

Streszczenie

Zesztywniające zapalenie stawów kręgosłupa należy do chorób przewlekłych, charakteryzujących się postępującym procesem zapalnym, który obejmuje stawy krzyżowo-biodrowe, stawy oraz więzadła kręgosłupa czy też pierścienie włókniste, prowadząc do ich kostnego zeszywnienia. Zesztywniające zapalenie stawów kręgosłupa cechuje się podobieństwem do reumatoidalnego zapalenia stawów i łuszczykowego zapalenia stawów dlatego do badań włączono także pacjentów z tymi jednostkami chorobowymi. Etiologia ZZSK nie jest w pełni poznana. Dużą rolę w patogenezie tej choroby przypisuje się predyspozycjom genetycznym. Wskazuje się także na duży udział czynników środowiskowych. Przewlekły proces zapalny może nasilać zjawisko stresu oksydacyjnego, przejawiającego się zaburzeniem równowagi między układem utleniaczy i przeciwutleniaczy. Wówczas dochodzi do zwiększonego wytwarzania reaktywnych form tlenu lub obniżenia zdolności układów, które neutralizują wolne rodniki lub naprawiają uszkodzenia przez nie wywołane. Co może świadczyć o wzmożonym działaniu pierwszej linii obrony antyoksydacyjnej, w związku z nadprodukcją wolnych rodników tlenowych. Może to być związane z zaburzeniem procesu mineralizacji kości oraz nasileniem reakcji zapalnej.

Efektywne działanie tzw. pierwszej linii obrony antyoksydacyjnej polega na przeciwdziałaniu powstawaniu nowych wolnych rodników. Zaangażowane są tu SOD, CAT, GPx, a także pierwiastki o potencjale antyoksydacyjnym (Cu, Zn, Se). Czynniki te mogą przyczyniać się do rozwoju zaburzeń związanych z ZZSK.

Celem pracy była ocena zależności pomiędzy stężeniem wybranych pierwiastków (Na, K, Ca, Mg, Be, Ba, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Al, P, As, Se, Mo, Cd, Sn, Pb, Hg, Li, B, Sr, Sb) a ich wpływem na zaburzenia patogenetyczne, które występują w ZZSK. Dokonano także oceny parametrów stresu oksydacyjnego w postaci enzymów antyoksydacyjnych stanowiących pierwszą linię obrony (SOD, CAT, GPx, GR) i wskaźnika lipoperoksydacji (MDA) oraz funkcjonowania mechanizmów obronnych u chorych z ZZSK w porównaniu z osobami zdrowymi. Dokonano także analizy molekularnej polimorfizmów genów *CTLA4*, *STAT4*, *COL1A1* i *PTPN22* oraz próby ustalenia związków pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów w ZZSK.

Do badań włączono osoby pomiędzy 18. a 82. rokiem życia. Badaniem objęto łącznie 227. pacjentów, w tym 58. z ZZSK, 111. z RZS i 58. z ŁZS, z regionów bydgoskiego, grudziądzkiego i starachowickiego. Grupę odniesienia stanowiły 72. osoby pozbawione chorób przewlekłych, w tym także o etiologii wolnorodnikowej oraz 228 osób pochodzących

z terenów środowiskowo czystych. Materiał do badań stanowiła krew żylna pobrana na EDTA z żyły odłokciowej, w której przeprowadzono izolację genomowego DNA i dokonano analizy molekularnej polimorfizmów metodą PCR-RFLP oraz zbadano stężenia makro- i mikroskładników oraz metali ciężkich metodą ICP-MS. Po odwirowaniu krwi pełnej w próbkach z przyspieszaczem wykrzepiania uzyskano surowicę, w której dokonano pomiaru aktywności SOD, CAT, GPx, GR. Oznaczono także stężenie CP i zbadano intensywność procesów peroksydacji lipidów (MDA). Parametry te zostały oznaczone przy użyciu techniki ELISA.

Stwierdzono wyższą aktywność enzymów antyoksydacyjnych: SOD ($p=0$), CAT ($p=0$) i GPx ($p=0$), a także podwyższone stężenie białka ostrej fazy (CP) ($p=0$) u chorych z ZZSK, w porównaniu z grupą osób zdrowych. Stwierdzono zaburzenie w obrębie równowagi pierwiastkowej organizmu w grupie badanej z ZZSK, w porównaniu z grupą osób zdrowych, co przejawiało się podwyższonym stężeniem Ca ($p=0$), Na ($p=0$), Cu ($p=0$), Mo ($p=0.001$), Cr ($p=0$), Se ($p=0$), V ($p=0$), Co ($p=0$), Al ($p=0$), Sn ($p=0$) oraz As ($p=0$), przy obniżonym stężeniu Mg ($p=0$), P ($p=0$), K ($p=0$), Mn ($p=0.005$), Zn ($p=0$), Pb ($p=0$), Cd ($p=0$). Stwierdzono wyższe stężenie MDA ($p=0$) w grupie chorych z ZZSK w porównaniu z osobami zdrowymi. Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy wybranym polimorfizmem, a występowaniem ZZSK w przypadku polimorfizmów *PTPN22* ($p=0.8$) i *STAT4* ($p=0.94$). Dowiedziono, iż u osób z ZZSK z genotypem *CC* genu *PTPN22* dochodzi do obniżenia aktywności GPx ($p=0.022$) i GR ($p=0.012$), w porównaniu z chorymi z genotypem *CT*.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy wskazują na złożoną naturę choroby, jaką jest ZZSK. Na ich podstawie można wnioskować, iż gospodarka pierwiastkowa, obrona antyoksydacyjna, czynniki środowiskowe i genetyczne, są ściśle powiązane i mogą wpływać na kondycję organizmu. Także uzyskane wyniki badań ankietowych dostarczają cennych informacji dotyczących czynników predysponujących do wystąpienia zaburzeń w ZZSK. Niekorzystny wpływ wywierają nałogi, narażenia zawodowe, czy niewłaściwe zwyczaje żywieniowe. Prowadzenie szerokokrojonych badań nad mechanizmami patogenetycznymi, udziałem i rolą poszczególnych mechanizmów biochemicznych i polimorfizmów genetycznych, może dostarczać cennych informacji w opracowaniu skutecznych terapii i efektywnym leczeniu chorych z ZZSK. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy potwierdzają udział zjawiska stresu oksydacyjnego, zaburzeń dotyczących wybranych układów enzymatycznych w funkcjonowaniu naturalnej bariery osydacyjnej. W efekcie nasileniu mogą ulegać zmiany zapalne aktywujące układ odpornościowy. Zaburzenia gospodarki pierwiastkowej przyczyniają się do rozwoju zjawiska

stresu oksydacyjnego w wyniku obniżenia stężenia mikroelementów nasilających odpowiedź oksydoredukcyjną, jak również podwyższenia toksycznych pierwiastków. Zaburzenia równowagi makro- i mikrośladników w obrębie organizmu w połączeniu ze zjawiskiem stresu oksydacyjnego mogą bezpośrednio przyczyniać się do powstania nieprawidłowości dotyczących procesów mineralizacji tkanki kostnej. Destabilizacja gospodarki pierwiastkowej może mieć również istotne znaczenie dla układu immunologicznego, ponieważ aktywacja szlaku NF- κ B oraz uwalnianie licznych cytokin prozapalnych leży u podłoża zmian patologicznych prowadzących do wystąpienia ZZSK.

Summary

Ankylosing spondylitis is a chronic disease characterized by a progressive inflammatory process that affects the sacroiliac joints, joints and ligaments of the spine or fibrous rings, leading to bone ankylosis. Ankylosing spondylitis is similar to rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis, therefore the studies also included patients with these diseases. The etiology of Ankylosing spondylitis is not fully understood. Genetic predisposition plays a major role in the pathogenesis of this disease. There is also a large share of environmental factors. Chronic inflammatory process may exacerbate the phenomenon of oxidative stress, manifested by an imbalance between the oxidant and antioxidant systems. Then, there is an increased production of reactive oxygen species or a reduction in the ability of systems that neutralize free radicals or repair damage caused by them. Which may indicate the increased activity of the first line of antioxidant defense due to the overproduction of oxygen free radicals. This may be associated with a disturbance in the bone mineralization process and an increase in the inflammatory reaction.

Effective operation of the so-called the first line of antioxidant defense is to prevent the formation of new free radicals. SOD, CAT, GPx are involved here, as well as elements with antioxidant potential (Cu, Zn, Se). These factors may contribute to the development of ankylosing spondylitis disorders.

The aim of the study was to assess the relationship between the concentration of selected elements (Na, K, Ca, Mg, Be, Ba, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Al, P, As, Se, Mo, Cd, Sn, Pb, Hg, Li, B, Sr, Sb) and their influence on pathogenic disorders that occur in AS. The parameters of oxidative stress in the form of antioxidant enzymes constituting the first line of defense (SOD, CAT, GPx, GR) and the lipoperoxidation index (MDA) as well as the functioning of defense mechanisms in patients with ankylosing spondylitis as compared to healthy people were also assessed. The molecular analysis of *CTLA4*, *STAT4*, *COL1A1* and *PTPN22* gene polymorphisms was also performed, and an attempt was made to establish relationships between the occurrence of particular genotypes in Ankylosing spondylitis.

People between 18 and 82 years of age were included in the study. A total of 227 patients were included in the study, including 58 patients with ankylosing spondylitis, 111 with rheumatoid arthritis and 58 with psioartic arthritis, from the Bydgoszcz, Grudziądz and Starachowice regions. The reference group consisted of 72 people devoid of chronic diseases, including those with free radical aetiology and 228 people from environmentally clean areas . The material for the research was venous blood collected for EDTA from the antecubital vein,

in which the isolation of genomic DNA was performed, molecular analysis of polymorphisms was performed using the PCR-RFLP method, and the concentrations of macro- and micronutrients and heavy metals were examined using the ICP-MS method. After centrifugation of whole blood in tubes with a clotting accelerator, serum was obtained in which the activity of SOD, CAT, GPx, GR was measured. The concentration of CP was also determined and the intensity of lipid peroxidation (MDA) processes was examined. These parameters were determined using the ELISA technique.

There was a higher activity of antioxidant enzymes: SOD ($p=0$), CAT ($p=0$) and GPx ($p=0$), as well as an increased concentration of acute phase protein (CP) ($p=0$) in patients with ankylosing spondylitis, compared to a group of healthy people. There was a disturbance in the elemental balance of the organism in the study group with AS, as compared to the group of healthy people, which was manifested by an increased concentration of Ca ($p=0$), Na ($p=0$), Cu ($p=0$), Mo ($p=0.001$), Cr ($p=0$), Se ($p=0$), V ($p=0$), Co ($p=0$), Al ($p=0$), Sn ($p=0$) and As ($p=0$), with a reduced concentration of Mg ($p=0$), P ($p=0$), K ($p=0$), Mn ($p=0.005$), Zn ($p=0$), Pb ($p=0$), Cd ($p=0$). There was a higher concentration of MDA ($p=0$) in the group of patients with ankylosing spondylitis in comparison to healthy subjects. There were no significant differences between the selected polymorphism and the occurrence of ankylosing spondylitis in the case of *PTPN22* ($p=0.8$) and *STAT4* ($p=0.94$) polymorphisms. It has been proven that in patients with ankylosing spondylitis with the *CC* genotype of the *PTPN22* gene, the activity of GPx ($p=0.022$) and GR ($p=0.012$) is reduced, compared to patients with the *CT* genotype.

The research carried out in this dissertation shows the complex nature of the disease, which is ankylosing spondylitis. On its basis, it can be concluded that elemental economy, antioxidant defense, environmental and genetic factors are closely related and can affect the condition of the organism. The results of the questionnaire studies also provide valuable information on the factors predisposing to disorders in ankylosing spondylitis. Addictions, occupational exposures or inappropriate eating habits have a negative influence. Conducting extensive research on the pathogenetic mechanisms, participation and role of individual biochemical mechanisms and genetic polymorphisms, can provide valuable information in the development of effective therapies and effective treatment of patients with ankylosing spondylitis. The results presented in this paper confirm the participation of the phenomenon of oxidative stress and disorders of selected enzyme systems in the functioning of the natural oxidative barrier. As a result, inflammatory changes that activate the immune system may be intensified. Elemental disorders contribute to the development of the phenomenon of oxidative stress as a result of lowering the concentration of micronutrients enhancing the

redox response, as well as increasing the toxic elements. Disturbances in the balance of macro- and micronutrients within the organism, combined with the phenomenon of oxidative stress, may directly contribute to the occurrence of abnormalities in the processes of bone tissue mineralization. The destabilization of the elemental balance may also be important for the immune system, because the activation of the NF- κ B pathway and the release of numerous pro-inflammatory cytokines underlie the pathological changes leading to the occurrence of ankylosing spondylitis.