

V. Mosby Company, St. Luis Toronto (1984). — 7. *Leite E., Gray J., Mota M. C., Cunha-Vaz J. G.*: Evaluation of quality of cataract surgery. I. Corneal endothelial permeability. Eur. J. Implant. Ref. Surg. 2: 5-8 (1990). — 8. *Low C. H.*: Experience with the diffractive multifocal intraocular lens in Singapore. Asia-Pacific J. Ophthalmol. 3: 20-22 (1991). — 9. *Oshika T., Masuda K.*: Clinical evaluation of hydrogel intraocular lens. Asia-Pacific J. Ophthalmol. 3: 23-27 (1991). — 10. *Pearce J. L.*: The Pearce tripod posterior chamber lenses. w: Rosen E. S., Haining W. M., Arnott E. J.: Intraocular lens implantation, 376-382., The C. V. Mosby Company, St. Luis Toronto (1984).

11. *Rosen R. S.*: Capsular surgery (editorial review). Eur. J. Implant. Ref. Surg. 2: 1-4 (1990). — 12. *Sinskey R. M.*: Posterior chamber lens implantation in extracapsular surgery. w: Rosen E. S., Haining W. M., Arnott E. J.: Intraocular lens implantation,

383-388., The C. V. Mosby Company, St. Luis Toronto (1984). — 13. *Smiddy W. E., Savush M. R., O'Brien T. P., Scott D. R., Huang S. S.*: Implantation of scleral-fixated posterior chamber intraocular lenses. J. Cataract Refract. Surg. 16: 691-695 (1990). — 14. *Świetliczko I., Nawrocki J., Nawrocka Z.*: Wartość witrektomii i lensektomii w leczeniu zaćm wikłających i powikłań urazów. Klin. Oczna 92: 11-12 (1990). — 15. *Thrasher B. H.*: Extracapsular cataract extraction with posterior chamber (Shearing lens implantation technique). w: Rosen E. S., Haining W. M., Arnott E. J.: Intraocular lens implantation, 417-423., The C. V. Mosby Company, St. Luis Toronto (1984). — 16. *Yoshida S.*: Comparison between procedures and postoperative results in cataract surgery. Folia Ophthalmol. Jpn 41: 314-319 (1990).

Praca wpłynęła: 22.11.1993

WARUNKI PRENUMERATY "KLINIKI OCZNEJ"

Cena prenumeraty krajowej na rok 1994 wynosi 400 000 zł, zagranicznej 900 000 zł. Należność za prenumeratę należy wpłacać na czytelnie wypełnionym przekazie na konto:

Redakcja "Kliniki Ocznej"
ul. Kopernika 38, 31-501 Kraków
BPH SA Kraków VI Oddział
Nr 323431-93376-136

Wszelkich dodatkowych informacji dotyczących prenumeraty udziela:

Redakcja "Kliniki Ocznej" tel. 18-84-43
tel./fax 21-42-30

Wydawnictwo "Vesalius" ul. Wiślicko 1, 31-538 Kraków
tel./fax 21-33-87

Marta Misiuk-Hojło

Autoantygeny siatkówkowe

Retinal autoantigens

Hasła: autoagresja siatkówkowa, antygen S, IRBP, rodopsyna

Key words: retinal autoimmunity, antigen S, IRBP, rhodopsin

Etiologia zapaleń błony naczyniowej stanowiła i stanowi nadal jeden z kluczowych problemów badawczych we współczesnej okulistyce. Wiele schorzeń naczyniówki powodowanych jest infekcją bakteryjną, wirusową lub pasożytniczą. Czynniki infekcyjne mogą inicjować stan zapalny poprzez bezpośrednio uszkodzenie struktur gałki ocznej lub, co jest być może ważniejsze, poprzez stymulowanie odczynu immunologicznego przeciwko własnym antygenom oka. Poza tym, czynniki infekcyjne mogą działać jako adjuwanty, ułatwiając odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciw autologicznym antygenom tkankowym.

Te specyficzne antygeny występują tylko w określonej tkance i zazwyczaj dają reakcje krzyżowe z odpowiadającymi im antygenami innych gatunków. Immunizacja pewnych gatunków zwierząt specyficznymi antygenami tkankowymi innych gatunków często wyzwała procesy patogenetyczne w określonych tkankach. Niektóre z tych procesów przypominają zmiany zachodzące w odpowiadających im schorzeniach u ludzi i uważane są za ich modele eksperymentalne.

Specyficzne antygeny w siatkówce wykryli w 1906 r. *Hess* i *Romer*^{1,2}. W 1910 r. *Elsching* przedstawił wyniki swoich badań nad etiologią zapalenia współczulnego wskazując na autoagresję jako patomechanizm tego schorzenia¹¹. Spowodowało to podjęcie wielu prób wywołania eksperymentalnego zapalenia naczyniówki (EZN) poprzez immunizację zwierząt wyciągami z błony naczyniowej³. W 1965 r. *Wacker* i *Lipton* wykazali, że substancje pochodzące z siatkówki o wiele skuteczniej wywołują EZN niż wyciągi z naczyniówki^{3,2}.

Obecnie uważa się, że pięć białek oka może wywoływać zapalenie naczyniówki po podaniu drogą pozajelitową, zmieszane z adjuwantem. Są to: antygen S (AgS), „interphotoreceptor retinoid binding

protein” (IRBP), rodopsyna, transducyna i fosfodiesteraza cyklicznego GMP. Białka te znajdują się prawie wyłącznie w fotoreceptorach siatkówki, a więc w komórkach charakteryzujących się wysokim stopniem zróżnicowania anatomicznego i funkcjonalnego.

Analizy serologiczne odpowiedzi immunologicznych wykonane przez *Weckera* i *Liptona* wkrótce po odkryciu własności immunologicznych siatkówki wykazały, że istnieją dwie frakcje antygenów siatkówkowych. Jedną z nich, rozpuszczalną, nazwaną antygenem S, druga nierozpuszczalną antygenem P^{3,3}. Antygen S uznany został za główny czynnik patogenetyczny, gdyż antygen P (później zidentyfikowany jako rodopsyna) wykazywał minimalne działanie chorobotwórcze^{3,4}. Na początku lat osiemdziesiątych uzyskano jednak wyniki świadczące o tym, że w dużych dawkach również rodopsyna wywołuje EZN.

Antygen S. Wyizolowany został prawie jednocześnie w dwóch laboratoriach: w Europie i w USA w 1975 r.^{10,31} z siatkówki wołu. Wyraźne zmiany patologiczne zaobserwowano w oczach świnek morskich i szczurów już po podaniu niskich dawek antygeny (1 mikrogram)^{2,8}, ale zazwyczaj stosowana jest dawka 30 mikrogramów^{8,26}. Preparaty AgS używane w większości badań uzyskiwane są z siatkówek bydłych lub świnek morskich. Działanie patogenne w warunkach doświadczalnych wywiera również ludzki AgS.

Zdolność indukowania EZN przez AgS zależy od towarzyszących mu adjuwantów. W większości laboratoriów używa się do tego celu adjuwantu *Freunda*, który jest mieszaniną olei mineralnych z *Mycobacterium*^{8,26}. Innym adjuwantem, wykazującym według niektórych autorów jeszcze skuteczniejsze działanie patogenne są bakterie *Bordetella pertussis*. Dodanie ich do adjuwantu *Freunda* przyspiesza wystąpienie objawów chorobowych i zaostża przebieg schorzenia⁸.

Szczególne związki AgS z tkanką nerwową podkreśla wykrycie tego antygeny w szyszynce. U niższych kręgowców odgrywa ona rolę fotoreceptora i zachowuje pewne anatomiczne cechy siatkówki nawet u ssaków. W związku z tym, szyszynka

Z Kliniki Ocznej AM we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. Piotr Hańcysz

Reprint requests to:
Dr med. Marta Misiuk-Hojło
ul. Majakowskiego 16 m. 15, 54-317 Wrocław

u zwierząt immunizowanych antygenem S ulega stanowi zapalnemu¹⁸.

Lokalizacja AgS na poziomie tkankowym określona została metodami immunohistochemicznymi. Wykazały one, że znajduje się on jedynie w warstwie fotoreceptorów, związany z błoną plazmatyczną¹⁶. Badania za pomocą mikroskopu elektronowego wskazały na obecność AgS głównie w zewnętrznych częściach pręcików³⁷, tylko śladowe jego ilości znaleziono w częściach wewnętrznych. Ocenia się, że AgS stanowi 0,5% rozpuszczalnych białek siatkówki i 0,2% szyszynki.

Badania nad fototransdukcją wykazały, że AgS odgrywa tu istotną rolę. Początkowo uważano, iż jest on identyczny z kinazą rodopsyny, ale hipoteza ta została odrzucona ze względu na różnice w ciężarze cząsteczkowym tych dwóch białek³⁰.

Pfister i wsp.²⁷ określili AgS jako białko 48K (lub arystyne) znalezione w 1978 r. przez Kuhna w częściach zewnętrznych pręcików²⁰. Hipotezy te zostały poparte badaniami elektroforetycznymi, immunochemicznymi, funkcjonalnymi i histopatologicznymi (indukcja EZN). AgS odgrywa w fototransdukcji rolę regulacyjną: łączy się z rodopsyną i blokuje aktywację fosfodiesterazy cyklicznego GMP, kontrolując w ten sposób proces jego hydrolizy³⁶. To połączenie zachodzi również in vivo w czasie adaptacji do światła⁵. Jednakże, obecność AgS w całej komórce fotoreceptorowej, w tym również w regionie synaptycznym i w szyszynce nieważliwej na światło sugeruje, że może on odgrywać też inną rolę.

AgS może być wyizolowany z siatkówki metodami chromatograficznymi, izoelektrofokalizacją lub chromatofokalizacją^{4,10,31}. Metodą krótszą jednocelową jest chromatografia z użyciem przeciwciał monoklonalnych¹.

Oczyszczony antygen jest białkiem o ciężarze cząsteczkowym ok. 50000 daltonów składającym się z 404 aminokwasów³¹. Określono skład aminokwasowy bydłczy³¹ i ludzkiego AgS². Zawiera on wysokie stężenie kwasów glutaminowych i asparaginowych i małą ilość metioniny i histydyny. Lipidy i węglowodany występują w ilościach śladowych. Punkt izoelektryczny waha się od pH 5,5 do 5,8³¹.

Obecne badania dotyczące AgS koncentracją w szyszynce na znacznej mierze na próbach ustalenia, które fragmenty peptydowe antygeny stanowią serologicznie i patogenetycznie czynne epitopy. Próby te polegają na izolacji fragmentów peptydowych za pomocą różnych substancji, np. alpha-chymotrypsyny lub CNBr (cyanogen bromide)¹⁵, a następnie otrzymaniu przeciwciał monoklonalnych, które definiują specyficzne epitopy w cząsteczce. W kilku laboratoriach udało się otrzymać przeciwciała monoklonalne przeciwko AgS. Mogą one być użyteczne w poszukiwaniu immunoreaktywności na AgS w normalnej i rozwijającej się siatkówce i szyszynce u wielu kręgowców i bezkręgowców²³, w próbach określania immunoreaktywności na AgS w siatkówczaku i guzach centralnego układu nerwowego^{9,24}, w celu oczysz-

czania AgS¹, wreszcie przy badaniach nad modulowaniem EZN⁷. Przy użyciu syntetycznych peptydów jest obecnie możliwa identyfikacja i charakterystyka siedmiu przeciwciał monoklonalnych przeciwko AgS¹⁰.

Poziom AgS można mierzyć za pomocą specyficznych przeciwciał metodą ELISA³⁸ lub radioimmunologiczną²⁷. Techniki te pozwalają na wykrycie kilku nanogramów antygeny na mililitr. Możliwe, iż krążący AgS jest związany w formie kompleksów immunologicznych i dlatego niekiedy nie udaje się go wykryć.

Mechanizm indukowania EZN przez AgS stanowi szerokie zagadnienie i został opisany przez autorów w poprzednich pracach^{25,26}.

Antygen P i rodopsyna. Wacker i Lipton stwierdzili, że w nierozpuszczalnej frakcji siatkówki znajduje się specyficzny antygen nazwany antygenem P³³. Wytwarza on przeciwciała, ale nie dawał odpowiedzi komórkowej i nie wywoływał EZN u immunizowanych świńek morskich. Sądono wówczas, że antygen P jest rodopsyną lub jej białkowym składnikiem — opsyną. Potwierdziły to późniejsze badania Faure'a¹², który wykazał, że antygen P jest rodopsyną. Udział rodopsyny w procesach immunopatogenetycznych był kontrowersyjny, gdyż wiele jej preparatów używanych do immunizacji nie było czystych i skażenie AgS mogło być odpowiedzialne za aktywność chorobotwórczą. Takie częściowo tylko oczyszczone preparaty rodopsyny powodowały EZN u świńek morskich¹². Jednakże również w wyniku eksperymentów z użyciem oczyszczonej rodopsyny w wysokich dawkach²² uzyskano EZN bez zmian w odcinku przednim oka.

Interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP). Jest glikoproteiną wykrytą przez Wiggerta i wsp. w 1970 r.³⁵, którzy następnie cztery lata poświęcili na jej wyizolowanie i zbadanie. Bydłczy i małpi IRBP ma ciężar cząsteczkowy ok. 140 kDa. Poza siatkówką znaleziono go również w szyszynce wielu kręgowców. W odróżnieniu od AgS, niskie stężenie IRBP odkryto w korze mózgowej³⁵. Występuje on w stosunkowo dużej ilości w przestrzeni pozakomórkowej pomiędzy fotoreceptorami siatkówki. Jego funkcja polega na transporcie retinolu pomiędzy fotoreceptorami i nabłonkiem barwnikowym³⁵. Obecnie bada się strukturę genu IRBP i jego rolę w dziedzicznych dystrofiach siatkówkowych²⁹. Jest on syntetyzowany w fotoreceptorach. EZN indukowane przez IRBP przypomina stan zapalny wywołany przez AgS zarówno pod względem zmian klinicznych jak i histopatologicznych. Jednakże, zauważyć można dwie cechy odmienne. Po pierwsze, przebieg choroby jest krótszy w przypadku EZN indukowanego przez IRBP. Po drugie, u szczerów z EZN wywołany przez AgS nie występowały zmiany zapalne w oponach otaczających szyszynkę, które to zmiany obserwowano u zwierząt z EZN indukowanym przez IRBP. W ostatnich latach IRBP uznano za identyczny z antygenem A, który został odkryty przez Faure'a¹² i określony jako jeden z dwóch głównych antygenów rozpuszczalnych siatkówki (wraz z AgS).

Transducyna. Białko to wzmacnia sygnał świetlny rodopsyny i następującą potem aktywację siatkówkowego cyklicznego GMP fotodiesterazy²¹. Badania nad właściwościami chorobotwórczymi transducyny podjął Chan i wsp.¹⁴. Uzyskali oni EZN po immunizacji szczerów rasy Lewis 40 mikrogramami bydłczej transducyny.

Fosfodiesteraza cyklicznego GMP. Przypuszcza się, że udział w procesach wzrokowych poprzez obniżenie stężenia cyklicznego GMP w cytoplazmie jako odpowiedź na bodziec świetlny²¹. Wykluczono identyczność fotodiesterazy z AgS. Badania Faure'a w wsp. wykazały, że odpowiednio czyste preparaty fosfodiesterazy wywołują EZN.

Istnieje prawdopodobieństwo, że poza wymienionymi autoantygenu siatkówkowymi również inne białka siatkówki mogą wywoływać odpowiedź autoimmunologiczną. Stosunkowo nową metodą pozwalającą na ich identyfikację jest immunotransfer (Western blot). Pozwala ona, po oddzieleniu elektroforetycznym, na znalezienie antygenów rozpoznawanych przez przeciwciała pacjenta. Po oczyszczeniu tych antygenów można byłoby zastosować je w rozmaitych testach, szczególnie w testach odporności komórkowej. Dzięki temu istnieje możliwość wykrycia nowych antygenów odpowiedzialnych za zapalenie siatkówkowo-naczyniówkowe lub retinopatie degeneracyjne.

Piśmiennictwo

- Banga J. P., Suleyman S., Kasp E., Brown E.: Immunoaffinity purification of retinal S-antigen using monoclonal antibodies directed to different antigenic sites. *Invest. Ophthalmol. Sci.* 28: 604-607 (1987). — 2. Beneski D. A., Donoso L. A., Edelberg K. E., Magargal L. E., Folberg R., Merryman C.: Human retinal S-antigen: Isolation, purification and characterization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25: 686-690 (1984). — 3. Bloch-Michel E.: Auto-immunité à l'uvée. W: Campinchi R., Faure J. P., Bloch-Michel E., Haut J.: L'Uvée, phénomènes immunologiques et allergiques. *Rapport de la Soc. Fr. Ophthalmol.* 184-239 Masson, Paris, (1970). — 4. Borthwick G. M., Forrester J. V.: Purification of retinal S-antigen by ion-exchange chromatography and chromatofocusing. *Exp. Eye Res.* 37: 613-625 (1983). — 5. Broekhuysse R. M., Janssen A. P., Tolluizen E. F.: Effect of light-adaptation on the binding of 48 kDa protein (S-antigen) to photoreceptor cell membranes. *Curr. Eye Res.* 6: 607-610 (1987). — 6. Broekhuysse R. M., Winkers H. J., Kuhlmann E. D., Van Vugt A. H. M.: Opsin-induced experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Curr. Eye Res.* 3: 1405-1412 (1984). — 7. De Kozak Y., Mirshahi M., Boucheix C., Faure J. P.: Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by active immunization with autoantigen-specific monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 17: 541-547 (1987). — 8. De Kozak Y., Sakai J., Thillaye B., Faure J. P.: S-antigen-induced experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Curr. Eye Res.* 1: 327-337 (1981). — 9. Donoso L. A., Hann H., Dietschold B., Merryman C. F.: Rhodopsin and retinoblastoma. *Arch. Ophthalmol.* 104: 111-113 (1986). — 10. Dorey C., Faure J. P.: Isolement et caractérisation partielle d'un antygen retinien responsable de l'uvéorétinite auto-immune expérimentale. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 128: 229-232 (1977).
- Elschnig A.: Studien zur sympathischem Ophthalmia. *Graefes Arch. Ophthalmol.* 76: 509-546 (1910). — 12. Faure J. P.: Autoimmunity and the retina. *Curr. Top. Eye Res.* 2: 215-302 (1980). — 13. Faure J. P., De Kozak Y., Dorey C., Tuyen V. V.: Activité de différentes préparations antigéniques de la rétine dans l'induction de l'uvéorétinite auto-immune expérimentale chez le cobaye. *Arch. Ophthalmol. (Paris)* 37: 47-60 (1977). — 14. Gery J.,

- Mochizuki M., Nussenblatt R. B.: Retinal specific antigens and immunopathogenic process they provoke. *Progr. Retinal. Res.* 5: 75-109 (1986). — 15. Gregerson D. S., Putterman G. J.: Preparation, isolation and immunochemical studies of the cyanogen bromide peptides from a retinal photoreceptor cell autoantigen, S-antigen. *J. Immunol.* 133: 843-848 (1984). — 16. Kaslow C. M., Wacker W. B.: Localization of a uveitogenic soluble retinal antigen in the normal guinea pig eye by an indirect fluorescent antibody technique. *Int. Arch. Allergy* 44: 11-20 (1973). — 17. Kaslow C. M., Wacker W. B.: Pinal reactivity of anti-retina sera. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16: 181-184 (1977). — 18. Kaslow C. M., Wacker W. B.: Pinal gland in S-antigen induced experimental autoimmune uveitis. W: O'Brien P. J., Klein D. C.: Pinal and Retinal Relationships. Academic Press, Orlando, 315-329 (1985). — 19. Knospe V., Donoso L. A., Banga J. P., Damms T.: Epitope mapping of bovine retinal S-antigen with monoclonal antibodies. *Curr. Eye Res.* 7: 1137-1147 (1988). — 20. Kuhn H.: Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes. *Biochemistry* 17: 4389-4395 (1978).
- Kuhn H., Hall S. W., Wilden U.: Light-induced binding of 48 kDa-protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. *FEBS Lett.* 176: 437-478 (1984). — 22. Marak G. E. Jr., Shichi H., Rao N. A., Wacker W. B.: Patterns of experimental allergic uveitis induced by rhodopsin and retinal outer segments. *Ophthalmic Res.* 12: 165-176 (1980). — 23. Mirshahi M., Boucheix C., Colletot G., Thillaye B., Faure J. P.: Retinal S-antigen epitopes in vertebrate and invertebrate photoreceptors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26: 1016-1021 (1985). — 24. Mirshahi M., Boucheix C., Dherym P., Faure J. P.: Expression of the photoreceptor specific S-antigen in human retinoblastoma. *Cancer* 57: 1497-1500 (1986). — 25. Misiuk-Hojto M.: Zapalenia naczyńnikowo-siatkówkowe: formy kliniczne a modele doświadczalne. *Klin. Oczna (w druku)*. — 26. Misiuk-Hojto M., Ruiz-Moreno J., Thillaye B., De Kozak Y.: Eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie naczyńnikowo-siatkówki wywołane immunizacją antygenem S. *Klin. Oczna* 95: 105-108 (1993). — 27. Pfister C., Chabre M., Plouet J., Tuyen V. V., De Kozak Y., Faure J. P., Kuhn H.: Retinal S-antigen identified as the 48 K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. *Science* 228: 891-893 (1985). — 28. Roa N. A., Wacker W. B., Marak G. E. Jr.: Experimental allergic uveitis. Clinicopathologic features with varying doses of S-antigen. *Arch. Ophthalmol.* 97: 1954-1958 (1979). — 29. Références sur la biologie moléculaire de l'IRBP. *Proc. ARVO Meeting, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28 Suppl. 17, 18, 251, 252 (1987). — 30. Shichi H.: Possible identity of experimental uveitogenic antigen (S-antigen) with rodopsin kinase. *Jpn. J. Ophthalmol.* 25: 306-311 (1981).
 - Wacker W. B., Donoso L. A., Kaslow C. M., Yankeelov J. A. Jr., Organisciak D. T.: Experimental allergic uveitis: Isolation, characterization and localization of a soluble uveitogenic antigen from bovine retina. *J. Immunol.* 119: 1949-1958 (1977). — 32. Wacker W. B., Lipton M. M.: Experimental allergic uveitis. *Nature* 206: 252-254 (1965). — 33. Wacker W. B., Lipton M. M.: Experimental allergic uveitis. I. Production in the guinea-pig and rabbit by immunization with retina in adjuvant. *J. Immunol.* 101: 151-156 (1968). — 34. Wacker W. B., Lipton M. M.: The role of two retina antigens in production of experimental allergic uveitis and its suppression by mycobacteria. *Int. Arch. Allergy* 41: 370-380 (1971). — 35. Wiggert B., Chader G. J.: Monkey interphotoreceptor retinal binding protein (IRBP): isolation, characterization and synthesis. W: Bridges C. D., Adler A. J. The Interphotoreceptor Matrix in Health and Disease, Alan R. Liss, New York, 89-110 (1985). — 36. Wilden U., Hall S. W., Kuhn H.: Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.* 83: 1174-1178 (1986). — 37. Yajima S., Seki F., Takano S., Usui M.: Localization of S-antigen by enzyme-labeled antibody method and electron microscopy. *Jpn. J. Ophthalmol.* 27: 526-534 (1983). — 38. Zaal J., Doekes G., Breebaant A. C., Kijlstra A.: Quantitative determination of S-antigen in human ocular tissues, aqueous humor and serum. *Curr. Eye Res.* 5: 736-774 (1986).