

Otwarte badanie wpływu etydronianu na markery obrotu kostnego, wskaźniki zapalenia i układ RANKL/OPG w aktywnym zeszywniającym zapaleniu stawów kręgosłupa.

Pilotowe badanie wpływu etydronianu na liczbę i aktywność metaboliczną prozapalnej subpopulacji monocytów CD14+CD16+ we krwi pacjentów z zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa

Open study to evaluate etidronate influence on bone markers, inflammation and RANKL/OPG system in ankylosing spondylitis (AS) patients with active inflammation.

Effect of etidronate on number and metabolic activity of proinflammatory subpopulation of blood monocytes CD14+CD16+ in AS patients – a pilot study

Mariusz Korkosz¹, Dorota Telesińska-Jasiówka¹, Maciej Siedlar², Marzena Lenart²

¹Pododdział Reumatologii Kliniki Chorób Wewnętrznych i Geriatrii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, kierownik Kliniki prof. dr hab. med. Tomasz Grodzicki

²Zakład Immunologii Klinicznej, Katedra Immunologii Klinicznej i Transplantologii Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii, Uniwersytet Jagielloński *Collegium Medicum*, kierownik Katedry prof. dr hab. med. Marek Zembala

Słowa kluczowe: zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa, markery kostne, RANKL, osteoprotegeryna, monocyty CD14+CD16+.

Key words: ankylosing spondylitis, bone markers, RANKL, osteoprotegerin, monocytes CD14+CD16+.

Streszczenie

Cel pracy: Ocena wpływu 3-miesięcznego cyklicznego leczenia etydronianem (bisfosfonianem) na markery kostne, wskaźniki zapalne i układ RANKL/osteoprotegeryna (RANKL/OPG) u pacjentów z aktywnym zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa (ZZSK). Ocena wpływu etydronianu na liczbę prozapalnych monocytów CD14+CD16+ i ich aktywność metaboliczną u pacjentów z aktywnym ZZSK.

Materiał i metody: Etydronian podawano (w dwóch 14-dniowych cyklach) 25 mężczyznom spełniającym nowojorskie kryteria rozpoznania ZZSK, u których stwierdzono zwiększone stężenia wskaźników zapalnych (OB i/lub CRP). Przed podaniem leku

Summary

Objective: The aim of the study was to assess the effect of etidronate (bisphosphonate) on bone markers, inflammatory markers and RANKL/OPG in male subjects with active ankylosing spondylitis (AS). To explore the influence of etidronate on number and metabolic activity of proinflammatory subpopulation of blood monocytes CD14+CD16+ in AS patients.

Material and methods: Etidronate (two 14-days cycles) was administered in a group of 25 men fulfilling New York AS criteria and having elevated ESR and/or CRP values. Osteocalcin (OC, formation marker), telopeptid β -CTX (CTX, resorption marker), soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand (sRANKL)

Adres do korespondencji:

dr med. Mariusz Korkosz, Pododdział Reumatologii Kliniki Chorób Wewnętrznych i Geriatrii, Szpital Uniwersytecki w Krakowie, ul. Śniadeckich 10, 31-531 Kraków; tel. +48 12 424 88 00, faks +48 12 424 88 54, e-mail: mariusz.korkosz@mp.pl

Praca wpłynęła: 9.07.2009 r.

i po kolejnych cyklach oznaczano osteokalcynę (OC, marker kościotworzenia), telopeptydy β -CTX (CTX, marker resorpcji), rozpuszczalny ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy κ B (*receptor activator of nuclear factor κ B ligand* – sRANKL) i osteoprotegerynę (OPG).

Wyniki: Po leczeniu etydronianem stwierdzono istotne statystycznie zmniejszenie się stężeń CTX, OC i CRP oraz nieistotne statystycznie zmniejszenie stężenia sRANKL, natomiast zwiększenie stężenia OPG. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy markerami kostnymi a CRP, sRANKL i OPG, a także pomiędzy CRP a sRANKL i OPG. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy wskaźnikiem sRANKL/OPG wyjściowym i po 1. cyklu oraz wyjściowym i po 2. cyklu. Nie stwierdzono różnic w bezwzględnej liczbie subpopulacji monocytów, tj. prozapalnej (CD14+CD16+) i klasycznej (CD14++CD16-) przed 1. cyklem i po 1. cyklu etydronianu. Po stymulacji PHA uzyskano średnio ok. 80-krotny wzrost wydzielania immunosupresyjnej cytokiny IL-10 i ok. 40-krotny wzrost wydzielania TNF- α przez izolowane komórki jednojądrowe krwi obwodowej po 1. cyklu etydronianu.

Wnioski:

1. Etydronian wykazuje działanie antyresorpcyjne i przeciwzapalne u mężczyzn chorych na ZZSK.
2. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy CRP a markerami kostnymi, sRANKL, OPG i sRANKL/OPG, co sugeruje brak sprzężenia procesu zapalenia z remodelacją tkanki kostnej w ZZSK.
3. Etydronian nie wpływa na liczbę prozapalnych monocytów CD14+CD16+ we krwi obwodowej oraz zwiększa stymulowaną PHA syntezę cytokin przez jednojądrowe komórki krwi obwodowej, z przewagą wydzielania immunosupresyjnej IL-10.

Wstęp

Zesztywniające zapalenie stawów kręgosłupa (ZZSK) jest przewlekłą chorobą zapalną, w której dochodzi do dwóch przeciwstawnych procesów: z jednej strony do zaniku kostnego, tj. nadżerek i układowej osteoporozy, a z drugiej do nieprawidłowej osteogenezy powodującej zmiany strukturalne w postaci syndesmofitów i ankylozy w kręgosłupie i stawach obwodowych [1].

Nadżerki są wczesnym objawem ZZSK; najczęściej obserwuje się je w stawach krzyżowo-biodrowych i na krawędziach trzonów kręgow. W odróżnieniu od reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) nie są one jednak dominującymi zmianami strukturalnymi. Osteoporoza w ZZSK rozwija się w wyniku przewlekłego układowego zapalenia mediowanego cytokinami prozapalnymi oraz w mniejszym stopniu i na późniejszych etapach choroby czynnościowego ograniczenia ruchomości kręgosłupa i stawów obwodowych [2]. W ZZSK stwierdzono nadmierną aktywność osteoklastów spowodowaną zapaleniem [3], które zaburza równowagę w układzie kościotworzenia (osteogeneza) a kościoreSORPCJA, i prowadzi do zaniku kości beleczkowej, a później również korowej.

Nieprawidłowa osteogeneza – objawiająca się syndesmofitozą i ankylozą – jest konsekwencją zaburzone-

and osteoprotegerin (OPG) were assayed before and after each cycle of treatment.

Results: The statistically significant decrease of CTX, OC and CRP, a non statistically significant elevation of OPG and reduction of sRANKL after etidronate treatment were observed. There were no correlation between bone markers and CRP, sRANKL and OPG as well as between CRP and sRANKL and OPG. Statistically significant correlation between sRANKL/OPG ratio before treatment and after 1st and 2nd cycle were found. No difference between number of proinflammatory monocytes (CD14+ CD16+) and classic monocytes (CD14++CD16-) were found before and after etidronate treatment with regard to the true number of cells in blood. Following PHA stimulation the average 80-fold increase in IL-10 production and only 40-fold rise in TNF- α were observed after 1. cycle of etidronate in PHA-stimulated peripheral blood mononuclear cells of patients, in comparison to cytokine production straight before the first run of etidronate.

Conclusions:

1. Etidronate has anti-resorptive and anti-inflammatory properties in men with AS.
2. There was no correlation between CRP and bone markers, sRANKL, OPG and sRANKL/OPG ratio which may suggest a lack of relationship between inflammation and bone remodeling in AS.
3. Etidronate treatment does not influence the number of proinflammatory monocytes CD14+CD16+ in peripheral blood and increases the PHA-stimulated cytokine production by peripheral blood mononuclear cells, with prevalent immunosuppressive IL-10 synthesis.

go remodelowania kości podchrzęstnej w obrębie przyczepów, w których toczy się w ZZSK zapalenie (*enthesitis* i *osteitis*). Zapalenie powoduje migrację ze szpiku do przyczepu komórek prekursorowych chondrocytów, które dojrzewając, tworzą chrząstkę włóknistą, a następnie przekształcają się w osteoblasty produkujące tkankę kostną [4]. Na wszystkich etapach ww. procesu konieczna jest stymulacja chondrocytów i osteoblastów przez białka morfogenetyczne kości (*bone morphogenetic proteins* – BMP) i grupę białek Wnt (*wingless proteins*) [5, 6]. W tym mechanizmie dochodzi do formowania się syndesmofitów oraz ankylozy w stawach kręgosłupa i obwodowych, uważanych za tzw. uszkodzenie strukturalne (*structural damage*) w ZZSK.

W ZZSK zachodzą więc prawdopodobnie równocześnie dwa przeciwstawne procesy – osteoporoza i osteogeneza – oba, jak się wydaje, mediowane przez zapalenie. Dlatego poszukuje się leków, które z jednej strony będą zapobiegać zanikowi kostnemu, tj. nadżerkom i osteoporozie, a z drugiej zmianom strukturalnym w postaci syndesmofitów i ankylozy, czyli osteogenezie. Ponieważ na początku dominuje zapalenie powodujące w przyczepach nadżerki, oprócz działania przeciwzapalnego korzystne byłoby równoczesne działanie antyresorpcyjne hamujące osteoklasty. Na późniejszym etapie choroby, w którym dominuje osteogeneza powodująca

zmiany strukturalne, korzystne byłoby hamowanie migracji i dojrzewania chondrocytów oraz osteoblastów. Na te przebiegające lokalnie i postępujące po sobie dwa procesy nakłada się układowa osteoporoza, która postępuje już od wczesnych etapów choroby, kiedy korzystne byłoby hamowanie aktywności osteoklastów.

W ujęciu komórkowym, z jednej strony, w ZZSK należy kontrolować aktywność prozapalną monocytów/makrofagów, a z drugiej – osteoklasty, które są komórkami odpowiadającymi za niszczenie kości oraz osteoblasty i ich prekursorzy odpowiedzialne za zmiany strukturalne. Najbardziej dystalnym układem zwiększającym aktywność osteoklastów jest RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*, ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy κ B) i OPG (osteoprotegeryna) produkowane pod wpływem TNF- α w osteoblastach [7]. Obecnie poszukuje się leków, które mogłyby w ZZSK ingerować w te procesy.

Do opanowania zapalenia w ZZSK stosuje się przede wszystkim niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), rzadziej glikokortykosteroidy i leki modyfikujące RZS, czyli sulfasalazynę i metotreksat. Ostatnio bardzo skuteczne w hamowaniu zapalenia w ZZSK okazały się leki blokujące TNF- α , ale ich stosowanie wiąże się ze zwiększonym ryzykiem ciężkich zakażeń, nie jest znane długotrwałe bezpieczeństwo ich stosowania u młodych pacjentów, a koszty leczenia są dla świadczeniodawcy wysokie. Zwrócono również uwagę na bisfosfoniany, szczególnie te, które oprócz działania antyresorpcyjnego mają również właściwości przeciwzapalne (klodronian, etydronian i pamidronian) [8].

Istnieją liczne przesłanki z badań na zwierzętach, hodowlach komórkowych i prowadzonych u pacjentów z RZS i ZZSK, które wskazują na potencjalne korzyści ze stosowania bisfosfonianów w ZZSK. Osterman i wsp. stwierdzili w adiuwantowym RZS u szczurów, że klodronian hamował zapalenie i uszkodzenie strukturalne stawów [9]. Podobnie w modelu adiuwantowym RZS u myszy korzystnie działał pamidronian, hamując zapalenie i powstawanie nadżerek. Zoledronian, bisfosfonian III generacji, w modelu mysim RZS indukowanym przez TNF- α znacząco hamował (pojedyncza dawka) lub zablokował (powtarzane dawki) nadżerki kostne i niszczenie chrząstki stawowej, natomiast nie hamował zapalenia błony maziowej [10]. W innym badaniu z zoledronianem, w którym oceniano jego wpływ na zapalenie błony maziowej i uszkodzenie strukturalne stawów u szczurów z RZS indukowanym kolagenem, stwierdzono, że w badaniach histologicznych i radiologicznych istotnie zmniejszył on liczbę powstających nadżerek [11]. Nie prowadzono do tej pory podobnych badań na modelach zwierzęcych ZZSK. W hodowli komórek pacjentów z ZZSK Pan i wsp. stwierdzili, że zole-

dronian hamuje ekspresję RANKL na komórkach osteoblastycznych poprzez aktywowanie enzymu konwertującego TNF- α (TACE) [12]. W innych badaniach prowadzonych w hodowlach komórkowych stwierdzono, że bisfosfoniany (pamidronian, klodronian, alendronian) hamują selektywnie dojrzewanie, różnicowanie się i aktywność prozapalną komórek linii makrofagowo-monocytarnej i z tego względu wykazują działanie przeciwzapalne wyrażone zmniejszeniem produkcji cytokin i hamowaniem właściwości prezentacji antygenów [13]. Inne bisfosfoniany, np. etydronian, wykazały w hodowli synowocytów zwierząt z indukowanym eksperymentalnie RZS hamowanie IL-6, PGE2, substancji P i czynnika wzrostu śródbłonna naczyńowego (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), co przemawia za działaniem hamującym zapalenie i angiogenezę [14].

Obecnie uważa się, że zapalenie w ZZSK rozwija się głównie w przyczepach i kości podchrzęstnej, dlatego też badano w tych lokalizacjach – głównie w stawach krzyżowo-biodrowych – obecność komórek odpowiadających za zapalenie i niszczenie kości. Francois i wsp. stwierdzili istotnie większy w porównaniu z grupą kontrolną odsetek makrofagów CD68+ w biopsjach kości podchrzęstnej stawów krzyżowo-biodrowych oraz osteoklastów i makrofagów w chrząstce tych stawów [15]. W materiale pobranym z krążków międzykręgowych pacjentów z ZZSK Brown i wsp. wykryli monocyty wykazujące ekspresję katepsyny K, enzymu produkowanego przez aktywowane osteoklasty [16]. Ponadto w badaniach rezonansem magnetycznym (*magnetic resonance imaging* – MRI) z zastosowaniem środka kontrastowego stawów krzyżowo-biodrowych pacjentów z ZZSK uwidoczniło objawy zapalenia w kości podchrzęstnej i przylegającym szpiku kostnym [17]. Badana w ZZSK aktywność winianoopornej fosfatazy kwaśnej (TRAP), enzymu wydzielanego przez aktywne osteoklasty, jest większa niż w grupie kontrolnej, co sugeruje zwiększoną aktywność osteoklastów w tej chorobie [3].

Z dostępnych bisfosfonianów tylko pamidronian (podawany wyłącznie dożylnie) badano u pacjentów z ZZSK w sześciu badaniach otwartych [18–23] i jednym z randomizacją [24], w którym w grupie kontrolnej podawano mniejszą dawkę leku. Badano wskaźniki zapalne (CRP, OB), markery kostne i wskaźniki kliniczne (BASDAI, BASFI, BASMI) oraz zmiany w MRI. Obserwowano zmniejszenie wskaźników zapalnych, zmniejszenie intensywności objawów zapalenia w MRI, tj. obrzęku szpiku kostnego, wysięku, nadżerek i hamowanie zapalenia przyczepów oraz w różnym zakresie poprawę wskaźników klinicznych. Nie we wszystkich badaniach uzyskano spadek ocenianych wskaźników. Stosowano różne schematy podawania pamidronianu (dawka i interwał pomiędzy kolejnymi infuzjami) oraz badano gru-

py w różnie zaawansowanym wieku i z różną długością trwania choroby. W jednym badaniu, oceniającym markery kostne, zaobserwowano znaczące zmniejszenie BASDAI oraz wskaźników kościotworzenia i resorpcji, ale nie CRP, OB i BASFI. Wydaje się, że pamidronian działa bardziej na tkankę kostną i tkanki miękkie kręgosłupa (struktury osiowe) niż na zapalenie błony maziowej stawów obwodowych, ponieważ nie uzyskano jednoznacznych dowodów zmniejszenia wskaźników zapalnych we wszystkich badaniach. Poprawa kliniczna, mierzona BASDAI i BASFI, była niewielka i opóźniona, zazwyczaj po 3. infuzji, a wyniki były lepsze przy dawkach większych i krótszych odstępach między kolejnymi wlewami. Hamowanie aktywności osteoklastów, mające odzwierciedlenie w zmniejszeniu stężenia markerów resorpcji, przemawia za korzystnym wpływem na gęstość masy kostnej.

Powyższe dane, zarówno o działaniu antyresorpcyjnym, przeciwzapalnym, jak i wpływającym na układ RANKL/OPG, przemawiają za potencjalnymi korzyściami ze stosowania bisfosfonianów w ZZSK.

Monocyty tworzą (wraz z limfocytami i komórkami NK) pulę jednojądrowych komórek krwi obwodowej. Z krwi migrują do tkanek, gdzie różnicują się m.in. w makrofagi tkankowe i osteoklasty. Monocyty krwi obwodowej stanowią heterogenną populację komórek. Różnice w ekspresji determinant CD14 i CD16 na ich powierzchni mogą być podstawą do podziału na dwie odmienne subpopulacje monocytów: o silnej ekspresji cząsteczki CD14 (tj. CD14++CD16–; „klasyczne monocyty”) oraz słabszej ekspresji CD14 (tj. CD14+CD16+; „monocyty prozapalne”) wykazujące cechy makrofagów tkankowych [25]. W porównaniu z monocytami CD14++CD16–, komórki CD14+CD16+ są głównymi producentami prozapalnego TNF- α , nie syntetyzują IL-10 (cytokiny o najsilniej wyrażonych właściwościach immunosupresyjnych), mają mniejszą zdolność do fagocytozy oraz mogą uzupełniać pulę tkankową komórek dendrytycznych. Odsetek monocytów CD14+CD16+, stanowiący u osób zdrowych ok. 9 \pm 5% monocytów krwi obwodowej, rośnie u chorych z przewlekłymi sta-

nami zapalnymi. Nie ustalono, czy zmienia się liczebność komórek obu subpopulacji w aktywnym ZZSK po leczeniu bisfosfonianami oraz jak wpływają one na produkcję przez monocyty cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych.

Cel pracy

Ocena wpływu 3-miesięcznego cyklicznego leczenia etydronianem na markery kostne, wskaźniki zapalne i układ sRANKL/OPG u pacjentów z aktywnym ZZSK. Analiza wpływu etydronianu na liczbę i aktywność metaboliczną (stymulowaną PHA produkcję TNF- α i IL-10) prozapalnych monocytów CD14+CD16+ u pacjentów z aktywnym ZZSK.

Materiał i metody

Pacjenci i kryteria zakwalifikowania do badania

Badaniem objęto 25 mężczyzn chorych na ZZSK, spełniających następujące kryteria zakwalifikowania do badania:

- wiek > 18. roku życia,
 - nowojorskie kryteria rozpoznania ZZSK,
 - OB > 28 mm/godz. i/lub CRP > 5 mg/l.
- Kryteria wykluczenia były następujące:
- obecność choroby wpływającej na metabolizm kości (wątroby, nerek, tarczycy, jelit, stan po resekcji żołądka itp.),
 - stosowanie leków wpływających na metabolizm kości (np. glikokortykosteroidów),
 - przeciwwskazania do stosowania bisfosfonianów,
 - objawy nadwrażliwości na etydronian lub inne bisfosfoniany,
 - brak współpracy w przyjmowaniu leku i pobieraniu materiału do badań.

Charakterystykę kliniczną i laboratoryjną pacjentów przedstawiono w tabeli I. Uzyskano zgodę komisji bioetycznej na przeprowadzenie badania, a chorzy przed zakwalifikowaniem do leczenia zgodnie z protokołem badania podpisywali świadomą zgodę na udział w badaniu.

Tabela I. Charakterystyka wyjściowa 25 pacjentów (dane kliniczne i laboratoryjne)

Table I. 25 patients characteristics at baseline (clinical and laboratory)

Charakterystyka kliniczna i laboratoryjna	Średnia (odchylenie standardowe)
wiek (lata)	41,36 \pm 15,35
czas trwania choroby (lata)	12,72 \pm 5,95
OB (mm/godz.)	28,36 \pm 23,14
CRP (mg/l)	18,89 \pm 22,52

Podawanie leku

Etydronian dwusodowy w tabletkach 400 mg (ICN Polfa Rzeszów Valeant) podawano w dwóch 14-dniowych cyklach (jedną tabletkę dziennie) z przerwą 76-dniową wg zaleceń producenta. W przerwie pomiędzy dwoma cyklami pacjenci przyjmowali preparat wapnia i witaminy D₃.

Badania laboratoryjne

Krew do badań pobierano przed rozpoczęciem pierwszego cyklu (oznaczenie 0), po jego ukończeniu (oznaczenie 1.) oraz po ukończeniu drugiego cyklu leczenia (oznaczenie 2.). Badania laboratoryjne przeprowadzono metodą ELISA, posługując się zestawami firmy Biomedica [sRANKL (rozpuszczalny RANKL), OPG] oraz Roche Diagnostic [CRP, osteokalcyna, CTX (teloptyd β -CTX)]. Krew do ww. badań pobierano rano na czczo i przechowywano w temperaturze -70°C . Do badania populacji monocytów używano świeżej krwi; próbki pobrano od trzech ostatnich pacjentów zakwalifikowanych do programu – przed 1. cyklem etydronianu i po nim. Badanie aktywności cytokin po stymulacji wykonano pilotowo u jednego, ostatniego zakwalifikowanego do programu pacjenta. Do badania subpopulacji monocytów używano próbek świeżej krwi (200 μl) pobranej na EDTA. Komórki płukano w 3 ml soli fizjologicznej, następnie z 200 μl zawiesiny komórkowej pozostałych po wirowaniu pobierano 100 μl i barwiono przez 30 min na lodzie, w probówkach typu TruCount z mikrokuleczkami oraz przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD45-APC, -HLA-DR-PerCP, -CD14-FITC, i -CD16-PE (BD i Culter). Następnie erytrocyty lizowano 400 μl FACS Lysing Solution (BD), a pozostałe komórki niezwłocznie zbierano (łącznie z 10 000 mikrokuleczek) i analizowano zgodnie z instrukcją producenta, wykorzystując cytometr przepływowy FACSCanto (BD). Jednojądrowe komórki krwi obwodowej izolowano na standardowym gradiencie Fikolu, stymulowano 18 godz. fitohemaglutyniną (PHA; 2,5 $\mu\text{g/ml}$), a stężenia TNF i IL-10 w nadsączach hodowlanych określano metodą cytofluometryczną z wykorzystaniem zestawów CBA (BD), zgodnie z instrukcją producenta.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu STATISTICA (wersja 8). W celu ustalenia rozkładu zmiennych stosowano test Shapiro i Wilka. Korelacje obliczano testem *rang* Spearmana. Parametry mierzalne porównywano, stosując test-t dla prób zależnych i test ANOVA Friedmana (ze współczynnikiem zgodności Kendalla) dla prób niezależnych. We wszystkich testach różnice uznawano za statystycznie istotne przy współczynniku $p < 0,05$.

Wyniki

Stwierdzono istotnie statystyczne zmniejszenie stężenia CTX, OC i CRP oraz nieistotne statystycznie zmniejszenie stężenia sRANKL, a zwiększenie stężenia OPG w surowicy pacjentów po leczeniu etydronianem (ryc. 1–5).

Średnie stężenia badanych markerów dla kolejnych oznaczeń przedstawiono w tabeli II.

Stwierdzono istotne korelacje pomiędzy markerami kostnymi – CTX i osteokalcyną, wyjściowo ($R = 0,77$; $p < 0,05$) i po 2. cyklu ($R = 0,65$; $p < 0,05$). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy markerami kostnymi a CRP, sRANKL i OPG, jak również pomiędzy CRP a sRANKL i OPG.

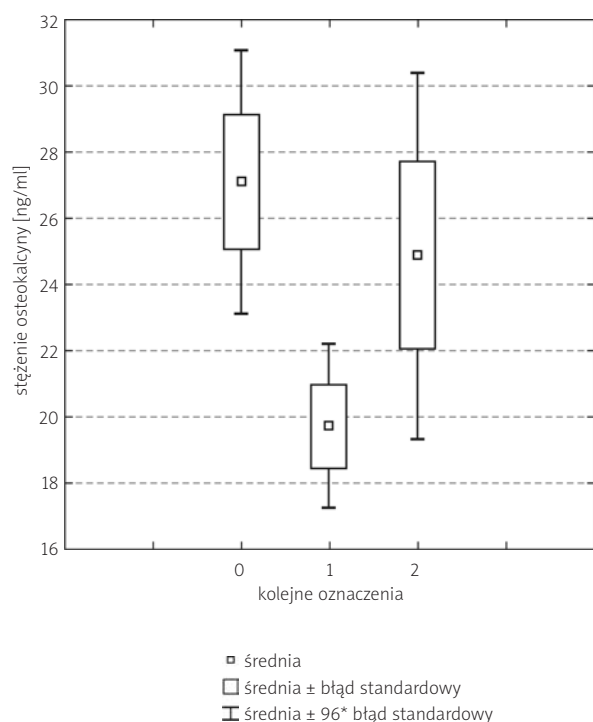
Wykazano dodatnią korelację pomiędzy wskaźnikiem sRANKL/OPG wyjściowym i po 1. cyklu ($R = 0,96$; $p < 0,05$) oraz wyjściowym i po 2. cyklu ($R = 0,8$; $p < 0,05$). Wskaźnik sRANKL/OPG po 1. cyklu etydronianu zmniejszył się, a po 2. cyklu powrócił niemal do wartości wyjściowych (ryc. 6; różnice nieznamienne statystycznie).

Nie stwierdzono korelacji wskaźników zapalnych, markerów kostnych, sRANKL, OPG i sRANKL/OPG ze wskaźnikami klinicznymi ZZSK – aktywności (BASDAI) i sprawności (BASFI).

W badaniu monocytów krwi obwodowej nie stwierdzono różnic w bezwzględnej liczbie obu subpopulacji, tj. prozapalnej (CD14+CD16+) i klasycznej (CD14++CD16–) przed 1. cyklem etydronianu i po 1. cyklu etydronianu (tab. III). Po stymulacji PHA uzyskano ok. 80-krotny wzrost wydzielania IL-10 (8,1 vs 641,03 pg/ml) i ok. 40-krotny wzrost wydzielania TNF- α (118,33 vs 4528,62 pg/ml) przez jednojądrowe komórki krwi obwodowej po 1. cyklu podawania etydronianu.

Omówienie wyników i dyskusja

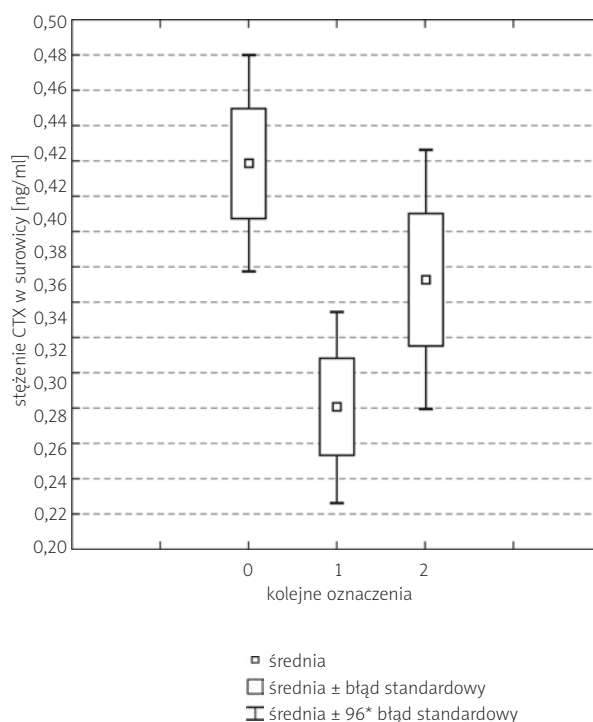
W badaniu autorzy wykazali, że etydronian istotnie statystycznie zmniejsza stężenie markerów resorpcji (CTX) i tworzenia (OC) (ryc. 1 i 2) oraz ich wzajemną dodatnią korelację, co wskazuje na jego działanie antyresorpcyjne u mężczyzn chorych na ZZSK. Podobne wyniki uzyskuje się w przypadku osteoporozy pomenopauzalnej, w której udowodniono, że etydronian hamuje aktywność osteoklastów i wtórnie zmniejsza aktywność osteoblastów [26]. Wyniki uzyskane przez autorów niniejszej pracy przemawiają więc za tym, że punktem uchwytu działania etydronianu u mężczyzn w ZZSK są osteoklasty. Równocześnie etydronian zmniejszył znamienne stężenie CRP (ryc. 3), co może potwierdzać wpływ leku na komórki linii makrofagowo-monocytowej w ZZSK, podobnie jak wpływ obserwowany w przypadku klodronianu, pamidronianu i alendronianu w badaniach na zwierzętach i w hodowlach komórkowych. W badaniach tych udowodniono mechanizm tzw. recyklingu bisfosfonia-



ANOVA Friedmana i współczynnik zgodności Kendalla 0,73; p = 0,00003

Ryc. 1. Stężenia osteokalcyny w surowicy przed 1. cyklem etydronianu (0), po 1. cyklu (1) i po 2. cyklu (2).

Fig. 1. Serum concentrations of osteocalcin before 1. cycle of etidronate (0), after 1. cycle (1) and after 2. cycle (2).



ANOVA Friedmana i współczynnik zgodności Kendalla 0,63; p = 0,00014

Ryc. 2. Stężenia CTX w surowicy przed 1. cyklem etydronianu (0), po 1. cyklu (1) i po 2. cyklu (2).

Fig. 2. Serum concentrations of CTX before 1. cycle of etidronate (0), after 1. cycle (1) and after 2. cycle (2).

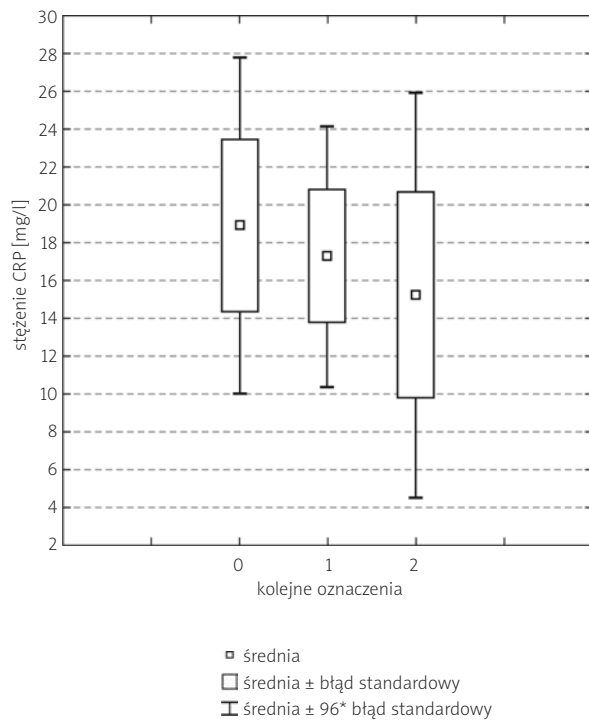
Tabela II. Średnie stężenia badanych markerów w poszczególnych pobraniach

Table II. Average concentrations of biochemical markers in consecutive assessment

Badane parametry	I pobranie (wyjściowe)	II pobranie (po 1. cyklu)	III pobranie (po 2. cyklu)
OC [ng/ml]	27,11	19,72	24,87
CTX [ng/ml]	0,42	0,28	0,35
CRP [mg/l]	18,89	17,30	15,21
sRANKL [pmol/l]	0,23	0,17	0,18
OPG [pmol/l]	2,54	2,83	2,71
sRANKL/OPG	0,135	0,089	0,104

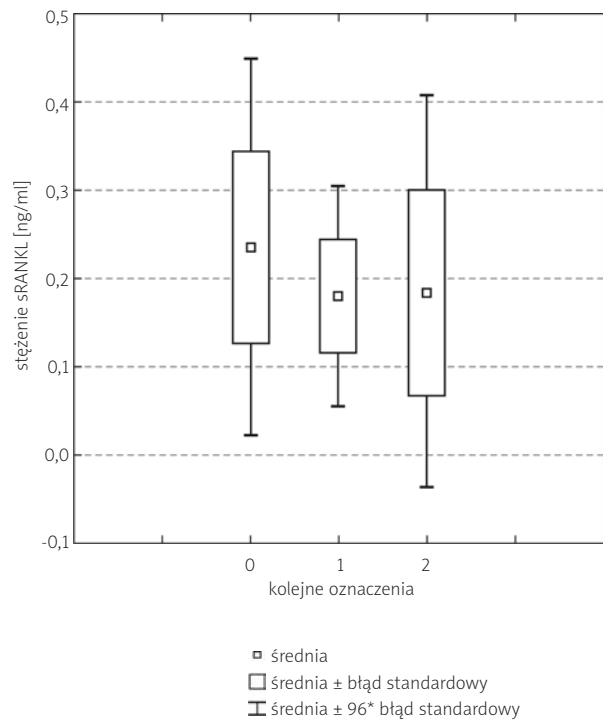
nów, polegający na przechodzeniu cząsteczek leku z osteoklastów, które są pierwszymi „docelowymi” komórkami dla bisfosfonianów, do przylegających do nich makrofagów i monocytów *in situ*.

W badaniu pilotowym monocytów autorzy nie wykazali zmniejszenia liczby subpopulacji prozapalnej o fenotypie CD14+CD16+ we krwi obwodowej pod wpływem etydronianu; niemniej u jedyne go pa-



ANOVA Friedmana i współczynnik zgodności Kendalla 0,29;
 $p = 0,017$

Ryc. 3. Stężenia CRP w surowicy przed 1. cyklem etydronianu (0), po 1. cyklu (1) i po 2. cyklu (2).
Fig. 3. Serum concentrations of CRP before 1. cycle of etidronate (0), after 1. cycle (1) and after 2. cycle (2).



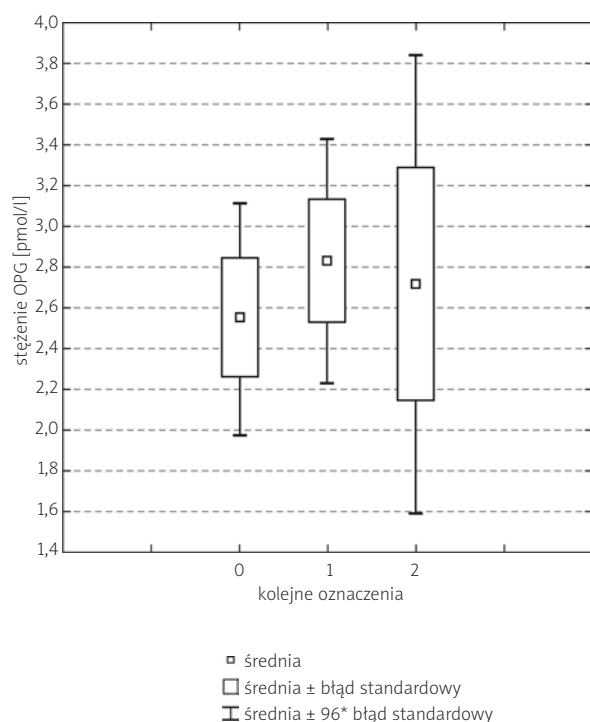
ANOVA Friedmana i współczynnik zgodności Kendalla 0,1;
 $p = 0,54$

Ryc. 4. Stężenia sRANKL w surowicy przed 1. cyklem etydronianu (0), po 1. cyklu (1) i po 2. cyklu (2).
Fig. 4. Serum concentrations of sRANKL before 1. cycle of etidronate (0), after 1. cycle (1) and after 2. cycle (2).

Tabela III. Liczebność komórek subpopulacji monocytów przed i po 1. cyklu etydronianu – wartości dla 3 pacjentów i średnie

Table III. Numbers of monocytes in two subpopulations before and after 1. cycle of etidronate – for 3 patients and mean values

Pacjenci	Wykonanie badania	Bezwzględna liczba CD14+/CD16+ w μ l krwi	Bezwzględna liczba CD14+/CD16- w μ l krwi
pacjent PG	przed 1. cyklem	36,67	503,00
	po 1. cyklu	24,57	354,91
pacjent WL	przed 1. cyklem	45,35	503,42
	po 1. cyklu	62,89	581,50
pacjent KB	przed 1. cyklem	46,14	410,36
	po 1. cyklu	51,59	518,10
średnia	przed 1. cyklem	42,72	472,26
	po 1. cyklu	46,35	484,84

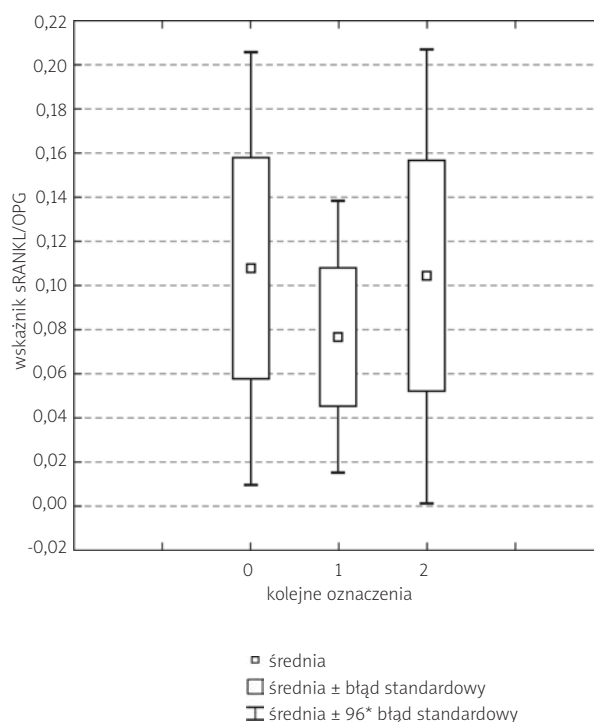


ANOVA Friedmana i współczynnik zgodności Kendalla 0,007; $p = 0,095$

Ryc. 5. Stężenia OPG w surowicy przed 1. cyklem etydronianu (0), po 1. cyklu (1) i po 2. cyklu (2).

Fig. 5. Serum concentrations of OPG before 1. cycle of etidronate (0), after 1. cycle (1) and after 2. cycle (2).

cja, u którego oznaczano wydzielanie cytokin, stwierdzono, że po podawaniu etydronianu produkcja IL-10 (przeciwzapalnej) wzrosła 80-krotnie, a TNF- α (prozapalnego) tylko 40-krotnie. Można założyć, że etydronian stosowany *in vivo* aktywuje monocyty do produkcji cytokin pod wpływem nieswoistych bodźców prozapalnych (np. PHA), jednakże równowaga syntezy czynników prozapalnych i przeciwzapalnych jest znacznie przesunięta na korzyść tych ostatnich. Obecnie nie wiadomo, jak pod wpływem etydronianu modyfikuje się liczba i aktywność monocytów/makrofagów tkankowych, które potencjalnie mogą być zaangażowane w remodelację tkanki kostnej i podtrzymywanie miejscowego stanu zapalnego. Zakładając, że monocyty obu subpopulacji mogą migrować do tkanek (w których u pacjentów z ZZSK toczy się proces zapalny), etydronian może modulować odpowiedź zapalną monocytów w kierunku wzmożenia produkcji cytokin przeciwzapalnych przez monocyty „klasyczne” w stopniu znacznie większym niż prozapalnych przez monocyty subpopula-



ANOVA Friedmana i współczynnik zgodności Kendalla 0,02; $p = 0,84$

Ryc. 6. Wskaźnik sRANKL/OPG w surowicy przed 1. cyklem etydronianu (0), po 1. cyklu (1) i po 2. cyklu (2).

Fig. 6. Serum sRANKL/OPG ratio before 1. cycle of etidronate (0), after 1. cycle (1) and after 2. cycle (2).

cji CD14+CD16+, co z kolei wpływałoby pozytywnie na zapalenie miejscowe. Wydaje się więc, że badania prowadzone na modelu *in situ* mogłyby wyjaśnić rzeczywisty wpływ leku na przebudowę strukturalną kości i aktywność prozapalną monocytów/makrofagów w ZZSK.

Wprawdzie nie opublikowano dotychczas badań z wykorzystaniem etydronianu w ZZSK u ludzi, wyniki badania autorów można odnieść do dwóch badań w RZS u ludzi. W pierwszym podawanie interwałowe przez 72 tyg. etydronianu zahamowało ekspresję markera resorpcji (dezoksyperydynoliny), którego zmniejszenie korelowało ze zmniejszeniem wskaźników zapalnych (IL-6); uzyskano również skuteczniejsze w porównaniu z grupą kontrolną hamowanie niszczenia stawów mierzonego skalą Larsena [27]. W drugim badaniu podawanie interwałowe etydronianu przez 3 lata spowodowało wzrost gęstości mineralnej kości i aktywności fosfatazy zasadowej (markera kościotworzenia) oraz zmniejszenie wydalania z moczem dezo-

ksypirydynoliny, markera resorpcji kości; zmniejszyło się również w porównaniu z grupą kontrolną uszkodzenie stawów oceniane za pomocą skali Larsena [14].

W badanej grupie autorom nie udało się wykazać oczekiwanej dodatniej korelacji stężeń markerów kostnych z CRP, w odróżnieniu od pierwszego z wyżej cytowanych badań. Jedną z przyczyn może być mała liczebność grupy badanej. Należy jednak pamiętać, że w świetle ostatnio dostępnych badań, w ZZSK może nie występować sprzężenie procesu zapalnego z przebudową tkanki kostnej, szczególnie osteogenezą, co do niedawna wydawało się oczywiste ze względu na analogię do RZS [1, 28]. Van Der Heijde i wsp. wykazali bowiem, że leczenie ZZSK przez 2 lata blokerami TNF- α (etanerceptem, infliksymabem) hamowało wprawdzie zapalenie, ale nie osłabiło tempa uszkodzenia strukturalnego (syndesmofitozy i ankylozy), którego postęp mierzono wskaźnikiem radiologicznym mSASSS (*modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score*) w kręgosłupie. Przemawia to za brakiem związku zapalenia z remodelacją kości [29, 30]. W poszukiwaniu wytłumaczenia tego zaskakującego faktu Maksymowich proponuje hipotezę, w której podstawową rolę odgrywa białko Dickkopf-1 (DKK-1) [31]. Diarra i wsp. wykazali, że to białko powstające pod wpływem TNF- α hamuje aktywność BMP i Wnt, czyli głównego układu aktywującego migrację, dojrzewanie i aktywność chondrocytów i następnie ich transformację do osteoblastów tworzących syndesmofity i ankylozę [31]. A zatem w ZZSK TNF- α poprzez DKK-1 paradoksalnie działa „korzystnie”, hamując osteogenezę, dlatego też wg Maksymowicha blokowanie TNF- α powodując „zwolnienie hamulca” w postaci DKK-1, zwiększa tempo osteogenezy, tak niekorzystnej w ZZSK [32]. Lories i wsp. postulują, że brak takiego sprzężenia jest obserwowany w późniejszych stadiach choroby, kiedy zapalenie ma już charakter typowy dla ZZSK, tj. przewlekły i nawracający, a wtedy nie jest już sprzężone z kościotworzeniem, które uzyskuje pewną autonomię [4]. Sprzężenie takie natomiast najprawdopodobniej występuje na wczesnym etapie choroby, kiedy dochodzi do tzw. *entheseal stress* w obrębie przyczepów, powodującego ostre zapalenie i równoczesne zaktywowanie komórek prekursorowych chondrocytów w kości podchrzęstnej. Na tym wczesnym etapie hamowanie zapalenia może być skuteczne w osłabieniu wtórnej i sprzężonej z nim remodelacji tkanki kostnej, tj. głównie niekorzystnej osteogenezy. Wyniki badania autorów, czyli brak związku zapalenia (CRP) z remodelacją tkanki kostnej (markery kostne) po interwencji lekiem – który, jak wykazano w niniejszej pracy, działa korzystnie na oba te procesy – można by odnieść do ww. teorii. Należy uwzględnić fakt, że średni czas trwania ZZSK w obserwowanej grupie wy-

niósł ok. 13 lat, co trzeba uznać za późny etap choroby, na którym oba te procesy przebiegają już rozbieżnie.

Kim i wsp. wykazali, że stężenie sRANKL jest w ZZSK zwiększone i koreluje ujemnie z gęstością masy kostnej, co sugeruje, że patogeneza osteoporoz w ZZSK może być związana z nieprawidłowo zwiększonym wskaźnikiem RANKL/OPG i silniejszą stymulacją osteoklastów [33]. Zmniejszenie stężenia sRANKL i zwiększenie stężenia OPG w badanej grupie leczonej etydronianem nie było istotne statystycznie (ryc. 4 i 5). Niemniej należy pamiętać, że RANKL jest produkowany głównie lokalnie w tkance kostnej przez osteoblasty pod wpływem TNF- α , dlatego wyniki oznaczeń we krwi nie muszą oddawać rzeczywistych relacji *in situ*. Vandooren i wsp. badali układ RANKL/OPG błony maziowej w RZS i seronegatywnych spondyloartropatiach (SpA) przed leczeniem i po leczeniu blokerem TNF- α i udowodnili podobną ekspresję wyjściową RANKL/OPG w obu tych jednostkach chorobowych [34]. Ponadto stwierdzili, że ich ekspresja w SpA nie korelowała z nasileniem zapalenia „na obwodzie” i nie zmieniała się pod wpływem leczenia anty-TNF, co również potwierdza brak związku zapalenia z remodelacją tkanki kostnej w ZZSK.

Autorzy niniejszej pracy wykazali natomiast dodatnią korelację pomiędzy wskaźnikiem sRANKL/OPG wyjściowym i po 1. cyklu oraz wyjściowym i po 2. cyklu, co mogłoby przemawiać za równoczesnym „proporcjonalnym” wpływem etydronianu na syntezę obu tych czynników. Biorąc pod uwagę patofizjologię przebudowy tkanki kostnej, „wspólnym mianownikiem” zmniejszenia RANKL i OPG mógłby być osteoblast, który syntezuje oba te związki, jednak biorąc pod uwagę patomechanizm działania etydronianu, wydaje się mało prawdopodobne, aby wpływał on bezpośrednio na osteoblasty. Zmniejszenie sRANKL i wskaźnika sRANKL/OPG po 1. cyklu etydronianu, a ich wzrost po 2. cyklu – wartości wskaźnika sRANKL/OPG powróciły niemal do wyjściowych (ryc. 4 i 6) – można by wytłumaczyć hipotezą, że hamowanie po 1. cyklu etydronianu osteoklastów i zapalenia (TNF zwiększa wydzielanie RANKL) powoduje zmniejszenie sRANKL i sRANKL/OPG. Natomiast po 2. cyklu obserwuje się nagromadzenie RANKL ze względu na zmniejszenie liczby dostępnych i aktywnych komórek efektorowych dla RANKL, czyli dojrzałych osteoklastów (uszkodzenie wewnątrzkomórkowego układu ATP przez etydronian) i nasileniem kompensacyjnego dojrzewania linii osteoklastycznej, co wymaga od układu osteoimmunologicznego sterującego przebudową tkanki kostnej w chorobach zapalnych, takich jak ZZSK, większego stężenia sRANKL.

Oczywiście, kwestią otwartą pozostaje dawkowanie leku i jego wpływ na uzyskane wyniki. Lek nie jest zarejestrowany do leczenia ZZSK i osteopenii/osteoporozy wtórnej w ZZSK. Autorzy stosowali dawkowanie zalecone przez producenta i zarejestrowane dla osteoporozy pomenopauzalnej u kobiet. W innych chorobach, np. chorobie Pageta czy hiperkalcemii nowotworowej, dawkowanie etydronianu różni się znacznie, tj. podaje się dawki dzienne do 20 mg/kg m.c. przez 3–6 mies. Wydaje się, że stosowanie większych dawek metodą interwałową lub ciągłą może mieć większy wpływ na stężenie oznaczanych substancji, a to z kolei może się przekładać na większy wpływ leku na przebudowę tkanki kostnej (remodeling) w ZZSK.

Wnioski

1. Etydronian podawany cyklicznie wykazuje działanie antyresorpcyjne i przeciwzapalne u mężczyzn chorych na ZZSK.
2. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy CRP a markerami kostnymi, sRANKL, OPG i sRANKL/OPG, co sugeruje brak sprzężenia procesu zapalenia z remodelacją tkanki kostnej w ZZSK.
3. Etydronian nie wpływa na liczbę prozapalnych monocytów CD14+CD16+ we krwi obwodowej, natomiast silnie indukuje stymulowaną PHA produkcję przeciwzapalnej IL-10 przez monocyty wchodzące w skład puli jednojądrowych komórek krwi obwodowej.

Piśmiennictwo

1. Sieper J. Developments in the scientific and clinical understanding of the spondyloarthritides. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 208.
2. Schett G. Osteoimmunology in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 210.
3. Toussiot E, Dumoulin G, Nguyen N, et al. Changes in bone cell enzymatic activities in ankylosing spondylitis and relationship with the inflammatory proces. *Arthritis Rheum* 2006; 54: S466.
4. Lories R, Luyten F, de Vlam K. Progress in spondylarthritis. Mechanism of new bone formation in spondylarthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 221.
5. Johnson ML, Kamel MA. The Wnt signaling pathway and bone metabolism. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19: 376-382.
6. Lories R, Luyten F. Bone morphogenic proteins in destructive and remodelling arthritis. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: 207.
7. Loddenkemper K, Burmester GR. What is the rank of RANKL in spondylarthritis? *Arthritis Rheum* 2008; 58: 641-644.
8. Toussiot E, Wendling D. Antiinflammatory treatment with bisphosphonates in ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19: 340-345.
9. Osterman T, Kippo K, Laurén L, et al. Effect of clodronate on established collagen-induced arthritis in rats. *Inflamm Res* 1995; 44: 258-263.
10. Herrak P, Görtz B, Hayer S, et al. Zoledronic acid protects against local and systemic bone loss in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2327-2337.
11. Sims NA, Green JR, Glatt M, et al. Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2338-2346.
12. Pan B, Farrugia AN, To LB, et al. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res* 2004; 19: 147-154.
13. Pennanen N, Lapinjoki S, Urtti A, Mönkkönen J. Effect of liposomal and free bisphosphonates on the IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from RAW 264 cells in vitro. *Pharm Res* 1995; 12: 916-922.
14. Yamamoto K, Yoshino S, Shue G, Nagashima M. Inhibitory effect of bone resorption and inflammation with etidronate therapy in patients with rheumatoid arthritis for 3 years and in vitro assay in arthritis models. *Rheumatol Int* 2006; 26: 627-632.
15. Francois RJ, Neure L, Sieper J, Braun J. Immunohistological examination of open sacroiliac biopsies of patients with ankylosing spondylitis: detection of tumour necrosis factor alpha in two patients with early disease and transforming growth factor beta in three more advanced cases. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 713-720.
16. Braun J, Baraliakos X, Zelder C. Clinical and histopathological findings in patients with ankylosing spondylitis before and after surgical treatment for axis correction and erection of the spine. *Arthritis Rheum* 2006; 54: S466.
17. Bollow M, Enzweiler C, Taupitz M, et al. Use of contrast enhanced magnetic resonance imaging to detect spinal inflammation in patients with spondyloarthritides. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: S167-S174.
18. Cairns AP, Wright SA, Taggart AJ, et al. An open study of pulse pamidronate treatment in severe ankylosing spondylitis, and its effect on biochemical markers of bone turnover. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 338-339.
19. Grover R, Shankar S, Aneja R, et al. Treatment of ankylosing spondylitis with pamidronate: an open label study. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 688-689.
20. Haibel H, Brandt J, Rudwaleit M, et al. Treatment of active ankylosing spondylitis with pamidronate. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42: 1018-1020.
21. Maksymowych WP, Jhangri GS, Leclercq S, et al. An open study of pamidronate in the treatment of refractory ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1998; 25: 714-717.
22. Maksymowych WP, Lambert R, Jhangri GS, et al. Clinical and radiological amelioration of refractory peripheral spondyloarthritis by pulse intravenous pamidronate therapy. *J Rheumatol* 2001; 28: 144-155.
23. Toussiot E, Le Huédé G, Lohse A, et al. Transient efficacy of pulse pamidronate treatment in active spondylarthropathies: an open study of 35 cases. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: 348.
24. Maksymowych WP, Jhangri GS, Fitzgerald AA, et al. A six-month randomized, controlled, double-blind, dose-response comparison of intravenous pamidronate (60 mg versus 10 mg) in the treatment of nonsteroidal antiinflammatory drug-refractory ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 766-773.

25. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 584-592.
26. Meunier PJ, Confavreux E, Tupinon I, et al. Prevention of early postmenopausal bone loss with cyclical etidronate therapy (a double-blind, placebo-controlled study and 1-year follow-up). *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2784-2791.
27. Hasegawa J, Nagashima M, Yamamoto M, et al. Bone resorption and inflammatory inhibition efficacy of intermittent cyclical etidronate therapy in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30: 474-479.
28. Schett G. Joint remodelling in inflammatory disease. *Ann Rheum Dis* 2007; 66 (Suppl 3): iii42-iii44.
29. van der Heijde D, Landewé R, Baraliakos X, et al.; Ankylosing Spondylitis Study for the Evaluation of Recombinant Infliximab Therapy Study Group. Radiographic findings following two years of infliximab therapy in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 3063-3070.
30. van der Heijde D, Landewé R, Einstein S, et al. Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 1324-1331.
31. Diarra D, Stolina M, Polzer K, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007; 13: 156-163.
32. Maksymowych WP, Chiowchanwisawakit P, Clare T, et al. Inflammatory lesions of the spine on magnetic resonance imaging predict the development of new syndesmophytes in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 93-102.
33. Kim HR, Kim HY, Lee SH. Elevated serum levels of soluble receptor activator of nuclear factors- κ B ligand (sRANKL) and reduced bone mineral density in patients with ankylosing spondylitis (AS). *Rheumatology* 2006; 45: 1197-1200.
34. Vandooren B, Cantaert T, Noordenbos T, et al. The abundant synovial expression of the RANK/RANKL/Osteoprotegerin system in peripheral spondylarthritis is partially disconnected from inflammation. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 718-729.