

(73)

Rola chemokin w schorzeniach narządu wzroku. Część II.

Udział chemokin w chorobach narządu wzroku

The role of chemokines in ocular diseases. Part II.
Participation of chemokines in ocular diseases

Roman Malesiński¹, Małgorzata Mrugacz², Alina Bakunowicz-Łazarczyk²

¹Z Oddziału Chorób Oczu Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Białymstoku

Ordynator: dr n. med. Bogusław Żywalewski

²Z Kliniki Okulistyki Dziecięcej Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Alina Bakunowicz-Łazarczyk

Summary:

The chemokines are family of ca. 50 chemotactic cytokines produced by leucocytes and tissue cells, which regulate and stimulate leucocytes migration. Dysregulation of this process is apparent in chronic inflammation, allergic eye disease, corneal graft rejection, proliferative vitreoretinopathies and age-related macular degeneration. Antagonists of chemokine receptors have demonstrated anti-inflammatory and antiviral activity and may represent new generations of therapeutic agents.

Słowa kluczowe:

chemokiny, receptory chemokin, choroba autoimmunizacyjna.

Key words:

chemokines, chemokine receptors, autoimmune disease.

Nabłonek barwnikowy siatkówki (RPE) *in vitro* produkuje kilkanaście chemokin, włączając w to CXCL8/ IL8, CCL2/ MCP-1, i CCL5/ RANTES w odpowiedzi na cytokiny prozapalne TNF, INF gamma (1). Produkcja CCL2/ MCP-1 i CCL8/ IL8 przez RPE w warunkach laboratoryjnych jest hamowana przez dexametazon i cyclosporynę, oba leki są używane do leczenia zapalenia błony naczyniowej. Wydzielanie 80% CXCL8/ IL8 i CCL2/ MCP-1 odbywa się w kierunku podstawy RPE (2). Dlatego możliwe jest, iż chemokiny produkowane przez RPE zatrzymują leukocyty w choriokapilarach jako mechanizm zabezpieczający przed wnikaniem komórek zapalnych do siatkówki.

Zapalenie błony naczyniowej

Wzrost poziomu CXCL8/ IL8 wykazano w surowicy pacjentów z ostrym zapaleniem błony naczyniowej (acute uveitis – AU). U 50% pacjentów z nieleczonym idiopatycznym AU stwierdzono w płynie komorowym CXCL8/ IL8. Poziom CXCL10/ IP10 był znacząco wyższy u pacjentów z aktywnym zapaleniem. Poziom CCL4/ MIP-1 beta i CCL5/ RANTES był podwyższony, ale utrzymujący się na stosunkowo niskim poziomie (3). Monitorowanie poziomu CCL2/ MCP-1 i CCL4/ MIP-1 beta w trakcie leczenia zapalenia naczyń siatkówki (retinal vasculitis – RV) wykazuje zależność między poziomem tych chemokin, a nasileniem objawów choroby (4). W chorobie Behçeta występuje nadreaktywność neutrofilii wielojądrzastych. Poziom CXCL8/ IL8 odpowiedzialnych za indukcję aktywacji i migracji neutrofilii jest podwyższony w surowicy pacjentów z chorobą Behçeta. Poziom CXCL8/ IL8 w surowicy, podwyższony u pacjentów z aktywną postacią choroby, może być stosowany jako marker nasilenia

choroby (5). CXCL8/ IL8 wykryto także w naciekach skóry oraz w płynie z punkcji stawów u pacjentów z towarzyszącym zapaleniem stawów w chorobie Behçeta (6). W doświadczalnym autoimmunologicznym zapaleniu siatkówki i naczyniówki (experimental autoimmune uveoretinitis – EAU) stwierdzono, że poziom CCL2/ MCP-1, CCL3/ MIP-1 alfa, CCL5/ RANTES był najwyższy w największym nasileniu objawów chorobowych w komórkach siatkówki (7). Doświadczalne zapalenie autoimmunologiczne mózgu (experimental autoimmune encephalomyelitis – EAE) u szczurów wywołane jest po wstrzyknięciu białka MBP (myelin basic protein) wywołującego także AU. W miarę rozwoju zapalenia stwierdzono wzrost poziomu CCL2/ MCP-1 w tęczówce, ciele rzęskowym oraz w rdzeniu kręgowym. Przy wywoływaniu AU u myszy po podaniu MBP stwierdzono podwyższony poziom CCL5/ RANTES, CCL2/ MCP-1 i CCL3/ MIP-1 alfa. Poziom CCL4/ MIP-1 beta był najwyższy w szczycie choroby. W nawrotowym zapaleniu błony naczyniowej (recurrent acute uveitis – RAU) wywoływanym u szczurów ponownym podaniem MBP powodując AU i EAE, stwierdzono podwyższony poziom CCL2/ MCP-1 w tęczówce i ciele rzęskowym. Podwyższony poziom CCL5/ RANTES był obecny w przedklinicznym stadium RAU, podczas gdy CCL4/ MIP-1 beta był najwyższy w szczycie choroby. CCL3/ MIP-1 alfa był obecny w RAU i małał w szczycie choroby (8). W badaniach nad doświadczalnym zapaleniem przedniego odcinka błony naczyniowej (experimental autoimmune anterior uveitis – EAAU) u szczurów badano wpływ pyrrolidone dithiocarbamate (PDTC) – inhibitora czynnika jądrowego – kappa B (nuclear factor-kappa B-NF kappa B) na poziom chemokin i ekspresję receptorów chemokin w komórkach tęczówki i cia-

ła rzęskowego. Wykazano, że PDTC znacząco łagodzi objawy zapalenia u szczurów z EAAU poprzez hamowanie NF-kappa B w tęczówce i ciełe rzęskowym i hamowanie ekspresji genów chemokin CCL2/ MCP-1, CCL5/ RANTES, CXCL8/ IL 8 oraz receptorów chemokin CCR2, CCR5 i CXCR3. Blokowanie NF-kappa B zmniejsza objawy zapalenia i może być rozpatrywane jako strategia leczenia zapalenia przedniego odcinka gałki ocznej (9). U ludzi i zwierząt chemokiny odgrywają dużą rolę w migracji leukocytów i przełamaniu barier naczyniowych w ostrych i nawrotowych zapaleniach błony naczyniowej. Ostatnie badania nad czynnikami zapalenia w EAU wykazały, że chemokiny są produkowane przez komórki napływowo (leukocyty) i komórki obecne w miejscu zapalenia (głównie RPE). Badając poziom mRNA u myszy EAU techniką PCR, stwierdzono podwyższony poziom CCL1/ TCA-3, CCL5/ RANTES, CCL22/ MDC, CXCL9/ MIG i CXCL10/ IP10. Poziom CXCL1/ MIP-2, CXCL14, CCL27/ ESKina był stale obecny i nie rósł w trakcie zapalenia. Pełnią one funkcje regulacyjne w normalnych warunkach jako chemokiny konstytutywne (10). W trakcie badań u ludzi i zwierząt odkryto wiele chemokin obecnych w różnych formach zapalenia naczyń. Produkowane są one przez leukocyty lub komórki RPE i odgrywają ogromną rolę w patogenezie choroby. Chemokiny i ich receptory służą także do badań nad nowymi lekami wpływającymi na migrację, aktywację i akumulację leukocytów w miejscu zapalenia.

Zapalenie rogówki

Podczas infekcji rogówki *Pseudomonas aeruginosa* dochodzi do dysregulacji miejscowej odpowiedzi immunologicznej. W komórkach rogówki następuje wzrost poziomu IL-1 i CXCL1/ MIP-2. Następuje wzrost stężenia CCL3/ MIP-1alfa w rogówce powiązany ze wzrostem nacieku neutrofilami.

Wzrost CXCL1/ MIP-2 jest proporcjonalny do stopnia nasilenia objawów choroby. Stosowanie leczenia przeciwciałami przeciw CXCL1/ MIP-2 powoduje redukcję objawów. Hamowanie CXCL1/ MIP-2 nie powoduje zmniejszenia liczby bakterii w rogówce, jednak to CXCL1/ MIP-2 uczestniczy w patogenezie zapalenia rogówki poprzez przyciągnięcie do ogniska zapalenia neutrofilów tworzących nacieki (11).

W modelowym zapaleniu rogówki wywołanym przez *Staphylococcus aureus* u myszy BALB/ c i C57BL/ 6 wykorzystano dwa szczepy *S. aureus* 8325-4 i *Staph* 38. Dobę po infekcji myszy zabijano i badano liczbę bakterii i leukocytów wielojądrowych w rogówce oraz poziom wybranych cytokin i chemokin. Stwierdzono podwyższony poziom CXCL1/ MIP-2 u myszy C57BL/ 6 (12). Zakażenie wirusem opryszczki HSV-1 powoduje często zapalenie miąższu rogówki, które w poważnych przypadkach może prowadzić do konieczności transplantacji rogówki. Częścią zapalenia rogówki na tle HSV-1 jest rozpoczęcie angiogenezy w awaskularnej prawidłowo rogówce. Mysiom na rogówkę z toczącym się zapaleniem wywołanym HSV-1 podawano krople do oczu zawierające plasmid DNA kodujący IL-12. Powodowało to redukcję reakcji zapalnej, której towarzyszył wzrost ekspresji angiostatycznych chemokin CXCL9/ MIG i CXCL10/ IP10 (13). Stosując leczenie zakażonych wirusem HSV-1 rogówek myszy przeciwciałami anty-CXCL10/ IP10 uzyskano zmniejszenie produkcji chemokin prozapalnych i nacieku komórkami jednojądrzastymi. Leczenie przeciwciałami

anty-CXCL10/ IP10 prowadziło do zahamowania przenikania wirusa z rogówki do siatkówki u leczonych zwierząt. Z jednej strony CXCL10/ IP10 działa korzystnie angiostatycznie, z drugiej jednak działanie chemotaktyczne zwiększa nacieki komórek zapalnych. W badaniach CXCL1/ GRO-alfa, CXCL8/ IL 8 i CCL2/ MCP-1 w zapaleniu rogówki badano ludzkie gałki oczne usuwane z powodu przewlekłego zapalenia rogówki. Stwierdzono podwyższony poziom CXCL1/ GRO-alfa i CCL2/ MCP-1 w nabłonku w okolicy rąbka rogówki oraz CCL2/ MCP-1 w zrębie rogówki (14).

Choroby alergiczne oczu

Wykazano obecność receptorów CCR1 i CCR3 na powierzchni eozynofili w próbkach też pobranych od pacjentów z atopowym zapaleniem rogówki i spojówek i wrzodem rogówki. Przeciwciała przeciwko CCR1 i CCR3 hamowały chemotaksję eozynofili wywołaną przez CCL11/ eotaksynę (15). W biopsjach spojówkowych pacjentów z wiosennym zapaleniem rogówki i spojówek (vernal keratoconjunctivitis – VKC) chemokiny CCL5/ RANTES i CCL11/ eotaksyna były obecne w epitelium i endotelium. Stwierdzono też zwiększoną liczbę komórek zapalnych wrażliwych na CCL2/ MCP-1, CCL5/ RANTES, CCL7/ MCP-3, CCL11/ eotaksyna. Obecność komórek wyrażających ekspresję CCL1/ TCA-3, CCL18/ MIP-4 i CCL22/ MDC, działających chemotaktycznie na komórki T, może wyjaśnić napływ limfocytów do spojówki w VKC. Analizując ekspresję receptorów w alergicznym zapaleniu spojówek, wykazano, że CXCR3 na napływowych limfocytach T była znacząco większa niż w prawidłowej tkance (16). Oprócz limfocytów i makrofagów znaczącą rolę w patogenezie przewlekłych alergicznych chorób oczu odgrywają eozynofile. Podwyższony poziom CCL11/ eotaksyna i CCL24/ eotaksyna-2 (obie chemokiny działające na eozynofile) stwierdzono w spojówce pacjentów z VKC. Poziom CCL24/ eotaksyna-2 był podwyższony we łzach u pacjentów z VKC i atopowym zapaleniem rogówki i spojówek. Poziom CCL24/ eotaksyna-2 we łzach korelował z poziomem eozynofili we łzach. Jednym ze źródeł CCL11/ eotaksyna są fibroblasty spojówki. Wykazano udział CCL3/ MIP-1 alfa jako kostymulatora w reakcji nadwrażliwości bezpośredniej w spojówce. Stwierdzono, że obecność CCL3/ MIP-1 alfa warunkuje przebieg degranulacji komórek tucznych i wystąpienie fazy wczesnej reakcji alergicznej (early allergic reaction – EAR) (17). W patogenezie chorób alergicznych uczestniczą limfocyty i eozynofile, interakcje między tymi komórkami a chemokinami są przedmiotem licznych badań.

Przeszczep rogówki

Mimo postępu w chirurgii rogówki i leczenia immunosupresyjnego odrzut przeszczepu jest nadal dość częsty. Poziom CXCL8/ IL8 jest znacznie podwyższony w rogówkach pacjentów z pęcherzowym obrzękiem rogówki w pseudofakii (pseudophakic bullous keratopathy – PBK) w porównaniu z prawidłowymi rogówkami. Jeżeli PBK jest związany z urazem operacyjnym, może on być przyczyną wzrostu CXCL8/ IL8. Odrzut przeszczepu charakteryzuje się naciekiem limfocytarnym tkanek dawcy. Odpowiedź ta jest powiązana z podwyższoną ekspresją genów chemokin CCL2/ MCP-1, CCL3/ MIP-1 alfa, CCL4/ MIP-1 beta i CCL5/ RANTES u myszy z odrzutem przeszczepu allogenicznego rogówek.

W badaniach nad mRNA cytokin i chemokin w rogówkach szczurów po syngenicznym lub allogenicznym przeszczepie rogówki stwierdzono podwyższony poziom CCL2/ MCP-1, CCL3/ MIP-1 alfa i CCL5/ RANTES w obu przeszczepach rogówki – syngenicznym i allogenicznym, począwszy od 5. dnia po transplantacji pozostaje wysoki do 13. dnia. W obu grupach poziom MIP-2 był podwyższony 5. dnia, ale w grupie z przeszczepem syngenicznym spadał 13. dnia, w przeszczepie allogenicznym zaś utrzymywał się na wysokim poziomie. Możliwe jest, że chemokiny i cytokiny powstają na skutek urazu operacyjnego i mogą zapoczątkowywać angiogenezę i migrację komórek do przeszczepionej rogówki.

W przeszczepach syngenicznych ta początkowa odpowiedź może zanikać, ale w przeszczepach allogenicznych narasta i może prowadzić do odrzutu przeszczepu (18).

Proliferacje siatkówkowe

Proliferacje witreoretinalne (proliferative vitreoretinopathy – PVR) są częstą przyczyną niepowodzeń chirurgii odwarstwienia siatkówki. Proliferacyjna retinopatia cukrzycowa (proliferative diabetic retinopathy – PDR) jest związana z utratą perycytów i komórek śródbłonka mikrokrążenia siatkówkowego. PVR i PDR charakteryzują się występowaniem błon łącznotkankowych rozciągających się od siatkówki do ciała szklistego. Poziom CXCL8/ IL8 jest znacząco podwyższony w ciele szklistym u pacjentów z PDR w porównaniu z pacjentami z PVR. Poziom CCL2/ MCP-1 jest podwyższony zarówno u pacjentów z PVR, jak i pacjentów z PDR w porównaniu z grupą kontrolną. U pacjentów z PDR podwyższony jest poziom CXCL8/ IL8 oraz CXCL10/ IP10. Poziom CXCL8/ IL8 (ma działanie stymulujące angiogenezę) jest wyższy w aktywnym stanie choroby, podczas gdy CXCL10/ IP10 jest podwyższony u pacjentów w nieaktywnym stanie choroby (19). CCL2/ MCP-1 jest wykrywany u 70% pacjentów z PVR i PDR, brakuje go jednak u pacjentów z idiopatycznymi błonami przedsiatkówkowymi.

Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem

Błona neowaskularna włóknistonaczyniowa w przebiegu zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD) jest wiodącą przyczyną nieodwracalnej, znacznej utraty wzroku u pacjentów powyżej 60. roku życia w krajach zachodnich. Komórki nabłonka barwnikowego siatkówki RPE wytwarzają CCL2/ MCP-1, który razem z VEGF i innymi czynnikami wzrostu może zapoczątkowywać rozwój błony neowaskularnej (20). CCL2/ MCP-1 powoduje przyciąganie makrofagów do powierzchni RPE. Makrofagi i komórki RPE wytwarzając VEGF, nasilają proces rozwoju neowaskularyzacji podsiatkówkowej.

Reasumując, należy podkreślić, że rola chemokin i ich receptorów w schorzeniach narządu wzroku jest obecnie przedmiotem licznych zainteresowań badaczy. Wykazano, że antagoniści receptorów chemokin działają silnie przeciwzapalnie i przeciw-wirusowo. Mogą zatem stanowić leki nowej generacji w schorzeniach zapalnych gałki ocznej.

PIŚMIENNICTWO:

- Crane IJ, Wallace CA, Mc Kilop-Smith S, Knott RM, Forrester JV: *Cytokine regulation of RANTES production by human retinal pigment epithelial cells*. Cell Immunol 1998, 184, 37-44.
- Holtkamp GM, De Vos AF, Peek R, Kijlstra A: *Analysis of a secretion pattern of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and transforming growth factor-beta 2 (TGF beta 2) by human retinal pigment epithelial cells*. Clin Exp Immunol 1999, 118, 35-40.
- Verma MJ, Lloyd A, Rager H, Streiter R, Kunkel S, Taub B, Wakefield D: *Endotoxin-induced uveitis is partially inhibited by anti-IL-8 antibody treatment*. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997, 40, 2465-2470.
- Wallace GR, Farmer I, Church A, Graham EM, Stanford MR: *Serum levels of chemokines correlate with disease activity in patients with retinal vasculitis*. Immunol Lett 2003, 90, 59-64.
- Zouboulis CC, Katsantonis J, Kettler R, Treudler R, Kaklamanis E, Hornemann S, Kaklamanis P, Orfeanos C: *Adamantiades-Behcet's disease: interleukin-8 increased in serum of patients with active oral and neurological manifestations and is secreted by small vessel endothelial cells*. Arch Dermatol 2000, 292, 279-284.
- Erntli I, Kiraz S, Calguneri M, Celik I, Erman M, Hazedaroglu IC, Kirazli S: *Synovial fluid cytokine levels in Behcet's disease*. Clin Exp Rheumatol 2001, 19, 37-41.
- Sonoda KH, Sasa Y, Qiao H, Tsutsumi C, Hisatomi T, Komiyama S, Kubota T, Sakamoto T, Kawano YI, Ishibashi T: *Immunoregulatory role of ocular macrophages produce RANTES to suppress experimental autoimmune uveitis*. J Immunol 2003, 171, 2652-2659.
- Manczak M, Jiang S, Orzechowska B, Adamus G: *Crucial role of CCL3/ MIP 1-alfa in the recurrence of autoimmune anterior uveitis induced with myelin basic protein in Lewis rats*. J Autoimmunol 2002, 18, 259-270.
- Yang CH, Fang IM, Lin CP, Yang CM, Chen MS: *Effects of the NF-kappa B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate on experimentally induced autoimmune anterior uveitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005, 46, 1339-1347.
- Foxman EF, Zhang M, Hurst SD, Muchamel T, Shen D, Wawrousek EF, Chan CC, Gery I: *Inflammatory mediators in uveitis: differential induction of cytokines and chemokines in the Th1 versus Th2 mediated ocular inflammation*. J Immunol 2002, 168, 2483-2492.
- Xue ML, Thacur A, Wilcox MD, Zhu H, Lloyd AR, Wakefield D: *Role and regulation of CXC-chemokines in acute and experimental keratitis*. Exp Eye Res 2003, 76, 221-231.
- Hume EB, Cole N, Khan S, Garthwaite LL, Aliwarga Y, Schubert TL, Wilcox MD: *A Staphylococcus aureus mouse keratitis topical infection model: Cytokine balance in different strains of mice*. Immunol Cell Biol 2005, 83, 294-300.
- Lee S, Zheng M, Desphande S, Kug ES, Hamilton TA, Rouse BT: *IL-12 suppresses the expression of ocular inflammatory lesions by effects on angiogenesis*. J Leuk Biol 2002, 71, 469-476.
- Spandau UH, Toksoy A, Verhaart A, Gillitzer R, Kruse FE: *High expression of chemokines Gro-alpha (CXCL-1), IL-8 (CXCL-8), and MCP-1 (CCL-2) in inflamed human corneas in vivo*. Arch Ophthalmol 2003, 121, 825-831.
- Fukugawa K, Okada N, Fujishima H, Nakajima T, Tsubota K, Takano Y, Kawasaki H, Saito H, Hirai K: *CC-chemokine receptor-3 a possible target in treatment of allergy related corneal ulcer*. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002, 43, 58-62.

16. El-Asrar AMA, Struyf S, Al-Kharashi SA, Missotten L, van Damme J, Geboes K: *Expression of chemokine receptors in vernal keratoconjunctivitis*. Br J Ophthalmol 2001, 85, 1357-1361.
17. Miyazaki D, Nakamura T, Toda M, Richardson K, Ono SJ: *Macrophage inflammatory protein 1 alpha as a costimulatory cell-mediated immediate hypersensitivity reactions*. J Clin Invest 2005, 115, 434-442.
18. King WJ, Comer RM, Hudde T, Larkin FP, George AJT: *Cytokine and chemokine expression kinetics after corneal transplantation*. Transplantation 2000, 70, 1225-1233.
19. Yuuki T, Kanda T, Kimura Y, Kotajima N, Tanamura J, Kobayashi I, Kishi S: *Inflammatory cytokines in vitreous fluid and serum of patients with diabetic retinopathy*. J Diabetes Complications 2001, 15, 257-259.
20. Grossniklaus HE, Ling JX, Wallace TM, Dothmar S, Lawson DH, Cohen C, Elnor VM, Elnor SG, Sternberg Jr. P: *Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularisation*. Mol Vis 2002, 8, 119-126.

Praca wpłynęła do Redakcji 03.11.2005 r. (796)
Zakwalifikowano do druku 05.07.2007 r.

Adres do korespondencji (reprint requests to):

lek. med. Roman Malesiński
ul. Pułaskiego 115 m 28
15-337 Białystok

We are pleased to invite you to the
9th
INTERNATIONAL CONGRESS OF THE POLISH SOCIETY
OF CATARACT AND REFRACTIVE SURGEONS

which will be held in Warsaw, Poland
25–27 September 2008

Venue:

Congress-Exhibition Center Gromada Hotel, 02-148 Warsaw, 32 17th Stycznia str.

Main topics:

- ❖ **current phacoemulsification techniques**
- ❖ **new surgical techniques in refractive surgery**
- ❖ **cataract surgery complications**
- ❖ **free papers**

9th International Congress of the Polish Society of Cataract and Refractive Surgeons is organized by:
Department of Ophthalmology Medical University of Warsaw, 03-709 Warsaw, 13 Sierakowskiego str.

Prof. Jerzy Szaflik MD, PhD
President of the Organizing Committee

For further details please visit
www.pto.com.pl www.cataracta2008.pl
from November the 1st 2007