

(87)

# Ocena stężenia rozpuszczalnego Fas w surowicy krwi u pacjentów z zapaleniem błony naczyniowej

## *Assessment of sFas concentration in serum of uveitis patients*

Małgorzata Mrugacz<sup>1</sup>, Alina Bakunowicz-Łazarczyk<sup>1</sup>, Dorota Średzińska-Kita<sup>1</sup>,  
Beata Żelazowska-Rutkowska<sup>2</sup>, Jolanta Wysocka<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Z Kliniki Okulistyki Dziecięcej Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Alina Bakunowicz-Łazarczyk

<sup>2</sup> Z Zakładu Pediatrycznej Diagnostyki Laboratoryjnej Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jolanta Wysocka

### Summary:

**Purpose:** To evaluate the concentration of sFas in serum of uveitis patients.

**Material and methods:** Serum samples were collected from 13 patients with uveitis and 12 controls. All patients have underwent ophthalmic and laboratory examinations. The sFas levels were determined by immunoenzymatic assay ELISA.

**Results:** We found statistically increased levels of sFas in serum of patients with uveitis compared with controls.

**Conclusions:** Our results suggest a systemic nature of uveitis with persistent activation of the immune system. Apoptosis may play regulatory role in ocular inflammation of patients with uveitis.

### Słowa kluczowe:

zapalenie błony naczyniowej, apoptoza, sFas

### Key words:

cytokines, Sjögren's syndrome, tear fluid.

### Pacjenci i Metody

Badania przeprowadzono u 13 pacjentów (9 chłopców i 4 dziewczyny) w wieku od 5 lat do 17 lat, średnia wieku  $14,08 \pm 3,42$ , objętych opieką Kliniki Okulistyki Dziecięcej w Białymstoku z powodu zapalenia błony naczyniowej. Grupę kontrolną stanowiło 8 chłopców i 4 dziewczyny w wieku od 7 lat do 16 lat, średnia wieku  $13,55 \pm 4,01$ .

W każdym przypadku brano pod uwagę informacje uzyskane z wywiadu oraz badania okulistycznego, które obejmowało ostrość wzroku oraz badanie przedniego i tylnego odcinka oka, a także z badań dodatkowych, takich jak: pole widzenia, USG typu B i angiografia fluoresceinowa. U wszystkich pacjentów wykonano również zestaw badań laboratoryjnych zawierający: morfologię krwi z rozmazem, odczyn Biernackiego, przeciwciała przeciwjądrowe ANA, białko CRP, czynnik RF, komórki LE, ASO, proteinogram, poziom immunoglobulin IgG, IgM, IgA, IgE, poziom glukozy w surowicy, badanie w kierunku toksoplazmozy, toksokarozy, brucelozy, boreliozy, listeriozy, cytomegalii, badanie ogólne moczu. Wykonywano również zdjęcie RTG klatki piersiowej i próbę Rt 23, a w wybranych przypadkach określano HLA B27. Każdy pacjent podczas hospitalizacji był konsultowany przez stomatologa, laryngologa i reumatologa. W czasie wykonywania ww. badań u żadnego z pacjentów nie stosowano leczenia miejscowego i ogólnego.

W celu oznaczenia sFas w surowicy krwi pobierano 5 ml krwi, którą odwirowywano, a następnie surowicę zamrażano w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  (zgodą Komisji Bioetycznej nr R-I-

003/326/2005). Do oznaczeń wykorzystano metodę immunoenzymatyczną ELISA z zastosowaniem odpowiedniego zestawu diagnostycznego (Quantikine, R&D Systems, USA). W tym celu wykorzystano 96-dółkową płytkę opłaszczoną monoklonalnymi przeciwciałami anti-sFas, do której odpipetowano odpowiednią objętość przygotowanych wcześniej standardów oraz próbek surowicy krwi. Płytkę inkubowano 2 godziny, następnie całość poddawano płukaniu roztworem płuczącym i ponownie inkubowano wraz z roztworem koniugatu. Po ponownym płukaniu do dołek dodawano enzym (TBM), co powodowało powstanie barwnego produktu wprost proporcjonalnego do poziomu sFas w badanej próbce. Intensywność zabarwienia mierzono fotometrycznie w czytniku ELISA (ANTHOS).

Długość fali wynosiła 450 nm. Wszystkie procedury dotyczące czasu inkubacji, rozcieńczeń standardów i liczby płukań wykonano zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu. Wartość minimalnego wykrywalnego stężenia sFas wynosiła 20 pg/ml.

Porównania stężenia sFas w surowicy krwi u pacjentów z zapaleniem błony naczyniowej i w grupie kontrolnej dokonano za pomocą testu Wilcozona. Poziom istotności przyjęto dla  $p < 0,05$ .

### Wyniki

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że zapalenie błony naczyniowej występuje w jednym oku u 8 pacjentów, obustronnie zaś u 5 pacjentów. Ostrość wzroku wahała się od liczenia palców przed okiem (lppo) do 5/5. U 3 chorych

objawy zapalenia błony naczyniowej ograniczone były do odcinka przedniego, u pozostałych obejmowały tylny odcinek gałki ocznej. U 7 chorych wystąpiły osady na śródbłonku rogówki, u 3 zaś zrosty tylne tęczęwki z soczewką oraz zmętnienia torby tylnej soczewki. U 8 pacjentów wykazano zmiany w ciele szklistym pod postacią wysięku drobnopłytkowego lub pasmowatych mętw. U 2 pacjentów stwierdzono białawe ogniska zapalne na dnie oczu i obrzęk okolicy plamki.

Na podstawie badań laboratoryjnych u 3 pacjentów stwierdzono toksoplazmozę (klasa IgG), u 1 – toksokarozę (klasa IgG), u 2 – boreliozę (klasa IgM) i cytomegalię (w klasie IgG). U jednego pacjenta wykazano dodatni antygen HLA B27. Odchylenia od stanu prawidłowego w badaniu okulistycznym i w badaniach laboratoryjnych przedstawia tabela I.

Stężenie sFas w surowicy krwi u pacjentów z zapaleniem błony naczyniowej wynosiło od 1213,8 pg/ml do 9894,5 pg/ml,

Nr pacjenta No of patient	Inicjały / Initials	Wiek / Age	Ostrość wzroku Visual acuity	Badanie okulistyczne Ophthalmic examination	Badania dodatkowe Additional examinations	Badania laboratoryjne Laboratory examinations	sFas w surowicy serum sFas (pg/ml)
1.	A.A.	15	Vod = 5/7 Vos = 5/5	Wysięk drobnopłytkowy i męty w ciele szklistym obojga oczu.	USG B – liczne męty w ciele szklistym obojga oczu	–	1332,8
2.	C.A.	11	Vod = 5/25 Vos = 5/25	Wysięk na śródbłonku rogówki i zmętnienia pod torbą tylną soczewki obojga oczu. Męty w ciele szklistym obu oczu.	USG B – welonowate męty w ciele szklistym obu oczu.	Toksoplazmoza – wynik + (IgG 137,0 IU/ml).	3212,8
3.	D.M.	15	Vod = 5/7 Vos = 5/5	Męty w ciele szklistym OP. Dno OP – skroniowo od plamki białawe ognisko wielkości 1/2 DD, z przegrupowaniem barwnika.	USG B – pasmowate męty w ciele szklistym OP.	Toksoplazmoza – wynik + (IgG 181 IU/ml) Toksokaroza – wynik + (IgG 2,3???)	9871,8
4.	K.D.	15	Vod = lppo Vos = 5/5	Zmętnienie torby tylnej OP.	USG B – pasmowate męty w ciele szklistym OP.	ASO 252 IU/ml.	7353,0
5.	K.A.	14	Vod = 5/5 Vos = 5/10	Męty w ciele szklistym OL. Dno oczu – poniżej tarczy n. II dwa białawe ogniska; obrzęk plamki OL.	USG B – męty w ciele szklistym OL.	ASO 1371 IU/ml; Toksoplazmoza – wynik + (IgG 103 IU/ml).	9894,5
6.	K.P.	10	Vod = 5/12 Vos = 5/12	Męty w ciele szklistym obojga oczu.	USG B – welonowate męty w ciele szklistym obojga oczu.	–	5439,8
7.	L.M.	10	Vod = lp z 2 m Vos = lp z 3 m	Osady na śródbłonku rogówki, wysięk drobnopłytkowy w komorze przedniej, zrosty tylne okrężne, biaława błona w źrenicy obojga oczu.	USG B – gęsty wysięk w ciele szklistym obojga oczu.	Borelioza – wynik + (IgM 1,2 BBU/ml); Cytomegalia – wynik + (IgG 39 IU/ml).	7564,8
8.	Ł.D.	15	Vod = 5/5 Vos = 5/5	Wysięk drobnopłytkowy w ciele szklistym obojga oczu.	USG B – wysięk w ciele szklistym obojga oczu.	–	3349,1
9.	M.M.	16	Vod = 5/5 Vos = 5/10	Osady na śródbłonku rogówki, wysięk drobnopłytkowy w komorze przedniej, zmętnienie torby tylnej OL.	USG B – welonowate męty w ciele szklistym OL.	ASO 740 IU/ml.	1431,8
10.	M.M.	9	Vod = 5/5 Vos = 5/5	Wysięk na śródbłonku rogówki OL.	–	ANA – wynik + (1,7 IU/ml); HLA B27 – wynik +.	1213,8
11.	O.A.	13	Vod = 5/5 Vos = 5/5	Osady na śródbłonku rogówki, wysięk drobnopłytkowy w komorze przedniej OP.	–	–	4193,9
12.	S.W.	17	Vod = 5/5 Vos = 5/5	Osady na śródbłonku rogówki, wysięk drobnopłytkowy w komorze przedniej, pojedyncze zrosty tylne w OL. Dno OL – obrzęk plamki.	–	Borelioza – wynik + (IgM 15,3 BBU/ml).	6659,7
13.	Z.Ł.	5	Vod = 5/5 Vos = 1/50	Osady na śródbłonku rogówki, wysięk drobnopłytkowy w komorze przedniej, pojedyncze zrosty tylne w OL.	–	Cytomegalia – wynik + (IgG 30 UA/ml).	5112,8

Tab. I. Odchylenia od stanu prawidłowego i w badaniach laboratoryjnych u pacjentów z zapaleniem błony naczyniowej.

Tab. I. Abnormal results of ophthalmic and laboratory examinations in patients with uveitis.

średnio 5125,85 pg/ml  $\pm$  3023.16 W grupie kontrolnej stężenie sFas wahało się między 314,8 pg/ml a 879,2 pg/ml i wynosiło średnio 618,62 pg/ml  $\pm$  184.65. Analiza statystyczna wykazała różnice znamienne statystycznie między stężeniem sFas w surowicy krwi pacjentów z ZBN a stężeniem sFas w surowicy krwi badanych z grupy kontrolnej ( $p = 0,002218$ ).

### Dyskusja

Narząd wzroku stanowi reprezentatywny organ miejsca uprzywilejowanego immunologicznie. Jednym z fundamentalnych mechanizmów, mających udział w uprzywilejowaniu immunologicznym w oku, jest apoptoza bazująca na systemie Fas-Fas ligand (11).

W naszej pracy stwierdziłyśmy znamienne statystycznie wyższy poziom sFas w surowicy pacjentów z zapaleniem błony naczyniowej w porównaniu z grupą kontrolną. Podobne rezultaty uzyskali Nakamura i wsp., Fujihara i wsp. oraz Hamzaoui i wsp., którzy stwierdzili podwyższony poziom sFas w surowicy krwi pacjentów z chorobą Behçeta (12,13,14). W badaniach przeprowadzonych przez Sugita i wsp. wykazano znacząco wyższe stężenie sFas w surowicy pacjentów z chorobą Behçeta, sarkoidozą i zapaleniem błony naczyniowej wywołanym wirusem limfotropowym typu-1 (*human T lymphotropic virus type-1- HTLV-1*) (7). Wzrost ekspresji antygenu Fas/Fas ligand na limfocytach T krwi obwodowej stwierdzono u pacjentów z chorobą Behçeta, zespołem Vogta-Koyanagi-Harady i idiopatycznym zapaleniem przedniego odcinka błony naczyniowej (15). Najnowsze badania wykazują, że wysokie stężenia sFas w surowicy krwi stwierdza się u pacjentów ze schorzeniami autoimmunologicznymi, takimi jak reumatoidalne zapalenie stawów czy toczeń rumieniowaty przewlekły. Dzieje się tak prawdopodobnie na skutek przewlekłej aktywacji komórek immunologicznych w ww. jednostkach chorobowych (16).

W przeciwieństwie do rezultatów naszych badań, niskie poziomy sFas w surowicy znaleziono w ZBN zlokalizowanych w oku w przebiegu toksoplazmozy i w przypadku zapalenia odcinka przedniego gałki ocznej (7).

### Wnioski

1. Wyniki naszych badań sugerują, że zapalenie błony naczyniowej ma systemową naturę, związaną ze stałą aktywacją systemu immunologicznego.
2. Apoptoza może odgrywać rolę regulującą w rozwoju procesów zapalnych w oku w przebiegu zapalenia błony naczyniowej.

### Piśmiennictwo:

1. Streilein JW: *Regional immunity and ocular immune privilege*. Chem Immunol 1999, 73, 11-38.
2. McKechnie NM, King BCR, Flechter E, Braun G: *Fas-ligand is stored in secretory lysosomes of ocular barrier epithelia and released with microvesicles*. Exp Eye Res 2006, 83, 304-314.
3. Goules A, Tzioufas AG, Manousakis MN, Kirou KA, Crow MK, Routsias JG: *Elevated levels of soluble CD40 ligand (sCD40L) in serum of patients with systemic autoimmune diseases*. J. Autoimmun 2006, 26, 165-171.

4. Øgard C, Sørensen TL, Krogh E: *Increased CD40 ligand in patients with acute anterior uveitis*. Acta Ophthalmol Scand 2005, 83, 370-373.
5. Kim WU, Chung SM, Han TW, Sah WJ, Kim MH: *Elevated soluble Fas in aqueous humor of patients with Behçet's uveitis: correlation with uveitis severity*. Jpn J Ophthalmol, 2002, 46, 18-23.
6. Sotozono C, Sano Y, Suzuki T, Tada R, Ikeda T, Nagata S, Kinoshita S: *Soluble Fas ligand expression in the ocular fluids of uveitis patients*. Curr Eye Res 2000, 20(1), 54-57.
7. Sugita S, Taguchi C, Takase H, Sagawa K, Sueda J, Fukushi K, Hikita N, Watanabe T, Itoh K, Mochizuki M: *Soluble Fas ligand and soluble Fas in ocular fluid of patients with uveitis*. Br J Ophthalmol 2000, 84, 1130-1134.
8. Sueda J, Hikita N, Mochizuki M, Jimi A, Kojiro M: *Kinetics of apoptotic cells in experimental autoimmune uveoretinitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000, 41, 799-804.
9. Dick AD, Siepmann K, Dees C, Duncan L, Broderick C, Liveridge J, Forrester JV: *Fas-Fas ligand-mediated apoptosis within aqueous during idiopathic acute anterior uveitis*. Invest. Ophthalmol Vis Sci 1999, 40, 2258-2267.
10. Chan CC, Matteson DM, Li Q, Whitcup SM, Nussenblatt RB: *Apoptosis in patients with posterior uveitis*. Arch Ophthalmol 1997, 115(12), 1559-1567.
11. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA: *Fas-ligand induced apoptosis as a mechanism of immune privilege*. Science 1995, 270, 1189-1192.
12. Nakamura S: *Cell biology in endogenous uveitis*. J Jpn Ophthalmol 1997, 101, 975-986.
13. Fujihara T, Takeuchi T, Tsubota K, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Abe T: *Serum soluble Fas/APO-1 is increased in patients with primary Sjogren's syndrome*. Clin Rheumatol 1998, 17(6), 496-499.
14. Hamzaoui K, Hamzaoui A, Zakraoui L, Chabbou A: *Levels of soluble Fas/APO-1 in patients with Behçet's disease*. Mediators Inflamm 1998, 7(2), 111-114.
15. Yang P, Ji L, Zhou H, Huang X, Xie C, Jin H, Chen L, Kijlstra A: *Disturbed expression of Fas/FasL on CD4(+) and CD8(+)T cells in Behçet's disease, Vogt-Koyanagi-Harada syndrome, and idiopathic anterior uveitis*. Ocul Immunol Inflamm 2001, 9(3), 185-191.
16. Cheng J, Zhou T, Liu C: *Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule*. Science 1994, 263, 1759-162.

Praca wpłynęła do Redakcji 10.03.2007 r. (969)  
Zakwalifikowano do druku 09.10.2007 r.

Adres do korespondencji (Reprint request to):  
dr n. med. Małgorzata Mrugacz  
Klinika Okulistyki Dziecięcej  
ul. Waszyngtona 17  
15-274 Białystok