

Ocena stężenia rozpuszczalnego białka Fas w surowicy chorych na twardzinę układową

Serum soluble Fas levels in patients with systemic sclerosis

Magdalena Szymanek, Grażyna Chodorowska, Małgorzata Kowal, Aldona Pietrzak, Renata Miturska, Dorota Krasowska

Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Dermatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. n. med. Grażyna Chodorowska

Post Dermatol Alergol 2010; XXVII, 5: 406–414

Streszczenie

Wprowadzenie: Twardzina układowa (*systemic sclerosis* – SSc) jest chorobą tkanki łącznej charakteryzującą się przewlekłym procesem zapalnym o podłożu autoimmunologicznym. Badania ostatnich lat wskazują, że jedną z przyczyn nadmiernego pobudzenia limfocytów mogą być zaburzenia procesu apoptozy. Wydaje się, że szczególną rolę w regulacji procesu na drodze receptorowej odgrywa rozpuszczalne białko Fas (sFas).

Materiał i metody: Badaniami objęto grupę 40 kobiet w wieku 34–79 lat z rozpoznaną SSc. Oceniano stężenie białka Fas w surowicy chorych w zależności od podtypu klinicznego SSc, czasu trwania choroby, postaci klinicznej, aktywności procesu chorobowego, stopnia i rozległości stwardnienia skóry, okresu mikroangiopatii twardzinowej, obecności zmian w płucach, przetyku i sercu, poziomu dopełniacza C3, obecności przeciwciał przeciwjądrowych oraz stosowania preparatów immunosupresyjnych. Grupę kontrolną stanowiło 29 zdrowych kobiet, dobranych odpowiednio pod względem wieku.

Wyniki i wnioski: Wyniki badań wykazały istotnie wyższe stężenie sFas w surowicy chorych na SSc w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych. Nie obserwowano istotnych różnic w stężeniu Fas w zależności od obrazu klinicznego choroby. Uzyskany wynik badań wydaje się wskazywać, że sFas jest ważnym wskaźnikiem zapobiegania indukcji apoptozy limfocytów T w SSc, a tym samym może prowadzić do ich wzmożonej proliferacji.

Słowa kluczowe: twardzina układowa, rozpuszczalne białko Fas, apoptoza.

Abstract

Introduction: Systemic sclerosis (SSc) is a connective tissue disease characterised by a chronic inflammatory process of autoimmune basis. The research conducted for the last few years shows that one of the causes of excessive lymphocyte activation can be disorders of the apoptotic process. Soluble Fas (sFas) is a protein which plays an important role in the regulation of the apoptosis receptor pathway.

Material and methods: The study included a group of 40 women between 34 and 79 years old, with diagnosed systemic sclerosis. The analysis comprised clinical subtype, duration, activity of pathological process, degree and extent of skin involvement, microvascular damage, presence of changes in lung, oesophagus and heart, level of complement C3 as well as antinuclear antibodies and applied immunosuppressive treatment. The control group included 29 healthy women, matched for age.

Results and conclusions: In our research we found significantly higher concentration of sFas protein in serum of patients suffering from systemic scleroderma in comparison with the healthy control group. There were no significant differences in the levels of sFas depending on examined systemic scleroderma clinical manifestations. The obtained result seems to be an important prevention indicator of T lymphocyte apoptosis induction in systemic sclerosis, at the same time leading to their increased proliferation.

Key words: systemic sclerosis, soluble Fas protein, apoptosis.

Adres do korespondencji: dr hab. n. med. Dorota Krasowska, prof. UM, Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Dermatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul. Radziwiłłowska 13, 20-080 Lublin, tel./faks +48 81 532 36 47, e-mail: dorota.krasowska@am.lublin.pl

Wprowadzenie

Twardzina układowa (*systemic sclerosis* – SSc) należy do układowych chorób tkanki łącznej, które cechuje przewlekły proces zapalny o podłożu autoimmunologicznym [1]. Dominującym objawem schorzenia jest postępujące włóknienie skóry, tkanki podskórnej i narządów wewnętrznych, prowadzące do ich niewydolności [2–4].

Etiologia i patogenezę SSc nie jest do końca wyjaśniona. Zasadniczą rolę w rozwoju choroby odgrywają komórki śródbłonna, komórki układu immunologicznego (zwłaszcza limfocyty T i B) oraz fibroblasty [5]. Czynniki zewnętrzne, pod wpływem których dochodzi do aktywacji komórek układu immunologicznego i odpowiedzi autoimmunologicznej, nie są bliżej poznane [6]. Wśród wielu hipotez uwzględnia się predyspozycje genetyczne (obecność haplotypów DR3, DR5, DRw52) i oddziaływanie czynników środowiskowych [7]. Zwraca uwagę rola mikrochimerizmu, narażenie na organiczne rozpuszczalniki i toksyny (toluen, benzen, ksylen, węglowodory alifatyczne, żywice epoksydowe), udział czynników infekcyjnych, zwłaszcza ludzkiego wirusa cytomegalii, niektórych leków, jak bleomycyny, witaminy K, penicylaminy, β -adrenolityków, pentazocyny oraz genetycznie uwarunkowana indywidualna podatność na stres oksydacyjny połączona z wydzielaniem wolnych rodników [1, 8–12]. W ostatnich latach podkreśla się rolę zaburzeń procesu apoptozy lub jego nieprawidłowej regulacji. Apoptoza (z greckiego *apoptosis* – opadanie liści) jest aktywnym, uporządkowanym procesem przemian morfologicznych i biochemicznych determinowanych ekspresją odpowiednich genów, prowadzącym do śmierci komórki. Umożliwia eliminację komórek bez wywoływania stanu zapalnego i uszkodzenia otaczających tkanek [13]. Indukcja apoptozy może następować na drodze wewnątrzpochodnej (mitochondrialnej) oraz zewnątrzpochodnej (receptorowej). Droga mitochondrialna, dominująca, wiąże się z uruchomieniem kaskady kaspaz. Obserwuje się zwiększenie przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej, czego następstwem jest przemieszczanie się białek z przestrzeni perimitochondrialnej do cytoplazmy [14–16]. Droga zewnątrzpochodna polega na indukcji apoptozy w następstwie wiązania swoistego liganda przez receptor znajdujący się na powierzchni komórki. Decydującą rolę odgrywa tu receptor Fas (APO-1, CD95). Jest on glikozylowanym białkiem błonowym typu I o masie cząsteczkowej 45 kDa. Wykazuje ekspresję na powierzchni różnych typów prawidłowych i nowotworowych ludzkich linii komórkowych, m.in. na limfocytach T, B, makrofagach, hepatocytach czy tymocytach. W odpowiedzi na sygnał apoptotyczny dochodzi do połączenia liganda Fas (FasL) z receptorem Fas, czego konsekwencją jest proces trimerizacji receptora Fas. Oddziaływanie pomiędzy receptorem i ligandem (Fas–FasL) odgrywa istotną rolę w indukowaniu apoptozy linii limfoidalnej i wywoływaniu systemowej odpowiedzi immunologicznej. Działanie pro-

apoptotyczne możliwe jest pod wpływem kompleksu białek adaptorowych, które są pośrednikami reakcji, lub przez kontakt komórek [17–21].

Następstwem zaburzeń procesu apoptozy w przebiegu twardziny układowej są zmiany w układzie immunologicznym związane z upośledzoną zdolnością do eliminacji autoreaktywnych limfocytów T czy B, co stymuluje fibroblasty do syntezy nadmiernych ilości kolagenu i składników macierzy zewnątrzkomórkowej, ostatecznie doprowadzając do postępującego włóknienia skóry, tkanki podskórnej i narządów wewnętrznych [2, 22, 23].

Istotną rolę w ocenie zaburzeń procesu apoptozy, który stanowi niezbędny mechanizm regulujący odpowiedź immunologiczną i warunkujący utrzymanie stanu tolerancji organizmu w stosunku do własnych antygenów u chorych na SSc, odgrywa pomiar parametrów stymulujących lub hamujących proces, a będących wykładnikiem nasilenia zjawiska zaprogramowanej śmierci komórek [24].

Cel

Celem pracy jest ocena stężenia rozpuszczalnego białka Fas (sFas) w surowicy chorych na SSc w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych, a także ocena stężenia sFas w zależności od cech klinicznych, laboratoryjnych i zaawansowania procesu chorobowego w badanej grupie chorych na SSc.

Materiał i metody

Badaniami objęto grupę 40 kobiet w wieku 34–79 lat (średnia 57,03 \pm 11,16 roku) chorych na SSc, hospitalizowanych w Katedrze i Klinice Dermatologii, Wenerologii i Dermatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie w 2008 r. Wszystkie kobiety uczestniczące w badaniach spełniały kryteria rozpoznania choroby zaproponowane przez Amerykańskie Towarzystwo Reumatologiczne (*American Rheumatism Association* – ARA) [25]. U 34 (85%) chorych stwierdzono twardzinę układową typu lSSc, a u 6 (15%) pacjentek rozpoznano postać dSSc. Większość spośród badanej grupy stanowiły chore z późną nieaktywną SSc. Zmiany narządowe obserwowano w płucach, przetyku i sercu. Do badań włączono chore w trakcie leczenia immunosupresyjnego oraz te, które nie przyjmowały leków immunosupresyjnych przez okres przynajmniej 6 miesięcy poprzedzających badanie. Charakterystykę grupy badanej przedstawiono w tabeli 1. Grupę kontrolną stanowiło 29 zdrowych kobiet w wieku 36–77 lat (średnio 55,90 \pm 11,13 roku).

Żadna spośród badanych osób (zarówno w trakcie badań, jak i w okresie jednego miesiąca poprzedzającego badanie) nie wykazywała klinicznych cech infekcji. Z badań wykluczono osoby palące tytoń, a także podające w wywiadzie współistnienie chorób alergicznych lub innych mogących mieć związek z zaburzeniami procesu apoptozy.

Tab. 1. Charakterystyka badanej grupy chorych na twardzinę układową

Średnia wieku [lata]	57,03 ±11,16
Postać kliniczna, n (%)	
ISSc	34 (85)
dSSc	6 (15)
Czas trwania choroby, n (%)	
wczesna	9 (22,5)
późna	31 (77,5)
Aktywność procesu chorobowego, n (%)	
aktywny	9 (22,5)
nieaktywny	31 (77,5)
Stopień i rozległość zajęcia skóry mierzona mRSS	
ISSc	0–14 (średnio 5,74)
dSSc	5–22 (średnio 15,33)
Obraz badania kapilaroskopowego, n (%)	
wczesny	13 (32,5)
aktywny	18 (45)
późny	9 (22,5)
Zmiany w płucach, n (%)	
czynnościowe (spirometria i DLCO)	18 (45)
obrazowe (HRCT)	35 (87,5)
Zmiany w przełyku (skopia górnego odcinka przewodu pokarmowego), n (%)	
obecne	29 (72,5)
brak	11 (27,5)
Zmiany w sercu (EKG i echokardiogram), n (%)	
obecne	27 (68,5)
brak	13 (32,5)
Poziom dopełniacza w surowicy	
C3 [g/l] (norma 0,9–1,8)	0,59–1,51 (średnio 1,10)
C4 [g/l] (norma 0,1–0,4)	0,08–0,36 (średnio 0,21)
Obecność przeciwciał przeciwjądrowych, n (%)	
Scl-70	21 (52,5)
ACA	14 (35)
przeciw polimerazie I	1 (2,5)
przeciw fibrylarynie	1 (2,5)
brak	3 (7,5)
Zastosowane leczenie, n (%)	
cyklofosamid i preparaty steroidowe	6 (15)
preparaty steroidowe	21 (52,5)
brak	13 (32,5)

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobierana z żyły odłokciowej w objętości 5 ml „na skrzep”. Próbkę krwi niezwłocznie po pobraniu wirowano przez 15 min przy obrotach 1000 × g, a uzyskaną surowicę porcjowano po 200 µl i przechowywano w temperaturze –80°C do momentu wykonania oznaczeń. Stężenie białka Fas oceniano z zastosowaniem metody immunoenzymatycznej ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). W tym celu wykorzystano gotowy zestaw odczynników i 96-dołkowych płytek Human sAPO-1/Fas ELISA (Bender MedSystems, Austria) o czułości < 13,2 pg/ml. Dokonano odczytu z mikroplątek przy użyciu automatycznego, jednokanałowego czytnika absorbancji ELISA ELx800 (BioTek Instruments, USA). Komputer sprzężony z czytnikiem, za pomocą programu KCJR, na podstawie odczytanej absorbancji światła z badanych studzienek i studzienek ze stężeniami standardów, wykreślał krzywe liniowe, logarytmiczne lub półlogarytmiczne, na podstawie których wyliczał stężenia badanych parametrów. Analizę statystyczną otrzymanych wyników badań przeprowadzono za pomocą programu Statistica 8.0. Ocenę zgodności rozkładu badanych cech z rozkładem normalnym przeprowadzono przy użyciu testu Shapiro-Wilka. Dla porównania wyników liczbowych w dwóch grupach zastosowano test *t*-Studenta dla zmiennych niezależnych. Za istotne statystycznie przyjmowano wyniki przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Wyniki

Wyniki badań wykazały wysoce znamienne statystycznie ($p < 0,01$) wyższy poziom białka Fas w surowicy chorych na SSc w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych. W grupie chorych wartości sAPO-1/Fas wahały się od 222,00 pg/ml do 1026,71 pg/ml (średnio 480,40 ±223,82 pg/ml), a w grupie kontrolnej osób zdrowych od 119,92 do 597,42 pg/ml (średnio 327,94 ±112,54 pg/ml) (tab. 2., 3., ryc. 1.). Otrzymane wyniki badań nie wykazały znamiennej statystycznie różnicy w stężeniu białka Fas w surowicy chorych w zależności od podtypu klinicznego SSc, czasu trwania choroby, jej postaci klinicznej, aktywności procesu chorobowego, stopnia i rozległości stwardnienia skóry, okresu mikroangiopatii twardzinowej, obecności zmian w płucach, w przełyku i w sercu, poziomu dopełniacza C3, obecności przeciwciał przeciwjądrowych oraz stosowania preparatów immunosupresyjnych ($p > 0,05$) (tab. 4., 5.).

Tab. 2. Stężenie sFas u chorych na twardzinę układową i w grupie kontrolnej osób zdrowych

Grupa badana	sAPO-1/FAS [pg/ml]				
	średnia	SD	mediana	minimalne	maksymalne
chorzy	480,4030	223,82171	424,1950	222,0000	1026,7100
grupa kontrolna	327,9486	112,5441	339,3300	119,9200	597,420

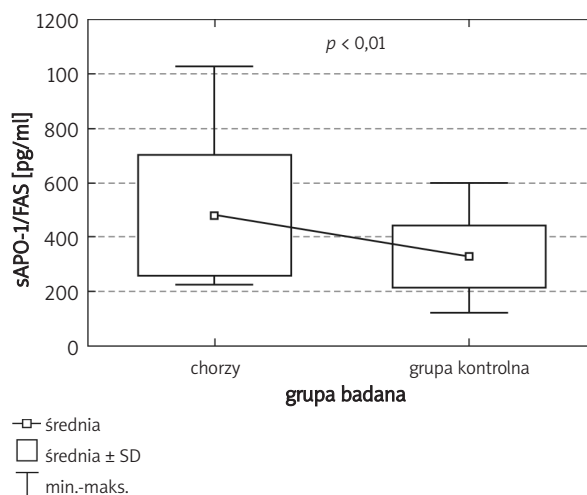
Omówienie wyników

Rozpuszczalne białko Fas jest powierzchniową proteiną, która odgrywa istotną rolę w przekaźnictwie komórkowym. Reguluje stężenie ligandu Fas oraz liczbę receptorów błonowych, a w szczególności hamuje oddziaływanie ligandu Fas z receptorem Fas w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, tym samym zapobiegając indukcji procesu apoptozy [26]. O roli, jaką pełni białko sFas w inicjowaniu zaprogramowanej śmierci komórki, świadczą dotychczasowe wyniki badań przeprowadzonych u chorych na SSc i inne choroby autoimmunologiczne [27].

Wyniki badań wykazały istotnie wyższe stężenie sFas w surowicy chorych na SSc w porównaniu z osobami zdrowymi. Podwyższone stężenie sFas wydaje się przemawiać za zahamowaniem aktywacji drogi receptorowej w przebiegu procesu apoptozy u chorych na SSc. Wydaje się, że wzrost ekspresji białka Fas jest najprawdopodobniej odzwierciedleniem fizjologicznej odpowiedzi na zachodzącą w SSc aktywację komórek T [6, 27, 28]. W badaniach wielu autorów stwierdzono podwyższone stężenie sFas w grupie chorych na twardzinę układową w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych [26, 29–31]. Autorzy sugerują, że podwyższony poziom sFas może być ważnym wskaźnikiem zapobiegania indukcji apoptozy limfocytów T w SSc [26]. Warto zaznaczyć, że wyznacznikiem rozpoczęcia procesu apoptozy na drodze zewnątrzkomórkowej jest przyłączenie się ligandu Fas do receptora Fas [20]. Białko sFas, oddziałując na połączenie FasL–Fas, wydaje się zapobiegać indukcji procesu apoptozy, a tym samym sprzyjać pobudzeniu limfocytów T w SSc. Uzyskane wyniki badań sugerują, że w patogenezie twardziny układowej sFas może odgrywać istotną rolę w hamowaniu procesu apoptozy. Można przypuszczać, że uniemożliwiając rozpoczęcie zaprogramowanej śmierci komórki, powoduje wzrost odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów na autoantygeny, ostatecznie doprowadzając do nadmiernej aktywacji limfocytów T [6, 27, 28]. Stummvoll i wsp. obserwowali istotnie statystycznie wyższe stężenie sFas w surowicy chorych na SSc w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych. Dodatkowo wykazali wyższą ekspresję receptora Fas w limfocytach CD8+ chorych na SSc w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych, co wydaje się przemawiać za wzmożoną apoptozą tych limfocytów. Nie obserwowali istotnych różnic w ekspresji receptora Fas w limfocytach CD4+. Uzyskane wyniki badań własnych oraz dane z piśmiennictwa pozwalają sądzić, że zaburzenia stężenia sFas w surowicy chorych na SSc mogą być wyznacznikiem aktywacji limfocytów T w przebiegu SSc. Dane z piśmiennictwa wskazują, że u chorych na SSc występuje nie tylko zwiększona liczba aktywowanych limfocytów T w porównaniu z osobami zdrowymi, ale także wzmożona ekspresja receptorów dla białka Fas na tych komórkach [32]. Wynika z tego, że podwyższony poziom sFas w surowicy chorych na SSc może chronić autoreaktywne limfocyty T przed apoptozą indu-

Tab. 3. Porównanie stężenia sFas w grupie chorych i w grupie kontrolnej osób zdrowych

Parametr procesu apoptozy	Wartość funkcji testowej	Istotność
sAPO-1/FAS	3,36764	$p < 0,01$



Ryc. 1. Stężenie białka Fas w grupie badanej chorych na twardzinę układową ($N = 40$) i grupie kontrolnej osób zdrowych ($N = 29$)

kowaną przez system Fas ligand i prowadzić do nadmiernej aktywacji limfocytów T [6, 27, 28].

Warto jednak zwrócić uwagę, że istnieją badania, w których nie obserwowano znamiennych różnic stężenia sFas w surowicy chorych na SSc w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych, co być może wynika ze sposobu przeprowadzenia badań, różnic w aktywności procesu chorobowego lub zastosowanego leczenia [27, 33, 34].

Wyniki badań nie wykazały zależności pomiędzy stężeniem sFas a postacią kliniczną SSc, co sugeruje, że być może stężenie sFas, a tym samym pośrednio proces apoptozy indukowany przy udziale drogi receptorowej, dotyczy SSc ogólnie, nie jest zaś charakterystyczny dla postaci *limited* lub *diffuse*. Być może wpływ na otrzymane wyniki miał rozkład ilościowy badanej grupy, w której większość stanowili chorzy z postacią *limited*, a tylko 6 przypadków dotyczyło postaci *diffuse*. Stwierdzony brak zależności pomiędzy stężeniem sFas a postacią kliniczną choroby jest zgodny z wynikami innych autorów. W pracach prowadzonych przez Wetziga i wsp. oraz Stummvolla i wsp. u chorych na lSSc i dSSc również nie obserwowano znamiennych różnic stężenia sFas w zależności od postaci klinicznej choroby [26, 32].

Wydaje się, że regulacja procesu apoptozy na drodze receptora Fas ma miejsce w obu postaciach choroby, niemniej jednak uwzględniając obraz kliniczny, można by się

Tab. 4. Stężenie sFas w grupie badanej chorych na twardzinę układową w zależności od obrazu klinicznego choroby

Twardzina		sAPO-1/FAS [pg/ml]				
		średnia	SD	mediana	minimalne	maksymalne
postać kliniczna	lSSc	492,7253	235,33736	431,8000	222,0000	1026,7100
	dSSc	410,5767	135,4047	378,8000	235,7200	609,340
czas trwania choroby	wczesny	441,2722	229,87286	386,7500	222,0000	965,1400
	późny	491,7635	224,5912	431,6700	235,7200	1026,710
aktywność procesu chorobowego	aktywny	370,4367	112,84836	353,6600	235,7200	609,3400
	nieaktywny	512,3287	238,8474	441,8800	222,0000	1026,710
okres mikroangiopatii twardzinowej	wczesny	425,4267	196,9957	424,3250	222,0000	940,0300
	późny	441,6944	180,8458	400,8200	235,7200	901,0500
	aktywny	511,5433	246,1108	386,7500	287,8400	965,1400
FVC	w normie	489,6217	229,90698	431,9300	222,0000	1026,7100
	obniżone	339,9375	76,3504	349,1350	244,7600	416,720
TLC	w normie	477,0683	238,78104	392,8600	222,0000	1026,7100
	obniżone	469,9556	192,4893	416,7200	244,7600	901,050
DCO SB _{sk}	w normie	510,4580	255,33101	439,7500	222,0000	1026,7100
	obniżone	436,4122	188,2734	396,1500	235,7200	901,050
zmiany w HRCT	obecne	464,0983	206,43604	431,6700	222,0000	965,1400
	brak	594,5360	328,0150	408,7800	287,8400	1026,710
zmiany w przetyku	obecne	443,9031	214,31059	383,5200	222,0000	1026,7100
	brak	576,6300	229,6185	457,3800	333,3400	965,140
odchylenia w EKG	obecne	400,6169	96,92370	392,8600	235,7200	594,8400
	brak	518,8185	257,0857	441,8800	222,0000	1026,710
odchylenia w echokardiogramie	obecne	442,0959	207,31606	383,0050	222,0000	1026,7100
	brak	527,2228	240,0282	451,4150	242,5100	965,140
poziom dopełniacza C3	prawidłowy	445,1561	184,46313	416,7200	235,7200	940,0300
	obniżony	547,2300	353,8691	389,8050	222,0000	1026,710
obecność przeciwciał	Scl-70	425,0367	202,76795	374,0800	222,0000	940,0300
	ACA	526,2429	222,8821	439,8800	267,6700	965,140
zastosowana immunosupresja	S + C	332,1467	80,0992	343,5000	235,7200	441,8800
	S	530,4219	245,6574	447,8300	242,5100	965,1400
	brak	468,0292	209,8234	431,9300	222,0000	1026,7100

spodziewać wyższego stężenia sFas u chorych z dSSc, u których często dochodzi do zajęcia narządów wewnętrznych i gwałtowniejszego przebiegu, szczególnie we wczesnych stadiach choroby [26, 35–37].

Odmiennie wyniki badań uzyskali Dzikowska-Bartkowiak i wsp., którzy obserwowali istotnie statystycznie różnice w stężeniach sFas w zależności od postaci klinicznej choroby. Badaniu poddano dwie porównywalne

pod względem liczbowym grupy chorych (15 chorych na dSSc i 14 na lSSc). Autorzy wykazali wyższe stężenia sFas u chorych na dSSc w porównaniu z pacjentami z lSSc [29, 38]. Ingegnoli i wsp. obserwowali znamienne wyższą ekspresję receptora Fas w limfocytach CD4+ i CD8+ u chorych na dSSc. Uzyskane wyniki wydają się potwierdzać zaburzenia procesu homeostazy limfocytów w patogenie SS. Autorzy sugerowali, że wzmożona ekspresja

receptora Fas u chorych z postacią *diffuse* może prowadzić do rozwoju mechanizmów samoregulacji w reakcji na zaburzenia odpowiedzi immunologicznej. Wydaje się, że nadmierna aktywacja limfocytów T obserwowana w następstwie oddziaływania białka sFas może ostatecznie powodować eliminację autoreaktywnych limfocytów na drodze szlaków apoptotycznych, aktywowanych przy udziale receptora Fas [39].

Analiza zależności pomiędzy stężeniem sFas a czasem trwania SSc nie wykazała istotnych statystycznie różnic w stężeniu sFas w grupie chorych we wczesnym i późnym okresie SSc. Podobne wyniki uzyskali Stummvoll i wsp., którzy w badaniach prowadzonych u 39 chorych na SSc, ze średnim okresem trwania choroby 10 ± 9 lat, również nie obserwowali istotnych korelacji stężenia białka Fas z czasem trwania procesu chorobowego [32].

Wyniki badań dotyczących zależności pomiędzy stężeniem sFas w surowicy chorych na SSc a aktywnością procesu chorobowego nie wykazały istotnych różnic w stężeniu białka Fas u chorych z aktywnym i nieaktywnym procesem chorobowym, co sugeruje, że być może stężenie sFas w surowicy jest niezależne od aktywności SSc. Warto jednak nadmienić, że na rezultat mógł mieć wpływ podział grupy badanej, bowiem większość chorych (31 osób) była w nieaktywnej fazie SSc. W pracach prowadzonych przez Wetziga i wsp. u chorych na SSc wykazano jedynie nieznaczną korelację pomiędzy stężeniem sFas a aktywnością procesu zapalnego mierzoną podwyższonym stężeniem CRP, OB i/lub obecnością kompleksów immunologicznych, leukocytozą oraz zajęciem skóry. Autorzy częściej obserwowali podwyższone stężenia sFas u chorych w aktywnym okresie choroby, niemniej jednak w pojedynczych przypadkach również u chorych w nieaktywnej fazie SSc stężenia sFas były wysokie [26]. Nie można wykluczyć, że różnice pomiędzy otrzymanymi rezultatami a wynikami uzyskanymi przez Wetziga i wsp. wynikają z uwzględnienia innych kryteriów oceny aktywności SSc. W badaniach własnych aktywność procesu chorobowego oceniano zgodnie z indeksem aktywności wg *European Scleroderma Study Group*, który uwzględnia 10 parametrów klinicznych choroby [indeks Rodnana (*Rodnan skin score* – RSS), sklerodaktylia, nasilenie zmian skórnych w ostatnim miesiącu, obecność owrzodzeń palców, zmiany naczyniowe, zapalenie stawów, symetryczne obrzęki i bolesność, obniżona wartość DLCO, pogorszenie wydolności sercowo-płucnej w ciągu ostatniego miesiąca, OB, hipokomplementemia C3 lub C4].

Wyniki badań nie wykazały istotnych zależności między stężeniem sFas a stopniem i rozległością zajęcia skóry wyrażoną zmodyfikowaną skalą RSS (mRSS), co sugeruje, że być może apoptoza limfocytów T w surowicy nie jest dominującym procesem w patogenezie zmian skórnych u chorych na SSc. Istotną rolę w procesie włóknienia skóry przypisuje się bowiem odkładaniu włókien kolagenu, który jest produkowany w nadmiarze przez niektóre populacje fibroblastów [26]. Otrzymane wyniki znajdują

Tab. 5. Porównanie stężenia sFas w grupie badanej chorych na twardzinę układową w zależności od obrazu klinicznego choroby

sAPO-1/FAS	Wartość funkcji testowej	p
postać kliniczna	0,82547	> 0,05
czas trwania choroby	-0,59079	> 0,05
aktywność procesu chorobowego	-1,71548	> 0,05
okres mikroangiopatii twardzinowej	0,509364	> 0,05
FVC	1,28060	> 0,05
TLC	0,08129	> 0,05
DCO SB _{sk}	1,00775	> 0,05
zmiany w HRCT	-1,22683	> 0,05
zmiany w przetyku	-1,71588	> 0,05
odchylenia w EKG	-1,59506	> 0,05
odchylenia w echokardiogramie	-1,20355	> 0,05
poziom dopełniacza C3	-1,05504	> 0,05
obecność przeciwciał	-1,39068	> 0,05
zastosowana immunosupresja	1,951282771	> 0,05

potwierdzenie w badaniach prowadzonych przez Atesa i wsp., którzy również nie wykazali znamienych zależności pomiędzy stężeniem sFas a stopniem i rozległością zajęcia skóry u chorych na SSc [27]. Odmienne wyniki badań uzyskali Dziańkowska-Bartkowiak i wsp., którzy obserwowali nie tylko dodatnią korelację pomiędzy stężeniem sFas a stopniem zaawansowania zmian skórnych, ale także wprost proporcjonalną zależność między stężeniem sFas w surowicy a zajęciem układu kostno-stawowego. Być może różnice w rezultatach badań wynikają z zastosowania różnych skal do oceny stopnia i rozległości zmian skórnych. W badaniach własnych postępowano się bowiem skalą wg Rodnana, która opiera się na palpacyjnej ocenie grubości fatdu skóry 17 obszarów ciała. W badaniach prowadzonych przez Atesa i wsp. oraz Dziańkowską-Bartkowiak i wsp. oceniano grubość skóry 15 obszarów ciała. Na podstawie otrzymanych wyników autorzy sugerują, że podwyższone stężenie sFas w twardzinie układowej może być wskaźnikiem zajęcia skóry i układu kostno-stawowego [29].

Analiza zależności pomiędzy stężeniem sFas a okresem mikroangiopatii twardzinowej ocenianym na podstawie badania kapilaroskopowego wata paznokciowego nie wykazała zależności pomiędzy stężeniem sFas a wczesnym, aktywnym i późnym okresem mikroangiopatii twardzinowej, co pozwala sugerować, że być może stężenie sFas w surowicy jest niezależne od zmian obserwowanych w mikrokrażeniu. Zasadniczą rolę w rozwoju

mikroangiopatii twardzinowej przypisuje się bowiem uszkodzeniu komórek śródbłonna drobnych naczyń, co prowadzi do zaburzenia równowagi pomiędzy procesami koagulacji i fibrynolizy. Aktywacja układu immunologicznego, choć niezwykle ważna w patogenezie SSc, wydaje się zjawiskiem wtórnym, bowiem nacieki z komórek jednojądrowych pojawiają się jakiś czas po stwierdzeniu apoptozy komórek śródbłonna [40]. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono badań dotyczących stężenia sFas w zależności od okresu mikroangiopatii twardzinowej. Istnieją jednak doniesienia, w których u pacjentów z twardziną układową z ograniczonymi stwardnieniami skóry (ISSc) obserwowano odwrotnie proporcjonalną zależność między czasem trwania zaburzeń wazomotorycznych (tj. objawu Raynauda) a stężeniem sFas. Zjawisko to nie jest do końca wyjaśnione, najprawdopodobniej wiąże się z nasilonym hamowaniem procesu apoptozy we wczesnych stadiach choroby, w następstwie czego dochodzi do rozwoju autoimmunologicznych procesów włóknienia [41].

Analiza korelacji pomiędzy stężeniem sFas a obecnością zmian w płucach, ocenianych na podstawie wyniku badania tomografii komputerowej klatki piersiowej wysokiej rozdzielczości (HRCT) oraz parametrów czynnościowych płuc – natężonej pojemności życiowej (FVC), całkowitej pojemności płuc (TLC) i pojemności dyfuzyjnej płuc (DLCO) wyrażonej wskaźnikiem DCO SB_{sk} , nie wykazała istnienia znamienych zależności. Otrzymane wyniki znajdują potwierdzenie w badaniach innych autorów. Ates i wsp. nie wykazali istotnych różnic w stężeniu sFas w surowicy chorych z obecnością zwłóknień w płucach i chorych bez zmian w obrazie HRCT klatki piersiowej. Nie obserwowali także znamienych korelacji pomiędzy stężeniem sFas w surowicy a pojemnością dyfuzyjną płuc [27]. Podobne rezultaty uzyskali Luzina i wsp. oraz Wetzig i wsp. [26, 42].

Mimo stwierdzenia braku zależności między stężeniem sFas a obecnością zmian w płucach, warto zwrócić uwagę, że istnieją doniesienia, w których podkreśla się rolę sFas w rozwoju choroby śródmiąższowej płuc u chorych na SSc. Potwierdzają to prace poświęcone roli procesu apoptozy w patogenezie SSc indukowanej przez bleomycynę. Kuwano i wsp. wykazali, że przeciwciała anty-FasL podawane w iniekcjach mogą zapobiegać procesowi włóknienia płuc indukowanemu przez bleomycynę u chorych na SSc. Przeciwciała anty-Fas najprawdopodobniej hamują apoptozę indukowaną na drodze Fas–FasL [43]. Wydaje się jednak, że nie jest to wystarczający mechanizm ochronny, ponieważ procesy włóknienia w płucach są wywoływane nie tylko na drodze ligand–receptor [23].

Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy stężeniem sFas w surowicy a obecnością zmian w przełyku uwidocznionych w skopii górnego odcinka przewodu pokarmowego u chorych na twardzinę układową. Otrzymane wyniki są zgodne z rezultatami badań Stummvolla i wsp. oraz Wetziga i wsp., którzy również nie

obserwowali znamienych różnic w stężeniu sFas w surowicy chorych ze zmianami w przełyku w stosunku do chorych bez uchwytnych zmian w skopii górnego odcinka przewodu pokarmowego [26, 32].

W badaniach dotyczących zależności między obecnością zmian w sercu (EKG i echokardiogram) a stężeniem sFas w surowicy nie wykazano istotnych różnic w porównaniu z grupą osób, u których nie obserwowano zajęcia serca. Nie można wykluczyć, że relatywnie małe grupy badanych ze zmianami w EKG i echokardiogramie mogły wpłynąć na uzyskane wyniki.

Podsumowując – w badaniach własnych nie wykazano istotnych zależności pomiędzy stężeniem sFas w surowicy a wykładnikami zajęcia narządów wewnętrznych u chorych na SSc. Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że być może apoptoza komórek zależna od sFas nie jest głównym mechanizmem powstawania zmian narządowych u chorych na SSc. Zasadniczą rolę w patogenezie zmian przypisuje się bowiem nadmiernemu odkładaniu się włókien kolagenowych jako następstwu zaburzonej syntezy kolagenu przez fibroblasty. W badaniach prowadzonych w warunkach *in vitro* potwierdzono, że do wytwarzania dużych ilości kolagenu zaktywowane fibroblasty nie wymagają stałej stymulacji komórek układu immunologicznego. Komórki układu immunologicznego wydają się niezbędne do pobudzenia czynności fibroblastów związanej z wyselekcjonowaniem subpopulacji fibroblastów zdolnych do wytwarzania dużych ilości kolagenu [44]. Co ciekawe, sugeruje się również, że stężenie sFas może być związane z nadmierną aktywnością fibroblastów. Wzmogłą ekspresję receptora Fas obserwowano bowiem nie tylko w limfocytach, ale także w fibroblastach i innych komórkach odpowiedzi immunologicznej [45].

W badaniach nie potwierdzono istotnych zależności pomiędzy stężeniem sFas a poziomem składowej C3 dopełniacza i obecnością przeciwciał przeciwjądrowych. Ze względu na brak w dostępnym piśmiennictwie podobnych badań interpretacja otrzymanych wyników jest trudna. Warto jednak zauważyć, że rolę przeciwciał w patogenezie SSc podkreśla się w aspekcie zmian naczyniowych i narządowych związanych z procesem apoptozy komórek śródbłonna i włóknieniem, nie zaś z bezpośrednim oddziaływaniem na komórki układu immunologicznego [46].

Nie wykazano znamienych statystycznie zależności między stężeniem sFas a zastosowanym leczeniem immunosupresyjnym. Odmiennie wyniki uzyskali Ates i wsp., którzy stwierdzili znamienne wyższe stężenie sFas w surowicy nieleczonych chorych na SSc w porównaniu z grupą osób zdrowych i chorych w trakcie terapii. U chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) przed włączeniem leczenia obserwowano także istotnie wyższe stężenie sFas w porównaniu z chorymi w nieaktywnej fazie choroby i grupą kontrolną osób zdrowych. Stężenie sFas u chorych w aktywnym okresie choroby, u których rozpoczęto leczenie immunosupresyjne, było niższe niż u chorych z aktywnym RZS bez immunosupresji. Różnice te nie osiągnęły

jednak istotności statystycznej. Warto nadmienić, że spośród 30 chorych na RZS, których poddano badaniu, 28 było w aktywnej fazie choroby. Preparaty steroidowe, cyklofosfamid, azatiopryna czy metotreksat, wywierając działanie immunosupresyjne, są silnymi czynnikami stygulującymi proces apoptozy [27, 47].

Podsumowując – wykazane istotnie wyższe stężenie białka sFas w surowicy chorych na SSc w porównaniu z osobami zdrowymi wydaje się przemawiać za zahowaniem drogi receptorowej w aktywacji procesu apoptozy u chorych na SSc. Stwierdzenie braku istotnych różnic w stężeniu sFas w zależności od obrazu klinicznego choroby sugeruje, że zmiany stężenia sFas dotyczą SSc ogólnie, nie są zaś charakterystyczne dla określonych manifestacji klinicznych.

Piśmiennictwo

- Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol* 2005; 26: 587-95.
- Denton CP, Black CM. Scleroderma – clinical and pathological advances. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004; 18: 271-90.
- Haustein UF. Systemic sclerosis-scleroderma. *Dermatol Online J* 2002; 8: 3.
- Latsi PI, Wells AU. Evaluation and management of alveolitis and interstitial lung disease in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15: 748-55.
- Trojanowska M, Varga J. Molecular pathways as novel therapeutic targets in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19: 568-73.
- Gindzieńska-Sieśkiewicz E, Klimiuk PA, Kowal-Bielecka O, et al. Aspekty immunopatologiczne twardziny układowej. *Pol Merk Lek* 2005; 19: 800-3.
- Haustein UF, Andereg U. Pathophysiology of scleroderma: an update. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998; 11: 1-8.
- Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, et al. Oxidative stress and the pathogenesis of scleroderma: the Murrell's hypothesis revisited. *Semin Immunopathol* 2008; 30: 329-37.
- Herrick AL, Matucci Cerinic M. The emerging problem of oxidative stress and the role of antioxidants in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 4-8.
- Jimenez SA, Artlett CM. Microchimerism and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 86-90.
- Ricciari V, Spadaro A, Fuksa L, et al. Specific oxidative stress parameters differently correlate with nailfold capillaroscopy changes and organ involvement in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2008; 27: 225-30.
- Sfrent-Cornateanu R, Mihai C, Stoian I, et al. Antioxidant defense capacity in scleroderma patients. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 836-41.
- Kern P, Keilholz L, Forster C, et al. In vitro apoptosis in peripheral blood mononuclear cells induced by low-dose radiotherapy displays a discontinuous dose-dependence. *Int J Radiat Biol* 1999; 75: 995-1003.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-6.
- Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature* 2000; 407: 777-83.
- Szpringer E, Lutnicki K. Znaczenie apoptozy w wybranych chorobach w dermatologii. *Nowa Med* 2002; 3: 24-32.
- Arai H, Gordon D, Nabel EG, et al. Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 13862-7.
- Kavurma MM, Khachigian LM. Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression. *Cell Death Differ* 2003; 10: 36-44.
- Mitrus I, Missol-Kolka E, Szala S. Geny proapoptotyczne w terapii genowej nowotworów. *Współcz Onkol* 2001; 5: 242-9.
- Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 29-55.
- Watzlik A, Dufter C, Jung M, et al. Fas ligand gene-carrying adeno-5 AdE-asy viruses can be efficiently propagated in apoptosis-sensitive human embryonic retinoblast 911 cells. *Gene Ther* 2000; 7: 70-4.
- Gu YS, Kong J, Cheema GS, et al. The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2008; 38: 132-60.
- Yamamoto T, Nishioka K. Possible role of apoptosis in the pathogenesis of bleomycin induced scleroderma. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 44-50.
- Gilmore TD, Koedood M, Piffat KA, White DW. Rel/NF-kappaB/ikappaB proteins and cancer. *Oncogene* 1996; 13: 1367-78.
- Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA, et al. Preliminary criteria for classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
- Wetzig T, Petri JB, Mittag M, et al. Serum levels of soluble Fas/APO-1 receptor are increased in systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 1998; 290: 187-90.
- Ateş A, Kinikli G, Turgay M, et al. The levels of serum-soluble Fas in patients with rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2004; 23: 421-5.
- Cheng J, Zhou T, Liu C. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; 263: 1759-62.
- Dziankowska-Bartkowiak B, Waszczykowska E, Zalewska A, et al. Evaluation of caspase 1 and sFas serum levels in patients with systemic sclerosis: correlation with lung dysfunction, joint and bone involvement. *Mediators Inflamm* 2003; 12: 339-43.
- Cipriani P, Fulminis A, Pingiotti E, et al. Resistance to apoptosis in circulating alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2006; 33: 2003-14.
- Nozawa K, Kayagaki N, Tokano Y, et al. Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1126-9.
- Stummvoll GH, Aringer M, Smolen JS, et al. Derangement of apoptosis-related lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39: 1341-50.
- Goel N, Ulrich DT, Clair WS, et al. Lack of correlation between serum soluble Fas/APO-1 levels and autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1738-43.
- Tomokuni A, Aikoh T, Matsuki T, et al. Elevated soluble Fas/APO-1 (CD95) levels in silicosis patients without clinical symptoms of autoimmune diseases or malignant tumours. *Clin Exp Immunol* 1997; 110: 303-9.
- Chung L, Lin J, Furst DE, et al. Systemic and localized scleroderma. *Clin Dermatol* 2006; 24: 374-92.
- LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15: 202-5.
- LeRoy EC, Medsger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001; 28: 1573-6.
- Dziankowska-Bartkowiak B, Waszczykowska E, Sysa-Jędrzejowska A. Ocena zjawiska apoptozy u chorych na twardzinę układową. *Przegl Dermatol* 2003; 1: 17-23.

39. Ingegnoli F, Trabattoni D, Saresella M, et al. Distinct immune profiles characterize patients with diffuse or limited systemic sclerosis. *Clin Immunol* 2003; 108: 21-8.
40. Krasowska D. Patogeneza, kryteria rozpoznawania i klasyfikacja twardziny układowej. *Przeegl Dermatol* 2008; 95: 225-8.
41. Dziańkowska-Bartkowiak B, Zalewska A, Sysa-Jedrzejowska A. Duration of Raynaud's phenomenon is negatively correlated with serum levels of interleukin 10 (IL-10), soluble receptor of interleukin 2 (sIL2R), and sFas in systemic sclerosis patients. *Med Sci Monit* 2004; 10: CR202-8.
42. Luzina IG, Papadimitriou JC, Anderson R, et al. Induction of prolonged infiltration of T lymphocytes and transient T lymphocyte-dependent collagen deposition in mouse lungs following adenoviral gene transfer of CCL18. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2643-55.
43. Kuwano K, Hagimoto N, Kawasaki M, et al. Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1999; 104: 13-9.
44. Jelaska A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor beta 1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2230-9.
45. LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma fibroblasts in vitro. *J Clin Invest* 1974; 54: 880-9.
46. Ahmed SS, Tan FK, Arnett FC, et al. Induction of apoptosis and fibrillin 1 expression in human dermal endothelial cells by scleroderma sera containing anti-endothelial cell antibodies. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2250-62.
47. Mountz JD, Wu J, Cheng J, et al. Autoimmune disease: a problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1415-20.