

ЦЕЛУЛАРНИ ИМУНСКИ ОДГОВОР ЛИМФОЦИТА СИНОВИЈСКЕ ТЕЧНОСТИ НА АНТИГЕН УРЕАПЛАЗМЕ КОД БОЛЕСНИКА СА РАЈТЕРОВИМ СИНДРОМОМ

Љиљана ПАВЛИЦА¹, Нада ПЕЈНОВИЋ², Нада ДРАШКОВИЋ³

1. Клиника за реуматологију и клиничку имунологију, ВМА;
2. Институт за експерименталну медицину, ВМА; 3. Институт за микробиологију, ВМА, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ: Циљ овог рада био је да допринесе разјашњењу дела етиопатогенетских механизма у настанку артритиса код болесника са урогениталним обликом Рајтеровог синдрома. Испитано је 24 болесника са Рајтеровим синдромом (24 узорак крви и девет узорака синовијске течности) и 10 болесника контролне групе (10 узорака крви и пет узорака синовијске течности болесника са реуматоидним артритисом). Тестирање пролиферативног одговора лимфоцита крви и синовијске течности вршено је стимулацијом митогеном (PHA) и антигеном уреаплазме. Активност лимфоцита мерена је применом методе са ³H-тимидином. Пролиферација лимфоцита крви на стимулацију митогеном и антигеном уреаплазме није се разликовала између две групе болесника. Пролиферација лимфоцита синовијске течности на стимулацију митогеном није се разликовала, док је на стимулацију антигеном уреаплазме пролиферација била значајно већа код болесника са Рајтеровим синдромом ($p < 0,05$). Није нађена разлика у пролиферативном одговору лимфоцита крви и синовијске течности на стимулацију антигеном уреаплазме код болесника са Рајтеровим синдромом. Централно место у настанку артритиса код болесника са Рајтеровим синдромом припада целуларном имунском одговору, који је заправо одговор на присутни микроорганизам, „окидач“ ове болести.

Кључне речи: Рајтеров синдром, антиген уреаплазме, пролиферација лимфоцита, синовијска течност.

УВОД

Рајтеров синдром је серонегативни артритис који се испољава после акутне урогениталне или ентералне инфекције, а придружене офталмолошке и/или мукокутане промене чине клиничку слику потпуног облика болести. Према ранијим схватањима, артритис у Рајтеровом синдрому је рективне природе, што подразумева немогућност изолације проузроковача из оболелог зглоба. Међутим, има све више аутора који износе уверење да је артритис у урогениталном облику ове болести условљен присуством инфективног агенса у зглобу. Ту тврдњу заснивају на многобројним саопштењима налаза хламидије и уреаплазме у оболелом зглобу, применом нових дијагностичких метода молекуларне биологије, који су објављени у последњих десетак година [1-3]. Осим тога, бројна испитивања хуморалног и целуларног имунског одговора на присуство бактерије „окидач“ у оболелом зглобу код болесника са Рајтеровим синдромом подржале су претходне тврдње [4-7].

ЦИЉ РАДА

Циљ рада био је да допринесе разумевању једног сегмента етиопатогенетских механизма у настанку Рајтеровог синдрома тестирањем пролиферативног одговора лимфоцита крви и синовијске течности оболелог зглоба, на стимулацију митогеном и антигенском компонентом инфективног агенса, уреаплазме, једног од познатих „окидач“ урогениталног облика ове болести.

МЕТОД РАДА

Болесници

У четворогодишњем периоду испитано је 24 болесника са урогениталним обликом Рајтеровог синдрома: 22 особе мушког и две особе женског пола. Старост болесника била је од 18 до 59 година, у просеку 30 година. Испуњавали су следеће критеријуме: сви су имали претходну урогениталну инфекцију проузроковану хламидијом (*Chlamydia trachomatis*) или уреаплазмом (*Ureaplasma urealyticum*) и артритис, а неки и офталмолошке и/или мукокутане промене. Клинички, бактериолошки и серолошки налази испитаника приказани су у табели 1. Контролну групу чинило је 10 болесника са реуматоидним артритисом који су испуњавали критеријуме ARA (*American Rheumatism Association*): шест особа женског и четири особе мушког пола старости од 36 година до 72 године, у просеку 57 година.

Тести пролиферације лимфоцитија

Мононуклеарне ћелије испитиваних серума и синовијске течности изоловане су на густином градијенту (*Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway*) у одговарајућем обогаћеном медијуму (*RPMI; INC, Costa Mesa, USA*) и постављене у микроплоче у концентрацији 3×10^5 по култури. Додат је митоген PHA у четвороструко опадајућим концентрацијама, у нивоу од 6-60 $\mu\text{g/ml}$. Културе су инкубирани у термостату на 37°C у атмосфери са 5% CO₂. Максимална пролиферација постигнута је за 72 сата, а 16-18 сати пре завршетка инкубације додаван је ³H-тимидин који се уграђује у новосинтетисану ДНК. Додат је такође и антиген уреаплазме (UU; 50-6,3

ТАБЕЛА 1. Клинички, бактериолошки и серолошки налази код болесника са Рајтеровим синдромом.
 TABLE 1. Clinical, bacteriological and serological findings in patients with Reiter's syndrome.

Болесници <i>Patients</i>	Уретритис <i>Urethritis</i>	Промене на очима <i>Ocular lesions</i>	Мукокутане промене <i>Mucocutaneous lesions</i>	Трајање болести <i>Duration of disease</i>	Брис уретре/ /цервикса <i>Urethral/cervical swab</i>	Серумска антитела на ХТ и УУ <i>PB anti-CT/UU antibodies</i>	Синовијска течност <i>Synovial fluid (SF)</i>	Антитела на ХТ/УУ у син. течности <i>SF anti-CT/UU antibodies</i>
1	+	C	-	7 месеци <i>7 months</i>	CT	++/-	CT	+/-
2	+	-	-	6 месеци <i>6 months</i>	CT	-/-	CT	-/-
3	+	-	BC	4 месеца <i>4 months</i>	CT	-/-	-	-/-
4	+	C	BC	<4 недеље <i><4 weeks</i>	-	+ /++	UU	-/-
5	+	C	-	<4 недеље <i><4 weeks</i>	-	++/-	CT	-/-
6	+	-	SA	3 месеца <i>3 months</i>	UU	- /++	-	- /+
7	+	-	-	3 месеца <i>3 months</i>	-	- /++	UU	- /+
8	+	CC	SA	4 месеца <i>4 months</i>	UU	- /+	UU	HP ND
9	+	-	SA	10 месеци <i>10 months</i>	-	+ /++	UU	+ /++
10	+	-	-	5 месеци <i>5 months</i>	CT	- /+	-	- /-
11	+	CC	-	4 месеца <i>4 months</i>	-	++/-	HP ND	HP ND
12	+	C	-	11 месеци <i>11 months</i>	CT	- /+	HP ND	HP ND
13	+	C	-	4 недеље <i>4 weeks</i>	-	++/-	CT	- /-
14	+	-	-	5 месеци <i>5 months</i>	CT	- /-	HP ND	HP ND
15	+	CC	SA	<4 недеље <i><4 weeks</i>	CT	- /-	-	NR ND
16	+	-	-	6-7 недеља <i>6-7 weeks</i>	CT	- /-	HP ND	HP ND
17	+	C	-	4 месеца <i>4 months</i>	CT	- /-	-	- /-
18	+	C	BC	5-6 недеља <i>5-6 weeks</i>	UU	+ /-	UU	HP ND
19	cerv	C	-	4 месеца <i>4 months</i>	-	- /+	HP ND	HP ND
20	cerv	I	SA	<4 недеље <i><4 weeks</i>	UU/ UU,CT	- /-	UU	HP ND
21	+	-	-	<4 недеље <i><4 weeks</i>	CT	- /+	-	HP ND
22	+	CC	-	5 месеци <i>5 months</i>	UU	- /+	UU	HP ND
23	+	-	-	<4 недеље <i><4 weeks</i>	CT	++ /+	HP ND	HP ND
24	+	-	-	<4 недеље <i><4 weeks</i>	-	- /++	-	- /+

C – конјунктивитис, CC – кератокоњунктивитис, I – иридоциклитис, BC – баланитис цирцинатни; SA – стоматитис афтозни, cerv – цервицитис, ++ – активна инфекција, + – скорашња инфекција, HP – није рађено, ХТ – хламидија трахоматис, УУ – уреоплазма уреалитикум

C – conjunctivitis, CC – ceratoconjunctivitis, I – iridocyclitis, BC – balanitis circinata, SA – stomatitis aphotosa, cerv – cervicitis, ++ – actual infection, + – recent infection, ND – not done, CT – Chlamydia trachomatis, UU – Ureaplasma urealyticum, PB – peripheral blood

μg/ml; Војномедицинска академија, Београд). Трајање културе је шест дана, а осам часова пре краја инкубације додаје се ³X-тимидин (0,2 μCi по култури) [8]. Активност узорака мерена је у сцинтилационом бега бројачу. Резултати су изражени у апсолутним вредностима као импулси у минути (срт/min) или у релативним вредностима као индекс пролиферације. Индекс пролиферације лимфоцита крви и синовијске течности

одређен је из односа максималне пролиферације (срт) у присуству антигена и пролиферације у нестимулисаним културама.

Припрема антигена уреоплазме. Изолација уреоплазме рађена је у течним селективним подлогама [9]. Узорак од 8 ml денатурисан је загревањем на 60°C у току 15 минута уз стално мешање на магнетској мешалици. Узорак је потом центрифугиран на

2000×g 40 минута ради одстрањења непотребних честица. Супернатант је пажљиво пренет у претходно одмерене стаклене епрувете (Corex) и центрифугиран на 9000×g у току 30 минута ради таложења уреаплазме. Талог је испран три пута стерилним физиолошким раствором, а финални талог 15 ml ресуспендован је у 1,2 ml физиолошког раствора.

Бактериолошка испитивања

Изолација бактерија вршена је из брисева уретре, цервикса, експримата простате и из узорака синовијске течности. Синовијска течност стављана је у стерилну епрувету са 5 ml хепарина и одмах је одношена у лабораторију. Изолација хламидије рађена је у култури Мекој (McCoу) ћелија третираних циклохексимидам [10], а уреаплазме у течним селективним подлогама [9].

Серолошка испитивања

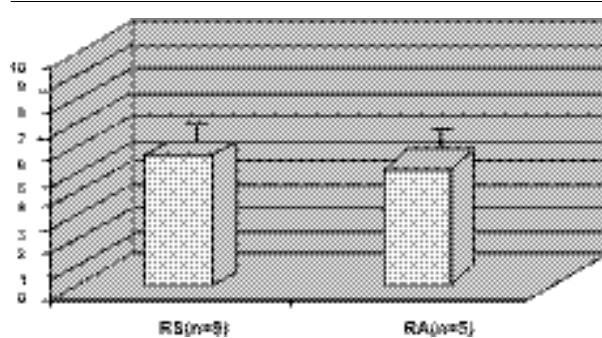
Одређивање титра антитела на хламидију и уреаплазму из синовијске течности вршено је једном, на почетку испитивања, а из серума два пута – на почетку испитивања и после 14 дана. Серолошка дијагностика хламидије рађена је методом имунопероксидазе за доказивање IgM, IgA и IgG антитела специфичних за хламидију (IPAZYME Chlamydia: Savyon Diagnostics Ltd, Bear Sheve, Israel). Знак активности инфекције је присуство IgM, IgA и високих титрова IgG антитела (већих од 1:64). Серолошка дијагностика уреаплазме рађена је тестом инхибиције метаболизма употребом комерцијално припремљених сетова (International Mycoplasma, BP 70583030 Toulon, Cedex 9, France). Знак активности инфекције су титрови већи од 1:16.

Статистичка анализа

За статистичку анализу добијених података коришћени су: средња вредност плус-минус стандардна грешка (SE) и Ман-Витнијев U-тест. Праг значајности била је вероватноћа од 0,05 и 0,01.

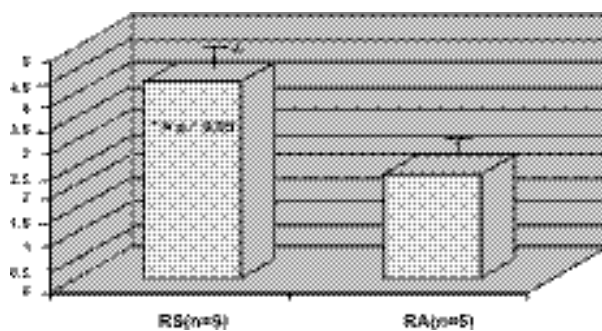
РЕЗУЛТАТИ

Пролиферација лимфоцита крви на стимулацију митогеном и антигеном уреаплазме није се разликовала између болесника са Рајтеровим синдромом и болесника контролне групе. Такође није било разлике у пролиферативном одговору лимфоцита синовијске течности на митогену стимулацију између болесника са Рајтеровим синдромом и болесника контролне групе (Графикон 1). Међутим, пролиферација лимфоцита синовијске течности на стимулацију антигеном уреаплазме била је већа код болесника са Рајтеровим синдромом у поређењу са болесницима контролне групе, а разлика је статистички значајна ($p < 0,05$) (Графикон 2). Није нађена разлика у пролиферативном одговору лимфоцита крви и синовијске



ГРАФИКОН 1. Пролиферација лимфоцита синовијске течности на митогену (PHA) стимулацију код болесника са Рајтеровим синдромом и болесника контролне групе изражена кроз средњу вредност индекса пролиферације $\pm SE$ ($p > 0,05$).

GRAPH 1. Proliferation of synovial fluid mononuclear cells from patients with Reiter's syndrome and control group in response to mitogen (PHA). Responses are expressed as mean values $\pm SE$ ($p > 0,05$).



ГРАФИКОН 2. Пролиферација лимфоцита синовијске течности на стимулацију антигеном уреаплазме код болесника са Рајтеровим синдромом и болесника контролне групе изражена кроз средњу вредност индекса пролиферације $\pm SE$ ($p < 0,05$).

GRAPH 2. Proliferation of synovial fluid mononuclear cells from patients with Reiter's syndrome and control group in response to urea plasma antigen. Responses are expressed as mean values $\pm SE$ ($p < 0,05$).

течности на стимулацију антигеном уреаплазме код болесника са Рајтеровим синдромом.

ДИСКУСИЈА

У овом раду показано је да лимфоцити синовијске течности болесника са Рајтеровим синдромом показују значајно већи пролиферативни одговор на стимулацију антигеном уреаплазме од лимфоцита синовијске течности болесника контролне групе, док разлика у пролиферативном одговору не постоји када су лимфоцити стимулирани митогеном. Резултати наших испитивања указују на то да је повећан пролиферативни одговор лимфоцита синовијске течности болесника са Рајтеровим синдромом последица присуства антигена и антигеном стимулираних лимфоцита у инфламаторном зглобу. То значи да се главни имунски одговор на уреаплазму одиграва на целуларном нивоу у оболелом зглобу. Ово потврђују ранији налази Форда (Ford) и сарадника да лимфоцити синовијске течности пре него

лимфоцити крви указују на инфективни узрок артритиса [11, 12]. Хоровиц (*Horowitz*) и сарадници [13] су показали да постоји корелација између клиничке ремисије постигнуте после ерадикације уреоплазме употребом антибиотика и опадања целоуларног имунског одговора лимфоцита синовијске течности на стимулацију антигеном уреоплазме. Није нађена статистички значајна разлика у пролиферативном одговору лимфоцита крви и синовијске течности на стимулацију антигеном уреоплазме код болесника са Рајтеровим синдромом, што се подудара са нашим налазима. Хуморални имунски одговор на уреоплазму само је показатељ инфекције овом бактеријом и указује на постојање сензибилизације имунског система туђим антигеном.

Треба нагласити да је пролиферација лимфоцита синовијске течности на антиген уреоплазме код наших болесника била нижа него што је то већина других аутора описивала [11-15]. Ова разлика може се тумачити пре свега различитим припремама антигена, односно избора соја уреоплазме за издвајање антигена или различитим условима култивације лимфоцита. Упркос томе, ове налазе треба пре свега схватити као одраз локалног присуства *CD4 T+* лимфоцита у синовијској течности, који су рективни са антигеном уреоплазме. Због тога, они су вредни подаци које у будућим истраживањима треба додатно потврђивати, користећи сензитивније методе.

ЗАКЉУЧАК

Закључили смо да присуство антигена, антиген-специфичних *T* ћелија и ефикасних антиген презентирајућих ћелија (*CD4+* ћелије) у зглобу оболелих од Рајтеровог синдрома упућује на тврдњу да целоуларни имунски одговор има централно место у патогези артритиса у оболелих од Рајтеровог синдрома.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gerard HC, Branigan PJ, Schumacher HR, Hudson AP. Synovial *Chlamydia trachomatis* in patients with reactive arthritis/Reiter's

- syndrome are viable but show aberrant gene expression. *J Rheumatol* 1998; 25: 734-42.
2. Vittecoq O, Schaefferbeke T, Favre S, Daragon A, Biga N, Cambon-Michot C, et al. Molecular diagnosis of *Ureaplasma urealyticum* in an immunocompetent patient with destructive reactive polyarthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 2084-9.
3. Taylor-Robinson D, Gilroy CB, Horowitz S, Horowitz J. *Mycoplasma genitalium* in the joints of two patients with arthritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 1066-9.
4. Fendler C, Wu P, Eggens U, Laitko S, Sorensen H, Distler A, et al. Longitudinal investigation of bacterium-specific synovial lymphocyte proliferation in reactive arthritis and Lyme arthritis. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 784-8.
5. Goodall JC, Yeo G, Huang M, Raggiacchi R, Gaston JS. Identification of *Chlamydia trachomatis* antigens recognized by human *CD4+* lymphocytes by screening an expression library. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1513-22.
6. Hermann E, Meyer-zum-Buschenfelde KH. Value of antigen, antibody and pathogen-specific lymphocyte detection in diagnosis of pathogen-induced arthritis. *Z Rheumatol* 1995; 54: 16-25.
7. Halme S, Latvala J, Karttunen R, Palatsi I, Saikku P, Surcel HM. Cell-mediated immune response during primary *Chlamydia pneumoniae* infection. *Infect Immun* 2000; 68: 7156-8.
8. Sieper J, Kingsley G, Palacios-Boix A, Pitzalis C, Treharne J, Hughes R, et al. Sensorial T lymphocyte specific immune response to *Chlamydia trachomatis* in Reiter's disease. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 588-98.
9. McCormack WM, Almeida PC, Bailey PE, Grady EM, Lee YH. Sexual activity and vaginal colonization with genital mycoplasmas. *JAMA* 1972; 221: 1375-7.
10. La Scolea LJ, Keddell JE. Efficacy of various cell culture procedures for detection of *Chlamydia trachomatis* and applicability to diagnosis of pediatric infections. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 705-8.
11. Ford DK, da Roza D, Shah P. Cell-mediated immune responses of synovial mononuclear cells to sexually transmitted, enteric and mumps antigens in patients with Reiter's syndrome, rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1981; 8: 220-32.
12. Ford DK, da Roza D, Schulzer M. Lymphocytes from the site of disease but not blood lymphocytes indicate the cause of arthritis. *Ann Rheum Dis* 1985; 44: 701-10.
13. Horowitz S, Horowitz J, Taylor-Robinson D, Sukenik S, Apte RN, Bar-David J, et al. *Ureaplasma urealyticum* in Reiter's syndrome. *J Rheumatol* 1994; 21: 877-82.
14. Ford DK, da Rosa D, Shah P, Wenman WM. Cell-mediated immune responses of synovial mononuclear cells in Reiter's syndrome against *Ureaplasma* and *Chlamydial* antigens. *J Rheumatol* 1980; 7: 751-5.
15. Braun J, Grolms M, Distler A, Sieper J. The specific antibacterial proliferation of reactive arthritis sensorial T cells is not due to their higher proportion of *CD45RO+* cells compared to peripheral blood. *J Rheumatol* 1994; 21: 1702-7.

CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSE OF SYNOVIAL FLUID LYMPHOCYTES TO UREAPLASMA ANTIGEN IN REITER'S SYNDROME

Ljiljana PAVLICA¹, Nada PEJNOVIĆ², Nada DRAŠKOVIĆ³

1. Clinic of Rheumatology and Clinical Immunology, Military Medical Academy; 2. Institute of Immunology, MMA; 3. Institute of Microbiology, MMA, Belgrade

INTRODUCTION

Reiter's syndrome (RS) is a seronegative arthritis that occurs after urogenital or enteric infection which in addition with ocular and/or mucocutaneous manifestations presents complete form of disease. According to previous understanding arthritis in the RS is the reactive one, which means that it is impossible to isolate its causative agent. However, there are the more and more authors suggesting that arthritis in the urogenital form of disease is caused by the infective agent in the affected joint. This suggestion is based on numerous

studies on the presence of *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum* in the inflamed joint by using new diagnostic methods in molecular biology published in the recent literature [1-3]. Besides, numerous studies of the humoral and cell-mediated immune response to „triggering“ bacteria in the affected joint have supported previous suggestions [4-7].

Aim of the study was to determine whether synovial fluid T-cells specifically recognize the „triggering“ bacteria presumably responsible for the Reiter's syndrome.

METHOD

The ³H-thymidine uptake procedure for measuring lymphocyte responses was applied to lymphocytes derived concurrently from synovial fluid (SF) and from peripheral blood (PB) [8]. Ureaplasma antigen and mitogen PHA stimulated lymphocytes in 24 RS patients (24 PB samples, 9 SF samples) and the results were compared with those found in 10 patients with rheumatoid arthritis (RA) (10 PB samples, 5 SF samples).

Preparation of ureaplasma antigen. Ureaplasma was cultured on cell-free liquid medium [9]. Sample of 8 ml was heat-inactivated for 15 minutes at 60°C and permanently stirred with magnetic mixer. The sample was centrifuged at 2000 x g for 40 minutes and then deposits carefully carried to other sterile glass tubes (Corex) and recentrifuged at 9000 x g for 30 minutes. The deposit was washed 3 times in sterile 0.9% NaCl, and final sediment was resuspended in 1.2 ml sterile 0.9% NaCl.

Bacteriology: Chlamydia trachomatis was isolated by cell culture using cycloheximide-treated McCoy cells [10], while Ureaplasma urealyticum was identified according to its biochemical properties grown on cell-free liquid medium [9].

RESULTS

Proliferative response of the PB lymphocytes to stimulation by mitogen and ureaplasma antigen did not differ between RS and RA patients. Also, there was no difference in proliferative response of SF lymphocytes to mitogen stimulation between RS and RA patients (Figure 1). However, proliferation of SF lymphocytes stimulated by ureaplasma antigen was significantly elevated in RS patients compared with the control group. This difference is statistically significant ($p < 0.05$) (Figure 2). Difference in proliferative response of the PB and SF lymphocytes stimulated by the ureaplasma antigen was not found in RS patients.

DISCUSSION

It was found that SF lymphocytes of RS patients showed significantly elevated proliferative response to stimulation by the ureaplasma antigen compared with SF lymphocytes of the control group. There was

no difference when the lymphocytes were stimulated by the mitogen. Our findings suggest that elevated proliferative response of lymphocytes is the sign of stimulation cell-mediated immunity to antigen present in inflamed joint. Hence, the main immune response to Ureaplasma is on the cell-mediated level in the affected joint. This confirms the earlier finding reported by Ford et al. who concluded that synovial rather than peripheral blood lymphocytes indicate the microbiological cause of arthritis [11, 12]. Horowitz et al. demonstrated the correlation between clinical remission after antibiotic therapy and eradication of Ureaplasma, together with a decrease in cellular immune response synovial fluid lymphocytes to ureaplasma antigen stimulation [13]. In that study Horowitz did not find statistically significant difference of ureaplasma proliferative response between PB and SF lymphocytes in patients with RS. We obtained the same results. Then we concluded that sensibilization of immune system exist in the presence of foreign antigen in RS patients.

The other authors demonstrated higher stimulation indices than the ones we found in our patients [11-15]. This difference may be the result of different preparation of antigens, in other words selection of serotype of Ureaplasma for antigen preparation different conditions of lymphocyte cultivation.

We concluded that the presence of antigen, antigen-specific T cells and efficient antigen-presenting cells (CD4+T cells) in the joint of RS patients strongly suggests that a T-cell-mediated response to bacteria has the central role in the pathogenesis of Reiter's syndrome.

Key words: Reiter's syndrome, ureaplasma antigen, proliferative lymphocyte response, synovial fluid.

Ljiljana PAVLICA

Klinika za reumatologiju i kliničku imunologiju

Vojnomedicinska akademija

Crnotravska 17, 11000 Beograd

Tel: 011 661 122 / 26-208, 26-270