

İlerlemiş Proliferatif Diabetik Retinopati Etyopatogenezinde İnterlökin-8'in Rolü*

Ahmet AKSÜNGER¹, H.Haluk AKBATUR², Meral OR²,
Dilek GÜVEN¹, Hamza OKUR³, Berati HASANREİSOĞLU⁴

ÖZET:

Diabetik retinopatinin en önemli komplikasyonu olan Proliferatif Diabetik Retinopati (PDR) fibrovasküler membranlarla karakterize bir göz hastalığıdır. Bu çalışmada nötrofiller, lenfositler ve retina pigment epitel hücreleri üzerine kemotaktik etkili olduğu bilinen, oküler enflamasyonlarda ve proliferatif göz hastalıklarında rol oynadığı gösterilmiş olan interlökin-8'in PDRdeki rolü araştırılmıştır. 9 hastanın üçünde interlökin-8 düzeyi vitreusta yükselmiş olarak bulunmuştur. Hastaların hiçbirinin kan örneklerinde interlökin-8 düzeyi yüksek bulunmamıştır (p<0.01). Kontrol grubu olarak kadavra gözlerinden alınan vitreus örneklerinde de İL-8 düzeyi yüksek olarak saptanmamıştır (p<0.01). Bu bulgular bize interlökin-8'in PDR patogenezinde rol oynuyor olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Anjiogenezis, İnterlökin-8, kemotaksis, proliferatif diabetik retinopati

SUMMARY

THE ROLE of INTERLEUKIN-8 in PATHOGENESIS of ADVANCED PROLIFERATIF DIABETIC RETINOPATHY

Proliferative diabetic retinopathy which is an important complication of diabetic retinopathy, is characterized by fibrovascular membranes. Interleukin 8 (IL-8) is known to have chemotactic effect on neutrophiles, lymphocytes and retinal pigment epithelial cells and also a role in ocular inflammations and proliferative eye diseases. In this study, the role of IL8 on proliferative diabetic retinopathy was investigated. In 3 out of 9 patients, levels of IL-8 in the vitreous were found to be elevated. IL-8 level was not high in any of the blood samples (p<0.01). Vitreous samples from cadaver eyes, taken as the control group, did not show high IL-8 levels (p<0.01). According to these results, we suppose that IL-8 has a role in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. *Ret-vit 1994; 2:63-6*

Key words: Angiogenesis, chemotaxis, Interleukin-8, proliferative diabetic retinopathy

Geliş: 13.2.1994

Kabul: 14.3.1994

Yazışma adresi: Ahmet Aksünger

11. sok. 15/5 Bahçelievler /Ankara

* Bu çalışma Gazi Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından finanse edilmiştir.

1. Dr Gazi ÜTF Göz Hast ABD
2. Doç Dr Gazi ÜTF Göz Hast ABD
3. Öğr Gör Dr Gazi ÜTF Göz Hast ABD
4. Prof Dr Gazi ÜTF Göz Hast ABD

PDR yeni damar oluşumları ve nonneoplastik hücre proliferasyonu sonucu gelişen fibrovasküler kontraktıl membranlarla karakterize bir göz hastalığıdır.¹⁻⁵

PDR'de oluşan yeni damarların retinal iskemisi sonucu geliştiği belirtilmektedir. Ancak bu mekanizma tek başına PDR'de ön kamara açısı ve iriste oluşan yeni damarların etyopa-

togenezini açıklamakta yetersiz kaldığı için, yeni damar oluşumunu stimüle eden lokal aktif faktörler üzerine de yoğun çalışmalar yapılmış ve iskemik retina bölgesinden salınan birtakım anjiogenetik faktörlerin yeni damar oluşumlarını stimüle ettiği gösterilmiştir. Bu teori iris ve ön kamara açısında görülen yeni damarları açıklamaktadır. Bu sitümulanların duyu retina ve retina pigment epitel hücreleri tarafından sentezlendiği ve/veya kan retina bariyeri bozulması sonucu vitreusa geçtiği belirtilmektedir. Bu anjiogenetik faktörlerin en önemlileri büyüme faktörleri-dir.^{1,3,4} Bununla birlikte son zamanlarda birtakım sitokinlerin de proliferatif ve anjiogenetik etkilerinin olduğu gösterilmiştir.^{6,7}

Büyüme faktörlerinden acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, tumor necrosis factor alpha, transforming growth factor beta ve platelet derived growth factor'ün anjiogenetik ve proliferatif etkileri *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla gösterilmiş ve bu maddelerin ileri PDR'li hastaların vitreus örneklerinde artmış olduğu belirtilmiştir.^{3,4,8} Sitokinlerden interlökin-1 ve interlökin-6'nın PDR'li hastaların vitreus örneklerinde artmış olduğu gösterilmiştir.^{5,9} Nötrofiller üzerine güçlü kemotaktik etkisi olan interlökin-8'in *intraoküler* enflamasyonlarda ve PVR'de vitreusta yükselmiş olarak bulunduğu bildirilmektedir.^{9,10} Yine İL-8'in hayvan modellerinde korneal neovaskülarizasyona neden olduğu gösterilmiştir.⁷ Bu bulgular ışığında neovasküler ve proliferatif bir hastalık olan ileri PDR'li hastaların vitreus örneklerinde İL-8' düzeyini araştırdık.

GEREÇ ve YÖNTEM

İlerlemiş PDR'ye bağlı vitreus ve retina patolojileri nedeniyle pars plana vitrektomi uygulanan 9 hastanın 9 gözü çalışma kapsamına alındı. Preoperatif laser yapılmış olgularla, daha önce göz ameliyatı geçirmiş olgular çalışmanın dışında bırakıldı. Hastaların beşi kadın, dördü erkekti. Yaşları 34-65 arasında değişmekteydi (ort. yaş= 51).

Hastaların hepsinde pars plana vitrektomi esnasında, cerrahinin başlangıcında ve dilüsyonun olmaması için infüzyon sıvısı açılmadan önce, en az 0.5cc vitreus örneği alındı. Yine hastalardan cerrahinin uygulandığı gün

kan örneği alınıp, 1500 devirde 10 dakika santrifüje edilerek serum ayrıştırıldı. Kontrol grubu olarak kadavra gözlerinden alınan vitreus örnekleri kullanıldı. Bilinen bir göz hastalığı olan, vefat sebebi sepsis ve nöroviral hastalık olan kadavra gözlerinden alınan vitreus örnekleri çalışmaya dahil edilmedi.

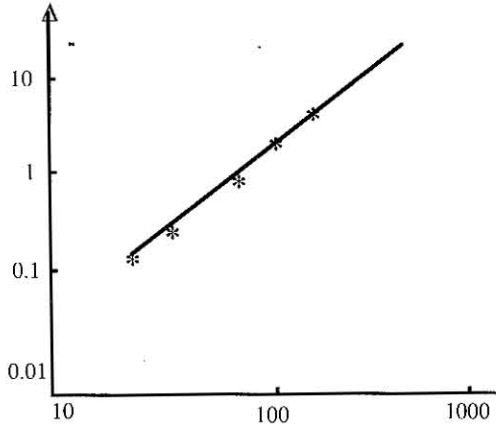
Alınan tüm numuneler tetkik tarihine kadar -30°C de saklanmıştır.

Vitreus ve serum örneklerinde İL-8 tayini Quantikine™ Human İL-8 immunassay (katalog no:D8000, R&D system, İnc. Mineapolis) kiti kullanılarak ve ELISA metoduyla yapıldı. Rekombinant insan İL-8 (30 ng) içeren liyofilize flakon 5 ml RD5 ile sulandırılarak 6000 pg/ml lik solüsyon elde edilmiştir. Bu solüsyon kullanılarak ml'de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.75 ve 0 pg/ml'lik standart solüsyonlar hazırlanmıştır. İL-8'e karşı murine monoklonal antikor içeren 96'lık mikrotiter plate açılmış platteki her bir bölüme RD1A solüsyonu konduktan sonra ilk 16 bölüme standart solüsyonlardan, geri kalan bölümlere de vitreus ve serum örneklerinden 100 µl konup üzeri plastik şerit ile kapatılarak oda ısısında iki saat inkübasyona bırakılmıştır. Otomatik yıkayıcıda kitin yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra İL-8'e karşı poliklonal antikor içeren sıvıdan her bir bölüme 200µl konup tekrar oda ısısında iki saat inkübasyona bırakılmıştır. Otomatik yıkayıcıda tekrar yıkayıp sustrat solüsyondan her bir bölüme 200µl konup oda ısısında 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 2N sülfirik asit içeren durdurucu solüsyondan her bir bölüme 50 µl konularak reaksiyon tamamlanmıştır. Spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda optik yoğunlukları okunmuştur. Buradan elde edilen standart eğri Şekil-1 de görülmektedir.

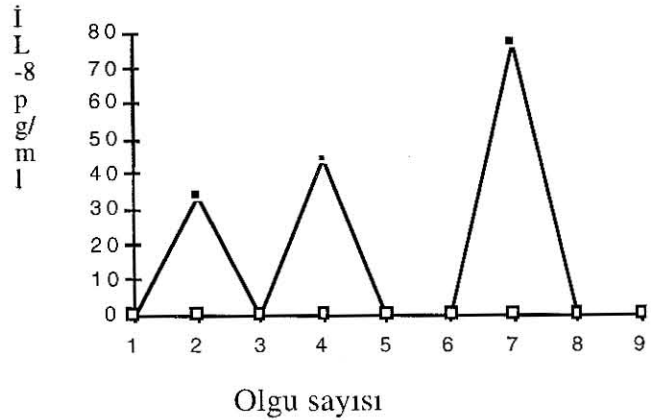
BULGULAR

İleri PDR'li 9 hastanın üçünün vitreus örneklerinde 34-44 ve 77 pg/ml arasında değişen ort:51.6 pg/ml İL-8 düzeyi saptadık.

Kullanmış olduğumuz yöntem ile saptanabilen İL-8 düzeyi 15.75-1000 pg/ml dir. 15.75 pg/ml'nin altındaki değerler standarda göre ölçülemez kabul edilmiştir. Ancak spektrofotometrik değerler standart eğri ile karşılaştırıldığında diğer 6 hastanın hepsinde vitreustaki İL-8 düzeyinin optik yoğunluk değerleri sıfır optik yoğunluk değerinin üstünde çıkmıştır.



Şekil 1: Spektrofotometreden elde edilen standart eğri



Şekil 2: Vitreus IL-8 Düzeyleri

Buna dayanarak bu hastalardaki İL-8 düzeyinin 1-15 pg/ml arasında olduğu söylenebilir.

Kadavra gözlerinden aldığımız kontrol grubu vitreus örnekleri ile hastaların kan örneklerinin hiçbirinde kullanmış olduğumuz yöntem ile ölçülebilir İL-8 düzeyi saptanmamıştır. Bu örneklerin hepsinde spektrofotometredeki optik dansite değeri standarttaki sıfır değerine yakın bulunmuştur.

İleri PDR'li 9 hastaya ait vitreus İL-8 düzeyleri Şekil-2 de görülmektedir.

Bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde StatView™ Brain Pover Inc. 1.0 Dan Feldman ve Jim Gagron 'ın hazırlamış oldukları program kullanılmış ve karşılaştırmalar t-testi ile yapılmıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Diabetik retinopatinin en şiddetli komplikasyonu olan ve diabetik hastalardaki körlüğün en önemli nedeni olan ilerlemiş diabetik retinopatideki fibrovasküler proliferatif membranın yapısı ve oluşumu üzerine oftalmoloji alanında yoğun çalışmalar yapılmıştır.^{1,3,4,8,9} Yeni damar oluşumu ve proliferatif etkiden, iskemik retina bölgesinden salınan mediyatörlerin sorumlu olduğu gösterilmiştir.^{1,3-5} Ayrıca kan retina bariyerinin bozulması sonucu vitreusa geçen bazı serum komponentlerinin de fibrovasküler membran oluşumuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir.^{1,8,9} İL-8'in ilerlemiş PDR patogenezinde rolü yok mudur sorusuna yanıt aradığımız ça-

lışmamızda İL-8'i 9 hastanın üçünün vitreus örneğinde yüksek olarak bulundu. Kontrol grubu olarak bilinen bir göz hastalığı olmayan kadavra gözlerinden aldığımız vitreus örneklerinin hiçbirinde İL-8 düzeyi kullanmış olduğumuz metod ile ölçülebilir düzeyde saptanmadı. İlerlemiş PDR'li 9 hastanın üçünün vitreusunda İL-8 düzeyi 34-77 pg/ml arasında saptanmış olup kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0.01$).

Hastaların hepsinde aynı zamanda kan interlökin-8 düzeyine de bakıldı. Kan İL-8 düzeyine bakmamızın nedeni, göz içindeki düzeyi yüksek bulursak, bunun kan retina bariyerindeki bozulma sonucu göz içine geçmiş İL-8 olup olmadığını saptamaktır. Hastaların hiçbirinde kan İL-8 düzeyi yükselmiş olarak bulunmadı ve vitreus İL-8 düzeyi ile kan İL-8 düzeyi arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık tesbit edildi ($p < 0.01$). Bu da bize vitreustaki İL-8'in kan retina bariyerindeki bozulma sonucu göz içine geçmiş İL-8 değil, lokal olarak üretilen İL-8 olduğunu göstermektedir.

Önceki çalışmalarla insan rekombinan İL-8'in tavşan korneasında neovaskülarizasyon gelişmesine neden olduğu gösterilmiştir. Yine kliniğimizde yapılan bir çalışmada İL-8 düzeyi PVR'li hastaların vitreus örneklerinde yüksek olarak bulunmuştur.¹¹ Böylece anjiyogenetik ve kemotaktik etkisi gösterilmiş olan ve proliferatif oküler hastalıklarda vitreusta yüksek olarak bulunan İL-8'in, PDR'li hastaların vitreusunda da yüksek bulunması PDR pa-

togenezinde rol oynuyor olabileceğini düşündürmektedir.

De Boer ve ark yapmış oldukları bir çalışmada İL-8'i üveitli hastaların %45'de ve PDR'li hastaların ise %33 de vitreusta yükselmiş olarak bulmuşlardır. Bizim bulgularımızda bunu destekler niteliktedir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular bize yeni damar oluşumu ve anormal hücrel proliferasyon ile karakterize olan PDR patogenezinde İL-8'in rol oynuyor olabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Davis DM: Proliferative diabetic retinopathy. Retina. Ryan SJ (ed) The c.v. Mosby comp. ST. Louis, 1989, Cilt-3, s:367-402
2. Bilgihan K: Epidermal Büyüme Faktörünün kornea endotel ve retina pigment epitelindeki etkileri: Uzmanlık tezi, Ankara-1993
3. Frank RN: On the pathogenesis of diabetic retinopathy. Ophthalmology 1984; 91:626-634
4. Wiedemann P: Growth factors in retinal diseases . Surv Ophthal. 1992; 36:5:373-84
5. Kaufmann DTH, Rimarachin JA, Pertrige CA, Gerritsen ME: Neutrophil chemoattractant activity in vitreous from patients with PVR and severe diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 1989; 30 (suppl):11
6. Bauda MJ, Knighton DR, Hunz Tk, Werb Z: İzolation of a nonmitogenic angigenesis factor from wound fluid. Proc. Nat. Acad.Sci. USA 1992; 79:7773-7
7. Elner Wm, Streiter RM, Kunkel SL, Martonvi CL, Koch AE, Palverini PJ, Elner SG: İnterleukin-8: a corneal factor that induces neovaskularization. Invest. Ophth. Vis Sci 1992; 31:985, 1992
8. Lewis G, Guerin C, Erickson P: Basic fibroblast growth factor stimulates proliferation of nonneuro-retinal cell invivo. Invest. Ophth. Vis. Sci 1991; 32:754
9. de Boer JH, Hack CE, Verhoeven JA, Baarsma GS, de Jong PTVM, Rademakers JJM et al: Chemoattractant and neutrophil degranulation activities related to interleukin-8 in vitreous fluid in uveitis and vitreoretinal disosders. Invest. Ophth. Vis. Sci 1993; 34:12:3376-85
10. Akduman L: Üveit etyopatogenezinde interlökin-8'in rolü. Uzmanlık Tezi. Ankara, 1993
11. Aksünger A: Proliferatif vitreoretinopati patogenezinde İnterlökin-8'in rolü. Uzmanlık tezi. Ankara, 1994