

Marta Misiuk-Hojło, Jose Ruiz-Moreno, Brigitte Thillaye i Yvonne de Kozak
Eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie naczyń i siatkówki wywołane immunizacją antygenem S

Experimental autoimmune uveoretinitis induced by S-antigen immunization

Summary. Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) was induced in Lewis rats by a single injection in foot pads of S-antigen in complete Freund's adjuvant. Clinically, during the 2nd week after immunization, EAU starts by acute anterior, lately — posterior uveitis. Peptide S2, located in the N-terminal region of S-antigen, has a regulatory effect on EAU, while peptide M is a pathogenic site inducing EAU. Antibodies directed at peptide S2 were observed in rats not developing EAU while high levels of antibodies directed at S-antigen and peptide M were present in all rats.

Hasła: doświadczalne zapalenie naczyń i siatkówki, antygen S

Key words: experimental choroiditis, antigen S

Wstrzyknięcie w tylne łapy świnki morskiej, królika, małpy czy szczura ekstraktu z siatkówki z dodatkiem adjuwantu *Freunda*, może spowodować stan zapalny siatkówki i naczyń i siatkówki (eksperymentalne zapalenie naczyń i siatkówki — EZN). Doświadczenie to, wykonane po raz pierwszy przez *Wackera* i *Liptona*^{1,2}, zapoczątkowało liczne prace badawcze wykazujące wartość EZN jako modelu choroby autoimmunologicznej i prawdopodobną rolę autoagresji siatkówkowej w zapaleniach siatkówki i naczyń i siatkówki u człowieka⁷⁻⁹.

Najbardziej znanym antygenem stosowanym do uzyskania EZN oraz testów autoagresji siatkówkowej u ludzi jest antygen S (Ag-S), białko rozpuszczalne oczyszczone w 1975 r.^{1,5,6}. U szczurów i małp wywołano również EZN za pomocą białka IRBP (interphotoreceptor binding protein) oraz rodopsyny⁹. Antygen S, inaczej arrestyna, znana jest również ze swej funkcji regulacyjnej w fototransdukcji¹⁰, występuje też w innych narządach między innymi w przysadce mózgowej^{2,11}. Przeciwciała monoklonalne^{3,8} używane są do analizy epitopów antygeny S i identyfikacji tych spośród nich, które są odpowiedzialne za jego efekty chorobotwórcze.

Wykazano, że krótkie sekwencje aminokwasów antygeny S zlokalizowane w jego C-końcowym od-


cinku (peptydy 286-297, 304-314, 339-352 i 352-364) są patogenne, wywołujące EZN. Natomiast sekwencja aminokwasów 40-50 antygeny S występująca w jego N-końcowym odcinku (peptyd S2) ma regulacyjne działanie na EZN⁴.

Obecna praca ma na celu: 1. Opis klinicznych i histopatologicznych cech EZN wywołanych przez antygen S (złożony z 404 aminokwasów) oraz przez krótki syntetyczny peptyd 35 (złożony z 19 aminokwasów). 2. Analizę zachowania się poziomu przeciwciał na podanie antygeny S, peptydów chorobotwórczych: peptydu 35 (aminokwas 337-356) i peptydu M (aminokwas 303-320) oraz peptydu regulacyjnego S2 (aminokwas 40-50).

Material i metodyka

EZN wywołane było u szczurów poprzez jednokrotne wstrzyknięcie w tylne łapy 30 µg bydlęcego antygeny S lub 5 µg peptydu 35 z dodatkiem adjuwantu *Freunda*. Do doświadczeń używano szczurów płci męskiej rasy Lewis w wieku 8-12 tygodni.

Antygen S izolowany był z siatkówek bydlęcych i oczyszczony przez filtrację żelową, a następnie poddawany chromatografii hydroksypatytowej. Do chwili użycia przechowywany był w temperaturze -80°C. Przeciwciała oznaczone były immunoenzymatycznym testem ELISA. Surowice do oznaczeń otrzymano z próbek krwi pobranych przez punkcję kardialną. Do badań histopatologicznych enukleowane oczy utrwalane były w roztworze *Bouina*, zalewane parafiną, a wycinki barwione hematoksyliną — eozyną. Zwierzęta obserwowano co 2 dni w biomikroskopie począwszy od 10 dnia po immunizacji.

 **COHERENT. LASERY YAGOWE I ARGONOWE**

25 lat pracy
spowodowało,
że
nie mamy
sobie równych

ul. Królowej Jadwigi 37b/7
30-209 Kraków
Poland

tel.: (0-12) 21-58-10
21-63-91

fax: (0-12) 21-71-46

tlx: 0326286 Vamp PL

**C.X. CONSULTRONIX
LASERS**

Sp. z o.o.

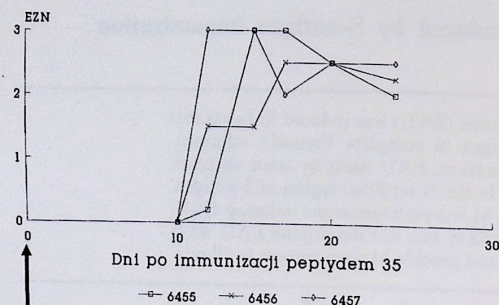
Z Laboratorium Immunopatologii Oka, INSERM U 86 w Paryżu
Kierownik: dr Jean-Pierre Faure
Z Kliniki Okulistycznej AM we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. Piotr Hańczyk

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

Wyniki

Peptyd 35 wywołał u 3 szczurów zapalenie naczyńki rozpoczynające się 10 dnia po wstrzyknięciu, osiągając największe nasilenie między 12 a 14 dniem, następnie zauważono wyraźną tendencję do jego wygasania (ryc. 1).

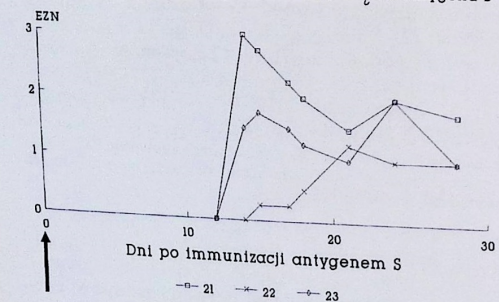
Stan zapalny naczyńki obserwowany w lampie szczelinowej po jednokrotnym wstrzyknięciu peptydu S2



Ryc. 1. Zapalenie naczyńki wywołane u szczurów po wstrzyknięciu peptydu P 35.

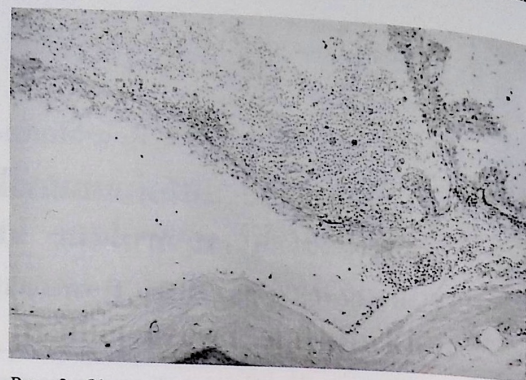
U zwierząt immunizowanych 30 µg antygenem S powstawało EZN o różnym nasileniu. Należy zauważyć, że u 1 szczura stan zapalny rozpoczął się późno i charakteryzował się słabym nasileniem (ryc. 2).

Stan zapalny naczyńki obserwowany w lampie szczelinowej po jednokrotnym wstrzyknięciu antygenem S

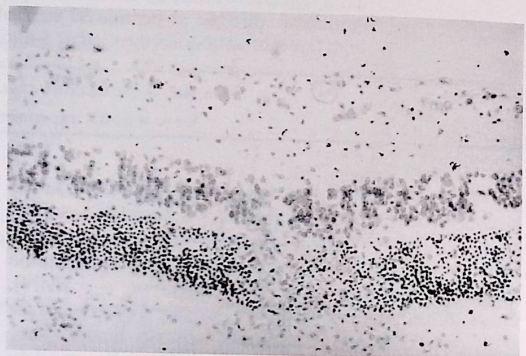


Ryc. 2. Zapalenie naczyńki wywołane immunizacją szczurów antygenem S.

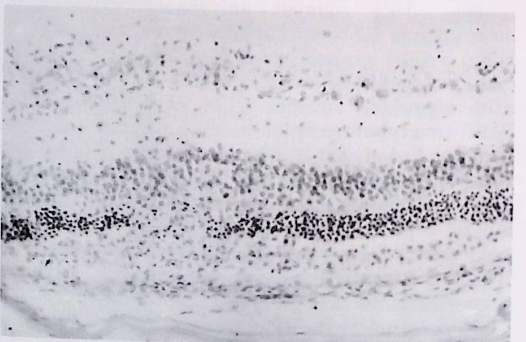
Histopatologiczne aspekty EZN były identyczne u szczurów po podaniu antygenem S i peptydu 35. W pierwszym dniu stanu zapalnego indukowanego antygenem S obserwowano zapalenie przedniego odcinka naczyńki z naciekami tęczówki, ciała rzęskowego i komory przedniej komórkami wielojądrazastymi (ryc. 3). Jednocześnie w siatkówce widoczne były obszary obrzęku i komórki zapalne w 3 warstwach jądrazastych. Towarzyszyła temu infiltracja komórek wzrokowych komórkami jedno i wielojądrazastymi ze złoami fibryny wokół małych naczyń (ryc. 4).



Ryc. 3. Obraz uzyskany w pierwszym dniu stanu zapalnego indukowanego antygenem S: zapalenie przedniego odcinka naczyńki z naciekami tęczówki, ciała rzęskowego i komory przedniej komórkami wielojądrazastymi.



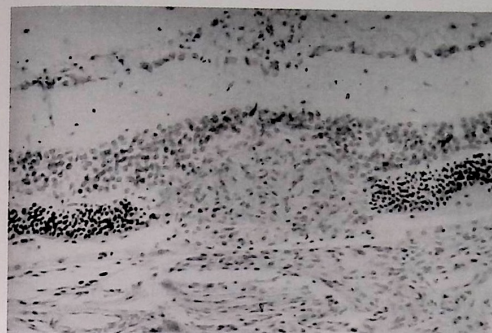
Ryc. 4. Obraz uzyskany w początkowym okresie stanu zapalnego indukowanego antygenem S: widoczne obszary obrzęku w siatkówce i komórki zapalne w 3 warstwach jądrazastych.



Ryc. 5. Obraz uzyskany w 3 dni po wstrzyknięciu peptydu P35: widoczne komórki zapalne wokół naczyń włosowatych siatkówki i destrukcja zewnętrznych fragmentów komórek wzrokowych.

W trzy dni po wstrzyknięciu peptydu 35 obserwowano komórki zapalne wokół naczyń włosowatych siatkówki i destrukcję zewnętrznych fragmentów komórek wzrokowych nacieczonych komórkami zapalnymi (ryc. 5). Widoczne były guzki *Dalen-Fuscha*

z komórkami nabłonkowatymi opisywane w zapaleniu współczulnym (ryc. 6). 10 dni po immunizacji peptydem 35 siatkówka była nadal nacieczona komórkami zapalnymi, komórki wzrokowe i część warstwy komórek dwubiegunowych zostały zniszczone (ryc. 7).



Ryc. 6. Guzki Dalen-Fuscha z komórkami nabłonkowatymi.

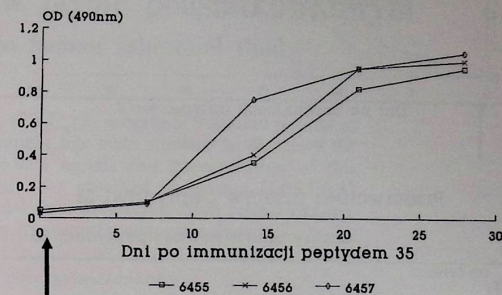


Ryc. 7. Obraz uzyskany w 10 dni po immunizacji peptydem P35: siatkówka nadal nacieczona komórkami zapalnymi, komórki wzrokowe i część warstwy komórek dwubiegunowych uległy zniszczeniu.

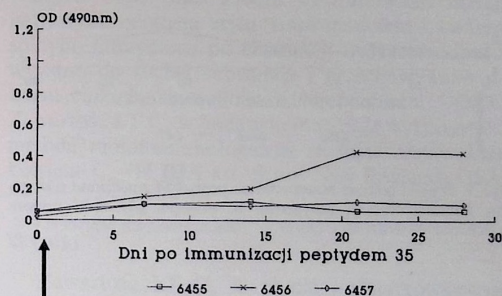
Poziom przeciwciał oznaczono w kolejnych próbkach surowic pobieranych kolejno co 7 dni od dnia immunizacji peptydem 35. Każda krzywa przedstawia ewolucję poziomu przeciwciał u poszczególnych szczurów. Okazuje się, że u szczurów immunizowanych przeciw peptydowi 35 stwierdza się wysoki poziom przeciwciał na peptyd 35 i niski poziom przeciwciał na S-Ag (ryc. 8). Przeciwnie, szczury immunizowane antygenem S wykazują wysoki poziom przeciwciał na S-Ag i niski poziom przeciwciał na peptyd 35. Wysoki poziom przeciwciał na peptyd M znaleziono u szczurów immunizowanych antygenem S, podczas gdy niski poziom przeciwciał stwierdzono u szczurów immunizowanych peptydem 35 (ryc. 9). Poziom przeciwciał na S-Ag, peptyd M i peptyd 35 nie był zależny od wystąpienia choroby. Zarówno u szczurów z objawami EZN jak i u zwierząt bez tych objawów, występował podobny poziom przeciwciał na S-Ag, peptyd M i peptyd 35.

Najważniejsza była odpowiedź na peptyd S2. Okazało się, że wyższy poziom przeciwciał na peptyd S2 wykryto u szczura, u którego rozwinęło się EZN i opóźnionym początku i słabym nasileniu w porównaniu z innymi zwierzętami (ryc. 10).

Szczury immunizowane peptydem 35 przeciwciała przeciw peptydowi 35



Szczury immunizowane peptydem 35 przeciwciała przeciw antygenowi S



Ryc. 8. Poziom przeciwciał oznaczony w kolejnych próbkach surowic pobieranych co 7 dni od dnia immunizacji peptydem P35. Każda krzywa przedstawia ewolucję poziomu przeciwciał u poszczególnych szczurów.

Wnioski

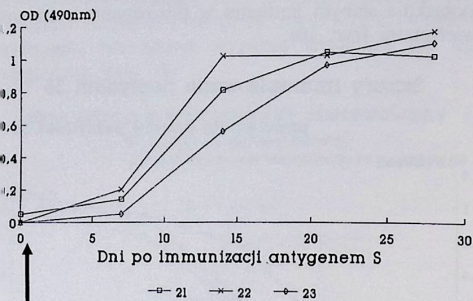
1. Poziom przeciwciał na antygen S, peptyd M i peptyd 35 jest uzależniony od antygeny użytego do immunizacji, natomiast nie wykazuje związku z rozwojem EZN.

2. Poziom przeciwciał na peptyd S2 jest związany z EZN o słabym nasileniu.

3. Ten eksperymentalny model, analogiczny do zapalenia naczyńki i siatkówki u człowieka, stanowi cenny warsztat badawczy umożliwiający lepsze zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie reakcji autoimmunologicznych skierowanych przeciwko komórkom wzrokowym. Pozwała ona na prowadzenie eksperymentalnych prób modulacji schorzenia przez niektóre syntetyczne peptydy antygeny S.

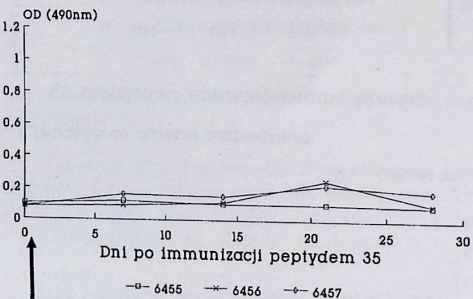
Przeciwciała przeciw peptydowi M

Szczury immunizowane antygenem S



Przeciwciała przeciw peptydowi M

Szczury immunizowane peptydem 35



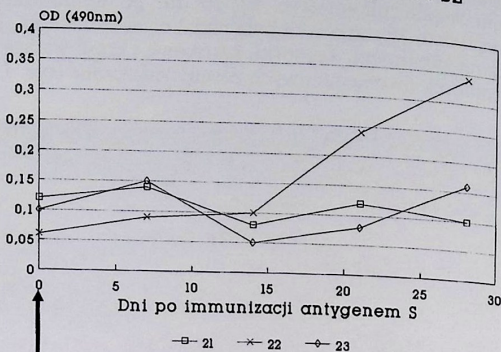
Ryc. 9. Wysoki poziom przeciwciał na peptyd M znaleziono u szczurów immunizowanych antygenem S, podczas gdy niski poziom przeciwciał stwierdzono u szczurów immunizowanych peptydem P35.

Piśmiennictwo

1. Borthwick G. M., Forrester J. V.: Purification of Retinal S-Antigen by Ion-Exchange Chromatography and Chromatofocusing. *Exp. Eye Res* 37: 613-625 (1983). — 2. Collin J. P., Mirshahi M., Brisson P.: Pineal-retinal molecular relationships. *Neuroscience* 19: 657-666 (1986). — 3. De Kozak Y., Mirshahi M., Boucheix

M. Misiuk-Hojlo, J. Ruiz-Moreno i inni

Przeciwciała przeciw peptydowi S2



Ryc. 10. Wyższy poziom przeciwciał na peptyd S2 wykryto u szczura, u którego rozwinęło się zapalenie naczyniówki o opóźnionym początku i słabym nasileniu.

C., Faure J. P.: Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis in rats by S-antigen specific monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 15: 1107-1111 (1985). — 4. Donoso L. A., Yamaki K., Merryman C. F.: Human S-antigen: characterization of uveitopathogenic sites. *Curr. Eye Res.* 7: 1077-1085 (1988). — 5. Dorey C., Cozette J., Faure J. P.: A Simple and Rapid Method for Isolation of Retinal S Antigen. *Ophthalmic Res.* 14: 249-255 (1982). — 6. Dorey C., Faure J. P.: Isolement et caractérisation partielle d'un antigène rétinien responsable de l'uvéïte-rétinite auto-immune expérimentale. *Ann. Immunol. (Paris)* 128 c: 229-232 (1977). — 7. Faure J. P.: Autoimmunity and the retina. *Curr. Top. Eye Res.* 2: 215-302 (1980). — 8. Faure J. P., Mirshahi M., Dorey C., Thillaye B., De Kozak Y.: Production and specificity of monoclonal antibodies to retinal S-antigen. *Curr. Eye Res.* 3: 867-872 (1984). — 9. Gery J., Mochizuki, Nussenblatt R. B.: Retinal Specific Antigens and Immunopathogenic Processes The Provoke. *Progress in Retinal Research* 5: 75-109 (1986). — 10. Pfister C., Chabre M., Plouet J.: Retinal S-antigen identified as the 48 K protein regulation light-dependent phosphodiesterase in rods. *Science* 228: 891-893 (1985).

11. Rodriguez M. M., Hackett J., Gaskins R.: Interphotoreceptor retinoid-binding protein in retinal rod cells and pineal gland. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* 27: 844-850 (1986). — 12. Wacker W. B., Donoso L. A., Kalsow C. M.: Experimental allergic uveitis. *J. Immunol.* 119: 1949-1988 (1977)

Praca wpłynęła: 11.06.1992.

Jolanta Andrzejewska-Buczko, Andrzej Stankiewicz i Włodzimierz Buczko

Zawartość leukotrienu C₄ w płynie podsiatkówkowymLeucotriene C₄ content in human subretinal fluid

Summary. Concentration of leucotriene C₄ (LT C₄) in subretinal fluid and plasma of 12 patients with idiopathic retinal detachment has been studied. In 10 cases the subretinal fluid contained LT C₄ (0.34±0.24 ng/ml) and concentration of this substance was about 10 times lower than that observed in plasma (4.05±0.83 ng/ml). The presence of LT C₄ in subretinal fluid may result from retinal damage and it can be considered as an important prognostic factor.

Hasła: leukotrien C₄, płyn podsiatkówkowy

Key words: leucotriene C₄, subretinal fluid

Pomimo licznych i intensywnych badań etiopatogeneza odwarstwień siatkówki pozostaje nadal niejasna. Według Starzyckiej⁹ obecność wolnych kwasów tłuszczowych w płynie podsiatkówkowym może być wynikiem uszkodzenia siatkówki stanowiąc tym samym wskaźnik prognostyczny.

Liczne dane z piśmiennictwa wskazują na udział prostaglandyn w przebiegu stanów zapalnych spojówki, rogówki, tęczęwki i naczyniówki^{3,4,7,8}.

Williams i wsp.¹⁰ oraz wyniki badań naszej Kliniki wskazują na obecność tromboksanu B₂ i prostacykliny — produktów działania cyklooksygenazy na kwas arachidonowy — w płynie podsiatkówkowym u ludzi.

Biorąc powyższe pod uwagę celem pracy było zbadanie zachowania leukotrienu C₄ (LT C₄) — aktywnego produktu powstającego w wyniku działania lipooksygenazy na kwas arachidonowy⁶.

Materiał i metodyka

Badaniem objęto 12 pacjentów z odwarstwieniem siatkówki, w wieku od 14 do 70 lat (średni wiek 42 lata). Wszyscy chorzy byli leczeni operacyjnie. Płyn podsiatkówkowy pobierano śródoperacyjnie na 0.01 mM (5 μl/ml) kwas nordihydroguajaretowy (NDGA). Krew z żyły łokciowej pobierano do plastikowych probówek umieszczonych w lodzie zawierających

0.05 M EDTA (95 μl/ml krwi) oraz 0.01 mM kwas NDGA. Płyn oraz osocza ekstrahowano eterem naftowym, octanem etylu, isopropanolem i kwasem solnym. Otrzymane po ekstrakcji nadsącze odparowywano do suchej substancji i przechowywano do czasu badania zamrożone w temperaturze -20°C. Zawartość LT C₄ w badanym materiale wykonywano metodą radioimmunologiczną stosując zestaw Leucotriene C₄ ³H RIA kit, firmy New England, USA.

Wyniki

Zawartość LT C₄ w płynie podsiatkówkowym i osoczu przedstawia tabela I.

Tabela I

Zawartość leukotrienu C₄ (ng/ml) w płynie podsiatkówkowym i osoczu u ludzi

Pacjenci	Płyn podsiatkówkowy	Osocze
1. B.G.	0.2	2.9
2. S.A.	0.6	3.3
3. K.M.	0.3	5.4
4. G.W.	0.63	4.5
5. D.M.	0.34	4.7
6. Sz.G.	0.4	3.2
7. H.S.	0	3.8
8. W.Cz.	0.66	4.4
9. M.A.	0.1	3.8
10. B.D.	0.2	3.1
11. Ch.N.	0	5.5
12. B.J.	0.63	4.0
	0.34±0.24	4.05±0.83

Z Kliniki Okulistycznej AM w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. Andrzej Stankiewicz
Z Zakładu Farmakodynamiki AM w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. Włodzimierz Buczko

Reprint requests to:
Dr Jolanta Andrzejewska-Buczko,
ul. Akademicka 6 m. 18, Białystok