

УДК 616.72 – 002.72: 579.01.8:616-097.

© Коллектив авторов, 2009.

КЛЕТОЧНЫЕ И ГУМОРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИЭНДОТОКСИНОВОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

К. В. Белоглазова, А. В. Петров, А. И. Гордиенко, А. А. Бакова*Кафедра внутренней медицины №2 (зав. – проф. В. А. Белоглазов) Крымского государственного медицинского университета им. С. И. Георгиевского, г. Симферополь.*

CELLULAR AND HUMORAL MECHANISMS OF ANTIENDOTOXIN IMMUNITY OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

K. V. Byeloglazova, A. V. Petrov, A. I. Gordienko, A. A. Bakova

SUMMARY

59 patients suffering from rheumatoid arthritis (RA) were studied for determination of specific antiendotoxin antibodies (anti-ET-IgG, anti-ET-IgM, anti-ET-IgA) and receptors to ET on poly and mononuclear leukocytes (CD14+, LPS-Fitc) levels. 32 healthy donors were control group. It was prove that the patients with rheumatoid arthritis have dysbalance of antiendotoxin immunity, increase expression of receptors to ET on monocytes in peripheral blood, which depends on duration of disease. Dysbalance of antiendotoxin immunity may result in pathological endotoxin action.

КЛІТИННІ Й ГУМОРАЛЬНІ МЕХАНІЗМИ АНТИЕНДОТОКСИНОВОГО ІМУНІТЕТУ У ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ

К. В. Білоглазова, А. В. Петров, А. І. Гордієнко, А. А. Бакова

РЕЗЮМЕ

У 59 хворих на ревматоїдний артрит (РА) вивчено рівень специфічних антиендотоксинових антитіл (анти- ET- Ig G, анти- ET- Ig M, анти- ET- IgA) в сироватки крові та рівень рецепторів до ендотоксину (ЕТ) на полі та мононуклеарних лейкоцитах (CD14+, LPS-Fitc). У якості норми використовували результати вивчення гуморального та клітинного антиендотоксинового імунітету 32 здорових осіб. Доведено, що у хворих на РА має місце дисбаланс антиендотоксинового імунітету на тлі підвищення рівню рецепторів до ЕТ на моноцитах периферичної крові, які мають залежність від катемнезу РА. Дисбаланс клітинного та гуморального антиендотоксинового імунітету створює умови для патологічного впливу ЕТ на перебіг захворювання.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, эндотоксин, антитела.

Ревматоидный артрит (РА) является актуальной проблемой современной медицины, что связано с широкой распространённостью в структуре ревматических болезней, высокой заболеваемостью и инвалидизацией больных среди населения Европейского региона, включая Украину [1, 2, 12, 15, 17].

В последние годы достигнут значительный прогресс в понимании аутоиммунных механизмов, лежащих в основе развития РА [3, 5, 16].

В многочисленных исследованиях при РА выявляют выраженный дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и увеличение количества активированных поликлональных В-лимфоцитов и плазматических клеток, синтезирующих широкий спектр аутоантител [4, 8, 11].

Изучение интегральных факторов поликлональной активации В-лимфоцитов у генетически предрасположенных лиц представляется нам особенно интересным аспектом в иммунопатогенезе аутоиммунных заболеваний. Известно, что классическим поликлональным активатором В-лимфоцитов является липополисахарид (ЛПС, эндотоксин — ЭТ), представляющий собой основной структурный компо-

нент внешней мембраны грамотрицательных бактерий, постоянно действующим резервуаром, которой являются дистальные отделы кишечника [9, 11, 18].

Решающую роль в распознавании эндотоксина (ЭТ) грамотрицательной бактерии и бактериальной ДНК играют CD 14 рецепторы на клетках моноцитарно-макрофагального ряда [6, 7, 18].

По современным представлениям, системная реакция организма на ЭТ зависит как от его количества поступившего в организм, так и от функционального состояния эндотоксинсвязывающих систем макроорганизма [9, 13]. Патологическая роль ЭТ связана с дисрегуляцией рецепторных функций при избытке ЭТ [9, 13, 18].

В организме человека существует множество механизмов нейтрализации биологически активных форм ЛПС. Особое место в нейтрализации ЭТ, занимают антиэндотоксинные антитела (анти-ЭТ-АТ), значение которых в механизмах связывания и детоксикации ЛПС [9, 13, 14].

Целью настоящего исследования является: изучение дисбаланса клеточного и гуморального антиэндотоксинового иммунитета, рецепторов к эндотоксину у больных РА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением состояло 59 больных РА, из них 53 женщины и 6 мужчин, находившихся на лечении в ревматологическом отделении КРУ клинической больницы им. Н.А.Семашко г. Симферополя. Все больные поступили в стационар по поводу обострения основного заболевания. Возраст пациентов РА от 19 до 68 лет. Длительность заболевания от 1 года и свыше 10 лет. Все больные были разделены на 3 клинические группы, в зависимости от длительности заболевания. 1 группу составили больные РА с продолжительностью заболевания до 5 лет, 2 группу - пациенты с длительностью заболевания от 5 до 10 лет, 3 группу - больные, страдающие РА более 10 лет.

У всех больных выявлен диагностирован серопозитивный вариант РА. Диагноз РА устанавливали по критериям АСР (Американская Коллегия Ревматологов, 1987г) [3]. Основными клиническими проявлениями являлись боль (при пальпации и движении), припухлость поражённых суставов, утренняя скованность в суставах от 30 минут, выраженное ограничение подвижности суставов. Данные объективного обследования суставов, используя стандартные опросники НАQ. По данным рентгенологического исследования были выявлены типичные для РА изменения. Рентгенологическую стадию определяли по модифицированному методу Steinbrocker. Активность РА по клиническим и лабораторным данным в среднем соответствовала II степени. Активность болезни определяли согласно классификации, принятой в Украине в 1979 (Ассоциация Ревматологов Ук-

раины 2002г) [3]. Нарушение функции суставов у больных РА - II степени.

Материалом исследования служила периферическая кровь, которую получали при поступлении больного на стационарный этап лечения. Содержание антиэндотоксиновых антител классов А, М и G (соответственно анти-ЭТ-Ig А, анти-ЭТ-Ig М и анти-Эт-Ig G) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве антигена использовали ЭТ грамотрицательной энтеробактерии *Escheria coli* K30 (09:K30:P12), выделенный из бактериальной биомассы методом водно-фенольной экстракции и дополнительно очищенный от примесей РНК обработкой цетавлоном («Serva», Германия). Уровни анти-ЭТ-антител выражали в условных единицах оптической плотности конечного продукта ферментативной реакции для разведения тестируемой сыворотки крови 1:50 [20]. Изучение рецепторов к ЭТ на моно и полинуклеарных лейкоцитах (CD14+, LPS-Fitec) осуществлялось с помощью проточной лазерной флюорометрии (протоколы методики разработаны в лаборатории иммунологии Крымского государственного медицинского университета им С.И.Георгиевского).

Для сравнительного анализа полученных результатов изучено состояние антиэндотоксинового иммунитета в группе практически здоровых доноров (контрольная группа – 32 здоровых донора).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные о состоянии гуморального антиэндотоксинового иммунитета у больных РА представлены в таблице 1.

Таблица 1

Уровень антител к эндотоксину у больных ревматоидным артритом

ГРУППА	Анти-ЭТ-IgA	Анти-ЭТ-IgM	Анти-ЭТ-IgG
1 группа n=18	0,329±0,052 p<0,1	0,352±0,044 p<0,1	0,698±0,112 p<0,01
2 группа n=20	0,346±0,042 p<0,05	0,267±0,033 p>0,5	0,634±0,085 p<0,01
3 группа n=21	0,207±0,021* p>0,5	0,150±0,02* p<0,05	0,428±0,054* p>0,05
Доноры n=32	0,218±0,044	0,243±0,042	0,357±0,044

Примечание: p - достоверность различий с уровнем здоровых доноров; (*) отмечена достоверность различий между показателем группы 2 и 3 групп (p<0,05 и выше).

Из данных представленных в таблице 1 следует, что у больных РА в 1 клинической группе с длительностью заболевания до 5 лет уровень анти-ЭТ-Ig А достоверно не отличается от величины этого показателя в группе здоровых лиц (p<0,1). У больных РА во 2 клинической группе (с длительностью заболевания 5-10 лет) отмечается увеличение концентрации анти-ЭТ-Ig А в 1,6 раза по сравнению с нормой (p<0,05). У больных РА в третьей клинической группе (с длительностью заболевания более 10 лет) изучаемый пока-

затель достоверно не отличается от группы здоровых доноров и на 67,1% достоверно ниже показателя 2 клинической группы (p<0,01).

Как следует из представленных данных у больных РА в 1 и во 2 клинических группах уровень анти-ЭТ-IgM достоверно не отличается от величины этого показателя в норме. У больных 3 клинической группой с длительным течением РА происходит достоверное снижение концентрации данных специфических антител как по сравнению с нормой – 1,6 раз

($p < 0,05$), так и по сравнению с больными 1 и 2 клинических групп ($p_{1,3} < 0,001$ $p_{2,3} < 0,01$).

Содержание анти-ЭТ-IgG у больных 1 и 2 групп достоверно превышает показатели группы здоровых доноров ($p < 0,01$). Максимально высокий уровень анти-ЭТ-IgG (в 1,95 раза) зарегистрирован у больных на ранних этапах заболевания РА в 1 клинической группе а также у пациентов с длительностью заболевания от 5-10 лет во 2 группе соответственно в 1,78 раза по срав-

нению с нормой ($p < 0,01$ в обоих случаях).

У больных с длительным течением РА в 3 клинической группе определяется достоверное снижение анти-ЭТ-IgG в 1,63 и 1,48 раза по сравнению с соответствующими показателями у больных 1 и 2 групп ($p < 0,05$ во всех случаях) и достоверно не отличается от уровня нормы.

Данные об экспрессии рецепторов к ЭТ у больных РА представлены в таблице 2.

Таблица 2

Экспрессия CD14 рецепторов и LPS fitc. на моноцитах и гранулоцитах у больных ревматоидным артритом

ГРУППА	CD14 рецепторы на моноцитах	CD14 рецепторы на гранулоцитах	LPS Fitc на моноцитах	LPS Fitc на гранулоцитах
2 группа n=15	29,5±2,18 p<0,05	0,85±0,05 p<0,5	2,45±0,18 p<0,05	1,23±0,04 p<0,1
3 группа n=14	30,8±2,11 p<0,05	0,82±0,06 p>0,5	2,37±0,11 p<0,05	1,16±0,05 p>0,5
Доноры	24,0±1,54	0,79±0,03	1,96±0,14	1,13±0,04

Примечание: p- достоверность различий по сравнению с нормой.

При анализе полученных результатов представленных в таблице 2 у больных РА длительностью заболевания 5-10 (2 группа) и более 10 лет (3 группа) выявлено повышение уровня CD14 рецепторов на моноцитах соответственно на 22,9% и на 28,3%, ($p < 0,05$ в обоих случаях), по сравнению с группой здоровых доноров. Вместе с тем, достоверных различий экспрессии CD14 рецепторов на моноцитах между двумя сравниваемыми группами (группа 2 и 3) не выявлено.

По результатам исследований уровень CD14 рецепторов на гранулоцитах во 2 и 3 группах достоверно не отличается от группы доноров.

Выявлено также статистически значимое различие уровня LPS Fitc. на моноцитах у больных РА 2 и 3 группы ($p < 0,05$) по сравнению с группой доноров. Уровень LPS fitc. на моноцитах во 2 группе на 25% и в 3 группе на 21% превышает величину этого показателя в норме. Достоверные различия показателей между группами больных РА не зарегистрированы.

По результатам исследований (табл. 2) экспрессия LPS Fitc. на гранулоцитах у больных ревматоидным артритом 2 и 3 клинических групп достоверно не отличается от нормы. ($p < 0,1$ и $p > 0,5$).

Какое же значение имеют, выявленные нами изменения антиэндоксинного иммунитета у больных РА?

Антиэндоксинный Ig A, как известно, является строительным материалом для создания секреторного Ig A, играющего важную роль в формировании кишечного барьера на пути транслокации ЭТ в портальную кровь [13, 14]. Нормальный уровень данных специфических антител у больных РА в 1 клинической группе может быть связано с ригидностью анти-

эндотоксинового иммунитета в новых патофизиологических условиях формирования аутоиммунного воспаления. Применение базисных препаратов у больных 2 группы (на протяжении 5-10 лет) приводит к ослаблению кишечного барьера по отношению к ЭТ за счет закономерного развития гастроэнтеропатии, ослабления иммунной системы ассоциированной со слизистыми оболочками, развития дисбактериоза кишечника. Вместе с тем, на этом этапе развития заболевания иммунная система еще способна отреагировать на повышение транслокации ЭТ в портальный кровоток повышением синтеза анти-ЭТ-Ig A, направленного на консолидацию энтерального барьера, что и наблюдается у больных во 2 клинической группе. Дальнейшее развитие заболевания приводит к истощению специфического гуморального ответа, что проявляется в «нормализации» анти-ЭТ-Ig A у больных 3 клинической группы, что по сути является отражением депрессии этого звена специфического иммунитета. Таким образом, по отношению к Анти-ЭТ-Ig A антиэндоксинный иммунитет проходит 3 этапа: ригидность- активация-депрессия.

При РА создаются все условия для избыточной транслокации ЭТ в портальный кровоток, вместе с тем, как показали наши исследования, нормальный уровень анти-ЭТ-IgM у больных в 1 и во 2 клинических группах скорее является отражением определенной ригидности антительного ответа на поступающий в портальную кровь ЭТ, в условиях ослабления кишечного барьера (действие базисной терапии, НПВС). Нормальный специфический ответ на ЭТ как известно характеризуется повышением синтеза анти-ЭТ-IgM. При длительном течении РА у больных в 3 клинической группе обнаружено снижение анти-ЭТ-

IgM, что, по нашему мнению, является отражением его депрессии.

В предыдущих работах было показано, что анти-ЭТ-IgG может определяться как гиперреспондерный (при высоком уровне анти-ЭТ-IgG), нормореспондерный и гипореспондерный (при низком уровне анти-ЭТ-IgG) вариант. В целом, группу больных РА можно отнести гиперреспондерному варианту анти-ЭТ-IgG. Известно, что лица с нормальным и с повышенным ответом на эндотоксин чаще болеют заболеваниями аутоиммунной природы [19]. При длительном течении РА в 3 группе гиперреспондерный по анти-ЭТ-IgG вариант трансформируется в нормореспондерный, что также свидетельствует о постепенном истощении антиэндотоксического гуморального иммунитета. Таким образом, потенциально, патогенетическая роль эндотоксина грам-негативной флоры кишечника, как фактора самоподдержания хронического аутоиммунного воспаления, имеет возрастает при длительном течении заболевания.

Таким образом, в дебюте РА и на ранних (до 5 лет) этапах развития заболевания регистрируется напряженное состояние антиэндотоксического иммунитета в виде повышенного уровня специфических антител относящихся к IgG (1 и 2 группа) Ig A (у больных 2 группы) при нормальном уровне Ig M антител. При длительной персистенции заболевания (свыше 10 лет) наблюдается постепенное истощение данного специфического иммунитета в виде снижения уровня анти-ЭТ-Ig A, анти- Ig M и «нормализация» анти-ЭТ-IgG. При этом, учитывая повышенный уровень экспрессии рецепторов к ЭТ на клетках моноцитарного ряда во 2 и 3 клинических группах у больных РА имеется высокая степень готовности данных клеток к ответу на связанный с ЛПБ (липополисахаридсвязывающий белок) или свободный эндотоксиновый стимул в виде продукции провоспалительных цитокиновых [10].

ВЫВОДЫ

1. У всех больных РА с катамнезом до 10 лет выявлено повышение уровня антиэндотоксического иммуноглобулина G (гиперреспондеры на эндотоксин), в то время как при РА с длительностью заболевания более 10 лет уровень анти-ЭТ-IgG достоверно не отличается от уровня нормы (нормореспондеры)

2. Анти-ЭТ-IgG ответ на эндотоксин у больных РА с длительностью заболевания до 5 лет по специфическим Ig A и Ig M не выходит за границы физиологического диапазона, в то время как у больных РА с длительностью заболевания от 5 до 10 лет характеризуется повышением анти-ЭТ-IgA в 1,6 раза ($p < 0,05$). При длительности заболевания РА более 10 лет нами зарегистрировано снижение уровня анти-ЭТ-Ig M

на 19,9% ($p < 0,05$) и более низкие чем в группах сравнения больных РА уровень анти-ЭТ-Ig A, что трактуется нами как депрессия гуморального антиэндотоксического иммунитета при длительном течении РА и длительной базисной терапии.

3. У всех больных с РА зарегистрировано достоверное повышение экспрессии CD14 в 1,2-1,3 раза ($p < 0,05$) и LPS Fc в 1,2 раза ($p < 0,05$) рецепторов на клетках моноцитарно-макрофагального ряда, что характеризует высокую готовность данных клеток к провоспалительному цитокиновому ответу на эндотоксиновый стимул.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коваленко В.М., Шуба Н.М. Ревматичні хвороби суглобів: медико-соціальні проблеми в Україні та шляхи їх вирішення // Укр.ревм.журнал. - 2001. - №3. - С. 3-7.

2. Балабанова Р.М. Ревматоидный артрит // В книге: Ревматические болезни. Под ред. В.А.Насоновой., Н.В.Бунчука. - М. - 1997. - С.257-294.

3. Коваленко В.Н. Ревматоидный артрит: этиопатогенез, клиника, диагностика, лечение // Ліки України. - 2005. - №1. - С.24-26.

4. Potentiation of lipopolysaccharide-induced chemokine and adhesion molecule expression in corneal fibroblasts by soluble CD14 or LPS-binding protein.// Fukuda K, Kumagai N et al.// Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005 Sep;46(9):3095-101

5. Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis// Abdollahi-Roodsaz, S, Joosten LA et al. // Arthritis Rheum. 2007 Sep; 56(9):2957-67.

6. CD14 Is an Acute-Phase Protein// Sylvette Bas, Benoit R et al// The Journal of Immunology, 2004, 172: 4470-4479.

7. CD14+, CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis.// Kawanaka N, Yamamura et al// Arthritis Rheum. 2002 Oct;46(10):2578.

8. Г.Н.Дранник// Клиническая иммунология и аллергология//К.: ООО "Полиграф плюс", 2006. -481 с.

9. The endotoxin-binding bactericidal/permeability-increasing protein (BPI): a target antigen of autoantibodies.// H. Schultz, * J. Weiss et al// Journal of Leukocyte Biology Volume 69, April 2001 505-512/

10. The Functional variant(Asp299gly) of Toll-like receptor 4(TLR4) influences TLR4-mediated cytokine production in rheumatoid arthritis.// Mieke F. Roelofs, Mark H. Wenink et al.// The Journal of Rheumatology 2008;35:4.558-561.

11. B Cell Maturation Antigen, the Receptor for a Proliferation-Inducing Ligand and B Cell-Activating Factor of the TNF Family, Induces Antigen Presentation in B Cells// Min Yang, Hidenori Hase// The Journal of Immunology, 2005, 175: 2814-2824.

12. Коваленко В.Н. Ревматические заболевания: итоги пленума правления Ассоциации ревматоло-

гов України//Здоров'я України №21 стр 13,15.

13. Yakovlev M. Element of endotoxin theory of human physiology and pathology: systemic endotoxemia, endotoxin aggreation and endotoxin insufficiency // J.Endotoxin Research. – 2000. Vol. 16, N2. – P. 120- 122.

14. Heine H., Rietschel E. T., Ulmer A.J. The biology of endotoxin //Mol. Biotechnol.- 2001.- Vol.19, №3.- P. 279-296.

15. В.А.Насонова, Е.Л.Насонов Рациональная фармакотерапія ревматических заболеваний//Москва, 2003.

16. Inflammation in Rheumatoid Arthritis // Arthritis Rheum.-2002.-v.46.-No.10- P.2578-2588.

17. Ревматоидный артрит. Диагностика и лечение.//Коваленко В.Н., Шуба Н.М // - К.: Морион, 2001. -272 с.

18. Macintire D.K., Bellhorn T.L. Bacterial translocation: clinical implications and prevention //Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.- 2002.- 32, №5.- P. 1165-1178.

19. Immune activation in the small intestine in patients with rheumatoid arthritis // R Nissinen , M Leirisalo-Repo et al// The Journal of Immunology. November 2003

20. Спосіб визначення антитіл до ліпополісахаридів грамнегативних бактерій. Друк. Патент, 70193 А України, МКІ 7 А61К31/01, Заявл. 29.12.2003; Опубл. 15.09.2004, Бюл. № Гордієнко А.І, Білоглазов В.О.