

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA



TEZĂ DE DOCTORAT

**MOLECULE REGLATOARE ÎN BOLI  
AUTOIMUNE**

Doctorand  
**Jude Dana Claudia**

Conducător științific  
**Prof. Dr. Doru Dejica**

**2009**

## CUPRINS

CUPRINS	2
INTRODUCERE	6
PARTEA TEORETICĂ	8
ARTRITA REUMATOIDĂ	9
LUPUSUL ERITEMATOS SISTEMIC	18
SCLEROZA SISTEMICĂ	27
PARTEA SPECIALĂ	37
CAPITOLUL I. MOLECULELE DE ADEZIUNE CELULARĂ SOLUBILE sVCAM, sICAM ȘI sE-Sele ÎN ARTRITA REUMATOIDĂ, LUPUS ERITEMATOS SISTEMIC ȘI SCLEROZA SISTEMICĂ	38
sCAM serice la pacienți cu artrită reumatoidă	40
sCAM serice la pacienți cu lupus eritematos sistemic	59
sCAM serice la pacienți cu scleroză sistemică	75
CAPITOLUL II. INTERLEUKINA 12	92
IL-12 serică la pacienți cu artrită reumatoidă	93
IL-12 serică la pacienți cu lupus eritematos sistemic	102
IL-12 serică la pacienții cu scleroză sistemică	112
CAPITOLUL III. INTERLEUKINA 17	120
IL-17 serică la pacienți cu artrită reumatoidă	122
IL-17 serică la pacienți cu lupus eritematos sistemic	135
IL-17 serică la pacienți cu scleroză sistemică	141
CAPITOLUL IV. CXCL 10	147
CXCL10 serică la pacienți cu artrită reumatoidă	149
CXCL10 serică la pacienți cu lupus eritematos sistemic	158
CXCL10 serică la pacienți cu scleroză sistemică	169
CAPITOLUL V. sCD163	179
sCD163 serică în artrita reumatoidă	182
sCD163 serică în scleroza sistemică	189
CAPITOLUL VI. CORELAȚII RECIPROCE ALE IL-12, IL-17, CXCL10, sCD163 serice	195
CONCLUZII	210
BIBLIOGRAFIE	214

## INTRODUCERE

Bolile autoimune reprezintă un grup aparte al patologiei medicale, în primul rând prin răspândirea lor în diferite domenii ale practicii medicale, de la medicina internă, cu disciplinele ei (reumatologie, hematologie, hepatogastroenterologie, nefrologie) la dermatologie, neurologie și endocrinologie.

Efortul cercetărilor s-a îndreptat îndeosebi spre cunoașterea substratului patogenetic al bolilor autoimune, organospecifice sau sistemice, etiologia fiind încă destul de obscură. În căutarea mecanismelor care implică factori umorali și celulari ai sistemului imun, aceștia s-au înmulțit grație tehnologiei biomoleculare avansate din ultimii ani. O parte din acești factori stau la baza implementării lor în diagnostic și elaborării terapiei imunomodulatoare selective, care a ameliorat eficacitatea medicației actuale și implicit prognosticul bolilor autoimune.

Artrita reumatoidă, lupusul eritematos sistemic și sclerodermia se situează printre cele mai frecvente și redutabile boli autoimune sistemice, fiind consacrate cele mai numeroase studii fundamentale și aplicative.

Domeniul cel mai bine reprezentat în cercetarea consacrată acestor boli este al imunității celulare. Astfel, s-au adus precizări ale rolului unor subseturi limfocitare, celule dendritice și celule natural ucigașe (NK), cum este identificarea recentă a unui nou tip de limfocite T helper (LTh), care se alătură celor două deja bine cunoscute, LTh1 și LTh2, designat LTh17, răspunzător de producția unei noi citokine proinflamatoare, IL-17. Cercetările sunt în desfășurare și se așteaptă stabilirea locului pe care îl ocupă aceste celule imunocompetente, cu producții lor agresivi, în patogeniza bolilor autoimune, fiind sugerată deja perspectiva folosirii acestora ca ținte terapeutice. În momentul de față există un număr mai însemnat de lucrări experimentale decât clinice.

O altă achiziție a ultimilor ani, mai precis a rolului acesteia în bolile autoimune, este citokina chemotactică CXCL10, care atrage LT activate și celulele NK spre țesuturile inflamate, fiind valorificată ca țintă terapeutică cu anticorpii monoclonali aflați recent în trialuri de fază avansată în unele boli autoimune.

O altă moleculă care suscită actualmente un mare interes clinic este CD163, marker al activării alternative a liniei celulare monocit-macrofagice, cu virtuți antiinflamatoare ale porțiunii transmembranale clivată proteolitic și existentă în ser, sCD163.

Interleukina 12 (IL-12) polarizează răspunsul imun tip LTh1 prin inducerea gama-interferonului de către LT, celulele NK și macrofage. Intervenția acestei citokine în bolile autoimune este controversată, având o acțiune duală: proinflamatoare precoce și antiinflamatoare tardivă în artrita reumatoidă, cea din urmă fiind cuplată cu un efect inhibitor asupra angiogenezei, în care este mediată de CXCL10. Pe de altă parte, s-a demonstrat recent că IL-12 participă și la amorsarea mecanismelor patogenetice din bolile autoimune anticorp-dependente, cum sunt lupusul eritematos sistemic și miastenia gravis.

Acestea sunt premisele cercetării interpretate în ultimii doi ani, în care am dozat concentrația serică a IL-12, IL-17, CXCL10 și sCD163 la pacienții cu artrită reumatoidă, lupus eritematos sistemic și scleroză sistemică. Am evaluat comparativ comportamentul acestor molecule la pacienții cu boală recentă și cu evoluție îndelungată, urmărind corelația cu diferite manifestări clinice ale bolii, starea de activitate și severitatea ei, corelația cu markerii serologici imuni și ai inflamației. În fine, am acordat o importanță deosebită corelației dintre cele patru molecule, aspect neabordat până acum.

Deși cuprinsă în primul capitol, preocuparea pentru moleculele de adeziune celulară sVCAM-1, sICAM-1 și sE-Sel a reprezentat un prilej de a efectua și la noi în țară un studiu privind concentrația serică a acestora în cele trei boli autoimune. Importanța dozării acestora este mult comentată în literatură, rezultatele fiind destul de contradictorii.

## CAPITOLUL I

### MOLECULELE DE ADEZIUNE CELULARĂ SOLUBILE sVCAM-1, sICAM-1 ȘI sE-Sel LA PACIENȚI CU ARTRITĂ REUMATOIDĂ, LUPUS ERITEMATOS SISTEMIC ȘI SCLEROZĂ SISTEMICĂ

Moleculele care sunt exprimate pe suprafața membranei celulare și prin cuplarea de un ligand (component de legare) specific cresc activitatea unei celule pentru altă celulă sau pentru un component al matricei extracelulare (ECM), sunt considerate molecule de adeziune celulară (CAM). Interesul pentru aprofundarea cunoștințelor privind CAM a crescut progresiv datorită importanței studiului lor în variate boli: infecțioase, imunologice, neoplazice, cardiovasculare ș.a.

Supernatantul celulelor activate *in vitro* conține sCAM și nu surprinde faptul că serul sau plasma pacienților cu boli imune conține aceste molecule solubile care au fost cuantificate prin teste imunoenzimatică (ELISA), dovedindu-se niveluri crescute în majoritatea cazurilor, începând din 1993 (168). Cel mai mare interes l-au suscitât sCAM aparținând superfamiliei imunoglobulinelor, mai ales sVCAM-1 și sICAM-1, precum și familia selectinelor, îndeosebi selectina E solubilă (sE-Sel).

#### sCAM serice la pacienți cu artrită reumatoidă

**Obiective.** La un an de la evidențierea în 1992 a sCAM în circulația pacienților cu variate stări patologice (186) au fost publicate rezultatele cercetărilor efectuate în AR, constatându-se concentrații ridicate a sVCAM-1 (187, 188) sau ICAM-1 (187, 189, 190) sau valori nemodificate ale sICAM-1 (191) și sE-Sel (192), față de subiecții sănătoși. Investigațiile în această direcție, mai numeroase în ultima decadă, continuate și în prezent (193-215), relevă aceleași neconcordanțe privind atât incidența deviațiilor patologice ale concentrației acestor sCAM cât și corelația cu activitatea bolii, severitatea ei, diferitele manifestări clinico-evolutive și markerii serologici inflamatori/imunologici.

**Pacienți și metodă.** Cercetarea s-a efectuat la 36 de femei și 6 bărbați cu AR. Un lot de 32 de subiecți, donatori de sânge a reprezentat grupul de control. S-a folosit metoda imunoenzimatică (ELISA), cu kituri furnizate de R&D Systems (Abingdon, Anglia)

**Concluzii.** 1. Numai la 9,5% din pacienți nivelul sVCAM-1 era crescut aparținând stadiilor II și III.

2. sICAM-1 serică a înregistrat o medie mai mare decât la normali:  $17,10 \pm 3,27$  ng/ml vs  $12 \pm 2,16$  ng/ml ( $p=0,0001$ ). La 36,6% din pacienți valorile erau peste nivelul maxim de la normali, 81% aparținând stadiilor II și III.

3. sE-Sel serică medie a depășit pe aceea de la normali:  $1,91 \pm 0,44$  ng/ml vs  $1,34 \pm 0,61$  ng/ml ( $p=0,0001$ ), dar la nici un pacient nivelul sE-Sel nu era peste valoarea maximă de la normali.

4. sICAM-1 s-a corelat cu vechimea bolii ( $r=0,427$ ;  $p<0,01$ ).

5. Durata redorii matinale s-a corelat cu nivelele crescute ale sICAM-1 ( $r=0,838$ ;  $p=0,0001$ ).

6. sICAM-1 s-a corelat cu VSH ( $r=0,508$ ;  $p<0,001$ ) iar sE-Sel numai cu valorile cele mai ridicate ale moleculei ( $r=0,427$ ;  $p=0,01$ ). sICAM-1 s-a corelat și cu concentrația serică a CRP ( $r=0,380$ ;  $p=0,01$ ); sVCAM-1 și sE-Sel s-au corelat cu CRP doar la nivelurile înalte ale acestor molecule.

7. Nivelurile ridicate ale sICAM-1 serice s-au corelat cu activitatea bolii, exprimată prin DAS28 ( $r=0,687$ ;  $p=0,001$ ).

#### sCAM serice la pacienți cu lupus eritematos sistemic

**Obiective.** Din 1993 până în 2008 inclusiv s-au efectuat 24 de studii la pacienții cu LES, privind concentrația serică a sCAM care suscită cel mai mare interes: sVCAM-1, sICAM-1 și sE-Sel. Rezultatele sunt discordante ca incidență, nefiind elucidat rolul sau valoarea uneia sau alteia dintre molecule în contextul

patogenetic și diagnostic al bolii. Din lucrările consacrate modificărilor serice ale sVCAM-1, sICAM-1 și sE-Sel la pacienții cu LES majoritatea au găsit concentrații ridicate ale sVCAM-1 (187, 188, 221-232) dar și normale (233, 234). Nivelul sICAM-1 s-a comportat mai puțin constant, pe lângă creșteri ale sale (221, 225, 230, 234-240) s-au constatat frecvente concentrații nemodificate față de sănătoși (187, 191, 222, 223, 226, 228).

Scopul acestei cercetări a fost de a evalua prevalența creșterii concentrațiilor serice ale sVCAM-1, sICAM-1 și sE-Sel la pacienții cu LES, în diferite stadii de evoluție a bolii, activitate sau remisie, cu sau fără asocieri morbide, îndeosebi nefrită lupică, serozită, vasculită, sindrom antifosfolipidic. Totodată, ne-a interesat dacă există modificări clinice distructive la pacienții cu valori crescute ale uneia sau alteia dintre sCAM și dacă aceștia constituie un subgrup cu risc aparte pentru anumite complicații, cu necesitatea unei terapii aparte.

**Pacienți.** Investigațiile au fost efectuate la 40 de femei și 4 bărbați, care au întrunit cel puțin patru criterii diagnostice stabilite de American College of Rheumatology (ACR) pentru diagnosticul LES (27). Grupul de control a fost format de 32 de subiecți, 88% sex feminin, cu vârstă cuprinsă între 23 și 56 de ani, corespunzător majorității pacienților cu LES. Toți erau donatori de sânge, fără afecțiuni care să fie susceptibile de a produce creșteri ale sCAM. Pentru determinare s-a folosit metoda amintită la AR.

**Concluzii.** 1. Concentrația medie a sVCAM-1 serică a fost semnificativ mai mare la pacienți față de normali:  $81,77 \pm 36,93$  ng/ml vs  $44,62 \pm 9,47$  ng/ml ( $p= 0,0001$ ). La 69,9% din pacienți nivelul seric al sVCAM-1 a depășit pe cel maxim de la normali. Șapte din cele mai înalte 10 valori aparțineau pacienților cu LES activ iar 8 din cele mai scăzute 10 valori erau ale pacienților cu boală inactivă.

2. Media concentrației serice a sICAM-1 a fost mai mare la lupici, față de normali dar cu o semnificație statistică mai redusă, comparativ cu sVCAM-1:  $15,58 \pm 4,16$  ng/ml vs  $12,82 \pm 2,16$  ng/ml ( $p= 0,003$ ), numai la 18,2% depășind concentrația maximă a grupului de control.

3. Nivelul seric mediu al sE-Sel nu a înregistrat o creștere față de normali. Doar la 9% din pacienți valorile erau crescute peste nivelul maxim de la normali.

4. Corelația sCAM cu manifestările clinice ale LES s-a dovedit înalt semnificativă în cazul celor 3 sCAM, la cei 16 pacienți cu nefrită, serozită sau vasculită, coeficientul r depășind 0,836 ( $p< 0,0001$ ) iar SLEDAI peste scorul 7 la 88%.

5. sVCAM-1 serică s-a corelat cu VSH ( $r =0,424$ ;  $p< 0,001$ ) și negativ cu C4 ( $r = -0,398$ ;  $p< 0,001$ ). sICAM-1 și sE-Sel s-au corelat cu VSH la concentrațiile ridicate ale moleculei ( $r =0,384$ ;  $p< 0,01$  respectiv  $r =0,466$ ;  $p< 0,001$ ).

6. sVCAM-1 s-a corelat cu activitatea bolii, exprimată de SLEDAI ( $r =0,621$ ;  $p< 0,001$ ), sICAM-1 s-a corelat la limita semnificației statistice ( $r =0,322$ ;  $p< 0,05$ ), iar sE-Sel nu s-a corelat cu SLEDAI.

### **sCAM serice la pacienți cu scleroză sistemică**

**Obiective.** Scopul acestei cercetări a fost să determinăm concentrațiile serice ale sVCAM-1, sICAM-1 și sE-Sel la pacienții cu ScSd, comparativ cu ScSl, să stabilim corelația dintre cele trei sCAM și a nivelurilor acestora cu manifestările clinice, gradul de severitate a bolii și markerii serologici ai inflamației.

**Pacienți și metodă.** Studiul s-a realizat la 34 de pacienți cu ScS, 31 femei și 3 bărbați. Un lot de 27 subiecți donatori de sânge, majoritatea hipertensivi cu vârstă cuprinsă între 23 și 61 de ani, au reprezentat grupul de control, pe care l-am designat „normal”. Metoda de determinare a fost amintită la AR și LES

**Concluzii.** 1. Nivelul seric mediu al sVCAM-1 a fost mai mare decât la normali:  $73,5 \pm 18,9$  ng/ml la pacienții cu ScSd și  $76,2 \pm 23$  ng/ml în ScSl, față de  $49,6 \pm 8,4$  ng/ml la normali ( $p= 0,0001$  respectiv  $p= 0,002$ ). Valorile crescute au fost găsite la 50%, respectiv 58,3%.

2. Concentrația medie a sICAM-1 a fost mai mare la pacienți:  $22,4 \pm 6,3$  ng/ml și  $21,6 \pm 5,7$  ng/ml, față de normali, care aveau  $16,1 \pm 2,77$  ng/ml ( $p= 0,0001$  respectiv  $p= 0,008$ ).

3. Nivelul seric mediu al sE-Sel a fost crescut la ambele forme clinice de ScS:  $1,82 \pm 0,65$  ng/ml și  $1,32 \pm 0,17$  ng/ml, față de  $0,6 \pm 0,4$  ng/ml la normali ( $p=0,0001$ ), cu creștere semnificativ mai mare în ScSd față de ScSI ( $p=0,002$ ). Valorile individuale crescute, s-au găsit numai la pacienții cu ScSd (41%).

4. Corelația sCAM cu manifestările clinice a fost semnificativă între sICAM-1 și extinderea leziunilor sclerotice asociate cu unele organopatii (pulmonare și cardiace) ( $r=0,624$ ;  $p<0,001$ ), dar nu cu fenomenul Raynaud, ulcerele digitale.

5. Corelația cu markerii serologici ai inflamației a fost relevantă pentru VSH și CRP, fiind înregistrată o frecvență semnificativ mai mare a VSH crescută la pacienții cu nivele peste media fiecărei sCAM ( $p<0,05$ ), iar concentrațiile ridicate ale CRP s-au corelat cu cele peste media ale sE-Sel.

9. Corelația cu severitatea ScSd a fost elocventă în privința sVCAM-1 și sE-Sel, toți pacienții cu concentrații crescute ale sVCAM-1 și 8 din 12 cu sE-Sel crescută aveau boală severă.

## CAPITOLUL II

### INTERLEUKINA 12

În ultimii ani s-a demonstrat foarte clar că IL-12 este implicată în patogeneza bolilor autoimune mediate de LTh1 (288). S-a arătat că IL-12 participă și la mecanismele de inducere a bolilor autoimune mediate de anticorpi, cum sunt miastenia gravis (290) și LES.

#### IL-12 serică la pacienți cu artrită reumatoidă

**Obiective.** Datele privitoare la semnificația clinică a IL-12 și a concentrației ei serice la pacienții cu AR sunt sărace, în raport cu cele experimentale (303, 304). De asemenea, lipsesc studii clinice în stadii incipiente și tardive ale AR și nu cunoaștem preocupări axate pe corelații între IL-12 și unele citokine ca CXCL10, IL-17 și sCD163.

Scopul acestei cercetări este evaluarea concentrației serice a heterodimerului IL12 (p70) la pacienții cu AR în diferite stadii de activitate, corelația cu unele manifestări clinice și modificări serologice.

**Pacienți.** Determinarea concentrației serice a IL-12 s-a efectuat la 27 femei și 3 bărbați cu AR, diagnosticul și stadializarea fiind stabilite după criteriile enumerate la Anexa 1 și 2. Un lot de 15 subiecți, donatori de sânge a reprezentat grupul de control. Dozarea s-a efectuat ca la *Capitolul I*, folosind metoda și kiturile provenite de la aceeași sursă, anticorpii monoclonali "captură" ai metodei ELISA recunoscând doar heterodimerul p70 uman al IL-12 și nicidecum cele două subunități ale dimerului, p30 și p40.

**Concluzii.** 1. Nivelul mediu al IL-12 serice ( $10,05 \pm 3,46$  pg/ml), a fost semnificativ mai mare decât la normali ( $5,67 \pm 0,4$  pg/ml). Aproape toți pacienții aveau concentrații peste nivelul maxim găsit la normali.

2. Diferența dintre valorile medii ale IL-12 la pacienții cu grad sever de activitate a bolii față de cei cu activitate redusă sau medie a fost semnificativă,  $p<0,001$  respectiv  $p<0,01$ , iar nivelul mediu al citokinei la pacienții cu activitate scăzută (DAS  $<3,2$ ) a depășit pe cel de la normal la limita semnificației statistice ( $p<0,05$ ).

3. Pacienții cu nivelurile cele mai ridicate ale IL-12 și cu DAS  $>3,2$  aveau un scor al articulațiilor dureroase și tumefiate mai mare decât pacienții cu activitate minimă a bolii (DAS  $<3,2$ ,  $p=0,01$  respectiv  $p<0,05$ ).

4. Pacienții cu AR mai recentă (sub 3 ani), spre deosebire de aceia cu boală mai îndelungată (peste 7 ani) au avut o corelație moderată dar semnificativă a IL-12 cu DAS28 ( $r=0,62$ ;  $p<0,01$ ).

5. La lotul global s-a înregistrat o corelație moderată dar semnificativă, a nivelului IL-12 serice cu CRP ( $r=0,59$ ;  $p<0,01$ ), dar la pacienții cu activitate intensă (DAS28  $>5,1$ ) corelația a fost puternică ( $r=0,74$ ;  $p<0,001$ ).

6. IL-12 serică s-a corelat cu concentrația IL-17, CXCL-10 și sCD163 la un nivel înalt ( $p=0,0001$ ), fiind posibilă cooperarea acestora la patogeneza AR.

7. Determinarea IL-12 serice la pacienții cu AR recentă poate constitui un marker serologic/imunologic al activității/severității bolii.

### **IL-12 serică la pacienți cu lupus eritematos sistemic**

**Obiective.** Datele din literatură privind IL-12 serică în LES sunt diametral opuse. Cercetările inițiale au arătat o producție deficitară a IL-12 (321), în timp ce altă investigație nu a confirmat-o (322). S-a demonstrat că nivelul seric nu se corelează cu activitatea bolii (320) și nu se modifică după administrarea imunosupresivelor (323). Scopul acestei cercetări a fost (1) să evaluăm comportamentul IL-12 (p75) serice la pacienții cu LES, comparativ cu grupul de control; (2) să investigăm corelația acesteia cu activitatea bolii și unii markeri serologici; (3) să corelam modificările IL-12 cu cele ale unei alte citokine proinflamatoare (IL-17) și a unei chemokine (CXCL-10) indusă de IFN $\gamma$ , la rândul său indus de către IL-12.

**Pacienți și metodă.** Cercetarea s-a efectuat la 25 pacienți cu LES, 17 în activitatea bolii și 8 în acalmie (inactivitate). Determinarea concentrației serice a IL-12 s-a efectuat cu un kit ELISA Quantikine, furnizat de R&D Systems Inc (Abingdon, UK), cu o sensibilitate de 5 pg/ml.

**Concluzii.** 1. Concentrația medie a IL-12 serice la pacienți ( $8,88 \pm 2,15$  pg/ml) a fost ridicată ( $p < 0,0001$ ) față de la normali ( $5,67 \pm 0,40$  pg/ml), 92% din valori fiind situate peste nivelul maxim al grupului de control.

2. Pacienții în fază de activitate aveau concentrația medie mai mare față de cei în remisie ( $10,18 \pm 1,9$  pg/ml vs  $7,21 \pm 2,11$  pg/ml,  $p < 0,01$ ) și a celor din urmă față de normali ( $p < 0,001$ ).

3. Confruntarea SLEDAI cu nivelul seric individual al IL-12 nu a relevat o corelație semnificativă ( $r = 0,258$ ;  $p > 0,05$ ), dar valorile cele mai mari s-au corelat evident ( $r = 0,62$ ;  $p < 0,001$ ) acest grup fiind dominat de pacienții cu organopatii (pericardită, pleurezie, vasculită exclusiv neuropatie lupică).

4. Nu am constatat o diferență între nivelul IL-12 la cei cu nefropatie lupică și la cei fără această organopatie.

5. Coexistența SLEDAI de inactivitate cu un nivel mai ridicat al IL-12, observată la câțiva pacienți, sugerează că starea de remisie apreciată prin SLEDAI nu este însoțită de anularea mecanismelor patogenetice al activării imune, care sunt doar estompate la un prag subclinic.

6. Componentul C4 al sistemului complement a avut o concentrația serică corelată invers cu IL-12 ( $r = -0,63$ ;  $p = 0,005$ ). Deși prezența anticorpilor anti-ADNs a fost mai frecventă la pacienții în puseu și la cei cu SLEDAI de inactivitate ( $p < 0,01$ ), titrul acestor anticorpi nu s-a corelat semnificativ cu nivelul seric al IL-12. Nici VSH, CRP și ACL nu s-au corelat cu concentrația IL-12.

7. Nu am înregistrat diferențe privind nivelul IL-12 în funcție de medicația imunosupresivă aplicată anterior pacienților.

8. IL-12 serică s-a corelat cu IL-17 ( $r = 0,57$ ;  $p = 0,003$ ) și CXCL10 ( $r = 0,906$ ;  $p = 0,0001$ ).

### **IL-12 serică la pacienții cu scleroză sistemică**

**Obiective.** S-a observat că riscul apariției organopatiilor la pacienții cu ScS difuză (ScSd) crește cu vechimea bolii (337), în timp ce fibroza cutanată retrocedează spontan, chiar la pacienții netratați (334). S-a demonstrat că organopatiile severe apar în primii trei ani ai bolii la cei mai mulți pacienți cu ScSd, iar progresiunea spre îngroșarea pielii apare rar după 5-6 ani (338). IL-12 polarizează LT nediferențiate fiind cel mai puternic regulator *in vivo* al balanței citokinelor LTh1/LTh2 spre LTh1.

Ne-am propus să determinăm concentrația serică a IL-12 la pacienții cu ScS, având intenția în primul rând să vedem care este influența vechimii bolii asupra nivelului citokinei, dacă există vreo corelație cu prezența organopatiilor, markerii serologici și alți factori umorali, ca IL-17, CXCL-10 și sCD163, posibil implicați în patogeneză ScS.

**Pacienți și metodă.** Au fost luați în studiu 20 de pacienți cu ScS. La toți pacienții s-a efectuat profilul clinic cutanat (extindere, localizare, aspect) și a interesării organelor interne (inimă, plămâni, rinichi, esofag). Un lot de 15 subiecți, predominant femei, donatori de sânge, cu vârsta cuprinsă între 23 și 54 de ani au

reprezentat grupul de control, pe care l-am designat "normali". Determinarea IL-12 s-a efectuat ca la pacienții cu AR și LES

**Concluzii.** 1. Nivelul seric mediu al IL-12 a fost de  $8,96 \pm 4,54$  pg/ml la pacienți, față de  $5,67 \pm 0,4$  pg/ml la sănătoși, diferența fiind înalt semnificativă ( $p= 0,0001$ ). Valorile individuale ale IL-12 a depășit nivelul maxim al normalilor la 80,5% din pacienți.

2. S-a constatat frecvența mai mare a concentrațiilor ridicate ale IL-12 serice la pacienții cu organopatii asociate, îndeosebi cardiorespiratorii, dar nu am constatat o corelație semnificativă.

3. O constatare deosebită am remarcat privind valorile medii și distribuția concentrațiilor individuale în funcție de durata evoluției ScS: frecvența mai mare a valorilor ridicate ale IL-12 la pacienții cu boală recentă (2-6 ani), comparativ cu cei cu boală îndelungată (8-16 ani) ( $r = -0,57$ ;  $p= 0,01$ ).

4. Nu am găsit corelații semnificative între nivelul seric al IL-12 și markerii serologici investigați, deși concentrația lor a fost frecvent crescută: VSH-75%, CRP-65% și ANA-80%.

6. IL-12 serică nu s-a corelat cu IL-17 ( $r = -0,069$ ;  $p= 0,816$ ), pozitiv și intens semnificativ cu CXCL10 ( $r = 0,943$ ;  $p= 0,0001$ ) și fără corelație cu sCD163.

### CAPITOLUL III

#### INTERLEUKINA 17

**Obiective.** În anii din urmă s-a descoperit o nouă familie de LTh CD4+ , caracterizată prin producția IL-17, numită LTh 17. Datele experimentale sugerează ca IL-17 are un rol important în patogeneza artritei. Deși descoperită acum 10 ani, doar recent i s-a atribuit acestei citokine un potențial rol cheie în AR (367).

#### IL-17 serică la pacienți cu artrită reumatoidă

**Obiective.** Scopul cercetării noastre a fost să evaluăm concentrația IL-17 în serul pacienților cu AR, față de un grup de control. Totodată, să investigăm corelația IL-17 cu activitatea bolii, cu unele manifestări ale acesteia și cu markerii serologici ai inflamației și cu alte molecule circulante susceptibile să fie implicate în patogeneza: IL-12, CXCL10 și sCD163.

**Pacienți și metodă.** Cercetarea s-a efectuat la 25 pacienți cu AR, 23 femei și 2 bărbați, grupul de control este format din 23 subiecți sănătoși, 20 femei și 3 bărbați. Determinarea s-a efectuat cu ELISA, folosind kitul furnizat de R&D Systems (Abingdon, Anglia).

**Concluzii.** 1. Nivelul mediu al IL-17 serice ( $13,39 \pm 2,60$  pg/ml) a fost mult ridicat față de normali ( $7,34 \pm 0,94$  pg/ml,  $p < 0,0001$ ). La 92% din pacienți valorile au fost crescute.

2. Valorile medii ale IL-17 au fost mai mari la pacienții în stadiul III, față de stadiul I ( $p < 0,01$ ) și stadiul II ( $p < 0,05$ ) și în stadiul II față de stadiul III ( $p < 0,05$ ).

3. Cele mai mari concentrații ale IL-17 s-au corelat invers cu vechimea AR, adică erau prezente la pacienții cu boală mai recentă (1-4 ani) ( $r = -0,751$ ;  $p < 0,032$ ).

4. IL-17 s-a corelat semnificativ cu durata redorii matinale și numărul articulațiilor dureroase ( $r = 0,35$ ;  $p < 0,05$ ).

5. Concentrația serică a IL-17 s-a corelat invers cu IL-12 ( $r = -0,862$ ;  $p = 0,0001$ ), pozitiv cu CXCL10 ( $r = 0,986$ ;  $p = 0,0001$ ) și sCD163 ( $r = 0,684$ ;  $p < 0,0001$ ), expresie a unui posibil antagonist IL-12 vs IL-17, a unui sinergism IL-17 – CXCL10.

#### IL-17 serică la pacienți cu lupus eritematos sistemic

**Obiective.** LTh17 sunt implicate recent în patogeneza LES, pe baza mai multor cercetări experimentale murine și mai puțin clinice (397). Recent s-a demonstrat că la pacienții cu LES există o producție crescută a IL-17, reprezentând sinteza excesivă de către LTCD4+ și LT CD3+ dublu negative CD4-CD8- (398). Aceeași cercetare a arătat că IL-17 și IL-23 pot fi detectate în rinichii pacienților cu nefrită lupică, sugerând că această citokină poate contribui la producerea leziunilor renale.



**Pacienți și metodă.** Cercetarea s-a efectuat la 23 femei și 2 bărbați. Determinarea IL-17 serice s-a efectuat ca la pacienții cu AR.

**Concluzii.** 1. La toți pacienții investigați am constatat un nivel seric crescut al IL-17, cu o medie de  $30,32 \pm 4,95$  pg/ml, mult peste aceea de la normali ( $7,34 \pm 0,94$  pg/ml),  $p=0,0001$ .

2. La pacienții cu LES activ (SLEDAI > 6) s-a evidențiat o valoare medie mai mare decât la cei în inactivitate (SLEDAI < 3) ( $p < 0,001$ ), diferența fiind semnificativă și la pacienții în remisie față de normali ( $p < 0,01$ ).

3. S-a remarcat influența duratei bolii asupra nivelurilor serice ale IL-17, semnificativ mai mari la pacienții cu LES activ însoțit de nefropatie și cu evoluție mai recentă (între 6 și 9 ani) ( $p < 0,01$ ); pacienții cu boală mai veche (11-20 de ani) aveau predominant LES inactiv, cu valori moderat ridicate ale IL-17 serice.

4. Nivelul seric al IL-17 la pacienții cu diferite manifestări de organ a fost semnificativ mai mare la cei cu nefrită lupică, îndeosebi asociată cu serozitate (pleurezie ± pericardită), valorile depășind media statistică a tuturor pacienților.

5. Componentul C4 al complementului era scăzut semnificativ la 88% din pacienții cu boală activă și o treime din cei inactivi, corelația negativă fiind semnificativă ( $r = -0,63$ ;  $p < 0,005$ ). Anticorpii anti-ADNs, C3, CRP VSH, ACL deși cu nivele patologice între 40% și 100%, nu s-au corelat semnificativ cu concentrația IL-17.

8. Corelația nivelului seric al IL-17 cu SLEDAI a fost foarte evidentă ( $r = 0,845$ ;  $p = 0,0001$ ).

9. Corelația IL-17 serice cu IL-12 a fost prezentă ( $r = 0,57$ ;  $p = 0,003$ ) dar mai ales cu CXCL10 ( $r = 0,968$ ;  $p = 0,0001$ ).

### IL-17 serică la pacienți cu scleroză sistemică

**Concluzii.** 1. Nivelul seric al IL-17 a fost mai mare la pacienți ( $25,88 \pm 8,30$  pg/ml), față de normali ( $7,34 \pm 0,94$  pg/ml),  $p = 0,0001$ . În afară de un pacient, toate valorile depășeau concentrația maximă găsită la normali.

2. Comparația mediei valorilor IL-17 la pacienții cu ScS mai recent diagnosticată (2-6 ani) cu a celor cu boală de lungă durată (8-14 ani) a relevat nivelul mai mare la cei cu ScS.

3. Nivelul seric al IL-17 s-a corelat negativ cu IL-12 și pozitiv cu CXCL10 dar nu s-a corelat cu sCD163.

## CAPITOLUL IV

### CXCL 10

CXCL10, numită anterior IP-10 (interferon  $\gamma$ -inducible protein) este o proteină de 10 kDa (425) care atrage LT activate și celulele NK. Este o citokină produsă de diferite tipuri celulare, după stimularea de către citokinele proinflamatoare (426). Cercetări recente au raportat că expresia tisulară și/sau concentrația serică a CXCL10 și CXCR3 este crescută în variate boli autoimune, ca AR, LES, ScS, scleroza multiplă, discopatiile autoimune, diabetul zaharat tip 1 și boala Addison (429).

### CXCL10 serică la pacienți cu artrită reumatoidă

**Obiective.** În ultimii ani s-a dat o importanță deosebită funcției distructive a CXCL10 în AR (445). Cercetarea noastră s-a orientat în direcția aprecierii relevanței clinice a CXCL10 în AR și corelației cu manifestările evolutive și cu unele molecule implicate în patogeniza bolii (IL-12, IL-17 și sCD163).

**Pacienți și metodă.** Studiul a fost realizat la 33 pacienți cu AR în diferite stadii ale bolii. Un lot de 20 de subiecți donatori de sânge a reprezentat grupul de control. Metoda de determinare a CXCL10 serice a fost efectuată cu ELISA, cantitatea minimă detectabilă fiind cuprinsă între 0,41 și 4,46 pg/ml.

**Concluzii.** 1. Nivelul mediu al CXCL10 serice a fost de 3 ori mai mare la pacienți ( $168,80 \pm 145,18$  pg/ml), față de normali ( $47,24 \pm 41,44$  pg/ml), diferența fiind înalt semnificativă ( $p=0,0001$ ). La 39% din pacienți valorile individuale erau crescute, peste concentrația maximă a grupului de control.

2. Stratificarea pacienților după DAS28 a scos în evidență diferența semnificativă dintre pacienții în stadiul I cu activitate redusă și cei în stadiul III, cu activitate intensă ( $p < 0,05$ ).

3. Nu am înregistrat o corelație între concentrația chemokinei și activitatea bolii, nefiind deosebiri semnificative între pacienții din cele trei stadii.

4. Nu s-a observat o corelație semnificativă a nivelului CXCL10 cu manifestările articulare și extraarticulare, titrul factorului reumatoid, CRP și VSH

5. Nivelul seric al CXCL10 s-a corelat cu cel al IL-12 ( $r = 0,986$ ;  $p = 0,0001$ ), IL-17 ( $r = 0,684$ ;  $p = 0,0001$ ) și sCD163 ( $r = 0,994$ ;  $p = 0,0001$ ).

### **CXCL10 serică la pacienți cu lupus eritematos sistemic**

**Obiective.** În ultimii ani s-au adus dovezi privind aglomerarea LT și a altor leucocite la nivelul leziunilor lupice. Studiile recente au semnalat creșterea concentrației serice a CXCL10 la pacienții cu LES activ. Rolul exact al CXCL10 în patogeneza LES, ca “inductor”, “amplificator” sau doar „indicator” al leziunilor din această boală nu este încă pe deplin elucidat, necesitând aprofundări viitoare (429). Ne-am propus să investigăm importanța clinică a dozării CXCL10 din ser, prin studiul concentrației la pacienții cu LES activ și inactiv, comparativ cu subiecții sănătoși, să evaluăm corelația nivelului seric cu activitatea bolii, manifestările clinice mai importante, markerii serologici, imunologici și ai inflamației. În fine, am apreciat utilă din punct de vedere teoretic și practic cercetarea corelației CXCL10 serice cu unele citokine proinflamatoare circulante IL-12, IL-17. Determinarea în ser s-a efectuat ca la pacienții cu AR folosind același grup de control.

**Concluzii.** 1. Nivelul mediu al CXCL10 serice a fost mult mai ridicat la pacienți ( $281,29 \pm 221,58$  pg/ml), față de normali ( $47,24 \pm 41,44$  pg/ml),  $p = 0,0001$ . La 55% pacienți valorile CXCL10 au fost crescute, depășind nivelul de la normali.

2. Concentrația medie a CXCL10 la pacienții cu LES activ ( $413,19 \pm 119,22$  pg/ml), a depășit pe aceea de la cei în remisie ( $149,19 \pm 119,22$  pg/ml),  $p = 0,0001$ .

3. Nivelul seric mediu al CXCL10 la pacienții cu LES inactiv a fost semnificativ mai ridicat decât la normali ( $p = 0,003$ ).

4. Nivelul seric al CXCL10 s-a corelat semnificativ cu SLEDAI ( $r = 0,876$ ;  $p = 0,0001$ ).

5. La pacienții cu LES însoțit de organopatii nivelul seric crescut al CXCL10 a fost mai frecvent decât la cei fără aceste asocieri clinice de organ.

6. CXCL10 seric s-a corelat semnificativ cu IL-12 ( $r = 0,986$ ;  $p = 0,0001$ ) și IL-17 ( $r = 0,968$ ;  $p = 0,0001$ ).

### **CXCL10 serică la pacienți cu scleroză sistemică**

**Obiective.** Se știe puțin despre rolul chemokinelor care atrag predominant LTh1 sau LTh2 în ScS, dar s-a precizat recent intervenția puternică a chemoattractanților LTh1-CXCL10 și MIG și a LTh2 chemoattractanților-TARC și MDC (469, 470). Doar două cercetări recente au evaluat nivelul seric al CXCL10, semnalând creșterea acestuia (459, 470).

Scopul acestui studiu a fost să investigăm comportamentul CXCL10 serice la pacienții cu ScS și corelațiile acestuia cu fenotipul bolii, vechimea ei, markerii imunologici/inflamatori, citokinele proinflamatoare IL-12, IL-17 și markerul activării macrofagice sCD163.

**Pacienți și metodă.** Studiul a inclus 15 pacienți cu ScS, 13 femei și 2 bărbați. Un lot de 20 subiecți donatori de sânge, cu vârsta cuprinsă între 23 și 61 ani, au reprezentat grupul de control, pe care l-am designat “normali”. Determinarea CXCL10 s-a efectuat ca la AR și LES

**Concluzii.** 1. Nivelul mediu al CXCL10 serice a fost mai mare la pacienți ( $288,7 \pm 253,94$  pg/ml) față de normali ( $47,24 \pm 41,44$  pg/ml),  $p=0,0001$ .

2. Nu s-a remarcat o dozebire semnificativă între nivelul seric al CXCL10 la pacienții cu ScSd și ScSI și nu s-a găsit o diferență notabilă între pacienții cu organopatii și cei fără aceste asocieri, ca afectarea cardiacă, pulmonară, ulcerării digitale ș.a.

3. Compararea valorilor serice ale CXCL10 ale pacienților cu boală recentă (2-6 ani) cu cei de lungă durată (8-14 ani) a evidențiat un nivel mai mare la primul grup ( $374,85 \pm 200,75$  pg/ml) față de al doilea ( $190,36 \pm 155,82$  pg/ml), la limita semnificației statistice ( $p=0,05$ ).

4. Nu s-au constatat corelații ale CXCL10 cu markerii serologici, imunologici și ai inflamației (ANA, CRP, VSH).

5. Concentrația serică a CXCL10 s-a corelat cu IL-12 ( $r = 0,943$ ;  $p = 0,0001$ ) și IL-17 ( $r = 0,829$ ;  $p = 0,0001$ ), nu și cu nivelul sCD163 ( $r = 0,444$ ;  $p = 0,112$ ).

## CAPITOLUL V

### sCD163

sCD163 este o glicoproteină de 130kD exprimată selectiv de linia celulară monocit-macrofagică (480), fiind suprimată de mediatorii proinflamatori cD163 solubil (sCD163) reprezintă porțiunea extramembranală a CD163 detașată de pe suprafața monocit-macrofagelor și evidențiable în ser (500, 501).

### sCD163 serică în artrita reumatoidă

**Obiective.** O singură cercetare a fost consacrată pacienților cu AR (490). Studiu de față l-am elaborat pentru aprecierea concentrației sCD163 în serul pacienților cu AR, corelația cu activitatea bolii, markerii serologici și unii markeri imunologici cu implicații patogenetice în această boală (IL-12, IL-17 și CXCL-10), folosind o metodă imunoenzimatică standardizată.

**Pacienți și metodă.** sCD163 s-a dozat la 33 pacienți cu AR, 29 femei și 4 bărbați. Un lot de 20 subiecți, donatori de sânge, majoritatea de sex feminin, cu vârsta între 23 și 49 ani a reprezentat grupul de control (normal). Determinarea s-a efectuat imunoenzimatic, cu kitul Macro163TM, furnizat de Trillium Diagnostics (Groeningen, Olanda)

**Concluzii.** 1. Concentrația serică a sCD163 a fost de  $57,36 \pm 8,6$  ng/ml, în timp ce la normali era  $40,65 \pm 6,69$  ng/ml, diferența fiind elocventă ( $p=0,0001$ ). La 55% din pacienții cu AR concentrația individuală a sCD163 s-a aflat peste cea mai mare valoare a normalilor, toate depășind media grupului de control.

2. Atât VSH și CRP, markeri inflamatori obișnuiți în AR, s-au corelat statistic cu nivelul seric al sCD163 ( $r = 0,42$ ;  $p < 0,05$  și respectiv  $r = 0,58$  și  $p = 0,01$ ).

3. Nivelul seric al sCD163 nu s-a corelat semnificativ cu scorul DAS 28 de activitate a AR, atât ca grup global cât și stratificat în stadiile I, II și III.

4. Nu am găsit corelații semnificative statistic între nivelul seric al sCD163 și manifestările AR (articulare și extraarticulare) cu durata evoluției acestora și tratamentul aplicat.

5. sCD163 s-a corelat cu IL-12 ( $r = 0,990$ ;  $p = 0,0001$ ) și CXCL10 ( $r = 0,994$ ;  $p = 0,0001$ ) nu și cu IL-17 ( $r = 0,440$ ;  $p = 0,115$ ).

### sCD163 serică în scleroza sistemică

**Obiective.** Factorul de creștere derivat din trombocite (PDGF) și factorul  $\beta$  de transformare a creșterii (TGF $\beta$ ) sunt determinanții moleculari ai fibrogenzei și se corelează cu severitatea fibrozei (475, 520). În bună parte aceste molecule sunt produse de monocit-macrofagele activate, PDGF fiind implicat în chemotactismul monocitelor și activarea macrofagelor (475). Aceste date sunt suficient de convingătoare că linia celulară monocit-macrofagică este implicată în patogeneza sclerozei sistemice. Cercetarea interprinsă în acest studiu a urmărit comportamentul sCD163 la pacienții cu ScS, în vederea surprinderii unei modificări

serice cantitative, realizabilă prin dozarea imunoenzimatică de mare sensibilitate. Nu este cunoscută concentrația serică la pacienții cu ScS, nici corelațiile ei cu evoluția și severitatea bolii, markerii serologici, imunologici ai inflamației și cu comportamentul unei citokine-chemokine implicate în patogeneză, care aparțin cu precădere fenotipului limfocitelor LTh1 ca: IL-12, IL-17 și CXCL10. Acestea sunt premisele investigațiilor din cercetarea de față. Totodată nu dispunem de date publicate privind acești parametrii.

**Pacienți și metodă.** Studiul a inclus 14 pacienți cu ScS, 13 femei și 1 bărbat. Lotul de control a fost format din 20 subiecți.

**Concluzii.** 1. Nivelul mediu al sCD163 din ser a fost mai mare la pacienți ( $54,82 \pm 7,21$  ng/ml), față de grupul de control ( $40,65 \pm 6,69$  ng/ml), diferența fiind înalt semnificativă statistic ( $p = 0,0001$ ). La 35,7% din pacienți valorile au depășit nivelul maxim de la normali.

2. Concentrația sCD163 s-a corelat semnificativ cu aceea a CRP ( $r = 0,62$ ;  $p < 0,01$ ), dar nu și cu VSH.

3. Deoarece majoritatea valorile mai mari decât media sCD163 aparțineau pacienților cu ScS însoțită de afectare pulmonară și/sau cardiacă, este posibil ca nivelul sCD163 să fie corelat cu severitatea bolii, aspect ce necesită investigații ulterioare.

4. Absența unei corelații semnificative a sCD163 cu IL-12, IL-17 și CXCL10, citokine dependente de activarea LTh1, sugerează că activarea liniei celulare monocit-macrofagice, exprimată prin CD163 ca marker al acesteia, reprezintă o participare alternativă și independentă la patogeneza ScS.

## Bibliografie

213. Klimiuk PA, Fiedorczyk M, Sierakowski S, Chwiecko J. Soluble cell adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1, and sE-selectin) in patients with early rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2007; 36: 345-350.
214. Hussein MR, Fathi NA, El-Din AEZ et al. Alterations of CD4+, CD8+ T cell subsets interleukin-1 $\beta$ , IL-10, IL-17, tumor necrosis factor- $\alpha$  and soluble intercellular adhesion molecule-1 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Preliminary observation. *Pathol Oncol Res* 2008; 14: 321-328.
233. Yao GH, Liu ZH, Zhang X et al. Circulating thrombomodulin and vascular cell adhesion molecule-1 and renal vascular lesion in patients with lupus nephritis. *Lupus* 2008; 17: 720-726.
301. Paunovic V, Carroll HP, Vandembroeck K, Gadina M. Crossed signals: the role of interleukin 12, 17, 23 and 27 in autoimmunity. *Rheumatology* 2009; 47: 771-776.
354. van Beelen AJ, Teunissen MBM, Kapsenberg ML, de Jong EC. Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 374-381.
366. Gabay C, Mc Innes B. The biological and clinical importance of the new generation cytokines in rheumatic diseases
430. Lee EY, Lee Z-H, Song YW. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmunity Revs* 2009; 8: 379-383.
- es. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 230-236.
434. Proost P, Struyf S, Loos T et al. Coexpression and interaction of CXCL10 and CD26 in mesenchymal cells by synergising inflammatory cytokine: CXCL10 are discriminative markers for autoimmune arthropathies. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R107-R120.
444. Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. *Febs J* 2008; 275, 4448-4455.
462. Bauer JW, Baechler EC, Petri M et al. Elevated serum levels of interferon - regulated chemokines are biomarkers for active human systemic lupus erythematosus. *Plos Med* 2006; 3: 2274-2284.
470. Antonelli A, Ferri C, Fallahi P et al. CXCL10 ( $\alpha$ ) and CCL2 ( $\beta$ ) chemokines in systemic sclerosis – a longitudinal study. *Rheumatology* 2009; 47: 45-49.

490.Matsushita N, Kashiwagi M, Wait R et al. Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3 . Clin Exp Immunol 2002; 130: 156-161.

508.Moller HJ, Gronbaek H, Scioldt et al. Soluble CD163 from activated macrophage predicts mortality in acute in acute liver failure . J Hepatol 2007; 47: 671-676.

## CURRICULUM VITAE

**Nume:** Jude

**Prenume:** Dana Claudia

**Data și locul nașterii:** 19 februarie 1970, Băbeni, jud. Sălaj

**Starea civilă:** căsătorită

**Cetățenia:** română

### ACTIVITATEA PROFESIONALĂ

1988 – Absolvent Liceul de Matematică Fizică „Gh. Șincai” Baia Mare

1998 – Absolvent Facultatea de Medicină, UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

### ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ

Din 2001 – Doctorand cu frecvență, domeniul Medicină, titlul lucrării „Molecule reglatoare în boli autoimune”, conducător științific prof. dr. Doru Dejica

2008 – rezident „medicină de familie”

### Specializări

2006 – Curs postuniversitar „Patologia colonului”, 11-13 mai, Cluj-Napoca

2006 – Școala de Vară Națională „Genomica Funcțională în Terapie și Biologia Cancerului”, 2-12 iulie, Cluj-Napoca

2007- Simpozionul internațional de neurogastroenterologie- 6.octombrie, Cluj-Napoca

2008-Curs despre tulburari functionale digestive-10 martie, Cluj-Napoca

**Membru al asociațiilor profesionale:**

Membru al Societății Române de Imunologie

Membru al Societății Române de Alergologie

**PARTICIPĂRI LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE – CONGRESE, SIMPOZIOANE  
ȘI CONFERINȚE**

- Congresul Național de Angiologie și Chirurgie Vasculară, Cluj-Napoca, 1999
- Conferința Națională Anuală a Societății Române de Alergologie și Imunologie, Cluj-Napoca, 2003
- A 33-a Conferință Națională de Imunologie și Alergologie, Cluj-Napoca, 2003
- Conferința Națională Anuală a Societății de Alergologie și Imunologie Clinică, Brașov, 2004
- Masa rotundă: „Prezent și viitor în bolile alergice”, Cluj-Napoca, 2004
- Simpozionul „Actualități în terapia alergiei”, Cluj-Napoca, 2005
- International Symposium of Neurogastroenterology, Brașov, 2005
- Simpozionul de Imunopatologie, Ediția I, Târgu-Mureș, 2005
- Conferința Națională de Alergologie și Imunologie Clinică, Cluj-Napoca, 2006
- Simpozionul „Studiul FIELD: Fenofibratul o nouă abordare terapeutică a pacientului diabetic”, Cluj-Napoca, 2006
- Primul Congres al Societății Române de Alergologie și Imunologie Clinică, Târgu-Mureș, 2007
- Conferința Națională de Imunologie, organizat de Societatea de Imunologie din România – Filiala Craiova, 2009

***Capitol carte***

1. **Claudia Jude.** Boala Behçet. In: Dejica D (ed). *Tratat de imunoterapie.* Cluj-Napoca: Ed Mega, 2006:859-863.

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY „IULIU  
HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA**



**Ph.D. THESIS**

**REGULATING MOLECULES IN AUTOIMMUNE  
DISEASES**

**Ph.D. candidate**

**Jude Dana Claudia**

**Scientific coordinator**

**Prof. Doru Dejica, Ph.D.**

**2009**

# CONTENT

**INTRODUCTION**

**THEORETICAL PART**

**RHEUMATOID ARTHRITIS**

**SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS**

**SYSTEMIC SCLEROSIS**

**SPECIAL PART**

**CHAPTER I. SOLUBLE INTERCELLULAR ADHESION sVCAM-1, sICAM-1 AND sE-SEL MOLECULES IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS, SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND SYSTEMIC SCLEROSIS**

**Serum sCAM in patients with rheumatoid arthritis**

**Serum sCAM in patients with systemic lupus erythematosus**

**Serum sCAM in patients with systemic sclerosis**

**CHAPTER II. INTERLEUKIN 12**

**Serum IL-12 in patients with rheumatoid arthritis**

**Serum IL-12 in patients with systemic lupus erythematosus**

**Serum IL-12 in patients with systemic sclerosis**

**CHAPTER III. INTERLEUKIN 17**

**Serum IL-17 in patients with rheumatoid arthritis**

**Serum IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus**

**Serum IL-17 in patients with systemic sclerosis**

**CHAPTER IV. CXCL 10**

**Serum CXCL10 in patients with rheumatoid arthritis**

**Serum CXCL10 in patients with systemic lupus erythematosus**

**Serum CXCL10 in patients with systemic sclerosis**

**CHAPTER V. sCD163**

**Serum sCD163 in rheumatoid arthritis**

**Serum sCD163 in systemic sclerosis**

**CHAPTER VI. MUTUAL CORRELATIONS OF SERUM IL-12, IL-17, CXCL10, sCD163**

**CONCLUSIONS**

**BIBLIOGRAPHY**

**ABBREVIATIONS**

**INTRODUCTION**



Autoimmune diseases are a special group in the medical pathology, primarily because of their spread in different areas of the medical practice, from internal medicine, with its disciplines (rheumatology, hepato-gastroenterology, hematology, and nephrology) to dermatology, neurology and endocrinology.

The researchers' efforts have been particularly directed to the knowledge of the pathogenetic sublayer of the autoimmune, organ-specific or systemic diseases, etiology being still obscure. Searching for mechanisms involving humoral and cellular factors of the immune system, they have recently multiplied thanks to the advanced bio-molecular technology. Some of these factors underlay their implementation in diagnostic and the development of the selective immunomodulatory therapy, which has improved the efficiency of the current medication and therefore the prognosis of the autoimmune diseases.

Rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and scleroderma are among the most frequent and redoubtable systemic autoimmune diseases, many substantial and applied studies having been dedicated to them.

The best represented domain in the research of these diseases is cellular immunity. Thus, the role of some lymphocyte subsets has been clarified, dendritic cells and natural killer cells (NK), for instance the recent identification of a new type of T helper lymphocyte (ThL), which joins the two already well-known, Th1L and Th2L, designed Th17L, responsible for the production of a new pro-inflammatory cytokine, IL-17. The research is ongoing and it is expected to determine the role these immunocompetent cells play, with their aggressive products, in the pathogenesis of the autoimmune diseases; the perspective of their use as therapeutic targets has already been suggested. Currently there are more experimental works than clinical studies.

Another recent acquisition, more precisely of its role in autoimmune diseases, is chemotactic cytokine CXCL10, which attracts activated LT and NK cells to inflamed tissues, being used as a therapeutic target with monoclonal antibodies recently in advanced phase trials in some autoimmune diseases.

Another molecule which currently raises great clinical interest is CD163, a marker of alternative activation of monocytes-macrophages cell line, with anti-inflammatory features of transmembrane portion proteolytically split and existing in serum, sCD163.

Interleukin 12 (IL-12) polarizes the Th1L type immune response by inducing gamma-interferon by LT, NK cells and macrophage cells. The intervention of this cytokine in autoimmune diseases is controversial, having a dual action: early pro-inflammatory and late anti-inflammatory in rheumatoid arthritis, the latter being associated with an inhibitory effect on angiogenesis, which is mediated by CXCL10. On the other hand, it has been recently demonstrated that IL-12 participates

in priming pathogenetic mechanisms in antibody-dependent autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus and myasthenia gravis.

These are the premises of the research from the last two years, in which we dosed serum concentration of IL-12, IL-17, CXCL10 and sCD163 in patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis. We comparatively evaluated the behavior of these molecules in patients with a recent disease and with an extensive disease, aiming to correlate with different clinical occurrences of the disease, its activity and its severity, to correlate with serological immune markers and the markers of the inflammation. Finally, we gave special importance to the correlation of the four molecules, issue not addressed so far.

Although included in the first chapter, the concern for cell adhesion sVCAM-1, sICAM-1 and sE-Sel molecules was an opportunity to develop, also in our country, a study on the serum concentration of these three autoimmune diseases. The importance of dosing them is very much commented upon in the literature, the results being rather contradictory.

## **CHAPTER I**

### **SOLUBLE INTERCELLULAR ADHESION sVCAM-1, sICAM-1 AND sE-SEL MOLECULES IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS, SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND SYSTEMIC SCLEROSIS**

Molecules that are expressed on the cell membrane surface and by coupling with a ligand (binding component) increase specific activity of a cell for another cell or for a component of the extracellular matrix (ECM), are considered cell adhesion molecules (CAM). The interest in deepening knowledge of CAM has increased gradually due to the importance of their study in various diseases: infectious, immunological, neoplastic, cardiovascular, etc.

The supernatant of the cells activated *in vitro* includes sCAM and it is not surprising that serum or plasma of patients with immune diseases contain these soluble molecules which were measured by immunoenzymatic tests (ELISA), proving high levels in most cases, since 1993 (168). The biggest concern was raised by sCAM belonging to immunoglobulins class, especially sVCAM-1 and sICAM-1, and by the selectines class, particularly soluble E selectine (sE-Sel).

#### **Serum sCAM in patients with rheumatoid arthritis**

## **Objectives**

One year after sCAM in patients with various pathological conditions (186) were highlighted in 1992, the results of the researches developed in RA have been published, observing the high concentrations of sVCAM-1 (187, 188) or ICAM-1 (187, 189, 190) or unchanged levels of sICAM-1 (191) and sE-Sel (192) compared to healthy subjects. Investigations in this direction, more numerous in the last decade, continued nowadays (193-215) and revealed the same differences on the incidence of pathological deviations in the concentration of these sCAM and the correlation with the activity of the disease, its severity, its various clinical-evolutionary manifestations and the serological inflammatory / immunological markers.

## **Patients and method**

The research was conducted on 36 women and 6 men with RA. A group of 32 subjects, blood donors, represented the control group. It was used the immunoenzymatic method (ELISA) with kits supplied by R & D Systems (Abingdon, England).

## **Conclusions**

1. Only 9.5% of the patients had a high level of sVCAM-1 in II and III stages.
2. The serum sICAM-1 registered an average higher than in normal subjects:  $17.10 \pm 3.27$  ng/ml vs.  $12 \pm 2.16$  ng / ml ( $p = 0.0001$ ). In 36.6% of the patients the values were over the maximum levels of the normal subjects, 81% in II and III stage.
3. The average serum sE-Sel exceeded that of the normal subjects:  $1.91 \pm 0.44$  ng / ml vs.  $1.34 \pm 0.61$  ng / ml ( $p = 0.0001$ ), but none of the patients had the sE-Sel level over the maximum values of normal subjects.
4. The sICAM-1 was correlated with the disease age ( $r = 0.427$ ,  $p < 0.01$ ).
5. The duration of the morning stiffness was correlated with the high levels of sICAM-1 ( $r = 0.838$ ,  $p = 0.0001$ ).
6. The sICAM-1 was correlated with ESR ( $r = 0.508$ ,  $p < 0.001$ ) and sE-Sel only with the highest values of the molecule ( $r = 0.427$ ,  $p = 0.01$ ). sICAM-1 was also correlated with serum concentration of the CRP ( $r = 0.380$ ,  $p = 0.01$ ); sVCAM-1 and sE-Sel were correlated with CRP only at the high levels of these molecules.
7. The high levels of serum sICAM-1 were correlated with the disease activity, expressed by DAS28 ( $r = 0.687$ ,  $p = 0.001$ ).

## **Serum sCAM in patients with systemic lupus erythematosus**

## **Objectives**

From 1993 to 2008 including, 24 studies in patients with SLE were performed, on the serum concentration of sCAM that raises the most interest: sVCAM-1, sICAM-1 and sE-Sel. Results are discrepant in incidence, not elucidating the role or the value of any of the molecules in the pathogenetic and diagnostic context of the disease. In most of the studies on the serum changes of sVCAM-1, sICAM-1 and sE-Sel in patients with SLE it have been found high concentrations of sVCAM-1 (187, 188, 221-232) but also normal (233, 234). sICAM-1 level behaved less consistently, frequent unchanged concentrations were found compared to healthy subjects (187, 191, 222, 223, 226, 228) besides its growth (221, 225, 230, 234-240).

The purpose of this research was to assess the prevalence of the increase of sVCAM-1, sICAM-1 and sE-Sel serum concentrations in patients with SLE, in different stages of evolution, activity or remission of the disease, with or without morbid associations, especially lupus nephritis, serosity, vasculitis, antiphospholipid syndrome. However, we were interested if there are any clinical destructive changes in patients with high values of any of the sCAM and if they constitute a subgroup with special risk for certain complications, needing special therapies.

### **Patients**

The investigations were conducted on 40 women and 4 men, who met at least four diagnostic criteria established by the American College of Rheumatology (ACR) for the diagnosis of SLE (27). The control group was composed of 32 subjects, 88% female, age between 23 and 56, corresponding to most patients with SLE. All were blood donors, without other diseases that are likely to produce high value of sCAM. The determining method was the one mentioned in RA.

### **Conclusions**

1. The average concentration of serum sVCAM-1 was significantly higher in patients compared to normal subjects:  $81.77 \pm 36.93$  ng / ml vs.  $44.62 \pm 9.47$  ng / ml ( $p = 0.0001$ ). In 69.9% of the patients serum level of sVCAM-1 has exceeded the maximum of the normal subjects. Seven of the highest 10 values belonged to patients with active SLE and 8 of the lowest 10 values were in patients with inactive disease.

2. The average serum concentration of sICAM-1 was higher in patients with SLE than in normal subjects, but with a lower statistical significance compared to sVCAM-1:  $15.58 \pm 4.16$  ng / ml vs.  $12.82 \pm 2.16$  ng / ml ( $p = 0.003$ ), only in 18.2% exceeding the maximum concentration of the control group.

3. The average serum level of sE-Sel has not increased compared to normal subjects. Only in 9% of the patients the values were over the maximum level of the normal subjects.

4. The sCAM correlation with clinical manifestations of SLE has proved highly significant for the 3 sCAM, in the 16 patients with nephritis, vasculitis or serosity, the r coefficient exceeding 0.836 ( $p < 0.0001$ ) and SLEDAI over the score of 7 to 88%.

5. The serum sVCAM-1 was correlated with ESR ( $r = 0.424$ ,  $p < 0.001$ ) and negatively with C4 ( $r = -0.398$ ,  $p < 0.001$ ). sICAM-1 and sE-Sel were correlated with ESR at high concentrations of the molecule ( $r = 0.384$ ,  $p < 0.01$  respectively  $r = 0.466$ ,  $p < 0.001$ ).

6. The sVCAM-1 was correlated with the disease activity expressed by SLEDAI ( $r = 0.621$ ,  $p < 0.001$ ), sICAM-1 was correlated at the limit of the statistical significance ( $r = 0.322$ ,  $p < 0.05$ ) and sE-Sel wasn't correlated with SLEDAI.

## **Serum sCAM in patients with systemic sclerosis**

### **Objectives**

The purpose of this research was to determine serum concentrations of sVCAM-1, sICAM-1 and sE-Sel in patients with dSSc, compared with lSSc, to establish the correlation among the three sCAM and their levels with clinical manifestations, the severity of the disease and the serological markers of the inflammation.

### **Patients and method**

The study was conducted on 34 patients with SSc, 31 women and 3 men. A group of 27 subjects, blood donors, many of them hypertensive, aged 23 to 61, were the control group, which I designed as "normal subjects". The method of determination has been referred to in RA and SLE.

### **Conclusions**

1. The average serum level of sVCAM-1 was higher than in normal subjects:  $73.5 \pm 18.9$  ng / ml in patients with dSSc and  $76.2 \pm 23$  ng / ml in patients with lSSc vs.  $49.6 \pm 8.4$  ng / ml in normal subjects ( $p = 0.0001$ , respectively  $p = 0.002$ ). High values were found in 50% and respectively in 58.3% of the patients.

2. The average concentration of sICAM-1 was higher in patients:  $22.4 \pm 6.3$  ng / ml and  $21.6 \pm 5.7$  ng / ml, compared to the normal subjects, that had  $16.1 \pm 2.77$  ng / ml ( $p = 0.000$ , respectively  $p = 0.008$ ).

3. The average serum level of sE-Sel was high in both clinical forms of SSc:  $1.82 \pm 0.65$  ng/ml and  $1.32 \pm 0.17$  ng/ml vs.  $0.6 \pm 0.4$  ng/ml in the normal subjects ( $p = 0.0001$ ), with a significant increase in dSSc than in lSSc ( $p = 0.002$ ). High individual values were found only in patients with dSSc (41%).

4. The sSCAM correlation with clinical manifestations was significant between sICAM-1 and the surface of the associated sclerotic lesions to some organopathies (pulmonary and cardiac) ( $r = 0.624$ ,  $p < 0.001$ ) but not with Raynaud phenomenon, digital ulcers.

5. The correlation with the serological markers of the inflammation was relevant to ESR and CRP, being registered a significantly higher frequency of ESR in patients with levels over the

average for each sCAM ( $p < 0.05$ ) and high concentrations of CRP were correlated with those over the average of sE-Sel.

6. The correlation with dSSc severity was eloquent on sVCAM-1 and sE-Sel, all patients with high concentrations of sVCAM-1 and 8 of 12 with high sE-Sel were suffering from a severe disease.

## **CHAPTER II INTERLEUKIN 12**

Recently it has been clearly demonstrated that IL-12 is involved in the pathogenesis of autoimmune diseases mediated by Th1L (288). It was shown that IL-12 also participates in the mechanisms of induction of antibody-mediated autoimmune diseases, such as myasthenia gravis (290) and SLE.

### **Serum IL-12 in patients with rheumatoid arthritis**

#### **Objectives**

The data on the clinical significance of IL-12 and its serum concentration in patients with RA are poor, compared to the experimental ones (303, 304). The clinical studies in early and late stages of RA are also missing, and we do not know any studies focused on the correlation between IL-12 and some cytokines as CXCL10, IL-17 and sCD163.

The purpose of this research is to evaluate the serum concentration of the IL12 heterodimer (p70) in patients with RA in various stages of activity, the correlation with some clinical manifestations and serological changes.

#### **Patients**

The determination of IL-12 serum concentration was conducted on 27 women and 3 men with RA, diagnosis and staging being determined according to the criteria listed in Annex 1 and 2. A group of 15 subjects, blood donors, represented the control group. Determination was made as in *Chapter I*, using the method and the kits from the same source, monoclonal antibodies "caught" by ELISA method recognizing only p70 human heterodimer of IL-12 and not the two subunits of the dimer, p30 and p40.

#### **Conclusions**

1. The average level of serum IL-12 ( $10.05 \pm 3.46$  pg / ml) was significantly higher than in the normal subjects ( $5.67 \pm 0.4$  pg / ml). Almost all the patients had levels over the maximum level found in normal subjects.

2. It was a significant difference between the average values of IL-12 in patients with severe degree of disease activity than in those with low or moderate activity,  $p < 0.001$  respectively  $p < 0.01$ , and the average level of cytokines in patients with low activity (DAS  $< 3.2$ ) exceeded that of a normal subject at the limit of the statistical significance ( $p < 0.05$ ).

3. The patients with the highest levels of IL-12 and with DAS  $> 3.2$  had a score of the painful and swollen joints higher than the patients with minimal disease activity (DAS  $< 3.2$ ,  $p = 0.01$  respectively  $p < 0.05$ ).

4. The patients with recent RA (under 3 years), unlike those with a more extensive disease (over 7 years), had a moderate, but significant correlation of IL-12 with DAS28 ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.01$ ).

5. The whole group showed a moderate but significant correlation of the IL-12 serum level with CRP ( $r = 0.59$ ,  $p < 0.01$ ), but in patients with high activity (DAS28  $> 5.1$ ) the correlation was strong ( $r = 0.74$ ,  $p < 0.001$ ).

6. The serum IL-12 was correlated with IL-17, CXCL-10 and sCD163 concentrations at a high level ( $p = 0.0001$ ), making possible their cooperation to the pathogenesis of RA.

7. The serum IL-12 determination in patients with recent RA may be a serological/immunological marker of the disease activity/severity.

## **Serum IL-12 in patients with systemic lupus erythematosus**

### **Objectives**

The data on serum IL-12 in SLE are diametrically opposed. Initial investigations showed a deficient production of IL-12 (321), while other investigation did not confirm it (322). It was demonstrated that serum level does not correlate with disease activity (320) and it remains unchanged after the administration of the immunosuppressants (323). The purpose of this research was (1) to evaluate the behavior of serum IL-12 (P75) in patients with SLE, compared with the control group; (2) to investigate its correlation with disease activity and with some serological markers; (3) to correlate IL-12 changes with those of another pro-inflammatory cytokines (IL-17) and a chemokine (CXCL-10) induced by IFN $\gamma$ , in its turn induced by IL-12.

### **Patients and method**

The research was conducted on 25 patients with SLE, 17 in disease activity and 8 in lull (inactivity). The determination of IL-12 serum concentration was conducted by an ELISA Quantikine kit provided by R & D Systems Inc. (Abingdon, UK) with a sensitivity of 5 pg/ml.

### **Conclusions**

1. The average concentration of serum IL-12 in patients ( $8.88 \pm 2.15$  pg/ml) was higher ( $p < 0.0001$ ) compared to normal subjects ( $5.67 \pm 0.40$  pg/ml), 92% of the values being over the maximum level of the control group.

2. The patients in the active phase had average concentrations higher than those in remission ( $10.18 \pm 1.9$  pg/ml vs.  $7.21 \pm 2.11$  pg/ml,  $p < 0.01$ ) and the latter to the normal subjects ( $p < 0.001$ ).

3. SLEDAI coping with individual serum level of IL-12 did not reveal a significant correlation ( $r = 0.258$ ,  $p > 0.05$ ), but most values were clearly correlated ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.001$ ), this group being dominated by patients with organopathy (pericarditis, pleurisy, vasculitis exclusively lupus neuropathy).

4. We found no difference between IL-12 level in patients with nephropathy and in those with no such organopathy.

5. The coexistence of the SLEDAI of inactivity with a higher level of IL-12, observed in some patients, suggests that the remission condition assessed by SLEDAI is not associated with the cancellation of pathogenetic mechanisms of immune activation, which are only dimmed to a subclinical stage.

6. C4 component of the complement system had a serum concentration conversely correlated with IL-12 ( $r = -0.63$ ,  $p = 0.005$ ). Although the presence of anti-dsDNA antibodies was more common in patients with flare and in those with SLEDAI of inactivity ( $p < 0.01$ ), the titre of these antibodies did not correlate significantly with serum level of IL-12. Neither ESR, CRP nor ACL were correlated with the concentration of IL-12.

7. We found no differences regarding the IL-12 level depending on the immunosuppressive medication previously given to patients.

8. The serum IL-12 was correlated with IL-17 ( $r = 0.57$ ,  $p = 0.003$ ) and CXCL10 ( $r = 0.906$ ,  $p = 0.0001$ ).

## **Serum IL-12 in patients with systemic sclerosis**

### **Objectives**

It was noted that the risk of organopathies in patients with diffuse SSc (dSSc) increases with the disease age (337), while dermal fibrosis is reduced spontaneously, even in untreated patients (334). It has been shown that severe organopathies occur in the first three years of the disease in most patients with dSSc and progression to skin thickening occurs rarely after 5-6 years (338). IL-12 polarizes undifferentiated LT, being the strongest *in vivo* regulator of the balance of the Th1L/Th2L cytokines to Th1L.

We aimed to determine IL-12 serum concentration in patients with SSc, with the intention primarily to see the influence of the disease age on the level of cytokine, if there is any correlation with the presence of organopathies, serological markers and other humoral factors as IL-17, CXCL-10 and sCD163, possibly involved in the pathogenesis of SSc.

### **Patients and method**



20 patients with SSc have been studied. All patients have been carried out skin clinical profile (surface, location, appearance) and internal organs (heart, lung, kidney and esophagus) were examined. A group of 15 subjects, predominantly women, blood donors, aged between 23 and 54 years, were the control group, which I designed the "normal subjects". The determination of IL-12 was performed as in patients with RA and SLE.

### **Conclusions**

1. The average serum level of IL-12 was  $8.96 \pm 4.54$  pg/ml in patients vs.  $5.67 \pm 0.4$  pg/ml in healthy subjects, the difference being highly significant ( $p=0.0001$ ). An individual value of IL-12 has exceeded the maximum level of the normal subjects in 80.5% of the patients.

2. Greater frequency of high concentrations of serum IL-12 was found in patients with associated organopathies, particularly cardio-respiratory, but we found no significant correlation.

3. We noted a special finding on the average values and the distribution of individual concentrations depending on the duration of the SSc evolution: greater frequency of high levels of IL-12 in patients with a recent disease (2-6 years) than in those with a extensive disease (8-16 years) ( $r = -0.57$ ,  $p=0.01$ ).

4. We found no significant correlations between serum levels of IL-12 and the investigated serological markers, although their concentration was frequently high: ESR-75%, CRP-65% and ANA-80%.

6. Serum IL-12 wasn't correlated with IL-17 ( $r= -0.069$ ,  $p= 0.816$ ), positive and highly significant with CXCL10 ( $r= 0.943$ ,  $p= 0.0001$ ) and no correlation with sCD163.

## **CHAPTER III INTERLEUKIN 17**

### **Objectives**

Recently it has been found a new family of ThL CD4 +, characterized by the production of IL-17, called ThL 17. Experimental data suggest that IL-17 plays an important role in the pathogenesis of arthritis. Although discovered 10 years ago, only recently a potentially key role in RA (367) has been assigned to this cytokine.

### **Serum IL-17 in patients with rheumatoid arthritis**

### **Objectives**

The purpose of our research was to evaluate IL-17 concentration in the serum of the patients with RA, compared to a control group. Moreover, we intended to investigate IL-17 correlation with the disease activity, with some of its manifestations and with the serological markers of the

inflammation and with other circulating molecules that may be involved in pathogenesis: IL-12, CXCL10 and sCD163.

### **Patients and method**

The research was conducted on 25 patients with RA, 23 women and 2 men; the control group was composed of 23 healthy subjects, 20 women and 3 men. The determination was performed with ELISA, using the kit provided by R & D Systems (Abingdon, England).

### **Conclusions**

1. The average level of serum IL-17 ( $13.39 \pm 2.60$  pg/ml) was much higher than in normal subjects ( $7.34 \pm .94$  pg/ml,  $p < 0.0001$ ). 92% of the patients had high values.

2. The average values of IL-17 were higher in patients in stage III vs. stage I ( $p < 0.01$ ) and stage II ( $p < 0.05$ ), and in stage II vs. stage III ( $p < 0.05$ ).

3. The highest concentrations of IL-17 were inversely correlated with age of the RA, i.e. they were present in patients with a recent disease (1-4 years) ( $r = -0.751$ ,  $p < 0.032$ ).

4. IL-17 was significantly correlated with the duration of the morning stiffness and with the number of painful joints ( $r = 0.35$ ,  $p < 0.05$ ).

5. Serum concentration of IL-17 was inversely correlated with IL-12 ( $r = -0.862$ ,  $p = 0.0001$ ), positive with CXCL10 ( $r = 0.986$ ,  $p = 0.0001$ ) and sCD163 ( $r = 0.684$ ,  $p < 0.0001$ ), expression of a possible IL-12 vs. IL-17 antagonism, of an IL-17 - CXCL10 synergism.

## **Serum IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus**

### **Objectives**

Th17L have been recently involved in the pathogenesis of SLE, based on several murine experimental research rather than clinical ones (397). It has been recently shown that in patients with SLE there is an increased production of IL-17, representing the excessive synthesis by LT CD4+ and LT CD3+ double negative CD4-CD8- (398). The same research showed that IL-17 and IL-23 can be detected in the kidneys of the patients with lupus nephritis, suggesting that this cytokine may contribute to the renal injury.

### **Patients and method**

The research was conducted on 23 women and 2 men. The determination of serum IL-17 was performed as in patients with RA.

### **Conclusions**

1. In all investigated patients we found an high serum level of IL-17, with an average of  $30.32 \pm 4.95$  pg/ml, much higher than that of the normal subjects ( $7.34 \pm 0.94$  pg ml),  $p = 0.0001$ .

2. In patients with active SLE (SLEDAI > 6) it has been shown an average value higher than in those with inactive SLE (SLEDAI < 3) ( $p < 0.001$ ), the difference being significant in patients in remission compared to normal subjects ( $p < 0.01$ ).

3. It was noted the influence of the disease duration on serum levels of IL-17, significantly higher in patients with active SLE associated with nephropathy and with a recent development (from 6 to 9 years) ( $p < 0.01$ ); patients with older disease (11-20 years) predominantly had inactive SLE, with moderately high levels of serum IL-17.

4. The serum level of IL-17 in patients with various organ manifestations was significantly higher than in those with lupus nephritis, particularly associated with serosity (pleurisy  $\pm$  pericarditis), the values exceeding the statistical average of all the patients.

5. C4 component of the complement was significantly low in 88% of the patients with active disease and one third of the inactive ones, negative correlation being significant ( $r = -0.63$ ;  $p < 0.005$ ). dsDNA antibodies, C3, CRP ESR, ACL, although with pathological levels between 40% and 100%, wasn't correlated significantly with the IL-17 concentration.

8. The serum level correlation of IL-17 with SLEDAI was very evident ( $r = 0.845$ ,  $p = 0.0001$ ).

9. The correlation of serum IL-17 with IL-12 was present ( $r = 0.57$ ,  $p = 0.003$ ) and especially with CXCL10 ( $r = 0.968$ ,  $p = 0.0001$ ).

### **Serum IL-17 in patients with systemic sclerosis**

#### **Conclusions**

1. The serum level of IL-17 was higher in patients ( $25.88 \pm 8.30$  pg/ml) vs. normal subjects ( $7.34 \pm 0.94$  pg/ml),  $p = 0.0001$ . Except one patient, all the values exceeded the maximum concentration found in normal subjects.

2. The comparison of the average IL-17 values in patients with recently diagnosed SSc (2-6 years) with those with an extensive disease (8-14 years) showed higher level in patients with SSc.

3. The serum level of IL-17 was negatively correlated with IL-12 and positively with CXCL10, but wasn't correlated with sCD163.

## **CHAPTER IV**

### **CXCL 10**

CXCL10, previously called IP-10 (interferon  $\gamma$ -inducible protein), is a protein of 10 kDa (425) which attracts activated LT and NK cells. It is a cytokine produced by different cell types, after the stimulation produced by pro-inflammatory cytokines (426). Recent researches have reported that the tissue expression and/or serum concentration of CXCL10 and CXCR3 is high in

various autoimmune diseases, such as RA, SLE, SSc, multiple sclerosis, autoimmune discopathies, type 1 diabetes and Addison's disease (429).

## **Serum CXCL10 in patients with rheumatoid arthritis**

### **Objectives**

Recently it has been given a great importance to the destructive function of CXCL10 in RA (445). Our research was directed towards assessing the clinical relevance of CXCL10 in RA and the correlation with progressive manifestations and with some molecules involved in the pathogenesis of the disease (IL-12, IL-17 and sCD163).

### **Patients and method**

The study was conducted on 33 patients with RA in different stages of the disease. A group of 20 subjects, blood donors, represented the control group. The determining method for the serum CXCL10 was performed with ELISA, the minimum detectable amount ranging between 0.41 and 4.46 pg/ml.

### **Conclusions**

1. The average level of serum CXCL10 was three times higher in patients ( $168.80 \pm 145.18$  pg/ml) compared to normal subjects ( $47.24 \pm 41.44$  pg/ml), the difference being highly significant ( $p = 0.0001$ ). In 39% of the patients individual values were high, over the maximum concentration of the control group.

2. The stratification of the patients according to the DAS28 revealed significant differences between the patients in stage I with low activity and those in stage III, with high activity ( $p < 0.05$ ).

3. I have seen no correlation between chemokine concentration and the disease activity, no significant differences between the patients in the three stages.

4. There was no significant correlation of the CXCL10 level with articular and extra-articular manifestations, the titre of rheumatoid factor, CRP and ESR.

5. The serum levels of CXCL10 was correlated with that of IL-12 ( $r = 0.986$ ,  $p = 0.0001$ ), IL-17 ( $r = 0.684$ ,  $p = 0.0001$ ) and sCD163 ( $r = 0.994$ ,  $p = 0.0001$ ).

## **Serum CXCL10 in patients with systemic lupus erythematosus**

### **Objectives**

Recently it has been proved the agglomeration of LT and of other leucocytes at the surface of lupus lesions. Recent studies have reported a high serum concentration of CXCL10 in patients with active SLE. The precise role of CXCL10 in the pathogenesis of SLE, as "inducer", "booster" or only "indicator" of lesions of this disease is not yet completely elucidated, future thorough studies being

necessary (429). We aimed to investigate the clinical importance of the CXCL10 dosing from the serum, by studying the concentration in patients with active and inactive SLE, compared with healthy subjects, to evaluate the correlation of the serum level with the disease activity, the most important clinical manifestations and the serological, immunological and inflammation markers. Finally, we found useful, from theoretical and practical perspective, the research of the correlation of the serum CXCL10 with some pro-inflammatory circulating cytokines IL-12, IL-17. The determination in the serum was made as in patients with RA using the same control group.

### **Conclusions**

1. The average level of the serum CXCL10 was much higher in patients ( $281.29 \pm 221.58$  pg / ml) compared to normal subjects ( $47.24 \pm 41.44$  pg / ml),  $p = 0.0001$ . In 55% of the patients, CXCL10 values were high, exceeding the normal level.

2. The average concentration of CXCL10 in patients with active SLE ( $413.19 \pm 119.22$  pg/ml) has exceeded that of those in remission ( $149.19 \pm 119.22$  pg/ml),  $p = 0.0001$ .

3. The average serum levels of CXCL10 in patients with inactive SLE was significantly higher than in normal subjects ( $p = 0.003$ ).

4. The serum level of CXCL10 was significantly correlated with SLEDAI ( $r = 0.876$ ,  $p = 0.0001$ ).

5. In patients with SLE associated with other organopathies, a high serum level of CXCL10 was more frequent than in those with no such clinical associations.

6. The serum CXCL10 was significantly correlated with IL-12 ( $r = 0.986$ ,  $p = 0.0001$ ) and IL-17 ( $r = 0.968$ ,  $p = 0.0001$ ).

## **Serum CXCL10 in patients with systemic sclerosis**

### **Objectives**

We know little about the role of the chemokines that predominantly attract Th1L or Th2L in SSc, but it has been recently proved the strong intervention the Th1L chemoattractants CXCL10 and MIG and Th2L chemoattractants TARC and MDC (469, 470). Only two recent studies have evaluated serum level of CXCL10, signaling its growth (459, 470).

The purpose of this study was to investigate the behavior of serum CXCL10 in patients with SSc and its correlation with the disease phenotype, its age, the immunological/inflammatory markers, pro-inflammatory cytokines IL-12, IL-17 and the sCD163 marker of the macrophage activation.

### **Patients and method**

The study included 15 patients with SSc, 13 women and 2 men. A group of 20 subjects, blood donors, aged between 23 and 61 years, were the control group, which I designed as "normal subjects". The CXCL10 determination has been made as in RA and SLE.

### **Conclusions**

1. The average level of serum CXCL10 was higher in patients ( $288.7 \pm 253.94$  pg / ml) than in normal subjects ( $47.24 \pm 41.44$  pg/ml),  $p=0.0001$ .

2. It was noted no significant difference between the serum level of CXCL10 in patients with dSSc and lSSc and it was not found a notable difference between patients with organopathies and those with no such associations, as pulmonary and heart disease, digital ulcers, etc.

3. The comparison of the serum values of CXCL10 in patients with a recent disease (2-6 years) to those with a more extensive disease (8-14 years) revealed a higher level in the first group ( $374.85 \pm 200.75$  pg/ml) compared to the second one ( $190.36 \pm 155.82$  pg/ml), at the limit of statistical significance ( $p=0.05$ ).

4. There were found no correlations of CXCL10 with serological, immunological and inflammation markers (ANA, CRP, ESR).

5. The serum concentration of CXCL10 was correlated with IL-12 ( $r = 0.943$ ,  $p = 0.0001$ ) and IL-17 ( $r = 0.829$ ,  $p = 0.0001$ ) but not with sCD163 level ( $r = 0.444$ ,  $p = 0.112$ ).

## **CHAPTER V**

### **sCD163**

sCD163 is a 130kD glycoprotein expressed selectively by the monocytes-macrophages cell line (480), being suppressed by pro-inflammatory mediators. Soluble cD163 (sCD163) represents the extra-membrane portion of CD163 detached from the surface of the monocytes-macrophages and highlighted in the serum (500, 501).

### **Serum sCD163 in rheumatoid arthritis**

#### **Objectives**

Only one research has been devoted to patients with RA (490). We developed this study to assess the serum concentration of sCD163 in patients with RA, the correlation with disease activity, serological markers and some immunological markers with pathogenetic implications in this disease (IL-12, IL-17 and CXCL-10), using a standardized immunoenzymatic method.

#### **Patients and method**

sCD163 was dosed in 33 patients with RA, 29 women and 4 men. A group of 20 subjects, blood donors, mostly female, aged between 23 and 49 years, were the control group (normal

subjects). The determination was made immunoenzymatically, with Macro163™ kit provided by Trillium Diagnostics (Groenigen, Netherlands).

### **Conclusions**

1. The serum concentration of sCD163 was  $57, 36 \pm 8.6$  ng/ml, whereas in the normal subjects it was  $40.65 \pm 6.69$  ng/ml, the difference being eloquent ( $p = 0.0001$ ). In 55% of the patients with RA, the individual concentration of sCD163 was over the highest value of the normal subjects, all exceeding the average of the control group.

2. Both ESR and CRP, the usual inflammatory markers in the RA, were statistically correlated with the serum level of sCD163 ( $r = 0.42$ ,  $p < 0.05$  respectively  $r = 0.58$  and  $p = 0.01$ ).

3. The serum level of sCD163 was not significantly correlated with DAS 28 activity score of RA, both as a whole group and a stratified one in stages I, II and III.

4. We found no statistically significant correlations between the serum level of sCD163 and the RA manifestations (articular and extra-articular) with the duration of their evolution and the given treatment.

5. sCD163 was correlated with IL-12 ( $r = 0.990$ ,  $p = 0.0001$ ) and CXCL10 ( $r = 0.994$ ,  $p = 0.0001$ ) but not with IL-17 ( $r = 0.440$ ,  $p = 0.115$ ).

## **Serum sCD163 in systemic sclerosis**

### **Objectives**

Platelet-derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) are molecular determinants of fibrogenesis and are correlated with the fibrosis severity (475, 520).

These molecules are produced mostly by activated monocytes-macrophages, PDGF being involved in monocytes chemotactism and in activated macrophages (475). These data are sufficiently convincing that monocytes-macrophages cell line is involved in the pathogenesis of systemic sclerosis. The research made in this study followed the behavior of sCD163 in patients with SSc to find a quantitative serum change, made by immunoenzymatic dosing of high sensitivity. It is not known the serum concentration in patients with SSc, nor its correlation with the development and the severity of the disease, serological, immunological and inflammation markers and with the behavior of a cytokine-chemokine involved in the pathogenesis, which mainly belong to Th1L lymphocytes phenotype as: IL-12, IL -17 and CXCL10. These are the premises for investigation of the present research. We don't have any published data on these parameters.

### **Patients and method**

The study included 14 patients with SSc, 13 women and 1 man. The control group was composed of 20 subjects.

### **Conclusions**

1. The average level of sCD163 in the serum was higher in patients ( $54.82 \pm 7.21$  ng/ml) vs the control group ( $40.65 \pm 6.69$  ng/ml), the difference being highly statistically significant ( $p = 0.0001$ ). In 35.7% of the patients, values exceeded the maximum level of the normal subjects.

2. The concentration of sCD163 was significantly correlated with that of CRP ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.01$ ), but not with ESR.

3. Since most values higher than the sCD163 average were in patients with SSc associated with pulmonary and/or heart disease, it is possible that sCD163 level to be correlated with the severity of the disease, an aspect that requires further investigation.

4. The absence of significant correlations of sCD163 with IL-12, IL-17 and CXCL10, cytokines dependent on the Th1L activation, suggest that activation of the monocytes-macrophages cell line, expressed by CD163 as a marker of it, is an alternative and independent participation in the pathogenesis of SSc.

## **Bibliography**

213. Klimiuk PA, Fiedorczyk M, Sierakowski S, Chwiecko J. Soluble cell adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1, and sE-selectin) in patients with early rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2007; 36: 345-350.
214. Hussein MR, Fathi NA, El-Din AEZ et al. Alterations of CD4+, CD8+ T cell subsets interleukin-1 $\beta$ , IL-10, IL-17, tumor necrosis factor- $\alpha$  and soluble intercellular adhesion molecule-1 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Preliminary observation. *Pathol Oncol Res* 2008; 14: 321-328.
233. Yao GH, Liu ZH, Zhang X et al. Circulating thrombomodulin and vascular cell adhesion molecule-1 and renal vascular lesion in patients with lupus nephritis. *Lupus* 2008; 17: 720-726.
301. Paunovic V, Carroll HP, Vandenbroeck K, Gadina M. Crossed signals: the role of interleukin 12, 17, 23 and 27 in autoimmunity. *Rheumatology* 2009; 47: 771-776.
354. van Beelen AJ, Teunissen MBM, Kapsenberg ML, de Jong EC. Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 374-381.
366. Gabay C, Mc Innes B. The biological and clinical importance of the new generation cytokines in rheumatic diseases
430. Lee EY, Lee Z-H, Song YW. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmunity Revs* 2009; 8: 379-383.
- es. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 230-236.
434. Proost P, Struyf S, Loos T et al. Coexpression and interaction of CXCL10 and CD26 in mesenchymal cells by synergising inflammatory cytokine: CXCL10 are discriminative markers for autoimmune arthropathies. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R107-R120.
444. Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. *Febs J* 2008; 275, 4448-4455.
462. Bauer JW, Baechler EC, Petri M et al. Elevated serum levels of interferon- $\gamma$ -regulated chemokines are biomarkers for active human systemic lupus erythematosus. *Plos Med* 2006; 3: 2274-2284.
470. Antonelli A, Ferri C, Fallahi P et al. CXCL10 ( $\alpha$ ) and CCL2 ( $\beta$ ) chemokines in systemic sclerosis – a longitudinal study. *Rheumatology* 200; 847: 45-49.



490. Matsushita N, Kashiwagi M, Wait R et al. Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3 . *Clin Exp Immunol* 2002; 130: 156-161.
508. Moller HJ, Gronbaek H, Scioldt et al. Soluble CD163 from activated macrophage predicts mortality in acute in acute liver failure . *J Hepatol* 2007; 47: 671-676.

## CURRICULUM VITAE

**Name:** Jude

**Surname:** Dana Claudia

**Date and place of birth:** 19. 02. 1970, Băbeni – Sălaj

**Marital status:** married

**Citizenship:** Romanian

### PROFESSIONAL ACTIVITY

1988- Graduate Mathematics-Physics “Gheorghe Șincai” High School, Baia Mare

1998 – Graduate Faculty of Medicine, University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

### SCIENTIFIC ACTIVITY

2001 to date – full time PhD candidate, Medicine field, the title of the paper: “Regulator molecules in autoimmune diseases”, scientific coordinator prof. Doru Dejica, Ph.D

2008 – family medicine resident

#### Specialization

2006 - Post-graduate course “Pathology of the Colon”, 11.05-13.05

2006 – National Summer School “Functional Genomics in Therapy and in Biology of the Cancer”, 2.06-12.06, Cluj-Napoca

2007 - Post-graduate course “International Symposium of Neurogastroenterology”, 06.10, Cluj-Napoca.

2008 - Post-graduate course “Functional digestive disorders”, 10.03

#### Member of professional associations:

Member of Romanian Society of Immunology

Member of Romanian Society of Allergology

### PARTICIPATIONS AT SCIENTIFIC EVENTS

-National Congress of Angiology and Vascular Surgery, Cluj-Napoca, 1999

2003  
-National Annual Conference of Romanian Society of Allergology and Immunology, Cluj-Napoca,

-the 33th National Conference of Immunology and Allergology, Cluj-Napoca 2003

2004  
-National Annual Conference of Romanian Society of Allergology and Clinic Immunology, Brașov,

-Round table: “Present and future in allergic diseases”, Cluj-Napoca, 2004

- “News in allergies therapy” –symposium, Cluj-Napoca, 2005

- International Symposium of Neurogastroenterology, Brașov, 2005

- Immunopathology Symposium, 1<sup>st</sup> edition, Târgu Mureș, 2005

-National Annual Conference of Romanian Society of Allergology and Clinic Immunology, Cluj-Napoca, 2006

-“FILED study: Fenofibrate: a new therapeutic approach of diabetich patient” Symposium, Cluj-Napoca, 2006

- The first Congress of the Romanian Society of Allergology and Clinic Immunology, Târgu Mureș, 2007

-The National Conference of Immunology, organized by the Romanian Society of Immunology-Craiova department, 2009

### **Scientific papers**

#### ***Articles published – first author***

1. Claudia Jude, Doru Dejica, New proinflammatory cytokines as therapeutic targets in Rheumatoid arthritis, Clujul Medical 2009; LXXXII (3): 339-342.
2. Claudia Jude, Ileana Nicoară, Cristina Pamfil, Alexandra Crăciun, Simona Rednic, Doru Dejica. Seric concentration of the soluble adhesion molecules sVCAM-1 and sICAM-1, s-E-sel in patients with systemic sclerosis. Sibiul Medical 2009; 2: 34-35.

#### ***Book chapter***

Claudia Jude. Behçet’s disease. In: Dejica D. (ed.), Immunotherapy Manual. Cluj-Napoca: ed. Mega, 2006, 859-863.