobine, ali su svi u principu slabo imunogeni. Najčešće ispitivani lekovi su

prokainamid i hidralazin. Samo 6% pacijenata sa prokainamid-indukovanim LLS imaju antitela na prokainamid, za razliku od 50% svih pacijenata koji dobijaju ovaj lek, 19-35% pacijenata sa idiopatskim SLE i do 30% zdravih odraslih osoba koje nikada nisu dobijale ovaj lek. Ovo ukazuje na činjenicu da nastanak LLS indukovano prokainamidom ne zavisi od anti-lek antitela (192). I za neke druge lekove (etanercept, infliksimab, adalimumab) nema dokaza da prisustvo antitela na odgovorni lek korelira sa pojavom autoantitela i razvojem LILLS (193, 194). Visoka incidencija anti-hidralazin antitela i patogeni mehanizam kod hidralazin-indukovanog LLS objašnjavaju se molekularnom mimikrijom (strukturna sličnost između hidralazina i nukleotida adenzina) i ukrštenom reaktivnošću (engl. cross-reactivity) antitela (195).

I prokainamid i hidralazin se vezuju za polinukleotide i stvaraju lek-DNA strukturu koja je potencijalno imunogenija od nativnih DNK molekula. Ovi lekovi takođe mogu da se vezuju i za nukleoproteine, što povećava njihovu imunogenost. DNK modifikovana ovim agensima postaje mnogo antigenija. Ovi lekovi, kao i izonijazid i d-penicilamin mogu da indukuju promenu konfiguracije DNK. DNK u novoj Z konfiguraciji značajno je imunogenija, tako da lek-DNK kompleks može indukovati stvaranje nekih autoantitela prisutnih kod LILLS (196, 197, 198).

Histoni, DNK vezujući proteini, koji su odgovorni za pakovanje DNK u hromatin koji nije pasivna struktura, podležu dinamičnoj modifikaciji (kao što je acetilacija, metilacija, fosforilacija), što ima važnu regulatornu ulogu u ekspresiji gena. Pretpostavlja se da određeni lekovi mogu direktno da se vežu za hromatin i menjaju ekspresiju gena. Dokazano je da hidralazin inteeaguje sa solubilnim DNK-histon kompleksom. Ova strukturna promena čini histone znatno rezistentnije na proteolitičku digestiju, a izmenjena struktura takođe može biti znatno imunogenija, što može objasniti visoku incidenciju antihistonskih antitela kod LILLS (199). Međutim, iako se antitela protiv subjedinica histona uobičajeno detektuju kod pacijenata sa LILLS, precizna uloga ovih i drugih autoantitela u patogenezi LILLS nije jasna. Bila bi greška poistovetiti prisustvo anti-histonskih antitela sa dijagnozom LILLS (200).

Stvaranje reaktivnih metabolita sa sličnim karakteristikama može objasniti zašto hemijski i farmakološki različiti lekovi mogu indkovati autoimunost i izazvati sličnu kliničku sliku. Reaktivni metaboliti imaju kapacitet da formiraju stabilne komplekse sa sopstvenim makromolekulima ili da direktno stimulišu limfocite. Iako postoje studije koje sugerišu da lekovi ili njihovi metaboliti indukuju specifični T ćelijski odgovor, najverovatnije na izmenjene sopstvene proteine, nema uverljivih dokaza da ovo pokreće autoimunost. Najverovatnije citotoksičnost reaktivnih metabolita dovodi do apoptoze pre nego nekroze, a apoptotična telašca sadrže veliku koncentraciju autoantigena, što može indkovati imunski odgovor (201). Još ranije je ustanovljeno da reaktivni metaboliti prokainamida poboljšavaju limfocitni mitogeni odgovor i stimulišu B-ćelijsku sekreciju imunogloblina (202).

1.7.4.2. Citokini/anticitokini (INF-alfa, TNF-alfa)

Pored pomenutih lekova, dokazano je i da brojni citokini/anticitokini mogu izazvati autoimunost kod ljudi. Tip I interferona, uključujući INF-alfa, igra odlučujuću ulogu u antivirusnom imunskom odgovoru. Između 0.15% i 0.7% pacijenata lečenih IFN-alfa razvijaju LLS (203). Smatra se da INF-alfa može delovati na autoimunost tako što deluje na apoptozu. Interesantno, nivo IFN-alfa je povećan i kod idiopatskog SLE i može korelirati sa titrom anti-DNK antitela (203). Takođe, podaci pokazuju da citokini mogu aktivisati autoreaktivne T ćelije stimulacijom produkcije virusnih superantigena (204). Novije studije sugerišu da IFN-alfa može indkovati diferencijaciju dendritičnih ćelija kod pacijenata sa lupusom i tako delovati na patogenezu (205). Druga studija čak dokazuje da IFN-alfa može uticati na autoimunski odgovor tako što pokreće monocitnu diferencijaciju u APC (206).

Mehanizam kojim anti-TNF- α indukuje LLS nije razjašnjen. Prva hipoteza bi mogla da bude sposobnost terapijskih anti-TNF-alfa antitela da se vezuju za površinu ćelije i indukuju ćelijsku smrt apoptozom. Ovo bi rezultiralo oslobađanjem antinukleozomalnih autoantigena i indukciju anti-dsDNK antitela (207). Druga hipoteza se bazira na pretpostavci da supresija Th1 odgovora TNF

inhibitorima može favorizovati Th2 odgovor dovodeći do SLE (208). Treća hipoteza govori o ulozi bakterijske infekcije kao snažnog stimulansa dovodeći do aktivacije poliklonalnih B-limfocita i produkcije autoantitela (209).

1.7.4.3. Minociklin

Minociklin može da indukuje razne imunske i autoimunske fenomene kao što su autoimunski hepatitis, trombocitopeniju i kutani lupus. Minociklin je lek koji ima brojne efekte na imunski i inflamatorni sistem. Na primer, minociklin inhibiše metaloproteinaze, uključujući i kolagenazu (MMP-1), želatinazu (MMP-2) i stromelizin (MMP-3). Pored toga, minociklin selektivno inhibiše T ćelijsku produkciju TNF-alfa, ali paradoksalno poboljšava oslobađanje IL-6 i TNF-alfa iz monocita (210). Moguće je da minociklin može indukovati autoimunske fenomene in vivo mehanizimima sličnim onima kojima blokiraju anti-TNF agensi (203).

1.7.4.4. Propiltiouracil

PTU je lek koji često izaziva LLS. Mehanizam kojim PTU indukuje toksičnost nije potpuno razjašnjen, i mada ima nekih sličnosti, najverovatnije se razlikuje od mehanizma kojim drugi lekovi indukuju LLS. In vitro studije su pokazale da i PTU pokreću citotoksične efekte samo u prisustvu aktivisanog neutrofila. Pokazano je da se PTU akumulira u neutrofilima i vezuje za MPO, menjajući njenu strukturu (211). MPO i hidrogen peroksid koji stvaraju neutrofili metabolišu lek, stvarajući reaktivne metabolite koji potom preko T limfocita, stimulišu imunski sistem. Metaboliti koji imaju citotoksičnu aktivnost dovode do ćelijske smrti i produkcije autoantitela (211). Tiolna grupa kod antitiroidnih lekova dopušta vezivanje za ćelijske makromolekule, i tako deluje kao haptent i indukuje stvaranje antitela. Takođe, metaboliti PTU ulaze u kompeticiju sa timidinom, inhibišući DNK sintezu ili bivaju inkorporirani u DNK (212). Takođe, humana MPO i tiroid peroksidaza (TPO) su članovi iste porodice gena, tako da kod pacijenata sa tiroidnom bolešću anti-TPO antitela mogu dovesti do ukrštene

reakcije sa MPO (213). U svakom slučaju, dolazi do abnormalne regulacije imunske funkcije, što posledično dovodi do neželjenih efekata leka.

Kod pacijenata sa LLS, pored pomenutih antitela, naročito kod pacijenata sa Grejvsovom bolešću koji prolongirano uzimaju PTU, detektuju se i ANCA. Brojni ANCA povezani lupus-like sindromi, vaskulitisi i izolovani nefritisi opisani su kod ovih pacijenata (181). Takođe, PTU dovodi do poremećaje NETs kod pacijenata sa ANCA vaskulitisom indukovanim PTU (61, 214).

Mehanizam kojim PTU indukuje stvaranje ANCA nije potpuno razjašnjen. Poremećaj regulacije NETs može biti uključen u patogenezu PTU-indukovanog LLS (42, 59). Za razliku od SLE, značaj aktivnosti DNase I u patogenezi lekom indukovano LLS još uvek nije razjašnjena. Dugotrajna ekspozicija leku koji indukuje produkciju ANCA, može dovesti do vitalno teških komplikacija (215, 216).

1.7.5. Klasifikacija

Kao idiopatski LE, LE indukovano lekom se deli na subakutni kutani, diskoidni i sistemski, odnosno lupus-like sindrom (LLS).

1.7.5.1. Subakutni kutani LE indukovano lekom

SCLE indukovano lekom je veoma sličan idiopatskom SCLE kada su u pitanju kliničke i serološke karakteristike i mnogo je češći od sistemske forme (217). Mnogi slučajevi idiopatskog SCLE mogu biti indukovani lekom. Klinički se manifestuje tipičnim fotosenzitivnim simetričnim, neožiljnim anularno-policikličnim ili eritemoskvamoznim plakovima, obično na fotoekspoziranim zonama. Imunološki profil obuhvata često prisustvo anti-Ro/SSA i/ili anti-La/SSB antitela, zajedno sa ANA i anti-histonskim antitelima.

1.7.5.2. Lekom indukovano diskoidni LE

Hronični (diskoidni) LE indukovano lekom je veoma redak i obično je u vezi sa agensima fluorouracila ili nesteroidnim antiinflamatornim lekovima (174).

1.7.5.3. LLS indukovan lekom

Sistemska LLS obično počinje više meseci ili godina od uvođenja odgovornog leka. Ne postoje standardni dijagnostički kriterijumi za dijagnozu LILLS. U mnogim slučajevima pacijenti sa sistemskim LILLS ne ispunjavaju ACR kriterijume za dijagnozu SLE.

Tipično pozitivna 4 simptoma i znaka bolesti koji se mogu smatrati dijagnostičkim kriterijumima su: artritis (artralgije), serozitis, ANA i anti-histonska antitela.

Najčešći simptomi su artralgije, mijalgija, groznica, malaksalost, pleuritis i perikarditis. Artralgija je vrlo karakterističan simptom, javlja se kod 90% pacijenata i često je jedini klinički simptom. Najčešće zahvata simetrično male zglobove, ali može zahvatiti i pojedinačne zglobove. Opisani su slučajevi i artritisa, ali koji retko dovodi do destrukcije zgloba. CNS i bubrezi obično nisu zahvaćeni. Kutane promene se ređe javljaju i obično su slabijeg intenziteta nego kod SLE. Fotosenzitivnost, purpura i erythema nodosum se češće javljaju kod LILLS nego kod idiopatskog SLE, dok su malarni eritem, alopecija, diskoidne lezije i oralne ulceracije prilično retke (174).

1.7.6. Antitela kod LLS indukovanog lekom

Najčešće se detektuju ANA sa homogenim obrascem i anti-histonska antitela (pozitivna kod 95% pacijenata). Titar ovih antitela postepeno opada sa rezolucijom LILLS. Međutim, anti-histonska antitela nisu patognomonična za LILLS, pozitivna su i kod drugih bolesti vezivnog tkiva. Za razliku od idiopatskog SLE, anti-dsDNA i anti-ENA antitela su retka (174). Antikardiolipinska antitela nađena su kod pacijenata sa LLS indukovanog hidralazinom, prokainamidom, hlorpromazinom (čak do 75% pacijenata) i kinidinom (173).

Anti-MPO i anti-El antitela prvi put su opisana kod hidralazin-indukovanog LLS (218, 219, 220). Potom su anti-MPO i anti-PR3 antitela detektovana i kod PTU-indukovanog LLS (221, 222), dok su anti-MPO nađena i kod LLS pokrenutog sulfasalazinom i minociklinom (223, 224). Postojanje glomerulonefritisa kod pacijenata sa hidralazin-indukovanim LLS je najverovatnije u vezi sa anti-MPO

antitelima. Međutim, iako se anti-MPO antitela detektuju kod više od 50% pacijenata sa hidralazin-indukovanim LLS, ona nisu nađena kod LLS indukovanoj prokainamidom, što je u skladu sa odsustvom bubrežne bolesti kod ovih pacijenata.

1.8 RADNA HIPOTEZA

ANCA pozitivni pacijenti u odnosu na ANCA negativne pacijente imaju težu kliničku formu SLE. Polispecifična ANCA, posebno anti-mijeloperoksidaza i anti-laktoferin ANCA su serološki markeri aktivnog SLE. Pacijenti sa sniženom aktivnošću DNaze I imaju češće ANCA čije prisustvo i koncentracija koreliraju sa imunoserološkim markerima aktivnosti SLE. Pacijenti sa PTU-indukovanim ANCA pozitivnim LLS imaju sniženu aktivnost DNaze I u serumu.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu dosadašnjih saznanja o ulozi ANCA i aktivnosti DNaze I u patogenezi SLE, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Ispitati učestalost i profil ANCA (mijeloperoksidaza, proteinaza 3, laktoferin, elastaza, BPI, katepsin G) kod SLE i LILLS.
2. Ispitati kliničke i imunoserološke razlike između ANCA pozitivnih pacijenata sa SLE i LILLS.
3. Ispitati kliničke i imunoserološke razlike između ANCA pozitivnih i ANCA negativnih pacijenata sa SLE.
4. Ispitati udruženost prisustva i koncentracije određenog tipa ANCA sa kliničkim i serološkim manifestacijama SLE i LILLS.
5. Utvrditi korelaciju između koncentracije ANCA sa imunoserološkim (komponente komplemента, antihromatinska antitela) i kliničkim parametrima aktivnosti SLE i LILLS.
6. Utvrditi odnos između aktivnosti DNaze I u serumu, ANCA i kliničkih parametara SLE i LILLS.

3. PACIJENTI I METODE

Naša retrospektivna studija obuhvatila je 159 konsekutivnih pacijenata dijagnostikovanih, lečenih i praćenih u Kliničkom centru Srbije - KCS (Klinika za dermatovenerologiju, Klinika za nefrologiju, Klinika za alergologiju i imunologiju i Klinika za endokrinologiju) od januara 2008. do septembra 2015. godine. Studija je izvedena u skladu sa pravilima Helsinške deklaracije i odobrena je od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.1. SELEKCIJA ISPITANIKA

Kriterijumi za uključivanje SLE pacijenata u studiju bili su sledeći:

1. Za pacijente sa novonastalim SLE: postavljena dijagnoza SLE na osnovu ACR kriterijuma (130).
2. Za pacijente sa relapsom SLE da nisu lečeni pulsevima ciklofosfamida ili metilprednizolona najmanje prethodna 3 meseca. Relaps lupusa je definisan kao svaki porast SLEDAI-2K skora za bar 3 poena u poređenju sa prethodnom kontrolom (225).
3. Pacijenti u vreme uzimanja uzoraka nisu smeli biti na dozama prednizona većim od 20 mg/48h, niti su smeli dobijati drugu imunosupresivnu terapiju 3 meseca pre uvođenja u studiju.
4. Za pacijente sa LLS indukovanim PTU: dijagnoza postavljena na osnovu prisustva ACR kriterijuma koji su povezani sa primenom PTU i koji su se povukli nakon obustavljanja leka, sa ili bez upotrebe imunosupresiva (174).
5. Svi pacijenti sa LLS indukovanim PTU morali su da imaju bar 3/11 ACR kriterijuma za SLE (ANA su bila obavezan kriterijum).
6. Potpisan informisani pristanak za učešće u studiji.

Kod 142/159 (89%) pacijenata SLE je dijagnostikovano na osnovu ACR kriterijuma (American College of Rheumatology criteria) (130). Kod 17/159 (11%) pacijenata postavljena je dijagnoza ANCA-udruženog PTU-indukovanog LLS.

Kontrolna grupa, u odnosu na pacijente sa LLS, se sastojala od 22 zdrave osobe i 10 ANCA negativnih pacijenata sa autoimunskim hipertireoidizmom lečenih PTU. Nije ustanovljena značajna razlika u polu, godinama života i dužini primene PTU između pacijenata i kontrolne grupe.

Našom studijom obuhvaćeno je 159 konsektivnih pacijenata sa LE, od kojih 142 sa idiopatskim SLE i 17 sa LLS indukovanim PTU koji su ispunili sledeće inkluzivne kriterijume: 1) novodijagnostikovana bolest (44/142 (31%) SLE i svih 17 (100%) sa LILLS) ili 2) SLE relaps (98/142) (69%) koji nije lečen pulsevima ciklofosfamida ili metilprednizolona bar prethodna 3 meseca. Relaps lupusa je definisan kao svaki porast SLEDAI-2K skora za bar 3 poena u poređenju sa prethodnom kontrolom (225).

Među pacijentima sa SLE, ženskog pola je bilo 118/142 (83.1%), a muškog 24/142 (16.9%). Prosečna starost ispitanika sa SLE prilikom uključivanja u studiju je bila 40.4 ± 16.4 godina, sa opsegom od 9 do 78 godina. Prosečno trajanje SLE kod 142 pacijenta koji su ispunili kriterijume za SLE bilo je 4.6 ± 5.9 godina (opseg 0-32 godine).

Među pacijentima sa LILLS, ženskog pola je bilo 15/17 (88.2%), a muškog 2/17 (11.8%). Prosečna starost pacijenata sa LILLS bila je 38.9 ± 12 , sa opsegom 24-64 godine. Vreme kliničkog praćenja je bilo 4.1 ± 2 (opseg 0.8-6.4 godina).

Pacijenti koji su ispunjavali navedene inkluzivne kriterijume bili su stratifikovani na osnovu vrste i tipa LE. Svaki od ispitanika potpisao je informisani pristanak o učestvovanju u studiji, u slučaju maloletnih pacijenata pristanak su potpisivali roditelji. U vreme uključivanja u studiju registrovani su sledeći podaci: uzrast, pol, trajanje bolesti i aktuelna terapija. Pacijentima je određen indeks aktivnosti bolesti i uzeti su im uzorci venske krvi bez koagulansa i poslani u imunološku laboratoriju Kliničkog centra Srbije gde su urađene imunoserološke analize i profil ANCA, i iz izdvojenog seruma određena aktivnost DNaze I.

Praćeno je 25/40 pacijenata sa ANCA pozitivnim SLE i 12/17 pacijenata sa LLS indukovanim PTU, i njima su nakon perioda praćenja ponovljeni imunoserološki parametri i ANCA profil. Kod 25 pacijenata sa SLE srednje vreme praćenja bilo je 1.9 ± 1.5 godina (opseg 0.1-5.5 godina), a kod 12 LILLS pacijenata srednje vreme praćenja bilo je 4.1 ± 2 (opseg 1.2-6.1 godina).

Dijagnoza LLS indukovanog lekom postavljena je na osnovu prosustva SLE kriterijuma koji su povezani sa uzimanjem PTU i koji su se povukli nakon obustavljanja leka, sa ili bez upotrebe imunosupresivne terapije (174). Svi pacijenti morali su da imaju bar 3/11 ACR kriterijuma za SLE (ANA su bila obavezan kriterijum). Na PTU terapiji održavanja bilo je 12/17 pacijenata (50–150 mg/day), dok je visokim dozama PTU (300-400 mg/day) lečeno 5/17 pacijenata. Na intermitentnoj PTU terapiji bilo je 8/17 pacijenata. Nakon isključenja PTU, klinička remisija postignuta je kod svih pacijenata posle 4 ± 2 meseca (opseg 3 nedelje-8.5 meseci). Samo isključenjem PTU, remisija je postignuta kod 10/17 pacijenata. Sistemskim kortikosteroidima lečeno je 7/17 pacijenata (i.v. metilprednizolonski puls kod 2 pacijenta, i oralni prednizon u dozi od 1 mg/kg duže od 8 nedelja, sa postepenim snižavanjem doze kod 5 pacijenata). Nakon postizanja remisije LLS, 5/17 pacijanata je lečeno radioaktivnim jodom, a 4/17 lečeno je hirurški. Pacijenti su praćeni tokom 4.1 ± 2 godine (opseg 0.8-6.4 godine), a imunoserološki parametri i profil ANCA ponovljeni su kod 12/17 pacijenata kod kojih je srednje vreme praćenja bilo 2.6 ± 1.7 godina (opseg 0.4-5.2 godine).

3.2. INSTRUMENTI MERENJA

Svim pacijentima u ispitivanoj grupi uzeti su uzorci krvi i standardnim metodama su izmereni imunoserološki parametri aktivnosti bolesti i određen ANCA profil, dok je aktivnost DNaze I u serumu izmerena kod 36 pacijenata sa SLE i svih 17 pacijenata sa ANCA pozitivnim PTU-indukovanim LLS.

3.2.1. ANCA profil

U uzorcima seruma pacijenata detektovana su humana autoantitela (ANCA) klase IgG prema šest različitih antigena, odnosno neutrofilnih proteina: MPO, PR3, El, Lf, Cat-G i BPI, upotrebom semikvantitativnog *in vitro* ELISA testa (ANCA-Profile, Euroimmun, Germany). Test kit sadrži 12 traka sa po 8 bazenčića, posebno obloženih sa navedenim antigenima. Nakon odmrzavanja serumi su razblaženi 1:101 i razliveni na ploču sa 96 bazenčića. Nakon inkubacije od 30 min na sobnoj temperaturi (18°C do 25°C) tri puta su isprani. U 2. koraku, u svaki bazenčić dodaje se 100 µL enzim konjugata (peroksidaza obeležena anti-humanim IgG) i ponovo inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi (18°C do 25°C) da bi se reakcija nastavila. U 3. koraku, posle drugog ispiranja, dodaje se 100 µL rastvora hromogen/supstrata i inkubira 15 minuta na sobnoj temperaturi. Reakcija se prekida dodavanjem 100 µL rastvora za prekid reakcije istim redosledom i brzinom kao dodavanje hromogen/supstrata. Tokom enzimske reakcije razvija se žuta boja čiji se intenzitet meri fotometrijski na 450 nm tokom 30 minuta od dodavanja rastvora za prekid reakcije.

Izračunavanje rezultata: kako fotometar nema automatsko prazno podešavanje, srednja vrednost prvo mora biti izračunata i oduzeta od svih drugih merenih vrednosti. Zatim se srednja vrednost svih merenja kalibratora računa i množi sa faktorom 0.2. Ovo obezbeđuje gornji limit normalnog opsega (cut-off). Vrednosti iznad označenih kao cut-off se smatraju pozitivnim, a vrednosti ispod cut-off negativnim. Pored kvalitativnog računanja, moguća je i semikvantitativna evaluacija rezultata računanjem indeksa za svaki antigen, osim PR3, pomoću formule:

$$\text{Extinction of the patient sample} / \text{extinction of calibrator} \times 0.2 = \text{Ratio}$$

Izuzetak je računanje indeksa za PR3. Dobijeni rezultat množi se sa 1.4.

Na osnovu indeksa vrednosti optičke gustine za svaki antigen, rezultat se interpretira kao negativan (< 1.0), slabo pozitivan (≥ 1.0 do 2), pozitivan (≥ 2.0 do 5.0) i jako pozitivan (≥ 5.0).

Pored ANCA profila, odnosno računanja indeksa za svih šest antigena, koncentracija anti-MPO i anti-PR3 antitela (cut-off 20 U/mL) određena je direktnim kvantitativnim ELISA testom (Euroimmun, Germany).

3.2.2. Ostali imunoserološki parametri

3.2.2.1. Određivanje koncentracije komponenti komplementa (C3 i C4)

Koncentracija komponenti komplementa C3 i C4 izmerena je iz uzoraka krvi standardnim metodama - automatska nefelometrija za komponente komplementa ((Binding Site, UK). Normalne vrednosti za C3 komponentu komplementa (C3) su 0.8-1.8 g/L, a za C4 komponentu komplementa (C4) su 0,1-0,4 g/L.

3.2.2.2. Određivanje prisustva i koncentracije ANA, anti-dsDNK, anti-ENA, anti-nukleozomalna, anti-histonska, anti-C1q, antikardiolipinska antitela

Titar IgG ANA je meren metodom indirektno imunofluorescencije (IF) upotrebom supstrata - HEp-2 ćelijama (Euroimmun, Germany). Titar ANA \geq 1:80 je smatran patološkim. Pacijenti sa SLE i negativnim nalazom ANA su testirani na prisustvo anti-Ro(SSA) antitela ELISA metodom (Orgentec Diagnostika, Mainz, Germany).

Koncentracija IgG anti-dsDNK antitela određena je IIF (Crithidia luciliae, Euroimmun, Germany) i ELISA metodom za određivanje visoko aviditetnih IgG anti-dsDNK (cut-off 90 U/mL) (Genesis Diagnostics, UK).

Koncentracija anti-ENA - ekstraktibilni nuklearni antigeni (Sm/RNP, Sm, SS-A, SS-B) je merena (cut-off 20 U/mL) ELISA metodom (Euroimmun, Germany).

Anti-histonska i anti-nukleozomalna antitela su izmerena ELISA metodom (Orgentec Diagnostika GmbH, Germany). Koncentracije anti-histonskih antitela ispod 40 U/mL i anti-nukleozomalnih antitela ispod 20 U/mL smatrane su normalnim.

Anti-C1q (cut-off 10 U/mL), IgG/IgM antikardiolipinska antitela (aCL) (cut-off 10 GPL U/mL, odnosno 7 MPL U/mL) i IgG/IgM anti- β 2 glikoprotein I (cut-off 8 U/mL) su određeni takođe ELISA metodom (Orgentec Diagnostika GmbH, Germany) prema uputstvu proizvođača.

Prisustvo krioglobulina je ispitano standardnom procedurom (226).

Sve imunoserološke analize urađene su u imunološkoj laboratoriji KCS.

3.2.3. Klinički indeks aktivnosti bolesti - SLEDAI-2K

Indeks aktivnosti SLE - SLEDAI-2K je određen na osnovu prisustva simptoma i znakova u kliničkoj slici, i laboratorijskih parametara - prilog 1 (167). Podaci potrebni za izračunavanje indeksa su dobijeni iz medicinske dokumentacije (istorije bolesti, ambulantni kartoni). Vrednost SLEDAI-2K ≥ 7 je označavala umereno do visoko aktivnu bolest, dok je vrednost SLEDAI-2K < 7 označavala SLE niske aktivnosti (227).

3.2.4. Aktivnost DNaze I u serumu

Aktivnost serumske DNaze I merena je ELISA metodom (Orgentec Diagnostika GmbH, Germany) koja meri degradaciju Dnaze I supstrata, formiranje enzim konjugat kompleksa (korišćenjem peroksidaze rena) i enzimsku reakciju. Serumi su nakon odmrzavanja razblaženi 1:11 i razliveni na ploču sa 96 bazenčića obloženih sa DNK. Nakon inkubacije od 1 sata na 37°C, ploče se ispiraju. Potom se dodaje enzim (peroksidaza rena) konjugovan sa anti-DNaza I supstratom i inkubira 15 minuta na sobnoj temperaturi da bi se nastavila reakcija sa preostalim (nerazgrađenom) DNK. Nakon dodavanja supstrata, tokom enzimske reakcije se razvija žuta boja čiji se intenzitet meri spektrofotometrijski na 450 nm.

Intenzitet boje je obrnuto proporcionalan aktivnosti DNaze I u uzorku seruma. U analizu se uključuje i serija standarda, kao i pozitivna i negativna kontrola. Prema specifikaciji proizvođača, u studiji opsega normalnih vrednosti sa zdravim davaocima krvi, granična vrednost za značajnu redukciju enzimske aktivnosti bila je 25%_{mL}, tako da je aktivnost DNaze I u serumu manja od 75%_{mL} smatrana smanjenom.

Aktivnost DNaze I u serumu 22 zdravih davaoca krvi iznosila je 67.24±13.19%/_{mL}. Ustanovljeno je da je za ovu grupu pacijenata granična vrednost za značajnu redukciju enzimske aktivnosti = aritmetička sredina - 1 standardna devijacija (SD) vrednosti u kontrolnoj grupi, odnosno da se smanjenom smatra aktivnost DNaze I u serumu koja je niža od 67.24±13.19%/_{mL}.

3.3. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza urađena je upotrebom softverskog paketa SPSS (engl. Statistical Package for Social Sciences) za Windows, verzija 20.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). Korišćene su metode deskriptivne i inferencijalne statistike.

Od metoda deskriptivne statistike korišćene su: mere centralne tendencije (aritmetička sredina i medijana), mere varijabiliteta (interval varijacije, standardna devijacija i interkvartilni rang) i relativni brojevi. Vrednosti kontinuiranih varijabli su prikazane kao prosečna vrednost ± 1 SD, a diskontinuiranih varijabli kao brojevi i procenti.

Statističke metode korišćene za povezane i nezavisne uzorke su: χ^2 -test, Fisher-ov test tačne verovatnoće, McNemar test, Mann-Whitney U-test, Wilcoxon test ekvivalentnih parova, Kruskal-Wallis test i t-test). Distribucija vrednosti proverena je upotrebom Shapiro-Wilk testa.

Za poređenje kliničkih i seroloških parametara između dve grupe pacijenata – SLE i LLS indukovano lekom, korišćen je χ^2 -test. Za poređenje prisustva seroloških parametara, uključujući ANCA profil, između pacijenata sa LLS u aktivnoj fazi i remisiji, primenjen je McNemar test.

Za poređenje vrednosti seroloških parametara između SLE i LLS pacijenata korišćen je t-test ili Mann-Whitney test, u zavisnosti da li su podaci normalno distribuirani ili ne. Za poređenje seroloških parametara između pacijenata sa LLS u aktivnoj fazi i remisiji, upotrebljen je t-test ili Wilcoxon test.

Za poređenje aktivnosti DNaze I u serumu SLE pacijenata, LLS pacijenata u aktivnoj fazi i zdravih osoba u kontrolnoj grupi, korišćena je jednosmerna (engl. „one-way“) analiza varijanse (ANOVA). Za poređenje aktivnosti serumske DNaze I između dve grupe LLS pacijenata (u aktivnoj fazi i remisiji) i kontrolnoj grupi, upotrebljen je Kruskal-Wallis test sa naknadnim poređenjem parova pomoću Mann-Whitney U-testa.

Moguća povezanost, odnosno stepen povezanosti dva parametra izračunat je pomoću koeficijenta korelacije. Vrednosti koeficijenta korelacije mogu biti u rasponu od -1 do 1. Predznak koeficijenta korelacije pokazuje smer povezanosti:

vrednosti od -1 do 0 postoje kod negativne povezanosti, a vrednosti od 0 do 1 kod pozitivne povezanosti. Vrednosti bliske 0 ukazuju na odsustvo povezanosti. Statistička značajnost koeficijenta korelacije testirana je t-testom. Na osnovu testa korelacije koji nije statistički značajan ($p > 0.05$) zaključeno je da između varijabli nema povezanosti, a na osnovu testa koji jeste statistički značajan ($p \leq 0.05$) da ima. Jačina povezanosti je određena na osnovu vrednosti koeficijenta korelacije: vrednost 0.7-1 označava jaku povezanost, 0.3-0.69 osrednju povezanost, < 0.3 slabu povezanost i vrednost oko 0.0 znači da nema povezanosti.

Moguća korelacija između aktivnosti DNaze I i koncentracije MPO- i PR3-ANCA u serumu LLS pacijenata ustanovljena je primenom Pearson-ovog koeficijenta korelacije (r), a između aktivnosti DNaze I i seroloških parametara (ANA, anti-histonska, anti-nukleozomalna antitela) izračunata je upotrebom Spearman-ovog koeficijenta korelacije (r_s).

Podaci su prikazani tabelarno i grafički. Vrednosti verovatnoće (p) manje od 0.05 smatrane su statistički značajnim, dok su p -vrednosti manje od 0.01 smatrane visoko statistički značajnim.

4. REZULTATI

4.1. DEMOGRAFSKI PODACI, KLINIČKI I IMUNOSEROLOŠKI PARAMETRI PACIJENATA SA IDIOPATSKIM SLE I LEKOM INDUKOVANIM LLS

4.1.1. Demografski podaci pacijenata sa SLE i PTU-indukovanim LLS

Našom studijom je obuhvaćeno 142 pacijenta sa SLE i 17 pacijenata sa LILLS. Osnovni demografski podaci prikazani su u tabeli 4.

Tabela 4. Demografski i klinički podaci pacijenata sa idiopatskim SLE i PTU-indukovanim LLS

	SLE n=142	PTU-indukovan LLS n=17
Pol: Ž (%)	118 (83.1)	15 (88.2)
Starost (godine): prosek±SD (opseg)	40.4±16.4 (9-78)	38.9±12 (24-64)
Starost Ž (godine): prosek±SD (opseg)	39.9±16 (9-78)	39.2±12.6 (24-64)
Starost M, godine: prosek±SD (opseg)	42.7±18.4 (11-75)	35.5±9.1 (29-42)
SLEDAI-2K: prosek±SD (opseg)	10.5±6.2 (1-34)	-
SLEDA-2K >=7, n (%)	83/128 (64.8)	-
Novonastali SLE (%)	44 (31)	-
Trajanje SLE (god): prosek±SD (opseg)	4.6±5.9 (0.04-32)	-
Graves' disease / Hashimoto thyroiditis	-	13/4
Primena PTU (meseci): medijana (opseg)	-	36 (14-108)
Kliničko praćenje (god) prosek±SD (opseg)	1.9±1.7 (0.08-6.8)	4.1±2 (0.8-6.4)

SLE, sistemski lupus erythematosus; PTU, propiltiouracil; LLS, lupus-like sindrom; SD, standardna devijacija

4.1.2. Kliničke manifestacije pacijenata sa SLE i PTU-indukovanim LLS

Kliničke karakteristike 142 pacijenata sa SLE i 17 pacijenata sa PTU-indukovanim LLS prikazane su u tabeli 5. Niko od 17 PTU-indukovanih LLS pacijenata nije imao zahvaćenost bubrega, seroznih membrana, neurološke manifestacije i hepatitis. Koža je bila zahvaćena kod 57.8% pacijenata sa SLE i 88.2% sa LLS. Među SLE pacijentima, malarni eritem imalo je 34.4%, DLE promene 11.7%, SCLE tip promena i urtikariju po 2.3% pacijenata, dok niko od 17 LILLS pacijenata nije imao navedene kutane promene. Purpuru, urticaria-like vaskulitis i ulceracije imalo je 88.2% LILLS pacijenata za razliku od samo 4.7% SLE pacijenata.

Kod pacijenata sa SLE, od ostalih organskih manifestacija najčešće je zabeleženo zahvatanje zglobova - sinovitis (55.8%), bubrega (54.9%) i hematološki poremećaji (47.3%), i to najčešće leukopenija (41.9%).

Pacijenti sa idiopatskim SLE visoko statistički značajno češće su imali malarni eritem ($p<0.01$), a pacijenti sa LILLS purpuru i vaskulitis ($p<0.01$). Od drugih organa, zglobovi ($p<0.01$) i bubreg ($p<0.01$) su visoko statistički značajno češće bili zahvaćeni kod pacijenata sa SLE u odnosu na pacijente sa LILLS (tabela 5). Sistemske manifestacije (febrilnost, atralgije/mialgija) bile su visoko statistički značajno češće ($p<0.01$) kod pacijenata sa LILLS. Međutim, i pored prisustva atralgija/mialgije kod svih (100%) LILLS pacijenata, kliničke znake sinovitisa/artritisa imao je samo 1 (5.9%) LILLS pacijent.

Tabela 5. Kliničke manifestacije SLE i PTU-indukovanog LLS

Zahvaćenost organa (klinički simptomi i znaci)	SLE n=142	LILLS n=17
Febrilnost >38.5°C (%)	36/128 (28.1)	11 (64.7)**
Atralgije/mialgija	71/129 (55)	17 (100)**
Mukokutane promene (%)	74/128 (57.8)	15 (88.2)
Malarni eritem (%)	44/128 (34.4)**	0
DLE (%)	15/128 (11.7)	0
SCLE (%)	3/128 (2.3)	0
Purpura, urticaria like-vaskulitis, ulceracije (%)	6/128 (4.7)	15 (88.2)**
Urtikarija (%)	3/128 (2.3)	0
Oralne ulceracije (%)	9/128 (7)	0
Sinovitis (%)	72/129 (55.8)**	1 (5.9)
Bubrežna zahvaćenost (%)	73/133 (54.9)**	0
Neurološke manifestacije (%)	18/129 (14)	0
Citopenija (%)	61/129 (47.3)	8 (47.1)
Hemolitička anemija (%)	12/129 (9.3)	0
Leukopenija (%)	54/129 (41.9)	6 (35.3)
Trombocitopenija (%)	11/128 (8.6)	2 (11.8)
Poliserozitis (%)	22/128 (17.2)	0
Autoimunski hepatitis (%)	10/128 (7.8)	0

SLE, sistemski lupus erythematosus; PTU, propiltiouracil; LLS, lupus-like syndrome; DLE, diskoidni lupus erythematosus; SCLE, subakutni kutani lupus erythematosus.

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. * $p<0.05$ ** $p<0.01$

4.1.3. Imunoserološki parametri kod pacijenata sa SLE i PTU-indukovanim LLS

Od praćenih parametara stečene imunosti - antitela, ANA su bila prisutna kod 96.5% pacijenata sa SLE i svih pacijenata sa PTU-indukovanim LLS, ali je medijana ANA titra bila značajno veća kod SLE u odnosu na LILLS pacijente ($p < 0.01$) (tabela 6). Takođe, pacijenti sa SLE su značajno češće imali anti-dsDNK (IIF), high-avidity anti-dsDNK, anti-ENA, anti-SSA ($p < 0.01$), anti-histonska ($p < 0.05$), anti-nukleozomalna ($p < 0.01$) i anti-C1q antitela ($p < 0.05$) nego pacijenti sa LILLS (tabela 6). Srednje vrednosti (median) koncentracija anti-ENA, high-avidity anti-dsDNK, anti-nukleozomalnih ($p < 0.01$) i anti-C1q antitela bile su značajno više kod pacijenata sa SLE nego sa LLS ($p < 0.05$). Iako nije bilo razlike u učestalosti prisustva niskog komplementa i IgG aCL pozitivnosti, pacijenti sa LILLS su imali značajno veće prosečne koncentracije C3 ($p < 0.01$) i značajno više srednje vrednosti (medijana) koncentracija IgG/IgM aCL antitela ($p < 0.01$) nego pacijenti sa SLE.

Pacijenti sa teškim kliničkim manifestacijama, osim ANA i ANCA, imali su i krioglobuline, aCL antitela i nizak komplement.

Tabela 6. Imunoserološki parametri pacijenata sa SLE i PTU-indukovanim LLS

Serološki parametri	SLE n=36	LILLS n=17
ANA (IIF) (%)	137 (96.5)	17 (100)
Titar ANA, medijana (opseg)	320 (0-640)**	80 (40-640)
Anti-dsDNK (%)	86 (60.6)**	0
High-avidity anti-dsDNK (%)	25/41 (61)**	1 (5.9)
Anti-ENA (%)	90/139 (64.7)**	3 (17.6)
Anti-SSA (%)	78/139 (56.1)**	3 (17.6)
Anti-histonska At (%)	24/73 (32.9)*	1 (5.9)
Anti-nukleozomalna At (%)	61/68 (89.7)**	3 (17.6)
Anti-C1q (%)	39/79 (49.4)*	3 (17.6)
Nizak C3 (%)	56 (39.4)	6 (35.3)
Nizak C4 (%)	59 (41.5)	5 (29.4)
Krioglobulini (%)	33/67 (49.3)	8 (47.1)
aCL IgG (%)	16/98 (16.3)	6 (35.3)
aCL IgM (%)	14/98 (14.3)	7 (41.2) **
Anti- β 2-glikoprotein IgG (%)	4/98 (4.1)	0
Anti- β 2-glikoprotein IgM (%)	9/98 (9.2)	2 (11.8)

SLE, sistemski lupus erythematosus; PTU, propiltiouracil; LLS, lupus-like syndrome; Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

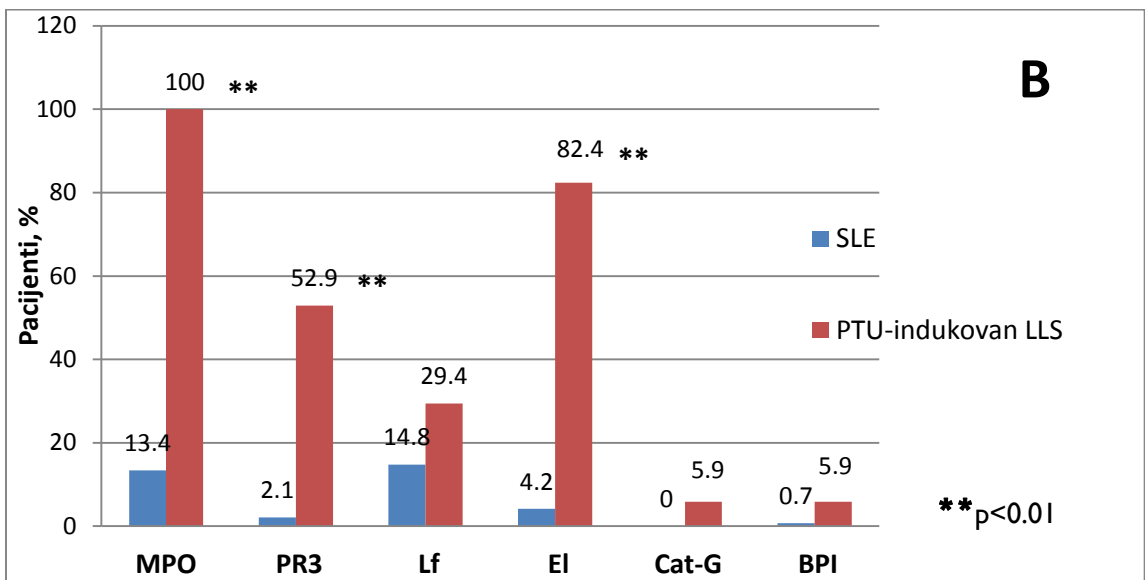
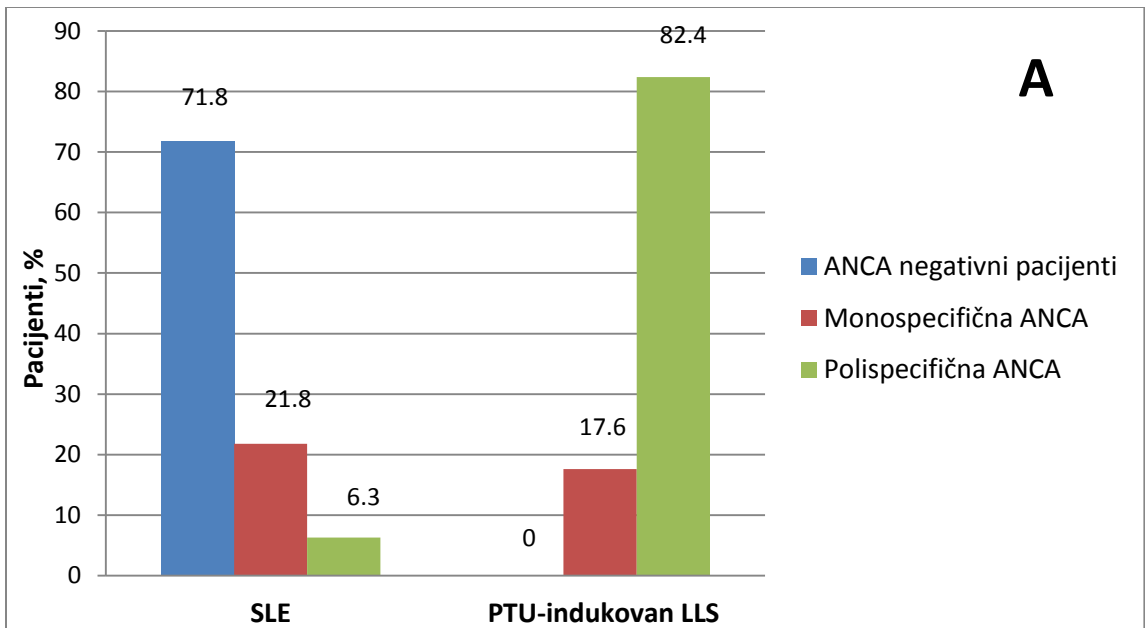
4.1.4. ANCA profil kod pacijenata sa SLE i PTU-indukovanim LLS

Polispecifična ANCA značajno češće su detektovana kod LLS nego kod SLE pacijenata ($p < 0.01$). Za razliku od PTU-indukovanog LLS, većina pacijenata sa SLE bila je ANCA negativna (71.8%) (grafikon 1A). Polispecifična ANCA su nađena kod 82.4% LILLS pacijenata, dok je samo 17.6% imalo monospecifična ANCA. LILLS pacijenti su značajno češće imali anti-MPO, anti-PR3 i anti-El u poređenju sa SLE pacijentima ($p < 0.01$) (grafikon 1B). Svi LLS pacijenti su bili ANCA pozitivni na bar jedan antigen (ELISA). Anti-MPO antitela imalo je 100%, anti-El 82.4%, a anti-PR3 52.9% LILLS pacijenata, što je bilo visoko statistički značajno više nego kod SLE pacijenata ($p < 0.01$). Anti-MPO, anti-El i anti-PR3 u visokim koncentracijama imalo je 47%, odnosno 29% i 5.9% LILLS pacijenata. Anti-BPI, anti-Cat-G- i anti-Lf kod LILLS bila su prisutna u srednjim i niskim koncentracijama. ANCA su imala značajno veću senzitivnost (100%) nego anti-histonska antitela (5.9%) kod PTU-indukovanog LLS (tabele 6 i 7).

Tabela 7. ANCA profil kod pacijenata sa idiopatskim SLE i LILLS

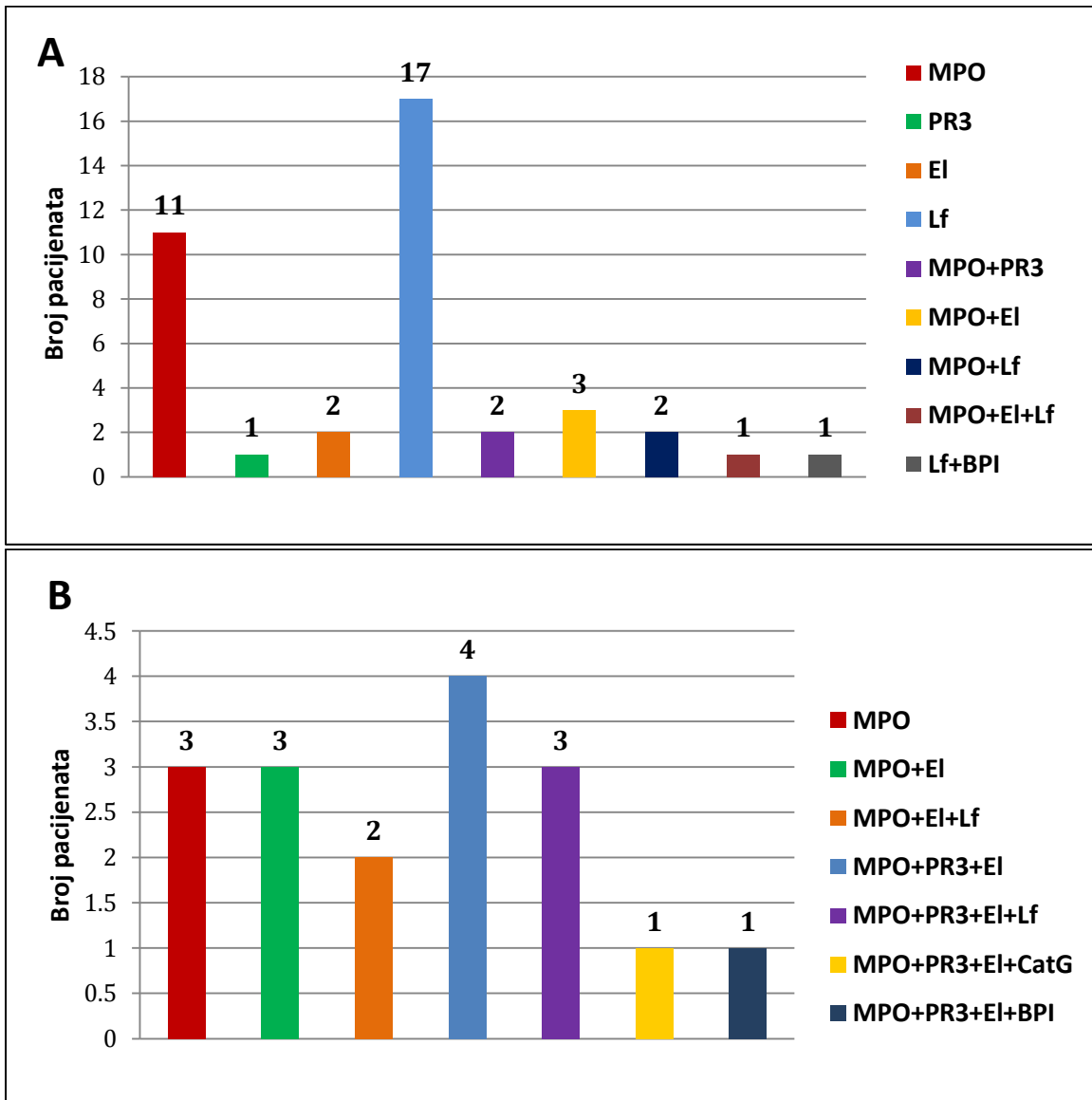
ANCA profil (ELISA)	SLE n=142	PTU-indukovan LLS n=17
ANCA pozitivnost	40 (28.2)	17 (100)**
Monospecifična ANCA (%)	31 (21.8)	3 (17.6)
Polispecifična ANCA (%)	9 (6.3)	14 (82.4)**
Anti-MPO (%)	19 (13.4)	17 (100)**
Anti-PR3 (%)	3 (2.1)	9 (52.9)**
Anti-Lf (%)	21 (14.8)	5 (29.4)
Anti-El (%)	6 (4.2)	14 (82.4)**
Anti-Cat-G (%)	0	1 (5.9)
Anti-BPI (%)	1 (0.7)	1 (5.9)

SLE, sistemski lupus erythematosus; PTU, propiltiouracil; LLS, lupus-like syndrome; Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$



Grafikon 1 (A) ANCA specifičnost kod 142 pacijenta sa SLE i 17 pacijenata sa PTU-indukovanim LLS; **(B)** ANCA profil kod pacijenata sa SLE i PTU-indukovanim LLS

U grupi 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata, 31 je imao monospecifična ANCA, 9 polispecifična ANCA, od kojih 8 sa dva autoantitela, a 1 sa tri (grafikon 2A). U grupi 17 LILLS pacijenata monospecifična ANCA je imalo samo 3 pacijenta (anti-MPO), polispecifična 14 pacijenata, od kojih 3 sa 2 autoantitela, 6 sa 3 autoantitela i 5 sa 4 autoantitela (grafikon 2B).



Grafikon 2 (A) ANCA specifičnost kod 40 ANCA pozitivnih SLE; **(B)** ANCA specifičnost kod 17 LILLS pacijenata

4.2. DEMOGRAFSKI PODACI, KLINIČKI I IMUNOSEROLOŠKI PARAMETRI PACIJENATA SA IDIOPATSKIM SLE

4.2.1 Demografski podaci ANCA pozitivnih i ANCA negativnih SLE pacijenata

Od 142 pacijenta sa idiopatskim SLE, ANCA pozitivnih je bilo 40 (28.2%), a ANCA negativnih 102 (71.8%). Demografski i klinički podaci ovih pacijenata prikazani su u tabeli 8. Među pacijentima sa ANCA pozitivnim SLE ženskog pola je bilo 33 (82.5%), a muškog 7 (17.5%). Srednja vrednost godina bila je 26.9 (opseg 1-82 godine), kod žena 39.9 godina (opseg 9-78 godina), kod muškaraca 42.7 godina (opseg 11-75 godina). Trajanje SLE u godinama bilo je 5.2 godine (opseg 0.04-32 godine), a vreme kliničkog praćenja 2.2 godine (opseg 0.08-6.8 godina). Novonastalih pacijenata u ovoj grupi bilo je 17 (42.5%). Pacijenata sa SLEDAI-2K indeksom jednakim ili većim od 7 bilo je 27 (67.5%).

Među pacijentima sa ANCA negativnim SLE ženskog pola bilo je 85 (83.3%), a muškog 17 (16.7%). Srednja vrednost godina kod ovih pacijenata bila je 21.3 godine (opseg 1-72 godine), kod žena 38.7 godina (opseg 9-78), kod muškaraca 36.2 godine (opseg 11-64 godine). Trajanje SLE bilo je 4.4 godine (opseg 0.04-21 godina), a vreme kliničkog praćenja bilo je 1.8 godina (opseg 0.08-6 godina).

Tabela 8. Demografski i klinički podaci pacijenata sa ANCA pozitivnim i ANCA negativnim SLE

	ANCA poz SLE n=40	ANCA neg SLE n=102
Pol: Ž (%)	33 (82.5)	85 (83.3)
Starost, godine: prosek±SD (opseg)	26.9±22.7 (1-82)	21.3±19.5 (1-72)
Starost Ž, godine: prosek±SD (opseg)	39.9±16 (9-78)	38.7±15.5 (9-78)
Starost M, godine: prosek±SD (opseg)	42.7±18.4 (11-75)	36.2±16.5 (11-64)
SLEDAI-2K: prosek±SD (opseg)	10.9±6.3 (4-28)	10.2±6.2 (1-34)
SLEDAI-2K ≥7 (%)	27 (67.5)	56 (63.6)
Novonastali SLE (%)	17 (42.5)	27 (26.5)
Trajanje SLE (god.): prosek±SD (opseg)	5.2±7.5 (0.04-32)	4.4±5.2 (0.04-21)
Vreme praćenja(god.):prosek±SD (opseg)	2.2±1.9 (0.08-6.8)	1.8±1.6 (0.08-6)

SLE, sistemski lupus erythematosus; PTU, propiltiouracil; LLS, lupus-like sindrom; SD, standardna devijacija

4.2.2. Kliničke manifestacije pacijenata sa idiopatskim SLE

Poređenje kliničkih manifestacija između ANCA pozitivnih i ANCA negativnih pacijenata prikazano je u tabeli 9.

Kod ANCA pozitivnih pacijenata kutane manifestacije bile su prisutne kod 42.5% pacijenata, a oralne ulceracije samo kod 5% pacijenata. Od ostalih organskih manifestacija najčešće je zabeleženo zahvatanje bubrega (52.5%), sinovitis (55%) i hematološki parametri (45%). Kod ANCA negativnih pacijenata kutane manifestacije su bile najčešće prisutne (64.8%), dok su oralne ulceracije, kao i kod ANCA pozitivnih pacijenata, retko zabeležene (8%). Takođe, kao i kod ANCA pozitivnog SLE, najčešće su detektovane atralgije (57.3%), sinovitis (56.2%), bubrežna zahvaćenost (55.9%) i hematološki parametri (48.3%). Kao što se vidi, bubreg, zglobovi i serozne opne su bili podjednako zahvaćeni kod pacijenata sa ANCA pozitivnim i ANCA negativnim SLE, kao i hematološki parametri. Pacijenti sa ANCA negativnim SLE statistički značajno češće su imali kutane promene, dok su pacijenti sa ANCA pozitivnim SLE statistički značajno češće imali neurološke manifestacije i autoimunski hepatitis.

Tabela 9. Kliničke manifestacije kod ANCA pozitivnih i ANCA negativnih SLE pacijenata

Zahvaćenost organa (klinički simptomi i znaci)	ANCA poz SLE n=40	ANCA neg SLE n=102
Febrilnost >38.5°C (%)	9 (22.5)	27/88 (30.7)
Mukokutane promene (%)	17 (42.5)	57/88 (64.8)*
Malarni raš (%)	10 (25)	34/88 (38.6)
DLE, (%)	3 (7.5)	12/88 (13.6)
SCLE (%)	0 (0)	3/88 (3.4)
Purpura, urticaria-like vasculitis, ulceracije	2 (5)	4/88 (4.5)
Urtikarija (%)	1 (2.5)	2 (2.3)
Bule (LE bullosus) (%)	0	1 (1.1)
Panikulitis (%)	1 (2.5)	0
Oralne ulceracije (%)	2 (5.0)	7/88 (8.0)
Atralgije (%)	20 (50)	51/89 (57.3)
Sinovitis (%)	22 (55)	50/89 (56.2)
Bubrežna zahvaćenost (%)	21 (52.5)	52/93 (55.9)
Neurološke manifestacije (%)	11 (27.5)**	7/89 (7.9)
Citopenija (%)	18 (45)	43/89 (48.3)
Leukopenija (%)	14 (35)	40/89 (44.9)
Hemolitička anemija (%)	6 (15)	12 (11.7%)
Trombocitopenija (%)	3 (7.5)	8/88 (9.1)
Poliserozitis (%)	5 (12.5)	17/88 (19.3)
Autoimunski hepatitis (%)	7 (17.5)*	4 (4.5)

SLE, sistemski lupus erythematosus; DLE, diskoidni lupus erythematosus; SCLE, subakutni kutani lupus erythematosus. Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

4.2.3. Imunoserološki parametri pacijenata sa idiopatskim SLE

Imunoserološki parametri kod 40 ANCA pozitivnih i 102 ANCA negativnih SLE pacijenata prikazani su u tabeli 10.

Većina ANCA pozitivnih i ANCA negativnih pacijenata je imala pozitivna ANA (95%, odnosno 97.1%). Anti-dsDNK antitela su detektovana kod 62.5% ANCA pozitivnih i 59.8% ANCA negativnih SLE pacijenata, dok je snižen komplement postojao kod 55% ANCA pozitivnih i 52.9% ANCA negativnih pacijenata. Nije bilo statističke značajnosti u postojanju navedenih parametara između ove dve grupe SLE pacijenata. Anti-ENA su detektovana kod 50% ANCA pozitivnih i 70.7% ANCA negativnih pacijenata. Anti-ENA antitela su se statistički značajno češće javljala kod pacijenata sa ANCA negativnim SLE nego kod pacijenata sa ANCA pozitivnim SLE. Anti-histonska antitela su bila pozitivna kod 39.1%, a anti-nukleozomalna kod

93.3% ANCA pozitivnih pacijenata, dok su anti-histonska bila pozitivna kod 30%, a anti-nukleozomalna kod 88.7% ANCA negativnih SLE pacijenata. Samo je koncentracija anti-nukleozomalnih antitela bila statistički značajno veća kod ANCA pozitivnih SLE pacijenata, dok je učestalost pomenutih antitela bila podjednaka kod obe grupe SLE pacijenata. Anti-C1q i aCL antitela su podjednako bila zastupljena i kod ANCA pozitivnih i negativnih pacijenata, a krioglobulini su značajno češće bili prisutni kod ANCA pozitivnih SLE pacijenata u odnosu na ANCA negativne.

Tabela 10. Imunoserološki parametri pacijenata sa ANCA pozitivnim i ANCA negativnim SLE

Serološki parametri	ANCA poz SLE n=40	ANCA neg SLE n=102
ANA (IIF) (%)	38 (95)	99 (97.1)
ANA titar, medijana (opseg)	320 (0-640)	320 (0-640)
Anti-dsDNK (IIF) (%)	25 (62.5)	61 (59.8)
Titar anti-dsDNK, medijana (opseg)	40 (0-1280)	20 (0-640)
Snižen C (%)	22 (55)	54 (52.9)
Snižen C3 (%)	16 (40)	40 (39.2)
Snižen C4 (%)	17 (42.5)	42 (41.2)
C3 (g/L), medijana (opseg)	0.86 (0.33-2.26)	0.91 (0.29-2.15)
C4 (g/L), medijana (opseg)	0.13 (0.03-0.47)	0.14 (0.03-0.8)
Anti-ENA (%)	20 (50)	70/99 (70.7)*
Anti-ENA (U/mL), medijana (opseg)	45.0 (0.1-250.0)	105.3 (0.1-200.0)
Anti-SSA (%)	18 (45)	60/99 (60.6)
Anti-SSA (U/mL), medijana (opseg)	138.2 (0.7-330.3)	105.8 (0.1-488.6)
Anti-histonska At (%)	9/23 (39.1)	15/50 (30)
Anti-histonska At (U/mL), medijana (opseg)	15.5 (1.1-552.5)	10.8 (1.3-285.3)
Anti-nukleozomalna At (%)	14/15 (93.3)	47/53 (88.7)
Anti-nukleozom. At (U/mL), medijana (opseg)	200 (6.5-200)*	94.8 (2.2-200.0)
Anti-c1q (%)	11/29 (37.9)	28/50 (56)
Anti/c1q (U/mL), medijana (opseg)	7.9 (0.9-111.0)**	10.4 (1.3-211.7)
Anti-rPp (%)	1/5 (20)	6/16 (37.5)
Anti-rPp (U/mL), medijana (opseg)	3.4 (1.2-389.3)	4.2 (0.4-200.0)
Krioglobulini (%)	11/14 (78.6)*	22/53 (41.5)
aCL (%)	9/36 (25)	15/70 (21.4)
aCL IgG (%)	8/36 (22.2)	10/70 (14.3)
aCL IgM (%)	6/36 (16.7)	9/70 (12.9)
aCL IgG (U/mL), medijana (opseg)	5.8 (1.2-39.3)*	2.8 (0.4-81.2)
aCL IgM, (U/mL), medijana (opseg)	3.2 (0.09-41.9)	2.3 (0.1-80.0)
Anti-β2-glycoprotein (%)	4/35 (11.4)	7/70 (10)
Anti-β2-glycoprotein IgG (%)	1/35 (2.9)	3/70 (4.3)
Anti-β2-glycoprotein IgM (%)	4/35 (11.4)	5/70 (7.1)

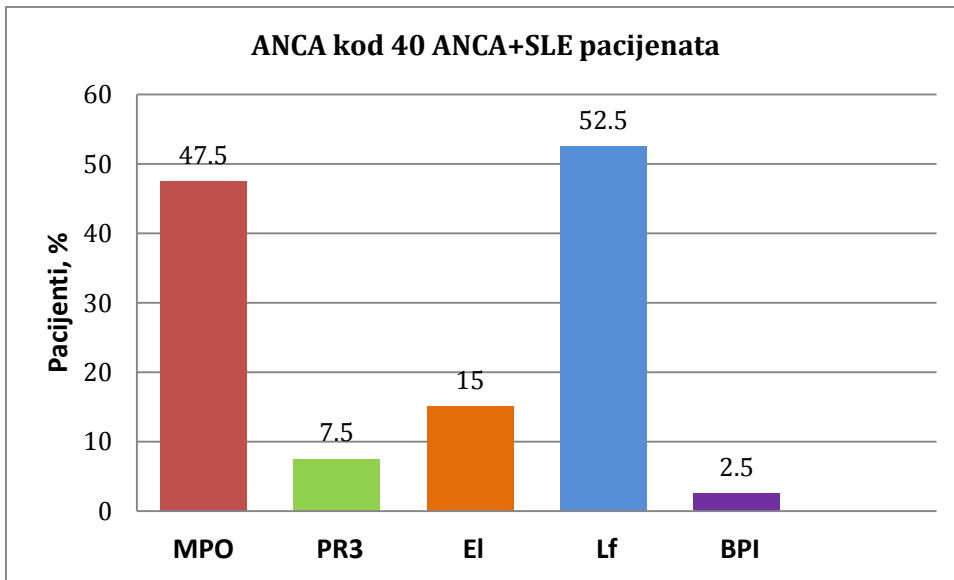
SLE, sistemski lupus erythematosus;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

4.2.4. ANCA profil kod pacijenata sa idiopatskim SLE

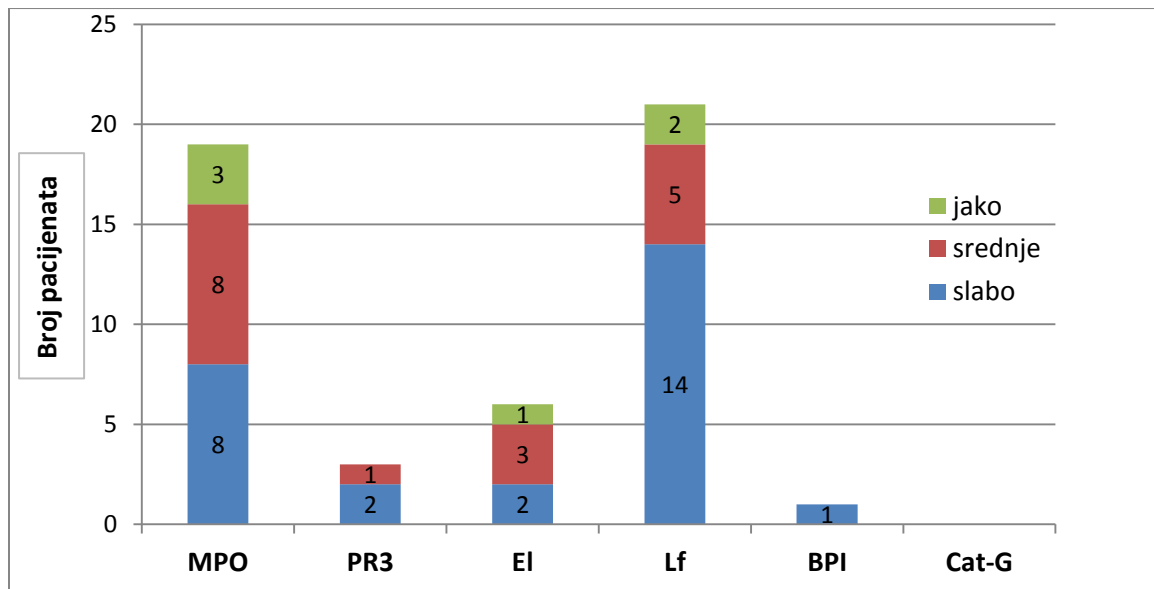
Od 142 pacijenta sa idiopatskim SLE, ANCA pozitivnih je bilo 40 (28.2%). Prevalencija anti-MPO je bila 13.4%, anti-PR3 2.1%, anti-El 4.2%, anti-Lf 14.8%, anti-BPI 0.7%, a niko od naših SLE pacijenata nije imao anti-Cat-G autoantitela.

Kod ANCA pozitivnih SLE pacijenata anti-MPO su bila pozitivna kod 47.5%, anti-Lf kod 52.5%, a anti-El kod 15% pacijenata. Samo 7.5% pacijenata je imalo anti-PR3, samo 1 pacijent (2.5%) je imao anti-BPI i niko nije imao anti-Cat-G (grafikon 3).



Grafikon 3. ANCA profil kod 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata

ANCA profil kod 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata izražen semikvantitativnim vrednostima prikazan je na grafikonu 4.



Grafikon 4. ANCA profil kod 40 ANCA pozitivnih pacijenata sa idiopatskim SLE (sa semikvantitativnim vrednostima)

ANCA pozitivnih SLE pacijenata sa monospecifičnim ANCA bilo je 31 (77.5%), dok je polispecifičnih sa dva autoantitela bilo 8 (20%), a samo 1 pacijent (2.5%) je imao polispecifična ANCA sa tri autoantitela (grafikon 4).

Koncentracija anti-MPO bila je visoko statistički značajno veća kod ANCA pozitivnih SLE pacijenata, kao i indeks anti-MPO, -PR3, -EI i anti-Lf (tabela 11).

Tabela 11. ANCA profil kod pacijenata sa ANCA pozitivnim i ANCA negativnim SLE

ANCA profil	ANCA poz SLE n=40	ANCA neg SLE n=102
Anti-MPO (U/mL), medijana (opseg)	15.2 (0.5-240.0)**	1.2 (0.2-37.5)
Anti-MPO indeks, medijana (opseg)	1.529 (0.054-6.439)**	0.073 (0.016-0.611)
Anti-PR3(U/mL), medijana (opseg)	1.65 (0.2-284.0)	1.20 (0.10-14.80)
Anti-PR3indeks, medijana (opseg)	0.120 (0.047-4.450)**	0.075 (0.014-0.471)
Anti-EI indeks, medijana (opseg)	0.142 (0.047-4.135)**	0.06 (0.024-0.747)
Anti-Lfindeks, medijana (opseg)	0.442 (0.064-7.398)**	0.164 (0.042-0.937)
Anti-Cat-G indeks, medijana (opseg)	0.092 (0.051-0.742)	0.078 (0.019-0.531)
Anti-BPI indeks, medijana (opseg)	19 (47.5)*	0.076 (0.026-0.562)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

4.2.5. Kliničke, imunoserološke karakteristike i ANCA profil kod novonastalih i prethodno lečenih SLE pacijenata

Od 142 pacijenta sa idiopatskim SLE novonastalih pacijenata bilo je 44 (31%), a već lečenih pacijenata 98 (69%). Pacijenti sa novonastalim SLE statistički značajno češće su imali sinovitis ($p < 0.05$), a visoko statistički značajno češće autoimunski hepatitis ($p < 0.01$) u odnosu na prethodno lečene SLE pacijente. Kliničke karakteristike *de novo* i već lečenih SLE pacijenata prikazane su u tabeli 12.

Tabela 12. Kliničke manifestacije kod novonastalih SLE i lečenih SLE pacijenata

Zahvaćenost organa (klinički simptomi i znaci)	De novo SLE (n=44)	Lečeni SLE (n=98)
Febrilnost >38.5°C (%)	14/34 (41.2)	22/94 (23.4)
Kutane promene (%)	17/34 (50)	57/94 (60.6)
Atralgije (%)	17/34 (50)	54/95 (56.8)
Sinovitis (%)	16/34 (47.1)*	56/95 (58.9)
Bubrežna zahvaćenost (%)	21/37 (56.8)	52/96 (54.2)
Neurološke manifestacije (%)	4/34 (11.8)	14/95 (14.7)
Citopenija (%)	18/35 (51.4)	43/94 (45.7)
Poliserozitis (%)	8/34 (23.5)	14/94 (14.9)
Autoimunski hepatitis (%)	6/34 (17.6)**	4/94 (4.3)
Tromboza (%)	2/35 (5.7)	4/94 (4.3)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Od imunoseroloških parametara samo je koncentracija IgG antikradiolipinskih antitela bila statistički značajno veća ($p < 0.05$). Imunoserološke karakterističke prikazane su u tabeli 13.

Tabela 13. Imunoserološki parametri pacijenata sa novonastalim SLE i lečenim SLE

Serološki parametri	De novo SLE (n=44)	Lečeni SLE (n=98)
Anti-dsDNK (IIF) (%)	23/44 (52.3)	63/98 (64.3)
Anti-dsDNK titar, medijana (opseg)	15 (0-640)	20 (0-1280)
Snižen C3 (%)	19/44 (43.2)	37/98 (37.8)
Snižen C4 (%)	21/44 (47.7)	38/98 (38.8)
C3 (g/L), medijana (opseg)	0.82 (0.29-2.19)	0.93 (0.36-2.26)
C4 (g/L), medijana (opseg)	0.13 (0.03-0.59)	0.15 (0.03-0.8)
Anti-histonska At (%)	4/19 (21.1)	20/54 (37)
Anti-nukleozomalna At (%)	15/17 (88.2)	46/51 (90.2)
Anti-ENA (%)	26/44 (59.1)	64/95 (67.4)
Anti-c1q (%)	9/21 (42.9)	30/58 (51.7)
Krioglobulini (%)	11/19 (57.9)	22/48 (45.8)
aCL IgG (%)	8/31 (25.8)	8/67 (11.9)
aCL IgM (%)	7/31 (22.6)	7/67 (10.4)
aCL IgG (U/mL), medijana (opseg)	5.7 (0.4-57.1)*	2.7 (0.4-81.2)
aCL IgM, (U/mL), medijana (opseg)	2.8 (0.09-20.6)	2.4 (0.1-80.0)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

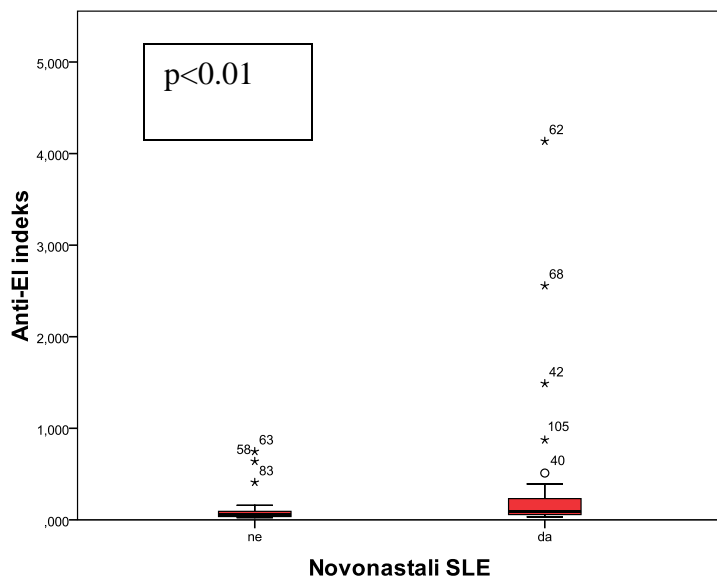
ANCA su češće bila prisutna kod novonastalih SLE pacijenata, kao i monospecifična, polispecifična ANCA, anti-MPO, anti-PR3, anti-El i anti-Lf autoantitela. ANCA profil ovih pacijenata prikazan je u tabeli 14. Koncentracija anti-MPO bila je veća, dok su indeksi anti-El i anti-Lf bili visoko statistički značajno viši kod novonastalih SLE pacijenata (grafikoni 5 i 6).

Tabela 14. ANCA profil kod pacijenata sa novonastalim SLE i lečenim SLE

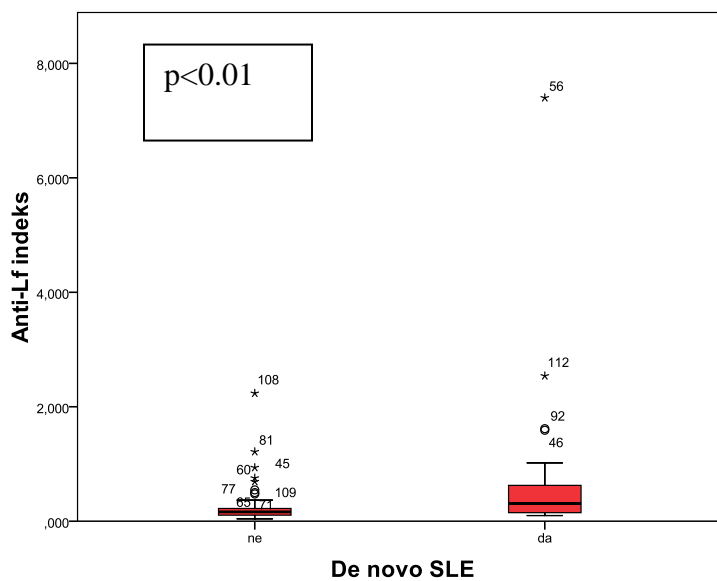
ANCA profil	<i>De novo</i> SLE (n=44)	Lečeni SLE (n=98)
ANCA (%)	16 (36.4)	24 (24.5)
Monospecifična ANCA (%)	12 (27.3)	19 (19.4)
Heterospecifična ANCA (%)	5 (11.4)	4 (4.1)
Anti-MPO (%)	8 (18.2)	11 (11.2)
Anti-PR3 (%)	2 (4.5)	1 (1.0)
Anti-El (%)	4 (9.1)	2 (2.0)
Anti-Lf (%)	8 (18.2)	13 (13.3)
Anti-BPI (%)	0	1 (1)
Anti-MPO (U/mL), medijana (opseg)	4.9 (0.2-201.6)	1.6 (0.2-240.0)
Anti-MPO indeks, prosek±SD (opseg)	0.09 (0.01-6.37)	0.07 (0.02-6.43)
Anti-El indeks, medijana (opseg)	0.09 (0.03-4.13)**	0.05 (0.02-0.74)
Anti-Lf indeks, medijana (opseg)	0.30 (0.09-7.39)**	0.16 (0.04-2.23)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01



Grafikon 5. Anti-El indeks kod *de novo* i lečenih SLE pacijenata



Grafikon 6. Anti-Lf indeks kod *de novo* i lečenih SLE pacijenata

4.2.6. Kliničke, imunoserološke karakteristike i ANCA profil kod novonastalih i prethodno lečenih ANCA pozitivnih SLE pacijenata

Među 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata, novonastalih je bilo 17 (42.5%), a već lečenih 23 (57.5%). Poređenje kliničkih i imunoseroloških karakteristika ove dve grupe pacijenata prikazano je u tabelama 15 i 16.

Nije bilo statistički značajne razlike u zahvaćenosti pojedinig organa između novonastalih i prethodno lečenih ANCA pozitivnih SLE pacijenata (tabela 15).

Tabela 15. Kliničke manifestacije kod *de novo* i lečenih ANCA pozitivnih SLE pacijenata

Zahvaćenost organa (klinički simptomi i znaci)	<i>De novo</i> ANCA poz SLE (n=17)	Lečeni ANCA poz SLE (n=23)
Febrilnost >38.5°C (%)	6 (35.3)	3 (13)
Kutane promene (%)	6 (35.3)	11 (47.8)
Atralgije (%)	9 (52.9)	11 (47.8)
Sinovitis (%)	10 (58.8)	12 (52.2)
Bubrežna zahvaćenost (%)	9 (52.9)	12 (52.2)
Neurološke manifestacije (%)	3 (17.6)	8 (34.8)
Citopenija (%)	8 (47.1)	10 (43.5)
Poliserozitis (%)	2 (11.8)	3 (13)
Autoimunski hepatitis (%)	4 (23.5)	1 (8.7)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

Takođe, nije bilo statistički značajne razlike u postojanju imunoseroloških parametara između novonastalih i prethodno lečenih ANCA pozitivnih SLE pacijenata (tabela 16).

Tabela 16. Imunoserološki parametri pacijenata sa novonastalim i lečenim ANCA pozitivnim SLE

Serološki parametri	De novo ANCA poz SLE (n=17)	Lečeni ANCA poz SLE (n=23)
Anti-dsDNK (IIF) (%)	11/17 (64.7)	14/23 (60.9)
Anti-dsDNK titar, medijana (opseg)	160 (0-640)	20 (0-1280)
Snižen C3 (%)	6/17 (35.3)	10/23 (43.5)
Snižen C4 (%)	8/17 (47.1)	9/23 (39.1)
C3 (g/L), medijana (opseg)	1.07 (0.33-2.19)	1.01 (0.36-2.26)
C4 (g/L), medijana (opseg)	0.12 (0.03-0.39)	0.14 (0.05-0.47)
Anti-histonska At (%)	2/7 (28.6)	7/16 (43.8)
Anti-nukleozomalna At (%)	4/5 (80)	10/10 (100)
Anti-ENA (%)	8/17 (47.1)	12/23 (52.2)
Anti-c1q (%)	3/12 (25)	8/17 (47.1)
Krioglobulini (%)	2/2 (100)	9/12 (75)
aCL IgG (%)	3/13 (23.1)	3/15 (20)
aCL IgM (%)	3/13 (23.1)	2/15 (13.3)
aCL IgG (U/mL), prosek (opseg)	6.2 (1.6-39.3)	4.7 (1.2-13.7)
aCL IgM, (U/mL), medijana (opseg)	3.2 (0.09-13.8)	3.3 (0.2-41.9)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

ANCA profil i poređenje između dve grupe ANCA pozitivnih SLE pacijenata prikazan je u tabeli 17. Anti-MPO su češće detektovana kod novonastalih ANCA pozitivnih pacijenata, dok su anti-Lf češće bila pozitivna kod već lečenih i praćenih ANCA pozitivnih SLE pacijenata.

Tabela 17. ANCA profil kod pacijenata sa *de novo* i lečenim ANCA pozitivnim SLE

ANCA profil	De novo ANCA poz SLE (n=17)	Lečeni ANCA poz SLE (n=23)
Anti-MPO (%)	4 (66.7)	15 (44.1)
Anti-Lf (%)	1 (16.7)	20 (58.8)
Anti-MPO (U/mL), medijana(opseg)	28.1 (2.8-201.6)	15.2 (0.5-240.0)
Anti-MPO indeks, prosek ±SD	1.91±1.89	2.09±2.44
Anti-Lf indeks, medijana (opseg)	0.17 (0.04-4.13)	0.08 (0.05-0.63)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

4.2.7. Kliničke, imunoserološke karakteristike i ANCA profil kod anti-MPO pozitivnih i anti-MPO negativnih ANCA pozitivnih SLE pacijenata

Anti-MPO pozitivni SLE pacijenti češće su imali sinovitis i citopeniju, a statistički značajno češće su imali atralgije, dok su ređe imali kutane promene i zahvaćenost bubrega u odnosu na anti-MPO negativne ANCA pozitivne SLE pacijente (tabela 18).

Tabela 18. Kliničke manifestacije kod anti-MPO pozitivnih i anti-MPO negativnih ANCA pozitivnih SLE pacijenata

Zahvaćenost organa (klinički simptomi i znaci)	Anti-MPO poz SLE n=19	Anti-MPO neg SLE n=21
Febrilnost >38.5°C (%)	5 (26.3)	4 (19)
Kutane promene (%)	7 (36.8)	10 (47.6)
Atralgije (%)	13 (68.4)*	7 (33.3)
Sinovitis (%)	13 (68.4)	9 (42.9)
Bubrežna zahvaćenost (%)	7 (36.8)	14 (66.7) (p=0.059)
Neurološke manifestacije (%)	5 (26.3)	6 (28.6)
Citopenija (%)	10 (52.6)	8 (38.1)
Poliserozitis (%)	2 (10.5)	3 (14.3)
Autoimunski hepatitis (%)	4 (57.1)	15 (45.5)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

Anti-MPO negativni pacijenti su statistički značajno češće imali anti-dsDNK, nizak C3 i C4, anti-ENA i anti-C1q antitela (tabela 19).

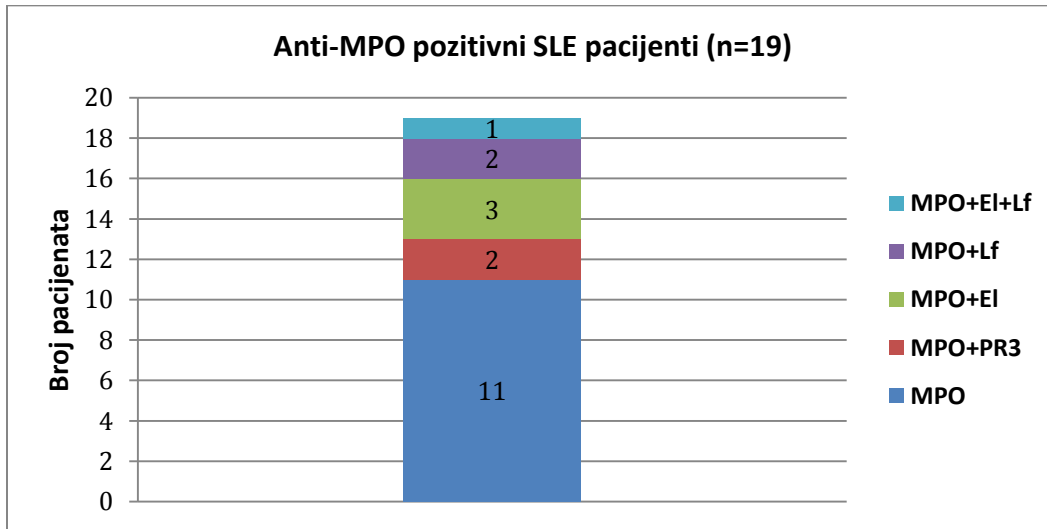
Tabela 19. Imunoserološki parametri anti-MPO pozitivnog i negativnog SLE

Serološki parametri	Anti-MPO poz SLE n=19	Anti-MPO neg SLE n=21
Anti-dsDNK (IIF) (%)	8/19 (42.1)	17/21 (81)*
Titar anti-dsDNK, medijana (opseg)	0 (0-649)	160 (0-1280)*
Snižen C3 (%)	3/19 (15.8)	13/21 (61.9)*
Snižen C4 (%)	5/19 (26.3)	12/21 (57.1)*
C3 (g/L), medijana (opseg)	1.29 (0.59-1.92)	0.78 (0.33-2.26) **
C4 (g/L), medijana (opseg)	0.19 (0.05-0.47)	0.07 (0.03-0.42) **
Anti-ENA (%)	6/19 (31.6)	14/21 (66.7)*
Anti-C1q (%)	2/14 (14.3)	9/15 (60)*
Krioglobulini (%)	5/8 (62.5)	6/6 (100)
aCL IgG (%)	3/11 (27.3)	3/17 (17.6)
aCL IgM (%)	4/11 (36.4)	1/17 (5.9)
aCL IgG (U/mL), prosek±SD	5.48±2.99	9.65±10.99
aCL IgM (U/mL), medijana (opseg)	5.1 (1.10-41.9)*	1.9 (0.09-19.2)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

Među anti-MPO pozitivnim SLE pacijentima 11 (57.9%) je imalo monospecifična, a 8 (42.1%) polispecifična ANCA, udružena sa anti-PR3 (2 pacijenta), sa anti-El (3 pacijenta), sa anti-Lf (2 pacijenta) i kod jednog pacijenta sa anti-El i anti-Lf autoantitelima (grafikon7).



Grafikon 7. ANCA profil kod anti-MPO pozitivnih SLE pacijenata

Anti-MPO negativni ANCA pozitivni SLE pacijenti su visoko statistički značajno češće imali anti-LF, dok su anti-MPO pozitivni pacijenti češće imali anti-El autoantitela (tabela 20).

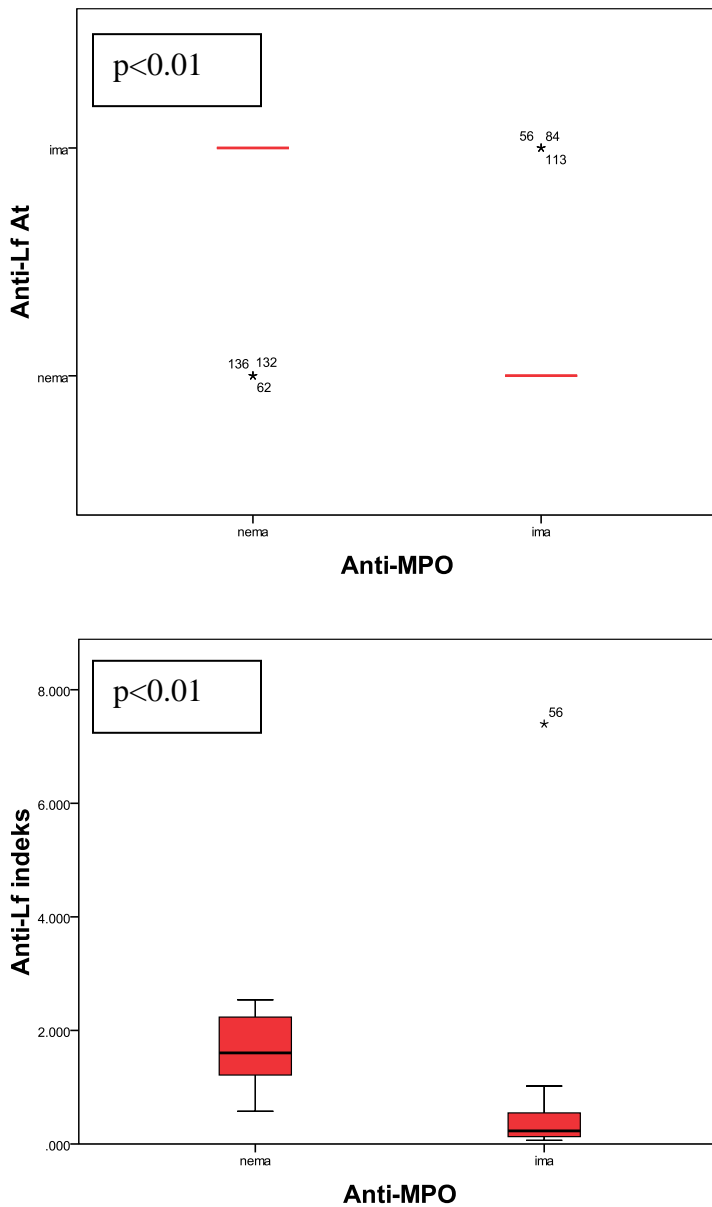
Tabela 20. ANCA profil kod pacijenata sa anti-MPO pozitivnim i anti-MPO negativnim SLE

ANCA profil	Anti-MPO poz SLE n=19	Anti-MPO neg SLE n=21
Anti-Lf (%)	3 (15.8)	18 (85.7)**
Anti-El (%)	4 (21.1)	2 (9.5)
Anti-MPO indeks, medijana (opseg)	2.34 (1.01-6.43)**	0.06 (0.05-0.21)
Anti-Lfindeks, medijana (opseg)	0.229 (1.06-7.39)	1.60 (0.57-2.53)**
Anti-Elindeks, medijana (opseg)	0.15 (0.05-2.55)**	0.10 (0.04-4.13)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

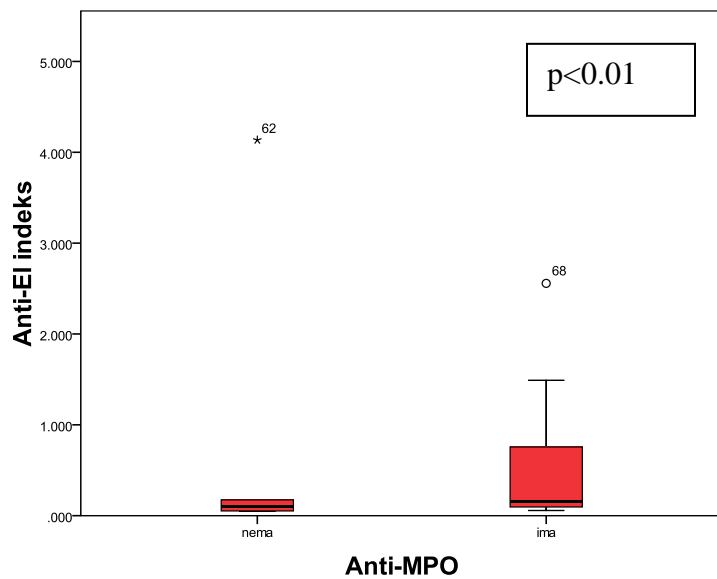
Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

Anti-Lf su visoko statistički značajno češća bila pozitivna kod anti-MPO negativnih ANCA pozitivnih SLE pacijenata. Takođe, indeks anti-Lf kod anti-MPO negativnih SLE pacijenata je bio značajno viši ($p < 0.01$) u odnosu na anti-MPO pozitivne SLE pacijente (grafikon 8).



Grafikon 8. Anti-Lf At i anti-Lf indeks kod anti-MPO negativnih SLE pacijenata

Za razliku od anti-Lf indeksa, anti-El indeks je bio visoko statistički značajno viši kod anti-MPO pozitivnih SLE pacijenata (grafikon 9).



Grafikon 9. Anti-El indeks kod anti-MPO pozitivnih SLE pacijenata

4.2.8. Kliničke, imunoserološke karakteristike i ANCA profil kod anti-El pozitivnih i anti-El negativnih SLE pacijenata

Anti-El pozitivni SLE pacijenti su češće imali neurološke i psihijatrijske manifestacije i citopeniju, dok su statistički značajno češće imali autoimunski hepatitis i pad C3 komponente komplementa (tabele 21 i 22).

Tabela 21. Kliničke manifestacije anti-El pozitivnog i anti-El negativnog SLE

Zahvaćenost organa (klinički simptomi i znaci)	El-ANCA poz SLE n=6	El-ANCA neg SLE n=34
Febrilnost >38.5°C (%)	3 (50)	6 (17.6)
Kutane promene (%)	3 (50)	14 (41.2)
Atralgije (%)	4 (66.7)	16 (47.1)
Sinovitis (%)	3 (50)	19 (55.9)
Bubrežna zahvaćenost (%)	1 (16.7)	20 (58.8) (p=0.08)
Neurološke manifestacije (%)	3 (50)	8 (23.5)
Citopenija (%)	5 (83.3)	13 (38.2)
Poliserozitis (%)	1 (16.7)	4 (11.8)
Autoimunski hepatitis (%)	3 (50)*	3 (8.8)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

Tabela 22. Imunoserološki parametri anti-El pozitivnog i anti-El negativnog SLE

Serološki parametri	Anti-El poz SLE n=6	Anti-El neg SLE n=34
Anti-dsDNK (IIF) (%)	4/6 (66.7)	21/34 (61.8)
Titar anti-dsDNK, medijana (opseg)	100.0 (0-640)	40.0 (0-1280)
Snižen C3 (%)	1/6 (16.7)	15/34 (44.1)
Snižen C4 (%)	2/6 (33.3)	15/34 (44.1)
C3 (g/L), prosek±SD	1.52±0.66	0.95±0.48*
C4 (g/L), medijana (opseg)	0.3 (0.07-0.43)	0.13 (0.03-0.47)
Anti-ENA (%)	2/6 (33.3)	18/34 (52.9)
Anti-C1q (%)	0/5	11/24 (45.8)
Krioglobulini (%)	2/2 (100)	9/12 (75)
aCL IgG (%)	1/4 (25)	5/24 (20.8)
aCL IgM (%)	1/4 (25)	4/24 (16.7)
aCL IgG (U/mL), prosek±SD (opseg)	9.9 (1.6-16.4)	5.15 (1.2-39.3)
aCL IgM, (U/mL), medijana (opseg)	6.6 (0.3-13.2)	3.2 (0.09-41.9)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

Anti-El pozitivni pacijenti su češće imali anti-MPO, dok su anti-El negativni češće imali anti-Lf autoantitela (tabela 23).

Tabela 23. ANCA profil kod pacijenata sa anti-El pozitivnim i anti-El negativnim SLE

ANCA profil	Anti-El poz SLE n=6	Anti-El neg SLE n=34
Anti-MPO (%)	4 (66.7)	15 (44.1)
Anti-Lf (%)	1 (16.7)	20 (58.8)
Anti-MPO (U/mL), medijana (opseg)	32.5 (4.0-101.5)	11.4 (0.5-240.0)
Anti-MPO indeks, medijana (opseg)	1.24 (0.21-2.14)	1.55 (0.05-6.43)
Anti-Lf indeks, medijana (opseg)	0.28 (0.15-0.57)	0.78 (0.06-7.39)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

4.2.9. Kliničke, imunoserološke karakteristike i ANCA profil kod anti-Lf pozitivnih i anti-Lf negativnih SLE pacijenata

Kod anti-Lf pozitivnih SLE pacijenata češće je postojala zahvaćenost bubrega i poliserozitis, dok su anti-Lf negativni ANCA pozitivni pacijenti statistički značajno češće imali atralgije i sinovitis (tabela 24).

Tabela 24. Kliničke manifestacije kod anti-Lf pozitivnih i anti-Lf negativnih SLE pacijenata

Zahvaćenost organa (klinički simptomi i znaci)	Anti-Lf poz SLE n=21	Anti-Lf neg SLE n=19
Febrilnost >38.5°C (%)	4 (19)	5 (26.3)
Kutane promene (%)	8 (38.1)	9 (47.4)
Atralgije (%)	7 (33.3)	13 (68.4)*
Sinovitis (%)	8 (38.1)	14 (73.7)*
Bubrežna zahvaćenost (%)	13 (61.9)	8 (42.1)
Neurološke manifestacije (%)	5 (23.8)	6 (31.6)
Citopenija (%)	9 (42.9)	9 (47.4)
Poliserozitis (%)	4 (19)	1 (5.3)
Autoimunski hepatitis (%)	3 (14.3)	3 (15.8)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

Takođe, anti-Lf pozitivni SLE pacijenti su značajno češće imali anti-dsDNK antitela i pad C3 i C4 komponenti komplementa (prikazano u tabeli 25).

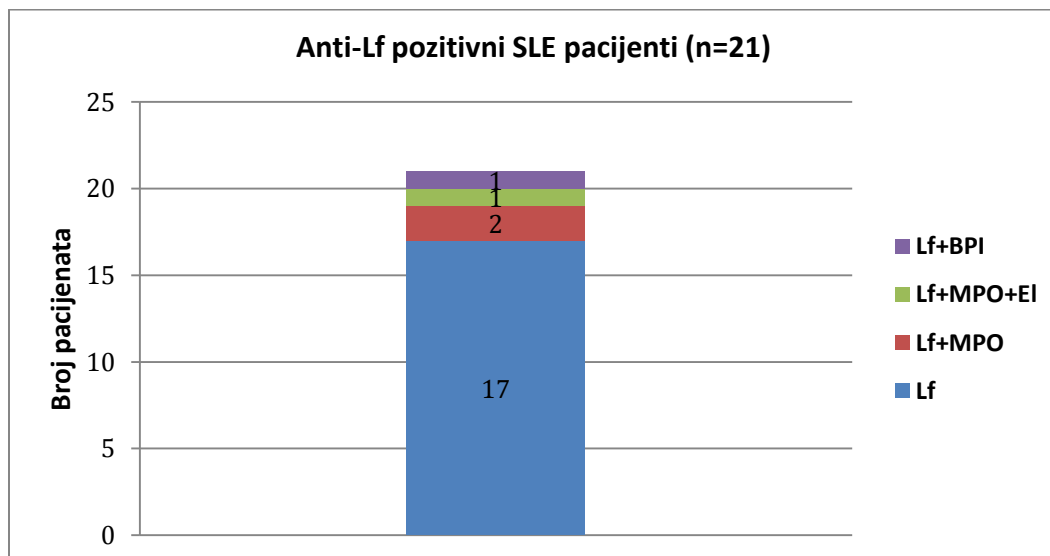
Tabela 25. Imunoserološki parametri kod anti-Lf pozitivnog i anti-Lf negativnog SLE

Serološki parametri	Anti-Lf poz SLE n=21	Anti-Lf neg SLE n=19
Anti-dsDNK (IIF) (%)	17/21 (81)*	8/19 (42.1)
Titar anti-dsDNK, medijana (opseg)	160 (0-1280)	0 (0-640)
Snižen C3 (%)	14/21 (66.7)**	2/19 (10.5)
Snižen C4 (%)	12/21 (57.1)*	5/19 (26.3)
C3 (g/L), medijana (opseg)	0.65 (0.33-2.26)*	1.43 (0.41-2.19)
C4 (g/L), medijana (opseg)	0.07 (0.03-0.42)	0.21 (0.04-0.47)
Anti-ENA (%)	13/21 (61.9)	7/19 (36.8)
Anti-C1q (%)	9/17 (52.9)	2/12 (16.7)
Krioglobulini (%)	5/5 (100)	6/9 (66.7)
aCL IgG (%)	3/16 (18.8)	3/12 (25)
aCL IgM (%)	1/16 (6.3)	4/12 (33.3)
aCL IgG (U/mL), prosek±SD (opseg)	5.15 (1.6-11.0)	6.05 (1.2-39.3)
aCL IgM (U/mL), medijana (opseg)	2.2 (0.09-19.2)	5.75 (0.3-41.9)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

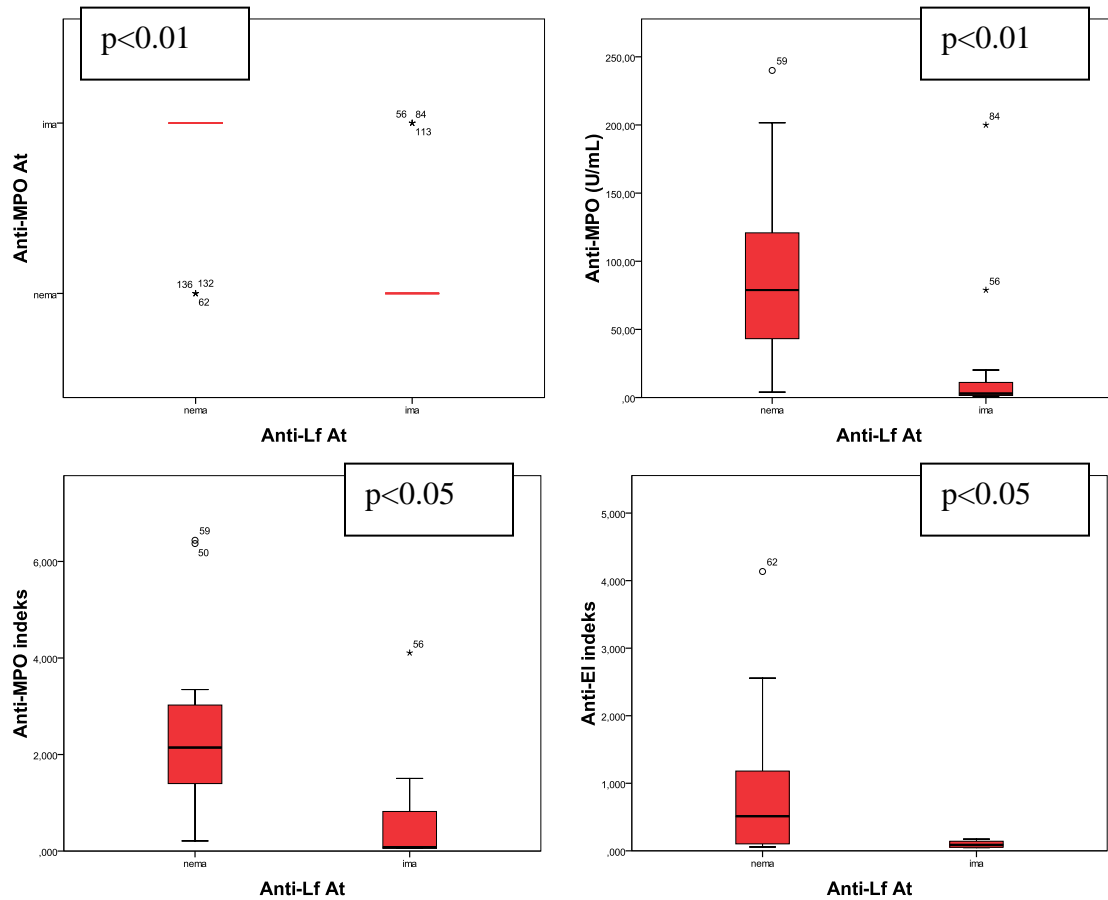
Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

Kod 21 anti-Lf pozitivnog SLE pacijenta 17 je imalo monospecifična ANCA, a 4 polispecifična (kod 2 sa pridruženim anti-MPO, 1 sa anti-MPO i anti-El i 1 pacijent sa anti-BPI autoantitelima) (grafikon 10).



Grafikon 10. ANCA profil kod anti-Lf pozitivnih SLE pacijenata

Anti-Lf pozitivni pacijenti su visoko statistički značajno ređe imali pozitivna anti-MPO ($p < 0.05$), značajno manju koncentraciju anti-MPO ($p < 0.01$) i niži anti-MPO indeks ($p < 0.05$), kao i ređe pozitivna anti-El i značajno niži indeks anti-El autoantitela (grafikon 11).



Grafikon 11. ANCA profil kod anti-Lf pozitivnih SLE pacijenata (n=21) u odnosu na anti-Lf negativne ANCA pozitivne SLE pacijente (n=19)

4.2.10. Kliničke manifestacije u odnosu na ANCA profil kod SLE pacijenata

Ako posmatramo zahvaćenost pojedinih organa u odnosu na ANCA pozitivnost, dobijamo rezultate prikazane u tabeli 26.

Pacijenti sa ANCA pozitivnim SLE statistički značajno ređe su imali zahvaćenost kože ($p < 0.05$), a visoko statistički značajno češće neurološke i psihijatrijske manifestacije ($p < 0.01$) i autoimunski hepatitis ($p < 0.05$).

Neurološke/psihijatrijske manifestacije bile su prisutne kod 29% pacijenata sa monospecifična ANCA pozitivnim SLE, u odnosu na 9.2% monospecifična ANCA negativnih SLE pacijenata. Pacijenti sa monospecifičnim ANCA visoko statistički značajno češće su imali neurološke i psihijatrijske manifestacije ($p < 0.01$).

Pacijenti sa negativnim anti-MPO statistički značajno češće su imali kutane promene u odnosu na pacijente sa pozitivnim anti-MPO ($p < 0.05$).

Pacijenti sa pozitivnim anti-El autoantitelima statistički značajno češće su imali neurološke i psihijatrijske manifestacije ($p < 0.05$) i visoko statistički značajno češće autoimunski hepatitis ($p < 0.01$) u odnosu na anti-El negativne SLE pacijente.

Pacijenti sa anti-Lf negativnim SLE statistički značajno češće su imali zahvatanje kože i atralgije ($p < 0.05$) u odnosu na anti-Lf negativne ANCA pozitivne SLE pacijente (tabela 26).

Tabela 26. Zahvaćenost organa kod 142 SLE pacijenta u odnosu na ANCA pozitivnost

ANCA	Pozitivna n=40	Negativna n=102
Koža	17/40 (42.5)	57/88 (64.8)*
Hematološki parametri	18/40 (45)	43/89 (48.3)
Atralgije	20/40 (50)	51/89 (57.3)
Sinovitis	22/40 (55)	50/89 (56.2)
Bubreg	21/40 (52.5)	52/93 (55.9)
Poliserozitis	5/40 (12.5)	17/88 (19.3)
Neurološke manifest.	11/40 (27.5)**	7/89 (7.9)
Hepatitis	7/40 (17.5)*	4/88 (4.5)
Anti-MPO At	Pozitivna n=19	Negativna n=123
Koža	7/19 (36.8)	67/109 (61.5)*
Hematološki parametri	6/19 (31.6)	48/110 (43.6)
Atralgije	13/19 (68.4)	58/110 (52.7)
Sinovitis	13/19 (68.4)	59/110 (53.6)
Bubreg	7/19 (36.8)	66/114 (57.9)
Poliserozitis	2/19 (10.5)	20/109 (18.3)
Neurološke manifest.	5/19 (26.3)	13/110 (11.8)
Hepatitis	3/19 (15.8)	7/109 (6.4)
Anti-El At	Pozitivna n=6	Negativna n=136
Koža	3/6 (50)	71/122 (58.2)
Hematološki parametri	5/6 (83.3)	56/123 (45.5)
Atralgije	4/6 (66.7)	67/123 (54.5)
Sinovitis	3/6 (50)	69/123 (56.1)
Bubreg	1/6 (16.7)	72/127 (56.7)
Neurološke manifest.	3/6 (50)*	15/123 (12.2)
Hepatitis	3/6 (50)**	7/122 (5.7)
Anti-Lf At	Pozitivna n=21	Negativna n=121
Koža	8/21 (38.1)	66/107 (61.7)*
Hematološki parametri	9/21 (42.9)	52/108 (48.1)
Atralgije	7/21 (33.3)	64/108 (59.3)*
Sinovitis	8/21 (38.1)	64/108 (59.3)
Bubreg	13/21 (61.9)	60/112 (53.6)
Poliserozitis	4/21 (19)	18/107 (16.8)
Neurološke manifest.	5/21 (23.8)	13/108 (12)
Hepatitis	3/21 (14.3)	7/107 (6.5)

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

4.2.11. Imunoserološki parametri i ANCA profil u odnosu na stepen težine GN

Od 133 pacijenta kod kojih su postojali klinički podaci o zahvaćenosti bubrega 60 (45.1%) nije imalo bubrežnu zahvaćenost, 43 (32.3%) je imalo histopatološki verifikovan GN, dok je 30 pacijenata (22.6%) imalo histopatološki neferifikovan GN (tabela 27).

Tabela 27. Tip GN kod 133 pacijenta sa idiopatskim SLE

GN	n=133
Nije zahvaćen bubreg (%)	60 (45.1)
Lakša forma (tipovi I, II, III)	11 (8.3)
Teža forma (tip IV, nekrotizujući)	30 (22.6)
Membranozni	2 (1.5)
HP neverifikovani tipovi	30 (22.6)

GN, glomerulonefritis

Pacijenti sa težom formom GN statistički značajno češće su imali pozitivna anti-dsDNK antitela. Titar anti-dsDNK je bio viši kod teže forme GN u odnosu na lakšu, a češće su imali i pad C3 i C4 (tabela 28).

Tabela 28. Imunoserološke karakteristike u odnosu na težinu GN

	Lakša forma GN, tipovi I, II, III n=11	Teža forma GN, tip IV, nekrotizujući n=30
Anti-dsDNK (%)	6 (54.5)	26 (86.7)*
Anti-dsDNK, medijana (opseg)	80.0 (0-640)	160 (0-1280)
Sniženi C3 (%)	3 (27.3)	16 (53.3)
Sniženi C4 (%)	3 (27.3)	14 (46.7)
C3 (g/L), prosek±SD	0.99±0.32	0.79±0.37
C4 (g/L), prosek±SD	0.15±0.07	0.14±0.10
aCL IgG (%)	3/8 (37.5)	5/20 (25)
aCL IgM (%)	2/8 (25)	4/20 (20)
aCL IgG, medijana (opseg)	5.15 (0.7-81.2)	6.6 (0.5-39.3)
aCL IgM, medijana (opseg)	4.15 (1.1-80.0)	3.84 (0.1-19.3)

GN, glomerulonefritis;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 **p<0.01

Pacijenti sa težom formom GN češće su imali pozitivna ANCA, monospecifična ANCA i anti-Lf antitela, dok su oni sa lakšim formama češće imali pozitivna anti-MPO antitela (tabela 29).

Tabela 29. ANCA profil u odnosu na težinu GN

	Lakša forma GN, tipovi I, II, III n=11	Teža forma GN, tip IV, nekrotizujući n=30
ANCA (%)	2 (18.2)	11 (36.7)
Anti-MPO (%)	2 (18.2)	3 (10)
Anti-MPO(U/mL), medijana (opseg)	2.7 (0.7-187.5)	2.6 (0.4-240.0)
Anti-MPO indeks, medijana (opseg)	0.13 (0.08-0.58)	0.07 (0.02-6.4)
Anti-PR3 (%)	1 (9.1)	2 (6.7)
Anti-PR3 (U/mL), medijana (opseg)	1.6 (0.8-49.4)	2.1 (0.1-284.0)
Anti-PR3 indeks, medijana (opseg)	0.09 (0.04-0.17)	0.08 (0.01-4.45)
Anti-Lf (%)	0	8 (26.7) (p=0.08)
Anti-Lf indeks, medijana (opseg)	0.18 (0.07-0.69)	0.19 (0.07-7.39)
Anti-El (%)	0	0
Anti-El index, medijana (opseg)	0.075 (0.049-0.09)	0.075 (0.02-0.74)
Anti-Cat-G (%)	0	0
Anti-BPI (%)	0	0
Monospecifična ANCA	1 (9.1)	9 (30)
Polispecifična ANCA	1 (9.1)	2 (6.7)

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 ** p<0.01

4.2.12. Imunoserološki parametri i ANCA profil kod 25 ANCA pozitivnih SLE pacijenata u praćenju

Od 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata, kod 25 su posle perioda praćenja ponovljeni imunoserološki parametri i ANCA profil. Srednje vreme praćenja bilo je 1.9 ± 1.5 godina (opseg 0.1-5.5 godina). Smanjio se broj pacijenata sa anti-dsDNK, niskim C3 ($p < 0.05$) i C4. Visoko statistički značajno je opao titar anti-dsDNK antitela ($p < 0.01$), a došlo je do veoma značajnog porasta koncentracije C3 ($p < 0.01$).

Takođe, smanjio se broj pacijenata sa mono- i polispecifičnim ANCA, a visoko statistički značajno se smanjio broj pacijenata sa anti-Lf antitelima. Koncentracija anti-MPO antitela opala je posle perioda praćenja (tabela 30).

Tabela 30. Imunoserološki parametri posle perioda praćenja

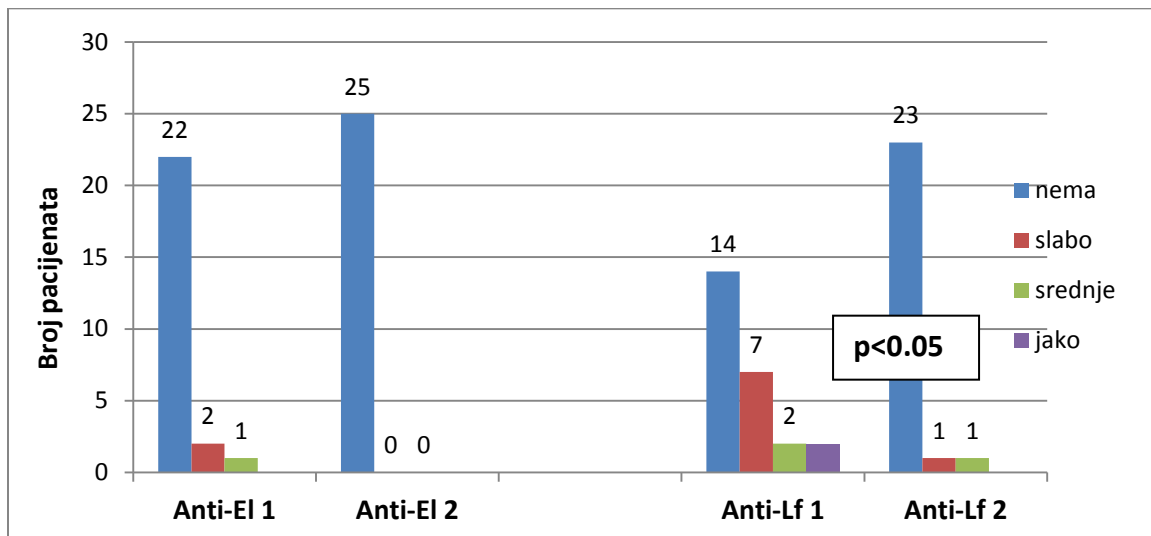
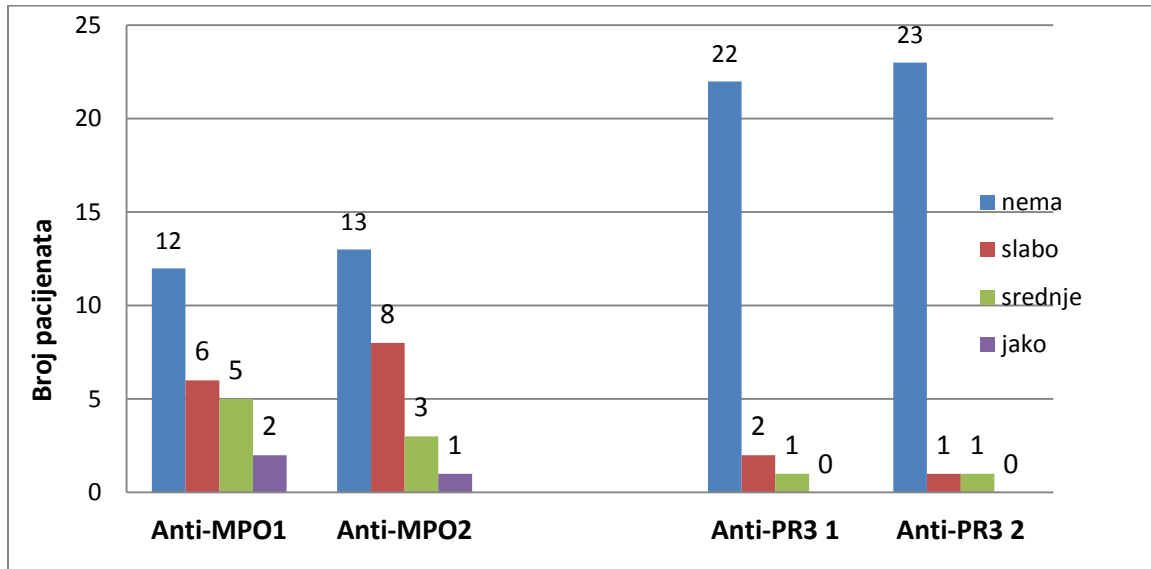
	ANCA poz SLE - prvi uzorak n=25	ANCA poz SLE - drugi uzorak n=25
Anti-MPO (U/mL), medijana (opseg)	33.1 (0.12-240.0)	28.5 (0.9-252.6)
Anti-dsDNK (%)	17 (68)	13 (48)
Anti-dsDNK, medijana (opseg)	160 (0-1280)**	10.0 (0-640)
Snižen C3 (%)	11 (44)*	5 (20)
Snižen C4 (%)	12 (48)	10 (40)
C3 (g/L), medijana (opseg)	0.87 (0.33-2.1)	1.18 (0.36-2.9)**
C4 (g/L), prosek \pm SD	0.151 \pm 0.069	0.142 \pm 0.093
Monospecifična ANCA	18 (72)	11 (44)
Anti-MPO (U/mL), medijana (opseg)	33.1 (0.12-240.0)	28.5 (0.9-252.6)
Anti-Lf (%)	11 (44)**	3 (12)

SLE, sistemski lupus erythematosus;

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Niko od 25 pacijenata sa ANCA pozitivnim SLE koji su praćeni nije imao anti-Cat-G i anti-BPI antitela. Jedan pacijent sa anti-MPO je postao negativan, jedan sa jakom pozitivnošću postao je srednje pozitivan, dok je dvoje sa srednjom koncentracijom ANCA postalo slabo pozitivno. Kod pacijenata sa anti-PR3 jedan sa slabom pozitivnošću je postao negativan. Sva tri pacijenta sa anti-El su postala negativna. Statistička značajnost u praćenju kada je ANCA pozitivnost u pitanju nađena je kod pacijenata sa anti-Lf antitelima ($p < 0.05$). Osam pacijenata sa anti-Lf antitelima je

postalo negativno, a u praćenju nije više bilo pacijenata sa jakom pozitivnošću (grafikon 12).



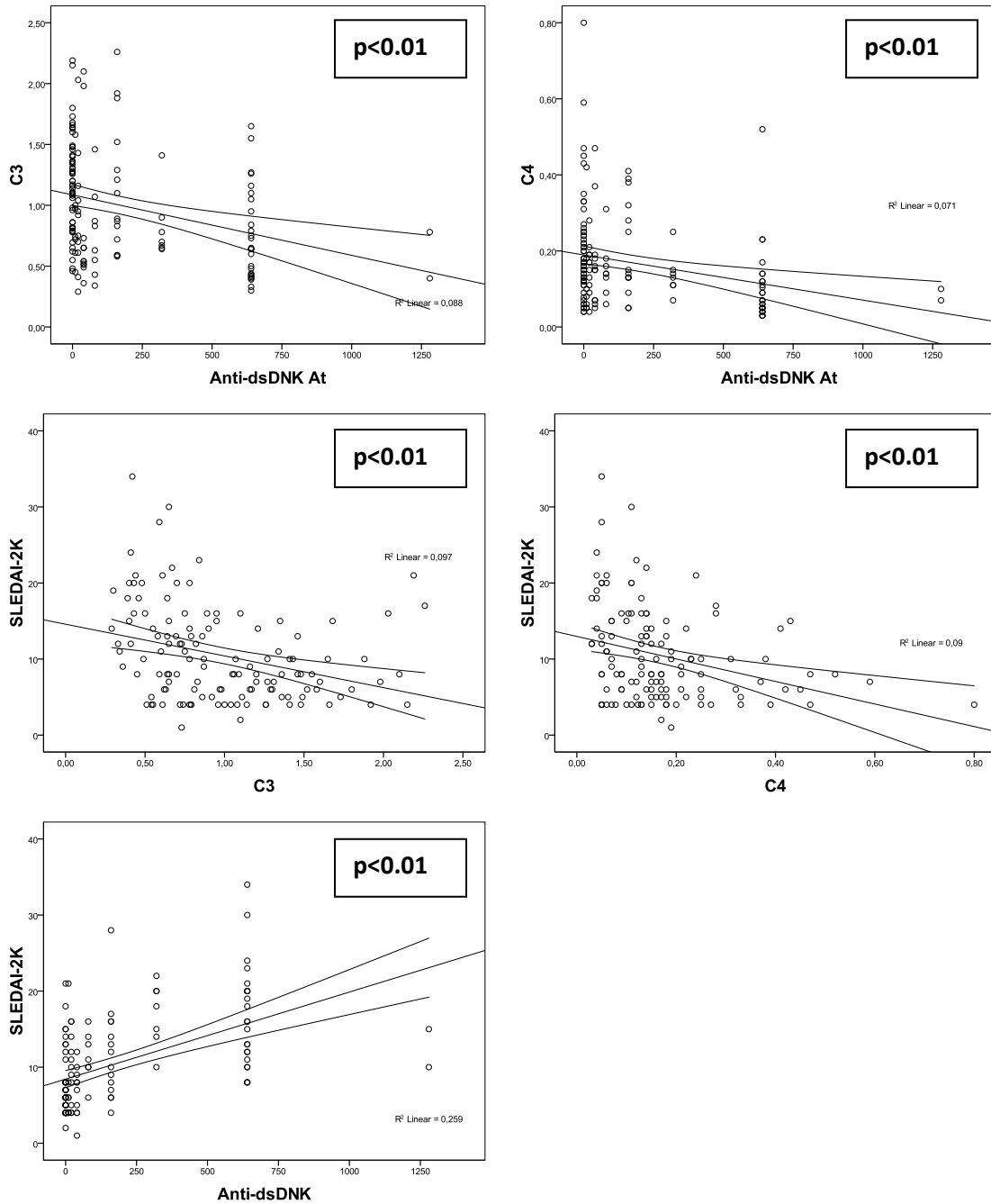
MPO 1, prvi uzorak; MPO 2, drugi uzorak (posle perioda praćenja); PR3 1, prvi uzorak; PR3 2, drugi uzorak; El 1, prvi uzorak; El 2, drugi uzorak; Lf 1, prvi uzorak; Lf 2, drugi uzorak.

Grafikon 12. ANCA profil posle perioda praćenja 25 SLE pacijenata

4.2.13. Korelacije imunoseroloških parametara i stepena aktivnosti bolesti

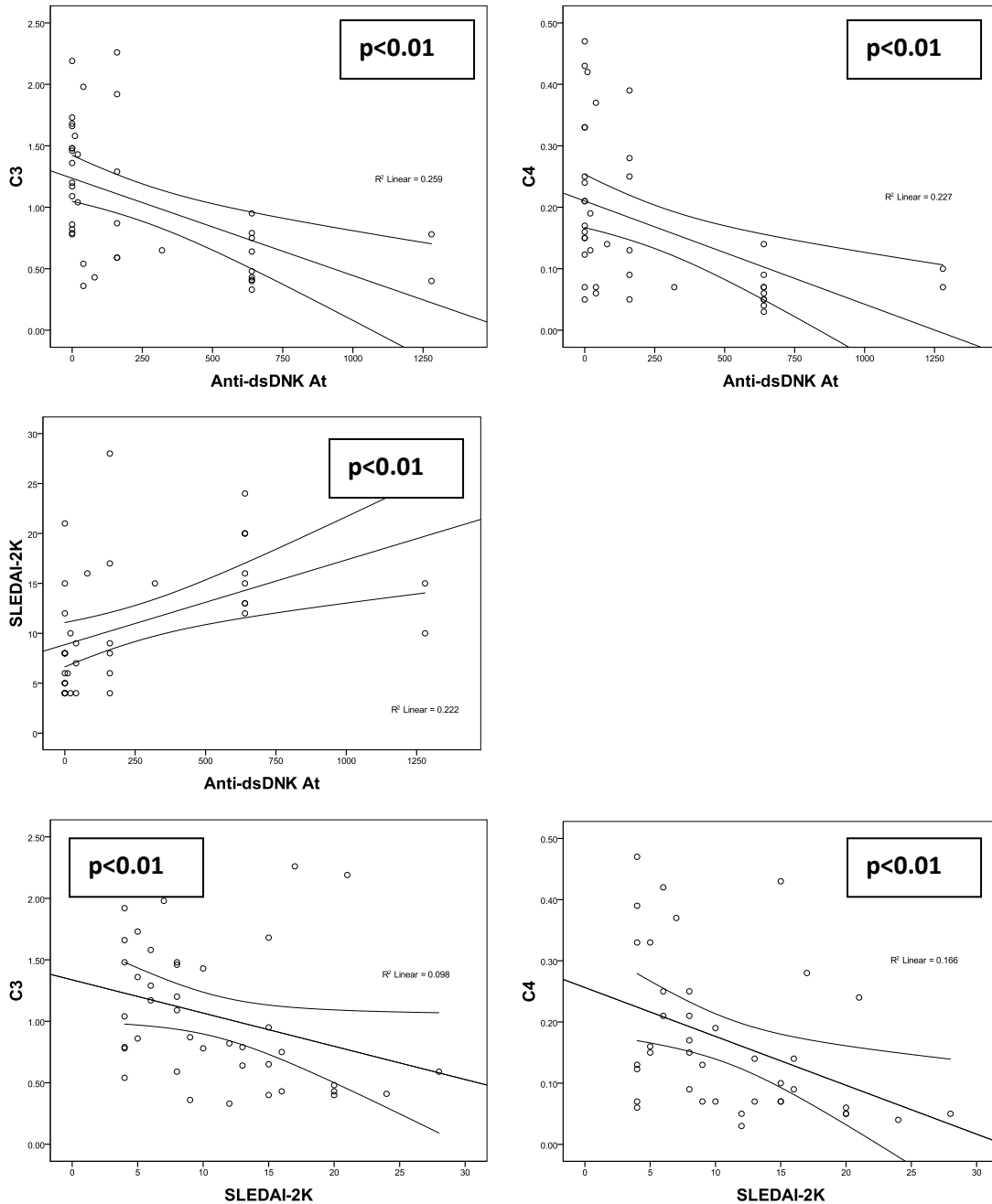
Korelacije između anti-dsDNK, C3, C4 i SLEDAI-2K kod svih 142 pacijenta sa idiopatskim SLE, kao i kod 40 pacijenata sa ANCA pozitivnim SLE prikazani su na grafikonima 13 i 14.

Kod 142 pacijenta sa SLE nađena je visoko statistički značajna osrednja negativna povezanost između titra anti-dsDNK i koncentracije C3 i C4, kao i između SLEDAI-2K i koncentracije C3 i C4, i osrednja pozitivna povezanost između titra anti-dsDNK i SLEDAI-2K (grafikon 13).



Grafikon 13. Korelacija titra anti-dsDNK At, C3, C4 i stepena aktivnosti bolesti kod 142 SLE pacijenta

Kod 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata nađena je takođe osrednja negativna povezanost između titra anti-dsDNK i koncentracije C3 i C4, kao i između SLEDAI-2K i koncentracije C3 i C4, a osrednja pozitivna povezanost između titra anti-dsDNK i SLEDAI-2K (grafikon 14, tabela 31).



Grafikon 14. Korelacija titra anti-dsDNK At, C3, C4 i stepena aktivnosti bolesti kod 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata

Tabela 31. Pozitivne korelacije imunoseroloških parametara i indeksa aktivnosti bolesti kod 40 ANCA pozitivnih pacijenata

Korelacija	ANCA pozitivan SLE n=40	Spearman koeficijent	p
Titar anti-dsDNK	C3 (g/L)	-0.595**	<0.001
	C4 (g/L)	-0.559**	<0.001
	SLEDAI-2K	0.576**	<0.001
SLEDAI-2K	C3 (g/L)	-0.391*	0.013
	C4 (g/L)	-0.459**	0.003

SLE, sistemski lupus erythematosus.

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 ** p<0.01

Međusobne korelacije između koncentracija i indeksa pojedinih ANCA kod 142 pacijenta sa idiopatskim SLE prikazane su u tabeli 32.

Postojala je pozitivna statistički značajna povezanosti između koncentracije anti-MPO i koncentracije anti-PR3, indeksa anti-El i koncentracije IgG i IgM aCL antitela, kao i između indeksa anti-MPO i indeksa ostalih ANCA u okviru ANCA profila. Takođe, ustanovljena je pozitivna visoko statistički značajna osrednja povezanost između indeksa anti-Lf i titra anti-dsDNK (tabela 32).

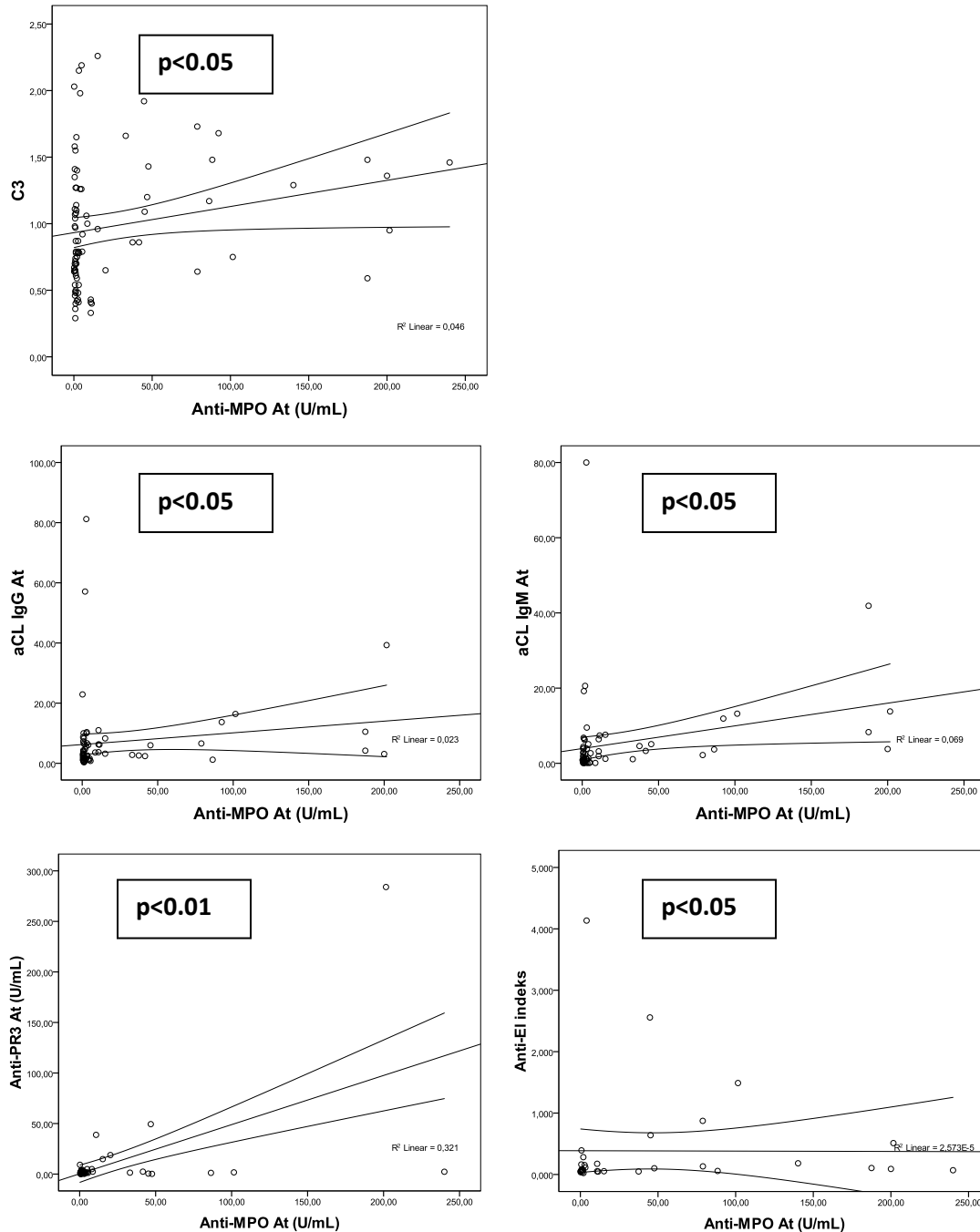
Tabela 32. Korelacija između pojedinih komponenti ANCA profila kod 142 pacijenta sa SLE

Korelacija	SLE n=142	Spearman koeficijent	p
Anti-MPO (U/mL)	C3 (g/L)	0.243*	0.024
	Anti-PR3 (U/mL)	0.346**	0.007
	Anti-El indeks	0.358*	0.037
	aCL IgG (U/mL)	0.482*	0.037
	aCL IgM (U/mL)	0.535*	0.018
Anti-MPO indeks	Anti-PR3 indeks	0.334**	0.003
	Anti-El indeks	0.516**	<0.001
	Anti-Lf indeks	0.111	0.337
	Anti-Cat-G indeks	0.398**	<0.001
	Anti-BPI indeks	0.375**	0.001
Anti-PR3 (U/mL)	aCL IgM (U/mL)	0.583*	0.036
Anti-Lf indeks	Titar anti-dsDNK	0.333**	0.003
	aCL IgG (U/mL)	0.483**	0.002

SLE, sistemski lupus erythematosus.

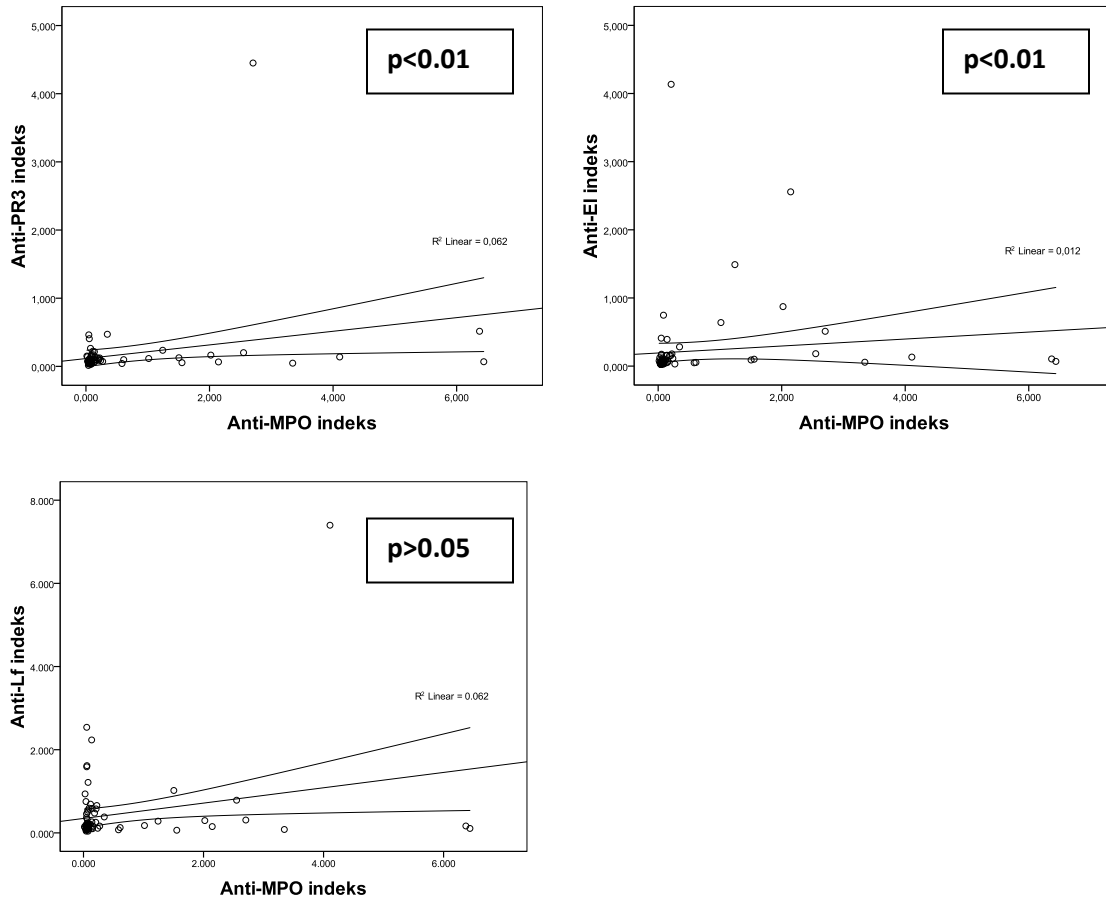
Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 ** p<0.01

Ustanovljena je pozitivna korelacija između koncentracije anti-MPO i koncentracije C3, IgG, IgM aCL, kao i pozitivna korelacija između anti-MPO i anti-PR3 koncentracije, odnosno anti-EI indeksa kod 142 SLE pacijenta (grafikon 15).



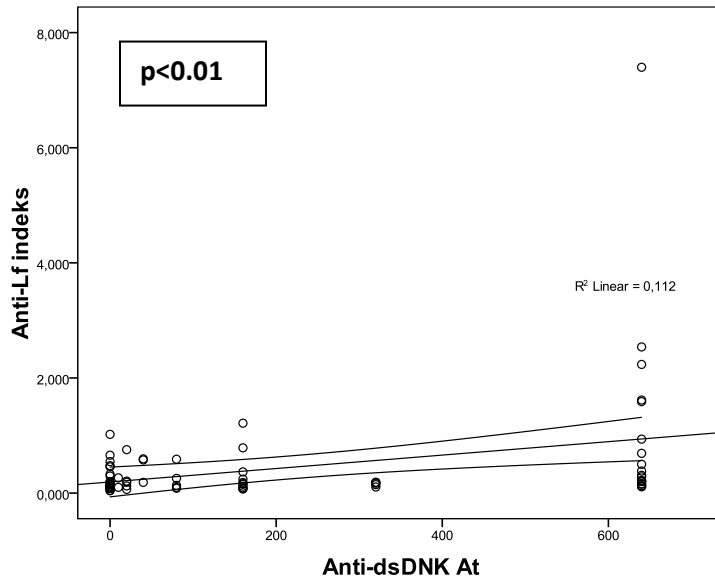
Grafikon 15. Pozitivne korelacije koncentracije anti-MPO antitela sa drugim imunoserološkim parametrima kod 142 SLE pacijenta

Takođe, dobijena je pozitivna korelacija između anti-MPO indeksa i anti-PR3 ($p < 0.01$), odnosno anti-EI indeksa ($p < 0.01$), a nije bilo korelacije između anti-MPO indeksa i anti-Lf indeksa ($p > 0.05$) (grafikon 16).



Grafikon 16. Korelacije anti-MPO indeksa sa ostalim ANCA indeksima

U grupi 142 SLE pacijenta nađena je i visoko statistički značajna pozitivna osrednja povezanost između anti-Lf indeksa i anti-dsDNK antitela i anti-Lf indeksa i koncentracije antikardiolipinskih IgG antitela (grafikon 17).



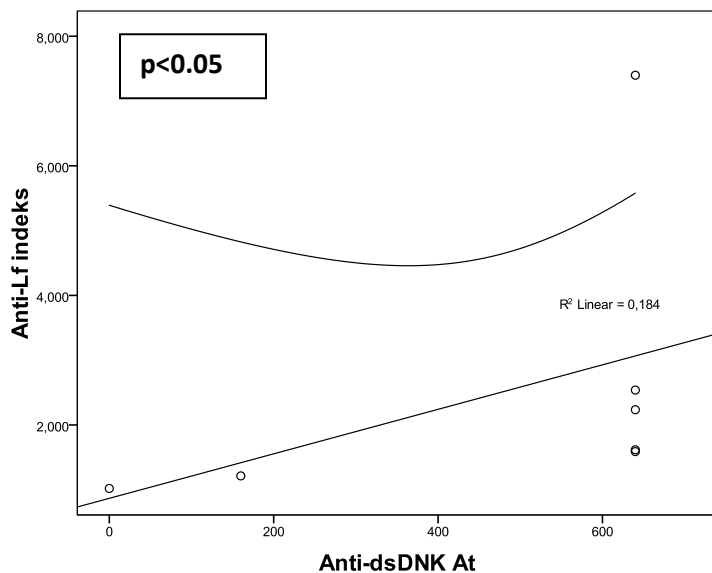
Grafikon 17 Pozitivna korelacija anti-Lf indeksa i anti-dsDNK antitela kod 142 SLE pacijenta

Korelacija između indeksa anti-Lf i titra anti-dsDNK kod 21 SLE pacijenta sa pozitivnim anti-Lf antitelima prikazana je u tabeli 33. Kod pacijenata sa pozitivnim anti-Lf ustanovljen je statistički značajno veći broj onih sa pozitivnim anti-dsDNK. Ustanovljena je jaka pozitivna povezanost između anti-Lf antitela i titra anti-dsDNK (tabela 33, grafikon 18).

Tabela 33. Korelacija anti-Lf indeksa i anti-dsDNK

Korelacija	Anti-Lf pozitivan SLE n=21	Spearman koeficijent	p
Anti-Lf indeks	Titar anti-dsDNK	0.802*	0.030

SLE, sistemski lupus erythematosus;
Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 ** p<0.01



Grafikon 18. Korelacija anti-Lf indeksa i titra anti-dsDNK kod 21 anti-Lf pozitivnog SLE pacijenta

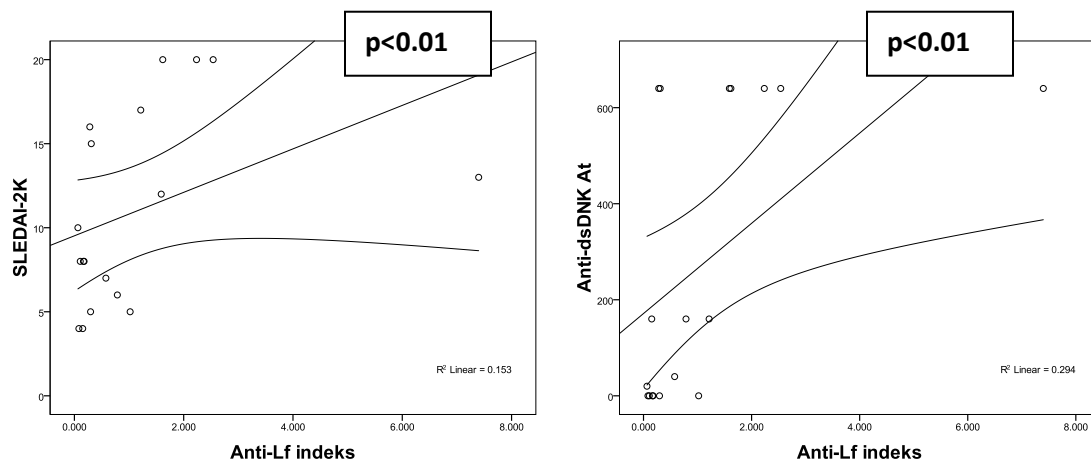
Korelacije između pojedinih imunoseroloških parametara kod 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata prikazane su u tabeli 34. Kod ANCA pozitivnih SLE pacijenata je utvrđena osrednja visoko statistički značajna pozitivna povezanost između indeksa anti-Lf i titra anti-dsDNK i SLEDAI-2K skora (grafikon 19), zatim pozitivna osrednja statistički značajna povezanost između indeksa anti-Lf i koncentracije anti-histonskih antitela, kao i osrednja pozitivna visoko statistički značajna povezanost između indeksa anti-Lf i koncentracije anti-C1q antitela (grafikon 20). Takođe, nađena je negativna osrednja statistički značajna povezanost između indeksa anti-Lf i koncentracije C3 i C4, kao i negativna osrednja povezanost između indeksa anti-Lf i indeksa anti-MPO (grafikon 21).

Tabela 34. Korelacija između pojedinih komponenti ANCA profila kod 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata

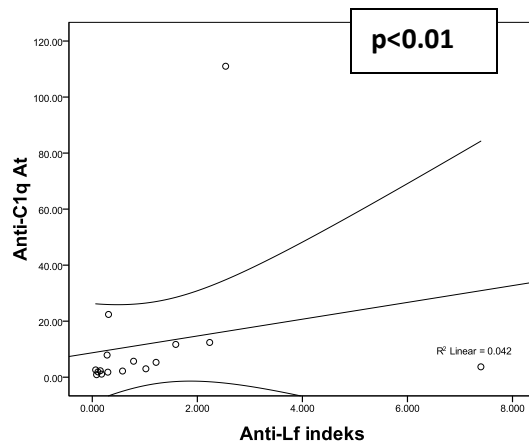
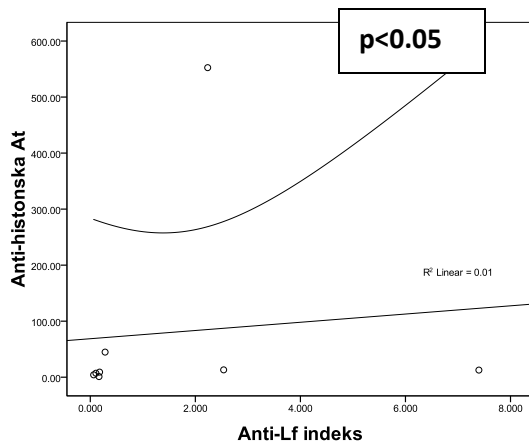
Korelacija	ANCA pozitivan SLE n=40	Spearman koeficijent	p	
Anti-MPO (U/mL)	C3 (g/L)	0.361*	0.024	
	Anti-nukleozomalna At	-0.597*	0.024	
	Anti-c1q	-0.414*	0.026	
Anti-MPO indeks	SLEDAI-2K	-0.531*	0.023	
	Anti-Lf indeks	-0.546*	0.019	
Anti-Lf indeks	Titar anti-dsDNK	0.670**	0.002	
	SLEDAI-2K	0.596**	0.009	
	C3 (g/L)	-0.566*	0.014	
	C4 (g/L)	-0.584*	0.011	
	Anti-histonska At	0.714*	0.047	
	Anti-C1q	0.659**	0.006	
	Anti-MPO indeks	-0.546*	0.019	
	El indeks	Nema korelacija		

SLE, sistemski lupus erythematosus.

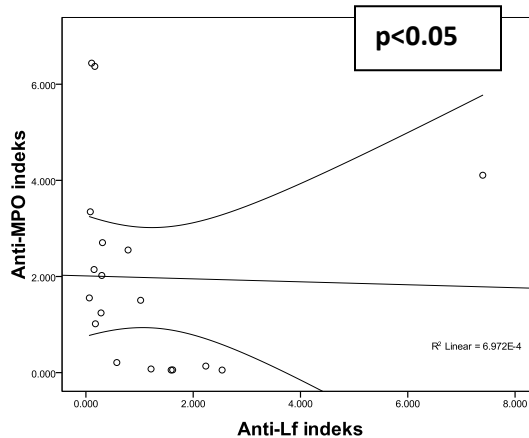
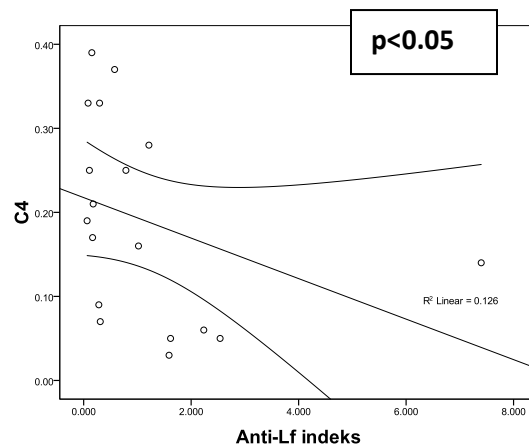
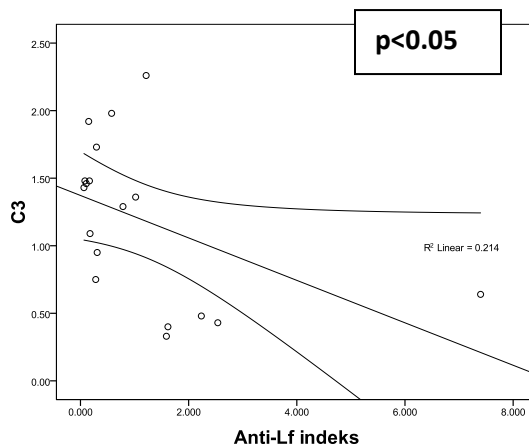
Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 ** p<0.01



Grafikon 19. Pozitivna korelacija anti-Lf indeksa i SLEDAI-2K skora, odnosno titra anti-dsDNK antitela kod 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata

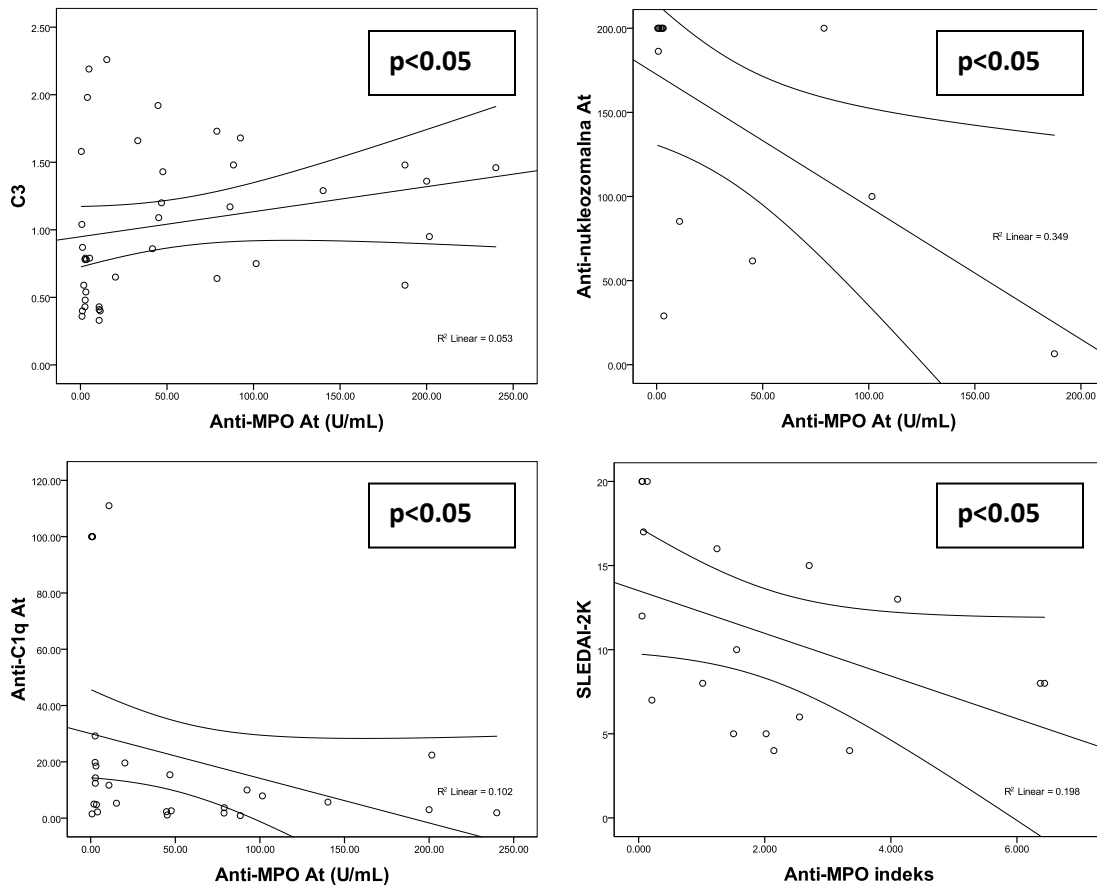


Grafikon 20. Pozitivna korelacija između anti-Lf i anti-histonskih, odnosno anti-C1q antitela kod 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata



Grafikon 21. Negativna korelacija između anti-Lf indeksa i komponenti komplementa, odnosno anti-MPO indeksa kod 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata

Postojala je pozitivna korelacija između koncentracije anti-MPO i koncentracije C3, a negativna između koncentracije anti-MPO i antinukleozomalnih antitela. Takođe, nije bilo pozitivne korelacije između indeksa anti-MPO i SLEDAI-2K skora (grafikon 22).



Grafikon 22. Pozitivne i negativne korelacije koncentracije anti-MPO i imunoseroloških parametara i SLEDAI-2K skora kod ANCA pozitivnih SLE pacijenata

4.3. POREĐENJE KLINIČKIH I IMUNOSEROLOŠKIH KARAKTERISTIKA KOD ANCA POZITIVNIH PACIJENATA SA SLE I LLS INDUKOVANIM LEKOM

4.3.1. Kliničke manifestacije ANCA pozitivnih SLE i LILLS pacijenata

Kada se porede kliničke manifestacije 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata sa 17 LILLS pacijenata (tabela 35), postoji statistički značajna razlika u postojanju određenih kutanih manifestacija. SLE pacijenti su značajno češće imali malarni raš i diskoidne promene ($p < 0.01$), a pacijenti sa PTU-indukovanim LLS purpuru i vaskulitis, uključujući i nekrotizujući vaskulitis ($p < 0.01$). Kod SLE pacijenata značajno češće je zabeležena zahvaćenost zglobova ($p < 0.01$), bubrega ($p < 0.01$), neurološke/psihijatrijske manifestacije ($p < 0.01$) i autoimunski hepatitis ($p < 0.05$).

Tabela 35. Kliničke manifestacije ANCA pozitivnog SLE i PTU-indukovanog LLS

Zahvaćenost organa (klinički simptomi i znaci)	ANCA poz SLE n=40	ANCA poz LILLS n=17
Febrilnost $>38.5^{\circ}\text{C}$ (%)	9 (22.5)	11 (64.7) **
Mukokutane promene (%)	17 (42.5)	15 (88.2)
Malarni raš (%)	10 (25)**	0
DLE (%)	3 (7.5)**	0
SCLE (%)	0 (0)	0
Purpura, urticaria like-vaskulitis, ulceracije (%)	2 (5)	15 (88.2) **
Urtikarija (%)	1 (2.5)	0
Bule (LE billosus) (%)	0	0
Panikulitis (%)	1 (2.5)	0
Oralne ulceracije (%)	2 (5.0)	0
Atralgije (%)	20 (50)**	1 (5.9)
Sinovitis (%)	22 (55)**	1 (5.9)
Bubrežna zahvaćenost (%)	21 (52.5)**	0
Neurološke manifestacije (%)	11 (27.5)**	0
Citopenija (%)	18 (45)	8 (47.1)
Leukopenija (%)	14 (35)	6 (35.3)
Trombocitopenija (%)	3 (7.5)	2 (11.8)
Poliserozitis (%)	5 (12.5)	0
Autoimunski hepatitis (%)	7 (17.5)*	0

SLE, sistemski lupus erythematosus; PTU, propiltiouracil; LLS, lupus-like syndrome; DLE, diskoidni lupus erythematosus; SCLE, subakutni kutani lupus erythematosus.

Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

4.3.2. Imunoserološki parametri ANCA pozitivnih SLE i LILLS pacijenata

Imunoserološki parametri pacijenata sa ANCA pozitivnim SLE i PTU-indukovanim LLS prikazani su u tabeli 36. ANA su bila prisutna kod 95% pacijenata sa SLE i svih pacijenata sa PTU-indukovanim LLS, ali je medijana ANA titra bila značajno veća kod SLE u odnosu na LILLS pacijente ($p < 0.01$) (tabela 36). Kod pacijenata sa ANCA pozitivnim SLE statistički značajno češće su detektovana anti-dsDNK, anti-nukleozomalna antitela ($p < 0.01$), anti-ENA i anti-histonska antitela ($p < 0.01$). Češće su bila prisutna anti-C1q antitela, krioglobulini i snižen C3 i C4, ali bez statističke značajnosti. IgG i IgM aCL antitela su češće bila pozitivna kod pacijenata sa LILLS.

Tabela 36. Imunoserološki parametri kod ANCA pozitivnog SLE i LILLS

Serološki parametri	ANCA poz SLE n=40	ANCA poz LILLS n=17
ANA (IIF) (%)	38 (95)	17 (100)
ANA titar, medijana (opseg)	640 (0-640)**	80 (40-640)
Anti-dsDNK (IIF) (%)	25 (62.5)**	0
Titar anti-dsDNK, medijana (opseg)	40 (0-1280)	0
Anti-ENA (%)	20 (50)*	3 (17.6)
Anti-histone (%)	9/23 (39.1)*	1 (5.9)
Anti-nucleosome (%)	14/15 (93.3)**	3 (17.6)
Anti-c1q (%)	11/29 (37.9)	3 (17.6)
Nizak C (%)	22 (55)	7 (41.2)
Nizak C3 (%)	16 (40)	6 (35.3)
Nizak C4 (%)	18 (45)	5 (29.4)
Krioglobulini (%)	11/14 (78.6)	8 (47.1)
aCL (%)	9/35 (25.7)	8 (47.1)
aCL IgG (%)	8/35 (22.9)	6 (35.3)
aCL IgM (%)	6/35 (17.1)	7 (41.2) ($p=0.06$)
aCL IgG, medijana (opseg)	5.8 (1.2-39.3)	7.0 (1.0-29.0)
aCL IgM, medijana (opseg)	3.2 (0.09-41.9)	6.9 (0.9-38.7)

SLE, sistemski lupus erythematosus; PTU, propiltiouracil; LLS, lupus-like syndrome; Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

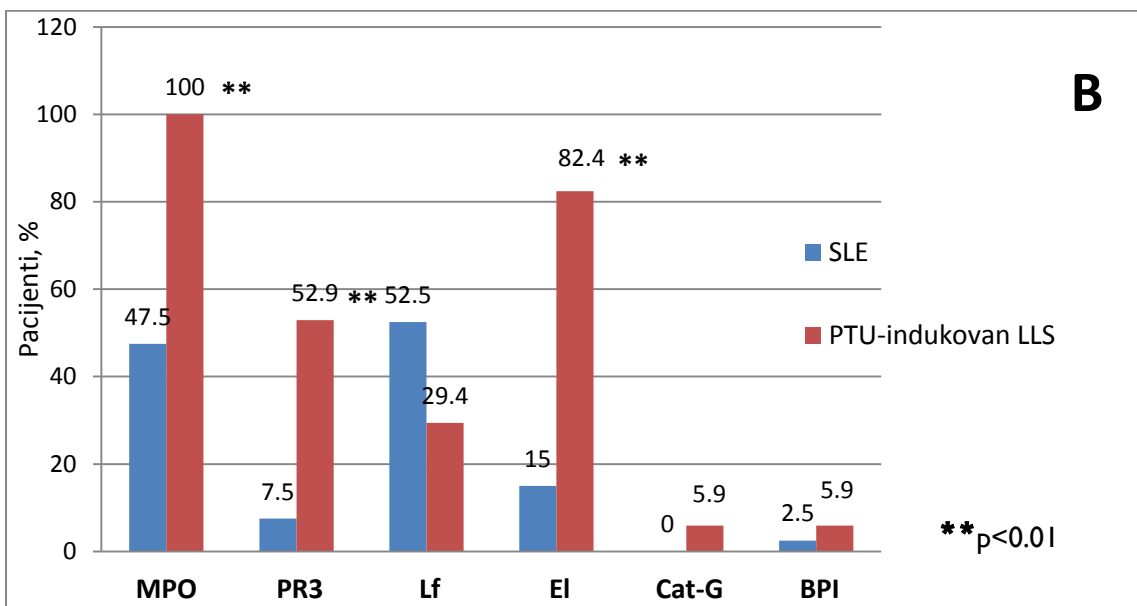
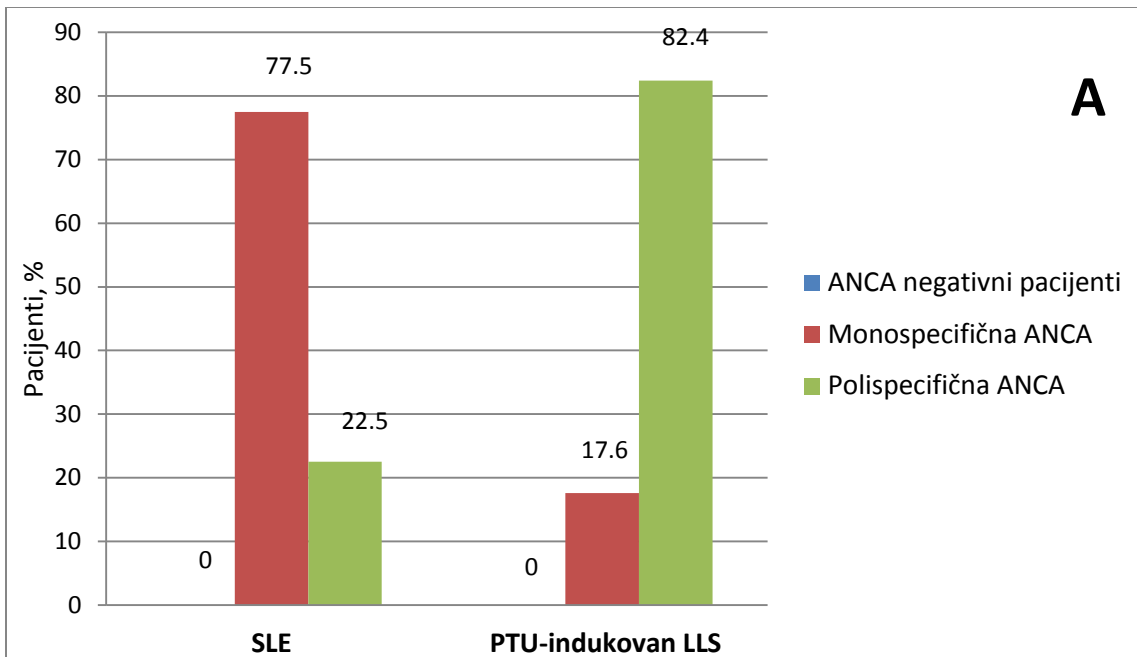
4.3.3. ANCA profil kod pacijenata sa ANCA pozitivnim SLE i LILLS

Kod pacijenata sa ANCA pozitivnim SLE visoko statistički značajno češće su bila detektovana monospecifična ANCA, dok su se kod PTU-indukovanog LLS visoko statistički značajno češće javljala polispecifična ANCA, anti-MPO, anti-PR3 i anti-El. Anti-Lf antitela su bila pozitivna kod 52.5% SLE i 29.4% LILLS pacijenata. Ipak, statistička značajnost između ove dve grupe pacijenata nije dostignuta kada je u pitanju prisustvo anti-Lf antitela. Koncentracija anti-MPO, anti-PR3 i anti-Lf antitela bila je značajno veća kod LILLS pacijenata (tabela 37, grafikon 23A i 23B).

Tabela 37. ANCA profil kod pacijenata sa ANCA pozitivnim SLE i LILLS

ANCA profil (ELISA)	ANCA pozitivan SLE (n=40)	PTU-indukovan LLS(n=17)
ANCA pozitivnost (%)	40 (100)	17 (100)
Monospecifična ANCA (%)	31 (77.5)**	3 (17.6)
Polispecifična ANCA (%)	9 (22.5)	14 (82.4)**
Anti-MPO (%)	19 (47.5)	17 (100)**
Anti-PR3 (%)	3 (7.5)	9 (52.9)**
Anti-Lf (%)	21 (52.5)	5 (29.4)
Anti-El (%)	6 (15)	14 (82.4)**
Anti-Cat-G (%)	0	1 (5.9)
Anti-BPI (%)	1 (2.5)	1 (5.9)
Anti-MPO (U/mL), prosek±SD	53.96±68.8	75.42±43.85 *
Anti-PR3(U/mL), mediana (opseg)	1.65 (0.2-284.0)	5.6 (0.8-79.2) **

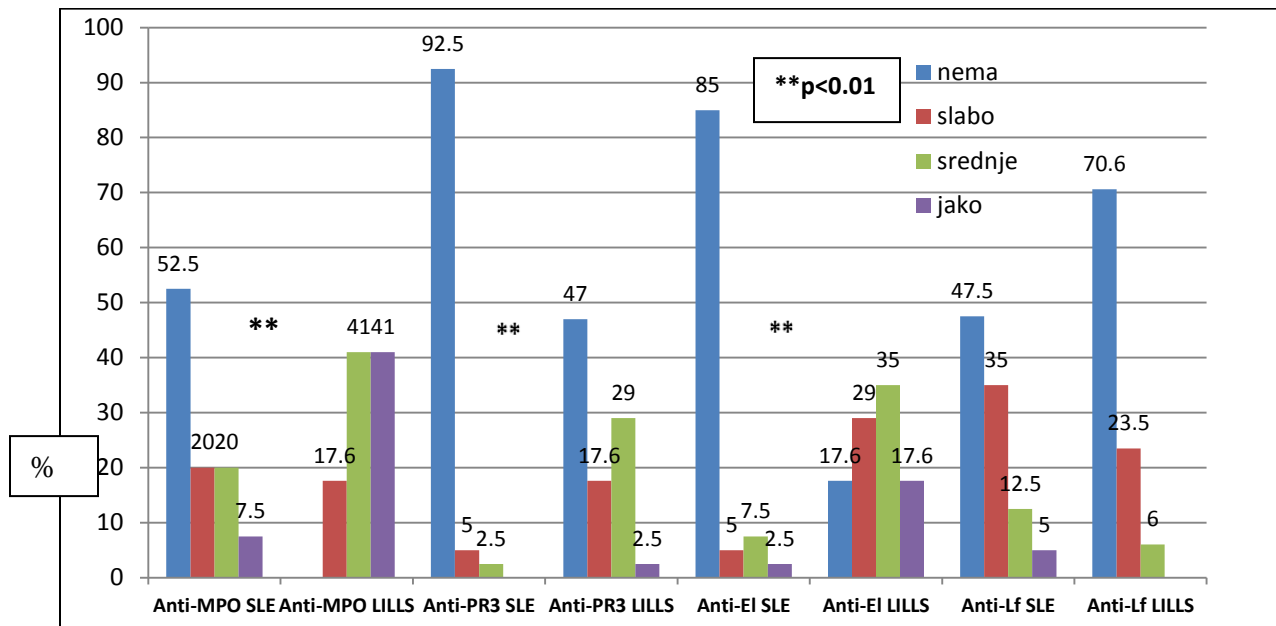
SLE, sistemski lupus erythematosus; PTU, propiltiouracil; LLS, lupus-like syndrome; Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. *p<0.05 ** p<0.01



Grafikon 23 (A) ANCA specifičnost kod ANCA pozitivnih SLE i LILLS pacijenata; **(B)** ANCA profil kod 40 ANCA pozitivnih SLE i LILLS pacijenata

Manji broj pacijenata sa idiopatnim SLE je imao ANCA u srednjoj i visokoj koncentraciji u odnosu na LILLS pacijente. Visoku i srednju koncentraciju anti-MPO imalo je po 41.2% LILLS pacijenata, za razliku od samo 7.5% SLE pacijenata sa visokom i 20% pacijenata sa srednjom koncentracijom. Svi LILLS pacijenti su imali anti-MPO, za razliku od 52.5% SLE pacijenata koji nisu imali detektovana anti-MPO antitela. Anti-El antitela u visokoj, odnosno srednjoj koncentraciji imalo je 17.6%, odnosno 35.3% LILLS pacijenata, za razliku od samo 2.5%, odnosno 7.5% SLE pacijenata. Ova antitela nije imalo 85% SLE pacijenata i 17.6% LILLS pacijenata. Postojala je visoko statistički značajna razlika u broju pacijenata sa pozitivnim ANCA i broju pacijenata sa visokim i srednjim koncentracijama anti-MPO, anti-PR3 i anti-El antitela u korist LILLS pacijenata ($p < 0.01$) (grafikon 24).

Nije bilo statističke značajnosti u broju pacijenata sa anti-Lf antitelima i semikvantitativnoj raspodeli koncentracije anti-Lf kod LILLS i SLE. Za razliku od anti-MPO, anti-PR3 i anti-El, veći broj pacijenata sa LILLS je bio anti-Lf negativan (70.6%) u odnosu na 47.5% SLE pacijenata. Niko od LILLS pacijenata nije imao anti-Lf u visokoj koncentraciji, a samo 1 pacijent (5.9%) je imao u srednjoj, dok je kod SLE 5% imalo visoku i 12.5% srednju koncentraciju anti-Lfantitela (grafikon 24).



Grafikon 24. ANCA profil (semikvantitativno) kod ANCA pozitivnog SLE i LILLS

Niko od pacijenata sa idiopatskim SLE nije imalo anti-Cat-G, a samo jedan pacijent sa LILLS (5.9%) je imao ova ANCA. Takođe, samo po jedan SLE (2.5%) i LILLS pacijent (5.9%) je imao anti-BPI antitela.

4.3.4. Imunoserološki parametri aktivnog PTU-indukovanog LLS i LLS u remisiji

LLS pacijenti su u toku remisije, nakon isključenja PTU, ređe imali ANA, nizak nivo C3, krioglobuline ($p < 0.05$) i IgM aCL pozitivnost ($p < 0.01$) u poređenju sa pacijentima koji su imali LLS u aktivnoj fazi (tabela 38). Takođe, LLS pacijenti koji su bili u remisiji imali su niže vrednosti nivoa anti-histonskih, anti-nukleozomalnih i IgG/IgM aCL antitela ($p < 0.05$).

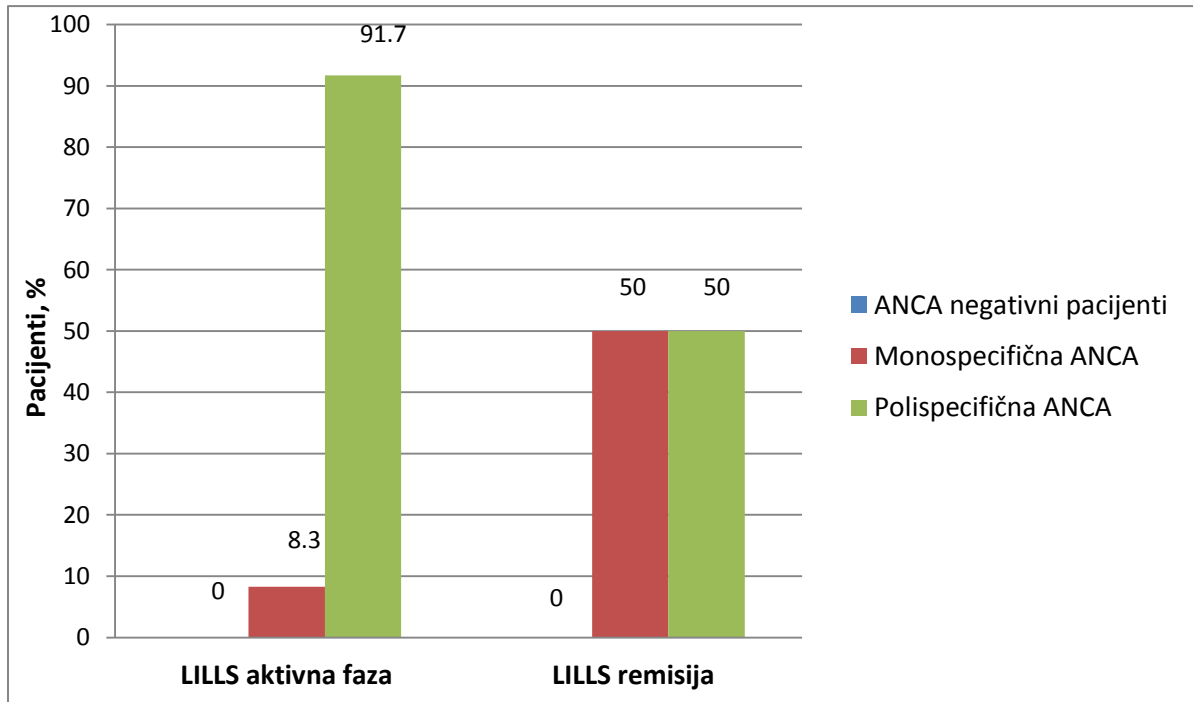
Tabela 38. Imunoserološki parametri PTU-indukovanog LLS u aktivnoj fazi i remisiji

Imunoserološki parametri	PTU-indukovan LLS - aktivna faza (n=12)	PTU-indukovan LLS - remisija (n=12)
ANA (%)	12 (100)*	7 (58.3)
Titar ANA, medijana (opseg)	60 (40-160)	40 (0-640)
Anti-dsDNK (IIF) (%)	0	0
High-avidity anti-dsDNK (%)	1 (8.3)	1 (8.3)
Anti-ENA (%)	2 (16.7)	2 (16.7)
Anti-histonska At (%)	0	0
Anti-nukleozomalna At (%)	2 (16.7)	0
Anti-C1q (%)	2 (20.0)	3 (33.3)
Snižen C3 (%)	6 (50.0)*	1 (8.3)
Snižen C4 (%)	4 (33.3)	1 (8.3)
Krioglobulini (%)	7 (58.3)*	2 (16.7)
aCL IgG At (%)	4 (33.3)	3 (25.0)
aCL IgM At (%)	6 (50.0)**	0
Anti-β2-glikoprotein IgG (%)	0	0
Anti-β2-glikoprotein IgM (%)	1 (8.3)	1 (8.3)

PTU, propiltiouracil; LLS, lupus-like syndrome.

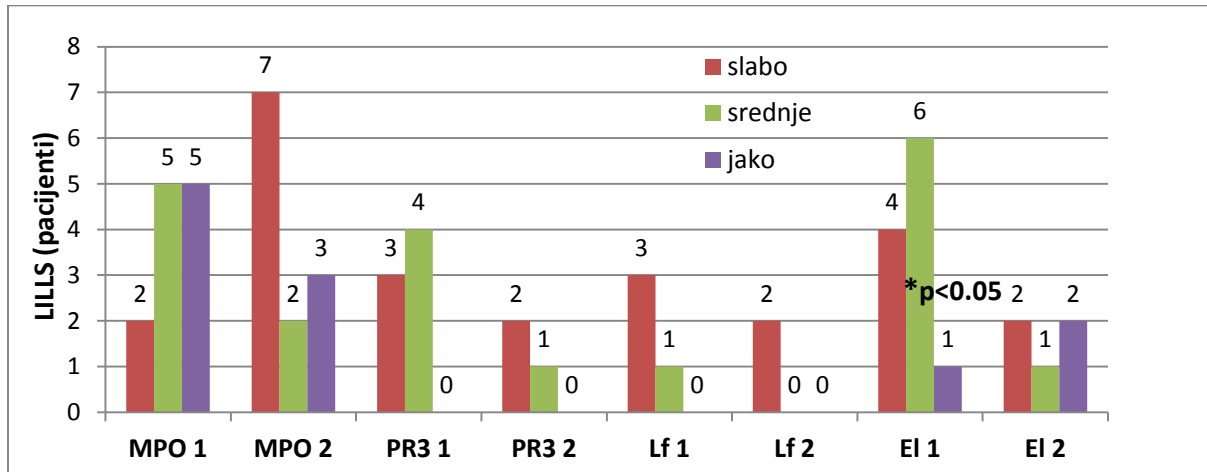
Vrednosti predstavljaju broj pacijenata. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Posle prekida PTU terapije, broj pacijenata sa polispecifičnim ANCA smanjen je sa 91.7% na 50%. S druge strane, broj pacijenata sa monospecifičnim ANCA povećan je sa 8.3% na 50% (grafikon 25).



Grafikon 25. ANCA specifičnost kod LILS u aktivnoj fazi i remisiji

Učestalost anti-El pozitivnosti ($p<0.05$) i koncentracija anti-MPO($p<0.01$) i anti-PR3 ($p<0.05$) značajno su opale posle obustavljanja PTU, ali je 25% LILLS pacijenata zadržao visoku anti-MPO pozitivnost. Nakon isključenja PTU, učestalost anti-PR3, anti-El, anti-Lf i anti-BPI negativnih pacijenata je povećana (grafikon 26).



MPO 1, anti-MPO u aktivnoj fazi; MPO2, anti-MPO u remisiji; PR3 1, anti-PR3 u aktivnoj fazi; PR3 2, anti-PR3 u remisiji; anti-Lf 1, anti-Lf u aktivnoj fazi; anti-Lf 2, anti-Lf u remisiji; El 1, anti-El u aktivnoj fazi; El 2; anti-El u remisiji

Grafikon 26. ANCA profil (semikvantitativno) kod PTU-indukovanog LILLS u aktivnoj fazi i remisiji

4.3.5. Senzitivnost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost ANCA

Tabela 39. Senzitivnost (Se), specifičnost (Sp), negativna prediktivna vrednost (NPV) i pozitivna prediktivna vrednost (PPV) polispecifičnih ANCA za LILLS u grupi ANCA pozitivnih pacijenata sa lupusom (n=57)

	ANCA pozitivan LILLS n=17	ANCA pozitivan SLE n=40
Polispecifična ANCA pozitivna	14	9
Polispecifična ANCA negativna	3	31

Se $14/17 \times 100 = 82,3\%$

Sp $31/40 \times 100 = 77,5\%$

NPV $31/34 = 91,1\%$

PPV $14/23 \times 100 = 60\%$

Tabela 40. Se, Sp, NPV i PPV monospecifičnih ANCA za SLE u grupi ANCA pozitivnih pacijenata sa lupusom (n=57)

	ANCA pozitivan SLE n=40	ANCA pozitivan LILLS n=17
Polispecifična ANCA pozitivna	31	9
Polispecifična ANCA negativna	9	14

Se $31/40 \times 100 = 77,5\%$
 Sp $14/17 \times 100 = 82,3\%$
 NPV $14/23 \times 100 = 60\%$
 PPV $31/34 \times 100 = 91,1\%$

Tabela 41. Se, Sp, NPV i PPV anti-MPO za LILLS u grupi ANCA pozitivnih lupusa (n=57)

	ANCA pozitivan LILLS n=17	ANCA pozitivan SLE n=40
Anti-MPO pozitivna	17	19
Anti-MPO negativna	0	21

Se 100%,
 Sp $21/40 = 52,5\%$
 NPV 100%
 PPV $19/36 = 52,7\%$

Tabela 42. Se, Sp, NPV i PPV anti-Lf za SLE u grupi ANCA pozitivnih lupusa (n=57)

	ANCA pozitivan SLE n=40	ANCA pozitivan LILLS n=17
Anti-Lf pozitivna	21	5
Anti-Lf negativna	19	12

Se $21/40 \times 100 = 52\%$
 Sp $12/17 \times 100 = 70\%$,
 PPV $21/26 \times 100 = 80\%$
 NPV $12/31 \times 100 = 39\%$

Tabela 43. Se, Sp, NPV i PPV anti-El za LILLS u grupi ANCA pozitivnih lupusa (n=57)

	ANCA pozitivan LILLS n=17	ANCA pozitivan SLE n=40
Anti-El pozitivna	14	6
Anti-El negativna	3	34

Se $14/17 \times 100 = 82\%$

Sp $34/40 \times 100 = 85\%$

NPP $34/37 \times 100 = 91,8\%$

PPV $14/20 \times 100 = 70\%$

Tabela 44. Se, Sp, NPV i PPV anti-El za autoimunski hepatitis (AIH) u grupi ANCA pozitivnih SLE (n=40)

	ANCA pozitivan SLE sa AIH n=6	ANCA pozitivan SLE bez AIH n=34
Anti-El pozitivna	3	0
Anti-El negativna	3	34

Se $3/6 \times 100 = 50\%$

Sp 100%

PPV 100%

NPV $34/37 \times 100 = 92\%$

Tabela 45. Se, Sp, NPV i PPV anti-Lf sa zahvatanjem bubrega u grupi ANCA pozitivnih SLE (n=40)

	ANCA pozitivan SLE sa zahvaćenim bubrezima n=21	ANCA pozitivan SLE bez zahvaćenih bubrega n=19
Anti-Lf pozitivna	13	8
Anti-Lf negativna	8	11

Se $13/21 \times 100 = 62\%$,

Sp $11/19 \times 100 = 58\%$

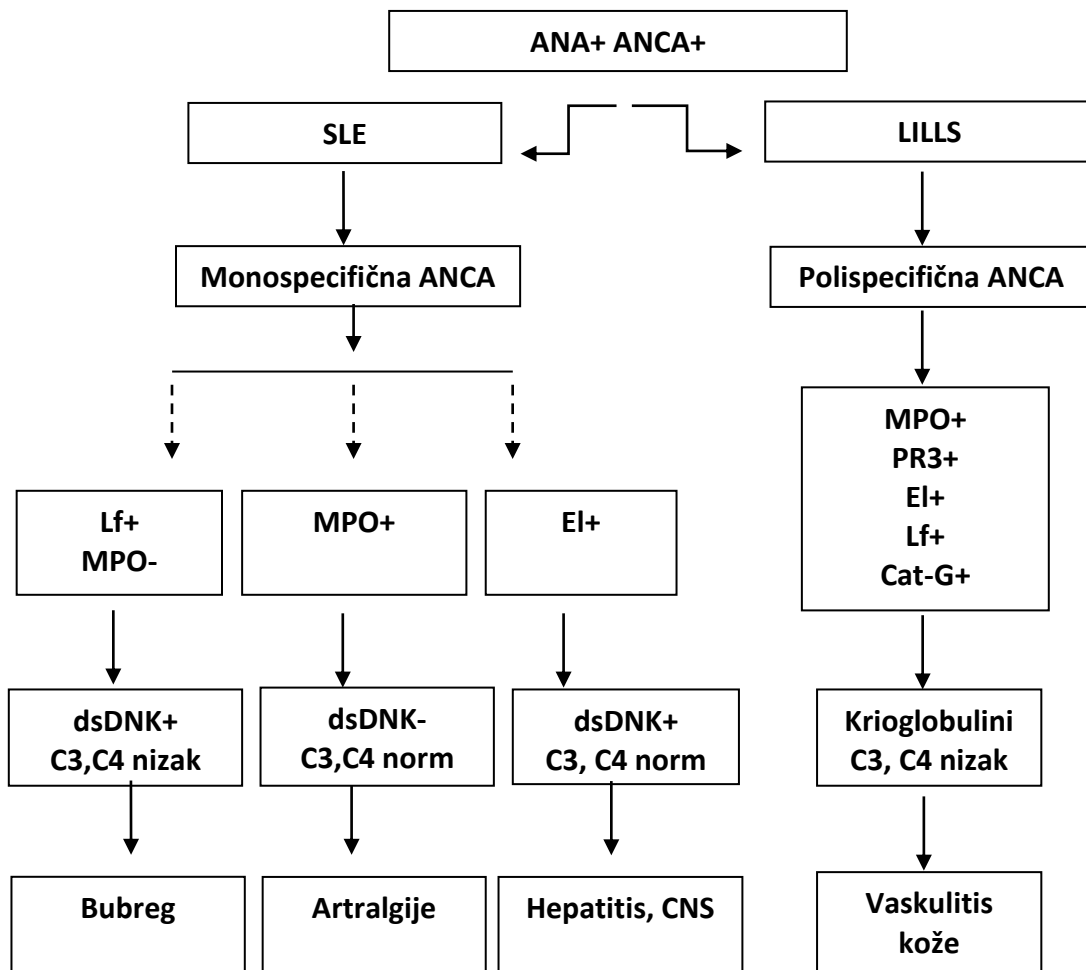
PPV $13/21 \times 100 = 62\%$

NPV $11/19 \times 100 = 58\%$

Tabela 46. Se, Sp, NPV i PPV ANCA za tip IV i nekrotizujući GN u grupi 41 SLE pacijenta sa urađenim HP pregledom bubrega (n=41)

	Tip IV i nekrotizujući GN n=30	Tip IV i nekrotizujući GN n=11
ANCA pozitivna	11	2
ANCA negativna	19	9

Se $11/30 \times 100 = 37\%$
 Sp $9/11 \times 100 = 82\%$
 PPV $11/13 \times 100 = 85\%$
 NPV $9/28 \times 100 = 32\%$

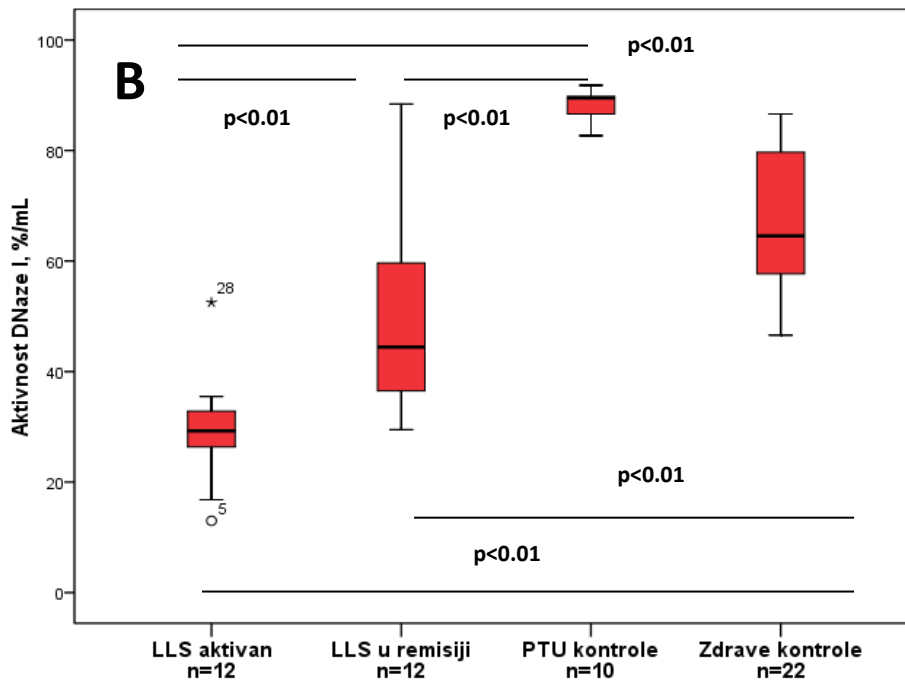
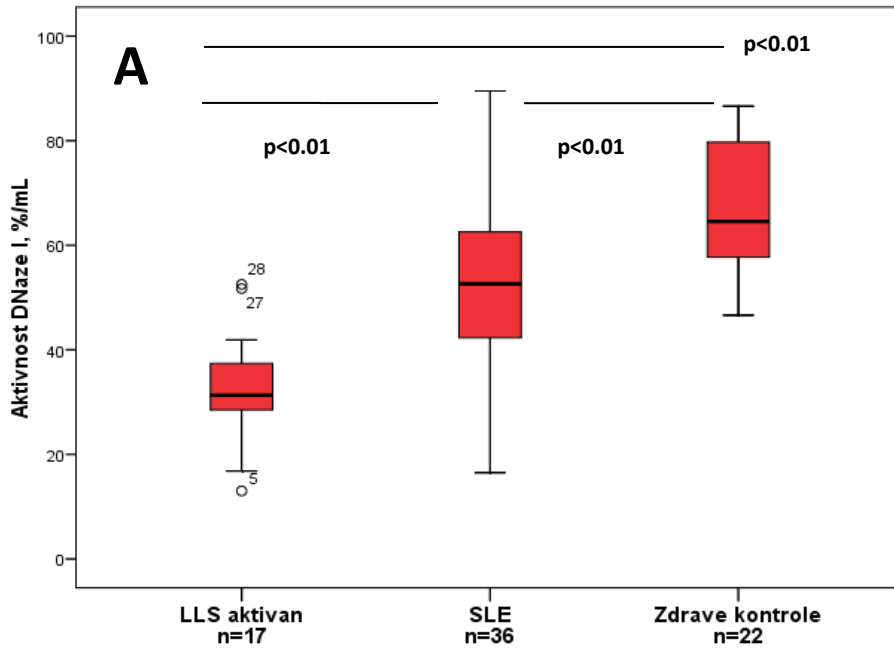


Grafikon 27. Dijagnostički algoritam ANCA pozitivnog SLE i LILLS

4.4. AKTIVNOST DNaze I KOD PACIJENATA SA SLE I PTU-INDUKOVANIM LLS

Aktivnost DNaze I u serumu određena je kod 36 pacijenata sa SLE i 17 pacijenata sa PTU-indukovanim LLS. Aktivnost serumske DNaze I kod PTU-indukovanog LLS bila je značajno niža u poređenju sa SLE pacijentima i zdravim kontrolama (grafikon 28A). Aktivnost DNaze I u serumu SLE pacijenata bila je značajno niža u poređenju sa zdravim kontrolama (grafikon 28A). Uočena je značajna razlika između učestalosti niske aktivnosti DNaze I u serumu LILLS pacijenata (100%), SLE pacijenata (58%) i zdravih kontrola (18%) ($p < 0.01$). Kod PTU-indukovanog LLS nije bilo korelacije između aktivnosti serumske DNaze I i titra ANA, odnosno nivoa anti-MPO, anti-PR3, anti-histonskih i anti-nukleozomalnih antitela.

Pacijenti sa aktivnim LLS imali su značajno nižu aktivnost DNaze I nego LLS pacijenti u remisiji ($p < 0.01$), zdrave kontrole ($p < 0.01$) i pacijenti lečeni PTU koji nisu razvili LLS ($p < 0.01$) (grafikon 27B). S druge strane, kod pacijenata sa srednje teškomi teškom formom SLE (SLEDAI-2K \geq 7), aktivnost serumske DNaze I ($59.7 \pm 14.3\%/mL$) bila je viša u odnosu na pacijente sa blažom formom (SLEDAI-2K \leq 6) SLE ($46.5 \pm 12.6\%/mL$) ($p < 0.05$). Važno je naglasiti da aktivnosti serumske DNaze I nije dostigla nivo aktivnosti kod zdravih osoba. LILLS pacijenti u fazi remisije su imali nižu aktivnost DNaze I nego zdrave kontrole i pacijenti lečeni PTU koji nisu imali LILLS ($p < 0.01$) (grafikon 28B).



Grafikoni 28 (A i B) . Aktivnost DNaze I kod SLE, PTU-indukovanog LLS i zdravih kontrola.

5. DISKUSIJA

Epidemiološki i klinički podaci pokazuju da faktori sredine, uključujući razne infekcije (bakterijski endokarditis, hepatitis C virus), silicijum, azbest i lekovi (posebno anti-tiroidni) mogu imati ulogu u razvoju ANCA-udruženih bolesti (engl. ANCA-associated diseases (AAD)). Takođe, mnogi faktori - genetski, hormonski, imunski poremećaji (imunski kompleksi, autoantitela, autoreaktivni limfociti, dendritične ćelije), kao i faktori sredine, dovode do nastanka lezija kod idiopatskog SLE. Prevalencija ANCA i njihovih ciljnih antigena, kao i moguća uloga ANCA u patogenezi SLE nije još uvek precizno određena. Na osnovu rezultata brojnih studija vidi se da nema saglasnosti u vezi sa udruženošću ANCA i aktivnosti bolesti, odnosno određenih kliničkih manifestacija i imunoseroloških karakteristika.

Među specifične antigene na koje se stvaraju ANCA, a koja su detektovana ELISA tehnikom, spadaju MPO, humana leukocitna El, Lf, PR3, Cat-G i BPI, i to najčešće na LF, a najređe na PR3 (228).

Prevalencija ANCA, detektovanih IIF testom, kod pacijenata sa SLE se kreće od 16.4 do 37.3%. Najmanji broj (16.4%) ANCA pozitivnih pacijenata imali su Galeazzi i saradnici. Prevalencija anti-MPO bila je 9.3%, anti-Lf 14.3%, anti-PR3 1.7%, a dokazana je i pozitivna korelacija sa određenim kliničkim manifestacijama (serozitis, artritis, venske tromboze) (228).

Pauzner i saradnici su detektovali ANCA u serumu 36% SLE pacijenata, ali nisu našli korelaciju između prisustva ANCA i SLEDAI skora, kao ni između ANCA i određenih kliničkih manifestacija (prisustvo vaskulitisa, zahvećenost bubrega i CNS-a) (229).

U studiji Schnabela i saradnika, 25% pacijenata sa SLE je imalo ANCA. Prevalencija anti-Lf je bila 10%, a anti-El 5%, nije bilo seruma sa anti-MPO i anti-PR3 antitelima. Nije bilo udruženosti sa određenim organskim manifestacijama (230).

Nishiya i sar. su ANCA našli u serumu 42% SLE pacijenata, anti-MPO je imalo 16% pacijenata, anti-Lf 32%, anti-Cat-G samo 3% pacijenata, dok je polispecifična ANCA (anti-MPO i anti-LF) imalo 10% pacijenata (231).

Zhao i sar. su upotrebom IF tehnike detektovali ANCA kod samo 22% pacijenata, ali je zato ELISA tehnikom anti-Cat-G antitela imalo čak 62.1%, a anti-Lf 8.4% SLE pacijenata. Antitela prema Cat-G su korelirala sa aktivnošću lupus nefritisa kod ovih pacijenata (232).

Manolova i sar. su ustanovili prevalenciju ANCA kod 29.1% SLE pacijenata. Anti-MPO antitela je imalo 10.9%, anti-Lf 18.2%, anti-PR3 12.7%, anti-BPI 23.6%, a anti-El 1.8% pacijenata. Nivo anti-PR3, anti-Lf i anti-BPI je korelirao sa indeksom aktivnosti bolesti korišćenjem SLEDAI indeksa aktivnosti (233).

U studiji koju su sprovedeli Molnar i sar, ANCA pozitivnih pacijenata bilo je 29.2%, i to sa anti-MPO antitelima 24.4%, a sa anti-PR3 antitelima 7.3% pacijenata. Autori nisu ustanovili statističku značajnost u razlici između nivoa ANCA između SLE i zdravih kontrola, kao ni vezu između ANCA i prisustva različitih kliničkih manifestacija i drugih imunoseroloških parametara (234). Takođe, utvrđeno je, kao i u ranijoj studiji Spronka i sar. (235), da ANCA pozitivni SLE pacijenti uglavnom ispoljavaju niske titrove ovih antitela (234).

Fauzi i saradnici su 2004. godine detektovali ANCA kod 24.8% SLE pacijenata, anti-MPO kod 1,5%, anti-PR3 kod 1.5% pacijenata, a najveći broj pacijenata (20.6%) je imao atipična ANCA (IIF). U ovoj studiji nije nađena udruženost ANCA i aktivnosti bolesti, kao ni ANCA i specifične zahvaćenosti organa (236).

U sprovedenim studijama, u poređenju sa ANCA negativnim pacijentima, ANCA pozitivni imaju veću incidenciju serozitisa (75.5%), akutne renalne insuficijencije (64.2%), miokarditisa (30.2%), neuroloških i psihijatrijskih manifestacija (26.4%), plućne hemoragije (7.5%), promena tipa livedo reticularis, venskih tromboza i artritisa. Značajna razlika između ove dve grupe pacijenata nađena je i u broju dijagnostičkih kriterijuma, indeksu aktivnosti bolesti, postojanju anemije, prisustvu anti-Sm antitela i nivou C3 komponente komplementa (C3) (228, 237).

U studiji Pradhana i sar. ANCA su nađena u serumu 37.3% pacijenata sa SLE. ANCA pozitivnost je bila veća kod pacijenata sa lupus nefritisom (48.8%) u

poređenju sa 11.1% SLE pacijenata bez nefritisa ($p < 0.05$). Predominantno su bila pozitivna anti-MPO antitela (54.5%), potom anti-Lf (16.9%) i anti-Cat-G (13.6%). Ovom studijom je utvrđeno da porast titra ANCA prati porast SLEDAI skora (238).

Pan i sar. su pokazali da je nivo ANCA značajno viši u serumu pacijenata sa SLE (33.3%) nego kod zdravih kontrola (3.3%), kao i da je nivo ANCA povezan sa aktivnošću SLE. Pored toga, pacijenti sa lupus nefritisom su značajno češće imali pozitivna ANCA u odnosu na pacijente bez nefritisa ($p < 0.01$). Incidencija zahvaćenosti CNS-a, bubrega i serozitisa u grupi ANCA pozitivnih pacijenata bila je značajno viša u odnosu na ANCA negativne SLE pacijente (239). Yu i sar. su utvrdili da je većina ANCA pozitivnih pacijenata (67.9%) imala tip IV lupus nefritisa sa višom stopom mortaliteta u odnosu na ANCA negativne pacijente i sa češćom detekcijom anti-dsDNK antitela (237).

Takođe, pozitivna anti-dsDNK i anti-Sm antitela, kao i snižene vrednosti C3 i C4, značajno češće su detektovani kod ANCA pozitivnih nego kod ANCA negativnih SLE pacijenata (239), što se objašnjava činjenicom da istovremeno sa produkcijom anti-hromatinskih antitela dolazi do stvaranja ANCA nakon oslobađanja NETs.

U našoj studiji koja je obuhvatila 142 pacijenta sa idiopatskim SLE, ANCA pozitivnih je bilo 40 (28.2%), a ANCA negativnih 102 (71.8%) (tabela 7). Pacijenti sa ANCA pozitivnim SLE su visoko statistički značajno češće imali neurološke i psihijatrijske manifestacije i autoimunski hepatitis, a značajno ređe zahvaćenost kože (tabela 9). Zglobovi i serozne opne su bili podjednako zahvaćeni, a hematološki poremećaji podjednako prisutni kod pacijenata sa ANCA pozitivnim i ANCA negativnim SLE (tabela 9). Takođe, nije bilo statistički značajne razlike u broju pacijenata sa zahvaćenim bubrezima između ANCA pozitivnih i ANCA negativnih SLE pacijenata (tabela 9), mada su pacijenti sa težom formom GN češće imali pozitivna ANCA, monospecifična ANCA i anti-Lf, dok su oni sa lakšim formama češće imali pozitivna anti-MPO (tabela 29). Nije bilo ni statistički značajne razlike u zahvaćenosti bubrega između novonastalih i prethodno lečenih SLE pacijenata u grupi svih 142 pacijenta sa idiopatskim SLE (tabela 12), kao ni između novonastalih i prethodno lečenih ANCA pozitivnih SLE pacijenata (tabela 15).

U objavljenim studijama frekvencija anti-MPO antitela kod pacijenata sa SLE kretala se od 0 (230) do 54.5% (238), dok su anti-Lf antitela zabeležena kod 10% (230) do 32% pacijenata (231). I u našoj studiji, najčešće detektovana antitela bila su anti-MPO i anti-Lf (grafikon 1). Prevalencija anti-MPO u grupi 142 pacijenta sa idiopatskim SLE bila je 13.4%, anti-Lf 14.8% i anti-El 4.2%. Za razliku od studije Manolove i sar. u kojoj su najzastupljenija ANCA bila anti-PR3 (12.7%) i anti-BPI (23.6%) (233), u ostalim, kao i u našoj studiji, samo mali broj pacijenata je imao ova antitela (2.1%, odnosno 0.7%). Takođe, za razliku od studije Zhao i sar. u kojoj je prevalencija anti-Cat-G bila 62.1% (232), studije Pradhana i sar. (13.6%) (238), studije Spronka i sar. (12%) (235) i studije Tamiya i sar. u kojoj je nivo anti-Cat-G bio značajno viši kod aktivnog i neaktivnog SLE u odnosu na zdrave kontrole, a značajno viši kod aktivnog u odnosu na neaktivni SLE (240), u našoj studiji nije bilo pacijenata sa pozitivnim anti-Cat-G antitelima. Uz to, iako su nivoi svih ostalih imunoreaktanata u sklopu ANCA profila (mereno ELISA tehnikom) kod ANCA pozitivnih SLE pokazali visoko statistički značajnu razliku u odnosu na ANCA negativne SLE, jedino nivo anti-Cat-G nije pokazao statistički značajnu razliku između ove dve grupe SLE pacijenata (tabela 11).

Za razliku od naše studije u kojoj je detekcija ANCA rađena ELISA tehnikom, u starijim studijama je rađena IIF metodom, bez ili sa određivanjem pojedinih antitela ELISA tehnikom. Često su postojale velike razlike u prevalenciji ANCA u zavisnosti od tehnike i to u vidu značajno nižih vrednosti kada se koristila IIF tehnika (232). Smatra se da ove razlike u rezultatima nastaju usled visokog titra ANA kod SLE pacijenata (detekcija na neutrofilima fiksiranim etanolom). Ukoliko istovremeno postoje ANA i ANCA teško ih je diferencirati, posebno ako su ANA u visokom titru. U tim slučajevima može se kao alternativni metod koristiti fiksacija granulocita paraformaldehidom, kako bi se potvrdila citoplazmatska priroda antigena koje prepoznaju ANCA (232, 233).

Najveći broj SLE pacijenata u našoj studiji imao je anti-Lf antitela (14.8% od ukupnog broja SLE pacijenata, odnosno čak 52.5% ANCA pozitivnih) (grafikon 1 i 3). Prevalencija anti-Lf antitela u objavljenim studijama bila je od 8.4% do 62% (228, 231, 233, 241, 242, 243). Prema rezultatima brojnih studija vidi se da nema

saglasnosti u vezi sa udruženošću anti-Lf i aktivnosti bolesti, odnosno određenih kliničkih manifestacija.

U studiji Schnabela i sar. 25% pacijenata je imalo ANCA, od toga 40% anti-Lf antitela, a 20% anti-El. Nije bilo korelacije ANCA sa organskom zahvaćenošću, kao ni sa stepenom aktivnosti bolesti (230). Caccavo i sar. su detektovali IgG anti-Lf antitela kod čak 55%, a Chikazawa i sar. u serumu 59% SLE pacijenata (244, 245). Njihovi rezultati su potvrdili saznanja da su anti-Lf često prisutna kod pacijenata sa SLE.

Caccavo i sar. su u studiji sprovedenoj na 97 SLE pacijenata ustanovili prisustvo IgG anti-Lf kod 55% pacijenata, a u srednjoj i visokoj koncentraciji kod 62% pacijenata. IgG anti-Lf antitela u srednjoj i visokoj koncentraciji bila su u korelaciji sa aktivnošću bolesti, anti-dsDNK antitelima i anti-kardiolipinskim antitelima. Takođe, ova antitela su bila povezana sa određenim kliničkim manifestacijama kao što su zahvaćenost kože i serozitis, a u srednjoj/visokoj koncentraciji sa Raynaud fenomenom, zahvatanjem bubrega, serozitisom i istorijom o pojavi tromboze (244). Chikazawa i sar, međutim, nisu našli povezanost anti-Lf i anti-MPO sa određenim kliničkim manifestacijama, ali su za anti-Lf, ne i za anti-MPO, našli statističku povezanost sa indeksom aktivnosti bolesti (245).

Kod 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata postojala je pozitivna povezanost između anti-Lf indeksa i titra anti-dsDNK, odnosno koncentracije anti-histonskih i anti-C1q antiteta, a negativna povezanost sa koncentracijom C3 i C4. Takođe, utvrđena je pozitivna povezanost sa indeksom aktivnosti bolesti, a negativna sa indeksom anti-MPO (tabela 34, grafikoni 19-21).

Kod anti-Lf pozitivnih pacijenata češće je postojala zahvaćenost bubrega i poliserozitis, dok su anti-Lf negativni pacijenti češće imali kutane promene, a statistički značajno češće atralgije i sinovitis (tabela 24). Takođe, anti-Lf pozitivni pacijenti su značajno češće imali anti-dsDNK antitela i pad C3 i C4 komponenti komplementa (tabela 25). Anti-Lf negativni pacijenti su visoko statistički značajno češće imali pozitivna anti-MPO i veću koncentraciju anti-MPO, kao i češće pozitivna anti-El i značajno viši indeks anti-El antitela (grafikon 11).

Za razliku od anti-MPO pozitivnih SLE pacijenata, u grupi 21 anti-Lf pozitivnog SLE pacijenta, više pacijenata (61.9%) je imalo GN u odnosu na Lf negativne SLE pacijente (42.1%), iako ni u ovoj grupi nije dostignuta statistička značajnost u razlici (tabela 24). Kao u studiji Pana i Yua, pacijenti sa težom formom GN su statistički značajno češće imali pozitivna anti-dsDNK. Titar anti-dsDNK je bio viši kod teže forme GN u odnosu na lakšu, a češće su ovi pacijenti imali i pad C3 i C4 (tabela 28).

U našoj grupi ANCA pozitivnih SLE samo je jedan pacijent (2.5%) imao trombozu, dok je kod Caccava i sar. 47% pacijenata imalo trombozu. Antikardiolipinska antitela predstavljaju jedan od glavnih faktora rizika za razvoj tromboze kod SLE pacijenata. Caccavo i sar. su ustanovili da istorija o postojanju tromboze reflektuje korelaciju između anti-Lf i antikardiolipinskih antitela (244).

U grupi 142 SLE pacijentaje ustanovljena visoko statitički značajna povezanost između anti-Lf indeksa i titra anti-dsDNK, odnosno koncentracije antikardiolipinskih IgG antitela (tabela 32). U grupi 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata postojala je statistički značajna pozitivna povezanost između indeksa anti-Lf i titra anti-dsDNK, odnosno SLEDAI-2K skora, odnosno koncentracije anti-histonskih antitela i anti-C1q antitela, a negativna značajna povezanost između indeksa anti-Lf i koncentracije C3 i C4 (tabela 34). U grupi 21 anti-Lf pozitivnog SLE pacijenta nađena je statistički značajna jaka pozitivna povezanost između indeksa anti-Lf i titra anti-dsDNK, kao i anti-Lf antitela i indeksa aktivnosti bolesti (tabela 33, grafikon 18).

Istovremeno, u svakoj od pomenutih grupa SLE pacijenata je postojala negativna povezanost anti-Lf indeksa i anti-MPO indeksa. Anti-Lf negativni pacijenti su visoko statistički značajno češće imali pozitivna anti-MPO i veću koncentraciju anti-MPO, kao i češće pozitivna anti-El i značajno viši indeks anti-El antitela (grafikon 11).

Statistička značajnost je nađena i u praćenju ANCA pozitivnosti kod pacijenata sa anti-Lf antitelima. Osmam pacijenata sa anti-Lf anitelima je postalo negativno, a u praćenju nije više bilo pacijenata sa jakom pozitivnošću (grafikon 12). Kada su u pitanju druga ANCA, iako se posle perioda praćenja povećao broj ANCA negativnih

pacijenata i broj pacijenata sa slabom reaktivnošću, nije bilo statističke značajnosti između dve grupe pacijenata (inicijalno i posle perioda praćenja).

Za razliku od anti-MPO i anti-El, veći broj pacijenata sa LILLS je bio anti-Lf negativan (grafikon 23), ali su za razliku od svih drugih ANCA, anti-Lf češće bila prisutna kod pacijenata sa idiopatskim SLE u odnosu na LILLS (tabela 37). Niko od LILLS pacijenata nije imao anti-Lf u visokoj koncentraciji, a samo 1 pacijent (5.9%) je imao u srednjoj, dok je kod SLE 5% imalo visoku i 12.5% srednju koncentraciju anti-Lf (grafikon 24). Ovo se slaže sa rezultatima Caccava i sar. koji su detektovali anti-Lf u srednjim i visokim koncentracijama, i to značajno udružena sa anti-dsDNK i antikardiolipinskim antitelima, čija je patogena uloga široko prihvaćena. (244).

Laktoferin je multifunkcionalan protein koji vezuje gvožđe, prisutan u mleku, pankreasnom soku, suzama i drugim mukoznim sekretima, kao i u sekundarnim granulama PMN. Lf pokazuje antimikrobnu aktivnost, kao i imunomodulatornu i antiinflamatornu funkciju, tako da prisustvo anti-Lf antitela može ometati imunoregulatornu aktivnost Lf, dovodeći do imunski posredovanih poremećaja. Prisustvo anti-Lf antitela opisano je kod više imunski posredovanih oboljenja, uključujući i SLE (244, 246).

S obzirom na udruženost anti-Lf i određenih kliničkih manifestacija, postavlja se pitanje da li ova antitela igraju ulogu u patogenezi SLE. Laktoferin ima fiziološku ulogu u vezivanju jona gvožđa (antioksidans) smanjujući produkciju proinflamatornih OH jona. Znači, anti-Lf antitela kod pacijenata sa SLE mogu inhibirati ove važne protektivne funkcije Lf i dovesti do porasta produkcije OH jona i, konsekutivno, do inflamacije. Lf blokira oslobađanje proinflamatornih citokina kao što su IL-6 i TNF-alfa. Takođe, Lf inhibiše produkciju IL-8 i modifikuje kaskadu komplementa tako što sprečava deponovanje C3 u imunske komplekse. Anti-Lf antitela kod pacijenata sa SLE mogu da inhibiraju ove efekte, dovodeći do porasta koncentracije proinflamatornih citokina IL-6, TNF-alfa i IL-8 i porasta deponovanja imunskih kompleksa sa C3. Ovo je od velike važnosti za patogenezu SLE, s obzirom na presudnu patogenetsku ulogu imunskih kompleksa. S druge strane, pošto je Lf katjonski glikoprotein, vrlo verovatno i Lf-anti-Lf imunski kompleks može sam po sebi biti patogen.

Takođe, anti-Lf mogu, kao i druga ANCA, indukovati oksidativni stres i degradaciju PMN, sa oslobađanjem reaktivnih kiseoničnih međuprodukata i konsektivnim oštećenjem tkiva. Stvaranje hidroksilnih radikala na mestu inflamacije zahteva gvožđe. Vezujući gvožđe Lf sprečava oštećenje tkiva tako što blokira štetne efekte kiseoničnih slobodnih radikala. Eksperimentalno je dokazano da anti-Lf antitela povećavaju intenzitet i trajanje efekta hidroksilnih radikala. (244). Prepoznavanje heterogenih epitopa nije se pokazalo kao odgovorno za širok spektar kliničkih manifestacija udruženih sa anti-Lf autoreaktivnošću (17).

Anti-MPO pozitivni SLE pacijenti češće su imali sinovitis i citopeniju, a statistički značajno češće artralgijske, dok su ređe imali kutane promene i bubrežnu zahvaćenost u odnosu na anti-MPO negativne pacijente (tabela 18). Anti-MPO negativni pacijenti su statistički značajno češće imali anti-dsDNA, nizak C3 i C4, anti-ENA i anti-C1q antitela (tabela 19). Anti-MPO negativni SLE pacijenti su visoko statistički značajno češće imali anti-Lf, dok su anti-MPO pozitivni pacijenti češće imali anti-El antitela (tabela 20).

U našoj grupi 19 anti-MPO pozitivnih SLE pacijenata, lupus nefritis je imalo 36.8% pacijenata, a u grupi anti-MPO negativnih 66.7% pacijenata, mada statistička značajnost u razlici nije dostignuta (tabela 18).

Iz naših rezultata se može zaključiti da anti-MPO imaju zaštitnu ulogu u smislu razvoja teže forme bolesti, a da anti-MPO i anti-El autoantitela imaju zaštitnu ulogu u smislu razvoja GN za razliku od anti-Lf kod ANCA pozitivnih SLE pacijenata. Aktivirani neutrofili oslobađaju NETs, tako da dolazi do vezivanja anti-MPO, anti-El, anti-Lf, anti-LL-37 i anti-hromatinska antitela za oslobođene citoplazmatske i nuklearne antigene neutrofila. Snižena aktivnost DNaze I (biće prikazano u daljem tekstu), uz generalno smanjenu razgradnju, dovodi do akumulacije NETs sa brojnim proinflamatornim i citotoksičnim komponentama. Oponizacija NETs i autoantitela koja formiraju imunske komplekse dovode do zapaljenja i oštećenja različitih tkiva i organa, dovodeći do stimulacije DC i sekrecije IFN-alfa i IL-6, ostavljajući „IFN-alfa potpis“ tipičan za SLE (38). Međutim, naši rezultati o povezanosti određenih ANCA sa zahvatanjem određenih organa i tkiva, i obrnuta korelacija između anti-MPO i anti-El sa jedne i anti-Lf sa druge strane, govori u prilog činjenici da NETs, osim

proinflamatornih, mogu ispoljavati i antiinflamatorne efekte. Schauer i sar. i Maueröder i sar. su pokazali da agregacija NETs, pomoću serin proteaza dovodi do degradacije citokina i hemokina, i na taj način utiče na rezoluciju neutrofilne inflamacije, odnosno na smanjenje intenziteta inflamacije kod akutnog gihta (247, 248). Pored toga, MPO ima jako kompleksne epitope za koje se vezuju autoantitela. Moguće da vezivanje antitela za različite epitope indukuje različite kliničke slike. Anti-MPO antitela pripadaju repertoaru prirodnih, često nepatogenih antitela. S druge strane, definisani su patogeni epitopi na MPO, kao i patogene IgG supklase anti-MPO antitela, posebno u grupi pacijenata sa PTU-indukovanim ANCA vaskulitisom (180). Razvoj dijagnostičkih procedura (ELISA; imunobloting) u pravcu detekcije IgG supklase antitela na određene epitope pomoći će u boljem tumačenju prisustva anti-MPO antitela. Li i saradnici su dokazali prisustvo autoantitela protiv linearnih peptida MPO kod pacijenata sa anti-GBM (*engl.* anti-glomerular basement membrane disease) i povezanost nekoliko peptida sa težinom bolesti (249). Takođe, ustanovljeno je da je prognoza bubrežne bolesti bolja kada pacijenti imaju samo anti-MPO nego i anti-GBM antitela (250). I kod naših pacijenata sa idiopatskim SLE, prisustvo anti-MPO nije značilo postojanje bubrežne bolesti, kao ni postojanje teže forme GN ukoliko bubrežna zahvaćenost postoji. GN je češći kod anti-MPO negativnih SLE pacijenata (tabela 18), a češće anti-MPO antitela imaju oni sa lakšom formom GN nego oni sa težom (tabela 29).

MPO je hem protein azurofilnih granula neutrofila koji koristi H₂O₂ za generisanje HOCl koja je moćan antimikrobni agens fagocita (13). Neprekidno visok nivo HOCl ima udela u etiologiji nekih patoloških stanja. HOCl oksidativno razgrađuje hem komplikovanim mehanizmom iz više etapa, a koji je započet oksidacijom gvožđa i prelaskom u feri oblik. Toksičnost slobodnih prelaznih jona metala se pripisuje njihovom kapacitetu da generišu visoko reaktivne sekundarne slobodne radikale kao što su hidroksilni radikali. Stvorena HOCl vrši povratnu regulaciju katalitičke aktivnosti MPO preko mehanizama destrukcije MPO hema i posledičnog oslobađanja slobodnog gvožđa (13). Moguće da kod idiopatskog SLE HOCl inhibiše MPO pomoću mehanizma koji uključuje destrukciju MPO hema. Gubitak katalitičke aktivnosti MPO korelira sa destrukcijom MPO hema i porastom

koncentracije slobodnog gvožđa. Dakle, faktori koji su udruženi sa povišenim nivoima MPO-HOCl sistema i/ili smanjenim biološkim „čistačima“ HOCl kao što su taurin, metionin, glutation i likopen, predstavljaju novi način stvaranja slobodnog dvovalentnog gvožđa u raznim inflamatornim bolestima (13). Inhibicija razgradnje MPO i/ili eliminacija njenih finalnih produkata može imati korisnu ulogu u smanjenju oslobađanja slobodnog gvožđa u brojnim inflamatornim stanjima. Ovim se može objasniti činjenica da su naši anti-MPO pozitivni SLE pacijenti imali lakšu formu SLE sa statistički značajno češćim samo atralgijama u odnosu na anti-MPO negativne pacijente (tabela 18).

Može se pretpostaviti da epitopski specifična anti-MPO antitela kod pacijenata sa SLE sa jedne strane inhibiraju funkciju MPO, što dovodi do pada koncentracije proinflatornih HOCl radikala, a sa druge strane inhibiraju samu razgradnju MPO, koncentraciju fero jona i konsektivno OH jona, što takođe smanjuje oštećenje tkiva. Ukoliko su imali zahvatanje bubrega, to je bila lakša forma GN (tabela 29), za razliku od MPO pozitivnih idiopatskih vaskulitisa koji imaju teške forme glomerulonefritisa (RPGN) i PTU-indukovanog LLS (obrađeno u poglavlju 4.3), koji nisu imali zahvatanje bubrega, ali su imali teže forme bolesti, pre svega zbog opsežnih vaskulitičnih promena na koži, sa nekrozom i ulceracijama (tabela 35).

Kod idiopatskih anti-MPO pozitivnih vaskulitisa, kao i kod PTU-indukovanog LLS, neadekvatno kontrolisana NEToza u prisustvu izotip i epitop specifičnih anti-MPO antitela ne inhibira MPO, već dovodi do pojačane produkcije slobodnih radikala i inflamacije. Suprotno, specifičan profil anti-MPO antitela kod pacijenata sa idiopatskim SLE dovodi do gubitak katalitičke aktivnosti MPO, što korelira sa lakšom kliničkom slikom. Kod naših 40 ANCA pozitivnih pacijenata ustanovljena je negativna korelacija između indeksa anti-MPO i SLEDAI-2K skora, što potvrđuje prethodni nalaz da pacijenti sa anti-MPO antitelima imaju manju aktivnost bolesti (tabela 34, grafikon 22).

Kod pacijenata sa idiopatskim SLE, zahvatanje bubrega i ostale kliničke manifestacije mogu se objasniti postojanjem brojnih drugih, pre svega hromatinskih antitela (anti-dsDNA, anti-histonska, anti-nukleozomalna), ali i anti-ENA i anti-C1q antitela (tabele 6 i 36). Takođe, treba pomenuti i da je visoku i srednju koncentraciju

anti-MPO imalo 41.2% LILLS pacijenata, za razliku od samo 7.5% SLE pacijenata sa visokom i 20% pacijenata sa srednjom koncentracijom (grafikon 24). Svi LILLS pacijenti su imali anti-MPO, za razliku od 52.5% SLE pacijenata koji nisu imali detektovana anti-MPO antitela (grafikon 23).

U našoj studiji, anti-El pozitivni SLE pacijenti su češće imali neurološke manifestacije i citopeniju, dok su statistički značajno češće imali autoimunski hepatitis i pad C3 komponente komplementa (tabele 21 i 22). Anti-El pozitivni pacijenti su češće imali anti-MPO, dok su negativni češće imali anti-Lf antitela (tabela 23). Kao i u grupi anti-MPO negativnih pacijenata, kod kojih je lupus nefritis bio češće prisutan u odnosu na anti-MPO pozitivne (tabela 18), u grupi anti-El negativnih SLE pacijenata 58.8% je imalo GN, u odnosu na 16.7% anti-El pozitivnih SLE pacijenata sa GN, mada ni ovde nije dostignuta statistička značajnost (tabela 21).

Uloga antitela prema elastazi u autoimunskim bolestima je i dalje nedovoljno jasna. ELISA tehnikom anti-El autoantitela su nađena kod pacijenata sa ANCA-pozitivnim vaskulitisima (WG, MPA). Ovi pacijenti sa pozitivnim anti-El antitelima su značajno češće imali tešku bubrežnu zahvaćenost. Međutim, za razliku od ranijih studija, Apenberg i sar. su ređe detektovali ova antitela kod pacijenata sa SLE (9/64 pacijenta) (251).

Figueredo i sar. su 2008. godine ispitivali ekspresiju IL-18 i IL-1beta, kao i nivo aktivnosti El u fluidu gingivalnih pukotina (engl. gingival crevicular fluid, GCF) iz inflamiranih gingiva pacijenata sa juvenilnim SLE (JSLE) i poredili ih sa ekspresijom GCF iz inflamiranih gingiva generalno zdravih osoba. Lokalna inflamacija u periodontalnom tkivu bila je povezana sa sistemskom inflamacijom, što je procenjeno na osnovu nivoa IL-18 u plazmi. Ukupan nivo IL-18 i IL-1beta u GCF je bio značajno niži kod pacijenata sa JSLE, dok je aktivnost slobodne El bila značajno viša kod pacijenata sa JSLE u odnosu na zdrave kontrole. Međutim, nivo IL-18 u plazmi je bio značajno viši kod pacijenata sa JSLE. Autori su ustanovili veću aktivnost El u GCF u inflamiranim gingivama pacijenata sa JSLE čak i kod nižih nivoa IL-18 i IL-13. Povećanje aktivnosti El ukazuje na hiperreaktivnost neutrofila kod

JSLE, najverovatnije kao posledicu prajming efekta usled višeg nivoa IL-18 u plazmi pacijenata sa JSLE (252).

Od ostalih seroloških parametara, u našoj studiji, anti-ENA antitela su se statistički značajno češće javljala kod pacijenata sa ANCA negativnim nego kod pacijenata sa ANCA pozitivnim SLE. Takođe, kod ANCA pozitivnih pacijenata koncentracija anti-C1q antitela bila je visoko statistički značajno niža nego kod ANCA negativnih pacijenata (tabela 10). Ovaj nalaz bi mogao da bude značajan ako se zna da postoji kooperativna uloga C1q i DNaze I u ubrzavanju degradacije hromatina iz nekrotičnih ćelija (253). Kombinacija neuspele neimunske opsonizacije ostataka mrtvih ćelija i abnormalne opsonizacije sekundarnih nekrotičnih ćelija od strane autoantitela bitno utiču na razvoj autoimunske bolesti (253). Pacijenti sa SLE nisu u stanju da razgrađuju NETs. NETs mogu aktivacijom DČ preko TLR7/9 da pokrenu oslobađanje IFN-alfa, a preko C1q mogu da aktiviraju komplement, što takođe sprečava degradaciju NETs (55, 56, 59, 254). C1q omogućava uklanjanje NETs od strane makrofaga, tako da nedostatak C1q dovodi do smanjene degradacije NETs. Anti-C1q autoantitela dovode do smanjenja nivoa C1q, što dovodi do stanja C1q deficijencije sa poremećenim uklanjanjem mrtvih ćelija (255).

U studiji Galeazzija i sar. kod ANCA pozitivnih SLE pacijenata na HEp-2 ćelijama nađena su i anti-SSA antitela, uz prisustvo, kod pojedinih pacijenata, i drugih antitela na ENA (228). Istovremeno prisustvo ovih antitela može se objasniti na više načina. Jedna mogućnost je da su pANCA lažno pozitivna s obzirom da je SSA antigen citoplazmatski, pa se zapravo ANCA testom detektuje prisustvo anti-SSA antitela. Druga mogućnost je da su istovremeno prisutna i pANCA i anti-SSA at u sklopu poliklonske B aktivacije koja kod LE dovodi do produkcije niza autoantitela, odnosno da se najverovatnije radi o nezavisnoj produkciji dva tipa antitela (228). Međutim, u našoj studiji nije dobijen ovaj nalaz. Naši ANCA negativni pacijenti su značajno češće imali pozitivna anti-ENA u odnosu na ANCA pozitivne pacijente (tabela 10).

Kriogloblini su bili pozitivni kod 78.6% naših ANCA pozitivnih SLE pacijenata, što je statistički značajno više nego kod ANCA negativnih SLE pacijenata ($p < 0.05$) (tabela 10). Ovo se može objasniti činjenicom da su kriogloblini rezultat poliklonske

aktivacije i da ANCA preko dejstva citokina pokreću i nastanak krioglobulina. Opisano je sinergističko dejstvo multispecifičnih ANCA i krioglobulina u nastanku vaskulitisa (256).

U grupi naših 142 SLE pacijenta novonastalih je bilo 44 (31%). Oni su statistički značajno češće imali sinovitis ($p < 0.05$) i autoimunski hepatitis ($p < 0.01$). Od seroloških parametara samo su aCL IgG antitela statistički češće bila prisutna kod *de novo* pacijenata ($p < 0.05$) (tabele 12 i 13). Svi tipovi ANCA su češće bili pozitivni kod novonastalih, ali je statistička značajnost postojala samo u indeksu anti-El i anti-Lf antitela u korist *de novo* SLE pacijenata ($p < 0.01$) (tabela 14). Nije bilo statistički značajne razlike u zahvaćenosti pojedinih organa između novonastalih i prethodno lečenih 40 ANCA pozitivnih SLE pacijenata, kao ni statistički značajne razlike u postojanju imunoseroloških parametara i ANCA (tabele 15 i 16). Anti-MPO su češće bila prisutna kod novonastalih, a anti-Lf kod prethodno lečenih, mada statistička značajnost između ove dve grupe SLE pacijenata nije dostignuta (tabela 17).

Prolongirana primena PTU, intermitentno ili u visokim dozama, može indukovati ANCA-udružen vaskulitis i LLS (211). U našoj grupi pacijenata sa LLS, 5/17 pacijenata je lečeno visokim dozama PTU, dok je 8/17 pacijenata bilo na intermitentnoj PTU terapiji. Veći broj žena u grupi pacijenata lečenih PTU (tabela 4) je zbog predominantno ženskog pola kod pacijenata obolelih od autoimunske bolesti žtitaste žlezde. Dobro je poznato da su žene više sklone slomu tolerancije, uključujući i lekom indukovanu autoimunost (257). Prosečno 30% pacijenata koji su na dugotrajnoj PTU terapiji (11.7 ± 6.1 meseci) postaju ANCA pozitivni, ali samo 10% ANCA pozitivnih pacijenata razvije AAD (257). Tokom 6.5 godina PTU-indukovan LLS dijagnostikovali smo kod 17 pacijenata (srednja vrednost (medijana) dužine PTU terapije bila je 36 months).

Kliničke i serološke manifestacije idiopatskog SLE i PTU-indkovanog LLS često se preklapaju. Iako je diferencijalna dijagnoza ponekad teška, u našoj grupi LLS pacijenata nije bilo neuroloških i psihijatrijskih manifestacija, bubrežne zahvaćenosti i poliserozitisa, za razliku od idiopatskog SLE (tabela 5). Iako su kod LLS pacijenata manifestacije od strane CNS-a i bubrega obično odsutne (174, 258), postoji nekoliko publikovanih slučajeva zahvaćenosti bubrega kod PTU-indkovanog

LLS (181, 259). Citopenija, posebno leukopenija, bila je prisutna u obe grupe pacijenata (260), što je potvrđeno i našom studijom. Takođe, našom studijom su potvrđena i ranija saznanja da kutane manifestacije mogu pomoći u ranoj dijagnozi LLS (174, 175, 181). Malarni raš, diskoidne promene, lezije karakteristične za subakutni kutani LE (anularno-policiklične i/ili psorijaziformne) i oralne ulceracije bile su prisutne kod pacijenata sa SLE (tabela 5). S druge strane, urticaria-like vaskulitis, purpura i kutane ulceracije mogu biti prisutne kod obe bolesti, ali su mnogo češće kod PTU-indukovanog LLS (261), što je potvrđeno i našom studijom (tabela 5).

Tipičan laboratorijski profil kod LLS indukovanog lekom uključuje pozitivna ANA sa homogenim obrascem i anti-histonska antitela, dok su anti-dsDNK i anti-ENA antitela obično odsutna (201). Naši SLE pacijenti su znatno češće imali anti-dsDNK, anti-ENA, anti-histonska, anti-nukleozomalna i anti-C1q antitela (tabela 6), profil tipičan za SLE udružen sa primenom INF- alfa (262).

Našom studijom ustanovljena je značajno veća prevalencija IgG ANCA kod PTU-indukovanog LLS (100%) u poređenju sa SLE (28.2%). Svi naši pacijenti sa PTU-indukovanim LLS bili su ANCA pozitivni i oni su znatno češće imali polispecifična ANCA, za razliku od idiopatskog SLE kod koga su dominirala monospecifična ANCA (tabela 7, grafikon 1A). Najčešći target antigeni kod LLS pacijenata bili su MPO, El i PR3 (tabela 7, grafikon 1B). Kao što je u ranijim publikacijama prikazano (181, 215), anti-MPO je najsenzitivniji dijagnostički marker za LLS indukovan PTU. Za razliku od tipičnog serološkog profila LLS indukovanog lekom, mi smo ustanovili da su ANCA imala značajno veću senzitivnost nego anti-histonska antitela za PTU-indukovan LLS. U odnosu na druge lekove, PTU retko indukuje anti-histonska antitela (179). HLA haplotipovi i povećan nivo IL-10 su važni za serološki profil lekom indukovanog LLS (263).

Ukoliko se LLS indukovan lekom dijagnostikuje na vreme, ima blaži tok i obično ne zahteva citotoksičnu terapiju (175). Kod naših pacijenata sve kliničke manifestacije su se povukle nakon prekida PTU terapije, bez primene imunosupresivne terapije kod 10/17 pacijenata, dok je kratkotrajna kortikosteroidna terapija bila potrebna kod 7/17 pacijenata. Za razliku od

idiopatskog SLE, tokom praćenja nije bilo relapsa, čak ni posle obustavljanja imunosupresivne terapije.

Posle isključenja PTU, učestalost pozitivnih ANA, IgM aCL antitela, krioglobulina i niskog C3, smanjena je u poređenju sa ovim parametrima tokom aktivne faze LLS (tabela 38). Za razliku od ovih seroloških markera, svi naši LLS pacijenti, i pored kliničke remisije, zadržali su ANCA pozitivnost. Posle prekida PTU terapije, broj pacijenata sa polispecifičnim ANCA smanjen je sa 91.7% na 50%. S druge strane, broj pacijenata sa monospecifičnim ANCA povećan je sa 8.3% na 50% (grafikon 25). Iako su anti-MPO perzistirala duže vreme, nivo koncentracije anti-MPO je značajno opao posle prekida PTU (grafikon 26). Visoka koncentracija anti-MPO može perzistirati mesecima, čak i godinama posle obustavljanja terapije (264).

PTU-indukovana anti-MPO prepoznaju različite epitope MPO u aktivnoj fazi i remisiji AAD (265). ANCA aviditet opada znatno brže nego ANCA titar, ali aviditet anti-MPO bolje korelira sa kliničkim manifestacijama bolesti (266). Takođe, koncentracija IgG anti-MPO ne smanjuje se istovremeno sa anti-MPO IgG4 subklasom koja postaje negativna vrlo brzo tokom kliničke remisije (267). Anti-MPO IgG4 subklasa koja postaje negativna po prekidu PTU, ukazuje da visok nivo anti-MPO može biti udružen sa ponovnom primenom PTU terapije (266), što je bio slučaj kod 8/17 naših pacijenata sa PTU-indukovanim LLS.

PTU je heterociklični lek dobijen iz tiouracila koji ima snažne antitiroidne efekte. Tiolska grupa PTU može se vezati za ćelijske makromolekule, tako da može da funkcioniše kao haptent. PTU i njegovi metaboliti se akumuliraju u neutrofilima, vezuju se i menjaju strukturu MPO i drugih citoplazmatskih i nuklearnih antigena, indukujući razna autoantitela (268). Pretpostavlja se da su MPO-posredovan metabolizam minociklina i uticaj na normalnu apoptozu važni za anti-MPO pozitivan minociklin-indukovan LLS (176, 178). Međutim, novije studije su otkrile da je abnormalna regulacija NETs uključena u patogenezu mnogih bolesti, uključujući i trombozu, SLE i AAD (50, 269). Granulociti male gustine pokazuju veliki kapacitet za oslobađanje NETs, sa povećanom eksternalizacijom NET antigena, citrulinacijom autoantigena i produkcijom proinflammatoryh citokina (270, 271). Brojni stimulansi mogu pokrenuti NETozu, uključujući razne patogene, citokine (TNF-alfa, IL-8, IL-

17), azotni oksid i neke lekove, npr. PTU (3, 42). Nakazawa i saradnici su demonstrirali da su NETs najvažniji izvor autoantigena kod PTU-indukovanog AAD (42). NETs su glavni izvor citoplazmatskih (MPO, PR3, Lf, El, BPI, antimikrobni peptid koji aktivira dendritične ćelije) i nuklearnih autoantigena kod pacijenata sa PTU-indukovanim LLS, sa posledičnom indukcijom polispecifičnih ANCA i ANA, ali bez anti-dsDNK (tabele 36 i 37).

Neravnoteža između proizvodnje i uklanjanja NETs ima važnu ulogu u indukciji autoimunosti. Hakkim i saradnici su pokazali da je serumska DNaze I odgovorna za degradaciju NETs i sugerisali da genetska osnova za nisku aktivnost DNaze I može predstavljati predispoziciju za perzistiranje NETs i indukciju autoimunosti (56). Smanjena aktivnost DNaze I može poremetiti uklanjanje cirkulišuće DNK, povećati produkciju autoantitela koaktivacijom Toll-like receptora 9 (272). DNASE1 gen na hromozomu 16p13.3 i šest autozomalno kodominantnih alela su opisani, ali je dokazano da su DNASE1*1 i*2 aleli koji određuju različitu aktivnost DNaze I (273). Višestruki polimorfizam, prepoznat u promoterima, egzonima i intronima DNASE1 gena, može da menja svoju stabilnost, optimalan pH i aktivnost seruma (273).

Mi smo pokazali da je aktivnost DNaze I bila značajno niža u serumu pacijenata sa PTU-indukovanim LLS nego u serumu SLE pacijenata i zdravih osoba. Postoje različiti rezultati o korelaciji između aktivnosti DNaze I i aktivnosti SLE (65, 81). Niska aktivnost DNaze I može da dovede do perzistiranja NETs, što posledično utiče na indukciju polispecifičnih ANCA kod pacijenata sa PTU-indukovanim LLS. Prema tome, NETs mogu indukovati proizvodnju ANCA i mogu aktivirati komplement. Takođe, ANCA mogu stimulisati NETozu, produkciju kiseoničnih radikala i proinflamatornih citokina, koji zatim dovode do prekomernog autoimunskog odgovora (41).

Osim toga, kod pacijenata sa autoimunskim hipertireoidizmom, identifikovana nova mutacija (1218G>A, egzon 5) i višestruki polimorfizam DNASE1 gena, udruženi su sa njegovom nižom aktivnošću i toplotnom stabilnošću (274, 275). Pored genetskih, serološki faktori mogu uticati na aktivnost serumske DNaze I. G-aktin je prepoznat kao potencijalni inhibitor DNaze I (276). Nivo G-aktina se povećava tokom inflamacije (59), što može objasniti naš nalaz niske DNaze I u akutnoj fazi

PTU-indukovanog LLS. Takođe, moguće da su anti-DNaze I inhibitorna antitela (86) odgovorna za uočenu nisku aktivnost DNaze I (grafikon 28A). S druge strane, neke druge komponente seruma, kao što su anti-dsDNK antitela sa abzimskom aktivnošću, mogu uticati na porast aktivnosti DNaze I (277). Naši LLS pacijenti su bili anti-dsDNK negativni i oni su imali nižu aktivnost DNaze I nego anti-dsDNK pozitivni SLE pacijenti (grafikon 28B). Za razliku od anti-dsDNK antitela, anti-MPO antitela, koja su bila prisutna kod svih naših pacijenata sa PTU-indukovanim LLS, ne utiču na porast aktivnosti DNaze I. S obzirom da su brojni genetski i serološki faktori uključeni u regulaciju aktivnosti DNaze I, mi nismo našli korelaciju između nivoa koncentracije anti-MPO i enzimске aktivnosti.

Ekspresija DNaze I je regulisana alternativnim promoterima, splajsingom kao i faktorima inflamacije i ishemije. Novije studije su pokazale da bi aktivnosti serumske DNaze I mogla da bude dijagnostički marker za akutni infarkt miokarda (278). Mi smo otkrili da pad aktivnosti DNaze I nije konstantna karakteristika jednog pacijenta, već da se može menjati sa aktivnošću bolesti. Prekid PTU terapije kod naših LLS pacijenata doveo je do porasta aktivnosti DNaze I, ali aktivnost DNaze I nije dostigla nivo aktivnosti kod zdravih osoba i pacijenata lečenih PTU koji nisu imali LLS. Međutim, obustavljanje PTU dovodi do pada titra ANCA, do prekida NEToze, inflamacije i redukcije G-aktinom posredovane inhibicije DNaze I (276). I u našoj grupi LLS pacijenata, po prekidu PTU terapije došlo je do pada titra ANCA.

Svi ovi faktori mogu objasniti uočen porast aktivnosti DNaze I kod naših LLS pacijenata posle isključenja PTU. Za razliku od pacijenata sa PTU-indukovanim LLS, pacijenti koji su lečeni ovim lekom ali nisu razvili LLS imali su veću aktivnost DNaze I, što omogućava adekvatno uklanjanje PTU-indukovanih NETs. Visoka bazična aktivnost DNaze I može zaštititi pacijente od indukcije AAD.

Otkrivanje pacijenata sa niskom aktivnošću DNaze I može biti od presudne važnosti prilikom izbora terapijske strategije kod autoimunskog hipertireoidizma. Izbegavanje PTU kod pacijenata sa niskom serumskom aktivnošću DNaze I može sprečiti razvoj ANCA udruženog LLS. Takođe, merenje aktivnosti DNaze I može biti važno kod pacijenata lečenih drugim lekovima (minociklin, TNF-inhibitori, kinidin i prokainamid) koji smanjuju uklanjanje apoptotičnih ćelija i indukuju LLS (176, 177).

Posle isključenja uzročnog leka, antiinflamatorna i imunosupresivna terapija, i u budućnosti, DNaza I rezistentna na G-aktin, moći će da kontrolišu proinflamatorne efekte NET kod lekom indukovanoj AAD (64, 279).

6. ZAKLJUČCI

1. ANCA su prisutna kod 28% pacijenata sa SLE i kod 100% pacijenata sa LLS izazvanim propiltiourcilom.

2. Pacijenti sa LLS izazvanim PTU znatno češće imaju kutani vaskulitis, a znatno ređe artritis i zahvaćenost bubrega ($p<0.01$) u odnosu na pacijente sa SLE.

3. Pacijenti sa SLE koji su ANCA pozitivni češće imaju autoimunski hepatitis ($p<0.05$) i neurološke/psihijatrijske manifestacije ($p<0.01$), a značajno ređe kutane manifestacije ($p<0.05$) u odnosu na ANCA negativne pacijente sa SLE. Učestalost hematoloških, nefroloških i artikularnih manifestacija, kao i polioserozitisa, ne razlikuje se kod ANCA pozitivnih i ANCA negativnih pacijenata sa SLE.

4. ANCA su kod pacijenata sa SLE monospecifična (77.5%) i to najčešće za Lf (52.5%), MPO (47.5%) ili El (15%). Anti-Lf kod pacijenata sa SLE nisu udružena sa prisustvom anti-MPO ($p<0.01$) i anti-El ($p<0.05$). Suprotno u odnosu na SLE, ANCA su kod pacijenata sa LLS indukovanim PTU polispecifična (82.4%) i to najčešće za MPO (100%), El (82.4%) i PR3 (52.9%). U grupi ANCA pozitivnih pacijenata sa lupusom, monospecifična ANCA imaju senzitivnost od 78% za idiopatski SLE, dok polispecifična ANCA imaju senzitivnost od 82% za LLS izazvan PTU.

5. Anti-Lf kod pacijenata sa SLE pozitivno koreliraju sa titrom anti-dsDNK antitela i indeksom aktivnosti bolesti (SLEDAI-2K) ($p<0.01$), a negativno koreliraju sa koncentracijom C3 i C4 komponenti komplementa ($p<0.05$).

6. Anti-Lf su češće prisutna kod pacijenata sa bubrežnim manifestacijama i polioserozitisom, MPO-ANCA su udružena sa atralgijama ($p<0.05$), a anti-El sa autoimunskim hepatitisom ($p<0.05$). Pacijenti sa težom formom GN češće imaju

ANCA, i to monospecifična za Lf, dok pacijenti sa lakšim formama GN češće imaju anti-MPO antitela.

7. Aktivnost DNaze I kod LILLS je značajno niža nego kod SLE pacijenata i zdravih osoba ($p < 0.01$). Prekid PTU terapije dovodi do porasta aktivnosti DNaze I, mada aktivnost DNaze I ne dostiže nivo aktivnosti zdravih kontrola. U remisiji LLS indukovanog PTU, koncentracija anti-MPO opada, ali anti-MPO pozitivnost perzistira dugo vremena.

8. Detekcija prisustva i specifičnosti ANCA pomaže u dijagnostici imunoseroloških i kliničkih fenotipova pacijenata sa SLE. Niska aktivnost DNaze I i prisustvo polispecifičnih ANCA su prognostičko-dijagnostički biomarkeri za LLS indukovan PTU.

LITERATURA

1. Kaplan MJ. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* 2013;15:219.
2. Rosenblum MD, Remedios KA, Abbas AK. Mechanisms of human autoimmunity. *J Clin Invest* 2015;125:2228-33.
3. Kaplan MJ. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:691-9.
4. Rosenblum MD, Gratz IK, Paw JS, et al. Response to self antigen imprints regulatory memory in tissues. *Nature* 2011;480:538-542.
5. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532-5.
6. Kessenbrock K, Frohlich L, Sixt M, et al. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *J Clin Invest* 2008;118:2438-47.
7. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010;33:657-70.
8. Schuster S, Hurrell B, Tacchini-Cottier F. Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. *J Leukoc Biol* 2013;94:671-5.
9. Soehnlein O, Kenne E, Rotzius P, et al. Neutrophil secretion products regulate anti-bacterial activity in monocytes and macrophages. *Clin Exp Immunol* 2007;151:139-45.
10. Parmley RT, Cheah MS. Polymorphonuclear phagocytic cells. In: Sigal LH, Ron Z, editors. *Immunology and Inflammation. Basic mechanism and clinical consequences*. Mc Graw-Hill. New York, 1994;303-19.
11. Prince LR, Whyte MK, Sabroe I, Parker LC. The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr Opin pharmacol* 2011;11:397:403.
12. Abramson SL. Phagocyte deficiencies. In: Rich RR, editor. *Clinical Immunology*. Mosby, St Louis 1996;677-94.

13. Maitra D, Shaeib F, Abdulhamid I, et al. Myeloperoxidase acts as a source of free iron during steady-state catalysis by a feedback inhibitory pathway. *Free Radic Biol Med* 2013;63:90-8.
14. Yang D, de la Rosa G, Tewary P, Oppenheim JJ. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol* 2009;30:531-7.
15. Tamassia N, Le Moigne V, Rossato M, et al. Activation of an immunoregulatory and antiviral gene expression program in poly(I:C)-transfected human neutrophils. *J Immunol* 2008;181:6563-73.
16. Xu G, Xiong W, Hu Q, et al. Lactoferrin-derived peptides and Lactoferricin chimera inhibit virulence factor production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol* 2010;109:1311-18.
17. Audrain M, Gourbil A, Muller J, Esnault V. Anti-lactoferrin autoantibodies: relation between epitopes and iron-binding domain. *J Autoimmun* 1996;9:569-74.
18. Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol* 2001;90:271-84.
19. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532-5.
20. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 2012;189:2689-95.
21. Fuchs T, a Abed U, Goosmann C, et al. A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007;176: 231-41.
22. Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol* 2012;3:420.
23. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:577-82.
24. Krautgartner WD, Klappacher M, Hannig M, et al. Fibrin mimics neutrophil extracellular traps in SEM. *Ultrastruct Pathol* 2010;34:226-31
25. Cooper PR, Palmer LJ, Chapple IL. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? *Periodontol* 2000. 2013;63:165-97.

26. Menegazzi R, Decleva E, Dri P. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood* 2012; 119:1214-6.
27. Urban CF, Ermert D, Schmid M, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PloS Pathog* 2009;5:e1000639.
28. Cho JH, Fraser IP, Fukase K, et al. Human peptidoglycan recognition protein S is an effector of neutrophil-mediated innate immunity. *Blood* 2005;106:2551-8.
29. Wartha F, Beiter K, Normark S, Henriques-Normark B. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2007;10:52-6.
30. Lögters T, Margraf S, Altrichter J, et al. The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Med Microbiol Immunol* 2009;198:211-9.
31. O'Donoghue AJ, Jin Y, Knudsen GM, et al. Global substrate profiling of proteases in human neutrophil extracellular traps reveals consensus motif predominantly contributed by elastase. *PloS One* 2013;8:e75141.
32. Cho JH, Sung BH, Kim SC. Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788:1564-9.
33. Méndez-Samperio P. The human cathelicidin hCAP18/LL-37: a multifunctional peptide involved in mycobacterial infections. *Peptides*. 2010;31(9):1791-8.
34. Bianchi M, Niemiec MJ, Siler U, et al. Restoration of anti-*Aspergillus* defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:1243-52.e7.
35. Neeli I, Khan SN, Radic M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol* 2008;180:1895–1902.
36. Parker H, Winterbourn CC. Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Frontiers Immunol* 2012;3: 424.
37. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 2012;198:773-83.

38. Podolska MJ, Biermann MH, Maueröder C, et al. Inflammatory etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus: an update. *J Inflamm Res* 2015;8:161-71.
39. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2010;191:677-691.
40. Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Frontiers Immunol* 2013;3:420.
41. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarck U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009;15:623-5.
42. Nakazawa D, Tomaru U, Suzuki A, et al. Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: Implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 2012;64:3779-87.
43. Lu T, Kobayashi SD, Quinn MT, DeLeo FR. A NET Outcome. *Frontiers Immunol* 2012;3:365.
44. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin — a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol* 2003;40:395-405.
45. Beiter K, Wartha F, Albiger B, et al. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 2006;16:401-7.
46. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Rev Immunol* 2013;13:159-75.
47. Kasama T, Miwa Y, Isozaki T, et al. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Current Drug Targets. Inflammation Allergy* 2005;4:273-9.
48. Ratjen F, Grasemann H. New therapies in cystic fibrosis. *Curr Pharmaceutical Design* 2012;18:614-27.

49. Marcos V, Zhou Z, Yildirim AO, et al. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nature Med* 2010;16:1018–23.
50. Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C, et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* 2012;20:3007–18.
51. Kallenberg CGM, Heeringa P, Stegeman C. Mechanisms of Disease: pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides. *Nature Clin Practice. Rheumatology* 2006;2:661–70.
52. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *New England J Med* 2011;365:2110-21.
53. Knight JS, Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. *Frontiers Immunol* 2012;3:380.
54. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2011;187:538-52
55. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011;3:73ra20
56. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:9813–8.
57. Darrah E, Rosen A, Giles JT, Andrade F. Peptidylarginine deiminase 2, 3, and 4 have distinct specificities against cellular substrates: novel insights into autoantigen selection in rheumatoid arthritis. *Ann Rheumatic Dis* 2012;71:92–8.
58. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNApeptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Translational Med* 2011;3:73ra19.

59. Leffler J, Martin M, Gullstrand B, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol* 2012;188:3522–31.
60. Shao WH, Cohen PL. Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2011;13:202.
61. Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A. Possible implication of disordered neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of MPO-ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Nephrol* 2013;17:631–3.
62. Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, et al. Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase-ANCA-associated microscopic polyangiitis. *J Am Soc Nephrol* 2014;25:990–7.
63. Napirei M, Wulf S, Mannherz HG. Chromatin breakdown during necrosis by serum DNase 1 and the plasminogen system. *Arthritis Rheum* 2004;50:1873–83.
64. Manderson AP, Carlucci F, Lachmann PJ, et al. The in vivo expression of actin/salt-resistant hyperactive DNase I inhibits the development of anti-ssDNA and anti-histone autoantibodies in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R68.
65. Skiljevic D, Jeremic I, Nikolic M, et al. Serum DNase I activity in systemic lupus erythematosus: correlation with immunoserological markers, the disease activity and organ involvement. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1083-91.
66. Takeshita H, Mogi K, Yasuda T, et al. Mammalian deoxyribonucleases I are classified into three types: pancreas, parotid, and pancreas–parotid (mixed), based on differences in their tissue concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:481–4.
67. Sachs F. Uber die Nuclease. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1905; 46:337–53.
68. Fujihara J, Yasuda T, Ueki M, et al. Comparative biochemical properties of vertebrate deoxyribonuclease I. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2012;163:263-73.
69. Napirei M, Ricken A, Eulitz D, et al. Expression pattern of the Deoxyribonuclease 1 gene: lessons from the Dnase1 knockout mouse *Biochem J* 2004;380:929–37.

70. Lazarides E, Lindberg U. Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974;71:4742-6.
71. Zahm JM, Debordeaux C, Maurer C, et al. Improved activity of an actin-resistant DNase I variant on the cystic fibrosis airway secretions. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1153-7.
72. Mannherz HG, Peitsch MC, Zanotti S, et al. A new function for an old enzyme: the role of DNase I in apoptosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;198:161-74.
73. Yasuda T, Kishi K, Yanagawa Y, Yoshida A. Structure of the human deoxyribonuclease I (DNase I) gene: identification of the nucleotide substitution that generates its classical genetic polymorphism. *Ann Hum Genet* 1995;59:1-15.
74. Nadano D, Yasuda T, Kishi K. Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clin Chem* 1993;39: 448-52.
75. Polzar B, Zanotti S, Stephan H, et al. Distribution of deoxyribonuclease I in rat tissues and its correlation to cellular turnover and apoptosis (programmed cell death). *Eur J Cell Biol* 1994;64:200-10.
76. Tsukumo S, Yasutomo K. DNase I in pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2004;113:14-8.
77. Vyse TJ, Kotzin BL. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 1998;16:261-92.
78. Chitrabamrung S, Rubin RL, Tan EM. Serum deoxyribonuclease I and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 1981;1:55-60.
79. Napirei M, Karsunky H, Zevnik B, et al. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet* 2000;25:177-81.
80. Fenton K, Fismen S, Hedberg A, et al. Anti-dsDNA Antibodies Promote Initiation, and Acquired Loss of Renal Dnase1 Promotes Progression of Lupus Nephritis in Autoimmune (NZBxNZW)F1 Mice. *PLoS ONE* 2009;4:e8474.
81. Martinez-Valle F, Balada E, Ordi-Ros J, et al. DNase 1 activity in patients with systemic lupus erythematosus: relationship with epidemiological, clinical, immunological and therapeutical features. *Lupus* 2009;18:418-23.

82. Sallai K, Nagy E, Derfalvy B, et al. Antinucleosome antibodies and decreased deoxyribonuclease activity in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:56–9.
83. Martinez-Valle F, Balada E, Ordi-Ros J, et al. DNase1 activity in systemic lupus erythematosus patients with and without nephropathy. *Rheumatol Int* 2010;30:1601-4.
84. Bodaño A, González A, Ferreiros-Vidal I, et al. Association of a non-synonymous single-nucleotide polymorphism of DNASE1 with SLE susceptibility. *Rheumatology* 2006;45:819–23.
85. Leffler J, Gullstrand B, Jonsen A, et al. Degradation of neutrophil extracellular traps co-varies with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R84.
86. Yeh TM, Chang HC, Liang CC, et al. Desoxyribonuclease-inhibitory antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci* 2003;10:544-51.
87. Bosch X, Guilabert A, Font J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Lancet* 2006;368:404-18.
88. Savige J, Davies D, Falk RJ, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies and associated diseases: a review of the clinical and laboratory features. *Kidney International* 2000;57:846-62.
89. Davies GJ, Moran JE, Niall JF, Rayan GB. Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology. *BMJ* 1982;2:606.
90. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988;318:1651-7.
91. Jenne DE, Tschopp J, Ludemman J, et al. Wegener's auto-antigen decoded. *Nature* 1990;346:520.
92. Jennette JC, Hoidal JR, Falk RJ. Specificity of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies for proteinase 3. *Blood* 1990;75:2263-4.
93. Kallenberg CGM. Pathogenesis of ANCA-associated vasculitis, an update. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2011;41:224-31.

94. Csernok E. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and pathogenesis of small vessel vasculitides. *Autoimmun Rev* 2003;2:158-64.
95. Hong Y, Eleftheriou D, Hussain AA, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies stimulate release of neutrophil microparticles. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:49-62.
96. Holden NJ, Williams JM, Morgan MD, et al. ANCA-stimulated neutrophils release BlyS and promote B cell survival: a clinically relevant cellular process. *Ann Rheum Dis* 2011;70:2229-33.
97. Bonaci-Nikolić B, Andrejevic S, Pavlovic M, et al. Prolonged infections associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies specific to proteinase 3 and myeloperoxidase: diagnostic and therapeutic challenge. *Clin Rheumatol* 2010;29:893-904.
98. Kontic M, Radovanovic S, Nikolic M, Bonaci-Nikolic B. Concomitant drug- and infection induced antineutrophil cytoplasmic autoantibody (ANCA)-associated vasculitis with multispecific ANCA. *Med Princ Pract* 2012;21:488-91.
99. Guillevin L, Lhote F, Gherardi R. The spectrum and treatment of virus-associated vasculitides. *Curr Opin Rheumatol* 1997;9:31-6.
100. Ramos-Casals M, Jara Lj, Medina F, et al. HISPAMEC Study Group. Systemic autoimmune diseases co-existing with chronic hepatitis C virus infection (the HISPAMEC Registry): patterns of clinical and immunological expression in 180 cases. *J Intern Med* 2005;257:549-57.
101. Asherson RA, Cervera R. Antiphospholipid antibodies and infection. *Ann Rheum Dis* 2003;62:388-93.
102. Schmitt WH, van der Woude FJ. Clinical applications of antineutrophil cytoplasmic antibody testing. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:9-17.
103. Falk RJ, Gross WL, Guillevin L, et al. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): an alternative name for Wegener's granulomatosis. A joint proposal of the American College of Rheumatology, the American Society of Nephrology, and the European League against Rheumatism. *Arthritis Rheum* 2011;63:863-4.

104. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, et al. Nomenclature of systemic vasculitides: proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 1994;37:187-92.
105. Jennette JC. Nomenclature and classification of vasculitis: lessons learned from granulomatosis with polyangiitis (Wegener's granulomatosis). *Clin Exp Immunol* 2011;164:7-10.
106. Langford C. Clinical features and diagnosis of small-vessel vasculitis. *Cleve Clin J Med* 2012;79:S3-7.
107. Kallenberg CGM. Pathophysiology of ANCA-associated small vessel vasculitis. *Curr Rheumatol Rep* 2010;12:399-405.
108. Kallenberg CGM. Churg-Strauss syndrome: just one disease entity? (Editorial). *Arthritis Rheum* 2005;52:2589-93.
109. Grau RG. Churg-Strauss syndrome: 2005-2008 update. *Curr Rheumatol Rep* 2008;10:453-8.
110. Quismorio Jr FP. Clinical application of serologic abnormalities in systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 7th ed. Chicago: Lippincott Williams&Wilkins;2007.p.933-55.
111. Tutuncu ZN, Kalunian KC. The Definition and Classification of Systemic Lupus Erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*, 7th ed. Chicago: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.p.16-20.
112. Chang C, Gershwin ME. Drugs and autoimmunity-a contemporary review and mechanistic approach. *J Autoimmun* 2010;34:266-75.
113. Hahn BH. Overview of Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*, 7th ed. Chicago: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.p.46-53.
114. Hebra F. On diseases of the skin including the exanthemata. Vol 1. Adams F (trans) London, The New Sydenham Society 1866.
115. Kaposi M. Lupus vulgaris. In: Hebra F, Kaposi M, editors. On diseases of the skin including the exanthemata. Vol IV. Tay W (trans) London, The New Sydenham Society 1875.
116. Hutchinson J. Lupus erythematosus. *Med Times Gaz* 1879;1:1-3.

117. Wallace DJ. Definition and classification. In: Wallace DJ. *Lupus: The essential clinician's guide*. New York: Oxford University Press; 2008.p. 5-9.
118. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MB, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Eng J Med* 2003;349:1526-33.
119. Munoz LE, Gaipl US, Franz S, et al. SLE - a disease of clearance deficiency? *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1101-7.
120. Jewell ML, McCauliffe DO. Patients with cutaneous lupus erythematosus who smoke are less responsive to antimalarial treatment. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:983-7.
121. Manderson AP, Botto M, Walport MJ. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 2004;22:431-56.
122. Cohen PL, Caricchio R. Genetic models for the clearance of apoptotic cells. *Rheum Dis Clin North Am* 2004;30:473-86.
123. Brucato A, Cimaz R, Caporali R, et al. Pregnancy outcomes in patients with autoimmune diseases and anti-Ro/SSA antibodies. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011;40:27-41.
124. Kowal C, Degiorgio LA, Lee JY, et al. Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:19854-9.
125. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 2010;376:1498-509.
126. Girardi G, Redecha P, Salmon JE. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat Med* 2004;10:1222-6.
127. Deng GM, Liu L, Kyttaris VC, Tsokos GC. Lupus serum IgG induces skin inflammation through the TNFR1 signaling pathway. *J Immunol* 2010;184:7154-61.
128. Hahn BH, Ebling F, Singh RR, et al. Cellular and molecular mechanisms of autoantibody production in lupus. *Ann NY Acad Sci* 2005;1051:433-41.

129. Gilliam JN, Sontheimer RD. Skin manifestations of SLE. *Clin Rheum Dis* 1982;8:207-18.
130. Hochberg MG. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus (letter). *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
131. Gilliam JN, Sontheimer RD. Skin manifestations of SLE. *Clin Rheum Dis* 1982;8:207-18.
132. Zecevic RD, Vojvodić D, Ristić B, Pavlović MD, Stefanović D, Karadaglić D. Skin lesions - an indicator of disease activity in systemic lupus erythematosus? *Lupus* 2001;10:364-7.
133. Fabbri P, Cardinali C, Giomi B, Caproni M. Cutaneous lupus erythematosus: diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:449-65.
134. Wysenbeek AJ, Guedj D, Amit M, Weinberger A. Rash in systemic lupus erythematosus: prevalence and relation to cutaneous and non-cutaneous disease manifestations. *Ann Rheum Dis* 1992;51:717-9.
135. Sontheimer RD, Stastny P, Gilliam JN. Human histocompatibility antigen associations in subacute cutaneous lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1981;67:312-6.
136. Sontheimer RD. Clinical significance of subacute cutaneous lupus erythematosus skin lesions. *J Dermatol* 1985;12:205-212.
137. Kuhn A, Ruzicka T. Classification of cutaneous lupus erythematosus. In: Kuhn A, Lehmann P and Ruzicka T, editors. *Cutaneous Lupus Erythematosus*. Springer: Heidelberg; 2004.p.53-8.
138. Callen JP. Discoid lupus erythematosus - variants and clinical associations. *Clin Dermatol* 1985;3:49-57.
139. Mascaro JM, Herrero C, Hausmann G. Uncommon cutaneous manifestations of lupus erythematosus. *Lupus* 1997;6:122-31.
140. Su WP, Perniciaro C, Rogers RS, White JW. Chilblain lupus erythematosus (lupus perniosis): clinical review of the Mayo Clinic experience and proposal of diagnostic criteria. *Cutis* 1994;54:395-9.

141. Yell JA, Wojnarowska F. Bullous skin disease in lupus erythematosus. *Lupus* 1997;6:112-21
142. Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Lupus nephritis: current issues. *Ann Rheum Dis* 2003;62:795-8.
143. Chrysochou C, Randhawa H, Reeve R, Waldek S, Wood GN. Determinants of renal functional outcome in lupus nephritis: a single centre retrospective study. *QJM* 2008;101:313-6.
144. Appel GB, Radhakrishnan J, D'Agati VD. Secondary Glomerular Disease. In: *The Kidney*. Brenner BM. Ed.: 1382-98. The WB. Saunders, Philadelphia, 2004.
145. Cameron JS. Lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:413-24.
146. Dolff S, Berden JHM, Bijl M. Treatment of lupus nephritis. *Expert Rev Clin Immunol* 2010;6:901-11.
147. Rahman A, Isenberg DA. Systemic Lupus Erythematosus. *N Eng J Med* 2008;358:929-39.
148. Stojimirović B, Petrović D. Uticaj proteinurije na oštećenje tubulointersticijuma. *Med Pregl* 2003;LVI:351-4.
149. Petrović D, Stojimirović B. Proteinuria as a risk factor for progression of chronic renal disease. *Vojnosanit Pregl* 2008;65:552-8.
150. Christopher-Stine L, Siedner M, Lin J, et al. Renal Biopsy in Lupus Patients with Low Levels of Proteinuria. *J Rheumatol* 2007;34:332-5.
151. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, et al, on behalf of the International Society of Nephrology and Renal Pathology Society 149. Working Group on the classification of lupus nephritis. The Classification of Glomerulonephritis in Systemic Lupus Erythematosus Revisited. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:241-50.
152. Bihl GR, Petri M, Fine DM. Kidney biopsy in lupus nephritis: look before you leap. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:1749-52.
153. Wallace DJ. Clinical symptoms and signs. In: Wallace DJ. *Lupus: The essential clinician's guide*. New York: Oxford University Press; 2008.p.21-48.
154. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum* 2004;34:501-37.

155. Moore AE, Sabachewsky L, Toolan HW. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res* 1955;15:598-602.
156. Reichlin M. ANA negative systemic lupus erythematosus sera revisited serologically. *Lupus* 2000;9:116-9.
157. ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, et al. Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study. *Arthritis Rheum* 1990;33:634-43.
158. Cortes-Hernandez J, Ordi-Ros J, Labrador M, et al. Antihistone and anti-doublestranded deoxyribonucleic acid antibodies are associated with renal disease in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 2004;116:165-73.
159. Totoritis MC, Tan EM, McNally EM, Rubin RL. Association of antibody to histone complex H2A-H2B with symptomatic procainamide-induced lupus. *N Engl J Med* 1988;318:1431-6.
160. Craft J. Antibodies to snRNPs in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1992;18:311-35.
161. Symmons DP, Coppock JS, Bacon PA, et al. Development and assessment of a computerized index of clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. Members of the British Isles Lupus Assessment Group (BILAG). *Q J Med* 1988;69:927-37.
162. Liang MH, Socher SA, Larson MG, Schur PH. Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1989;32:1107-18.
163. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-40.
164. Bencivelli W, Vitali C, Isenberg DA, et al. Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. III. Development of a computerised clinical chart and its application to the comparison of different indices of disease activity. *The*

European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. *Clin Exp Rheumatol* 1992;10:549-54.

165. Gladman DD, Goldsmith CH, Urowitz MB, et al. Sensitivity to change of 3 Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Indices: international validation. *J Rheumatol* 1994;21:1468-71.

166. Petri M, Buyon J, Skovron ML. Reliability of SELENA SLEDAI and flares as a clinical trial outcome measure (abstract). *Arthritis Rheum* 1998;41:S218.

167. Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* 2002;29:288-91.

168. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996;39:363-9.

169. Rahman P, Gladman DD, Urowitz M, et al. Early damage as measured by the SLICC/ACR damage index is a predictor of mortality in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001;10:93-6.

170. Gladman DD, Urowitz MB, Goldsmith CH, et al. The reliability of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index in patients with Systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:809-13.

171. Morrow JD, Schroeder HA, Perry HM, Jr. Studies on the control of hypertension by hypohex. II. Toxic reactions and side effects. *Circulation* 1953;8:829-39.

172. Dustan HP, Taylor RD, Corcoran AC, et al. Rheumatic and febrile syndrome during prolonged hydralazine treatment. *JAMA* 1954;154:23-9.

173. Rubin RL. Drug-induced lupus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*, 7th ed. Chicago: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.p.870-900.

174. Vedove CD, Del Giglio M, Schena D, Girolomoni G. Drug-induced lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res* 2009;301:99-105.

175. Marzano AV, Vezzoli P, Crosti C. Drug-induced lupus: an update on its dermatologic aspects. *Lupus* 2009;18:935-40.
176. Chang C, Gershwin ME. Drugs and autoimmunity-a contemporary review and mechanistic approach. *J Autoimmun* 2010;34:J266-75.
177. Ablin J, Verbovetski I, Trahtemberg U, et al. Quinidine and procainamide inhibit murine macrophage uptake of apoptotic and necrotic cells: a novel contributing mechanism of drug-induced-lupus. *Apoptosis* 2005;10:1009-18.
178. Dunphy J, Oliver M, Rands AL, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies and HLA class II alleles in minocycline-induced lupus-like syndrome. *Br J Dermatol* 2000;142:461-7.
179. Xiao X, Chang C. Diagnosis and classification of drug-induced autoimmunity (DIA). *J Autoimmun* 2014;48-49:66-72.
180. Gao Y, Zhao MH, Guo XH, et al. The prevalence and target antigens of antithyroid drugs induced antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in Chinese patients with hyperthyroidism. *Endocr Res* 2004;30:205-13.
181. Wu R, Li R. Propylthiouracil-induced autoimmune syndromes: 11 case report. *Rheumatol Int* 2012;32:679-81.
182. Hess EV, Mongey A-B. Drug-related lupus: The same as or different from idiopathic disease? In: Lahita RG ed. *Systemic lupus erythematosus*. 2nd Ed. New York, NY: Churchill Livingstone, 1993; 893-904.
183. Wallace DJ, Dubois EL. Drugs that exacerbate and induce systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Dubois EL, eds. *Dubois' lupus erythematosus*. 3rd Ed. Philadelphia, PA: Lea & Febiger, 1987: 450-69.
184. Adams LE, Hess EV. Drug-related lupus. *Drug Safety* 1991;6:431-49.
185. Mongey AB, Sim E, Risch A, et al. Acetylation status is associated with serological changes but not clinically significant disease in patients receiving procainamide. *J Rheumatol* 1999;26: 1721-6.
186. Grisondi P, Girolomoni G. Biologic therapies in psoriasis: a new therapeutic approach. *Autoimmun Rev* 2007;6:515-9.

187. Howard PF, Hochberg MC, Bias WB, et al. Relationship between C4 null genes, HLA-D region antigens, and genetic susceptibility in systemic lupus erythematosus in Caucasian and Black Americans. *Am J Med* 1986;81:187-93.
188. Speirs C, Chapel H, Fielder AHL, et al. Complement system protein C4 and susceptibility to hydralazine-induced systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1989;1:922-4.
189. Adams LE, Balakrishnan K, Roberts SM, et al. Genetic, immunologic and biotransformation studies of patients on procainamide. *Lupus* 1993;2:89-98.
190. Woosley RL, Drayer DE, Reidenberg MM, et al. Effect of acetylator phenotype on the rate at which procainamide induces antinuclear antibodies and the lupus syndrome. *N Engl J Med* 1978;298:1157-9.
191. Batchelor JR, Welsh KL, Tinoco RM, et al. Hydralazine-induced systemic lupus erythematosus: influence of HLA-DR and sex on susceptibility. *Lancet* 1980;1:1107-9.
192. Russell AS, Ziff M. Natural antibodies to procainamide. *ClinExp Immunol* 1968;3:901-9.
193. Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, et al. Clinical response to adalimumab: relationship to anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:921-6.
194. Manosa M, Domenech E, Marin L, et al. Adalimumab-induced lupus erythematosus in Crohn's disease patients previously treated with infliximab. *Gut* 2008;57:559.
195. Yamauchi Y, Litwin A, Adams LE, et al. Induction of antibodies to nuclear antigens in rabbits by immunization with hydralazine-human serum albumin conjugates. *J Clin Invest* 1975;56:958-69.
196. Thomas TJ, Messner RP. Effects of lupus-inducing drugs on the B to Z transition of synthetic DNA. *Arthritis Rheum* 1986;29:638-45.
197. Lafer EM, Moller A, Nordheim A, et al. Antibodies specific for left-handed Z-DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:3546-50.

198. Gunnia UB, Thomas T, Thomas TJ. The effects of polyamines on the immunogenicity of polynucleotides. *Immunol Invest* 1991;20:337-50.
199. Portanova JP, Arndt RE, Tan EM, Kotzin BL. Anti-histone antibodies in idiopathic and drug-induced lupus recognize distinct intrahistone regions. *J Immunol* 1987;138:446-51.
200. Monestier M, Fasy TM, Debbas TM, Patel K. Deoxyribonuclease I treatment of histones for the detection of anti-histone antibodies in solid-phase immunoassays. Effect of protease contamination in commercial deoxyribonuclease I preparations. *J Immunol Methods* 1990;127:289-91.
201. Vasoo S. Drug-induced lupus: an update. *Lupus* 2006;15:757-61.
202. Adams LE, Sanders Jr CE, Budinsky RA, et al. Immunomodulatory effects of procainamide metabolites: Their implications in drug-related lupus. *J Lab Clin Med* 1989;113:482-92.
203. Yung RL, Richardson BC. Drug-induced lupus mechanism. In: Lahita RG, editor. *Systemic lupus erythematosus*, 5th ed. London: Elsevier; 2011.p385-403.
204. Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, et al. Interferon- α -induced endogenous superantigen: A model linking environment and autoimmunity. *Immunity* 2001;15:591-601.
205. Ronnblom L, Alm GV. A pivotal role for the natural interferon alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) on the pathogenesis of lupus. *J Exp Med* 2001;194:F59-F63.
206. Blanco P, Palucka AK, Gill M, et al. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001;294:1540-3.
207. Costa MF, Said NR, Zimmermann B. Drug-induced lupus due to anti-tumor necrosis factor α agents. *Semin Arthritis Rheum* 2008;37:381-7.
208. Borg FA, Isenberg DA. Syndromes and complications of interferon therapy. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19:61-6.
209. Caramaschi P, Biasi D, Colombatti M, et al. Anti-TNF α therapy in rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Rheumatol Int* 2006;26:209-14.

210. Kloppenburg M, Brinkman BMN, de Rooij-Dijk HH, et al. The tetracycline derivative minocycline differentially affects cytokine production by monocytes and T lymphocytes, *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:934-40.
211. Tetikkurt C, Yuruyen M, Tetikkurt S, et al. Propylthiouracil-induced lupus-like or vasculitis syndrome. *Multidiscip Respir Med* 2012;7:14
212. Prasad GVR, Bastacky S, Johnson JP. Propylthiouracil-induced diffuse proliferative lupus nephritis: review of immunological complications. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1205-10.
213. Kimura S, Ikeda-Saito M. Human myeloperoxidase and thyroid peroxidase, two enzymes with separate and distinct physiological functions, are evolutionary related members of the same gene family. *Proteins* 1998;3:113-20.
214. Chen M, Gao Y, Guo XH, Zhao MH. Propylthiouracil-induced antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Nat Rev Nephrol* 2012;8:476-83.
215. Gao Y, Chen M, Ye H, et al. Long-term outcomes of patients with propylthiouracil-induced anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibody-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:1515-20.
216. Bonaci-Nikolic B, Nikolic M, Andrejevic S, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated autoimmune diseases induced by antithyroid drugs: comparison with idiopathic ANCA vasculitides. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1072-81.
217. Uetrecht J. Drug-induced lupus erythematosus. In: Kuhn A, Lehmann P, Ruzicka T, editors. *Cutaneous lupus erythematosus*. Berlin: Springer; 2005.p.117-32.
218. Nassberger L, Sjöholm AG, Jonsson H, et al. Autoantibodies against neutrophil cytoplasm components in systemic lupus erythematosus and in hydralazine-induced lupus. *Clin Exp Immunol* 1990;81:380-3.
219. Nassberger L, Johansson AC, Björck S, Sjöholm AG. Antibodies to neutrophil granulocyte myeloperoxidase and elastase: autoimmune responses in glomerulonephritis and due to hydralazine treatment. *J Intern Med* 1991;229:261-5.

220. Torffvit O, Thysell H, Nassberger L. Occurrence of autoantibodies directed against myeloperoxidase and elastase in patients treated with hydralazine and presenting with glomerulonephritis. *Hum Exp Toxicol* 1994;13:563-7.
221. Choi HK, Merkel PA, Walker AM, et al. Drug-associated antineutrophil cytoplasmic antibody-positive vasculitis: prevalence among patients with high titers of antimyeloperoxidase antibodies. *Arthritis Rheum* 2000;43:405-13.
222. Dolman KM, Gans RO, Vervaat TJ, et al. Vasculitis and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies associated with propylthiouracil therapy. *Lancet* 1993;342:651-2.
223. Caulier M, Dromer C, Andrieu V, et al. Sulphasalazine-induced lupus in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1994;21:750-1.
224. Dunphy J, Oliver M, Rands AL, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies and HLA class II alleles in minocycline-induced lupus-like syndrome. *Br J Dermatol* 2000;142:461-7.
225. Petri M, Buyon J, Kim M. Classification and definition of major flares in SLE clinical trials. *Lupus* 1999;8:685-91.
226. Lamprecht P, Gause A, Gross WL. Cryoglobulinemic vasculitis. *Arthritis Rheum* 1999;42:2507-16.
227. Romero-Diaz J, Vargas-Vorackova F, Kimura-Hayama E, et al. Systemic lupus erythematosus risk factors for coronary artery calcifications. *Rheumatology* 2012;51:110-9.
228. Galezzi M, Morozzi G, Sebastiani GD, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in 566 European patients with systemic lupus erythematosus: prevalence, clinical association and correlation with other autoantibodies. *Clin Exp Rheum* 1998;16:541-6.
229. Pauzner R, Urowitz M, Gladman D, Gough J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1994;21:1670-3.
230. Schnabel A, Csernok E, Isenberg DA, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. Prevalence, specificities, and clinical significance. *Arthritis Rheum* 1995;38:633-7.

231. Nishiya K, Chikazawa H, Nishimura S, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody in patients with systemic lupus erythematosus is unrelated to clinical features. *Clin Rheumatol* 1997;16:70-5.
232. Zhao MH, Liu N, Zhang YK, Wang HY. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) and their target antigens in Chinese patients with lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2821-4.
233. Manolova I, Dancheva M, Halacheva K. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: prevalence, antigen specificity, and clinical associations. *Rheumatol Int* 2001;20:197-204.
234. Molnár K, Kovács L, Kiss M, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Dermatol* 2002;27:59-61.
235. Spronk PE, Bootsma H, Horst G, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1996;35:625-31.
236. Fauzi AR, Kong NC, Chua ML, et al. Antibodies in systemic lupus antineutrophil cytoplasmic erythematosus: prevalence, disease activity correlations and organ system associations. *Med J Malaysia*. 2004;59:372-7.
237. Yu YW, Liu ZR, Xie D, et al. Clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with lupus nephritis. 2006;26:833-6.
238. Pradhan VD, Badakere SS, Bichile LS, Almeida AF. Anti- neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in systemic lupus erythematosus: prevalence, clinical associations and correlation with other autoantibodies. *J Assoc Physicians India* 2004;52:533-7.
239. Pan HF, Fang XH, Wu GC, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in new-onset systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Inflammation* 2008;31:260-5.
240. Tamiya H, Tani K, Miyata J, et al. Defensins- and cathepsin G-ANCA in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2006;27:147-52.
241. Sinico RA, Pozzi C, Radice A, et al. Clinical significance of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for lactoferrin in renal diseases. *Am J Kidney Dis* 1993;22:253-60.

242. Manolova IM. Anti-lactoferrin antibodies in patients with connective tissue disease. *Folia Med* 2003;45:25-30.
243. Lee SS, Lawton JW, Chan CE, et al. Antilactoferrin antibody in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1992;31:669-73.
244. Caccavo D, Rigon A, Picardi A, et al. Anti-lactoferrin antibodies in systemic lupus erythematosus: isotypes and clinical correlates. *Clin Rheumatol* 2005;24:381-7.
245. Chikazawa H, Nishiya K, Matsumori A, Hashimoto K. Immunoglobulin isotypes of anti-myeloperoxidase and anti-lactoferrin antibodies in patients with collagen diseases. *J Clin Immunol* 2000;20:279-86.
246. Loch H, Skogh T, Kihlström E. Anti-lactoferrin antibodies and other types of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol* 1999 ;117:568-73.
247. Schauer C, Janko C, Munoz LE, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med* 2014;20:511-7.
248. Maueröder C, Kienhöfer D, Hahn J, et al. How neutrophil extracellular traps orchestrate the local immune response in gout. *J Mol Med (Berl)* 2015;93:727-34.
249. Li JN, Cui Z, Wang J, et al. Autoantibodies against Linear Epitopes of Myeloperoxidase in Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016;11:568-75.
250. Rutgers A, Slot M, van Paassen et al. Coexistence of anti-glomerular basement membrane antibodies and myeloperoxidase-ANCAs in crescentic glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 2005;46:253-62.
251. Apenberg S, Andrassy K, Wörner I, et al. Antibodies to neutrophil elastase: a study in patients with vasculitis. *Am J Kidney Dis* 1996;28:178-85.
252. Figueredo CM, Areas A, Sztajn bok FR, et al. Higher elastase activity associated with lower IL-18 in GCF from juvenile systemic lupus patients. *Oral Health Prev Dent* 2008;6:75-81.

253. Gaipal US, Beyer TD, Heyder P, et al. Cooperation between C1q and Dnase I in the clearance of necrotic cell-derived chromatin. *Arthritis Rheum* 2004;50:640-9.
254. Leffler J, Bengtsson AA, Blom AM. The complement system in systemic lupus erythematosus: an update. *Ann Rheum Dis* 2014;73:1601-6.
255. Gullstrand B, Mårtensson U, Sturfelt G, et al. Complement classical pathway components are all important in clearance of apoptotic and secondary necrotic cells. *Clin Exp Immunol* 2009;156:303-11.
256. Zivanovic D, Dobrosavljevic D, Nikolic M, Bonaci-Nikolic B. Cryoglobulins and multispecific antineutrophil cytoplasmic antibodies in propylthiouracil-induced necrotizing cutaneous vasculitis--a new association. *Eur J Dermatol* 2012;22:707-9.
257. Cin MO, Gursoy A, Morris Y, et al. Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibody in Graves' patients treated with propylthiouracil. *Int J Clin Pract* 2009;63:299-302.
258. Aguirre Zamorano MA, López Pedrera R, Cuadrado Lozano MJ. Drug-induced lupus. *Med Clin (Barc)* 2010;135:124-9.
259. Li MT, Zeng XJ, Fang WG, et al. Clinical characteristics of propylthiouracil (PTU)-induced antineutrophil cytoplasmic antibodies positive cases; analysis of a case of PTU-induced ANCA positive patients with hyperthyroidism. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004;84:2082-5.
260. Kobayashi S, Noh JY, Mukasa K, et al. Characteristics of agranulocytosis as an adverse effect of antithyroid drugs in the second or later course of treatment. *Thyroid* 2014;24:796-801.
261. Vedove CD, Simon JC, Girolomoni G. Drug-induced lupus erythematosus with emphasis on skin manifestations and the role of anti-TNF α agents. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2012;10:889-97.
262. Banchereau J, Pascual V, Palucka AK. Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation. *Immunity* 2004;20:539-50.

263. Gunnarsson I, Nordmark B, Hassan Bakri A, *et al.* Development of lupus-related side-effects in patients with early RA during sulphasalazine treatment—the role of IL-10 and HLA. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39:886-93.
264. Gao Y, Chen M, Ye H, *et al.* Follow-up of avidity and titre of anti-myeloperoxidase antibodies in sera from patients with propylthiouracil-induced vasculitis. *Clin Endocrinol (Oxford)* 2007;66:543-7.
265. Ye H, Zhao MH, Gao Y, Guo XH, Wang HY. Anti-myeloperoxidase antibodies in sera from patients with propylthiouracil-induced vasculitis might recognize restricted epitopes on myeloperoxidase molecule. *Clin Exp Immunol* 2004;138:179–82.
266. Gao Y, Ye H, Yu F, Guo XH, Zhao MH. Anti-myeloperoxidase IgG subclass distribution and avidity in sera from patients with propylthiouracil-induced antineutrophil cytoplasmic antibodies associated vasculitis. *Clin Immunol* 2005;117:87-93.
267. Roth AJ, Ooi JD, Hess JJ, *et al.* Epitope specificity determines pathogenicity and detectability in ANCA-associated vasculitis. *J Clin Invest* 2013;123:1773-83.
268. Yazisiz V, Ongüt G, Terzioğlu E, Karayalçın U. Clinical importance of antineutrophil cytoplasmic antibody positivity during propylthiouracil treatment. *Int J Clin Pract* 2010;64:19-24.
269. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, *et al.* Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:15880-5.
270. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Low density granulocyte: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol* 2013;35:455-63.
271. Yu Y, Su K. Neutrophil extracellular traps and systemic lupus erythematosus. *J Clin Cell Immunol* 2013;4. pii:139.
272. Capolunghi F, Rosado MM, Cascioli S, *et al.* Pharmacological inhibition of TLR9 activation blocks autoantibody production in human B cells from SLE patients. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:2281-9.
273. Takeshita H, Soejima M, Koda Y, *et al.* Gln222Arg (A2317G) polymorphism in the deoxyribonuclease I gene exhibits ethnic and functional differences. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:51-5.

274. Dittmar M, Bischofs C, Matheis N, Poppe R, Kahaly GJ. A novel mutation in the DNASE1 gene is related with protein instability and decreased enzyme activity in thyroid autoimmunity. *J Autoimmun* 2009;32:7-13.
275. Dittmar M, Woletz K, Kahaly GJ. Reduced DNASE1 gene expression in thyroid autoimmunity. *Horm Metab Res* 2013;45:257-60.
276. Lachmann PJ. The in vivo destruction of antigen--a tool for probing and modulating an autoimmune response. *Clin Exp Immunol* 1996;106:187-9.
277. Baranovskii AG, Buneva VN, Nevinsky GA. Human deoxyribonucleases. *Biochemistry (Mosc)* 2004;69:587-601.
278. Kawai Y, Yoshida M, Arakawa K, *et al.* Diagnostic use of serum deoxyribonuclease I activity as a novel early-phase marker in acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;109:2398-400.
279. Laponi MJ, Caresita A, Landoni VI, *et al.* Regulation of neutrophil extracellular trap formation by anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2013;345:430-7.

PRILOG 1 - SLEDAI - 2K (167)

Vrednost deskriptora se unosi ukoliko je simptom/znak bio prisutan prilikom pregleda ili u prethodnih 10 dana.

SLEDAI 2K		Descriptor	Definition
Weight	SCORE		
8	_____	Seizure	Recent onset, exclude metabolic, infectious or drug causes.
8	_____	Psychosis	Altered ability to function in normal activity due to severe disturbance in the perception of reality. Include hallucinations, incoherence, marked loose associations, impoverished thought content, marked illogical thinking, bizarre, disorganized, or catatonic behavior. Exclude uremia and drug causes
8	_____	Organic brain syndrome	Altered mental function with impaired orientation, memory, or other intellectual function, with rapid onset and fluctuating clinical features, inability to sustain attention to environment, plus at least 2 of the following: perceptual disturbance, incoherent speech, insomnia or daytime drowsiness, or increased or decreased psychomotor activity. Exclude metabolic, infectious, or drug causes.
8	_____	Visual disturbance	Retinal changes of SLE. Include cytoid bodies, retinal hemorrhages, serous exudate or hemorrhages in the choroid, or optic neuritis. Exclude hypertension, infection, or drug causes.
8	_____	Cranial nerve disorder	New onset of sensory or motor neuropathy involving cranial nerves.
8	_____	Lupus headache	Severe, persistent headache; may be migrainous, but must be nonresponsive to narcotic analgesia.
8	_____	CVA	New onset of cerebrovascular accident(s). Exclude arteriosclerosis.
8	_____	Vasculitis	Ulceration, gangrene, tender finger nodules, periungual infarction, splinter hemorrhages, or biopsy or angiogram proof of vasculitis.
4	_____	Arthritis	≥ 2 joints with pain and signs of inflammation (i.e., tenderness, swelling or effusion).
4	_____	Myositis	Proximal muscle aching/weakness, associated with elevated creatine phosphokinase/aldolase or electromyogram changes or a biopsy showing myositis.

PRILOG 1 - SLEDAI - 2K, nastavak

4	_____	Urinary casts	Heme-granular or red blood cell casts.
4	_____	Hematuria	>5 red blood cells/high power field. Exclude stone, infection or other cause.
4	_____	Proteinuria	>0.5 gram/24 hours
4	_____	Pyuria	>5 white blood cells/high power field. Exclude infection.
2	_____	Rash	Inflammatory type rash.
2	_____	Alopecia	Abnormal, patchy or diffuse loss of hair.
2	_____	Mucosal ulcers	Oral or nasal ulcerations.
2	_____	Pleurisy	Pleuritic chest pain with pleural rub or effusion, or pleural thickening.
2	_____	Pericarditis	Pericardial pain with at least 1 of the following: rub, effusion, or electrocardiogram or echocardiogram confirmation.
2	_____	Low complement	Decrease in CH50, C3, or C4 below the lower limit of normal for testing laboratory
2	_____	Increased DNA binding	Increased DNA binding by Farr assay above normal range for testing laboratory.
1	_____	Fever	>38o C. Exclude infectious cause.
1	_____	Thrombocytopenia	<100,000 platelets / x109/L, exclude drug causes.
1	_____	Leukopenia	< 3,000 white blood cells / x109/L, exclude drug causes.

TOTAL SCORE: _____

SKRAĆENICE

PMN	- polimorfonuklearni neutrofilni leukociti
DĆ	- dendritične ćelije
APĆ	- antigen prezentujuće ćelije
NK	- natural killer cells
TNF	- tumor necrosis factor
TLR	- Toll-like receptori
HOCL	- hipohlorna kiselina
H2O2	- vodonik peroksid
NADH	- nikotinamid adenin dinukleotid
NOX	- NADPH oksidaze
IFN	- interferon
IL	- interleukin
DNK	- dezoksiribonukleinska kiselina
FcγR	- Fc fragment imunoglobulina G
LL37	- katelicidin peptid
ANCA	- antineutrofilna citoplazmatska antitela
MPO	- mijeloperoksidaza
PR3	- proteinaza 3
El	- elastaza
Lf	- laktoferin
Cat-G	- katepsin-G
BPI	- bactericidal/permeability increasing protein
NSP	- neutrofilna serin proteaza
MMP-1	- kolagenaza
MMP-2	- želatinaza
MMP-3	- stromelizin
BlyS	- B lymphocyte stimulator
NETs	- neutrophil extracellular traps
PAD	- peptidilarginin deiminaza
Dnaza	- dezoksiribonukleaza
DNASE*	- gen za DNazu
HLA	- humani leukocitni antigen
MHC	- major histocompatibility complex
PTU	- propiltiouracil
TPO	- tiroid peroksidaza
ANA	- antinukleusna antitela
dsDNK	- double-stranded DNA
Sm	- Smith
C	- komponenta komplementa
aCL	- antikardiolipinska antitela
ENA	- ekstraktibilni nuklearni antigeni
SLE	- sistemski lupus erythematosus
DLE	- diskoidni lupus erythematosus
CHLE	- chilblain lupus erythematosus

LEP	- lupus erythematosus profundus
LLS	- lupus-like sindrom
LILLS	- lekom indkovan lupus-like sindrom
AAD	- ANCA-associated diseases
SVV	- small vessel vasculitis
MPA	- mikroskopski poliangiitis
GPA	- granulomatoza sa poliangiitisom
WG	- Wegenerova granulomatoza
GN	- glomerulonefritis
FSNGN	- fokalno segmentni nekrotizujući glomerulonefritis
RPGN	- rapidno progresivni glomerulonefritis
GBM	- glomerular basement membrane
LN	- lupus nephritis
GCF	- gingival crevicular fluid
JSLE	- juvenilni SLE
AIH	- autoimunski hepatitis
ARDS	- akutni respiratorni distress sindrom
ALI	- acute lung injury
CF	- cistična fibroza
HBV	- hepatitis B virus
HCV	- hepatitis C virus
IIF	- indirektna imunofluorescencija
ELISA	- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HEp	- humane epitelne ćelije
SEM	- scanning elektronska mikroskopija
ACR	- American College of Rheumatology
SLEDAI	- Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SLEDAI-2K	- modifikovan SLEDAI
BILAG	- British Isles Lupus Assessment Group index
SLAM	- Systemic Lupus Activity Measure
ECLAM	- European Consensus Lupus Activity Measure
SLICC	- Systemic Lupus International Collaborating Clinics Damage Index
Se	- senzitivnost
Sp	- specifičnost
NPV	- negativna prediktivna vrednost
PPV	- pozitivna prediktivna vrednost
ANOVA	- jednosmerna analiza varijanse
SPSS	- Statistical Package for Social Sciences

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Mirjana Gajić-Veljić rođena je 1970. godine u Šapcu. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu u Beogradu 1996. godine sa prosečnom ocenom 8,63. Magistarsku tezu iz dermatovenerologije pod nazivom "Autoimunske bulozne dermatoze dečijeg doba sa subepidermalnim rascepom – korelacija kliničkih, histopatoloških i imunopatoloških parametara" pod mentorstvom profesora Miloša Nikolića odbranila je 2004. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Specijalistički staž iz dermatovenerologije obavila je na Medicinskom fakultetu u Beogradu od 1998. do 2001. godine, kada je položila specijalistički ispit sa odličnim uspehom. Zaposlena je na Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu od 2001. godine i radi na odeljenju pedijatrijske dermatologije. U zvanje asistenta pri Katedri dermatovenerologije Medicinskog fakulteta u Beogradu izabrana je 2005. godine, a od 2012. do 2015. godine bila je sekretar Katedre dermatovenerologije Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Aktivno je učestvovala kao organizator i predavač na brojnim domaćim i međunarodnim simpozijumima i kongresima. Učestvovala je kao predavač po pozivu na XI Prolećnom Simpozijumu EADV 2014. godine. Autor je i koautor brojnih naučnih publikacija i radova u domaćim i inostranim časopisima. Bila je mentor u većem broju studentskih radova. Od 2011. godine saradnik je na projektu Ministarstva za nauku Republike Srbije.

Član je predsedništva, a od 2004. do 2008. godine i sekretar Dermatovenerološke sekcije Srpskog lekarskog društva. Član je Udruženja dermatovenerologa Srbije, Evropskog udruženja dermatovenerologa (EADV), Društva medicinskih mikologa Srbije i Balkanskog udruženja za dermoskopiju.

Govori engleski jezik. Udata je, majka jednog dečaka.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a **Mirjana Gajić-Veljić**

broj upisa _____

Izjavljujem

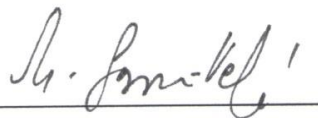
da je doktorska disertacija pod naslovom

„Antineutrofilna citoplazmatska antitela – značaj za dijagnozu i procenu aktivnosti sistemskog lupusa i lupusa indukovano lekom“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19. februara 2016. godine



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Mirjana Gajić-Veljić**

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada „Antineutrofilna citoplazmatska antitela – značaj za dijagnozu i procenu aktivnosti sistemskog lupusa i lupusa indukovanog lekom“

Mentor **Prof. dr Miloš Nikolić**

Potpisana **Mirjana Gajić-Veljić**

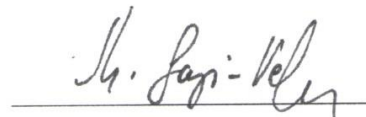
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19. februara 2016. godine



Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Antineutrofilna citoplazmatska antitela – značaj za dijagnozu i procenu aktivnosti sistemskog lupusa i lupusa indukovanoog lekom“

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

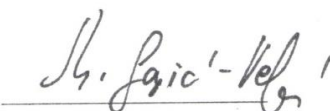
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19. februara 2016. godine



Original article

Importance of low serum DNase I activity and polyspecific anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in propylthiouracil-induced lupus-like syndrome

Mirjana Gajic-Veljic^{1,2,*}, Branka Bonaci-Nikolic^{1,3,*}, Branislav Lekic²,
Dusan Skiljevic^{1,2}, Jasmina Ciric^{1,4}, Svetlana Zoric⁴, Biljana Stojimirovic^{1,5} and
Milos Nikolic^{1,2}

Abstract

Objective. To study the role of deoxyribonuclease (DNase) I activity and ANCA in propylthiouracil (PTU)-induced lupus-like syndrome (LLS).

Methods. We compared 36 SLE patients with 17 PTU-induced LLS patients diagnosed from 2008 to 2014. We studied ANCA profile (MPO, PR3, lactoferrin, CTG, elastase, bactericidal/permeability-increasing protein), anti-dsDNA, anti-ENA, anti-nucleosome, anti-histone, anti-C1q, anti-aCL, complement components, cryoglobulins and serum DNase I activity. Healthy persons and patients without LLS treated with PTU comprised the control groups. Twelve LLS patients were serologically and clinically followed for 4.1 (s.d. 2.0) years.

Results. PTU-induced LLS patients less frequently had arthritis, renal and neurological manifestations, but more frequently had fever, purpura, urticarial-like vasculitis and ulceration ($P < 0.01$). PTU-induced LLS patients more frequently had polyspecific ANCA (anti-MPO, anti-elastase and anti-PR3 were most commonly detected) ($P < 0.01$). SLE patients more frequently had anti-dsDNA, anti-ENA, anti-nucleosome, anti-C1q ($P < 0.01$) and anti-histone antibodies ($P < 0.05$). PTU-induced LLS patients had lower DNase I activity than SLE patients and controls ($P < 0.01$). Discontinuation of PTU increased DNase I activity, although it did not reach the levels of controls ($P < 0.01$). After remission, MPO-ANCA decreased ($P < 0.01$), but persisted for a long time.

Conclusion. PTU, as a trigger, and low DNase I activity, as a predisposing factor, may lead to LLS. Polyspecific ANCAs are useful markers for differentiating SLE from PTU-induced LLS. Low DNase I activity might be an important prognostic biomarker for PTU-induced LLS. Monitoring of ANCA and DNase I activity may prevent long-lasting exposure to causal drugs, unnecessary immunosuppressive therapy and severe complications of LLS.

Key words: systemic lupus erythematosus, lupus-like syndrome, propylthiouracil, deoxyribonuclease I (DNase I), anti-neutrophil cytoplasmic antibodies.

Rheumatology key messages

- Polyspecific ANCAs in propylthiouracil-induced lupus-like syndrome are significantly more prevalent than in SLE.
- DNase I activity in lupus-like syndrome is significantly lower than in SLE and healthy controls.
- Propylthiouracil and low DNase I activity may lead to lupus-like syndrome.

¹Faculty of Medicine, University of Belgrade, ²Clinic of Dermatovenereology, ³Clinic of Allergy and Clinical Immunology, ⁴Clinic of Endocrinology and ⁵Clinic of Nephrology, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia

Submitted 1 December 2014; revised version accepted 28 May 2015

*Mirjana Gajic-Veljic and Branka Bonaci-Nikolic contributed equally to this study.

Correspondence to: Milos Nikolic, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Clinic of Dermatovenereology, Clinical Center of Serbia, Pasterova 2, 11000 Belgrade, Serbia.
E-mail: milos.nikolic@med.bg.ac.rs

Introduction

ANCAs are specific for proteases or cationic proteins such as PR3, neutrophil elastase (NE), CTG, MPO, lactoferrin (Lf), azurocidin, lysozyme and bactericidal/permeability-increasing (BPI) protein [1]. ANCAs specific for PR3 and MPO are serological markers of granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis, respectively. Also, ANCA can be detected in drug-induced autoimmune syndromes, infections, inflammatory bowel and CTDs [1].

SLE is an autoimmune disease characterized by the production of various autoantibodies, the deposition of immune complexes with subsequent complement activation and multi-organ damage. Approximately 10% of lupus-like syndromes (LLS) are associated with drug exposure [2]. Drug-induced LLS is temporally related to drug introduction and resolves after discontinuation of the offending drug. LLS is most frequently induced by hydralazine, procainamide, quinidine, isoniazid, minocycline, TNF- α inhibitors, IFN- α , propylthiouracil (PTU), etc. [2–6]. Drug-induced LLS is characterized by positive ANA and anti-histone antibody [7]. PTU and minocycline have been associated with pANCA in LLS patients, but with conflicting results regarding their pathogenic role, prevalence, target antigens and clinical associations [4, 8, 9].

The mechanism of PTU-induced ANCA production is not well understood. Dysregulation of neutrophil extracellular traps (NETs) could be involved in the pathogenesis of PTU-induced LLS [10, 11]. NETs, an important component of innate immunity, are composed of chromatin and neutrophil proteins (MPO, PR3, NE, CTG, Lf, etc.). Degradation of NETs is regulated by deoxyribonuclease I (DNase I) [12, 13]. A subgroup of SLE patients digests NETs poorly because of their low DNase I activity [14, 15]. Unlike SLE, the importance of DNase I activity in the pathogenesis of drug-induced LLS has not been elucidated. Long-lasting exposure to drugs that induce ANCA may result in severe, life-threatening complications [16, 17].

In this study, we compared clinical and serological data and DNase I activity of 36 SLE patients with those of 17 PTU-induced LLS patients. In addition, we examined how the discontinuation of PTU changes the clinical

presentation, immunoserological profile and the DNase I activity of PTU-induced LLS. This is the first report that validates the importance of serum DNase I activity as a new prognostic and diagnostic marker of ANCA-associated PTU-induced LLS.

Patients

Our retrospective study included 53 patients diagnosed, treated and followed up at the Clinical Center of Serbia (Departments of Dermatovenereology, Nephrology and Endocrinology), from January 2008 to June 2014. A total of 36 of 53 (68%) SLE patients were diagnosed according to the ACR criteria [18]; the remaining 17 of 53 (32%) patients had ANCA-associated PTU-induced LLS. The control groups consisted of 22 healthy persons and 10 ANCA-negative PTU-treated patients with autoimmune hyperthyroidism. There were no significant differences in age, gender or duration of PTU treatment between the patients and the controls. The Ethics Committee of the Clinical Center of Serbia approved the study.

Our study included 36 consecutive SLE patients (Table 1) who met the following inclusion criteria: newly diagnosed disease (9/36) or SLE in relapse (27/36) not treated with CYC or methylprednisolone pulses for at least three months previously. Lupus flare was defined as any increase in the SLEDAI-2K score by at least 3 points in comparison with the previous visit [19]. Of these 36 SLE patients, 15 were without systemic therapy. Maintenance therapy included low-dose prednisone (20 mg/48 h) in 6 of 36, low-dose prednisone with HCQ in 2 of 36 and only HCQ in 13 of 36.

The most important data for 17 patients with PTU-induced LLS are summarized in Table 1. The diagnosis was established according to the presence of SLE criteria related to drug exposure that resolved after discontinuation of the drug, with or without use of immunosuppressants [5]. All patients must have had at least 3 of 11 ACR criteria for SLE (ANA was the obligatory criterion). Of these 17 patients, 12 were on maintenance PTU therapy (50–150 mg/day), while 5 of 17 patients were treated with high-dose PTU (300–400 mg/day), and 8 of 17 patients were on intermittent PTU. After PTU

TABLE 1 Demographic and clinical data of SLE and PTU-induced LLS patients

Variable	SLE (n = 36)	PTU-induced LLS (n = 17)
Female, sex, n (%)	29 (80.5)	15 (88.23)
Age, mean (s.d.) (range), years	40.8 (16) (16–78)	38.9 (12) (24–64)
SLEDAI-2K, mean (s.d.) (range)	8.3 (4.7) (4–20)	—
New-onset SLE, n (%)	9 (25)	—
SLE duration, mean (s.d.) (range), months	60.8 (58.8) (1–240)	—
Graves' disease/Hashimoto thyroiditis, n	—	13/4
PTU therapy duration, months: median (range)	—	36 (14–108)
Time of clinical follow-up, mean (s.d.) (range), months	22.3 (8.1) (13–39)	49.6 (24.7) (10–77)
Relapses during follow-up, n	40	0**

** $P < 0.01$. PTU: propylthiouracil; LLS: lupus-like syndrome

discontinuation, clinical remission was achieved in all patients after 4 (s.d. 2) months (range 3 weeks to 8.5 months). Remission was achieved in 10 of 17 patients only with discontinuation of PTU. Seven of the 17 patients received systemic CSs (i.v. methylprednisolone pulses in two patients, and oral prednisone at 1 mg/kg over 8 weeks, with gradual tapering in five patients). After achieving remission of LLS, 5 of 17 patients were treated with radioactive iodine, and 4 of 17 were treated surgically. Twelve of the 17 patients were followed for 4.1 (s.d. 2.0) years (range 1.2–6.1 years).

Methods

Immunoserological parameters

Serum samples were analysed for IgG ANCA against six neutrophil proteins—MPO, PR3, NE, CTG, Lf and BPI—using semi-quantitative solid-phase ELISA (ANCA-Profile, Euroimmun, Lübeck, Germany). According to the ratio values of optical densities (sample/cut-off) for each antigen, the patients were classified as: negative, low positive, medium positive or highly positive. MPO-ANCA and PR3 ANCA concentrations (cut-off 20 U/ml) were studied by direct quantitative ELISA (Euroimmun).

IgG ANA was detected by IIF using HEp-2 cells (Euroimmun). IgG anti-dsDNA antibodies were determined by IIF (*Crithidia luciliae*, Euroimmun) and by ELISA for high-avidity IgG anti-dsDNA (cut-off 90 U/ml) (Genesis Diagnostics, Ely, UK). Concentrations of anti-ENAs (Sm/RNP, RNP, SSA, SSB) were measured (cut-off 20 U/ml) by ELISA (Euroimmun). Antihistone (cut-off 40 U/ml), antinucleosomal (cut-off 20 U/ml), anti-C1q (cut-off 10 U/ml), IgG/IgM aCL (cut-off 10 GPL U/ml and 7 MPL U/ml, respectively) and IgG/IgM anti- β 2 glycoprotein I (cut-off 8 U/ml) were measured by ELISA (Orgentec Diagnostika GmbH, Mainz, Germany).

Concentrations of C3 (normal 0.8–1.8 g/l) and C4 (normal 0.1–0.4 g/l) complement components were measured by nephelometry (Binding Site, Birmingham, UK). The presence of cryoglobulins was investigated by standard procedure [20].

DNase I activity

Serum DNase I activity was determined by ELISA (Orgentec Diagnostika GmbH) that measured degradation of the immobilized DNase substrate, formation of enzyme conjugate complexes using horseradish peroxidase conjugate solution, and enzymic colour reaction. The amount of colour was inversely proportional to the DNase I activity in the sample. The DNase I activity of 22 healthy persons was 67.24 (s.d. 13.19%/ml).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 20.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Descriptive statistics and statistical tests for related and unrelated samples were used (χ^2 -test, Fisher's exact test, McNemar test, Mann-Whitney *U*-test, Wilcoxon test, Kruskal-Wallis test and the *t*-test). For the comparison

of DNase I activity between SLE patients, LLS patients and healthy controls, one-way analysis of variance was used. For comparison of DNase I activity between the two groups of LLS patients (active phase and remission) and the controls, the Kruskal-Wallis test with post comparison of pairs using the Mann-Whitney *U*-test was employed. Correlations between DNase I activity and auto-antibodies were examined using Pearson's correlation test and Spearman's rank correlation coefficient. Probability (*P*) values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Clinical manifestations of SLE and PTU-induced LLS

Clinical characteristics of SLE and PTU-induced LLS patients are presented in Table 2. None of the 17 PTU-induced LLS patients had kidney, serous membranes or CNS involvement. Skin was affected in 72.2% of patients with SLE and 88.2% of patients with LLS. Purpura and urticaria-like vasculitis were present in 58.8%, while necrotizing vasculitis was present in 29.4% of LLS patients. Patients with severe clinical presentation, besides ANA and ANCA, had cryoglobulins, aCL and low complement.

Immunoserological parameters in SLE and PTU-induced LLS patients

ANAs were present in all patients with SLE and in all patients with PTU-induced LLS, but the median values of ANA titres were significantly higher in SLE than in LLS

TABLE 2 Clinical manifestations in SLE and PTU-induced LLS patients

Organ involvement	SLE (n = 36)	PTU-induced LLS (n = 17)
General		
Fever >38.5°C, n (%)	9 (25)	11 (64.7)**
Mucocutaneous changes, n (%)	26 (72.2)	15 (88.2)
Malar rash, n (%)	16 (44.4)	0**
DLE, n (%)	7 (19.4)	0**
SCLE, n (%)	1 (2.8)	0
Purpura, urticaria like-vasculitis, ulcerations, n (%)	4 (2.8)	15 (88.2)**
Urticaria, n (%)	1 (2.8)	0
Oral ulcerations, n (%)	3 (8.3)	0
Arthritis, n (%)	14 (38.9)	1 (5.9)*
Renal disease, n (%)	17 (47.2)	0**
CNS affection, n (%)	3 (8.3)	0
Cytopenia, n (%)	17 (47.2)	8 (47.1)
Haemolytic anaemia, n (%)	2 (5.6)	0
Leucopenia, n (%)	17 (47.2)	6 (35.3)
Thrombocytopenia, n (%)	9 (25)	2 (11.8)
Polyserositis, n (%)	4 (11.1)	0

P* < 0.05, *P* < 0.01. PTU: propylthiouracil; LLS: lupus-like syndrome.

TABLE 3 Immunoserological parameters of SLE and PTU-induced LLS patients

Serological parameter	SLE (n = 36)	PTU-induced LLS (n = 17)
ANA (IIF), n (%)	36 (100)	17 (100)
ANA titre, median (range)	320 (0–640)	80 (40–640)**
Anti-dsDNA (IIF), n (%)	24 (66.7)	0**
High-avidity anti-dsDNA, n (%)	20 (55.6)	1 (5.9)**
Anti-ENA, n (%)	25 (78.1)	3 (17.6)**
Anti-histone, n (%)	11 (30.6)	1 (5.9) *
Anti-nucleosome, n (%)	33 (91.7)	3 (17.6) **
Anti-C1q, n (%)	23 (63.9)	3 (17.6)**
Low C3, n (%)	23 (63.9)	6 (35.3)
Low C4, n (%)	13 (36.1)	5 (29.4)
Cryoglobulins, n (%)	16 (44.4)	8 (47.1)
aCL IgG, n (%)	5 (13.9)	6 (35.3)
aCL IgM, n (%)	3 (8.3)	7 (41.2)**
Anti-β2-glycoprotein IgG, n (%)	1 (2.8)	0
Anti-β2-glycoprotein IgM, n (%)	2 (5.6)	2 (12.5)
ANCA profile positivity, n (%)	9 (25)	17 (100)**
Anti-MPO, median (range), U/ml	1.1 (0.4–8.6)	68.8 (17.9–200.0)**
Anti-PR3, median (range), U/ml	1.05 (0.1–3.0)	5.6 (0.8–79.2)**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. PTU: propylthiouracil; LLS: lupus-like syndrome.

patients ($P < 0.01$) (Table 3). Also, patients with SLE more frequently had ENA, anti-dsDNA (IIF), high-avidity anti-dsDNA, anti-histone ($P < 0.05$), anti-nucleosome and anti-C1q ($P < 0.01$) than patients with LLS (Table 3). The median values of ENA, high-avidity anti-dsDNA, anti-nucleosome ($P < 0.01$) and anti-C1q levels were significantly higher in SLE than in LLS patients ($P < 0.05$). Although there was no difference in the frequency of low complement and IgG aCL positivity, PTU-induced LLS patients had a significantly higher average concentration of C3 ($P < 0.01$) and a significantly higher median concentration of IgG/IgM aCL ($P < 0.01$).

ANCA profile of SLE and PTU-induced LLS patients

Polyspecific ANCAs were more frequently found in PTU-induced LLS than in SLE patients ($P < 0.01$) (Fig. 1A). Polyspecific ANCAs were detected in 82.4% of LLS patients, whereas only 17.6% had monospecific ANCAs. LLS patients more frequently had MPO-, PR3- and NE-ANCAs in comparison with SLE patients ($P < 0.01$) (Fig. 1B). All LLS patients were ANCA-positive for at least one antigen (ELISA). High concentrations of MPO-, NE- and PR3-ANCAs were present in 47%, 29% and 6% of LLS patients, respectively. BPI-, CTG- and Lf-ANCAs in

LLS patients were present in medium or low concentrations. ANCAs had significantly higher sensitivity (100%) than anti-histone antibodies (6%) for PTU-induced LLS.

Contrary to PTU-induced LLS, most SLE patients were ANCA negative (Fig. 1A). Lf ANCAs were found in 25% of SLE patients. In SLE patients, polyspecific ANCAs (BPI- and Lf-ANCAs) were found in 2.8% of patients, and monospecific Lf-ANCAs in 22.2%. Only 5.5% had Lf-ANCAs in medium and 19.4% in low concentrations. There were no significant differences in the frequency of Lf-, BPI- or CTG-ANCA positivity between SLE and LLS patients.

Immunoserological parameters in active PTU-induced LLS and in remission

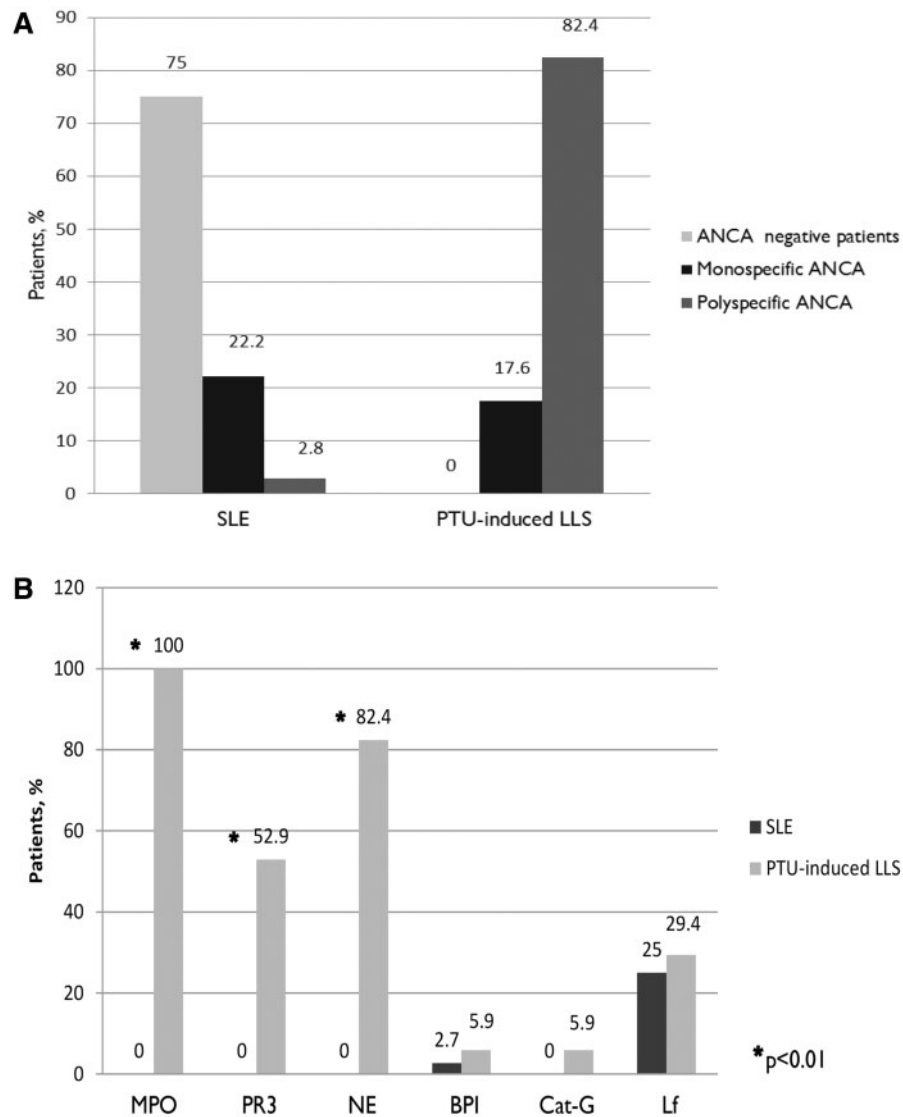
LLS patients in remission, after PTU discontinuation, less frequently had ANA, low C3, cryoglobulins ($P < 0.05$) and IgM aCL ($P < 0.01$) positivity in comparison with active LLS patients (Table 4). Also, LLS patients in remission had lower levels of anti-histone, anti-nucleosome and IgG/IgM aCL ($P < 0.05$).

After discontinuation of PTU, the number of patients with polyspecific ANCA decreased from 91.7% to 50%. Conversely, the number of patients with monospecific ANCA increased (from 8.3% to 50%). The frequency of NE-ANCA positivity ($P < 0.05$) and the level of MPO-ANCA ($P < 0.01$) and PR3-ANCA ($P < 0.05$) decreased significantly after PTU discontinuation (Table 4), but 25% of LLS patients remained highly MPO-ANCA positive. After PTU discontinuation, the frequency of PR3-, NE-, Lf- and BPI- ANCA-negative patients increased (Table 4).

DNase I activity in SLE and PTU-induced LLS patients

Serum DNase I activity in PTU-induced LLS was significantly lower in comparison with SLE patients and healthy controls (Fig. 2A). Serum DNase I activity was significantly lower in SLE patients compared with healthy controls (Fig. 2A). There was a significant difference between the frequencies of low DNase I activity in LLS patients (100%), SLE patients (58%) and healthy controls (18%) ($P < 0.01$). In PTU-induced LLS, there was no correlation between the DNase I activity and ANA titres, levels of MPO-ANCA, PR3-ANCA, anti-histone antibodies or anti-nucleosome antibodies.

Patients with active LLS had significantly lower DNase I activity than LLS patients in remission ($P < 0.01$), healthy controls ($P < 0.01$) and PTU-treated patients without LLS ($P < 0.01$) (Fig. 2B). On the other hand, in patients with moderate to severe SLE (SLEDAI-2K ≥ 7), serum DNase I activity [59.7 (14.3%/ml)] was higher than in patients with milder (SLEDAI-2K ≤ 6) SLE [46.5 (12.6%/ml)] ($P < 0.05$). It is important to stress that the DNase I activity did not reach the levels found in healthy individuals. LLS patients in remission had lower DNase I activity than the healthy controls and PTU-treated patients without LLS ($P < 0.01$) (Fig. 2B).

Fig. 1 ANCA profile in SLE and PTU-induced LLS

(A) The frequency of monospecific, polyspecific and negative ANCA in SLE and PTU-induced LLS patients. **(B)** ANCA profile in SLE and PTU-induced LLS. * $P < 0.01$. PTU: propylthiouracil; LLS: lupus-like syndrome; NE: neutrophil elastase; BPI: bactericidal/permeability-increasing protein; Lf: lactoferrin.

Discussion

The epidemiological and clinical data showed that environmental factors, including various infections (bacterial endocarditis, HCV), silica, asbestos and drugs (especially anti-thyroid) may be associated with the development of ANCA-associated diseases (AADs). Prolonged, intermittent and high-dose PTU treatment may induce ANCA-associated vasculitis and LLS [21]. In our LLS group, 5 of 17 patients were treated with high-dose PTU, while 8 of 17 patients received intermittent PTU therapy. The higher number of women in the PTU-treated group (Table 1) is due to the predominantly female sex of patients with autoimmune thyroid diseases. It is well known

that females are more prone to breakdown of tolerance, including drug-induced autoimmunity [22]. Approximately 30% of patients on long-term PTU treatment [11.7 (s.d. 6.1) months] become ANCA positive, but only some 10% of ANCA-positive patients develop AADs [22]. During a 6.5-year period, we diagnosed PTU-induced LLS in 17 patients (median PTU treatment period 36 months) (Table 1).

The clinical and serological manifestations of idiopathic SLE and PTU-induced LLS are often overlapping. Although the differential diagnosis is difficult, we showed that CNS manifestations, renal involvement and polyserositis are absent in PTU-induced LLS, contrary to idiopathic SLE (Table 2). Although CNS and renal

TABLE 4 Immunoserological parameters: PTU-induced LLS in active phase vs PTU-induced LLS in remission

Serological parameters	PTU-induced LLS, active phase (n = 12)	PTU-induced LLS, remission (n = 12)
ANA, n (%)	12 (100)	7 (58.3)*
ANA titre, median (range)	60 (40–160)	40 (0–640)
Anti-dsDNA (IIF), n (%)	0	0
High-avidity anti-dsDNA, n (%)	1 (8.3)	1 (8.3)
Anti-ENA, n (%)	2 (16.7)	2 (16.7)
Anti-histone, n (%)	0	0
Anti-nucleosome, n (%)	2 (16.7)	0
Anti-C1q, n (%)	2 (20.0)	3 (33.3)
Low C3, n (%)	6 (50.0)	1 (8.3)*
Low C4, n (%)	4 (33.3)	1 (8.3)
Cryoglobulins, n (%)	7 (58.3)	2 (16.7)*
aCL IgG, n (%)	4 (33.3)	3 (25.0)
aCL IgM, n (%)	6 (50.0)	0**
Anti-β2-glycoprotein IgG, n (%)	0	0
Anti-β2-glycoprotein IgM, n (%)	1 (8.3)	1 (8.3)
ANCA profile positivity, n (%)	12 (100)	12 (100)
Monospecific ANCA, n (%)	1 (8.3)	6 (50)
Polyspecific ANCA, n (%)	11 (91.7)	6 (50)
MPO, n (%)	12 (100)	12 (100)
Low	2 (16.7)	7 (58.3)
Medium	5 (41.7)	2 (16.7)
High	5 (41.7)	3 (25)
PR3, n (%)	7 (58.3)	3 (25)
Low	3 (25)	2 (16.7)
Medium	4 (33.3)	1 (8.3)
NE, n (%)	11 (91.7)	5 (41.7)*
Low	4 (33.3)	2 (16.7)
Medium	6 (50.0)	1 (8.3)
High	1 (8.3)	2 (16.7)
BPI, n (%)	1 (8.3)	0
Low	1 (8.3)	0
CTG, n (%)	1 (8.3)	1 (8.3)
Low	1 (8.3)	1 (8.3)
Lf, n (%)	4 (33.3)	2 (16.7)
Low	3 (25.0)	2 (16.7)
Medium	1 (8.3)	0
MPO-ANCA (U/ml), median (range), cut-off 20 U/ml	67.7 (17.9–100.0)	37.25 (22–105.5)**
PR3-ANCA (U/ml), median (range), cut-off 20 U/ml	12.95 (0.8–75.5)	6.5 (1.2–38.3)*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. PTU: propylthiouracil; LLS: lupus-like syndrome; NE: neutrophil elastase; BPI: bactericidal/permeability-increasing protein; Lf: lactoferrin; DNase I: deoxyribonuclease I.

involvement are usually absent [5, 23], there are a few reports of renal involvement in PTU-induced LLS [9, 24]. Cytopenia, especially leucopenia, is present in both groups of patients [25]. We confirmed the previous finding

that cutaneous manifestations may help in the early diagnosis of PTU-induced LLS [5, 7, 9]. Malar rash, discoid rash, subacute cutaneous lesions (annular-polycyclic and/or psoriasiform) and oral ulcerations have been found in SLE (Table 2). On the other hand, urticaria-like vasculitis, purpura and skin ulcers may be present in both diseases, but these lesions are more common in PTU-induced LLS [26].

The typical laboratory profile of drug-induced LLS includes positive ANA with a homogeneous pattern and anti-histone antibodies, whereas anti-dsDNA and anti-ENA are usually absent [27]. SLE patients more frequently had anti-dsDNA, anti-ENA, anti-histone, anti-nucleosome and anti-C1q antibodies (Table 3), the profile typical of the SLE-associated IFN α signature [28]. We showed a significantly higher prevalence of IgG ANCAs in PTU-induced LLS in comparison with idiopathic SLE (Table 3). The majority of idiopathic SLE patients were ANCA negative, and only 25% had solely Lf-ANCAs (Fig. 1). In contrast to idiopathic SLE, all our PTU-induced LLS patients were ANCA positive, and they more frequently had polyspecific ANCAs (Fig. 1A). MPO, NE and PR3 were the most frequent target antigens in LLS patients (Fig. 1B). As shown previously [9, 16], MPO-ANCA is the most sensitive diagnostic marker for PTU-induced LLS (Table 3). Contrary to the typical serological profile of drug-induced LLS, we found that ANCAs had a significantly higher sensitivity than anti-histone antibodies for PTU-induced LLS. Compared with other drugs, PTU rarely induces anti-histone antibodies [6]. HLA haplotypes and increased IL-10 levels are important for the specific serological profile of drug-induced LLS [29].

Drug-induced LLS, if diagnosed in time, has a milder course and usually does not require cytotoxic therapy [7]. In our patients, all clinical manifestations of LLS resolved after the PTU withdrawal, without immunosuppressive therapy in 10 of 17 patients, while short CS therapy was necessary in 7 of 17 patients. Contrary to idiopathic SLE, no relapses of LLS occurred during follow-up, even after the discontinuation of immunosuppressive therapy (Table 1). After PTU withdrawal, the frequency of positive ANA, IgM aCL, cryoglobulins and low C3 decreased in comparison with patients in the active phase of LLS (Table 4). Contrary to these serological markers, all our LLS patients, despite clinical remission, remained ANCA positive, with equal distribution of polyspecific and monospecific ANCAs (Table 4). Although MPO-ANCA persisted for a long time, the level of MPO significantly decreased after PTU withdrawal (Table 4). High MPO-ANCA concentration may persist for months or even years after PTU withdrawal [30]. PTU-induced MPO-ANCAs recognize different epitopes of MPO in the active phase and remission of AAD [31]. The ANCA avidity decreased more rapidly than the ANCA titre, but the avidity of MPO-ANCA correlates better with the clinical manifestations of disease [32]. Also, the concentration of IgG MPO-ANCA did not decrease simultaneously with the MPO-ANCA IgG4 subclass, which became negative early in clinical remission [33]. The

MPO-ANCA IgG4 subclass, which turned negative after cessation of PTU, suggested that the high level of MPO-ANCA might be associated with repeated PTU administration [32], present in 8 of 17 of our PTU-induced LLS patients.

PTU is a heterocyclic thiouracil-derived drug with strong anti-thyroid effects. The thiol group in PTU may bind to cellular macromolecules, and therefore may function as a hapten. PTU and its metabolites accumulate within neutrophils, and bind to and change the structure of MPO and other cytoplasmic and nuclear antigens, with the induction of various autoantibodies [34]. It has been suggested that MPO-mediated metabolism of minocycline and interference with normal apoptosis are important in MPO-ANCA-positive minocycline-induced LLS [2, 4]. However, recent studies have discovered that abnormal regulation of NETs is implicated in the pathogenesis of many diseases, including thrombosis, SLE and AAD [35, 36]. Low-density granulocytes show high capacity for releasing NETs, with increased externalization of NET antigens, citrullination of autoantigens and the production of proinflammatory cytokines [37, 38]. Many stimuli can trigger NETosis, including various pathogens, cytokines (TNF- α , IL-8, IL-17), nitric oxide and some drugs, including PTU [39, 11]. Nakazawa *et al.* [11] demonstrated that NETs are the most important source of autoantigens in PTU-induced AAD. NETs are the major sources of cytoplasmic (MPO, PR3, Lf, NE, BPI and antimicrobial peptide, which activate dendritic cells) and nuclear autoantigens in PTU-induced LLS patients, with consequent induction of polyspecific ANCAs and ANAs, but without anti-dsDNA (Table 3).

An imbalance between the formation and clearance of NETs has an important role in the induction of autoimmunity. Hakkim *et al.* [14] showed that serum DNase I is responsible for NET degradation and suggested that a genetic background of low DNase I activity could lead to the persistence of NETs and induction of autoimmunity. The impaired DNase I activity might reduce removal of circulating DNA, increasing production of autoantibodies by Toll-like receptor 9 co-activation [40]. The *DNASE1* gene maps on chromosome 16p13.3 and six autosomal codominant alleles have been described, but *DNASE1**1 and *2 have been shown to be common alleles with differing activities of DNase I [41]. The multiple polymorphisms identified in the promoter, exons and introns of the *DNASE1* gene could change its stability, optimum pH and serum activity [41].

We showed that DNase I activity was significantly lower in the sera of PTU-induced LLS than in the sera of SLE patients and healthy controls (Fig. 2A). There are conflicting results about the correlation between DNase I activity and SLE activity [15, 42]. Low DNase I activity could lead to the persistence of NETs, with consequent induction of polyspecific ANCAs in PTU-induced LLS patients. So, NETs may induce ANCA production and may activate complement; also ANCAs may stimulate NETosis and the production of oxygen radicals and proinflammatory cytokines, which then exaggerate the autoimmune

response [43]. Furthermore, in patients with autoimmune hyperthyroidisms, a novel mutation (1218G >A, exon 5) and multiple polymorphisms were identified in the *DNASE1* gene, associated with its lower activity and heat stability [44, 45]. Beside genetic factors, serological factors may influence serum DNase I activity. G-actin has been identified as a potent inhibitor of DNase I [46]. The G-actin level rises during inflammation [10], which may explain our finding of low DNase I in the acute phase of PTU-induced LLS. Also, it is possible that anti-DNase I inhibitory antibodies [47] may be responsible for the observed low DNase I activity (Fig. 2A). On the other hand, some other serum components, such as anti-dsDNA antibodies with abzyme activity, may increase the DNase I activity [48]. Our LLS patients were anti-dsDNA negative and they had lower DNase I activity than anti-dsDNA-positive SLE patients (Fig. 2B and Table 3). Contrary to anti-dsDNA antibodies, anti-MPO antibodies, present in all our patients with PTU induced-LLS, do not increase the DNase I activity. Since many genetic and serological factors are involved in the regulation of the DNase I activity, we did not find correlation between the level of MPO-ANCA and enzyme activity.

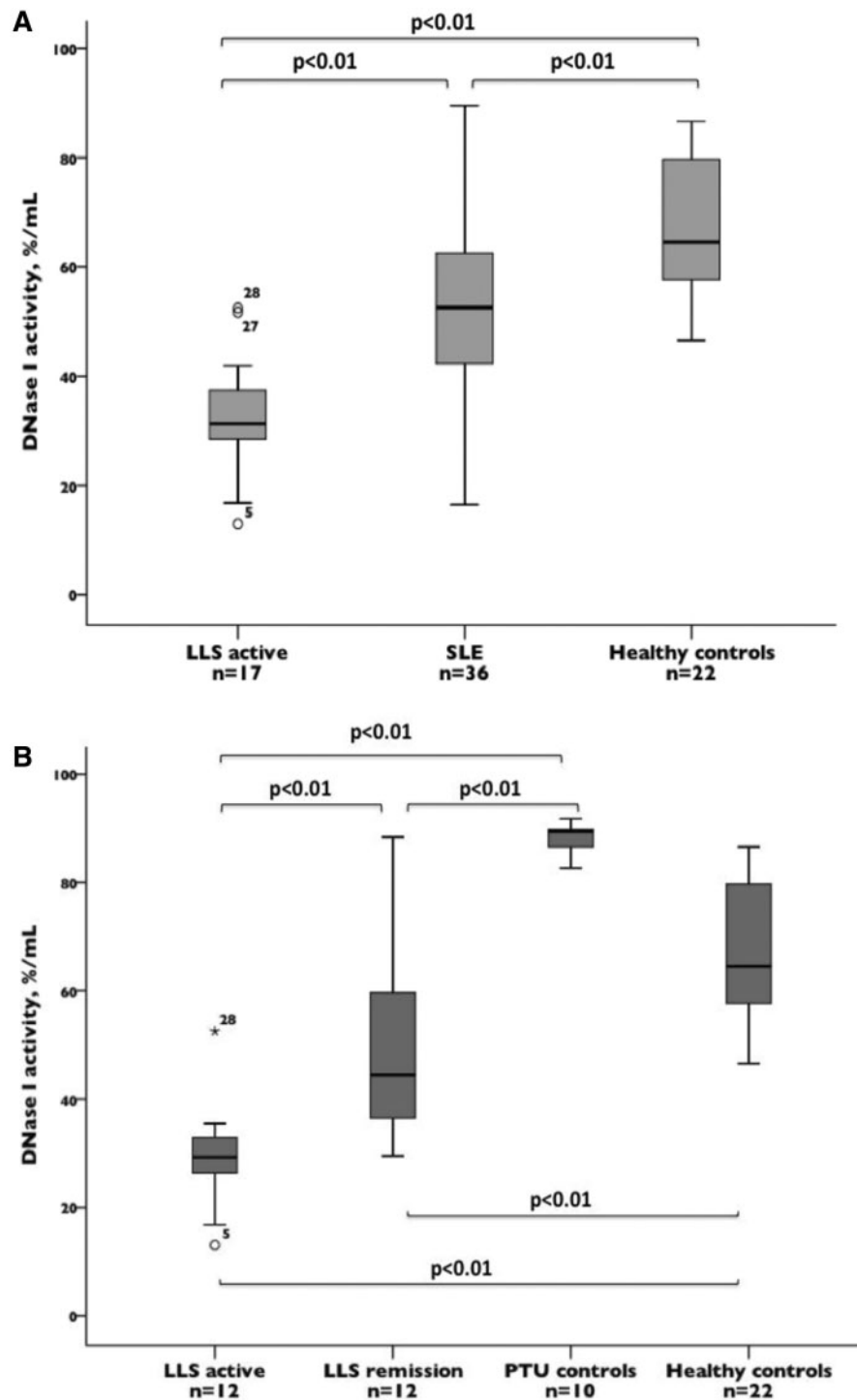
DNase I expression is regulated by the alternative promoter and splicing in inflammation or ischaemia, and recent studies have shown that the serum DNase I activity level might be a diagnostic marker for acute myocardial infarction [49]. We discovered that the decreased DNase I activity is not a constant characteristic of a given patient—it may change with the disease activity. Discontinuation of PTU in our LLS patients led to increase in DNase I activity, but the DNase I activity did not reach the levels of healthy individuals or of PTU-treated patients without LLS (Fig. 2B). However, PTU discontinuation leads to a decrease in ANCA titres (Table 4), NETosis, inflammation and reduction of G-actin-mediated inhibition of DNase I [46]. Together these factors may explain the observed increase in DNase I activity in our LLS patients after PTU withdrawal (Fig. 2B). Contrary to PTU-induced LLS patients, PTU-treated patients without LLS have higher DNase I activity, which enables adequate clearance of PTU-induced NETs, and this characteristic may protect the patients from the induction of AAD.

Identification of patients with low DNase I activity may be crucial for the treatment strategy for autoimmune hyperthyroidism. Avoidance of PTU in patients with low DNase I activity may prevent the development of ANCA-associated LLS. Also, monitoring of DNase I activity might be important in patients treated with drugs (minocycline, TNF inhibitors, quinidine and procainamide) that decrease the clearance of apoptotic cells and induce LLS [2, 3]. After withdrawal of offending drug(s), anti-inflammatory and immunosuppressive therapy (and, in the future, DNase I resistant to G-actin) will control the effects of NETs activation in drug-induced AAD [13, 50].

Conclusion

Idiopathic SLE and PTU-induced LLS may be very similar clinically and serologically, but patients with PTU-induced

Fig. 2 DNase I activity in SLE, PTU-induced LLS patients and controls



(A) DNase I activity in SLE, PTU-induced LLS patients and healthy controls. **(B)** DNase I activity in PTU-induced LLS patients (active disease and remission), in PTU-treated patients without LLS and in healthy controls. DNase I: deoxyribonuclease I; LLS: lupus-like syndrome; PTU: propylthiouracil.

LLS less frequently had arthritis and renal involvement, but more frequently had specific cutaneous lesions. There was a significantly higher prevalence of polyspecific ANCA in PTU-induced LLS in comparison with idiopathic

SLE patients. DNase I activity in LLS was significantly lower than in SLE patients and healthy persons. Discontinuation of PTU increased the DNase I activity, although it did not reach the levels of controls. In remission

of PTU-induced LLS, MPO-ANCA decreased, but persisted positive for a long time.

PTU, as a trigger, and low DNase I activity, as a predisposing factor, may lead to LLS. We are the first to report that low DNase I activity might be an important prognostic biomarker for PTU-induced LLS. ANCA profile and DNase I activity must be included in the algorithm of serological investigations in patients with autoimmune hyperthyroidism. The early diagnosis and selection of patients with low DNase I activity is crucial for improving the prognosis for drug-induced LLS.

Funding: Supported, in part, by the Ministry of Science of the Republic of Serbia, Grant No 175065.

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

References

- Bosch X, Guilabert A, Font J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Lancet* 2006;368:404–18.
- Chang C, Gershwin ME. Drugs and autoimmunity—a contemporary review and mechanistic approach. *J Autoimmun* 2010;34:J266–75.
- Ablin J, Verbovetski I, Trahtenberg U, Metzger S, Mevorach D. Quinidine and procainamide inhibit murine macrophage uptake of apoptotic and necrotic cells: a novel contributing mechanism of drug-induced-lupus. *Apoptosis* 2005;10:1009–18.
- Dunphy J, Oliver M, Rands AL, Lovell CR, McHugh NJ. Antineutrophil cytoplasmic antibodies and HLA class II alleles in minocycline-induced lupus-like syndrome. *Br J Dermatol* 2000;142:461–7.
- Vedove CD, Del Giglio M, Schena D, Girolomoni G. Drug-induced lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res* 2009;301:99–105.
- Xiao X, Chang C. Diagnosis and classification of drug-induced autoimmunity (DIA). *J Autoimmun* 2014;48–49:66–72.
- Marzano AV, Vezzoli P, Crosti C. Drug-induced lupus: an update on its dermatologic aspects. *Lupus* 2009;18:935–40.
- Gao Y, Zhao MH, Guo XH *et al.* The prevalence and target antigens of antithyroid drugs induced antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in Chinese patients with hyperthyroidism. *Endocr Res* 2004;30:205–13.
- Wu R, Li R. Propylthiouracil-induced autoimmune syndromes: 11 case report. *Rheumatol Int* 2012;32:679–81.
- Leffler J, Martin M, Gullstrand B *et al.* Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol* 2012;188:3522–31.
- Nakazawa D, Tomaru U, Suzuki A *et al.* Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 2012;64:3779–87.
- Napirei M, Wulf S, Mannherz HG. Chromatin breakdown during necrosis by serum DNase 1 and the plasminogen system. *Arthritis Rheum* 2004;50:1873–83.
- Manderson AP, Carlucci F, Lachmann PJ *et al.* The *in vivo* expression of actin/salt-resistant hyperactive DNase I inhibits the development of anti-ssDNA and anti-histone autoantibodies in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R68.
- Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K *et al.* Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:9813–8.
- Skiljevic D, Jeremic I, Nikolic M *et al.* Serum DNase I activity in systemic lupus erythematosus: correlation with immunoserological markers, the disease activity and organ involvement. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1083–91.
- Gao Y, Chen M, Ye H *et al.* Long-term outcomes of patients with propylthiouracil-induced anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibody-associated vasculitis. *Rheumatology* 2008;47:1515–20.
- Bonaci-Nikolic B, Nikolic M, Andrejevic S, Zoric S, Bukilica M. Antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated autoimmune diseases induced by antithyroid drugs: comparison with idiopathic ANCA vasculitides. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1072–81.
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
- Petri M, Buyon J, Kim M. Classification and definition of major flares in SLE clinical trials. *Lupus* 1999;8:685–91.
- Lamprecht P, Gause A, Gross WL. Cryoglobulinemic vasculitis. *Arthritis Rheum* 1999;42:2507–16.
- Tetikurt C, Yuruyen M, Tetikurt S, Bayar N, Ozdemir I. Propylthiouracil-induced lupus-like or vasculitis syndrome. *Multidiscip Respir Med* 2012;7:14.
- Cin MO, GURSOY A, Morris Y *et al.* Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibody in Graves' patients treated with propylthiouracil. *Int J Clin Pract* 2009;63:299–302.
- Aguirre Zamorano MA, López Pedrera R, Cuadrado Lozano MJ. Drug-induced lupus. *Med Clin* 2010;135:124–9.
- Li MT, Zeng XJ, Fang WG *et al.* [Clinical characteristics of propylthiouracil (PTU)-induced antineutrophil cytoplasmic antibodies positive cases; analysis of a case of PTU-induced ANCA positive patients with hyperthyroidism]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004;84:2082–5.
- Kobayashi S, Noh JY, Mukasa K *et al.* Characteristics of agranulocytosis as an adverse effect of antithyroid drugs in the second or later course of treatment. *Thyroid* 2014;24:796–801.
- Vedove CD, Simon JC, Girolomoni G. Drug-induced lupus erythematosus with emphasis on skin manifestations and the role of anti-TNF α agents. *J Dtsch Dermatol Ges* 2012;10:889–97.
- Vasoo S. Drug-induced lupus: an update. *Lupus* 2006;15:757–61.

- 28 Banchereau J, Pascual V, Palucka AK. Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation. *Immunity* 2004;20:539–50.
- 29 Gunnarsson I, Nordmark B, Hassan Bakri A *et al.* Development of lupus-related side-effects in patients with early RA during sulphasalazine treatment—the role of IL-10 and HLA. *Rheumatology* 2000;39:886–93.
- 30 Gao Y, Chen M, Ye H *et al.* Follow-up of avidity and titre of anti-myeloperoxidase antibodies in sera from patients with propylthiouracil-induced vasculitis. *Clin Endocrinol* 2007;66:543–7.
- 31 Ye H, Zhao MH, Gao Y, Guo XH, Wang HY. Anti-myeloperoxidase antibodies in sera from patients with propylthiouracil-induced vasculitis might recognize restricted epitopes on myeloperoxidase molecule. *Clin Exp Immunol* 2004;138:179–82.
- 32 Gao Y, Ye H, Yu F, Guo XH, Zhao MH. Anti-myeloperoxidase IgG subclass distribution and avidity in sera from patients with propylthiouracil-induced antineutrophil cytoplasmic antibodies associated vasculitis. *Clin Immunol* 2005;117:87–93.
- 33 Roth AJ, Ooi JD, Hess JJ *et al.* Epitope specificity determines pathogenicity and detectability in ANCA-associated vasculitis. *J Clin Invest* 2013;123:1773–83.
- 34 Yazisiz V, Ongüt G, Terzioğlu E, Karayalçın U. Clinical importance of antineutrophil cytoplasmic antibody positivity during propylthiouracil treatment. *Int J Clin Pract* 2010;64:19–24.
- 35 Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D *et al.* Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:15880–5.
- 36 Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* 2012;120:3007–18.
- 37 Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Low density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol* 2013;35:455–63.
- 38 Yu Y, Su K. Neutrophil extracellular traps and systemic lupus erythematosus. *J Clin Cell Immunol* 2013;4. pii:139.
- 39 Kaplan MJ. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:691–9.
- 40 Capolunghi F, Rosado MM, Cascioli S *et al.* Pharmacological inhibition of TLR9 activation blocks autoantibody production in human B cells from SLE patients. *Rheumatology* 2010;49:2281–9.
- 41 Takeshita H, Soejima M, Koda Y *et al.* Gln222Arg (A2317G) polymorphism in the deoxyribonuclease I gene exhibits ethnic and functional differences. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:51–5.
- 42 Martinez-Valle F, Balada E, Ordi-Ros J *et al.* DNase 1 activity in patients with systemic lupus erythematosus: relationship with epidemiological, clinical, immunological and therapeutical features. *Lupus* 2009;18:418–23.
- 43 Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönernermark U *et al.* Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009;15:623–5.
- 44 Dittmar M, Bischofs C, Matheis N, Poppe R, Kahaly GJ. A novel mutation in the DNASE1 gene is related with protein instability and decreased enzyme activity in thyroid autoimmunity. *J Autoimmun* 2009;32:7–13.
- 45 Dittmar M, Woletz K, Kahaly GJ. Reduced DNASE1 gene expression in thyroid autoimmunity. *Horm Metab Res* 2013;45:257–60.
- 46 Lachmann PJ. The *in vivo* destruction of antigen—a tool for probing and modulating an autoimmune response. *Clin Exp Immunol* 1996;106:187–9.
- 47 Yeh TM, Chang HC, Liang CC, Wu JJ, Liu MF. Deoxyribonuclease-inhibitory antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci* 2003;10:544–51.
- 48 Baranovskii AG, Buneva VN, Nevinsky GA. Human deoxyribonucleases. *Biochemistry* 2004;69:587–601.
- 49 Kawai Y, Yoshida M, Arakawa K *et al.* Diagnostic use of serum deoxyribonuclease I activity as a novel early-phase marker in acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;109:2398–400.
- 50 Lapponi MJ, Caresita A, Landoni VI *et al.* Regulation of neutrophil extracellular trap formation by anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2013;345:430–7.