

Czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α) jako potencjalny osoczowy marker przebiegu stwardnienia rozsianego – badania wstępne

Plasma tumour necrosis factor alpha (TNF- α) as a potential marker of multiple sclerosis – preliminary study

¹ Klinika Neurologii i Udarów Mózgu, Uniwersytet Medyczny w Łodzi (decyzją Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – Uchwała nr 277/2014 z dn. 17.04.2014 roku – Klinika Neurologii i Epileptologii z Oddziałem Udarowym została przemianowana na Klinikę Neurologii i Udarów Mózgu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi)

² Klinika Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Adres do korespondencji: Klinika Neurologii i Udarów Mózgu, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Żeromskiego 113, 90-549 Łódź, e-mail: magda-kacperska@o2.pl

* *Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi z zadania badawczego nr 502-03/5-062-01/502-54-111 oraz funduszy własnych. Artykuł został opracowany na podstawie rozprawy doktorskiej autorki pt.: Ocena ekspresji mikroRNA jako potencjalnych biomarkerów aktywacji układu immunologicznego w przebiegu stwardnienia rozsianego (SM) i zawiera znaczne jej fragmenty, wcześniej niepublikowane. Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Poprawka do Uchwały Komisji Bioetyki o projekcie eksperymentu medycznego nr RNN/234/12/KE z dnia 18.12.2012 r., poprawka nr KE/1827/13/P z dnia 15.10.2013 r., poprawka nr KB/447/14/P z dnia 15.04. 2014 r.), a także Dra n. med. Wiesława Chudzika, Dyrektora Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Wojskowej Akademii Medycznej – Centralnego Szpitala Weteranów.*

Streszczenie

Stwardnienie rozsiane (łac. *sclerosis multiplex*, SM) zaliczane jest do częstych przewlekłych chorób ośrodkowego układu nerwowego wiążących się z postępującą niepełnosprawnością. Dotyczy zwykle osób pomiędzy 20. a 40. rokiem życia, przy czym dwukrotnie częściej chorują kobiety. Mimo wieloletnich badań nadal bardzo mało wiemy na temat patogenez tej choroby. Klinicznie można wyróżnić cztery jej postaci, do najczęściej występujących należą postać rzutowo-remisyjna, wtórnie postępująca oraz pierwotnie postępująca. Patogeneza SM jest procesem bardzo skomplikowanym, biorą w nim udział m.in.: uszkodzenie bariery krew–mózg oraz bariery krew – płyn mózgowo-rdzeniowy, wtórny przerost astrogleju, toczący się proces zapalny i szeroko pojęta neurodegeneracja. Szczególną rolę w rozwoju SM, głównie na jego wczesnym etapie, odgrywa proces zapalny, w którym biorą udział różne subpopulacje komórek zapalnych. Dotychczasowe badania wskazują na szczególnie udział w tym procesie czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α) zaliczanego do cytokin prozapalnych. **Cel badania:** Celem niniejszej pracy była analiza stężenia TNF- α w osoczu pacjentów z SM w rzucie i remisji choroby oraz jego korelacja z parametrami klinicznymi przebiegu choroby w celu oceny roli TNF- α jako potencjalnego markera zaawansowania SM. Poszukując najważniejszych producentów TNF- α we krwi chorych z SM, analizowano również związek pomiędzy stężeniem TNF- α w osoczu i liczebnością leukocytów we krwi oraz ich subpopulacji. **Materiał i metodyka:** W badaniu wzięło udział 37 pacjentów z grup badanych (20 w grupie z rzutem i 17 w grupie z remisją choroby) oraz 30 osób z grupy kontrolnej. Od pacjentów pobrano do odpowiednich próbek krew żylną w ilości 4 ml. Wirowano ją (5000 rpm, 20 min, 23°C), a następnie ostrożnie usuwano górną warstwę z osoczem, zabezpieczano i przechowywano w temperaturze –80°C do czasu wykonywania oznaczeń. Do oznaczenia poziomu TNF- α w osoczu wykorzystano metodę ELISA. **Wyniki i wnioski:** We wstępnym badaniu nie wykazano istotnego wzrostu stężenia TNF- α w osoczu pacjentów z SM zarówno w rzucie, jak i w remisji. Zaawansowanie choroby (oceniane w skali EDSS) u osób z SM wykazało nieistotną statystycznie dodatnią korelację ze stężeniem TNF- α w osoczu pacjentów w grupie z rzutem oraz grupie w remisji. W podgrupie pacjentów z remisją SM, posiadających niskie poziomy TNF- α w osoczu (<1 pg/ml), zaobserwowano wyższe poziomy TNF- α u osób z większym zaawansowaniem choroby (mierzonym skalą EDSS). Porównanie liczby WBC u osób z SM w rzu-

cie oraz w remisji (razem) wykazało istotnie wyższe liczebności leukocytów we krwi pacjentów w rzucie. Wstępne badania na małych grupach pacjentów pokazują, że stężenie TNF- α w osoczu chorych mogłoby odzwierciedlać aktywności procesów patologicznych w SM. W tym celu konieczne są dalsze badania na większej grupie osób oraz ocena korelacji stężenia TNF- α we krwi z jego stężeniem w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Słowa kluczowe: stwardnienie rozsiane (SM), ośrodkowy układ nerwowy, zapalenie, czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α), ELISA, marker, osocze

Summary

Multiple sclerosis (MS) is a common chronic neurological disorder of the central nervous system that leads to progressive disability. The disease usually affects people between 20 and 40 years of age, with women being affected twice as often. Despite many years of research, very little is known about its pathogenesis. There are four distinct clinical presentations, of which the most common are the relapsing-remitting, the secondary progressive and primary progressive courses. The pathogenesis of MS is a complicated process, involving the disruption of the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers, secondary hyperplasia of the astroglia, inflammation, and neurodegeneration in a broad sense, among others. The inflammatory process involving various subpopulations of inflammatory cells plays a major role in the development of the disease, especially in its early stages. Previous studies have indicated that the tumour necrosis factor alpha (TNF- α), a proinflammatory cytokine, is particularly involved in the process. **Aim of the study:** To assess levels of TNF- α in the plasma of patients suffering from MS both undergoing a relapse and in remission, to correlate its concentration with clinical parameters, and to determine whether TNF- α could potentially serve as a marker of MS progression. The relationship between plasma concentrations of TNF- α and the number of leukocytes and subpopulations was analyzed in an attempt to identify major sources of TNF- α in the plasma in MS patients. **Material and methods:** Thirty-seven MS patients formed study groups (20 in the relapse group, 17 in the remission group). Thirty healthy volunteers formed the control group. Four millilitres of venous blood were collected from each participant. The blood was centrifuged (5000 rpm, 20 min, 23°C) until the plasma layer could be separated and stored at -80°C until the testing. TNF- α concentrations were determined using the ELISA method. **Results and conclusions:** The preliminary results did not show a statistically significant increase in TNF- α levels in the plasma of MS patients, both in the relapse and the remission groups. A positive correlation was found between the clinical severity of MS (measured by the EDSS score) and TNF- α levels in remission and relapse groups. However, it was not statistically significant. In a subgroup of patients in remission with low plasma levels of TNF- α (<1 pg/ml), higher TNF- α concentrations correlated with greater disability (EDSS score). WBC counts were statistically significantly higher in patients undergoing a relapse compared to the joint group of MS patients in relapse and in remission. Preliminary findings of small studies indicate that TNF- α plasma concentrations could potentially reflect the activity of underlying pathological processes in MS. Further studies on larger groups of patients are necessary to confirm the hypothesis as well as in order to correlate TNF- α concentrations in blood and the cerebrospinal fluid.

Key words: multiple sclerosis (MS), central nervous system, inflammation, tumour necrosis factor alpha (TNF- α), ELISA, marker, plasma

ZAPALENIE JAKO INTEGRALNY PROCES WPISANY W PATOFIZJOLOGIĘ STWARDNIENIA ROZSIANEGO

Stwardnienie rozsiane (*sclerosis multiplex*, SM) jest zapalno-demielinizacyjną chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Etiologia tego schorzenia nie została do końca wyjaśniona, jednakże dotychczasowe badania naukowe pozwoliły na dokładniejsze zrozumienie jego patogenezy⁽¹⁾. Wykazano, iż na rozwój SM ma wpływ wiele różnych czynników. Wśród najważniejszych wymienia się: predyspozycję genetyczną, czynniki środowiskowe, infekcje (wirusowe, bakteryjne, pasożytnicze) oraz zjawiska o charakterze autoagresji^(1,2). Choroba rozpoczyna się najczęściej pomiędzy 20. a 40. rokiem życia, choć zdarzają się przypadki zachorowań przed 10. oraz po 50. roku życia. Objawy widoczne

w SM związane są z uszkodzeniem różnych części układu nerwowego. Aby rozpoznać SM, należy wykazać rozszanie w czasie i przestrzeni. W chwili obecnej wyróżnia się cztery podstawowe postacie przebiegu klinicznego SM:

1. postać rzutowo-remisyjna – jest najczęściej występującą postacią SM, dotyczy 80–95% chorych;
2. postać wtórnie postępująca (około 10% przypadków) – charakteryzuje się progresją po okresie rzutowo-remisyjnym;
3. postać rzutowo-progresywna – charakteryzuje się progresją od początku choroby i wyraźnie widocznymi rzutami; co ważne, okresy pomiędzy nimi cechują się progresją objawów⁽³⁾;
4. postać pierwotnie postępująca – charakteryzuje się ciągłym i powolnym narastaniem zaburzeń neurologicznych od początku choroby, bez wyróżniania rzutów⁽³⁾.

Badania naukowe wykazują, iż do rozwoju SM dochodzi w sytuacji, gdy zaburzona zostanie kontrola oraz równowaga adaptacyjna odpowiedzi immunologicznej⁽⁴⁾. Nieprawidłowa aktywacja układu immunologicznego prowadzi do przenikania limfocytów T (CD4+, CD8+), B oraz makrofagów przez uszkodzoną barierę krew–mózg (*blood–brain barrier*, BBB) i jednoczesnego tworzenia charakterystycznych ognisk zapalnych w OUN⁽⁴⁾. Szczególną uwagę zwrócono tutaj na udział m.in. komórek B⁽⁵⁾, wytwarzających przeciwciała (takie jak cytokiny oraz chemokiny) czy komórki prezentujące antygen, co z kolei prowadzi do silnej aktywacji komórek T⁽⁴⁾. Na skutek tej aktywacji dochodzi do stymulacji limfocytów pomocniczych typu 1 (Th1), uwalniających prozapalne cytokiny, takie jak TNF- α , IL-6, INF- γ , które z kolei uruchamiają kaskadę reakcji zapalnej^(6,7).

U osób z SM zostaje zaburzona równowaga pomiędzy aktywnością limfocytów subpopulacji Th1 a Th2. W obrębie ognisk demielinizacyjnych poza cytokinami prozapalnymi obecne są także te o właściwościach antyzapalnych. Uwalniane są przez limfocyty Th2: IL-4, IL-10⁽¹⁾. Badania naukowe wykazały, że aktywne limfocyty T mogą uszkadzać również w sposób bezpośredni. Kluczową rolę w reakcji zapalnej odgrywają ponadto makrofagi oraz monocyty, które produkują nadmierne ilości toksycznych mediatorów oraz wolne rodniki⁽⁸⁾. Różnie wyrażony proces zapalny obserwowany jest we wszystkich etapach SM – od wczesnego po fazę przewlekłą. Co ważne, proces zapalny przebiega z defektem jego samoograniczenia oraz wygaszania^(9,10).

Na obraz SM składa się wiele procesów, takich jak demielinizacja, utrata oligodendrocytów czy uszkodzenie aksonów i neuronów. Prawdopodobnie wszystkie te zmiany zachodzą na podłożu zapalnym, w którym znaczącą rolę odgrywają limfocyty T, B, makrofagi oraz komórki mikrogleju. Szczególną rolę w toczącej się reakcji zapalnej u pacjentów z SM odgrywa czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α). Zaliczany jest on do cytokin, co wskazuje na jego udział w różnego rodzaju reakcjach zapalnych oraz immunologicznych organizmu. Znany jest od ponad 100 lat i działa przez specyficzne dla siebie receptory⁽¹¹⁾. Odpowiada za inicjację wielu reakcji, które w efekcie mogą prowadzić do ostrej bądź trwającej przewlekle reakcji zapalnej. Geny dla TNF obecne są na chromosomie 6p21.3 wśród genów głównego układu zgodności tkankowej (MHC)⁽¹²⁾. Badania naukowe wykazały, iż stymulowane limfocyty Th1 w SM uwalniają m.in. TNF- α ^(7,12). Wśród cytokin prozapalnych TNF- α odgrywa dominującą rolę, a co ważne, działa na wielu poziomach regulacji immunologicznej^(13,14). U chorych z SM stężenie TNF- α w płynie mózgowo-rdzeniowym koreluje z ciężkością choroby⁽¹⁵⁾. Brak jest badań u pacjentów SM, które potwierdziłyby ten stan w osoczu. Wykazano także, iż czynnik ten wpływa na indukcję ekspresji iNOS (indukowalna syntaza tlenu azotu, NOS), w astrocytach oraz w mikrogleju⁽¹⁵⁾. Trwają badania nad rolą TNF- α w patogenezie SM i pojawiają się

nowe doniesienia dotyczące jego udziału w tym procesie. Konieczne są również dalsze badania w celu wykazania, czy jego działanie jest korzystne czy niekorzystne z punktu widzenia klinicznego dla przebiegu choroby. Należy też potwierdzić rolę TNF- α jako kluczowego czynnika w procesach zapalnych i demielinizacyjnych.

CEL BADANIA

Zasadniczymi celami badania były:

1. Ocena stężenia TNF- α z osocza pacjentów z SM w okresie rzutu i remisji choroby.
2. Korelacja stężenia TNF- α z osocza pacjentów z SM w okresie rzutu oraz remisji z najistotniejszymi parametrami klinicznymi (takimi jak zaawansowanie choroby oceniane w skali EDSS i liczba dotychczasowych rzutów choroby).
3. W celu poszukiwania najważniejszych producentów TNF- α we krwi chorych z SM analizowano również związek pomiędzy stężeniem TNF- α w osoczu i liczebnością leukocytów oraz ich subpopulacji – neutrofilii, limfocytów oraz monocytów.

MATERIAŁ I METODYKA

Na udział w badaniu wyraziło zgodę 37 pacjentów z grupy badanej – 20 (55,6%) należało do grupy osób z SM w rzucie (przed leczeniem sterydami), a 17 (44,4%) do grupy pacjentów z SM w remisji klinicznej choroby. Grupy badane (rzut i remisja) nie różniły się istotnie w rozkładzie płci ($p = 0,58$). Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy w liczbie 30 osób, liczba kobiet – $n = 18$ (60%), mężczyzn – $n = 12$ (40%).

U wszystkich osób uczestniczących w badaniu rozpoznano – na podstawie kryteriów McDonald'a z 2005 roku⁽¹⁶⁾ – postać rzutowo-remisyjną SM. Podstawowym warunkiem uczestnictwa w badaniu było pisemne wyrażenie świadomej zgody przez pacjentów oraz ochotników (osoby zdrowe) po wcześniejszym zapoznaniu się z informacją. Po jej uzyskaniu przeprowadzono badanie podmiotowe. Od pacjentów jednorazowo pobrano krew żylną w ilości 4 ml do odpowiednich probówek (EDTA). Krew wirowano (5000 rpm, 20 min, 23°C), a następnie ostrożnie usuwano górną warstwę z osoczem. Zabezpieczony materiał przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonywania oznaczeń.

OZNACZANIE POZIOMÓW TNF- α W OSOCZU METODĄ IMMUNOENZYMATYCZNĄ (ELISA)

Do oznaczenia poziomu TNF- α w osoczu wykorzystano metodę immunoenzymatyczną ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Analizy przeprowadzono z użyciem komercyjnie dostępnych testów Quantikine (R&D Systems, MN, USA; nr kat DTA00C), zgodnie z zaleceniami producenta.

Na 96-dółkowej płytce opłaszczanej odpowiednimi mysimi przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko ludzkiemu TNF- α umieszczano standardy i badane próbki osocza ludzkiego i przeprowadzono oznaczenie. Absorbancję mierzono przy użyciu wielofunkcyjnego czytnika mikropłytek VICTOR™ X4 firmy PerkinElmer (USA). Każdą próbkę analizowano dwukrotnie. Stężenie TNF- α w badanej próbce określano na podstawie utworzonej krzywej wzorcowej, z wykorzystaniem oprogramowania WorkOut 2.5, stosując czteroparametrowy nieliniowy model regresji (4PL).

ANALIZA STATYSTYCZNA

Normalność rozkładu zweryfikowano za pomocą testu *W* Shapiro–Wilka. Różnice międzygrupowe analizowano za pomocą testu *U* Manna–Whitneya (w przypadku większej liczby grup stosowano nieparametryczny test ANOVA Kruskala–Wallisa). W celu oceny korelacji pomiędzy zmiennymi wykorzystano korelację rang Spearmana. Za istotnie statystycznie przyjęto różnice dla wartości statystyki $p < 0,05$.

WYNIKI

POZIOM TNF- α W BADANYCH GRUPACH

W grupie badanej chorych z SM w rzucie wykrywalną obecność TNF- α stwierdzono w osoczu 11 chorych z ogólnej liczby 20 (55%), a w grupie chorych z remisją SM – u 7 pacjentów z ogólnej liczby 17 chorych (42%). W grupie kontrolnej zdrowych ochotników TNF- α oznaczono w osoczu 16 z ogólnej liczby 30 osób (53,3%). U pozostałych pacjentów stężenie TNF- α było poniżej minimalnego progu detekcji zestawu przeznaczzonego do oznaczenia. Mediany stężeń TNF- α w osoczu pacjentów z SM w rzucie oraz w remisji, a także ochotników z grupy kontrolnej wynosiły odpowiednio 0,61 pg/ml, 0,52 pg/ml oraz 0,97 pg/ml i nie różniły się istotnie pomiędzy sobą (rys. 1).

Zaobserwowano znaczne różnice liczebności pacjentów w rzucie oraz w remisji SM dotyczące liczby chorych z wysokimi (> 1 pg/ml) i niskimi (< 1 pg/ml) poziomami TNF- α w osoczu krwi. W grupie pacjentów z rzutem SM wartości TNF- α > 1 pg/ml obserwowano u 5 osób z ogólnej liczby 11 chorych (45%), u których oznaczono stężenie TNF- α . Z kolei w grupie chorych z remisją SM tylko u jednego z 7 chorych (14%) poziom TNF- α przekraczał 1 pg/ml. W grupie kontrolnej poziomy TNF- α > 1 pg/ml stwierdzono u 8 osób z ogólnej liczby 16 (50%), u których dokonano oznaczeń. Choć różnice te nie są istotne statystycznie, warto zauważyć, że pomimo małej liczebności grup w przypadku pacjentów w remisji zaobserwowano niższy odsetek pacjentów z poziomem TNF- α > 1 pg/ml.

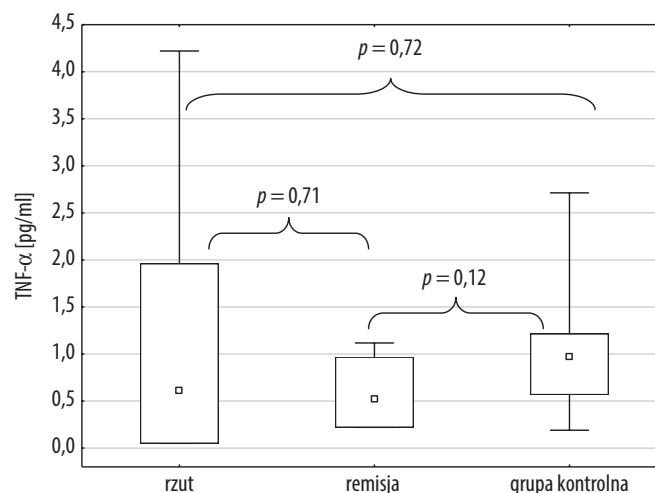
TNF- α A ZAAWANSOWANIE CHOROBY OCENIANE W SKALI EDSS

Zaawansowanie choroby oceniane w skali EDSS nie było powiązane istotną statystycznie korelacją z wartościami TNF- α w osoczu pacjentów w grupie z rzutem ($r = 0,16$, $p = 0,64$). Wyniki zobrazowano na rys. 2 A.

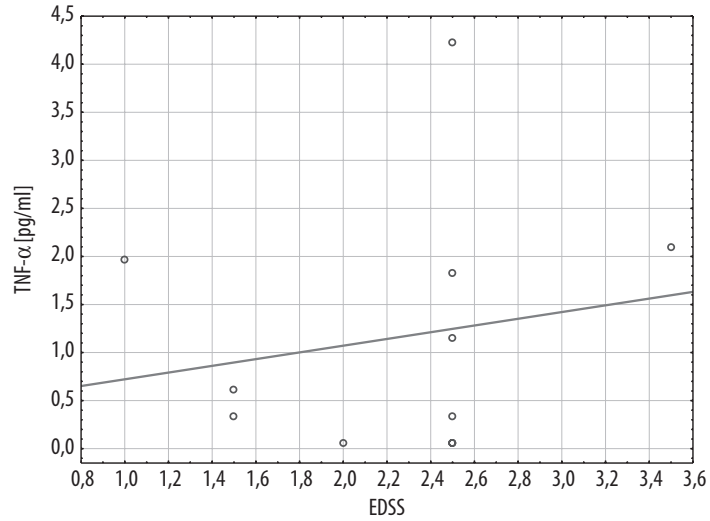
W grupie pacjentów z SM w remisji sytuacja była podobna ($r = 0,74$, $p = 0,056$). Warto jednak zwrócić uwagę na tendencję do współistnienia wyższych wyników w skali EDSS z wyższymi poziomami TNF- α w osoczu obserwowaną w grupie z remisją (rys. 2 B).

Analiza korelacji stężenia TNF- α w osoczu z zaawansowaniem choroby, ocenianym w skali EDSS, chorych z SM w rzucie oraz w remisji (łącznie), ocenianej w skali EDSS w momencie zakwalifikowania do badania, wykazywała dodatnią liniową korelację, która jednak nie była istotna statystycznie (korelacja rang Spearmana; $r = 0,25$, $p = 0,32$). Dane zobrazowano na rys. 2 C.

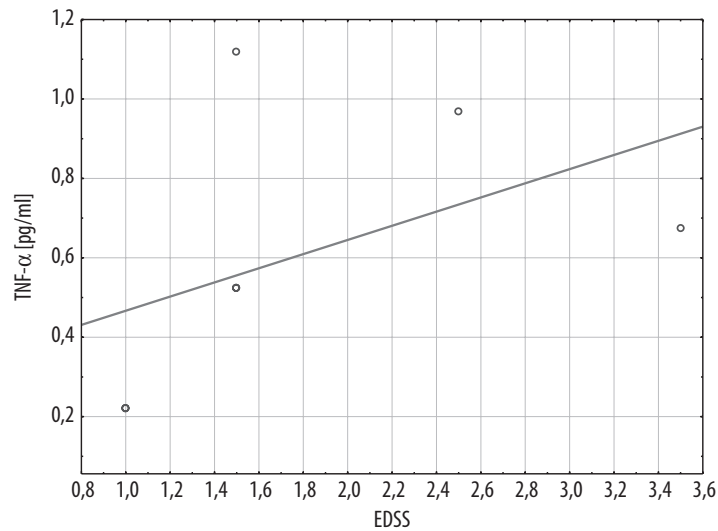
W podgrupie pacjentów z remisją SM posiadających niskie poziomy TNF- α w osoczu (< 1 pg/ml) zaobserwowano wyższe poziomy TNF- α niż u osób z większym zaawansowaniem choroby (mierzonym skalą EDSS).



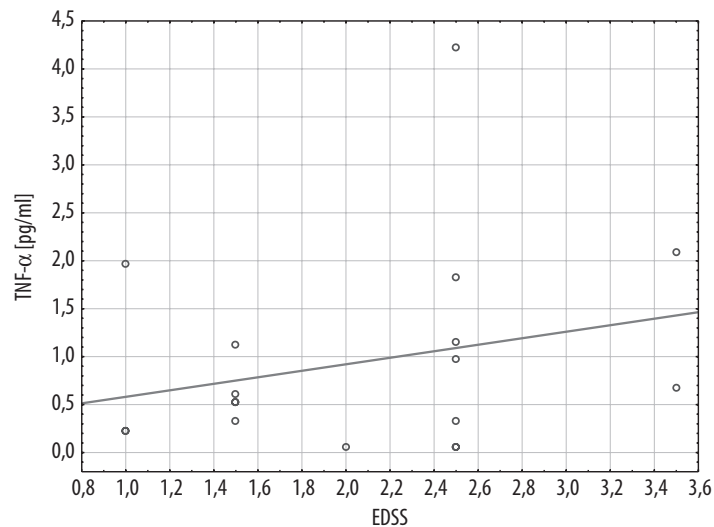
Rys. 1. Wykres obrazujący różnice w stężeniu TNF- α pomiędzy badanymi grupami



Ryc. 2 A. Wykres rozrzutu przedstawiający zależność pomiędzy TNF- α a współczynnikiem EDSS u pacjentów w rzucie



Ryc. 2 B. Wykres rozrzutu przedstawiający zależność pomiędzy TNF- α a współczynnikiem EDSS u pacjentów w remisji



128 Ryc. 2 C. Wykres rozrzutu przedstawiający zależność pomiędzy TNF- α a współczynnikiem EDSS u wszystkich pacjentów z SM

Analiza wykazała dodatnią liniową korelację, która była istotna statystycznie (korelacja rang Spearmana; $r = 0,94$, $p = 0,005$). Dane zobrazowano na rys. 3.

TNF- α A LICZBA RZUTÓW CHOROBY

Przeprowadzono analizę korelacji stężenia TNF- α w osoczu oraz liczby rzutów u chorych z SM. Wymienione powyżej parametry nie były powiązane istotną statystycznie korelacją zarówno w grupie z rzutem ($r = -0,34$, $p = 0,33$), jak i w grupie w remisji ($r = -0,09$, $p = 0,85$). Dane zobrazowano na rys. 4 A oraz 4 B.

Analiza korelacji stężenia TNF- α w osoczu i liczby rzutów u chorych z SM w rzucie oraz w remisji (łącznie) wykazywała ujemną liniową korelację, która jednak nie była istotna statystycznie (korelacja rang Spearmana; $r = -0,05$, $p = 0,84$). Dane zobrazowano na rys. 4 C.

KORELACJA POZIOMU TNF- α Z LICZBĄ LEUKOCYTÓW ORAZ LICZEBNOŚCIĄ ICH SUBPOPULACJI

Aby ustalić najważniejszych producentów TNF- α we krwi chorych z SM, analizowano związek pomiędzy stężeniem TNF- α w osoczu a liczebnością leukocytów oraz ich subpopulacji – neutrofilii, limfocytów oraz monocytów. Analiza, podobnie jak powyższe, została przeprowadzona osobno w obrębie podgrup pacjentów w rzucie oraz w remisji. Średnie wartości opisanych elementów morfotycznych zostały przedstawione w tabeli 1.

Analiza korelacji stężenia TNF- α w osoczu i liczby krwinek białych, neutrofilii, limfocytów oraz monocytów u chorych z SM, ocenianej w momencie zakwalifikowania, nie wykazała istotnych statystycznie zależności. Dokładne wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Uwagę zwraca tendencja ($r = 0,55$, $p = 0,08$) do współwystępowania wyższych wartości liczby leukocytów (WBC) z wyższymi stężeniami TNF- α wśród pacjentów z rzutem SM (rys. 5 A).

Zależności takiej nie obserwowano wśród pacjentów z remisją ($r = -0,16$, $p = 0,73$; rys. 5 B).

Analiza korelacji stężenia TNF- α z liczbą WBC u pacjentów w rzucie i remisji (razem) wykazała dodatnią liniową korelację, która jednak nie była istotna statystycznie (korelacja rang Spearmana; $r = 0,39$, $p = 0,11$).

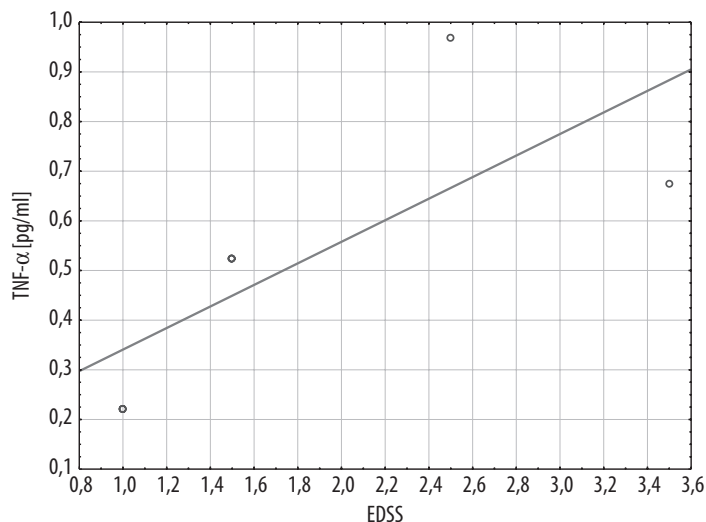
W przypadku pozostałych parametrów morfologicznych nie obserwowano istotnych różnic pomiędzy grupami.

OMÓWIENIE

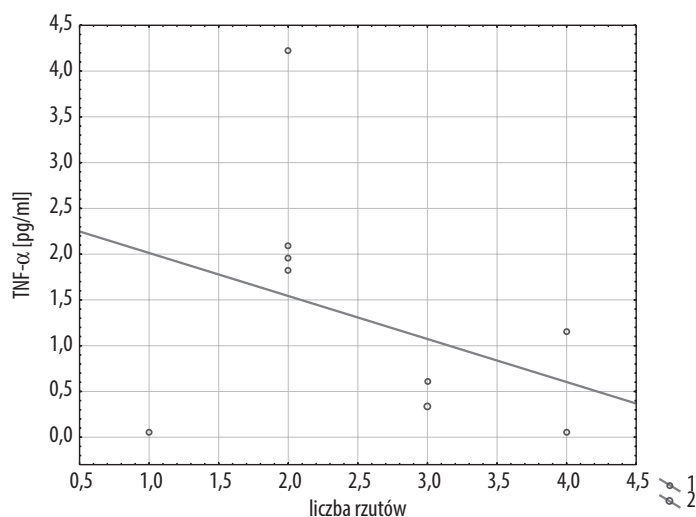
SM to zapalno-demielinizacyjna choroba OUN, na której rozwój wpływa szereg czynników⁽¹⁾. Trwają badania, których celem jest znalezienie biomarkerów aktywacji układu immunologicznego oraz procesu zapalnego w przebiegu SM, występującego nie tylko we wczesnej fazie choroby, ale także w fazie przewlekłej.

TNF- α traktowany był jako jeden z najważniejszych mediatorów stanu zapalnego w procesie powstawania SM^(13,17,18). Produkowany jest głównie przez komórki żerne (monocyty, makrofagi), także limfocyty T i B, neutrofile, keratynocyty, fibroblasty czy komórki śródbłonka. Wpływa na regulację immunologiczną układowo lub głęboko w obrębie OUN. Główne czynniki przyczyniające się do jego syntezy przez makrofagi to lipopolisacharydy ściany komórkowej bakterii, IFN- γ , IL-1, a także sam TNF- α , który wzmacnia również cytotoksyczność monocytów, makrofagów, eozynofili oraz zwiększa właściwości fagocytarne neutrofilii. Zaliczany jest on do cytokin, które są istotnymi mediatorami reakcji zapalnej⁽¹⁸⁾.

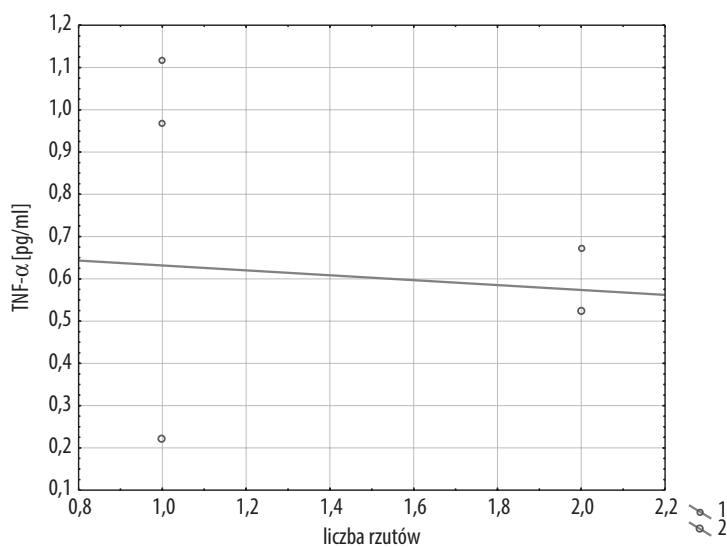
U pacjentów z SM stwierdzono zwiększone stężenie TNF- α w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w surowicy⁽¹⁹⁾.



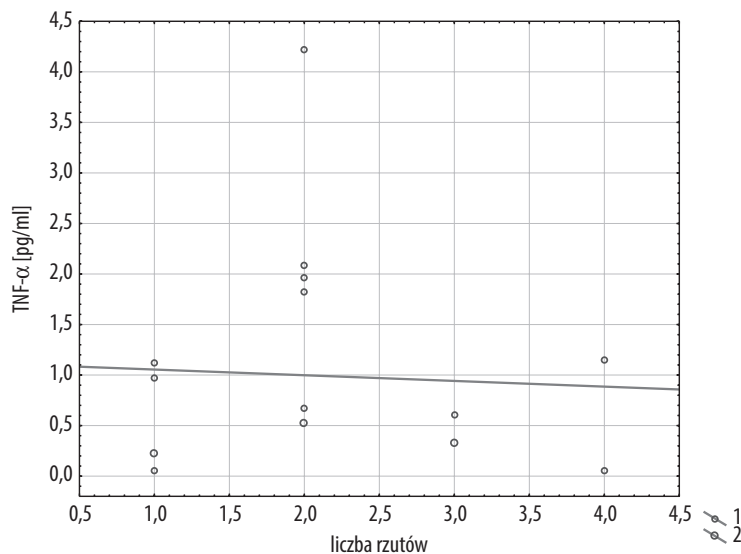
Rys. 3. Analiza korelacji stężenia TNF- α (dla pacjentów, u których stężenie wynosiło <1 pg/ml) w osoczu a zaawansowaniem SM w remisji ocenianym w skali EDSS



Rys. 4 A. Wykres rozrzutu przedstawiający zależność pomiędzy TNF-α a liczbą dotychczasowych rzutów u pacjentów z SM w rzucie



Rys. 4 B. Wykres rozrzutu przedstawiający zależność pomiędzy TNF-α a liczbą dotychczasowych rzutów u pacjentów w remisji



130 Rys. 4 C. Wykres rozrzutu przedstawiający zależność pomiędzy TNF-α a liczbą dotychczasowych rzutów u wszystkich pacjentów z SM

	WBC (10 ³ /mm ³)	Neutrofile (tys./μl)	Limfocyty (tys./μl)	Monocyty (tys./μl)
Rzut	7,60 ± 2,53	5,03 ± 2,44	2,02 ± 0,79	0,42 ± 0,14
Remisja	5,65 ± 1,26	3,45 ± 1,17	1,58 ± 0,42	0,38 ± 0,16
Rzut + remisja	6,71 ± 2,24	4,31 ± 2,09	1,82 ± 0,67	0,40 ± 0,15

Tabela 1. Średnie liczebności leukocytów oraz ich subpopulacji u pacjentów w grupach badanych

Wykazano także, iż koreluje ono z ciężkością choroby^(19,20). W badaniach na modelu doświadczalnym EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*) także odnotowano zwiększone stężenie TNF-α w korze mózgowej w momencie zaostrenia objawów choroby^(21,22). Obserwowano również, że stężenie TNF-α w limfocytach krwi obwodowej wzrastało podczas rzutu SM⁽²²⁾. Zasadne jest sprawdzenie, czy stężenie TNF-α w osoczu może być markerem aktywności choroby. Mediana stężenia TNF-α w osoczu u 11 pacjentów z SM w rzucie wyniosła 0,61 pg/ml, przy czym u pozostałych 9 pacjentów stężenie TNF-α w osoczu było poniżej minimalnego progu detekcji zestawu użytego do przeprowadzenia oznaczenia. U 7 pacjentów w remisji mediana wyniosła 0,52 pg/ml, przy czym u 10 pacjentów była poniżej poziomu detekcji, a u 16 zdrowych ochotników (kontrola) – 0,97 pg/ml, przy czym u 14 była poniżej poziomu detekcji. W niniejszym badaniu nie wykazano istotnego wzrostu stężenia TNF-α w osoczu pacjentów zarówno w rzucie, jak i w remisji SM, co może być związane z faktem, iż stężenie TNF-α w osoczu nie odzwierciedla toczącego się stanu zapalnego w OUN. Kolejną znaczącą kwestią może być fakt, iż ogólnie niski poziom ekspresji TNF-α u pacjentów z analizowanych grup może odzwierciedlać krótki okres półtrwania mRNA TNF-α w osoczu oraz brak czynników, które regulują stabilność mRNA dla TNF-α^(18,23). Zaawansowanie choroby, oceniane w skali EDSS, osób z SM wykazało nieistotną statystycznie dodatnią korelację ze stężeniem TNF-α w osoczu pacjentów zarówno w grupie z rzutem, jak i w grupie w remisji. Warto jednak zwrócić uwagę na tendencję do współistnienia wyższych wyników w skali EDSS z wyższymi poziomami TNF-α w osoczu obserwowaną w grupie z remisją. Zauważona zależność była bardzo bliska progu istotności statystycznej ($p = 0,056$), jednakże ze względu na niewielką liczebność obserwowanej grupy trudno formułować dalej idące wnioski. Taki wynik z pewnością skłania nas do kolejnych badań na większych kohortach pacjentów. Analiza korelacji stężenia TNF-α w osoczu z zaawansowaniem choroby, ocenianym w skali EDSS, chorych z SM w rzucie oraz w remisji (łącznie), ocenianej w skali EDSS w momencie zakwalifikowania do badania, wykazywała dodatnią liniową korelację, która jednak nie była istotna statystycznie.

W podgrupie pacjentów z remisją SM posiadających niskie poziomy TNF-α w osoczu (<1 pg/ml) zaobserwowano wyższe poziomy TNF-α u osób z większym zaawansowaniem choroby (mierzonym skalą EDSS).

Przeprowadzono także analizę korelacji stężenia TNF-α w osoczu z liczbą przebytych rzutów u chorych z SM.

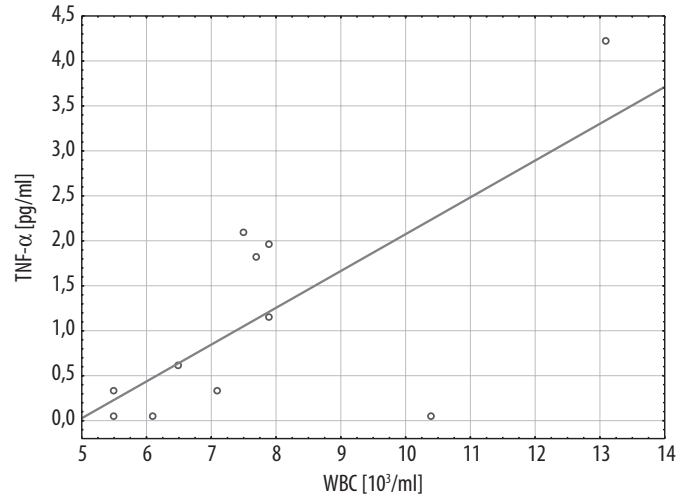
Wymienione powyżej parametry nie były powiązane istotną statystycznie korelacją zarówno w grupie z rzutem, jak i w grupie w remisji.

W celu znalezienia przyczyny zmian poziomu TNF-α w osoczu chorych z SM w prezentowanym badaniu analizowano również korelację stężenia tej cytokiny z liczebnością leukocytów oraz ich subpopulacji we krwi obwodowej pacjentów z SM. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zależności, jednak uwagę zwraca tendencja ($p = 0,08$) do współwystępowania wyższych liczebności leukocytów z wyższymi stężeniami TNF-α w osoczu wśród pacjentów z rzutem SM. Może to potwierdzać hipotezę, że głównym producentem TNF-α we krwi obwodowej chorych z SM są właśnie leukocyty. Wiadomo bowiem, iż TNF-α indukuje ekspresję cząsteczek adhezyjnych oraz różnych chemokina, które odgrywają kluczową rolę w gromadzeniu się leukocytów w miejscu zapalenia^(12,24). Porównanie liczby WBC u pacjentów z SM w rzucie oraz w remisji (razem) wykazało istotnie ($p = 0,01$) wyższe liczebności leukocytów we krwi pacjentów w rzucie.

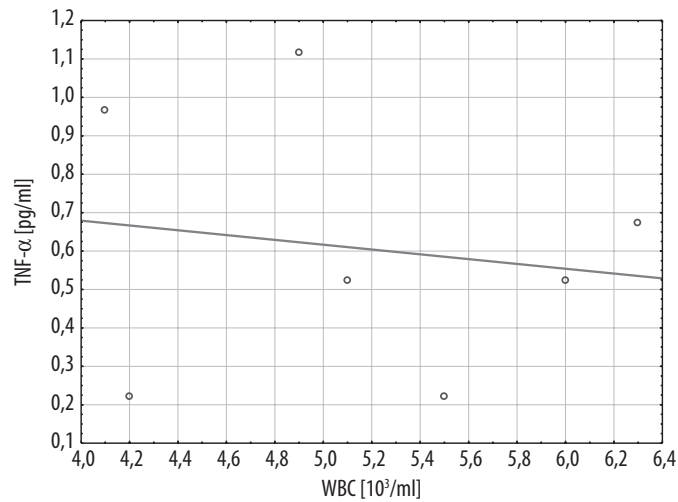
Z kolei porównanie liczby neutrofilii u pacjentów z SM w rzucie oraz w remisji wykazało silną tendencję ($p = 0,06$) wskazującą na wyższe wartości neutrofilii we krwi pacjentów w rzucie. Liczne badania wykazały, iż neutrofile w istotny sposób wpływają na odpowiedź immunologiczną i proces zapalny u pacjentów z SM. Komórki te prowokują zwiększoną produkcję cytokin prozapalnych

	Współczynnik korelacji	p
Pacjenci w rzucie		
WBC	0,55	0,08
Neutrofile	0,37	0,26
Limfocyty	-0,39	0,23
Monocyty	-0,12	0,73
Pacjenci w remisji		
WBC	-0,16	0,73
Neutrofile	0,13	0,79
Limfocyty	-0,30	0,51
Monocyty	-0,40	0,37
Pacjenci rzut + remisja		
WBC	0,38	0,13
Neutrofile	0,23	0,38
Limfocyty	-0,31	0,23
Monocyty	-0,21	0,41

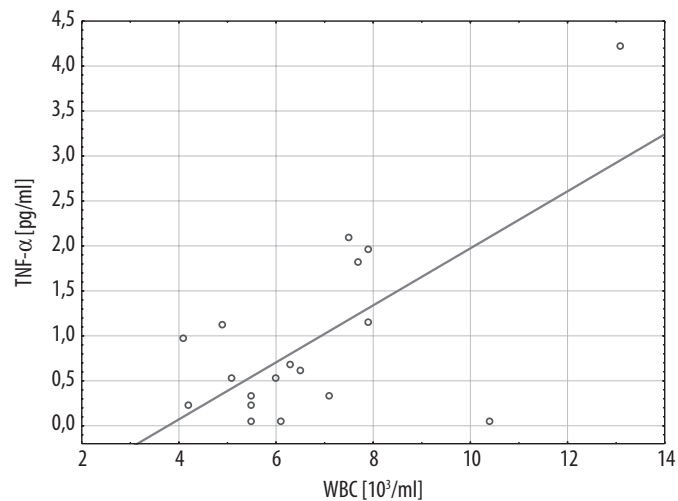
Tabela 2. Wyniki analizy korelacji pomiędzy liczbą leukocytów oraz liczebnością ich subpopulacji u pacjentów z badanych grup a stężeniem TNF-α w osoczu



Rys. 5 A. Wykres rozrzutu przedstawiający zależność pomiędzy TNF- α a liczbą wszystkich leukocytów (WBC) u pacjentów w rzucie



Rys. 5 B. Wykres rozrzutu przedstawiający zależność pomiędzy TNF- α a liczbą wszystkich leukocytów (WBC) pacjentów z SM w remisji



132 Rys. 5 C. Wykres rozrzutu przedstawiający zależność pomiędzy TNF- α a liczbą WBC u wszystkich badanych pacjentów z SM

(w tym TNF- α). Badania wykazały, iż u pacjentów z SM w trakcie rzutu liczba neutrofilów była znacznie wyższa niż w remisji oraz grupie zdrowych ochotników. Wskazuje to na silną aktywację neutrofilów w trakcie nawrotu choroby u osób z SM^(12,23,25). Korelacja stężenia TNF- α z liczbą neutrofilów pacjentów z SM w rzucie oraz remisji nie wykazała jednak istotnych statystycznie zależności⁽²⁵⁾. Korelacja stężenia TNF- α z liczbą monocytów pacjentów z SM w rzucie oraz remisji również nie wykazała istotnych statystycznie zależności, podobnie jak w przypadku limfocytów pacjentów z SM w rzucie oraz w remisji.

W piśmiennictwie pojawiły się doniesienia, które podają w wątpliwości kwestie podwyższonego stężenia TNF- α u pacjentów z SM (przed klinicznym nawrotem choroby i po nim)^(26,27). U niektórych pacjentów w przypadku braku klinicznego nawrotu choroby poziom TNF- α był także na wyższym poziomie⁽²⁸⁾. Wykazano to również w niniejszym badaniu, nie stwierdzono bowiem istotnych statystycznie różnic w poziomie osocznego TNF- α pomiędzy grupami pacjentów w rzucie i remisji choroby. Obserwacje te przyczyniły się do wysunięcia hipotezy, że inne czynniki o działaniu „stresującym” mogą być przyczyną takich „fałszywie dodatnich wyników”. W przypadku nawrotów choroby bądź nasilenia objawów, którym towarzyszą silne sytuacje stresujące, stężenie TNF- α może być zmienne^(23,28). Aby ustalić stężenie TNF- α we krwi chorych jako potencjalny marker aktywności procesów patologicznych w SM, niezbędne są dalsze badania na większej grupie pacjentów, z uwzględnieniem różnych postaci klinicznych choroby oraz analizy innych parametrów aktywności choroby, m.in. radiologicznych. Niezbędna jest również ocena korelacji stężenia TNF- α we krwi z jego stężeniem w płynie mózgowo-rdzeniowym.

PIŚMIENNICTWO: BIBLIOGRAPHY:

- Lassmann H., Brück W., Lucchinetti C.F.: The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 2007; 17: 210–218.
- Stinissen P., Raus J., Zhang J.: Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. *Crit. Rev. Immunol.* 1997; 17: 33–75.
- Lublin F.D., Reingold S.C.: Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996; 46: 907–911.
- Dalakas M.C.: B cells in the pathophysiology of autoimmune neurological disorders: a credible therapeutic target. *Pharmacol. Ther.* 2006; 112: 57–70.
- Duddy M., Bar-Or A.: B-cells in multiple sclerosis. *Int. MS J.* 2006; 13: 84–90.
- Ando D.G., Clayton J., Kono D. i wsp.: Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cell. Immunol.* 1989; 124: 132–143.
- Selmaj K.W., Raine C.S.: Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann. Neurol.* 1988; 23: 339–346.
- Jack C., Ruffini F., Bar-Or A., Antel J.P.: Microglia and multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 2005; 81: 363–373.
- Martino G., Adorini L., Rieckmann P. i wsp.: Inflammation in multiple sclerosis: the good, the bad, and the complex. *Lancet Neurol.* 2002; 1: 499–509.
- Rejdak K.: Patogeneza stwardnienia rozsianego. *Aktualn. Neurol.* 2009; 9: 86–90.
- Korobowicz A.: Biologia czynnika martwicy nowotworów typu alfa (TNF-alfa). *Pol. Merkur. Lekarski* 2006; 21: 358–361.
- Lubecka-Macura A., Kohut M.: Nadrodzina TNF – mechanizm działania, funkcje biologiczne i możliwości terapeutyczne. *Prz. Gastroenterol.* 2010; 5: 303–309.
- Beck J., Rondot P., Catinot L. i wsp.: Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations? *Acta Neurol. Scand.* 1988; 78: 318–323.
- Benvenuto R., Paroli M., Buttinelli C. i wsp.: Tumour necrosis factor-alpha synthesis by cerebrospinal-fluid-derived T cell clones from patients with multiple sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 1991; 84: 97–102.
- Lubina-Dąbrowska N., Stępień A., Chalimoniuk M.: Aktualny stan badań nad stwardnieniem rozsianym. *Pol. Merkur. Lekarski* 2013; 34: 135–139.
- Polman C.H., Reingold S.C., Edan G. i wsp.: Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann. Neurol.* 2005; 58: 840–846.
- Coclet-Ninin J., Dayer J.M., Burger D.: Interferon-beta not only inhibits interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α but stimulates interleukin-1 receptor antagonist production in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur. Cytokine Netw.* 1997; 8: 345–349.
- Bitsch A., Kuhlmann T., Da Costa C. i wsp.: Tumour necrosis factor alpha mRNA expression in early multiple sclerosis lesions: correlation with demyelinating activity and oligodendrocyte pathology. *Glia* 2000; 29: 366–375.
- Sharief M.K., Hentges R.: Association between tumor necrosis factor- α and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1991; 325: 467–472.
- Selmaj K., Raine C.S., Cross A.H.: Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. *Ann. Neurol.* 1991; 30: 694–700.
- Sharief M.K., McLean B., Thompson E.J.: Elevated serum levels of tumor necrosis factor- α in Guillain-Barré syndrome. *Ann. Neurol.* 1993; 33: 591–596.
- Navikas V., He B., Link J. i wsp.: Augmented expression of tumour necrosis factor- α and lymphotoxin in mononuclear cells in multiple sclerosis and optic neuritis. *Brain* 1996; 119: 213–223.
- Deleault K.M., Skinner S.J., Brooks S.A.: Tristetraprolin regulates TNF TNF- α mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways. *Mol. Immunol.* 2008; 45: 13–24.
- Rieckmann P., Albrecht M., Kitzke B. i wsp.: Tumor necrosis factor- α messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann. Neurol.* 1995; 37: 82–88.
- Ziaber J., Tchórzewski H., Chmielewski H. i wsp.: [TNF-alpha binding ability as a sign of peripheral blood neutrophils pre-activation in the course of multiple sclerosis]. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1999; 33: 789–796.
- Male D., Brostoff J., Roth D.B., Roitt I.: *Immunologia*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2008.
- Chofflon M., Juillard C., Juillard P. i wsp.: Tumor necrosis factor alpha production as a possible predictor of relapse in patients with multiple sclerosis. *Eur. Cytokine Netw.* 1992; 3: 523–531.
- Nisipeanu P., Korczyn A.D.: Psychological stress as risk factor for exacerbations in multiple sclerosis. *Neurology* 1993; 43: 1311–1312.