

(66)

# Ekspresja antygeny HLA-DR na komórkach nabłonka spojówki u pacjentów z zespołem suchego oka

## HLA-DR antygen expression on conjunctival epithelial cells in patients with dry eye

Małgorzata Mrugacz, Nella Żywalewska

Z Kliniki Okulistyki Dziecięcej Akademii Medycznej w Białymstoku  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Alina Bakunowicz-Łazarczyk

**Summary:** Purpose: The aim of this study was to investigate the expression of HLA-DR antigen on conjunctival epithelial cells from patients with dry eye.  
Material and methods: Ophthalmic examination and dry eye diagnostic tests were performed. Impression cytology specimens were collected in thirty patients with dry eye and in thirty people of control group. Conjunctival epithelial cells were processed for flow cytometry, by using monoclonal antibodies to HLA-DR.  
Results: A significant increase of HLA-DR expression on epithelial cells was found in patients with dry eye compared with normal eyes. We also found positive correlation of increased expression HLA-DR with ocular complaints and diagnostic tests for dry eye such as Schirmer test, FBUT and lissamine green staining.  
Conclusions: These results confirm the presence of immunological processes in the pathogenesis of dry eye syndrome. Increased expression of HLA-DR antigen positively correlates with the parameters of dry eye diagnostic tests. HLA-DR measurement might be a useful method for monitoring inflammatory conjunctival changes in this disorder.

**Słowa kluczowe:** zapalenie, cytometria przepływowa, cytologia impresyjna, suche oko.

**Key words:** inflammation, flow cytometry, impression cytology, dry eye.

Przyczyny występowania objawów suchego oka są wieloczynnikowe i mogą być związane z niedoborem poszczególnych składników zarówno powierzchni oka, jak i filmu łzowego (1,2,3). Badania ostatnich lat wskazują na udział procesów immunologicznych w zespole suchego oka (4,5,6). Istotne znaczenie przypisuje się komórkom nabłonka spojówki, które mogą odgrywać rolę w powstawaniu zapalenia drogą cząsteczek należących do głównego układu zgodności tkankowej MHC klasy II (major histocompatibility complex), takich jak antygen HLA-DR (human leukocyte antigen – DR). HLA-DR odgrywa kluczową rolę w inicjacji odpowiedzi zapalnej, w komunikacji między limfocytami a innymi komórkami (np. komórkami nabłonka) oraz w kontrolowaniu migracji leukocytów w procesie zapalnym (7).

**Celem pracy** jest zbadanie stopnia ekspresji antygeny HLA-DR na komórkach nabłonka spojówki u pacjentów z zespołem suchego oka.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono u 30 chorych z rozpoznaniem zespołem suchego oka, w tym u 12 pacjentek z zespołem Sjögrena (średnia wieku  $45,2 \pm 10,5$  roku) oraz u 18 osób z zespołem suchego oka niezwiązanym z zespołem Sjögrena – 14 kobiet i 4 mężczyzn

(średnia wieku  $46,4$  roku  $\pm 11,0$  lat). Wszyscy pacjenci stosowali leczenie objawowe zespołu suchego oka w postaci preparatów sztucznych łez. Grupę kontrolną stanowiło 30 osób zdrowych – 16 kobiet i 14 mężczyzn (średnia wieku  $44,7 \pm 11,5$  roku).

Przeprowadzone badania obejmowały: wywiad – występowanie uporczywych dolegliwości ocznych o charakterze uczucia ciała obcego w oku, światłowstrętu i pieczenia; badanie odcinka przedniego oka w lampie szczelinowej oraz wykonanie testów diagnostycznych potwierdzających zespół suchego oka, takich jak test Schirmera, pomiar czasu przerwania filmu łzowego (FBUT), załeganie fluoresceiny i barwienie zielenią lissaminy (8,9).

Do badania stopnia ekspresji antygeny HLA-DR na komórkach nabłonka spojówki wykorzystano metodę cytometrii przepływowej. W celu uzyskania komórek nabłonka zastosowano metodę cytologii impresyjnej (10,11). Polega ona na przyłożeniu do spojówki filtra miliporowego, dociśnięciu go, a następnie oderwaniu wraz z przyklejonymi komórkami zewnętrznej warstwy nabłonka. Z każdego oka, po znieczuleniu miejscowym spojówki, pobierano 4 preparaty w odległości kilku milimetrów od rąbka na godz. 12., 6., 3., i 9. Do badania zastosowano filtry miliporowe (filtry polietersulfonowe, o wielkości porów  $0,20 \mu\text{m}$ ; Supor, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI).

Uzyskany materiał poddano analizie w cytometrze przepływowym EPICS XL (Beckman Coulter Corporation, Miami, FL, USA) za pomocą odpowiednich zestawów (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Liczba komórek wymagana do analizy każdego pomiaru wynosiła od 1000 do 3000. Wyniki określano w procentach (%) komórek HLA-DR pozytywnych. Próbkę pobierane do badań zostały zakodowane przez osobę niebiorącą udziału w badaniu i analizowane w sposób anonimowy. Wszyscy badani wyrazili zgodę na wykonywane badania. Procedury przeprowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Akademii Medycznej w Białymstoku. Analizy statystycznej dokonano za pomocą testu Fishera i testu t-Studenta.

### Wyniki

Na dolegliwości ze strony oczu, takie jak dyskomfort, uczucie obecności ciała obcego w oku, światłowstręt i pieczenie, skarżyły się 23 osoby z zespołem suchego oka i dwie z grupy kontrolnej. Stwierdzono znamienne statystycznie różnice występowania tych dolegliwości między populacją pacjentów z zespołem suchego oka a grupą kontrolną ( $p < 0,001$ ). Zapalenie brzegów powiek obserwowano u czterech pacjentów z zespołem suchego oka i u dwóch osób z grupy kontrolnej. Nie stwierdzono znamienne statystycznych różnic występowania zapalenia brzegów powiek w grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną ( $p = 0,673$ ).

Średnia wartość testu Schirmera była istotnie statystycznie niższa u pacjentów z zespołem suchego oka ( $5,48 \pm 2,90$  mm) w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej ( $24,25 \pm 5,08$ ) ( $p < 0,001$ ). Średnia wartość czasu przerwania filmu łzowego wynosiła  $4,9 \pm 2,3$  s u pacjentów z suchym okiem i  $10,02 \pm 1,3$  s w grupie kontrolnej. Stwierdzono różnice znamienne statystycznie ( $p < 0,001$ ). Zaleganie fluoresceiny zaobserwowano u 5 pacjentów z zespołem suchego oka i u 2 badanych z grupy kontrolnej. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w występowaniu nieprawidłowych wyników zalegania fluoresceiny między grupą chorych a grupą kontrolną ( $p = 0,430$ ). Nieprawidłowy wynik barwienia zielenią lissaminy stwierdzono u 19 pacjentów z zespołem suchego oka i u 2 z grupy kontrolnej. Różnice były znamienne statystycznie ( $p < 0,001$ ).

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono ekspresję antygenu HLA-DR w 83,09% komórek nabłonka spojówki u pacjentów z zespołem suchego oka i w 10,66% komórek u osób z grupy kontrolnej. Średnia wartość odsetka komórek HLA-DR pozytywnych była znamienne statystycznie wyższa w grupie pacjentów z zespołem suchego oka w porównaniu z grupą kontrolną ( $p < 0,001$ ). Stwierdzono pozytywną korelację między ekspresją antygenu HLA-DR a występowaniem dolegliwości subiektywnych, nieprawidłowymi wartościami testu Schirmera, FBUT i zaleganiem zieleni lissaminy ( $p < 0,001$ ). Nie znaleziono korelacji ekspresji antygenu HLA-DR z występowaniem objawów zapalenia brzegów powiek i zaleganiem fluoresceiny ( $p = 0,548$ ).

### Wnioski

1. Przeprowadzone badania potwierdzają udział procesów immunologicznych w patogenezie zespołu suchego oka.
2. Zwiększenie ekspresji HLA-DR ma negatywny wpływ na parametry testów diagnostycznych zespołu suchego oka.
3. Pomiar ekspresji antygenu HLA-DR może być użyteczną metodą monitorowania zmian zapalnych spojówki w tej jednostce chorobowej.

### PIŚMIENNICTWO:

1. Stankiewicz A., Mikita A.: *Fizjologia i patologia filmu łzowego w przebiegu suchego oka*. Klin. Oczna, 1998, 100, 323-329.
2. Johnson M. E., Murphy P. J.: *Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome*. Prog. Retin. Eye Res., 2004, 23, 449-474.
3. Baudouin C.: *The pathology of dry eye*. Surv. Ophthalmol., 2001, 45, 211-220.
4. Brignole F., Pisella P. -J., Goldschild M., De Saint Jean M., Goguel A., Baudouin C.: *Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells of patients with dry eyes*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2000, 41, 1356-1363.
5. Hikichi T., Yoshida A., Tsubota K.: *Lymphocyte infiltration of the conjunctiva and the salivary gland in Sjögren's syndrome*. Arch. Ophthalmol., 1993, 11, 743-750.
6. Zierhut M., Dana R., Stern M. E., Sullivan D. A.: *Immunology of the lacrimal gland and ocular tear film*. Trends Immunol., 2002, 23, 333-335.
7. Hamrach P.: *Novel characterisation of MHC class II-negative population of resident corneal Langerhans cells*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2002, 43, 639-646.
8. Lemp M. A., Dolhman C. H., Holly F. J.: *Corneal desiccation despite normal tear volume*. Ann. Ophthalmol., 1970, 6, 258-284.
9. Lee S. H., Tseng S. C.: *Rose bengal staining and cytologic characteristics associated with lipid tear deficiency*. Am. J. Ophthalmol., 1997, 124, 736-750.
10. Calonge M., Diebold Y., Saez V., de Salamanca A. E., Garcia-Vazquez C., Corrales R., Herreras J. M.: *Impression cytology of the ocular surface: a review*. Exp. Eye Res., 2000, 78, 457-472.
11. Brignole-Baudouin F., Ott A. C., Warnet J. M., Baudouin C.: *Flow cytometry in conjunctival impression cytology: a new tool for exploring ocular surface pathologies*. Exp. Eye Res., 2004, 78, 473-481.

Praca wpłynęła do Redakcji 18.12.2004 r. (660).

Zakwalifikowano do druku 6.04.2005 r.

II Sympozjum Sekcji Okulistyki Wojskowej PTO, Kraków 19–21.05.2005 r.

#### Adres do korespondencji (Reprint requests to):

dr n. med. Małgorzata Mrugacz  
Klinika Okulistyki Dziecięcej  
ul. Waszyngtona 17  
15-274 Białystok