

Krzyżowo reagujące przeciwciała antyfosfolipidowe jako marker obecności endotoksyny w surowicach i płynach stawowych uzyskanych od pacjentów z zapaleniami stawów

Cross-reacting anti-cardiolipin antibodies as a marker of presence of endotoxin in the sera and synovial fluids of patients with arthritis

Jakub Ząbek¹, Jacek Noworyta¹, Maria Brasse-Rumin¹, Bożena Wojciechowska², Maria Rell-Bakalarska³

¹Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii w Warszawie, kierownik Zakładu doc. dr hab. biol. Jakub Ząbek

²Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Instytutu Reumatologii w Warszawie, kierownik Zakładu dr farm. Bożena Wojciechowska

³Przychodnia Przykliniczna Instytutu Reumatologii w Warszawie, kierownik Przychodni dr med. Maria Rell-Bakalarska
dyrektor Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie prof. dr hab. med. Sławomir Maśliński

Słowa kluczowe: zapalenia stawów, płyny stawowe, endotoksyna, przeciwciała aCL, przeciwciała aLPS, krzyżowa reaktywność przeciwciał.

Key words: arthritis, synovial fluids, endotoxin, antibodies to cardiolipin and to LPS, cross-reactivity of autoantibodies.

Streszczenie

Analizując grupy surowic i płynów stawowych pochodzące z różnych zapaleń stawów, autorzy zauważyli, że częstość występowania przeciwciał aCL w tych grupach była wysoka (ok. 30–40% – zbliżona do częstości w chorobach z autoimmunizacją) i powiązali to z przejściową obecnością w tych materiałach związków aktywnych biologicznie, w tym bakteryjnych (LPS, PG-PS), także zawierających reszty fosforanowe (czy wręcz PL), a ponadto podejrzewanych o właściwości artrytogenne.

Celem pracy było wykazanie, że krzyżowo reagujące z LPS przeciwciała aCL, obecne w surowicach i płynach stawowych uzyskanych od chorych z zapaleniem stawów stanowią część większej puli, jaką są przeciwciała dla tak złożonego antygenu, jak LPS i mogą wskazywać na obecność endotoksyny, np. w płynach stawowych, a to z kolei może być pomocne w różnicowaniu etiologii aktualnie istniejącego zapalenia stawów.

Stwierdzono, że w większości analizowanych 43 płynów stawowych (86%) występowały przeciwciała dla LPS, przeciwciała aCL stwierdzono w 53,5% płynów stawowych, a obecność endotoksyny w ok. 30% i prawdopodobnie dodatkowo w ok. 30% z obecnością substancji hamujących. W większości analizowanych płynów

Summary

Analysing the large groups of sera and synovial fluids from patients with arthritis we observed, that frequency of the aCL presence in above mentioned materials was relatively high (about 30-50%) – very similar to aCL frequency in the sera of patients with autoimmune disease and we consider this as a result of the presence in synovial fluid phosphate – rich bacterial cell wall chemical compounds like LPS, teichoic acid or peptidoglycan – considered as „arthritogenic” factors.

The aim of the study was to prove that aCL antibodies cross-reacting with LPS (endotoxin) from arthritic synovial fluids are part of the aPL antibodies pool and correlated with presence in joints bacterial cell wall components and beside they may be usefull in differential diagnosis of the different kind of arthritis and also in explanation of their aetiology at all.

In prevalence of the 43 analysed synovial fluids antibodies to LPS were present in 86% of cases, aCL in 53.5% and endotoxin in about 30% and probably in additional 30% with presence inhibiting LAL test substances have been found. Additionally in 3/4 of the analysed synovial fluids the appearance of anti LPS and aCL antibodies was strongly correlated.

Adres do korespondencji:

doc. dr hab. biol. Jakub Ząbek, Zakład Mikrobiologii i Serologii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher,
ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa

Praca wpłynęła: 8.02.2006 r.

stawowych stwierdzono współwystępowanie endotoksyny, przeciwciał aLPS i aCl – co wskazuje na korelację tych parametrów. W ponad 75% surowic i prawie 50% płynów stawowych LPS wyotywały neutralizację odczynu ELISA – aCl, izolowane zaś metodą chromatografii *powinowactwa* czyste przeciwciała aCl i aLPS wykazywały także reaktywność z antygenami heterologicznymi, np. przeciwciała aCl reagowały z czystym LPS. Obecność w płynach stawowych krzyżowo reagujących przeciwciał aCl może być śladem obecności w płynach stawowych ewentualnego czynnika etiologicznego zapaleń stawów, jakimi są zabite bakterie lub ich fragmenty zawierające związki *artrytogene*, jak LPS, PG-PS, lub kwasy teichowe, szczególnie gdy ich obecność jest skorelowana z obecnością w płynach stawowych KKL.

Wstęp

Przeciwciała antyfosfolipidowe (aPL) występują w wielu jednostkach chorobowych o infekcyjnej etiologii bakteryjnej (kiła, borelioza, leptospiroza, toksoplazmoza, trąd, gruźlica) czy wirusowej (AIDS, ospa, świnka, różyczka, wirusowe zapalenie wątroby typ B i C). Są one także wykrywane w wielu chorobach z autoimmunizacją (toczeń trzewny, wtórny i pierwotny zespół antyfosfolipidowy, reumatoidalne zapalenie stawów) [1, 2].

Znaczenie diagnostyczne przeciwciał antykardiolipinowych oraz antykoagulantu toczniowego (LAC) wynika z faktu ścisłej asocjacji ich występowania z wieloma groźnymi objawami klinicznymi, towarzyszącymi zespołowi antyfosfolipidowemu (APS), takimi jak zakrzepice żyłne i tętnicze, poronienia, trombocytopenia oraz z licznymi innymi objawami ze strony układu nerwowego i krążenia [3–7].

Kardiolipina (Cl, czyli difosfatydyloglicerol) to kluczowy związek i najbardziej reprezentatywny dla szerszej grupy ujemnie naładowanych fosfolipidów (PL). Z reguły jednak przeciwciała obecne w wyżej opisanych schorzeniach reagują nie tylko z Cl, ale wykazują także krzyżową reaktywność z innymi ujemnie naładowanymi PL.

Wydaje się wszakże, że epitopem docelowym są grupy fosfodwuestrowe PL i stąd prawdopodobnie reakcje krzyżowe z takimi związkami, jak dsDNA, ssDNA, RNA i RNP oraz polimerami złożonymi z siarczanu heparanu i dermatanu (składniki proteoglikanów), a także z heparyną [5, 8, 9] i wieloma innymi ważnymi biologicznie związkami zawierającymi grupy fosfodwuestrowe, np. NAD, NADP, FAD oraz CoA (należącymi do grupy koenzymów i witamin) (dane własne, nieopublikowane).

Do grupy związków chemicznych zawierających grupy fosfodwuestrowe czy fosforanowe należy także bardzo wiele związków pochodzenia bakteryjnego, np. antygeny ściany komórkowej bakterii, LPS, kwasy teichowe i teichojowe, peptydoglikan (PG), fosforylowane białka membranowe błony zewnętrznej (OMP) czy swoiste dla bakte-

In about 75% of sera and in 50% of synovial fluids cases LPS was able to neutralize the ELISA-anti Cl test and „affinity” purified antibodies to LPS and Cl cross-reacting with heterologic antigen (aCl with LPS) – and vice versa/ in ELISA tests.

The presence of the cross-reacting with LPS, aCl antibodies could be a remnant of the presence in joints bacterial arthritogenic compounds considered as aetiologic agents able to generating different kind of arthritis – especially when they are associated with the presence in the synovial fluids circulating immune complexes.

rii PL. Także LPS zawiera w swojej cząsteczce, w tzw. lipidzie A, związane wiązaniem fosfodwuestrowym reszty fosfatydyloetanoloaminy (Pet), a peptydoglikan (główny komponent ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich) zawiera w swej strukturze reszty fosfodwuestrowe [10].

Na dodatek takie związki, jak LPS czy PG i produkty ich degradacji, są silnie immunogenne, a ponadto w zależności od budowy mają właściwości immunomodulatoryjne. Dotyczy to w szczególności LPS, który ma charakter tzw. superantygeny, czyli cząsteczki, która może *nie-swoiście* stymulować odpowiedź przeciwciałową. Może on zatem systemowo i lokalnie (np. w jamie stawu) dzięki swym właściwościom biologicznym stymulować proces zapalny i jednocześnie syntezę autoprzeciwciał, a wiemy, że niestrawione (ale zabite) komórki bakterii lub ich fragmenty zawierające ww. związki znajdujące się w jamie stawu i płynie stawowym. Obserwowany dość często fenomen obecności, np. RF-IgM czy innych autoprzeciwciał w płynach stawowych przy RF-IgM-ujemnych surowicach to zapewne efekt lokalnej superstymulacji układu odpornościowego przez LPS czy pochodne PG [11, 12].

Bezpośrednią przyczyną podjęcia badań była, poza wcześniej wymienionymi obserwacjami dotyczącymi podwyższonej częstości występowania przeciwciał aCl w surowicach pacjentów z zapaleniem stawów, w których występowały także przeciwciała dla antygenów bakterii Gram-ujemnych, obserwacja poczyniona w trakcie realizacji opublikowanej już pracy [13], że przy adsorpcji sefarozą sprzężoną z polimyksyną B (użytą do weryfikacji testu LAL – stosowanego do wykrywania obecności endotoksyny) [14]. W eluatach z ww. złoża stwierdziliśmy obecność endotoksyny oraz immunoglobulin o aktywności aCl i aLPS, co wskazywałoby, że mamy do czynienia z przeciwciałami aCl krzyżowo reagującymi z LPS [15].

Temat ten będzie przedmiotem oddzielnej pracy, gdyż niewykluczone, że złoża to może posłużyć do opracowania prostej metody weryfikacji obecności w materiałach biologicznych (krew, płyn stawowy, płyn mózgowo-rdzeniowy itp.) endotoksyny w postaci skom-

pleksowanej z przeciwciałami w formie kompleksów immunologicznych (KKI), w tym także krzyżowo reagujących z LPS przeciwciałami aCl.

Celem pracy było wykazanie, że krzyżowo reagujące z LPS przeciwciała aCl obecne w surowicach i płynach stawowych uzyskanych od chorych z zapaleniem stawów stanowią część większej puli, jaką są przeciwciała dla tak złożonego antygeny jak LPS, i mogą wskazywać na obecność endotoksyny, np. w płynach stawowych, a to z kolei może być pomocne w różnicowaniu etiologii aktualnie istniejącego zapalenia stawów bądź też etiologii zapalenia stawów w ogóle.

Materiał i metody

Do analiz wykorzystano 43 jałowe bakteriologicznie płyny stawowe (w tym 28 odpowiadających im surowic), pochodzące głównie od pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) – 13, niezróżnicowanym zapaleniem stawów – 25, tłuszczowym zapaleniem stawów (ŁZS) – 2, zespołem Sjögrena – 1, chorobą zwyrodnieniową – 1, zesztyniającym zapaleniem stawów kręgosłupa (ZZSK) – 1. Surowice i płyny stawowe pochodziły z Przychodni Przyklinicznej Instytutu Reumatologii.

W surowicach metodą ELISA wykonano oznaczenia przeciwciał przeciwko następującym antygenom bakteryjnym: ECA, LPS *Salmonella enteritidis*, LPS *Salmonella typhimurium*, LPS *Klebsiella pneumoniae*, pełnemu ekstraktowi z komórek *Yersinia enterocolitica*, lipidowi A, KDO, peptydoglikanowi (PG), pentapeptydowi (PP o sekwencji D-ala-glu-liz-D-ala-D-ala) oraz kwasowi lipotejchowemu (KT). W wyżej opisanych surowicach wykonano oznaczenie przeciwciał aCl (metodą ELISA) (w klasie IgG i IgM) zmodyfikowaną metodą wg Harrisa [16, 17], a obecność krążących kompleksów immunologicznych (KKI) wykonano testem ELISA – typ CIC-C₁q Enzyme Immunoassay Kit firmy Quidel, USA.

W metodzie oznaczania przeciwciał aCl wg Harrisa [7] stosuje się rozcieńczenie surowic 1/50 i jeśliby zastosować takie samo rozcieńczenie do płynów stawowych, w których notabene średnie stężenie białka jest 2–4-krotnie niższe niż w surowicy, to uzyskalibyśmy wartości O.D._{450 nm} na granicy czułości odczytu spektrofotometrycznego. Konieczne zatem było ustalenie nowych norm dla płynów stawowych, a niemożliwe było ustalenie norm na podstawie oznaczania aCl w grupie płynów stawowych *pourazowych*, gdyż nie były one dostępne.

Ustalenie norm przeciwciał aCl w płynach stawowych wykonano na podstawie średniego stężenia białka w puli analizowanych płynów stawowych, które wyniosło 2,02 g/dl, było zatem 3–4-krotnie niższe niż przeciętne stężenie białka w surowicy (6–8 g/dl). Rozcieńczenie robocze płynów stawowych powinno więc wahać

się od 1/10 do 1/5, przy założeniu, że proporcje pomiędzy frakcjami w płynie stawowym i surowicy są zachowane, co istotnie miało miejsce. Przeliczenie rozcieńczenia w stosunku do jego średniego stężenia białka w płynie stawowym względem surowic pozwoliło utrzymać normy stosowane dla surowic, czyli $x+4SD=0,110$ dla aCl klasy IgG i 0,173 dla klasy IgM.

Obecność endotoksyny w surowicach i płynach stawowych badano testem Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Pyrogen[®] Ultra firmy Cambrex, USA.

Krzyżową reaktywność przeciwciał aLPS z Cl i reaktywność przeciwciał aCl z antygenem LPS wykazywano we frakcjach immunoglobulin izolowanych metodą *affinity* na fazie stałej (nitroceluloza i płytki polistyrenowe do odczynu ELISA opłaszczony odpowiednim antygenem – LPS lub Cl) [wg 18].

Test neutralizacji odczynu ELISA-aCl endotoksyną (w dawce 100 µg na 100 µl rozcieńczonej 1/25 surowicy) wykonywano, opierając się na analogicznych testach neutralizacji odczynu ELISA dla przeciwciał anty-LPS, opracowanych przez Noworytę i wsp. [17], a prowadzonych w celu potwierdzenia swoistości odczynów ELISA służących do wykrywania przeciwciał antybakteryjnych.

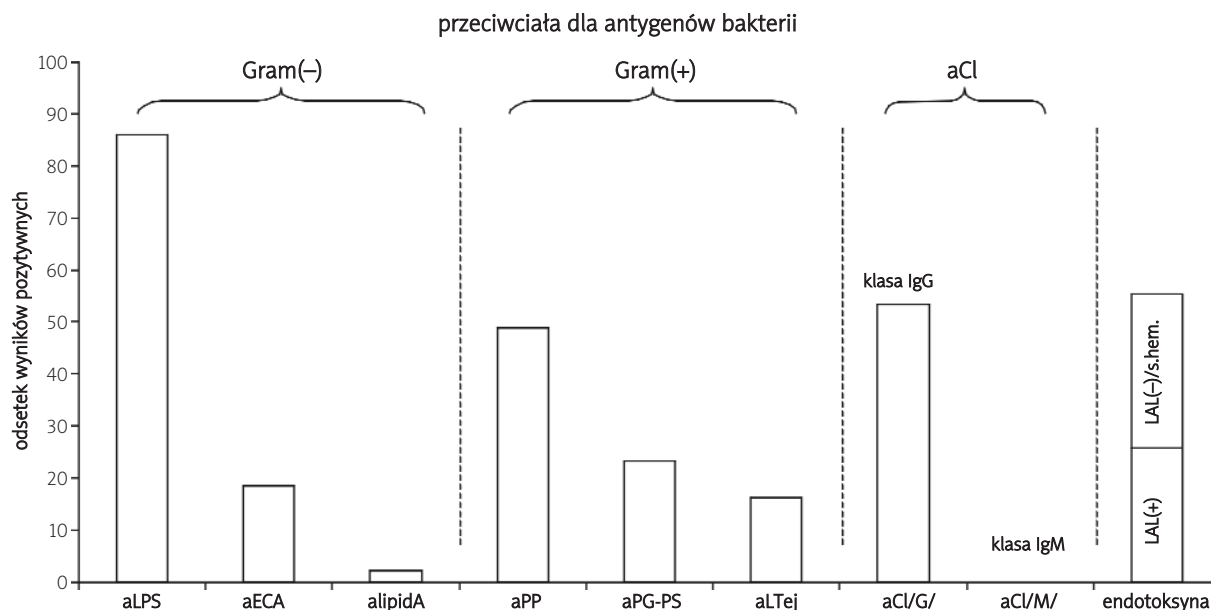
Wyniki

W 43 płynach stawowych pochodzących od pacjentów z niezróżnicowanym zapaleniem stawów i RZS oznaczano przeciwciała dla 3 typów LPS (LPS *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*), przeciwciała antygeny ECA, lipidu A, aCl oraz przeciwciała dla peptydoglikanu (PG-PS), pentapeptydu (PP) i kwasu tejchowego (KT), a także obecność endotoksyny metodą biologiczną (test wykrzepiania hemolizatu *Limulus polyph.*).

Częstość (%) występowania podwyższonych poziomów ww. przeciwciał w zestawieniu z obecnością endotoksyny przedstawiono na ryc. 1.

Przeciwciała dla jednego z trzech typów LPS występowały w większości (86%) badanych płynów stawowych, przeciwciała aCl w 53,5%, a obecność endotoksyny wykazano w ok. 30% płynów stawowych. Przeciwciała antygeny ECA wykryto w 18,6%, a dla lipidu A tylko w 1/43, co stanowi 2,3% badanych płynów stawowych. Przeciwciała dla antygenów charakterystycznych dla bakterii Gram-dodatnich, jak pentapeptyd (PP), peptydoglikan (PG-PS) czy kwasy tejchowe (KT), wykryto w następujących odsetkach płynów stawowych: aPP – 48,8%, aPG-PS – 23,2% i aKT – 16,2%.

Należy dodać, że w 26 na 43 (60,5%) płynów stawowych obserwowano odpowiedź zarówno dla antygenów bakteryjnych Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich, co może wskazywać na jednoczesną obecność (i stymulację układu odpornościowego) bakterii i/lub fragmentów bakterii obu ww. grup.

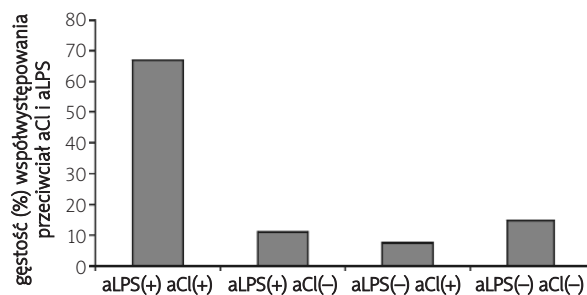


Ryc. 1. Częstość (%) występowania przeciwciał dla typowych antygenów bakterii Gram(-) i Gram(+) i dla aCl oraz obecność endotoksyny w płynach stawowych pacjentów z zapaleniem stawów.

Fig. 1. Frequency (%) of antibodies to typical Gram(-) and Gram(+) bacterial antigens and to cardiolipin appearance.

Analiza aktywności przeciwciałowych występujących w poszczególnych płynach stawowych wskazywała, że w znacznej liczbie płynów stawowych zaobserwowano występowanie jednocześnie przeciwciał dla antygenów bakteryjnych i przeciwciał aCl, KKI oraz endotoksyny, i dlatego dokonano porównania częstości ich współwystępowania.

Porównanie częstości (%) współwystępowania przeciwciał aLPS i aCl przedstawiono na ryc. 2.



Ryc. 2. Porównanie częstości (%) współwystępowania przeciwciał aCl i aLPS w płynach stawowych pacjentów z zapaleniami stawów.

Fig. 2. Comparison of frequencies (%) co-occurrence antibodies to cardiolipin and LPS in synovial fluids of patients with arthritis.

Przeważający odsetek płynów stawowych, tj. 66,7%, stanowiły płyny stawowe aLPS i aCl-dodatnie, w 18,4% płynów stawowych występowały przeciwciała aLPS lub aCl pojedynczo [grupa aLPS(+)/aCl(-) plus aLPS(+)/aCl(-)], a płyny stawowe (ujemne) bez przeciwciał aLPS i aCl stanowiły 14,8%. W grupie płynów stawowych aLPS(+)/aCl(+) wolna endotoksyna występowała w ok. 30%, a KKI były stwierdzane w przeszło połowie (51,9%) przypadków. Ponadto w 29,6% przypadków LAL(-) występowały w badanych płynach stawowych substancje hamujące test LAL, należy je zatem traktować jako materiały z prawdopodobną obecnością endotoksyny. Wysoki odsetek płynów stawowych z jednocześnie występującymi podwyższonymi poziomami przeciwciał aLPS i aCl wskazuje na korelację tych parametrów, u podstaw których leży prawdopodobnie częściowa identyczność epitopów w obu tych antygenach, prowadząca do występowania krzyżowo reagujących przeciwciał.

Zauważone, porównywalne (wysokie) odsetki występowania przeciwciał aLPS i aCl, a także obecność wolnej endotoksyny [test LAL(+)] i związanej [test LAL(-)/SH(+)] oraz obecność KKI skłoniły autorów do przeanalizowania częstości (%) współwystępowania tych 4 parametrów w indywidualnych płynach stawowych, a to z kolei mogłyby wskazywać na ścisłą korelację ww. parametrów.

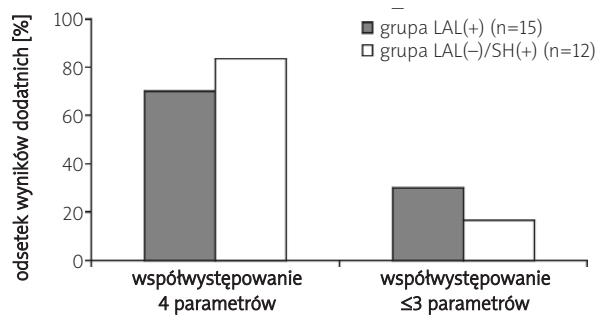
Analizę przeprowadzono w 2 grupach: I – surowice LAL(+) i II – surowice LAL(-)/SH(+), a wyniki przedstawiono na ryc. 3.

Częstości współwystępowania jednocześnie 4 parametrów (aLPS, aCl, endotoksyny i/lub SH oraz KKI) w pojedynczych płynach stawowych dla grup LAL(+) i LAL(-)/SH(+) są porównywalne i, co istotne, ok. 70% grupy LAL(+) i ponad 80% grupy LAL(-)/SH(+) stanowią płyny stawowe, w których współwystępują analizowane 4 parametry.

Aby potwierdzić krzyżową reaktywność przeciwciał aLPS z Cl i przeciwciał aCl z LPS, posłużono się wstępnie testem neutralizacji odczynu ELISA – aCl wysokimi dawkami (100 i 200 µg) LPS (ryc. 4.) oraz izolowanymi metodą *affinity* przeciwciałami aCl i aLPS.

Neutralizacja odczynu ELISA – aCl antygenem LPS w surowicach wahała się od 73,2 do 21% w grupie kontrolnej, średnio 57% (dla dawki 100 µg LPS) i od 74,6 do 10,4% (średnio 59% dla 200 µg LPS), a w płynach stawowych od 71,9 do 11% (średnio 30,6%) i od 54 do 10,2% (średnio ok. 20%); miała charakter zależny od dawki – zwłaszcza przy dawce 100 µg LPS zaobserwowano najwyższe spadki.

Jeśli rzeczywiście krzyżowa reaktywność przeciwciał występuje i nie jest wynikiem przypadkowej obecności reszt fosforanowych w zastosowanych do neutralizacji antygenach (LPS), to powinniśmy uzyskać reakcję czystych preparatów przeciwciał aCl (izolowanych na wysoko oczyszczonych Cl) z antygenem homologicznym, czy-

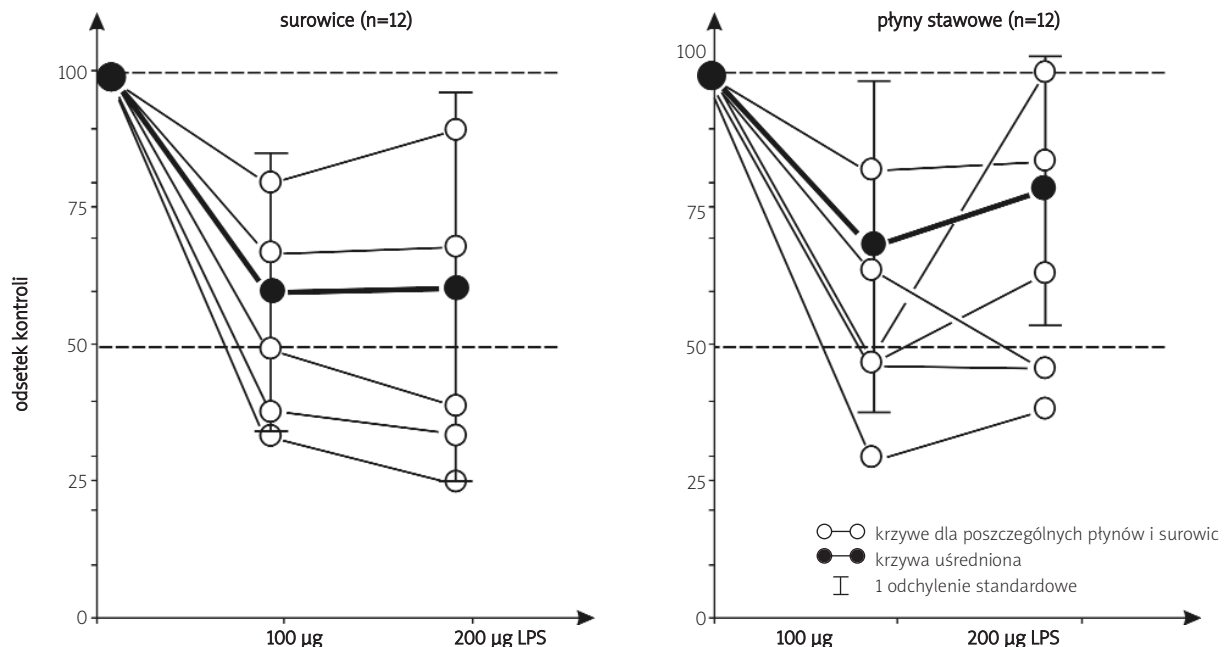


Ryc. 3. Porównanie częstości (%) występowania czterech parametrów (aLPS, aCl, endotoksyny i KKI) w indywidualnych płynach stawowych w grupach LAL(+) i LAL(-)/SH(+).

Fig. 3. Comparison of frequencies (%) co-appearance of four parameters (anti-LPS, anti-Cl, CIC and endotoxin) in particular synovial fluids in the two groups: LAL-positive and LAL-negative/SH-positive.

li Cl, ale także z LPS. To samo dotyczy przeciwciał czystych aLPS, które poza LPS powinny także reagować z Cl.

Wyniki dodatkowo potwierdzające wzajemną krzyżową reaktywność przeciwciał aLPS i aCl, izolowanych z 4 wybranych płynów stawowych (metodą chromatografii powinowactwa), są przedstawione na ryc. 5. Podobnie



Ryc. 4. Średni odsetek neutralizacji odczynu ELISA do oznaczania surowicznych i występujących w płynach stawowych przeciwciał aCl lipopolisacharydem (w dawkach 100 i 200 µg).

Fig. 4. Mean percentage (%) of neutralization ELISA test used for estimation the presence in the sera and synovial fluids anticardiolipin antibodies by lipopolisaccharide (in doses 100 and 200 µg).

jak w przypadku neutralizacji odczynu ELISA-aCl (klasy IgG) LPS-em, uzyskaliśmy duże rozrzuty natężenia (wyrażonego w O.D._{450 nm}) krzyżowej reaktywności izolowanych (w powtórzeniach eksperymentów) metodą *affinity* przeciwciał od prawie zerowych wartości do wartości wielokrotnie przekraczających zamieszczone uśrednione dane.

Zarówno przeciwciała izolowane metodą *affinity* z zastosowaniem antygenów Cl, jak i przeciwciała izolowane na antygenie LPS z poszczególnych surowic wykazywały reaktywność w różnym natężeniu z obydwooma antygenami w większości analizowanych surowic i płynów stawowych. Według autorów odzwierciedla to różnice w poziomach i wzajemnej proporcji podpuł izolowanych przeciwciał krzyżowo reagujących z poszczególnych surowic.

Dyskusja

Wysoka częstość występowania przeciwciał aCl w materiale (surowica + płyn stawowy), pochodzącym od chorych z różnymi zapaleniami stawów, zwróciła naszą uwagę już we wczesnych latach 90. Zaobserwowaliśmy, że przeciętna częstość występowania podniesionych poziomów przeciwciał aCl w tych materiałach waha się od 30 do ponad 50% analizowanych przypadków, oraz że korelują z nimi poziomy przeciwciał dla antygeny ściany komórkowej bakterii – szczególnie dla różnego typu LPS. Obserwacje te były prezentowane na I Konferencji pt. *Reumatologia w praktyce lekarza rodzinnego*, zorganizowanej w 1994 r. w Inowrocławiu [19].

Z powodu ówczesnych trudności technicznych w oczyszczeniu, wykrywaniu i analizie ilościowej antygenów bakteryjnych (LPS, PG) w materiale biologicznym praca nie została opublikowana, ale już wtedy zwróciliśmy uwagę na fakt obecności podniesionych poziomów nie tylko przeciwciał aCl, ale także czynników reumatoidalnych czy innych autoprzeciwciał w tych surowicach [19]. Fakt ten może się wiązać nie tylko z właściwościami *superantygennymi* wielu komponentów ściany komórkowej bakterii, ale także, a może przede wszystkim, z prezentacją układowi odpornościowemu dość powszechnie występujących reszt fosfodwuestrowych, fosforanowych lub innych PL, które występują np. w cząsteczce LPS (gdzie występują związane z lipidem A reszty fosfatydyloetanolaminy) [10, 11].

Prace związane z krzyżową reaktywnością przeciwciał aPL są prowadzone w Zakładzie Mikrobiologii i Serologii IR od wczesnych lat 90., a ich zasadniczym (nadrzędnym) celem jest wydzielenie i ustalenie, która z podpuł przeciwciał aPL jest istotnym elementem patomechanizmów odpowiedzialnych za objawy zespołów APS, które często towarzyszą układowym chorobom tkanki łącznej [9, 15, 17].

Wydaje się, że epitopem docelowym są grupy fosfodwuestrowe PL, stąd prawdopodobnie reakcje krzyżo-

we z antygenem ds i ssDNA, RNA i RNP oraz polimerami złożonymi z siarczanu heparanu i dermatanu (składniki proteoglikanów tworzących otoczkę włókien kolagenowych) oraz z heparyną.

Teoretycznie przeciwciała aPL mogą także obok ww. antygenów reagować z licznymi ważnymi biologicznie związkami zawierającymi grupy fosfodwuestrowe, np. NAD, NADP, FAD oraz CoA, które należą do grupy koenzymów i witamin (prace w toku).

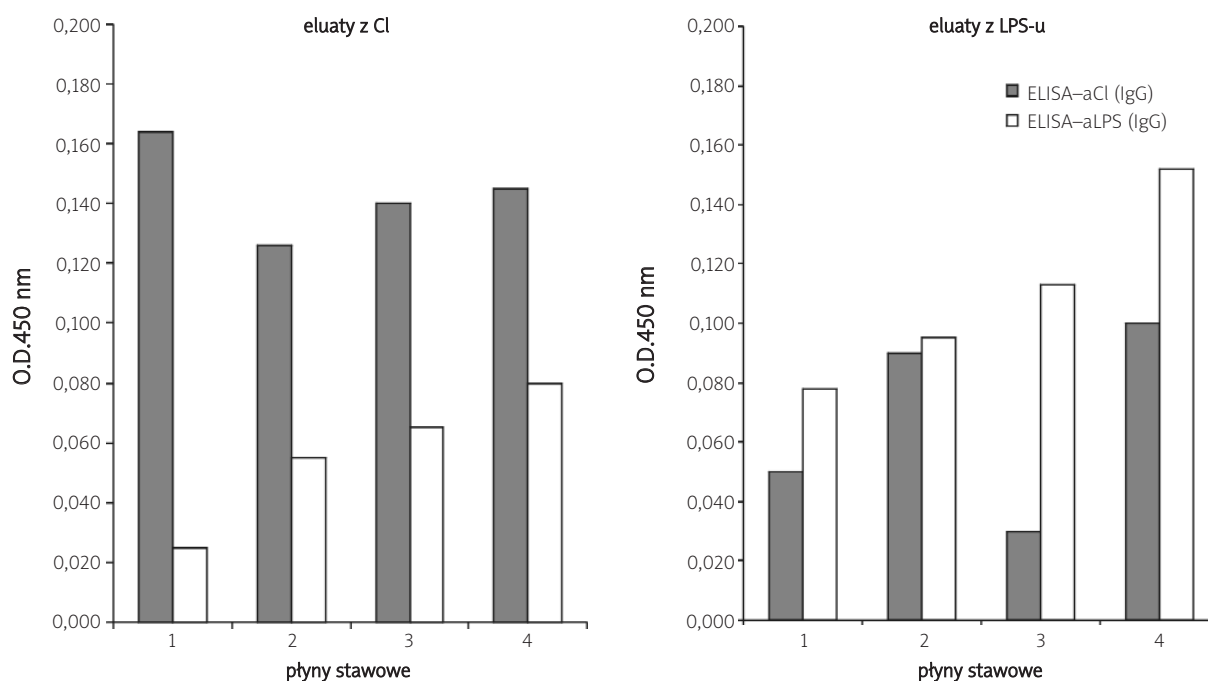
Jak wykazało wielu autorów, zapalenia stawów towarzyszące chorobom reumatycznym w znacznej części są spowodowane śródstawowym występowaniem sfagocytowanych i zabitych bakterii lub ich fragmentów, które są trudno metabolizowane przez *garnitur* enzymów lizosomalnych człowieka, co prowadzi do przewlekłego stanu zapalnego w jamie stawu. Wykazano, że przetrwanie antygenów bakteryjnych w modelowych eksperymentach na zwierzętach czy w przypadku zapaleń stawów u ludzi dochodzi do wielu miesięcy czy nawet lat [11].

Wziąwszy pod uwagę wszystkie ww. okoliczności oraz konieczność szybkiego zróżnicowania w praktyce klinicznej, czy mamy do czynienia z wczesną postacią układowych chorób tkanki łącznej, czy reaktywnego zapalenia stawów (ReZS) bądź z ujemną (*niemą*) postacią infekcyjnego zapalenia stawów oraz fakt, że infekcja w przebiegu schorzenia podstawowego może prowadzić do zaostrzenia procesu podstawowego, dokonano możliwie pełnej analizy obecności przeciwciał dla antygenów bakteryjnych i krzyżowo reagujących z antygenami bakteryjnymi przeciwciał aPL (w kontekście obecności LPS i KKI) w surowicach i płynach stawowych uzyskanych od pacjentów z zapaleniem stawów.

Wykazano obecność przeciwciał aCl w płynach stawowych (53,5%), co stanowi ponad połowę analizowanych, a przeciwciała dla jednego z 3 typów LPS w ponad 86% surowic. Obecność LPS (endotoksyny) w badanej grupie wykazano w ok. 30% płynów stawowych. Nie dziwi nieco niższa częstość występowania endotoksyny, ponieważ nie do końca rozstrzygnięty jest problem jej inaktywacji m.in. przez czynniki surowicze (np. z frakcji α_{1-2} -globulin) i/lub przeciwciała (np. aLPS czy aPL).

Endotoksyna jest bardzo złożoną, wieloepitopową cząsteczką i przeciwciała mogą być skierowane do różnych jej fragmentów, i nawet jeśli przeciwciało nie powoduje inaktywacji endotoksyny przez przyłączenie się bezpośrednio do lipidu A, co – jak twierdzi wielu autorów – powinno mieć miejsce [20], to może w postaci KKI ograniczyć czasowo aktywność biologiczną endotoksyny jako *superantygenu*, pirogeny czy immunogenu.

Będzie to przedmiotem osobnej pracy (w przygotowaniu do druku), gdyż puła przeciwciał dla LPS jest złożona z co najmniej 3 podpuł przeciwciał, dla tzw. antygeny O (części korowej i rdzeniowej) przeciwciał krzyżo-



Ryc. 5. Krzyżowa reaktywność przeciwciał aCl i aLPS, izolowanych metodą chromatografii powinowactwa, w odczynie ELISA z antygenem homologicznym i heterologicznym.

Fig. 5. Cross-reactivity of anti-Cl and anti-LPS antibodies, isolated by "affinity" chromatography method, in ELISA test with using homological and heterological antigen.

żowo reagujących z PL oraz przeciwciał dla lipidu A, a zastosowana przez nas metoda ELISA wykrywa sumę tych podpul, ponieważ płytki są opłaszczane całymi cząsteczkami LPS.

Wyraźnie widać związek (korelację) obecności przeciwciał aLPS, aCl i endotoksyny, gdyż aż w 3/4 płynów stawowych przeciwciała te współwystępują, a w pozostałych ok. 30% przypadków, gdzie albo brak przeciwciał dla LPS przy dodatnich aCl lub odwrotnie [aLPS(+), a Cl(-)] – poziomy tego przeciwciała, które jest poniżej przyjętej wartości odcięcia (*cut off*) – są z reguły wyższe od wartości średniej dla całej grupy.

Obecność wspólnego epitopu na obu cząsteczkach (LPS i Cl) potwierdziły eksperymenty z neutralizacją odczynu ELISA-aCl przez LPS, gdzie uzyskano neutralizację odczynu (wyrażoną spadkiem O.D._{450 nm} w odczynie ELISA po preinkubacji płynów stawowych z LPS) w większości płynów stawowych oraz krzyżową reaktywność przeciwciał z obydwoima antygenami (LPS i Cl) izolowanymi z wybranych płynów stawowych zarówno na antygenie LPS, jak i na Cl. Fakt, że w części płynów stawowych nie uzyskano neutralizacji, tylko podwyższenie odczytu, może wynikać z tego, że doszło w nich do dysocjacji KKI po dodaniu nadmiaru antygeny, czyli LPS.

Stosunkowo duża dawka LPS (100–200 µg), konieczna do neutralizacji odczynu ELISA-aCl (w średnio

ok. 50%) jest wg autorów spowodowana stosunkowo niskim odsetkiem grup fosfodwuestrowych w stosunku do całości cząsteczki LPS (niska gęstość epitopu zwiększa dawkę skuteczną konieczną do wykazania efektu).

Fakt, że krzyżowo reagujące przeciwciała aCl stanowią w całej puli przeciwciał aLPS tylko pewien procent, jest wg autorów ważny ze względu na potencjalną patogenność tych przeciwciał, co będzie ustalone w toku dalszych eksperymentów.

Obecność tej podpuli przeciwciał potwierdziły eksperymenty z izolowanymi metodą chromatografii powinowactwa czystymi przeciwciałami aCl i aLPS. W obu przypadkach przeciwciała te znacznie silniej reagowały z antygenem homologicznym (tj. takim, na którym były izolowane), niż z antygenem, który tylko zawierał wspólny epitop, indukujący przeciwciała krzyżowo reagujące.

Tocząca się dyskusja nad rolą krzyżowo reagujących przeciwciał, i to nie tylko aPL, ale także innych przeciwciał antybakteryjnych czy antywirusowych, nie doprowadziła jeszcze do ostatecznego ustalenia ich roli w patomechanizmie schorzeń układu ruchu, ale rysują się już pewne przesłanki wskazujące, po pierwsze, że obecność krzyżowo reagujących przeciwciał zwiększa zakres możliwości interakcji tych przeciwciał z różnymi antygenami komórek i tkanek docelowych zawierających PL, a to ewidentnie zwiększa zakres potencjalnych uszko-

dzeń (przy wspomaganii przez układy efektorowe, jak układ komórek cytotoksycznych czy układ dopełniacza) tkanek czy określonych narządów, co ma niewątpliwie miejsce w chorobach narządu ruchu [21–24].

Po drugie, wydaje się, że konieczna jest dokładna analiza korelacji nie tylko puł, ale i podpuł w obrębie przeciwciał krzyżowo reagujących, co obserwujemy w przypadku przeciwciał anty-dsDNA [9], gdyż proporcje potencjalnie patogennych podpuł przeciwciał względem tych, których patogenność jest teoretycznie mała czy wręcz mają one działanie ochronne (np. przeciwciała neutralizujące endotoksynę), może mieć ogromne znaczenie w analizie indywidualnych przypadków zapaleń stawów.

Przedstawiana praca to kolejna praca realizowana w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Informatyzacji nr 3PO5B 015 23. Jest ona próbą wykazania, że na podstawie całościowej analizy serologicznej odpowiedzi przeciwciałowej (podpuł przeciwciał) połączonej z analizą obecności i aktywności biologicznej DNA oraz substancji pochodzenia bakteryjnego uda się uzyskać postęp w różnicowaniu i prognozowaniu dalszego przebiegu chorób narządów ruchu.

Praca sfinansowana z grantu MNil nr 3PO5B 015 23.

Piśmiennictwo

- Kandiah DA, Krilis SA. Immunology and methods of detection of antiphospholipid antibodies. In: The antiphospholipid syndrome, Asherson RA, Cervera R, Piette JC, Shoenfeld Y (eds). CRC Press Inc. Boca Raton, New York, London, Tokyo 1996; 29-47.
- Loizou SA, Walport MJ, Davies KA. The antiphospholipid syndrome in infectious diseases. In: The antiphospholipid syndrome, Asherson RA, Cervera R, Piette JC, Shoenfeld Y (eds). CRC Press Inc. Boca Raton, New York, London, Tokyo 1996; 267-84.
- McNeil HP, Chesterman CN, Krilis SA. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. *Adv Immunol* 1991; 49: 193-201.
- Alarcón-Segovia D, Dezele M, Oria CV, et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine* 1989; 68: 353-65.
- Ząbek J. Przeciwciała antyfosfolipidowe i antykofaktorowe – immunochemia, patomechanizmy, metody oznaczania. *Twój Magazyn Medyczny. Reumatologia, wydanie specjalne* 2005; 3: 18-23.
- Ginsburg KS, Liang MH, Newcomer I, et al. Anticardiolipin antibodies and the risk for ischaemic stroke and venous thrombosis. *Ann Int Med* 1992; 117: 997-1002.
- Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2: 1211-4.
- DeBruijn JH. Chemical structure and serological activity of natural and synthetic cardiolipin and related compounds. *Br J Vener* 1966; 42: 121-9.
- Ząbek J, Luft S, Wojciechowska B i wsp. Badania nad krzyżową reaktywnością przeciwciał antyfosfolipidowych w układowych chorobach tkanki łącznej. *Reumatologia* 1995; 33: 111-20.
- Murphy TF, West TE, Apicella MA. Antigen release from the bacterial surface. In: *Microbial Antigenodiagnosis. Vol. I. General Considerations*. Wicher K (ed.). CRC Press Inc, Boca Raton, Florida 1987; 89-103.
- Noworyta J. Zakażenia bakteryjne i ich rola w indukcji i przebiegu chorób reumatycznych. *Reumatologia* 1996; 34: 800-11.
- Jorgensen JH. Endotoxemia. In: *Microbial Antigenodiagnosis. Vol. II. Practical Applications*. Wicher K (ed.). CRC Press Inc, Boca Raton, Florida 1987; 69-77.
- Noworyta J, Ząbek J, Brasse-Rumin M i wsp. Obecność endotoksyny w płynach stawowych u pacjentów z chorobami narządu ruchu jako marker podejrzananej etiologii infekcyjnej. *Reumatologia* 2006, 44, 26-33.
- Obojska K. Antybiotyki oligo- i polipeptydowe. *Post Bioch* 1976; 22: 55-90.
- Ząbek J, Luft S, Wojciechowska B i wsp. Problemy związane ze standaryzacją oznaczania przeciwciał antykardiolipinowych. *Reumatologia* 1998; 36: 5-14.
- Harris EN, Gharavi AE, Wasley GD, et al. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay and inhibition studies to distinguish between antibodies to cardiolipin from patients with syphilis or autoimmune disease. *J Infect Dis* 1988; 157: 23-31.
- Luft S, Frączek D, Jędryka-Góral A i wsp. Badania nad występowaniem przeciwciał surowiczych przeciwko kardiolipinie u chorych na układowe choroby tkanki łącznej. *Reumatologia* 1990; 28: 161-9.
- Noworyta J, Ząbek J, Brasse-Rumin M i wsp. Odpowiedź humoralna na wybrane antygeny pałeczek Gram-ujemnych w chorobach narządu ruchu. *Reumatologia* 2001; 39: 31-43.
- Ząbek J, Zawadzka F, Gutowska-Grzegorzczak G i wsp. I Konferencja Reumatologia w praktyce lekarza rodzinnego, Inowrocław 1994. *Reumatologia* 1994; 32: 153-4.
- Cedzyński M, Świerzko AS, Kaca W. Struktura chemiczna, biosynteza i aktywność biologiczna endotoksyn. Postulowane metody zapobiegania wstrząsowi endotoksycznemu. W: *Zapalenie – patofizjologia, klinika*. Wyd Med Press, Warszawa 1998; 232-50.
- Vaarala O, Vaara V, Palosuo T. Effective inhibition of cardiolipin-binding antibodies in Gram-negative infections by bacterial lipopolysaccharide. *Scand J Immunol* 1988; 28: 607-12.
- Meroni PL, Tincani A, Barcellini W, et al. What is the pathogenic role of antiphospholipid antibodies? *Clin Exp Rheumatol* 1994; 12: S43-7.
- Meroni PL, Tincani A, Harris EN, et al. The pathophysiology of antiphospholipid antibodies. *Clin Exp Rheumatol* 1989; 7 (Suppl 3): 81-4.
- Triplett DA. Antiphospholipid antibodies: proposed mechanisms of action. *Ann J Reprod Immunol* 1992; 28: 211-5.