

NATALIA LEWKOWICZ<sup>1</sup>, MAŁGORZATA BANASIK<sup>2</sup>, HENRYK TCHÓRZEWSKI<sup>2</sup>,  
ANNA J. KURNATOWSKA<sup>1</sup>, PRZEMYSŁAW LEWKOWICZ<sup>2</sup>

## Przewaga wytwarzania cytokin typu Th1 u chorych z aftami nawracającymi\*

### Predominance of Production of Th1 Type Cytokines in Recurrent Aphthous Ulceration

<sup>1</sup> Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej UM w Łodzi

<sup>2</sup> Zakład Immunologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

#### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Afty nawracające to choroba o niewyjaśnionej etiologii, w której zaburzenia odpowiedzi immunologicznej odgrywają znaczącą rolę. W ostatnich latach sugeruje się udział autoimmunizacji w powstawaniu aft nawracających.

**Cel pracy.** Ocena jednego z czynników predysponujących do rozwoju autoimmunizacji u chorych z aftami nawracającymi. Zbadano typ odpowiedzi immunologicznej oceniając profil wydzielanych cytokin Th1/Th2.

**Materiał i metody.** Zbadano 12 chorych z aftami nawracającymi w fazie aktywnej i remisji choroby oraz 19 osób zdrowych. Oznaczono wytwarzanie cytokin IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-10 oraz TGF- $\beta$  przez komórki jednójadrzaste krwi obwodowej w hodowlach niestymulowanych oraz stymulowanych PHA. Użyto zestawu Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit do cytometrii przepływowej oraz testu ELISA do oceny TGF- $\beta$ .

**Wyniki.** Zaobserwowano znacząco większe wytwarzanie cytokin typu Th1: IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  u chorych (zarówno w fazie aktywnej, jak i remisji choroby) w porównaniu do osób zdrowych. Wydzielanie cytokin typu Th2 było zróżnicowane: stężenie IL-10 było obniżone, IL-5 podwyższone, a IL-4 nie odbiegało od wartości obserwowanych u osób zdrowych. Wytwarzanie cytokiny przeciwzapalnej TGF- $\beta$  było znacznie obniżone u osób z aftami nawracającymi niezależnie od fazy choroby.

**Wnioski.** Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na przewagę odpowiedzi typu Th1 u chorych z aftami nawracającymi, co może być przyczyną zwiększonej predyspozycji do autoimmunizacji u tych osób (**Dent. Med. Probl. 2004, 41, 4, 655–660**).

**Słowa kluczowe:** afty nawracające, cytokiny, autoimmunizacja.

#### Abstract

**Background.** Aetiology of recurrent aphthous ulceration (RAU) is still poorly explained. The imbalance of immune response has been implicated in the pathogenesis of this disease. Recent studies have suggested possible autoimmune scenario for RAU development.

**Objectives.** In this study, we analysed the profile of Th1/Th2 type cytokine production in RAU patients as one of the crucial factors of the development of autoimmunity.

**Material and Methods.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from 12 RAU patients in the active and in the remission stage of the disease, and 19 healthy individuals. IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-10 and TGF- $\beta$  production by unstimulated and PHA stimulated PBMC was measured using cytometric bead array and ELISA.

**Results.** PBMC from patients with RAU produced greater amounts of Th1 type cytokines IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  independently of the stage of the disease, whereas the production of the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  was significantly decreased. The level of IL-5 production was increased in RAU, both in the active and in the remission stage, but IL-4 production in RAU was not different from controls.

**Conclusions.** In this study, we have shown the predominance of Th1 type cytokine production in RAU that predispose to the development of autoimmunity (**Dent. Med. Probl. 2004, 41, 4, 655–660**).

**Key words:** recurrent aphthous ulcerations, cytokines, autoimmunity.

\* Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 2 P05E 09126 oraz w ramach działalności statutowej nr 503-244-3 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Afty nawracające (RAU – *recurrent aphthous ulcerations*) to choroba o niewyjaśnionej etiologii, w której zaburzenia odpowiedzi immunologicznej odgrywają znaczącą rolę. W ostatnich latach coraz częściej bierze się pod uwagę udział autoimmunizacji w powstawaniu aft nawracających. Badania nad teorią autoimmunizacyjną rozpoczęły się w latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia [1, 2]. Obecnie uważa się, że bakterie kolonizujące jamę ustną, takie jak: *Streptococcus sanguis* i *Streptococcus mutans*, a także ich antygeny mogą być odpowiedzialne za powstawanie aft u osób predysponowanych [3–5]. Podkreśla się ponadto rolę wirusów z rodziny *Herpesviridae* w rozwoju patologicznej odpowiedzi układu immunologicznego u chorych z aftami nawracającymi [5]. Nieznane natomiast pozostają mechanizmy prowadzące do nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej w stosunku do powszechnie występujących drobnoustrojów jamy ustnej w aftach nawracających.

Cytokiny są jednym z najważniejszych czynników determinujących rodzaj odpowiedzi immunologicznej, a profil wydzielanych cytokin może predysponować do rozwoju autoimmunizacji lub przed nią chronić. Wyróżnia się dwie zasadnicze grupy cytokin: typu Th1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) i typu Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) [6]. Cytokiny typu Th1 są odpowiedzialne za indukcję odpowiedzi prozapalnej typu komórkowego, wytwarzanie IgG i predysponują do reakcji autoimmunizacyjnych, cytokiny natomiast typu Th2 mają działanie przeciwzapalne, promują odpowiedź humoralną i wytwarzanie IgE [7]. Należy także wymienić TGF- $\beta$  – cytokinę o działaniu przeciwzapalnym, która znacząco przyczynia się do hamowania procesów autoimmunizacyjnych i jest wydzielana głównie przez limfocyty regulatorowe [8]. Badania przeprowadzone przez Buno et al. [9] wykazały podwyższone stężenia IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 w wycinkach błony śluzowej klinicznie niezmienionej u chorych z aftami nawracającymi w porównaniu do osób zdrowych, a stężenie IL-10 było podobne w obu grupach. Wyniki tych badań sugerują, że stężenie podstawowe (*baseline*) cytokin prozapalnych u osób z RAU jest wyższe niż u osób zdrowych.

Celem pracy była ocena profilu wydzielanych cytokin u chorych z aftami nawracającymi jako jednego z czynników mogących predysponować do rozwoju autoimmunizacji.

## Materiał i metody

Do badań zakwalifikowano 12 chorych z małymi aftami nawracającymi: 7 mężczyzn, 5 kobiet w wieku 19–56 lat (średnia wieku  $38,2 \pm 13,08$

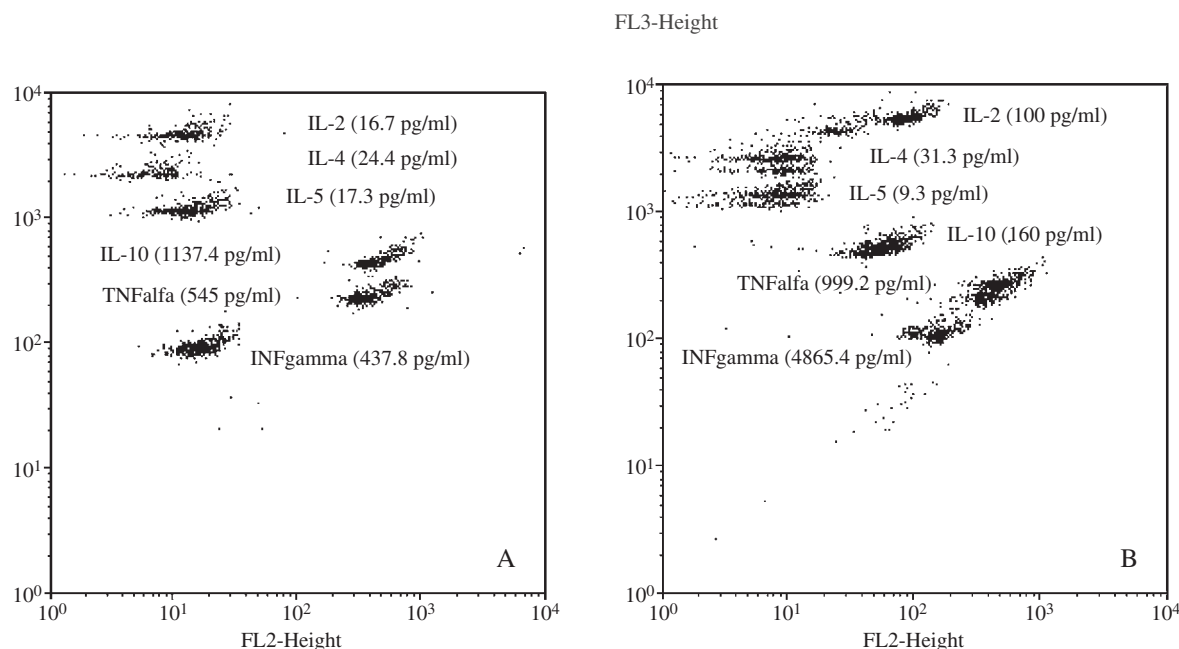
lat), którzy byli ogólnie zdrowi i nie przyjmowali leków, a częstotliwość nawrotów aft nie była mniejsza niż 1 afta w miesiącu. Grupę porównawczą stanowiło 19 osób zdrowych, u których nigdy nie występowały afty nawracające. Osoby chore były badane dwukrotnie: w fazie aktywnej i w fazie remisji choroby. Od każdej osoby badanej została pobrana krew z żyły łokciowej do probówki z antykoagulantem. Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC – *peripheral blood mononuclear cells*) zostały wyizolowane poprzez wirowanie na gradiencie stężeń (Lymphoprep; Nycomed Pharma AS, Norway). Do hodowli PBMC użyto RPMI 1640 medium (Biomed, Lublin, Poland) z dodatkiem 10% surowicy zarodków cielęcych (FCS, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), 2 mM/l glutaminy (Gibco, Paisley, UK) i 1% penicyliny i streptomycyny (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Gęstość PBMC wynosiła  $1 \times 10^6$  kom./ml. Komórki jednojądrzaste były hodowane przez 21 godzin w temperaturze 37°C i 5% CO<sub>2</sub> bez i w obecności fitohemaglutyniny – PHA (5  $\mu$ g/ml). Do oznaczenia wydzielania cytokin IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-10 użyto zestawu Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit (Cytometric Bead Array™, BD Biosciences, San Diego, CA) do cytometrii przepływowej. Wydzielanie TGF- $\beta$  zostało oznaczone z użyciem zestawu Human TGF- $\beta$ 1 (R&D Systems, Germany) metodą ELISA. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Dla wszystkich badanych grup wyliczono wartości średnie, odchylenie standardowe oraz standardowy błąd średniej (SEM). W celu sprawdzenia zgodności uzyskanych wyników w obrębie grupy z rozkładem normalnym wykorzystano weryfikację statystyczną Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lillieforsa. Weryfikację statystyczną wartości oczekiwanych przeprowadzono testem U Manna-Whitneya oraz testem serii Walda-Wolfowitza. Różnice między fazą aktywną a remisji choroby oceniono testem kolejności par Wilcoxon. Wartości  $p < 0,05$  uznano za istotne statystycznie.

## Wyniki

Wydzielanie cytokin przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej w hodowli 21-godzinnej niestymulowanej i stymulowanej mitogenem PHA odzwierciedla rzeczywisty i potencjalny profil odpowiedzi immunologicznej u osób badanych. Do oceny wytwarzania cytokin Th1/Th2 wykorzystano metodę cytometryczną, która umożliwia analizę sześciu cytokin w jednej próbce (ryc. 1).

U chorych z aftami nawracającymi zaobser-



**Ryc. 1.** Przykład analizy stężeń cytokin uwalnianych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej po stymulacji PHA (5 µg/ml) w 21-godzinnej hodowli: **A** – osoba zdrowa, **B** – osoba z aftami nawracającymi w fazie aktywnej choroby. Cytokiny oznaczono metodą cytometrii przepływowej w nadsączach pohodowlanych (Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit, FACSCalibur, BD Bioscience)

**Fig. 1.** The example of the cytokine level produced by peripheral blood mononuclear cells cultured for 21 hours and stimulated with PHA (5 µg/ml). The level of cytokines measured in culture supernatants using cytometric bead array (Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit, FACSCalibur, BD Bioscience)

wowano kilkakrotnie większe wydzielanie cytokin typu Th1 IL-2, IFN-γ i TNF-α przez PBMC stymulowane zarówno w fazie aktywnej, jak i remisji choroby w porównaniu do osób zdrowych (ryc. 2). Wytwarzania cytokin o przeważającym działaniu przeciwzapalnym IL-10 i TGF-β1 po stymulacji PHA było obniżone dwukrotnie u osób chorych niezależnie od fazy choroby (ryc. 3, 4). Wydzielanie IL-5 przez komórki jednojądrzaste było podwyższone, stężenie IL-4 natomiast nie odbiegało od wartości obserwowanych u osób zdrowych (ryc. 3).

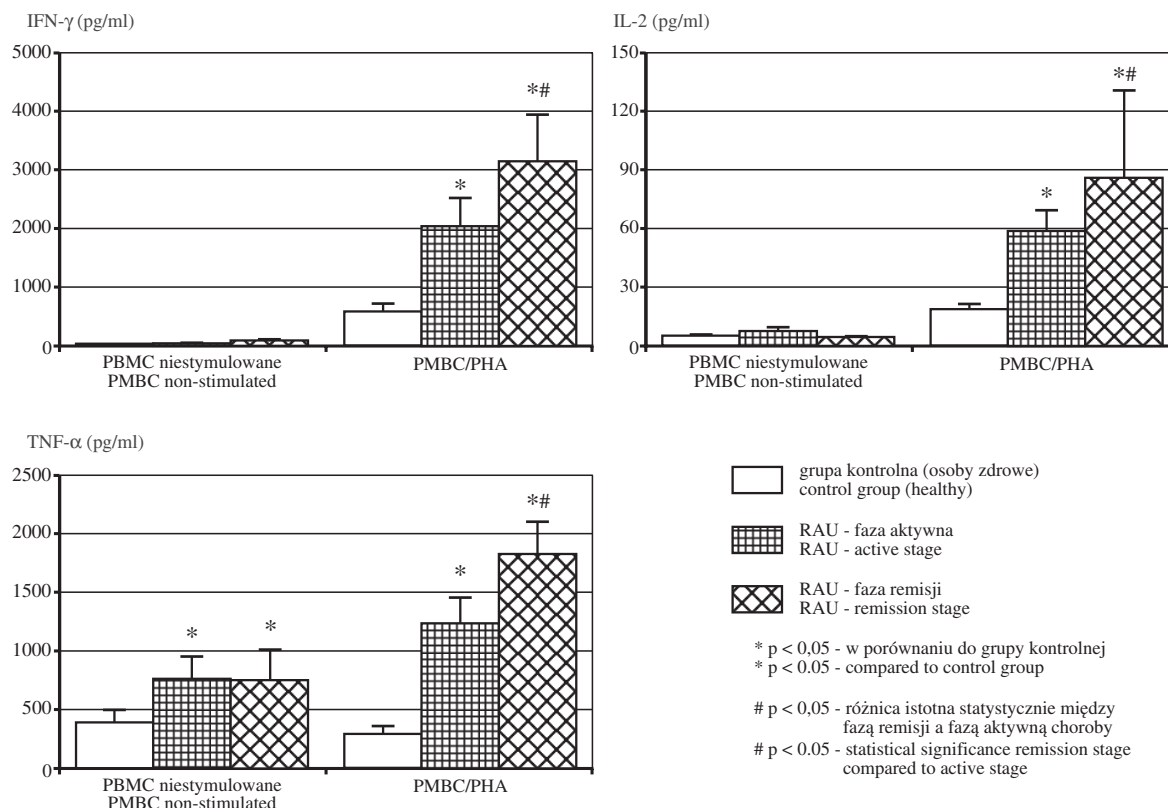
W hodowlach niestymulowanych zaobserwowano większe wydzielanie TNF-α u osób chorych niezależnie od fazy choroby, a także IFN-γ u chorych w fazie remisji. Stężenie IL-10 i TGF-β1 bez stymulacji było znacząco niższe u osób chorych zarówno w fazie aktywnej choroby, jak i remisji – podobnie jak w hodowlach stymulowanych.

## Omówienie

Mimo wieloletnich badań nad patogenezą aft nawracających, wyniki ich nie pozwalają ani potwierdzić, ani wykluczyć autoimmunizacyjnej teorii rozwoju choroby. Podatność na choroby autoimmunizacyjne zależy od wielu czynników, m.in.

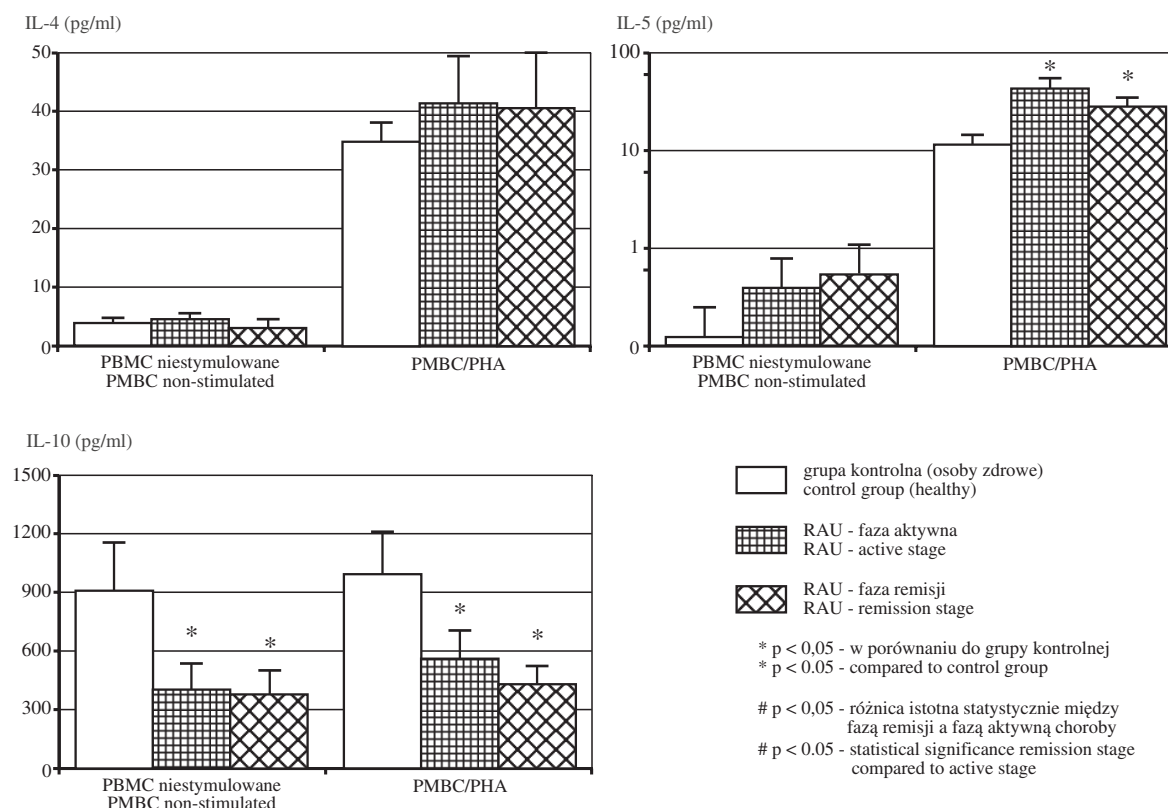
genetycznych i środowiskowych [10]. Mimo złożonych mechanizmów kontrolujących wykształcenie tolerancji, w organizmie zdrowych osób znajdują się autoreaktywne limfocyty T i B, które są zdolne do proliferacji w swoistych warunkach. Do rozwoju autoimmunizacji predysponuje dominacja cytokin prozapalnych (IL-2, IL-12, IFN-γ i TNF-α), duże stężenie autoantygenu (pierwotne zapalne niszczenie tkanek), zaburzona apoptoza i nieprawidłowo działające mechanizmy supresji obwodowej z udziałem limfocytów regulatorowych [11].

W przeprowadzonych badaniach oceniono profil wydzielania cytokin przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej jako jednego z możliwych czynników predysponujących do autoimmunizacji. U chorych z RAU zaobserwowano przewagę wytwarzania cytokin typu Th1: IL-2, IFN-γ i TNF-α, przy jednoczesnym obniżonym wydzielaniu cytokin o działaniu przeciwzapalnym: IL-10 i TGF-β1. Wykazane zaburzenia stwierdzono zarówno w fazie aktywnej choroby, jak i w fazie remisji, co może sugerować obecność uwarunkowania genetycznego do wydzielania określonego profilu cytokin u osób z aftami nawracającymi. Wyniki obserwacji własnych są zgodne z wcześniejszymi badaniami wydzielanych cytokin u pacjentów z aftami nawracającymi, przeprowadzonymi me-



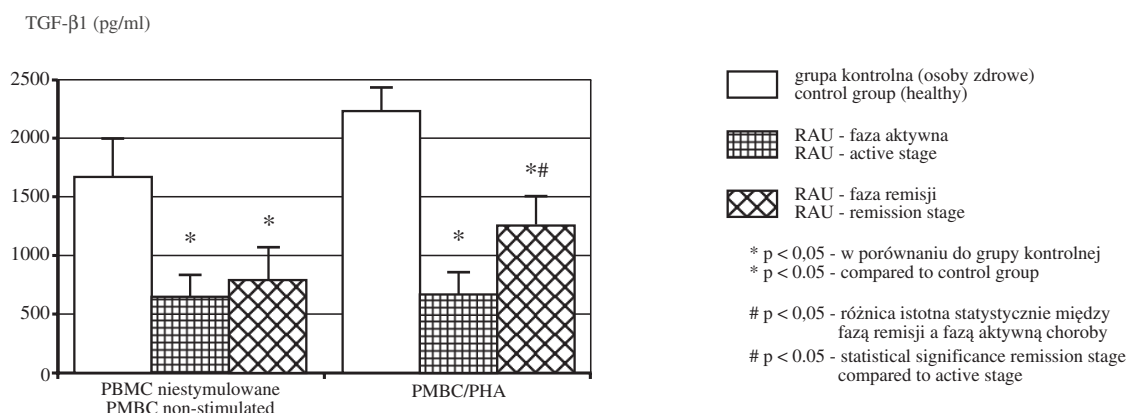
**Ryc. 2.** Poziom wydzielania cytokin typu Th1 (wartości średnie  $\pm$  SEM) przez komórki jednójdrzaste krwi obwodowej w 21-godzinnych hodowlach bez pobudzenia (PBMC niestymulowane) i stymulowanych PHA (5  $\mu$ g/ml, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)

**Fig. 2.** Levels of Th1 type cytokine production (mean  $\pm$  SEM) by PBMC cultured for 21 hours and unstimulated or stimulated with PHA (5  $\mu$ g/ml, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)



**Ryc. 3.** Poziom wydzielania cytokin typu Th2 (wartości średnie  $\pm$  SEM) przez komórki jednójdrzaste krwi obwodowej w 21-godzinnych hodowlach bez pobudzenia (PBMC niestymulowane) i stymulowanych PHA (5  $\mu$ g/ml, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)

**Fig. 3.** Levels of Th2 type cytokine production (mean  $\pm$  SEM) by PBMC cultured for 21-hours and unstimulated or stimulated with PHA (5  $\mu$ g/ml, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)



**Ryc. 4.** Poziom wydzielania TGF-β1 (wartości średnie ± SEM) przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej w 21-godzinnych hodowlach bez pobudzenia (PBMC niestymulowane) i stymulowanych PHA (5 µg/ml, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)

**Fig. 4.** Level of TGF-β1 production (mean ± SEM) by PBMC cultured for 21 hours and unstimulated or stimulated with PHA (5 µg/ml, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)

tołą PCR i dotyczącymi błony śluzowej jamy ustnej zmienionej i niezmienionej chorobowo [9].

Przewaga wydzielania cytokin prozapalnych przez PBMC krwi obwodowej i komórki błony śluzowej sprzyja dojrzewaniu komórek dendrytycznych pochodzących z błony śluzowej jamy ustnej. Takie w pełni dojrzałe komórki dendrytyczne mogą prezentować antygeny bakterii saprofitycznych lub autoantygeny limfocytom Th w węzłach chłonnych. Następstwem jest aktywacja i ekspansja limfocytów T oraz ich migracja do błony śluzowej jamy ustnej. Potwierdzeniem takiej możliwości mogą być badania immunohistochemiczne, które wykazały dominującą obecność limfocytów T CD4 i dużą ekspresję MHC klasy II we wczesnych stadiach zmian aftowych [12–14]. Dlatego jest prawdopodobne, że zachwianie równowagi wydzielania cytokin pro- i przeciwzapalnych może być przyczyną rozwoju autoimmunizacji zależnej od limfocytów T i wystąpienia aft nawracających.

Zaburzenia w wydzielaniu cytokin mogą mieć również wpływ na pobudzenie odporności nie-

swoistej u chorych z aftami nawracającymi niezależnie od fazy choroby, co zostało wykazane we wcześniejszych badaniach autorów [15]. Poziom wydzielania TNF-α, głównego stymulatora układu odporności nieswoistej, był znacznie podwyższony u chorych zarówno w fazie aktywnej, jak i remisji. Niestymulowane komórki jednojądrzaste krwi obwodowej od chorych z aftami wytwarzały ponadto większe ilości TNF-α niż u osób zdrowych. Świadczy to o stałym wysokim poziomie wydzielania tej cytokiny w aftach nawracających.

Wyniki obecnych badań ułatwiają poszukiwanie skutecznego leczenia aft nawracających. Wydaje się uzasadnione stosowanie leków immunosupresyjnych lub wpływających na polaryzację limfocytów Th1/Th2 z jednoczesnym monitorowaniem stężeń cytokin prozapalnych i równowagi Th1/Th2 w czasie leczenia. Powyższe obserwacje wymagają dalszych badań z indywidualnym doborem leków i oceną wskaźników immunologicznych przed i w czasie leczenia.

## Piśmiennictwo

- [1] GRAYKOWSKI E. A., BARILE M. F., LEE W. B., TANLEY H. R.: Recurrent aphthous stomatitis. Clinical, therapeutic, histopathologic and hypersensitivity aspects. J. Am. Med. Assoc. 1966, 196, 637–644.
- [2] LEHNER T.: Autoimmunity in oral diseases, with special reference to recurrent oral ulceration. Proc. R. Soc. Med. 1968, 61, 515–524.
- [3] HASAN A.: Recognition of a unique peptide epitope of the mycobacterial and human heat shock protein 65-60 antigen by T cells of patients with recurrent oral ulcers. Clin. Exp. Immunol. 1995, 99, 392–397.
- [4] HASAN A., SHINNICK T., MIZUSHIMA V., VAN DER ZEE R., LEHNER T.: Defining a T-cell epitope within HSP 65 in recurrent aphthous stomatitis. Clin. Exp. Immunol. 2002, 128, 318–325.
- [5] SUN A., CHIA J. S., CHIANG C. P.: Increased proliferative response of peripheral blood mononuclear cells and T cells to *Streptococcus mutans* and glucosyltransferase D antigens in the exacerbation stage of recurrent aphthous ulcerations. J. Formos. Med. Assoc. 2002, 101, 560–566.
- [6] MOSMANN T. R., COFFMAN R. L.: Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol. 1989, 7, 145–173.



- [7] COFFMAN R. L., MOSMANN T. R.: CD4<sup>+</sup> T-cell subsets: regulation of differentiation and function. *Res. Immunol.* 1991, 142, 7–9.
- [8] GORELIK L., FLAVELL R. A.: Abrogation of TGF- $\beta$  signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 2000, 12, 171–181.
- [9] BUNO I. J., HUFF J. C., WESTON W. L., COOK D. T., BRICE S. L.: Elevated levels of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha, interleukins 2, 4, and 5, but not interleukin 10, are present in recurrent aphthous stomatitis. *Arch. Dermatol.* 1998, 134, 827–831.
- [10] DAVIDSON A., DIAMOND B.: Autoimmune diseases. *N. Engl. J. Med.* 2001, 345, 340–350.
- [11] TCHÓRZEWSKI H.: Autoimmunity and allergy – a double edged sword. *Int. Rev. Allerg. Clin. Immunol.* 2002, 8, 71–75.
- [12] POULTER L.W., LEHNER T.: Immunohistology of oral lesions from patients with recurrent oral ulcers and Behcet's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 1989, 78, 189–195.
- [13] HAYRINEN-IMMONEN R.: Immune activation in recurrent oral ulcers. *Scand. J. Dent. Res.* 1992, 100, 222–227.
- [14] HAYRINEN-IMMONEN R., NORDSTROM D., MALMSTROM M., HIETANEN J., KONTTINEN Y. T.: Immune-inflammatory cells in recurrent oral ulcers. *Scand. J. Dent. Res.* 1991, 99, 510–518.
- [15] LEWKOWICZ N., LEWKOWICZ P., KURNATOWSKA A., BANASIK M., GŁOWACKA E., CEDZYŃSKI M., ŚWIERZKO A., LAUK-PUCHAŁA B., TCHÓRZEWSKI H.: Innate immune system is implicated in recurrent aphthous ulcer pathogenesis. *J. Oral Pathol. Med.* 2003, 32, 475–481.

### Adres do korespondencji:

Natalia Lewkowicz  
Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej UM  
ul. Pomorska 251  
92-213 Łódź  
e-mail: natalewk@wp.pl  
tel.: +48 42 675 75 40

Praca wpłynęła do Redakcji: 29.04.2004 r.

Po recenzji: 16.06.2004 r.

Zaakceptowano do druku: 16.06.2004 r.

Received: 29.04.2004

Revised: 16.06.2004

Accepted: 16.06.2004