

## **Rol of Serum Angiopoietin-2 and Von Willebrand Factor in Renal Affection Syrian Patients with Systemic Lupus Erythematosus**

**Dr. Jomana Saleh\***

**(Received 29 / 5 / 2017. Accepted 5 / 9 / 2017)**

### **□ ABSTRACT □**

**Background:** Several lines of evidence demonstrate excessive endothelial activation in systemic lupus erythematosus (SLE). Angiopoietin-2 (Ang-2) and Von Willebrand Factor are two biomarkers of endothelial cell activation that may be clinically useful in SLE.

**Objective:** to examine the clinical utility of two proposed biomarkers of endothelial activation; angiopoietin-2 and Von Willebrand Factor in SLE correlating their serum concentration with disease activity and renal affection.

**Subjects and methods:** Ang-2 and Von Willebrand Factor were measured in sera obtained from 60 patients with SLE (6 male patients and 54 female) and 30 healthy controls by ELISA methodology. Disease activity was calculated according to the SLE Disease Activity Index (SLEDAI). Patients were classified according to disease activity and renal involvement.

**Results:** Both Ang-2 and WF concentrations were increased in patients with SLE in comparison to controls ( $P < 0.001$ ). Both Ang-2 and WF were significantly higher in the active group and active nephritis subgroup in comparison to inactive group and active patients without nephritis, respectively ( $P < 0.001$ ). Both markers were positively correlated with SLEDAI and protein/ creatinine ratio. Serum Ang-2 was superior to serum WF as predictor of SLE activity and discriminator of lupus nephritis.

**Conclusion:** We can Rely on Elevated concentrations of circulating Von Willebrand Factor and Ang-2 as biomarker of disease activity and renal affection in SLE. We found that Serum Ang-2 was superior to serum Von Willebrand Factor as predictor of SLE activity and nephritis. These Results should be conducted to put serum Ang-2 as a candidate drug target where functional blockade could seem to protect against endothelial damage in such disease.

**Key words:** Systemic lupus erythematosus, angiopoietin-2, soluble thrombomodulin, SLEDAI.

## دور الأنجيوبويتين-2 (ANG-2) المصلي وعامل فون ويلبراند Von Willebrand Factor في تطور العلة الكلوية لدى مرضى الذآب الحمامي السوريين

الدكتورة جمانة صالح\*

(تاريخ الإيداع 2017 / 5 / 29. قُبل للنشر في 2017 / 9 / 5)

### □ ملخص □

**الخلفية العلمية** أثبتت العديد من الدراسات وأشارت إلى العلاقة الوطيدة ما بين الأذية البطانية ومرض الذآب الحمامي الجهازى. يعد  $Angiopoietin-2$  و  $Von Willebrand Factor$  two واصمان مهمان في تفعيل الخلية البطانية مما قد يجعله مفيد سريرياً في SLE.

**هدف الدراسة** فحص الاستخدامات السريرية المتعددة للواصمين الحيويين المقترحين للتفعيل البطني وهما الانجيوبويتين-2 وعامل  $Von Willebrand Factor$  عند الأشخاص المصابين بمرض الذئبة الحمامية الجهازية وكذلك تحديد التراكيز المصلية لكلا الواصمان والمرتبطة بالعلة الكلوية لهذا المرض.

**المواد والطرق** حددت التراكيز المصلية لكل من  $Ang-2$  و  $WF$  في مصول 60 مريضاً مصاباً بمرض الذئبة الحمامية الجهازية SLE (6 ذكور و 54 إناث) و 30 شواهد أصحاء بطريقة وفق منهجية الإليزا enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**النتائج** كانت نسب كل من الأنجيوبويتين وعامل  $Von Willebrand Factor$  تزداد بالمقارنة مع الأصحاء ( $P<0.001$ )، كما سُجِّلت مستويات مرتفعة لكلا الواصمين عند مجموعة الأشخاص المصابين بالذئبة الحمامية النشطة والمجموعة الفرعية للأشخاص المصابين بالتهاب الكلية.

أظهر كل من الواصمين ارتباط إيجابي مع (SLEDAI) ومعدل بروتين/ كرياتينين، كما أن مستويات الأنجيوبويتين-2 المصلية كانت أعلى من مستويات عامل  $Von Willebrand Factor$  المصلية كمؤشر لنشاط مرض الذئبة الحمامية الجهازية ومميز لالتهاب الكلية المصاحبة لهذا المرض.

**الاستنتاجات** يمكن الاعتماد على التراكيز المرتفعة من عامل فون ويلبراند والأنجيوبويتين-2 في جهاز الدوران كواصمين حيويين لتحديد نشاط مرض الذآب الحمامي الجهازى والعلة الكلوية المرتبطة به، وجدنا أن مستويات الأنجيوبويتين-2 المصلية كانت أعلى من مستويات عامل فون ويلبراند المصلية لذلك تعدد كمؤشر لنشاط مرض الذئبة الحمامية الجهازية والالتهاب الكلوي، حيث تبين هذه النتائج إمكانية استخدام مصل الأنجيوبويتين-2 كهدف دوائي مرشح وظيفته الحماية ضد الأذية البطانية لهذا المرض.

**الكلمات المفتاحية:** الذئبة الحمامية الجهازية، الأنجيوبويتين-2، الترومبومودولين المنحل، SLEDAI.

\* أستاذ مساعد - كلية الصيدلة - جامعة دمشق

## مقدمة

الذئبة الحمامية الجهازية Systemic lupus erythematosus مرضٌ مناعيٌ ذاتيٌ يتميزُ بتشكُّلِ معقداتٍ مناعيةٍ تحتوي على مزيجٍ معقدٍ من الحموض النووية للمستضدات الذاتية والبروتينات المرتبطة بالحموض النووية والأجسام الضدّية الذاتية المتعلقة بها تتوضّع هذه المعقدات المناعية، في الذئبة الحمامية الجهازية في العديد من الأعضاء، ويكونُ الاعتلالُ الوعائي والالتهابُ الوعائي اختلاطينِ نموذجيينِ ومرتبطينِ بتوضّع المعقدات المناعية على البطانة الوعائية وبالتشيط البطاني وارتشاح الخلايا الالتهابية [1].

الذآب مرض مزمن لا يمكن التنبؤ بسيره وله طيف واسع من الأعراض تتراوح بين الخفيفة والشديدة وينتهي بالموت إن لم يعالج . يتميز هذا المرض بعلامة رئيسية هي الطفح الأحمر red rash على منطقة الأنف والخدين ومنه أخذ اسمه lupus erythematosus. تشمل الأفات الداخلية الأكثر خطورة الكليتين والأوعية الدموية وخلايا الدم والقلب ويترافق مع ظواهر مناعية عديدة تشمل فرط غاما غلوبولين الدم ونقص المتممة [1].

بالعموم فإن SLE مرض جهازى غير معروف السبب يتميز باضطراب مناعي يحدث فيه تأذي الخلايا والأنسجة تحت تأثير أزداد ذاتية autoantibodies ومعقدات مناعية وهو يصيب عدة أعضاء وبشكل خاص الجلد والمفاصل والجهاز الوعائي [1].

تبقى إمرضيته غير معروفة إلى الآن ولا يزال السبب المحفز مبهماً إلا أن هناك دلائل تشير إلى وجود تأثيرات بين الشذوذات المشفرة وراثياً للجهاز المناعي والعوامل خارجية المنشأ المسرعة لحدوث الإصابة مثل UVA و UVB والأدوية والحمل والكرب النفسي [1].

يتميز تشيطُ التفعيل البطاني بتغيرات في النمط الظاهري من الحالة الخاملة غير الحساسة إلى الحالة الحساسة، أو من حالة عدم استجابة إلى حالة الاستجابة [2]. يكون النمط الظاهري للخلية الظهارية المفعلة نوداً وما قيل خثاري وقبل التهابي. إن حالة التفعيل للطبقة البطانية هي محدد رئيسي للإبتداء، التوضع، مدى وانتشار الضرر الالتهابي، ولذلك فإن عوامل تفعيل الخلية البطانية أو الضرر هي محط اهتمام كبير [3].

برز في السنوات القليلة الماضية دور الأنجيوبويتين ANG-2 كمفتاح وسيط لتفعيل الخلية البطانية، حيث يتم إنتاج الأنجيوبويتين ANG-2 عبر الخلايا البطانية ويتم تخزينه فيها في أجسام تدعى (WPBs) Weibel-palade Bodies وبالتالي فإنه يتوفر بسهولة بعد التحفيز البطاني وينتج تحرر الأنجيوبويتين ANG-2 عن زعزة الاستقرار السريعة للبطانة واقترح أن الأنجيوبويتين ANG-2 يعمل كمنظم سلبي ذاتي للبطانة الهادئة في حالة الراحة ويعمل كمنظم الإفراز للبطانة المستقرة والخاملة بل وأكثر من ذلك، فإن الأنجيوبويتين ANG-2 يطلق رد فعل التهابي عبر تفعيل البطانة وتحريض النفوذية [4]. تم التعرف مؤخراً على نظام مستقبلات الأنجيوبويتين ANG-2 على أنها المنظم الرئيسي لقابلية الاستجابة الوعائية للمرضات الالتهابية و وصف التفعيل البطاني على أنه الحدث الرئيسي لتجميع ولتوظيف الكريات البيضاء وتسريع التصلب العصيدي في الذئبة الحمامية الجهازية، مما يشير إلى أن التشيط البطاني في الذئبة الحمامية يمثل عملية معتمدة على (Ang-2) [5] ، بما أن التفعيل البطاني في الذئبة الحمامية الجهازية يمثل عملية معتمدة على ANG-2 فمن المفترض أن تعكس نسبة ANG-2 الموجودة في الدوران مدى الخلل الحاصل في السطح البطاني المنشط [6].

يعتبر عامل فون ويلبراند (Von Willebrand Factor) بروتين سكري متعدد القسيمات ذو وزن جزيئي كبير، مكون من سلسلة من تحت الوحدات الناضجة، يتواجد في البلازما ويتم إنتاجه البيولوجي من قبل الخلايا البطانية

والنواء وإن العامل فون ويلبراند المصنع في الخلايا البطانية إما أن يخزن في أجسام تدعى Weible Palade bodies (WBPs) ضمن البطانة أو يفرز في البلازما والذي يعكس بدوره مستويات فون ويلبراند الجائل في الدوران، بينما فون ويلبراند المصنع في الصفائح يشكل 10-20 % من مجمل العامل الموجود في الجسم ويتم تخزينه في حبيبات تدعى ألفا  $\alpha$ ، ويحرر منها عقب عملية تفعيل الصفائح وتشكل الخثرة [7].

يلعب هذا العامل دوراً أساسياً في عملية الارتقاء الأولي والثانوي وتعود وظيفته البدئية الى دعم التصاق الصفائح مع تحت البطانة subendothelium من خلال تشكيل جسر بين مكونات تحت البطانة ومستقبلات الصفائح وذلك في مواقع الأذية الوعائية، كما أنه يرتبط مع الفيبرينوجين وبالتالي يدعم تشكل الخثرة وثباتها، أما دوره الآخر يتجلى بقدرته على الارتباط مع العامل الثامن VIII حيث يعد حاملاً له في البلازما وبالتالي يحميه من التحلل السريع ويطيل نصف عمره [8].

يدعم العامل WF التصاق الصفائح وتكدسها في مواقع الأذية الوعائية في ظروف إجهاد قص عالي، وذلك من خلال تشكيل جسر bridging بين المستقبلات السطحية الموجودة على سطح الصفائح وبين مقومات القالب تحت البطاني subendothelium مما يساهم في تشكيل السدادة الصفحية [9].

في مرحلة الراحة لا يرتبط WF الجائل مع الصفائح، إذ يتواجد في البلازما بشكله الكروي المطوي غير الفعال، ويكون غير قادر على الارتباط مع الصفائح. ولكن عند حدوث أذية في البطانة تحدث تغيرات في هيئة العامل WF تؤدي إلى عدم تطويه unfold وتحوله إلى الشكل المتطاوول elongated form، وهذا الشكل يكشف مواقع ارتباطه الدفينة [9].

تتضمن الأذية الالتهابية الوعائية في الذئبة الحمامية الجهازية تأثيراً ضاراً على الخلايا البطانية، إفراز موضعي للسيتوكينات وطلائع الالتهاب عامل التنخر الورمي (TNF-a) أو الانترلوكين-1 (IL-1)، ترسب المعقدات المناعية ICs، زيادة إنتاج أوكسيد النترجين وزيادة التعبير عن جزيئات الالتصاق مما يؤدي إلى التصاق العدلات وتفعيل البطانة [9, 10].

تفرز العدلات بعد الالتصاق العديد من الأنزيمات مثل ميلوبيروكسيداز myeloperoxidase والإستاز elastase مما يؤدي إلى إصابة البطانة وهذا يعكس تحرر كميات متزايدة من عامل فون ويلبراند إلى الدوران [11]. بالتالي فإن المستويات المرتفعة منه في المصل بعد الأذية البطانية وصفت على أنها مؤشر للحالة قبل الخثرية في الذئبة الحمامية الجهازية [12]. لذلك فإنه يمكن أن يكون للواصمات الحيوية في الدم المحيطي لتفعيل الخلية البطانية استخدام سريري في الذئبة الحمامية الجهازية.

## مشكلة البحث

لا تزال الإصابة بأمراض المناعة الذاتية معضلة صحية كبيرة يجب الاهتمام بها خاصة في بلادنا. تتوضح العديد من الأدلة على التنفيع البطاني المفرط في مرض الذئبة الحمامية الجهازية، مما يلقي الضوء على دور واصمين حيويين هامين بتنفيع الخلية البطانية هما الانجيوپويتين (Ang-2) وعامل Von Willebrand Factor المتوقع أن يكون لهما فائدة سريرية في مرض الذئبة الحمامية الجهازية.

## أهمية البحث وأهدافه

• فحص الاستخدامات السريرية المتعددة للواصمين الحيويين المقترحين لتنفيع البطاني وهما الانجيوپويتين-2 وعامل Von Willebrand Factor عند الأشخاص المصابين بمرض الذئبة الحمامية الجهازية.  
• تحديد التراكيز المصلية والتي ترتبط بوجود نشاط المرض والعلّة الكلوية.

## طرائق البحث ومواده

### الاعتيان والمرضى

تمّ إخضاع ستين مريضاً مُصاباً بالذئبة الحمامية معتمدين معايير تصنيف الذئبة الحمامية الجهازية، وقد تطوعوا من عيادات المرضى المصابين بالأمراض الرثوية [13] والقسم الطبّي الداخلي للأمراض الرثوية في مستشفى المواساة ومشفى الأسد الجامعي في دمشق حيث تمّ استبعاد المصابين بأية أمراض أخرى أو حتى خباثات، بالنسبة للمرضى عددهم 6 ذكور و54 وخمسين أنثى وأعمارهم تتراوح من 20-39 سنة ومتوسط أعمارهم 24 سنة. تم أخذ التاريخ المرضي الكامل وأجريت الفحوص السريرية لجميع المرضى وأجري تقييم فعالية المرض باستخدام مؤشر فعالية مرض الذئبة الحمامية الجهازية (SLEDAI) [14].

تمّ تقسيم مرضى الذئبة الحمامية تبعاً لنشاط المرض إلى مجموعتين:

• مجموعة ذئبة حمامية غير نشطة تضمّ عشرين مريض (SLEDAI >6).

• مجموعة ذئبة حمامية نشطة تضمّ أربعين مريض (SLEDAI <6).

وتمّ تقسيم مجموعة الذئبة الحمامية النشطة إلى مجموعتين حسب غياب أو وجود التهاب الكبد والكلية إلى:

• مجموعة تضمّ المرضى المصابين بالذئبة الحمامية النشطة مع وجود التهاب كبد وكلية (n=28).

• مجموعة تضمّ المرضى المصابين بالذئبة الحمامية دون وجود التهاب كلية (n=12).

حدّدت الذئبة الحمامية النشطة مع التهاب الكلية كدليل مرضي نسيجي لالتهاب الكبيبات الكلوية، إضافة إلى التصنيف الحالي لفهرس نشاط مرض الذئبة الحمامية الجهازية.

إنّ العناصر المكونة للمرحلة الرابعة للأذية الكلوية حسب فهرس نشاط مرض الذئبة الحمامية الجهازية هي:

• بيلة دموية (أكثر من خمس كريات حمراء في الساحة العالية التكبير بعد استبعاد الحصى، الإنتانات

والمسببات الأخرى).

• بيلة قيحية التهابية (أكثر من خمس كريات بيضاء في الساحة العالية التكبير بعد استبعاد الإنتانات).

• بيلة بروتينية (أكثر من 0.5 ملغ / 24 ساعة كبدائية ويمكن يستمر في الزيادة أعلى من 0.5 ملغ / 24

ساعة).

• اسطوانات بولية (حبيبية أو من خلايا دموية حمراء).

أيضاً، تم شمل التأثير الصحي الواضح للعمر الثلاثيني والاتصال الجنسي دون أية أدلة على الاضطرابات الرئوية والمرض الطبي المزمن.

المجموعة المعيارية تضم (27) أنثى و(3) ذكور أعمارهم تتراوح من (23) إلى (31) سنة والوسطي لهم (26) سنة.

تم تحديد التعداد الدموي الكامل (CBC) باستخدام عدادة نيوباور الألمانية وتحديد سرعة التثقيل للكريات الحمراء (سرعة التثقيل الدموي تقاس بمل/ساعة) في الساعة الأولى بطريقة Westergren، في مخبر الأحياء الدقيقة في كلية الصيدلة، جامعة دمشق.

كما تم تحديد القياس النوعي للأضداد المصلية المضادة لطاقي الدنا بواسطة (EIA) وقياس مستويات شدف المتممة الثالثة والرابعة (C3 و C4) بطريقة nephelometric مستخدمين جهاز التحليل البشري Minineph™ لحواظ المتممة الثالثة والرابعة، كما تم قياس الكرياتينين المصلي، وذلك في مخبر مشفى الأسد الجامعي.

تم قياس مستويات الواصمين الأنجيوبويتين والعامل فون ويلبراند عن طريق عينات المصل المأخوذة من سنتين مريض مصابين بالذئبة الحمامية (سنة ذكور وأربعة وخمسين إناث) ومن خلال مراقبة ثلاثين شخصاً صحياً وفق منهجية الإليزا (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)، كما تم حساب وتحليل بيانات 60 مريضاً وعرضت المميزات السريرية والعمرية الرئيسية في الجدول (1).

جدول(1): التظاهرات السريرية والعمرية حسب جهاز تقييم مؤشر فعالية مرض الذئبة الحمامية الهازية لمرضى الذئبة الحمامية.

القياس	مرضى الذئبة الحمامية الجهازية (n=60)
البيانات الاحصائية	
العمر (سنوات)، متوسط (25-75) %	24(20-39)
الجنس، انثى، %	90%
المظاهر السريرية	
التهاب الاوعية الدموية %	5%
التهاب المفاصل %	23.3%
التهاب العضلات %	1.6%
اطراح البول %	6.6%
بيلة دموية %	5%
بيلة بروتينية %	46.6%
طفح جلدي جديد %	8.3%
تساقط الشعر %	8.3%
تقرحات الفم %	13.3%
ذات الجنب %	1.6%

انخفاض المتممة المناعية %	58.3%
اضداد ضد-الدنا %	43.3%
نقص الصفائح %	10%
نقص الكريات البيض %	23.3%

### التحليل الإحصائي

تم استخدام احصاء (IBM SPSS) للتحليل البياني، وتم التعبير عن البيانات باستخدام النسب الوسطية الربعية الدنيا والعليا، والتعبير عن البيانات الاسمية كتكرار ونسب مئوية، تمت المقارنة بين المرضى والمرجعين وبين المرضى ذات المجموعات الفرعية باستخدام اختبار Mann-Whitney ، كما تم حساب العلاقات بين تراكيز الانجيوبويتين والعامل فون ويلبراند والمعالم المختلفة باستعمال اختبار ترابط مرتبة Spearman.

عينت القيم الحدية المرضية المثالية للواصمين من خلال حساب المساحات تحت المنحني (ROC) لتحديد الاختلاف بين مرضى الذئبة الحمامية الجهازية مع أو بدون نشاط ومرضى الذئبة الحمامية الجهازية مع أو بدون التهاب كلية.

اعتبرت القيم المتوقعة الأقل من (0.05) هامة، أما القيم المتوقعة الأقل من (0.001) كانت في غاية الأهمية.

### النتائج والمناقشة

#### النتائج

كانت نسب كل من الأنجيوبويتين والعامل فون ويلبراند مرتفعة بالمقارنة مع الأصحاء ( $P < 0.001$ )، كما سُجِّلت مستويات مرتفعة لكلا الواصمين عند مجموعة الأشخاص المصابين بالذئبة الحمامية النشطة والمجموعة الفرعية للأشخاص المصابين بالتهاب الكلية.

أظهر كل من الواصمين ارتباط إيجابي مع (SLEDAI) ومعدل بروتين/كرياتينين عال، كما أن مستويات الأنجيوبويتين - 2 المصلية كانت أعلى من مستويات العامل فون ويلبراند المصلية كمؤشر لنشاط مرض الذئبة الحمامية الجهازية ومميز لالتهاب الكلية المصاحبة لهذا المرض.

كان متوسط تركيز المصل لكلا الواصمين عالي بصورة واضحة لمجموعات جزئية مختلفة من مرضى الذئبة الحمامية الجهازية مقارنة بالأصحاء ( $p < 0.001$ ) الجدول (2).

جدول (2): مقارنة بين مجموعة الشواهد الاصحاء ومختلف مجموعات المرضى الفرعية آخذين

بعين الاعتبار مستويات ANG-2 والعامل فون ويلبراند المصلية.

المجموعات الجزئية المدروسة	مستوى الانجيوبويتين (بيكوغرامل)	قيمة p	مستوى العامل فون ويلبراند (بيكوغرامل)	قيمة p
الاصحاء n=30	270 (190-276.2)	-----	100 (95-150)	-----
كل المرضى n=60	880 (492.5-1178.5)	>0.001**	850 (600-1075)	>0.001**

**0.001>	(1500-812.5)1000	**0.001>	(1600-870)1055	النشطين n=40
**0.001>	(600-275)450	**0.001>	(497.5-405)455	غير النشطين n=20
**0.001>	(1537.5-1000)1150	**0.001>	(1775-1050)1250	النشطين مع التهاب كلية n=28
**0.001>	(837.5-600)725	**0.001>	(847.5-727.5)765	النشطين بدون التهاب كلية n=12

0.05<P: اختلاف غير ملحوظ

0.05>P: اختلاف ملحوظ (\*)

0.001>P: اختلاف ملحوظ بشكل كبير (\*\*)

يبين الجدول (3) والشكل (1) نتائج مقايسة مؤشرات الواصمات الحيوية لمجموعات جزئية في المجموعات النشطة من مرضى مع أو بدون التهاب كلية، كل من الانجيوبوتين-2 والعامل فون ويلبراند المصليين كان مرتفع بشكل واضح لمجموعة المرضى النشطين مع التهاب كلية (p<0.001).

جدول (3): مقارنة انجيوبوتين المصل والعامل فون ويلبراند بين مرضى نشطين

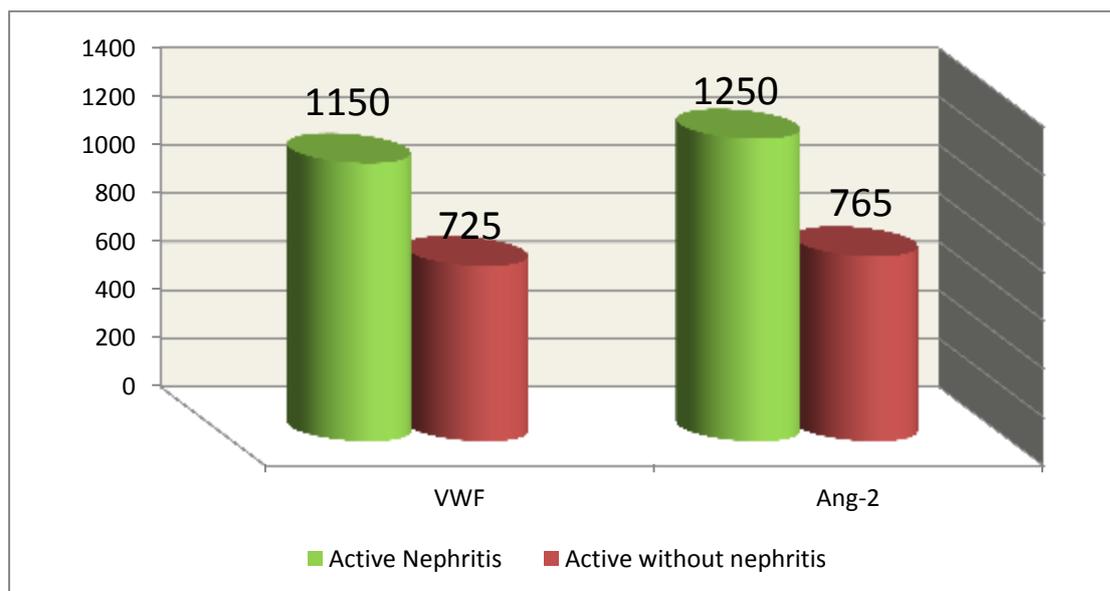
مع التهاب كلوي ونشطين بدون التهاب كلوي لمجموعات من مرضى الذئبة الحمامية الجهازية:

قيمة الـ p	المرضى النشطين n=40		المجموعات القياس
	بدون التهاب كلية n=12 متوسط (75-25)%	مع التهاب كلية n=28 متوسط (75-25)%	
**0.001>	(847.5-727.5)765	(1775-1050)1250	الانجيوبوتين (بيكوغامل)
**0.001>	(837.5-600)725	(1537.5-1000)1150	العامل فون ويلبراند (بيكوغامل)

0.05<P: اختلاف غير ملحوظ

0.05>P: اختلاف ملحوظ (\*)

0.001>P: اختلاف ملحوظ بشكل كبير (\*\*)



الشكل (1): مقارنة بين ANG-2 والعامل فون ويلبراند لدى مجموعة المرضى الذين لديهم الذئبة الحمامية مع التهاب الكلى الحمامي والمرضى الذين لديهم الذئبة الحمامية بدون التهاب الكلى الحمامي.

تبين عبر دراسة علاقات الارتباط ضمن مجموعة المرضى الذين يعانون من مرض الذئبة الحمامية مع التهاب الكلى الحمامي أن مستويات العامل فون ويلبراند المصلية تبدي ارتفاعاً ملحوظاً بمستوى نتروجين يوريا الدم، الكرياتينين، معدل البروتين/كرياتينين، ونتيجة مؤشر فعالية مرض الذئبة الحمامية الجهازية SLEDAI (0.75 , 0.78 , 0.79) (على التوالي) ( $P < 0.001$ ).

بشكل مشابه، أظهر الانجوبوتين علاقة ايجابية واضحة بصورة كبيرة مع يوريا المصل، الكرياتينين، معدل (البروتين/الكرياتينين) وسجل (SLEDAI) ( $r = 0.72, 0.70, 0.96$  على الترتيب) ( $p < 0.001$ ).

بالإضافة الى العلاقات الايجابية الواضحة مع المستويات المضادة للدنا ثنائي الطاق ( $r = 0.72, p = 0.05$ )

الجدول (4).

جدول (4): العلاقات بين كلا العامل فون ويلبراند والانجوبوتين المصليان

ومختلف المتغيرات المصلية المدروسة ضمن مجموعة مرضى نشطين بالذئبة الحمامية الجهازية.

العامل فون ويلبراند		الانجوبوتين		القياس
قيمة p	قيمة r	قيمة p	قيمة r	
$0.05 <$	$0.11-$	$0.05 <$	$0.19-$	الهيموغلوبين(غ/دل)
$0.05 <$	0.13	$0.05 <$	0.11	TLC
$0.05 <$	$0.22-$	$0.05 <$	$0.14-$	اللمفاويات (ل/109)
$0.05 <$	0.19	$0.05 <$	0.16	الصفائح(ل/109)
$0.05 <$	0.17	$0.05 <$	0.20	سرعة التثفل(مم/سا)
$**0.001 >$	0.79	$**0.001 >$	0.79	البروتين/الكرياتينين
$**0.001 >$	0.75	$**0.001 >$	0.72	يوريا(مغ/دل)

**0.001>	0.78	**0.001>	0.70	الكرياتينين(مغ/دل)
0.05 <	0.30-	0.05 <	0.29-	C3(مغ/دل)
0.05 <	0.29-	0.05 <	0.26-	C4(مغ/دل)
0.05 <	0.30	*0.05	0.38	اضداد ضد-الدنا ثنائي الطاق
**0.001>	0.75	**0.001>	0.96	مجموع SLEDAI

تم دراسة المساحة تحت المنحني ROC لتقييم المستويات الحدية المتعددة مما يساعد في تقصي فعالية الذئبة الحمامية الجهازية وكشف الالتهاب الكلوي، وجدنا أنه عندما يكون العامل فون ويلبراند المصلي بقيمة الحدية المثلى <600 بيكوغ/مل، يكون لدينا حساسية تشخيصية، نوعية، قيم متوقعة ايجابية وسلبية وفعالية تبلغ 87.5%، 95%، 97.2%، 79.2%، 90% على الترتيب مما مكن التمييز بين المرضى النشطين وغير النشطين. بينما كانت مصداقية اختبارات التشخيص بالنسبة للأنجيوبوتين 100% لكل المعايير (الحساسية، النوعية، القيم المتوقعة الإيجابية والسلبية، والفعالية) بمستوى حدي <580 بيكوغ/مل الجدول (5).

الجدول(5): علاقة مستويات العامل فون ويلبراند وأنجيوبوتين المصل مع، C3، C4 وضد-الدنا ثنائي الطاق على اساس نشاط المرض.

القياس	الحدية	النوعية %	الحساسية %	P-	P+	الفعالية
العامل فون ويلبراند (بيكوغ/مل)	<600	95	87.5	7902	97.2	90
انجيوبوتين (بيكوغ/مل)	<580	100	100	100	100	100
C3 (مغ/دل)	>115	95	92.5	8604	97.4	93.3
C4 (مغ/دل)	>16	100	85	7609	100	90
ضد-الدنا (وحدة دولية/مل)	<24	90	100	100	95.2	96.7

P: قيم متوقعة

للتمييز بين المرضى مع التهاب الكلوي كان المستوى الحدي الأمثل <800 بيكوغ/مل، مع حساسية تشخيصية، نوعية، قيم متوقعة ايجابية وسلبية هي 96.4%، 83.3%، 93%، 91%، و92.5% على الترتيب، بينما مستوى الحدي الأمثل للأنجيوبوتين كان <925 بيكوغ/مل، ومطابق 100% لكل معايير مصداقية التشخيص (الحساسية، النوعية، القيم المتوقعة الإيجابية والسلبية، والفعالية) الجدول (6).

الجدول (6): علاقة مستويات العامل فون ويلبراند وانجوبيوتين المصل مع C3 ،  
C4 وضد الدنا ثنائي الطاق على اساس الانتان الكلوي في الذئبة الحمامية الجهازية.

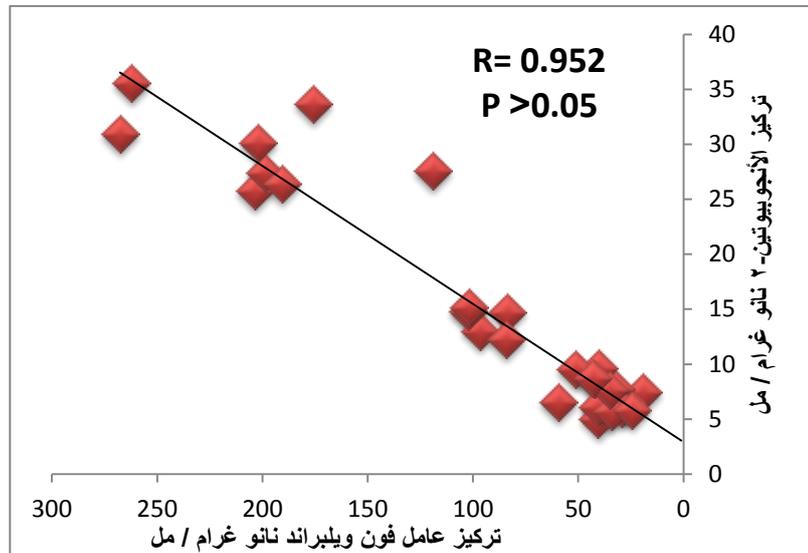
القياس	الحدية	النوعية %	الحساسية %	P-	P+	الفعالية
العامل فون ويلبراند (بيكوغرامل)	800<	83.3	96.4	91	93	92.5
انجوبيوتين (بيكوغرامل)	925<	100	96.4	92.3	100	97.5
C3 (مغادل)	75>	50	64.3	37.5	75	60
C4 (مغادل)	14>	50	60.7	35.3	73.9	57.5
ضد الدنا (وحدة دولية/امل)	130<	83.3	75	58.8	91.3	77.5

P : قيم متوقعة

تم دراسة الارتباط بين مستويات معالم تخرب البطانة وتأديها من خلال المستويات البلازمية للعاملين VWF ،

TM

عند دراسة علاقة الارتباط بين المستويات البلازمية لكلا الواصمين لدى المرضى: تبين وجود علاقة ارتباط إيجابي يُعتد بها إحصائياً حيث كانت قيمة عامل الارتباط ( $R=0.952$ ) وقيمة  $P<0.05(0.000001)$  كما هو موضح بالشكل (2)



الشكل(2) علاقة الارتباط بين المستويات البلازمية لعامل فون ويلبراند والأنجوبيوتين لدى المرضى الخاضعين للدراسة.

بينت دراستنا وجود علاقة ارتباط إيجابي هام يُعتد بها إحصائياً بين المستويات البلازمية للواصمين، والتي تتسبب بتخرب خلايا البطانة الوعائية وحدوث انشطار وتحرر عامل فون ويلبراند من سطح هذه الخلايا [15] وهذا ما يفسر علاقة الارتباط الإيجابي بين هذين الواصمين، وبما أن معظم المستويات البلازمية للأنجوبيوتين وعامل فون ويلبراند تكون ناتجة عن تحررها من خلايا البطانة الوعائية فبالتالي يمكن اعتبارهما كواصمات تدل على وجود أذية وعائية [16, 17].

## المناقشة

يحدث الخلل الوظيفي البطاني في SLE بواسطة تعتقد عوامل الخطورة التقليدية، والتأثيرات الضائرة للمعالجة و SLE بحد ذاته كعامل خطورة مستقل والذي يعتبر فيه تفعيل الخلايا البطانية الوعائية المتواسط مناعياً كآلية فيزيولوجية مرضية محتملة لضرر الأعضاء الجهازية [18].

يتحرر Ang-2 من قبل الخلايا البطانية الوعائية ويمثل سيتوكين هام يسهم في النشاطات الفيزيولوجية والأحداث الفيزيولوجية المرضية للخلايا البطانية. كما يعتبر العامل فون ويلبراند غليكوبروتين سطحي خلوي ويتواجد في الخلايا البطانية الوعائية نوعياً، كما يعتبر واصم جزئي للأذية البطانية [19].

في هذه الدراسة، أظهرت مستويات Ang-2 والعامل فون ويلبراند المصلية زيادة معتبرة جداً لدى مرضى الذئبة الحمامية النشطة. SLE بالمقارنة مع مرضى الذئبة الحمامية غير النشطة والشواهد الأصحاء. وهذا يوافق الدراسات السابقة [6, 10, 19, 20]. يمكن تفسير المستويات المرتفعة لهذين الواسمين في SLE بحقيقة أن SLE يتصف بضرر وعائي التهابي والذي وفقاً له تتأثر الخلايا البطانية (ECs) endothelial cells [20].

تقيم مستويات الأنجيوبوتين-2 والعامل فون ويلبراند درجة ارتباط مرض الذئبة الحمامية الجهازية بالأذية الوعائية الالتهابية والذي يطال تأثيرها الخلايا البطانية (ECs)، مما يشير إلى أن التفعيل البطاني في الذئبة الحمامية النشطة يمكن أن يظهر كعملية مرتبطة بالأنجيوبوتين-2، وهذه الكمية من الأنجيوبوتين-2 داخل الدوران يمكن أن تعكس مدى التفعيل البطاني في السطح وخصوصاً في البطانة الكلوية [21].

يحدث ارتفاع مستوى العامل فون ويلبراند في البلازما وفقد وظيفته بواسطة آليات مختلفة، من ضمنها الكبت المحدث بالسيتوكين للعامل فون ويلبراند (TNF $\alpha$  و IL)، وتحريره من الغشاء البطاني الحال للبروتين المعتمد على الإلاستاز والعدلات المفعلة، وترسب المعقدات المناعية، وفرط إنتاج NO وأكسدة الحموض الأمينية الحرجة وظيفياً في مجال العامل فون ويلبراند خارج خلوي.

تدعم هذه النتائج المعطيات في هذا البحث، حيث أثبتنا وجود علاقة إيجابية معتبرة لمستوى العامل فون ويلبراند مع مؤشر SLEDAI، لكن لم يتم التمكن من إيجاد علاقات معتبرة بينه ومنتابئات أخرى لنشاط المرض مثل anti-dsDNA و C3 و C4، وذلك في معظم المجموعات الفرعية.

أما بخصوص Ang-2 المصلي، يظهر مرضى SLE النشاط علاقات معتبرة إحصائياً مع مؤشر SLEDAI و ESR و anti-dsDNA، كما توافقت نتائجنا مع تلك لدى El-Banawy وزملائه [19].

لتوضيح العلاقة بين Ang-2 المصلي، والعامل فون ويلبراند المصلي وتأثر الكلية، قورن المرضى النشطين المصابين بالذئبة الحمامية والمصاحبة لالتهاب الكلية مع المرضى المصابين بالذئبة الحمامية النشطة بدون التهاب الكلية (28 و n= 12 على التوالي)، حيث تم ملاحظة ارتفاع بنسب كبيرة ومهمة لكل من الأنجيوبوتين والعامل فون ويلبراند لدى مجموعة التهاب الكلية.

كانت هذه النتائج موافقة لتلك لدى الباحثين الاخرين الذين اقترحوا بأن التصفية الكلوية المنخفضة ليست كافية في تفسير زيادة تركيز العامل فون ويلبراند لدى المرضى الذين يعانون التهاب الكلية المصاحبة لمرض الذئبة الحمامية، حيث أنه يطرح بواسطة الكلى، لكنه بسبب زيادة اصطناع والتعبير عن العامل فون ويلبراند في البطانة، خاصة في الكليتين، وبين David وزملائه أيضاً عن أن البطانة في الكلية حددت كمصدر غني Ang-2، لذلك المرض الكلوي المزمن قد يؤدي مباشرة إلى زيادة تحرير Ang-2 من الكلى و/أو من البطانة الجهازية البعيدة عند مرضى مرض

الذئبة الحمامية والمصاحبة لالتهاب الكلية كان أنجيوبويتين المصل ومستويات العامل فون ويلبراند المصلبة مرتبطاً بشكل إيجابي مع البيلة البروتينية والتي تم الإخبار عنها [22, 23].

أظهر kumpers وجود ارتباط وثيق بين تركيز Ang-2 والوظيفة الحاجزية للأوعية الدموية، وذلك باستخدام البيلة البروتينية باعتباره واسم للنفوذية البطانية الكبيبية. تتفق هذه النتائج مع دور Ang-2 في زعزعة سلامة واستقرار الخلايا البطانية، مما تسبب في بيلة بروتينية [22].

كما بين أن مصل Ang-2 كان يفوق مصل العامل فون ويلبراند و antidsDNA في التنبؤ عن نشاط SLE فكانت (100% مقابل 97.2% لمصل العامل فون ويلبراند و 95.2% ل antidsDNA) والفعالية كانت (100% مقابل 90% Ang-2 و 96.7% antidsDNA)، أيضاً لتمييز التهاب الكلية المصاحبة للذئبة الحمامية، كان المصل Ang-2 أفضل بكثير من العامل فون ويلبراند المصلي و antidsDNA كان (100% مصل Ang-2 مقابل 93% مصل العامل فون ويلبراند و 91.5% antidsDNA) والفعالية (97.5% مصل Ang-2 مقابل 92.5% مصل العامل فون ويلبراند و 77.5% antidsDNA).

بينت هذه الدراسة وجود علاقة ارتباط إيجابي هام يُعَدُّ بها إحصائياً بين المستويات البلازمية للواصمين ما يفسر علاقة الارتباط الإيجابي بين هذين الواصمين، وبما أن معظم المستويات البلازمية تكون ناتجة عن تحررها من خلايا البطانة الوعائية وبالتالي يمكن اعتبارهما كواصمات تدل على وجود أذية وعائية.

## الاستنتاجات والتوصيات:

### الاستنتاجات

1- يمكن أن تعتبر التراكيز المرتفعة من العامل فون ويلبراند و Ang-2 واصماً لنشاط المرض والعلّة الكلوية في الذئبة الحمامية.

2- كانت Ang-2 المصل متفوقة على العامل فون ويلبراند المصل anti dsDNA في التنبؤ عن نشاط الذئبة الحمامية والتهاب الكلية.

3- بينت الدراسة هذه أيضاً أن مستويات الأنجيوبويتين-2 المصلية ترتبط بشكل إيجابي مع قيم SLEDAI، إلا أنه لم يتم إظهار ارتباط إيجابي كبير مع antidsDNA<sup>21</sup> وهذا يمكن أن يكون له علاقة بالاختلاف بالطريقة المستعملة لتقييم نتيجة antidsDNA.

4- وفقاً لذلك، تم اقتراح أن التقييم الكمي للدنا antidsDNA قد تسمح بكشف أفضل عن العلاقة بين antidsDNA وأنجيوبويتين-2 المصل.

5- بالرغم من أن العامل فون ويلبراند وكذلك تركيز الأجسام المضادة ل ضد dsDNA يعبر عن نشاط المرض، إلا أن ارتباطهم ليس قوياً بما فيه الكفاية، ومستويات العامل فون ويلبراند تعكس حقيقة أن هذا الجزيء ليس منتجاً لتنشيط المناعة الذاتي مثل anti-dsDNA.

### التوصيات

يجب القيام بدراسات إضافية لجعل Ang-2 المصلي هدف مقترح للدواء حيث يمكن أن يكون الحجب الوظيفي بمثابة حماية ضد الأذية البطانية في أمراض كهذه.

## المراجع:

1. Sun W, Jiao Y, Cui B, Gao X, Xia Y, Zhao Y. *Immune complexes activate human endothelium involving the cell signaling HMGB1-RAGE axis in the pathogenesis of lupus vasculitis*. Lab Invest. 2013 Jun; 93(6):626-38.
2. Aird WC. *Spatial and temporal dynamics of the endothelium*. J Thromb Haemost. 2005; 3:1392-1406.
3. Page AV and Liles WC. *Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases*. Virulence. 2013 Apr 19; 4(6).
4. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, Gale NW, Witznath M, Rosseau S, Suttrop N, Sobke A, Herrmann M, Preissner KT, Vajkoczy P and Augustin HG. *Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF- $\alpha$  and has a crucial role in the induction of inflammation*. Nat Med 2006; 12:235-239.
5. Lemieux C, Maliba R, Favier J, Théorêt JF, Merhi Y, Merhi Y and Sirois MG. *Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses*. Blood 2005; 105: 1523-1530.
6. Kümpers P, David S, Haubitz M, Hellpap J, Horn R, Brocker V, Schiffer M, Haller H and Witte T. *The Tie2 receptor antagonist angiopoietin 2 facilitates vascular inflammation in systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis 2009; 68: 1638-1643.
7. Yuan H, Deng N, Zhang S, Cao Y, Wang Q, Liu X, et al. *The unfolded von Willebrand factor response in bloodstream: the self-association perspective*. Journal of hematology & oncology. 2012; 5(1):65.
8. Lenting P, Casari C, Christophe O, Denis C. *von Willebrand factor: the old, the new and the unknown*. Journal of thrombosis and haemostasis. Journal of hematology & oncology. 2012; 10(12):2428-37.
9. Sawada K, Yamamoto H, Yago H et al. *A simple assay to detect endothelial cell injury; measurement of released von Willebrand factor from cells*. Exp Mol Pathol 1992; 57:116-23.
10. Akbarian M, Jamshidi R, Shahram F, Akhlaghi M, Khosravi S, Almasi S and Davatchi F. *Assessment of serum von Willebrand factor in patients with systemic lupus erythematosus*. Acta Medica Iranica. 2009; 47 (2): 97-102.
11. Gando S, Kameue T, Matsuda N, Hayakawa M and Hoshino H. *Serial changes in neutrophil-endothelial activation markers during the course of sepsis associated with disseminated intravascular coagulation*. Thromb Res 2005; 116: 91-100.
12. Hochberg MC. *Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum 1997; 40:1725.
13. Bombardier C, Gladman D, Urowitz M, Caron D, Chang C. *Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE*. Arthritis Rheum 1992; 35, 630-40.
14. Ahmad Y, Shelmerdine J, Bodill H, Lunt M, Patrick MG, The LS, Bernstein RM, Walker MG and Bruce IN. *Subclinical atherosclerosis in systemic lupus erythematosus (SLE): the relative contribution of classic risk factors and the lupus phenotype*. Rheumatology 2007; 46: 983-988.
15. Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA, Ciolkiewicz M and Sierakowski S. *Clinical significance of selected endothelial activation markers in patients with systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol. 2008; 35:1307-1313.
16. Weng HB and Li S. *Early changes of plasma angiopoietin-2 in patients with multiple trauma*. World J Emerg Med 2011, Vol 2, No 4.

17. Yuelan C, Guojun S, and Xinguo L .*Detection of plasma von Willebrand factor inpatients with systemic lupuserythematosus and its clinical significance*. Chinese Journal of Dermatology 2011;32 (1) 12-13.

18. Santos MJ, Carmona-Fernandes D, Canhão H, Canas da Silva J and Fonseca JE. Early Vascular Alterations in SLE and RA Patients—A Step towards Understanding the Associated Cardiovascular Risk. Plos One 2012; 7 (9):e44668.

19. El-Banawy HS, Gaber EW, Maharem DA and Matrawy KA. *Angiopoietin-2, endothelial dysfunction and renal involvement in patients with systemic lupus erythematosus*. J Nephrol.2011; doi: 10.5301/jn.5000030.

20. Fiedler U and Augustin HG. *Angiopoietins: a link betweenangiogenesis and inflammation*. TrendsImmunol.2006; 27:552-558.

21. Hassan AA, Al-Akaad AF and Osman AM. *Serum nitric oxide andthrombomodulin levels in patients withsystemic lupus erythematosus: a possibleaddition to disease activity parameters?* El-Minia Med Bull 2008; 19(2): 136-149.

22. David S, Kumpers P, Lukasz A, Fliser D, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM, Kliem V, Haller H and Kielstein JT. *Circulating angiopoietin-2 levels increasewith progress of chronic kidney disease*. Nephrol Dial Transplant 2010; 25: 2571-2576.

23. Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y and Augustin HG . *The Tie-2 ligand Angiopoietin-2 destabilizes quiescentendothelium through an internal autocrine loop mechanism*. J Cell Sci 2005; 118: 771–780.