

## Przydatność oznaczania w surowicy krwi stężeń interleukiny 6 (IL-6), metaloproteinaz i ich tkankowych inhibitorów w ocenie aktywności reumatoidalnego zapalenia stawów

*The value of the assessment of interleukin-6 (IL-6), matrix metalloproteinases and their inhibitors in serum in the assessment of rheumatoid arthritis activity*

Piotr Adrian Klimiuk, Stanisław Sierakowski, Ewa Gińdzieńska-Sieśkiewicz, Justyna Chwiećko

Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Białymstoku,

kierownik Kliniki prof. dr hab. med. Stanisław Sierakowski

**Słowa kluczowe:** reumatoidalne zapalenie stawów, interleukina 6, metaloproteinazy, tkankowe inhibitory metaloproteinaz.

**Key words:** rheumatoid arthritis, interleukin 6, metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases.

### Streszczenie

Celem niniejszej pracy była analiza korelacji pomiędzy stężeniem IL-6 w surowicy krwi a stężeniem metaloproteinaz (MMPs, *matrix metalloproteinases*) i ich tkankowych inhibitorów (TIMPs, *tissue inhibitors of metalloproteinases*) oraz klinicznymi wskaźnikami aktywności choroby u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS). Stężenia IL-6, kolagenazy 1 (MMP-1), stromelizyny 1 (MMP-3), żelatynazy B (MMP-9), TIMP-1 i TIMP-2 oznaczono w surowicy 32 chorych na RZS, opierając się na metodzie ELISA. W przeprowadzonych badaniach wykazano korelację pomiędzy stężeniem IL-6 a całkowitym stężeniem badanych MMPs ( $p < 0,001$ ) i całkowitym stężeniem badanych TIMPs ( $p < 0,001$ ). Stwierdzono również, że stężenie w surowicy IL-6 całkowitych stężeń badanych MMPs i TIMPs korelowało z szybkością opadania krwinek czerwonych, stężeniem białka C-reaktywnego, liczbą bolesnych i obrzękniętych stawów oraz wskaźnikiem stawowym Ritchiego. Należy sądzić, że analiza stężeń IL-6, badanych MMPs i TIMPs może być przydatna w ocenie aktywności reumatoidalnego zapalenia stawów.

### Wstęp

Reumatoidalne zapalenie stawów (RS) jest przewlekłym zapalnym schorzeniem układowym tkanki łącznej, w przebiegu którego dochodzi do niszczenia struktur sta-

### Summary

The aim of the study was to explore whether the serum level of interleukin 6 (IL-6) is correlated with matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), and with clinical markers of the disease activity in rheumatoid arthritis (RA). Concentrations of IL-6, interstitial collagenase (MMP-1), stromelysin-1 (MMP-3), gelatinase B (MMP-9), TIMP-1 and TIMP-2 were measured with an ELISA technique in serum of 32 RA patients. We found the correlations between IL-6 and total measured MMPs ( $p < 0.001$ ), and total measured TIMPs ( $p < 0.001$ ). Furthermore, serum IL-6, MMPs and TIMPs correlated with the erythrocyte sedimentation rate, C reactive protein level, the number of tender and swollen joints, and Ritchie articular index (RAI). We conclude that analysis of the serum IL-6, MMPs and TIMPs levels may be useful in the assessment of the RA activity.

wych i okołostawowych. W rezultacie prowadzi ono do ograniczenia możliwości wykonywania przez chorego codziennych czynności życiowych. Istotną rolę w patogenezie RZS wydają się pełnić limfocyty, makrofagi i synowocyty, które niszczą tkanki stawowe poprzez wiele me-

---

### Adres do korespondencji:

dr hab. med. Piotr Adrian Klimiuk, Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych, Akademia Medyczna, ul. Skłodowskiej 24a, 15-276 Białystok

Praca wpłynęła: 3.08.2005 r.

chanizmów, w tym przez produkowane przez siebie cytokiny oraz metaloproteinazy (MMPs, *matrix metalloproteinases*) [1, 2]. Obok kluczowych prozapalnych cytokin, takich jak czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , *tumour necrosis factor  $\alpha$* ) i interleukina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), w patogenezie RZS istotną rolę odgrywa IL-6 [3–6]. Wykazuje ona potencjał do pobudzania produkcji białek ostrej fazy, i to nawet większy niż IL-1 $\beta$  [7]. IL-6 jest ponadto czynnikiem wzrostu dla limfocytów B i stymuluje wydzielanie immunoglobulin. Cytokina ta aktywuje także komórki T i pobudza proliferację fibroblastów [8]. W przebiegu RZS niezmiernie ważne jest zwiększanie przepuszczalności śródbłonna dla limfocytów przez IL-6 [4], co w rezultacie pozwala na ich migrację do błony maziowej stawów. Właściwość ta jest szczególnie istotna w zainicjowaniu i rozwoju reumatoidalnego procesu zapalnego w obrębie stawowej błony maziowej. IL-6 odgrywa również pośrednio rolę w procesie degradacji chrząstki stawowej. Związane jest to z blokowaniem przez nią proliferacji chondrocytów i tworzenia proteoglikanów oraz stymulowaniem rozpadu proteoglikanów wywołanemu przez IL-1 $\beta$  [9]. Ponadto IL-6 jest odpowiedzialna za wystąpienie gorączki i pobudzanie katabolizmu, prowadzące do kacheksji [4]. Znaczenie IL-6 w patogenezie RZS potwierdzają próby kliniczne terapii, skierowane przeciwko tej cytokinie, których skutkiem jest zmniejszenie aktywności choroby [10]. Należy jednak pamiętać, że IL-6 przejawia również właściwości cytokiny przeciwzapalnej. Wykazano, że IL-6 zmniejsza syntezę TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  [4] oraz pobudza wytwarzanie tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMPs, *tissue inhibitors of metalloproteinases*) [11]. TIMPs są, jak wiadomo, inhibitorami metaloproteinaz (MMPs, *matrix metalloproteinases*) biorących udział w procesach degradacji i przebudowy tkanek stawowych [11, 12]. Celem pracy była analiza korelacji pomiędzy stężeniem IL-6 w surowicy a stężeniem metaloproteinaz, ich tkankowych inhibitorów oraz klinicznymi wskaźnikami aktywności choroby u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów.

## Grupa badana i metody

Badaniami objęto 32 chorych (25 kobiet i 7 mężczyzn) z reumatoidalnym zapaleniem stawów rozpoznanym na podstawie kryteriów Amerykańskiego Kolegium Reumatologicznego (ACR, *American College of Rheumatology*) z 1987 r. [13]. Wśród analizowanych pacjentów średnia wieku wynosiła 55,1 $\pm$ 12,7 roku, a czas trwania choroby 17,1 $\pm$ 6,9 roku. W trakcie 3 ostatnich miesięcy przed badaniem niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) stosowane były przez wszystkich chorych, a 23 przyjmowało także leki modyfikujące przebieg choroby (17 metotreksat i 6 sulfasalazynę). Aktywność choroby analizowano na podstawie liczby bolesnych i obrzękniętych stawów, wskaźnika stawowego Ritchiego [14], szybkości opadania krwinek czerwonych (OB) oraz stężenia białka C-reaktywnego (CRP, *C-reactive protein*).

W badaniach wykorzystano krew pobieraną z żyły łokciowej, którą następnie wykrzepiano przez 30 min, po czym wirowano przez 10 min (1000 x g). Surowicę pochodzącą od poszczególnych chorych dzielono na pojedyncze próbki, które mrożono w temperaturze -80°C. Używając komercyjnych zestawów ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), oznaczano w surowicy stężenia IL-6 (Bender MedSystems, Vienna, Austria) oraz MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 (Biotrak, Amersham Pharmacia Biotech Limited, Little Chalfont Buckinghamshire, England), ściśle stosując się do instrukcji producenta. Stężenia IL-6 wyrażono w pg/ml, natomiast MMPs i TIMPs w ng/ml. Czulość poszczególnych zestawów ELISA była następująca: 1,4 pg/ml (IL-6); 1,7 ng/ml (MMP-1); 2,35 ng/ml (MMP-3); 0,6 ng/ml (MMP-9); 1,25 ng/ml (TIMP-1) i 3,0 ng/ml (TIMP-2).

Analizy statystycznej dokonano na podstawie korelacji Spearmana. Korelację uznawano za znamienne przy  $p < 0,05$ .

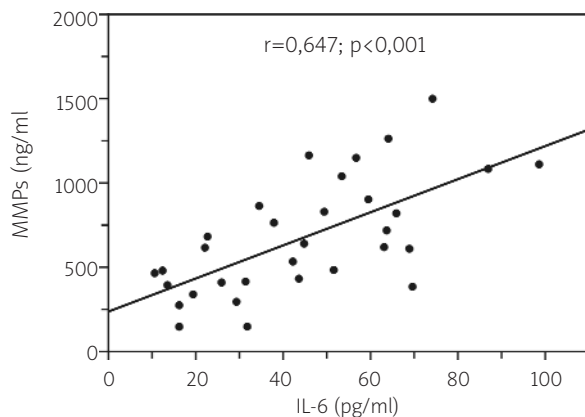
## Wyniki

W rezultacie przeprowadzonych analiz stwierdzono dodatnią korelację ( $r=0,647$ ;  $p < 0,001$ ) pomiędzy stężeniem IL-6 i łącznym stężeniem wszystkich badanych metaloproteinaz (MMP-1, MMP-3 i MMP-9) w surowicy chorych na RZS (ryc. 1). Znamienne statystycznie zależność ( $r=0,591$ ;  $p < 0,001$ ) wykazano również pomiędzy stężeniem IL-6 i łącznym stężeniem badanych tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP-1 i TIMP-2) w surowicy badanych pacjentów (ryc. 2.).

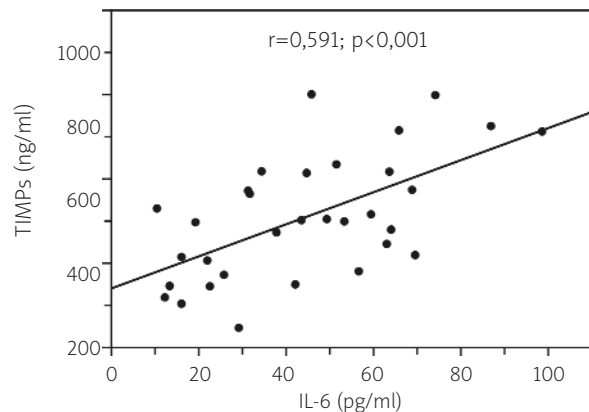
W surowicy pacjentów z RZS stężenie IL-6 korelowało ze wskaźnikami aktywności choroby, takimi jak szybkość opadania krwinek czerwonych (OB) ( $r=0,721$ ;  $p < 0,001$ ), stężenie białka C-reaktywnego (CRP) ( $r=0,601$ ;  $p < 0,001$ ), liczba bolesnych ( $r=0,518$ ;  $p < 0,01$ ) i obrzękniętych stawów ( $r=0,525$ ;  $p < 0,01$ ) czy wskaźnik Ritchiego ( $r=0,464$ ;  $p < 0,01$ ). Również łączne stężenie badanych metaloproteinaz (MMP-1, MMP-3 i MMP-9) korelowało z OB ( $r=0,737$ ;  $p < 0,001$ ), CRP ( $r=0,371$ ;  $p < 0,05$ ), liczbą bolesnych ( $r=0,533$ ;  $p < 0,01$ ) i obrzękniętych stawów ( $r=0,590$ ;  $p < 0,001$ ) czy wskaźnikiem Ritchiego ( $r=0,469$ ;  $p < 0,01$ ). Ponadto łączne stężenie badanych tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP-1 i TIMP-2) korelowało z OB ( $r=0,506$ ;  $p < 0,01$ ), CRP ( $r=0,355$ ;  $p < 0,05$ ), liczbą bolesnych ( $r=0,510$ ;  $p < 0,01$ ) i obrzękniętych stawów ( $r=0,477$ ;  $p < 0,01$ ) czy wskaźnikiem Ritchiego ( $r=0,373$ ;  $p < 0,05$ ).

## Dyskusja

Biorąc pod uwagę częstość występowania w populacji oraz prowadzący do inwalidztwa przebieg, reumatoidalne zapalenie stawów stanowi niezmiernie ważny problem społeczny. W przebiegu choroby u wielu pacjentów oprócz zmian stawowych rozwijają się także



**Ryc. 1.** Korelacja pomiędzy stężeniem interleukiny 6 (IL-6) a łącznym stężeniem badanych metaloproteinaz (MMP-1, MMP-3 i MMP-9) w surowicy chorych na reumatoidalne zapalenie stawów.



**Ryc. 2.** Korelacja pomiędzy stężeniem IL-6 a łącznym stężeniem badanych tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP-1 i TIMP-2) w surowicy chorych na reumatoidalne zapalenie stawów.

powikłania narządowe, stanowiące zagrożenie dla ich zdrowia i życia. Skłoniło to wielu badaczy do zwrócenia szczególnej uwagi na tę układową chorobę tkanki łącznej. Wykazano, że ważną rolę w destrukcji tkanek stawowych i okołostawowych odgrywają limfocyty, makrofagi i synowioocyty. Przyjmuje się, że biorą one udział w reumatoidalnym procesie zapalnym, m.in. poprzez wytwarzanie prozapalnych cytokin i metaloproteinaz [1, 2]. Do prozapalnych cytokin biorących udział w patogenezie schorzenia oprócz TNF- $\alpha$  i interleukiny 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) należy również IL-6 wytwarzana przez monocyty, komórki śródbłonna, fibroblasty i limfocyty T. Produkcja IL-6 jest stymulowana przez IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  [4, 15]. W RZS obecność IL-6 wykazano w błonie maziowej stawów, w płynie stawowym oraz w surowicy krwi. Ekspresja IL-6 w błonie maziowej stawów, płynie stawowym i krwi u chorych na RZS jest większa w porównaniu z pacjentami z chorobą zwyrodnieniową stawów oraz osobami zdrowymi [3, 4, 6]. Jak wiadomo, IL-6 pełni wiele ważnych funkcji w procesie zapalnym, o których wspomniano we wstępie.

W przebiegu reumatoidalnego procesu zapalnego tkanki stawowe i okołostawowe niszczone są przez metaloproteiny syntetyzowane przez makrofagi i synowioocyty [1, 2, 11]. Spośród metaloproteinaz wyróżnia się m.in. kolagenazę (MMP-1), stromelizynę 1 (MMP-3) i żelatynazę B (MMP-9). Obecność MMPs stwierdzono nie tylko w maziówce stawowej czy w płynie stawowym, ale także w surowicy krwi pacjentów z RZS [16, 17]. Niszcząca aktywność metaloproteinaz jest regulowana m.in. przez wytwarzanie ich w postaci nieaktywnych proenzymów, jak i przez ich inhibitory, do których należą też tkankowe inhibitory

metaloproteinaz. Stwierdzono, że produkcja TIMPs jest pobudzana m.in. przez IL-6 [11].

W poprzedniej pracy wykazaliśmy korelację stężenia IL-6 w surowicy chorych na RZS ze stężeniem kolagenazy, stromelizyny 1 i żelatynazy B. Stwierdziliśmy również korelację IL-6 z tkankowymi inhibitorami metaloproteinaz, zarówno TIMP-1, jak i TIMP-2 [18]. W obecnym opracowaniu postanowiliśmy zwrócić szczególną uwagę i przedstawić korelację IL-6 zarówno z łącznym stężeniem badanych metaloproteinaz (MMP-1, MMP-3 i MMP-9), jak i łącznym stężeniem badanych tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP-1 i TIMP-2). Wykazaliśmy zarówno korelację pomiędzy stężeniem IL-6 a całkowitym stężeniem badanych MMPs, jak i całkowitym stężeniem badanych TIMPs. Wydaje się, że łączne analizowanie stężeń badanych MMPs i TIMPs zaangażowanych w patogenezę choroby jest właściwsze w ocenie aktywności procesu reumatoidalnego.

Ponadto w obecnej pracy stwierdziliśmy korelację nie tylko stężeń IL-6, ale i łącznych stężeń badanych metaloproteinaz (MMP-1, MMP-3, MMP-9) oraz tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP-1 i TIMP-2) w surowicy krwi ze wskaźnikami aktywności choroby, takimi jak szybkość opadania krwinek czerwonych, stężenie białka C-reaktywnego, liczba bolesnych i obrzękniętych stawów oraz wskaźnik stawowy Ritchiego. Także w innych badaniach u chorych na RZS wykazano korelację IL-6 z OB i CRP [3, 6, 19, 20]. Wiadomo również, że stężenie IL-6 koreluje ze stężeniem takich cytokin, jak IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , uważanych za odgrywające kluczową rolę w patogenezie RZS [21]. W opracowaniach innych autorów zaobserwowano również korelację pomiędzy stężeniem w surowicy MMP-3 a OB i liczbą obrzęknię-

tych stawów [22–24] oraz pomiędzy stężeniem TIMP-1 a OB [23]. Wyniki naszych badań w powiązaniu z danymi z piśmiennictwa sugerują, że określanie w surowicy chorych na RZS stężenia IL-6, łącznego stężenia badanych MMPs (MMP-1, MMP-3 i MMP-9) oraz TIMPs (TIMP-1 i TIMP-2) może być pomocne w ocenie aktywności choroby i monitorowaniu leczenia.

### Wnioski

1. W surowicy chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów stężenie interleukiny 6 koreluje z łącznym stężeniem badanych metaloproteinaz (MMP-1, MMP-3 i MMP-9) oraz tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP-1 i TIMP-2).
2. Stężenie IL-6, łączne stężenie badanych metaloproteinaz (MMP-1, MMP-3 i MMP-9) oraz tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP-1 i TIMP-2) w surowicy chorych na RZS koreluje ze wskaźnikami aktywności choroby, takimi jak szybkość opadania krwinek czerwonych, stężenie białka C-reaktywnego, liczba bolesnych i obrzękniętych stawów oraz wskaźnik stawowy Ritchiego.
3. Analiza stężenia IL-6, łącznego stężenia badanych metaloproteinaz (MMP-1, MMP-3 i MMP-9) oraz tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP-1 i TIMP-2) w surowicy chorych może być pomocna w ocenie aktywności RZS i monitorowaniu leczenia.

### Piśmiennictwo

1. Bresnihan B. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26: 717-19.
2. van den Berg WB, van Lent PL. The role of macrophages in chronic arthritis. *Immunobiology* 1996; 195: 614-23.
3. Bernacka K, Sierakowski S, Lachowicz M i wsp. Próba korelacji stężenia rodników hydroksylowych w ocenie dwualdehydu malonowego ze stężeniem IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF $\alpha$  w surowicy pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów. *Reumatologia* 1996; 34: 15-20.
4. Klimiuk PA, Sierakowski S. Cytokiny w reumatoidalnym zapaleniu stawów. I. Cytokiny prozapalne. *Pol Merk Lek* 2001; 11: 510-13.
5. Olszewski WL, Pazdur J, Kubasiewicz E, et al. Lymph draining from foot joints in rheumatoid arthritis provides insight into local cytokine and chemokine production and transport to lymph nodes. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 541-9.
6. Sierakowski S, Bernacka K, Lachowicz M, et al. Concentrations of IL-6 and TNF $\alpha$  in the serum of patients with rheumatoid arthritis in the course of disease. *Reumatologia* 1996; 34: 184-90.
7. Suffredini AF, Fantuzzi C, Badolato R, et al. New insights into the biology of the acute phase response. *J Clin Immunol* 1999; 19: 203-14.
8. Dinant HJ, Dijkmans BAC. New therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Pharm World Sci* 1999; 21: 49-59.
9. Jikko A, Wakisaka T, Iwamoto M, et al. Effects of interleukin-6 on proliferation and proteoglycan metabolism in articular chondrocyte cultures. *Cel Biol Int* 1998; 22: 615-21.
10. Klimiuk PA, Sierakowski S. Cytokiny i ich antagoniści w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów. *Przegl Lek* 2002; 59: 108-12.
11. Nagase H, Okada Y. Proteinases and matrix degradation. In: *Textbook of rheumatology*. Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, et al. (eds). W. B. Saunders Company, Philadelphia 1997; 323-41.
12. Firestein GS. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *Textbook of rheumatology*. Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, et al. (eds). W. B. Saunders Company, Philadelphia 1997; 851-97.
13. 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: 315-24.
14. Ritchie DM, Boyle JA, McInnes JM, et al. Clinical studies with an articular index for the assessment of joint tenderness in patients with rheumatoid arthritis. *Q J Med* 1968; 37: 393-406.
15. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cytokines. In: *Cellular and molecular immunology*. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds). W. B. Saunders Company, Philadelphia 1994; 240-60.
16. Klimiuk PA, Sierakowski S, Latosiewicz R, et al. Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in different histological variants of rheumatoid synovitis. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41: 78-87.
17. Klimiuk PA, Yang H, Goronzy JJ, et al. Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid arthritis is T cell dependent. *Clin Immunol* 1999; 90: 65-78.
18. Klimiuk PA, Sierakowski S, Chwiećko J. Stężenie interleukiny 6 (IL-6) w surowicy koreluje ze stężeniem metaloproteinaz i ich tkankowych inhibitorów w reumatoidalnym zapaleniu stawów. *Pol Arch Med Wewn* 2003; 109: 119-23.
19. Franke S, Herrmann D, Hein G, et al. Interleukin-6, soluble interleukin-2-receptor and soluble interleukin-6-receptor in sera of patients with rheumatoid arthritis: influences of disease activity and drug therapy. *Eur J Med Res* 1997; 29: 401-6.
20. Houssiau FA, Devogelaer J, Van Damme J, et al. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 784-8.
21. van Leeuwen MA, Westra J, Limburg PC, et al. Interleukin-6 in relation to other proinflammatory cytokines, chemotactic activity and neutrophil activation in rheumatoid synovial fluid. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 33-8.
22. Ichikawa Y, Yamada C, Horiki T, et al. Serum matrix metalloproteinase-3 and fibrin degradation product levels correlate with clinical disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 533-40.
23. Keyszer G, Lambiri I, Nagel R, et al. Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1), and MMP-1/TIMP-1 complex in rheumatic disease. Correlation with clinical activity of rheumatoid arthritis versus other surrogate markers. *J Rheumatol* 1999; 26: 251-8.
24. So A, Chamot AM, Peclat V, et al. Serum MMP-3 in rheumatoid arthritis: correlation with systemic inflammation but not with erosive status. *Rheumatology* 1999; 38: 407-10.