

Ocena stężenia TNF- α w surowicy dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit

Evaluation of TNF- α concentration in blood serum of children with inflammatory bowel diseases

Urszula Grzybowska-Chlebowczyk¹, Halina Woś¹, Bożena Gabryel², Sabina Więcek¹, Maciej Kajor³, Jacek Pająk³

¹Klinika Pediatrii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

²Zakład Farmakologii Klinicznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

³Zakład Histopatologii Katedry Patomorfologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Przegląd Gastroenterologiczny 2008; 3 (3): 149–153

Słowa kluczowe: TNF- α , nieswoiste zapalenia jelit.

Key words: TNF- α , inflammatory bowel diseases.

Adres do korespondencji: dr n. med. Urszula Grzybowska-Chlebowczyk, Klinika Pediatrii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, ul. Medyków 16, 40-752 Katowice, tel. +48 32 207 17 00, faks +48 32 207 17 21, e-mail: klinikapediatrii@slam.katowice.pl

Streszczenie

Wprowadzenie: Czynniki martwicy nowotworów α (TNF- α) jest ważnym mediatorem zapalenia odpowiedzialnym za wiele objawów klinicznych w nieswoistych zapaleniach jelit.

Cel: Ocena stężenia TNF- α w surowicy dzieci chorych na nieswoiste zapalenie jelit oraz próba wykazania związku jego stężenia z wybranymi objawami klinicznymi i mutacją genu NOD2/CARD15.

Materiał i metody: Badaniem objęto 78 dzieci w wieku 4–18 lat (średnia 14 lat), 38 z chorobą Leśniowskiego-Crohna, 40 z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Rozpoznanie choroby ustalono na podstawie kryteriów Porto. Grupę kontrolną stanowiło 23 dzieci w podobnym przedziale wiekowym z zaburzeniami czynnościowymi przewodu pokarmowego. Zawartość TNF- α w surowicy u badanych dzieci oznaczono metodą ELISA przy użyciu zestawu firmy Bender.

Wyniki: Stężenie TNF- α w grupie dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna było znacznie statystycznie wyższe w porównaniu z dziećmi z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i grupy kontrolnej ($p=0,007$). Nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic w stężeniu TNF- α w zależności od stanu odżywienia i aktywności choroby w badanych grupach dzieci. W analizie stężenia TNF- α u wszystkich dzieci z co najmniej jedną mutacją genu NOD2/CARD15 (R702W, G908R, L1007fs) nie wykazano różnic znamienne statystycznie.

Wnioski: Wykazano wyższe stężenie TNF- α u dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna, nie stwierdzono związku z występowaniem objawów klinicznych oraz mutacją genu NOD2/CARD15 u badanych dzieci.

Abstract

Introduction: TNF- α is an important inflammatory mediator and it plays a substantial role in creating numerous clinical symptoms in inflammatory bowel diseases.

Aim: The aim of this study was to evaluate the concentration of TNF- α in blood serum of children with IBD as well as an attempt to correlate its concentration with selected clinical symptoms and mutation of the NOD2/CARD15 gene.

Material and methods: The study comprised 78 children, aged between 4 and 18 years (mean 14 years), 38 with Crohn's disease and 40 with ulcerative colitis. The diagnosis was established on the basis of the Porto criteria. The control group comprised 23 children, in a similar age range, with functional disorders of the alimentary tract. The concentration of TNF- α in blood serum of the examined children was detected with the ELISA method, by using the set produced by Bender.

Results: The concentration of TNF- α in the group of children with Crohn's disease was statistically significantly higher than the concentration in children with ulcerative colitis and the control group ($p=0.007$). We did not find any statistically significant differences in TNF- α concentration in relation to the nutritional state and disease activity in the examined groups of children. The analysis of TNF- α concentration in children with at least one mutation of NOD2/CARD15 (R702W, G908R, L1007fs) gene did not show statistically significant differences.

Conclusions: A higher concentration of TNF- α in children with Crohn's disease was observed but we did not find a correlation between clinical symptoms and mutation of the NOD2/CARD15 gene.

Wstęp

Cytokinami nazywa się hormonopodobne peptydy i niskocząsteczkowe białka wpływające na funkcje komórek i warunkujące ich wzajemne oddziaływanie. Są one wytwarzane głównie przez komórki układu odpornościowego – aktywowane limfocyty i makrofagi. Czynnikiem martwicy nowotworów α (TNF- α) jest cytokiną o właściwościach immunomodulujących i przeciwnowotworowych. Syntezę i wydzielanie TNF- α , stymulują głównie toksyny bakteryjne w wyniku aktywacji receptorów CD14 i CD11/18 [1, 2].

Głównym czynnikiem indukującym syntezę i uwalnianie TNF- α w makrofagach są lipopolisacharydy błon komórkowych bakterii Gram-ujemnych. Limfocyty T i B po stymulacji wykazują również wzmożoną syntezę i uwalnianie TNF- α . W przebiegu reakcji typu późnego TNF- α jest uwalniany z ziarnistości mastocytów. W komórkach Panetha w jelicie cienkim stwierdzono obecność mRNA dla TNF- α [3–5]. Cytokina ta działa pleiotropowo i jest określana jako centralny regulator wielu reakcji biologicznych. Działa prozapalnie i immunoregulatorowo, powoduje wzrost przepuszczalności małych naczyń. Przez pobudzenie komórek T, eozynofili oraz indukcję endotelialnych cząstek adhezyjnych inicjuje ruch krążących komórek zapalnych do tkanek. Czynnikiem TNF- α bierze udział w patogenezie ostrych stanów zapalnych spowodowanych przez bakterie, tj. wstrząsu en-

dotoksycznego, posocznicy oraz przewlekłych stanów zapalnych, takich jak nieswoiste zapalenia jelit. Odgrywa dużą rolę w powstawaniu wielu objawów klinicznych charakterystycznych dla choroby Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejącego zapalenia jelita grubego [6–8]. Jelito jest ważnym organem immunologicznym zawierającym sieć komórkową wydzielającą peptydy, białka i inne czynniki obronne. Czynniki genetyczne mogą mieć udział zarówno w zwiększonej penetracji bakterii i ich produktów, jak i zaburzonej śluzówkowej odpowiedzi immunologicznej na te produkty bakteryjne [9, 10].

Cel pracy

Celem pracy była ocena stężenia TNF- α w surowicy dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit oraz próba wykazania związku jego stężenia z wybranymi objawami klinicznymi i mutacją genu NOD2/CARD15.

Materiał i metody

Badaniami objęto 78 dzieci w wieku 4–18 lat (średnia 14 lat), 38 z chorobą Leśniowskiego-Crohna, 40 z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Rozpoznanie choroby ustalono na podstawie kryteriów Porto (badanie podmiotowe, przedmiotowe, badania laboratoryjne, immunologiczne, radiologiczne, endoskopowe górnego i dolnego odcinka przewodu pokarmowego, histopatologiczne).

Grupę kontrolną stanowiło 23 dzieci w podobnym przedziale wiekowym z zaburzeniami czynnościowymi przewodu pokarmowego. Charakterystykę kliniczną badanych dzieci przedstawiono w tab. I.

Zawartość TNF- α w surowicy oznaczano metodą immunoenzymatyczną (ELISA), wykorzystując zestawy do określania cytokin firmy Bender MedSystems (Austria). Ekstynkcję odczytywano w czytniku do mikroplitek Multiscan RC (Labsystems, Finlandia). Z uzyskanych wartości ekstynkcji obliczono stężenia cytokin w stosunku do krzywej wzorcowej wykonywanej oddzielnie dla każdej serii oznaczeń.

Najniższe stężenie oznaczalne w zestawach dla TNF- α wynosiło 3,83 pg/ml. Oznaczenia TNF- α wykonano w Zakładzie Farmakologii Klinicznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

Metody analizy statystycznej

Ponieważ rozkład większości zmiennych różnił się istotnie od rozkładu normalnego (test Kołmogorowa-Smirnowa, $p < 0,05$), do ich opisu stosowano medianę (zakres), a do weryfikacji hipotez – testy nieparametryczne. Różnice między podgrupami w odniesieniu do zmien-

Tabela I. Charakterystyka kliniczna badanych dzieci
Table I. Clinical picture of examined children

Wyszczególnienie	Choroba Leśniowskiego-Crohna	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego	Grupa kontrolna
liczba	38	40	23
wiek [lata] (mediana, zakres)	14 (5–18)	14 (6–18)	15 (4–18)
płeć (liczba, odsetek)			
• męska	22 (57,9%)	18 (45%)	11 (47,8%)
• żeńska	16 (42,1%)	22 (55%)	12 (52,2%)
dodatni wywiad rodzinny (liczba pacjentów)	3 (7,9%)	6 (15%)	–
wskaźnik Cole'a (mediana, zakres)	86 (66–135,7)	89,7 (72,9–159,5)	94,2 (75,2–128,8)
PCDAI/skala Truelova-Wittsa (mediana, zakres)	50 (27,5–80)	6 (4–12)	–

PCDAI – wskaźnik aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna
(ang. *pediatric Crohn's disease activity index*)

nych numerycznych weryfikowano z użyciem testu U Manna-Whitneya. W przypadku występowania więcej niż dwóch podgrup w pierwszym etapie stosowano test Kruskala-Wallisa. Jeżeli wartość p w tym teście wynosiła $<0,05$, w dalszej części podgrupy porównywano parami z zastosowaniem testu U Manna-Whitneya. Zależności między dwoma zmiennymi numerycznymi weryfikowano z zastosowaniem testu korelacji rang Spearmana.

Wyniki

Stężenie TNF- α w grupie dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna było znamienne statystycznie wyższe w porównaniu ze stężeniami u dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i w grupie kontrolnej (tab. II).

W analizie statystycznej badano związek TNF- α z aktywnością choroby i stanem odżywienia badanych dzieci. Nie stwierdzono znamienne statystycznych różnic TNF- α w zależności od stanu odżywienia i przebiegu choroby w badanych grupach dzieci (tab. III).

Nie potwierdzono związku między obecnością poszczególnych mutacji genu NOD2/CARD15 ze stężeniem TNF- α w badanych grupach. Również w analizie stężenia TNF- α u wszystkich dzieci z co najmniej jedną mutacją genu NOD2/CARD15 (R702W, G908R i L1007fs) nie wykazano znamienych statystycznie różnic (tab. IV).

Omówienie

Czynnik TNF- α jest wydzielany w błonie śluzowej przewodu pokarmowego i stanowi ważny mediator zapalenia w nieswoistych zapaleniach jelit. Badania dotyczące jego stężeń w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit zarówno w surowicy chorych, jak i w zmienionej zapalnie błonie śluzowej jelit są niejednoznaczne. W badaniach własnych wykazano znamienne statystycznie wyższe stężenia TNF- α w surowicy dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna w porównaniu z pozostałymi grupami badanych. Podobne wyniki przedstawił Murch. Również w jego badaniach stężenie TNF- α było podwyższone, przede wszystkim w okresach zaostrzenia choroby, w porównaniu z okresami remisji. MacDonald stwierdził wysokie stężenie TNF- α w błonie śluzowej jelit związane z nasileniem zmian zapalnych, które jednak nie korelowało ze stężeniem w surowicy. Również Olson wykazał wysoką ekspresję TNF- α w biopsjach błony śluzowej jelit u dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit [11, 12].

W przebiegu nieswoistych zapaleń jelit cytokina ta może być odpowiedzialna za wiele objawów klinicznych:

- gorączkę – jest endogennym pirogenem wywołującym wzrost temperatury, bezpośrednio wpływając na neurony podwzgórza i pośrednio przez indukując wydzielania interleukiny 1 (IL-1),
- zapalenie stawów – wywołuje apoptozę chondrocytów

Tabela II. Porównanie stężenia TNF- α u badanych dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit

Table II. Comparison of TNF- α concentration in children with IBD

	Choroba Leśniowskiego-Crohna	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego	Grupa kontrolna	p
stężenie TNF- α (mediana, zakres)	28,5 (6,4–116,2)	16,1 (0–88,9)	17,4 (3,5–80,1)	0,007

Tabela III. Korelacja między stężeniem TNF- α a wskaźnikami Truelowa-Wittsa, PCDAI, Cole'a u badanych dzieci z nieswoistym zapaleniem jelit

Table III. Correlation between TNF- α concentration and activity index (Truelove-Witts, PCDAI) and Cole's index in children with IBD

Wskaźniki (mediana, zakres)	TNF- α	
	R Spearman	p
Truelowa-Wittsa 6 (4–12)	–0,21	0,2
PCDAI 50 (27,5–80)	0,24	0,14
Cole'a (wrzodziejące zapalenie jelita grubego) 89,7 (72,9–159,5)	0,11	0,51
Cole'a (choroba Leśniowskiego-Crohna) 86 (66–135,7)	–0,05	0,74

PCDAI – wskaźnik aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna (ang. pediatric Crohn's disease activity index)

Tabela IV. Związek mutacji R702W, G908 lub L1007fs ze stężeniem TNF- α u badanych dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit

Table IV. Correlation between mutation R702W, G908 or L1007fs and TNF- α concentration in children with IBD

	Mutacja (+)	Mutacja (–)	p
cała badana grupa TNF- α (mediana, zakres)	(n=22) 22,4 (2,9–116,2)	(n=56) 19,5 (0,26–95,2)	0,4
choroba Leśniowskiego-Crohna TNF- α (mediana, zakres)	(n=15) 28 (6,4–95,2)	(n=23) 32,4 (8,3–116,2)	0,3
wrzodziejące zapalenie jelita grubego TNF- α (mediana, zakres)	(n=7) 18,3 (2,9–57,3)	(n=33) 15,8 (0–88,9)	0,44

- chrząstki wzrostowej i hamuje ich proliferację,
- wyniszczenie – wywiera potencjalnie kataboliczny efekt na komórki tłuszczowe (hamuje aktywację lipazy lipoproteiny) i mięśniowe, skutkując lipolizą i glikogolizacją, znacznie wpływa na metabolizm kolagenu, a także jest odpowiedzialna za brak łąkania (efekt anorektyczny) i wpływa na wzrost katabolizmu białkowego,
 - niedobór wzrostu – obniża insulinowy czynnik wzrostu 1 (ang. *insulin like growth factor 1* – IGF-1) przez redukcję ekspresji receptorów hormonu wzrostu GH w hepatocytach; razem z IL-1 może wywołać stan oporności IGF-1 systemowo lub na poziomie chrząstki wzrostowej [13, 14].

U badanych przez autorów niniejszej pracy dzieci nie występowała zależność stężenia TNF- α w surowicy z aktywnością choroby. Ze względu na rolę, jaką odgrywa TNF- α w procesach zapalnych i jego udział w etiopatogenezie niedożywienia u dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit, autorzy przeprowadzili analizę związku stężenia TNF- α ze stanem odżywienia, która jednak nie dała wyniku pozytywnego. Podobne wyniki uzyskał Hyams. Nie zaobserwował korelacji stężenia TNF- α ze stanem odżywienia oraz z aktywnością choroby u dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna [15–17].

W patogenezie tej choroby mutacje genu NOD2/CARD15 ściśle wiążą się z wydzielaniem cytokin prozapalnych, głównie TNF- α . Gen NOD2/CARD15 jest składową wrodzonego układu immunologicznego, regulującego odpowiedź na patogeny bakteryjne. Ponadto koduje wewnątrzkomórkowe czynniki ważne w odpowiedzi zapalnej na peptydoglikany bakteryjne. Produkt genu NOD2/CARD15 aktywuje transkrypcję czynnika jądrowego NF κ B po stymulacji przez lipopolisacharydy ściany komórkowej bakterii.

W komórkach niepobudzonych kompleks NF κ B łączy się z inhibitorem. Aktywne bodźce przez lipopolisacharydy i TNF- α indukują fosforylację, prowadząc do proteolitycznego rozkładu inhibitora NF κ B. Uwolniony kompleks ulega przemieszczeniu do jądra komórkowego, gdzie inicjuje transkrypcję genów prozapalnych.

Mutacja genu NOD2/CARD15, której skutkiem jest obniżenie aktywacji NF κ B w monocytach, makrofagach lub komórkach dendrytycznych (po ekspozycji na produkty bakteryjne) może powodować napływ różnych cytokin prozapalnych i innych czynników zaburzających homeostazę mikrośrodowiska jelitowego [18–20].

Regulacja odpowiedzi immunologicznej na antygeny jelitowe pozwala zrozumieć patogenезę choroby Leśniowskiego-Crohna. Głównym mechanizmem patogenetycznym w tym przypadku jest odpowiedź immunologiczna komórek Th1 uwalniających duże liczby interferonów IFN- γ i TNF- α . Stężenie cytokin, które

powodują różnicowanie komórek Th do Th1, głównie IL-12 i IL-18, jest znacznie podwyższone w błonie śluzowej osób z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Komórki T w prawidłowej blaszce właściwej błony śluzowej jelita pochodzą z kępek Peyera i ulegają apoptozie. W chorobie Leśniowskiego-Crohna są one odporne na apoptozę, akumulują się i są przyczyną zapalenia oraz uszkodzenia tkanek. Błona śluzowa jelita pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna zawiera małą liczbę cytokin zapobiegających apoptozie IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 [21–23].

W badaniu autorzy nie stwierdzili różnic w zakresie stężenia TNF- α w zależności od obecności poszczególnych mutacji genu NOD2/CARD15. Halme i wsp. wykazali natomiast związek mutacji L1007fs z małym wydzielaniem cząstek TNF w monocytach krwi obwodowej pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna [24]. Wydaje się, że konieczne są dalsze badania związku mutacji genu NOD2/CARD15 z wydziałaniem TNF- α u chorych z nieswoistymi zapaleniami jelit.

Wnioski

Wykazano wyższe stężenie TNF- α u dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Nie stwierdzono jednak związku z występowaniem objawów klinicznych oraz mutacją genu NOD2/CARD15 u badanych dzieci.

Praca została sfinansowana z projektu badawczego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 0881/PO5/2005/29.

Piśmiennictwo

1. Jędrzejczak WW. Komórki, cytokiny, receptory i choroby. W: Cytokiny. Zastosowanie kliniczne. Jędrzejczak WW, Podolak-Dawidziak M (red). Volumed, Wrocław 1997; 33-51.
2. Robak T. Biologia i farmakologia cytokin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa-Łódź 1995.
3. Hale KK, Smith CG, Baker SL i wsp. Multifunctional regulation of the biological effects of TNF-alpha by the soluble type and type II TNF receptors. *Cytokine* 1995; 7: 26-38.
4. Bischoff SC, Lorentz A, Schwengberg S i wsp. Mast cells an important cellular source of tumour necrosis factor alpha in human intestinal tissue. *Gut* 1999; 44: 643-52.
5. Wershil BK. Immune mediators and cytokines in gastrointestinal inflammation. *Curr Opin Gastroenterol* 1992; 8: 975-82.
6. Rabinovici R, Renz J, Esser KM i wsp. Serum tumor necrosis factor-alpha profile in trauma patients. *J Trauma* 1993; 35: 698-702.
7. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 2000; 181: 176-80.
8. MacLindon ME, Mahida. Pro-inflammatory cytokines in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol*

- Ther 1996; 10: 72-4.
9. Yuan Q, Walker WA. Innate immunity of the gut: mucosal defense in health and disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38: 463-73.
 10. Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet* 2002; 359: 62-9.
 11. Olson AD, Ayass M, Chensue S. Tumor necrosis factor and IL-1beta expression in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 16: 241-6.
 12. MacDonald TT, Hutchings P, Choy MY i wsp. Tumor necrosis factor- α and interferon- γ production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin Exp Immunol* 1990; 81: 301-5.
 13. Ballinger AB, Camacho-Hübner C, Croft NM. Growth failure and intestinal inflammation. *Q J Med* 2001; 94: 121-5.
 14. Wong SC, Macrae VE, McGrogan P, Ahmed SF. The role of pro-inflammatory cytokines in inflammatory bowel disease growth retardation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43: 144-55.
 15. Resta-Lenert S, Barrett KE. Probiotics and commensals reverse TNF- α and IFN- γ induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2006; 130: 731-46.
 16. Murch SH, Lamkin VA, Savage MO i wsp. Serum concentrations of tumor necrosis factor α in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1991; 32: 913-7.
 17. Hyams JS, Treem WR, Eddy E i wsp. Tumor necrosis factor - α not elevated in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991; 12: 233-6.
 18. Chamailard M, Philpott D, Girardin SE i wsp. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory disease. *PNAS* 2003; 100: 3455-60.
 19. Inohara N, Nunez G. The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* 2001; 20: 6473-81.
 20. Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N i wsp. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor- κ B activation. *J Biol Chem* 2002; 277: 41701-5.
 21. MacDonald TT, Path FR, DiSabatino A i wsp. Immunopathogenesis of Crohn's disease. *J Parent Enter Nutr* 2005; 29: 118-25.
 22. Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 648-56.
 23. MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000; 51: 2-9.
 24. Halme L, Turunen U, Paavola-Sakki P i wsp. CARD15 frameshift mutation in patients with Crohn disease is associated with immune dysregulation. *Scand J Gastroenterol* 2004; 12: 1243-9.