

(43)

# Wpływ monocytów na wczesną aktywację limfocytów T u dzieci z idiopatycznym zapaleniem błony naczyniowej

## The effect of monocytes on early activation of lymphocytes T among children with idiopathic uveitis

**Alina Bakunowicz-Łazarczyk, Tadeusz Moniuszko, Dorota Średzińska-Kita, Małgorzata Mrugacz**

Z Kliniki Okulistyki Dziecięcej Samodzielnego Publicznego Dziecięcego Szpitala Klinicznego Akademii Medycznej w Białymstoku  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Alina Bakunowicz-Łazarczyk

**Summary:** Purpose: We have investigated T Lymphocytes ability for CD69 molecule induction in presence and absence of monocytes in idiopathic uveitis.  
Material and methods: Twenty-five children with idiopathic uveitis were studied. The control group consisted of 12 healthy children. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinised venous blood, by density gradient centrifugation. CD69 expression was cytometrically assessed on freshly isolated and cultured T lymphocytes.  
Results: CD69 expression on freshly isolated peripheral blood T lymphocytes was low in both studied groups. LPS-stimulated monocytes added to cultures of T lymphocytes induced increase in CD69 expression but significantly lower in children with idiopathic uveitis compare to healthy children.

**Słowa kluczowe:** monocyty, CD69, limfocyty T, idiopatyczne zapalenie błony naczyniowej.

**Key words:** monocytes, CD69, T lymphocytes, idiopathic uveitis.

Proces zapalny w błonie naczyniowej przebiega z udziałem limfocytów T (14). Wczesnym markerem aktywacji tych komórek jest cząsteczka CD69 (12). Należy ona do rodziny receptorów zdolnych do transdukcji sygnału, będących produktem kompleksu genów związanych z układem komórek NK. I tak mRNA dla CD69 jest wykrywany już po 30 minutach od stymulacji TCR, a samo białko – po upływie od 2 do 3 godzin (6). Mimo że nie został jeszcze poznany ligand dla tego receptora, to jego występowanie na powierzchni różnych komórek układu immunologicznego świadczy o znaczącej biologicznej roli tego receptora (7). Wiadomo, że bierze on udział w procesach prowadzących do syntezy cytokin innych receptorów oraz w zjawiskach cytotoxyczności (9,10,11).

W poprzedniej naszej pracy dotyczącej markerów aktywacji limfocytów T krwi obwodowej u dzieci z idiopatycznym zapaleniem błony naczyniowej wykazaliśmy wzrost odsetka komórek z obecnością cząsteczek HLA-DR i CD 49a (1). Nie było natomiast różnicy istotnej statystycznie między grupą dzieci chorych i zdrowych w zakresie antygeny CD69. W pracy prezentowanej obecnie oceniamy wpływ monocytów na zdolność indukcji cząsteczki CD69 na limfocytach T krwi obwodowej. W badaniach na zwierzętach supernatanty stymulowanych monocytów zwiększały ekspresję tego receptora, co świadczy o potencjalnym wpływie tych komórek na mechanizmy aktywacji limfocytów T *in vivo* (13).

### Materiał i metoda

Badaniami objęto grupę 25 osób (11 dziewcząt i 14 chłopców) w wieku 7-18 lat z zapaleniem błony naczyniowej, u których nie znaleziono czynnika etiologicznego schorzenia. U 11 osób stwierdzono obustronną postać choroby, u pozostałych postać jednostronną. U 12 pacjentów zapalenie dotyczyło części pośredniej błony naczyniowej, z tego u 5 chorych występował dodatkowo odczyn zapalny ze strony odcinka przedniego błony naczyniowej. U 1 chorego procesem chorobowym zajęty był jedynie przedni odcinek błony naczyniowej, u 12 zaś osób zapalenie dotyczyło tylnego odcinka naczyniówki. Ostrość wzroku oka zajętego procesem zapalnym wynosiła od 5/50 do 5/8. Grupę kontrolną stanowiło 12 zdrowych dzieci z wadami wzroku. U wszystkich pacjentów wykonano badanie okulistyczne uzupełnione badaniami dodatkowymi oraz laboratoryjnymi.

Badania dodatkowe obejmowały:

1. USG gałki ocznej.
2. Komputerowe pole widzenia.
3. Tonometrię.
4. Angiografię fluoresceinową.  
Wachlarz badań laboratoryjnych zawierał:
  1. Morfologię krwi z rozmazem.
  2. OB.
  3. Badanie ogólne moczu.

4. Test lateksowy i odczyn Waalera-Rosego.
5. CRP.
6. ASO.
7. Proteinogram.
8. Przeciwciała p-jądrowe-index, RNP, Scl 70, anty-DNA.
9. Enzym konwertujący angiotensynę.
10. Dopełniacz, seromukoid.
11. Glukozę w surowicy krwi.
12. Immunoglobuliny (E, G, A, M).
13. RTG klatki piersiowej, próbę tuberkulinową.
14. Badania w kierunku toksoplazmozy, toksokarozy, brucelozы, listeriozy, boreliozy, yersiniozy.
15. Badanie na obecność wirusów *Cytomegalii*, *Coxsackie*, *Herpes simplex*, *Herpes zooster*.
16. Badanie kału na jaja pasożytów i cysty lamblii.
17. HLA B27.
18. Cytometrię przepływową.
19. Konsultację stomatologiczną, laryngologiczną, ginekologiczną.

U 12 chorych stwierdzono osady na śródbłonku rogówki, u 6 osób występował wysięk zapalny w komorze przedniej o różnym stopniu nasilenia z tendencją do zrostów tylnych. U 8 osób zaobserwowano początkowe zmętnienie torby tylnej soczewki. U 24 chorych stwierdzono wysięk zapalny w ciele szklistym od drobnopłytkowego do welonowatych mętów zapalnych. U 10 osób występowały zmiany zapalne w okolicy pars plana o niewielkim stopniu nasilenia. U 5 osób występował obrzęk siatkówki w okolicy plamki. U 6 chorych stwierdzono podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe, które opanowano, stosując leczenie miejscowe zachowawcze.

W przypadku żadnego z wyników badań laboratoryjnych nie stwierdzono odchyień od normy.

## Metody

### Ocena morfologii krwi obwodowej

Poszczególne składowe leukogramu oceniano za pomocą analizatora hematologicznego firmy Coulter MAXM. Pobierano 2 ml krwi żyłnej, w której określano leukocytozę ( $\times 10^9/l$ ) oraz liczbę limfocytów i monocytów w wartościach odsetkowych.

### Ocena subpopulacji komórek jednojądrowych krwi obwodowej z użyciem przeciwciał monoklonalnych

Do 100  $\mu l$  pełnej krwi dodawano po 10  $\mu l$  następujących przeciwciał monoklonalnych (Becton-Dickinson): anty-CD14 (PE) /anty-CD45 (FITC), anty-CD3 (FITC) /anty-CD19 (PE), anty-CD4 (FITC) /anty-CD8 (PE), anty-CD3 (FITC) /anty-HLA-DR (PE), anty-CD3 (FITC) /anty-CD16 +anty-CD56 (PE), anty-CD3 (FITC) /anty-CD69 (PE). Do każdego zestawu stosowano odpowiednie kontrole izotypowe. Po 15 min inkubacji w temperaturze pokojowej każdą z próbek poddawano procesowi szybkiej lizy, dodając kolejno kwas mrówkowy, węglan sodowy (stabilizator błon leukocytów) oraz paraformaldehyd (utrwalacz).

### Hodowle limfocytów i limfocytów/monocytów

Frakcję limfocytarno-monocytarną uzyskiwano poprzez wirowanie heparynizowanej krwi żyłnej na gradiencie preparatu Lymphoprep. Komórki z interfazy przemywano dwukrotnie, a następnie liczono i określano żywotność za pomocą błękitu trypanu. Następnie komórki zawieszano do gęstości  $2 \times 10^6/ml$  w płynie Hanksa wzbogaconym L-glutaminą (2 mM), penicyliną 100 j. /ml, streptomycyną 100  $\mu g/ml$  i 10% surowicą cielęcą. Uzyskaną zawiesinę komórkową – w ilości po 4 ml – rozlewano do płytek Petriego o średnicy 60 mm i inkubowano w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. Komórki nieprzylegające do powierzchni płytki (limfocyty) usuwano za pomocą dwukrotnego płukania w 2 ml płynu

	Zdrowe dzieci Healthy children n=12	Dzieci z idiopatycznym zapaleniem błony naczyniowej Children with idiopathic uveitis n=25
Liczba krwinek białych White blood count ( $\times 10^9/l$ ) $\bar{x} \pm SD$	5,74 $\pm$ 1,35	6,18 $\pm$ 1,64
Monocyty (%) / Monocytes	5,96 $\pm$ 1,65	6,64 $\pm$ 2,03
Limfocyty (%) / Lymphocytes	34,18 $\pm$ 5,13	35,47 $\pm$ 6,56
CD3+ (%) limfocyty T T lymphocytes	73,12 $\pm$ 5,29	71,18 $\pm$ 5,61
CD4+ (%) limfocyty T pomocnicze T helper lymphocytes	43,73 $\pm$ 10,27	47,53 $\pm$ 7,32
CD8+ (%) limfocyty T supresorowe T suppressor lymphocytes	22,97 $\pm$ 7,06	22,76 $\pm$ 6,15
CD19+ (%) limfocyty B B lymphocytes	8,17 $\pm$ 3,49	7,83 $\pm$ 4,18
CD3+ -HLA-DR (%) Limfocyty T aktywowane Activated T lymphocytes	5,21 $\pm$ 1,64	8,73 $\pm$ 3,16*
CD3-CD16+CD56+ (%) Komórki NK/NK cells	11,28 $\pm$ 5,19	12,37 $\pm$ 6,44

Tab. I. Charakterystyka składników morfologicznych krwi badanych.

Table I. The characteristic of blood components in studied groups.

\* p < 0.001

	Zdrowe dzieci Healthy children n=12	Idiopatyczne zapalenie błony naczyniowej Idiopathic uveitis n=25	
	(1)	(2)	
pełna krew whole blood	3,47±1,86	4,13±2,03	p <sub>1-2</sub> >0,05
limfocyty (- LPS) lymphocytes (- LPS)	2,96±1,78	3,52±2,19	p <sub>1-2</sub> >0,05
limfocyty (+ LPS) lymphocytes (+ LPS)	3,35±2,31	3,18±1,97	p <sub>1-2</sub> >0,05
monocyty (-LPS) + limfocyty monocytes (-LPS) + lymphocytes	6,73±4,05	7,41±4,64	p <sub>1-2</sub> > 0,05
monocyty (+ LPS) + limfocyty monocytes (+ LPS) + lymphocytes	17,91±6,33	13,38±5,27	p <sub>1-2</sub> < 0,05

Tab. II. Ekspresja cząsteczki CD69 (%) na limfocytach u dzieci z idiopatycznym zapaleniem błony naczyniowej.

Table II. CD69 expression (%) on T cells of children with idiopathic uveitis.

Hanksa. Komórki przylegające do płytek, stanowiące głównie monocyty (ok. 90%), usuwano za pomocą zdrapywacza firmy Sarstedt i płukania w 2 ml płynu Hanksa. Zawiesiny limfocytów odwirowywano i zawieszano do gęstości  $1 \times 10^6/\text{ml}$  w podłożu hodowlanym bez LPS lub z dodatkiem LPS (E. coli-serotyp - 0111: B4 -10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oraz bez monocytów lub z dodaniem tych komórek  $2 \times 10^5$  w objętości 200  $\mu\text{l}$ . Proporcja limfocytów do monocytów wynosiła wtedy 5: 1. Hodowle prowadzono przez 24 godz.

#### Ocena subpopulacji limfocytów CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>

200  $\mu\text{l}$  zawiesiny komórek uzyskanych z hodowli mieszano w plastikowych probówkach wirowniczych w kształcie stożka (5 x 33 mm) w łaźni wodnej z 10  $\mu\text{l}$  przeciwciał monoklonalnych anti-CD3 (FITC) i 10  $\mu\text{l}$  anti-CD69 (PE). W układach kontrolnych stosowano odpowiednie przeciwciała zgodne izotypowo. Po 30 minutach inkubacji w 4<sup>o</sup> C zawiesinę komórek odwirowywano, płukano w PBS i zawieszano w 200  $\mu\text{l}$  PBS z dodatkiem 2% surowicy cielęcej i 0,2% NaN<sup>3</sup>. Jako utrwalacz stosowano paraformaldehyd. Próbkę mieszało automatycznie i analizowano ( $10^4$  komórek) w cytometrze przepływowym Coulter EPICS XL. Wyniki przedstawiono jako wartości odsetkowe. Dokonując analizy statystycznej uzyskanych wyników, posługiwano się testem t-Studenta.

#### Wyniki

Stwierdzono niskie wartości odsetkowe limfocytów T z ekspresją cząsteczki CD69 w analizowanych próbkach krwi u dzieci zdrowych i u dzieci z idiopatycznym zapaleniem błony naczyniowej, nie wykazywały one w obu grupach różnic znamienych statystycznie (tab. I). W obu grupach badanych stwierdzono podobne wartości odsetkowe komórek T z ekspresją cząsteczki CD69 w hodowli limfocytów i monocytów. Dodanie do powyższego układu LPS zwiększyło ekspresję CD69 w obu grupach, wartość zaś odsetkowa komórek T z ekspresją CD69 była znamienne statystycznie niższa w grupie z idiopatycznym zapaleniem błony naczyniowej (tab. II).

#### Omówienie

Wartości odsetkowe limfocytów T z ekspresją cząsteczki CD69 w analizowanych cytometrycznie próbkach pełnej krwi pochodzących zarówno od dzieci zdrowych, jak i od dzieci z idiopatycznym

zapaleniem błony naczyniowej były niskie i nie różniły się między sobą. Kilmartin i wsp. wykazali u osób z zapaleniem tylnego lub środkowego odcinka błony naczyniowej wzrost odsetka limfocytów CD4<sup>+</sup> z ekspresją antygenu CD69 (4). Zjawisko to dotyczyło jedynie przypadków ze znacznym nasileniem procesu chorobowego. Zapalenie błony naczyniowej o lżejszym przebiegu nie wywoływało podobnych zmian. Obserwowane różnice mogą zależeć od stopnia endogennej stymulacji komórek T. Wydaje się, że najlepiej stopień aktywacji limfocytów T dokumentuje analiza puli komórek pochodzących z miejsca zapalenia. Dick i wsp. w idiopatycznym zapaleniu przedniego odcinka błony naczyniowej stwierdzili wzrost odsetka komórek CD4<sup>+</sup> z cząsteczką CD69 i CD25 infiltrujących do ciała szklistego w porównaniu z krwią obwodową (2). W procesie indukcji cząsteczki CD69 mogą brać udział komórki linii monocyt/makrofag. Badania na modelu zwierzęcym wykazały, że stopień ekspresji badanego antygenu aktywacji zależy od proporcji monocytów do limfocytów w warunkach hodowli oraz jedynie od kontaktu sygnałnego między tymi komórkami (3). Na obecnym poziomie badań wydaje się, że kluczową rolę w regulacji syntezy CD69 w przewlekłym zapaleniu spośród czynników pochodzenia monocytarno-makrofagowego odgrywa TNF $\alpha$ . Aktywuje on region promotorowy od końca 5' dla genu kodującego ten antygen aktywacji (5). W naszych badaniach w 24-godzinnych hodowlach limfocytów i monocytów o stałej proporcji wartości odsetkowe komórek T z ekspresją cząsteczki CD69 były podobne w obu grupach badanych dzieci. Dodanie do powyższego układu LPS zwiększało ekspresję CD69 zarówno w grupie dzieci zdrowych, jak i w grupie dzieci z idiopatycznym zapaleniem błony naczyniowej. Jednak wartość odsetkowa w tym drugim przypadku była znamienne statystycznie niższa. Uzyskane dane są trudne do wytłumaczenia.

Obserwowane przez nas w poprzednim badaniu cechy przewlekłej aktywacji limfocytów T mogły sugerować potencjalny wpływ stymulowanych monocytów na wzrost ekspresji cząsteczki CD69 u dzieci z idiopatycznym zapaleniem błony naczyniowej. Z drugiej jednak strony w procesie zapalnym przeciwzapalne cytokiny wytwarzane przez limfocyty pomocnicze redukują prozapalny potencjał komórek linii monocyt/makrofag. Istotną rolę mogłaby w tym zjawisku odgrywać IL-13, której rekombinowana postać redukuje nasile-

nie zmian zapalnych w przebiegu zapalenia błony naczyniowej indukowanej siatkówkowym antygenem S (8). Ocena roli tej cytokiny w omawianym procesie będzie wymagała dalszych badań.

### Wnioski

1. Monocyty odgrywają istotną rolę kostymulacyjną w indukcji cząsteczki CD69 na limfocytach T.

2. Zmniejszona ekspresja CD69 na komórkach T pochodzących od dzieci z idiopatycznym zapaleniem błony naczyniowej może być wynikiem wpływu endogennych czynników supresyjnych.

**PIŚMIENNICTWO:** 1. Bakunowicz-Łazarczyk A., Moniuszko T., Średzińska-Kita D., Mrugacz M.: *Wybrane markery aktywacji limfocytów T krwi obwodowej u dzieci z idiopatycznym zapaleniem błony naczyniowej*. *Klinika Oczna* 2001, 103, 1-3. 2. Dick A. D., Siepmann K., Dees C., Duncan L., Broderick C., Liversidge J., Forrester J. V.: *Fas-Fas ligand-mediated apoptosis within aqueous during idiopathic acute anterior uveitis*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1999, 40, 2258-2267. 3. Gern J. E., Vrtis R., Kelly E. A. B., Dick E. C., Busse W. W.: *Rhinovirus produces nonspecific activation of lymphocytes through a monocyte-dependent mechanism*. *J. Immunol.*, 1996, 157, 1605-1612. 4. Kilmartin D. J., Fletcher Z. J., Almeida J. A., Liversidge J., Forrester J. V., Dick A. D.: *CD69 expression on peripheral CD4+ T cells parallels disease activity and is reduced by mycophenolate mofetil therapy in uveitis*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001, 42, 1285-1292. 5. Lopez-Cabrera M., Munoz E., Blazquez M. V., Ursa M. A., Santis A. G., Sanchez-Madrid: *Transcriptional regulation of the gene encoding the human C-type lectin leucocyte receptor AIM/CD69 and functional characterization of its tumor necrosis factor- $\alpha$*

*responsive elements*. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 21545-21551. 6. Lopez-Cabrera M., Santis A. G., Fernandez-Ruiz E., Blacher R., Esch F., Sanchez-Mateos P., Sanchez-Madrid F.: *Molecular cloning, expression and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors*. *J. Exp. Med.*, 1993, 178, 537-547. 7. Marzio R., Manuel J., Betz-Corradin S.: *CD69 and regulation of the immune function*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 1999, 21, 565-582. 8. Roberge F. G., Smet M. D., Benichou J., Kriete M. F., Raber J., Hakimi J.: *Treatment of uveitis with recombinant human interleukin-13*. *Br. J. Ophthalmol.*, 1998, 82, 1195-1198. 9. Swat W., Dessing M., von Boehmer H., Kisielow P.: *CD69 expression during selection and maturation of CD4+CD8+ thymocytes*. *Eur. J. Immunol.*, 1993, 23, 739-741. 10. Testi R., D'Ambrosio D., De Maria R., Santoni A.: *The receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells*. *Immunol. Today*, 1994, 15, 479-483. 11. Testi R., Cifone M. G., Santoni A.: *Role of CD69 in NO production by human monocytes*. *Res. Immunol.*, 1995, 146, 682-683. 12. Testi R., Philipps J. H., Lanier L. L.: *T cell activation via Leu-23 (CD69)*. *J. Immunol.*, 1989, 143, 1123-1128. 13. Vilanova M., Taveres D., Ferreira P., Oliveira L., Nobrega A., Appelberg R., Arala-Chaves M.: *Role of monocytes in the up-regulation of the early activation marker CD69 on B and T murine lymphocytes induced by microbial mitogens*. *Scand. J. Immunol.*, 1996, 43, 155-163. 14. Xu H., Rizzo L. V., Silver P. B., Caspi R. R.: *Uveitogenicity is associated with a TH-1 like lymphokine profile: cytokine-dependent modulation of early and committed effector T cells in experimental autoimmune uveitis*. *Cell. Immunol.*, 1997, 178, 69-78.

Praca wpłynęła do Redakcji 18.07.2002 r. (82).

Adres do korespondencji (Reprint requests to):  
prof. dr hab. n. med. Alina Bakunowicz-Łazarczyk  
Klinika Okulistyki Dziecięcej SPDSK  
ul. J. Waszyngtona 17  
15-247 Białystok