

Badanie stężenia E-selektyny w surowicy u chorych z chorobą Raynauda i twardziną układową

Serum E-selectin measurement in patients with Raynaud's disease and systemic sclerosis

ANNA LIS-ŚWIĘTY, LIGIA BRZEZIŃSKA-WCISŁO, DOMINIKA WCISŁO-DZIADECKA, ILONA KULAWIK

Katedra i Klinika Dermatologii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach, kierownik Katedry i Kliniki dr hab. med. Ligia Brzezińska-Wcisło prof. nadzw. ŚAM

Abstract

Raynaud's phenomenon is the typical initial symptom of systemic sclerosis (SSc), yet only a small fraction of patients with this symptom will develop an associated connective tissue disease.

The aim of this study was to assess the predictive value of soluble E-selectin in the progression to SSc in Raynaud's disease. Serum E-selectin levels were measured by ELISA in 50 women with Raynaud's phenomenon (32 Raynaud's disease patients, 18 SSc patients) and 15 healthy controls. Levels of E-selectin in Raynaud's disease were significantly increased compared with normal controls ($p < 0.001$) and significantly reduced compared with SSc patients ($p < 0.001$). Levels of E-selectin were significantly higher in Raynaud's disease patients in whom either positive antinuclear antibody and/or abnormal nailfold capillary findings were identified than in patients without these findings ($p < 0.025$), but significantly lower than in SSc patients ($p < 0.005$). No correlation was found between E-selectin levels and Raynaud's phenomenon/cutaneous sclerosis duration, ANA titre, SSc type and systemic involvement. These data seem to confirm the involvement of endothelial cells in the pathogenesis of Raynaud's disease and SSc. Serum levels of E-selectin not only demonstrate the extent of endothelial injury and/or activation, but also could be a useful marker to monitor the progression to SSc in Raynaud's disease.

Key words: systemic sclerosis, Raynaud's disease, E-selectin.

Streszczenie

Chociaż objaw Raynauda jest pierwszą charakterystyczną manifestacją twardziny układowej (SSc), tylko u niewielkiej części chorych z tym objawem rozwija się choroba tkanki łącznej.

Celem badania była ocena znaczenia E-selektyny jako parametru prognostycznego co do rozwoju SSc u chorych z chorobą Raynauda. Stężenie E-selektyny w surowicy oznaczano metodą ELISA u 50 kobiet z objawem Raynauda (32 chore z chorobą Raynauda, 18 chorych z SSc) i 15 kobiet zdrowych. Stężenie E-selektyny w chorobie Raynauda było znacząco podwyższone w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,001$), natomiast znacząco niższe w porównaniu z wartością w SSc ($p < 0,001$). Stężenia E-selektyny były znacząco wyższe u chorych z chorobą Raynauda, u których stwierdzono obecność przeciwciał przeciwjądrowych i/lub zmiany kapilaroskopowe, niż u chorych bez tych odchyłeń ($p < 0,025$), ale znacząco niższe niż u chorych z SSc ($p < 0,005$). Nie stwierdzono istotnych korelacji pomiędzy stężeniem E-selektyny a czasem trwania objawu Raynauda/stwardnień skóry, mianem ANA w surowicy, postacią SSc i progresją zmian narządowych w SSc. Wyniki te przemawiają za rolę komórek śródbłonna w patogenezie choroby Raynauda i SSc. Stężenie E-selektyny odzwierciedla nasilenie uszkodzenia i/lub aktywacji śródbłonna i w chorobie Raynauda może służyć jako marker progresji w kierunku SSc.

Słowa kluczowe: twardzina układowa, choroba Raynauda, E-selektyna.

(PDiA 2005; XXII, 5: 250–254)

Adres do korespondencji: dr med. Anna Lis-Święty, Katedra i Klinika Dermatologii, Śląska Akademia Medyczna, ul. Francuska 20/24, 40-027 Katowice, tel. +48 32 256 11 82, 259 15 80, e-mail: kikderm@slam.katowice.pl

Wstęp

Zmiany naczyniowe należą do najwcześniejszych objawów twardziny układowej (*systemic sclerosis*, SSc). Klinicznie manifestują się one objawem Raynauda, teleangiectazjami oraz dają się uwidocznić w badaniu kapilaroskopowym wału paznokciowego. Objaw Raynauda (napadowe blednięcie z następnym sinieniem i obrzękiem rąk) przez wiele lat może być izolowanym objawem i wówczas rozpoznawana jest choroba Raynauda. Jeżeli stwierdza się współistniejące schorzenia, mówimy o ze-spole Raynauda. Obok rozszerzonych i pozazębianych pętli, charakterystycznych dla choroby Raynauda, dla SSc typowe jest zwężenie światła i zanikanie naczyń [1]. Zaburzenia naczyniowe mają charakter ogólnoustrojowy, dotyczą naczyń mikrokrążenia w skórze, tkance podskórnej, mięśniach i narządach wewnętrznych [2]. W badaniach histologicznych i ultrastrukturalnych wykazano cechy uszkodzenia komórek śródbłonna (wakuolizacja, obrzęk, martwica, zwiększenie ubytków *gaps*), jak również cechy świadczące o jego pobudzeniu (nasilenie proliferacji, zgrubienie błony podstawnej) [3]. Charakterystyczną cechą wczesnego okresu SSc stanowią okołonaczyniowe nacieki, złożone z komórek jednojądrowych [4]. Stwierdzono, że nacieki te korelują z progresją zmian skórnych i narządowych [5]. Zmianom naczyniowym towarzyszy zwiększona ekspresja cząstek adhezyjnych, m.in. ICAM-1, VCAM-1 i E-selektyny, na powierzchni śródbłonna [6–8]. Cząstki te ulegają złuszczeniu, są uwalniane do krążenia i mogą służyć jako wskaźniki nasilenia patologii naczyniowej [9, 10]. Ponieważ u chorych z objawem Raynauda stwierdzono zwiększoną ekspresję E-selektyny przed wystąpieniem stwardnień, można spodziewać się, że wykrycie w krążeniu podwyższonego stężenia tej cząstki adhezyjnej może stanowić czuły parametr prognostyczny, świadczący o początku procesu autoimmunologicznego [11].

Celem pracy była ocena stężenia E-selektyny w surowicach chorych z chorobą Raynauda oraz SSc i określenie wartości tego parametru w rokowaniu co do rozwoju i progresji twardziny.

Materiał i metodyka

Badaniami objęto 50 kobiet z objawem Raynauda w wieku od 21 do 71 lat, średnio 46 lat, hospitalizowanych w Klinice Dermatologii ŚAM w Katowicach z podejrzeniem lub rozpoznaniem twardziny układowej w początkowym okresie rozwoju – do 3 lat od wystąpienia stwardnień skóry. Czas trwania objawu Raynauda wynosił od 0,5 do 26 lat, średnio 6,6 lat. U każdej chorej wykonywano badanie kapilaroskopowe wałów paznokciowych, oznaczano przeciwciała przeciwjądrowe ANA metodą IIF na komórkach Hep-2 i przeprowadzono szczegółowe badania diagnostyczne pozwalające na ocenę zajęcia przez proces chorobowy narządów wewnętrznych. Zmiany w przełyku roz-

poznawano na podstawie stwierdzonych zaburzeń perystaltyki i/lub wygładzenia fałdów błony śluzowej w badaniu radiologicznym przełyku. Zajęcie płuc stwierdzano w przypadkach obustronnych zmian włóknistych w badaniu rentgenologicznym klatki piersiowej. Zmiany kardiologiczne o charakterze arytmii, zaburzeń przewodnictwa w badaniu EKG lub podczas elektrostymulacji przezprzełykowej i cechy niewydolności prawokomorowej, wtórnej do nadciśnienia płucnego, rozpoznawano jako zajęcie mięśnia sercowego w przebiegu SSc. Zajęcie nerek przez proces chorobowy rozpoznawano na podstawie utrzymującego się białkomoczu i współistnienia nadciśnienia tętniczego. Zmiany mięśniowe typu *myositis* poza objawami klinicznymi: osłabieniem i bólami mięśni, rozpoznawano na podstawie zwiększenia aktywności enzymów mięśniowych (fosfokinazy kreatynowej i aldolazy) oraz odchyień w badaniu elektromiograficznym i histopatologicznym. Poza tym przeprowadzono rutynowe badania laboratoryjne: OB, morfologię krwi, badanie ogólne moczu oraz wykonywano odczyn Waleria-Rosego, latex-R, elektroforetyczny rozdział białek surowicy i oceniano funkcję nerek. U 18 chorych rozpoznano SSc w oparciu o kryteria Amerykańskiego Towarzystwa Reumatologicznego (Masi i wsp., 1980). Biorąc pod uwagę topografię stwardnień skóry i przebieg choroby, posługiwano się najszerszej przyjętym podziałem twardziny układowej na postać ze stwardnieniami ograniczonymi do odsebnych części ciała (*limited SSc*, ISSc) oraz postaci uogólnioną (*diffuse SSc*, dSSc). Analizując zmiany układowe, u badanych chorych uwzględniono charakter i nasi-

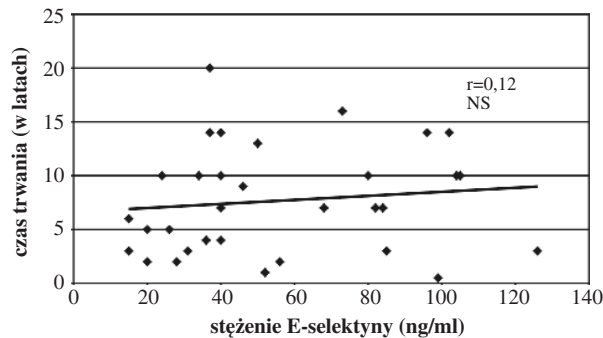
Tab. 1. Charakterystyka kliniczna kobiet z chorobą Raynauda i SSc

Cecha	Choroba Raynauda n=32	SSc n=18
wiek	40,2	51,8
przedział wieku w latach	21–70	27–71
czas trwania objawu Raynauda	7,7	5,4
przedział czasowy w latach	0,5–20	0,5–26,0
czas trwania stwardnień skóry	nie stwierdzono	1,5
przedział czasowy w latach		0,3–3,0
zmiany kapilaroskopowe		
pętla R i S – obecne	19 (59,4%)	18 (100%)
pętla R – obecne,	13 (40,6%)	nie stwierdzono
pętla S – nie stwierdzono		
obecność ANA w surowicy	17 (53,1%)	18 (100%)
miano ANA	3124,2±6312,1	1657,8±2422,1
zmiany narządowe		
przełyk	nie stwierdzono	16 (88,9%)
płuca	nie stwierdzono	9 (50%)
serce	nie stwierdzono	10 (55,6%)
mięśnie	nie stwierdzono	3 (16,7%)
nerki	nie stwierdzono	nie stwierdzono

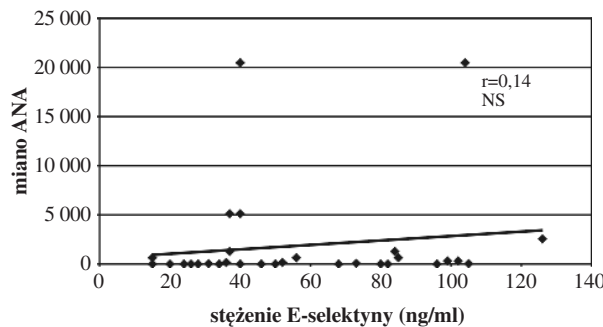
Tab. 2. Stężenie E-selektyny w surowicy kobiet zdrowych, z chorobą Raynauda i SSc

Badane grupy	Liczba chorych	E-selektyna, ng/ml			Liczba wyników podwyższonych n (%)
		średnia	SD	rozrzut	
kontrola	n=15	32,4	15,9	14-65	
choroba Raynauda	n=32	56,0a	31,4	15-126	12 (37,5%)
SSc	n=18	92,8b	27,4	51-160	16 (88,9%)

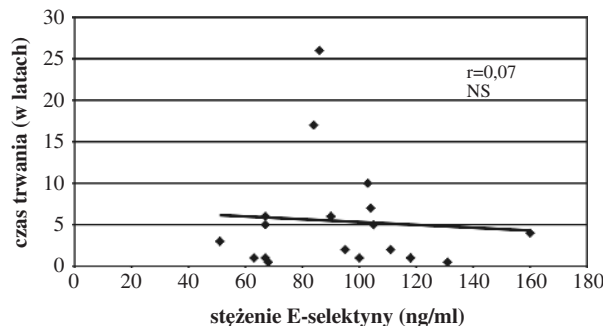
a – $p < 0,001$, porównano chorobę Raynauda z grupą kontrolną; wyniki podwyższone – stężenie $>$ średnia + 2SD w grupie kontrolnej;
 b – $p < 0,001$, porównano chorobę Raynauda z SSc



Ryc. 1. Stężenie E-selektyny w zależności od czasu trwania choroby Raynauda



Ryc. 2. Stężenie E-selektyny w zależności od miana ANA w surowicy w chorobie Raynauda



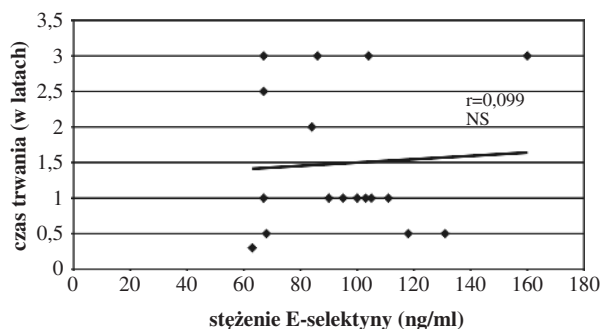
Ryc. 3. Stężenie E-selektyny w zależności od czasu trwania objawu Raynauda w SSc

lenie zmian oraz liczbę zajętych narządów. Szybką progresję zmian układowych w SSc rozpoznawano, gdy stwierdzono zmiany włókniste w płucach i objęcie procesem chorobowym co najmniej 2 innych narządów, takich jak przełyk, serce, nerki, mięśnie. U pozostałych chorych z SSc progresję zmian narządowych oceniono jako umiarkowaną. Charakterystykę kliniczną kobiet z chorobą Raynauda i SSc podano w tab. 1. Wśród badanych było 18 pacjentek z SSc (10 chorych z ISSc i 8 chorych z dSS) i 32 pacjentki z chorobą Raynauda. Chore zakwalifikowane do badania stężenia E-selektyny w surowicy nie były wcześniej leczone środkami immunosupresyjnymi i/lub steroidami. Grupę kontrolną stanowiły surowice 15 zdrowych kobiet wybranych spośród pracownic kliniki. Stężenie E-selektyny w surowicy oznaczano metodą ELISA, używając odczynników R&D Systems Europe Ltd.: Human E-selectin Parameter, zgodnie z zaleceniami producenta testu. Intensywność reakcji barwnej oceniano w czytniku ELISA przy długości fali 450 nm. Zakres pomiaru stężenia E-selektyny wynosił: 0,5–10 ng/ml, czułość $<$ 0,1 ng/ml, surowice rozcieńczano w stosunku 1:20.

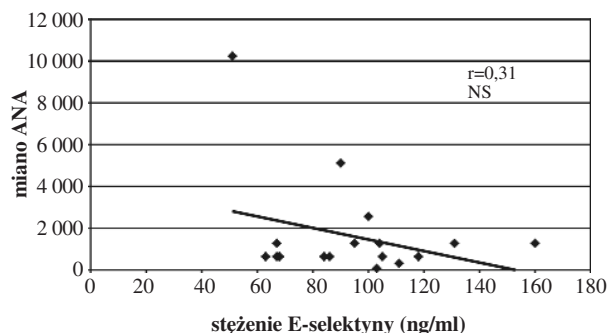
Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej i scharakteryzowano za pomocą średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego. Istotność statystyczną średnich arytmetycznych stężeń E-selektyny pomiędzy poszczególnymi grupami badanymi określano za pomocą testu t-Studenta. Stosując analizę regresji, przy pomocy współczynnika korelacji prostoliniowej r określano związek stężenia E-selektyny z czasem trwania choroby i mianem ANA w surowicy chorych. Wyniki były oceniane jako znamienne statystycznie, gdy $p < 0,05$.

Wyniki

W tab. 2. podano stężenia E-selektyny w surowicy kobiet zdrowych, z chorobą Raynauda i twardziną układową. Stężenie E-selektyny w chorobie Raynauda ($56 \pm 31,4$ ng/ml) było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z wartością grupy kontrolnej ($32,4 \pm 15,9$ ng/ml), ale istotnie statystycznie niższe w porównaniu z SSc ($92,8 \pm 27,4$ ng/ml), $p < 0,001$. Stężenie E-selektyny było podwyższone u 37,5% chorych z chorobą Raynauda i 88,9% chorych z SSc. Ryciny 1.–5. ilustrują stężenie E-selektyny w za-



Ryc. 4. Stężenie E-selektyny w zależności od czasu trwania stwardnień skóry w SSc

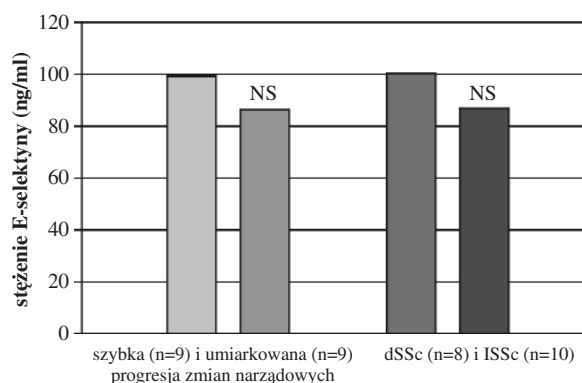


Ryc. 5. Stężenie E-selektyny w zależności od miana ANA w surowicy w SSc

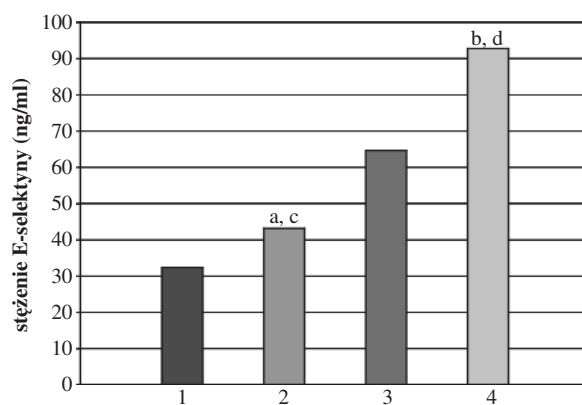
leżności od czasu trwania objawu Raynauda, miana ANA w chorobie Raynauda i SSc oraz od czasu trwania stwardnień skóry w SSc. Linijna analiza regresji i korelacji nie wykazała istotnych statystycznie zależności pomiędzy stężeniem E-selektyny w surowicy a badanymi parametrami. Ryc. 6. przedstawia stężenie E-selektyny w podgrupach kobiet z chorobą Raynauda, SSc i grupie kontrolnej. Stężenie E-selektyny w chorobie Raynauda ze zmianami kapilaroskopowymi i/lub obecnymi ANA ($64,7 \pm 33$ ng/ml) było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z wartością w chorobie Raynauda bez zmian kapilaroskopowych i przeciwciał przeciwjądrowych w surowicy ($43,2 \pm 24,8$ ng/ml), ale istotnie statystycznie niższe w porównaniu z SSc, odpowiednio $p < 0,025$ oraz $p < 0,005$. Stężenie E-selektyny u chorych z chorobą Raynauda bez zmian kapilaroskopowych z ujemnym wynikiem badania IIF było wyższe w porównaniu z grupą kontrolną, ale nieznamienne statystycznie. Na ryc. 7. porównano stężenie E-selektyny w podgrupach chorych z SSc. Stężenie E-selektyny było wyższe u chorych z postacią dSSc ($100,3 \pm 34,6$ ng/ml) w porównaniu z postacią ISSc ($86,8 \pm 19,9$ ng/ml) oraz u chorych z szybką progresją zmian narządowych ($99,2 \pm 21,6$ ng/ml) w porównaniu z umiarkowaną progresją zmian narządowych ($86,3 \pm 32,2$ ng/ml), ale nie stwierdzono różnic znamienych statystycznie.

Omówienie

Zaburzenia naczynioruchowe w obrębie dystalnych części kończyn o charakterze objawu Raynauda występują u ok. 3 do 16% ogólnej populacji [12]. Tylko u niewielu z tych chorych może rozwinąć się choroba tkanki łącznej, najczęściej twardzina układowa. Dlatego przypuszcza się, że patofizjologia pierwotnego i wtórnego objawu Raynauda różnią się. Przemawia za tym także obserwacja, że twardzina rozwija się najczęściej u tych chorych z objawem Raynauda, u których stwierdza się dodatnie przeciwciała przeciwjądrowe i/lub zmiany w badaniu kapilaroskopowym [13, 14]. U chorych z chorobą Raynauda stwierdza się zwiększone stężenie wskaźników aktywacji i/lub



Ryc. 6. Stężenie E-selektyny w surowicy w podgrupach chorych z SSc



- | | |
|---|--|
| 1 – kontrola (n=15) | Różnice znamienne statystycznie: |
| 2 – choroba Raynauda (n=13) zmiany w kapilaroskopii (-) i ANA (-) | a – NS |
| 3 – choroba Raynauda (n=19) zmiany w kapilaroskopii (+) i ANA (+) | b – $p < 0,001$ w porównaniu z grupą kontrolną |
| 4 – SSc (n=18) | c – $p < 0,025$ w porównaniu z podgrupami chorych z chorobą Raynauda |
| | d – $p < 0,005$ w porównaniu z SSc |

Ryc. 7. Stężenie E-selektyny w podgrupach chorych z chorobą Raynauda, w grupie kontrolnej i SSc

uszkodzenia śródbłonna, ale zaburzenia te mają łagodniejszy charakter w porównaniu z SSc [15, 16]. Hebbar i wsp. [11] wykryli zwiększoną ekspresję E-selektyny na komórkach śródbłonna u chorych z objawem Raynauda, u których następnie obserwowano rozwój SSc. W przedstawionym badaniu stwierdzono podwyższone stężenie E-selektyny w surowicy chorych z objawem Raynauda bez stwardnień skóry. Stężenie E-selektyny było szczególnie wysokie u chorych ze zmianami kapilaroskopowymi i/lub obecnością przeciwciał przeciwjądrowych w surowicy. Nie stwierdzono istotnych korelacji pomiędzy stężeniem E-selektyny a czasem trwania objawu Raynauda, typem i mianem ANA w surowicy. U chorych z objawem Raynauda, u których nie stwierdzono żadnych odchyłeń przemawiających za przejściem w kolagenozę, stężenie E-selektyny było wyższe niż w grupie kontrolnej osób zdrowych, ale nieznamienne statystycznie. Tak jak w poprzednich badaniach [10], chorzy we wczesnym stadium SSc wykazywali wysokie stężenia E-selektyny, istotnie wyższe niż chorzy z chorobą Raynauda. Stężenie E-selektyny korelowało z cięższym przebiegiem choroby: było wyższe u chorych z postacią dSSc i szybką progresją zmian narządowych [10, 17, 18]. Przydatność monitorowania stężenia E-selektyny w ocenie aktywności choroby w SSc potwierdziły także badania określające stężenie tego parametru przed i po terapii lekami naczyniowymi i immunosupresyjnymi [19, 20]. Podwyższone stężenie E-selektyny zarówno u chorych z chorobą Raynauda, jak z SSc potwierdza aktywację śródbłonna w obu schorzeniach. Wyższe stężenia E-selektyny u chorych z SSc, jak również z chorobą Raynauda z odchyleniami w badaniu kapilaroskopowym i/lub obecnością przeciwciał przeciwjądrowych mogą wskazywać na większy stopień patologii naczyniowej w tych stanach. Poza E-selektyną podobną zależność wykazano, badając stężenia innych czynników śródbłonkowych, takich jak: ET-1, t-PA, PAI-1, czynników płytkowych beta TG, PDGF, TGF-beta [21]. Obserwacje te sugerują możliwość wykorzystania tych parametrów jako dodatkowych czynników prognostycznych rozwoju SSc. Należy jednak pamiętać, że E-selektyna nie jest swoistym markerem chorób naczyniowych czy kolagenoz i może występować w wyższym stężeniu u chorych z różnymi stanami zapalnymi, a zwłaszcza w infekcjach [22]. Jednak bez względu na nieswoisty charakter tej cząstki adhezyjnej, jej oznaczenie wydaje się odgrywać znaczącą rolę w ocenie aktywności i ciężkości procesu chorobowego w SSc oraz może służyć do monitorowania wyników leczenia. Obecne badania wskazują także na jej przydatność w ocenie ryzyka rozwoju SSc, ustaleniu rokowania i dalszego postępowania terapeutycznego w tej chorobie.

Piśmiennictwo

1. Jabłońska S, Chorzelski T: Twardzina. W: Choroby skóry. PZWL Warszawa, 2001, 282-92.

2. Freemont A, Holland J, Fielding P, et al.: Studies of the microvascular endothelium in uninvolved skin of patients with systemic sclerosis: direct evidence for generalized microangiopathy. *Br J Dermatol* 1992; 126: 561-8.
3. Kahaleh M: Vascular disease in scleroderma: endothelial T-lymphocyte fibroblast interactions. *Rheum Dis Clin N A* 1990; 16: 53-73.
4. Fleishmajer R, Perlsh J, West W: Ultrastructure of cutaneous cellular infiltrates in scleroderma. *Arch Dermatol* 1977; 113: 1161-6.
5. Roum A, Whiteside T, Medsger T, et al.: Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 645-53.
6. Eckes B, Mauch C, Langnok O, et al.: Scleroderma and feedback control by extracellular matrix. W: New trends in scleroderma research. Pathophysiology, clinics and therapy. Abstract Book. Dresden, 1993.
7. Kahaleh M: Lymphocyte interactions with the vascular endothelium in systemic sclerosis. *Clin Dermatol* 1994; 12: 371-7.
8. Sollberg S, Peltonen J, Uitto J, et al.: Elevated expression of beta 1 and beta 2 integrins, intercellular adhesion molecule-1 in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1990; 79: 346-52.
9. Sfikakis P, Tesar J, Baraf H: Circulating intercellular adhesion molecule-1 in patients with systemic sclerosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68: 88-92.
10. Lis A, Bogdanowski T: Stężenie E-selektyny w surowicy jako marker aktywności choroby w twardzinie układowej. *Przegl Dermatol* 1999; 86: 529-34.
11. Hebbar M, Lassale P, Janin A, et al.: E-selectin expression in salivary endothelial cells and sera from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 406-12.
12. Wigley F: Raynaud's phenomenon. *Curr Opin Rheumatol* 1993; 5: 773-84.
13. Priolet P, Vayssairat M, Housset E: How to classify Raynaud's phenomenon: long-term follow-up study of 73 cases. *Am J Med* 1987; 83: 494-8.
14. Kallenberg C: Connective tissue disease in patients presenting with Raynaud's phenomenon alone. *Ann Rheum Dis* 1991; 112: 666-7.
15. Kahaleh B, Matucci-Cerinic M: Raynaud's phenomenon and scleroderma. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1-4.
16. Blann A, Illingworth K, Jayson M: Mechanism of endothelial cell damage in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. *J Rheumatol* 1993; 20: 1325-30.
17. Carson C, Beall L, Hunder G, et al.: Serum ELAM-1 is increased in vasculitis, scleroderma and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1993; 20: 809-14.
18. Gruschwitz M, Hornstein O, Driesch P: Correlation of soluble adhesion molecules in the peripheral blood of scleroderma patients with their in situ expression and with disease activity? *Arthritis Rheum* 1995; 38: 184-9.
19. Apras S, Ertenli I, Ozbalkan Z, et al.: Effects of oral cyclophosphamide and prednisolone therapy on the endothelial functions and clinical findings in patients with early diffuse systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2256-61.
20. Mittag M, Beckheinrich P, Hausteiner U: Systemic sclerosis – related Raynaud's phenomenon: effects of iloprost infusion therapy on serum cytokine, growth factor and soluble adhesion molecule levels. *Acta Derm Venereol* 2001; 81: 294-7.
21. Silveri F, De Angelis R, Poggi A, et al.: Relative roles of endothelial cell damage and platelet activation in primary Raynaud's phenomenon (RP) and RP secondary to systemic sclerosis. *Scand J Rheumatol* 2001; 30: 290-6.
22. Bevilacqua M: Endothelial leukocyte adhesion molecules. *Ann Rev Immunol* 1993; 38: 83-4.