

Stężenie TNF, receptorów TNF RI i RII oraz wybranych markerów ostrej fazy u chorych na zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa

Tumour necrosis factor, tumour necrosis factor receptor I and II and acute phase response markers in ankylosing spondylitis patients

Izabela Korczowska-Łącka¹, Hanna Przepiera-Będzak², Marek Brzosko², Jan K. Łącki³, Paweł Hrycaj¹

¹Zakład Reumatologii i Immunologii Klinicznej Katedry Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, kierownik Zakładu dr hab. med., prof. UM Paweł Hrycaj

²Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie, kierownik Kliniki dr hab. med., prof. PAM Marek Brzosko

³Klinika i Poliklinika Układowych Chorób Tkanki Łącznej Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie, kierownik prof. dr hab. med. Jan K. Łącki

Słowa kluczowe: zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa, czynnik martwicy nowotworu α , rozpuszczalny receptor czynnika martwicy nowotworu α RI, rozpuszczalny receptor czynnika martwicy nowotworu α RII.

Key words: ankylosing spondylitis, tumour necrosis factor α , tumour necrosis factor receptor I, tumour necrosis factor receptor II.

Streszczenie

Zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa (ZZSK) to przewlekły, postępujący proces zapalny prowadzący do stopniowego usztywnienia stawów. Uważa się, iż w celu oceny aktywności procesu chorobowego powinno się brać pod uwagę zarówno objawy kliniczne, jak i wyniki oznaczeń laboratoryjnych markerów zapalenia. Na rozwój zapalenia w ZZSK mają wpływ cytokiny. Celem badania było określenie zależności między niektórymi białkami ostrej fazy tj.: białkiem C-reaktywnym, kwaśną α 1-glikoproteiną, α 1-antychymotrypsyną, transferyną oraz cytokinami (czynnik martwicy nowotworu α oraz rozpuszczalne receptory dla czynnika martwicy nowotworu TNF RI oraz TNF RII) oraz aktywnością kliniczną chorych na ZZSK, a także porównanie z grupą kontrolną złożoną z osób zdrowych. Wykazano dodatnią korelację między stężeniem TNF- α a stężeniami kwaśnej α 1-glikoproteiny oraz OB, a także stwierdzono istotną zależność między stężeniami wolnych receptorów TNF RI a TNF RII w badanej grupie chorych. Wyniki uzyskane przez autorów niniejszej pracy nie wykazały istotnych zależności między wskaźnikami BASDAI, BASG-6, BASG-t a badanymi białkami ostrej fazy. Nie wykazały również zależności statystycznej między receptorami RI i RII dla TNF a BASMI oraz BASDAL.

Summary

Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic inflammatory, rheumatological disease affecting primarily the sacroiliac joint and vertebral column. Some clinical and laboratory parameters such as some acute reactive proteins are frequently used to determine the disease activity. Cytokines are soluble proteins that have specific roles in the inflammatory response. This study aimed to evaluate the relation between the level of some acute phase proteins such as C-reactive protein, acid α 1-glycoprotein, α 1-antichymotrypsin, transferrin, the cytokine tumour necrosis factor- α , and soluble receptors of tumour necrosis factor TNF-RI and TNF-RII, and the clinical findings of patients with AS compared to healthy subjects. In our study we found a correlation between TNF- α levels and AGP and OB as well as a positive correlation between TNF-RI and TNF-RII in our group of patients. We did not find any correlation between BASDAI, BASG-6, BASG-t and acute phase protein. There were also no correlations between TNF-RI and TNF-RII and BASMI and BASDAL.

Adres do korespondencji:

dr med. Izabela Korczowska-Łącka, Zakład Reumatologii i Immunologii Klinicznej, Katedra Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Przybyszewskiego 39, 60-356 Poznań, e-mail: ikorz@post.pl

Praca wpłynęła: 20.02.2009 r.

Wstęp

Zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa (ZZSK) to przewlekły, postępujący proces zapalny prowadzący do stopniowego usztywnienia stawów, obejmujący stawy krzyżowo-biodrowe, drobne stawy kręgosłupa, pierścienie włókniste oraz więzadła kręgosłupa. Może w nim dochodzić do zajęcia stawów obwodowych i innych narządów (np. tęczówki). Mimo że przyczyna choroby pozostaje nieznana, zwraca się uwagę na toczące się procesy autoimmunologiczne, czynniki genetyczne, infekcyjne oraz środowiskowe.

Na rozwój zapalenia w ZZSK mają wpływ cytokiny regulujące kolejne etapy odpowiedzi immunologicznej. Należą do nich m.in.: interleukina 1 (IL-1), interleukina 2 (IL-2), interleukina 6 (IL-6), czynnik martwicy nowotworu α (*tumor necrosis factor α* – TNF- α) oraz interferon γ (IFN- γ) [1, 2]. Cytokiny te stymulują komórki efektorowe, takie jak fibroblasty, osteoklasty oraz neutrofile, powodując w konsekwencji niszczenie tkanek. Jednocześnie dochodzi do aktywacji limfocytów B i produkcji immunoglobulin. Interleukina 6 zajmuje szczególne miejsce wśród cytokin. Jest uznawana za cytokinę przełącznikową, ponieważ indukuje produkcję białek ostrej fazy w wątrobie, co stanowi wykładnik systemowej aktywacji zapalnej. Wykazano, iż stężenie białek ostrej fazy odzwierciedla kliniczną aktywność oraz ciężkość choroby u chorych na ZZSK [3]. Wśród białek ostrej fazy należy wymienić: CRP, fibrynogen, α 1-antytrypsynę, kwaśną α 1-glikoproteinę (AGP), α 1-antychymotrypsynę (ACT), α 2-antypłazminę, ceruloplazminę oraz surowiczy amyloid A (SAA).

Nie udało się ustalić złotego standardu mierzącego aktywność choroby [4, 5]. Uważa się, iż w celu oceny aktywności procesu chorobowego powinno się brać pod uwagę zarówno objawy kliniczne (ból nocny kręgosłupa i/lub sztywność poranną, zapalenia stawów obwodowych oraz objawy pozastawowe), jak i wyniki oznaczeń laboratoryjnych markerów zapalenia. Do markerów laboratoryjnych stosowanych w ocenie aktywności zapalenia w ZZSK należą: OB, białka ostrej fazy, spośród których najczęściej wybierane jest CRP, a także cytokiny, takie jak TNF- α [1, 6–9]. Postać błonowa TNF- α jest wiązana głównie przez receptor TNF RI, a receptor TNF RII wiąże formę rozpuszczalną i błonową. Obecność obu receptorów TNF stwierdzono w materiale biologicznym osób chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) oraz ZZSK i dlatego można sądzić, że pełnią one ważne funkcje w regulacji tych chorób.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w grupie 43 mężczyzn, grupę kontrolną stanowiło 60 zdrowych dobranych

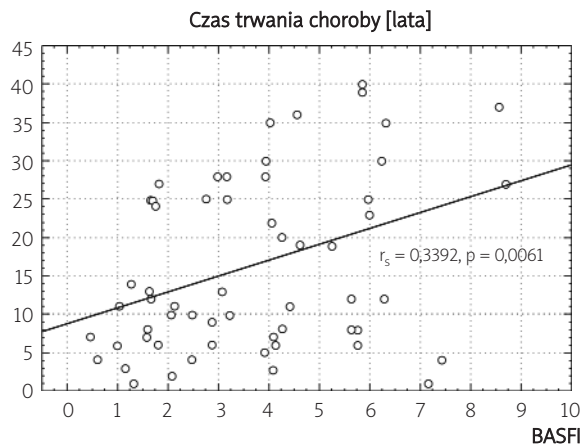
losowo ochotników. Średnia wieku chorych wynosiła $48,4 \pm 12,5$ roku, zakres 25–70 lat. Średni czas trwania choroby wynosił $18 \pm 10,9$ roku. Rozpoznanie ZZSK ustalono na podstawie kryteriów nowojorskich [10]. Grupę kontrolną stanowili mężczyźni w wieku 28–62 lat (średnia $45,7 \pm 9,9$ roku).

Krew do badań pobierano na czczo, bez dodatku środków hamujących krzepnięcie, a surowice uzyskane po odwirowaniu przechowywano w temperaturze -70°C . Surowicze stężenia wybranych białek ostrej fazy, tj. CRP, AGP, ACT, oraz transferyny oznaczono metodą immunoelektroforetyczną. Stężenie TNF- α , TNF RI, TNF RII w surowicy oznaczono przy użyciu zestawu Quantikine Human (R&D System, USA). Do porównania średniej arytmetycznej oraz odchylenia standardowego (SD) określonej grupy wyników w grupie badanej i kontrolnej posłużono się testem U Manna-Whitneya. Badanie zależności między poszczególnymi zmiennymi przeprowadzono za pomocą testu korelacji Spearmana, będącego również testem nieparametrycznym. W powyższych testach istotność statystyczna dotyczyła porównywanych zmiennych przy współczynniku $p < 0,05$.

Wyniki

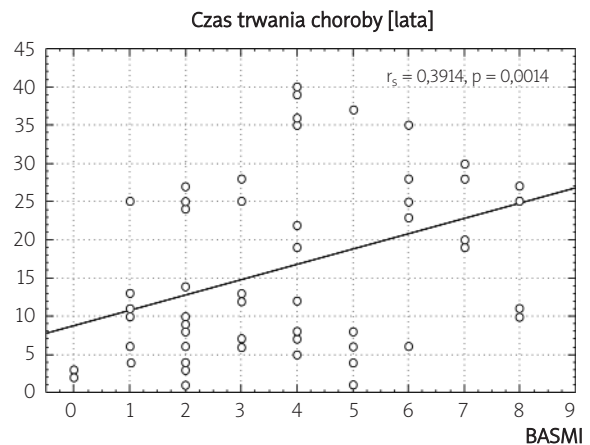
Aktywność choroby w badanej grupie chorych, mierzona wg indeksu BASDAI, wynosiła średnio $3,6 \pm 2$ (zakres 0,8–8,5) i dodatnio korelowała ($r = 0,728$, $p < 0,05$) z aktywnością choroby wg indeksu BASFI $3,7 \pm 2,1$ (zakres 0,5–8,7). Stwierdzono dodatnią zależność między wartościami indeksów BASFI ($r = 0,34$, $p < 0,005$) i BASMI ($r = 0,39$, $p < 0,001$) a czasem trwania choroby (ryc. 1) oraz dodatnią zależność indeksów BASFI oraz BASMI i wiekiem chorych (odpowiednio: $r = 0,32$, $p < 0,01$ i $r = 0,40$, $p < 0,001$) (ryc. 2).

Wartości OB były podwyższone w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,001$), średnia wartość wynosiła 34 ± 29 mm/godz. Stężenie CRP wynosiło $15,9$ mg/l, było znamienne wyższe ($p < 0,001$) w porównaniu z grupą kontrolną i wykazywało dodatnią korelację ze stężeniami AGP ($r = 0,6899$, $p < 0,05$), ACT ($r = 0,7926$, $p < 0,05$) oraz wartościami OB ($r = 0,5286$, $p < 0,05$). Stężenia białka AGP w surowicy chorych mieściły się w zakresie 520–2204 mg/l i były znamienne wyższe w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,001$). Średnie stężenie białka ACT w surowicy chorych było zwiększone w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,001$) i wykazywało dodatnią korelację z wartościami AGP badanej grupy chorych ($r = 0,7358$, $p < 0,05$) oraz ujemną korelację ze stężeniem transferyny ($r = -0,3477$, $p < 0,05$). Stężenie transferyny wynosiło 2182 mg/l i było znamienne niższe w porównaniu ze stężeniem w grupie kontrolnej ($p < 0,001$).



Ryc. 1. Wartość indeksu BASFI w zależności od czasu trwania choroby.

Fig. 1. BASFI index correlated with disease duration.



Ryc. 2. Wartość indeksu BASMI w zależności od czasu trwania choroby.

Fig. 2. BASMI index correlated with disease duration.

Tabela I. Stężenie wybranych parametrów ostrej fazy w badanej grupie chorych na ZZSK oraz w grupie kontrolnej

Table I. The levels of acute phase markers in a group of ankylosing spondylitis patients and in a control group

Parametry	Grupa chorych na ZZSK	Grupa kontrolna
OB [mm/godz.]	34 ±29 (2–134)	7 ±3* (4–18)
CRP [mg/l]	15,9 ±13,4 (0–57)	0,4 ±1,3* (0–18,5)
AGP [mg/l]	1135 ±385 (520–2204)	729 ±273* (0–1615)
ACT [mg/l]	446 ±152 (195–850)	301 ±75* (70–500)
transferyna [mg/l]	2182 ±368 (1254–3230)	3101 ±1041* (0–6820)
TNF-α [pg/ml]	1,55 ±0,62 (0–3,2)	1,11 ±1,78 NS (0–5,2)
TNF RI [pg/ml]	1464 ±507 (709–3632)	1248 ±420# (735–2010)
TNF RII [pg/ml]	1861 ±592 (500–3718)	1553 ±465 NS (905–2818)

#p < 0,05 w porównaniu z grupą kontrolną

*p < 0,001 w porównaniu z grupą kontrolną

NS – brak zależności istotnych statystycznie

Stężenie surowiczego TNF-α wynosiło 1,55 pg/ml i nie odnotowano istotnych różnic w porównaniu z grupą kontrolną. Wykazano natomiast dodatnią korelację między stężeniem TNF-α a stężeniami AGP ($r = 0,3545$, $p < 0,05$) oraz OB ($r = 0,3154$, $p < 0,05$). Średnie stężenia receptora I dla TNF-α w surowicy chorych wynosiło 1464 pg/ml. Stwierdzono znamienne większe stężenia TNF RI w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$). Stężenia receptora typu II dla TNF-α w surowicy chorych mieściły się w zakresie od 500 do 3718 pg/ml i nie znaleziono zależności statystycznie znamiennej między grupą badaną a kontrolną. Stwierdzono natomiast istotną zależność między stężeniami wolnych receptorów TNF RI a TNF RII w badanej grupie chorych ($r = 0,4917$, $p < 0,05$). Wyniki wszystkich oznaczanych parametrów przedstawiono w tabeli I.

Omówienie

Według Cowlinga i wsp. u chorych na ZZSK istnieje pozytywna korelacja między stężeniami CRP i wartościami OB a aktywnością choroby [6]. Jednocześnie Spoorenberg [9], Dougados i wsp. [3] wykazali, że wzrost wartości OB i stężenia CRP następuje częściej u chorych z objawami pozastawowymi [3, 7]. W badaniu autorów niniejszej pracy zaobserwowano znamienne wyższe wyniki OB oraz CRP w porównaniu z grupą kontrolną. W wielu badaniach wykazano korelację wskaźników klinicznych z aktywnością zapalną choroby mierzoną za pomocą stężeń CRP [3, 8, 11]. Niektórzy badacze wskazują również na dodatnią korelację między wartościami indeksu BASDAI a stężeniami CRP

i wartościami OB [8]. W pracy autorów nie zauważono takich zależności. Spośród innych białek ostrej fazy dodatnią korelację ze stężeniami IgA u chorych na ZZSK wykazują α 1-antytrypsyna, kwaśna α 1-glikoproteina oraz haptoglobina [12]. Wyniki pracy autorów wykazały znamienne wyższe wartości AGP, ACT w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych osób oraz dodatnie korelacje między oznaczanymi białkami ostrej fazy.

W piśmiennictwie zwraca się uwagę na istnienie korelacji między wartościami wskaźników BASDAI, BASG-6, BASG-t a aktywnością choroby mierzoną stężeniami CRP. Ponadto wykazano pozytywną korelację między wartościami indeksu BASDAI a wartościami OB oraz BASDAI a stężeniami CRP w grupie pacjentów z zajęciem stawów obwodowych i jej brak u pacjentów z objawami wyłącznie ze strony kręgosłupa [8]. Również Lange i wsp. znaleźli korelację między wartościami indeksu BASDAI a wartościami OB, stężeniami CRP i SAA [13], natomiast Toussiroit i wsp. [2] oraz Dougados i wsp. [3] nie wykazali związku między wartościami BASDAI a stężeniami CRP. Wyniki autorów nie wykazały znamiennej statystycznie zależności między wskaźnikami BASDAI, BASG-6, BASG-t a badanymi białkami ostrej fazy. Wydaje się, że przyczyną powyższych rozbieżności mogą być różne grupy chorych, stosowane leki oraz, prawdopodobnie, dane demograficzne, które nie są uwzględniane w analizach.

W ostatnich latach podkreśla się kluczową rolę TNF i jego receptorów w patogenezie chorób reumatycznych. Dwukierunkowość działania TNF- α (stymuluje układ odpornościowy oraz ma działanie immunosupresyjne) potwierdza obserwacja, że działając bezpośrednio na limfocyty T, TNF- α może powodować apoptozę albo proliferację komórek w badaniach *in vitro*. Czynnikiem martwicy nowotworu α jest cytokiną prozapalną o działaniu plejotropowym, wytwarzaną przez różne typy komórek, m.in. makrofagi, leukocyty, komórki śródbłonka, adipocyty, komórki mięśni gładkich, a także kardiomyocyty, i zwiększa wytwarzanie IL-1 oraz IL-6, będąc aktywatorem transkrypcji tych cytokin. U osób chorych na RZS oraz ZZSK stwierdza się zwiększoną ekspresję TNF na komórkach błony maziowej i obecnych w niej makrofagach.

W badaniu autorów średnie stężenie TNF- α było wyższe w badanej grupie chorych, natomiast różnica nie była znamienne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych osób. Stone i wsp. [14] stwierdzili słabą korelację między wartościami BASDAI a stężeniami TNF- α ($p = 0,09$), a inni badacze nie zaobserwowali takich zależności [15]. Bal i wsp. [16] wykazali dodatnią korelację jedynie między BASMI i BASFI a stężeniem sIL-2R i – podobnie jak w badaniach autorów – nie stwierdzili korelacji między wskaźnikami

indeksów określających aktywność choroby a stężeniami TNF- α . Z wielu badań wynika, że stężenie rozpuszczalnych receptorów dla TNF w osoczu chorych na RZS jest zwiększone i koreluje z aktywnością choroby [17]. Zauważono także, że rozpuszczalne receptory dla TNF mają zdolność do neutralizacji toksycznego działania TNF i mogą się zachowywać jak inhibitory TNF. Heilig i wsp. przeprowadzili badania dotyczące oceny ekspresji receptorów dla TNF u chorych na RZS oraz ZZSK. Stwierdzili, że jednojądrowe komórki zapalne u chorych na RZS wykazywały ekspresję TNF RII we wszystkich badanych przypadkach, natomiast w ZZSK nie wykazywały takiej ekspresji [18]. Wywnioskowano stąd, że receptory te są wskaźnikami aktywności w RZS i mogą zachowywać się tak jak antagoniści dla TNF [17]. U 6 z 11 chorych na ZZSK komórki te wykazywały natomiast ekspresję TNF RI [18]. W badaniach autorów stwierdzono podwyższone wartości TNF RI w porównaniu z grupą kontrolną.

W przeciwieństwie do prac omawiających rolę receptorów dla TNF w patogenezie RZS, publikacji na temat roli tych receptorów w patogenezie ZZSK jest mało. Wyniki autorów niniejszej pracy nie wykazały zależności statystycznej między receptorami RI i RII dla TNF a BASMI i BASDAI. Wydaje się zatem, że stężenie rozpuszczalnych receptorów u mężczyzn chorych na ZZSK nie wpływa na subiektywną ocenę sprawności funkcjonalnej.

Piśmiennictwo

1. Gratacós J, Collado A, Filella X, et al. Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol* 1994; 33: 927-931.
2. Toussiroit E, Lafforgue P, Boucraut J, et al. Serum levels of interleukin 1-beta, tumor necrosis factor-alpha, soluble interleukin 2 receptor and soluble CD8 in seronegative spondylarthropathies. *Rheumatol Int* 1994; 13: 175-180.
3. Dougados M, Gueguen A, Nakache JP, et al. Clinical relevance of C-reactive protein in axial involvement of ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1999; 26: 971-974.
4. Ruof J, Stucki G. Validity aspects of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in ankylosing spondylitis: a literature review. *J Rheumatol* 1999; 26: 966-970.
5. Spoorenberg A, van Tubergen A, Landewé R, et al. Measuring disease activity in ankylosing spondylitis: patient and physician have different perspectives. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 789-795.
6. Cowling P, Ebringer R, Cawdell D, et al. C-reactive protein, ESR, and klebsiella in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1980; 39: 45-49.
7. Laurent MR, Panayi G. Acute-phase proteins and serum immunoglobulins in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1983; 42: 524-528.

8. Spoorenberg A, van der Heijde D, de Klerk E, et al. Relative value of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in assessment of disease activity in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1999; 26: 980-984.
9. Tutuncu ZN, Bilgie A, Kennedy LG, Calin A. Interleukin-6, acute phase reactants and clinical status in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 425-426.
10. Moll JM, Wright V. New York clinical criteria for ankylosing spondylitis. A statistical evaluation. *Ann Rheum Dis* 1973; 32: 354-363.
11. Sheehan NJ, Slavin BM, Donovan MP, et al. Lack of correlation between clinical disease activity and erythrocyte sedimentation rate, acute phase proteins or protease inhibitors in ankylosing spondylitis. *Br J Rheumatol* 1986; 25: 171-174.
12. Mackiewicz A, Khan MA, Reynolds TL, et al. Serum IgA, acute phase proteins, and glycosylation of alpha 1-acid glycoprotein in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 99-103.
13. Lange U, Boss B, Teichmann J, et al. Serum amyloid A – an indicator of inflammation in ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 2000; 19: 119-122.
14. Stone MA, Payne U, Pacheco-Tena C, Inman RD, et al. Cytokine correlates of clinical response patterns to infliximab treatment of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 84-87.
15. Vazquez-Del MM, Garcia-Gonzalez A, Muñoz-Valle JF, et al. Interleukin 1beta (IL-1beta), IL-10, tumor necrosis factor-alpha, and cellular proliferation index in peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2002; 29: 522-526.
16. Bal A, Unlu E, Bahar G, et al. Comparison of serum IL-1 beta, sIL-2R, IL-6, and TNF-alpha levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 2007; 26: 211-215.
17. Heilig B, Wermann M, Gallati H, et al. Evaluation TNF receptor plasma concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Investig* 1992; 70: 22-27.
18. Heilig B, Pezzutto A, Lukoschek M, Hunstein W. Expression of TNF receptors in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Z Rheumatol* 1993; 52: 383-389.