

Katarzyna Kurowska, Dagmara Mirowska, Anna Członkowska

Wpływ dożylnie podawanego metyloprednizolonu na parametry układu immunologicznego u chorych na stwardnienie rozsiane w trakcie rzutu

II Klinika Neurologiczna Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie
Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie

Podawanie glikokortykosteroidów jest najczęściej stosowaną metodą leczenia rzutów stwardnienia rozsianego. Nie do końca jednak został wyjaśniony mechanizm ich działania w zaostrzeniach choroby. Celem naszej pracy była ocena parametrów profilu immunologicznego (odsetka limfocytów B, T i ich subpopulacji, monocytów oraz wydzielanej przez nie cytokin IL-6 i IL-8) we krwi obwodowej. Za pomocą cytometrii przepływowej zbadano krew obwodową 10 chorych w trakcie stosowania preparatu Solu-Medrol. Obserwowano istotną statystycznie poprawę stopnia niesprawności mierzonej w skali EDSS. Odnotowano także istotny wzrost odsetka limfocytów B oraz spadek limfocytów T supresorowych. Wyniki badania wskazują, że GS wpływają nie tylko na poprawę stanu klinicznego, ale także wywierają wpływ na parametry profilu immunologicznego krwi obwodowej.

Summary

Glicocorticosteroids (GS) are the most common therapy of multiple sclerosis relapses, however mechanism of beneficial effect is not fully known. The aim of our study was to evaluate the changes of immunological profile (percentage of lymphocytes B, T and monocytes, and produced by this cells IL-6 and IL-8) during intravenous administration of Solu-Medrol. Using two-colour flow cytometry we have studied peripheral blood of 10 patients during exacerbation. We have observed statistically significant improvement of distability measured with EDSS. Statistically significant increase in lymphocyte B percentage and decrease in supressor T cells was also noted. Results of our study indicate that GS therapy affects not only clinical state but also parameters of peripheral blood immune profile.

Wstęp

Stwardnienie rozsiane (s.r.) jest przewlekłą chorobą demielinizacyjną ośrodkowego układu nerwowego (oun) o złożonej etiologii, w której prawdopodobnie dużą rolę odgrywają zaburzenia o charakterze autoimmunologicznym, prowadzące do niszczenia osłonek mielinowych włókien nerwowych.

W patogenezie s.r. dominuje odpowiedź immunologiczna typu komórkowego, a przede wszystkim aktywacja limfocytów T CD4+ (głównie subpopulacji Th1). Mechanizm ten jednak nie został jak dotąd bliżej wyjaśniony. Dzięki aktywacji we krwi obwodowej, co wydaje się czynnikiem niezbędnym dla zapoczątkowania procesu autoimmunologicznego w s.r., limfocyty T stają się zdolne do przechodzenia do oun. Proliferacja limfocytów i wydzielanie przez nie cytokin o działaniu

prozapalnym, metaloproteaz oraz zwiększenie ekspresji cząstek adhezyjnych powoduje bowiem uszkodzenie bariery krew–mózg i ułatwienie przenikania przez nią następnym komórkom. W obrębie oun dalsza aktywacja i penetracja autoreaktywnych komórek T jest możliwa pod warunkiem ponownego pobudzenia przez swoisty dla nich antygen (znajdujący się na komórkach prezentujących antygen, np. komórkach mikrogleju). W kolejnym etapie dochodzi do aktywacji i „wciągnięcia” w toczący się już proces zapalny innych komórek: limfocytów B, cytotoksycznych limfocytów T, komórek mikrogleju i astrocytów. Efektem jest synteza i wydzielanie cytokin prozapalnych: IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- α , a także innych chemokin, przeciwciał i enzymów proteolitycznych. (Bar, Oliviera i wsp. 1999, Franchimont, Louis i wsp. 1998, Oliveri, Valentino i wsp. 1998).

We krwi obwodowej chorych na s.r. stwierdza się zwiększone stężenie i wzrost produkcji niektórych cytokin, np.: IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-6 i IL-8.

IL-6 jest cytokiną produkowaną przede wszystkim przez monocyty i makrofagi, ale także fibroblasty, komórki śródbłonna, limfocyty T i B, keratynocyty, chondrocyty, komórki owodni, komórki rezydujące w oun (w tym astrocyty i komórki mikrogleju).

Głównymi czynnikami indukującymi produkcję tej interleukiny są IL-1, interferony, TNF, LPS i wirusy. IL-6 hamuje zwrotnie wydzielanie TNF. IL-6 należy do grupy czynników aktywujących geny dla białek ostrej fazy.

Działanie IL-6 jest wielokierunkowe: pobudza syntezę białek ostrej fazy w wątrobie, podtrzymuje przeżywanie niektórych neuronów, w oddziaływaniu na limfocyty B stymuluje terminalne różnicowanie w kierunku komórek uwalniających immunoglobuliny różnych klas, uczestniczy też w aktywacji rozpoznających antygen limfocytów T i ich różnicowaniu w kierunku limfocytów T cytotoksycznych. Rola IL-6 w patogenezie s.r nie jest jednoznacznie określona. Interleukina ta prawdopodobnie pobudza syntezę przeciwciał przeciwwirusowych, sprzyja procesom regeneracji neuronów poprzez działanie przeciwzapalne (hamowanie syntezy TNF- α , IL-beta1a, indukowanie antagonistów receptorów dla IL-1). IL-6 może ponadto chronić komórki oligodendrogleju przed działaniem TNF- α . Wydaje się również, że IL-6 może pobudzać sekrecję autoprzeciwciał przeciwmielinowych oraz indukować ich działanie remielinizacyjne (Navikas, Matusevicius i wsp. 1996, Alenka, Rabatic i wsp. 1999, Gagro, Rabatic i wsp. 1999).

IL-8 jest chemokiną produkowaną głównie przez makrofagi i monocyty. Jej wydzielanie wzmagają zarówno IL-1, jak i TNF α . Jednym z czynników regulujących ekspresję genu dla IL-8 jest receptor dla glikokortykosteroidów.

Oddziaływanie IL-8 na neutrofile obejmuje chemotaksję (przyciąganie do miejsca reakcji zapalnej czy immunologicznej, pobudzanie ich właściwości bakteriobójczych), degranulację i uwolnienie enzymów lizosomalnych oraz działanie cytotoksyczne. Interleukina ta stymuluje przechodzenie krążących limfocytów T przez wysoki śródbłonek naczyń żylnych pozawłosowatych, indukuje uwalnianie przez bazofile niektórych mediatorów reakcji anafilaktycznej (np.: histaminy, leukotrienu B4). IL-8 indukuje szybki napływ neutrofilów do ognisk zapalnych w oun i natychmiastową egzocytozę proteaz prowadząc do uszkodzenia struktur

białkowych. Astrocyty i mikroglej zdrowej tkanki mózgowej posiadają niewielkie ilości receptorów dla IL-8. Badania przeprowadzone (post mortem) na mózgach pacjentów chorujących na s.r. wykazały znaczny wzrost ekspresji receptorów dla IL-8. Przypuszcza się, że ta chemokina może odgrywać znaczącą rolę w promowaniu reakcji zapalnej rozwijającej się w oun. Zmniejszenie jej wydzielania przez komórki należące do układu immunologicznego, głównie granulocyty w trakcie podawania metylprednizolonu mogłoby być jednym z elementów wyjaśniających pozytywny wpływ leku na przebieg zaostrzenia s.r. (Eleovara, Lalla i wsp. 1998, Gagro, Rabatic i wsp. 1999, Hesselenger, Horuk i wsp. 1999).

Stosowanie w leczeniu rzutu s.r. dużych dawek glikokortykosteroidów (GS), podawanych dożylnie przez kilka dni (3–5), jest powszechnie stosowaną metodą. Spośród GS najczęściej podawany jest metyloprednizolon (Gasperini, Pozzili i wsp. 1998, Hawkins, Wolinsky i wsp. 2001, Leussink, Jung i wsp. 2001).

Spośród mechanizmów działania glikokortykosteroidów (GS), które zostały potwierdzone w badaniach na modelach zwierzęcych, a mogą mieć znaczenie w leczeniu rzutów s.r. uważa się:

1. Zmniejszenie ekspresji antygenów MHC (głównego układu zgodności tkanekowej człowieka) klasy II na powierzchni makrofagów i ograniczenie wytwarzania leukotrienów i prostaglandyn, co powoduje zwężenie naczyń włosowatych, ogranicza obrzęk, odkładanie depozytów fibryny oraz migrację komórek reakcji zapalnej do otaczających tkanek, a także zahamowanie degranulacji tych komórek.
2. Redystrybucję limfocytów T, apoptozę dojrzałych form limfocytów oraz zahamowanie ich aktywacji.
3. Ograniczenie wytwarzania interleukin o działaniu prozapalnym, np. IL-1, IL-2, IL-8.
4. Zahamowanie aktywności komórek śródbłonna, szczególnie w kontekście ekspresji na ich powierzchni cząstek adhezyjnych oraz ekspresji receptorów dla cząstek adhezyjnych na powierzchni limfocytów T.
5. Ograniczenie syntezy immunoglobulin, za wyjątkiem IgE.

Wszystkie powyższe elementy odgrywają znaczącą rolę w stabilizacji uszkodzonej bariery krew–mózg i zahamowaniu napływu komórek immunologicznych do oun, oraz w tworzeniu się miejscowej reakcji zapalnej (Elovaara, Lalla i wsp. 1998, Franchimont, Louis i wsp. 1998, Hesselenger, Horuk i wsp. 1999, Lessiuk, Jung i wsp. 2001).

Celem naszego badania było określenie wpływu dożylnie podawanego metyloprednizolonu na rozkład podstawowych fenotypów komórkowych (limfocytów i monocytów) krwi obwodowej oraz wydzielanych przez te komórki IL-6 i IL-8.

Material

Do badania zostali włączeni chorzy na s.r. (spełniający kryteria rozpoznania według McDonalda) leczeni w II Klinice Neurologicznej IPiN z powodu zaostrzenia s.r. Średnia wieku w badanej grupie wynosiła 32 lata \pm 11,21 (najmłodszy

pacjent miał 21 lat, najstarszy 50 lat). Czas trwania choroby wynosił średnio $2,85 \pm 3,53$. Zbadano 5 kobiet i 5 mężczyzn. Połowa z chorych otrzymała 500 mg metyloprednizolonu (preparat SoluMedrol) a druga połowa 1000 mg leku na dawkę stosowanego przez 5 kolejnych dni we wlewie dożylnym.

Żadna z osób badanych nie przyjmowała leków zmieniających naturalny przebieg choroby (interferony, gliatamer, cytostatyki lub immunoglobuliny podawane dożylnie)

Metoda

Do oceny parametrów profilu immunologicznego wykorzystana została krew żylna pobrana na heparynę (próbówki Primavette a 7,5 ml, Sarstedt, Niemcy) w ilości ok. 5,0 ml przed leczeniem oraz w 7 dobie od momentu rozpoczęcia terapii. Po wstępnym przygotowaniu materiału (izolacja metodą wirowania w gradiencie stężeń lub lizowanie krwinek czerwonych) według odpowiednich procedur dostarczonych przez producenta (Becton Dickinson, USA), poszczególne markery powierzchniowe oraz interleukiny wewnątrzkomórkowe zostały zidentyfikowane za pomocą antyludzkich przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z barwnikami fluorescencyjnymi (fikoerytryną – PE lub izotiocyjanianem fluoresceiny – FITC).

Przy użyciu gotowych kompletów przeciwciał należących do zestawu Simul-test IMK Lymphocyte® (Becton Dickinson, USA) z pełnej krwi oznaczono następujące fenotypy komórkowe: $CD3^+CD19^-$ (limfocyty T), $CD3^-CD19^+$ (limfocyty B), $CD3^+CD4^+$ (limfocyty Th), $CD3^+CD8^+$ (limfocyty Ts), $CD3^-CD56^+CD16^+$ (komórki NK).

Ponadto za pomocą odpowiednio dobranych zestawów przeciwciał, oznaczone zostały w wyizolowanych limfocytach, monocytach i granulocytach wewnątrzkomórkowe interleukiny: $CD3^+IL-6$ (IL-6 wytwarzana przez limfocyty T), $CD14^+IL-6$ (IL-6 wytwarzana przez monocyty) $CD19^+IL-6$ (IL-6 wytwarzana przez limfocyty B), $CD45^+IL-6$ – IL-6 wytwarzana przez granulocyty, $CD3^+IL8$ (IL-8 wytwarzana przez limfocyty T), $CD14^+IL-8$ (IL-8 wytwarzana przez monocyty), $CD19^+IL8$ (IL-8 wytwarzana przez limfocyty B), $CD45^+IL-8$ (IL-8 wytwarzana przez granulocyty).

Oznaczanie zarówno poszczególnych populacji komórkowych, jak i komórek wytwarzających interleukiny zostało uzupełnione o kontrolę pozytywną i negatywną, umożliwiając właściwe odczytanie i interpretację uzyskanych wyników (zestawy kontrolne dla IL-6 i IL-8: HiCK 3, 4, zestawy przeciwciał dla antygenów powierzchniowych: kontrola pozytywna umożliwiająca precyzyjne ustawienie bramki w celu oddzielenia populacji limfocytów i monocytów w obrazie cytometrycznym – $CD14^+CD45^+$ oraz kontrola izotypowa negatywna – IgG1IgG2a).

Analizę cytometryczną przeprowadzono za pomocą dwukolorowej cytometrii przepływowej wykorzystując aparat Vantage (Becton Dickinson, USA) stosując program komputerowy CellQuest (Becton Dickinson, USA).

Uzyskane wyniki zostały poddane ocenie statystycznej przy pomocy Testu Wilcozona dla dwóch próbek zależnych. Za istotne statystycznie uznano $p < 0,05$.

Wyniki

W trakcie podawania GS odnotowano poprawę stopnia niesprawności u wszystkich zbadanych osób. Przed leczeniem EDSS mieścił się w granicach 2,0–5,0 (średnio $3,45 \pm 0,92$), po leczeniu obejmował zakres 1,0–4,0 (średnio $2,40 \pm 0,93$) ($p < 0,05$).

W zakresie parametrów profilu immunologicznego obserwowano istotne statystycznie zmiany odsetka komórek o fenotypie $CD19^+CD3^-$, $CD3^+CD8^+$ oraz trend zmian w zakresie komórek $CD14^+IL-8$.

Przed leczeniem odsetek limfocytów B wynosił średnio $10,07 \pm 2,20$, po 7 dniach $17,08 \pm 5,54$ ($p = 0,03$). Odsetek limfocytów T supresorowych przed leczeniem osiągał wartość $27,2 \pm 4,8$, po 7 dniach podawania GS $24,44 \pm 5,49$ ($p = 0,04$).

Odsetek monocytów wytwarzających IL-8, który przed terapią wynosił $71,37 \pm 16,06$ zmniejszył się do $56,64 \pm 19,96$ ($p = 0,08$).

W zakresie pozostałych parametrów nie obserwowano istotnych statystycznie zmian.

Omówienie

Poprawa w zakresie EDSS u wszystkich chorych na s.r. w naszym badaniu jest istotnym potwierdzeniem dotychczas publikowanych wyników (Olivieri i wsp., 1998, Uitdehaag i Barkhof, 1998, Brusaferrri i Candelise, 2000, Sharrack i wsp., 2000). Jak do tej pory podawanie dożylnie metyloprednisolonu jest najczęściej stosowaną formą leczenia rzutów choroby (Hawkins, 2001).

Rezultaty naszego badania wskazują także, że GS wywierają wpływ na parametry profilu immunologicznego oceniane we krwi obwodowej. Wzrost odsetka limfocytów B wydaje się być korzystny ze względu na pośredni wzrost ekspresji receptorów dla czynników różnicowania (przekształcenie w komórkę produkującą immunoglobuliny), a co za tym idzie wzrost odporności (Jakóbiński, Gaciąg i wsp. 1995). Jak wiadomo rzut s.r. jest zwykle związany ze spadkiem odporności organizmu i częściej występuje w miesiącach wiosennych i jesiennych, kiedy wzrasta narażenie na infekcje. Wzrost odsetka limfocytów B jest jednak trudny do wytłumaczenia w aspekcie działania GS, gdyż w badaniach na modelach zwierzęcych GS ograniczają produkcję przeciwciał (za wyjątkiem klasy IgE) (Jakóbiński, Gaciąg i wsp. 1995).

Spadek w zakresie odsetka limfocytów Ts związany jest prawdopodobnie z mechanizmem redystrybucji i zahamowania ich aktywacji pod wpływem leczenia GS, co zostało udowodnione w modelach doświadczalnych (Ellovaara, Lalla i wsp. 1998, Lessiuk, Jung i wsp. 2001) i jest korzystne w aspekcie złagodzenia odpowiedzi immunologicznej towarzyszącej rzutowi. Szczególnie interesujący wydaje się jednak spadek odsetka monocytów wytwarzających IL-8. Wiadomo, że jest ona w znacznym stopniu odpowiedzialna za migrację komórek zapalnych do ognisk i uszkodzenia struktur białkowych (Muller-Lander, Jones i wsp. 1996, Cross, Woodroffe 1999). W badaniach patomorfologicznych mózgow pacjentów,

k którzy zmarli w przebiegu s.r. stwierdzano znaczny wzrost ekspresji receptorów dla IL-8 (Hesselenger i Horuk, 1999). W tym aspekcie zmniejszenie krążących monocytów zdolnych do wytwarzania IL-8 w trakcie leczenia GS może mieć szczególne znaczenie dla procesu zdrowienia.

W zakresie uzyskanych wyników wydaje się, że glikokortykosteroidy w s.r. wywierają korzystny wpływ w zakresie parametrów reakcji immunologicznej, odgrywającej rolę w procesie tworzenia się ognisk demielinizacyjnych.

Piśmiennictwo

1. Bar-Or A., Oliviera M.L. i wsp.: Molecular pathogenesis of multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 1999, 100, 252–259.
2. Brusaferrri F., Candelise L.: Steroids for multiple sclerosis and optic neuritis: a meta-analysis of randomized controlled clinical trial, *J. Neurol.* 2000, 247, 435–442.
3. Cross Ak, Woodroffe Mn: Chemokine modulation of matrix metalloproteinase and TI production in adult rat brain microglia and a human microline in vitro, *Glia* 1999 Dec; 28(3):183–189.
4. Elovaara I., Lalla M. i wsp.: Methylprednisolone reduces adhesion molecules in blood and cerebrospinal fluid in patients with MS, *Neurology*, 1998, 51, 1703–1707.
5. Franchimont D., Louis i wsp.: Effects of dexamethasone on hte profile of cytokine secretion in human whole blood cell culture, *J. Neuroimmunol.* 1998, 59–65.
6. Gagro A., Rabatic S. i wsp.: Detection of intracellular cytokines by flow cytometry, *Centr. Europ.Journal of Neurology*, 1999, 24, 125–131.
7. Gasperini C., Pozzilli C.C. i wsp.: Effect of steroids on GD-enhancing lesions before and during recombinant beta interferon-1a treatment in relapsing remitting multiple sclerosis, *Neurology*, 1998, 50, 403–406.
8. Hawkins C.P., Wolinsky J.S. i wsp.: Treatment of acute relapses, w: Principles of treatments in multiple sclerosis, Oxford, 2001, 14–22.
9. Hesselenger J., Horuk R.: Chemokine and chemokine receptor expression in the cetral nervous system, *Jour. Neurovirol.* Feb 1999, 5(1), 13–26
10. Jakóbisiak M., Gaciąg Z. i wsp.: Immunologia, 1995, wyd. II, 159–160, 258–264.
11. Leussink V., Jung S. i wsp.: High-dose metyloprednisolone therapy in Multiple Sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes, *Arch. Neurology*, Vol 58, Jan 2001, 91–97.
12. Martin R., Hohlfeld R.: Current immunotherapy of multiple sclerosis, *Clin. Immunother.* 1996, 5, supl. 1, 12–21.
13. McDonald et al.: Recommended Diagnostic Criteria for MS, *Ann. Neurol.* 2001; 50: 121–127.
14. Muuler-Lander U., Jones Jl. i wsp.: Enhaced expression of chemotactic receptors in multiple sclerosis lesions., *Jour. Neurol Sci* 1996, Dec; 144(1–2):135–141.
14. Oliveri R.L., Valentino P. i wsp.: Randomized trial comparing two different high doses of methylprednisolone in MS. A clinical and MRI study, *Neurology*, 1998, 50, 1833–1836.
15. Rudic R.A., Cohen J.A. i wsp.: Management of multiple sclerosis, *New Engl. J. Med.* 1997, 337, 1604–1612.
16. Sharrack B., Hughes R.A.C i wsp.: The effect of oral and intravenous methylprednisolone treatment on subsequent relapse rate in multiple sclerosis, *J. Neurol. Sci.* 2000, 173, 73–77.
17. Tselis A.C., Lisak R.P.: Multiple sclerosis. Therapeutic update, *Arch. Neurol.* 1999, 56, 277–280.
18. Uitdehaag B., Barkhof F.: Methylprednisolone for acute relapses of Multiple Sclerosis, can oral replace intravenous administration?, *CNS Drugs*, Oct 1998, 10(4), 233–237.
19. Van Oosten B.W., Truyen L. i wsp.: Choosing drug therapy for multiple sclerosis, *Drugs*, 1998, 56, 555–569.
20. Żeromski J., Dworacki G.: Ocena immunofenotypu komórek limfoidalnych przy pomocy cytometrii przepływowej – uwagi praktyczne i zastosowanie kliniczne, *Centr.-Europ. J. Immunol.* 1996, 21, 99–106.