

УДК 616.728.-002

## ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ У БОЛЬНЫХ КОКСАРТРОЗОМ, АССОЦИИРОВАННЫМ С ПЕРСИСТИРУЮЩЕЙ ИНФЕКЦИЕЙ CHLAMYDIA TRACHOMATIS

<sup>1</sup>Гольдина И.А., <sup>2</sup>Павлов В.В., <sup>2</sup>Прохоренко В.М., <sup>1</sup>Гайдуль К.В.

<sup>1</sup>Научно – исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, e-mail: igoldina@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБУ «Новосибирский НИИТО» им. Я.Л. Цивьяна, Новосибирск

С целью выявления иммунологических особенностей хронического артрита, ассоциированного с Chlamydia Trachomatis, было проведено исследование спонтанной и митоген – индуцированной пролиферативной активности мононуклеарных крови у больных с артритом тазобедренного сустава, ассоциированным с персистирующими в синовиальной ткани Chlamydia Trachomatis. Было установлено, что мононуклеарные клетки крови больных, инфицированных Chlamydia Trachomatis, характеризуются более высоким уровнем спонтанной пролиферации. При стимуляции пролиферативной активности этих клеток Т- или В – клеточными митогенами, индуцирующими поликлональную активацию преимущественно Т-лимфоцитов, или В- лимфоцитов, соответственно, было выявлено, что ответ на митогенное воздействие клеток инфицированных больных значительно снижен, по сравнению с таковым неинфицированных, что свидетельствует о снижении у них клеточного и гуморального звена иммунитета. Полученные нами данные обуславливают необходимость более глубокого исследования иммунологических параметров у данной категории больных с целью дифференцированного подхода к терапии и прогнозирования степени риска развития послеоперационных инфекционных осложнений при протезировании тазобедренного сустава.

**Ключевые слова:** коксартроз, мононуклеарные клетки крови, пролиферация, Chlamydia Trachomatis

## THE PROLIFERATIVE ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF PATIENTS WITH COXAE ARTHROSIS ASSOCIATED WITH PERSISTENT CHLAMYDIA TRACHOMATIS INFECTION

<sup>1</sup>Goldina I.A., <sup>2</sup>Pavlov V.V., <sup>2</sup>Prokchorenko V.M., <sup>1</sup>Gaidul K.V.

<sup>1</sup>Scientific research institute of fundamental and clinical immunology, Novosibirsk, e-mail: igoldina@mail.ru;

<sup>2</sup>FSGFI «Novosibirsk's SRITO» in order to Y.L. Civian, Novosibirsk

Abstract. In order to reveal the immunological characteristics of chronic arthritis associated with Chlamydia Trachomatis, a study of spontaneous and mitogen – induced proliferative activity of blood mononuclear cells of patients with hip arthritis associated with persistent in synovial tissue Chlamydia Trachomatis have been conducted. It was found that the blood mononuclear cells of patients, infected with Chlamydia Trachomatis, were characterized by a higher level of spontaneous proliferation. Upon the stimulation of proliferative activity by T- or B- cell mitogens that inducing the polyclonal activation of predominantly T-lymphocytes or B-lymphocytes, respectively, it was found that the response to the mitogenic effects by cells of infected patients is significantly reduced as compared to that of uninfected patients. It shows the reduction in their cellular and humoral immunity. Our findings necessitate a deeper study of immunological parameters of these patients for the purpose of the differentiated approach to the treatment and prognosis of the postoperative infectious complications risk at hip replacement.

**Keywords:** coxae arthritis, blood mononuclear cells, proliferation, Chlamydia Trachomatis

*Chlamydia Trachomatis* (*Ch. Trachomatis*) – широко распространенный возбудитель, вызывающий не только заболевания мочеполовой системы, глаз, но и инфекционных артритов [2]. Хламидии представляют собой облигатные внутриклеточные патогены клеток эукариот, для которых характерен специфический двухфазный цикл развития, предполагающий возможность формирования как метаболически активных ретикулярных телец (РТ), так и неактивных элементарных телец (ЭТ). На основании различий антигенной структуры основного протеина внешней мембраны, *Ch. Trachomatis* разделены на 3 биоварианта с различным органотропизмом: серовары А, В, Ва, С вызывают инфекционные

заболевания глаз; серовары D, E, F, G, H, I, J, K являются причиной заболеваний, передающихся половым путем; серовары L1, L2, L3 – этиологический фактор венерической лимфогранулемы [12]. В то же время, геном различных сероваров *Ch. Trachomatis* идентичен на 99%, а различия наблюдаются лишь в небольшом его участке (около 50 kb). При инфицировании *Ch. Trachomatis* поражают эпителиальные клетки, присоединяясь к ним и проникая в цитоплазму, образуя мембраносвязанную везикулу, внутри которой ЭТ подвергаются 7–8 делениям, в результате чего формируются РТ, до 80% которых далее вновь дедифференцируются в ЭТ. В клетке *Ch. Trachomatis* локализуются внутри изолированных вакуолей, окру-

женных мембраной, в которых они недосягаемы для лизосомальных ферментов [3]. Было установлено, что диссеминация *Ch. Trachomatis* из первичного очага заражения обусловлена их инфильтрацией в полиморфноядерные лейкоциты в активной фазе инфекции, и моноциты в хронической ее фазе [11]. Следовательно, циркулирующие моноциты переносят патоген и иницируют как воспаление, так и иммунный ответ на инфекцию. Дендритные клетки, являясь профессиональными антиген – презентующими клетками, также инфицируются *Ch. Trachomatis*, что сопровождается экспрессией ко-стимуляторных молекул, и секрецией провоспалительных цитокинов [4, 6]. Подавление пролиферации хламидий осуществляется  $\gamma$ -интерфероном и ФНО- $\alpha$ , стимулирующими продукцию индоламина 2,3-диоксигеназы (ИДО), энзима, катализирующего деградацию триптофана [10]. Причем функционально активная триптофан-синтаза, ген обеспечивающий бактерии возможность использования индола как субстрата для синтеза триптофана, когда внутриклеточный синтез триптофана подавлен ИДО, обнаружена только в сероварах, вызывающих заболевания мочеполовой системы и отсутствует в таковых, индуцирующих заболевания глаз, что, по – видимому, и обуславливает органотропизм хламидий [9]. Для хламидий характерна способность к длительной персистенции – поддержанию жизнеспособности без продукции инфекционных телец, как в моноцитах, так и в дендритных клетках человека, что сопровождается увеличением экспрессии гена St604, кодирующего белок теплового шока hsp 60, который вовлечен в поддержание состояния персистенции [2, 4].

Исследованиями последних лет было установлено, что *Ch. Trachomatis*, которые ранее рассматривались как этиологический фактор реактивных (стерильных) артритов, возникающих у некоторых больных после урогенитальной хламидийной инфекции, способны в течение многих лет персистировать в моноцитах синовиальной ткани сустава [1, 5], что обуславливает необходимость дифференцированного подхода к терапии хламидия – ассоциированных артритов. Согласно современным представлениям, при развитии реактивного хламидия – ассоциированного артрита происходит формирование асептического воспаления в синовиальной ткани сустава, индуцированного инфекцией в мочеполовой системе, как правило, у генетически предрасположенных индивидуумов – носителей генов HLA-B27, HLA-B39, HLA-B60, HLA-DRI. Как правило, данные артриты харак-

теризуются сочетанием несимметричного периферического иммуноопосредованного поражения сустава с сакроилеитом и экстраартикулярными проявлениями в виде увеита, псориаза, неспецифического язвенного колита, при отсутствии в крови ревматоидного фактора [7]. При инфекционном хламидия – индуцированном артрите синовиальная ткань не является стерильной, в ней обнаруживаются персистирующие *Ch. Trachomatis*, у которых происходит остановка цикла развития микроорганизма на поздней стадии формирования ЭТ, количество которых снижается, и образуются aberrantные формы РТ. Хламидии в состоянии персистенции характеризуются высокой резистентностью к антибактериальной терапии, причем среди биовариантов *Ch. Trachomatis*, персистенция в синовиальной ткани характерна для сероваров, вызывающих заболевания глаз, что, как предполагается, обусловлено более эффективной диссеминацией этих сероваров из очага первичного инфицирования [2].

Несмотря на то, что способность *Ch. Trachomatis* к персистенции в моноцитах синовиальной ткани сустава в настоящее время убедительно доказана, иммунный статус больных при данном виде артритов остается практически неизученным.

На основании изложенного выше, **целью данного исследования** было выявить иммунологические особенности хронического артрита, ассоциированного с *Ch. Trachomatis*.

#### Материалы и методы исследования

В исследование были включены 24 больных из числа пациентов клиники ФГБУ «Новосибирский НИИТО» им. Я.Л. Цивьяна, 10 мужчин и 14 женщин в возрасте 46–67 лет с установленным диагнозом коксартроза, с длительностью заболевания от 11 до 28 лет, поступивших в клинику для проведения операции первичного тотального замещения тазобедренного сустава (ТБС) эндопротезом. Эксперименты проводили с соблюдением «Этических принципов проведения научных медицинских исследований с участием человека», в соответствии с приказом Минздрава РФ № 266 (Правила клинической практики в Российской Федерации) от 19.06.2003 г. Согласно современным диагностическим критериям, ни у одного из включенных в исследование больных артрит не был реактивным, а рассматривался как идиопатический.

*Среда для культивирования мононуклеарных клеток крови (МНК):* RPMI-1640 (ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирская область, п. Кольцово), содержащая 5% сыворотки крови человека АВ (IV) (Новосибирский центр крови), 10мМ Нерес (ICN Biomedicals Inc, Aurora, Ohio),  $4 \times 10^{-3}$ М 2-меркаптоэтанол (L.Oba Feinchemie, Fischamene), 2 Мм L-глутамин (ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирская область, п. Кольцово), 40 мкг/мл гентамицина (ФГУП НПО «Вирион»).

**Выделение и культивирование МНК:** Венозную кровь с добавлением гепарина (20 ед / мл), полученную за 1 сутки до проведения операции, центрифугировали на градиенте плотности фиколла 1,078 г/см<sup>3</sup> (Lymphocyte separation medium, MP Biomedicals, LLC, Eschwege, Germany) при 1500 оборотов/мин. в течение 40 мин. Клетки, собранные из интерфазы, и представленные на 96% лимфоцитами и моноцитами, отмывали и осаждали центрифугированием. МНК культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в концентрации 1x10<sup>6</sup>/мл при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности в течение 72 часов.

**Оценка пролиферативной активности МНК:** Для индукции поликлональной активации клеток использовали Т- и В-клеточные митогены в субоптимальных концентрациях, которые составили для ConA (Sigma) 2 мкг/мл, PWM (Sigma) 5 мкг/мл, PHA (Sigma) 10 мкг/мл. Пролиферативную активность МНК определяли стандартным методом, по включению радиоактивной метки (Н<sup>3</sup> тимидин). Количественные показатели пролиферации представляли в абсолютных (имп/мин) и относительных величинах, в виде индексов влияния, рассчитанных как частное от деления показателя индуцированной пролиферации на показатель спонтанной пролиферации.

**Детекция ДНК *Ch. trachomatis*** проводилась методом полимеразной цепной реакции. МНК и образцы синовиальной ткани, полученные интраоперационно из области переходной складки ТБС, измельчали и гомогенизировали. Прилипающие клетки, представленные преимущественно макрофагами, получали методом адгезии к пластику, как описано ранее [1]. ДНК из них, а также из МНК крови выделяли с использованием тест – системы ВектоДНК – экстракция – 3 (Вектор – Бест, Новосибирск). Амплификацию полученной ДНК осуществляли с использованием пар олигонуклеотидных праймеров, гомологичных консервативным участкам антипараллельных цепей ДНК *Ch. trachomatis*. («ВектоХлами – ДНК – ампли – 100»), Вектор – Бест, Новосибирск, в программируемом амплификаторе «Терцик» (ДНК – технологии, Москва). Продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 1% геле агарозы с добавлением бромистого этидия (ВектоДНК – ЭФ, Вектор – Бест, Новосибирск). Положительными считали образцы с наличием в геле видимой полосы ДНК, соответствующей по длине ДНК контрольного образца (501 пара нуклеотидов)

**Статистическую обработку** данных проводили с применением методов описательной статистики, сравнительного анализа, при помощи непараметрического U – критерия Манна – Уитни для двух независимых групп, с использованием коммерческого пакета программ «Statistica 7.0» (StatSoft, USA). Результаты представляли в виде медианы и интервала между 1 и 4 квартилями (Me (25%; 75%). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

На основании исследования инфицированности синовиальной ткани, больные коксартрозом были разделены на 2 группы. Контрольную группу составили пациенты, в макрофагах синовиальной ткани которых ДНК *Ch. Trachomatis* обнаруже-

на не была. Больные же, инфицированные *Ch. Trachomatis*, составили группу исследования. Больные данных групп не отличались по показателям общеклинических лабораторных исследований (общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимическое исследование крови (общий белок, фибриноген, ревматоидный фактор).

Так как спонтанная и индуцированная митогенами пролиферация МНК является одним из параметров, характеризующих состояние иммунной системы, мы провели сравнительное исследование показателей пролиферации МНК больных обеих групп. Поскольку моноциты рассматриваются как клетки, способные к переносу хламидий из очага инфицирования, как было показано выше, в серии предварительных экспериментов мы изучали наличие ДНК *Ch. Trachomatis* в МНК периферической крови больных. Было установлено, что у больных коксартрозом, включенных в исследование, ДНК *Ch. Trachomatis* в МНК крови не выявляется.

При изучении спонтанной пролиферации МНК, было установлено, что группа больных коксартрозом, инфицированных *Ch. Trachomatis*, характеризуется значительно более высоким ее уровнем (табл. 1).

**Таблица 1**

Показатели спонтанной пролиферации мононуклеарных клеток крови у больных коксартрозом (Me (25%; 75 %) имп/мин

Группы больных	Спонтанная пролиферация
1.	4263,5 (1345; 5580)
2.	579 (285; 846)**

**Примечание.** 1 – инфицированные *Ch. Trachomatis*, n = 11; 2 – не инфицированные *Ch. Trachomatis*, n = 13; \* – статистическая значимость различий между группами ( $p < 0,05$ , H-критерий Крускала – Уоллиса); \*\* – статистическая значимость различий между группами ( $p < 0,01$ , U – критерий Манна – Уитни).

Известно, что повышение спонтанной пролиферации лимфоцитов коррелирует с наличием воспаления [8]. Выявленный нами высокий уровень спонтанной пролиферации МНК у группы больных, инфицированных *Ch. Trachomatis*, несмотря на отсутствие различий в общеклинических лабораторных показателях с больными контрольной группы, свидетельствует о наличии у них хронического воспалительного процесса, возможно, вызванного хламидийной инфекцией в синовиальной ткани, что было обнаружено нами ранее при ее морфологическом исследовании [1].

**Таблица 2**

Показатели пролиферации мононуклеарных клеток крови у больных коксартрозом (Ме (25%; 75%), ИВ

Группы больных	СopA – индуцированная пролиферация	PWM – индуцированная пролиферация	РНА – индуцированная пролиферация
1	12,35 (5,98; 26,4)	48,02 (22,31; 81,36)	46,55 (20,25; 127,28)
2	66,7 (26,3; 85,2)**	134,4 (92,8; 219,2)**	118,5 (77,9; 185,3)**

Примечание. 1 – инфицированные *Ch. Trachomatis*, n = 11; 2 – не инфицированные *Ch. Trachomatis*, n = 13; \* – статистическая значимость различий между группами (p < 0,05, Н-критерий Крускала – Уоллиса); \*\* – статистическая значимость различий между группами (p < 0,01, U – критерий Манна – Уитни).

При исследовании ответа иммунокомпетентных клеток больных на митогены, было установлено, что МНК крови больных обеих групп отвечали на воздействие митогенами выраженной пролиферацией клеток. Причем уровень стимулированной пролиферации МНК как на Т-, так и на В-клеточные митогены больных, не инфицированных *Ch. Trachomatis*, соответствовал нормальным значениям и значительно превышал таковой инфицированных больных (табл. 2).

Снижение ответа на поликлональную активацию как Т-, так и В-клеточными митогенами МНК крови инфицированных *Ch. Trachomatis* больных свидетельствует о недостаточности у них как клеточного, так и гуморального звеньев иммунитета.

Таким образом, больные хроническим инфекционным артритом, на примере коксартроза, ассоциированного с *Ch. Trachomatis*, характеризуются более высоким уровнем спонтанной пролиферации МНК крови. При стимуляции пролиферативной активности этих клеток как Т-клеточными митогенами, индуцирующими поликлональную активацию преимущественно Т-лимфоцитов, так и В-клеточным, индуцирующим, соответственно, преимущественно В-лимфоциты, было выявлено, что ответ на митогенное воздействие МНК инфицированных больных значительно снижен, по сравнению с таковым неинфицированных.

### Заключение

В проведенном нами исследовании пролиферативной активности МНК крови больных коксартрозом, ассоциированным с *Ch. Trachomatis*, было выявлено, что иммунный статус данных больных отличается от такового неинфицированных, по параметрам спонтанной и митоген – стимулированной пролиферации МНК, что свидетельствует о наличии у данной группы больных хронического воспаления в суставе и снижении клеточного и гуморального звена

иммунитета. Полученные нами данные обуславливают необходимость более глубокого исследования иммунологических параметров у данной категории больных с целью дифференцированного подхода к терапии и прогнозирования степени риска развития послеоперационных инфекционных осложнений при протезировании тазобедренного сустава.

### Список литературы

1. Гольдина И.А., Павлов В.В., Прохоренко В.М. Клинико – морфологические особенности коксартроза, ассоциированного с *Chlamydia Trachomatis* // Бюллетень СО РАМН. – 2007. – Т. 124, № 2. – С. 43–46.
2. Carter J.D., Hudson A.P. The evolving story of Chlamydia-induced reactive arthritis // *Curr. Opin. Rheumatol.* – 2010. – V. 22. – P. 424–430.
3. Cocchiari J.L., Valdivia R.H. New insights into Chlamydia intracellular mechanisms // *Cell. Microbiol.* – 2009 – V. 11. – P. 1571–1578.
4. Datta B., Niau F., Thalmann J.D. Differential infection outcome of Chlamydia trachomatis in human blood monocytes and monocyte-derived dendritic cells // *BMC Microbiol.* – V. 14. – P. 209–222. URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14209>.
5. Gerard H.C., Whittum-Hudson J.A., Carter J.D. Molecular biology of infectious agents in chronic arthritis: Rheumatic Dis. *Clin North. Amer.* – Elsevier, USA, 2009. – P. 1–19.
6. Gervassi A., Alderson M.R., Suchland R. Differential regulation of inflammatory cytokine secretion by human dendritic cells upon Chlamydia Trachomatis infection // *Infect. Immun.* – 2004. – V. 72. – P. 7231–7239.
7. Hamdulay S.S., Glynne S.J., Keat A. When is arthritis reactive? // *Postgrad Med.* – 2006 – V. 82. – P. 446 – 453. doi: 10.1136/pgmj.2005.044057.
8. Khanna A.K. Reciprocal role of cyclins and cyclin kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 on lymphocyte proliferation, allo-immune activation and inflammation // *BMC Immunol.* – 2005. – V. 6. – P. 22. doi: 10.1186/1471-2172-6-22..
9. Morrison R.P. New insights into a persistent problem – Chlamydia infections // *J. Clin. Invest.* – V. 111. – P. 1647–1649.
10. Njau F., Wittkop U., Rohde M. In vitro neutralization of tumor-necrosis factor-alfa during Chlamydia pneumoniae infection impairs dendritic cells maturation/function and increases chlamydial progeny // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2009 – V. 55. – P. 215–225.
11. Patton D.L., Kuo C.C. Histopathology of Chlamydia trachomatis salpingitis after primary and repeated reinfections in the monkey subcutaneous pocket model // *J. Reprod. Fertol.* – 1989. – V.85. – P. 647–656.
12. Peipert J.F. Clinical practice. Genital chlamydial infections // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – V. 349. – P. 2424–2430.