

Antikūnų prieš ciklinį citrulinintą peptidą sąsaja su uždegiminiais baltymais sergant reumatoidiniu artritu

Gabija Mončiūtė¹, Megė Černiauskienė², Loreta Bagdonaitė²

¹ Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas

Vilnius University Faculty of Medicine

² Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra

Vilnius University, Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine

El. paštas: loreta.bagdonaitė@mf.vu.lt

Santrauka

Tyrimo tikslas. Nustatyti reumatoidinio artrito žymens – antikūnų prieš ciklinį citrulinintą peptidą (anti-CCP), bei uždegiminių serumo baltymų galimas tarpusavio sąsajas.

Tyrimo medžiaga ir metodai. Tirta ir analizuota reumatoidiniu artritu sergančių 30 pacientų grupė (tiriamųjų amžiaus vidurkis – $57,5 \pm 14,9$ metų). Tiriamiesiems imunofermentinės analizės metodu nustatyta antikūnų prieš ciklinį citrulinintą peptidą (anti-CCP) koncentracija. Gavus teigiamą serumo anti-CCP rezultatą, buvo atliktas mėginio baltymų frakcijų nustatymas agarozės gelio elektroforezės bei NDS-PAGE gelio elektroforezės būdu, siekiant įvertinti

anti-CCP sąsajas su uždegiminiais baltymais. Dešimt tiriamųjų, kuriems nustatytas neigiamas anti-CCP tyrimo rezultatas, pasirinkti kaip kontrolinė grupė.

Rezultatai. Agarozės gelio elektroforezės būdu frakcionavus serumo baltymus, pastebėta mažesnė 60 kDa baltymo raiška tarp teigiamus anti-CCP rezultatus turinčių pacientų, lyginant su kontrolinės grupės pacientais, kuriems nustatyti neigiami anti-CCP rezultatai. Keliose frakcijose – 1, 6, 17 – aptikti pavieniai ~90 kDa, 110–118 kDa, >200 kDa baltymai. NDS-PAGE gelio elektroforezės metodu nustatyta taip pat mažesnė 60 kDa baltymo raiška tarp pacientų, kurių anti-CCP rezultatai teigiami. Aptikta didesnė baltymų variacija žemiau 20 kDa. Frakcijose, kuriose buvo teigiamų anti-CCP rezultatų grupės pacientų kraujo serumas, pastebėti mažesnio dydžio (15 kDa) baltymai.

Išvados. Atliekant agarozės gelio elektroforezę nepastebėta anti-CCP sąsajų su uždegiminiais baltymais. NDS-PAGE gelio elektroforezės metodu, remiantis baltymų molekulinė mase, nustatyta galima anti-CCP sąsaja su ūminės fazės uždegiminiu baltymu – serumo amiloidu A.

Reikšminiai žodžiai: reumatoidinis artritas, antikūnai, ciklinis citrulinintas peptidas, serumo baltymai, uždegiminiai baltymai.

ĮVADAS

Reumatoidinis artritas (RA) yra autoimuninė liga, dažniausiai pažeidžianti smulkiosius rankų ir kojų sąnarius [1]. Šiai ligai būdingi aktyvumo svyravimai, ir jei RA tinkamai negydomas ar nekontroliuojamas, sukelia negrįžtamus sąnarių ir sausgyslių pažeidimus, kurie sutrikdo žmogaus sveikatą ir gyvenimo kokybę, sukeldami neįgalumą ar ankstyvą mirtį [1–3].

Siekiant išvengti sąnarių pažeidimų, neįgalumo ir nemalonių ligos padarinių, labai svarbu nedelsiant diagnozuoti ligą bei taikyti veiksmingą gydymą. Ankstyvas gydymas gali pagerinti simptomus bei sulėtinti ligos progresavimą. Geriausių rezultatų pasiekama, kai gydymas pradedamas per 3–6 mėnesius nuo ligos pradžios, tačiau daugumai pacientų diagnozė nustatoma gerokai pavėluotai [4].

Tam, kad diagnostika būtų ankstyva, greita ir tiksli, reikalingi patikimi biožymenys bei rezultatų rodikliai [5]. Atradus stiprų reumatoidinio faktoriaus (RF) ryšį su RA prasidėjo svarbus autoimuninių ligų imuninių biožymenų kūrimo etapas. Neseniai RA pacientams nustatytas antikūnus, atpažįstančius citrulinintus baltymus bei peptidus (ACPA), įskaitant antikūnus prieš ciklinius citrulinintus

peptidus (anti-CCP), buvo sukurti komerciniai ACPA/CCP testai, pasižymintys geresnėmis charakteristikomis, palyginti su RF. Šis RA specifinis biožymuo padėjo gerinti diagnostikos tikslumą [6].

Esant ACPA, suaktyvėja citokinų veikla, todėl atsiranda imuninės sistemos sukeltų audinių ir organų pokyčių. Tai savo ruožtu skatina pacientams būdingų RA simptomų, įskaitant skausmą, uždegimą ir ribotus sąnarių judesius, atsiradimą. Todėl patikimas ir ankstyvas ACPA nustatymas yra labai svarbus ankstyvai diagnozei, nes ACPA teigiamą rezultatą turintiems pacientams eroziniai sąnarių pokyčiai išsivysto ir anksčiau, ir didesniu mastu, todėl reikia skubiai pradėti gydymą [7].

Kadangi RA yra ne tik autoimuninė, bet ir lėtinė uždegiminė liga, ja sergant padaugėja įvairių uždegiminių veiksnių, kurie prisideda prie ligos eigos. Patvirtinta, kad didėja ūminės fazės uždegiminio baltymo – C reaktyviojo baltymo koncentracija. Tačiau iki šiol nedaug žinoma apie reumatoidinio artrito ligonių anti-CCP sąsajas su uždegiminiais baltymais serume: ar anti-CCP gali būti susijęs su tam tikrų uždegiminių baltymų koncentracijų padidėjimu / su-

mažėjimu ar netgi atsiradimu? Svarbu tai išsiaiškinti, siekiant tobulinti autoimuninių ligų diagnostiką ir susidaryti aiškesnę patogenezę vaizdą.

TYRIMO TIKSLAS

Nustatyti reumatoidinio artrito žymens – antikūnų prieš ciklinį citrulinintą peptidą (anti-CCP), bei uždegiminių serumo baltymų galimas tarpusavio sąsajas.

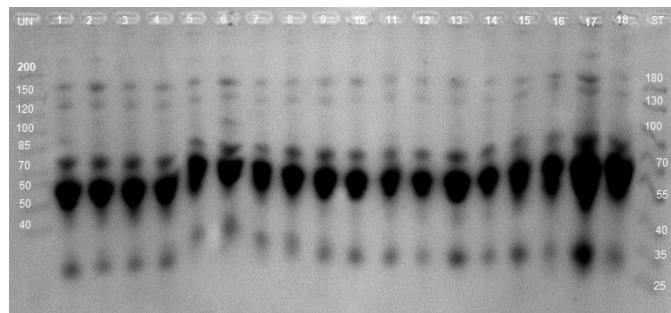
TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Tirti ir analizuoti 30 pacientų, sergančių RA, duomenys. Tiriamųjų amžius nuo 32-ųjų iki 87-ųjų metų (vidurkis – $57,5 \pm 14,9$ m.). Moterų amžiaus vidurkis lygus $55,8 \pm 14,6$ metų, vyrų – $66,2 \pm 15,5$ metų. Siekiant nustatyti, kurie pacientai turėjo anti-CCP antikūnų, atlikta imunofermentinė analizė pasitelkiant „Phadia 250“ analizatorių, kuriame pritaikytas EliA CCP fluoroimunofermentinis kiekybinis metodas. Toliau buvo atliekamas serumo baltymų frakcijų nustatymas agarozės gelio elektroforezės būdu, naudojant 12 % poliakrilamidinį gelį bei 5 % agarozės gelį. Dešimt tiriamųjų, kuriems nustatytas neigiamas anti-CCP tyrimo rezultatas, pasirinkti kaip kontrolinė grupė.

REZULTATAI

Serumo baltymų frakcijų nustatymas agarozės gelio elektroforezės būdu, esant teigiamiems anti-CCP rezultatams

Trisdešimt serumo mėginių, kuriuose aptiktas anti-CCP kiekis, viršijantis pamatines biologines vertes (>10 U/ml), buvo naudojami baltymų frakcijoms stebėti atliekant tyrimą agarozės gelio elektroforezės būdu ir palyginti su 10 kontrolinių serumų, kuriuose aptiktas anti-CCP kiekis neviršijo nurodytų pamatinių biologinių verčių slenksčio (<7 U/ml). Visose frakcijose aptiktų baltymų molekulinės masės buvo 190 kDa, 140 kDa, 75 kDa, 60 kDa ir 35 kDa (1 pav.).



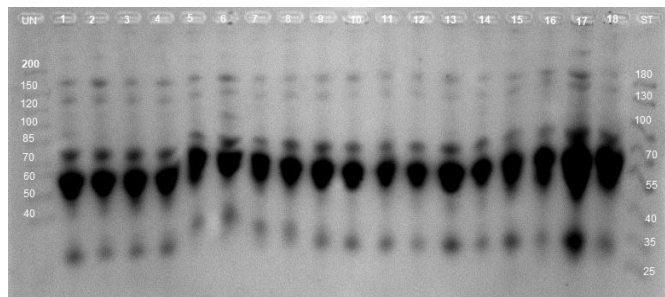
1 pav. Agarozės gelio elektroforezės rezultatai:

1–15 takeliai – serumas pacientų, kuriems nustatytas teigiamas anti-CCP rezultatas; 16–18 takeliai – serumas kontrolinių pacientų, kuriems nustatytas neigiamas anti-CCP kiekis; UN ir ST – baltymų molekulinės masės standartai

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis results: lanes 1–15 – serum patients with a positive anti-CCP result; lanes 16–18 – control patients serum with negative anti-CCP levels; UN and ST are protein molecular weight standards

Didžiausia baltymų koncentracija – ties 60 kDa, o mažiausia – ties didžiausiomis molekulinėmis masėmis, t. y. 190 bei 140 kDa. Nustatyta, kad tarp kontrolinių pacientų frakcijose pastebimo baltymo, esančio ties 60 kDa, raiška yra didesnė nei pacientams, kuriems nustatytas teigiamas anti-CCP rezultatas.

Atliekant elektroforezę pastebėti ir išryškėję pavieniai baltymai atskirose frakcijose (2 pav.). Paciento serumo mėginyje (1 frakcija), kuriame buvo nustatytas teigiamas anti-CCP rezultatas, pastebėtas ~90 kDa fragmentas. Taip pat dar vienam pacientui (6 frakcija), kuriam nustatytas teigiamas anti-CCP, matomas baltymas ties 110–118 kDa, o paciento serume, kuris buvo pasirinktas kaip kontrolinis mėginys, >200 kDa fragmentas.



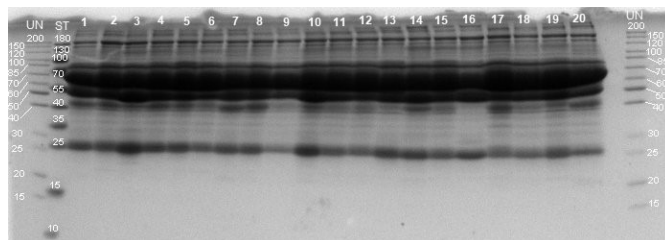
2 pav. Agarozės gelio elektroforezės rezultatai: frakcijose aptikti pavieniai baltymai (1, 6 ir 17 serumo mėginiai)

Fig. 2. Results of agarose gel electrophoresis: fractions of single proteins (serum samples 1, 6 and 17)

Serumo baltymų frakcijų nustatymas NDS-PAGE gelio elektroforezės metodu, esant teigiamiems anti-CCP rezultatams

Trisdešimties pacientų, kurių nustatytos anti-CCP koncentracijos viršijo pamatinių biologinių verčių intervalus (teigiami anti-CCP rezultatai), ir 7 kontrolinių pacientų, t. y. kurių anti-CCP vertės neviršijo pamatinių biologinių verčių intervalų, kraujo serumo mėginiai buvo frakcionuoti ir NDS-PAGE gelio elektroforezės metodu.

Pirmuose 20 tiriamųjų serumų baltymų, kurie buvo aptinkami visose frakcijose, molekulinės masės varijavo nuo 25 kDa iki virš 200 kDa (3 pav.). Pacientų serumo

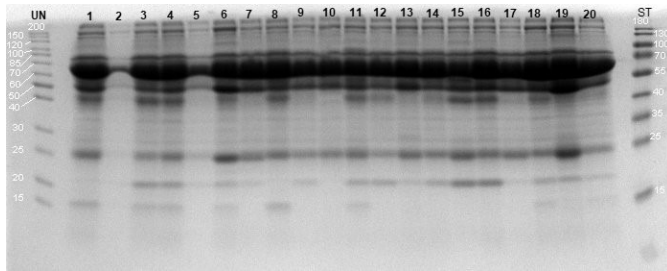


3 pav. NDS-PAGE gelio elektroforezės rezultatai: 1–16 mėginiai – serumas pacientų, kuriems nustatytas teigiamas anti-CCP rezultatas; 17–20 mėginiai – kontrolinių pacientų serumas; UN ir ST – baltymų molekulinės masės standartai

Fig. 3. Results of NDS-PAGE gel electrophoresis: 1–16 serum samples with positive anti-CCP result; 17–20 samples – serum of control patients; UN and ST are protein molecular weight standards

baltymų frakcijose pastebėtas tam tikrų baltymų, kurių molekulinės masės – 25 kDa, 42 kDa, 55 kDa, 60–70 kDa, 85 kDa, 180 kDa, koncentracijos padidėjimas. Didžiausia baltymų koncentracija – ties 60–70 kDa molekulinės masės baltymais, o mažiausia – baltymų, kurių molekulinė masė varijavo nuo 30 kDa iki 40 kDa. Pastebėta, kad pacientų, kuriems nustatytas anti-CCP kiekis neviršijo pamatinių biologinių verčių intervalo, baltymo, esančio ties 60–70 kDa, raiška didesnė nei pacientų, kuriems nustatytas teigiamas anti-CCP rezultatas.

Vertinant pavienius atskirus atvejus, 3, 10, 13, 14 ir 16 frakcijose, kuriose buvo pacientų serumo mėginiai su teigiamais anti-CCP rezultatais, pastebėta didesnė 25 kDa molekulinės masės baltymo koncentracija. Tai sudaro 31,25 % (5/16) visų pacientų, turinčių teigiamą anti-CCP rezultatą. Taip pat žymesnis koncentracijos padidėjimas matomas ir ties 42 kDa dydžio baltymu 7, 8, 14 frakcijose, kuriose buvo pacientų serumai su teigiamais anti-CCP rezultatais (t. y. 18,75 %, arba 3/16), bei 17 ir 20 frakcijose, kuriose buvo pacientų serumai su neigiamais anti-CCP rezultatais. Labai maži 42 kDa molekulinės masės baltymo kiekiai (12,5 %, arba 2/16) pastebėti 9 ir 16 frakcijose.



4 pav. Serumo baltymų NDS-PAGE gelio elektroforezė: 1–15 bei 19 ir 20 mėginiai – serumas pacientų, kuriems nustatytas teigiamas anti-CCP rezultatas; 16–18 mėginiai – kontrolinių pacientų; UN ir ST – baltymų molekulinės masės standartai

Fig. 4. NDS-PAGE gel electrophoresis of serum proteins: 1–15, 19, 20 serum samples with positive anti-CCP result; 16–18 samples – serum of control patients; UN and ST are protein molecular weight standards

Dvidešimties tiriamųjų elektroforezės rezultatai skirtingi nuo prieš tai aptartų pacientų (4 pav.). Baltymų molekulinės masės visose frakcijose varijavo nuo 15 kDa iki >200 kDa. Pacientų serumo baltymų frakcijose pastebėtas koncentracijos padidėjimas tam tikrų baltymų, kurių molekulinės masės išliko panašaus dydžio, kaip ir prieš tai 20 nagrinėtų pacientų, t. y. 25 kDa, 42 kDa, 50–55 kDa, 60–70 kDa, 85 kDa, 116 kDa, 180 kDa. Didžiausią koncentraciją (kiekį) turi baltymai, kurių dydžio variacija yra tarp 60–70 kDa, o mažiausią – baltymai, kurių molekulinė masė varijuoja nuo 30 kDa iki 40 kDa. Pastebėta, kad pacientų, kuriems nustatytas anti-CCP kiekis neviršijo pamatinių biologinių verčių intervalo, baltymo, esančio ties 60–70 kDa, raiška didesnė nei pacientų, kuriems nustatytas teigiamas anti-CCP rezultatas.

Įvertinant atskirus atvejus, šiame elektroforezės gelyje frakcionavosi ir mažesnio dydžio, t. y. 15 kDa, baltymai, kurie užfiksuoti teigiamo anti-CCP rezultato frakcijose, tačiau

jų kiekiai nėra dideli. Taip pat aptikta ir 20 kDa baltymų, kurių nebuvo pirmiau aptartame gelyje, o 1, 6 ir 19 takeliuose – didesnės koncentracijos baltymų, kurių molekulinė masė ~25 kDa (3/17, arba 17,6 %). Didesnė 42 kDa baltymo koncentracija nustatyta ties 1, 3, 4, 8, 11, 15 frakcijomis su teigiamais anti-CCP rezultatais (6/17, arba 35,3 %) bei 16 frakcija su neigiamu anti-CCP rezultatu. Serumo 2 ir 3 frakcijos turėjo tik kelis išsifrakcionavusius baltymus. Didesnė variacija tarp baltymų pastebėta <20 kDa.

REZULTATŲ APTARIMAS

Reumatoidinis artritas, kaip labiausiai paplitusi sąnarius pažeidžiančios autoimuninės ligos forma, tapo pagrindine ir besivystančia paradigma, padedančia suprasti imuninių ligų patogenezę ir sukurti veiksmingą gydymą. Ypač prie to prisidėjo biožymens – antikūnų prieš ciklinį citrulinintą peptidą atradimas, kuris pagerino diagnostikos tikslumą – prieš tai plačiau naudoto reumatoidinio faktoriaus specifiskumas siekia tik ~86 %, o anti-CCP šiuo atveju turi didesnę specifiskumą, t. y. >95 % [6]. Šio autoantikūno nustatymas prisideda prie ankstyvos diagnozės ir veiksmingesnio gydymo, kas gali padėti užkirsti kelią dideliems sąnarių pažeidimams ir užtikrinti geresnius rezultatus ilgalaikėje perspektyvoje [5].

Siekiant nustatyti, ar yra galima anti-CCP sąsaja su uždegiminiais baltymais, atlikta agarozės gelio elektroforezė, kurios metu frakcionuota 30 serumo mėginių, esant teigiamam anti-CCP rezultatui, bei 10 serumo mėginių, kurių anti-CCP rezultatas neigiamas (kontroliniai mėginiai). Plačiau publikuojamų mokslinių tyrimų, kurių metu RA ligonių kraujo serumas tiriamas pasitelkiant agarozės gelį, neaptikta, todėl neabejotinas šio darbo mokslinis naujumas. Didžiausia baltymų koncentracija pastebėta ties ~67–70 kDa – šią molekulinę masę turi albuminas, kuris yra gausiausias baltymas žmogaus organizme. Tačiau didesnė albumino raiška pastebima frakcijose, kuriose buvo kontrolei pasirinktų pacientų serumas – tai yra neigiamas anti-CCP rezultatas. Galima spręsti, kad albumino raiška buvo šiek tiek sumažėjusi sergančiųjų RA serumo frakcijose, galimai dėl lėtinio uždegimo, kuris turi įtakos baltymų sintezei bei medžiagų apykaitai [8]. Matoma ir baltymų raiška ties 75 kDa – tokio dydžio yra ne vienas serume aptinkamas baltymas, pvz. transferinas, serumo amiloidas A ar kiti ūminės fazės baltymai. Galima spręsti, kad tokia ūminės fazės baltymų raiška atsiranda dėl organizmo atsako į uždegimą, kai vertiname RA pacientų serumą, o kontrolinių pacientų atveju galime spėti, kad toje vietoje labiau aptinkamas transferinas. Vertinant pavienius baltymus atskirose frakcijose, 1 frakcijoje (teigiamas anti-CCP rezultatas) pastebėtas 90 kDa baltymas, kuris galėtų būti komplemento komponento C3 fragmentas C3d. Sergant RA būdinga komplemento kaskados aktyvacija, kurios metu C3 suskaldomas į smulkesnius fragmentus [9]. Kitoje, 6 frakcijoje (teigiamas anti-CCP rezultatas) pastebimas baltymas ties 110–118 kDa. Tokios molekulinės masės yra CRB pentamerai, kurie yra ūminės fazės baltymai. Padidėję šio baltymo kiekiai yra uždegiminiai žymenys, nustatomi RA pacientams [10].

Dėl galimos anti-CCP sąsajos su uždegiminiais baltymais atlikta ir NDS-PAGE gelio elektroforezė. Neigiamo

anti-CCP rezultato mėginiai pasirinkti kaip kontroliniai. Kaip ir naudojant agarozės gelį, didžiausias baltymų kiekis aptiktas ties 60–70 kDa, kas patvirtina tendenciją dėl albumino – pastebėta šio baltymo didesnė raiška tų pacientų serume, kurių anti-CCP rezultatas buvo neigiamas. Zainab ir bendraautorai [11] savo tyrime pastebėjo didelę 68 kDa baltymo raišką, tačiau paties baltymo neįvardijo, tik paminėjo, kad prieš jį pastebėta antikūnų sintezė. Jahangir ir kt. [12] taip pat patvirtino didesnę 67 kDa baltymo raišką ir įvardijo, kad tai yra albuminas, kuris, kaip jau minėta, yra gausiausias baltymas serume, tačiau nepastebėjo jokio skirtumo tiek tarp pacientų, kuriems nustatytas teigiamas anti-CCP rezultatas, tiek tarp pacientų, kurie turėjo neigiamą atsaką. Mokslininkai nustatė didesnę baltymo raišką ties 50 kDa, kaip ir mūsų tyrime, tačiau autoriai šį pokytį aptiko pacientams, kurie serga reumatoidiniu artritu, o mūsų atliktame tyrime raiška pastebėta tiek sergantiems, tiek kontroliniams pacientams [11]. Baltymai, kurių molekulinė masė yra 50 kDa – sunkiosios imunoglobulinų grandinės, kurios paprastai yra tiek sveikų, tiek sergančių asmenų serume, tik gali skirtis kiekiai [13]. Kiti tyrėjai – Van Steendam ir bendraautorai [14] teigė, kad ties tokia molekuline mase galima pastebėti fibrinogeno izoformą, tačiau necitrulinintą jo formą, tiek sveikų žmonių serume, tiek sergančių RA, o tai irgi gali būti susiję su mūsų elektroforezės rezultatais. Ties 20–25 kDa molekuline mase pastebime IgG lengvasias grandines, kurios aptiktos tiek kontrolinių, tiek reumatoidinio artrito pacientų serume. Tai koreliuoja su kitų autorių rezultatais [13]. Ties 116 kDa juostele dažnai aptinkamas fibrinonektinas arba, tiksliau, kažkuri jo izoforma, kuri yra jungiamojo audinio baltymas, pastebimas tiek sveikiems, tiek sergantiems asmenims – šio baltymo raiška nustatyta visuose serumuose, kas sutapo su kitų autorių pateiktais elektroforezės rezultatais [13]. Taip pat pastebėta ir 151 kDa molekulinės masės ceruloplazmino raiška, kuri būdinga tiek kontrolinių, tiek sergančių RA pacientų serume. Hu ir kiti [15] patvirtino šio baltymo buvimą atlikę su RA susijusių 55 straipsnių metaanalizę. Mūsų elektroforezės duomenys rodo, kad pacientams, kuriems įtartas reumatoidinis artritas ir buvo teigiami anti-CCP rezultatai, išryškėjo baltymai, kurių molekulinė masė 15 kDa. Tokią masę turi serumo amiloidas A. Prieš tai minėti mokslininkai [15] patvirtino serumo amiloido A buvimą ligonių serume, išanalizavę du su RA susijusius straipsnius, kuriuose paminėta šio baltymo raiška. Serumo amiloidas A yra ūminės fazės baltymas, kurio sintezė bei raiška padidėja esant uždegiminėms reumatinėms ligoms ir tai galima pastebėti atliekant elektroforezę, o sveikiems individams baltymo kiekiai yra normalūs. Serumo amiloidas A yra jautresnis žymuo nei CRB esant nedideliame uždegime [16]. Galime spręsti, kad šie uždegiminiai baltymai sukelia organizmo apsauginę reakciją, į kurią įsitraukia imuninė sistema, gamindama antikūnus kaip atsaką, kas šiuo atveju galėtų būti ir anti-CCP autoantikūnai, todėl įmanoma anti-CCP sąveika su serumo amiloido A baltymais.

Apibendrinant rezultatus pasakytina, kad tiek agarozės gelio, tiek NDS-PAGE gelio elektroforezės būdu pastebėti didesni albumino kiekiai pacientams, kuriems nustatytas

neigiamas anti-CCP rezultatas. Nors atliekant agarozės gelio elektroforezę pastebėti pavieniai uždegiminiai baltymai atskirose frakcijose, tačiau naudojant NDS-PAGE gelį tokių baltymų neaptikta. NDS-PAGE gelio elektroforezės rezultatai parodė, kad RA pacientams, turintiems teigiamą anti-CCP rezultatą, aptikta serumo amiloido A raiška, kurios nepastebėta atliekant agarozės gelio elektroforezę. Šiuo atveju galime įžvelgti NDS-PAGE gelio elektroforezės metodu nustatytą galimą antikūnų prieš ciklinį citrulinintą peptidą sąsają su ūminės fazės baltymais (serumo amiloidu A). Tačiau, kad galėtume visiškai patvirtinti šią sąsają, reikėtų atlikti išsamesnius tyrimus – surinkti didesnę pacientų imtį, daryti daugiau pakartojimų, įtraukti ir tikslesnius tyrimus, pvz. masių spektrometriją, skysčių chromatografiją-masių spektrometriją.

IŠVADOS

Agarozės gelio elektroforezės metodu atlikus serumo baltymų frakcionavimą, nenustatyta galimos anti-CCP sąsajos su serume esančiais uždegiminiais baltymais, tačiau RA sergantiems pacientams buvo rasti mažesni albumino kiekiai, palyginti su kontroline grupe. Atlikus serumo baltymų frakcionavimą NDS-PAGE gelio elektroforezės metodu, pastebėta galima anti-CCP sąsaja su ūminės fazės uždegiminiu baltymu – serumo amiloidu A.

Gauta: 2024 11 20

Priimta spaudai: 2024 11 29

Summary

STUDY OF THE ASSOCIATION OF ANTI-CYCLIC CITRULLINATED PEPTIDE ANTIBODIES WITH INFLAMMATORY PROTEINS IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS

Gabija Mončiūtė, Megė Černiauskienė, Loreta Bagdonaitė

Aim of the study – to identify the possible association between rheumatoid arthritis markers – antibodies against cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) and inflammatory serum proteins.

Material and methods. A group of 30 patients with rheumatoid arthritis (average age of the subjects – 57.5 ± 14.9 years) was studied and analyzed. Determination of the concentration of antibodies against cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) was performed by immunoenzymatic analysis. Agarose gel electrophoresis and NDS-PAGE gel electrophoresis were performed to assess fractionations of serum proteins and anti-CCP possible association to inflammatory proteins. 10 subjects' blood serum samples with a negative anti-CCP test result were selected as the control group.

Results. Agarose gel electrophoresis fractionation of serum proteins showed a lower expression of the 60 kDa protein in anti-CCP-positive patients compared with anti-CCP-negative controls. Single proteins of ~90 kDa, 110–118 kDa and above 200 kDa were detected in several fractions (1, 6, 17). SDS-PAGE also detected a lower expression of the 60 kDa protein in anti-CCP-positive patients. Higher protein variation below 20 kDa was detected. In fractions containing serum from anti-CCP-positive patients, a smaller protein size (15 kDa) was observed.

Conclusions. Agarose gel electrophoresis showed no anti-CCP link to inflammatory proteins; NDS-PAGE gel electrophoresis showed a possible anti-CCP association to the acute-phase inflammatory protein – serum amyloid A.

Keywords: rheumatoid arthritis, antibodies, cyclic citrullinated peptide, serum proteins, inflammatory proteins.

LITERATŪRA

1. Filippucci E, Cipolletta E, Mashadi Mirza R, Carotti M, Giovagnoni A, Salaffi F, et al. Ultrasound imaging in rheumatoid arthritis. *Radiol Med*. 2019 Nov; 124(11): 1087–100.
2. Alpizar-Rodriguez D, Finckh A. Is the prevention of rheumatoid arthritis possible? *Clin Rheumatol* 2020 May; 39(5): 1383–9.
3. Zhou S, Huang G. Some important inhibitors and mechanisms of rheumatoid arthritis. *Chem Biol Drug Des* 2022 Jun; 99(6): 930–43.
4. Karami J, Aslani S, Jamshidi A, Garshasbi M, Mahmoudi M. Genetic implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis; an updated review. *Gene* 2019 Jun 20; 702: 8–16.
5. de Brito Rocha S, Baldo DC, Andrade LEC. Clinical and pathophysiologic relevance of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Advances in Rheumatology* 2019 Jan 17; 59(1): 2.
6. Daikh DI. Rheumatoid arthritis: Evolving recognition of a common disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2022 Mar; 36(1): 101740.
7. Iyengar Karthikeyan P, Vaish A, Nune A. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody (ACPA) and Rheumatoid arthritis: Clinical relevance. *J Clin Orthop Trauma* 2021 Dec 1; 24: 101729.
8. Kaplan H, Cengiz G, Şaş S, Eldemir YÖ. Is the C-reactive protein-to-albumin ratio the most remarkable simple inflammatory marker showing active disease in patients with axial spondyloarthritis, psoriatic arthritis, and rheumatoid arthritis? *Clin Rheumatol* 2023 Nov; 42(11): 2959–69.
9. Ramanathan S, Srinivas CN, Ramanathan S, Srinivas CN. Serum Protein Electrophoresis and Its Clinical Applications. In: *Biochemical Testing – Clinical Correlation and Diagnosis* [Internet]. IntechOpen; 2019 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/69537>
10. Pope JE, Choy EH. C-reactive protein and implications in rheumatoid arthritis and associated comorbidities. *Semin Arthritis Rheum* 2021 Feb; 51(1): 219–29.
11. Zainab B, Ullah A, Tanveer Z, Umar M, Bugti F, Na-eem M, et al. Serologic Detection Of Proteins Associated With Rheumatoid Arthritis Patients By Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Sds-Page). *International Journal of Biology and Biotechnology* 2017 Jan 1; 14: 11–5.
12. Jahangir S, John P, Bhatti A, Aslam MM, Mehmood Malik J, Anderson JR, et al. LC-MS/MS-Based Serum Protein Profiling for Identification of Candidate Biomarkers in Pakistani Rheumatoid Arthritis Patients. *Life (Basel)* 2022 Mar 21; 12(3): 464.
13. Kim CW, Cho EH, Lee YJ, Kim YH, Hah YS, Kim DR. Disease-specific Proteins from Rheumatoid Arthritis Patients. *J Korean Med Sci* 2006 Jun; 21(3): 478–84.
14. Van Steendam K, Tilleman K, De Ceuleneer M, De Keyser F, Elewaut D, Deforce D. Citrullinated vimentin as an important antigen in immune complexes from synovial fluid of rheumatoid arthritis patients with antibodies against citrullinated proteins. *Arthritis Res Ther* 2010; 12(4): R132.
15. Hu C, Dai Z, Xu J, Zhao L, Xu Y, Li M, et al. Proteome Profiling Identifies Serum Biomarkers in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 2022; 13: 865425.
16. Zhou J, Dai Y, Lin Y, Chen K. Association between serum amyloid A and rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum* 2022 Feb; 52: 151943.