

Streszczenie w języku polskim

Wstęp

Stwardnienie rozsiane jest najczęstszą zapalno-demielinizacyjną chorobą ośrodkowego układu nerwowego – szacuje się, że na całym świecie dotyczy ona około 2,9 mln ludzi. Polska należy do krajów o wysokim wskaźniku chorobowości MS. Bezpośrednia przyczyna tej choroby jest nieznana, określono natomiast czynniki ryzyka jej rozwoju. Do czynników niemodyfikowalnych zalicza się płeć żeńską, wiek pomiędzy 20 a 35 rokiem życia oraz czynniki genetyczne i infekcje wirusowe, szczególnie EBV. Do najbardziej istotnych modyfikowalnych czynników ryzyka rozwoju MS zalicza się palenie papierosów, niski poziom witaminy D3 oraz otyłość w okresie dojrzewania. Wyróżnia się następujące postacie choroby: aktywny kliniczny izolowany zespół, postać rzutowo-remisyjna, pierwotnie postępująca i wtórnie postępująca. Rozpoznanie stawia się na podstawie stwierdzenia współistnienia rozsiania w czasie i przestrzeni, z wykorzystaniem kryteriów McDonald'a z roku 2017.

Stwardnienie rozsiane jest chorobą autoimmunologiczną, o nie do końca poznanej patogenezie. Reakcja autoimmunologiczna wynika z zaburzenia tolerancji immunologicznej, czyli równowagi pomiędzy aktywnością zapalną – efektorową i regulatorową. Głównymi i najlepiej przebadanymi grupami komórek zaangażowanymi w rozwój MS są limfocyty T CD4+, limfocyty T CD8+ oraz limfocyty B. Ostatnie lata przyniosły nowe dane o udziale w patogenezie MS elementów odpowiedzi nieswoistej - komórek mieloidalnych, astrocytów, mikrogleju, komórek dendrytycznych i komórek NK.

Komórki NK to duże ziarniste limfocyty charakteryzowane przez obecność markera powierzchniowego CD56 i brak markera powierzchniowego CD3 (CD56⁺ CD3⁻). Stanowią średnio 10% limfocytów krwi obwodowej i są jednym z głównych składników odporności wrodzonej. Komórki NK są częścią pierwszej linii obrony organizmu i odgrywają kluczową rolę w zabijaniu komórek zainfekowanych patogenem i komórek nowotworowych. Istnieje tradycyjny podział komórek NK na dwie główne subpopulacje ze względu na poziom ekspresji markera powierzchniowego CD56 – NK CD56^{bright} o dużej ekspresji CD56 i NK CD56^{dim} – o małej ekspresji CD56. Stwierdzenie obecności lub braku innych markerów na powierzchni komórek NK może służyć do wyróżniania różnych subpopulacji. Funkcja komórki NK jest determinowana przez potencjał do uwalniania ziarnistości cytotoksycznych, cytotoksyczność zależną od przeciwciał, interakcje z receptorami

programowanej śmierci czy też zdolność do uwalniania cytokin. Ze względu na efekt jaki dają, komórki NK można podzielić na dwie główne grupy: cytotoksyczne i regulatorowe.

Wyniki wielu badań świadczą o udziale komórek NK w patogenezie MS, ale wnioski z nich nie są jednoznaczne. Wskazują bowiem na dwa przeciwstawne kierunki działania komórek NK: ochronny – regulatorowy, zmniejszający objawy MS i patogenny – wzmagający odpowiedź autoimmunologiczną, promujący zaostrzenia.

Cel pracy

Celem pracy jest ocena znaczenia komórek NK w patogenezie stwardnienia rozsianego poprzez ocenę różnic w fenotypie, wydzielaniu enzymów litycznych i cytokin oraz funkcji komórek NK pomiędzy grupami pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią MS, pierwotnie postępującą postacią MS i grupą kontrolną.

Pacjenci, materiał i metody

Grupę badaną stanowiło 35 chorych na stwardnienie rozsiane, diagnozowanych w Klinice Neurologii z Pododdziałem Leczenia Udaru Mózgu oraz Poradni Neurologicznej Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego nr 2 w Rzeszowie. Kryteria włączenia do badania obejmowały: wiek powyżej 18 roku życia, możliwość wyrażenia świadomej zgody na badanie, brak jakiegokolwiek terapii immunomodulującej w przeszłości oraz obecnie, brak leczenia immunosupresyjnego w przeszłości oraz obecnie, odstęp od sterydoterapii wynoszący co najmniej 8 tygodni, brak rzutu choroby lub zaostrzenia w ciągu ostatnich 8 tygodni, brak aktywnej infekcji przewlekłej, brak jakiegokolwiek infekcji w ciągu ostatnich 4 tygodni.

Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych osób. Grupę dobrano pod względem struktury płci i wieku zbliżonej do grupy badanej. Zdrowi ochotnicy byli rekrutowani spośród pracowników Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego nr 2 w Rzeszowie i Uniwersytetu Rzeszowskiego. Warunkami kwalifikacji do badania były: wiek powyżej 18 roku życia, możliwość wyrażenia świadomej zgody na badanie, brak stwierdzonych chorób autoimmunologicznych, brak stosowania leków mających wpływ na układ immunologiczny, brak aktywnej przewlekłej infekcji, brak infekcji w ciągu ostatnich 4 tygodni.

Materiałem do badań była krew żylna. Analizę materiału przeprowadzono w laboratorium Zakładu Immunologii Człowieka Instytutu Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego. Obejmowała ona przygotowanie próbek do cytometrii przepływowej poprzez izolację komórek jednojądrzastych krwi obwodowej, zakładanie hodowli komórkowych, a

następnie oznaczanie markerów powierzchniowych (CD56, CD335, CD27, CD274, CD73) i wewnątrzkomórkowych (granzym B, granzym K, perforyna, TGF- β , IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-13). Analizę cytometryczną przeprowadzono za pomocą cytometru przepływowego Amnis® CellStream® (Cytek Biosciences). Wyniki opracowano w programie Cell Stream Analyzer w wersji 1.5.17. Odnotowano odsetek poszczególnych subpopulacji komórek oraz medianę intensywności fluorescencji.

Bazę danych i badania statystyczne przeprowadzono w oparciu o oprogramowanie komputerowe Statistica 9.1 (StatSoft, Polska).

Badania wykonano po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej przy Izbie Lekarskiej w Rzeszowie zgodnie z protokołem zaakceptowanym przez Komisję (decyzja nr 85/2023/B).

Wyniki

Do badania zakwalifikowano 35 pacjentów z rozpoznaniem stwardnieniem rozsianym. W grupie badanej było 28 kobiet (80%) oraz 7 mężczyzn (20%). Wiek pacjentów w grupie badanej wynosił od 20 do 65 lat. Mediana dla wieku pacjentów wyniosła 41 lat. U 22 pacjentów rozpoznano rzutowo-remisyjną postać stwardnienia rozsianego (63%), u 13 postać pierwotnie postępującą stwardnienia rozsianego (37%).

W grupie pacjentów z rozpoznaną postacią rzutowo-remisyjną MS było 18 kobiet (82%) i 4 mężczyzn (18%) w wieku od 20 do 53 lat. Mediana dla wieku pacjentów w tej grupie wyniosła 33 lata. W grupie pacjentów z rozpoznaną postacią pierwotnie postępującą MS było 10 kobiet (77%) i 3 mężczyzn (23%) w wieku od 40 do 65 lat. Mediana dla wieku pacjentów w tej grupie wyniosła 52 lata.

Do grupy kontrolnej początkowo zakwalifikowano 15 zdrowych osób - 12 kobiet (80%) i 3 mężczyzn (20%) w wieku od 23 do 65 lat (mediana 40 lat). W skład grupy kontrolnej poddanej pełnej analizie ostatecznie weszło 12 zdrowych osób. Wśród nich 9 stanowiły kobiety (75%) a 3 mężczyźni (25%). Wiek uczestników grupy kontrolnej wynosił od 23 do 65 lat. Mediana dla wieku uczestników tej grupy wyniosła 41,5 roku.

Analizę danych rozpoczęto od porównania immunofenotypu komórek NK pomiędzy trzema grupami: pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią MS, pacjentów z pierwotnie postępującą postacią MS i zdrową kontrolą. Analiza ta miała na celu stwierdzenie czy badane grupy różnią się w zakresie subpopulacji NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335-, NK CD335+, NK CD27-, NK CD27+, NK CD274-, NK CD274+, NK CD73-, NK CD73+.

Nie zaobserwowano istotnych różnic w odsetku żadnej z badanych subpopulacji komórek NK pomiędzy pacjentami z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą. Nie stwierdzono istotnych różnic w MFI subpopulacji komórek NK CD335-, NK CD27-, NK CD274-, NK CD73- i NK CD73+ pomiędzy pacjentami z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą. Stwierdzono wyższe MFI subpopulacji NK CD335+ w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS i w grupie pacjentów z RRMS względem grupy pacjentów z PPMS. Stwierdzono wyższe MFI subpopulacji NK CD27+ w grupie kontrolnej względem grup pacjentów z RRMS i PPMS. Stwierdzono większą wartość MFI subpopulacji komórek NK CD274+ w grupie pacjentów z PPMS względem grupy pacjentów z RRMS.

W drugim etapie analizy danych porównano odsetek i MFI subpopulacji komórek NK zawierających poszczególne enzymy lityczne (granzym B, granzym K, perforyna) i cytokiny (TGF- β , IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-13) pomiędzy trzema grupami: pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią MS, pacjentów z pierwotnie postępującą postacią MS oraz kontrolą. Analiza ta miała na celu stwierdzenie czy badane grupy różnią się w zakresie potencjalnych funkcji komórek NK.

Stwierdzono wyższy odsetek komórek NK zawierających granzym B u pacjentów z RRMS względem grupy kontrolnej (w subpopulacjach NK CD27+ i NK CD73-).

Stwierdzono wyższy odsetek komórek NK zawierających granzym K w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacji NK CD56^{bright}) i w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacji NK CD27-). Wyższe MFI komórek NK zawierających granzym K zaobserwowano w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacji NK CD56^{dim}).

Nie stwierdzono różnic w odsetku i MFI komórek NK zawierających perforynę pomiędzy pacjentami z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą.

Wyższy odsetek komórek NK zawierających TGF- β stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacjach NK CD335+, NK CD27+, NK CD27-) oraz w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacji NK CD335+). Wyższe MFI komórek NK zawierających TGF- β stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacji NK CD335+) i w grupie pacjentów z PPMS względem grupy kontrolnej (w subpopulacji NK CD274-).

Wyższy odsetek komórek NK zawierających IFN- γ stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacjach NK CD56^{bright}, NK CD335-, NK CD27-, NK CD274-) oraz w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacjach NK CD56^{bright}, NK CD335+, NK CD27-).

Stwierdzono wyższy odsetek komórek NK zawierających IL-10 w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacjach NK CD56^{bright}, NK CD335+, NK CD27-). Wyższe MFI komórek NK zawierających IL-10 stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacjach NK CD56^{bright}, NK CD335+) oraz w grupie pacjentów z PPMS względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacji komórek NK CD27+).

Wyższy odsetek komórek NK zawierających IL-4 stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacjach NK CD27-, NK CD274-) oraz w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacjach NK CD335+, NK CD27-, NK CD274+). Wyższe MFI komórek NK zawierających IL-4 stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacji NK CD335+).

Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka komórek NK zawierających IL-13 pomiędzy pacjentami z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą. Wyższe MFI komórek NK zawierających IL-13 stwierdzono w grupie pacjentów z PPMS względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacji NK CD27+).

Wnioski

1. Komórki NK pacjentów z RRMS i PPMS nie różnią się pod względem odsetka danego fenotypu od siebie oraz od komórek NK osób zdrowych. Różnice fenotypowe można stwierdzić jedynie na podstawie analizy MFI.
2. Komórki NK pacjentów z RRMS, PPMS różnią się od komórek NK zdrowych osób zawartością granzymu B i K, ale nie perforyny. Komórki NK pacjentów z RRMS i PPMS nie różnią się od siebie pod względem zawartości enzymów cytolitycznych.

3. Komórki NK pacjentów z RRMS, PPMS różnią się od komórek NK zdrowych osób zawartością TGF- β , IFN- γ , IL-10 i IL-4, ale nie IL-13. Komórki NK pacjentów z RRMS i PPMS różnią się od siebie pod względem zawartości cytokin jedynie w zakresie MFI.

4. Komórki NK pacjentów z RRMS i PPMS poprzez mniejszą zawartość cytokin przeciwzapalnych mogą wykazywać osłabioną funkcję regulatorową w porównaniu do komórek NK zdrowych osób.

Słowa kluczowe: stwardnienie rozsiane, komórki NK, odporność nieswoista