

(132)

Aspekty immunologiczne filmu łzowego

Immunological aspects of tear fluid

Małgorzata Mrugacz, Nella Żywalewska, Alina Bakunowicz-Łazarczyk

Z Kliniki Okulistyki Dziecięcej Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. n med. Alina Bakunowicz-Łazarczyk

Summary: The eye is linked to the common mucosal immune system. This system play the part in preservation of the ocular surface. Tear fluid contains pro and anti-inflammatory factors such as lactoferrin, plasmin, immunoglobulins, and a lot of cytokines (interleukins, GM-CSF, TGF alfa and beta). The cornea is immunologically preferred, as a result of lack of resident lymphoreticular cells.

Słowa kluczowe: immunologia, płyn łzowy, rogówka.

Key words: immunology, tear fluid, cornea.

Powierzchnia oka stanowi immunologiczny „mikrokosmos”, w którym działają lokalne systemy obronne analogiczne do tych spotykanych w innych błonach śluzowych. Należą do nich: prawidłowa rezydująca flora bakteryjna, bariery anatomiczne, wydzielanie mucyny, czynniki bakteriostatyczne i bakteriolityczne, miejscowa odpowiedź komórkowa i humoralna. Często aktywacja jednego systemu prowadzi do pobudzenia drugiego, dając w rezultacie wysoce zintegrowaną serię mechanizmów obrony gospodarza (1). Choć odporność na patogeny jest niezbędna do ochrony widzenia, odpowiedź immunologiczna grozi uszkodzeniem tkanek oka. Są one szczególnie podatne na uszkodzenie w wyniku reakcji zapalnej. Dlatego regulacja układu immunologicznego oka jest niezwykle istotna dla ochrony widzenia (12).

Układ immunologiczny filmu łzowego

Gruczoł łzowy odgrywa kluczową rolę w immunologicznej ochronie powierzchni oka ze względu na obecność komórek plazmatycznych, limfocytów T i B, komórek dendrytycznych i makrofagów (19). W filmie łzowym obecne są liczne czynniki przeciwzapalne i przeciwbakteryjne. Zostały one omówione poniżej.

Lizozym

Jest to enzym bakteriolityczny, który prowadzi do przerwania ściany komórkowej bakterii poprzez hydrolizę wiązania między kwasem N-acetylmuraminowym a N-acetyloglukozaminą (wiązanie to jest również punktem uchwytu dla penicyliny). Lizozym stanowi przeszło 40% protein płynu łzowego. Został on zidentyfikowany w komórkach nabłonka gruczołu łzowego i przewodów łzowych. Większość badań wskazuje na spadek poziomu lizozymu wraz z wiekiem, a także w stanach deficytu żelaza, co jest przyczyną zwiększonego ryzyka infekcji u pacjentów z zespołem suchego oka (8).

Laktoferyna

Stanowi ponad 25% protein płynu łzowego. Jej działanie polega na zwiększeniu aktywności komórek NK (natural killers) i pozabawieniu bakterii odżywczego żelaza (8).

Betalizyna

Jej obecność we łzach podlega dyskusji. Jest czynnikiem antybakteryjnym powodującym lizę ściany komórkowej bakterii (8).

Immunoglobuliny

W płynie łzowym stwierdzono obecność wszystkich klas immunoglobulin, ale tylko IgA występuje w znaczących ilościach 20-30 mg/100 ml (14). Wśród nich znajdują się też przeciwciała swoiste, skierowane bezpośrednio przeciwko wielu antygenom: bakteriom, wirusom i chlamydiom.

IgA jest produkowana w gruczole łzowym przez komórki plazmatyczne, które czynią z niej jedną z największych „fabryk” IgA w organizmie. Komórki plazmatyczne powstają w wyniku różnicowania limfocytów B, pochodzących pierwotnie z migdałków (19) lub z innej tkanki limfatycznej związanej z błoną śluzową. Na przykład immunizacja drogą pokarmową wywołuje odpowiedź ze strony IgA zarówno w ślinie, mleku, jak i łzach. Jest to możliwe dzięki wspólnemu układowi immunologicznemu błon śluzowych, w którym wspólne limfocyty B podróżują z GALT (błony śluzowej przewodu pokarmowego) do gruczołu łzowego, gdzie różnicują się w komórki plazmatyczne zdolne do produkcji IgA. Mechanizmy, za pośrednictwem których limfocyty B (IgA+) docierają do gruczołu łzowego, nie są do końca wyjaśnione, chociaż wiadomo, że retencja i dystrybucja limfocytów B IgA+ jest stymulowana przez prowokację antygenów i regulowana przez różne czynniki: immunologiczne, nerwowe, hormonalne i limfocyty T (8). Badania wykazały np., że prozapalna cytokina IL-6 pobudza wydzielanie IgA przez leukocyty wielojądrowe (PMNs). Również działanie GM-CSF (czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i makrofagów) na PMNs powoduje wzrost ekspresji receptorów dla IgA (16).

Wydzielnicza IgA (SIgA – secretory IgA) występuje w formie dimerów, mających łańcuch łączący J i związanych ze składnikiem wydzielniczym SC (secretory component). SC jest wydzielany przez komórki gruczolowe gruczołu łzowego. Jego synteza i wydzielanie są stymulowane przez TNF-alfa, TNF-beta, IL-1 alfa i IL-1 beta (8).

IgA pokrywa powierzchnię spojówki, łącząc się z błoną śluzową spojówki przez kwas sialinowy. Jej główna funkcja polega na ochronie powierzchni oka przed przyleganiem i kolonizacją bakterii. IgA redukuje absorpcję antygenów, uczestniczy w neutralizacji toksyn i wirusów, bierze udział w eliminacji plazmidów. Wydzielnicza IgA jest odporna na niszczenie przez enzymy proteolityczne zawarte we łzach (8).

Poziom IgA zwiększa się zwłaszcza podczas przedłużonego zamknięcia oczu, np. podczas snu. Wówczas stężenie IgA we łzach stanowi prawie 80% całkowitej ilości protein i wspólnie z fibronektyną, składnikami dopełniacza i plazminą tworzy na powierzchni oka środowisko zapalne (17).

W reakcjach zapalnych, toczących się na powierzchni oka biorą udział zarówno czynniki humoralne (układu dopełniacza i fibrynolitycznego), jak i komórkowe (histamina, serotonina, metabolity kwasu arachidonowego, cytokiny). Ich źródłem są tkanki przedniej powierzchni oka (rogówki i spojówki) lub komórki zapalne (makrofagi i leukocyty wielojądrowe), które „wkroczyły” do filmu łzowego lub zajęły nieunaczynioną rogówkę (16).

Składniki dopełniacza

Są ważnym mediatorem i aktywatorem ostrych reakcji zapalnych. Indukują chemotaksję leukocytów wielojądrowych (PMNs), zwiększają wazodilatację, biorą udział w opsonizacji ciał obcych i nasilają fagocytozę (16).

Obecność składników dopełniacza we łzach jest przedmiotem dyskusji. Niektórzy badacze donoszą o obecności składników dopełniacza C1-C7 i properdyny w płynie łzowym. Ostatnio wykazano obecność składników dopełniacza w tkance rogówkowej. Uważa się, że składniki dopełniacza (C3 i czynnik B) są zarówno uwalniane przez PMNs rekrutowane podczas zapalenia, jak i syntetyzowane przez komórki nabłonka rogówki i spojówki. Ostatnie badania wskazują jednak, że bardziej prawdopodobnym ich źródłem są komórki nabłonkowe, gdyż PMNs nie są obecne w płynie łzowym w warunkach prawidłowych (16).

Plazmina

Jest nieswoistą proteinazą, która powstaje w wyniku aktywacji plazminogenu przez specyficzne aktywatory, uwalniane z komórek nabłonka rogówki. Działanie plazminy polega na rozkładzie białek macierzy zewnątrzkomórkowej, w szczególności fibronektyny, co ma istotne znaczenie w początkowych stadiach odnowy nabłonka rogówki.

Plazmina również generuje czynniki chemotaktyczne dla PMNs i aktywuje układ dopełniacza. Badania wykazały, że jej aktywność zwiększa się podczas odpowiedzi zapalnej na soczewki kontaktowe (CLARE: contact lens induced acute red eye), co uruchamia także inne mechanizmy zapalne, np. uwolnienie metabolitów kwasu arachidonowego (16).

Cytokiny

Cytokiny są multipotencjalnymi peptydami, które regulują aktywność, różnicowanie i proliferację limfocytów, monocytów i innych komórek immunokompetentnych (6). W płynie łzowym wykryto szereg cytokin, takich jak: interleukina IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, interferon gamma (IFN- γ), czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α) (5,9,13).

W stanach zapalnych narządu wzroku o podłożu immunologicznym najważniejszą rolę odgrywają interleukiny IL-1, IL-6, IL-8 oraz TGF- β .

Interleukina 1 (IL-1) jest jednym z głównych regulatorów odpowiedzi immunologicznej i zapalnej. Stymuluje wytwarzanie prze-

ciwiał przez limfocyty T, powstawanie i chemotaksję neutrofilii i monocytów, a także jest silnym induktorem innych zapalnych cytokin, takich jak: IL-6, IL-8, TNF-alfa oraz GM-CSF (3). W tkankach oka IL-1 indukuje enzymy rodzaju metaloproteinaz w komórkach zrębu rogówki, pobudza ruchy komórek Langerhansa i jest mediatorem apoptozy keratocytów. IL-1 nie tylko zapoczątkowuje proces destrukcji, ale też odgrywa znaczącą rolę w procesach naprawczych przez nasilenie ekspresji czynnika wzrostu keratocytów i hepatocytów. Jest także istotnym czynnikiem patogenetycznym wielu chorób dotyczących narządu wzroku, takich jak keratopatia pęcherzowa, stożek rogówki, jałowy wrzód rogówki, zespół suchego oka (9,11). W filmie łzowym obecne są formy prozapalne IL-1, takie jak: IL-1 α , prekursor i dojrziała forma IL-1 β oraz przeciwzapalna forma IL-1 Ra. IL-1 α i β są homologiczne w 25% i powstają w komórce w wyniku działania odpowiednich proteaz, choć IL-1 α jest już aktywna jako prekursor (3). Stężenie IL-1 α jest takie samo we łzach wydzielanych podstawowo i odruchowo, natomiast stężenie IL-1 β jest znacznie niższe we łzach wydzielanych odruchowo (13). Wskazuje to na fakt, że IL-1 α jest produkowana przez gruczoł łzowy, podczas gdy IL-1 β – przez komórki nabłonka spojówki i rogówki (12). IL-1 Ra jest natomiast antagonistą receptora dla IL-1, który dzięki podobieństwu do IL-1 α i β blokuje receptory IL-1, hamując jej działanie.

Interleukina 6 (IL-6) bierze udział w odpowiedzi immunologicznej i w reakcji zapalnej. Pobudza proliferację cytotoksycznych limfocytów T, stymuluje różnicowanie limfocytów B. W tkankach oka pobudza migrację komórek nabłonka rogówki przez wzrost wydzielania integryny alfa5beta1. IL-6 jest również indukowana podczas niszczących procesów, takich jak herpetyczne zapalenie rogówki (12).

Interleukina 8 (IL-8) jest czynnikiem chemotaktycznym dla neutrofilii, potęguje także ich właściwości bakteriobójcze oraz stymuluje migrację limfocytów T przez śródbłonki naczyń do miejsca zapalenia (6). Zarówno IL-6, jak i IL-8 są indukowane w komórkach rogówki przez inne cytokiny prozapalne IL-1 i TNF-alfa *in vitro*. IL-6 i IL-8 nie tylko biorą udział w reakcjach zapalnych, ale także w utrzymaniu homeostazy powierzchni oka (12).

TGF beta-1 i beta-2 (transformujący czynnik wzrostu beta-1 i beta-2) należą do cytokin przeciwzapalnych, których prawdopodobnymi źródłami są gruczoł łzowy i nabłonek powierzchni oka (5). TGF beta-1 jest izoformą dominującą i odgrywa istotną regulatorową rolę w hamowaniu zapalenia powierzchni oka, indukcji prawidłowego wzrostu i różnicowania nabłonka powierzchni oka oraz procesów gojenia.

TGF-beta jest czynnikiem immunosupresyjnym *in vivo*. Hamuje proliferację komórek, takich jak: limfocyty T cytotoksyczne, NK, makrofagi, a także ekspresję cytokin zapalnych, takich jak IL-6, oraz HLA klasy II i receptorów IL-2. TGF beta-1 jest uniwersalnym inhibitorem proliferacji nabłonka i promotorem prawidłowego różnicowania komórek nabłonka. Reguluje syntezę takich składników macierzy zewnątrzkomórkowej, jak kolagen, fibronektyna, glikozaminoglikany; zwiększa ekspresję integryn i innych cząstek adhezyjnych; redukuje ekspresję metaloproteinaz macierzy. Tym samym jest on istotnym składnikiem też wpływającym na gojenie się ran rogówki (5).

GM-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów i granulocytów)

Jest ważnym mediatorem zapalenia na powierzchniach nabłonka (17). GM-CSF uwalniany podczas zapalenia bierze udział w inicjacji nieswoistej odpowiedzi immunologicznej poprzez działanie na neutrofile. Miejscowa produkcja GM-CSF w miejscu zapalenia może też aktywować neutrofile przez potęgowanie ich zdolności do wychwytu

i niszczenia mikroorganizmów, które wkroczyły na powierzchnię nabłonka (8). GM-CSF może również uczestniczyć w reakcjach immunologicznych typu komórkowego, pobudzaniu wzrostu i różnicowaniu komórek Langerhansa w kierunku komórek APCs (komórek prezentujących antygen) oraz w chemotaksji tych komórek w miejsce zapalenia (16).

Układ immunologiczny spojówki i rogówki

Nabłonek spojówki i rogówki jest istotnym elementem mechanizmów obronnych oka. Pomimo że spojówka i rogówka w podobny sposób podlegają działaniu środowiska zewnętrznego, ich mechanizmy obronne są całkowicie różne.

Spojówka jest tkanką wysoce reaktywną, bogato unaczynioną i połączoną z układem limfatycznym (CALT: conjunctiva associated lymphoid tissue). W spojówce znajdują się komórki prezentujące antygen MHC klasy II (MHC II+). W nabłonku są to komórki Langerhansa, limfocyty T HML-1 i CD8 oraz limfocyty alfa/beta TCR (T cell receptor) Ag. W istocie właściwej występują komórki dendrytyczne i limfocyty B, w regionie podnabłonkowym zaś nieliczne limfocyty T CD 8 + (8).

W przeciwieństwie do spojówki rogówka jest stosunkowo mało reaktywna, a jej system immunologiczny – w pewnej mierze ograniczony. Jest to związane z niezwykłym zjawiskiem mającym miejsce w oku, tak zwanym uprzywilejowaniem immunologicznym. Według definicji z 1998 roku jest to proces, który polega na zminimalizowaniu ekspresji reakcji immunopatologicznych w narządzie lub tkance (4). Jest to mechanizm ochronny procesu widzenia, gdyż hamuje reakcję zapalną o podłożu immunologicznym, która zawsze wiąże się z ryzykiem uszkodzenia tkanek oka (10,15). W procesie immunologicznego uprzywilejowania w oku uczestniczą czynniki anatomiczne (bariera krew – oko, brak odpływu chłonki, brak naczyń w rogówce i soczewce oka), zmniejszona liczba lub brak komórek prezentujących antygen (APCs), a także obecność czynników immunosupresyjnych hamujących proliferację i sekrecję cytokin prozapalnych (6). APCs charakteryzujące się ekspresją MHC (II+) odgrywają znaczącą rolę w inicjacji i rozprzestrzenianiu się odpowiedzi immunologicznej. Komórki te „wychwytyją” antygeny wkraczające do tkanek i prezentują je limfocytom T w węzłach chłonnych, co skutkuje aktywacją limfocytów i innych komórek efektorowych. Udowodniono, że w rąbku rogówki i na jej obwodzie są obecne komórki APCs MHC (II+). Komórki te, nazywane komórkami Langerhansa, w odpowiedzi na czynniki infekcyjne, zadrażnienie środkami chemicznymi i miejscowe uszkodzenie mogą migrować z rąbka rogówki do centrum (7,10).

W rogówce odbywa się również synteza chemokin, takich jak MCP-1 (czynnik chemotaktyczny monocytów) i RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted protein). Białka te działają chemotaktycznie wobec monocytów i limfocytów, przyciągając je do miejsca, w którym toczy się proces zapalny. RANTES może również indukować wiązanie limfocytów CD4+ do glikozaminoglikanów w macierzy zewnątrzkomórkowej, co również umożliwia ich gromadzenie się w miejscu zapalenia. Chemokiny te są produkowane przez keratocyty (wyspecjalizowane fibroblasty rogówki) pod wpływem IL-1 alfa i TNF-alfa, dzięki czemu komórki zrębu rogówki są postrzegane jako główna bariera przeciwko rozprzestrzenianiu się czynników infekcyjnych do wnętrza gałki ocznej i do naczyń limfatycznych. W przeciwieństwie do keratocytów komórki nabłonka rogówki poddane działaniu IL-1 alfa i TNF-alfa produkują jedynie IL-8, która działa chemotaktycznie wobec neutrofilii i inicjuje ostrą reakcję zapalną, nie produkując natomiast RANTES i MCP-1. Dzięki temu nie docho-

dzi do kumulacji nadmiernej ilości leukocytów, a tym samym zaburzenia przezierności rogówki i obniżenia ostrości wzroku (18).

Reasumując, należy podkreślić, że wiedza o układzie immunologicznym narządu wzroku, a szczególnie powierzchni oka, jest ciągle niepełna. Konieczne jest pełniejsze zrozumienie reakcji immunologicznych na poziomie komórkowym i molekularnym w aspekcie całego organizmu, jak i odpowiedzi lokalnej poszczególnych narządów. Będzie ono wymagać połączenia wysiłków badaczy z różnych dziedzin. Jeszcze większym wyzwaniem jest poznanie sposobów manipulowania odpowiedzią immunologiczną, może to bowiem mieć nieocenioną wartość w zapobieganiu i leczeniu schorzeń, między innymi związanych z zaburzeniami filmu łzowego.

Indeks skrótów

- APCs – komórki prezentujące antygen, takie jak komórki dendrytyczne, limfocyty B, makrofagi.
 Cytokiny – cząsteczki regulujące różnicowanie i proliferację komórek; mediatory reakcji zapalnych i immunologicznych.
 GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów.
 HLA – antygeny ludzkich limfocytów.
 NK – naturalna komórka cytotoksyczna N.
 Integryny – cząsteczki na powierzchni leukocytów; biorą udział w adhezji leukocytów do komórek śródbłonka.
 Interleukiny – cząsteczki służące komunikowaniu się, wzajemnemu oddziaływaniu i kooperacji między komórkami układu odpornościowego.
 MCP-1 – białko chemotaktyczne dla monocytów.
 MHC – cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej; biorą udział w wiązaniu i prezentacji antygenów limfocytom T. MHC klasy I znajduje się na powierzchni wszystkich komórek jednójdrzastych, MHC klasy II – na limfocytach B, makrofagach, komórkach dendrytycznych.
 RANTES – białko wydzielane przez prawidłowe limfocyty T. Działa chemotaktycznie na monocyty, limfocyty T, komórki NK, eozynofile. Pobudza proliferację limfocytów T.
 TGF beta-1, beta-2 – transformujący czynnik wzrostu.

PIŚMIENICTWO:

1. Baudouin Ch.: *The pathology of dry eye*. Surv. Ophthalmol., 2001, 45, 211-221.
2. Gamache D. A., Dimitrijevic S. D.: *Secretion of proinflammatory cytokines by human conjunctival epithelial cells*. Ocul. Immunol. Inflamm., 1997, 5, 117-128.
3. Gołąb J., Jakóbskiak M., Lasek W.: *Immunologia*, 2002.
4. Gregerson D. S.: *Immune privilege in the retina*. Ocular Immunol. Inflamm., 1998, 6, 257-267.
5. Gupta A., Monroy D.: *Transforming growth factor beta-1 and beta-2 in human tear fluid*. Curr. Eye Research., 1996, 5, 605-614.
6. Hamrah P., Huq S. O., Liu Y., Zhang Q., Dana M. R.: *Corneal immunity is mediated by heterogeneous population of antigen-presenting cells*. J. Leukoc. Biol., 2003, 74, 172-178.
7. Koevary S. B.: *Ocular immune privilege: a review*. Clinical Eye and Vision Care, 2000, 12, 97-106.
8. McClellan K., Fraco A.: *Mucosal defense of the outer eye*. Surv. Ophthalmol., 1997, 42, 233-246.

9. Nakamura Y, Sotozono C.: *Inflammatory cytokines in normal human tears*. Curr. Eye Res., 1998, 25, 673-676.
10. Niederkorn J. Y.: *Immune privilege in the anterior chamber of the eye*. Crit. Rev. Immunol., 2003, 22, 13-46.
11. Niederkorn J. Y., Peeler J. S., Mellon J.: *Phagocytosis of particulate antigens by corneal epithelial cells stimulates interleukin-1 secretion and migration of Langerhans cells into the central cornea*. Reg. Immunol., 1989, 2, 83-90.
12. Rolando M., Zierhut M.: *The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease*. Surv. Ophthalmol., 2001, 45, 203-210.
13. Solomon A., Dursun D.: *Pro and anti-inflammatory forms of Interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease*. Inv. Ophth. Vis. Sci., 2001, 42, 2283-2292.
14. Stankiewicz A., Mikita A.: *Fizjologia i patologia filmu łzowego w przebiegu zespołu suchego oka*. Klin. Oczna, 1998, 100, 323-329.
15. Streilein J. W.: *Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation*. J. Leukoc. Biol., 2003, 74, 179-185.
16. Thakur A., Willcox M.: *Inflammatory components of human tear fluid*. Austr. N. Z. J. Ophthalmol., 1996, 24, 13-16.
17. Thakur A., Willcox M.: *The Proinflammatory cytokines and arachidonic acid metabolites in human overnight tears: homeostatic mechanisms*. J. Clin. Immunol., 1998, 18, 61-70.
18. Tran M. T., Isusi M.: *Proinflammatory cytokines induce RANTES and MCP-1 synthesis in human corneal keratocytes but not in corneal epithelial cells*. Inv. Ophth. Vis. Sci., 1996, 37, 987-992.
19. Zierhut M., Dana Reza M.: *Immunology of the lacrimal gland and ocular tear film*. Trends Immunol., 2002, 23, 333-335.

Praca wpłynęła do Redakcji 1.03.2004 r. (581).

Zakwalifikowano do druku 4.05.2005 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):

dr n. med. Małgorzata Mrugacz

Klinika Okulistyki Dziecięcej

ul. Waszyngtona 17

15-247 Białystok