

IDENTIFICAREA ȘI CUANTIFICAREA CERAMIDEI ȘI CITRULINEI DIN LICHIDUL ARTICULAR AL PACIENȚILOR CU POLIARTRITĂ REUMATOIDĂ

Coziana Ciurtin¹, Mădălina Cojocaru², Florența Andrei³, V. Stoica¹

¹Catedra de Medicină Internă și Reumatologie, Spitalul „Dr. I. Cantacuzino“, București

²Institutul de Biologie și Patologie Celulară „N. Simionescu“, București

³Spitalul Clinic Găești

Rezumat

Introducere: Se acceptă, în prezent, faptul că una dintre caracteristicile definitorii ale procesului patologic din poliartrita reumatoidă (PR) constă în proliferarea excesivă fibroblastică. Studii extrem de recente au demonstrat implicarea ceramidei în semnalizarea apoptotică și în inducerea morții celulare programate în culturile de sinoviocite. De asemenea, se cunoaște caracterul specific al citrulinării substraturilor peptidice în diagnosticul bolii.

Material și metodă: Folosind metoda spectroscopiei de rezonanță magnetică a protonului ne-am propus analiza comparativă a concentrației ceramidei și citrulinei din lichidul sinovial în PR comparativ cu artroza, cu scopul argumentării acestor date recente.

Rezultate: Analiza statistică cantitativă a celor doi metaboliți din lichidul articular a evidențiat concentrația crescută a citrulinei și ceramidei la pacienții cu PR.

Concluzii: Identificarea unei concentrații specific crescute a ceramidei și citrulinei poate constitui un marker diagnostic al lichidului sinovial din PR și poate oferi explicații pertinente legate de patogenia bolii.

Cuvinte cheie: ceramidă, citrulină, lichid sinovial, poliartrită reumatoidă

Abstract

Ceramide and citrulline in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients

Introduction: It is generally accepted that one of the most important characteristics of pathological process implicated in rheumatoid arthritis (RA) is the excessive fibroblastic proliferation. Recently, different studies have shown the implication of ceramide in apoptotic signalization and in programmed death induction in cultured synoviocytes. It is also recognized the important role of citrullination of different peptides in the pathogenesis of the disease.

Material and method: We have assessed the concentration of ceramide and citrulline in synovial fluid samples collected from RA and osteoarthritic patients, using magnetic resonance spectroscopy method in order to sustain these theories.

Results: The quantitative analysis of synovial fluid has shown the statistically significant increased concentration of citrulline and ceramide in RA synovial samples.

Conclusion: Identification of a specific increased concentration of citrulline and ceramide could be a diagnostic marker for RA and could offer explanations regarding the complex pathogenesis of the disease.

Key words: ceramide, citrulline, synovial fluid, rheumatoid arthritis

INTRODUCERE

După cum se cunoaște până în prezent, poliartrita reumatoidă (PR) implică la nivel histologic o hiperplazie a sinovialei, care este însoțită de producția excesivă a numeroaselor citokine inflamatoare de către celulele sinoviale. Acestea, la rândul lor, par a fi elemente *trigger* ale hiperplaziei sinoviale, precum și inductoare ale distrugerii tisulare, mediate enzimatic. Studii recente încearcă să testeze posibilitatea de a folosi diferite terapii care să influențeze proliferarea necontrolată a sinovialei din PR (1).

Ceramida este un derivat lipidic care intră în compoziția numeroaselor tipuri celulare, fiind identificată în mediul înconjurător celular de la nivelul variatelor tipuri de țesuturi. Proliferarea marcată celulară din PR

a ridicat de mai mult timp suspiciunea existenței unui defect al procesului de apoptoză (2). Se cunoaște în prezent faptul că modificările celulare apoptotice sunt mult mai frecvente în PR în comparație cu alte boli, precum artroza sau în comparație cu țesutul sinovial normal (3, 4). Activarea apoptozei prin intermediul ceramidei este un efect al citokinelor inflamatoare, a căror prezență la nivelul articulației inflamate reprezintă o constantă a bolii. Rolul deosebit de complex al TNF α este dovedit prin implicarea sa în numeroase procese de la nivelul organismelor vii, precum neoplaziile, șocul septic, cașexia, inflamația, autoimunitatea și vindecarea rănilor (5). Mecanismele prin care se realizează acțiunea sa la nivel celular nu sunt deplin elucidate până în prezent. Una dintre căile sale de acțiune este mediata de producerea ceramidei (6, 7).

Ceramida este un produs de hidroliză a sfinngomielinei, sub acțiunea sfinngomielinazei. Cuantificarea apoptozei se apreciază în funcție de activitatea sfinngomielinazei acide și neutre, glicozilceramid sintetazei, sfinngomielin sintetazei și ceramidazei (8). Efectele ceramidei în producerea apoptozei se realizează prin permeabilizarea membranei externe mitocondriale pentru proteine de dimensiuni mici, iar noile ipoteze susțin faptul că există adevărate canale pentru ceramidă, care sunt metastabile (9).

Relativ recent a fost introdusă în cercetarea medicală metoda spectroscopiei de rezonanță magnetică nucleară în scopul caracterizării din punct de vedere biochimic a compoziției fluidelor biologice. Exploatând fenomenul general al rezonanței magnetice a protonului, metoda dă posibilitatea atribuirii univoce a semnalelor de rezonanță a diferitelor specii de atomi de hidrogen din diferite structuri chimice și astfel creează premisele cuantificării prezenței metaboliților care conțin hidrogen din compoziția lichidului sinovial.

MATERIALE ȘI METODE

Studiul nostru și-a propus identificarea și cuantificarea comparativă a metaboliților din lichidul sinovial al pacienților cu PR și artroză, folosind în acest scop eșantioane obținute prin artrocenteză de la 22 de pacienți cu PR și 18 cu artroză.

Probele au fost analizate imediat pentru determinările biochimice, imunologice și de celularitate uzuale, iar pentru cele de tip spectrometrie de rezonanță magnetică nucleară după refrigerare prealabilă (la maximum 3 zile de la recoltare). Toate spectrele au fost înregistrate la frecvența de 400 MHz, frecvența de rezonanță a protonului și au putut fi identificați următorii compuși: glutamină, treonină, lactat, hidroxi-butirat, glicină, dimetil-amină și lipoproteine asociate acizilor grași, precum și fracțiuni ale colesterolului. Scopul principal al studiului a constat în analiza

comparativă a concentrației ceramidei și citrulinei în lichidul sinovial din cele două patologii.

Am folosit ca referință a deplasărilor chimice, semnalul TSP la $\delta = 0$ ppm (semnal extern) și ca referințe interne semnalele protonilor din structura alaninei ($\delta = 1,487$ ppm), lactatului ($\delta = 1,33$ ppm) și valinei ($\delta = 1,05$ ppm).

REZULTATE

Analiza biochimică, imunologică și de celularitate a demonstrat caracteristicile lichidului sinovial din cele două boli, care reies din tabelul 1.

În corelație cu datele din literatura de specialitate, am emis ipoteza posibilității de a evidenția prezența individualizată a unor compuși lipidici, precum ceramida, al cărei semnal pare a se detașa din spectrul global al CH₂ lipidelor, atribuție de semnal care nu a fost realizată în prezent la nivelul lichidului articular sau a altui fluid biologic.

Toate spectrele analizate au evidențiat semnalele corespondente lanțului terminal acil al acizilor grași (semnalul CH₃-lipidelor), precum și spectrele largi corespunzătoare rezonanțelor grupărilor CH₂ (semnalul CH₂-lipidelor) care sunt generic atribuite chilomicronilor și triacilglicerolilor asociați lipoproteinelor de densitate foarte mică (VLDL).

Probele cu caracter intens inflamator, precum cele din PR și câteva cu artroză, au prezentat semnale atribuibile grupelor de tip colină, asociate LDL, și respectiv HDL fosfolipidelor, prezente la $d = 3,25$ ppm (tabelul 2). Am identificat prezența semnalului citrulinei în toate probele analizate cu diferențe semnificative ale concentrației între cele două boli (figurile 1-3).

DISCUȚII

Experiența clinică a demonstrat de foarte multe ori că analiza biochimică a compoziției lichidului sinovial nu este diagnostică. Există, desigur, numeroase

Tabelul 1
Caracteristici ale compoziției lichidului sinovial din poliartrita reumatoidă și artroză

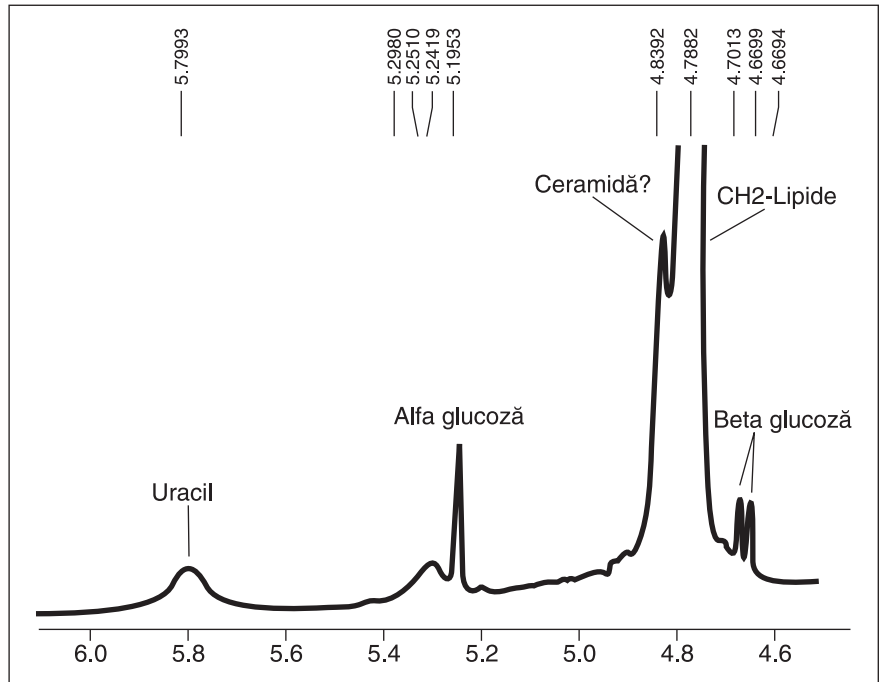
Diagnostic	Poliartrită reumatoidă	Boală artrozică
Glucoză (mg/dl, medie ± SD)	64,2 ± 10,1	112,4 ± 34,2
Colesterol (mg/dl, medie ± SD)	176,9 ± 25,7	63,1 ± 21,6
Lacticodehidrogenază (mg/dl medie ± SD)	354 ± 63,3	278,3 ± 86,3
pH	6,8 ± 0,7	7,3 ± 0,2
Celularitate	Ragocite, PMN, fără celule lupice	Celule epiteliale, rare PMN, celule lupice absente
Factorul reumatoid pozitiv		
Mn (% , 95% CI)	2 (50%, 0,06-0,93)	0
Fn (% , 95% CI)	23 (62,16%, 0,44-0,77)	0
DAS (medie ± SD)	1,8 ± 0,32	0

Tabelul 2

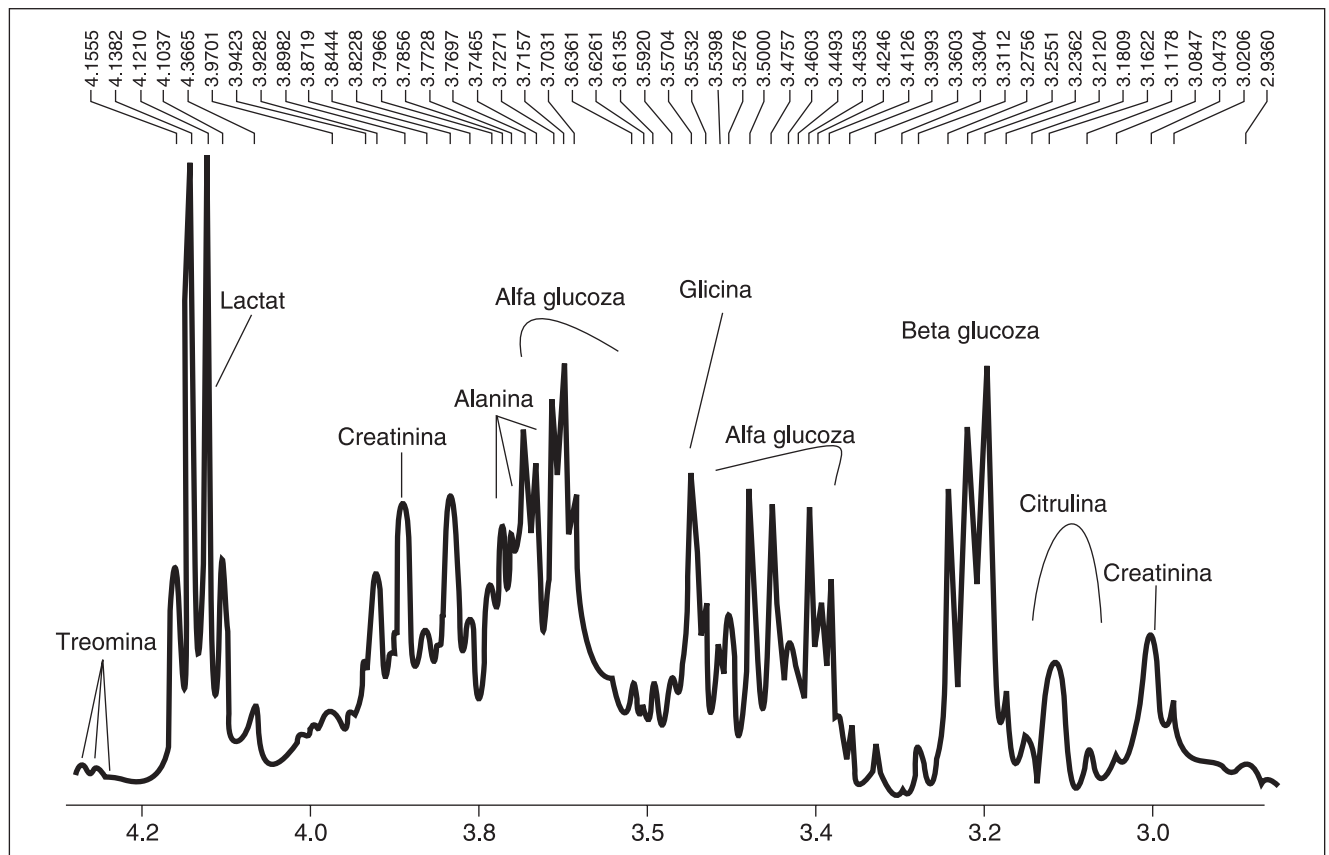
Explicații în text

Denumirea metabolitului	PR mmol/l	Artroză mmol/l	p*
CH2 lipide	24,76 ± 4,85	17,69 ± 2,67	P = 0,048
Ceramida	3,55 ± 0,52	2,87 ± 0,35	P = 0,038
Citrulina	0,65 ± 0,13	0,34 ± 0,092	P = 0,016

*Test t pe eșantioane independente cu distribuție gaussiană

**Figura 1**

Spectru de lichid sinovial din poliartrita reumatoidă – detaliu $\delta = 4.6-6.0$. Se observă semnalele β și α glucozei, CH2-lipidelor, ceramidei și uracilului

**Figura 2**

Spectru de lichid sinovial din poliartrita reumatoidă – detaliu $\delta = 3.0-4.2$. Se observă semnalele β și α glucozei, creatinei, lactatului, treoninei și citrulinei

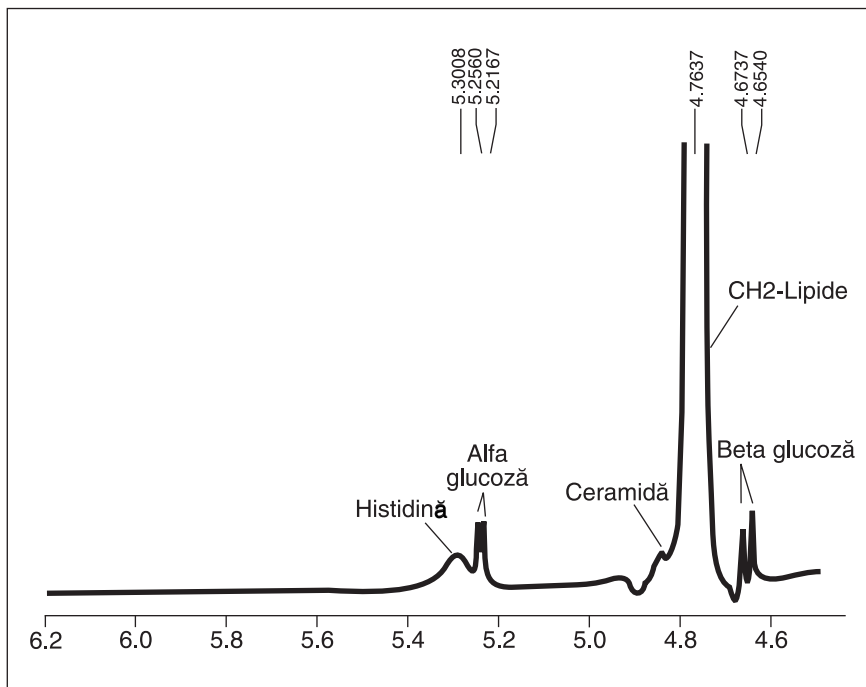


Figura 3
Spectru de lichid sinovial din artroză –
detaliu $\delta = 4.6-6.0$
Se observă semnalele β și α glucozei,
CH₂-lipidelor, ceramidei și histidinei

determinări cu caracter orientativ, care ajută în susținerea sau combaterea unei ipoteze diagnostice. De aceea, ne-am propus în primul rând realizarea unei analize mult mai complexe a compoziției lichidului sinovial, în scopul înțelegerii cât mai profunde a mecanismelor care guvernează diferitele patologii.

Pentru mai multă relevanță am comparat rezultatele obținute în urma analizei biochimice clasice de laborator, care se aplică în mod curent în departamentele de reumatologie a spitalelor, cu cele obținute printr-o tehnică mult mai puțin accesibilă, aflată în prezent în stadiu de cercetare în medicină, dar care are un potențial de explorare imens.

Prezența unor lanțuri mai scurte între componentele moleculare mobile ale lipoproteinelor pot ridica suspiciunea creșterii utilizării lipidelor în cadrul metabolismului intraarticular, în ciuda mediului intens hipoxic, așa cum a mai fost raportat anterior (10).

Extrem de omogen, indiferent de magnitudinea spectrului CH₂ lipidelor (4,78 ppm) identificăm prezența unui peak la 4,81-4,83 ppm, caracteristic semnalului ceramidei în toate probele provenite de la pacienții cu PR și numai în câteva ale pacienților cu artroză. Am putea specula o posibilă corelație cu efectele cunoscute ale ceramidei de inducere a apoptozei la nivelul țesutului sinovial (11, 12), concentrația crescută a acestuia fiind un argument al nivelului crescut al apoptozei celulelor sinoviale întâlnit în PR (13).

Posibilitatea de a detecta prezența citrulinei are o importanță diagnostică foarte mare pentru PR. Studii anterioare (14, 15, 16) deosebit de ample au demonstrat

faptul că citrulina, catalizată de către peptidil-arginin-deiminază, este o modificare posttranslațională a peptidil-argininei la citrulină, care are o implicație extrem de importantă în patologia PR.

Citrulina fibronectinei poate altera interacțiunile existente între fibronectină și receptorii factorilor de creștere, ceea ce pare a avea implicații extrem de importante în perturbarea angiogenezei și apoptozei, evenimente patologice centrale ale PR.

Deși, de cele mai multe ori, variabilitatea fiziologică (17), stadiul bolii, gradul de inflamație articulară, precum și numărul relativ mic de probe analizate, justificat atât de dificultatea obținerii lor, precum și de costurile ridicate ale investigației, nu ne-au dat posibilitatea unui diagnostic de certitudine, valoarea acestei investigații nu poate fi concurată până în prezent de nici o altă metodă de studiu biochimic al fluidelor biologice.

Studiile recente au stabilit faptul că efectele apoptotice ale ceramidei sunt inițiate prin cross-linkarea antigenului Fas și a receptorului pentru TNF α . Aceste date sugerează că ceramida acționează în momente diferite ale turn-over-ului celular, precum și dependent de nivelul de activare a celulei.

Receptorii pentru IL 1 și TNF α , precum și antigenul Fas sunt exprimați la nivelul sinovioцитelor. Deși, stimularea lor în totalitate determină activarea sfinngomielinazei și generarea ceramidei ca mesager secundar, totuși, fiecare exercită efecte diferite asupra celulelor sinoviale (18).

Rolul căii sfinngomielină-ceramidă la nivelul sinovialei reumatoide nu a fost elucidat complet. Este încă

necunoscut modul de a reacționa al celulelor sinoviale la creșterea intracelulară a concentrației ceramidei.

Datele acumulate până în prezent sugerează, precum am menționat, faptul că efectele TNF α și IL 1 sunt mediate prin intermediul ceramidei (19). Multe dintre aceste date reprezintă un argument în favoarea rolului major al acestui mesager lipidic în medierea semnalelor IL1 și a TNF α (20, 21).

Ambele citokine stimulează svingomielinaza și astfel ceramida pare a funcționa ca și mediator pozitiv de creștere a acestor celule. Studiile efectuate au demonstrat însă efectul proapoptotic al ceramidei asupra fibroblaștilor de proveniență umană aflați în cultură (22, 23).

BIBLIOGRAFIE

1. **Guiducci S, Del Rosso A, Cinelli M** – Raloxifene reduces urokinase-type plasminogen activator-dependent proliferation of synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005, 7: 1244-1253.
2. **Baier A, Meineckel I, Gay S** – Apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 2003, 15: 274-179.
3. **Bourbon NA, Sandirasegarane L, Kester M** – Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase C: implications for growth arrest. *J Biol Chem*, 2002, 277: 3286-12892.
4. **Bond MG, Murphy MR, Bennett AC** – Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-independent type II apoptotic pathway. *J Biol Chem* 2002, 277: 13787-13795.
5. **Yazlovitskaya EM, Pelling JC, Persons DL** – Association of apoptosis with the inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase activity in the tumor necrosis factor alpha-resistant ovarian carcinoma cell line UCI 101. *Mol Carcinog*, 1999, 25: 14-20.
6. **Chen HH, Zhao S, Song JG** – TGF-beta1 suppresses apoptosis via differential regulation of MAP kinases and ceramide production. *Cell Death Differ*, 2003, 10: 516-527.
7. **Chigorno V, Giannotta C, Ottico E** – Sphingolipid uptake by cultured cells: complex aggregates of cell sphingolipids with serum proteins and lipoproteins are rapidly catabolized. *J Biol Chem*, 2005, 280: 2668-2675.
8. **Chou CT, Yang JS, Lee MR** – Apoptosis in rheumatoid arthritis: expression of Fas, Fas-L, p53 and Bcl-2 in rheumatoid synovial tissues. *J Pathol*, 2001, 193: 110-116.
9. **Modrak DE** – Measurement of ceramide and sphingolipid metabolism in tumors: potential modulation of chemotherapy. *Methods Mol Med*, 2005, 111: 183-194.
10. **Anishkin A, Sukharev S, Colombini M** – Searching for the molecular arrangement of transmembrane ceramide channels. *Biophys J*, 2007 in press.
11. **Naughton D, Whelan M, Smith EC** – An investigation of the abnormal metabolic status of synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis by high field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *FEBS Lett*, 1993, 317: 135-138.
12. **Mizushima N, Kohsaka H, Miyasaka N** – Ceramide, a mediator of interleukin 1, tumour necrosis factor α , as well as Fas receptor signalling, induces apoptosis of rheumatoid arthritis synovial cells. *Ann Rheum Dis*, 1998, 57: 495-499.
13. **Clair T, Aoki J, Koh E** – Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer Res*, 2003, 63: 5446-5453.
14. **Dyatlovitskaya EV, Kandyba AG** – Role of biologically active sphingolipids in tumor growth. *Biochemistry*, 2006, 71: 10-17.
15. **Barilla M, Carsons SE** – Fibronectin fragments and their role in inflammatory arthritis. *Sem Arthr Rheum*, 2000, 29: 252-265.
16. **Lundberg K, Nijenhuis K, Vossenaar ER** – Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. *Arthr Res Ther*, 2005, 7: 458-467.
17. **Chang X, Yamada R, Suzuki A** – Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatol*, 2005, 44: 40-50.
18. **Damyanovich AZ, Staples JR, Marshall KW** – The effects of freeze/thawing on human synovial fluid observed by 500 MHz 1H magnetic resonance spectroscopy. *J Rheumatol*, 2000, 27: 746-752.
19. **Embade V, Valeron PF, Aznar S** – Apoptosis induced by Rac-GTPase correlates with induction of fasL and ceramide production. *Mol Biol Cell*, 2000, 11, 4347-4358.
20. **Futerman AH, Hannun YA** – The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep*, 2004, 5: 777-782.
21. **Kolettas E, Skoufos I, Kontargiris E** – Bcl-2 but not clusterin/apolipoprotein J protected human diploid fibroblasts and immortalized keratinocytes from ceramide-induced apoptosis: role of p53 in the ceramide response. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 445: 184-195.
22. **Takeshita A, Shinoda H, Nakabayashi Y** – Sphingosine 1-phosphate acts as a signal molecule in ceramide signal transduction of TNF-alpha-induced activator protein-1 in osteoblastic cell line MC3T3-E1 cells. *J Oral Sci*, 2005, 47: 43-51.
23. **Sawai H, Domae N, Okazaki T** – Current status and perspectives in ceramide-targeting molecular medicine. *Curr Pharm Des*, 2005, 11: 2479-2487.

CONCLUZII

Rezultatele studiului nostru aduc informații extrem de importante cu privire la identificarea pentru prima oară a ceramidei din compoziția lichidului sinovial, realizând o relație evidentă cu intensitatea crescută a fenomenului apoptotic, precum și corelarea prezenței citrulinei cu evenimente caracteristice patogeniei PR.

Vizitați *site-ul*

SOCIETĂȚII ROMÂNE DE REUMATOLOGIE

www.srreumatologie.ro