

Cytokiny prozapalne u dzieci z bólem stawów niewyjaśnionego pochodzenia oraz chorych na młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów

Proinflammatory cytokines in children with arthralgia and juvenile idiopathic arthritis

Ewa Kontny¹, Małgorzata Kwiatkowska², Beata Kołodziejczyk², Anna Romicka², Lidia Rutkowska-Sak²

¹Zakład Patofizjologii i Immunologii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

²Klinika i Poliklinika Wieków Rozwojowych Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

Słowa kluczowe: cytokiny prozapalne, artralgie u dzieci, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów.

Key words: proinflammatory cytokines, arthralgia in children, juvenile idiopathic arthritis.

Streszczenie

Wielu cytokinom (m.in. czynnikowi martwicy nowotworów, *tumour necrosis factor* – TNF, interleukinom 6, 8, 17 i 23) przypisuje się istotną rolę w odpowiedzi zapalnej oraz w procesach destrukcji chrząstki i kości stawowej. Uważa się, że w młodzieńczym idiopatycznym zapaleniu stawów (MIZS) oznaczanie stężenia tych cytokin może mieć pomocniczą wartość diagnostyczną i być użyteczne w monitorowaniu przebiegu choroby. Niektóre z cytokin (TNF, IL-6) przyczyniają się również do powstania i utrzymywania się przetrwałego bólu stawów zajętych procesem zapalnym.

Celem pracy było porównanie profilu i stężenia powyższych cytokin w surowicach dzieci z MIZS oraz z bólem stawów, którego przyczyny nie udało się ustalić („arthralgia”). Stwierdzono, że u dzieci chorujących na MIZS stężenia badanych cytokin wykazują znaczny stopień wzajemnej korelacji, a wytwarzanie niektórych cytokin (IL-23 w postaci nielicznostawowej oraz TNF w postaci wielostawowej) nasila się w okresie okołopokwitaniowym. U dzieci z „arthralgiami” takich zależności natomiast nie zaobserwowano (wytwarzanie cytokin było nieskoordynowane i niezależne od pokwitania). Mimo tych różnic, w grupie dzieci z „arthralgią” zarówno profil, jak i stężenia ocenianych cytokin nie różniły się w sposób statystycznie istotny od profilu i stężeń u dzieci z MIZS. Dlatego też autorki niniejszej pracy uważają, że u dzieci dolegliwości bólowe stawów o nieustalonej przyczynie („arthralgie”) zobowiązują do wnikliwej obserwacji i dalszej diagnostyki.

Summary

Many cytokines (e.g. TNF, IL-6, IL-8, IL-17, IL-23) are thought to play a critical role in the inflammatory response as well as in joint cartilage and bone destruction processes. In juvenile idiopathic arthritis (JIA) cytokines are supposed to serve as helpful biomarkers for diagnosis and monitoring of the disease. Proinflammatory cytokines, such as TNF and IL-6, also contribute to the generation and maintenance of inflammatory joint pain. The aim of the present study was to compare the serum cytokine profile and concentrations in two groups of children: suffering from JIA and with joint pain of unknown causes (arthralgia). In JIA sera concentrations of tested cytokines were positively inter-correlated and the levels of some of them (IL-23 and TNF in oligoarticular and polyarticular subsets, respectively) were significantly elevated in children of pubescent age. By contrast, in children with arthralgia cytokines were produced in an uncoordinated way and their levels did not change in the pubescence period. Despite these differences, both cytokine profile and concentrations were similar in both JIA and arthralgia groups. Therefore, we conclude that arthralgia in children obliges clinicians to perform thorough observation and further diagnosis.

Adres do korespondencji:

dr hab. med. Ewa Kontny, Zakład Patofizjologii i Immunologii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa, tel. +48 22 844 25 40

Praca wpłynęła: 30.08.2010 r.

Wstęp

Terminem młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS) określa się grupę przewlekłych zapaleń stawów wieku dziecięcego, o podłożu autoimmunizacyjnym i nieznanej etiologii. Zgodnie z obowiązującymi kryteriami, bazującymi na objawach klinicznych pierwszych 6 miesięcy choroby, wyodrębnia się 6 podtypów (manifestacji klinicznych) MIZS [1]. Najnowsze badania, obejmujące m.in. różnice w uwarunkowaniach genetycznych, zaburzeniach czynności układu odporności wrodzonej i nabytej oraz w funkcjonowaniu mechanizmów immunoregulacyjnych, wskazują z jednej strony na odrębność etiopatogenezy poszczególnych podtypów MIZS. Z drugiej jednak strony, zjawiska doprowadzające do destrukcji struktur stawu, towarzyszące przede wszystkim postaci nielicznostawowej i wielostawowej, wydają się podobne [2].

W rozwoju i podtrzymywaniu przetrwałej odpowiedzi zapalnej oraz w procesach destrukcji chrząstki i kości stawowej istotną rolę przypisuje się cytokinom. Wśród wielu cytokin, które funkcjonują w sieci wzajemnych oddziaływań, główną rolę patogenną przypisuje się czynnikiowi martwicy nowotworu (*tumour necrosis factor* – TNF) oraz interleukinie 6 (IL-6), wytwarzanym przez komórki układu odporności wrodzonej [3]. Leki neutralizujące aktywność biologiczną TNF zarejestrowano już do leczenia dzieci chorych na postać wielostawową MIZS, a dotychczasowe badania kliniczne wskazują na skuteczność tej terapii także w postaci nielicznostawowej rozszerzającej się. Lek

blokujący aktywację komórek przez IL-6 wykazuje natomiast największą skuteczność terapeutyczną w uogólnionej postaci MIZS [4, 5]. Badania u zwierząt z zapaleniem stawów wywołanym doświadczalnie oraz liczne badania u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) wskazują, że również IL-17, wytwarzana głównie przez subpopulację limfocytów pomocniczych (tzw. limfocyty Th17) i komórki tuczne, wpływa wielokierunkowo na komórki biorące udział w odpowiedzi immunologiczno-zapalnej i procesach destrukcyjnych [3, 6, 7]. Interleukina 17 stymuluje m.in. wytwarzanie chemokin, innych cytokin prozapalnych (np. IL-6 i TNF), czynników i cytokin proangiogennych (m.in. IL-8), metaloproteaz degradujących chrząstkę, a także cytokin (RANKL) i receptorów (RANK) promujących osteoklastogenezę i w rezultacie destrukcję kości [3, 6]. U ludzi różnicowanie limfocytów T pomocniczych w komórki Th17 jest zależne m.in. od IL-6, a utrzymanie puli tych komórek (prolifracja) jest podtrzymywane przez IL-23 [3, 6].

Najnowsze badania u zwierząt z zapaleniem stawów indukowanym podaniem antygeny wskazują, że zarówno TNF, jak i IL-6 w istotny sposób przyczyniają się do powstania i utrzymywania się przetrwałego bólu stawów zajętych procesem zapalnym [8]. Wobec tego wydaje się, że obie te cytokiny mogą odgrywać ważną rolę w odczuwaniu bólu u chorych cierpiących na choroby reumatyczne. W wieku rozwojowym bóle kostno-stawowo-mięśniowe mogą być oznaką różnych chorób [9, 10]. W MIZS objawy bólowe nie zawsze są komunikowane (np. w postaci o początku nielicznostawowym na ból skarży się zaledwie 25% dzieci), co może wynikać z nieumiejętności rozpoznawania i/lub oceny przez dzieci tych objawów [10]. Z kolei u dzieci bez klinicznych objawów zapalenia stawów lub urazu bóle stawów mogą być spowodowane wieloma przyczynami (np. chorobą nowotworową, jałową martwicą kości, fibromialgią, wadami postawy bądź nadmierną wiotkością więzadeł), mogą to być również przemijające bóle kończyn o niewyjaśnionej etiologii, zwane bólami wzrostowymi [9, 10].

Celem niniejszej pracy było określenie profilu i stężenia cytokin w surowicach dzieci z bólami stawów, których przyczyny nie udało się ustalić („artralgie”), w porównaniu z dziećmi z MIZS. W badaniach oceniano cytokiny (TNF, IL-6, IL-8, IL-17, IL-23), którym przypisuje się kluczową rolę w odpowiedzi zapalnej i procesach destrukcyjnych w stawach oraz odczuwaniu bólu.

Materiał i metody

Badaniami objęto łącznie 51 dzieci, w tym: 25 dzieci z nielicznostawową i 11 dzieci z wielostawową postacią MIZS oraz 15 dzieci z bólami stawów utrzymującymi się przez co najmniej 6 tygodni („artralgie”), których przyczyny

Tabela I. Charakterystyka badanych grup dzieci. Wartości przedstawiają średnie arytmetyczne \pm SEM

Table I. Characteristics of the examined groups of children. Values are means \pm SEM

Grupa	Wiek (lata)	Czas choroby (miesiące)	OB (mm/h)	CRP (mg/l)
I – artralgie (n = 15)	11,1 \pm 0,98	16,5 \pm 6,7	13,2 \pm 3	4,3 \pm 1,9
II – MIZS postać nielicznostawowa (n = 25)	10,8 \pm 0,79	24,8 \pm 8,2	21,1 \pm 3,84	13 \pm 4,26
III – MIZS postać wielostawowa (n = 11)	10,7 \pm 1,57	29 \pm 14,9	29,2 \pm 7,6	33,7 \pm 10,85
p I vs II	NS	NS	NS	NS
p I vs III	NS	NS	0,04	0,01
p II vs III	NS	NS	NS	NS

OB – odczyn Biernackiego; CRP – białko C-reaktywne; p – różnice statystycznie istotne pomiędzy porównywanymi grupami dzieci; NS – różnice nieistotne statystycznie; n – liczba pacjentów

(po wykluczeniu m.in. zdefiniowanych chorób tkanki łącznej, zakażeń, chorób nowotworowych, odczynów poszczepiennych, urazów itp.) nie udało się ustalić. Charakterystykę badanych grup pacjentów przedstawiono w tabeli I.

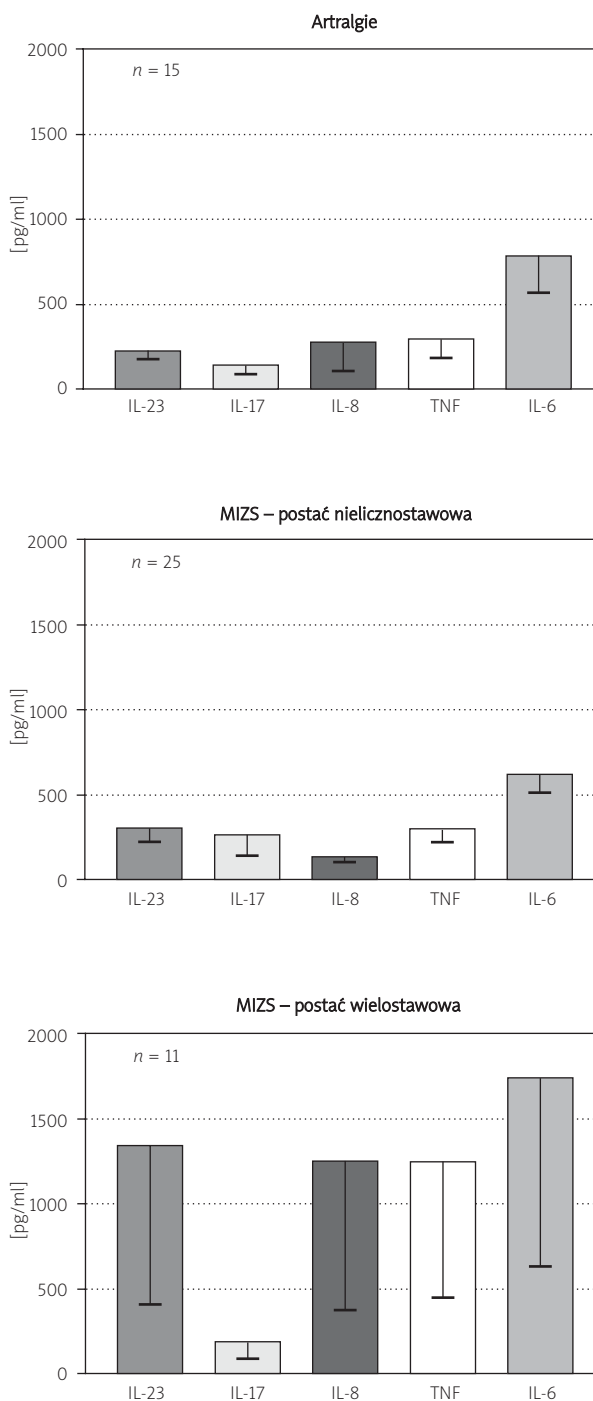
Wszystkie dzieci z MIZS były w klinicznie aktywnej fazie choroby. W grupie z MIZS o początku nielicznostawowym u 3 dzieci rozpoznano postać rozszerzającą się. U żadnego z dzieci nie stwierdzono w surowicy obecności czynnika reumatoidalnego, a obecność przeciwciał swoistych dla cyklicznych cytrulinowanych peptydów (anty-CCP, oznaczane zestawem Immunoscan CCPlus firmy Euro-Diagnostica) stwierdzono wyłącznie u 3 dzieci z wielostawową postacią MIZS.

Stężenia wybranych cytokin oznaczano w surowicach, stosując swoiste dla danej cytokiny testy ELISA: TNF i IL-17 – zestawy Duo-Set (R&D, Polska); IL-23 – układ własny z użyciem szczurzej IgG1 swoistej dla podjednostki p19 ludzkiej IL-23 (przeciwciało opłaszczające), mysiej biotynylowanej IgG1 swoistej dla podjednostki p40 ludzkiej IL-23 i IL-12 (przeciwciało wykrywające) oraz rekombinowanej ludzkiej IL-23 (wszystkie odczynniki z NatuTec eBioscience, Niemcy); IL-6 i IL-8 – układ własny opisany uprzednio [11].

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 6.0 (StatSoft, Polska). Różnice pomiędzy badanymi grupami dzieci oceniano testami nieparametrycznymi (test U Manna-Whitneya oraz Kruskalla-Wallisa), korelacje pomiędzy stężeniami badanych cytokin badano, stosując test Spearmana. Jako istotną statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$. Na rycinach wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm błąd standardowy (SEM).

Wyniki

Stężenia ocenianych cytokin w surowicach dzieci z „artalgiami” oraz nielicznostawową i wielostawową postacią MIZS przedstawiono zbiorczo na rycinie 1. W wielostawowej postaci MIZS średnie stężenia większości cytokin były większe niż w pozostałych grupach dzieci, jednak z powodu dużego rozrzutu wyników różnice nie były istotne statystycznie. Z tych samych powodów nie stwierdzono statystycznie znamiennych różnic, porównując grupę dzieci z „artalgiami” z całą grupą MIZS (postać nielicznostawowa i wielostawowa łącznie; dane nieprzedstawione). Należy podkreślić, że w grupie dzieci z „artalgiami” średnie stężenia cytokin były bardzo zbliżone do stężeń u dzieci z nielicznostawową postacią MIZS (ryc. 1). Co ciekawe, w obu postaciach MIZS odnotowano wzajemną korelację pomiędzy stężeniami większości badanych cytokin, co przemawia za ich skoordynowanym wytwarzaniem. Takiej zależności nie obserwowano jednak w grupie dzieci z „artalgiami” (tab. II).



n – liczba pacjentów

Ryc. 1. Stężenia cytokin prozapalnych w surowicach dzieci z „artalgiami” oraz MIZS. Wartości przedstawiają średnie arytmetyczne \pm SEM.

Fig. 1. Concentrations of proinflammatory cytokines in sera of children with arthralgia and JIA. Values are means \pm SEM.

W dalszej analizie w każdej z badanych grup wyodrębniono dzieci młodsze (< 10. roku życia) i starsze (≥ 10 . roku życia; faza prepubertalna i pubertalna okresu pokwitania) (ryc. 2). W MIZS u dzieci starszych średnie stężenia większości cytokin były większe niż u dzieci młodszych, a różnice istotne statystycznie zauważono w przypadku 2 cytokin: IL-23 w postaci nielicznostawowej oraz TNF w postaci wielostawowej. W grupie dzieci z „artralgiami” takich różnic nie stwierdzono.

Omówienie

Profil cytokin w surowicy jest odzwierciedleniem przebiegającej odpowiedzi zapalnej. W przypadku chorób reumatycznych przetrwały proces zapalny toczy się w zajętych chorobowo stawach, dlatego stężenia cytokin w płynie stawowym są większe niż w surowicy, ale ich profil jest podobny. Ostatnio wykazano, że w nielicznostawowej i wielostawowej postaci MIZS profil cytokin

w osoczu i płynie stawowym jest bardzo zbliżony, chociaż odmienny niż w układowej postaci tej choroby [12]. To wskazuje, że w nielicznostawowej i wielostawowej postaci MIZS odpowiedź zapalna ma wspólny patomechanizm. Jednak samo określanie profilu cytokin ma wątpliwą wartość diagnostyczną, choć może mieć znaczenie pomocnicze i być użyteczne w monitorowaniu przebiegu choroby. Przemawia za tym m.in. fakt, że u osób chorych na inne przewlekłe choroby (np. cukrzycę) stwierdza się umiarkowane zwiększenie stężenia tych samych cytokin co w MIZS [5]. Wobec tego cytokiny prozapalne, zwłaszcza te wykazujące działanie plejotropowe i ogólnoustrojowe (TNF, IL-6), mogą brać udział w różnych zjawiskach towarzyszących przetrwałej odpowiedzi zapalnej (np. odczuwaniu bólu, procesach destrukcyjnych czy objawach uogólnionych), niezależnie od rodzaju czynnika inicjującego tę odpowiedź.

Wyniki niniejszej pracy potwierdzają tę obserwację, wskazując na podobieństwo profilu i stężenia cytokin prozapalnych w surowicach dzieci z „artralgiami” i u dzieci chorych na MIZS. Pomimo pewnych zaobserwowanych różnic (w przypadku „artralgii” wytwarzanie badanych cytokin jest mniej skoordynowane i nie wzrasta w okresie prepubertalnym i pubertalnym) fakt, że stężenia cytokin prozapalnych (m.in. TNF i IL-6) w „artralgiach” i nielicznostawowej postaci MIZS są zbliżone, przemawia za tym, że także w „artralgiach” może toczyć się skryty proces zapalny. Odkrycie, że IL-6 i TNF biorą udział w odczuwaniu bólu stawów, w których toczy się proces zapalny, ale nie w przypadku stawów „zdrowych”, przemawia za słusznością tego przypuszczenia [8]. W związku z tym zlokalizowanie tego procesu i jego skuteczne leczenie wydają się niezwykle istotne. Wykazano bowiem, że wśród dorosłych cierpiących na „artralgie” i wykazujących zwiększone ryzyko zachorowalności na RZS, tj. tych, u których występują swoiste autoprzeciwiata (anty-CCP, czynnik reumatoidalny), a w komórkach krwi obwodowej stwierdza się zwiększoną ekspresję genów kodujących niektóre cytokiny i chemokiny, w ciągu kilku miesięcy u niemal 20% osób rozwija się pełnoobjawowe RZS [13]. „Artralgia” może być zatem jednym z czynników predykcyjnych rozwoju chorób reumatycznych. Można zakładać, że u dzieci z dużym stężeniem nie tylko klasycznych cytokin prozapalnych (TNF, IL-6), ale także cytokin o wybitnym potencjale destrukcyjnym (IL-17), którym przypisuje się rolę patogenną także w MIZS [14, 15], istotna jest przede wszystkim dalsza obserwacja reumatologiczna.

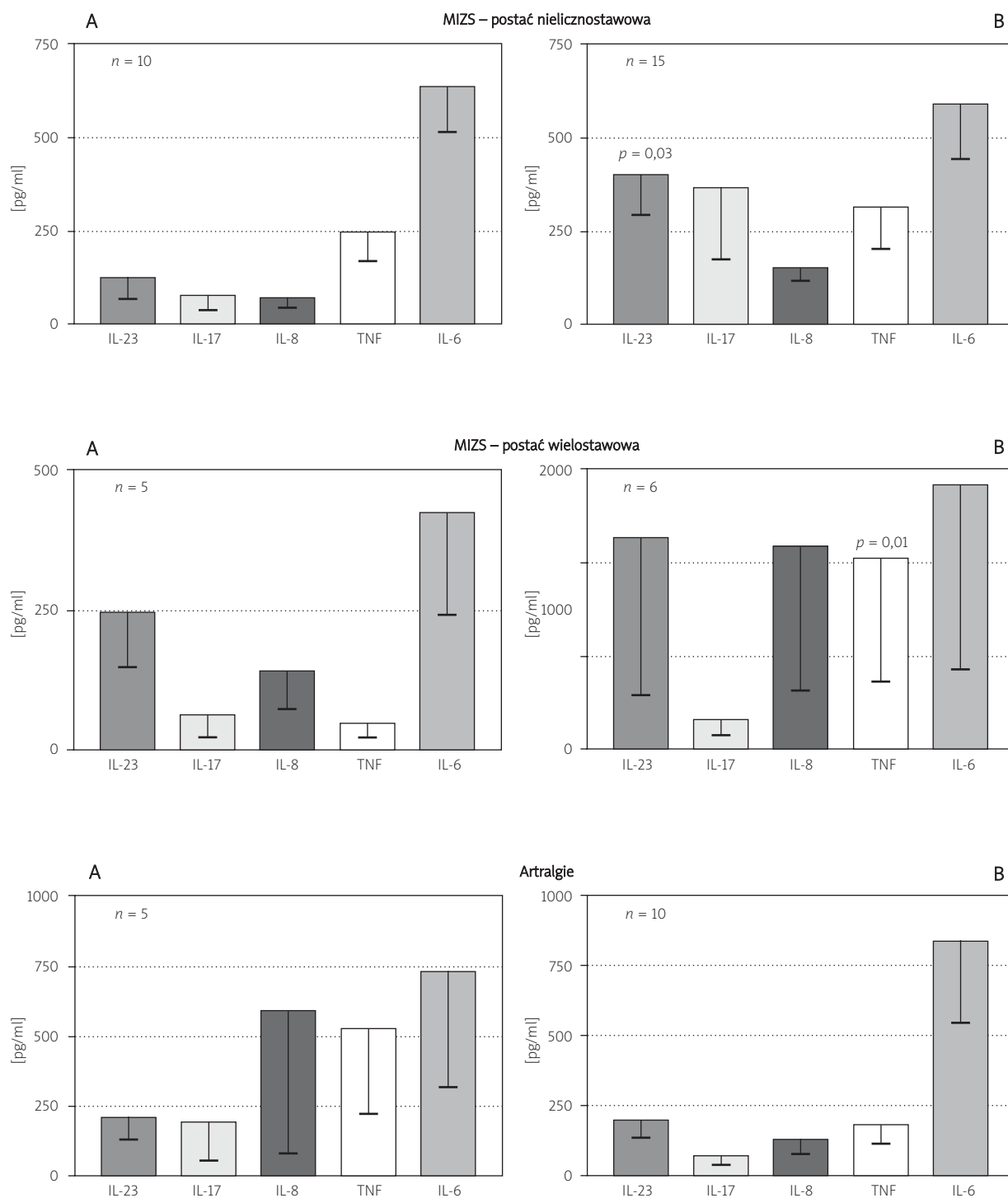
Na podstawie własnych obserwacji i nowych danych z piśmiennictwa, autorzy niniejszej pracy uważają, że ocena profilu cytokin prozapalnych w surowicach dzieci z „artralgiami” może mieć pomocniczą wartość diagnostyczną i prognostyczną. Konieczne są jednak dalsze

Tabela II. Zależność pomiędzy stężeniami cytokin wyrażona współczynnikiem korelacji liniowej Pearsona (*r*)

Table II. Relationship between the concentrations of tested cytokines expressed by the linear Pearson correlation coefficient (*r*)

Artralgie	IL-23	IL-17	IL-8	TNF	IL-6
IL-23		NS	NS	NS	NS
IL-17			NS	NS	NS
IL-8				NS	0,62
TNF					NS
MIZS: postać nielicznostawowa	IL-23	IL-17	IL-8	TNF	IL-6
IL-23		0,55	0,47	0,56	NS
IL-17			0,59	NS	NS
IL-8				NS	NS
TNF					0,72
MIZS: postać wielostawowa	IL-23	IL-17	IL-8	TNF	IL-6
IL-23		0,83	0,93	0,85	NS
IL-17			0,97	0,98	NS
IL-8				0,98	NS
TNF					NS

Wartości współczynnika *r*: 0,3 – < 0,5 – korelacja przeciętna; 0,5 – < 0,7 – korelacja wysoka; 0,7 – < 0,9 – korelacja bardzo wysoka; 0,9 – < 1 – korelacja prawie pełna; NS – nieistotne statystycznie



n – liczba pacjentów, *p* – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupą dzieci młodszych i starszych

Ryc. 2. Stężenia cytokin prozapalnych w surowicach dzieci młodszych (< 10. roku życia) i starszych (≥ 10. roku życia). Wartości przedstawiają średnie arytmetyczne ± SEM. A – dzieci młodsze, B – dzieci starsze.

Fig. 2. Concentrations of proinflammatory cytokines in sera of younger (< 10 years old) and older (≥ 10 years old) children. Values are means ± SEM. A – younger children, B – older children.

badania, uwzględniające wielokrotną obserwację chorych w dłuższym przedziale czasowym.

Wnioski

Uzyskane wyniki wskazują, że u dzieci chorujących na MIZS wytwarzanie niektórych cytokin (IL-23 w postaci nielicznostawowej oraz TNF w postaci wielostawowej) nasila się w okresie okołopokwitaniowym, a stężenia badanych cytokin wykazują znaczny stopień wzajemnej korelacji. U dzieci z „artralgiami” takich zależności nie zaobserwowano, co wskazuje, że w „artralgjach” badane cytokiny są wytwarzane w sposób nieskoordynowany i niezależny od pokwitania. Mimo tych różnic, w grupie dzieci z „artralgiami” zarówno profil, jak i stężenia ocenianych cytokin (TNF, IL-6, IL-8, IL-23 i IL-17) nie różniły się w sposób statystycznie istotny od profilu i stężenia cytokin u dzieci z MIZS. Wobec tego autorzy niniejszej pracy uważają, że u dzieci dolegliwości bólowe stawów o nieustalonej przyczynie („artralgie”) zobowiązują do wnikliwej obserwacji i dalszej diagnostyki.

Piśmiennictwo

- Petty RE, Southwood TR, Manners P, et al. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol* 2004; 31: 390-392.
- Macaubas C, Nguyen K, Milojevic D, et al. Oligoarticular and polyarticular JIA: epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 616-626.
- Kontny E, Maśliński W. Sieć cytokin i implikacje terapeutyczne w chorobach reumatycznych. W: Wiland P. (red.). Leczenie biologiczne chorób reumatycznych. Termedia, Poznań 2009; 9-36.
- Rutkowska-Sak L, Żuber Z. Skuteczność leczenia biologicznego w młodzieńcym idiopatycznym zapaleniu stawów. W: Wiland P. (red.). Leczenie biologiczne chorób reumatycznych. Termedia, Poznań 2009; 113-130.
- Prakken BJ, Albani S. Using biology of disease to understand and guide therapy of JIA. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2009; 23: 599-608.
- Kontny E, Maśliński W. Patogeneza reumatoidalnego zapalenia stawów. W: Wiland P. (red.). *Reumatologia 2009/2010 – nowe trendy*. Termedia, Poznań 2010; 13-35.
- Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, et al. Cutting edge: mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 2010; 184: 3336-3340.
- Schaible HG, von Banchet GS, Boettger MK, et al. The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1193: 60-69.
- Bron DCS. Arthralgia in children. *Can Fam Physician* 1983; 29: 2149-2151.
- Tuszkiewicz-Misztal E, Postępski J. Diagnostyka bólów stawów u dzieci – kontrowersje. *Przegl Lek* 2009; 66: 1-2.
- Kontny E, Grabowska A, Kowalczewski J, et al. Taurine chlo-ramine inhibition of cell proliferation and cytokine production by rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 2552-2560.
- van den Ham HJ, de Jager W, Bijlsma JWJ, et al. Differential cytokine profiles in juvenile idiopathic arthritis subtypes revealed by cluster analysis. *Rheumatology* 2009; 48: 899-905.
- van Baarsen LGM, Bos WH, Rustenburg F, et al. Gene expressing profiling in autoantibody-positive patients with arthralgia predicts development of arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 694-704.
- Agarwal S, Misra R, Aggarwal A. Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *J Rheumatol* 2008; 35: 515-519.
- Nistala K, Moncrieffe H, Newton KR, et al. Interleukin-17-producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 875-887.