

NATALIA LEWKOWICZ¹, HENRYK TCHÓRZEWSKI², ANNA J. KURNATOWSKA¹,
PRZEMYSŁAW LEWKOWICZ²

Obecność autoprzeciwciał przeciw desmosomom u chorych z aftami nawracającymi*

Presence of Antibodies Against Prickle Cell Desmosomes in Patients with Recurrent Aphthous Ulceration

¹ Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej UM w Łodzi

² Zakład Immunologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

Streszczenie

Wprowadzenie. Etiologia aft nawracających nie jest dostatecznie poznana. Wyniki niektórych badań wskazują na autoimmunizacyjny charakter aft nawracających z obecnością zarówno mechanizmów humoralnych, jak i komórkowych świadczących o autoimmunizacji.

Cel pracy. Ocena obecności niektórych autoprzeciwciał w surowicy chorych z aftami nawracającymi w aktywnej fazie choroby.

Materiał i metody. Zbadano 19 chorych z aftami nawracającymi w aktywnej fazie choroby oraz 20 osób zdrowych. Technika immunofluorescencji pośredniej oceniono obecność autoprzeciwciał przeciw błonie podstawnej, desmosomom warstwy kolczystej oraz przeciwciał przeciwjądrowych w surowicy chorych. Zbadano ponadto wpływ surowicy na proliferację i aktywność metaboliczną komórek linii ustalonej HeLa B u pacjentów w aktywnej fazie choroby.

Wyniki. Wynik dodatni na obecność autoprzeciwciał stwierdzono u 16 spośród 19 przebadanych pacjentów. U 13 chorych wykryto przeciwciała przeciw desmosomom ($p < 0,001$), u 5 chorych stwierdzono obecność przeciwciał przeciwjądrowych w surowicy, w tym u 2 osób także przeciwciała przeciw błonie podstawnej. Wykryte przeciwciała w surowicach osób z aftami nawracającymi miały wpływ na zahamowanie proliferacji komórek linii HeLa B w hodowli ($p < 0,05$).

Wnioski. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na możliwość współwystępowania podobnego typu przeciwciał w chorobach błony śluzowej o odmiennej symptomatologii klinicznej. Obecność autoprzeciwciał przeciw różnym strukturom nabłonka u chorych z aftami nawracającymi jest kolejnym dowodem na autoimmunizacyjny charakter choroby (*Dent. Med. Probl.* 2004, 41, 4, 661–669).

Słowa kluczowe: afty nawracające, autoprzeciwciała, autoimmunizacja.

Abstract

Background. Aetiology of recurrent aphthous ulceration (RAU) is still poor explained. Recent studies have suggested possible autoimmune scenario for RAU development with involvement of both humoral and cell-mediated mechanisms.

Objectives. In this study we analysed the presence of autoantibodies against different antigens of epithelium in RAU patients in the active stage of the disease.

Material and Methods. Sera were obtained from 19 RAU patients in the active stage of the disease, and 20 healthy individuals. Antibodies against prickle cell desmosomes and basement membrane were detected using tissue sections of primate tongue and oesophagus. Antibodies against cell nuclei were detected using HEp-2 cells. Presence of antibodies was detected using indirect immunofluorescence tests. The effect of sera from RAU patients on HeLa B cell proliferation and metabolism was evaluated using chemiluminescence and colorimetric techniques.

Results. We detected antibodies against different antigens of epithelium in 16 of 19 tested RAU patients, and 13 of them were positive for antibodies against desmosomes ($p < 0.001$). In 5 RAU patients antinuclear antibodies were

* Praca finansowana w ramach grantów KBN nr 2 P05E 091 26 i nr 3 P05A 067 25.

present, and 2 of them were also positive for antiepithelial basement membrane. Antibodies detected in sera of RAU individuals had the inhibitory effect on HeLa B cell proliferation ($p < 0.05$).

Conclusions. In this study we have shown the coexistence of different antibodies in RAU that are believed to be specific for bullous dermatoses. Presence of autoantibodies against various epithelial antigens in RAU may prove an autoimmune background of the disease (**Dent. Med. Probl.** 2004, 41, 4, 661–669).

Key words: recurrent aphthous ulceration, autoantibodies, autoimmunity.

Afty nawracające (RAU – *recurrent aphthous ulceration*) to choroba o niewyjaśnionej etiologii. Mimo iż badania nad patogenezą choroby są prowadzone od wielu lat, wyniki nie pozwalają ani potwierdzić, ani wykluczyć autoimmunizacyjnego podłoża choroby. Za tą koncepcją wydaje się przemawiać nawrotowy przebieg choroby z tendencją do selektywnej migracji komórek immunokompetentnych do miejsca rozwoju afty i wybiórczym niszczeniem nabłonka oraz przewaga profilu cytokin typu Th1 u chorych, co predysponuje do rozwoju autoimmunizacji [1, 2]. Podkreśla się ponadto rolę czynników zakaźnych w rozwoju aft nawracających, gdyż bakterie kolonizujące jamę ustną, takie jak *Streptococcus sanguis* i *Streptococcus mutans*, a także wirusy z rodziny *Herpesviridae* mogą stać się celem komórek układu immunologicznego u osób predysponowanych, generując proliferację limfocytów autoreaktywnych [3–5].

Innym czynnikiem mogącym wskazywać na autoimmunizacyjny charakter aft nawracających jest obecność różnego typu autoprzeciwciał w surowicy osób chorych. W badaniach na grupie 88 chorych u 68% wykryto przeciwciała przeciwko komórkom nabłonka, w grupie osób zdrowych natomiast nie odnotowano obecności tych przeciwciał [6]. Healy et al. [7] badali obecność autoprzeciwciał charakterystycznych dla zapalenia naczyń u chorych z aftami nawracającymi. Wykazano obecność przeciwciał przeciwko komórkom śródbłonka (AECA – *antiendothelial cell autoantibodies*) u 19 spośród 20 badanych pacjentów z aftami. Ich poziom był wyższy w fazie aktywnej choroby. Przeciwciała skierowane przeciwko cytoplazmie neutrofilów (ANCA – *antineutrophil cytoplasmic autoantibodies*) zostały natomiast wykryte tylko u 1 z 20 badanych osób z aftami nawracającymi. U 17% chorych z aftami wykryto w surowicy także przeciwciała przeciwko komórkom mięśni gładkich (ASMA – *antismooth muscle autoantibodies*), które nie występowały u osób zdrowych [8].

Choroby o udokumentowanym podłożu autoimmunizacyjnym w obrębie jamy ustnej, takie jak pęcherzyca i pemfigoid, zostały zbadane pod kątem obecności swoistych autoprzeciwciał i odpowiadającym im autoantygenów. Przeciwciała te dotyczą antygenów desmosomalnych w pęcherzycy i antygenów związanych z błoną podstawną w pemfigoidzie [9]. W zależności od rodzaju autoantygeny, ob-

jawy kliniczne tych chorób mogą znacznie się różnić, co daje podstawę do postawienia hipotezy, że przeciwciała przeciwko różnym strukturom nabłonka mogą występować w innych chorobach błony śluzowej przebiegających z niszczeniem nabłonka, także w aftach nawracających.

Celem pracy była ocena obecności przeciwciał skierowanych przeciwko desmosomom warstwy kolczystej, błonie podstawnej oraz przeciwciał przeciwko ANA – *antinuclear antibodies* w surowicy chorych z aftami nawracającymi w aktywnej fazie choroby. U chorych wykryto obecność autoprzeciwciał przeciw błonie podstawnej i desmosomom na substratach małych z błony śluzowej języka i przelyku, a przeciwciała przeciwciałowe na komórkach linii HEp-2 (*human epithelial cells*). Oceniono ponadto wpływ surowic pacjentów w aktywnej fazie choroby na proliferację i aktywność metaboliczną komórek linii ustalonej HeLa B.

Material i metody

Do badań zakwalifikowano 19 chorych z małymi aftami nawracającymi w aktywnej fazie choroby: 12 mężczyzn, 9 kobiet w wieku 19–56 lat (średnia wieku $36,8 \pm 12,31$ lat). Wybrani pacjenci byli ogólnie zdrowi i nie przyjmowali leków, a częstotliwość nawrotów aft w półrocznym okresie poprzedzającym badania nie była mniejsza niż jeden epizod w miesiącu. Grupę porównawczą do badań nad proliferacją i metabolizmem komórek HeLa B stanowiło 20 osób zdrowych. Od każdej osoby badanej została pobrana krew z żyły łokciowej do probówki na skrzep. Próbkę wirowano 3000 obr./min przez 10 minut w celu uzyskania surowicy. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Ocena obecności autoprzeciwciał metodą immunofluorescencji pośredniej (IIF – *indirect immunofluorescence*)

Do badań metodą immunofluorescencji pośredniej wykorzystano materiały i odczynniki firmy Euroimmun AG, Luebeck, Germany. Badanie

przeciwciał skierowanych przeciw desmosomom i błonie podstawnej przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch rodzajów substratów: błony śluzowej języka i przełyku małpy. Skrawki substratów, naniesione na szkiełka podstawowe, inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej z surowicą badaną rozcieńczoną w PBS-Tween (1 : 10). Odpłukane substraty (PBS-Tween) inkubowano z poliwalentną surowicą skierowaną przeciwko ludzkiej immunoglobulinie (kozia immunoglobulina znakowana fluoresceiną – FITC, rozcieńczona w stosunku 1:10 w PBS-Tween). Zastosowanie poliwalentnej surowicy jako reagenta wykrywającego przeciwciała związane z substratem pozwoliło na wykrycie swoistych przeciwciał w klasie IgA, IgG oraz IgM. Kontrolę dodatnią stanowiły surowice zawierające przeciwciała przeciw błonie podstawnej oraz desmosomom.

Ocena obecności przeciwciał przeciwdrozwych wykonano techniką IIF z wykorzystaniem jako substratu komórek nabłonkowych linii ustalonej HEp-2, wyprowadzonej z komórek raka krtani. Komórki HEp-2, naniesione na szkiełka podstawowe, inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej z surowicą badaną, rozcieńczoną w PBS-Tween (1:100). Odpłukany substrat inkubowano z poliwalentną surowicą skierowaną przeciwko ludzkiej immunoglobulinie (kozia immunoglobulina znakowana FITC, rozcieńczona 1 : 10 w PBS-Tween). Kontrolę dodatnią stanowiła surowica zawierająca przeciwciała przeciwdrozwowe o homogenym typie świecenia. Miano graniczne metody wynosiło 1:100. Ocenę obecności związanych autoprzeciwciał wykonano mikroskopem fluorescencyjnym z przystawką do archiwizacji obrazu (Carl Zeiss Jena, „Junalumar”).

Hodowla komórek HeLa B

Linia komórkowa HeLa B (komórki nabłonkowe z raka szyjki macicy) została pozyskana z Centrum Wirusologii i Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Komórki HeLa inkubowano z surowicami „świeżymi” oraz inaktywowanymi (56°C, 30 min). Inaktywacja surowicy (*heat inactivation*) polegająca na ogrzaniu surowicy do 56°C przez 30 minut, niszczy składniki układu dopełniacza, cytokiny i czynniki wzrostu, pozostawiając nienaruszone immunoglobuliny klas IgA, IgG i IgM, które w temperaturze 56–60°C są stabilne [10]. Komórki HeLa B zawieszono w płynie hodowlanym o składzie: płyn Parkera (45% v/v) (BioMed, Lublin), płyn Hanksa (45% v/v) (BioMed), surowica cielęca (10% v/v) (BioMed), antybiotyki (1% penicylina oraz streptomycyna (Sigma-Aldrich). Zawiesinę ko-

mórek HeLa B o gęstości 5×10^4 kom./ml inkubowano wraz z badanymi surowicami (świeżymi oraz podanymi uprzednio inaktywacji cieplnej) przez 72 godziny (37°C, 5% CO₂) na 96 celkowych płytkach (Nunc A/S, Roskilde, Dania) w stosunku 100 µl zawiesiny komórek do 10 µl surowicy.

Ocena proliferacji komórek HeLa

Komórki HeLa B inkubowano z badanymi surowicami w warunkach opisanych powyżej. Po okresie inkubacji oceniono proliferację komórek HeLa B metodą kolorymetryczną inkorporacji i redukcji enzymatycznej soli WST-8 za pomocą zestawu Cell Counting Kit 8 firmy Alexis, USA. Pomiar proliferacji wykonano dodając do badanej hodowli 10 µl WST-8 (sól sodowa – 2-2-metoksy-4-nitrofenylu)-5-(2,4-disulfofenylu)-2H tetrazoliiny) i dokonując pomiaru ekstynkcji w czterech punktach czasowych (po 1, 2, 3 i 4 godzinach inkubacji, 37°C, 5% CO₂). Metoda ta jest oparta na redukcji enzymatycznej WST-8, pod wpływem działania wewnątrzkomórkowej dehydrogenazy, w rozpuszczalny w wodzie żółty farmazon. Ilość powstałego barwnego farmazonu jest proporcjonalna do aktywności enzymu, którego aktywność enzymatyczna jest proporcjonalna do liczby komórek. Ilość żółtego farmazonu zmierzono kolorymetrycznie spektrofotometrem (Labsystems) przy λ – 460 nm (filtr odczytu) i 600 nm (filtr referencyjny).

Ocena aktywności metabolicznej komórek HeLa

Komórki HeLa B inkubowano z badanymi surowicami w warunkach opisanych wyżej. Po okresie inkubacji oceniono aktywność metaboliczną komórek HeLa B, mierząc poziom wewnątrzkomórkowego 5’adenozyno trifosforanu (ATP) z użyciem zestawu CytoPro Kit firmy Thermo Labsystems, Helsinki, Finland. Metoda jest oparta na założeniu, iż wzrost wydzielania ATP jest charakterystyczny dla komórek aktywowanych i proliferujących. Do 100 µl zawiesiny komórkowej dodawano 100 µl enzymu samolizyny i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie do 180 µl ekstraktu zawierającego komórkowy ATP dodano 20 µl ATP monitoring reagent (Thermo Labsystems). W reakcji egzoergicznej utleniania D-lucyferyny do oksylucyferyny, produktem ubocznym są kwanty światła, których liczba jest wprost proporcjonalna do ilości ATP. Chemiluminescencja reakcji enzymatycznej utleniania D-lucyferyny została zmierzona luminome-

trem MLX Microtiter Plate Luminometr, Dynex, USA. Wartość ATP wyrażono w nM.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną autoprzeciwciał w badanej grupie dokonano testem χ^2 z przyjętym założeniem, iż w populacji osób zdrowych obecność tych przeciwciał jest < 1%. Z tego względu dla tej grupy badań za istotne statystycznie przyjęto wartości $p < 0,001$.

Weryfikację statystyczną wpływu surowicy osób z aftami nawracającymi na metabolizm i proliferację komórek HeLa B w stosunku do osób zdrowych przeprowadzono testem t-Studenta z przyjętym założeniem, iż otrzymany rozkład jest zgodny z rozkładem normalnym. Wartości $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

Wyniki

Obecność autoprzeciwciał w surowicy chorych z aftami nawracającymi

Badanie obecności przeciwciał w surowicy skierowanych przeciw strukturom nabłonka błony śluzowej zostało ocenione metodą immunofluorescencji pośredniej. Do oceny przeciwciał na substratach tkankowych małych zastosowano rozcieńczenie surowicy 1:10, a w przypadku oceny ANA rozcieńczenie wynosiło 1:100. Zestawienie wyników badań IIF przedstawiono w tabeli 1.

Przeciwciała przeciwjądrowe zostały wykryte u 5 spośród 19 badanych pacjentów, w tym u 4 stwierdzono typ świecenia jądrowego (ryc. 1). Przeciwciała przeciwko błonie podstawnej, przy

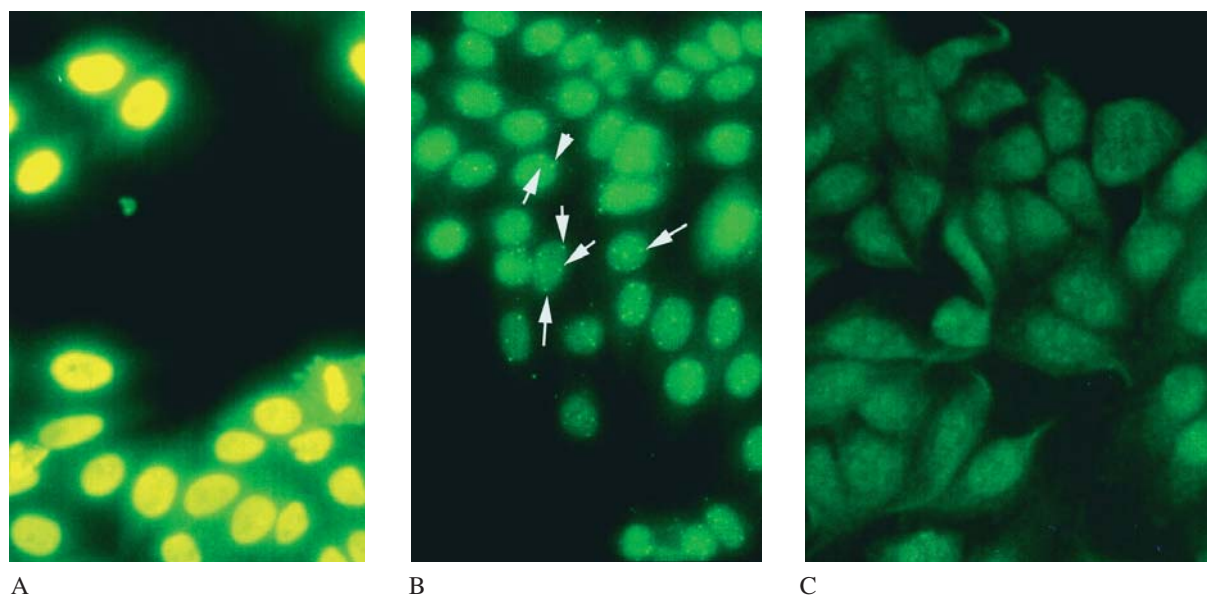
Tabela 1. Wykaz przeciwciał wykrytych metodą immunofluorescencji pośredniej w surowicy pacjentów z aftami nawracającymi w aktywnej fazie choroby

Table 1. Antibodies detected in sera of RAU patients with active lesions using indirect immunofluorescence tests

Numer pacjenta (Number of patient)	Rodzaj substratu (Type of substrate)							Obecność autoprzeciwciał (Presence (of auto-anti-bodies)
	Hep-2 – miano graniczne ≥ 1:10 (Hep-2 – titer ≥ 1:10)		błona śluzowa przełyku małpy – miano graniczne ≥ 1:10 (primate oesophagus sections – titer ≥ 1:10)		błona śluzowa języka małpy – miano graniczne ≥ 1:10 (primate tongue sections – titer ≥ 1:10)			
	ANA	typ świecenia (fluorescence pattern)	błona podstawna (basement membrane)	desmosomy (desmosoms)	błona podstawna (basement membrane)	desmosomy (desmosoms)	świecenie komórkowe (cell fluorescence)	
1	+	jąderkowe homogenne	–	–	–	–	–	+
2	+		–	+	–	–	–	+
3	–		–	+	–	+	–	+
4	–		–	+	–	–	–	+
5	–		–	–	–	–	–	–
6	–	jąderkowe	–	+	–	–	–	+
7	+		+	–	–	+	+	+
8	–		–	+	–	–	–	+
9	–		–	–	–	–	–	–
10	+		jąderkowe	–	–	–	–	+
11	–	jąderkowe	–	+	–	–	–	+
12	+		+	–	–	–	–	+
13	–		–	+	–	–	+	+
14	–		–	+	–	–	–	+
15	–		–	+	–	+	–	+
16	–	jąderkowe	–	–	–	–	–	–
17	–		–	+	–	–	–	+
18	–		–	+	–	–	–	+
19	–		–	+	–	+	–	+
Σ	5			2	12	0	4	3

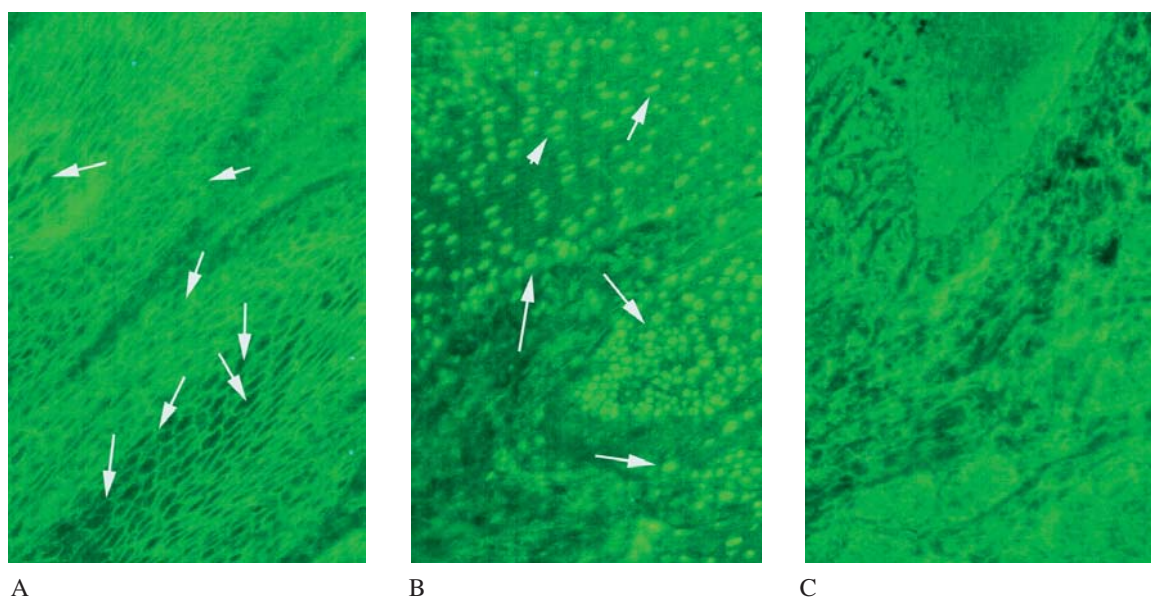
(+) – obecne przeciwciała, (–) – przeciwciał nie wykryto.

(+) – antibodies, (–) – no antibodies detected.



Ryc. 1. Przykład wykrywania przeciwciał przeciwjądrowych w surowicy (rozcieńczenie 1:100) na komórkach Hep-2 jako substrat, metodą IIF: **A** – pacjent nr 2 (wg tab. 1) – typ świecenia homogenne, **B** – pacjent nr 1 – typ świecenia jąderkowe, **C** – kontrola ujemna. Powiększenie 1250×

Fig. 1. Detection of antinuclear antibodies in sera diluted 1:100 using Hep-2 cells as a substrate for IIF tests (×1250): **A** – patient nr 2 (according to table 1) – homogenous fluorescence pattern, **B** – patient nr 1 – granular fluorescence pattern, **C** – negative control



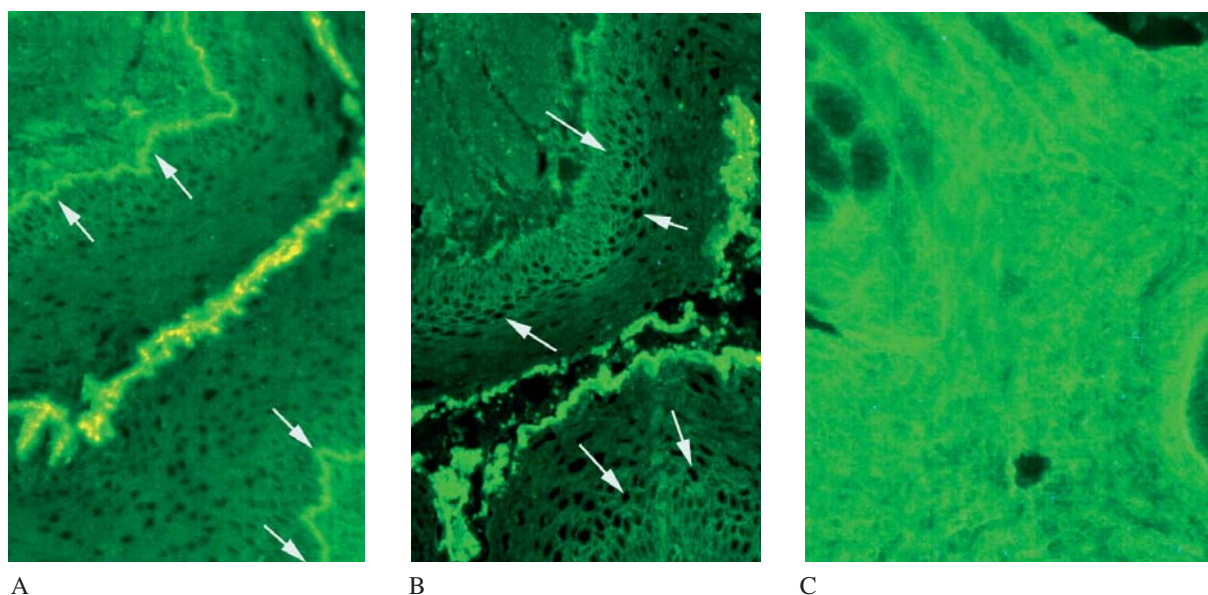
Ryc. 2. Przykład analizy wykrywania przeciwciał w surowicy (rozcieńczenie 1:10) metodą IIF z użyciem jako substratu błony śluzowej języka małpy: **A** – pacjent nr 3 – przeciwciała przeciw desmosomom, **B** – pacjent nr 13 – świecenie komórkowe homogenne, **C** – kontrola ujemna. Powiększenie 1250×

Fig. 2. Detection of antibodies in sera diluted 1:10 using primate tongue sections as a substrate for IIF tests (×1250): **A** – patient nr 3 – antibodies against desmosoms, **B** – patient nr 13 – homogenous fluorescence pattern, **C** – negative control

wykorzystaniu błony śluzowej przełyku małpy jako substratu, stwierdzono u 2 chorych, natomiast na substracie z błony śluzowej języka małpy przeciwciała te były ujemne u wszystkich badanych (ryc. 2, 3). Należy zaznaczyć, że u tych samych 2 pacjentów wykryto wcześniej przeciwciała prze-

ciwjądrowe, a u jednego z nich także przeciwciała przeciw desmosomom na substracie pochodzącym z języka małpy.

Najwięcej dodatnich wyników uzyskano w przypadku przeciwciał przeciw desmosomom z użyciem błony śluzowej przełyku małpy jako



Ryc. 3. Przykład wykrywania przeciwciał w surowicy (rozcieńczenie 1:10) metodą IIF z użyciem jako substratu błony śluzowej przełyku małpy: **A** – pacjent nr 7 – przeciwciała przeciw błonie podstawnej, **B** – pacjent nr 6 – przeciwciała przeciw desmosomom, **C** – kontrola ujemna. Powiększenie 1250×

Fig. 3. Detection of antibodies in sera diluted 1:10 using primate oesophagus sections as a substrate for IIF tests ($\times 1250$): **A** – patient nr 7 – antibodies against basement membrane, **B** – patient nr 6 – antibodies against desmosoms, **C** – negative control

substratu – u 12 chorych stwierdzono obecność tych przeciwciał (ryc. 3) ($p < 0,001$). Znacznie mniejsza liczba dodatnich wyników dla przeciwciał przeciw desmosomom została uwidoczniła po zastosowaniu błony śluzowej języka małpy jako substratu (4 pacjentów). Na podkreślenie zasługuje ponadto wykazanie u 3 chorych przeciwciał ANA na substracie tkankowym z języka małpy, w tym u 1 z tych pacjentów przeciwciała ANA wypadły ujemnie we wcześniejszych badaniach na komórkach HEp-2 (ryc. 2B). Podsumowując, u 16 spośród 19 badanych chorych wykryto auto-przeciwciała, w tym u 4 współwystępowanie dwóch lub więcej rodzajów przeciwciał.

Wpływ surowicy chorych z aftami nawracającymi na metabolizm i proliferację komórek HeLa B

Aby sprawdzić, czy wykryte autoprzeciwciała mają właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek nabłonkowych, wykonano ocenę proliferacji i aktywności metabolicznej komórek HeLa B w hodowli z surowicami pacjentów będących w aktywnej fazie choroby. Do badań zastosowano surowice „świeże” i inaktywowane termicznie, co powodowało, że inaktywowane zostały składniki układu dopełniacza, cytokiny i czynniki wzrostu, a pozostawały jedynie immunoglobuliny.

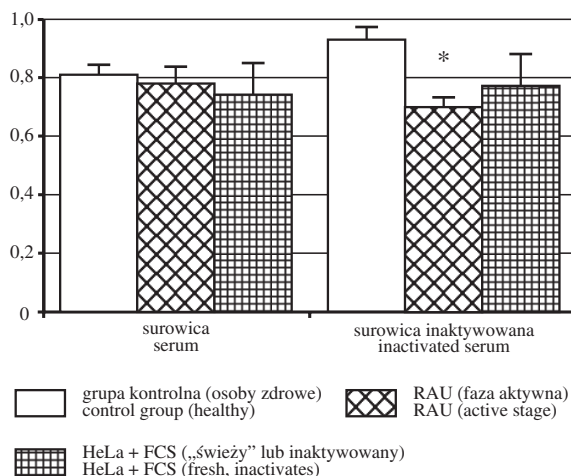
Wykazano, że na obniżenie proliferacji ko-

mórek HeLa B miały wpływ surowice inaktywowane osób chorych ($p < 0,05$), a surowice świeże osób chorych nie wpływały na proliferację komórek nabłonkowych (ryc. 4). Przeciwnie, surowice świeże od osób z aftami nawracającymi zwiększały aktywność metaboliczną komórek nabłonkowych, mierzoną ilością wewnątrzkomórkowego ATP ($p < 0,05$), lecz takiego wpływu nie miały surowice inaktywowane osób chorych (ryc. 5).

Omówienie

Przełamanie mechanizmów chroniących organizm przed odpowiedzią immunologiczną w stosunku do własnych antygenów może doprowadzić do rozwoju autoimmunizacji, w której wiodącą rolę odgrywają autoreaktywne limfocyty T i B. Produktem pobudzonych autoreaktywnych limfocytów B są przeciwciała skierowane przeciwko własnemu antygenom. Takie przeciwciała mogą powstawać pierwotnie, w wyniku przełamania mechanizmów tolerancji, i wówczas są przyczyną niszczenia własnych komórek po związaniu do autoantygenów. Autoprzeciwciała mogą powstawać także wtórnie na skutek toczących się procesów zapalnych lub autoimmunizacyjnych zapoczątkowanych przez mechanizmy odpowiedzi komórkowej. Dochodzi wówczas do przełamania mechanizmu „ignorancji”, ponieważ komórki immunokompetentne w wyniku toczącej się reakcji zapalnej mają kontakt z wcześniej niedostępnymi

proliferaacja komórek HeLa B (absorbancja CCK-B; $\lambda = 450$ nm)
proliferation of the cells HeLa B (absorbance CCK-B; $\lambda = 450$ nm)



* $p < 0,05$ - różnica istotna statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej
* $p < 0,05$ - statistical significance compared to control group

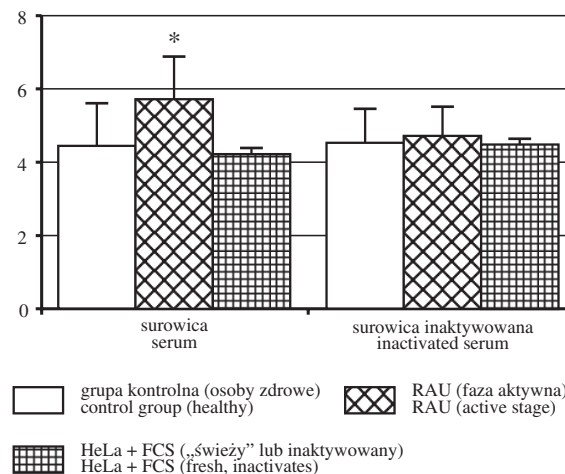
Ryc. 4. Analiza proliferacji komórek HeLa B hodowanych z surowicami pacjentów z aftami nawracającymi w aktywnej fazie choroby, u których wykryto auto-przeciwciała oraz z surowicami osób zdrowych (wartości średnie \pm SD). Komórki HeLa B inkubowano przez 72 godz., 37°C, 5% CO₂ z surowicami „świeżymi” oraz inaktywowanymi (56°C, 30 min). Kontrolę ujemną stanowiła surowica cielęca (Fetal Calf Serum; FCS) świeża oraz inaktywowana w takich samych warunkach jak surowica badana

Fig. 4. Effect of sera from RAU patients in the active stage of the disease with detected autoantibodies and healthy individuals on HeLa B cell proliferation (mean \pm SD). HeLa B cells were incubated for 72 hours, 37°C, 5% CO₂ with fresh and inactivated (56°C, 30 min) sera. Fresh and inactivated fetal calf serum (FCS) was used as negative control

(ukrytymi) autoantygenami [11]. Zgodnie z tym autoprzeciwciała wtórne mogą nie być bezpośrednią przyczyną powstawania objawów chorobowych w przebiegu autoimmunizacji. W ostatnich latach powiększyła się liczba chorób jamy ustnej, w patogenezie których udział biorą autoprzeciwciała. Oprócz wcześniej poznanych chorób o podłożu autoimmunizacyjnym, takich jak: pęcherzyca, pemfigoid, choroba Sjögrena czy toczeń rumieniowaty układowy, dodać można chorobę Behceta, przewlekłe wrzodziejące zapalenie błony śluzowej jamy ustnej (CUS), liszaj płaski oraz, prawdopodobnie, afty nawracające [1, 12].

Obecne badania zmierzały do oceny obecności autoprzeciwciał skierowanych przeciwko różnym strukturalnym nabłonka u chorych z aftami nawracającymi w aktywnej fazie choroby. Zastosowane metody miały charakter przesiewowy, bez uwzględnienia zarówno klas wykrywanych przeciwciał, jak i ich swoistości w stosunku do po-

ATP (nM)



* $p < 0,05$ - różnica istotna statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej
* $p < 0,05$ - statistical significance compared to control group

Ryc. 5. Analiza aktywności metabolicznej komórek HeLa B oparta na pomiarze wewnątrzkomórkowego stężenia ATP, hodowanych z surowicami pacjentów z aftami nawracającymi w aktywnej fazie choroby, u których wykryto autoprzeciwciała oraz surowicami osób zdrowych (wartości średnie \pm SD). Komórki HeLa B inkubowano przez 72 godz., 37°C, 5% CO₂ z surowicami „świeżymi” oraz inaktywowanymi (56°C, 30 min). Kontrolę ujemną stanowiła surowica cielęca (FCS) świeża oraz inaktywowana w takich samych warunkach jak surowica badana

Fig. 5. Effect of sera from RAU patients in the active stage of the disease with detected autoantibodies and healthy individuals on HeLa B cell metabolism measured as ATP level (mean \pm SD). HeLa B cells were incubated for 72 hours, 37°C, 5% CO₂ with fresh and inactivated (56°C, 30 min) sera. Fresh and inactivated fetal calf serum (FCS) was used as negative control

szczególnych antygenów nabłonka. Badania IIF były wykonywane w najniższych, dopuszczalnych przez metodę, rozcieńczeniach surowic. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano występowanie przeciwciał przeciwko desmosomom u 13 z 19 przebadanych osób z aftami nawracającymi ($p < 0,001$). Przeciwciała klasy IgG przeciw desmosomom są swoiste dla pęcherzyca i w zależności od postaci klinicznej choroby mogą reagować z różnymi komponentami desmosomów: desmogleiną 1, 2 lub 3, enwoplakiną czy periplakiną [12]. Przeciwciała przeciw błonie podstawnej, charakterystyczne dla pemfigoidu, były obecne tylko u 2 pacjentów. Przeciwciała ANA, które mogą występować w przebiegu wielu chorób o podłożu autoimmunizacyjnym, takich jak: toczeń rumieniowaty układowy, mieszana choroba tkanki łącznej (MCTD), reumatoidalne zapalenie stawów, twardzina układowa, zespół Sjögrena, wrzodziejące zapalenie jelit [13], wykryto u 6 chorych

z aftami nawracającymi. U jednego z pacjentów przeciwciała te zostały wykryte tylko na substracie tkankowym, z jednoczesnym ujemnym wynikiem na komórkach HEp-2. Tego typu przeciwciała są opisywane w przypadku rzadko występującej (rzadko wykrywanej) choroby błony śluzowej jamy ustnej, nazwanej *chronic ulcerative stomatitis* [14].

Wykryte autoprzeciwciała mogą mieć charakter przeciwciał pierwotnych, odpowiedzialnych za powstawanie zmian na błonie śluzowej jamy ustnej i będących głównym czynnikiem etiologicznym. Wydaje się jednak bardziej prawdopodobne, że wykazane przeciwciała mają charakter wtórny, jako odpowiedź układu immunologicznego na pojawienie się nowych autoantygenów na skutek niszczenia błony śluzowej jamy ustnej powodowane przez inne czynniki etiologiczne. Autoprzeciwciała powstające wtórnie będą charakteryzować się niższym mianem i mogą nie brać bezpośredniego udziału w niszczeniu tkanek. Tłumaczy to brak objawów podobnych do pęcherzycy w przebiegu aft nawracających, mimo obecności przeciwciał przeciw desmosomom.

Do oceny cytotoksyczności przeciwciał obecnych w surowicy osób z RAU w stosunku do komórek nabłonkowych wykonano testy proliferacji i metabolizmu komórek HeLa B. Częściowe zahamowanie proliferacji komórek HeLa przez surowice inaktywowane termicznie, zawierające tylko immunoglobuliny, wskazuje na niewielką cytotoksyczność przeciwciał chorych z aftami nawracającymi w stosunku do linii komórek nabłonkowych HeLa B. Jest to zgodne z rodzajem wykry-

tych autoprzeciwciał, ponieważ u większości pacjentów wykryto przeciwciała przeciw desmosomom, które wiążą antygeny powierzchniowe komórek. Obserwowany wzrost metabolizmu wewnątrzkomórkowego pod wpływem surowic świeżych może być m.in. wynikiem wysokiego stężenia składników układu dopełniacza obserwowany u tych pacjentów, a także obecności cytokin i czynników wzrostu w surowicy [15]. Potwierdza to brak wzrostu ATP w badaniach tych samych surowic, poddanych uprzednio inaktywacji, ponieważ składniki dopełniacza, cytokiny i czynniki wzrostu są białkami wrażliwymi na ciepłą inaktywację i w badanym układzie doświadczalnym są nieaktywne. Na podstawie przeprowadzonych badań trudno jest jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie czy obecność wykrytych autoprzeciwciał wpływa destrukcyjnie na komórki błony śluzowej jamy ustnej w warunkach *in vivo*.

Wyniki badań wskazują na możliwość współwystępowania niektórych autoprzeciwciał w chorobach błony śluzowej jamy ustnej o całkowicie odmiennym przebiegu klinicznym. Dalsze, bardziej szczegółowe badania z oceną dokładnego miana przeciwciał, ich klas i swoistości w stosunku do docelowych autoantygenów, przyczynią się do wyjaśnienia znaczenia autoprzeciwciał w patogenezie aft nawracających.

Podziękowanie. Autorzy pracy składają podziękowania prof. dr. hab. med. Zbigniewowi Bajowi, dr n. med. Małgorzacie Banasik, dr n. przyr. Bożenie Lauk-Puchale oraz mgr analityki medycznej Ewie Ligockiej za pomoc przy realizacji pracy.

Piśmiennictwo

- [1] EVERSOLE L. R.: Immunopathogenesis of oral lichen planus and recurrent aphthous stomatitis. *Sem. Cut. Med. Surg.* 1997, 16, 284–294.
- [2] 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.
- [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 HSP65 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] SUN A., HSIEH R. P., LIU B. Y., WANG J. T., LEU J. S., WU Y. C., CHIANG C. P.: Strong association of antiepithelial cell antibodies with HLA-DR3 or DR7 phenotype in patients recurrent oral ulcers. *J. Formos. Med. Assoc.* 2000, 99, 290–294.
- [7] HEALY C. M., CARVALHO D., PEARSON J. D., THORNHILL M. H.: Raised anti-endothelial cell autoantibodies (AECA), but not anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA), in recurrent oral ulceration: modulation of AECA binding by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interferon-gamma (IFN-gamma). *Clin. Exp. Immunol.* 1996, 106, 523–528.
- [8] SUN A., WU Y. C., WANG J. T., LIU B. Y., CHIANG C. P.: Association of HLA-te22 antigen with anti-nuclear antibodies in Chinese patients with erosive oral lichen planus. *Proc. Natl. Sci. Coun. Repub. China B.* 2000, 24, 63–69.
- [9] JABŁOŃSKA S., CHORZEŃSKI T.: Choroby pęcherzowe o podłożu autoimmunologicznym. W: Choroby skóry. Red.: Jabłońska S., Chorzelski T. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002, 223–258.

- [10] FUDENBERG H. H., STITES D. P., CALDWELL J. L., WELLS J. V.: Basic and clinical immunology. Lange Med. Publ., Oxford 1978, 254–278.
- [11] SALAMAN M. R.: A two-step hypothesis for the appearance of autoimmune disease. *Autoimmunity* 2003, 36, 57–61.
- [12] KAROLEWSKA E., KONOPKA T.: Autoimmune process participation in the oral pathologies. *Dent. Med. Probl.* 2004, 41, 267–276.
- [13] TAN E. M.: Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 1989, 44, 93–151.
- [14] WORLE B., WOLLENBERG A., SCHALLER M., KUNZELMANN K. H., PLEWIG G., MEURER M.: Chronic ulcerative stomatitis. *Br. J. Dermatol.* 1997, 137, 262–265.
- [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
tel.: +48 42 675 75 40
e-mail: natalewk@wp.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 5.07.2004 r.
Po recenzji: 28.07.2004 r.
Zaakceptowano do druku: 28.07.2004 r.

Received: 5.07.2004
Revised: 28.07.2004
Accepted: 28.07.2004