

NATALIA LEWKOWICZ¹, ANNA KURNATOWSKA¹, PRZEMYSŁAW LEWKOWICZ²,
MAŁGORZATA BANASIK², HENRYK TCHÓRZEWSKI^{2, 3}

Rola neutrofili krwi obwodowej w patogenezie aft nawrotowych

Peripheral blood neutrophils in pathogenesis of recurrent aphthous ulcers

¹ Zakład Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej i Przyzębia IS AM w Łodzi

² Zakład Immunologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

³ Centrum Wirusologii i Mikrobiologii PAN w Łodzi

Streszczenie

Wprowadzenie. Afty nawrotowe to choroba błony śluzowej jamy ustnej, charakteryzująca się występowaniem nawrotowych bolesnych nadżerek. Etiologia aft nawrotowych jest dotychczas niewyjaśniona, nie ma też skutecznych środków w leczeniu i zapobieganiu. Udowodniono, że w patogenię tej choroby jest zaangażowany układ immunologiczny. Na podstawie dotychczasowych badań można sądzić, iż neutrofile krwi obwodowej są zaangażowane w patogenię aft nawrotowych.

Cel pracy. Celem pracy jest ocena stanu czynnościowego neutrofili krwi obwodowej, ich wpływu na pojemność antyoksydacyjną surowicy w patogenię choroby zarówno w fazie aktywnej, jak i remisji.

Materiał i metody. Badaniami objęto 20 pacjentów z aftami nawrotowymi, występującymi przynajmniej raz w miesiącu oraz 19 zdrowych osób. Oceniono następujące wskaźniki immunologiczne: wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT) przez neutrofile metodą chemiluminescencji krwi pełnej, całkowitą pojemność antyoksydacyjną surowicy metodą kalorymetryczną, ekspresję cząsteczki adhezyjnej CD11b na neutrofilach oraz ekspresję receptorów TNF- α na neutrofilach metodą cytometrii przepływowej.

Wyniki. Wykazano większe wytwarzanie RFT przez neutrofile spoczynkowe i stymulowane fMLP w porównaniu do grupy osób zdrowych. Wydzielanie RFT po stymulacji OZ i PMA było podobne we wszystkich trzech grupach. Preinkubacja neutrofili z TNF- α nie wywołała u chorych efektu preaktywacji *in vitro*. Wykazano obniżenie pojemności antyoksydacyjnej surowicy u chorych niezależnie od fazy choroby w porównaniu do osób zdrowych. Stwierdzono zwiększoną ekspresję CD11b na neutrofilach spoczynkowych i stymulowanych fMLP u chorych z aftami w stosunku do grupy porównawczej. Wyniki te potwierdzają przypuszczenie, iż neutrofile osób chorych znajdują się w stanie preaktywacji. Wykazano istotnie niższą ekspresję receptorów TNFR-I i TNFR-II na neutrofilach pacjentów z aftami nawrotowymi w porównaniu do osób zdrowych, a także brak odpowiedzi na działanie TNF- α *in vitro* w postaci spadku średniej ekspresji tych receptorów na neutrofilach. Nie wykazano istotnych różnic w badanych wskaźnikach między fazą aktywną a remisją choroby.

Wnioski. Przeprowadzone badania wskazują, że neutrofile krwi obwodowej chorych z aftami nawrotowymi znajdują się w stanie preaktywacji, co może być jednym z elementów przyczyniających się do rozwoju choroby (**Dent. Med. Probl.** 2002, 39, 1, 69–77).

Słowa kluczowe: afty nawrotowe, etiologia, neutrofile.

Abstract

Background. Recurrent aphthous ulcers (RAU) is the most common oral disease characterized by repeated development of painful ulcers. The etiology of recurrent aphthous ulcers is still unknown. Many studies have suggested that this inflammatory disease is the result of abnormal immune response directed toward the oral mucosa. There is also evidence to suggest that PMN may be activated and may play the role in the RAU pathogenesis.

Objectives. The purpose of the study was to assess peripheral blood neutrophil condition in RAU patients both in active and in remission stage of the disease.

Material and methods. The study population consisted of 20 RAU patients, who had at least one aphthous lesion per month and 19 healthy controls. The reactive oxygen intermediates (ROI) production was assessed by means of

the whole blood luminol-enhanced chemiluminescence, total antioxidant status was analysed in serum using colorimetric method, CD11b and TNFR expression on neutrophils were studied using the flow cytometry method.

Results. The increased ROI production was observed in resting and fMLP stimulated neutrophils of RAU patients in active and remission stage as compared to healthy controls. OZ and PMA stimulated ROI production was similar in all groups. After incubation of neutrophils with TNF- α , the phenomenon of its priming *in vitro* was not seen in RAU. The level of antioxidants was significantly decreased in serum of RAU patients in both active and remission stage of the disease as compared to controls. The increased expression of CD11b was observed on resting and fMLP stimulated neutrophils both in active and remission stage of the disease. TNF-receptor expression was decreased in resting neutrophils in RAU patients in the two groups as compared to controls. TNF- α did not cause the decrease of TNFR expression on neutrophils in RAU. No significant changes between active and remission RAU was found.

Conclusions. The results of this study show that peripheral blood neutrophils are primed in RAU which could have an influence on cause of the disease (**Dent. Med. Probl.** 2002, 39, 1, 69–77).

Key words: recurrent aphthous ulcers, etiology, neutrophils.

Afty nawrotowe to jedna z najczęściej występujących chorób błony śluzowej jamy ustnej, dotycząca 17–50% populacji. Choroba charakteryzuje się występowaniem bolesnych nadżerek, pojawiających się zwykle po raz pierwszy w okresie dzieciństwa lub dojrzewania i nawracających ze wzrastającą częstotliwością i nasileniem wraz z wiekiem. Etiologia aft nawrotowych jest dotychczas nieznana, pomimo licznych badań zmierzających do wyjaśnienia. Nie ma też skutecznych środków w leczeniu i zapobieganiu tej choroby. Brane są pod uwagę czynniki zarówno miejscowe, jak i ogólne, mogące przyczyniać się do rozwoju aft nawrotowych. Wśród czynników wymienia się: uraz mechaniczny błony śluzowej, skład śliny, działanie związków chemicznych, bakterie, wirusy, środki spożywcze, niektóre choroby ogólnoustrojowe.

W ostatnich latach coraz więcej badaczy stwierdza, iż w patogenезę aft nawrotowych jest zaangażowany układ immunologiczny. Potwierdza to wiele badań oraz pewna skuteczność niektórych leków immunomodulujących w leczeniu tej choroby. Uważa się, że czynniki miejscowe i ogólne związane z występowaniem aft mogą przez wpływ na układ immunologiczny zapoczątkować bądź modulować przebieg choroby. Dotychczasowe badania dotyczące funkcjonowania układu immunologicznego u chorych z aftami skupiały się głównie na ocenie wskaźników odporności swoistej. Zapomina się często, że ważną funkcję pełni także system odporności wrodzonej, który zapoczątkowuje i moduluje późniejszą odpowiedź nabytą. Neutrofile jako część odporności wrodzonej, dzięki zdolności wytwarzania cytokin, reaktywnych form tlenu (RFT) i ekspresji antygenów MHC klasy II oddziałują na pozostałe elementy układu odpornościowego, mogą więc być zaangażowane w rozwój choroby.

Celem badań była ocena stanu czynnościowego neutrofili krwi obwodowej u chorych z aftami nawrotowymi w fazie aktywnej i remisji choroby.

Material i metody

Badaniami objęto 39 osób, w tym 20 osób z aftami nawrotowymi, pojawiającymi się przynajmniej raz w miesiącu: 11 kobiet i 9 mężczyzn w wieku 18–56 lat (średnia wieku $38,2 \pm 13,08$) oraz 19 zdrowych ochotników, u których nigdy nie występowały afty nawrotowe.

Chorzy z aftami nawrotowymi byli pacjentami Zakładu Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej i Przyzębia Instytutu Stomatologii AM w Łodzi w latach 1999–2000. Dla badanych osób opracowano specjalną kartę, zawierającą dane z wywiadu, badania przedmiotowego i trzymiesięcznej obserwacji. Na tej podstawie do badań immunologicznych zakwalifikowano osoby, które nie zgłaszały innych chorób i nie przyjmowały żadnych leków.

Do badań pobierano krew żylną z żyły łokciowej systemem zamkniętym Vacutiner w objętości 5 ml do plastikowej probówki z heparyną litową o końcowym stężeniu 10 U/ml oraz 5 ml na skrzep do plastikowej probówki niezawierającej antykoagulantów. Krew do badań od chorych z aftami była pobierana dwukrotnie: w fazie aktywnej choroby (1–3 dzień od chwili pojawienia się zmian) oraz w fazie remisji (brak zmian).

Badania immunologiczne zostały wykonane w Zakładzie Immunologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi.

Ocena wytwarzania RFT przez neutrofile

Badania przeprowadzono metodą chemiluminescencji zależnej od luminolu w krwi pełnej za pomocą aparatu MLX Microtiter Plate Lumino-metr (Dynex). Oceniano chemiluminescencję spontaniczną oraz stymulowaną fMLP (2×10^{-6} M), opsonizowanym zymosanem (0,3 mg/ml) i PMA (200 ng/ml). W celu wywołania efektu preaktywacji neutrofili *in vitro* zastosowano dodatkowy układ, w którym próbki były inkubowane

z TNF- α (10 ng/ml) przez 15 minut w temperaturze pokojowej.

Wartości chemiluminescencji krwi pełnej skorygowano o bezwzględną liczbę neutrofili oraz stężenie hemoglobiny i wyrażono w umownych jednostkach luminescencji RLUMax (relative light units max).

W celu uwidocznienia wpływu TNF- α na wielkość wytwarzania RFT w poszczególnych grupach, obliczono wartości procentowych zmian w wytwarzaniu RFT komórek poddanych działaniu TNF- α w stosunku do neutrofili nieinkubowanych w obecności tej cytokiny. Uzyskane wielkości pomniejszono o wartość wynikającą ze stymulujących właściwości TNF- α , według wzoru:

wskaźnik preaktywacji =

$$= \left\{ \frac{CL_{TNF-\alpha + fMLP} + CL_{spoczynkowe} - CL_{spoczynkowe + TNF-\alpha}}{CL_{fMLP}} \times 100 \right\} - 100.$$

Ocena całkowitej pojemności antyoksydacyjnej surowicy

Ocenę całkowitej pojemności antyoksydacyjnej surowicy przeprowadzono metodą kolorymetryczną opartą na redukcji powstawania kationo-rodnika ABTS^{•+} [kation 2, 2'-azydo-bis (3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)], która zachodzi pod wpływem antyutleniaczy zawartych w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Badanie przeprowadzono z użyciem odczynników firmy Randox Lab. UK. Odczyt absorbancji próbek badanych i standardów przeprowadzono metodą jednopunktowego pomiaru przy długości fali 630 nm. Stężenia antyutleniaczy wyliczono na podstawie wzorca i różnicy pomiędzy absorbancją po dodaniu substratu a początkową. Wyniki wyrażono w jednostkach mmol/l.

Ocena ekspresji cząsteczki adhezyjnej CD11b oraz receptorów dla TNF- α TNF-RI i TNF-RII na neutrofilach

Ocenę wykonano metodą immunofluorescencyjnego znakowania pełnej krwi. Ekspresję cząsteczki CD11b oceniano na neutrofilach spoczynkowych i stymulowanych fMLP (10^{-8} M przez 20 minut w temperaturze pokojowej). Ekspresję receptorów TNF-RI i TNF-RII oceniano na neutrofilach spoczynkowych i inkubowanych z TNF- α (10 ng/ml przez 15 minut w temperaturze pokojowej). 100 μ l krwi mieszano i inkubowano z odpowiednią ilością przeciwciał monoklonalnych anti-CD11b-FITC (Becton-Dickinson) oraz anti-

TNF-RI znakowanych fluoresceiną lub anti-TNF-RII znakowanych fikoerytryną (R&D). Erytrocyty usuwano przez dodanie do próbek płynu lizującego (Becton-Dickinson), 10-minutowej inkubacji i wypłukaniu. Następnie próbki utrwalano 1% paraformaldehydem. Analizę próbek przeprowadzono cytometrem przepływowym FACS-Calibur z argonowym laserem (Becton-Dickinson). Do analizy wyników użyto programu WinMDI 2.7. Wyniki wyrażono jako średnią wartość immunofluorescencji (MFI – mean fluorescent intensity).

W celu uwidocznienia wpływu TNF- α na poziom ekspresji jego receptorów na neutrofilach w poszczególnych badanych grupach, obliczono wartości procentowych zmian w ekspresji TNF-R komórek poddanych działaniu TNF- α w stosunku do neutrofili nieinkubowanych w obecności tej cytokiny według wzoru:

wskaźnik spadku ekspresji TNF-R =

$$= 100 - \frac{TNF-R \text{ po inkubacji z TNF-}\alpha}{TNF-R} \times 100.$$

Analiza statystyczna

Dla wszystkich ocenianych wskaźników w obrębie grup badanych obliczono wartość średnią, odchylenie standardowe (SD). Do weryfikacji statystycznej wartości oczekiwanych zastosowano następujące testy: *t*-Studenta (wariancje jednokowe), Cohrana-Coxa (wariancje różne), Manna-Whitne'a dla rozkładów nieparametrycznych oraz *t*-Studenta dla zmiennych powiązanych.

Za poziom istotny statystycznie przyjęto $p \leq 0,05$. Analizę statystyczną przeprowadzono programem Statistica 5.0 PL.

Wyniki

Wydzielanie reaktywnych form tlenu przez neutrofile

Badania oceniające stan aktywacji neutrofili na podstawie produkcji reaktywnych form tlenu przeprowadzono na komórkach spoczynkowych i stymulowanych w układzie bez i po preaktywacji z TNF- α . Wyniki wyrażone w jednostkach RLUMax przedstawiono w tabeli 1.

Analiza wartości wykazała, iż neutrofile spoczynkowe i stymulowane fMLP osób chorych w fazie aktywnej i okresie remisji wytwarzały większe ilości RFT w porównaniu do osób zdrowych. Wartości chemiluminescencji po stymulacji

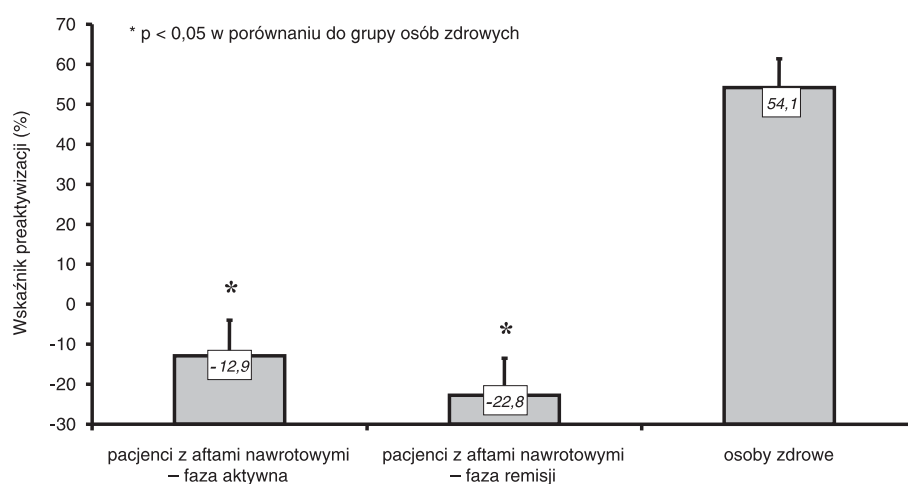
Tabela 1. Analiza wartości wytwarzania reaktywnych form tlenu przez neutrofile spoczynkowe i stymulowane fMLP, OZ i PMA pacjentów w fazie aktywnej i remisji choroby oraz osób zdrowych

Table 1. The average values of reactive oxygen intermediates production by resting or stimulated neutrophils in patients and controls

	Bez inkubacji TNF- α Inkubacja TNF- α	Neutrofile niestymulowane	fMLP	OZ	PMA
Osoby zdrowe	– +	0,43 \pm 0,24 0,73 \pm 0,34	0,73 \pm 0,32 * 1,42 \pm 0,50	3,96 \pm 1,46 3,96 \pm 1,20	2,93 \pm 0,99 3,09 \pm 1,13
Pacjenci z aftami nawrotowymi – faza aktywna choroby	– +	*0,94 \pm 0,61 *1,33 \pm 0,62	*1,51 \pm 0,89 1,68 \pm 1,02	3,66 \pm 1,75 4,09 \pm 2,18	2,49 \pm 1,21 2,79 \pm 1,97
Pacjenci z aftami nawrotowymi – faza remisji choroby	– +	*0,64 \pm 0,24 *1,03 \pm 0,68	*1,33 \pm 0,73 1,25 \pm 0,80	4,56 \pm 2,83 3,83 \pm 2,12	2,32 \pm 2,14 *2,11 \pm 1,46

^a $p < 0,05$ różnica istotna statystycznie pomiędzy komórkami spoczynkowymi a inkubowanymi z TNF- α i stymulowanymi fMLP w obrębie grupy.

* $p < 0,05$ w porównaniu do grupy osób zdrowych.



Ryc. 1. Analiza wpływu TNF- α na wytwarzanie RFT przez neutrofile stymulowane fMLP osób chorych na afty nawrotowe w fazie aktywnej i remisji choroby oraz osób zdrowych

Fig. 1. Effect of TNF- α on ROI production by fMLP stimulated neutrophils in active and remission RAU and controls

opsonizowanym zymosanem (OZ) i PMA były zbliżone we wszystkich trzech grupach.

Neutrofile osób chorych inkubowane z TNF- α w układzie bez stymulacji generowały większe ilości RFT w porównaniu do grupy osób zdrowych. Powyższe obserwacje dotyczyły osób chorych, niezależnie od fazy choroby. Wartości chemiluminescencji neutrofile stymulowanych fMLP lub OZ w powyższym układzie badawczym nie różniły się istotnie u wszystkich badanych. Po stymulacji PMA neutrofile inkubowanych z TNF- α zaobserwowano spadek wytwarzania RFT w grupie osób chorych w fazie remisji w porównaniu do osób zdrowych, wartości w grupie osób chorych w fazie aktywnej nie różniły się natomiast istotnie od wartości w grupie osób zdrowych.

W warunkach prawidłowych TNF- α powoduje zwiększoną odpowiedź granulocytów na fMLP.

Porównanie wartości chemiluminescencji neutrofile stymulowanych fMLP z wartościami CL po inkubacji komórek z TNF- α i stymulacji fMLP dla poszczególnych badanych grup umożliwia ocenę zdolności neutrofile do przejścia w stan preaktywacji. W tym celu wyliczono wskaźnik oceniający zdolność neutrofile do preaktywacji pod wpływem TNF- α . U osób zdrowych wytwarzanie RFT po inkubacji neutrofile z TNF- α i stymulacji fMLP wzrasta o 54,1% w porównaniu do neutrofile bez preaktywacji, podczas gdy u osób chorych w fazie aktywnej zaobserwowano spadek wydzielania RFT o 12,9%, a w fazie remisji o 22,8 % (ryc. 1).

Całkowita pojemność antyoksydacyjna surowicy

Analiza całkowitej pojemności antyoksydacyjnej surowicy wykazała obniżone wartości w grupie

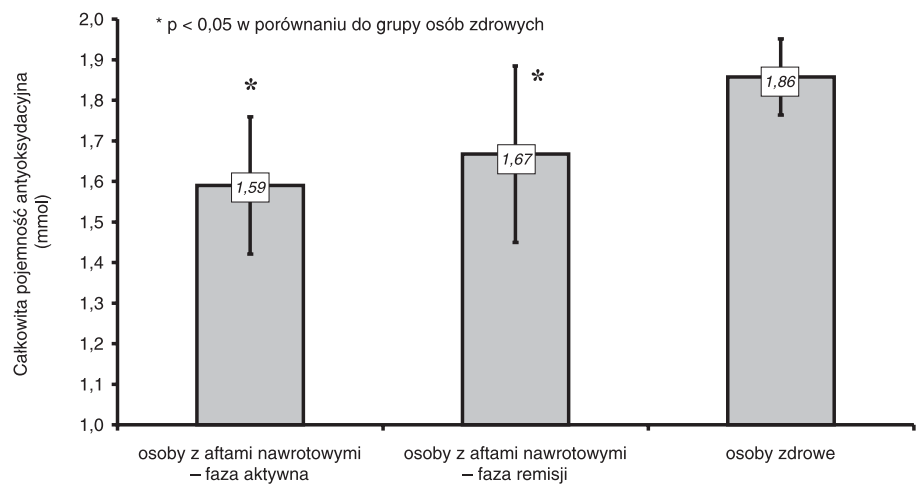
chorych zarówno w fazie aktywnej ($p < 0,0001$), jak i w fazie remisji ($p = 0,009$) w porównaniu do osób zdrowych. Średnia wartość całkowitej pojemności antyoksydacyjnej jest nieznacznie wyższa u pacjentów w fazie remisji choroby w porównaniu do wartości obserwowanej w fazie aktywnej, nie są to jednak różnice istotne statystycznie. Zestawienie średnich wartości całkowitej pojemności antyoksydacyjnej surowicy \pm SD w badanych grupach przedstawiono na rycinie 2.

Ekspresja cząsteczki adhezyjnej CD11b na neutrofilach

Oceniając ekspresję CD11b na neutrofilach spoczynkowych i stymulowanych fMLP, zaobserwowano zwiększoną ekspresję cząsteczki adhezyjnej na neutrofilach spoczynkowych i stymulowanych fMLP osób chorych w obu grupach w porównaniu

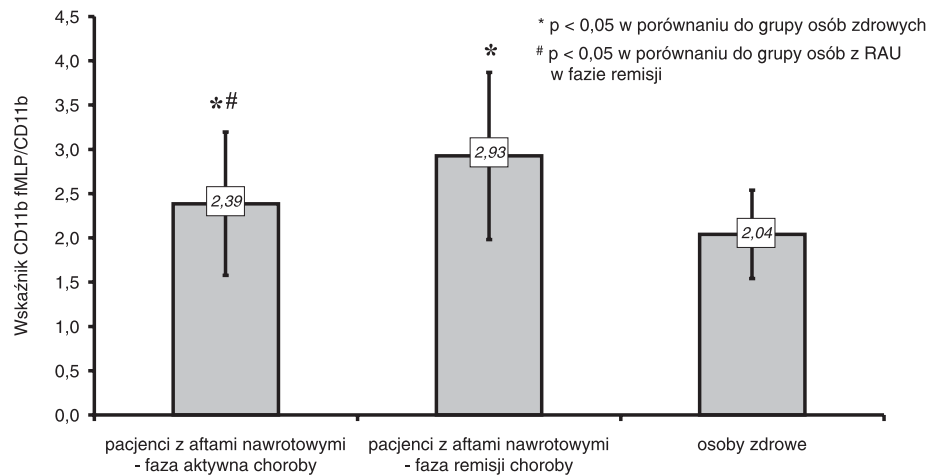
do grupy osób zdrowych (tab. 2). Ekspresja CD11b na neutrofilach spoczynkowych w fazie aktywnej wyniosła $1263,4 \pm 447,33$, w fazie remisji $1244,1 \pm 492,06$ i w grupie osób zdrowych $895,0 \pm \pm 455,00$. Po stymulacji fMLP ekspresja CD 11b wyniosła $2757,1 \pm 526,75$ w fazie aktywnej, $3241,6 \pm \pm 298,52$ w fazie remisji i $1825,0 \pm 1025,00$ w grupie osób zdrowych.

W celu oceny wpływu fMLP na ekspresję CD11b na neutrofilach dla badanych grup, obliczono wskaźnik wzrostu ekspresji cząsteczki adhezyjnej po stymulacji fMLP. Wskaźnik ten miał najwyższe wartości w grupie osób chorych w fazie remisji choroby ($2,93 \pm 0,944$). U chorych w fazie aktywnej wskaźnik był także znacząco wyższy w porównaniu do osób zdrowych ($2,39 \pm 0,809$ vs $2,04 \pm 0,500$). Zestawienie średnich wartości \pm SD w badanych grupach wraz z poziomami istotności przedstawiono na rycinie 3.



Ryc. 2. Analiza średnich wartości całkowitej pojemności antyoksydacyjnej surowicy pacjentów chorych na afty nawrotowe i osób zdrowych

Fig. 2. The average values of total antioxidant status of serum in RAU and controls



Ryc. 3. Analiza średnich wartości wskaźnika CD11b fMLP/CD11b u chorych na afty nawrotowe i u osób zdrowych

Fig. 3. The average values of CD11b fMLP/CD11b index in RAU and controls

Ekspresja receptorów TNF- α TNF-RI i TNF-II na neutrofilach

Ekspresję receptorów TNF-RI i TNF-II oceniono na neutrofilach spoczynkowych i uprzednio inkubowanych z TNF- α . Wykluczono możliwość wpływu inkubacji neutrofilów z TNF- α na blokowanie dostępu przeciwciał monoklonalnych do miejsc wiążących receptory.

Wykazano istotnie niższą ekspresję receptorów TNF-RI i TNF-II na neutrofilach spoczynkowych pacjentów z aftami nawrotowymi w obu grupach w porównaniu do osób zdrowych (tab. 2). Inkubacja komórek z TNF- α wywołała spadek ekspresji receptorów we wszystkich grupach. Po inkubacji neutrofilów z TNF- α poziom ekspresji receptora TNF-RI był podobny we wszystkich trzech grupach, ekspresja receptora TNF-II w grupie pacjentów z aftami była natomiast istotnie niższa, w porównaniu do osób zdrowych. Obliczono procentowy spadek ekspresji receptorów

TNF- α po zadziałaniu tej cytokiny w stosunku do komórek spoczynkowych dla poszczególnych grup (ryc. 4). Zaobserwowano, że największy spadek średniej ekspresji tych receptorów nastąpił u osób zdrowych (o 36,2% receptora TNF-RI i 24,2% receptora TNF-II), u osób chorych ekspresja receptorów obniżyła się natomiast zaledwie o 18,4% w fazie aktywnej i 15,6% w fazie remisji – receptora TNF-RI oraz o 9,4% w fazie aktywnej i 4,7% w fazie remisji – receptora TNF-II.

Omówienie

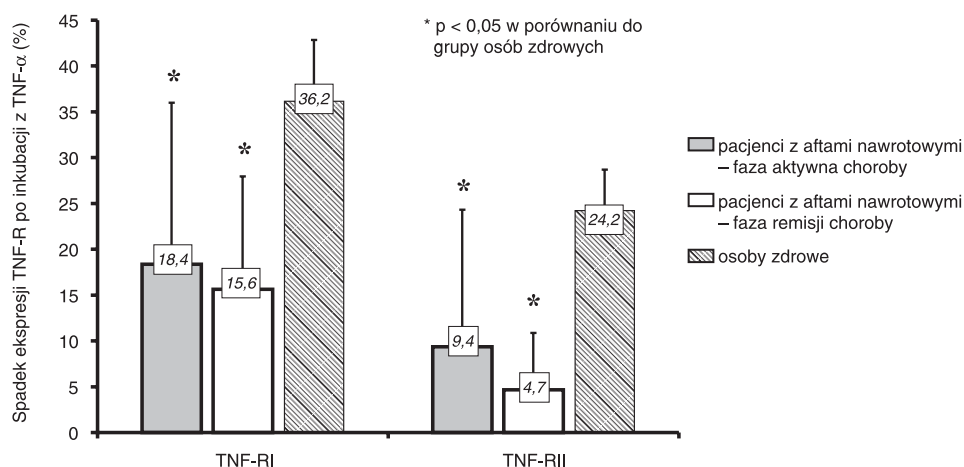
Etiologia aft nawrotowych jest nieznana, dlatego też leczenie zmian jest objawowe i niewystarczająco skuteczne. W powstawaniu choroby upatruje się znaczący udział układu immunologicznego. Neutrofile są istotnym elementem wrodzonej odpowiedzi immunologicznej organizmu. Są one zdolne nie tylko do indukcji i modulacji odpowiedzi immunologicznej, ale również do aktywacji nabytej odpowiedzi immunologicznej. Dowie-

Tabela 2. Analiza średnich wartości ekspresji receptorów CD11b, TNF-RI i TNF-II na komórkach spoczynkowych i stymulowanych pacjentów z aftami nawrotowymi i osób zdrowych

Table 2. The expression of CD11b, TNF-RI and TNF-II on resting and stimulated neutrophils in RAU and controls

	Pacjenci z aftami nawrotowymi – faza aktywna choroby	Pacjenci z aftami nawrotowymi – faza remisji choroby	Osoby zdrowe
CD11b	1263,4 \pm 447,33*	1244,1 \pm 492,06*	895,0 \pm 455,01
CD11b/fMLP	2757,1 \pm 526,75*	3241,6 \pm 298,52*	1825,0 \pm 1025,24
TNF-RI	24,0 \pm 3,30*	23,3 \pm 3,82*	28,3 \pm 4,32
TNF-RI/TNF- α	19,1 \pm 2,82	19,0 \pm 2,21	18,0 \pm 2,96
TNF-II	59,7 \pm 21,80*	61,5 \pm 11,08*	98,45 \pm 10,12
TNF-II/TNF- α	58,8 \pm 11,42*	58,0 \pm 10,87*	74,6 \pm 8,43

* $p < 0,05$ w porównaniu do grupy osób zdrowych.



Ryc. 4. Analiza procentowego spadku ekspresji receptorów TNF-RI i TNF-II na neutrofilach po inkubacji z TNF- α w porównaniu do komórek spoczynkowych u osób zdrowych i pacjentów z aftami nawrotowymi w fazie aktywnej i remisji choroby

Fig. 4. Effect of TNF- α on percentage decrease of TNF-RI and TNF-II expression on neutrophils in RAU and controls

dziono, że od stanu czynnościowego neutrofilii zależy zarówno poprawność odpowiedzi organizmu na patogeny, jak i prawidłowość funkcjonowania układu immunologicznego w stosunku do własnych antygenów. Wynika to z faktu, iż neutrofile przez system cytokin, reaktywnych form tlenu i azotu oraz substancji zawartych w ziarnistościach mogą indukować odpowiedź zależną od limfocytów [1–3].

Badanie wytwarzania RFT przez neutrofile jest jednym z najważniejszych testów czynnościowych oceniających prawidłowość funkcjonowania tych komórek. Ocena receptorów powierzchniowych neutrofilii w badaniach diagnostycznych może być miarą aktywacji komórki. Badania własne wybranych wskaźników neutrofilii były prowadzone z zastosowaniem metod umożliwiających ich ocenę we krwi pełnej, co w przypadku tych niezwykle czułych na czynniki zewnętrzne komórek eliminowało możliwość ich aktywacji w czasie izolacji.

Jak wynika z uzyskanych danych, neutrofile krwi obwodowej chorych z aftami znajdują się w stanie preaktywacji. Przemawiają za tym wyższe wartości wydzielania RFT przez neutrofile spoczynkowe i stymulowane fMLP osób chorych, a także brak odpowiedzi na TNF- α w warunkach *in vitro*.

Wcześniejsze badania dotyczące poziomu wytwarzania O_2^- przez neutrofile krwi obwodowej wykazały obniżoną produkcję u osób chorych w porównaniu z osobami zdrowymi [4]. Przeciwnie, wyniki otrzymane przez Ueta mogą wynikać z zastosowanej metodyki badań, opartej na ocenie produkcji O_2^- przez neutrofile izolowane. Wykazano bowiem, że sam proces izolacji komórek doprowadza do ich aktywacji [5–7]. Zważywszy na to, że niestymulowane neutrofile krwi obwodowej wydzielają zwiększone ilości RFT, ich izolacja, a następnie stymulacja fMLP lub PMA mogą doprowadzić do braku wzrostu wydzielania RFT i w stosunku do neutrofilii osób zdrowych na skutek „wypalenia się” komórek.

Aby określić wpływ wysokich wartości RFT wytwarzanych przez neutrofile chorych z aftami nawrotowymi na barierę antyoksydacyjną krwi obwodowej, wykonano badania oceniające całkowitą pojemność antyoksydacyjną osocza. Obniżone wartości pojemności antyoksydacyjnej u pacjentów z aftami są prawdopodobnie skutkiem przewlekłe utrzymującego się niezależnie od fazy choroby, podwyższonego stężenia RFT.

Bezpośrednie następstwa związane ze zwiększonym wydzielaniem RFT i załamaniem bariery antyoksydacyjnej dotyczą peroksydacji lipidów zarówno elementów ścian komórkowych, jak i frakcji lipoprotein osocza, uszkodzenia białek

poprzez modyfikację reszt aminokwasowych, agregację lub fragmentację cząsteczek białkowych, uszkodzenia zasad nukleinowych, reszt cukrowych lub powstawania pęknięć nici kwasów nukleinowych. Procesy te doprowadzają do zaburzenia funkcji komórek, zmian antygenów powierzchniowych oraz mutacji. Pośrednie działanie RFT polega na oddziaływaniu ich dalszych form, powstałych w toku przemian wolnorodnikowych (chloraminotauryny, kwasu podchlorowego, jonu nadtlenoazotynowego, trójtlenku azotu), na transdukcję sygnału wewnątrzkomórkowego komórek immunokompetentnych, m.in. komórek prezentujących antygen, limfocytów B i T [2, 8, 9]. Działanie to związane jest m.in. z aktywacją jądrowych czynników transkrypcyjnych NF- κ B, AP-1 odpowiedzialnych za indukcję wytwarzania cytokin prozapalnych: IL-1, IL-6, IL-8, INF- α , TNF- α [10–12].

Wykazana w obecnych badaniach wysoka ekspresja CD11b na neutrofilach spoczynkowych i stymulowanych fMLP u chorych obydwu grup wskazuje również na preaktywację komórek *in vivo*. Cząsteczka CD11b jest podjednostką wchodzącą w skład receptora dla składnika C3 dopełniacza. Wysoka ekspresja CR3 na powierzchni neutrofilii przyczynia się do wzrostu adhezji komórek i ich zdolności fagocytarnych.

Wcześniejsze prace z tego zakresu wskazywały, że migracja spontaniczna i chemotaksja neutrofilii jest podobna w grupie chorych z RAU i osób zdrowych [13], a adherencja stymulowanych neutrofilii jest większa u chorych z aftami nawrotowymi [14]. Późniejsze doniesienia sugerowały zaburzenie funkcji neutrofilii polegające na obniżonej migracji spontanicznej i osłabionej fagocytozie u chorych zarówno w fazie aktywnej, jak i w fazie remisji choroby [15]. Wymienione badania funkcji neutrofilii były prowadzone na komórkach izolowanych, które ponadto były poddawane długim okresom inkubacji (18–24 h), co w przypadku neutrofilii osób chorych mogło wpłynąć na wyczerpanie możliwości czynnościowych komórek i ich słabą odpowiedź w warunkach *in vitro*.

W badaniach własnych wykazano obniżoną ekspresję receptorów dla TNF- α na powierzchni neutrofilii, co może się wiązać z ekspozycją *in vivo* tych komórek na czynniki aktywujące np.: TNF- α , LPS, IL-8, w wyniku czego dochodzi do złuszczenia bądź internalizacji receptorów. Ten mechanizm regulacyjny powoduje ograniczenie działania TNF- α na neutrofile [16–19].

Analiza wybranych wskaźników czynności neutrofilii krwi obwodowej u chorych zarówno w fazie aktywnej, jak i w remisji choroby pozwoliła na potwierdzenie hipotezy o zaangażowaniu wrodzonych mechanizmów obrony organizmu w patogenezę choroby o podłożu zapalnym. Brak

powrotu ocenianych wskaźników immunologicznych w fazie remisji do wartości obserwowanych u osób zdrowych może wynikać z przebiegu choroby u osób zakwalifikowanych do badań, gdyż były to osoby ze szczególnie ciężką postacią aft nawrotowych. Wydaje się, iż faza bezobjawowa u badanych chorych jest okresem zapoczątkowania kolejnego rzutu choroby. Brak poprawy wskaźników immunologicznych pomiędzy okresem remisji a fazą aktywną choroby może ponadto świadczyć o nieprawidłowym działaniu mechanizmów supresyjnych, biorących udział w samoograniczaniu się procesu zapalnego.

Niezależnie od tego, czy brak normalizacji wskaźników immunologicznych w fazie remisji choroby jest następstwem zbyt krótkiego czasu między kolejnymi rzutami choroby, czy też pierwotnością dysfunkcji niektórych elementów obrony organizmu, można zaryzykować stwierdzenie,

iż neutrofile krwi obwodowej biorą udział w patogenezie aft nawrotowych, a ich aktywność z pewnością nie jest prawidłowa i adekwatna do charakteru choroby.

Wnioski

1. Neutrofile krwi obwodowej są w stanie preaktywacji u pacjentów z aftami nawrotowymi zarówno w fazie aktywnej, jak i w fazie remisji choroby.

2. Zwiększonemu wytwarzaniu reaktywnych form tlenu przez neutrofile towarzyszy obniżona pojemność antyoksydacyjna surowicy u chorych z aftami nawrotowymi.

3. Zaobserwowane zmiany wskaźników immunologicznych u chorych mogą być związane z patomechanizmem choroby.

Piśmiennictwo

- [1] CASSATELLA M. A.: The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today* 1995, 16, 21–27.
- [2] MARCINKIEWICZ J.: Neutrophil chloramines: missing links between innate and acquired immunity. *Immunol. Today* 1997, 12, 161–167.
- [3] CHERTOV O., YANG D., ZACK-HOWARD O. M., OPPENHEIM J. J.: Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol. Rev.* 2000, 177, 68–78.
- [4] UETA E., OSAKI T., YONEDA K.: A clinical trial of Azelastine recurrent aphthous ulceration, with an analysis of its actions on leukocytes. *J. Oral Pathol. Med.* 1994, 23, 123–129.
- [5] DAHLGREN C., KARLSSON A.: Respiratory burst in human neutrophils. *J. Immunol. Met.* 1999, 232, 3–14.
- [6] HAMPTON M. B., WINTERBOURN C. C.: Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils. *J. Immunol. Met.* 1999, 232, 15–22.
- [7] LUNDAHL J., HALLDEN G., HALLGREN M., SKOLD C. M., HED J.: Altered expression of CD11b/CD18 and CD62L on human monocytes after cell preparation procedures. *J. Immunol. Met.* 1995, 180, 93–100.
- [8] CLANCY R. M., AMIN A. R., ABRAMSON S. B.: The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum.* 1998, 41, 1141–1152.
- [9] KOLB H., KOLB-BACHOFEN W.: Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator. *Immunol. Today* 1998, 19, 556–560.
- [10] SUZUKI Y. J., FORMAN H. J., SEVANIAN A.: Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 1997, 22, 269–275.
- [11] SCHMIDT K. N., AMSTAD P., CERUTTI P. et al.: The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- κ B. *Chemistry and Biology* 1995, 2, 13–18.
- [12] MULLER J. M., RUPEC R. A., BAEUERLE P. A.: Study of gene regulation by NF- κ B and AP-1 in response to reactive oxygen intermediates. *Methods* 1997, 11, 301–312.
- [13] DAGALIS P., BAGG J., WALKER D. M.: Spontaneous migration and chemotactic activity of neutrophil polymorphonuclear leukocytes in recurrent aphthous ulceration. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1987, 64, 298–301.
- [14] WRAY D., CHARON J.: Polymorphonuclear neutrophil function in recurrent aphthous stomatitis. *J. Oral Pathol. Med.* 1991, 20, 392–394.
- [15] SISTIG S., CEKIC-ARAMBASIN A., RABATIC S., VUCICEVIC-BORAS V., KLEINHEINZ J., PIFFKO J.: Natural immunity in recurrent aphthous ulceration. *J. Oral Pathol. Med.* 2001, 30, 275–280.
- [16] BALAZOVICH K., SUCHARD S., REMICK D., BOXER L.: Tumor necrosis factor- α and fMLP receptors are functionally linked during fMLP-stimulated activation of adherent human neutrophils. *Blood* 1996, 2, 690–696.
- [17] BEMELMANS M., GOUMA D., BUURMAN W.: LPS-induced sTNF-receptor release *in vivo* a murine model. *J. Immunol.* 1993, 151, 5554–5562.
- [18] WARD P., MCLEIGH K.: Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1995, 9, 1697–1702.
- [19] WARD P.: Neutrophils and adjuvant arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 1997, 107, 225–226.

Adres do korespondencji:

Natalia Lewkowicz
Zakład Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej i Przyzębia IS AM
ul Pomorska 251
92-213 Łódź
tel.: (42) 675-75-40

Praca wpłynęła do Redakcji: 29.03.2002 r.
Zaakceptowano do druku: 4.04.2002 r.

Received: 29.03.2002
Accepted: 4.04.2002