

Obecność endotoksyny w płynach stawowych u pacjentów z chorobami narządu ruchu jako marker podejrzewanej etiologii infekcyjnej

The presence of endotoxin in synovial fluids from connective tissue diseases (Ctd-s) patients with as a suspected disease aethiological marker

Jacek Noworyta¹, Jakub Ząbek¹, Maria Brasse-Rumin¹, Jolanta Gago¹, Maria Rell-Bakalarska²

¹Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie, kierownik Zakładu doc. dr hab. n. biol. Jakub Ząbek

²Przychodnia Przykliniczna Instytutu Reumatologii, kierownik Przychodni dr med. Maria Rell-Bakalarska, dyrektor Instytutu Reumatologii prof. dr hab. med. Sławomir Maśliński

Słowa kluczowe: endotoksyna, test LAL, lipopolisacharyd, płyn stawowy.

Key words: endotoxin, Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test, lipopolysaccharide, synovial fluid.

Streszczenie

Celem pracy było wykazanie obecności endotoksyny w płynach stawowych pacjentów z zapalnymi chorobami układu ruchu (w większości z reumatoidalnym zapaleniem stawów i z nieodróżnionym zapaleniem stawów).

Zastosowano i wstępnie oceniono użyteczność testu LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) w wykrywaniu endotoksyny (LPS) jako głównego i funkcjonalnie najważniejszego składnika ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych.

W grupie 50 chorych, w tym 60% z reumatoidalnym zapaleniem stawów, wykazano ogólny odsetek 42% chorych z płynami stawowymi, w których stwierdza się obecność endotoksyny. Jednocześnie wśród płynów stawowych endotoksynujemnych bardzo wysoki (66,6%) odsetek płynów z obecnością substancji (czynników) hamujących test LAL. Sugeruje to znaczną liczbę płynów stawowych z wynikami fałszywie ujemnymi, szczególnie że retrospektywna analiza wykazała w tych płynach obecność przeciwciał dla LPS i/lub jego wybranych subkomponentów sięgającą 80%.

W dyskusji poruszono ewentualną rolę endotoksyny (zwłaszcza pałeczek *Salmonella enteritidis* lub *S. typhimurium*) i jej składnika toksycznego (lipid A) w indukowaniu zaostrzonej fazy chorób narządu ruchu (głównie reumatoidalnego zapalenia stawów i nieodróżnionych zapaleń stawów) na podstawie dotychczasowych doświadczeń własnych i piśmiennictwa światowego.

Summary

The aim of the study was to show the presence of endotoxin in the synovial fluids from the patients suffering of Ctd-s (in prevalence RA and other undifferentiated joint arthritis).

The usefulness of the applied LAL-test (Limulus Amebocyte Lysate) was evaluated (just in endotoxin /LPS/ assessment), as a main and functionally most important of the Gram-negative bacterial cell wall component.

It was proved, that in the group of 50 synovial fluids from Ctd-s patients 42% was LAL-positive (with presence of endotoxin) and in 60% of RA patients LAL-test was also positive.

Simultaneously, in the total amount of LAL-negative synovial fluids we found, that in 66.6% the inhibiting LAL-test substances (including antibody) have been found. It suggest, that in tested material we have obtained considerable amount of the fals-negative tests (results), because that a retrospective analysis showed in tested synovial fluids the presence of anti-LPS or antibodies to selected LPS subcomponents up to 80%.

In discussion a possible influence of endotoxin, especially bacilli from genus *Salmonella enteritidis* (or *S. typhimurium*) and their toxic component (lipid A) on the induction acute phase Ctd-s (especially in RA and undifferentiated inflammation of joints) – basing on our own experiments and literature, was touched.

Adres do korespondencji:

dr biol. Jacek Noworyta, Zakład Mikrobiologii i Serologii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. E. Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa

Praca wpłynęła: 23.11.2005 r.

Ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych zawiera m.in. niezwykle istotny immunogen (znaczenie w serodiagnostyce) i o wielu różnorodnych właściwościach biologicznych składnik lipopolisacharydowy (LPS), który jest bardzo toksyczny dla organizmu ludzkiego i zwierzęcego [1–4]. Został on nazwany endotoksyną, ponieważ jest ściśle związany z powierzchnią komórek bakteryjnych i uwalnia się dopiero po ich lizie, powodując reakcję kaskadową prowadzącą do zaburzeń o charakterze hematologiczno-immunologicznym, doprowadzających do toksycznych i zapalnych objawów ogólnych oraz miejscowych. Są one wynikiem głównie indukcji czynników prozapalnych (typu cytokin, limfokin, kinin, prostaglandyn) [5–7].

LPS zawiera lipid A, do którego przyłączony jest polisacharyd, złożony z rdzenia (polisacharydowego) i powtarzających się podjednostek (np. mannoza – ramnoza – galaktoza). Sam lipid A składa się z fosforylowanych jednostek dwucukru – glikozaminy, do których są przyłączone liczne długocząsteczkowe kwasy tłuszczowe, z których kwas β -hydroksymirystynowy (14-węglowy) zawsze występuje w lipidzie A i jest jego unikatowym składnikiem, inne kwasy tłuszczowe są różne u różnych gatunków bakterii Gram-ujemnych. Podobnie jednakowy u wszystkich bakterii Gram-ujemnych jest rdzeń polisacharydu, jednakże każdy z gatunków ma swoistą powtarzającą się jednostkę liniowego trójcukru lub rozgałęzionych cztero- albo pięciocukrów (tzw. *antygen O*), które stanowią o swoistości antygenowej (np. wśród rodzaju *Salmonella* wykryto ok. 2 000 typów antygenowych).

Rozkład LPS do lipidu A i polisacharydu wykazał, że o toksyczności decyduje lipid A. Należy nadmienić, że LPS stanowi najbardziej powierzchniową strukturę ściany komórkowej drobnoustrojów G(-) i ściśle łączy się z podstawowymi składnikami, tj. lipoproteiną i białkową błoną zewnętrzną (OMP). Ze względu na to, że stosowane w diagnostyce chorób narządu ruchu o podejrzewanej etiologii bakteryjnej metody serologiczne obarczone są licznymi wątpliwościami (zwłaszcza dotyczącymi reakcji krzyżowych nawet między antygenami odległych taksonomicznie drobnoustrojów, np. *Chlamydia*, *Salmonella*, *Yersinia*) [8–10], w przedstawianych badaniach podjęto próbę stwierdzenia obecności endotoksyny w płynach wysiękowych i wybranych surowicach. Pozwoliłoby to częściowo tłumaczyć wewnątrzstawową indukcję przeciwciał dla LPS i jego subkomponentów i przynajmniej w niektórych przypadkach uwiarygodnić etiologię infekcyjną stanu zapalnego, wyrażającego się powstaniem wysięku stawowego, co pozwala na zastosowanie odpowiedniej terapii, ewentualnie jej modyfikację.

Praca ma charakter wstępny i jej celem jest zorientowanie się co do rozmiaru zjawiska występowania endotoksyny w płynach stawowych i/lub odpowiednich surowicach, weryfikacja osiągniętych rezultatów, a w konsekwencji ewentualne ich wdrożenie do diagnostyki rutynowej lub bardziej szczegółowych badań o charakterze podstawowym.

Częściową weryfikacją mogłoby być zastosowanie polimyksyny B (antybiotyku polipeptydowego), która – jak wykazali Lopes i Innis [11] – reaguje z LPS i powoduje m.in. jego zmiany morfologiczne oraz utratę właściwości toksycznych. Używana jest też w postaci związanej z nośnikiem (np. sefarozą) do oczyszczania płynów z endotoksyny.

Materiał i metody

Materiałem do badań były próbki 50 płynów stawowych oraz 10 surowic, stanowiących pary do 10 z ww. płynów. Pochodziły one głównie od chorych konsultowanych w Przychodni Przykliniknej IR (39 płynów) oraz pojedynczo z klinik IR.

Spośród badanych płynów stawowych połowa, tj. 25, pochodziła od chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS), od 3 chorych z łuszczycowym zapaleniem stawów (ŁZS), od 2 z zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa (ZZSK) i chorobą zwyrodnieniową. Pojedyncze rozpoznania dotyczyły: zapalenia wielostawowego, młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów (MIZS), zespołu suchości i dny. Prawie 1/3, tj. 14, badanych płynów pochodziła od chorych z niezróżnicowanymi zapaleniami stawów i/lub układowymi chorobami tkanki łącznej, wyróżniającymi się również wysiękami stawów.

Oznaczenia endotoksyny dokonywano przy użyciu biologicznego testu – zestawu LAL (Limulus Amebocyte Lysate) firmy Cambrex, który jest testem jakościowym, ale można go także traktować jako ilościowy z uwagi na możliwość przeliczania uzyskanych wyników na jednostki enzymatyczne j.e./ml. Test ten jest oceniany jako równoznaczny z testem na pirogenność, badaną na skórze królików.

Zasadę tego testu stanowią dwuetapowe reakcje enzymatyczne:

1. proenzym $\xrightarrow{\text{endotoksyna}}$ koagulaza
2. koagulogen $\xrightarrow{\text{koagulaza}}$ koagulina

Okazało się [12], że endotoksyna bakterii Gram-ujemnych katalizuje aktywację proenzymu lizatu, uzyskanego z amebocytów krwi kraba (*Limulus polyphemus*). Stopień tej aktywacji zależy od stężenia endotoksyny.

Zaktywowany enzym (koagulaza) swoiście hydrolizuje wiązania wewnątrz białka (koagulogenu) obecnego w lizacie (LAL). Wynikiem tej hydrolizy jest żelifikacja powstałej koaguliny. Test jest niezwykle czuły; reaguje na śladowe stężenia endotoksyny; zatem przed właściwym zastosowaniem powinien służyć do kontroli apirogenności wody, szklanych probówek i końcówek plastikowych używanych w badaniach, jak również samych analizowanych preparatów na obecność tzw. substancji hamujących reakcje enzymatyczne. Należy podkreślić ogromne znaczenie pH badanych próbek, które powinno mieścić się w granicach 6–8. Wrażliwość lizatu na zmianę temperatury, światła i czas przechowywania w stanie zamrożenia, ewentualnie w temperaturze lodówki (2–8°C) każdą wykonywać badania szybko, w warunkach sterylnych. Niezwykle ważne jest wstępne szczegółowe zapoznanie się z warunkami wykonywania testu i rygorystyczne ich respektowanie.

W przeprowadzonych badaniach na 50 płynach stawowych i 10 surowicach zachowano procedurę zgodnie ze wskazówkami producenta testu.

Wykonanie oznaczenia endotoksyny oraz kontrola czułości lizatu:

- standardy o określonym stężeniu endotoksyny uzyskanej ze szczepu bakteryjnego *E. coli* 055: B5, wyrażonym w jednostkach j.e./ml (0,06; 0,03; 0,015; 0,0075) oraz badane płyny stawowe i/lub surowice w ilości 100 µl przenoszono do szklanych probówek (10x75 mm). Za ujemną kontrolę służyła apirogenna woda destylowana;
- do wszystkich probówek reakcyjnych dodawano po 100 µl rozpuszczonego w H₂O liofilizatu (LAL), na-

tychmiast dokładnie mieszano i umieszczano (po zakorkowaniu) w łaźni wodnej o temperaturze 37°C±1°C. Nie mieszając probówek w trakcie inkubacji, po 60 min (±2 min), każdą z próbek obracano o 180° (ostrożnie, łagodnym ruchem) i natychmiast oceniano żelifikację (pozytywną, jeśli nie spływała po brzegach probówki);

- badane próbki płynów stawowych i/lub surowic nastawiano w 2-krotnych powtórzeniach, a w badaniach półilościowych wykonywano ich rozcieńczenia w H₂O (2-krotne), oznaczając końcowe rozcieńczenie, w którym następowała żelifikacja;
- skryning na obecność w badanych próbkach substancji hamujących test LAL wykonywano, dodając do każdego z rozcieńczeń tej próbki (100 µl) po 10 µl standardu endotoksyny o 10 x większym stężeniu niż wynosi czułość lizatu (w tym przypadku był to standard o stężeniu 0,6 j.e./ml). Żelifikacja, przy określonym rozcieńczeniu, wskazywała na brak substancji hamujących test LAL. I odwrotnie, brak żelifikacji oznaczał ich obecność. Taki skryning wykonywano z próbkami ujemnymi w teście zasadniczym na obecność endotoksyny;
- częściową weryfikację obecności endotoksyny niezwiązanej wykonywano następująco: gęstą, jednorodną zawiesinę nośnika – sefaroza (zaktywowanego wg zaleceń producenta – firma Bio-Rad), ze związaną polimiksyną B w soli buforowanej (PBS) o objętości 1 ml, mieszano w stosunku 1:1 z płynem stawowym rozcieńczonym 1: 5 i inkubowano w temperaturze pokojowej przez godzinę w probówkach plastikowych (w objętości 5 ml) z korkiem, mieszając na kotyście laboratoryjnej typu KL-942 przy liczbie 30 cykli/min. Po dokonanej absorpcji ewentualnie występującej endotoksyny i po odwirowaniu (13 000 obr./min przez 10 min) uzyskany supernatant oceniano testem LAL (w sposób opisany wyżej).

Tabela I. Obecność endotoksyny w płynach stawowych 3 grup pacjentów z chorobami narządu ruchu

Table I. *The presence of endotoxin in synovial fluid from three group of patients with connective tissue diseases*

Rozpoznanie choroby (n = liczba chorych)	Liczba (%) płynów stawowych ze stwierdzoną obecnością endotoksyny
reumatoidalne zapalenie stawów; n=25	15 (60%)
spondyloartropatie + układowe choroby narządu ruchu; n=11	2 (18,2%)
niezróżnicowane zapalenia stawów; n=14	4 (28,6%)
razem; n=50	21 (42%)

Wyniki

W badaniach 50 płynów stawowych wykazano obecność endotoksyny u 21 chorych, co stanowiło 42%. Analiza rozpoznań klinicznych, wśród których wyłoniły się 3 grupy, z wyraźną dominacją reumatoidalnego zapalenia stawów (n=25), wykazała interesujące spostrzeżenia, że w stanach wysiękowych towarzyszących RZS aż w 60% przypadków stwierdzono obecność endotoksyny (tabela I). Zdecydowanie niższe odsetki wykazano wśród chorych z niezróżnicowanym zapaleniem stawów (28,6%) oraz w nielicznej grupie (n=11) ze spondyloartropatiami i/lub układowymi chorobami narządu ruchu (18,2% wyników dodatnich).

Na wybranych 11 płynach stawowych z dodatnim wynikiem na obecność endotoksyny dokonano próby ilościowego oznaczenia jej stężenia, drogą 2-krotnych rozcieńczeń, powtórnych badań testem LAL i przeliczeń wg wskazówek producenta. Okazało się, że o ile średnie stężenie endotoksyny wyniosło 3,3 j.e./ml, o tyle 4 płyny stawowe wykazywały jej obecność powyżej tego poziomu, tj. 4–8,1 j.e./ml (po 2 płyny od chorych z RZS i niezróżnicowanym zapaleniem stawów). Pozostałe 7 płynów stawowych zawierało poziomy niższe (choć wielokrotnie przekraczające czułość testu =0,03 j.e./ml), tj. 1–2 j.e./ml, w tym 4 od chorych na RZS i 1 od chorego z wielostawowym zapaleniem zawierały stężenie endotoksyny równe 2 j.e./ml, natomiast 2 płyny (od chorych na ŁZS i z niezróżnicowanym zapaleniem stawów) – 1 j.e./ml.

Kolejne badanie skryningowe, wykonane na 21 płynach stawowych ujemnych w teście LAL na obecność endotoksyny, miało na celu zorientowanie się co do rozmiaru zjawiska występowania substancji hamujących test LAL, bez szczegółowego wnikania w charakter, np. chemiczny, tych substancji czy też stwierdzenia wpływu (często podkreślanego) pH środowiska. Stosując także metodę 2-krotnych rozcieńczeń wykazano, że w przypadku aż 10 płynów (47,6%) rozcieńczonych 1:8 i z dodaną do nich endotoksyną (0,6 j.e./ml) uzyska-

no wynik ujemny w teście LAL. Odpowiednio w 3 (14,3%) płynach w rozcieńczeniu 1:4 oraz w 1 (4,7%) w rozcieńczeniu 1:2 również uzyskano wyniki ujemne, świadczące o występowaniu zjawiska hamowania reakcji enzymatycznej w teście LAL przez nieznaną czynnik (substancja i/lub pH środowiska). Brak negatywnego oddziaływania na odpowiedź w teście LAL stwierdzano zaledwie w 1/3 (33,3%) grupy badanych płynów stawowych.

Końcowa, doświadczalna część pracy dotyczyła zbadania na 22 płynach stawowych dodatnich w teście LAL możliwości absorpcji endotoksyny z tego materiału biologicznego, co mogłoby świadczyć z jednej strony o jej obecności w stanie wolnym czy np. związanym w swoistych kompleksach immunologicznych, a z drugiej – jednocześnie sugerować wiele zjawisk wartych dalszego wyjaśnienia, np. krzyżowych reakcji przeciwciałowych z mniej czy bardziej złożonymi antygenami, czasami z natury i funkcji odległymi (kardiolipiny, lipoproteidy, fosfolipidy itp.). Okazało się – choć na małym materiale – że w 4 (36,4%) na 11 płynów uzyskano absorpcję endotoksyny przez związaną na fazie stałej (nośniku) polimyksynę B. W przypadku 1 płynu (9,1%) uzyskano niewyjaśnione zjawisko wzmocnienia testu LAL, po absorpcji polimyksyną B, choć był to wynik dość subiektywny (jakościowy), aczkolwiek wymagający wyjaśnienia.

Tabela II. Jednoczesne występowanie endotoksyny i przeciwciał (niezależnie od klasy immunoglobulin) w płynach stawowych wobec wybranych LPS i ich subkomponentów (liczba płynów n=21)

Table II. Contemporaneous appearance of endotoxin and antibodies to selected LPS-s and their subcomponents (independently of Ig-s class) in the synovial fluids (number of fluids n=21)

Obecność endotoksyny	Obecność przeciwciał wobec wybranych antygenów				Liczba płynów stawowych	
	LPS			Lipid A		KDO
	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>K. pneumoniae</i>			
+					4	
+	+	+			5	
+		+			4	
+					2	
+			+		1	
+	+				1	
+	+			+	1	
+	+	+	+	+	1	
+	+	+		+	1	
+		+		+	1	
	23,8%	23,8%	9,5%		28,5%	

Poddane badaniom płyny stawowe na obecność endotoksyny uprzednio zostały zbadane na obecność przeciwciał dla m.in. niektórych LPS pateczek Gram-ujemnych (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae*) i ich subkomponentów (lipid A i KDO – kwas deoksyoktulonowy) [9]. Obecnie dokonano analizy występowania tych przeciwciał zarówno w grupie płynów ze stwierdzoną endotoksyną, jak i w grupie bez jej obecności. Wyniki przedstawiono w tabelach II i III, z których wynika kilka spostrzeżeń.

W grupie płynów stawowych, w których wykazano obecność endotoksyny, stwierdzono nieco wyższe odsetki płynów z podwyższonym poziomem przeciwciał dla badanych homologicznych (oprócz lipidu A) antygenów w porównaniu z grupą płynów endotoksynoujemnych. Dotyczyło to szczególnie antygeny KDO.

W obu grupach płynów podwyższone poziomy przeciwciał częściej występowały dla LPS gatunków *Salmonella*, opisywanych jako infekcyjny czynnik wiązany z zapaleniem stawów niż dla LPS *K. pneumoniae*. Również w obu grupach płynów wyłoniły się pewne wzory płynów ze stwierdzonymi przeciwciałami, które dominowały liczebnie, a zwłaszcza z przeciwciałami wyłącznie dla złożonych antygenów LPS *S. enteritidis* i/lub *S. typhimurium* i zwłaszcza w grupie płynów z nieobecną endotoksyną.

Dość interesującym spostrzeżeniem było to, że w grupie płynów endotoksynodatnych w 19% nie stwierdzono badanych przeciwciał, natomiast w grupie endotoksynoujemnych odsetek był zbliżony, choć wyższy – 24,1%.

Dyskusja

Niewątpliwie najcenniejszym wynikiem badań było wykazanie obecności endotoksyny aż w 60% płynów wysiękowych towarzyszących reumatoidalnemu zapaleniu stawów. Nie jest to całkowicie zaskakujące, od wielu bowiem lat badania serologiczne oraz dotyczące odpowiedzi komórkowej [13] w licznych przypadkach RZS sugerują zwiększoną odpowiedź humoralną [14–18] wobec drobnoustrojów Gram-ujemnych (i ich antygenów ściany komórkowej, np. ECA i związanym z nim LPS). Mając na uwadze wysoką aktywność biologiczną endotoksyny, jej zdolności indukowania wielu czynników prozapalnych z komórek układu immunologicznego, zarówno krążących we krwi obwodowej, jak i przebywających miejscowo (w zapalnym płynie stawowym), nasuwa się pytanie dotyczące roli LPS w wywoływaniu stanów wysiękowych w RZS, a także w tzw. UA (*undifferentiated arthritis*). Takich nieodróżnicowanych zapaleń stawów w obecnych badaniach było nie-

Tabela III. Występowanie przeciwciał (niezależnie od klasy immunoglobulin) w płynach stawowych z niestwierdzoną w teście LAL endotoksyną (liczba płynów n=29)

Table III. Appearance of antibodies (independently of Ig-s class) in the synovial fluids with nonconfirmed by LAL test presence of endotoxin (number of fluids n=29)

Obecność endotoksyny	Obecność przeciwciał wobec wybranych antygenów					Liczba płynów stawowych
	LPS			Lipid A	KDO	
	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>K. pneumoniae</i>			
–						7
–		+				6
–	+	+				6
–	+				+	4
–			+			1
–	+	+		+		1
–				+		1
–		+			+	1
–	+	+	+		+	1
–	+	+			+	1
	17,2%	20,1%	6,9%	6,9%	13,8%	

mal 1/3 przypadków chorobowych, a RZS z jednoczesnymi stanami wysiękowymi stanowiło aż 50%.

Wyrywkowo zbadano też występowanie endotoksyny w surowicach chorych, u których uprzednio wykrywano ją w płynach stawowych. Okazało się, że na 10 badanych surowic w 3 uzyskano wyniki dodatnie na obecność endotoksyny, w tym w 2 przypadkach było to niezróżnicowane zapalenie stawów, a w 1 – RZS. Jak wskazują dane z piśmiennictwa, test LAL jest bardzo kontrowersyjny, zwłaszcza w zastosowaniu diagnostycznym dotyczącym ewentualnej endotoksemii. Wydaje się, że głównie surowicze α -globuliny wiążą endotoksynę [19], i zaleca się wręcz wykonywanie tego badania na heparynizowanym osoczu, a nie na surowicy. Rzadko test ten koreluje z bakteriami, a jeżeli już koreluje, to liczba bakterii Gram-ujemnych zawierających w ścianie komórkowej LPS powinna wynosić co najmniej 100 komórek/ml krwi. Istnieją jednak liczne inne substancje, które mogą powodować fałszywie dodatnie wyniki w teście LAL. Należą do nich surowicze białka i enzymy, nukleoproteidy, peptydoglikany i inne bakteryjne toksyny [20], a więc czynniki, które mogą być obecne w płynie stawowym i/lub do niego przenikać.

W prowadzonych obecnie eksperymentach na płynach stawowych pozostaje nierozwiązany problem, czy obserwowano też wyniki fałszywe w teście LAL. Niewątpliwie stężenie endotoksyny, które wynosiło 0,03 j.e./ml, wielokrotnie przewyższało czułość testu/lizatu, natomiast na wybranych 11 płynach stawowych z wynikiem dodatnim stężenie to zostało wyliczone (wg procedury producenta) na poziomie 1–8,1 j.e./ml (patrz: *Wyniki*). Cytowane wg Jorgensena [19] dane wskazują na bardzo wysoką czułość testu LAL, sięgającą 0,05 ng/ml czystej endotoksyny.

Odrotnym problemem, wykazany w 21 płynach stawowych, w których nie wykrywano endotoksyny, było stwierdzenie aż w 66,6% obecności substancji hamujących. Być może wpłynęły one (niekorzystnie) bardzo wyraźnie na odsetek płynów, w których wykrywano endotoksynę, a który mógł wynosić znacznie więcej niż 42%.

Istnieje wiele modyfikacji metod eliminujących czynniki hamujące test LAL, takich jak np. stosowanie ekstrakcji chloroformowej w celu denaturowania inhibitorów, modyfikowanie pH kwasem octowym (precypitującym inhibitory), a następnie zobojętnianie środowiska buforem fosforanowym, co optymalizuje warunki wykonania testu LAL [wg 19].

Chociaż praca nie miała ściśle charakteru metodycznego, niemniej za danymi z piśmiennictwa należy podkreślić [wg 19], że różne płyny ustrojowe badano przy użyciu testu LAL, w tym krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn z ropni, a także płyn stawowy. Wiele prób było dodatnich, ale w bardzo zróżnicowanym stopniu. Dotyczy-

ło to zwłaszcza krwi i płynu z ropni (np. okołonerkowych), a w przypadku krwi sugerowano przede wszystkim możliwość, że LPS translokowany jest z przewodu pokarmowego i absorbowany przez układ krwionośny. Istnieją też doniesienia [wg 20] o wykrywaniu w różnym stopniu – przy użyciu testu LAL – endotoksyny nawet u zdrowych wolontariuszy (do 32%) [21].

Wyżej wymienione kwestie dotyczące występowania czynników wpływających na stwierdzenie – w wysokim stopniu – wyników zarówno fałszywie dodatnich, jak i fałszywie ujemnych obniżają rangę stosowania testu LAL w wykrywaniu endotoksyny w płynach ustrojowych, w tym również w płynach stawowych.

Niemniej niezwykła czułość tej metody biologicznej i łatwość wykonania, zwłaszcza przy stworzeniu warunków wykluczających wpływ substancji (czynników) hamujących, sugerują próby poszukiwania endotoksyny również w rzadko badanych płynach stawowych.

W tym aspekcie zapoczątkowane badania absorbowania potencjalnie obecnej endotoksyny przez polimyksynę B, związaną na fazie stałej, zmierzały do poznania charakteru występowania tej toksyny, tj. w stanie wolnym lub związanym. Wykazując zaledwie w 36,4% (w 4 płynach na 11 badanych płynów stawowych) endotoksynę w stanie wolnym, można domniemywać również jej obecność w stanie związanym, np. w immunokompleksach, w których obecne przeciwciała mogą maskować niektóre epitopy LPS, a zwłaszcza decydujący o toksyczności lipid A. Ma on właściwości aktywowania reakcji enzymatycznych w lizacie z amebocytów *Limulus polyphemus* (o tym, że lipid A daje dodatnie reakcje w teście LAL, przekonano się również w tych badaniach). Zagadnienie występowania LPS swoistego dla jakiegoś gatunku pałeczek Gram-ujemnych i/lub endotoksyny w kompleksach immunologicznych i w stanie wolnym jest ważne zarówno diagnostycznie, jak i klinicznie, i wymaga szczegółowych badań, które rozpoczęto.

Interesujące było retrospektywne porównanie (korelacja) występowania przeciwciał dla LPS niektórych gatunków pałeczek Gram-ujemnych i ich subkomponentów (lipid A i KDO) w grupach płynów stawowych ze stwierdzoną i niestwierdzoną obecnością endotoksyny. Mogłoby to – jak się wydaje – sugerować, przynajmniej w niektórych przypadkach, wewnątrzstawową indukcję przeciwciał przez obecne albo całe antygeny LPS, albo częściowo rozłożone w trakcie translokacji bakterii, głównie za pośrednictwem monocytów krwi obwodowej [22, 23].

Chociaż ani założeniem, ani celem pracy nie była korelacja retrospektywnych wyników badań serologicznych z obecnością endotoksyny w płynach stawowych, to jednak można było podejrzewać, przynaj-

mniej w nielicznych przypadkach, wewnątrzstawową indukcję przeciwciał dla całych złożonych LPS i/lub ich subkomponentów (lipid A i KDO). Jest zastanawiające, że w obu analizowanych grupach płynów, tj. w grupie z obecnością i bez obecności endotoksyny, wykrywano bardzo wysokie odsetki płynów z podwyższonym poziomem przeciwciał dla ww. antygenów (odpowiednio 80,1 i 75,8%). Występowały one głównie w klasach IgA i IgM, dowodząc ostrej fazy procesu zapalnego, który świadczyłby raczej o nadważeniu, zwłaszcza w przypadkach z udokumentowanym, długoletnim RZS. Uwzględniając możliwość niewykrycia endotoksyny, z uwagi na wykazane prawdopodobieństwo szerokiego udziału substancji hamujących test LAL, nie można było wykluczyć podobnych odsetków płynów z jednoczesną obecnością endotoksyny i przeciwciał. Czyniłoby to bardziej wiarygodnym podejrzenie infekcyjnego podłoża stanu zapalnego i jego zaostrzenia się.

Na podstawie zarówno piśmiennictwa [24–27], jak i aktualnych – choć ograniczonych – badań nasuwa się pytanie, czy i w jakim stopniu oraz czy w ogóle infekcje wywołane pałeczkami Gram-ujemnymi, których istotnym składnikiem ściany komórkowej (zarówno strukturalnym, jak i funkcjonalnym) jest LPS (endotoksyna), biorą udział w patogenezie RZS i wielu tzw. niezróżnicowanych zapaleń stawów oraz czy reaktywne zapalenie stawów (ReZS) nie jest pierwszym etapem przekształcania się w przewlekłą jednostkę chorobową, jaką jest m.in. RZS z jego różnymi okresami remisji i zaostrzeń. Być może w przypadku przedstawianych badań mamy do czynienia z takimi zaostrzeniami, wyrażającymi się wysiękami stawów, a wynikającymi z nadkażenia i/lub uaktywnienia się bakterii Gram-ujemnych, przebywających nawet w odległym od ich naturalnego środowiska bytowania – jakim jest przewód pokarmowy, miejscu organizmu.

Trzeba pamiętać, że będące obiektem zainteresowania pałeczki *Salmonella* (i ich LPS), w odróżnieniu do *Shigella*, są drobnoustrojami, mogącymi rozprzestrzeniać się po całym organizmie drogą translokacji z przewodu pokarmowego poprzez układ krwionośny i limfatyczny. Obecność endotoksyny (LPS) oraz przeciwciał przeciwko niej skierowanych w płynach stawowych nie jest zaskakująca. Zatem udział niektórych pałeczek Gram-ujemnych (w tym *Salmonella*) w patogenezie RZS i niezróżnicowanych zapaleń stawów nie jest wykluczony, a autorzy pracy coraz częściej włączają się w nurt badań wyjaśniających ten frapujący pogląd, reprezentowany przez wiele ośrodków [24, 25] zajmujących się badaniami klinicznymi i podstawowymi w reumatologii.

Praca sfinansowana z grantu MNil nr 3PO5B 015 23.

Piśmiennictwo

1. Bunning VK, Raybourne RB, Archer DL. Foodborne enterobacterial pathogens and rheumatoid disease. Soc Appl Bacteriol Symp Ser 1988; 17: 87S-107S.
2. Behar SM, Porcelli SA. Mechanisms of autoimmune disease induction. The role of the immune response to microbial pathogens. Arthritis Rheum 1995; 38: 458-76.
3. Noworyta J. Zakażenia bakteryjne i ich rola w indukcji i przebiegu chorób reumatycznych. Reumatologia 1996; 34: 800-11.
4. Zhang X, Rimpiläinen M, Simelyte E, et al. What determines arthritogenicity of bacterial cell wall? A study on *Eubacterium* cell wall-induced arthritis. Rheumatology (Oxford) 2000; 39: 274-82.
5. Sobieszkańska BM. Rola artrytogennych pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae oraz *Borrelia burgdorferi* w patomechanizmie reaktywnego zapalenia stawów (REA). Post Microbiol 1997; 36: 101-21.
6. Soler-Rodríguez AM, Zhang H, Lichenstein HS, et al. Neutrophil activation by bacterial lipoprotein versus lipopolysaccharide: differential requirements for serum and CD14. J Immunol 2000; 164: 2674-83.
7. Penttinen MA, Holmberg CI, Sistonen L, et al. HLA-B27 modulates nuclear factor kappaB activation in human monocytic cells exposed to lipopolysaccharide. Arthritis Rheum 2002; 46: 2172-80.
8. Paerregaard A, Espersen F, Hoiby N. Cross-reactions between *Yersinia enterocolitica* serogroup O: 3 and other serogroups of the same species, as well as thirty-four other bacterial species. APMIS 1988; 96: 315-24.
9. Noworyta J, Ząbek J, Brasse-Rumin M, i wsp. Odpowiedź humoralna na wybrane złożone antygeny bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich oraz ich subkomponenty badana w surowicy i płynie stawowym pacjentów z chorobami narządu ruchu. Reumatologia 2003; 41: 259-68.
10. Brasse-Rumin M, Noworyta J, Ząbek J. Nieswoiste reakcje serologiczne w diagnostyce chorób narządu ruchu podejrzewanych o etiologię infekcyjną. Reumatologia 2004; 42: 31-7.
11. Lopes J, Inniss WE. Electron microscopy of effect of polymyxin on *Escherichia coli* lipopolysaccharide. J Bacteriol 1969; 100: 1128-9.
12. Young NS, Levin J, Prendergast RA. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation. J Clin Invest 1972; 51: 1790-7.
13. Chen T, Rimpiläinen M, Luukkainen R, et al. Mononuclear cell response to enterobacteria and Gram-positive cell walls of normal intestinal microbiota in early rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. Clin Exp Rheumatol 2002; 20: 193-200.
14. Aoki S, Yoshikawa K, Yokoyama T, et al. Role of enteric bacteria in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: evidence for antibodies to enterobacterial common antigens in rheumatoid sera and synovial fluids. Ann Rheum Dis 1996; 55: 363-9.
15. Tiwana H, Wilson C, Walmsley RS, et al. Antibody responses to gut bacteria in ankylosing spondylitis, rheumatoid arthritis, Crohn's disease and ulcerative colitis. Rheumatol Int 1997; 17: 11-6.
16. Wilson C, Thakore A, Isenberg D, et al. Correlation between anti-*Proteus* antibodies and isolation rates of *P. mirabilis* in rheumatoid arthritis. Rheumatol Int 1997; 16: 187-9.

17. Rashid T, Darlington G, Kjeldsen-Kragh J, et al. Proteus IgG antibodies and C-reactive protein in English, Norwegian and Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 1999; 18: 190-5.
18. Rashid T, Leirisalo-Repo M, Tani Y. et al. Antibacterial and anti-peptide antibodies in Japanese and Finnish patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2004; 23: 134-41.
19. Jorgensen JH. Endotoxemia. In: *Microbial Antigenodiagnosis*. Wicher K (ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida 1987: 70-7.
20. Murphy TF, West TE, Apicella MA. Antigen release from the bacterial surface. In: *Microbial Antigenodiagnosis*. Wicher K (ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida 1987: 90-103.
21. DuBose D, Lemaire M, Brown J, et al. Survey for positive Limulus amoebocyte lysate test in plasma from humans and common research animals. *J Clin Microbiol* 1978; 7: 139-41.
22. Tamburrino V, Monno R, Valenza MA, et al. Incidence of *Yersinia enterocolitica* antibodies in patients with inflammatory joint diseases. *Clin Rheumatol* 1993; 12: 354-6.
23. Wuorela M, Jalkanen S, Toivanen P, et al. *Yersinia lipopolysaccharide* is modified by human monocytes. *Infect Immun* 1993; 61: 5261-70.
24. Albert LJ. Infection and rheumatoid arthritis: Infection and rheumatoid arthritis: guilt by association? *J Rheumatol* 2000; 27: 564-6.
25. Ebringer A, Wilson C, Tiwana H. Is rheumatoid arthritis a form of reactive arthritis? *J Rheumatol* 2000; 27: 559-63.
26. Hyrich KL, Inman RD. Infectious agents in chronic rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13: 300-4.
27. Victorio-Navarra S. Infectious agents in arthritis and autoimmunity. *Mod Rheumatol* 2003; 13: 97-102.