

(88)

Ocena roli wybranych cytokin w indukowaniu zmian ocznych w przebiegu zespołu suchego oka związanego z zespołem Sjögrena

The evaluation of chosen cytokines in induction of ocular changes in Sjögren's syndrome of dry eye

Nella Żywalewska-Górna, Małgorzata Mrugacz, Alina Bakunowicz-Łazarczyk

Z Kliniki Okulistyki Dziecięcej Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. Alina Bakunowicz-Łazarczyk

Summary:

Purpose: To evaluate the role of pro-inflammatory cytokines interleukin-8 (IL-8) and interferon-gamma (IFN-gamma) in pathogenesis of Sjögren's syndrome of dry eye (SS – dry eye), and in induction of ocular changes in this disease.

Material and methods: Tear samples were collected from 25 patients with Sjögren's syndrome of dry eye and 33 healthy volunteers. Cytokine levels were determined by ELISA. Ophthalmic examinations, including tests for dry eye, were used to study the ocular surface. The levels of these cytokines in tears and dry eye findings were compared.

Results: The tears level of IL-8 and IFN-gamma in SS – dry eye patients were significantly higher than those in controls. We found positive correlation between the tears levels of pro-inflammatory cytokines and dry eye findings (subjective and objective assessments and diagnostic tests).

Conclusions: The elevated level of pro-inflammatory cytokines in tears fluid of patients with Sjögren's syndrome of dry eye may be important factor in the pathogenesis of this disease. Significant correlation between tears level of cytokines and dry eye findings suggest, that these cytokines induce inflammatory changes of ocular surface in Sjögren's syndrome of dry eye.

Słowa kluczowe:

cytokiny, zespół Sjögrena, płyn łzowy.

Key words:

cytokines, Sjögren's syndrome, tear fluid.

Zespół suchego oka jest definiowany jako zaburzenie filmu łzowego, spowodowane niedostatecznym wydzielaniem łez lub ich zwiększonym parowaniem, co skutkuje uszkodzeniem międzypowiekowej powierzchni oka i związanymi z tym objawami dyskomfortu ze strony oczu (1,2). Zespół suchego oka związany z niedostatecznym wydzielaniem łez dzieli się na zespół suchego oka związany z zespołem Sjögrena i zespół suchego oka niezwiązany z zespołem Sjögrena (1).

Etiopatogeneza zespołu suchego oka nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona. Ostatnie badania wskazują, że kluczowym mechanizmem uszkadzającym powierzchnię oka jest proces zapalny o podłożu immunologicznym (3). Przypuszcza się, że szczególną rolę w powstawaniu zmian zapalnych powierzchni oka w przebiegu tego schorzenia odgrywają cytokiny, a ściślej zaburzenie równowagi poziomu cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych w płynie łzowym (4,5,6).

Zespół Sjögrena jest chorobą ogólnoustrojową o podłożu autoimmunologicznym, w której dochodzi do limfocytarnego nacieczenia gruczołów łzowych i/ lub ślinowych, a w rezultacie – do atrofii tych gruczołów (7).

Już w 1965 roku wprowadzono podział zespołu Sjögrena na:

1. Pierwotny zespół Sjögrena, który występuje jako choroba izolowana;

2. Wtórny zespół Sjögrena, który towarzyszy innym chorobom autoimmunologicznym, takim jak: reumatoidalne zapalenie stawów, układowy toczeń rumieniowaty, twardzina układowa, mieszana choroba tkanki łącznej. Częstość występowania zespołu Sjögrena szacuje się średnio na 0,6-4% populacji (8).

Cel pracy

Celem pracy jest ustalenie, czy cytokiny pozapalne, takie jak IL-8 i IFN- γ , odgrywają rolę w etiopatogenezie zespołu suchego oka związanego z zespołem Sjögrena. Dokonano tego, porównując poziom ww. cytokin w łzach pacjentów z zespołem suchego oka i w grupie kontrolnej osób zdrowych. Celem pracy jest również określenie zależności pomiędzy stężeniem tych cytokin w łzach a objawami podmiotowymi i przedmiotowymi oraz parametrami testów diagnostycznych zespołu suchego oka.

Materiał i metodyka

Badaniom poddano 25 pacjentów z zespołem Sjögrena, w tym 5 osób (20%) z pierwotnym zespołem Sjögrena oraz 20 osób (80%) z wtórnym zespołem Sjögrena. W grupie pacjentów z pierwotnym zespołem Sjögrena były 4 kobiety (80%) i 1 mężczyzna (20%). W grupie pacjentów z wtórnym zespołem Sjögrena było 17 kobiet (85%) i 3 mężczyzn (15%). Grupa porównaw-

cza obejmowała 33 osoby zdrowe, w tym 24 kobiety (72%) i 9 mężczyzn (27%).

U każdego pacjenta przeprowadzono dokładne badanie podmiotowe, wykonano badanie przedmiotowe powierzchni oka w biomikroskopie oraz testy diagnostyczne zespołu suchego oka, tzn: test Schirmera, barwienie rogówki i spojówki fluoresceiną i zielenią lizaminy, pomiar czasu przerwania filmu łzowego z użyciem fluoresceiny (fBUT) oraz ocena fałdów spojówkowych w skali LIPCOF.

Na kolejnym etapie badań od każdego pacjenta pobierano płyn łzowy za pomocą szklanych mikropilar, umiejscowionych w kącie zewnętrznym szpary powiekowej, w ilości co najmniej 100-150 μ l. Uzyskane próbki płynu łzowego zamrażano w temperaturze -70 °C, a poziom badanych cytokin oznaczany był metodą immunoenzymatyczną ELISA.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą programu Statistica v. 6. 1.

Wyniki

W łzach pacjentów z zespołem Sjögrena stężenie cytokin prozapalnych (IL-8 i IFN- γ) było znamienne statystycznie wyższe (odpowiednio: IL-8: 1244,5 pg/ml; IFN- γ : 10,8 pg/ml) w porównaniu do stężenia tych cytokin w łzach w grupie kontrolnej (odpowiednio: IL-8: 437,2 pg/ml; IFN- γ : 4,5 pg/ml) (test Wilcoxon, $p < 0,001$).

Wykazano korelacje istotne statystycznie i dodatnie pomiędzy stężeniem IL-8 i IFN- γ w łzach pacjentów z zespołem Sjögrena a stopniem nasilenia uczucia pieczenia oczu, piasku pod powiekami i światłowstrętu (test Spearmana, $p < 0,001$). Nie stwierdzono natomiast takiej zależności z uczuciem suchości oczu.

Ponadto wykazano istotne statystycznie i ujemne korelacje pomiędzy stężeniem cytokin prozapalnych w łzach a wielkością testu Schirmera, testu fBUT oraz korelacje dodatnie z wielkością fałdów spojówkowych i barwieniem rogówki fluoresceiną (test Spearmana, $p < 0,001$). Nie stwierdzono natomiast zależności znamiennej z przekrwieniem brzegu powieki, nieregularnością brzegu powieki i zaczopowaniem gruczołów Meiboma (tabela I).

Dyskusja

Pflugfelder był pierwszym autorem, który zasugerował udział cytokin zapalnych w etiopatogenezie zespołu suchego oka. Stwierdził on, że poziom mRNA kodującego cytokiny prozapalne (IL-1 α , TNF- α , TGF β 1, IL-6 i IL-8) w spojówce chorych z zespołem Sjögrena był wyższy niż u osób zdrowych. Ponadto poziom mRNA IL-1 α i IL-8 był zależny znamienne statystycznie od wielkości testu Schirmera.

Należy podkreślić, że po miejscowej przeciwzapalnej terapii steroidami następował spadek poziomu badanych cytokin, który korelował z poprawą objawów klinicznych *keratoconjunctivitis sicca* (4).

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdziliśmy podwyższony poziom IL-8 i IFN- γ w łzach wszystkich pacjentów z zespołem Sjögrena w odniesieniu do stężenia tych cytokin w łzach osób zdrowych. Wysoki poziom ww. cytokin w łzach świadczy, że są one produkowane miejscowo.

Zwiększona aktywność IL-8, głównie ze względu na jej silne właściwości chemotaktyczne wobec leukocytów wielojądrowych, została wykazana w wielu schorzeniach zapalnych powierzchni oka – zarówno infekcyjnych (bakteryjnych, wirusowych), jak i nieinfekcyjnych (alergicznym) (9). IL-8 jako silna chemokina jest odpowiedzialna za nacieki limfocytarne (w szczególności z limfocytów LT CD+) gruczołów ślinowych w zespole Sjögrena. Dowiodła tego analiza immunohistochemiczna materiału biopsyjnego gruczołów ślinowych mniejszych pobranych od pacjentów z zespołem Sjögrena, która wykazała znaczący wzrost ekspresji na komórkach nabłonka chemokin IL-8, MIP-1 α , 1 β i RANTES (10). Dotychczasowe badania wykazały również udział IFN- γ w zespole Sjögrena. Udowodniono, że w przebiegu tego schorzenia jest on produkowany przez limfocyty T CD 4+, które tworzą nacieki gruczołów łzowych i ślinowych (10). Ponadto stwierdzono, że IFN- γ zwiększa ekspresję zapalnych cząstek adhezyjnych HLA-DR komórek nabłonka ślinianek, spojówki i gruczołu łzowego oraz pośredniczy w procesach patologicznej keratynizacji komórek nabłonka spojówki (11,12,13,14).

	R(IL-8)	P(IL-8)	R(IFN- γ)	P (IFN- γ)
Suchość oczu / Dryness sensation	0,21	0,31	0,35	0,08
Pieczenie oczu / Burning sensation	0,63	0,000	0,63	0,002
Piasek pod powiekami / "Sand" sensation	0,58	0,001	0,58	0,002
Światłowstręt / Photophobia	0,42	0,03	0,42	0,005
Przekrwienie brzegu powieki / Lid margin hyperemia	0,21	0,30	0,19	0,34
Nieregularność brzegu powieki / Lid margin irregularity	-0,01	0,82	-0,02	0,92
Zaczopowanie gruczołów Meiboma / Meibomian glands plugging	-0,02	0,89	0,09	0,64
Test Schirmera / Schirmer test	-0,90	0,000	-0,89	0,000
f BUT	-0,85	0,000	-0,72	0,000
Faldy spojówkowe / Conjunctival folds	0,58	0,005	0,61	0,001

Tab. I. Korelacje pomiędzy stężeniem cytokin prozapalnych w łzach a objawami podmiotowymi, przedmiotowymi i parametrami testów diagnostycznych zespołu suchego oka (test Spearmana, zależności znamienne statystycznie dla $p < 0,001$).

Tab. I. Correlations between tears level of cytokines and subjective, objective assessments and dry eye tests (Spearman test, significant correlations $p < 0,001$).

W przeprowadzonych przez nas badaniach poziom cytokin prozapalnych w łzach korelował wysoce znamienne statystycznie z objawami podmiotowymi oraz z parametrami testów diagnostycznych, będącymi wykładnikiem stopnia uszkodzenia spojówki i rogówki oraz wydzielania łez (test Schirmera, test fBUT, barwienie rogówki fluoresceiną). Nie wykazano natomiast takiej zależności z uczuciem suchości oczu, nieregularnością i przekrwieniem brzegu powieki oraz z zaczerwienieniem gruczołów Meiboma. Wyniki te były analogiczne do uzyskanych przez Solomona, który stwierdził wzrost poziomu prozapalnej formy IL-1 w łzach pacjentów z zespołem suchego oka związanym z zespołem Sjögrena i z MGD (15).

Wnioski

1. Wzrost stężenia cytokin prozapalnych w łzach pacjentów z zespołem suchego oka związanym z zespołem Sjögrena stanowi istotny czynnik etiopatogenetyczny tego schorzenia.
2. Korelacja stężenia badanych cytokin z objawami podmiotowymi i przedmiotowymi oraz z parametrami testów diagnostycznych u pacjentów z zespołem suchego oka związanym z zespołem Sjögrena potwierdza ich udział w powstawaniu zmian zapalnych powierzchni oka w przebiegu tej jednostki chorobowej.

Piśmiennictwo:

1. Lemp MA: *Report of the National Eye Institute /Industry workshop on clinical trials in dry eyes*. CLAO J 1995, 21, 221-232.
2. Pojda SM: *Rozpoznawanie zespołu suchego oka*. Kontaktologia i Optyka Okulistyczna 2001, 2, 71-75.
3. Baudouin C: *The pathology of dry eye*. Surv Ophthalmol 2001, 45, 211-221.
4. Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A: *Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjogren's syndrome keratoconjunctivitis sicca*. Curr Eye Res, 1999, 19, 201-211.
5. Rolando M, Zierhut M: *The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease*. Surv Ophthalmol 2001, 45, 203-210.
6. Pflugfelder SC: *Antiinflammatory therapy for dry eye*. Am J Ophthalmol 2004, 137, 337-342.
7. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos, Alexander E L, Carsons SE, et al: *Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group*. Ann Rheum Dis 2002, 61, 554-558.
8. *Basic and Clinical Science Course: Zapalenia wewnątrzgałkowe i błony naczyniowej*. Wyd Urban & Partner. Wrocław 2005, 45-92.
9. Cook EB, Stahl JL, Lowe L, Chen R, Morgan E, et al: *Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of tears using microparticle-based flow cytometry: allergics vs. non-allergics*. Journal of Immunological Methods 2001, 254, 109-118.
10. Cuello C, Palladinetti P, Tedla N, Di Girolamo N, Lloyd AR, McCluskey PJ, Wakefield D: *Chemokine expression and leucocyte infiltration in Sjogren's syndrome*. Br J Rheumatol 1998, 37, 779-783.
11. Brookes SM, Price EJ, Maini RN: *Interferon-gamma and epithelial cell activation in Sjogren's syndrome*. Br J Rheumatol 1995, 34, 226-231.
12. Hirai N, Kawasaki S, Tanioka H, Connon CJ: *Pathological keratinisation in the conjunctival epithelium of Sjogren's syndrome*. Exp Eye Res 2006, 82, 371-378.
13. Stahl JL, Barney NP: *Ocular allergic disease*. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2004, 4, 455-459.
14. Tsubota K, Fukagawa K, Fujihara T, Schimmura S, Saito K: *Regulation of human leukocyte antigen expression in human conjunctival epithelium*. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999, 40, 28-34.
15. Strong B, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC: *Topical cyclosporine inhibits conjunctival apoptosis in experimental murine keratoconjunctivitis sicca*. Cornea 2005, 24, 80-85.

Praca wpłynęła do Redakcji 20.02.2007 r. (951)
Zakwalifikowano do druku 09.10.2007 r.

Adres do korespondencji (Reprint request to):
lek. med. Nella Żywalewska-Górna
Klinika Okulistyki Dziecięcej Akademii Medycznej
w Białymstoku
ul. Waszyngtona 17
15-274 Białystok