

Üveitli Hastalarda Vitreus İnterlökin-8 Düzeyi ve Oküler Enflamasyondaki Rolü*

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

ÖZET

İntraoküler enflamasyonlarda gözdeki hasarın oluş mekanizması oftalmoloji ve immünoloji alanlarında yoğun araştırmaların konusu olmaktadır. Nötrofiller üzerine güçlü kemoatraktan etkisi olan ve anjiogenetik etkisi olduğu belirtilen interlökin-8 (İL-8)'in üveitli hastaların vitreus ve kan örneklerindeki düzeyi ve oküler enflamasyondaki rolü araştırılmıştır. İL-8 düzeyi değişik etyolojilere sahip 12 hastanın 7'sinin vitreus örneğinde yüksek bulunmuştur (15 pg/ml ve üzerinde). Kontrol grubu olarak kadavra gözlerinden alınan vitreus örnekleri ile hastaların kan örneklerinin hiç birinde kullanmış olduğumuz yöntem ile kaydedilebilir düzeyde İL-8 saptanmamıştır (p<0.01).

Anahtar Kelimeler: Üveit, , İnterlökin-8, Oküler enflamasyon,

SUMMARY

THE LEVELS of INTERLEUKIN-8 in VITREOUS SAMPLES from PATIENTS with UVEITIS and ITS ROLE in OCULAR INFLAMMATION

The mechanism of ocular destruction in intraocular inflammation has been extensively investigated in ophthalmology and immunology divisions. Interleukin-8 has an angiogenic effect and a chemoattractant effect on neutrophiles. In this study Interleukin-8 levels in vitreous and blood samples of patients with uveitis and the role of interleukin-8 in the ocular inflammation are investigated. Interleukin-8 level was found to be high in vitreous samples of 7 patients out of 12 patients with different etiologies. (> 15pg/ml). In blood samples of the patients and vitreous samples from cadaver eyes taken as the control group, no Interleukin-8 level could be detected by the method that we used. (p<0.01). *Ret-vit 1994; 2:67-70*

Key words: Interleukin-8, ocular inflammation, uveitis

Geliş: 21.1.1994

Kabul:8.3.1994

Yazışma: 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 Gazi ÜTF İmmünoloji ABD

4 Prof Dr Gazi ÜTF Göz Hast ABD

İntraoküler enflamasyonlara toplumda 20/100.000 oranında rastlanmakta ve hastaların yaklaşık yarısında etyoloji saptanamamaktadır.¹ t-hücrelerinin üveit patogeneğinde anahtar mediyatör rol oynadığı bilinmektedir. Ancak hangi hücrel mediyatörlerin doku hasarına yol açtığı halen bilinmemektedir.^{2,3} Otoimmün hastalıklar ve iskemik hasarlar gibi nonenfeksiyöz enflamatuvar hastalıklarda, nötrofillerin doku hasarına neden olan mediyatörler salgıladıkları bilinmektedir.^{4,5}

Nötrofillerin enflamasyon bölgesine akümüasyonu spesifik kemotaktik faktörlerin salınımı sonucu olmaktadır. Bir sitokin olan İL-8 nötrofiller ve lenfositler üzerine etkili güçlü bir kemoatraktandır.^{6,7} İL-8'in üveitteki rolü hayvan modellerinde intravitreal enjeksiyonu ile araştırılmış ve nötrofil infiltrasyonu ile karakterize oküler enflamasyona neden olduğu gösterilmiştir.^{8,9}

Bu çalışmayla üveitli hastalardan pars plana vitrektomi (PPV) esnasında alınan vitreus örnekleri ile aynı hastalardan alınan kan örneklerinde İL-8 düzeyi ve hastalığın tipi ile İL-8 düzeyi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Kontrol grubu olarak bilinen bir göz hastalığı olmayan kadavra gözleri kullanılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İntraoküler enflamasyona bağlı vitreoretinal komplikasyonlar nedeniyle PPV uygulanan 12 hastadan vitreus ve kan örnekleri alınmıştır. Hastaların dördünde idiyopatik retinal vaskülit, üçünde Behçet Hastalığı, ikisinde endoftalmi birinde etyolojisi saptanamayan arka üveit ve iki hastada ise orta üveit mevcuttu.

Hastalardan vitreus örnekleri ile birlikte kan örnekleri de alınmış ve 1500 devirde 10 dakika santrifüje edilerek serum ayrıştırılmıştır.

Vitreus örneği PPV esnasında ve cerrahinin başlangıcında, dilüsyon olmaması için infuzyon sıvısı açılmadan önce ve en az 0.5cc alınmıştır.

Kontrol grubu olarak kadavra gözlerinden postmortem 1-12 saat sonra vitreus örneği alınmıştır. Bilinen göz hastalığı olan, sepsis veya nöroviral hastalıklar nedeniyle vefat etmiş olan kontrol grubu vitreus örnekleri çalışma kapsamının dışında tutulmuştur.

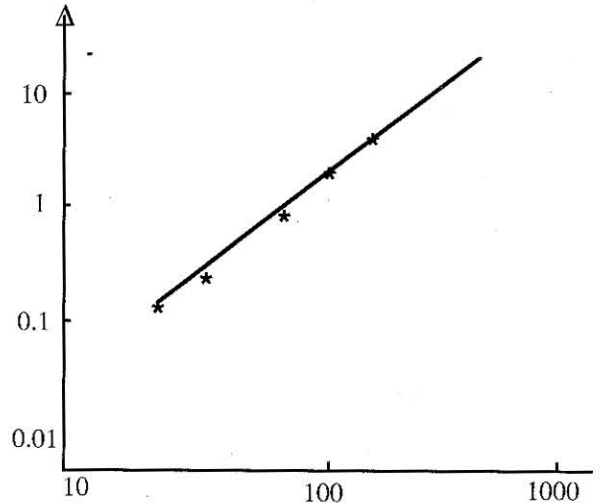
Alınan tüm örnekler -30 Cde plastik tüpler içinde tetkik tarihine kadar saklanmıştır.

Vitreus örneklerinde ve serumda interlökin-8 düzeyi Qauntikine™ Human İL-8 immunassay (Katalog No:D8000, R & D System, Inc. Mineapolis) kiti kullanılarak saptanmış ve çalışma ELISA tekniğiyle yapılmıştır. Tüm basamaklarda plastik tüp ve pipetler kullanılmıştır.

Rekombinant insan İL-8 (30 ng) içeren liyofilize İL-8 5ml RD5 ile sulandırılarak 6000 pg/ml dilüsyon elde edilmiştir.

Bu solüsyon kullanılarak 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 açılmıştır. Plate'teki her bir bölüme 100 µl RD1A solüsyonu konulmuştur. Standart tüplerinden sırayla alınan 100 µl solüsyon ilk 16 bölüme ve vitreus ve serum örneklerinden 100 µl diğer bölümlere konulmuştur. Üzeri plastik yapışkan şerit ile kapatılarak oda ısısında 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Otomatik yıkayıcıda kitin yıkama solüsyonu kullanılarak dörder defa yıkandıktan sonra İL-8'e karşı poliklonal antikor içeren sıvıdan her bölüme 200 µl konup, plastik yapışkan şerit ile kapatılarak tekrar iki saat oda ısısında inkübasyona bırakılıp otomatik yıkayıcıda tekrar yıkanmıştır. Substrat solüsyondan her bölüme 200 µl konup oda ısısında 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 2N sulfirik asit içeren durdurucu solüsyondan her bir bölüme 50 µl konarak reaksiyon tamamlanmış ve Spektrofotometrede 450 nm lik dalga boyunda optik yoğunlukları okunmuştur.

Buradan elde edilen standart eğri Şekil-1 'te görülmektedir.



Şekil 1: Spektrofotometreden elde edilen standart eğri

BULGULAR:

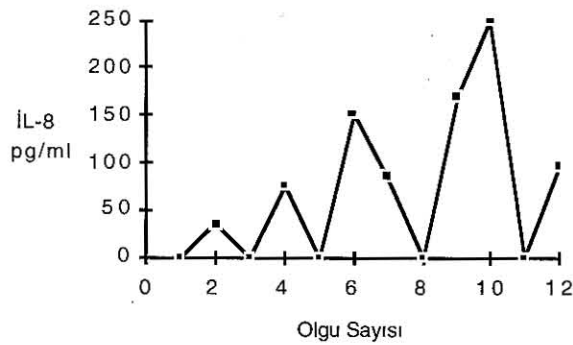
Değişik etyolojilere bağlı 12 üveitli hastanın 7'sinde 35-250 pg/ml arasında değişen düzeyde İL-8 saptanmıştır. Kontrol grubu olarak alınan kadavra gözlerinden hiçbirinde kullanmış olduğumuz metod ile ölçülebilir düzeyde İL-8 saptanmamıştır. Yine hastalardan alınan kan örneklerinin hiçbirinde ölçülebilir düzeyde İL-8 saptanmamıştır. Kullanmış olduğumuz metod ile ölçebildiğimiz minimum İL-8 düzeyi 15.75 pg/ml olduğundan bunun altındaki değerler İL-8 bulunmadı şeklinde değerlendirilmiştir. Üveitli 7 hastaya ait İL-8 düzeyleri Şekil-2 de görülmektedir.

Bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde StatView™ Brain pover Inc. Version 1.0 Dan Feldman ve Jim Gagron'un hazırlanmış olduğu program kullanılarak ve t-testi ile yapılmıştır.

TARTIŞMA VE SONUÇ:

Endotoksine bağlı üveitte ön kamara veya siliyer cisim ile iriste bulunan hücreler incelendiğinde araştırmacılar bu hücrelerin hemen hepsinin PMN lökositler olduğu olduğunu farketmişlerdir.^{10,11} Esas olayın PMN lökosit olması bize bu hücreleri buraya çeken güçlü bir kemoatraktan olması gerektiğini düşündürmektedir. Önceki çalışmalar ile bazı sitokinlerin ve moleküllerin kemoatraktan özelliğinin bu tip üveitte rol oynadığı gösterilmiştir.^{1,11,12}

Çalışmamızda İL-8 düzeyini üveitli 12 hastanın 7'sinin vitreusunda yükselmiş olarak bulduk. Kontrol grubu olarak kadavra gözlerinden alınan vitreus örneklerinin hiç birinde İL-8 düzeyini kullanmış olduğumuz



Şek 2: Üveitli hastalara ait, vitreus İL-8 düzeyi

yöntem ile ölçülebilir düzeyde saptamadık (<15 pg/ml). Üveitli hastaların %55'nin vitreus örneklerinde İL-8 düzeyi 35-250 pg/ml arasında saptanmış olup kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Hastaların hepsinde aynı zamanda kan İL-8 düzeyine de bakıldı. Kan İL-8 düzeyine bakmamızın iki nedeni vardı. Birincisi çeşitli sistemik hastalıkların bir manifestasyonu olan üveitte İL-8'in kan düzeyini yüksek bulabilecektik. İkincisi de eğer göz içindeki düzeyi yüksek bulursak, bunun kan retina bariyerindeki bozulma sonucu göz içine geçmiş İL-8 olup olmadığını saptamaktı. Hastaların hiç birinin serumunda ölçülebilir düzeyde İL-8 saptanmadı. Vitreustaki İL-8 düzeyi ile serum İL-8 düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık mevcuttu.

Kliniğimizde daha önce yapılan bir çalışmada aktif üveitli hastalarda İL-8 düzeyi vitreusta yüksek olarak bulunmuştu. RIA metoduyla ve Tavşan İL-8'i kullanılarak yapılan bu çalışmada saptanabilen en düşük değer 100 pg/ml idi. Bizim çalışmamızda da en yüksek değerler aktif vitritisi olan olgularda bulunmuştur.⁸ Ancak Akduman'ın çalışmasından farklı olarak aktif üveiti olmayan olgularda da yüksek İL-8 düzeyleri saptandı. Bu farklılık kullanmış olduğumuz yöntemin hassasiyeti nedeniyle olabilir.

De Boer ve ark 69 üveitli hastanın %45 nin vitreusunda 10-1830 pg/ml arasında değişen İL-8 düzeyleri tesbit etmişlerdir. Araştırmacılar insan rekombinan İL-8 kitini kullanarak ve ELISA metoduyla çalışmışlardır.¹³ Elde ettiğimiz sonuçlar araştırmacıların bulgularını destekler niteliktedir.

Aktif üveiti olan iki hastada vitreus İL-8 düzeyleri en yüksek bulunmuştur. Bu da aktif enflamasyon varlığında İL-8 düzeyinin belirgin olarak arttığını ve enflamasyon süreci boyunca etkisinin devam ettiğini göstermektedir.

Ekspirimental hayvan çalışmalarında insan rekombinan İL-8'in 100 pg/ml-1000 ng/ml dozlarında intravitreal enjeksiyonunun hücre infiltrasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Yine invitro şartlarda nötrofil kemotaksisi için gereken dozunun 100 pg/ml olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte İL-8'in insan gözündeki etkisinin invitro ve hayvan deneylerindeki değerlerden çok daha düşük

konsantrasyonda gelişmesi mümkündür. İL-8'in değişik biyolojik etkileri konsantrasyonuna bağlı olarak gelişmektedir. Bu yüzden düşük İL-8 düzeyi göz içinde bazı patolojik olayları başlatabilir.

Sonuç olarak, olgu sayımız az olmakla birlikte, elde ettiğimiz bulgular bize İL-8'in klinik üveit patogeneğinde rol oynadığını telkin etmektedir. Nötrofiller üzerine olan güçlü kemoatraktan etkisiyle nötrofil migrasyonunu başlatmakta ve bu da oküler enflamasyonlarda doku yıkımında etkili olmaktadır.

KAYNAKLAR:

1. Nussenblatt RB, Palestine AG: Uveitis, Fundamentals and clinical practice. Yearbook Medical Publishers, Inc. 1989; 2-20
2. Lightman S, Chan CC: İmmun mecanisms in chorio-retinal inflammation in man. Eye 1990; 4:345-353
3. Forrester JV: Uveitis:pathogenesis. Lancet 1991 338:1498-1501
4. Malech HL, Gallin JJ: Neutrophils in human diseases. N Engl J Med 1987; 317:687-694
5. Weissmann G, Korchak H: Rheumatoid arthritis : the rol of neutrophil activation. İnflamation 1990; 8(suppl):3-14
6. Thelen M, Peveri P, Kern P, von Tscharn V, Walz A, baggiolini M: Mecanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. FASEB J 1988; 2:2702-2706
7. Larsen CG, Anderson AO, Appela E, Oppenheim JJ, Matshushima K: The neutrophil activating protein (NAP-1) is also chemotactic for t-lymphocytes. Science 1991; 243:1464-1466
8. Akduman L: Üveit etyopatogeneğinde İL-8'in rolü. Uzmanlık tezi. Ankara 1993
9. Ferrick MR, Thureau SR, Oppenheim MH et al: Ocular inflammation stimulated by intravitreal IL-8 and İL-1. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1991; 32:1534-9
10. Rossenbaum JT, Samples JR, Hefeneider SH, Howes EL: Ocular inflammatory effects of intravitreal IL-1. Arch Ophthalmol 1987; 105:1117-20
11. Bhattacharjee P, Henderson B: İnflamatory responses to intraocularly injected IL-1. Curr. Eye Res 1987; 6:929-934
12. Jagels MA, Hugli TE: Neutrophil chemotactic factors promote leucocytosis; a common mecanesm for cellular recruitment from bone marrow. J İmmunol 1992; 48:1119-29
13. de Boer JH, Hack EC, Verhoeven AJ, Baarsma GS, de Jong PTVM, Rademakers AJJM et al: Chemoattractant and neutrophil degranulation activities related to IL-8 in vitreous fluid in üveitis and vitreoretinal disorders. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993; 34:12:3376-85