

(46)

Profil wybranych cytokin w zapaleniach błony naczyniowej różnego typu

Profile of selected cytokines in various forms of uveitis

Jolanta Rusiecka-Ziółkowska¹, Anna Turno-Kręcicka², Anna Białek-Szymańska², Ewa Salomon³

¹ Z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik: dr hab. Grażyna Gościńskiak

² Z Katedry i Kliniki Okulistyki Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik: dr hab. n. med. Marta Misiuk-Hojło

³ Z Katedry i Zakładu Fizjologii Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Ludmiła Borodulin-Nadzieja

Summary:

Purpose: The estimation of the level of selected inflammatory mediators in serum of patients with various types of uveitis.

Material and methods: The level of IL-1, IL-6 and TNF was assessed by means of microbiological tests and ELISA test in the group of 60 patients with uveitis, divided as regards to the character of uveitis and the type of the treatment and in control group.

Results: The levels of IL-1, IL-6 and TNF were higher in serum of patients with uveitis than in the control group. Patients with known etiology of uveitis had higher level of IL-6 and TNF. Patients with autoimmunological etiology of uveitis had higher level of IL-1 and IL-6 than volunteers in control group.

Conclusions: Higher levels of cytokines in serum of patients with uveitis than in control group indicate the activation of immunological response in various types of uveitis.

Słowa kluczowe: zapalenie błony naczyniowej, mediatorzy zapalenia, cytokiny.

Key words: uveitis, inflammatory, mediators, cytokines.

Etiopatogeneza większości przypadków zapalenia błony naczyniowej (ZBN) pozostaje niewyjaśniona. W celu jej poznania od dawna prowadzone są badania na zwierzętach laboratoryjnych (1,2). Analizie immunohistochemicznej poddawane są ludzkie tkanki uzyskane z enukleowanych gałek ocznych z ZBN. Mechanizmy prowadzące do destrukcji tkanek w przebiegu ZBN u ludzi nie są w pełni poznane, ponieważ większość badanego materiału obejmuje przypadki z zaawansowanym stadium choroby lub końcowym. W patogenezie ZBN brany jest pod uwagę udział komórek i mediatorów przez nie wydzielanych, zaburzenia regulacji w układzie immunologicznym, predyspozycje genetyczne oraz nieznanne czynniki zewnętrzne. Immunizacja antygenami powoduje wzbudzenie odpowiedzi immunologicznej humoralnej w postaci produkcji swoistych przeciwciał oraz komórkowej, której przypisuje się wiodącą rolę patogenetyczną w ZBN.

Materiał i metody

Badaniem objęto 60 chorych z ZBN w wieku 20-74 lata (średnia 28,2 roku) leczonych w Klinice Ocznej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Czas trwania choroby wynosił od kilku dni do 5 lat. Chorzy zostali podzieleni na grupy ze względu na charakter zapalenia (tło swoiste i autoimmunologiczne) oraz rodzaj zastosowanego leczenia (ogólne podawanie steroidów lub leczenie miejscowe). U 45 chorych badania wykonywano trzykrotnie: w dniu przyjęcia, po tygodniu oraz po miesiącu od czasu pierwszego badania. W czasie wykonywania badań chorzy

byli leczeni w zależności od etiologii choroby. Grupę kontrolną stanowiły 34 osoby zdrowe w wieku 20-50 lat (średnia 25,1 roku) bez zmian w gałce ocznej oraz bez występowania chorób oczu w przeszłości.

Cel

Celem pracy jest ocena stężeń wybranych mediatorów procesu zapalnego we krwi u pacjentów z różnymi postaciami zapalenia błony naczyniowej. Przeanalizowano również poziom wybranych cytokin w różnych okresach choroby, co daje możliwość obserwacji dynamiki stanu zapalnego na podstawie wartości stężeń jego mediatorów.

Interleukinę-1 beta (IL-1 beta) oznaczano metodą ELISA (Quantikine HS, R&D Systems, Minneapolis, USA). Aktywność interleukiny-6 (IL-6) oznaczano, używając mysiej linii komórek hybrydoma zależnych od interleukiny 6 (7TD1). W celu oznaczenia aktywności czynnika martwicy nowotworów (tumor necrosis factor – TNF) używano mysiej linii komórek sarkomy (WEHI-164). Statystyczną ocenę otrzymanych wyników przeprowadzono nieparametrycznym testem Wilcoxona.

Wyniki badań przedstawiono w tabelach I-III.

Omówienie wyników

Wykazano, że u wszystkich chorych z ZBN stężenia IL-6 i TNF były statystycznie wyższe niż u osób z grupy kontrolnej. Wyższy był również średni poziom IL-1, lecz różnica jego

Surowice badane/ Tested serum	IL-1 w pg/ml	IL-6 w j/ml	TNF w j/ml
N Chorych/Sick	53	60	60
\bar{X}	1,24	5,90	9,41
p	NZ	<0,01	<0,05
N Zdrowych/Healthy	29	34	32
\bar{X}	0,32	2,07	4,16
SE	± 0,08	± 0,59	± 0,80

Tab. I. Ocena statystyczna stężenia IL-1, IL-6, TNF w surowicy chorych z ZBN i surowicy osób zdrowych.

Tab. I. Statistic analysis of the level of IL -1, IL-6 and TNF in serum in patients with uveitis and control group.

Badane surowice/ Tested serum	IL-1 w pg/ml	IL-6 w j/ml	TNF w j/ml
W dniu przyjęcia/ At the day of admission			
\bar{X}	0,30	9,70	17,50
p	NZ	< 0,01	< 0,001
Po tygodniu/ After week			
\bar{X}	0,28	9,19	13,46
p	NZ	< 0,01	< 0,05
Po miesiącu/ After month			
\bar{X}	0,75	2,55	7,70
p	NZ	NZ	NZ
N Osoby zdrowe/ Healthy persons	29	34	32
\bar{X}	0,32	2,07	4,16
SE	±0,08	± 0,59	±0,80

Tab. II. Ocena statystyczna stężenia IL-1, IL-6, TNF w surowicy 10 chorych z ZBN o znanej etiologii z uwzględnieniem okresów rozwoju choroby w porównaniu ze stężeniem u osób zdrowych.

Tab. II. Statistic analysis of the level of IL-1, IL-6 and TNF in serum in 10 patients with known etiology of uveitis and control group as regards to the period of the disease.

wartości w stosunku do grupy kontrolnej nie była znamienne statystycznie. Palexas (3) stwierdził wysokie stężenie IL-1 w surowicy chorego z zapaleniem współczulnym. Badania różnych autorów sugerują, że cytokiny IL-1, IL-6 i TNF obecne w surowicy chorych z ZBN mogą odgrywać znaczącą rolę w patogenezie tego schorzenia (4,5,6). Rolę IL-1 w rozwoju

Surowice badane/ Tested serum	IL-1 w pg/ ml	IL-6 w j/ ml	TNF w j/ ml
n W dniu przyjęcia/ At the day of admission	22	29	28
\bar{X}	1,44	4,53	7,27
p	< 0,01	< 0,05	NZ
n Po tygodniu/After week	18	20	19
\bar{X}	0,43	6,85	6,68
p	NZ	< 0,01	NZ
n Po miesiącu/After month	22	27	28
\bar{X}	0,96	6,05	5,51
p	< 0,01	< 0,05	NZ
n Osoby zdrowe/Healthy persons	29	34	32
\bar{X}	0,32	2,07	4,16
SE	± 0,08	± 0,59	± 0,80

Tab. III. Ocena statystyczna stężenia IL-1, IL-6, TNF w surowicy chorych z ZBN o charakterze autoimmunologicznym z uwzględnieniem okresów rozwoju choroby w porównaniu ze stężeniem u osób zdrowych.

Tab. III. Statistic analysis of the level of IL -1, IL-6 and TNF in serum in patients with autoimmune uveitis and control group as regards to the period of the disease.

Objaśnienie (dotyczy tabel I- III):

- X – średnie stężenie/ mean concentration
- n – liczba badań/ number of tests
- p – statystyczna znamienność w stosunku do grupy kontrolnej/ statistical significance in comparison with control group
- SE – błąd standardowy/ standard error
- NZ – różnica statystycznie nieznamienne/ difference statistically insignificant

ZBN wykazano doświadczalnie, podając królikom do ciała szklatego rekombinowaną postać IL-1. W odpowiedzi zaobserwowano zmiany w odcinku przednim w postaci nacieku komórek zapalnych i wysięku w komorze przedniej (7). IL-6 i TNF to cytokiny wzbudzające procesy zapalne. Ich wysokie stężenie wykazano u chorych z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych, w posocznicy wywołanej przez bakterie Gram-ujemne, w płynie podsiatkówkowym u pacjentów z odwarstwieniem siatkówki, w płynie komory przedniej u chorych z zaćmą i w chorobach z reakcją autoimmunologiczną (4,5,6,8,9,10,11). Z kolei Feys (12) w badaniach własnych nie wykazał tych cytokin w surowicy chorych z ZBN. Rahi (13) zaobserwował wysokie stężenie IL-6 we krwi u chorych z zapaleniem naczyń siatkówki.

W ZBN obserwuje się pobudzenie komórek układu immunologicznego, co uruchamia kaskadową reakcję wydzielania różnych cytokin. Czynniki zapalne, między innymi IL-1 i TNF,

zwiększając przepuszczalność śródbłonka i przyleganie krążących limfocytów poprzez wzrost ekspresji cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1. W ten sposób przyczyniają się do uszkodzenia bariery krew-siatkówka. TNF wraz z interleukiną-8 (IL-8) działają chemotaktycznie na monocyty i neutrofile, powodując ich aktywację i zwiększenie właściwości fagocytarnych. Prowadzi to do napływu tych komórek do gałki ocznej, a uwalniane przez nie cytokiny nasilają przeciek z naczyń i proces zapalny. Oprócz komórek układu immunologicznego także tkanki gałki ocznej, komórki zrębu tęczówki, ciała rzęskowego, nabłonka barwnikowego siatkówki i komórki Müllera mogą wydzielać cytokiny zapalne (14).

W grupie chorych z ZBN o znanej etiologii (toksoplazmoza, toksokaroza czy zakażenie herpeswirusem) średnie stężenia IL-1 nie różniły się statystycznie od średnich stężeń IL-1 u osób z grupy kontrolnej. Jak się zatem wydaje, IL-1 nie odgrywa znaczącej roli w patomechanizmie ZBN spowodowanego znanymi czynnikami infekcyjnymi.

Zarówno w dniu przyjęcia, jak i po tygodniu od pierwszego badania stwierdzono wyższe stężenia IL-6 w surowicy chorych z ZBN o znanej etiologii niż w surowicy osób zdrowych. W badaniu kontrolnym wykonanym po 7 dniach spadek stężenia IL-6 był niewielki, co może wskazywać na utrzymywanie się stanu zapalnego. Oznaczenia wykonane po miesiącu wykazały znaczny spadek stężenia IL-6, które osiągnęło wartości porównywalne do stężeń IL-6 u osób w grupie kontrolnej. Świadczy to o normalizacji stanu zapalnego i jego zmniejszaniu się w czasie leczenia. Feys i wsp. (12) nie stwierdzili tej cytokiny w surowicy 6 badanych pacjentów z zapaleniem siatkówkowo-naczyniówkowym na tle toksoplazmozy, ale u 2 z nich wykazali jej obecność w płynie komorowym. Van Kooij i wsp. (4) wykazali obecność tej cytokiny w płynie komorowym pacjentów z aktywnym stadium infekcyjnego zapalenia błony naczyniowej.

Znamiennie wyższe średnie stężenie TNF w surowicy chorych z ZBN o znanej etiologii stwierdzono w dniu przyjęcia oraz 7 dni po przyjęciu. Po miesiącu leczenia stężenie TNF było niższe i nie różniło się znamienne od stężenia TNF u osób z grupy kontrolnej.

Podstawowym źródłem TNF są monocyty i makrofagi. Mogą go wydzielać także limfocyty, granulocyty, komórki mikrogleju i komórki Kupffera. Biosynteza TNF może być indukowana przez lipopolisacharydy bakteryjne (LPS), egzotoksyny gronkowcowe i paciorkowcowe, a także antygeny wirusowe i zakażenia pasożytnicze. Wydzielanie TNF podlega regulacji za pośrednictwem innych cytokin, takich jak IL-1, oraz na zasadzie dodatniego autosprężenia zwrotnego. Uzyskane przez nas wyniki badań mogą wskazywać na aktywację komórek immunokompetentnych przez czynniki infekcyjne u chorych z ZBN.

W grupie chorych z ZBN o znanej etiologii zaobserwowano zbieżność między stężeniem IL-6 a TNF. Obie cytokiny były znamienne podwyższone, co może wskazywać na ich udział w wyzwalaniu reakcji zapalnej w tej grupie. Jednocześnie w czasie przebiegu leczenia obserwowano spadek stężenia cytokin. Może on być spowodowany leczeniem swoistym i steroidoterapią, które zmniejszają pobudzenie komórek układu immunologicznego, a przez to wygaszają proces zapalny. Jak wspomniano wyżej, cytokiny podlegają wzajemnej regulacji i IL-6 może także zwrótnie hamować wydzielanie TNF.

W przeprowadzonych badaniach w grupie chorych z ZBN o charakterze autoimmunologicznym stężenie IL-1 było wyższe we wszystkich okresach choroby niż u osób zdrowych, a różnice te osiągnęły istotność statystyczną w dniu przyjęcia oraz po miesiącu. Wyższe stężenia IL-1 niż u osób zdrowych mogą sugerować udział tej cytokiny w rozwoju ZBN w przebiegu autoagresji. Cytokina ta bierze udział w uszkodzeniu bariery krew-siatkówka, zwiększa adhezję limfocytów do śródbłonka, indukuje produkcję IL-2, której przypisuje się dużą rolę w rozwoju schorzeń o podłożu autoimmunologicznym (15). IL-1 pobudza także syntezę interferonu gamma (IFN-gamma) i IL-6. IFN-gamma zwiększa ekspresję cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy II (major histocompatibility complex II – MHC II) na komórkach prezentujących antygen (antygen presenting cells – APC) oraz na komórkach tkanek gałki ocznej. W ten sposób pośrednio poprzez pozostałe cytokiny ułatwia prezentację autoantygenów limfocytom CD4. Stężenie IL-1 w surowicy chorych obniżyło się po miesiącu, jednak było nadal znamienne wyższe niż u osób w grupie kontrolnej. Różnica znamienna statystycznie sugeruje, że pomimo zastosowanego leczenia pobudzenie w układzie immunologicznym nadal się utrzymuje, co potwierdza przewlekły ogólnoustrojowy charakter schorzenia.

Średnie stężenie IL-6 w surowicy chorych z ZBN na tle autoagresji było znamienne wyższe we wszystkich okresach choroby niż w surowicy osób zdrowych. Najniższą wartość stężenia IL-6 stwierdzono w dniu przyjęcia. Następnie po tygodniu obserwowano wzrost jej poziomu, który utrzymywał się przez miesiąc. Utrzymywanie się wysokiego stężenia IL-6 w surowicy może być wynikiem pobudzenia komórek, które ją wydzielają, oraz regulacji ze strony innych cytokin stymulujących jej produkcję. IL-6 wraz z IL-1 biorą udział w reakcji ostrej fazy. Stymulują także różnicowanie komórek T w kierunku limfocytów T cytotoksycznych, które mogą pełnić rolę komórek efektorowych. IL-6 pobudza także proliferację i różnicowanie limfocytów B w kierunku plazmocytów, które mogą produkować przeciwciała w odpowiedzi na autoantygeny siatkówkowe. Rahi (13) wykazał obecność IL-6 w surowicy chorych z rzadkimi idiopatycznymi specyficznymi zespołami zapalenia błony naczyniowej, takimi jak: zapalenie wielogniskowe naczyniówki, retinohoroidopatia typu birdshot i choroidopatia pelzająca. Natomiast Hamzaoui K. i wsp. (5) wykazali wysokie stężenie IL-6 w surowicy pacjentów z chorobą Behçeta.

Średnie stężenia TNF oznaczone w surowicy pacjentów z ZBN o podłożu autoagresyjnym we wszystkich okresach choroby oraz u osób zdrowych nie różniły się znamienne statystycznie. Wydaje się, że u chorych z ZBN o etiologii autoagresyjnej TNF nie odgrywa takiej roli jak IL-1 i IL-6. IL-1 indukuje syntezę TNF, dlatego spodziewaliśmy się wyższych stężeń w surowicy również tej cytokiny. Brak wzrostu stężenia może być wynikiem działania czynników hamujących lub wiązania się TNF z rozpuszczalnymi receptorami obecnymi w surowicy. Dane z literatury o występowaniu TNF w surowicy chorych z ZBN są nieliczne i sprzeczne. Feys (12) nie wykrył TNF ani w surowicy, ani w gałce ocznej osób z ZBN. Natomiast Ahn Jae Kyoung i wsp. (6) stwierdzili obecność wysokiego stężenia TNF w płynie komorowym pacjentów z chorobą Behçeta. Rahi (13) wykazał obecność TNF w średnim stężeniu wynoszącym

153 pg/ml w surowicy chorych z zapaleniem naczyń siatkówki, jednak oznaczenia te były przeprowadzane jednorazowo na początku choroby.

Zaobserwowaliśmy odmienny profil cytokin u osób w badanych grupach. U pacjentów z ZBN o znanej etiologii istotną wydaje się patogenetyczna rola IL-6 i TNF. Natomiast w grupie z ZBN o etiologii autoagresyjnej wiodącymi wydają się IL-1 i IL-6. Na podkreślenie zasługuje podwyższone stężenie IL-6 zarówno w ZBN o znanej etiologii, jak i autoagresyjnej etiologii. Interleukina ta prawdopodobnie ma największe znaczenie w indukcji stanu zapalnego i jego rozwoju w tych schorzeniach.

Wnioski

1. Wyższe stężenia cytokin IL-1, IL-6 i TNF w surowicy 60 chorych z ZBN niż w surowicy osób z grupy kontrolnej wskazują na aktywację układu immunologicznego w przebiegu różnego typu zapalenia błony naczyniowej.
2. Różny profil cytokin w ZBN o znanej etiologii w chorobach z autoagresji (podwyższone stężenie odpowiednio IL-6 i TNF oraz IL-1 i IL-6) może wynikać z odmiennej patogenezы tych schorzeń.

Piśmiennictwo:

1. Caspi RR, Roberge FG, Chan ChCh, Wiggert B, Chader GJ, Rozenszajn LA, Lando Z, Nussenblatt RB: *A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens.* J Immunol 1988, 5, 1490-1495.
2. Kasner L, Chan CC, Whitcup SM, Gery I: *The paradoxical effect of tumor necrosis factor alpha in endotoxin-induced uveitis.* Invest Ophthalmol Vis Sci 1993, 34, 2911-2917.
3. Palexas GN, Sussman G, Welsh NH: *Ocular and systemic determination of IL-1 β and tumor necrosis factor in a patients with ocular inflammation.* Scand J Immunol 1992, 36, 173-175.
4. van Kooij B, Rothova A, Rijkers Ger T, de Groot-Mijnes J: *Distinct cytokine and chemokine profiles in the aqueous of patients with uveitis and Cystoid Macular Edema.* American Journal of Ophthalmology 2006, 142(1), 192-194.

5. Hamzaoui K, Hamzaoui A, Guemira F, Bassioud M, Hamza M, Ayed K: *Cytokine profile in Behcet's disease patients. Relationship with disease activity.* Scand J Rheumatol 2002, 31(4), 205-210.
6. Ahn JK, Yu HG, Chung H, Park YG: *Intraocular cytokine environment in active Behcet uveitis.* American Journal of Ophthalmology 2006, 142(3), 429-434.
7. Rosenbaum JT, Samples JR, Hefeneider SH, Howes EL: *Ocular inflammatory effects of intravitreal interleukin 1.* Arch Ophthalmol 1987, 105, 1117-1120.
8. Bakunowicz-Łazarczyk A, Moniuszko T, Stankiewicz A, Mrugacz M: *Stężenie wybranych cytokin w płynie podsiatkówkowym u chorych z odwarstwieniem siatkówki (IL-8, TNF-alpha, IFN-gamma).* Klin Oczna 1997, 99, 87-89.
9. Bakunowicz-Łazarczyk A, Moniuszko T, Średzińska-Kita D, Chwiećko J: *Stężenie wybranych cytokin w płynie komory przedniej oka chorych operowanych z powodu zaćmy (IL-1 beta, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alfa, IFN-gamma).* Klin Oczna 1997, 99, 235-237.
10. Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma JF, Nuijens JH, Van Schnijndel RJ: *Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis.* Blood 1989, 5, 1704-1710.
11. Hirano T, Matsuda T, Turner M: *Excessive production of IL-6/ Bcell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis.* Eur J Immunol 1988, 18, 1797-1801.
12. Feys J, Emond JP, Salvanet-Bouccara A, Dublanchet A: *Interleukin-6 and other cytokines in the aqueous humor in uveitis and endophthalmitis.* J Fr Ophthalmol 1994, 17, 634-639.
13. Rahi AH, Al-Kaff A, Rahi SL, Rahi JS: *Cytokine profile in uveitis. A point prevalence study.* Advances in ocular immunology. Elsevier Science B V 1994, 369-372.
14. Nagineni CN, Detrick B, Hooks JJ: *Human retinal pigment epithelial cells secrete cytokines in response to inflammatory mediators.* Advances in ocular immunology. Elsevier Science B V Amsterdam 1994, 17-20.
15. Imai Y, Sugita M, Nakamura S, Toriyama S, Ohno S: *Cytokine production and helper T cell subsets in Vogt-Koyanagi-Harada's disease.* Curr Eye Res 2001, 22, 312-318.

Praca wpłynęła do Redakcji 10.12.2007 r. (1022)
Zakwalifikowano do druku 11.03.2008 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
Jolanta Rusiecka-Ziółkowska
Katedra i Zakład Mikrobiologii AM
ul. Chałubińskiego 4
50-368 Wrocław
email: joda@mbio.am.wroc.pl