

УДК 612.017:571.27

Специфические антибактериальные антитела в сыворотке крови больных периодической болезнью

Г.П. Манукян

*Институт молекулярной биологии НАН РА
0014, Ереван, ул. Асратяна, 7*

Ключевые слова: периодическая болезнь, комменсальная микробиота, специфические антитела, IgG, IgA, адаптивный иммунитет

Периодическая болезнь (ПБ) [FMF, MIM249100] – системное аутовоспалительное заболевание, встречающееся преимущественно у народностей, проживающих в Средиземноморском бассейне, особенно у армян, евреев, арабов, турок и некоторых других национальностей [18]. Заболевание характеризуется острыми, саморазрешающимися атаками лихорадки и полисерозитов с массивной миграцией полиморфноядерных нейтрофилов. ПБ – наследственное аутосомно-рецессивное заболевание, причиной которого являются мутации в MEKV гене, кодирующем белок – пирин/маренострин, который экспрессируется в нейтрофилах, эозинофилах, моноцитах, дендритных клетках и фибробластах [2,3,16,17].

Несмотря на генетическую природу ПБ, факторы окружающей среды (диета, стресс, физическая нагрузка) играют определенную роль в запуске периодических атак [6,19]. Что это за факторы и каким образом они способствуют инициации острого воспаления остается неизвестным. Предполагается, что острые атаки при ПБ являются результатом нарушения баланса между иммунной системой хозяина и различными внешними и внутренними агентами, включающими и бактериальный компонент.

Взаимодействие между хозяином и кишечной микробиотой включает распознавание бактериальных сигналов с помощью рецепторов врожденного иммунитета, а именно TLR (Toll-подобные) и NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) рецепторов [5,12]. Подобный сигналинг важен не только для распознавания и запуска защитных механизмов, направленных против бактерий, но и для нормального функционирования иммунной системы, поддержания кишечного

эпителиального гомеостаза, регуляции воспаления слизистой и поддержания целостности эпителиального барьера [1,11]. Нарушения в системе распознавания комменсальных бактерий хозяином могут привести к тяжелым воспалительным заболеваниям, таким как заболевание Крона, неспецифический язвенный колит и т.д. [8].

Пирин относится к семейству белков CATERPILLER и является важнейшим регулятором провоспалительной активности клеток [18]. Было выдвинуто предположение, что белки этого семейства распознают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs) подобно TLRs. Микробиота кишечника находится под строгим контролем со стороны иммунной системы, и отклонения в гене, ответственном за регуляцию врожденного иммунитета, могут вызывать неограниченную иммунную активацию в ответ на обыкновенные сигналы со стороны комменсальных бактерий. При аутовоспалительных патологиях, к которым относится ПБ, иммунная система может чрезмерно и неадекватно реагировать на комменсальные бактерии, которые в норме игнорируются иммунной системой. Предполагается, что нейтрофилы, моноциты и дендритные клетки (ДК) больных ПБ могут проявлять повышенную чувствительность к физиологически нормальным концентрациям бактериальных лигандов, проникающих из просвета кишечника, и вызывать эпизоды острого воспаления, а также способствовать хроническому субклиническому воспалению в межприступном периоде. Одним из последствий такой продолжающейся стимуляции врожденного иммунитета может стать примирование адаптивного иммунного ответа, направленного на антигены кишечных комменсальных бактерий.

В этой связи целью настоящей работы явилось изучение системной иммунной реактивности (специфические IgG и IgA), направленной против кишечных комменсальных бактерий, в сыворотке больных ПБ и здоровых лиц.

Материал и методы

В исследование были вовлечены 13 больных ПБ (средний возраст – 24.3), из которых 9 больных находились в стадии ремиссии, а 4 – в остром периоде заболевания. Контрольную группу составили 11 здоровых лиц (средний возраст – 32.4). Сыворотка крови и образцы кала больных ПБ предоставлены медицинским центром “Армения”, отделением гастроэнтерологии и периодической болезни. Клинический диагноз ПБ ставился с учетом критериев Tel-Hashomer [10], а генетическое подтверждение мутаций в MEFV гене проведено в Центре медицинской генетики (Ереван). Материалом исследования для определения сывороточных антител к антигенам комменсальных бактерий послужила сыворотка крови и образцы кала. Образцы крови центри-

фугировали, а сыворотку хранили при -25°C до проведения исследований. Образцы крови взяты у всех больных ПБ и здоровых лиц, а образцы кала у 3 больных ПБ в межприступном периоде.

Анализ фекальной флоры

Образцы кала были собраны у 3 больных ПБ в периоде ремиссии и помещены в стерильные пробирки, после чего обработаны в течение 1 часа. Примерно 0.9 г фекальных образцов были разведены 1:10 в 0.9% NaCl, затем различные разведения были высеваны на чашки с селективными и неселективными средами. Все анаэробные бактерии на анаэробных селективных средах инкубировали в анаэробных камерах (10% CO_2 -90% N_2 атмосфер при 37°C). Чашки со средами для аэробных бактерий инкубировали 24-48 часов при 37°C . Со всех чашек было отобрано 120 изолятов, определение бактерий проводили с помощью окрашивания бактерий по Грамму и микроскопированию, а также секвенированием 16S rRNA генов.

Таксономическая идентификация бактерий с помощью 16S rDNA секвенс анализа

Для амплификации 16S rRNA генов была применена полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием непосредственно бактериальных колоний (1/4 биомассы из 1 мм колонии), с бактериальными праймерами 27F и 1492R (таблица). Амплификацию проводили с использованием GoTaq PCR набора (Promega, UK) при следующих условиях: начальная денатурация ДНК образца при 95°C 7 мин, с последующими 30 циклами денатурации при 95°C 30 сек, отжига при 57°C 30 сек, элонгации при 72°C 2 мин и конечной элонгацией при 72°C 10 мин. Ампликоны очищали с применением набора Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega, UK) согласно инструкциям производителя. 16S продукты анализировали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе Beckman (Beckman, UK) с использованием 6 бактериальных праймеров (таблица).

Ассемблирование полученных секвенсов проводили с помощью программы CLUSTALX v1.83 с последующим мануальным редактированием хроматограмм. Полученные консенсус секвенсы были введены в базу данных GenBank с использованием программы BLAST в NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Секвенсы с более чем 99% ДНК гомологией с данными GenBank рассматривались как аналогичные штаммам базы данных.

Таблица

Праймер	Олигонуклеотидная последовательность	Позиция в <i>E. coli</i>
27F ¹	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	8-27
1492R ¹	5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3'	1510-1492
519F ²	5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3'	519-536
519R ²	5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3'	536-519
926F ²	5'-AAACTCAAGGAATTGACGG-3'	907-926
926R ²	5'-CCGTCATTCCTTGAAGTTT-3'	926-907

Праймеры, использованные при секвенировании 16S rRNA генов

¹Weisburg WG, et al., 1991[22]; ²Lane DJ, et al., 1985 [9]

Измерение бактерия-специфических IgG антител в сыворотке

Специфические антитела, реагирующие с бактериями, были определены с помощью энзим-связывающего иммуносорбентного анализа (ELISA). Вкратце, для приготовления бактериальных лизатов чистые бактериальные культуры были растворены в карбонат-бикарбонатном буфере и гомогенизированы с помощью процедуры механического измельчения с Lysing Matrix E (MP Biomedicals, UK) в мини-битере (FastPrep FP120). 0.5 мкг/мкл бактериальных протеинов были использованы в качестве вводимого в ячейки антигена. Лизаты каждого из бактериальных штаммов были введены в стандартный 96-луночный планшет (immulon 4HBX) и оставлены на всю ночь при 4°C; после чего промыты в PBS, содержащем Tween 20 (PBST) и блокированы с 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA) в PBS 1 час при комнатной температуре. Последовательные 2-кратные разведения образцов исследуемых сывороток в PBS добавляли в ячейки и инкубировали 2 часа. После очередной промывки в ячейки добавляли козий античеловеческий иммуноглобулин G, конъюгированный с пероксидазой (Sigma-Aldrich, UK) в разведении 1:12000 в PBS и инкубированы 1 час. Тетрамethyl-бензидиновый (TMB) жидкий субстрат для ELISA (Sigma-Aldrich, UK) был добавлен в ячейки после промывки, цветная реакция продолжалась 20 мин, после чего реакцию останавливали добавлением 2N раствора H₂SO₄. Считывание оптических плотностей производили с помощью иммуноферментного ридера (Stat Fax 303+) с использованием волн длиной 450 и 630 нм.

Измерение бактерия-специфических IgA антител в сыворотке

Определение специфического IgA проводили аналогично определению IgG до стадии добавления вторичных антител. На этой стадии

был добавлен козий античеловеческий IgA (Sigma-Aldrich, UK) в разведении 1:2000 в PBS и ячейки инкубировали 1 час. За очередной промывкой ячеек следовала стадия добавления антикозьего IgG (1:1000), конъюгированного с биотином (Sigma-Aldrich, UK) с инкубацией на 1 час. После промывки следовало добавление экстравидин-пероксидазы (Sigma-Aldrich, UK) в разведении 1:1000 в PBS и инкубации на 1 час. Добавление субстрата и измерение оптической плотности были выполнены, как описано выше.

Статистический анализ

Статистический анализ выполнен с использованием программного пакета Statsoft Statistica (www.statsoft.com). Статистическую достоверность между средними значениями исследуемых групп оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Значения $p < 0.05$ были приняты как статистически достоверные.

Результаты и обсуждение

Для того, чтобы определить вызывают ли антигены комменсальных бактерий активацию специфического адаптивного системного ответа при ПБ, были определены наиболее часто изолируемые из кала больных ПБ комменсальные бактерии с помощью культуральных методов и 16S rDNA секвенс анализа, который является на сегодняшний день основным стандартным средством филогенетической классификации в описании бактериальных штаммов. Исходя из данных по секвенированию 16S rRNA генов, превалирующими бактериями, изолируемыми культуральными методами, стали бактерии рода *Bacteroides*, что совпадает с анализом биоразнообразия кишечной микробиоты при ПБ [7]. Другими часто изолируемыми бактериями стали штаммы *Escherichia coli* и бактерии, принадлежащие к бактериальным родам *Parabacteroides*, *Enterococcus* и *Lactobacillus*. Отобранные для иммунологических исследований 15 бактериальных штаммов, представляют 5 родов: *Bacteroides* – *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides sp.*, *Bacteroides dorei*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides finegoldii*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides uniformis*; *Parabacteroides* – *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides merdae*; *Escherichia* – *E.coli*, *Escherichia sp.*; *Enterococcus* – *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecium* и *Lactobacillus* – *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus reuteri*, что покрывает широкий спектр биоразнообразия, предоставляя возможность для скрининга специфического иммунного ответа на бактериальные антигены.

Бесклеточные лизаты отобранных бактерий использовали в качестве бактериальных антигенов для определения уровней бактерия-

специфических антител IgG и IgA в сыворотке больных ПБ и здоровых контролей. Разницы в специфических IgG и IgA к антигенам всех исследуемых комменсальных бактерий в сыворотке больных ПБ на стадии ремиссии и атаки обнаружено не было.

Сыворотка больных ПБ продемонстрировала чрезмерный системный IgG ответ, направленный против безвредных кишечных бактерий, и наибольшие уровни были обнаружены к *E. coli* и штаммам, принадлежащим к родам *Parabacteroides*, *Bacteroides* и *Enterococcus*. Наиболее значительные различия уровней специфических IgG были обнаружены в случае использования антигенов *E. coli* ($p < 0.001$) и *Parabacteroides distasonis* ($p < 0.001$) с повышением IgG в 2.5 раза в сыворотке больных ПБ по сравнению с контрольной группой (рисунок). Схожие результаты были получены при исследовании уровней специфических IgG, направленных на цельные антигены штаммов, принадлежащих к роду *Bacteroides* и *Parabacteroides merdae*, где разница в уровнях составила от 1.5 до 1.8 ($p < 0.01$ – $p < 0.001$). Измерение сывороточных IgG к бактериям рода *Enterococcus* выявило небольшое повышение специфических антител в группе больных ПБ: *E. faecium* ($p < 0.001$), *E. hirae* ($p < 0.01$). Единственными бактериями, не вызывающими повышения уровня циркулирующих в крови больных ПБ специфических IgG, явились бактерии рода *Lactobacillus*. Следует отметить, что в контрольной группе вариации специфических антител были очень низкими, тогда как группа больных ПБ продемонстрировала очень большие флуктуации соответствующих параметров.

В отличие от данных, полученных при исследовании специфических IgG антител к комменсалам, результаты определения специфических IgA антител продемонстрировали иную картину. Существенных отличий между уровнями бактерий-специфических IgA к исследуемым бактериям в сыворотках исследуемых групп обнаружено не было (рисунок), за исключением специфического IgA к *E. coli* штаммам ($p < 0.05$) и *P. merdae* ($p < 0.01$), уровни которых были незначительно повышены в сыворотке крови больных ПБ по сравнению с контрольной группой. Основная часть IgA синтезируется в lamina propria, количество которого в сумме превышает все другие иммуноглобулины вместе взятые [15]. В отличие от секреторного IgA, сывороточный IgA при связывании с IgA рецептором – FcαR является сильным триггером провоспалительной активности [20]. Следует также отметить, что циркулирующие концентрации иммуноглобулинов не отражают уровни локально синтезируемых иммуноглобулинов слизистых.

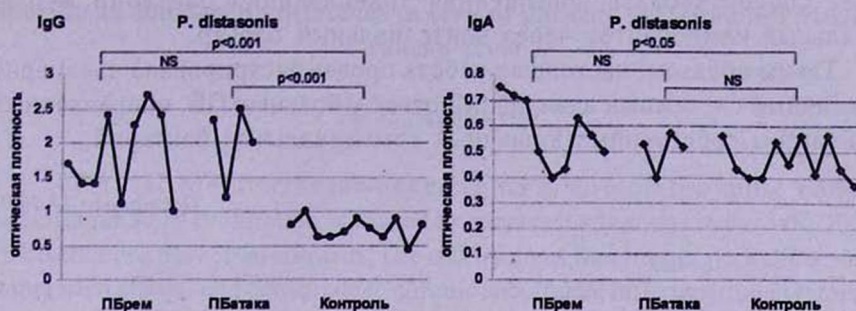


Рисунок. Специфические IgG и IgA к *P. distasonis* в сыворотке крови больных ПБ на стадии ремиссии (ПБрем), атаки (ПБатака) и здоровых лиц (Контроль). Точка – среднее значение для каждого субъекта исследования; достоверные значения – p , недостоверные – NS

Одним из главных защитных механизмов организма, предотвращающих транслокацию бактерий из просвета кишечника, является пассивный физический барьер, а именно образование слизи, защищающей эпителий, а также целый ряд клеточных и гуморальных механизмов. В норме адаптивный иммунитет в кишечнике в основном ограничен клетками, вырабатывающими антиген-специфический секреторный IgA, который способен нейтрализовать бактериальные токсины, вирусы, элиминировать антигены, поступающие на слизистую из просвета кишечника, стимулирует фагоцитоз, обеспечивая местный иммунитет [13]. Дефекты в любой из вышеперечисленных механизмов защитных систем могут привести к серьезным нарушениям и заболеваниям [4,21]. В норме процент бактериальной транслокации составляет 5-10% [14], что не оставляет негативных последствий, так как имеет физиологический характер и бактерии/бактериальные антигены не проходят далее мезентеральных лимфоузлов. У исследованной контрольной группы в данной работе уровень антител, направленный против комменсальных бактерий, был или очень низким или не обнаруживался. Таким образом, в норме антигены кишечных комменсальных бактерий не попадают в системную циркуляцию. Остается открытым вопрос, каким образом адаптивный иммунитет становится примированным к комменсальным бактериям у больных ПБ. В условиях мутированного пиринина нейтрофилы, моноциты и ДК могут быть высокочувствительными к экзо- и эндогенным стимулам, в частности к бактериям/бактериальным антигенам, транслоцирующим из просвета кишечника. В условиях нормального функционирования иммунной системы обыкновенные концентрации бактерий/бактериальных лигандов обрабатываются организмом без негативных последствий, но в генетически измененном организме с гиперчувствительной инфламасомой те же концентрации могут запустить воспалительный процесс. В свою очередь воспалению

может способствовать повышенной транслокация бактерий и бактериальных компонентов через эпителиальный барьер.

Таким образом, настоящая работа продемонстрировала чрезмерно агрессивный системный адаптивный ответ у больных ПБ, направленный на антигены собственных кишечных комменсальных бактерий.

Поступила 18.06.08

Սպեցիֆիկ հակամանրէային հակամարմինները պարբերական հիվանդությամբ անձանց արյան շիճուկում

Գ.Փ. Մանուկյան

Առատորոքոքային համախտանիշների ամենատարածված ներկայացուցիչ՝ պարբերական հիվանդության (ՊՀ) պատճառագիտության հիմքում ընկած են ռեցեսիվ մուտացիաները MEFV գենում, որը կոդավորում է պիրին կամ մարեմոստրին սպիտակուր: ՊՀ սուր բորբոքային նոպաների առաջացման, ինչպես նաև ռեմիսիայի շրջանում քրոնիկ բորբոքման պահպանման մեխանիզմները դեռևս մնում են անհայտ:

Հետազոտության նպատակն է հանդիսացել կոմենսալ բակտերիաների հանդեպ սպեցիֆիկ իմունային ռեակտիվականության գնահատումը ՊՀ հիվանդների և առողջ անձանց մոտ: ՊՀ հիվանդների կղանքային մուշներից անջատված մի շարք բակտերիաներ, որոնք պատկանում էին *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Escherichia*, *Enterococcus* և *Lactobacillus* ցեղերին, կիրառվել են նշված բակտերիաների հակածինների հանդեպ ուղղված համակարգային իմունոգլոբուլիններ G և A մակարդակը որոշելու համար: Բակտերիաների մույնականացումը հաստատվել է 16S ռՌՆԹ գենների սեկվենս հետազոտությամբ: Դիտարկվել է IgG մակարդակի վիճակագրորեն հավաստի բարձրացում *P. distasonis*, *E. coli* և *B. ovatus* բակտերիաների հակածինների հանդեպ ՊՀ հիվանդների շիճուկում, ի համեմատ առողջ անձանց, սակայն IgA մակարդակը զգալիորեն չէր տարբերվում: ՊՀ-ը բնութագրվում է չափազանց ագրեսիվ ադապտիվ պատասխանով կոմենսալ միկրոբիոտայի հանդեպ, որը բնականորեն անտեսվում է նորմալ իմունային համակարգի կողմից:

Specific antibacterial antibodies in sera of patients with familial Mediterranean fever

G.P. Manukyan

Familial Mediterranean fever (FMF), one of the most common autoinflammatory syndromes, is caused by recessive mutations in the *MEFV* gene, which encodes pyrin/marenostrin. The mechanisms that trigger periodic acute inflammation attacks and contribute to chronic subclinical inflammation in remission periods of FMF remain unknown.

The aim of this investigation was to evaluate the specific immune reactivity to commensal bacteria in patients with FMF and healthy subjects. A number of bacteria from fecal specimens of FMF patients belonging to five genera, namely *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Escherichia*, *Enterococcus*, and *Lactobacillus*, were used to determine the level of systemic IgG and IgA against the total antigens of these bacteria. Taxonomic affiliation of bacteria was confirmed by sequence analysis of 16S rRNA genes. Significantly increased levels of IgG against the antigens of *P. distasonis*, *E. coli* and *B. ovatus* were observed in the sera of FMF patients in comparison with controls, but there were no significant differences in IgA levels. FMF is characterized by the overly aggressive adaptive responses against the commensal microbiota, which is usually well tolerated by the normal immune system.

Литература

1. Cario E., Germen G., Podolsky D.K. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function, *Gastroenterology*, 2007, 132: 1359-1374.
2. Centola M., Wood G., Frucht D.M., Galon J., Aringer M. et al. The gene for familial Mediterranean fever, *MEFV*, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators, *Blood*, 2000, 95: 3223-3231.
3. Diaz A., Hu C., Kastner D.L., Schaner P., Reginato A.M. et al. Lipopolysaccharide-induced expression of multiple alternatively spliced *MEFV* transcripts in human synovial fibroblasts: a prominent splice isoform lacks the C-terminal domain that is highly mutated in familial Mediterranean fever, *Arthritis Rheum.*, 2004, 50: 3679-3689.
4. Fagarasan S., Muramatsu M., Suzuki K., Nagaoka H., Hiai H. et al. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science*, 2002, 298: 1424-1427.
5. Inohara N., Ogura Y., Fontalba A., Gutierrez O., Pons F. et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 5509-5512.
6. Kastner D.L. Familial Mediterranean fever: the genetics of inflammation, *Hosp. Pract.*, 1998, 33: 131-4, 139-40, 143-6 passim.
7. Khachatryan Z.A. Alterations in gut microbiota composition in familial Mediterranean fever. National Academy of Sciences of Armenia, Reports, 2006, 106: 374-380.
8. Landers C.J., Cohavy O., Misra R., Yang H., Lin Y.C. et al. Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens, *Gastroenterology*, 2002, 123: 689-699.

9. Lane D.J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1985, 82: 6955-6959.
10. Livneh A., Langevitz P., Zemer D., Zaks N., Kees S. et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever, *Arthritis Rheum.*, 1997, 40: 1879-1885.
11. Mazmanian S.K., Liu C.H., Tzianabos A.O., Kasper D.L. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system, *Cell*, 2005, 122: 107-118.
12. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature*, 1997, 388: 394-397.
13. Phalipon A., Cardona A., Kraehenbuhl J.P., Edelman L., Sansonetti P.J. et al. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo, *Immunity*, 2002, 17: 107-115.
14. Sedman P.C., Macfie J., Sagar P., Mitchell C.J., May J. et al. The prevalence of gut translocation in humans, *Gastroenterology*, 1994, 107: 643-649.
15. Suzuki K., Ha S.A., Tsuji M., Fagarasan S. Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut, *Semin. Immunol.*, 2006, 19: 127-135.
16. The French FMF Consortium. A candidate gene for familial Mediterranean fever, *Nat. Genet.*, 1997, 17: 25-31.
17. The International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever, *Cell*, 1997, 90: 797-807.
18. Ting J.P., Kastner D.L., Hoffman H.M. CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders, *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, 6: 183-195.
19. Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations, *Eur. J. Hum. Genet.*, 2001, 9: 473-483.
20. van Egmond M., Damen C.A., van Sriel A.B., Vidarsson G., van Garderen E. et al. IgA and the IgA Fc receptor, *Trends Immunol.*, 2001, 22: 205-211.
21. Wehkamp J., Harder J., Weichenthal M., Schwab M., Schäffeler E. et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression, *Gut*, 2004, 53: 1658-1664.
22. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *J. Bacteriol.*, 1991, 173: 697-703.