

Przeciwozynofilowe działanie IL-12 w hodowanej tkance ludzkiego polipa nosa

Antieosinophil action of IL-12 in human polip culture.

¹⁾ Andrzej M. Fal, ²⁾ Jerzy Rabczyński, ³⁾ Agnieszka Gerber,
³⁾ Wojciech Mikulewicz, ¹⁾ Wojciech Barg, ¹⁾ Andrzej Obojski

¹⁾ Z Kliniki Chorób Wewnętrznych i Alergologii, AM we Wrocławiu; kierownik: prof. J. Małolepszy

²⁾ z Zakładu Anatomii Patologicznej, AM we Wrocławiu; Kierownik: prof. J. Rabczyński

³⁾ z Oddziału Otolaryngologii Specjalistycznego Szpitala we Wrocławiu; ordynator: dr W. Mikulewicz

Summary: Rationale: Tissue eosinophilia is an important pathophysiological issue in bronchial asthma and nasal polyps. Its magnitude is regulated by several mechanisms, including selective migration of eosinophils to peripheral tissues and prolongation of survival. A key role in this processes is assigned to Th2 originating cytokines: IL-3, IL-5, GM-CSF. It has been previously demonstrated that IL-12 diminishes tissue eosinophilia in an animal model, and Hofstra showed that IL-12 together with IL-18 prevents allergen-induced increase bronchial hyperresponsiveness, BAL eosinophilia and the development of allergen-specific Th2 cells. Methods: Nasal polyps were obtained during routine surgery and were cultured in fragments of approximately 30 mg for 2, 6, and 15 days in RPMI 1640 in the absence or presence of IL-12. Afterwards a dose-dependency was tested at day 2 of culture. Polyp tissue from cultures was then processed to slides, stained with Giemsa and cells were counted in light microscopy (400x). Results: Eosinophils represented $62,8 \pm 21,3\%$ of residing cells in nasal polyps at the day 0. IL-12 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) caused a significant time-dependent decrease in the percentage of Eos after 2 and 6 days. The effect of IL-12 at day 2 was concentration-dependent: control, $28,2 \pm 2,9$; at 10 ng/ml, $13,9 \pm 6,4$ ($n=4$, $p<0,05$); at 100 ng/ml, $11,6 \pm 2,1$ ($p<0.01$); at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, $7,5 \pm 1,5$ ($p<0,005$). Conclusion: IL-12 acts as potent topical antieosinophilic agent. Its action can be seen in a cultured polyp environment. It is visible already after two days and is concentration-dependent. Further study is needed to elucidate tissue mechanisms of this action.

Pneumonol. Alergol. Pol. 2004, 72, 14-18

Key words: eosinophil, interleukin 12, asthma, nasal polyps

Wstęp

W wielu schorzeniach jednym z podstawowych objawów histopatologicznych jest obecność w tkankach obwodowych bogatego nacieku komórkowego, w którym dominują eozynofile. Istnieje wiele dowodów na to, że do najistotniejszych czynników promujących powstawanie tkankowych nacieków eozynofilowych należy wybiórczo indukowana ekspresja cząstek adhezyjnych zlokalizowanych na powierzchni komórek śródbłonna naczyń pod wpływem cytokin Th2 – IL-4 i IL-13^{1,2}. Na wzrost migracji wpływa także nasilenie produkcji substancji chemotaktycznych dla eozynofilów przez limfocyty Th2 oraz przez nie same³. Podstawowymi substancjami zwiększającymi chemotaksję eozynofilów do miejsc zapalenia i jednocześnie przedłużającymi tam okres ich przeżycia, poprzez opóźnienie apoptozy, są IL-3, IL-5, GM-CSF⁴. Działają one w połączeniu z selektywnymi chemoatraktantami eozynofila (RANTES, eotaksyna, MCP-4). Efekt wywierany przez te cytokiny został potwierdzony w badaniach *in vitro* i *in vivo*⁵.

Polipy nosa są to twory najczęściej o kształcie owalnym, blade, często półprzezroczyste, o strukturze galaretowatej. Umiejscowione bywają na bocznej ścianie nosa wzdłuż przebiegu środkowej lub górnej małżowiny nosowej. Wywodzą się z zatoki sitowej lub szczękowej. Występują przede wszystkim pomiędzy 5 a 20 r. ż. z tendencją do nawracania po chirurgicznym usunięciu, około dwukrotnie częściej obserwowane są u mężczyzn niż u kobiet. Występują w co najmniej czterech odmianach histologicznych. Najpowszechniejszą z nich jest tak zwany alergiczny (eozynofilowy) polip nosa, stanowiący 85-90% wszystkich polipów. Twór ten charakteryzuje się znacznym obrzękiem, hiperplazją komórek kubkowych oraz komórkowymi naciekami zapalnymi złożonymi w dużej mierze z eozynofilów⁶.

Patogeneza polipów nosa nie jest dokładnie wyjaśniona. Prawdopodobnie uczestniczy w niej wiele czynników etiologicznych. Niezależnie od przyjętej hipotezy, większość badaczy zgodnie uważa, że istotną rolę w rozwoju polipów odgrywają eozynofil i limfocyt a nacieki złożone z tych komórek dominują w obrazie histopatologicznym.

Duża liczba eozynofiliów charakteryzująca nacieki komórkowe w polipie i błonie podśluzowej w schorzeniach alergicznych dróg oddechowych wskazuje na możliwość pewnych wspólnych ogniw patofizjologicznych, w których eozynofile odgrywają istotną rolę. Wydaje się więc, że mechanizmy mogące przeciwdziałać eozynofilii w polipie mogą być podobne do tych, które występują w chorobach alergicznych przebiegających z eozynofilią tkankową.

IL-12 (p70) znana pierwotnie jako czynnik stymulujący komórki T, czynnik stymulujący komórki typu *natural killer* (NK) lub czynnik wzrostu limfocytów cytotoksycznych, jest cytokiną o cząsteczce heterodimerycznej złożonej z dwóch podjednostek: p40 i p35 (o masach odpowiednio: 40000 i 35000 daltonów) połączonych ze sobą mostkami dwusiarczkowymi⁷. Do najlepiej poznanych działań IL-12 należy potęgowanie aktywności komórek NK, przesunięcie równowagi Th1/Th2 na korzyść klonów Th1 poprzez wpływ na różnicowanie nie-różnicowanych komórek T CD4⁺ w kierunku Th1 oraz indukcja sekrecji IFN γ przez limfocyty Th1 i NK⁸. Wzrost produkcji interferonu wpływa ujemnie na aktywność komórek fenotypu Th2 i obniża ilość uwalnianych cytokin. Badania Gavetta i wsp. wykazały w modelu zwierzęcym, że IL-12 może hamować indukowany alergenem wzrost nadreaktywności oskrzeli, eozynofilię tkankową oraz ekspresję cytokin Th2⁹. Dalsze badania, prowadzone na immunizowanych szczepach myszy, wykazały iż obecność endogennej IL-12 jest niezbędna do przeciwdziałania niekontrolowanemu wzrostowi poalergicznej nadreaktywności oskrzeli¹⁰.

Opierając się na założeniu o podobieństwie środowiska zapalnego w tkance dotkniętej zapaleniem alergicznym i polipie eozynofilowym nosa, co zostało już uzasadnione w innych badaniach¹¹, postanowiliśmy sprawdzić możliwość wykorzystania tej łatwo dostępnej tkanki jako modelu do oceny wpływu interleukiny 12 na wielkość nacieku eozynofilowego i związanej z tym ewentualnej modulacji zapalenia alergicznego.

Materiały i metody

Material biologiczny.

Polipy nosa zostały uzyskane od 10 pacjentów poddanych polipektomii z powodów leczniczych. Wszyscy pacjenci leczeni byli kortykosteroidem miejscowym w dawce około 50 μ g 2 x dziennie przez co najmniej 10 dni przed polipektomią. Żaden z pacjentów nie otrzymywał kortykosteroidów sys-

temowych przez co najmniej dwa tygodnie przed zabiegiem.

Charakterystyka pacjentów.

Tkanki polipów uzyskano od pacjentów w wieku 36,7 \pm 12,6 lat (średnia \pm SD). Grupa obejmowała zarówno chorych z atopią (co zostało potwierdzone dodatnim wynikiem testu skórniego z przynajmniej jednym alergenem) oraz osoby bez cech atopii.

Izolacja i hodowla eozynofiliów krwi obwodowej

Użyta metoda była standardową procedurą stosowaną w laboratorium, opisaną wcześniej¹²: granulocyty ludzkie były izolowane z krwi żyłnej pobranej od zdrowych osób do próżniowych probówek z dodatkiem antykoagulantu (EDTA) poprzez odwirowanie w ciągłym gradiencie Percollu w temperaturze pokojowej. Od tego etapu wszystkie czynności wykonane były w temperaturze +4°C, aby zapobiec aktywacji komórek. Krwinki czerwone zostały usunięte poprzez zastosowanie lizy hipotonicznej. Następnie usunięto komórki CD16⁺ (neutrofile) przy użyciu techniki immunomagnetycznej. Czystość eozynofiliów, oparta na badaniu preparatów barwionych metodą Diff-Quick wynosiła 98 \pm 1%, a oceniona na podstawie barwienia erytrozyną B żywotność komórek – 99 \pm 0.5% (n=5).

Hodowla tkanki polipa *ex vivo*.

Polipy umieszczane były w medium RPMI 1640 (Biofluids Inc., Rockville, MD) natychmiast po pobraniu chirurgicznym. Następnie były cięte na fragmenty (w przybliżeniu każda o masie mokrej 30 mg) i poddane hodowli w oddzielnych wgłębieniach na płytce zawierającej 48 wgłębień (MultiwellTM, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, N.J.) w w objętości 250 μ l RPMI 1640 z dodatkiem 10% roztworu FBS inaktywowanego termicznie (Gibco BRL, Grand Island, N.Y., USA), 1% L-glutaminy (Gibco BRL), 1% roztworu Penicyliny – Streptomycyny (Gibco BRL), 1% roztworu fungizonu (Gibco BRL) w obecności lub przy braku IL-12 (1, 10, 100, 1000 ng/ml) (R&D Systems inc., Minneapolis, MN, USA). Hodowle były pozostawiane w 36,6°C i atmosferze zawierającej 4,5-5,0% dwutlenku węgla, a następnie przerywane po 1, 2, 3, 6 lub 15 dniach. Zarówno świeża (kontrolna) jak i hodowana tkanka polipa zostały utrwalona w 10% roztworze formaldehydu, poddane cyklowi inkubacji i kąpieli w VIP2000 Tissue Processor, zalane parafiną, a następnie pocięte na mikrotomie na skrawki o grubości 8 μ m. Skrawki barwione były metodą Giemsy. Liczba komórek zapalnych znajdujących się w nacięciach tkankowych była oceniana na co najmniej pięciu polach o powierzchni 2 mm² w mikroskopie świetlnym w powiększeniu 400x. Liczba eozynofiliów wyrażana była jako odsetek całkowitej liczby znalezionych komórek zapalnych. W celu wyeliminowania możliwości znacznego wypłukania lub migracji komórek z polipa do płynów hodowli, osad z przypadkowo wybranych dołków hodowlanych został ponownie zawieszony w 100 ml RPMI, i po przygotowaniu cytopszynów liczony po barwieniu zestawem Diff-Quick.

W pierwszym etapie sprawdzono, czy istnieje bezpośredni wpływ którejkolwiek z badanych substancji na przeżywalność eozynofila. W tym celu hodowano oczyszczone eozynofile krwi obwodowej w medium z dodatkiem jednej z następujących substancji: IL-12, przeciwciała: anty-IL-5, anty-GM-CSF, budezonid. Budezonid stanowił kontrolę dodatnią, gdyż w tych samych warunkach udowodniono wcześniej jego zależny od stężenia efekt przeciwozynofilowy¹³.

Analiza statystyczna.

Otrzymane w trakcie badań wyniki poddano opracowaniu statystycznemu. Przed wyborem testu sprawdzono zgodność rozkładu wartości (w poszczególnych grupach wyników) z rozkładem normalnym. Posługując się testem Kołmogorowa (przy alfa= 0.05), nie można wykażać dla żadnej grupy wyników rozbieżności z rozkładem normalnym. W związku z tym użyto do analizy testu parametrycznego t-Studenta.

Wyniki badań

W hodowlach ocenianych po 48 godzinach jedynie budezonid wykazał znamienny w stosunku do kontroli spadek przeżywalności eozynofili (ocenianej jako stosunek liczby żywych komórek do całkowitej liczby komórek). Dla budezonidu wartość ta wynosiła $54 \pm 4,9\%$ (średnia \pm SD) $n=5$ (liczba eksperymentów) i była niższa od kontroli: $68 \pm 6,2\%$ ($p < 0,05$). W hodowlach ocenianych po 6 dniach żadna z badanych substancji nie spowodowała różnego od warunków kontrolnych spadku odsetka żywych eozynofili (Ryc. 1).

W preparatach tkanki polipa wykonanych w dniu pobrania (kontrola – dzień 0) eozynofile stanowiły większość wśród komórek zapalnych w badanych polipach ($62,8 \pm 21,3\%$). Spadek odsetka eozynofili był widoczny w dniach: drugim, szóstym i piętnastym; osiągał odpowiednio: $44,9 \pm 11,7\%$ ($p < 0,05$ w stosunku do dnia 0), $36,5 \pm 5,4\%$ ($p < 0,05$), $17,6 \pm 9,2\%$ ($p < 0,05$) całości komórek. Dodatkowo stwierdzono, że ubytek liczby komórek nie jest związany z ich migracją z polipa do medium hodowlanego, ponieważ osady z wgłębień na płytkach, w których przeprowadzano hodowle zawierały bardzo podobną liczbę komórek, niezależnie od długości trwania i warunków hodowli.

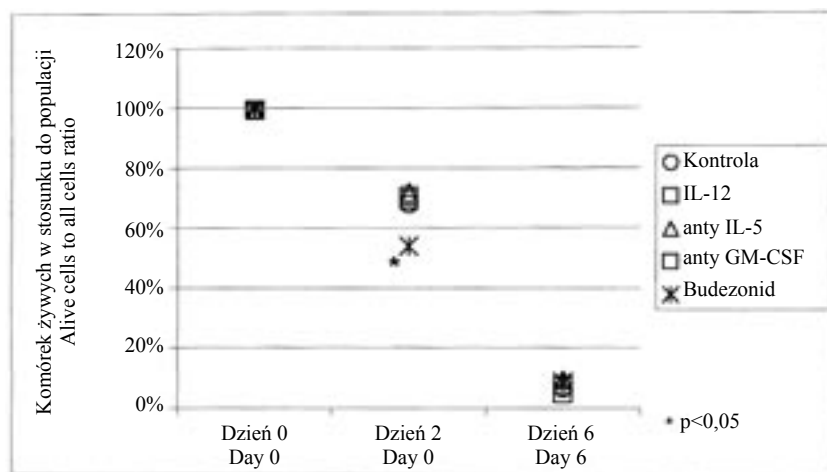
W hodowli przeprowadzonej z dodaniem IL-12 [$1 \mu\text{g/ml}$] obserwowano bardzo dynamiczny spadek odsetka eozynofili. Największy spadek nastąpił już po 48 godzinach hodowli ($20,3 \pm 7,2\%$ vs kontrola tego samego dnia $44,9 \pm 11,7\%$; $p < 0,005$), do dnia szóstego odsetek eozynofili nie uległ dalszej znamiennej zmianie i wynosił $22,9 \pm 10,7\%$ ($p < 0,05$ vs kontrola). W dniu piętnastym nie było różnic pomiędzy hodowlą kontrolną a IL-12. (Ryc. 2).

Następnie tkankę polipa hodowano z różnymi stężeniami IL-12 – 1, 10, 100 ng/ml i 1 $\mu\text{g/ml}$.

Wykazano wyraźną zależność efektu od stężenia, przy znamienności działania pojawiającej się już przy stężeniu 10 ng/ml. Eozynofilia w dniu zero w użytych w tej fazie badań polipach wynosiła $48,7 \pm 14,6\%$. W hodowlach z IL-12 po dniu drugim odsetek eozynofili w nacieku w tkance przy stężeniu 1 ng/ml wynosił $23,4 \pm 4,6\%$, 10 ng/ml – $13,9 \pm 6,4\%$, 100 ng/ml – $11,6 \pm 2,1$ i 1 $\mu\text{g/ml}$ – $7,5 \pm 1,5\%$. (Ryc. 3).

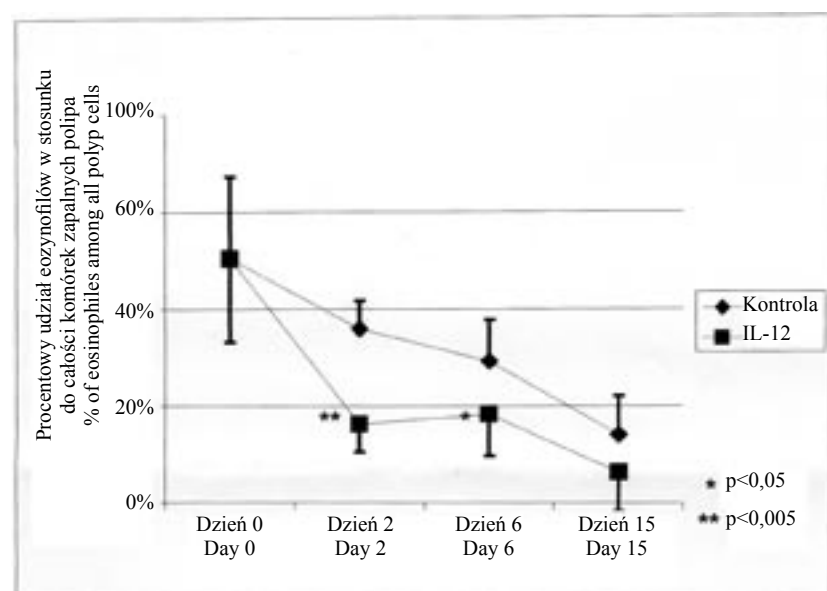
Rycina 1. Wpływ wybranych substancji na przeżywalność oczyszczonych eozynofili krwi obwodowej w hodowli in vitro ($n=5$).

Figure 1. Alive cells to all cells ratio.

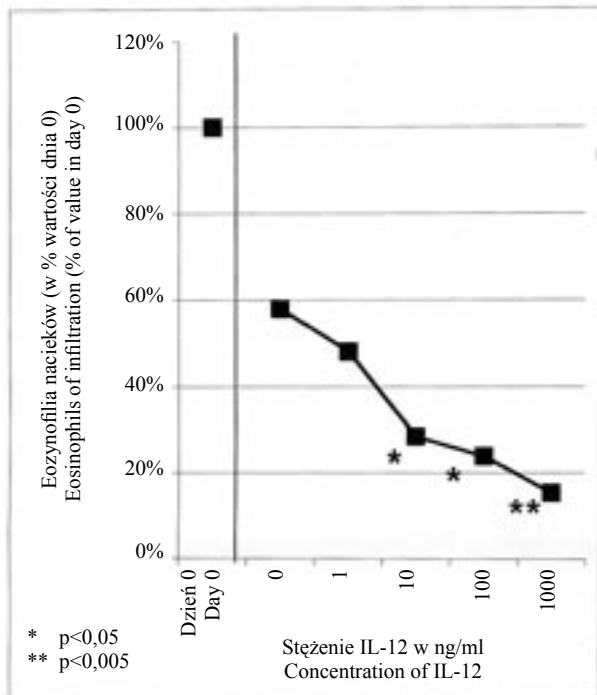


Rycina 2. Wpływ IL-12 w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ na odsetek eozynofili w naciekach komórkowych w tkance polipa hodowanej ex vivo ($n=6$).

Figure 2. % of eosinophils among all polyp cells.



Rycina 3. Wykres zależności stężenie efekt. Początkową wartość odsetka eozynofili przyjęto jako 100% (n=4).
Figure 3. Eosinophils of infiltration (% of value in day 0).



Dyskusja.

Interleukina 12 jest pleiotropową cytokiną aktywną w licznych procesach immunologicznych i zapalnych. Istnieją dowody na regulatorową rolę IL-12 w chorobach alergicznych. Jest ona prawdopodobnie związana z supresją odpowiedzi typu Th2 i przesunięciem równowagi cytokinowej w stronę Th1, co może wywoływać efekt w postaci „wygaszania” zapalenia alergicznego będącego w dużej mierze Th2-zależnym oraz zmniejszać eozynofilię krwi i tkankową, ponieważ interleukiny Th2 są najważniejszymi cytokinami promującymi granulocyty kwasochłonne. Wykazano, między innymi, że IL-12 niweluje u myszy eozynofilię płynu opłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych oraz ekspresję IL-4 i IL-5^{9,14}.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że IL-12 powoduje przyspieszony spadek eozynofilii w tkance polipa hodowanej w warunkach *ex vivo*, co koreluje z obserwacjami innych zespołów badawczych, przeprowadzanych jednak na modelach zwierzęcych a nie w hodowli *ex vivo* tkanki ludzkiej. Między innymi badania Gavetta i wsp. wykazały, że IL-12 może hamować indukowany alergenem wzrost nadreaktywności oskrzeli oraz rozwój eozynofilii tkankowej Th2. Następnie u immunizowanych szczepów myszy udowodniono, iż obecność endogennej IL-12 jest niezbędna

do przeciwdziałania niekontrolowanemu wzrostowi poalergenowej nadreaktywności oskrzeli^{10,15}.

Niezależnie prowadzone eksperymenty Sterna, Gleicha i Schleimera wykazały, że oczyszczone eozynofile w przeważającym odsetku nie przeżywiają w hodowli powyżej 72 godzin (wyjątek stanowią eozynofile osób atopowych lub preinkubowane z cytokinami proeozynofilowymi mające czas przeżycia do 5 dni¹⁶). Analogiczny eksperyment przeprowadzono na początku obecnych badań, osiągając identyczny wynik i dodatkowo dowodząc, że IL-12 nie powodowała przyspieszonej śmierci eozynofili w hodowli komórek oczyszczonych. Wyklucza to *de facto* bezpośredni wpływ IL-12 na eozynofile i skłania do przypuszczenia, że odnotowany spadek eozynofilii w hodowanych fragmentach polipa jest wynikiem działania pośredniego IL-12. Prawdopodobnie wywiera ona wpływ na inne komórki środowiska tkanki polipa, które są aktywne w procesie utrzymania życia i aktywności eozynofili. Może dochodzić do przyspieszenia apoptozy eozynofili związanych ze zmniejszeniem stężeń cytokin „proeozynofilowych” pochodzących z komórek Th2 hamowanych w tym przypadku przez zwiększone stężenie IFN γ spowodowane obecnością IL-12. Interpretacja taka potwierdza może wcześniejsze obserwacje m.in. Trinchieri’ego¹⁷ i Wynna¹⁸ o nasileniu produkcji IFN γ przez IL-12 oraz niezbędności tego etapu dla dalszej regulacji procesów zapalnych. Alternatywnie można założyć, że w środowisku zapalnym polipa, pod wpływem innych mediatorów, eozynofile zmieniają ekspresję receptorów błonowych i stają się podatne na bezpośrednie działanie IL-12. Obecne badania w żaden sposób nie odnoszą się jednak do tej hipotezy, nie istnieją również dotychczas doniesienia w literaturze światowej poruszające ten temat.

Efekt hypoeozynofilowy IL-12 był widoczny już po 24 godzinach hodowli i utrzymywał się przez sześć dni. Dodatkowo wykazano zależności wielkości efektu od użytej dawki (stężenia IL-12) – znamieny efekt obserwowano już w stężeniu IL-12 większym bądź równym 10 ng/ml.

Wnioski:

Interleukina 12 w środowisku hodowanych *ex vivo* fragmentów ludzkich polipów nosa wykazuje działanie przeciwozynofilowe, efektywnie obniżając odsetek eozynofili w naciekach komórkowych już w drugiej dobie hodowli.

Efekt ten jest zależny od dawki. Z obecnego eksperymentu nie wynika jasno mechanizm takiego

działania. Prawdopodobnym mechanizmem prowadzącym do redukcji eozynofilii tkankowej jest redukcja przez Th2 produkcji cytokin wydłużających przeżycie eozynofilów.

Piśmiennictwo:

1. Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J i wsp.: Interleukin-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium: association with expression of VCAM-1. *J Immunol* 1992; 148:1086-1092
2. Bochner BS, Klunk DA, Sterbinsky S.A. : Interleukin-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human endothelial cells. *J Immunol* 1995; 154: 799-803
3. Ohno I, Lea R, Finotto S i wsp.: Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) gene expression by eosinophils in nasal polyposis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5: 505-510
4. Simon H-U, Yousefi S, Schranz C: Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J Immunol* 1997; 158:3902-3908
5. Rothenberg ME, Owen WF Jr., Silberstein DS. i wsp.: Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J Clin Invest* 1988; 81:1986-1992
6. Settipane GA, Chaffee FH. Nasal polyps. *Am J Rhinol* 1987; 1:119-126
7. Trinchieri G: Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 1994; 84:4008-4027
8. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM: IL-10 inhibits human lymphocyte IFN γ production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* 1993; 178:1041-1048
9. Gavett SH, O'Hearn DJ, Li X i wsp. : Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J. Exp. Med.* 1995; 182:1527-1536
10. Keane-Myers A, Wysocka M, Trinchieri G, Wills-Karp M: Resistance to antigen-induced airway hyperresponsiveness requires endogenous production of IL-12. *J Immunol* 1998; 161:919-926
11. Laitinen L, Laitinen A, Neino M, Haahtela T: Eosinophilic airway inflammation during exacerbation of asthma and its treatment with inhaled corticosteroids. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 143: 423-427
12. Hansel TT, Pound JD, Pilling D i wsp.: Purification of human eosinophils by negative selection using immunomagnetic beads. *J Immunol Methods* 1989; 122:97-103
13. Lamas AM, Marcotte GV, Schleimer RP: Human endothelial cells prolong eosinophil survival. Regulation by cytokines and glucocorticoids. *J Immunol* 1989; 142:3978-3984
14. Iwamoto I, Kumano K, Kasai M i wsp.: Interleukin-12 prevents antigen-induced eosinophil recruitment into mouse airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1257-1260
15. Kips JC, Brusselle GJ, Joos GF i wsp.: Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:535-539
16. Stern M, Meagher L, Savill J, Haslett C: Apoptosis in human eosinophils. Programmed cell death in the eosinophil leads to phagocytosis by macrophages and is modulated by IL-5. *J Immunol* 1992; 148:3543-3549
17. Trinchieri G: Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 1994; 84:4008-4027
18. Wynn TA, Jankovic D, Hieny S i wsp.: IL-12 exacerbates rather than suppresses T helper 2-dependent pathology in the absence of endogenous IFN- γ . *J Immunol* 1995; 154: 3999-4009

Wpłynęła: 4.12.2003 r.

Adres: Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii AM, ul. Traugutta 57/59, 50-417 Wrocław