

Vernal keratokonjonktivitte gözyaşı makrofaj migrasyon inhibitör faktör düzeyleri

Tear levels of macrophage migration inhibitory factor in vernal keratoconjunctivitis

Onur Çatak¹, Orhan Aydemir², Bilal Üstündağ³

ÖZET

Amaç: Vernal keratokonjonktivit (VKC) patogenezi tam olarak anlaşılammış olup, sadece Tip I aşırı duyarlılık cevabıyla açıklanamamaktadır. Bu çalışmada VKC hastalarının gözyaşı makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF) düzeyini araştırmak amaçlanmıştır.

Yöntemler: Gözyaşı örnekleri topikal anestezi damlatmadan lateral kantusa yerleştirilen hematokrit tüplerine alındı. MIF düzeyleri ELISA yöntemi ile incelendi. Çalışmaya 20 VKC hastası ve 10 sağlıklı birey dahil edildi.

Sonuç: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında VKC'li hastalarda gözyaşı MIF seviyeleri anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0,001$).

Tartışma: Bu sonuçlar MIF'in VKC'in patogenezinde sürece önemli bir katkısı olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Makrofaj migrasyon inhibitör faktör, vernal keratokonjonktivit, ELISA

GİRİŞ

Vernal Keratokonjonktivit (VKC) kronik, asimetric seyredebilen bilateral, mevsime bağlı olarak kötüleşen, tarsal ve/veya bulber konjonktivayı tutabilen oküler yüzeyin allerjik inflamasyonudur. Hastalığın tipik formunda kaşıntı, hiperemi, fotofobi ve sulanma mevcuttur. Şiddeti arasında hafif farklılıklar olsa da %98 oranında hastalık bilateraldir [1]. Patogenezi ve etyolojisi tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Yapılan immünolojik çalışmalar VKC patogenezinin Tip I hipersensitiviteden daha karmaşık olduğunu göstermektedir [2].

Hastalığın yerleşik kesin bir tanı kriteri yoktur. Tarsal konjonktiva üzerinde ve korneaskleral bileşkede geniş papillalar tipik özellikleridir. Tanı tipik klinik bulgular ve anamnezle konmaktadır. VKC patogenezinde IgE ve non-IgE ilişkili immün cevabın

ABSTRACT

Objective: The pathogenesis of vernal keratoconjunctivitis (VKC) is not fully understood and cannot be explained only with type I hypersensitivity reaction. The aim of this study was to determine the Macrophage migration inhibitory factor (MIF) levels in tear fluids of patients with VKC.

Methods: Tear fluid samples were collected with microcapillary tubes for hematocrit at the lateral canthus of patients in the supine position without any anesthesia. Tear levels of MIF were measured by ELISA kit. Tear fluid samples were collected from 10 healthy subjects and 20 patients with VKC.

Results: Tear levels of MIF in patients with VKC were significantly higher than those in controls ($p<0,001$).

Conclusion: These results suggested that MIF may have significant effect on the pathogenetic process of VKC. *J Clin Exp Invest 2013; 4 (2): 195-198*

Key words: Macrophage migration inhibitory factor, vernal keratoconjunctivitis, ELISA

rolü olmasına rağmen, hastalığın seyrinde ve atipik vakalarda tanıyı destekleyecek klinik ya da laboratuvar testi yoktur [1].

Makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF) ilk olarak 1966'da makrofaj migrasyonunu inhibe edici molekül olarak tanımlanmıştır [3]. 115 aminoasit içeren 12,5 kDa ağırlığında peptittir [4]. T ve B lenfositleri, monosit ve makrofajlar, eozinofiller, nötrofiller, mast hücreleri, epitelyal hücreler, ön hipofiz bezi, karaciğer, beyin, böbrek, pankreas tarafından MIF'in salgılandığı tesbit edilmiştir [5-8].

Makrofaj migrasyon inhibitör faktörün gecikmiş tip hipersensitivitede rolü olduğu gösterilmiştir [3].

Bu çalışmada VKC'de ve sağlıklı insanlarda gözyaşı MIF seviyeleri ölçülerek hastalığın patogenezindeki muhtemel rolü araştırılmıştır.

¹ Elazığ Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Bölümü, Elazığ, Türkiye

² Firat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

³ Firat Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

Correspondence: Onur Çatak,

Elazığ Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Bölümü Elazığ Türkiye Email:dronurcatak@hotmail.com

Received: 26.03.2013, Accepted: 05.04.2013

Copyright © JCEI / Journal of Clinical and Experimental Investigations 2013, All rights reserved

YÖNTEMLER

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları polikliniğine başvuran 20 VKC'li hasta ve 10 sağlıklı bireyin katılımı ile Haziran 2009 ve Haziran 2010 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Araştırma için gözyaşı toplanmadan önce Lokal etik kurul onayı alındı. 18 yaş altı hastaların onamları ebeveynlerine imzalatıldı. 18 yaş üzerindeki deneklerin ise kendilerine çalışma ile ilgili bilgi verilerek imzalı onayları alındı.

Tüm hastalara gözlerinde kaşıntı, sulanma, fotofobi, yabancı cisim hissi semptomlarının varlığı soruldu. Önceki ataklar ve ilaç kullanım hikâyeleri sorgulandı. Çalışmaya alınan tüm hastalara tarsal konjonktiva muayenesi de dahil olmak üzere tam oftalmolojik muayene yapıldı. Konjonktiva hiperemisi, kemosis, sekresyon varlığı ve tipi, papillar oluşumlar, kornea ve limbus tutulumu bulguları açısından değerlendirildi. Çalışmaya son iki yıldan beri VKC öyküsü olan hastalar dahil edildi. Çalışma dışı bırakılma kriterleri, son bir ay içinde topikal veya sistemik steroid kullanımı, topikal antialerjik-antiinflamatuvar ilaç kullanımı, VKC dışında oküler patoloji varlığı, geçirilmiş cerrahi öyküsüdür. Kontrol grubu olarak allerji veya atopi hikâyesi olmayan, topikal veya sistemik steroid kullanmayan sağlıklı bireyler seçildi.

Hastaların ve kontrol grubunun gözyaşlarını elde etmek için 75 µl'lik hematokrit tüpleri (Hematokrit-Kapillaren, Hirschmann Laborgerate, Germany) kullanıldı. Hematokrit tüpleri dokular travmatize edilmeden lateral kantus kenarına yerleştirildi ve inferior gözyaşı menisküsünden gözyaşı toplanarak yeterli hacime ulaşıncaya kadar (100 µl) mikrosantrifüj tüplerine boşaltıldı. Örnekler hava geçirmeyen mikrosantrifüj tüplerinde sitokin düzeyleri çalışılincaya kadar -80 °C 'de saklandı. Gözyaşı MIF düzeyleri sandviç tip ELISA kiti olan MIF (Raybiotech® Human MIF ELISA Kit, Georgia, ABD) kiti ile belirlendi. Üreticilerin önerdiği prosedürlerde hiçbir modifikasyon yapılmaksızın optik absorbans değerleri 450 nm'de mikro ELISA otomatik okuyucusundan (model ELX 800: Bio Tek Instruments, Inc. USA) okundu. MIF için belirlenebilme alt limiti sırası ile 6 pg/ml idi. MIF seviyeleri için belirlenme limitinin altında kalan konsantrasyon değeri sıfır olarak kabul edildi. Tüm örnekler kodlanarak, tek kör olarak çalışıldı.

Çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS Windows 17,0 programı ile yapıldı. Hastalık ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U Testi uygulandı. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Kontrol grubu 7 (%70) erkek, 3 (%30) kadın olmak üzere 10 kişiden, VKC grubu 13 erkek (%65) ve 7 (%35) kadın olmak üzere toplam 20 kişiden oluşmaktaydı. Kontrol grubu yaş ortalaması $16,3 \pm 3,9$ yıl, VKC grubun yaş ortalaması $14,3 \pm 5,1$ yılı idi (Tablo 1).

Ortalama MIF seviyesi kontrol grubunda $311,20 \pm 32,41$ pg/ml olarak ölçüldü. VKC'li hastalarda ise $364,04 \pm 21,81$ pg/ml değeri elde edildi. VKC'li hastalarda MIF düzeyleri kontrol grubu MIF düzeylerinden yüksekti ($p < 0,001$) (Tablo 2) (Şekil 1).

Tablo1. Kontrol ve hasta grubu yaş ortalamaları ve cinsiyet dağılımı

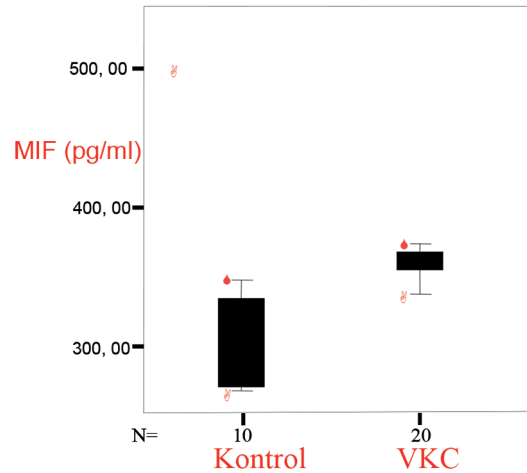
Gruplar	n	Yaş	Cinsiyet
Kontrol	10	$16,3 \pm 3,9$	7 E, 3 K
Vernal konjonktivit	20	$14,3 \pm 5,1$	13 E, 7 K

E:Erkek, K:Kadın

Tablo 2. Kontrol ve VKC hastalarının ortalama MIF düzeyleri

Gruplar	n	Gözyaşı MIF (pg/ml)
Kontrol	10	$311, 20 \pm 32, 41$
VKC	20	$364, 04 \pm 21, 81$

VKC: Vernal keratokonjonktivitli MIF: Makrofaj migrasyon inhibitör faktör



Şekil 1. Kontrol ve VKC hastalarının gözyaşı MIF düzeyleri

TARTIŞMA

MIF, sepsis, yaralanma ve cerrahi strese cevaben, immünitete rol alan hücrelerden ve ön hipofiz be-

zinden salınan sitokin olarak tanımlanmıştır [5]. Bu sitokin, sistemik inflamatuvar cevap sendromuna ve bunu izleyen multipl organ disfonksiyonuna yol açan inflamatuvar süreçte kritik düzenleyici bir rol oynamaktadır [9-12].

Adaptif immün cevaptaki MIF'in rolü, Th1 ve Th2 lenfosit alt kümelerinin bulunduğu çalışmalarda ekspresyonunun gösterilmesi ile desteklenmiştir. İn vivo gözlenen etkisine paralel olarak T hücrelerinin her iki alt kümesinden de MIF ekspresyonu bulunmasına rağmen, sekresyon predominant aktive Th2 klonunda artmıştır [13]. Bu veriler Th2 öncülüğünde antikor yapımının gelişiminde MIF'in rolünü desteklemektedir [13].

Klasik olarak VKC'de primer sorumlu Tip I hipersensitivite reaksiyon olarak düşünülür ancak IgE-mast hücre bağlı yolak VKC ile ilişkili klinik ve histopatolojik değişiklikleri açıklamakta yetersiz kalmaktadır [14-16].

Konjonktivanın histopatolojik çalışmalarında papillalarda mast hücre ve eozinofillerle birlikte mononükleer hücreler, fibroblastlar ve kollajenden oluşmuş kümeler görülmesi, VKC'de Tip I ve tip IV (gecikmiş veya hücrese) hipersensitivite reaksiyonlarının birlikte yer aldığı işaretidir [17].

Atopik donör kaynaklı insan eozinofilleri de MIF'in kaynağı olarak tesbit edilmiştir. Allerjik inflamatuvar hastalıkların stimülasyonu ile ilişkili C5a ve IL-5'in bu hücrelerden MIF'in salınımına neden olduğu bildirilmiştir [12]. Eozinofiller, bronşial astım, allerjik rinit ve atopik dermatit gibi allerjik inflamatuvar hastalıkların patogenezinde temel sorumlu hücrelerdir [18,19]. Astım hastalarının bronkoalveoler lavaj örneklerinin analizlerinde MIF protein ekspresyonunun arttığı ortaya çıkmış ve buna da alveollerdeki artmış bulunan eozinofillerin sebep olduğu sonucuna varılmıştır [20].

Kitaichi ve ark. yaptığı bir çalışmada ciddi atopik dermatitli hastaların gözyaşı MIF düzeylerine bakıldığında, kontrol grubuna göre hasta grubunda anlamlı derecede MIF düzeyinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçla ciddi atopik dermatitin oküler bulgularında MIF'in katkısı olabileceği sonucuna varılmıştır [21]. Bizim yaptığımız çalışmada VKC'li hastaların gözyaşı MIF düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,001$).

Nakamaru ve ark. MIF düzeylerinin allerjik rinitli hastalarda kontrol grubuna göre belirgin derecede daha yüksek olduğunu ve serum MIF düzeylerinin klinik semptom derecesinin şiddeti ile uyumlu olduğunu göstermişlerdir [22]. Çalışmamızda gözyaşı MIF düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında VKC'de anlamlı derecede yüksek düzeyde

olması konjonktival inflamasyonda rolü olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Mast hücreleri, T lenfositler ve eozinofillere ek olarak epitelyum hücrelerinin de allerjik inflamasyonda önemli bir sitokin kaynağı olduğu bilinmektedir [23,24]. Ancak MIF'in hem immün hücrelerden ve hem de epitelyumdan sentezlenmesi bu sitokinin gözyaşındaki kaynağını belirlemeyi güçleştirmektedir. Bu kaynaklar konjonktival folliküllerdeki lenfositler olabilir. Konjonktival epitelyal hücreler ya da inflamasyonda rol alan diğer mononükleer hücrelerden birlikte salgılanması da olasıdır.

T hücre kaynaklı MIF'in spesifik anti-MIF antikorları ile nötralizasyonu, anti-CD3 ve superantijen kaynaklı IL-2 sekresyonunun inhibisyonuna yol açarak %40-60 oranında T hücre proliferasyonunu azaltmaktadır [25]. Farelerin in vivo anti-MIF antikorları ile tedavisi, antijen kaynaklı T hücre proliferasyonunu inhibe eder ve antijen spesifik IgG yapımını azaltır [25]. Bu çalışmamızda VKC'de anti-MIF antikorlarının da denenmesine öncülük etmesine katkı sağlayabilir.

MIF antagonizmasına yönelik ilk deneysel yaklaşım nötralize anti-MIF antikorlarının kullanımınıdır. Birçok otoimmün hastalık modelinde terapötik etkinliği kanıtlanmıştır [26-30]. Bununla birlikte anti-MIF tedavisi yaklaşımı ile ilgili hala soru işaretleri mevcuttur. Aktive otoreaktif T hücrelerine etkili olmadığı, kısa yarı ömürleri, olası yan etkileri ve yüksek maliyetleri dezavantajlarıdır. Hayvan çalışmalarında MIF blokajının faydalı olduğu gösterilmesine rağmen insan popülasyonu üzerinde çalışma bulunmamaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızda, MIF'in VKC'nin patogenezindeki karmaşık sürece katkısı olduğu tezini güçlendirmiştir. Bu nedenle bu sitokine yönelik önümüzdeki süreçte spesifik antikorlarla insan çalışmaları yapılarak inflamasyondaki rolü üzerinde daha detaylı bilgilere ulaşılabilir. Moleküler immünolojide ilerleyen çalışmalarla beraber MIF'e yönelik daha geniş çaplı araştırmalarla VKC tedavisinde daha iyi terapötik stratejiler sağlanacağı düşünülebilir.

KAYNAKLAR

1. Bonini S, Bonini S, Lambiase A, et al. Vernal keratoconjunctivitis revisited. A case series of 195 patients with long-term follow up. *Ophthalmology* 2000;107:1157-1163.
2. Aragona P, Romeo GF, Puzzolo D, et al. Impression Cytology of the conjunctival epithelium in patients with vernal conjunctivitis. *Eye* 1996;10:82-85.

3. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 1966;153:80-82.
4. Mitchell R, Bacher M, Bernhagen J. Cloning and characterization of the gene for mouse macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J Immunol* 1995;154:3863-3870.
5. Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:791-800.
6. Imamura K, Nishihira J, Suzuki M. Identification and immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor in human kidney. *Biochem Mol Biol Int* 1996;40:1233-1242.
7. Shimizu T, Ohkawara A, Nishihira J, Sakamoto W. Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human skin and its immunohistochemical localization. *FEBS Lett* 1996;381:199-202.
8. Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, et al. MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function. *Mol Med* 1998;4:217-230.
9. Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest* 2003;124:1103-1115.
10. Schroeder S, Borger N, Wrigge H, et al. A tumor necrosis factor gene polymorphism influences the inflammatory response after cardiac operation. *Ann Thorac Surg* 2003;75:534-537.
11. Tomasdottir H, Hjartarson H, Ricksten A, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphism is associated with enhanced systemic inflammatory response and increased cardiopulmonary morbidity after cardiac surgery. *Anesth Analg* 2003;97:944-949.
12. Watanabe E, Hirasawa H, Oda S, et al. Cytokine-related genotypic differences in peak interleukin-6 blood levels of patients with SIRS and septic complications. *J Trauma* 2005;59:1181-1189.
13. Baugh JA, Donnelly SC. Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. *Journal of Endocrinology* 2003;179:15-23.
14. Allansmith MR. *The eye and immunology*. St Louis: Mosby 1982;118-124.
15. Coombs RRA, Gell PGH. *The classification of allergic reactions underlying disease*. Gell PGH, Coombs RRA (editors). *Clinical aspects of immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1962;13-27.
16. Johansson SGO, Hourihane JO, Bousquet J, et al. A revised nomenclature for allergy: an EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001;56:813-824.
17. Tomaç N. *Allerjik Konjonktivitler*. *T Klin J Med Sci* 2004;24:396-410.
18. Thomas LH, Warner JA. The eosinophil and its role in asthma. *General Pharmacology* 1996;27:593-597.
19. Kay AB, Barata L, Meng Q, et al. Eosinophils and eosinophil-associated cytokines in allergic inflammation. *International Archives of Allergy and Immunology* 1997;113:196-199.
20. Rossi AG, Haslett C, Hirani N, et al. Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF)-potential role in asthma. *Journal of Clinical Investigation* 1998;101:2869-2874.
21. Kitaichi N, Shimizu T, Honda A, et al. Increase in macrophage migration inhibitory factor levels in lacrimal fluid of patients with severe atopic dermatitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;244:825-828.
22. Nakamaru Y, Oridate N, Nishihira J, et al. Macrophage migration inhibitory factor in allergic rhinitis: its identification in eosinophils at the site of inflammation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004;113:205-209. Tomaç N. *Allerjik Konjonktivitler*. *T Klin J Med Sci* 2004;24:396-410.
23. Hingorani M, Calder VL, Buckley RJ, Lightman SL. The role of conjunctival epithelial cells in chronic ocular allergic disease. *Exp Eye Res* 1998;67:491-500.
24. Bradding P, Feather IH, Wilson S, et al. Immunolocalisation of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitis subject. *J Immunol* 1993;151:3853-3865.
25. Bacher M, Metz CN, Calandra T, et al. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7849-7854.
26. Cvetkovic I, Al-Abed Y, Miljkovic D, et al. Critical role of macrophage migration inhibitory factor activity in experimental autoimmune diabetes. *Endocrinology* 2005;146:2942-2951.
27. Denkinger CM, Denkinger M, Kort JJ, et al. In vivo blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates acute experimental autoimmune encephalomyelitis by impairing the homing of encephalitogenic T cells to the central nervous system. *J Immunol* 2003;170:1274-1282.
28. Matsui Y, Okamoto H, Jia N, et al. Blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:557-566.
29. Nicoletti F, Creange A, Orlikowski D, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) seems crucially involved in Guillain-Barre syndrome and experimental allergic neuritis. *J Neuroimmunol* 2005;168:168-174.
30. Yang N, Nikolic-Paterson DJ, Ng YY, et al. Reversal of established rat crescentic glomerulonephritis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF): Potential role of MIF in regulating glucocorticoid production. *Mol Med* 1998;4:413-424.