

(68)

# Interferon-gamma w płynie łzowym u pacjentów z mukowiscydozą

## IFN- $\gamma$ in tear fluid in patients with cystic fibrosis

Małgorzata Mrugacz<sup>1</sup>, Beata Żelazowska<sup>2</sup>, Alina Bakunowicz-Łazarczyk<sup>1</sup>,  
Jolanta Wysocka<sup>2</sup>, Alina Minarowska<sup>3</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 Laboratoryjnej Diagnostyki Pediatricznej Akademii Medycznej w Białymstoku

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

<sup>3</sup>Z III Kliniki Chorób Dzieci Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Maciej Kaczmarski

**Summary:** Purpose: To evaluate IFN- $\gamma$  concentration in tear fluid in CF patients.  
Material and methods: Tear samples were collected from 15 CF patients at the age 10-21, and from 15 patients in control group at the age 11-20. Cytokine levels were determined by ELISA.  
Results: The concentration of IFN- $\gamma$  in tear fluid in CF patients was  $10.75 \pm 2.23$  pg/ml, and  $4.06 \pm 0.57$  pg/ml in control group.  
Conclusions: The results of this study indicate that increased concentration of IFN- $\gamma$  in the tear fluid may be an important factor in the pathogenesis of dry eye in CF patients. They also open new perspectives related to therapeutic management.

Słowa kluczowe: zwłóknienie torbielowate, interferon-gamma.

Key words: cystic fibrosis, interferon-gamma.

Mukowiscydoza (zwłóknienie torbielowate – cystic fibrosis) jest najczęściej występującą w populacji rasy białej chorobą wywołaną mutacją pojedynczego genu, o autosomalnym recesywnym typie dziedziczenia. Jest ona nieuleczalna, prowadzi do skrócenia życia chorych. Jej przyczyną są mutacje genu położonego na długim ramieniu 7. chromosomu kodującego białko CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Spełnia ono m. in. funkcję kanału chlorkowego zależnego od cAMP, zlokalizowanego na szczycowej powierzchni komórek nabłonkowych gruczołów wydzielania zewnętrznego (9).

Dysfunkcja CFTR może wpływać na zaburzenia równowagi pro- i przeciwzapalnej. Istotną rolę w rozwoju zapalenia odgrywają cytokiny, które regulują funkcje komórek immunologicznych. Mają również wpływ na ekspresję prekursorów i mediatorów zapalenia przez komórki określonego miejsca w ustroju, co jest niezwykle ważne w lokalnej regulacji zapalenia (10).

Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) odgrywa znaczącą rolę w patogenezie schorzeń zapalnych. Jest wydzielany przez komórki T (cytotokyczne i Th1) i komórki NK, indukując aktywność przeciwwirusową i przeciwaproliferacyjną, stymulację makrofagów oraz kontrolę ekspresji cząsteczek adhezyjnych i receptorów powierzchniowych komórki. Ponadto ma wpływ na ekspresję cytokin i antygenów HLA II klasy (5,6).

**Celem pracy** jest ocena stężenia IFN- $\gamma$  w płynie łzowym u pacjentów z mukowiscydozą.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono u 15 chorych z rozpoznaną mukowiscydozą, którzy byli hospitalizowani w III Klinice Chorób Dzieci AM w Białymstoku. Grupę kontrolną stanowiło 15 osób zdrowych, w tym 8 dziewczynek i 7 chłopców w wieku od 11 do 20 lat, średnia wieku wynosiła  $14,02 \pm 3,05$  roku. W grupie pacjentów z mukowiscydozą było 7 dziewczynek i 8 chłopców w wieku od 10 do 21 lat, średnia wieku wynosiła  $14,75 \pm 3,42$  roku. Z badania wykluczono dzieci z towarzyszącymi schorzeniami dotyczącymi innych narządów. U wszystkich pacjentów z CF stosowano suplementację witaminy A.

W celu oznaczenia stężenia IFN- $\gamma$  w płynie łzowym u wszystkich badanych pobrano łzy za pomocą szklanych kapilar umiejscowionych w kącie zewnętrznym szpary powiekowej (zgoda Komisji Bioetycznej nr R-I-003/32/2003). Łzy uzyskiwano z obojga oczu w ciągu 5-15 minut, a następnie mieszano. Uzyskane próbki płynu łzowego natychmiast zamrażano w temperaturze  $-70$  st. w celu dalszej analizy metodą immunoenzymatyczną ELISA, stosując odpowiedni zestaw diagnostyczny (PIERCE ENDOGEN). W tym celu wykorzystano płytkę (96 dołków) opłaszczoną monoklonalnymi przeciwciałami specyficznymi IFN- $\gamma$ , do której odpipetowano odpowiednią objętość wcześniej przygotowanych standardów oraz próbek płynów łzowych pacjentów. Płytkę inkubowano 2 godziny. Następnie całość płukano roztworem płuczającym i ponownie inkubowano wraz z roztworem koniugatu (Streptavidin). Po ponownym płukaniu do dołków dodano enzym

(TMB), w wyniku czego powstał produkt barwny wprost proporcjonalny do poziomu IFN- $\gamma$  w badanej próbce. Intensywność zabarwienia zmierzono fotometrycznie w czytniku ELISA (ANTHOS), długość fali wynosiła 450 nm. Wszystkie procedury dotyczące czasu inkubacji, rozcieńczeń standardów i liczby płukań płytki zostały wykonane zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu.

Analizy statystycznej, obejmującej porównanie stężenia IFN- $\gamma$  w płynie łzowym u pacjentów z CF ze stężeniem IFN- $\gamma$  w łzach u badanych w grupie kontrolnej, dokonano za pomocą testu nieparametrycznego Wilcoxon (p = 0,05).

### Wyniki

Stężenie IFN- $\gamma$  w płynie łzowym u pacjentów z mukowiscydozą wynosiło od 8,41 do 17,27 pg/ml, średnio  $10,75 \pm 2,23$  pg/ml. U badanych z grupy kontrolnej stężenie IFN- $\gamma$  wahało się między 3,45 a 5,17 pg/ml, średnio wynosiło  $4,06 \pm 0,57$  pg/ml. Stwierdzono różnice znamienne statystycznie między stężeniem IFN- $\gamma$  w płynie łzowym

Liczba pacjentów Number of patients	Stężenie IFN- $\gamma$ u pacjentów z CF (pg/ml) IFN- $\gamma$ in CF patients	Stężenie IFN- $\gamma$ w grupie kontrolnej (pg/ml) IFN- $\gamma$ in control group
15	$10,75 \pm 2,23$	$4,06 \pm 0,57$

Tab. I. Stężenie IFN- $\gamma$  w płynie łzowym pacjentów z CF i w grupie kontrolnej.

Tab. I. IFN- $\gamma$  concentration in tear fluid in CF patients and control group.

wym pacjentów z CF a stężeniem IFN- $\gamma$  w łzach badanych z grupy kontrolnej (p = 0,00065). Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. I.

### Omówienie

W ostatnich latach zwrócono uwagę na udział procesów immunologicznych w mukowiscydozie (7). Wyniki badań *in vitro* i *in vivo* komórek nabłonka dróg oddechowych wskazują na istotny udział reakcji zapalnych w patogenezie tego schorzenia (2,4,7). Brak jest jednak danych na temat roli tych reakcji w występowaniu zmian w narządzie wzroku.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono wyższe stężenie IFN- $\gamma$  w łzach pacjentów z mukowiscydozą w porównaniu z grupą kontrolną. Podwyższony poziom IFN- $\gamma$  wykazano również w przypadku odrzucenia przeszczepu rogówki i w zespole Sjögrena (1,3,8), a wiadomo, że objawy suchego oka mogą stanowić pierwotną manifestację mukowiscydozy. Przeprowadzone badania mogą ułatwić odpowiedź na pytanie, czy zmiany oczne w przebiegu mukowiscydozy mogą być konsekwencją przewlekłego stanu zapalnego, co może okazać się istotne dla wyboru i efektywności leczenia.

### Wnioski

Wyniki naszych badań wskazują, że wyższe stężenie IFN- $\gamma$  w płynie łzowym może stanowić ważny czynnik w patogenezie zespołu suchego oka u pacjentów z mukowiscydozą. Otwierają również nowe perspektywy w postępowaniu terapeutycznym.

### PIŚMIENNICTWO:

1. Azuma M., Motegi K., Aota K., Hayashi Y., Sato M.: *Role of cytokines in the destruction of acinar structure in Sjögren's salivary glands*. Lab. Invest., 1997, 77, 269-280.
2. Berger M.: *Inflammatory mediators in cystic fibrosis lung disease*. Allergy Asthma Proc., 2002, 23, 19-25.
3. Hayashi Y., Haneji N., Hamano H.: *Cytokine gene expression and autoantibody production in Sjögren's syndrome of MRL/lpr mice*. Autoimmunity, 1996, 23, 269-277.
4. Muhlebach M. S., Noah T. L.: *Endotoxin activity and inflammatory markers in the airways of young patients with cystic fibrosis*. Am. J. Respir. Care Med., 2002, 165, 911-915.
5. Munker R., Andreeff M.: *Induction of death (CD95/FAS), activation and adhesion (CD95) molecules on blast cells of acute myelogenous leukemias by TNF-alpha and IFN-gamma*. Cytokines Mol. Ther., 1996, 2, 147-159.
6. Okamoto T., Yamakawa T., Yamamura K., Hino O.: *Induction of Fas ligand and Fas antigen mRNA expressions in interferon-gamma transgenic mouse liver*. Jpn J. Pharmacol., 1998, 78, 233-235.
7. Sagel S. D., Accurso F. J.: *Monitoring inflammation in CF*. Cytokines. Clin. Rev. Allergy Immunol., 2002, 23, 41-57.
8. Sano Y., Osawa H., Sotozono C., Kinoshita S.: *Cytokine expression during orthopic corneal allograft rejection in mice*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1998, 39, 1953-1957.
9. Sun X. C., Bonnano J. A.: *Expression, localization, and functional evaluation of CFTR in bovine corneal epithelial cells*. Am. J. Physiol. Cell, 2002, 282, 673-683.
10. Thakur A., Willcox D. P.: *Cytokine and lipid inflammatory mediator profile of human tears during contact lens associated inflammatory diseases*. Exp. Eye Res., 1998, 67, 9-19.

Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2003-2006 jako projekt badawczy nr 3 P05E 047 25.

Praca wpłynęła do Redakcji 1.03.2004 r. (592).

Zakwalifikowano do druku 19.01.2005 r.

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