

(10)

Typy przeciwciał przeciwsiatkówkowych (PPS) u chorych na samoistne zapalenie tylnego odcinka błony naczyniowej w teście immunofluorescencji pośredniej

Types of antiretinal antibodies (ARA) in patients with endogenous posterior uveitis in indirect immunofluorescence test

Agnieszka Kubicka-Trząska

Z Katedry i Kliniki Okulistyki Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Maria Starzycka

Summary: Purpose: To determine the types of antiretinal antibodies (ARA) in patients with endogenous posterior uveitis in active stage of the disease using indirect immunofluorescence test.
Material and methods: 50 patients - 29 women (58%) and 21 men (42%) in age 19-70 years with idiopathic posterior uveitis were examined. In all cases the ARA were determined by indirect immunofluorescence test on normal monkey retina, as a substrate and FITC-labelled goat's anti-human IgA, G, M serum (Euroimmun-Germany). The control serum was obtained from 50 blood donors: 20 women (40%) and 30 men (60%) in age 20-64 years.
Results: Indirect immunofluorescence test showed the reaction with the outer retinal segments in 97,5% of cases. In 9 patients (22,5%) with positive serum antinuclear antibodies (ANA), the additive reaction with the nuclei of both nuclear layers of retina was present. In one subject (2,5%), the diffuse fluorescence of all layers of retina was detected.
Conclusion: The most common type of ARA in patients with endogenous posterior uveitis were antibodies against the outer layers of retina, cytoplasm of photoreceptors and cells of outer nuclear layer.

Słowa kluczowe: przeciwciała przeciwsiatkówkowe, immunofluorescencja pośrednia, samoistne zapalenie błony naczyniowej.
Key words: antiretinal antibodies, indirect immunofluorescence, endogenous uveitis.

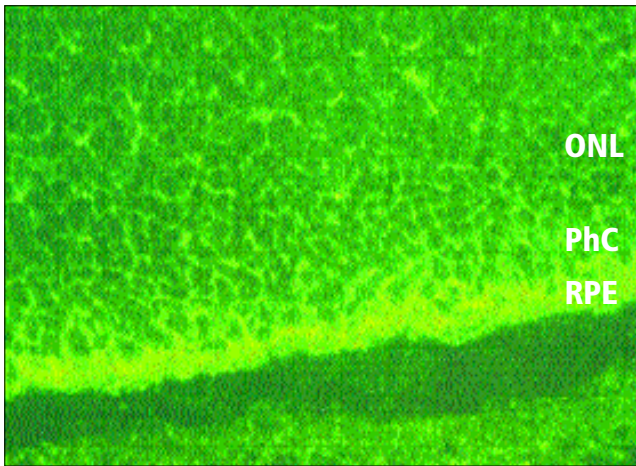
Teoria o istnieniu autoprzeciwciał skierowanych przeciwko tkankom oka sięga 1910 roku, kiedy Elschnig po raz pierwszy przedstawił hipotezę o ich udziale w etiopatogenezie współczulnego zapalenia błony naczyniowej (4). Obecnie prowadzone badania na modelach zwierzęcych wskazują, że zjawisko autoantygenowości oka może rzeczywiście odgrywać znaczącą rolę w jego immunopatologii. Znamy wiele schorzeń oczu, w których przebiegu stwierdza się obecność w surowicy przeciwciał przeciwsiatkówkowych. Do tej pory najlepiej poznanymi typami przeciwciał przeciwsiatkówkowych są przeciwciała, pojawiające się u chorych z zespołami paraneoplastycznymi – CAR (Carcinoma Associated Retinopathy) i MAR (Melanoma Associated Retinopathy). Przeciwciała te reagują z komórkami dwubiegunowymi lub fotoreceptorami i komórkami warstwy jądrazstej zewnętrznej siatkówki, wywołując objawy ciężkiej retinopatii (8,10,11,13,15). Wśród licznych publikacji na temat udziału przeciwciał przeciwsiatkówkowych w patomechanizmie idiopatycznego zapalenia błony naczyniowej tylko pojedyncze doniesienia dotyczą

analizy typów tych przeciwciał w przebiegu tego schorzenia (2,3,16). Dalsze badania nad rodzajami przeciwciał przeciwsiatkówkowych pozwolą wykazać, która z warstw siatkówki zawiera autoantygeny, biorące udział w patomechanizmie autoimmunologicznych zapaleń błony naczyniowej oka.

Celem pracy jest określenie z użyciem testu immunofluorescencji pośredniej, jakie typy przeciwciał przeciwsiatkówkowych pojawiają się w surowicy chorych na samoistne zapalenie tylnego odcinka błony naczyniowej w czynnym stadium choroby.

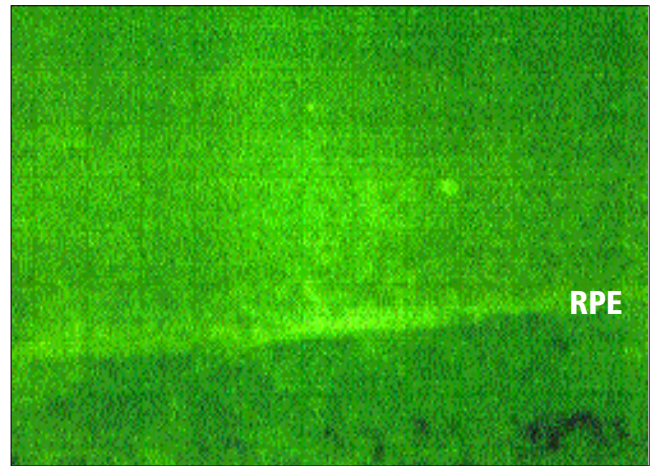
Materiał i metodyka

Badaniami objęto 50 chorych (69 oczu) z zapaleniem tylnego odcinka błony naczyniowej o nieznannej etiologii. Wśród badanych było 21 mężczyzn (42%) w wieku 15-70 lat (średni wiek – 32 lata) oraz 29 kobiet (58%) w wieku 16-66 lat (średni wiek – 38 lat). W 31 przypadkach (62%) choroba dotyczyła jednego oka, w 19 (38%) – obojga. Choroba wystąpiła po raz pierwszy u 12 chorych, u pozostających 38 chorych.



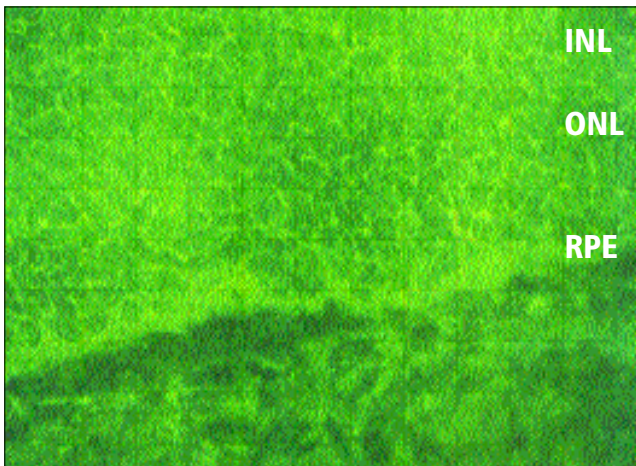
Ryc. 1. Immunofluorescencja cytoplazmy komórek zewnętrznych warstw siatkówki (komórek fotoreceptorowych oraz warstwy jądrazstej zewnętrznej).

Fig. 1. Immunofluorescence of retinal outer layers cells cytoplasm (photoreceptors and outer nuclear layer cells).



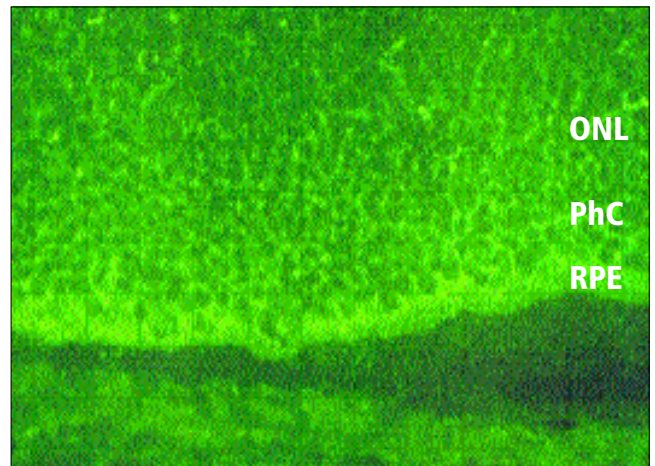
Ryc. 4. Brak reakcji surowicy kontrolnej z siatkówką – widoczna jedynie słaba autofluorescencja całej tkanki z fizjologiczną hiperfluorescencją nabłonka barwnikowego siatkówki.

Fig. 4. Control serum shows no reaction with retina – autofluorescence of whole tissue with physiological hyperfluorescence within the retinal pigmented epithelium are present.



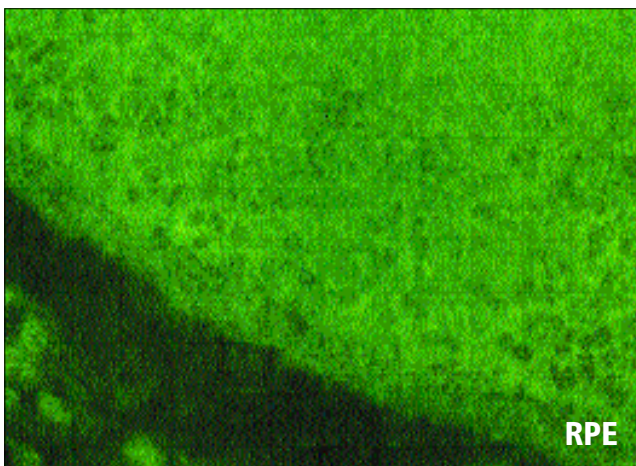
Ryc. 2. Immunofluorescencja cytoplazmy komórek zewnętrznych warstw siatkówki oraz jąder warstwy wewnętrznej i zewnętrznej o typie ziarnistym.

Fig. 2. Immunofluorescence of retinal outer layers cells cytoplasm and nuclei of inner and outer nuclear layers (speckled pattern).



Ryc. 5. Słaba fluorescencja zewnętrznych warstw siatkówki po reakcji z surowicą kontrolną.

Fig. 5. Control serum shows weak reaction in outer retinal layers.



Ryc. 3. Immunofluorescencja wszystkich warstw siatkówki.

Fig. 3. Immunofluorescence of all retinal layers.

Objaśnienia do rycin:

RPE – (retinal pigmented epithelium) nabłonek barwnikowy siatkówki

PhC – (photoreceptor cells) komórki fotoreceptorowe

ONL – (outer nuclear layer) warstwa jądrazsta zewnętrzna

INL – (inner nuclear layer) warstwa jądrazsta wewnętrzna

stałych miała charakter nawrotowy, w tym u 17 był to drugi rzut choroby, u 10 trzeci, a w 11 przypadkach stwierdzono więcej niż trzy nawroty zapalenia naczyniówki.

We wszystkich przypadkach przeciwciała przeciwsiatkówkowe (PPS) w surowicy oznaczano metodą immunofluorescencji pośredniej z użyciem mrożonych skrawków prawidłowej siatkówki małpiej oraz koziej surowicy antyglobulinowej (anti-human IgG, IgA, IgM)

związanej z fluoresceiną (firmy Euroimmun – Niemcy). Krew chorych pobierano z żyły łokciowej, a surowicę po odwirowaniu (3000 obr./s, t = 10 min), przechowywano w temperaturze -70°C do momentu wykonania badania. Grupę kontrolną stanowiła surowica uzyskana ze stacji krwiodawstwa od 50 dawców krwi – 20 mężczyzn (40%) w wieku od 22 do 68 lat (średni wiek 36,5 roku) oraz 30 kobiet (60%) w wieku od 20 do 64 lat (średni wiek 35 lat).

Kolejne etapy wykonania testu były następujące:

- 1) Rozmrożenie badanej surowicy i przygotowanie jej rozcieńczeń z użyciem buforu PBS-Tween w stosunku 1: 10, 1: 20, 1: 40, 1: 80 itd.
- 2) Umieszczenie w hydrofilnych polach płytek podstawowych 25 µl rozcieńczonej surowicy chorego oraz standaryzowanej ujemnej surowicy kontrolnej.
- 3) Umieszczenie płytek BIOCHIP zawierających skrawki siatkówki na korespondujących polach płytek podstawowych i inkubacja tkanki z surowicami w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
- 4) Splukanie nadmiaru surowicy buforem PBS-Tween i zanurzenie w kuwecie z roztworem PBS-Tween na 1 minutę.
- 5) Ponowna inkubacja preparatu z 20 µl koziej surowicy antyglobulinowej, związanej z fluoresceiną, w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
- 6) Splukanie nadmiaru znakowanej surowicy buforem PBS-Tween i następnie umieszczenie BIOCHIP-ów w buforze na 1 minutę.
- 7) Osuszenie preparatu, umieszczenie kropli glicerolu oraz założenie szkła nakrywkowego.
- 8) Ocena preparatu w mikroskopie fluorescencyjnym firmy Zeiss typu axioskop f1 z lampą HBO 100 z nasadką koobserwacyjną i fotograficzną MC 80 DX.

Wyniki

W surowicy 40 spośród 50 chorych test immunofluorescencji pośredniej wykazał obecność PPS w mianach od 1: 10 do 1: 320.

W 30 przypadkach (75%) odnotowano fluorescencję zewnętrznych warstw siatkówki z intensywną reakcją w warstwie komórek fotoreceptorowych oraz w obrębie cytoplazmy komórek warstwy jądrazastej zewnętrznej (ryc. 1).

W 9 przypadkach (22,5%), w których w teście immunofluorescencji pośredniej na komórkach HEp-2 stwierdzono obecność przeciwciał przeciwjądrowych (ANA), obserwowano dodatkową reakcję w jądrach komórek warstwy jądrazastej wewnętrznej i zewnętrznej siatkówki. U 8 chorych (20%) były to przeciwciała przeciwjądrowe o ziarnistym typie świecenia, a w 1 (2,5%) – o typie homogennym (ryc. 2).

W jednym przypadku w teście immunofluorescencji odnotowano reakcję we wszystkich warstwach siatkówki (2,5%) (ryc. 3).

Typy reakcji wszystkich badanych surowic w teście immunofluorescencji pośredniej z użyciem małej siatkówki jako substratu przedstawiono w tab. I.

U 10 chorych, u których nie stwierdzono obecności PPS w surowicy, w teście immunofluorescencji pośredniej odnotowano niecharakterystyczną, słabą autofluorescencję całej siatkówki z hiperfluorescencją nabłonka barwnikowego siatkówki. Podobną reakcję odnotowano w przypadku 39 kontrolnych surowic (78%), podczas gdy pozostałych 11 (22%) dało immunofluorescencję w obrębie zewnętrznych warstw siatkówki w rozcieńczeniu surowicy 1: 10 (ryc. 4,5).

Omówienie

Według Nöllega (12) ludzka surowica może zawierać 14 różnych typów przeciwciał przeciwsiatkówkowych, które w teście immunofluorescencji pośredniej reagują z różnymi strukturami tej tkanki. Obecnie wiadomo, że siatkówkowe organo-specyficzne autoantygeny są obecne nie tylko w komórkach fotoreceptorowych, ale także znajdują się w komórkach obydwu warstw jądrazastych, komórkach dwubiegunowych, zwojowych, warstwie spłotowatej zewnętrznej, a także w astrocytach siatkówkowych (9,10,11,13-17). Najlepiej poznane są reakcje autoprzeciwciał z siatkówką w przebiegu zespołów paraneoplastycznych. W retinopatii towarzyszącej czerniakowi skóry (MAR) stwierdzono immunofluorescencję komórek dwubiegunowych (11,15), podczas gdy w retinopatii rozwijającej się u chorych z rakiem drobnokomórkowym płuc oraz innymi nowotworami (CAR) odnotowano reakcję z fotoreceptorami i komórkami warstwy jądrazastej zewnętrznej (10) lub fotoreceptora-

Typy przeciwciał przeciwsiatkówkowych Types of antiretinal antibodies n = 40	Liczba chorych (No. of patients)	%
Immunofluorescencja cytoplazmy komórek fotoreceptorowych oraz cytoplazmy komórek warstwy jądrazastej zewnętrznej (Immunofluorescence of photoreceptors cytoplasm and cytoplasm of outer nuclear layer cells)	30	75
Immunofluorescencja zewnętrznych warstw siatkówki z fluorescencją ziarnistą jąder warstwy jądrazastej wewnętrznej i zewnętrznej siatkówki (Immunofluorescence of outer retinal layers with granular reaction within the nuclei of inner and outer nuclear layers)	8	20
Immunofluorescencja zewnętrznych warstw siatkówki z fluorescencją homogenną jąder warstwy jądrazastej wewnętrznej i zewnętrznej siatkówki (Immunofluorescence of outer retinal layers with ho-mogenous reaction within the nuclei of inner and outer nuclear layers)	1	2,5
Immunofluorescencja wszystkich warstw siatkówki (Immunofluorescence of all retinal layers)	1	2,5

Tab. I. Typy przeciwciał przeciwsiatkówkowych u chorych na endogenne zapalenie tylnego odcinka błony naczyniowej w teście immunofluorescencji pośredniej.
Tab. I. Types of antiretinal antibodies in patients with endogenous posterior uveitis in indirect immunofluorescence test.

mi i warstwą spłotową zewnętrzną albo tylko z komórkami zwojowymi siatkówki (8,13). Różne reakcje w teście pośredniej immunofluorescencji u chorych z zespołem CAR wynikają prawdopodobnie z odmiennej budowy antygenowej nowotworów. Przeciwciała powstające przeciwko różnym antygenom nowotworowym reagują krzyżowo z białkami siatkówki, co z kolei prowadzi do rozwoju retinopatii (10,11).

Ostatnie badania wskazują na duże prawdopodobieństwo udziału w etiopatogenezie zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD) przeciwciał skierowanych przeciwko astrocytom siatkówkowym (9,14). W witreoretinopatii proliferacyjnej oraz po laserokoagulacji argonowej siatkówki w przebiegu proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej stwierdzono obecność autoprzeciwciał, reagujących z antygenem S komórek fotoreceptorowych (6,7).

Obecność różnych typów immunofluorescencji została także potwierdzona w zapalnych schorzeniach oka. W przypadku zapaleń błony naczyniowej towarzyszących chorobom układowym immunofluorescencja dotyczy zewnętrznych członów fotoreceptorów oraz komórek Müllera (2,19). We współczulnym zapaleniu błony naczyniowej odnotowano natomiast słabą immunofluorescencję tylko warstwy komórek fotoreceptorowych (2). Podobną reakcję w teście immunofluorescencji pośredniej stwierdzono w grupie chorych z zapaleniem naczyniówkowo-siatkówkowym w przebiegu infekcji *Toxoplasma gondii* (18). Immunofluorescencję wewnętrznych struktur siatkówki, warstwy włókien nerwowych, komórek zwojowych oraz komórek Müllera zaobserwowano natomiast w przebiegu ocznej onchocerkozji (1).

Autoimmunogenność w stosunku do antygenów siatkówkowych, a szczególnie w stosunku do antygeny S, jest odpowiedzialna za patogenezę endogennych zapaleń błony naczyniowej oka (5). W teście immunofluorescencji pośredniej często występują autoprzeciwciała, reagujące z zewnętrznymi warstwami siatkówki, tj. warstwą komórek fotoreceptorowych i cytoplazmą komórek warstwy jądrazstej zewnętrznej (3,12). W pojedynczych przypadkach natomiast poza reakcją w tych dwóch warstwach siatkówki zaobserwowano dodatkową immunofluorescencję w warstwie spłotowej zewnętrznej, co może sugerować udział innych autoantygenów siatkówki w etiopatogenezie tego schorzenia (3). W badanej grupie chorych stwierdzono immunofluorescencję zewnętrznych warstw siatkówki, która była najwyraźniejsza w obrębie fotoreceptorów, co może być związane z obecnością przeciwciał skierowanych przeciwko najbardziej uveitogennemu u człowieka antygenowi siatkówki – antygenowi S. Podobnie we wszystkich przypadkach z dodatnimi przeciwciałami przeciwsiatkówkowymi odnotowano immunofluorescencję cytoplazmy komórek warstwy jądrazstej zewnętrznej. Nie zaobserwowano jednak w żadnym przypadku reakcji w warstwie spłotowej zewnętrznej. Ponadto w przypadku obecności przeciwciał przeciwjądrowych stwierdzono dodatkową reakcję w obrębie jąder warstwy jądrazstej zewnętrznej i wewnętrznej siatkówki. U jednego chorego wystąpiła rozlana fluorescencja wszystkich warstw siatkówki, której opisu nie znaleziono w piśmiennictwie.

Przedstawiana przez wielu autorów fizjologiczna autofluorescencja siatkówki charakteryzuje się rozlaną, ale słabą fluorescencją całej tkanki z wyraźniejszą hiperfluorescencją na poziomie nabłonka barwnikowego siatkówki, co jest prawdopodobnie wynikiem silnej autofluorescencji ziaren lipofuscyny (11,17). W badanym materiale 78% kontrolnych surowic w teście immunofluorescencji pośredniej

wykazało identyczną do przedstawionej powyżej reakcję z siatkówką. Należy jednak wspomnieć o pojedynczych doniesieniach, w których kontrolne surowice w rozcieńczeniu 1: 5 dawały słabą fluorescencję z warstwą komórek fotoreceptorowych (2), komórek zwojowych i włókien nerwowych (11), a także z wewnętrznymi warstwami siatkówki (1), co nie zostało jednak potwierdzone w przeprowadzonych badaniach.

Przeprowadzone badania pozwalają ustalić, że u chorych na samoistne zapalenie tylnego odcinka błony naczyniowej najczęściej występującymi przeciwciałami przeciwsiatkówkowymi w teście immunofluorescencji pośredniej były przeciwciała skierowane przeciwko zewnętrznym warstwom siatkówki, cytoplazmie komórek fotoreceptorowych i komórek warstwy jądrazstej zewnętrznej.

PIŚMIENNICTWO: 1. Chan C. C., Nussenblatt R. B., Kim M. K., Palestine A. G., Awadzi K., Ottesen E. A.: *Immunopathology of ocular onchocerciasis*. 2. *Antiretinal autoantibodies in serum and ocular fluids*. Ophthalmology, 1987, 94, 439-443. 2. Chan C. C., Palestine A. G., Nussenblatt R. B., Roberge F. G., BenEzra D.: *Antiretinal autoantibodies in Vogt-Koyanagi-Harada syndrome, Behçet disease, and sympathetic ophthalmia*. Ophthalmology, 1985, 92, 1025-1028. 3. Dumonde D. C., Graham E., Kasp-Grochowska E., Sanders M. D.: *Antiretinal autoimmunity and circulating immune complexes in patients with retinal vasculitis*. Lancet, 1982, 9, 787-792. 4. Elschnig A.: *Studien zur Sympatischen Ophthalmis. Die Antigene Wirkung des Augenpigmentes*. Albrecht von Graefe's Arch. Ophthalmol., 1910, 76, 509-546. 5. Forrester J. V., Stott D. I., Hercus K. M.: *Naturally occurring antibodies to bovine and human retinal S-antigen: a comparison between uveitis patients and healthy volunteers*. Br. J. Ophthalmol., 1989, 73, 155-159. 6. Gregerson D. S., Abrahams W. I., Puklin J. E.: *Serum antibody responses to bovine retinal S antigen and rod outer segments in proliferative diabetic retinopathy before and after argon laser photocoagulation*. Ophthalmology, 1982, 89, 767-771. 7. Grisanti S., Heimann K., Wiedermann P.: *Immune response to specific molecules of the retina in proliferative vitreoretinal disorders*. Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 1994, 232, 302-307. 8. Grunwald G. B., Klein R., Simmonds M. A., Kornguth S. E.: *Autoimmune basis for visual paraneoplastic syndrome in patients with small-cell lung carcinoma*. Lancet, 1985, 1, 658-661. 9. Gurne D. H., Tso M. O., Edward D. P., Ripps H.: *Antiretinal antibodies in serum of patients with age-related macular degeneration*. Ophthalmology, 1991, 98, 602-607. 10. Heckenlively J. R., Fawzi A. A., Oversier J., Jordan B. L., Aptsiauri N.: *Autoimmune retinopathy: patients with antirecoverin immunoreactivity and panretinal degeneration*. Arch. Ophthalmol., 2000, 118, 1525-1533. 11. Milam A. H., Saari J. C., Jacobson S. G., Lubinski W. P., Feun L. G., Alexander K. R.: *Autoantibodies against retinal bipolar cells in cutaneous melanoma – associated retinopathy*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1993, 34, 91-99. 12. Nölle B.: *Humorale Immunoreaktivität bei entzündlichen Augenerkrankungen – Eine Übersicht*. Z. ärztl. Fortbild., 1994, 88, 597-602. 13. Ohnishi Y., Ohara S., Sakamoto T., Kohno T.: *Cancer-associated retinopathy with retinal phlebitis*. Br. J. Ophthalmol., 1993, 77, 795-797. 14. Penfold P. L., Provis J. M., Furby J. H., Gatenby P. A., Billson F. A.: *Autoantibodies to retinal astrocytes associated with age-related macular degeneration*. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 1990, 228, 270-274. 15. Potter M. J., Adams G., Szabo S. M., Lee R., Mohaseb

K., Behn D.: *Autoantibodies to transducin in a patient with melanoma-associated retinopathy*. Am. J. Ophthalmol., 2002, 134, 128-130. **16.** Stanford M. R., Graham E., Kasp-Grochowska E., Sanders M. D., Dumonde D. C.: *A longitudinal study of clinical and immunological findings in 52 patients with relapsing retinal vasculitis*. Br. J. Ophthalmol., 1988, 72, 442-447. **17.** Whitcup S. M., Vistica B. P., Milam A. H., Nussenblatt R. B., Gery I.: *Recoverin-associated retinopathy: a clinically and immunologically distinctive disease*. Am. J. Ophthalmol., 1998, 126, 230-237. **18.** Whittle R. M., Wallace G. R.,

Whiston R. A., Dumonde D. C., Stanford M. R.: *Antiretinal antibodies in toxoplasma retinochoroiditis*. Br. J. Ophthalmol., 1998, 82, 1017-1021. **19.** Yokoyama M. M., Matsui Y., Yamashiroya H. M., O'Donnell M. J., Tseng C. H., Snyder D. A., Tessler H. H., Crispen R. G., Zimjewski C. M.: *Humoral and cellular immunity studies in patients with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome and pars planitis*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1981, 20, 364-370.

Praca wpłynęła do Redakcji 3.06.2003 r. (279).

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
dr n. med. Agnieszka Kubicka-Trzaska
ul. J. Lea 244/7
30-133 Kraków

Komitet Organizacyjny
VII MIĘDZYNARODOWEGO SYMPOZJUM
SEKCJI WSZCZEPÓW WEWNĄTRZGAŁKOWYCH I CHIRURGII REFRAKCYJNEJ
POLSKIEGO TOWARZYSTWA OKULISTYCZNEGO

zaprasza do udziału w symposium, które odbędzie się w Warszawie w dniach
9–11 września 2004 roku

Miejsce obrad:

Centrum Kongresowo–Wystawiennicze Hotel Gromada, 02-148 Warszawa, 17 Stycznia 32

Tematy główne:

- powikłania w chirurgii zaćmy
- współczesne techniki fakoemulsyfikacji
- nowe techniki operacyjne w chirurgii refrakcyjnej
- tematy wolne

Organizator VII Międzynarodowego Symposium Sekcji Wszczepów Wewnętrznych i Chirurgii Refrakcyjnej PTO:

**Samodzielny Publiczny Kliniczny Szpital Okulistyczny w Warszawie,
03-709 Warszawa, ul. Sierakowskiego 13**

Szczegółowe informacje w następnych wydaniach

Prof. dr hab. med. Jerzy Szaflik
Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego