

Rola cząsteczki CXCL8 w patogenezie zapalenia przyzębia

***Andrzej Miskiewicz¹, Grzegorz Szparecki²**

¹Zakład Chorób Błony Śluzowej i Przyzębia, Instytut Stomatologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Renata Górka

²Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. n. med. Barbara Górnicka

THE ROLE OF CXCL8 MOLECULE IN PERIODONTITIS PATHOGENESIS

Summary

Periodontitis is a heterogeneous group of diseases which derive from the impact of dental plaque on the immunological system of the host. Periopathogens present in the bacterial plaque stimulate various mechanism mostly of an innate immunity therefore the inflammation in periodontal tissues occurs. The main signs of periodontitis are the following: loss of periodontal attachment, increased probing depth, proteolysis of bone tissues surrounding the tooth, and finally bleeding on probing which accounts for an active inflammatory process. The visible signs of periodontitis, detected on clinical examination are the results of triggering specific pathways of inflammatory gene expression. The main group of cytokines responsible for the ongoing inflammatory process consists of interleukins. A is a crucial chemokine produced by monocytes in periodontal tissues. Due to its various forms released in the ongoing site of infection, the chemokine may have a different effect on the neutrophils and fibroblast which take part in the immune response of periodontitis. Up-to-date there has been a little research performed over the activity in periodontitis therefore it is important to clarify and confirm its contribution to the inflammatory process.

Key words: periodontitis, chemokine 8, inflammation, interleukins

WSTĘP

Zapalenia przyzębia stanowią heterogenną grupę chorób, które powstają w wyniku oddziaływania płytki nazębnej na system immunologiczny gospodarza (1-6). Periopatogeny zasiedlające płytkę nazębną stymulują głównie nieswoiste mechanizmy odpornościowe w tkankach przyzębia. Do głównych objawów klinicznych zapalenia przyzębia zaliczamy utratę przyczepu łącznotkankowego, zwiększoną głębokość kieszonek przyzębnych, utratę kości wyrostka zębodołowego oraz krwawienie na zgłębnikowanie, które świadczy o aktywności procesu zapalnego. Kliniczne objawy zapalenia przyzębia, dostrzegalne podczas badania przedmiotowego, wynikają z szeregu procesów molekularnych powstałych w wyniku aktywacji specyficznych ścieżek ekspresji genów. Główną grupę cząsteczek sygnałowych odpowiedzialnych za stan zapalny stanowią interleukiny. Do grupy tej należy chemokina (CXCL8), która jest wydzielana głównie przez mono-

cyty (7). Różne formy finalnej cząsteczki wydzielane w miejscu infekcji różnorodnie oddziałują na komórki fibroblastów oraz neutrofilii zaangażowanych w zapalenie przyzębia. Aktualny stan wiedzy w oparciu o badania naukowe jest niewystarczający, aby całkowicie potwierdzić i wyjaśnić szczegółowy udział cząsteczki w zapaleniu przyzębia.

Głównym czynnikiem etiologicznym zapalenia przyzębia są bakterie kolonizujące płytkę nazębną. W przypadku niewystarczającej higieny jamy ustnej, periopatogenne bakterie zyskują przewagę nad wrodzonymi mechanizmami odporności nieswoistej tkanek przyzębia. Dochodzi wówczas do powstania zapalenia dziąseł, a w przypadku braku leczenia i nasilenia oddziaływania biofilmu bakteryjnego rozwija się zapalenie przyzębia. Kompleksy bakteryjne izolowane z kieszonek przyzębnych zostały podzielone przez Socransky'ego w oparciu o kliniczny stopień nasilenia objawów zapalenia przyzębia (8). W oparciu o techniki biologii molekularnej

z miejsc o szczególnie nasilonym procesie zapalnym w przyzębiu izolowano głównie następujące gatunki bakterii, należące do kompleksu czerwonego: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* oraz *Treponema denticola*.

Najbardziej wirulentnym organizmem z powyższej grupy jest Gram-ujemna, beztlenowa pałeczka *P. gingivalis* (9). Wytwarza ona szereg egzotoksyn o charakterze metaloproteinaz, w tym gingipainę, która odpowiada za spadek ekspresji aktywujących receptorów na powierzchni komórek układu odpornościowego (10). Ponadto pałeczki te są źródłem endotoksyny w postaci lipopolisacharydu (LPS). W badaniach z zakresu nauk podstawowych wykazano, iż LPS *P. gingivalis* stymuluje produkcję czterech kluczowych cząsteczek odpowiedzialnych za stan zapalny przyzębia: interleukiny 1 β (Il-1 β), czynnika martwicy nowotworów TNF- α , interleukiny 6 (Il-6) oraz dwóch form CXCL8: CXCL8_{72aa} oraz CXCL8_{77aa} (11).

CXCL8, nazywana wcześniej interleukiną 8, jest chemokiną produkowaną przez makrofagi, monocyty, neutrofile, komórki tuczne, limfocyty, komórki NK (12), komórki nabłonkowe, komórki śródbłonna i mioocyty gładkie dróg oddechowych. Cząsteczka wytwarzana jest z prekursora o długości 99 aminokwasów, z którego po odcięciu 20-aminokwasowego peptydu powstają rozmaite warianty na drodze obróbki potranslacyjnej na N-końcu (13). Jej główny wariant liczy 72 aminokwasy – CXCL8-8_{72aa}, jednak spotyka się również warianty długości 79, 77, 70 i 69 aminokwasów. Wszystkie one wykazują aktywność biologiczną. Są produkowane po aktywacji szlaku NF- κ B w trakcie infekcji bakteryjnej, lecz ich ekspresja bez czynników aktywujących układ odpornościowy jest znikoma bądź nieobecna (14). Do receptorów CXCL8 zaliczamy cząsteczki CXCR1 i CXCR2 (15). Występują one w błonie komórkowej neutrofilów. Ich aktywacja ma właściwości chemotaktyczne oraz ułatwia degranulację komórek polimorfonuklearnych (16-19). Zmniejszona ekspresja receptorów zarówno u myszy, jak i u ludzi prowadzi do zwiększonej zapadalności na zakażenia układu moczowego (20). Pod wpływem CXCL8 neutrofile przemieszczają się w kierunku zwiększonego stężenia chemokiny, następuje egzocytoza zgromadzonych pęcherzyków oraz wybuch tlenowy. Ponadto wspomniane receptory znajdują się również na monocytach, limfocytach T i bazofilach, wobec których również interleukina 8 wykazuje działanie chemotaktyczne oraz stymuluje uwalnianie histaminy (18, 19). Z tego względu uznaje się interleukinę 8 za mediator prozapalny. Uczestniczy ona w patogenezie oraz odpowiedzi immunologicznej w zakażeniach bakteriami zarówno Gram-dodatnimi, jak i ujemnymi, w infekcjach wirusowych, chorobach autoimmunizacyjnych oraz nowotworach. Zwiększoną ekspresję odnotowano w tkankach pacjentów z łuszczycą (16), RZS (21), zapaleniem ucha środkowego (22) oraz rakiem płuca (23). Niestety, oprócz korzystnej funkcji, jaką interleukina 8 pełni w stymulacji układu odpornościowego, jej efekty mogą być także szkodliwe dla organizmu, nie tylko tam,

gdzie nadmierna odpowiedź zapalna prowadzi do uszkodzenia tkanek. Wykazuje również działanie angiogenne oraz mitogenne, co może przyspieszać rozwój niektórych nowotworów (24). Jak już wcześniej wspomniano, po aktywacji szlaku NF- κ B poprzez TNF- α następuje produkcja oraz sekrecja interleukiny 8. Już po 1 godzinie następuje 50-krotne zwiększenie jej ekspresji. Pomimo iż pierwszą reakcją komórek organizmu na wykrycie patogenu jest produkcja interleukiny 1 i TNF- α , to intensyfikacja odpowiedzi zapalnej do rozmiarów skutecznej reakcji odpornościowej jest zasługą CXCL8. Dopiero po jej aktywacji zachodzi masowa infiltracja neutrofilów do miejsca zakażenia, poprzedzona ich przechodzeniem przez ściany naczyń (25).

POLIMORFIZM GENU CXCL8

Tak jak większość genów ulegających ekspresji, również CXCL8 wykazuje polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) oraz polimorfizm mikrosatelitarny, związany z występowaniem rozlanego zapalenia oskrzelików (26). Natomiast SNP wpływają na przebieg astmy oskrzelowej, zakażenia RSV, mięsaka Kaposiego, raka żołądka, raka prostaty, stwardnienia rozsianego (27). Najważniejszym ze wspomnianych SNP wydaje się polimorfizm zlokalizowany w obrębie promotora, oznaczony symbolem rs4073 (28-30). Wskazuje to na ważną rolę, jaką odgrywa interleukina 8 w modulacji odpowiedzi immunologicznej. Ponadto istotna jest precyzyjna regulacja jej ekspresji oraz siły działania chemotaktycznego, na którą wpływają wspomniane polimorfizmy.

POSTULOWANY UDZIAŁ W ZAPALENIU PRZYŻĘBIA

Cząsteczka chemokiny 8 w przebiegu zapalenia przyzębia pełni istotną funkcję koordynującą różne mechanizmy odporności wrodzonej. Główną rolę w inicjacji reakcji zapalnej w przebiegu *periodontitis* spełnia interleukina 1 β , która powstaje w wyniku działania osi CD14-TLR-MD2-NF κ B, natomiast jej aktywna forma powstaje w wyniku cięcia enzymatycznego poprzez kompleks inflammasomu (31). Istotą aktywacji tego procesu jest dostępność komórek polimorfonuklearnych w miejscu zapalenia oraz ekspresji cząsteczki CD14r na powierzchni komórek. Jednak za dostępność komórek monocytarnych w miejscu zapalenia odpowiada mechanizm działania Il-17, która oddziałuje na komórki nabłonkowe (ang. *human gingival epithelial cells* – HGECS) w początkowej fazie zapalenia, stymulując syntezę chemokiny 8 (32). Pod wpływem cząsteczki CXCL8_{72aa} dochodzi do aktywacji neutrofilii oraz wzrostu potencjału chemotaktycznego tych komórek. Zjawisko to (ang. *priming*) sprzyja migracji komórek odpowiedzialnych za pozakomórkowe mechanizmy zwalczania drobnoustrojów. W badaniach klinicznych nad toksynami K oraz R gingipainy na komórkach HL-60 (ang. *human promyelocytic leukaemia cells*) wykazano, iż obie charakteryzują się powinowactwem do cięcia proteolitycznego formy CXCL8_{72aa}, a tym samym powstaniem czynnych analogów chemokiny 8.

Forma 72aa wraz z aktywacją receptora N-formylo-metylo-leucylo-fenylalaninowego (fMLP) odpowiada za wzrost właściwości chemotaktycznych w procesie tzw. primingu neutrofilów (33, 34). Wspomniane komórki po inkubacji charakteryzują się następującymi cechami: wzrostem stężenia aktywnych rodników tlenowych (ROS), przylegania do ścian naczyń krwionośnych oraz wzrostem potencjału chemotaktycznego mierzonego przy użyciu techniki Boydena (Neuroprobe, Inc.) (35). Odmienne przedstawia się wpływ chemokiny 8 na komórki fibroblastów. Stymulacja hodowlanych fibroblastów przy użyciu termicznie zabitych bakterii *P. gingivalis* stymuluje wytwarzanie TNF- α , serpiny 1 oraz wtórnie CXCL8, która działa synergistycznie wraz z IL-1 β na makrofagi oraz neutrofile, wpływając na wzrost migracji i opisane wcześniej zjawisko primingu. Jednak w przypadku stymulacji fibroblastów hodowlanych przy użyciu żywego szczepu *Porphyromonas* dochodziło do istotnie statystycznego ($p < 0,01$) spadku wydzielania TNF- α oraz wtórnie stężenia chemokiny 8 (36).

Inną kluczową rolę chemokiny 8 jest jej udział w procesach regeneracji oraz modelingu tkankowego po przeprowadzonym niechirurgicznym leczeniu przyzębia. W badaniach bioptatów tkankowych dziąsła pobranych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia 6 tygodni po przeprowadzonym leczeniu, poddanych izolacji mRNA, a następnie odwrotnej transkrypcji stwierdzono jedną z najwyższych ekspresji dla genu chemokiny 8. Ponadto w grupie 5% genów, dla których stwierdzono największą ekspresję mRNA, znalazły się m.in.: interleukina 12-A, interleukina 14 oraz metaloproteinaza 1. Odkrycie to jest istotne z punktu widzenia biologii procesu zapalnego, świadczy bowiem o innej, jeszcze nieustalonej ścieżce regulacji ekspresji CXCL8, która jest niepowiązana z klasyczną drogą ekspresji przy udziale cytokin prozapalnych (14).

Na podstawie powyższych wyników badań stwierdza się, iż udział cząsteczki chemokiny 8 w zapaleniu przyzębia ma charakter plejotropowy. Regulacja syntezy oraz wydzielania jest inicjowana poprzez kaskadę czynników wewnątrzkomórkowych działających głównie na poziomie jądra komórkowego (NF- κ B) oraz aktywacji specyficznych ligandów obecnych na błonie komórkowej (TNF- α R). Ponadto inne cytokiny prozapalne (IL-17), których działanie zostało potwierdzone w badaniach klinicznych zapalenia przyzębia (32), wpływają na wzrost ekspresji chemokiny 8. W odróżnieniu od innych cytokin prozapalnych cząsteczki są podatne na cięcie enzymatyczne przez metaloproteinazy bakteryjne.

PODSUMOWANIE

Cząsteczka jest czynnikiem regulatorowym, który odgrywa istotną rolę w etiopatogenezie zapalenia przyzębia. Chemokina 8 cechuje się plejotropowym mechanizmem działania nie tylko w rekrutacji komórek odpowiedzialnych za lokalny odczyn zapalny, ale także w procesach regeneracji tkanek przyzębia po przeprowadzonym leczeniu periodontologicznym. □

Piśmiennictwo

1. Agrawal P, Sanikop S, Patil S: New developments in tools for periodontal diagnosis. *Int Dent J* 2012 Apr; 62(2): 57-64.
2. Ghizoni JS, Taveira LA, Garlet GP et al.: Increased levels of *Porphyromonas gingivalis* are associated with ischemic and hemorrhagic cerebrovascular disease in humans: an *in vivo* study. *J Appl Oral Sci* 2012 Feb; 20(1): 104-112.
3. Sreedevi M, Ramesh A, Dwarakanath C: Periodontal status in smokers and nonsmokers: a clinical, microbiological, and histopathological study. *Int J Dent* 2012; 2012: 571-590.
4. Le D, Zhang H, Hu WJ, Liu DG: Preliminary study on gingival biotype by periodontal probing. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2012 Feb; 47(2): 81-84.
5. Miskiewicz A, Szparecki G: Salivary markers and periodontal symptoms in pancreatic cancer. *Gastroenterologia Polska* 2011 Dec; 18(3): 115-119.
6. Miskiewicz A, Szparecki G: Periodontitis as a Risk Factor in Cardiovascular Diseases. *Denatal and Medical Problems* 2010 Dec; 47(4): 472-477.
7. Yang DF, Huang H, Guan S et al.: Interleukin(IL)-4 promotion of gene transcription is mediated by ERK1/2 pathway in human pulmonary artery endothelial cells. *Mol Immunol* 2011 Sep; 48(15-16): 1784-1792.
8. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA et al.: Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998 Feb; 25(2): 134-144.
9. Grayson R, Douglas CW, Heath J et al.: Activation of human matrix metalloproteinase 2 by gingival crevicular fluid and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol* 2003 Jun; 30(6): 542-550.
10. Spencer DA, Green SE, Evans JM et al.: Platelet activating factor does not cause a reproducible increase in bronchial responsiveness in normal man. *Clin Exp Allergy* 1990 Sep; 20(5): 525-532.
11. Nourshargh S, Perkins JA, Showell HJ et al.: A comparative study of the neutrophil stimulatory activity *in vitro* and pro-inflammatory properties *in vivo* of 72 amino acid and 77 amino acid IL-8. *J Immunol* 1992 Jan 1; 148(1): 106-111.
12. Chuntharapai A, Lee J, Hebert CA, Kim KJ: Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. *J Immunol* 1994 Dec 15; 153(12): 5682-5688.
13. Hedges JC, Singer CA, Gerthoffer WT: Mitogen-activated protein kinases regulate cytokine gene expression in human airway myocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000 Jul; 23(1): 86-94.
14. Beikler T, Peters U, Prior K et al.: Gene expression in periodontal tissues following treatment. *BMC Med Genomics* 2008; 1: 30.
15. Zlotnik A, Yoshie O: The chemokine superfamily revisited. *Immunity* 2012 May 25; 36(5): 705-716.
16. Tang MM, Spanou Z, Tang H et al.: Rapid downregulation of innate immune cells, interleukin-12 and interleukin-23 in generalized pustular psoriasis with infliximab in combination with acitretin. *Dermatology* 2012; 225(4): 338-343.
17. Baggolini M, Walz A, Kunkel SL: Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989 Oct; 84(4): 1045-1049.
18. Bickel M: The role of interleukin 8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol* 1993 May; 64 (suppl. 5): 456-460.
19. Dunn FG, Kerr IC, McQueen MJ, Thomson RM: Comparison of intravenous bumetanide and frusemide during open heart surgery. *Postgrad Med J* 1975; 51 (suppl. 6): 72-76.
20. Ragnarsdottir B, Fischer H, Godaly G et al.: TLR- and CXCR1-dependent innate immunity: insights into the genetics of urinary tract infections. *Eur J Clin Invest* 2008 Oct; 38 (suppl. 2): 12-20.
21. Gangur V, Birmingham NP, Thanosvorakul S: Chemokines in health and disease. *Vet Immunol Immunopathol* 2002 Jul; 86(3-4): 127-136.
22. Smirnova MG, Kiselev SL, Gnuchev NV et al.: Role of the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6 and interleukin-8 in the pathogenesis of the otitis media with effusion. *Eur Cytokine Netw* 2002 Apr-Jun; 13(2): 161-172.
23. Yuan A, Chen JJ, Yao PL, Yang PC: The role of interleukin 8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci* 2005 Jan 1; 10: 853-865.
24. Zhu YM, Woll PJ: Mitogenic effects of interleukin 8/CXCL8 on cancer cells. *Future Oncol* 2005 Oct; 1(5): 699-704.
25. Vlahopoulos S, Boldogh I, Casola A, Brasier AR:

- Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin 8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood* 1999 Sep 15; 94(6): 1878-1889. **26.** Emi M, Keicho N, Tokunaga K et al.: Association of diffuse panbronchiolitis with microsatellite polymorphism of the human interleukin 8 (IL-8) gene. *J Hum Genet* 1999; 44(3): 169-172. **27.** Colobran R, Pujol-Borrell R, Armengol MP, Juan M: The chemokine network. II. On how polymorphisms and alternative splicing increase the number of molecular species and configure intricate patterns of disease susceptibility. *Clin Exp Immunol* 2007 Oct; 150(1): 1-12. **28.** Kamali-Sarvestani E, Nikseresht AR, Aliparasti MR, Vessal M: IL-8 (-251 A/T) and CXCR2 (+1208 C/T) gene polymorphisms and risk of multiple sclerosis in Iranian patients. *Neurosci Lett* 2006 Aug 14; 404(1-2): 159-162. **29.** Kato I, van Doorn LJ, Canzian F et al.: Host-bacterial interaction in the development of gastric precancerous lesions in a high risk population for gastric cancer in Venezuela. *Int J Cancer* 2006 Oct 1; 119(7): 1666-1671. **30.** Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L et al.: Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL) 6, IL-8, tumor necrosis factor alpha, NF- κ B1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. *Cancer Res* 2003 Jul 1; 63(13): 3560-3566. **31.** Szparecki G, Czerkies M, Miskiewicz A: A new approach for genetic factors influencing periodontitis. *Dent Med Probl* 2013; 50(2): 145-151. **32.** Takahashi N, Okui T, Tabeta K, Yamazaki K: Effect of interleukin 17 on the expression of chemokines in gingival epithelial cells. *Eur J Oral Sci* 2011 Oct; 119(5): 339-344. **33.** Guichard C, Pedruzzi E, Dewas C et al.: Interleukin 8-induced priming of neutrophil oxidative burst requires sequential recruitment of NADPH oxidase components into lipid rafts. *J Biol Chem* 2005 Nov 4; 280(44): 37021-37032. **34.** Huber AR, Kunkel SL, Todd RF 3rd, Weiss SJ: Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin 8. *Science* 1991 Oct 4; 254(5028): 99-102. **35.** Dias IH, Marshall L, Lambert PA et al.: Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* increase the chemotactic and respiratory burst-priming properties of the 77-amino-acid interleukin 8 variant. *Infect Immun* 2008 Jan; 76(1): 317-323. **36.** Palm E, Khalaf H, Bengtsson T: *Porphyromonas gingivalis* downregulates the immune response of fibroblasts. *BMC Microbiol* 2013; 13: 155.

nadesłano: 17.04.2013

zaakceptowano do druku: 20.05.2013

Adres do korespondencji:

*Andrzej Miskiewicz

Zakład Chorób Błony Śluzowej i Przyzębia IS WUM

ul. Miodowa 18, 00-246 Warszawa

tel./fax: +48 (22) 502-20-36

e-mail: andrzej.miskiewicz@wum.edu.pl