

## Białka ostrej fazy w chorobach reumatycznych – czy tylko markery?

*Acute phase proteins in rheumatic diseases – merely the markers of inflammation?*

Anna Olewicz-Gawlik, Paweł Hrycaj

Zakład Reumatologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,  
kierownik Zakładu dr hab. med. Paweł Hrycaj

**Słowa kluczowe:** białka ostrej fazy, choroby reumatyczne, reumatoidalne zapalenie stawów.

**Key words:** acute phase proteins, rheumatic diseases, rheumatoid arthritis.

### Streszczenie

Odpowiedź ostrej fazy należy do nieswoistych mechanizmów obronnych ludzkiego organizmu. Surowicze stężenia białek ostrej fazy (BOF) ulegają zmianom w warunkach ostrego i przewlekłego zapalenia, towarzyszącego chorobom reumatycznym, ale ich funkcja nie ogranicza się do roli markerów stanu zapalnego.

Celem pracy było określenie zależności między fukozylacją  $\alpha$ 1-kwaśnej glikoproteiny (AGP) i  $\alpha$ 1-antychymotrypsyny (ACT) a klinicznymi i laboratoryjnymi parametrami aktywności choroby w grupie 72 chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS). Wykazano silną dodatnią korelację między współczynnikami fukozytacji AGP-FR i ACT-FR w grupie badanej, nie stwierdzono natomiast zależności współczynników fukozytacji białek AGP i ACT od surowiczych stężeń tych białek. Ponadto stopień fukozytacji AGP i ACT był wyższy w grupie mężczyzn w porównaniu z grupą kobiet. W przypadku klinicznych wykładników aktywności RZS tendencję w kierunku zależności zaobserwowano jedynie między AGP-FR i ACT-FR oraz RADAI (*Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index*). Zmieniona fukozylacja BOF u chorych na RZS jest kolejnym przykładem aktywnego udziału tych glikoprotein w modulowaniu i regulacji odpowiedzi zapalnej ustroju.

### Summary

The acute phase response belongs to the mechanisms of the innate immune system. Serum levels of acute phase proteins (APP) change in response to acute and chronic inflammation (present in many rheumatic disorders), but their function is not limited to being a markers of inflammatory process.

The aim of the present study was to assess the relationship between the fucosylation of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (AGP) and  $\alpha$ 1-antichymotrypsin (ACT), and the clinical and laboratory parameters of disease activity in 72 patients with rheumatoid arthritis (RA).

We observed a strong positive correlation between AGP-FR and ACT-FR in the investigated group. A comparison of AGP and ACT concentrations with the degree of fucosylation of each protein did not revealed any relationship. Moreover, the degree of fucosylation of both proteins was higher in men than in women. Beside a weak association between AGP-FR and ACT-FR and RADAI (*Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index*), no correlations were observed between disease activity and AGP-FR or ACT-FR.

Changed fucosylation of APP in rheumatoid arthritis patients is an example of active role played by these glycoproteins in modulation and regulation of inflammatory response.

### Wstęp

Białka ostrej fazy (BOF) stanowią heterogenną grupę białek. Głównym miejscem ich syntezy jest wątroba. Surowicze stężenia BOF ulegają zmianom w warunkach ostrego i przewlekłego zapalenia; stężenia tzw. pozytywnych BOF, takich jak  $\alpha$ 1-kwaśna glikoproteina (AGP), białko C-reaktywne (*C-reactive protein* – CRP),  $\alpha$ 1-antychymotrypsyna (ACT), haptoglobina (HG), rosną, odwrotnie jest

w przypadku BOF negatywnych (albumina, prealbumina, transferyna) [1]. W procesie regulacji produkcji BOF kluczową rolę odgrywają cytokiny prozapalne – interleukina 6 (IL-6), IL-1 $\beta$ , czynnik martwicy nowotworów (*tumour necrosis factor* – TNF). W przebiegu procesu zapalenia ulega zmianom nie tylko stężenie BOF. Większość BOF to glikoproteiny. W ciągu ostatnich 30 lat badacze poświęcili wiele uwagi zmianom glikozytacji BOF w różnych stanach patologicznych, w tym w chorobach reumatycznych [2].

---

### Adres do korespondencji:

dr med. Anna Olewicz-Gawlik, Zakład Reumatologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu,  
ul. Przybyszewskiego 39, 60-356 Poznań, tel. +48 61 854 72 10, faks +48 61 854 72 12, e-mail: anolegaw@wp.pl

Większość chorób reumatycznych to przewlekłe, autoimmunologiczne choroby zapalne. Poza nielicznymi wyjątkami, stężenia BOF najczęściej oznaczanych u chorych na choroby reumatyczne rosną wraz z nasileniem zapalenia. Jak wspomniano powyżej, mimo niewątpliwej przydatności stężeń BOF w monitorowaniu aktywności chorób zapalnych, ich funkcji nie można sprowadzić wyłącznie do roli markerów stanu zapalnego.

Białko C-reaktywne jest białkiem dobrze znanym reumatologom, niewiele jednak mówi się o jego biologicznych właściwościach. Można wśród nich wymienić zdolność CRP do aktywacji dopełniacza drogą klasyczną [3], pobudzania procesu fagocytozy [4], wiązania receptora  $Fc\gamma$  ( $Fc\gamma R$ ) [5], a przez wiązanie antygenów jądrowych i komórek apoptotycznych CRP może wywierać działanie ochronne wobec immunizacji autoantygenami [6].

Nie tylko CRP spełnia w ustroju wiele ważnych funkcji, dotyczy to również wspomnianych już glikoprotein, w tym AGP i ACT. AGP –  $\alpha 1$ -kwaśna glikoproteina – może m.in. hamować agregację płytek krwi [7], wzmacniać wydzielanie antagonisty receptora IL-1 [8], hamować indukowaną TNF apoptozę [9]. Cząsteczki AGP i ACT mają w różnych ilościach determinanty zawierające fukozę, tzw. sialowany Lewis X ( $sLe^x$ ). Wykazano, że determinanty te, zawierające kwas sialowy, stanowią jeden z ligandów dla selektyn E, L i P [10], dzięki czemu białko AGP może uczestniczyć w regulacji migracji leukocytów do miejsc zapalenia. Odpowiadają także za antyneutrofilowe i hamujące aktywność dopełniacza właściwości AGP [11]. Fukozylacja AGP [12] i ACT (inhibitora proteaz serynowych) wzrasta w pewnych stanach patologicznych, w tym w reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS) [13, 14].

## Cel pracy

Celem badania była ocena związku fukozylacji dwóch BOF, AGP i ACT, z klinicznymi i laboratoryjnymi wskaźnikami aktywności choroby u chorych na RZS, najczęstszą zapalną chorobę reumatyczną.

## Materiał i metody

Badaniom poddano 72 chorych na RZS spełniających zmodyfikowane kryteria rozpoznania choroby z 1987 r., opracowane przez Amerykańskie Kolegium Reumatologiczne (*American College of Rheumatology* – ACR) [15]. Wszyscy chorzy zostali poinformowani o celu i przebiegu badania oraz wyrazili świadomą zgodę na udział w nim.

Do oceny klinicznej aktywności RZS u chorych zastosowano indeks RADAI (*Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index*) [16] oraz obliczono współczynnik aktywności choroby DAS 28 (3 i 4 zmienne) (*Disease Activity Score*) [17]. Oceny bólu odczuwanego przez chorych do-

konano za pomocą wizualnej skali analogowej (*Visual Analogue Scale* – VAS).

Krew żylną pobrano od chorych do próbek na OB oraz na skrzep. Po uformowaniu skrzepu krew odwirowano, a uzyskaną surowicę zamrożono do czasu wykonania oznaczeń w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Surowicze stężenia BOF (CRP, AGP i ACT) oznaczono za pomocą immunoelektroforezy rakietkowej [18], natomiast do określenia stężeń czynnika reumatoidalnego w klasie IgM (IgM RF) oraz przeciwciał przeciwcitrulinowych (anty-CCP) zastosowano gotowe zestawy ELISA (odpowiednio, IMTEC, Niemcy oraz Euroimmun, Niemcy), wartość OB oznaczono metodą standardową (Westergrena). Fukozylację AGP i ACT oznaczono z zastosowaniem metody opracowanej przez Rydéną i wsp. [19] i dla obu glikoprotein obliczono współczynniki fukozylacji AGP-FR i ACT-FR.

Dane demograficzne grupy badanej przeanalizowano za pomocą metod statystyki opisowej. Do oceny zależności między parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi aktywności RZS zastosowano nieparametryczny test korelacji porządku rang Spearmana. Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość  $p < 0,05$ . Wszystkie analizy wykonano z użyciem programu Statistica (Statsoft, 2005. Statistica version 7.1).

## Wyniki

Przebadano 72 chorych na RZS, 53 kobiety i 19 mężczyzn (średni wiek chorych wynosił 56,9 roku, średni czas trwania choroby 10,7 roku). Czterdziestu dwóch chorych było leczonych glikokortykosteroidami (średnia dawka równoważna dla prednizonu 6,1 mg), 49 chorych otrzymywało metotreksat (średnia dawka 16,5 mg), 31 stosowało jednocześnie glikokortykosteroidy i metotreksat. Ponadto 12 osób było leczonych sulfasalazyną, 3 osoby leflunomidem, 1 chlorochiną. Sześćdziesięciu sześciu chorych otrzymywało przewlekłe niesteroidowe leki przeciwzapalne.

Dwadzieścia dziewięć osób było dodatkowo leczonych z powodu nadciśnienia tętniczego, 22 z powodu stabilnej choroby wieńcowej, 9 z powodu cukrzycy i 6 z powodu chorób płuc (przewlekła obturacyjna choroba płuc i astma oskrzelowa). Szesnaście osób (22,2%) było uzależnionych od palenia tytoniu.

Wartości otrzymanych w grupie badanej parametrów klinicznych i laboratoryjnych przedstawiono w tab. I.

Stwierdzono istotną statystycznie korelację między współczynnikami fukozylacji AGP-FR i ACT-FR ( $r=0,85$ ). Stężenia AGP i ACT nie były związane ze stopniem fukozylacji wymienionych BOF. Wykazano także brak zależności między AGP-FR i ACT-FR a innymi parametrami zapalenia (CRP i OB).

W grupie badanej zaobserwowano także słabą zależność między AGP-FR i ACT-FR a indeksem aktywności

choroby RADAI, odpowiednio  $r=0,26$  i  $r=0,25$ . Nie stwierdzono istotnej zależności między współczynnikami fukozytacji AGP-FR i ACT-FR a DAS 28. W przypadku stężeń AGP i ACT zaobserwowano odwrotną sytuację – stężenia tych białek korelowały z DAS 28 (dla DAS 28 – 3 zmienne – odpowiednio  $r=0,42$ ;  $0,29$ ), ale nie z indeksem RADAI. Ból odczuwany przez chorych nie był związany ani ze stężeniami BOF, ani z AGP-FR i ACT-FR.

Nie zaobserwowano istotnej różnicy w fukozytacji BOF między chorymi na cukrzycę i resztą grupy badanej.

Wartości  $p$  dla stwierdzonych zależności były niższe od 0,05.

## Omówienie

Użyteczność współczynników fukozytacji AGP-FR i ACT-FR jako markerów aktywności choroby jest niewielka. Zaobserwowana słaba zależność między AGP-FR i ACT-FR a indeksem aktywności choroby RADAI, a jej brak w przypadku DAS 28, może wynikać z odmiennych zasad pomiaru aktywności choroby za pomocą obydwu narzędzi. Indeks RADAI zawiera zapytanie o ogólne nasilenie zapalenia stawów w ciągu ostatnich 6 mies., jest też narzędziem stosowanym samodzielnie przez chorego, DAS 28 dotyczy aktualnie obserwowanej aktywności choroby. Wzrost fukozytacji badanych BOF odzwierciedla zatem raczej podstawowy, patologiczny proces zapalny, a co się z tym wiąże, nie podlega krótkoterminowym wahaniom ocenianej klinicznie aktywności choroby. Stężenia BOF, jak już wspomniano, regulowane niezależnie od glikozylacji (w tym fukozytacji), odzwierciedlają z kolei właśnie krótkoterminowe zmiany w klinicznej aktywności choroby, stąd związek między stężeniami AGP, ACT i CRP oraz wskaźnikami DAS 28.

Podobne obserwacje opublikowali Rydén i wsp. [20]. Chorzy w tym badaniu byli oceniani 2-krotnie – na początku badania i po roku. Badacze zaobserwowali słabą zależność między surowiczymi stężeniami AGP i CRP a DAS 28 (odpowiednio:  $r=0,36$  i  $r=0,31$ ), natomiast wyłącznie w podgrupie mężczyzn znaleziono słabą zależność między AGP-FR i DAS 28 ( $r=0,28$ ). Mimo istotnego obniżenia wskaźnika DAS 28 w trakcie obserwacji współczynnik AGP-FR utrzymywał się po roku na poziomie podobnym do poziomu w momencie zakwalifikowania chorych do badania. Wyniki otrzymane przez Rydén i wsp. potwierdzają obserwację, że fukozyalizacja BOF może być odbiciem procesu zapalnego leżącego u podłoża RZS, natomiast nie dostarczają informacji na temat krótkoterminowej aktywności choroby, przydatnej w monitorowaniu jej przebiegu.

Indukowaną zapaleniem zwiększoną ekspresję determinanty sLe<sup>x</sup> opisano także dla cząsteczki ACT, aczkolwiek w stopniu mniejszym niż w przypadku AGP. Nie

**Tabela I.** Cechy kliniczne i parametry laboratoryjne chorych na RZS,  $n=72$

**Table I.** Clinical and laboratory parameters of rheumatoid arthritis patients,  $n=72$

Badane parametry	Średnia	Minimum	Maksimum	SD
VAS (mm)	48,75	4	90	21,2
DAS 28 (4 zmienne)	5,28	1,38	7,93	1,39
DAS 28 (3 zmienne)	5,12	1,59	7,86	1,39
RADAI	37,58	1,50	71,60	14,11
RF IgM (RU/l)	110,94	0	200	84,46
anty-CCP (j.m./l)	85,49	0	200	88,36
OB (mm/godz.)	27,24	1	90	22,44
CRP (mg/l)	8,05	0	73,3	13,33
AGP (mg/l)	1111,89	407	2202	405,93
ACT (mg/l)	563,83	251	1526	284,27
AGP-FR	2,35	0,41	3,81	0,76
ACT-FR	1,43	0,1	2	0,41

SD – odchylenie standardowe,  $n$  – liczba chorych w grupie badanej

opublikowano do tej pory doniesień porównujących kliniczną aktywność RZS ze stopniem fukozytacji ACT. Poza faktem przynależności AGP i ACT do grupy pozytywnych BOF, oba białka spełniają w ustroju inne role. ACT należy do grupy inhibitorów proteaz serynowych, dlatego pod wieloma względami fukozyalizacja ACT może mieć dla ludzkiego organizmu inne znaczenie niż fukozyalizacja AGP.

Podział badanych chorych pod względem płci ujawnił istotne różnice w wysokości współczynników fukozytacji AGP-FR i ACT-FR, które okazały się wyższe w podgrupie mężczyzn, co jest zgodne z doniesieniami z literatury. Wskazują one z jednej strony na zwiększoną fukozytację AGP u mężczyzn [20], z drugiej natomiast na obniżającą fukozytację AGP wpływ estrogenów [21], co jest prawdopodobnie przyczyną podobnych wyników w przypadku ACT.

Na fukozytację BOF mogą wpływać leki stosowane przez chorych. De Graaf i wsp. [22] zaobserwowali obniżenie fukozytacji AGP u chorych dobrze reagujących na leczenie metotreksatem lub azatiopryną. Podobny wpływ na fukozytację AGP wywarło leczenie infliksymabem, monoklonalnym przeciwciałem skierowanym przeciwko TNF [23].

W niniejszej pracy nie stwierdzono różnic w fukozytacji AGP i ACT w zależności od stosowanej farmakote-

rapii, co jest prawdopodobnie wynikiem stosowanej u większości badanych terapii metotreksatem; grupy leczone innymi lekami modyfikującymi przebieg choroby (LMPCh) były mało liczne. Żaden chory nie był leczony preparatami biologicznymi ani w momencie badania, ani w przeszłości. Przedmiotem omawianej pracy nie była także analiza odpowiedzi na stosowane leczenie, a badanie obejmowało tylko jedną wizytę.

## Wnioski

Przewlekłemu procesowi zapalnemu, jakim jest RZS, towarzyszy wzrost fukozytacji AGP i ACT. Stopień fukozytacji glikoprotein odzwierciedla raczej nasilenie stanu zapalnego w dłuższym przedziale czasowym u chorych na RZS, a nie krótkotrwałe wahania aktywności choroby, zależy również od płci chorych. Procesy syntezy i glikozylacji BOF są odrębnie regulowane.

Podsumowując, surowicze BOF są niezbędną składową złożonego układu, utrzymującego efekty reakcji zapalnych w dość wąskich granicach oraz przywracającego homeostazę ustroju [1]. Pogląd, że BOF służą ograniczeniu zniszczeń powodowanych przez proces zapalny, jest akceptowany [24]. Białka ostrej fazy nie są jedynie markerami zapalenia, ale jego czynnymi uczestnikami.

## Piśmiennictwo

- Baumann H. Hepatic acute phase reaction in vivo and in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989; 25: 115-126.
- Turner GA. N-glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectins. *Clin Chim Acta* 1992; 208: 149-171.
- Kaplan MH, Volanakis JE. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J Immunol* 1974; 112: 2135-2147.
- Kindmark CO. Stimulating effect of C-reactive protein on phagocytosis of various species of pathogenic bacteria. *Clin Exp Immunol* 1971; 8: 941-948.
- Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, et al. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fc gamma receptor II. *J Exp Med* 1999; 190: 585-590.
- Nakayama S, Du Clos TW, Gewurz H, et al. Inhibition of antibody responses to phosphocholine by C-reactive protein. *J Immunol* 1984; 132: 1336-1340.
- Snyder S, Coodley EL. Inhibition of platelet aggregation by alpha1-acid glycoprotein. *Arch Intern Med* 1976; 136: 778-781.
- Bories PN, Guenounou M, Feger J, et al. Human alpha 1-acid glycoprotein-exposed macrophages release interleukin 1 inhibitory activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 147: 710-715.
- Van Molle W, Libert C, Fiers W, et al. Alpha1-acid glycoprotein and alpha 1-antitrypsin inhibit TNF-induced but not anti-Fas-induced apoptosis of hepatocytes in mice. *J Immunol* 1997; 159: 3555-3564.
- Zollner TM, Asadullah K. Selectin and selectin ligand binding: a bittersweet attraction. *J Clin Invest* 2003; 112: 980-983.
- Williams JP, Weiser MR, Pechet TT, et al.  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein reduces local and remote injuries after intestinal ischemia in the rat. *Am J Physiol* 1997; 273: G1031-G1035.
- Higai K, Aoki Y, Azuma Y, Matsumoto K. Glycosylation of site-specific glycans of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1725: 128-1235.
- Elliott MA, Elliott HG, Gallagher K, et al. Investigation into the concanavalin A reactivity, fucosylation and oligosaccharide microheterogeneity of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein expressed in the sera of patients with rheumatoid arthritis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 688: 229-237.
- Brinkman-van der Linden EC, de Haan PF, Havenaar EC, et al. Inflammation-induced expression of sialyl LewisX is not restricted to  $\alpha$ 1-acid glycoprotein but also occurs to a lesser extent on  $\alpha$ 1-antichymotrypsin and haptoglobin. *Glycoconj J* 1998; 15: 177-182.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of Rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-324.
- Stucki G, Liang MH, Stucki S, et al. A self-administered rheumatoid arthritis disease activity index (RADAI) for epidemiologic research. Psychometric properties and correlation with parameters of disease activity. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 795-798.
- van der Heijde DM, van't Hof M, van Riel PL, et al. Development of a disease activity score based on judgment in clinical practice by rheumatologists. *J Rheumatol* 1993; 20: 579-581.
- Laurell CB. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analytical Biochemistry* 1966; 15: 45-52.
- Rydén I, Lundblad A, Pålsson P. Lectin ELISA for analysis of  $\alpha$ (1)-acid glycoprotein fucosylation in the acute phase response. *Clin Chem* 1999; 45: 2010-2012.
- Rydén I, Pahlsson P, Lundblad A, et al. Fucosylation of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (orosomucoid) compared with traditional biochemical markers of inflammation in recent onset rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* 2002; 317: 221-229.
- Brinkman-Van der Linden CM, Havenaar EC, Van Ommen CR, et al. Oral estrogen treatment induces a decrease in expression of sialyl Lewis x on alpha 1-acid glycoprotein in females and male-to-female transsexuals. *Glycobiology* 1996; 6: 407-412.
- De Graaf TW, Van Ommen EC, Van der Stelt ME, et al. Effects of low dose methotrexate therapy on the concentration and the glycosylation of alpha 1-acid glycoprotein in the serum of patients with rheumatoid arthritis: a longitudinal study. *J Rheumatol* 1994; 21: 2209-2216.
- Olewicz-Gawlik A, Korczowska-Łącka I, Łącki JK, et al. Fucosylation of serum  $\alpha$ (1)-acid glycoprotein in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab. *Clin Rheumatol* 2007; 26: 1679-1684.
- Baumann H, Gaudie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994; 15: 74-80.