

Stężenie i mikroheterogenność białek ostrej fazy u chorych z twardziną układową

The concentration and microheterogeneity of acute-phase proteins in patients with systemic sclerosis

Izabela Domysławska, Piotr A. Klimiuk, Agnieszka Sulik, Stanisław Sierakowski

Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Słowa kluczowe: białka ostrej fazy, heterogenność białek ostrej fazy, twardzina układowa.

Key words: acute phase proteins, heterogeneity of acute-phase proteins, systemic sclerosis.

Streszczenie

Stężenie i mikroheterogenność białek ostrej fazy (BOF) ulega zmianom w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych. Zmiany jakościowe niektórych białek ostrej fazy są określane jako mikroheterogenność główna. Elektroforeza dwóch kierunków powinowactwa z konkanawaliną A (ConA) jako ligandem jest z powodzeniem stosowana do oceny mikroheterogenności glikoprotein ostrej fazy. Określenie stężenia i mikroheterogenności BOF może być użyteczne we wczesnej diagnostyce i prognozowaniu przewlekłych procesów zapalnych, w tym twardziny układowej (TU). Do badania zakwalifikowano 45 pacjentów z TU w średnim wieku 46,2 roku. Wszyscy chorzy spełniali kryteria klasyfikacyjne ARA dla rozpoznania twardziny układowej. Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych ochotników (średni wiek 42,3 roku).

Stężenia kwaśnej glikoproteiny (AGP), antychymotrypsyny (ACT), ceruloplazminy (CP) były określane w surowicy metodą elektroimmunoforezy z użyciem przeciwciał anti-AGP, anti-ACT, anti-CP. Stężenie białka C-reaktywnego (*C-reactive protein* – CRP) było określane metodą radialnej immunodifuzji z użyciem przeciwciał anti-CRP. Mikroheterogenność BOF oceniono metodą elektroforezy dwóch kierunków z ConA na żelu agarazowym, jak opisywał Bøg-Hansen. W grupie chorych z TU obserwowano zwiększenie stężenia kilku z badanych białek ostrej fazy (AGP, CRP, CP). Umiarkowane zwiększenie stężenia CRP, AGP, CP obserwowano u 50% chorych z twardziną układową, u których stwierdzono zapalenie stawów oraz owrzodzenia skóry. Bardzo duże zwiększenie stężenia białek ostrej fazy występowało w grupie pacjentów z zajęciem serca i płuc. Mikroheterogenność BOF była zmieniona u badanych chorych i wykazywała zmienne, niejednoznaczne obrazy. Wyniki potwierdzają obecność zmian w odpowiedzi ostrej fazy u chorych z twardziną układową.

Summary

The concentration and microheterogeneity of acute-phase proteins (APP) differ in acute and chronic types of inflammation. The qualitative changes of some acute-phase glycoproteins are referred to as major microheterogeneity. Affinity electrophoresis with a lectin, concanavalin A (ConA), as a ligand has been successfully used to determine acute-phase glycoproteins microheterogeneity. The concentration and microheterogeneity of acute-phase proteins can be used in early diagnosis, management and prognosis of chronic inflammatory stages including Systemic Sclerosis (SS).

The study included 45 patients with SS with a mean age of 46.2 years. All patients fulfilled the American Rheumatism Association revised criteria for classification of SS. The control group comprised 15 healthy individuals with a mean age of 42.3 years. Serum levels of acid-glycoprotein (AGP), antichymotrypsin (ACT) and ceruloplasmin (CP) were measured by electroimmunoassay using anti-AGP, anti-ACT and anti-CP antibodies. The level of C-reactive protein (CRP) was determined by radial immunodiffusion with anti-CRP antibodies. The microheterogeneity of the acute-phase proteins was assessed by agarose affinity electrophoresis using Con A as a ligand, as described by Bøg-Hansen. The increased concentration of only a few proteins (AGP, CRP, CP) was found. A moderate rise of CRP, CP and AGP levels in about 50% of SS cases was associated with arthritis and cutaneous ulcers. High levels of proteins were observed in a group with pulmonary and heart involvement. Microheterogeneity of acute-phase proteins was changed in studied patients and showed different pictures. Our results support the changed acute-phase response in patients with systemic sclerosis.

Adres do korespondencji:

dr med. Izabela Domysławska, Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. M. Skłodowskiej-Curie 24 A, 15-206 Białystok, tel. +48 85 746 81 66, +48 85 746 84 82, e-mail: izadom@umwb.edu.pl

Wstęp

Twardzina układowa (TU), choroba należąca do układowych chorób tkanki łącznej, charakteryzuje się nasilonym procesem włóknienia. Uważa się, że proces włóknienia jest ostatnią fazą procesów patogenetycznych twardziny układowej. Poprzedzają ją fazy zapalenia systemowego oraz niszczenia naczyń. W pracach dotyczących patogenetyki tej choroby największy nacisk kładzie się na procesy dotyczące zmian naczyniowych – procesu uszkodzenia o typie waskulopatii i możliwości nakładania się zmian o charakterze zapalenia naczyń [1–3]. Nie wiele publikacji poświęcono wcześniejszym procesom, poprzedzającym wystąpienie zmian naczyniowych. Wiadomo, że są one obecne u wielu pacjentów z TU. Dowodem na to jest obecność autooprzeciwciał, stwierdzanych u około 20% chorych na wiele lat przed rozwojem TU [4]. Świadczą one o zaangażowaniu w proces zapalny reakcji humoralnej i komórkowej.

Odpowiedź ostrej fazy jest najwcześniejszą reakcją ustroju na toczące się w nim procesy zapalne. Określana jest m.in. za pomocą laboratoryjnych testów diagnostycznych, które są użyteczne w potwierdzeniu obecności procesu zapalnego, stopnia jego zaawansowania i rozległości. Zmiany jakościowe w białkach ostrej fazy, będących glikoproteinami, są nazywane mikroheterogennością główną. Stężenie i mikroheterogenność białek ostrej fazy (BOF) są różne w procesach ostrych i przewlekłych [5]. Elektroforeza dwóch kierunków, przy użyciu konkanawaliny A (ConA) jako liganda, z dużym powodzeniem jest stosowana do określenia zjawiska mikroheterogenności BOF. Przydatność tej metody diagnostycznej wykazano m.in. u chorych z ostrymi i prze-

wlekłymi procesami zapalnymi, w tym w reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS), toczniu rumieniowatym układowym (TRU), zeszywniającym zapaleniu stawów kręgosłupa (ZZSK) i chorobie nowotworowej.

Celem pracy była ocena przydatności stężeń i wartości współczynnika glikozylacji białek ostrej fazy u chorych z TU, a także ocena zależności stężeń białek ostrej fazy od obecności takich powikłań, jak włóknienie płuc, zapalenie mięśni, owrzodzenia skóry czy zapalenie stawów.

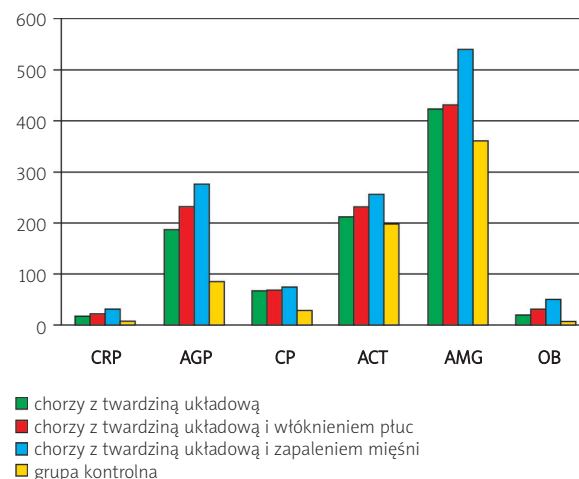
Materiał i metody

Do badania zakwalifikowano 49 chorych na TU w średnim wieku 46,2 roku. Byli oni hospitalizowani w Klinice Reumatologii UMB od marca 2004 r. do lipca 2007 r. Wszyscy chorzy spełniali kryteria klasyfikacyjne TU [6]. Grupę kontrolną stanowiło 15 osób zdrowych w wieku 42,3 roku. Szczegółową charakterystykę badanych przedstawiono w tabeli I. W badanych grupach wykluczono obecność infekcji o charakterze bakteryjnym, wirusowym lub grzybiczym (badanie kliniczne, posiewy płynów ustrojowych i wydzielin). Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Etycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Stężenia kwaśnej glikoproteiny (AGP), antychymotrypsyny (ACT), białka C-reaktywnego (CRP) oznaczono metodą immunoelektroforezy rakietkowej wg Laurella [7] z użyciem przeciwciał przeciw odpowiedniemu białku

Tabela I. Charakterystyka grupy badanej
Table I. Characteristic of the studied group

Badane parametry	Grupa badana	Grupa kontrolna
liczebność	49	15
średni wiek (lata)	46,2	42,3
płeć (K/M)	47/2	14/1
czas od wystąpienia pierwszych objawów	3 miesiące–32 lata (śr. 8,9 roku)	
postać obwodowa/ rozlana	35/14	
częstość objawów Raynauda (%)	92	
częstość występowania przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) (%)	65	



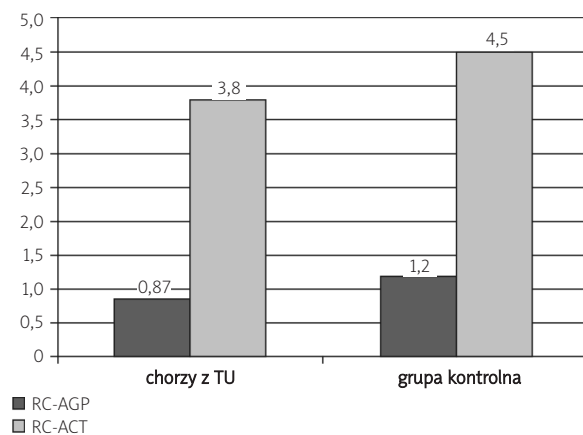
Ryc. 1. Wartości stężenia wybranych białek ostrej fazy oraz OB u chorych z TU ze współwystępowaniem różnych powikłań narządowych.

Fig. 1. Concentration of some acute phase proteins and value of ESR in patients with Systemic Sclerosis with different clinical manifestation.

Tabela II. Stężenia białek ostrej fazy u pacjentów z twardziną układową i w grupie kontrolnej
Table II. Concentration of the acute phase proteins in patients with systemic sclerosis and in the control group

Badane parametry	Grupa badana	Grupa kontrolna
białko C-reaktywne (CRP) (mg/dl)	17,6 ±11,8	8,1 ±3,1 mg/dl
α1-glikoproteina (AGP) (mg/dl)	187,6 ±27,1	98,7 ±18,6
ceruloplazmina (CP) (mg/dl)	67,8 ±14,6	28,7 ±11,5
α1-antychymotrypsyna (ACT) (mg/dl)	213,6 ±12,4	198,8 ±11,3
α2-makroglobulina (AMG) (mg/dl)	423,1 ±45,1	367,8 ±54,2
współczynnik reaktywności AGP (RC-AGP)	0,87 ±0,12	1,02 ±0,13
współczynnik reaktywności ACT (RC-ACT)	3,8 ±0,4	4,25 ±0,28

CRP – białko C-reaktywne, AGP – kwaśna glikoproteina, ACT – α1-antychymotrypsyna, CP – ceruloplazmina, AMG – α2-makroglobulina, RC-AGP – współczynnik reaktywności kwaśnej glikoproteiny, RC-ACT – współczynnik reaktywności α1-antychymotrypsyny

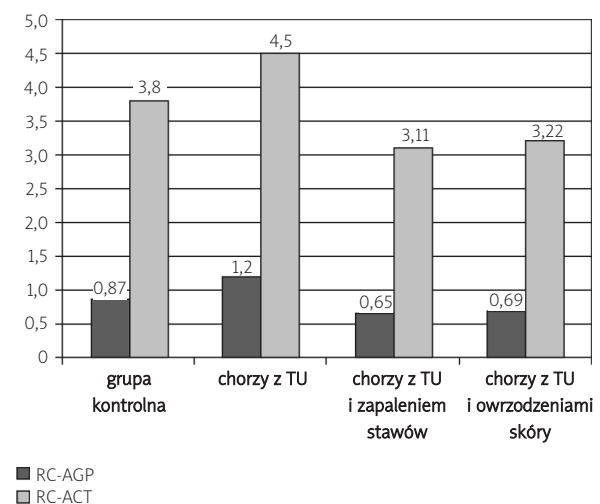


Ryc. 2. Wartości współczynnika glikozylacji wybranych białek ostrej fazy (RC-AGP – współczynnik glikozylacji kwaśnej glikoproteiny, RC-ACT – współczynnik glikozylacji antychymotrypsyny) u chorych z twardziną układową (TU).
Fig. 2. Value of reactivity coefficient of some acute phase proteins (RC-AGP – reactivity coefficient of AGP, RC-ACT – reactivity coefficient of ACT) in patients with systemic sclerosis.

firmy Sigma. Heterogenność białek ostrej fazy badano przy użyciu immunoelektroforezy dwóch kierunków z zastosowaniem konkanawaliny A jako liganda [8]. Konkanawalinę rozpuszczoną w 500 µl wody destylowanej dodawano do 1% roztworu agarozy, a następnie wylewano na szklaną płytkę pierwszego kierunku. Po zastygnięciu żelu wycinano w nim studzienki o średnicy 1 mm. W studzienkach umieszczano 10 µl rozcieńczonej surowicy badanej (1 : 10). Jako markera używano albuminy znaczonej błękitem, który wędrował jednocześnie z badanymi surowicami. Elektroforezę rozwijano w ciągu 60–70 min, przy następujących parametrach prądu: natężenie 20–30 mA, moc – 8 W, napięcie – 200 V.

Po zakończeniu wędrowki żel cięto na paski, które przenoszono na płytki drugiego kierunku. Na płytkach tych znajdował się żel z α-metylo-mannozydem oraz przeciwciałem dla kwaśnej glikoproteiny. α-metylo-mannozyd zastosowano celem rozpuszczenia kompleksów lecytynowo-glikoproteinowych. Po zmianie kierunku elektroforezę rozwijano w ciągu 18 godzin przy zasilaniu 80 V. Następnie płytki suszono w gorącym powietrzu, barwiono błękitem kumasyny. Pole powierzchni objęte precypitatami obliczano planimetrycznie. Wyliczano współczynnik reaktywności dla kwaśnej glikoproteiny – RC-AGP zgodnie ze wzorem:

$$RC = \frac{\text{suma pól wariantów reagujących z konkanawaliną A}}{\text{suma pól wariantów niereagujących z konkanawaliną A}}$$



Ryc. 3. Wartości współczynnika glikozylacji wybranych białek ostrej fazy (RC-AGP – współczynnik glikozylacji kwaśnej glikoproteiny, RC-ACT – współczynnik glikozylacji antychymotrypsyny) u chorych z twardziną układową (TU).
Fig. 3. Value of reactivity coefficient of some acute phase proteins (RC-AGP – reactivity coefficient of AGP, RC-ACT – reactivity coefficient of ACT) in patients with systemic sclerosis.

Analizę statystyczną przeprowadzono metodą statystyki opisowej z użyciem standardowych testów nieparametrycznych.

Wyniki

W grupie chorych z TU obserwowano zwiększenie stężenia niektórych białek ostrej fazy (AGP, CRP, CP). Szczegółowe wyniki przedstawiono na rycinie 1 i w tabeli II. Łagodne zwiększenie stężenia CRP, CP i AGP u 48% chorych z TU było obserwowane głównie w grupie z zapaleniem stawów oraz obecnością owrzodzeń skórnych. W nielicznej (8 pacjentów) grupie chorych stężenie BOF było znacznie zwiększone. U wszystkich tych pacjentów stwierdzono obecność istotnych powikłań narządowych, takich jak śródmiąższowa choroba płuc, cechy zapalenia naczyń oraz objawy świadczące o zajęciu mięśni.

Wartość współczynnika glikozylacji białek ostrej fazy w grupie chorych z TU (AGP, ACT) korelowała z wartościami stężeń BOF i nie była niższa w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 2 i 3). U części pacjentów stwierdzono znacznie obniżone wartości wskaźnika glikozylacji, co korelowało z obecnością istotnych powikłań narządowych – śródmiąższową chorobą płuc, zajęciem naczyń oraz zapaleniem mięśni.

Dyskusja

Patogeneza twardziny układowej jest złożona. Wydaje się jednak, że za rozwój zmian typowych dla choroby są odpowiedzialne trzy główne czynniki: 1) uszkodzenie naczyń, 2) aktywacja układu immunologicznego/reakcja zapalna, 3) proces włóknienia [9].

Odpowiedź komórkowa i humoralna odgrywają istotną rolę w patogenezie TU. Aktywacja odpowiedzi humoralnej jest odzwierciedlona w postaci obecności licznych autoprzeciwciał [10]. Odpowiedź komórkowa, która odpowiada za podtrzymanie przewlekłego stanu zapalnego u chorych na TU przejawia się infiltracją skóry oraz narządów wewnętrznych przez komórki jednojądrowe [11, 12]. Ekspansja komórek T CD4+ w tkankach odpowiada ze wiele objawów klinicznych występujących w przebiegu TU [13].

Niewiele jest wiadomo na temat reakcji ostrej fazy u chorych z TU. Wydaje się, że – podobnie jak w innych procesach zapalnych – pojawia się ona we wczesnych etapach choroby, często przed ujawnieniem się jej klinicznych objawów. Nieliczne badania prowadzone nad oceną stężeń BOF przedstawiają niejednoznaczne wyniki. W badaniach Mara i wsp. wykazano zwiększenie stężenia takich białek, jak antychymotrypsyna oraz α_2 -makroglobulina [14]. Seibold i wsp. wykazali jedynie zwiększenie stężenia antychymotrypsyny u chorych z TU [15]. W pracy Becvar i wsp. poddano ocenie zależność

różnych powikłań narządowych od obecności wskaźników stanu zapalnego [16]. Do najistotniejszych czynników, które powodują zwiększenie stężenia BOF w surowicy chorych na TU, zalicza się zapalenie stawów, obecność owrzodzeń w obrębie opuszek palców oraz śródmiąższową chorobę płuc. W bardzo dużej grupie pacjentów, ocenianej w badaniu klinicznym grupy EUSTAR, wyodrębniona grupa pacjentów z TU i zapaleniem stawów charakteryzowała się także wyższym niż w pozostałych grupach zwiększeniem stężenia markerów ostrej fazy w typ CRP [17]. Mechanizmy regulacji stężeń białek ostrej fazy bezsprzecznie są bezpośrednio zależne od cytokin prozapalnych, takich jak IL-6, IL-1, TNF- α . Podobne wnioski wyciągnęli w swojej pracy Kucharz i wsp. [18]. Stężenie tych cytokin u pacjentów z TU było umiarkowanie lub prawidłowe [19]. Wyniki niniejszej pracy wskazują na niejednorodność zmian w reakcji ostrej fazy u chorych z TU oraz potwierdzają, że takie powikłania, jak zapalenie stawów, zapalenie mięśni czy zapalenie śródmiąższowe płuc, przebiegają ze zwiększeniem stężeń białek ostrej fazy.

Piśmiennictwo

1. Carpentier PH, Maricq HR. Microvasculature in systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 1990; 16: 75-91.
2. Boyd RL, Wilson TJ, Van De Water J, et al. Selective abnormalities in the thymic microenvironment associated with avian scleroderma, an inherited fibrotic disease of L200 chickens. *J Autoimmun* 1991; 4: 369-80.
3. Furst DE. The endothelium in the pathogenesis of systemic sclerosis: is it primary or secondary? [editorial]. *J Mal Vasc* 1999; 24: 95-98.
4. Chen ZY, Silver RM, Ainsworth SK, et al. Association between fluorescent antinuclear antibodies, capillary patterns, and clinical features in scleroderma spectrum disorders. *Am J Med* 1984; 77: 812-822.
5. Volanakis JE. Acute-phase proteins in rheumatic diseases. In: *Arthritis and allied conditions*, Koopman WJ (ed.). Williams&Wilkins, Baltimore 1997; 505-514.
6. LeRoy EC, Medsger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001; 28: 1573-1576.
7. Laurell CB. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem* 1966; 15: 45-49.
8. Hansen JS, et al. Electrophoretic analysis of the glycan microheterogeneity of orosomucoid in cancer and inflammation. *Electrophoresis* 1986; 7: 180-192.
9. *Systemic sclerosis (textbook)*, Clements PhJ, Furst DE (eds). Williams&Wilkins, Baltimore 1996.
10. White B. Immunopathogenesis of systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 1996; 22: 695-708.
11. Chizzolini C. T lymphocyte and fibroblast interactions: the case of skin involvement in systemic sclerosis and other examples. *Springer Semin Immunopathol* 1999; 21: 431-450.
12. Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, et al. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Immunol* 2002; 168: 3649-3659.

13. Postlethwaite AE. Role of T cells and cytokines in effecting fibrosis. *Int Rev Immunol* 1995; 12: 247-258.
14. Marra R, Pagano L, Storti S, et al. Evaluation of some inflammatory, coagulative and immune parameters in progressive systemic sclerosis. *Acta Med Pol* 1988; 29: 81-88.
15. Seibold JR, Iammarino RM, Rodman GP. Alpha-1-antitrypsin in progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 367-370.
16. Becvar R, Stork J, Pesakova V, et al. Clinical correlations of potential activity markers in systemic sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051: 404-412.
17. Avouac J, Walker U, Tyndall A, et al. Characteristics of Joint Involvement and Relationships with Systemic Inflammation in Systemic Sclerosis: Results from the EULAR Scleroderma Trial and Research Group (EUSTAR) Database. *J Rheumatol* 2010; 37: 1488-1501.
18. Kucharz EJ, Grucka-Mamczar E, Mamczar A, et al. Acute-Phase Proteins in Patients with Systemic Sclerosis. *Clin Rheumatol* 2000; 19: 165-166.
19. Fagundus DM, LeRoy EC. Cytokines and systemic sclerosis. *Clin Dermatol* 1994; 12: 407-417.