

Piotr Radwan

Katedra i Klinika Gastroenterologii z Pracownią Endoskopową, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Nowe potencjalne cele leczenia nieswoistych chorób zapalnych jelit

New potential targets for therapeutic interventions in inflammatory bowel disease

STRESZCZENIE

Dotychczasowe strategie poszukiwania leków na nieswoiste choroby zapalne jelit (NChZJ) opierały się głównie na hamowaniu nadmiernie pobudzonej aktywności układu odpornościowego nabytego. Ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się komórkom „nieimmunologicznym”, takim jak: nabłonek limfatyczny, komórki tuczne (mastocyty) oraz komórki stromalne, które w pewnych warunkach aktywnie uczestniczą

w powstawaniu i przebiegu procesu zapalnego w NChZJ. Badania doświadczalne wskazują na możliwość modulacji nieprawidłowych oddziaływań tych komórek, które mogą stanowić nowe potencjalne cele interwencji terapeutycznych.

Gastroenterologia Kliniczna 2014, tom 6, nr 4, 148–152

Słowa kluczowe: nieswoiste choroby zapalne jelit, naczynia limfatyczne, komórki tuczne, komórki stromalne

ABSTRACT

Traditional approach to the treatment of inflammatory bowel disease (IBD) has been to target the excessive activity of the adaptive immune system. Recently much attention has been paid to nonimmunological cells such as lymphatic endothelium, mastocytes and stromal cells, which in some circumstances actively participate in the development

and progress of the inflammatory process in IBD. Experimental studies indicate that the aberrant activities of these cells may be modulated, and the cells could be potential targets of therapeutic interventions.

Gastroenterologia Kliniczna 2014, tom 6, nr 4, 148–152

Key words: inflammatory bowel disease, lymphatic endothelium, mastocytes, stromal cells

Etiopatogeneza nieswoistych chorób zapalnych jelit (NChZJ), obejmujących wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) i chorobę Leśniowskiego-Crohna (ChL-C) pozostaje nadal nie do końca wyjaśniona. Zasadniczą rolę w rozwoju i przebiegu tych schorzeń odgrywają czynniki genetyczne, środowiskowe i immunologiczne. Brak znanej etiologii powoduje, że leczenie nie jest przyczynowe, a oparte na wykorzystaniu dotychczas poznanych mechanizmów reakcji zapalnych powstających w błonie śluzowej i ścianie jelit. W ostatniej dekadzie nastąpił szybki rozwój terapii biologicznych

ingerujących w poszczególne ogniwa łańcucha zmian immunopatologicznych w NChZJ [1]. Największą grupę w dostępnym arsenale leków biologicznych stanowią monoklonalne przeciwciała przeciwko czynnikowi martwicy guza alfa (aTNF α , *anti-tumor necrosis factor α*). Leki te pozwalają na dobre kontrolowanie procesu zapalnego NChZJ, poprawę jakości życia chorych i zmniejszenie konieczności leczenia operacyjnego. Jak wykazano w metaanalizach, remisję choroby trwającą ponad rok można jednak uzyskać jedynie u około 30% pacjentów, a wielu z nich traci z czasem odpowiedź na

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. n. med. Piotr Radwan
Katedra i Klinika Gastroenterologii
z Pracownią Endoskopową UM
ul. K. Jaczewskiego 8, 20–090
Lublin
tel.: 603 794 944,
faks: 81 724 45 35
e-mail: piotr_radwan@wp.pl

leczenie [2, 3]. Stąd też uzasadnione są badania mające na celu opracowanie nowych metod terapeutycznych w NChZJ.

Dotychczasowe strategie poszukiwania nowych leków w tej grupie chorób opierają się głównie na hamowaniu nadmiernej aktywności układu immunologicznego nabytego (adaptacyjnego). Ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się komórkom pierwotnie „nieimmunologicznym”, które w przeszłości traktowano jako „niemych świadków”, lub „ofiary” procesu zapalnego. Chodzi tu między innymi o komórki układu limfatycznego, komórki tuczne (mastocyty) czy komórki zrębu (stromalne). Okazuje się, że zmiany strukturalne w tkance zmienionego zapalnie jelita nie są jedynie konsekwencją ataku czynników immunologicznych. Wymienione powyżej komórki aktywnie uczestniczą w procesie zapalenia, przyczyniając się do jego rozwoju, podtrzymywania, a niekiedy ustępowania (rezolucji). Wyniki badań doświadczalnych na zwierzęcych modelach zapaleń jelit wyraźnie wskazują na możliwość modulacji nieprawidłowych oddziaływań tych komórek, które można uznać za nowe, potencjalne cele interwencji terapeutycznych [4].

KOMÓRKI UKŁADU LIMFATYCZNEGO

Jelitowe mikrokrążenie naczyniowe odgrywa centralną rolę w powstawaniu i przebiegu procesu zapalnego. Składa się ono z dwóch zintegrowanych ze sobą funkcjonalnie części. Z jednej strony mikrokrążenie krwi, poprzez które dokonuje się napływ leukocytów (limfocytów, makrofagów, granulocytów, komórek dendrytycznych itp.) odpowiedzialnych za wzbudzenie reakcji zapalnych, z drugiej zaś mikrokrążenie limfatyczne, umożliwiające odprowadzanie składników zapalnych. Drenaż płynu obrzękowego, komórek immunologicznych, bakterii antygenów, chemokin powoduje zmniejszenie i ustępowanie zapalenia [5]. W przebiegu NChZJ następuje bardzo intensywna proliferacja zarówno naczyń mikrokrążenia krwi (angiogeneza), jak i mikrokrążenia limfatycznego (limfangiogeneza). O ile jednak procesy angiogenezy były wielokrotnie tematem licznych badań, o tyle limfangiogenezą bardziej zainteresowano się w ostatnich latach [6]. U chorych z WZJG i ChL-C stwierdza się wzrost gęstości sieci naczyń limfatycznych, które są często rozdęte, przenikają przez warstwę *muscularis mucosae*, czego nie obserwuje się w jelicie niezmienionym [7]. Proliferacja, tworzenie nowych naczyń limfatycznych, ich

ekspansja, są prawdopodobnie adaptacyjną reakcją na zapalenie, mającą na celu ograniczenie tego procesu. Przekroczenie zdolności drenujących nawet tak zwiększonej sieci limfatycznej powoduje zaleganie śródmiąższowego płynu obrzękowego z dużą zawartością prozapalnych cytokin, leukocytów, lipopolisacharydów śluzówkowych, bakterii i martwych komórek. Bogatobiałkowy płyn obrzękowy powoduje wzrost aktywności fibroblastów, przemianę (*remodeling*) substancji macierzy i sprzyja rozwojowi włóknienia w ścianie jelita [6, 8]. O roli niewydolności limfatycznej w zapaleniu jelit świadczą prace na zwierzętach, w których wykazano, że eksperymentalne zamknięcie limfatycznych naczyń krezkowych powodowało zapalenie jelit bardzo przypominające ChLC, z transmuralnymi naciekami, tworzeniem zmian ziarniniakowych, a nawet przetok jelitowych [9]. Nieprawidłowości sieci limfatycznej w NChLC były opisywane w przeszłości przez wielu znanych patologów, o czym częściowo zapomniano, a co niedawno przypomnieli Van Kruiningen i Colombel [10].

Głównymi funkcjami układu limfatycznego w ognisku zapalnym są:

- zmniejszenie obrzęku tkanki i oczyszczenie z antygenów,
- kontrolowanie wypływania leukocytów z rejonu zapalenia,
- oczyszczanie ogniska zapalnego z chemokin.

Zaburzenia wymienionych czynności zwykle współistnieją w zmienionym jelicie, przyczyniając się do podtrzymywania procesu zapalnego i wszystkich związanych z tym konsekwencji.

W doświadczalnym *colitis* u świnek morskich, wywoływanym kwasem trójnitrobenzenosulfonowym (TNBS) stwierdzono znaczne upośledzenie funkcji skurczowo-pompującej naczyń limfatycznych, co powodowało wyraźne pogorszenie perfuzji i odprowadzenia śródmiąższowego płynu obrzękowego. Zjawisko to wykazywało znamiennej korelację ze stopniem nasilenia wskaźników zapalnych [11].

Powstaje zatem pytanie, czy możemy modulować funkcję naczyń limfatycznych w eksperymentalnych modelach zwierzęcych oraz jak ta modulacja wpłynie na przebieg zapalenia? Doktor Silvio Danese, w czasie 9. Kongresu ECCO w Kopenhadze przedstawił interesujące wyniki badań, w których wykazał, że pobudzenie tak zwanego czynnika VEGF-C (*vascular endothelial growth factor-C*), regulującego limfangiogenezę, powodowało

znaczny wzrost proliferacji i gęstości naczyń limfatycznych w tkance jelita, podczas, gdy zablokowanie innego z czynników — VEGFR-3 powodowało zjawisko wręcz odwrotne. Sieć naczyń limfatycznych ulegała wówczas znacznemu zubożeniu. Co ciekawe, przekładało to się na przebieg zapalenia jelita. Pobudzenie układu limfatycznego wyraźnie zmniejszało nasilenie *colitis*, podczas gdy cięższy przebieg choroby obserwowano u zwierząt, u których wywołano zahamowanie limfangiogenezy [12].

Tego samego modelu doświadczalnego użyto dla oceny wpływu układu limfatycznego na wpływ leukocytów ze zmienionego zapalenia jelita do węzłów chłonnych. Pobudzenie VEGF-C i wzrost liczby i gęstości naczyń limfatycznych powodowały zwiększenie liczby leukocytów w węzle chłonnym, co świadczyło o zwiększonym odpływie komórek immunologicznych z ogniska zapalnego. Blokada zaś VEGFR-3 zmniejszała liczbę komórek w węzle, wskazując na ich zaleganie w ognisku zapalnym, przyczyniając się do jego podtrzymania [13].

Innym zadaniem naczyń limfatycznych jest ograniczanie procesu zapalenia, poprzez usuwanie prozapalnych chemokin CC. Zasadniczą rolę odgrywa tu nietypowy receptor „decoy” (D6), „zmiatający” większość chemokin CC, a którego ekspresja jest stwierdzana głównie na afferentnych naczyniach limfatycznych. U myszy modyfikowanych genetycznie (*knock out*), pozbawionych receptora D6 przebieg doświadczalnego *colitis* jest zdecydowanie cięższy, niż w typie „dzikim”, co wyraźnie wskazuje na działanie przeciwzapalne tego receptora. Również myszy pozbawione D6 są bardziej podatne na rozwój zmian nowotworowych powstających na podłożu zapalenia w stosunku do typu „dzikiego” [14].

Implikacje wynikające ze wszystkich powyższych rozważań i wyników badań być może pomogą w przyszłości na ustalenie zupełnie nowego podejścia terapeutycznego w NChZJ. Stymulacja układu limfatycznego umożliwić może usuwanie antygenów, chemokin i komórek immunologicznych ze zmienionego zapalenia jelita, zmniejszyć jego obrzęk, a przez to przyspieszyć ustępowanie i gojenie zmian wywołanych procesami immunologicznymi w przebiegu NChZJ.

KOMÓRKI TUCZNE (MASTOCYTY)

Kolejną populacją komórek, branych pod uwagę jako potencjalne cele terapeutyczne są komórki tuczne (mastocyty — MC [*mast*

cells]). Od dawna znany jest udział MC w reakcjach nadwrażliwości typu I, zależnych od IgE. Okazuje się jednak, że komórki te odgrywają również rolę w wielu reakcjach zapalnych, niezależnych od IgE, w tym także w NChZJ [15]. Mediatory uwalniane podczas degranulacji MC, takie jak: proteazy, cytokiny, chemokiny czy prostaglandyny powodują zwiększenie przepuszczalności naczyń mikrokrążenia, pobudzają migrację komórek immunologicznych, istotnie przyczyniając się do nasilenia procesu zapalnego [16]. U chorych z NChZJ stwierdza się zwiększoną liczbę MC w błonie śluzowej, podśluzowej, a w ChLC także w tkance tłuszczowej otaczającej jelito wraz ze wzmożoną ich degranulacją, wyrażoną wzrostem poziomu histaminy i jej metabolitów w moczu [17, 18].

W doświadczalnym modelu zapalenia jelit u myszy obserwowano zwiększenie liczby MC w tkance, postępujące stopniowo do 3 dnia trwania choroby, z następowym ich obniżeniem do wartości wyjściowych, co wskazuje na udział MC we wczesnych fazach zapalenia. O roli MC świadczy także łagodny przebieg eksperymentalnego *colitis* u myszy modyfikowanych genetycznie, pozbawionymi MC w porównaniu z myszami typu „dzikiego”, niepoddanymi modyfikacji [18].

Mastocyty są także aktywowane przez wolne, lekkie łańcuchy immunoglobulin (IgFLC, *Ig-Free Light Chains*) typu λ i κ , których zwiększone stężenie występuje w licznych chorobach, o podłożu immunologicznym, a między innymi w NChZJ [16, 19]. Jak wykazano w badaniach eksperymentalnych IgFLC, produkowane przez limfocyty B wiążą się z MC i prowadzą do ich degranulacji i uwolnienia wielu mediatorów powodujących zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych i rekrutację komórek zapalnych. Zastosowanie antagonisty IgFLC o nazwie F991 zapobiega aktywacji MC, zmniejszając nasilenie doświadczalnego *colitis* u myszy [16]. Być może zatem w przyszłości będzie to podstawą opracowania leku, o działaniu analogicznym do F991, który znajdzie praktyczne zastosowanie w leczeniu NChZJ u ludzi.

Od dawna wiadomo, że stres psychiczny, negatywne emocje i zdarzenia życiowe są czynnikami powodującymi zaostrzenie NChZJ [20]. Wykazano, że oddziaływanie stresu następuje poprzez włókna nerwowe cholinergiczne, przy współdziałaniu czynnika uwalniającego kortykotropinę (CRF, *corticotropin-releasing factor*) i granulocytów kwasochłonnych (eozynofili) powoduje aktywację MC i prowadzi do zwiększenia

szenia przepuszczalności błony śluzowej jelita, co może powodować zaostrenie NChZJ [21].

Do aktywacji MC może zatem dochodzić pod wpływem wielu bodźców: chemicznych (np. TNBS w doświadczalnym *colitis*), immunologicznych (IgFLC) bądź neurogennych (stres). Degranulacja MC powoduje uwolnienie szeregu mediatorów wywołujących wzrost przepuszczalności naczyń i błon śluzowych, rekrutację komórek zapalnych itp., co przyczynia się do powstania procesu zapalnego w jelicie. Opracowanie metod hamowania przedstawionych reakcji prozapalnych z udziałem MC może więc, przynajmniej z teoretycznego punktu widzenia, pomóc w uzyskaniu leków hamujących rozwój NChZJ.

KOMÓRKI STROMALNE

Jednymi z pierwszych etapów reakcji immunologicznej w odpowiedzi na antygen są aktywacja i dojrzewanie komórek prezentujących antygen (APC, *antigen presenting cell*), takich jak komórki dendrytyczne i makrofagi, które dokonują się w mikrośrodkowisku stworzonym przede wszystkim przez komórki stromalne (zrębu). W warunkach fizjologicznych komórki stromalne jelita, w skład których wchodzi fibroblasty i miofibroblasty, spełniają funkcje strukturalne. Wydzielając wiele cząsteczek o działaniu przeciwzapalnym, takich jak między innymi TGF- β , IL10, a także ochronnym, jak laminina- β 1, fibronektyna, białka macierzy zewnątrzkomórkowej, prostaglandyny przyczyniają się do podtrzymywania tolerancji immunologicznej, pobudzają odnowę nabłonka i procesy naprawcze [22]. Wydzielając chemokiny i substancje o charakterze chemoatraktantów, powodują napływ limfocytów śluzówkowych T i chronią je przed apoptozą oraz przedłużają przeżycie komórek pamięci dla przyszłych antygenowo specyficznych reakcji [4]. Tolerogenne działanie fibroblastów i miofibroblastów wyrażone jest też zdolnością hamowania proliferacji aktywowanych limfocytów CD4+ [23]. W pewnych warunkach mikrośrodkowiska mogą one indukować powstawanie dendrytycznych komórek (DC), o właściwościach regulatorowych [24].

Zlokalizowane strategicznie pod warstwą komórek nabłonkowych, uczestniczących w pobieraniu próbek antygenów (*sampling*) fibroblasty i miofibroblasty otoczone są jednocześnie przez limfocyty T, B, makrofagi i komórki dendrytyczne, pozostając w licznych interakcjach zarówno z nabłonkiem jak i komórkami immunologicznymi za pomocą systemu receptora CD40 i liganda CD40L. Te wzajemne relacje mają ważne znaczenie w regulowaniu i amplifikowaniu reakcji odpornościowych [4, 22].

Okazuje się jednak, że komórki stromalne mogą w pewnych warunkach nabierać właściwości aktywnych, „profesjonalnych” komórek immunologicznych, czynnie uczestnicząc w powstawaniu i przebiegu reakcji zapalnych. Komórki stromalne CD90+ izolowane z ludzkiej błony śluzowej okrężnicy wykazują ekspresję receptorów TLR (*Toll-like receptors*) oraz komórkowych typu NOD (NLR, *NOD-like receptors*), reagując na bakteryjne komponenty światła jelitowego, takie jak lipopolisacharyd (LPS) lub dwypeptyd myramylowy (MDP). Pod wpływem stymulacji wydzielają cytokiny pozapalne : IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, a także czynniki wzrostu jak granulocytarno-makrofagowy czynnik stymulujący kolonie (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), czy TGF- β 1 [4, 22]. Wreszcie, jak wykazano w 2013 roku, komórki stromalne zdolne są do zinternalizowania i prezentowania antygenów bakteryjnych, zachowując się jak profesjonalne APC [25]. W przebiegu NChZJ następuje przyspieszona proliferacja, wzrost i różnicowanie komórek fibroblastów i miofibroblastów, zwiększone uwalnianie chemokin, napływ i retencja aktywowanych leukocytów, wzmożona ekspresja cząsteczek adhezyjnych [4, 22]. Środowisko jelitowych komórek stromalnych tworzy wówczas tak zwaną „kolitogenną niszę” (*colitogenic niche*) w obrębie której zapoczątkowywany i podtrzymywany jest proces zapalny w obrębie jelit [26]. Opracowanie preparatów mogących hamować pobudzoną nadmiernie aktywność tych komórek pozwoliłoby na blokowanie reakcji zapalnych na samym początku łańcucha immunopatologicznego prowadzącego do rozwoju NChZJ.

1. Danese S. New therapies for inflammatory bowel disease: from the bench to the bedside. *Gut* 2012; 61: 918–932.
2. Peyrin-Biroulet L., Leman M. Review article: remission rates achievable by current therapies for inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2011; 33: 870–879.
3. Billioud V., Sandborn W.J., Peyrin-Biroulet L. Loss of response and need for adalimumab dose intensification in Crohn's disease: a systematic review. *Am. J. Gastroenterol.* 2011; 106: 674–684.
4. Danese S. Nonimmune cells in inflammatory bowel disease: from victim to villain. *Trends Immunol.* 2008; 29: 555–564.
5. Danese S. Role of the vascular and lymphatic endothelium in the pathogenesis of inflammatory bowel disease: "brothers in arms". *Gut* 2011; 60: 998–1008.
6. Alexander J.S., Chaitanya G.V., Grisham M.B., Boktor M. Emerging roles of lymphatics in inflammatory bowel disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010; 1207 (supl.1): E75-E85.
7. Pedica F., Ligorio P., Tonelli P. i wsp. Lymphangiogenesis in Crohn's disease: an immunohistochemical study using monoclonal antibody D2-40. *Virchows. Arch.* 2008; 457: 57–63.
8. D'Alessio S., Tacconi C., Fiocchi C., Danese S. Advances in therapeutic interventions targeting the vascular and lymphatic endothelium in inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2013; 29: 608–613.
9. Kalima T., Saloniemi H., Rahko T. Experimental regional enteritis in pigs. *Scand. J. Gastroenterol.* 1976; 11: 353–362.
10. Van Kruiningen H.J., Colombel J-F. The forgotten role of lymphangitis in Crohn's disease. *Gut* 2008; 57: 1–4.
11. Wu T.F., Carati C.J., MacNaughton W.K. i wsp. Contractile activity of lymphatic vessels is altered in the TNBS model of guinea pig ileitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006; 291: G566–G574.
12. D'Alessio S., Correale C., Arena V. i wsp. Stimulation of lymphatic function via VEGFR-3 as a novel therapy for chronic experimental intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2012; 142: S84–S85.
13. D'Alessio S., Correale C., Tacconi C. i wsp. VEGF-C-dependent stimulation of lymphatic function ameliorates experimental inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 2014; 124: 3863–3878.
14. Vetrano S., Borroni E.M., Sarukhan A. i wsp. The lymphatic system controls intestinal inflammation and inflammation-associated colon cancer through the chemokine decoy receptor D6. *Gut* 2010; 59: 197–206.
15. He S.H. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 2004; 10: 309–318.
16. Rijnierse A., Redegeld F.A., Blokhuis B.R. i wsp. Ig-Free Light Chains play a crucial role in murine mast cell-dependent colitis and are associated with human inflammatory bowel diseases. *J. Immunol.* 2010; 185: 653–659.
17. Stoyanova I.I., Gulubova M.V. Mast cells and inflammatory mediators in chronic ulcerative colitis. *Acta Histochem.* 2002; 104: 185–192.
18. Kurashima Y., Amiya T., Nochi T. i wsp. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P3X7 purinoceptors. *Nat. Commun.* 2012; 3: 1034.
19. Brebner J.A., Stockley R.A. Polyclonal free light chains: a biomarker of inflammatory disease or treatment target? *F1000 Med. Rep.* 2013; 5: 4.
20. Bernstein C.N., Singh S., Graff L.A. i wsp. A prospective population-based study of triggers of symptomatic flares in IBD. *Am. J. Gastroenterol.* 2010; 105: 1994-2002.
21. Vanuytsel T., Van Wanrooy S., Vanheel H. i wsp. Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut* 2013; 0: 1–7.
22. Fiocchi C., Ina K., Leite A., Vogel J. Alterations of mesenchymal and endothelial cells in inflammatory bowel disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006; 579: 168–176.
23. Powell D.W., Pinchuk I.V., Saada J.I. i wsp. Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu. Rev. Physiol.* 2011; 73: 213–237.
24. Owens B.M.J., Kaye P.M. Stromal cell induction of regulatory dendritic cells. *Front. Immunol.* 2012; 3: 262.
25. Owens B.M.J., Steevels T.A.M., Dudek M. i wsp. CD90+ stromal cells are non-professional innate immune effectors of the human colonic mucosa. *Front. Immunol.* 2013; 4: 307.
26. Danese S., Rutella S., Vetrano S. Mesenchymal stromal cells in inflammatory bowel disease: conspirators within the "colitogenic niche"? *Gut* 2013: 1098–1099.