

Sambor Grygorczuk¹, Joanna Zajkowska¹, Anatol Panasiuk², Maciej Kondrusik¹, Tomasz Chmielewski³, Renata Świerżbińska¹, Sławomir Pancewicz¹, Robert Flisiak², Stanisława Tylewska-Wierzbanowska³

AKTYWNOŚĆ KASPAZY 3 W HODOWLI KOMÓREK
JEDNOJĄDRZASTYCH KRWI OBWODOWEJ STYMULOWANYCH
ANTYGENAMI *BORRELIA BURGENDORFERI*

- ¹ Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: Sławomir Pancewicz
- ² Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: Danuta Prokopowicz
- ³ Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych Państwowego Zakładu
Higieny w Warszawie
Kierownik: Stanisława Tylewska-Wierzbanowska

*Oceniono stężenie aktywnej kaspazy 3, mediatora i markera apoptozy, w homogenacie hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) inkubowanych z krętkami *Borrelia burgdorferi*. Wyniki sugerują proapoptotyczne działanie *B. burgdorferi* na PBMC osób zdrowych oraz zmienioną podatność PBMC pacjentów z późną stawową postacią boreliozy na apoptozę, co może mieć związek z patogenezą przewlekłego odczynu zapalnego u tych chorych.*

Słowa kluczowe: borelioza z Lyme, zapalenie stawów, apoptoza, kaspaza 3
Key words: Lyme borreliosis, arthritis, apoptosis, caspase 3

WSTĘP

Borelioza z Lyme jest podostrą lub przewlekłą chorobą zakaźną szeroko rozpowszechnioną w strefie klimatu umiarkowanego półkuli północnej, wywoływaną przez krętka *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi s.l.*) przenoszony przez kleszcze *Ixodes* sp. Przewlekłe objawy boreliozy dotyczą szczególnie często układu kostno-stawowego (boreliozowe zapalenie stawów – *Lyme arthritis*, LA) (1,2). Zjawiska immunologiczne zachodzące w boreliozie z Lyme i ich rola w patogenezie choroby nie zostały w pełni wyjaśnione. W zajętych chorobowo stawach, mimo niewielkiej ilości wykrywalnych krętków, tworzą się obfite nacieki zapalne z udziałem limfocytów T i plazmacytów, o obrazie histopatolo-

gicznym przypominającym reumatoidalne zapalenie stawów (3,4). Objawy kostno-stawowe o różnym nasileniu (zapalenie stawów kolanowych z wysiękiem, objawy przypominające chorobę zwyrodnieniową stawów, nawracające bóle kostno-stawowe) mogą się przy tym u części pacjentów utrzymywać przewlekłe, pomimo eliminacji patogenu, co sugeruje niezdolność do prawidłowej kontroli i wygaszenia odpowiedzi zapalnej i immunologicznej (1,5,6). Antybiotykooporne LA wiąże się z obecnością określonych antygenów zgodności tkankowej, wspólnych z rzs (zwłaszcza DRB1*0401, *0404, *0101), co nasunęło podejrzenie udziału procesów autoimmunologicznych, prawdopodobnie typu reakcji krzyżowych, w jego patogenezie. Zarówno autoantygen uczestniczący w tej reakcji jak i mechanizm inicjujący jej wystąpienie nie są jednak znane (1,2).

Apoptoza (programowana śmierć komórki) jest procesem fizjologicznym dotyczącym większości typów komórek i niezbędnym do utrzymania homeostazy organizmu. Wśród mechanizmów wewnątrzkomórkowych uczestniczących w apoptotycznej degradacji składników komórki dużą rolę odgrywa rodzina kaspaz – proteaz obecnych w komórce w postaci proenzymów i ulegających aktywacji proteolitycznej w przebiegu apoptozy. Kaspazy są zdolne do lawinowej aktywacji dalszych cząsteczek prokaspazy, tworząc kaskadę enzymatyczną, na końcu której znajdują się enzymy efektorowe, w tym kaspaza 3, odpowiedzialne za degradację białek komórki (7,8).

Apoptoza limfocytów i innych leukocytów jest niezbędna w kontroli i fizjologicznym wygaszaniu reakcji zapalnej i immunologicznej, a jej upośledzenie wiąże się z ryzykiem autoimmunizacji (9,10,11). Apoptoza komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) chorych na boreliozę z Lyme i ewentualny związek jej zaburzeń z tendencją do autoimmunizacji nie była dotychczas oceniana. W obecnym badaniu wykorzystaliśmy aktywację kaspazy 3 jako marker apoptozy PBMC hodowanych w warunkach stymulacji antygenami *B. burgdorferi s.l.* Poszukiwaliśmy cech świadczących o zahamowaniu apoptozy PBMC u chorych z LA, które mogłyby być wyrazem upośledzonej kontroli odpowiedzi zapalnej i immunologicznej.

MATERIAŁ I METODY

Badanie objęło 13 osób: 7 pacjentów Kliniki Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji AMB hospitalizowanych z rozpoznaniem LA: 4 mężczyzn, 3 kobiety (34–61 lat, średnio 48 lat) oraz grupę kontrolną (K): 6 osób zdrowych (1 mężczyzna, 5 kobiet, wiek 27–50 lat, średnio 35 lat). Wszyscy pacjenci z LA podawali ukłucie przez kleszcza lub narażenie na ukłucia oraz zgłaszali bóle kostno-stawowe obejmujące głównie duże stawy kończyn, z towarzyszącą bolesnością palpacyjną i/lub przy wykonywaniu ruchów. Objawy były obecne od ≥ 8 miesięcy, 5 chorych było bez trwałej poprawy leczonych antybiotykami. U wszystkich rozpoznanie potwierdzono wykryciem swoistych przeciwciał w klasie IgG metodą immunoenzymatyczną (zestaw firmy Biomedica, USA).

Od badanych osób pobierano 7-8 ml krwi żyłnej i izolowano PBMC poprzez odwirowanie w płynie Gradisol L (Biomedica, Polska). PBMC zawieszano w stężeniu $7,5 \times 10^6$ komórek/mL w płynie hodowlanym RPMI 1640 (Biomed, Polska) z dodatkiem 10% inaktywowanej surowicy cielęcej oraz streptomycyny, a następnie inkubowano w atmosferze 5%CO₂ przy 37°C przez 2 doby, w obecności płynu hodowlanego (kontrola ujemna) oraz z zawiesiną krętków szczepów trzech genogatunków *B. burgdorferi s.l.*: *B. afzelii* VS 46110 (B.a.),

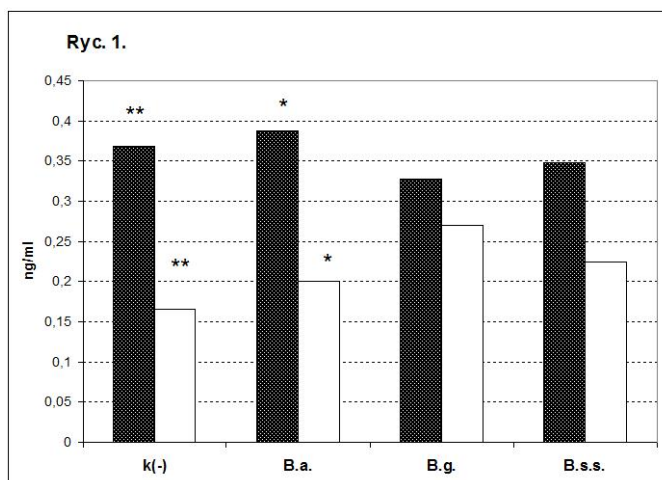
B. garinii 20047 (B.g.) i *B. burgdorferi sensu stricte* B-31 (B.s.s.), w dawce 10 krętków: 1 PBMC. Zawiesinę *B. burgdorferii s.l.* o stężeniu 10^8 komórek/mL uzyskano z hodowli prowadzonej w Pracowni Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie.

Stężenie aktywnej kaspazy 3 mierzono metodą immunoenzymatyczną zestawem firmy R&D Systems (USA), na mikroplycie 96-dołkowej. Dodatkowe odczynniki (PMSF, leupeptyna, pepstatyna i aprotynina) pochodziły z firmy Sigma-Aldrich (Niemcy). Procedurę przeprowadzono ściśle według instrukcji producenta.

W analizie statystycznej porównano: 1) średnie stężenie aktywnej kaspazy 3; 2) wskaźnik obliczony z wzoru $(Kas_{ant} - Kas_k) / Kas_k$ (gdzie Kas_k i Kas_{ant} - stężenie aktywnej kaspazy 3 odpowiednio w hodowli niestymulowanej oraz stymulowanej antygenowo), wyrażający względny wzrost stężenia pod wpływem stymulacji. Analizę przeprowadzono za pomocą pakietu Statistica, do porównań wykorzystując test t dla prób niezależnych, po potwierdzeniu rozkładu normalnego testem Shapiro i Wilka. Za istotne przyjęto $p < 0,05$.

WYNIKI

Średnie stężenie aktywnej kaspazy 3 w hodowli niestymulowanej było znacznie wyższe u chorych z LA niż w grupie kontrolnej. Pod wpływem stymulacji antygenowej

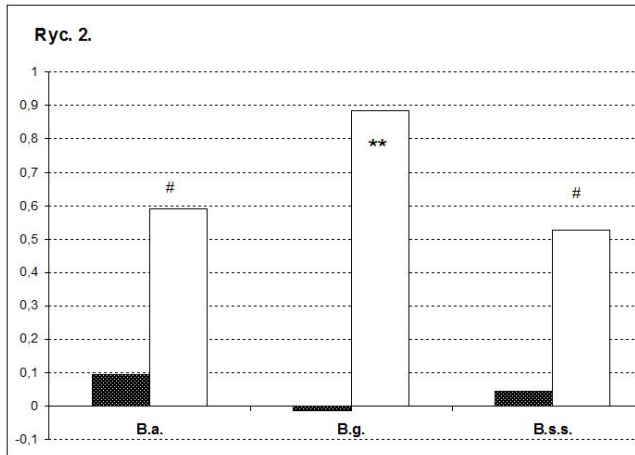


Ryc. 1. Średnie stężenie aktywnej kaspazy 3 w homogenacie hodowli PBMC pacjentów z późnym LA (słupki wypełnione) i w grupie kontrolnej (słupki puste), po 2 dobach inkubacji: k(-) – hodowla niestymulowana; B.a. – stymulacja *B. afzeli*; B.g. – stymulacja *B. garinii*; B.s.s. – stymulacja *B. burgdorferi s.s.*; ** - różnica wysoce znamiennej statystycznie między LA a K ($p = 0,01$); * - różnica znamiennej statystycznie między LA a K ($p = 0,042$);

Fig 1. Mean concentration of active caspase 3 in the homogenate of cultured PBMC from patients with late LA (filled bars) and in controls (empty bars), after 48 hours of incubation: k(-) – not stimulated; B.a. – stimulation with *B. afzeli*; B.g. – stimulation with *B. garinii*; B.s.s. – stimulation with *B. burgdorferi s.s.*; ** - statistically significant difference between LA and K ($p = 0,01$); * - statistically significant difference between LA and K ($p = 0,042$);

wystąpiła tendencja do wzrostu stężenia kaspazy-3 w grupie kontrolnej, ale nie w grupie LA, co doprowadziło do zaniku różnicy pomiędzy tymi grupami w hodowlach stymulowanych *B. garinii* i *B. burgdorferi s.s.* (rycina 1).

Względny wzrost stężenia kaspazy-3 pod wpływem stymulacji *B. garinii* był znacznie większy w grupie kontrolnej niż w grupie LA; w warunkach stymulacji *B. afzelii* i *B. burgdorferi s.s.* różnica ta osiągnęła jedynie pogranicze istotności statystycznej (rycina 2).



Ryc. 2. Średnia wzrost stężenia aktywnej kaspazy 3 w hodowli PBMC stymulowanych antygenami *B. burgdorferi s.l.* względem hodowli nie stymulowanej antygenowo [wskaznik obliczony ze wzoru $(Kas_{ant} - Kas_k) / Kas_k$, gdzie Kas_k i Kas_{ant} - stężenie aktywnej kaspazy 3 odpowiednio w hodowli niestymulowanej oraz stymulowanej antygenowo] w grupie chorych z późnym boreliozowym zapaleniem stawów (słupku wypełnione) i w grupie kontrolnej (słupki puste); B.a. – stymulacja *B. afzelii*; B.g. – stymulacja *B. garinii*; B.s.s. – stymulacja *B. burgdorferi s.s.*; ** - różnica wysoce znamiennej między LA a K ($p < 0,01$); # - różnica na granicy istotności statystycznej między LA a K ($p = 0,058$ dla B.ss. i $p = 0,094$ dla B.a.);

Fig. 2. Mean increase in active caspase 3 concentration in homogenate of cultured PBMC stimulated with *B. burgdorferi s.l.* antigens relative to not stimulated culture (calculated as in material and methods) in patients with late LA (filled bars) and in controls (empty bars); B.a. – stimulation with *B. afzelii*; B.g. – stimulation with *B. garinii*; B.s.s. – stimulation with *B. burgdorferi s.s.*; ** - statistically highly significant difference between LA and C ($p < 0,01$); # - difference of borderline significance between LA and K ($p = 0,058$ for B.ss. and $p = 0,094$ for B.a.);

DYSKUSJA

Zaobserwowaliśmy różnice w nasileniu apoptozy PBMC pochodzących od chorych z późnym LA oraz osób zdrowych w warunkach stymulacji antygenami *B. burgdorferi s.l.* Do badania wybraliśmy chorych z ewidentnym wielomiesięcznym wywiadem LA, obiektywnymi cechami uszkodzenia stawów i jednoznacznymi wynikami badań serologicznych. Uważamy, że grupa ta jest reprezentatywna dla populacji europejskich pacjentów z przewlekłymi dolegliwościami stawowymi związanymi z boreliozą. Jednak, ze względu na zróżnicowanie

szczepów *B. burgdorferi s.l.* możliwe są pewne różnice kliniczne i immunopatogenetyczne, w porównaniu z antybiotykoopornym LA opisywanym w Ameryce Północnej. Jako markera apoptozy użyliśmy aktywacji kaspazy 3, która, jako kaspaza efektorowa aktywowana na stosunkowo późnym, nieodwracalnym etapie apoptozy aktywowanej przez różnorodne bodźce, stanowi zarówno czuły, jak i swoisty wyznacznik tego procesu (7,8,12).

Dotychczasowe badania nad wpływem zakażenia *B. burgdorferi s.l.* na apoptozę limfocytów są nieliczne. *Perticarari* i wsp. stwierdzili nasilenie apoptozy limfocytów T CD4+ od osób zdrowych hodowanych z krętkami *B. burgdorferi s.l.*, co wskazuje na ich działanie proapoptotyczne i może być mechanizmem ochronnym umożliwiającym przetrwanie w organizmie żywiciela (13). Wiele innych drobnoustrojów chorobotwórczych chroni się przed działaniem mechanizmów odpornościowych stymulując apoptozę limfocytów (14,15). Obserwowana w naszych badaniach tendencja do wzrostu aktywności kaspazy 3 w hodowli PBMC osób zdrowych po inkubacji z *B. burgdorferi s.l.* może być wyrazem tego samego zjawiska.

Eliminacja nadmiaru aktywowanych limfocytów i innych leukocytów na drodze apoptozy jest naturalnym końcowym etapem odpowiedzi zapalnej i immunologicznej zachodzącym po eliminacji patogenu i chroniącym przed limfoproliferacją i rozwojem autoagresji (11). Zwiększającą się podatność limfocytów izolowanych z krwi obwodowej na apoptozę zaobserwowano w okresie rekonwalescencji po przebyciu ostrych zakażeń i potwierdzono badając aktywację limfocytów *in vitro* (8,9,10,12). *Vincent* i wsp. stwierdzili w płynie stawowym u chorych z LA obecność limfocytów T $\gamma\delta$ zdolnych do stymulowania apoptozy limfocytów T CD4+ i wywierających poprzez to efekt immunosupresyjny i immunomodulujący (16,17). Wybiórcze gromadzenie się w stawach chorych z LA klonów limfocytów T $\gamma\delta$ swoiście rozpoznających antygeny *B. burgdorferi s.l.* oraz ich silne działanie cytotoksyczne, umożliwiające nawet nielicznym komórkom $\gamma\delta$ wpływ na przebieg zapalenia potwierdziły badania *Roessner* i wsp. (18). Niedostateczna sprawność lub złe ukierunkowanie tego mechanizmu mogłoby przyczynić się do podtrzymywania odczynu zapalnego po eliminacji patogenu u części chorych z LA (18).

W obecnym badaniu odpowiedź PBMC chorych z LA na stymulację *B. burgdorferi s.l.* była odmienna niż u osób zdrowych. Aktywność kaspazy 3 była zwiększona, sugerując większe nasilenie apoptozy, ale nie następował dalszy jej wzrost pod wpływem stymulacji antygenowej. Wskazuje to na wyjściowo zwiększoną podatność PBMC na apoptozę, ale i zanik pro-apoptotycznego działania *B. burgdorferi s.l.* na PBMC. Ponieważ u pacjentów z późnym LA obecna jest stale silna swoista odpowiedź komórkowa (19), limfocyty rozpoznające antygeny krętkowe musiały występować w populacji PBMC i reagować na stymulację antygenową. Zarazem jednak ważne w patogenezie LA frakcje limfocytów, jak immunomodulujące komórki T $\gamma\delta$, gromadzą się głównie w ognisku stanu zapalnego, a więc ich udział w PBMC mógł być śladowy (18). Przyjęta metodyka nie daje możliwości oceny poszczególnych populacji PBMC, co wymagałoby wykorzystania metod cytometrycznych.

PODSUMOWANIE

1. Inkubacja z *B. burgdorferi s.l.* nasila apoptozę PBMC pochodzących od osób zdrowych.

2. Wrażliwość na czynniki proapoptotyczne PBMC od pacjentów z przewlekłym LA jest zmieniona w porównaniu z osobami zdrowymi, co może mieć związek z przewlekłymi zaburzeniami odpowiedzi zapalnej i immunologicznej. Nie zaobserwowano jednak przewidywanego zmniejszenia podatności na apoptozę.

S Grygorczuk, A Panasiuk, J Zajkowska, M Kondrusik, T Chmielewski, R Świerżbińska, S Pancewicz, R Flisiak, S Tylewska-Wierzbanowska

ACTIVITY OF THE CASPASE-3 IN THE CULTURE OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS STIMULATED WITH *BORRELIA BURGdorFERI* ANTIGENS

SUMMARY

Objective: To investigate whether the decreased rate of apoptosis of peripheral blood mononuclear cells occurs in patients with chronic *Lyme arthritis* (LA), which could contribute to persistent inflammation in those patients.

Methods: PBMC from 7 patients with LA and 6 healthy persons (control – C) were incubated for 48 hours without stimulation (negative control) or under antigenic stimulation with *Borrelia burgdorferi s.l.* spirochetes: *Borrelia afzelii* VS46110 (B.a.), *B. garinii* 20047 (B.g.) or *B. burgdorferi sensu stricto* B-31 (B.ss.). Concentration of the apoptosis mediator active caspase-3, was measured by ELISA in the culture homogenate.

Results: Mean active caspase-3 concentration was higher in LA than in C in unstimulated culture. Increase of active caspase-3 concentration under antigenic stimulation occurred in C (significant for B.g.), but not in LA.

Conclusions: 1) apoptosis rate of PBMC increases in presence of *B. burgdorferi s.l.*, which may be a defense mechanism of this pathogen; 2) in late LA there is increased baseline susceptibility of PBMC to apoptosis, but exposition to *B. burgdorferi s.l.* seem not to exert further pro-apoptotic effect. This altered response to pro-apoptotic stimuli may be related to persistent inflammatory pathology in this group of patients.

PIŚMIENNICTWO

1. Steere AC, Angelis SM. Therapy for Lyme arthritis. Strategies for the treatment of antibiotic-refractory arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:3079-86.
2. Steere AC, Klitz W, Drouin EE, i in. Antibiotic-refractory Lyme arthritis is associated with HLA-DR molecules that bind a *Borrelia burgdorferi* peptide. *J Exp Med* 2006;203:961-71.
3. Steere AC, Duray PH, Butcher EC. Spirochetal antigens and lymphoid cell surface markers in Lyme synovitis. Comparison with rheumatoid synovium and tonsillar lymphoid tissue. *Arthritis Rheum* 1988;31:487-95.
4. Shin JJ, Glickstein LJ, Steere AC. High levels of inflammatory chemokines and cytokines in joint fluid and synovial tissue throughout the course of antibiotic-refractory Lyme arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:1325-35.
5. Shadick NA, Phillips CB, Sangha O, i in. Musculoskeletal and neurologic outcomes in patients with previously treated Lyme disease. *Ann Intern Med* 1999; 131: 919-26.
6. Kalish RA, Kaplan RF, Taylor E, i in. Evaluation of study patients with Lyme disease, 10-20-year follow-up. *J Infect Dis* 2001;183:453-60.
7. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326:1-16.

8. Irmiler M, Thome M, Hahne M, i in. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190-5.
9. Akbar AN, Borthwick N, Salmon M, i in. The significance of low bcl-2 expression by CD45RO T cells in normal individuals and patients with acute viral infections. The role of apoptosis in T cell memory. *J Exp Med* 1993;178:427-38.
10. Uehara T, Miyawaki T, Ohta K, i in. Apoptotic cell death of primed CD45RO+ T lymphocytes in Epstein-Barr Virus-induced infectious mononucleosis. *Blood* 1992;80: 452-8.
11. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407:789-95.
12. Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, i in. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med* 1999;190:1891-6.
13. Perticarari S, Presani G, Prodan M, i in. Lymphocyte apoptosis co-cultured with *Borrelia burgdorferi*. *Microb Path* 2003;35:139-45.
14. Jendro MC, Köhler L, Kuipers JG, i in. Microbe-induced T-cell apoptosis: subversion of the host defense system? *FEMS Microbiology Letters* 2002;207:121-6.
15. Hirsch CS, Toosi Z, Johnson JL, i in. Augmentation of apoptosis and interferon- γ production at sites of active *Mycobacterium tuberculosis* infection in human tuberculosis. *J Infect Dis* 2002;183:779-88.
16. Vincent MS, Roessner K, Lynch D, i in. Apoptosis of Fas-high CD4+ synovial T cells by *Borrelia*-reactive Fas-ligand-high $\gamma\delta$ T cells in Lyme arthritis. *J Exp Med* 1996;184:2109-17.
17. Vincent MS, Roessner K, Sellati T, i in. Lyme arthritis synovial $\gamma\delta$ T cells respond to *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and lipidated hexapeptides. *J Immunol* 1998;161:5762-71.
18. Roessner K, Wolfe J, Shi C, i in. High expression of Fas ligand by synovial fluid – derived $\gamma\delta$ T cells in Lyme arthritis. *J Immunol* 2003;170:2702-10.
19. Dattwyler RJ, Volkman DJ, Luft BJ, i in. Seronegative Lyme disease: dissociation of the specific T- and B- lymphocyte responses to *Borrelia burgdorferi*. *N Engl J Med* 1988;319:1441-6.

Otrzymano: 17.10.2007 r.

Adres do korespondencji:

dr n. med. Sambor Grygorczuk

Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Akademii Medycznej w Białymstoku

ul. Żurawia 14; 15-540 Białystok

tel. 085-74 09 519, - 514, fax. 085-74 09 515

e-mail: samgryg@poczta.onet.pl, neuroin@amb.edu.pl