

## PÔVODNÁ PRÁCA

PYRIDINOLÍNOVÉ PRIEČNOVÄZBOVÉ ZLÚČENINY  
KOLAGÉNU PRI SYSTÉMOVEJ SKLERÓZE

R. IŠTOK, M. STANČIKOVÁ, J. LUKÁČ, J. ROVENSKÝ

PYRIDINOLINE CROSS-LINK COMPOUNDS OF COLLAGEN  
IN SYSTEMIC SCLEROSISVýskumný ústav reumatických chorôb, Piešťany  
Riaditeľ: prof. MUDr. J. Rovenský, DrSc.

## Súhrn

**Pozadie problému:** Systémová skleróza (SSc) je charakterizovaná poruchami metabolizmu kolagénu; ich výsledkom je fibróza mäkkých spojivových tkanív. Priečnoväzbové zlúčeniny kolagénu pyridinolín (Pyr) a deoxyypyridinolín (Dpyr) sú degradačné produkty kolagénu vylučované močom. Zvýšená koncentrácia pyridinolínu, najmä jeho frakcie pochádzajúcej z mäkkých tkanív (soft tissue pyridinoline, stPyr) bola opísaná u pacientov so SSc. Nevyjasnený zostáva tkanivový zdroj stPyr pri SSc.

**Cieľ práce:** Porovnať koncentrácie Pyr, Dpyr a stPyr v moči u pacientov so SSc, osteoporózou (OP) a zdravých kontrol. Zistiť, či parameter stPyr odráža rozsah kožného, resp. orgánového postihnutia u pacientov so SSc.

**Metódy:** Sledované súbory tvorilo 24 pacientov so SSc, 22 pacientov s OP a 11 zdravých kontrol. Koncentrácie Pyr a Dpyr v rannom moči sa určovali metódou HPLC s fluorescenčnou detekciou.

**Výsledky:** Pyr aj Dpyr boli signifikantne zvýšené u pacientov so SSc v porovnaní so zdravými kontrolami. Výrazne zvýšené boli hodnoty stPyr u pacientov so SSc oproti zdravým kontrolám aj pacientom s OP ( $62,9 \pm 50,0$  vs  $23,3 \pm 6,9$  a  $21,9 \pm 21,2$  nmol/mmol kreatinínu,  $p \leq 0,005$ ). Medzi skóre kožného postihnutia a hodnotami stPyr sme zistili signifikantnú pozitívnu koreláciu ( $r_s = 0,57$ ,  $p = 0,0063$ ). Výraznú koreláciu sme zaznamenali aj medzi skóre orgánového postihnutia a stPyr ( $r_s = 0,58$ ,  $p = 0,0057$ ).

**Záver:** Zvýšené hodnoty stPyr u pacientov so SSc a ich signifikantná korelácia s mierou kožného i orgánového postihnutia poukazujú na to, že zdrojom Pyr môžu byť fibrotizované tkanivá.

**Kľúčové slová:** systémová skleróza, pyridinolín, deoxyypyridinolín, kolagén.

## Summary

**Background of the problem:** Systemic sclerosis (SSc) is characterized by disturbance of collagen metabolism resulting in fibrosis of the soft connective tissues. Cross-link compounds of collagen, pyridinoline (Pyr) and deoxyypyridinoline (Dpyr), are the degradation products of collagen secreted by urine. The increased concentration of pyridinoline, especially the fraction originating from soft connective tissues (soft tissue pyridinoline, stPyr), has been described in patients with systemic sclerosis, however, its tissue source remains to be explained.

**Aim of the investigation:** The authors tried to compare Pyr, Dpyr and stPyr urine concentration in patients with SSc, osteoporosis (OP) and healthy persons, and to find out if stPyr reflects the extent of the skin and organ involvement in patients with SSc.

**Methods:** The investigated group consisted of 24 patients with SSc, 22 patients with OP, and 11 healthy persons. Pyr and Dpyr in samples of morning urine were estimated by HPLC method using fluorescence detection.

**Results:** Pyr and Dpyr were found to be increased significantly in patients with SSc when compared with healthy controls. Markedly increased values of stPyr were found in patients with SSc in comparison to both healthy controls and patient with OP ( $62,9 \pm 50,0$  vs  $23,3 \pm 6,9$  and  $21,9 \pm 21,2$  nmol/mmol creatinine,  $p \leq 0,005$ ). A significant positive correlation was found out between the score of skin involvement and stPyr values ( $r_s = 0,57$ ,  $p = 0,0063$ ). A marked correlation was also noted between the score of organ involvement and stPyr ( $r_s = 0,58$ ,  $p = 0,0057$ ).

**Conclusion:** The increased values of stPyr in patients with SSc and their correlation with the range of skin and organ involvement suggest that fibrotized tissues may be the source of Pyr.

**Key words:** systemic sclerosis, pyridinoline, deoxyypyridinoline, collagen.

Systémová skleróza (SSc) je choroba spojivového tkaniva neznámej etiológie charakterizovaná zvýšenou tvorbou zložiek extracelulárneho matrixu, najmä kolagénu, v koži

a niekedy vo vnútorných orgánoch. Samy fibrotické zmeny sú však výsledkom celej kaskády predchádzajúcich imunopatologických a vaskulopatických procesov (13, 16).

Tvorba tzv. priečnoväzbových zlúčenín v telopeptidových doménach kolagénu má kľúčovú úlohu pri stabilizácii supramolekulových štruktúr kolagénu v spojivových tkanivách. Oxidatívnou deamináciou zvyškov lyzínu, resp. hydroxylyzínu, za účasti lyzyloxidázy (EC 1.4.3.) vznikajú reaktívne aldehydické skupiny (allyzín, resp. hydroxyallyzín). Kondenzáciou týchto allyzínov s reaktívnymi zvyškami aminokyselín lyzínu, hydroxylyzínu a histidínu v rôznych kombináciách vznikajú finálne trivalentné a tetravalentné priečnoväzbové zlúčeniny typické pre určitý druh tkaniva. Dôležitým faktom je, že charakter dominujúcej väzby v tkanive určuje miera hydroxylácie lyzínu v telopeptidových doménach kolagénu (12).

Pyridinolín (Pyr) a deoxypyridinolín (Dpyr) sú trivalentné priečnoväzbové zlúčeniny vyskytujúce sa najmä v kostnom kolagéne typu I a chrupkovom kolagéne typu II. V zdravej ľudskej koži bolo opísané len veľmi malé zastúpenie týchto zlúčenín (7) (v skorších prácach boli dokonca pod detekčným limitom analytickej metódy (1)). Pyridinolíny uvoľnené pri degradácii spojiva sú pre metabolizmus organizmu nevyužiteľné a vylučujú sa močom. Polovica celkového kolagénu v tele sa nachádza v kostiach; je v nich relatívne najväčšie zastúpenie Pyr a najvyšší pomer Dpyr:Pyr. Preto sa považujú tieto zlúčeniny v moči najmä za markery kostnej resorpcie a intenzívne sa študujú pri osteoporóze (9, 10, 15).

LaMontagna a spol. (3) roku 1995 zistili významné zvýšenie koncentrácie Pyr v moči aj u pacientov so SSc. Na základe zhodnotenia korelácie Pyr s denzitometrickými nálezmi (BMD) interpretovali toto zvýšenie ako dôsledok akcelerácie osteoresorpcie pri SSc.

Stone a spol. (14) sa domnievajú, že zvýšená koncentrácia Pyr pri SSc nemusí byť následok len zvýšenej osteoresorpcie, ale môže pochádzať aj z mäkkých tkanív. Predložili jednoduchý spôsob, ako približne kvantifikovať frakciu Pyr v moči pochádzajúcu z mäkkých tkanív („soft-tissue Pyr“, stPyr): keďže pomer Pyr:Dpyr v kostnom kolagéne je asi 3,5:1, dá sa predpokladať, že:

$$\text{stPyr} = \text{Pyr} - 3,5 \times \text{Dpyr} \text{ (v nmol/mmol kreatinínu).}$$

Ukázalo sa, že hodnoty stPyr boli u pacientov so SSc v porovnaní so zdravými kontrolami významne zvýšené. Navyše autori zistili aj zvýšené koncentrácie degradačných produktov elastínu (desmozínu a izodesmozínu) v moči pri SSc. To ich viedlo k predpokladu, že potenciálnym tkanivovým zdrojom stPyr pri SSc môžu byť pľúca. Porovnanie s inými pľúcnymi chorobami (cystická fibróza, chronické obštrukčné pľúcne ochorenie) tento predpoklad nepotvrdilo. Pozorovali však výraznú asociáciu medzi zvýšením stPyr a treťou šesťdesiatimi šliach, ktoré preto označili za jeden z možných zdrojov Pyr.

Predložená práca je príspevkom k tejto veľmi zaujímavej, zatiaľ nevyjasnenej problematike týkajúcej sa zvýšeného výskytu Pyr v moči pacientov so SSc.

## MATERIÁL A METÓDY

V súbore pacientov so SSc sme určovali hodnoty Pyr, Dpyr a stPyr a porovnali ich so zdravými kontrolami (HC) a pacientmi s osteoporózou (OP). Semikvantitatívne vyhodnotenie kožného a orgánového postihnutia pri SSc sme korelovali s nameranými hodnotami stPyr. Porovnali sme aj pacientov s klinicky progredujúcim a stabilizovaným obrazom choroby.

Sledované súbory sa skladali z 24 pacientov so SSc a z 24 pacientov s denzitometricky potvrdenou OP. Súčasťou štúdie bolo aj 11 zdravých dobrovoľníkov s denzitometricky vylúčenou OP. Demografické údaje a klinická charakteristika pacientov so SSc sú v tabuľke 1.

**Tab. 1. Základné demografické a klinické údaje o pacientoch so SSc.**

Počet pacientov	24
Ženy/muži	23/1
Vek (roky, priemer±štandardná odchýlka)	50±14
Vekové rozpätie (roky)	23-75
Trvanie ochorenia (roky, priemer±stand.odchýlka)	7,2±5,4
Časové rozpätie (roky)	1-21
Forma ochorenia (stabilizovaná/progredujúca)	16/8
Postihnutie vnútorných orgánov:	
Ezofág	13 (54 %)
Pľúca	12 (50 %)
Srdce	10 (41 %)
Obličky	2 (8 %)

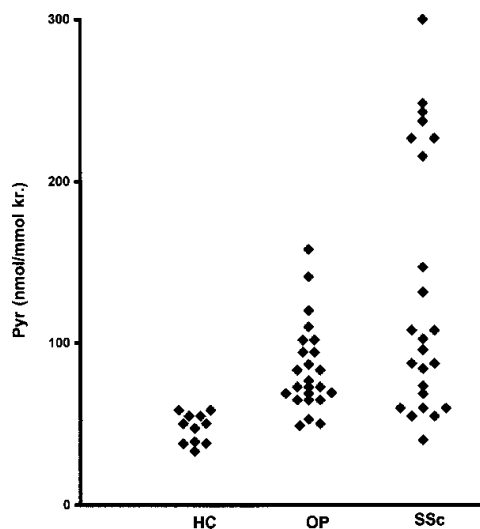
Rozsah dermosklerózy sa hodnotil semikvantitatívne podľa Rodnana a spol. (11). Pri hodnotení rozsahu orgánového postihnutia sa použila semikvantitatívna metóda publikovaná v práci Hughesa a spol. (2).

Vzorky ranného moču získané od pacientov so SSc, OP a zdravých kontrol sa skladovali pri -20 °C až do uskutočnenia analýzy. Pyr a Dpyr v moči sa určovali metódou vysokoúčinnnej ionexovej chromatografie s fluorescenčnou detekciou (5). Po štandardnej príprave vzorky z hydrolyzátu moču na kolónke s mikroparticulárnou celulózu sa Pyr a Dpyr izokraticky separovali na sulfobutylovom katexe (HEMA BIO 1000 SB) a detegovali pri excitačnej vlnovej dĺžke 295 nm a emisnej vlnovej dĺžke 400 nm.

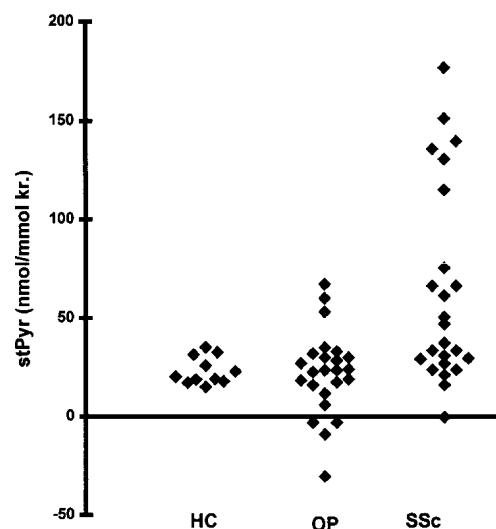
Chromatografický systém bol zostavený z pumpy LC10 AD, detektora RF 551, integrátora CR6 A (Shimadzu, Japonsko), dávkovača R 7725 (Rheodyne, USA) a kolóny 250x4 mm HEMA BIO 1000 SB (Tessek, ČR).

Mobilná fáza bola pripravená zmiešaním 0,45 mol/l roztoku síranu sodného (filtrovaného na 0,4 µm membráne Synpor) a 0,3 mol/l acetátového tlmivého roztoku (pH 3,0) v pomere 9:23. Prietok mobilnej fázy bol 0,8 ml/min.

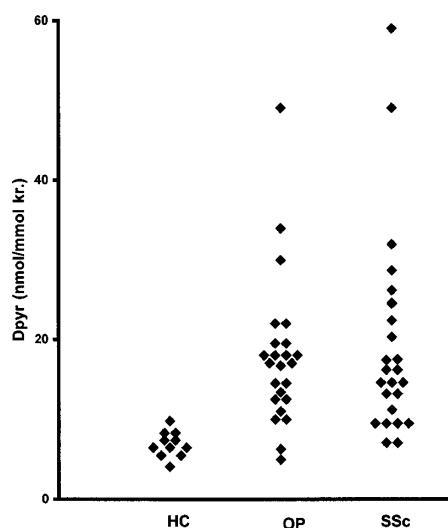
Ako kalibračný roztok pyridinolínov sa využil kalibračný roztok, ktorý je súčasťou kitu „Crosslinks by HPLC“ firmy Biorad (Mníchov, Nemecko). Kreatinín sa určoval spektrofotometricky na automatickom analyzátore Hitachi-Boehringer Mannheim 911.



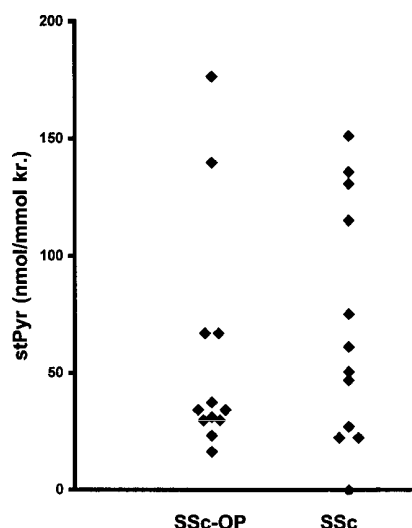
Obr. 1. Pyr v moči u kontrol (HC), pacientov s OP a SSc.



Obr. 3. stPyr v moči u kontrol (HC), pacientov s OP a SSc.



Obr. 2. Dpyr v moči u kontrol (HC), pacientov s OP a SSc.



Obr. 4. stPyr v moči u pacientov s SScs paralelným výskytom OP, resp. bez OP.

Na štatistické spracovanie výsledkov sa použil nepárový Mannov—Whitneyov test a na korelačnú analýzu Spearmanov korelačný koeficient.

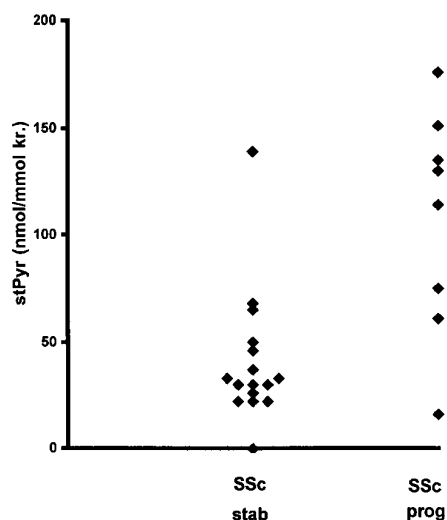
## VÝSLEDKY

Hodnoty Pyr aj Dpyr boli signifikantne zvýšené u pacientov so SSc v porovnaní so zdravými kontrolami (uvedené hodnoty predstavujú stredné hodnoty  $\pm$  štandardné odchýlky: Pyr  $136,5 \pm 96,0$  vs  $47,7 \pm 9,1$  nmol/mmol kreatinínu,  $p \leq 0,001$ , Dpyr  $20,6 \pm 16,7$  vs  $6,9 \pm 1,6$  nmol/mmol kreatinínu,  $p \leq 0,001$ ) (obrázky 1 a 2). V porovnaní so zdravými kontrolami bola u pacien-

tov so SSc výrazne zvýšená, viac než dvakrát, stredná hodnota stPyr ( $62,9 \pm 50,5$  vs  $23,3 \pm 6,9$  nmol/mmol kreatinínu,  $p \leq 0,005$ ). Stredné hodnoty stPyr u pacientov s OP ( $21,9 \pm 21,2$  nmol/mmol kreatinínu) a zdravých kontrol sa signifikantne nelíšili (obr. 3).

U polovice sklerodermických pacientov ( $n=12$ ) bola v čase štúdie diagnostikovaná OP. Hodnoty stPyr sa u pacientov so SSc a OP, resp. bez OP signifikantne nelíšili (stredné hodnoty  $56,5 \pm 50,2$  vs  $69,3 \pm 51,2$  nmol/mmol kreatinínu,  $p=0,68$ ) (obr. 4).

Medzi skóre kožného postihnutia a hodnotami stPyr sme zistili signifikantnú pozitívnu koreláciu ( $r_s=0,57$ ,  $p=0,0063$ ). Výraznú koreláciu sme zaznamenali aj medzi skóre orgánového postihnutia a stPyr ( $r_s=0,58$ ,  $p=0,0057$ ).



Obr. 5. stPyr v moči u SSc pacientov so stabilizovanou a progredujúcou formou ochorenia.

Súbor pacientov so SSc sa rozdelil na základe priebehu ochorenia na stabilizované ( $n=16$ ) a progredujúce formy SSc ( $n=8$ ). Stredná hodnota stPyr u pacientov s progredujúcim ochorením bola  $107,2 \pm 52,7$  nmol/mmol kreatinínu, u stabilizovaných  $40,7 \pm 31,1$  nmol/mmol kreatinínu ( $p \leq 0,02$ ) (obr. 5).

## DISKUSIA

Získané výsledky potvrdzujú pozorovania LaMontagna a spol. (3) a Stonea a spol. (14), že u pacientov so SSc sa vyskytujú zvýšené koncentrácie Pyr v moči. Jednoznačne vyššie hodnoty stPyr u chorých so SSc v porovnaní s chorými s OP i signifikantná korelácia medzi stPyr a skóre orgánového i kožného postihnutia však poukazuje na odlišný tkanivový zdroj zvýšeného Pyr v moči u týchto pacientov. Skutočnosť, že stredná hodnota stPyr v skupine pacientov s paralelným výskytom SSc aj OP neprevyšuje strednú hodnotu stPyr pri SSc bez OP je v súlade s predpokladom, že parameter stPyr neodráža zvýšenú degradáciu kostného kolagénu, ale skôr metabolizmus mäkkých tkanív. Nemožno teda interpretovať zvýšenie Pyr v moči pri SSc len ako dôsledok zrýchlenia osteoresorpcie (aj keď pozorované zvýšenie Dpyr potvrdzuje aj prítomnosť tohto fenoménu).

Zdrojom Pyr môžu byť fibrotizované tkanivá pacientov so SSc. Je známe, že množstvo Pyr v tkanive postihnutých orgánov prepočítané na mól kolagénu sa zvyšuje u pacientov s chronickým fibrotickým pľúcnym ochorením (4) aj pri fibrotických ochoreniach pečene rôznej etiológie (8). Ako potenciálny zdroj nemožno vylúčiť ani kožu, v ktorej tiež dochádza k akumulácii Pyr za určitých patologických podmienok napríklad v hypertrofických jazvách (6).

Na základe získaných poznatkov možno predpokladať, že zvýšené vylučovanie Pyr a Dpyr u pacientov so SSc neodráža len lokalizované sekundárne zmeny kostného obra-

tu a zápalové postihnutie šliach, ale aj kvalitatívne zmeny stabilizácie kolagénových fibríl priečnoväzbovými zlúčeninami pyridinolinového typu vo fibrotizovaných mäkkých tkanivách. Z hľadiska klinického významu určovania stPyr je zaujímavé, že zvýšené hodnoty stPyr v moči nachádzame najmä u pacientov s progredujúcou formou ochorenia.

## LITERATÚRA

1. Eyre, D.R., Koob, T.J., Van Ness, K.P.: Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 137, 1984, s. 380—388.
2. Hughes, P., Holt, S., Rowell, N.R., Dodd, J.: Thymus-dependent (T) lymphocyte deficiency in progressive systemic sclerosis. *Brit J Dermatol*, 95, 1976, s. 469—473.
3. La Montagna, G., Baruffo, A., Abbadessa, S., Maja, L., Tirri, R.: Evidence for bone resorption in systemic sclerosis. *J Rheumatol*, 22, 1995, s. 797—799.
4. Last, J.A., King, T.E., Nerlich, A.G., Reiser, K.M.: Collagen crosslinking in adult patients with acute and chronic fibrotic lung disease. *Amer J Pathol*, 141, 1990, s. 307—313.
5. Lichý, A., Macek, J., Adam, M.: Determination of hydroxylslypyridinoline in tissues and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 563, 1991, s. 153—157.
6. Moriguchi, T., Fujimoto, D.: Crosslink of collagen in hypertrophic scar. *J Invest Dermatol*, 72, 1979, s. 143—145.
7. Pasquali, M., Still, M.J., Dembure, P.P., Elsas L.J.: Pyridinium crosslinks in heritable disorders of collagen. *Amer J Hum Genet*, 57, 1995, s. 1508—1510.
8. Ricard-Blum, S., Bresson-Hadni, S., Ville, G., Grimaud, J.: Hydroxypyridinium collagen cross-links in human liver fibrosis: Study of Alveolar Echinococcosis. *Hepatology*, 15, 1992, s. 599—602.
9. Robins, S.P.: Functional properties of collagen and elastin. *Baillières Clin Rheum*, 2, 1988, s. 1—36.
10. Robins, S. P., Black, D., Paterson, R.C., Reid, D.M., Duncan, A., Seibel, M.J.: Evaluation of urinary hydroxypyridinium crosslink measurement as resorption markers in metabolic bone disease. *Europ J clin Invest*, 21, 1991, s. 310—315.
11. Rodnan, G.P., Lipinski, E., Luksick, J.: Skin thickness and collagen content in progressive systemic sclerosis and localised scleroderma. *Arthr Rheum*, 22, 1979, s. 130—140.
12. Seibel, M.J., Robins, S.P., Bilezikian, J.P.: Urinary pyridinium crosslinks of collagen. *Trends Endocrinol Metab*, 3, 1992, s. 263—270.
13. Seibold, J.R.: Scleroderma. S. 1113—1143. In: Kelley, W. (Ed.): *Textbook of rheumatology*. Philadelphia, W. B. Saunders Company 1993.
14. Stone, P.J., Korn, J.H., North, H., Lally, E.V., Miller, L.C., Tucker, L.B., Strongwater, S., Snider, G.L., Franzblau, C.: Cross-linked elastin and collagen degradation products in the urine of patients with scleroderma. *Arthr Rheum*, 38, 1995, s. 517—524.
15. Štork, J.: Metabolizmus kolagénu. S. 28—30. In: Štork, J.: *Sklerodermie*. Praha, Galén 1996.
16. White, B.: Immunologic aspects of scleroderma. *Curr Opin Rheumatol*, 7, 1995, s. 541—545.

Do redakcie došlo 28.7.1997.

Adresa autora: Mgr. R. Ištók, Výskumný ústav reumatických chorôb, Nábřežie I. Krasku 4, 921 01 Piešťany, Slovensko.