

Gdański Uniwersytet Medyczny

Rozprawa doktorska

Marcin Stanisławowski

**Wpływ ligandu receptora aktywującego jądrowy czynnik
NF- κ B, osteoprotegeryny i interleukiny 33 na metabolizm
tkanki kostnej w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit**

Promotor: Prof. dr hab. med. Zbigniew Kmiec

Zakład Histologii

Katedra Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Badania finansowane z grantu N402. 121.32/3989 (nr umowy 3989/P01/2007/32)

GDĄŃSK 2012

Wyrażam wdzięczność:

*Promotorowi pracy **Panu Profesorowi dr hab. med. Zbigniewowi Kmiecowi**, kierownikowi Katedry i Zakładu Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za wszechstronną pomoc, cenne wskazówki podczas wykonywania pracy oraz przygotowywania rozprawy;*

***Panu dr hab. Krzysztofowi Sworczakowi, prof. nadzw., Panu prof. dr hab. Marianowi Smoczyńskiemu oraz Panu prof. dr hab. Krzysztofowi Celińskiemu** za pomoc w zebraniu materiału i danych klinicznych;*

***Moim koleżankom i kolegom** z Katedry Histologii za twórczą atmosferę, która ułatwiła realizację tej pracy;*

oraz

***Wszystkim Niewymienionym Osobom**, których wiedza i pomoc przyczyniły się do powstania rozprawy.*

Spis treści

Wykaz skrótów	6
1. Wstęp.....	10
1.1. Epidemiologia i etiologia nieswoistych zapaleń jelit	10
1.2. Obraz kliniczny i histologiczny wrzodziejącego zapalenia jelita grubego	11
1.3. Obraz kliniczny i histologiczny choroby Leśniowskiego-Crohna	13
1.4. Ogólne i miejscowe zaburzenia w równowadze immunologicznej w nieswoistych zapaleniach jelit	15
1.5. Charakterystyka interleukiny 33.....	16
1.5.1 Rola interleukiny 33 w nieswoistych zapaleniach jelit	18
1.6. Charakterystyka oraz funkcja w metabolizmie kostnym i procesach zapalnych ligandu receptora aktywującego jądrowy czynnik NF- κ B (RANKL), receptora aktywującego jądrowy czynnik NF- κ B (RANK) i osteoprotegeryny (OPG)	19
1.6.1. Mechanizm regulacji osteoklastogenezy	19
1.6.2. Receptor aktywujący jądrowy czynnik NF- κ B (RANK)	20
1.6.3. Ligand receptora aktywującego jądrowy czynnik NF- κ B (RANKL)	20
1.6.4. Osteoprotegeryna (OPG).....	21
1.6.5. Nieswoiste zapalenia jelit i inne schorzenia charakteryzujące się brakiem równowagi w systemie RANKL/OPG	24
1.7. Powikłania towarzyszące nieswoistym zapaleniom jelit.....	24
1.8. Czynniki wpływające na obrót kostny w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit	25
2. Cele pracy.....	28
3. Pacjenci i materiały	29
3.1. Badane grupy.....	29
3.2. Materiał do badań.....	29
3.3. Materiały jednorazowego użytku	30
3.4. Odczynniki	30
3.5. Bufory i roztwory	31
3.6. Wzorce molekularne.....	32
3.7. Przeciwciała i zestawy do detekcji białek	32
3.8. Aparatura	32
3.9. Programy komputerowe	33

4. Metody.....	34
4.1. Izolacja całkowitego RNA z biopsji jelita grubego według zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego	34
4.2. Określenie stężenia i czystości oczyszczonego RNA	34
4.3. Odwrotna transkrypcja	35
4.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR)	35
4.5. Określenie stężenia sRANKL, OPG, IL-33 i C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I w surowicy krwi z wykorzystaniem testów immunoenzymatycznych (ELISA).....	37
4.6. Techniki immunohistochemiczne.....	38
4.7. Densytometryczny pomiar gęstości kości	39
4.8. Analiza statystyczna	40
5. Wyniki	41
5.1. Charakterystyka badanych grup	41
5.2. Ekspresja RANKL, OPG i IL-33 w odniesieniu do ekspresji β -aktyny na poziomie mRNA u chorych na ChLC, WZJG oraz w grupie kontrolnej	46
5.2.1. Ocena specyficzności uzyskanych produktów reakcji PCR w czasie rzeczywistym	46
5.2.2. Ocena ekspresji mRNA badanych cytokin pomiędzy grupami chorych na NZJ a grupą kontrolną	51
5.2.3. Ocena ekspresji mRNA badanych cytokin w tkance zmienionej i niezmienionej zapalnie u chorych na NZJ	54
5.3. Stężenie całkowitego sRANKL, OPG, IL-33 i C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I w surowicy krwi chorych na ChLC, WZJG oraz w grupie kontrolnej.....	59
5.4. Lokalizacja ekspresji RANKL, OPG oraz IL-33 na poziomie mikroskopu w skrawkach mrożeniowych u chorych na WZJG oraz w grupie kontrolnej	65
5.4.1. Obecność RANKL w biopsjach chorych na WZJG i w grupie kontrolnej	65
5.4.2. Obecność OPG w biopsjach chorych na WZJG i w grupie kontrolnej	67
5.4.3. Obecność IL-33 w biopsjach chorych na WZJG i w grupie kontrolnej	70
5.5. Kolokalizacja RANKL, OPG, IL-33 i CD3 na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego w skrawkach mrożeniowych u chorych na WZJG.....	73
6. Dyskusja	77

6.1. Ogólny stan zdrowia i ocena gęstości mineralnej kości chorych na nieswoiste zapalenia jelit	78
6.2. Miejscowa ekspresja genu dla RANKL oraz stężenie sRANKL w surowicy krwi chorych na nieswoiste zapalenia jelit oraz w grupie kontrolnej.....	79
6.3. Miejscowa ekspresja genu dla OPG oraz stężenie OPG w surowicy krwi chorych na nieswoiste zapalenia jelit oraz w grupie kontrolnej.....	80
6.4. Miejscowa ekspresja genu dla IL-33 oraz stężenie IL-33 w surowicy krwi chorych na nieswoiste zapalenia jelit oraz w grupie kontrolnej.....	83
6.5. Lokalizacja komórek odpowiedzialnych za ekspresję RANKL, OPG oraz IL-33 u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej	85
6.6. Hipoteza: niezależny od RANKL mechanizm zwiększonego obrotu kostnego u chorych na nieswoiste zapalenia jelit	88
6.7. Podsumowanie.....	89
7. Podsumowanie wyników i wnioski	91
8. Streszczenie	92
9. Bibliografia.....	94
10. Aneks.....	105

Wykaz skrótów

AP-1 - czynnik transkrypcyjny (Activator Protein-1)

APRIL - ligand indukujący proliferację (a proliferation inducing ligand)

BAFF - czynnik aktywujący limfocyty B należący do rodziny białek TNF (B cell Activating Factor belonging to the tumour necrosis Factor family)

bFGF - zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (basic Fibroblast Growth Factor)

BMD - mineralna gęstość kości (Bone Mineral Density)

BMMC - komórki tuczne pochodzące ze szpiku kostnego (Bone Marrow-derived Mast Cells)

BMP - morfogenetyczne białko kości (Bone Morphogenetic Protein)

CARD - domena aktywacji i rekrutacji kaspaz (Caspase Activation Recruitment Domain)

CCL - chemokina zawierająca motyw C-C (Chemokine (C-C motif) Ligand)

CD - antygen różnicowania komórkowego (Cluster of Differentiation)

CDAI - wskaźnik aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna (Crohn's Disease Activity Index)

c-fms - receptor dla M-CSF (receptor for M-CSF)

CFU-GM - jednostka tworząca kolonię granulocytów i makrofagów (Colony Forming Unit-Granulocyte-Macrophage)

ChLC - choroba Leśniowskiego-Crohna (Crohn's Disease, CD)

CRP - białko C-reaktywne (C Reactive Protein)

CTX - C-terminalny telopeptyd kolagenu typu I (carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen)

DAB - 3,3'-diaminobenzidyna (3,3'-diaminobenzidine)

DAPI - 4',6-diamidyno-2-fenylindol (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DC-LAMP - białko błonowe komórek dendrytycznych związane z lizosomem (Dendritic Cell Lysosome-Associated Membrane Protein)

DPX - Di-n-butylo ftalan w ksylene (Di-n-butyle Phthalate in Xylene)

DXA - absorpcjometria podwójnej energii promieniowania rentgenowskiego (Dual energy X-ray Absorptiometry)

EGF - naskórkowy czynnik wzrostu (Epidermal Growth Factor)

ELISA - test immunoenzymatyczny (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

FDCR-1 - receptor komórki dendrytycznej-1 (Follicular Dendritic Cell-derived Receptor-1)

FGF - czynnik wzrostu fibroblastów (Fibroblast Growth Factor)

FoxP3 - czynnik transkrypcyjny limfocytów T regulatorowych (Forkhead box P3)

GM-CSF - czynnik pobudzający kolonie granulocytów i makrofagów (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor)

HEV - żyłki z wysokim śródbłonkiem (High Endothelial Venules)

HT29 - ludzkie linie komórkowe gruczolakoraka jelita grubego II stopnia (human colon adenocarcinoma grade II cell line)

IFN - interferon (interferon)

IGF - insulinopodobny czynnik wzrostu (Insulin-like Growth Factor)

IgG - immunoglobulina G (Immunoglobulin G)

IL - interleukina (interleukin)

IL-1RL1 - receptor dla IL-1 (IL-1 Receptor Like 1)

iTreg - indukowany na obwodzie limfocyt Treg (induced Treg)

LIF - czynnik hamujący białaczkę (Leukemia Inhibitory Factor)

MAPK - kinazy białkowe aktywowane przez mitogen (Mitogen-Activated Protein Kinases)

MCP - białko chemotaktyczne dla monocytów (Monocyte Chemoattractant Protein)

M-CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (Macrophage Colony-Stimulating Factor)

MIP-1 α - białko zapalne makrofagów-1 α (Macrophage Inflammatory Protein-1 α)

MTWSI - zmodyfikowana skala aktywności Truelove'a i Witts'a (Modified Truelove and Witts Severity Index)

NF-HEV - czynnik jądrowy produkowany przez HEV (Nuclear Factor from HEVs)

NF- κ B - czynnik jądrowy κ B (Nuclear Factor κ B)

NGF - czynnik wzrostu nerwów (Nerve Growth Factor)

NH - komórka NH (Natural Helper cell)

NK - komórka NK (Natural Killer cell)

NKT - limfocyt NKT (Natural Killer T-cell)

NOD - domena wiążąca nukleotydy (Nucleotide-binding Oligomerization Domain)

NS - nieistotne statystycznie (statistically not significant)

nTreg - naturalna komórka Treg (natural Treg)

NZJ - nieswoiste zapalenia jelit (Inflammatory Bowel Diseases, IBD)

OCIF - czynnik hamujący osteoklastogenezę (Osteoclastogenesis Inhibitory Factor)

ODAR - receptor różnicowania i aktywacji osteoklasta (Osteoclast Differentiation and Activation Receptor)

ODF - czynnik różnicowania osteoklastów (Osteoclast Differentiation Factor)

OPG - osteoprotegeryna (osteoprotegerin)

OPGL - ligand osteoprotegeryny (osteoprotegerin ligand)

OSM - onkostatyna M (oncostatin M)

PBS - roztwór buforowany fosforanami (Phosphate Buffered Saline)

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy (Polymerase Chain Reaction)

PDGF - płytkopochodny czynnik wzrostu (Platelet-Derived Growth Factor)

PGD - prostaglandyna D (prostaglandin D)

PGE - prostaglandyna E (prostaglandin E)

PI-3K - kinaza 3 fosfatydyloinozytolu (phosphatidylinositol 3-kinase)

PMCA - ATPazy wapniowe błony komórkowej (Plasma Membrane Calcium ATPases)

PTH - parathormon (parathyroid hormone)

PTHrP - białko PTH-podobne (parathyroid hormone-related protein)

QPCR - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

RANK - receptor aktywujący jądrowy czynnik NF- κ B (Receptor Activator of Nuclear factor NF- κ B)

RANKL - ligand RANK (Receptor Activator of Nuclear factor NF- κ B Ligand)

ROS - reaktywne formy tlenu (Reactive Oxygen Species)

SEMF - podnabłonkowe miofibroblasty (subepithelial myofibroblasts)

SGBS - ludzkie adipocyty linii SGBS (human Simpson-Golabi-Behmel Syndrome adipocyte)

sRANKL - rozpuszczalna postać liganda RANK (soluble RANKL)

ST2 - białko związane z receptorem dla IL-1 (IL-1 receptor-related protein)

TGF - transformujący czynnik wzrostu (Transforming Growth Factor)

Th - limfocyt T pomocniczy (T helper cell)

TNF - czynnik martwicy nowotworu (Tumor Necrosis Factor)

TPO - trombopoetyna (thrombopoietin)

TR-1 - osteoprotegeryna (TNF Receptor-like molecule-1)

TRAF - czynnik związany z receptorem dla TNF (TNF- α Receptor-Associated Factor)

TRANCE - cytokina aktywująca związana z TNF (TNF-related activation-induced cytokine)

TRANCE-R - receptor dla TRANCE (TRANCE-receptor)

TRAP - winianooporna kwaśna fosfataza (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase)

Treg - limfocyt T regulatorowy (regulatory T cell)

TRPV - receptor waniloidowy (Transient Receptor Potential Vanilloid)

TSLP - limfopoetyna zrębu grasicy (Thymic Stromal Lymphopoietin)

VDR - receptor witaminy D (Vitamin D Receptor)

VEGF - czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (Vascular Endothelial Growth Factor)

VIP - naczynioaktywny peptyd jelitowy (Vasoactive Intestinal Peptide)

WHO - Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization)

WZJG - wrzodziejące zapalenie jelita grubego (Ulcerative Colitis, UC)

1. Wstęp

1.1. Epidemiologia i etiologia nieswoistych zapaleń jelit

Nieswoiste zapalenia jelit (NZJ) są przewlekłymi schorzeniami z okresami remisji, mającymi swoje źródło zarówno w uwarunkowaniach genetycznych, jak i środowiskowych oraz w lokalnych zaburzeniach układu odpornościowego. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu miejscowej odpowiedzi immunologicznej mogą wynikać z rozpoznawania prawidłowej flory bakteryjnej jako potencjalnych patogenów. Innymi istotnymi elementami sprzyjającymi rozwojowi NZJ są infekcje bakteryjne negatywnie wpływające na jelitową równowagę immunologiczną. W NZJ wyróżniamy m.in. dwie główne jednostki chorobowe: wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG, łac. colitis ulcerosa, CU) i chorobę Leśniowskiego-Crohna (ChLC, łac. morbus Leśniowski-Crohn, ang. Crohn's Disease, CD) [29, 34, 50, 67, 100, 128]. Ze względu na dość rzadkie występowanie mikroskopowych zapaleń jelita grubego, ich szczegółowa charakterystyka zostanie pominięta w niniejszej rozprawie. Należy jedynie zaznaczyć, że jest to zespół nieinfekcyjnych postaci zapaleń, do którego zalicza się zapalenia kolagenowe i limfocytowe, a ich charakterystyka opiera się na braku widocznych zmian w obrazie makroskopowym [50, 128].

Zasięg NZJ najczęściej obejmuje obszar Europy i Ameryki Północnej, zaś szczyt zachorowania przypada między 15 i 30 oraz 60 i 80 rokiem życia. Stosunek mężczyzn do kobiet z WZJG i ChLC, wynosi odpowiednio 1:1 oraz 1,1-1,8:1. Ponadto, obserwuje się większą zapadalność wśród osób z wyższej klasy socjoekonomicznej oraz w populacji żydowskiej ze Stanów Zjednoczonych, Europy i Afryki Południowej. Poziom ryzyka zachorowania spada u nieżydowskiej rasy kaukaskiej, Afroamerykanów, Hiszpanów i Azjatów. Palenie papierosów, jak również usunięcie wyrostka robaczkowego mogą chronić przed rozwojem WZJG. Z kolei występowaniu ChLC sprzyjają: palenie tytoniu, appendektomia oraz antykoncepcja doustna [29, 34, 50, 103]. Ponadto, zaawansowanie NZJ dodatnio koreluje z zaburzeniami stanu psychicznego, wynikającymi z długotrwałego stresu [29, 65].

Chociaż tło genetyczne NZJ jest częściowo poznane, wydaje się, że ważną rolę w patomechanizmie ChLC odgrywają mutacje występujące w obrębie genu CARD15/NOD2 na chromosomie 16 [7, 29, 33, 59] lub zmiany w genie receptora dla IL-23 na chromosomie 1 [29, 135]. Do innych mutacji towarzyszącym NZJ dochodzi na chromosomach: 2, 3, 5, 6, 10, 12, 14 i 19 [1, 29, 135].

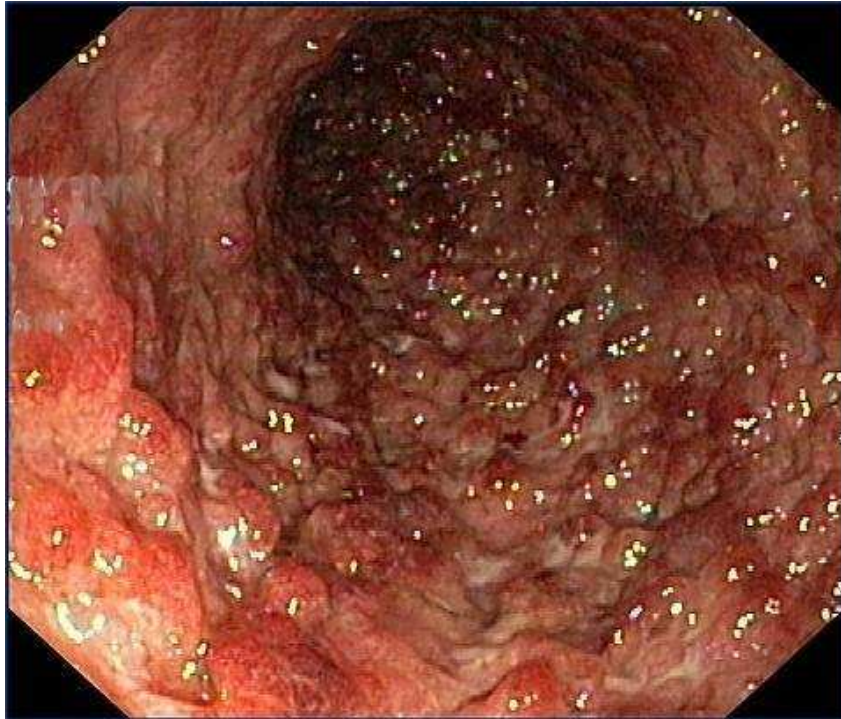
Infekcje wywoływane m.in. przez *Escherichia*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Shigella* mogą być katalizatorem przewlekłego stanu zapalnego u osób z NZJ. W normalnej sytuacji procesy zapalne po wygaśnięciu zakażenia ulegają wyhamowaniu i następuje stabilizacja aktywności komórek układu odpornościowego. W przypadku NZJ obserwuje się zjawisko sprzężenia zwrotnego dodatniego, gdzie początkowy proces zapalny uruchamia kaskadę sygnałów prowadzących do przewlekłego zapalenia jelit [29, 50, 66].

1.2. Obraz kliniczny i histologiczny wrzodziejącego zapalenia jelita grubego

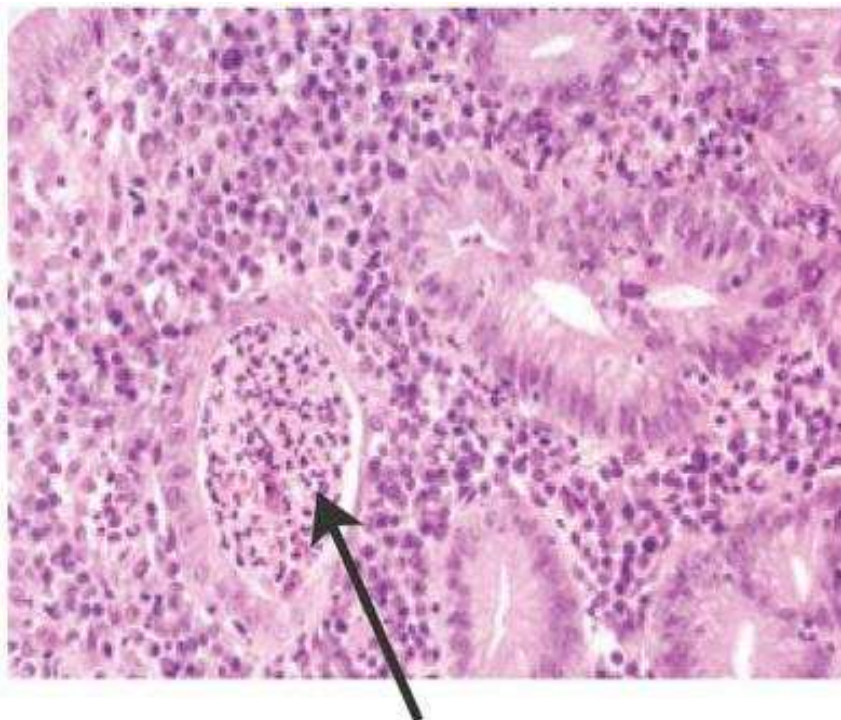
Do najważniejszych objawów obecnych we WZJG należą: bóle brzucha, krwawe biegunki, tachykardia, gorączka, spadek masy ciała. Ogólny wywiad pacjenta biorący pod uwagę wymienione symptomy, które składają się na 21-punktową skalę MTWSI (ang. Modified Truelove and Witts Severity Index) pozwala wstępnie ustalić stopień zaawansowania choroby. Punktacja powyżej 12 oznacza ciężką postać WZJG, zaś w stanie remisji waha się od 0 do 4 punktów. Wartości w granicach od 4 do 12 punktów świadczą o umiarkowanie aktywnej fazie choroby [29, 50, 136]. Badanie krwi oraz ocena histopatologiczna pozwalają ostatecznie potwierdzić diagnozę. I tak, w fazie progresji WZJG stwierdza się podwyższony poziom białka C-reaktywnego (CRP), wzrost ilości płytek krwi oraz obniżone stężenie hemoglobiny [29, 50].

Zmiany chorobowe biorą swój początek w odbytnicy i postępują proksymalnie aż do zajęcia odcinka lub całego jelita grubego. Najczęściej stan zapalny ogranicza się do odbytnicy i kolejnych fragmentów śluzówki. Natomiast u ok. 20% pacjentów stan zapalny obejmuje całe jelito grube [17, 29, 128]. Wygląd błony śluzowej zmienia się od silnie unaczynionej, chropowatej powierzchni do owrzodzonej, krwawiącej przy kontakcie z endoskopem z często występującymi pseudopolipami [29, 50, ryc. 1].

Stan zapalny zlokalizowany jest w błonie śluzowej, której cechą charakterystyczną jest degradacja krypt oraz ich zmniejszona liczba w porównaniu do tkanki niezmięnionej. Obserwuje się także brak ciągłości nabłonka w miejscach owrzodzeń. Ponadto, w blaszce właściwej występują liczne nacieki komórek jednojądrzastych, spada liczba komórek kubkowych, zaś w świetle krypt pojawiają się ropnie [29, 50, 128, 135, ryc. 2].



Ryc. 1. Kolonoskopowy obraz jelita grubego (okreźnica) pacjenta z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Zdjęcie przedstawia liczne owrzodzenia i polipy w obrębie błony śluzowej [www.kolumbus.fi/hans/gastrolab/e020.htm].



Ryc. 2. Wrzodziejące zapalenie jelita grubego obejmujące błonę śluzową określony z licznymi naciekami komórek jednojądrzastych w obrębie blaszki właściwej oraz zmianą architektury krypt. Strzałka wskazuje ropień widoczny w świetle krypty [135].

1.3. Obraz kliniczny i histologiczny choroby Leśniowskiego-Crohna

Do określenia aktywności ChLC stosuje się 600-punktową skalę CDAI (ang. Crohn's Disease Activity Index). Indeks uwzględnia m.in. liczbę płynnych wypróżnień, bóle brzucha, gorączkę, obecność przetok w obrębie jelit. Za zdrowe przyjmuje się osoby z punktacją od 0 do 150; powyżej, z wartościami od 150 do 220 znajdują się pacjenci z łagodną postacią choroby. Wynik przekraczający 220, ale nie większy niż 450 to średnio aktywna faza, zaś ocena powyżej 450 punktów oznacza bardzo zaawansowaną ChLC [114]. Wysoki poziom CRP, niedokrwistość, leukocytoza oraz hipoalbuminemia to również parametry opisujące stopień aktywności choroby [28, 29].

W przypadku gdy zmiany zapalne występują w jelicie krętym i okrężnicy dominującym objawem jest ból w prawym dole biodrowym, któremu towarzyszy biegunka. Do powikłań pojawiających się w ciężkim stanie zapalnym zaliczamy: perforacje i powstawanie przetok do pozostałych fragmentów jelit, żołądka, pęcherza moczowego lub pochwy. Częstość występowania przetok u osób z ChLC waha się od 30 do 40% [29, 50, 128].

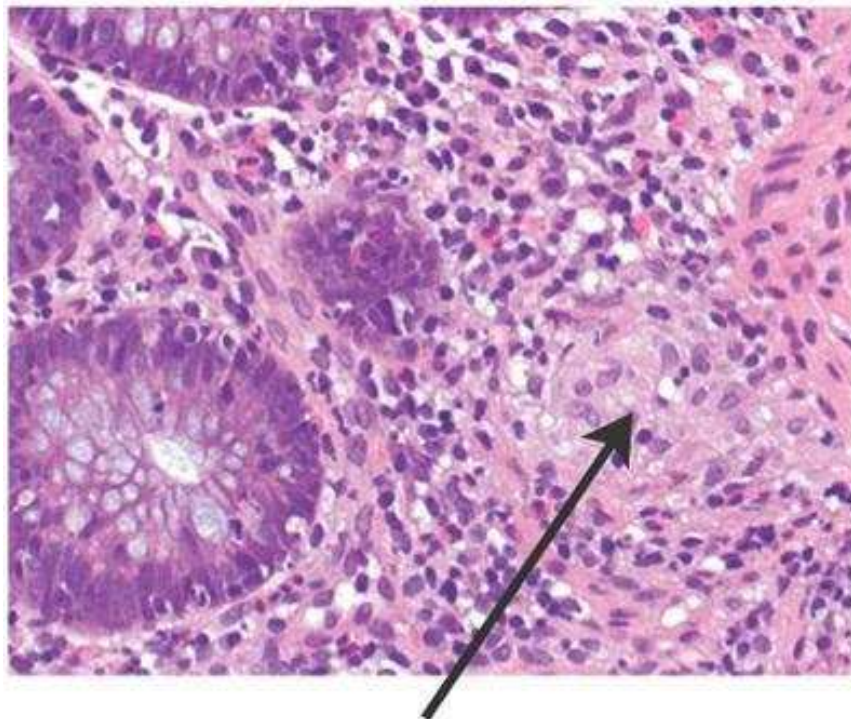
Degradacja ściany jelita cienkiego na skutek długotrwałych i znacznych przekształceń chorobowych prowadzi do ubytku powierzchni wchłaniania. Następstwem tego są: spadek masy ciała, hipokalcemia, odwodnienie, niedobór szeregu witamin, białka, magnezu i wielu innych istotnych elementów, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu [29, 50].

W przeciwieństwie do WZJG, które dotyczy tylko jelita grubego, ChLC obejmuje swoim zasięgiem praktycznie cały układ pokarmowy, od jamy ustnej aż do odbytu. Najczęściej zmiany występują w jelicie cienkim i grubym, a tylko u niewielkiego odsetka chorych obserwuje się procesy zapalne w odbytnicy. Następuje ciągła degradacja nie tylko błony śluzowej, jak we WZJG, ale i podśluzowej, zaś pomiędzy owrzodzeniami i pseudopolipami obecne są fragmenty niezmienione zapalnie [17, 29, 50, ryc. 3].

Zmiany patologiczne zlokalizowane są we wszystkich warstwach ściany jelita. Nabłonek błony śluzowej zachowuje ciągłość, nie zmienia się również ilość komórek kubkowych. Pozostałe elementy charakterystyczne dla tej jednostki chorobowej to nacieki jednojądrzastych komórek zapalnych oraz ziarniniaki, stanowiące zgrupowania olbrzymich komórek wielojądrowych typu Langhansa oraz limfocytów [29, 50, 128, 135, ryc. 4].



Ryc. 3. Kolonoskopowy obraz odcinka okrężnicy z rozległymi owrzodzeniami u osoby z chorobą Leśniowskiego-Crohna [29].



Ryc. 4. Zmieniona zapalnie błona śluzowa okrężnicy pacjenta z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Na zdjęciu widoczne są nacieki komórek jednojądrzastych w obrębie blaszki właściwej. Strzałka wskazuje ziarniniaka [135].

1.4. Ogólne i miejscowe zaburzenia w równowadze immunologicznej w nieswoistych zapaleniach jelit

Nabłonek jelita zbudowany jest z enterocytów, komórek kubkowych oraz enteroendokrynowych, limfocytów śródnabłonkowych, komórek pnia (macierzystych) oraz obecnych głównie w jelicie cienkim komórek Panetha i komórek M. Stanowi on pierwszą linię obrony przed patogenami, która może modulować aktywność komórek odpornościowych obecnych w blaszce właściwej błony śluzowej. Przykładowo, komórki nabłonka uwalniając limfopoetynę zrębu grasicy (TSLP) pobudzają limfocyty Th [100].

W prawidłowej błonie śluzowej jelit obserwuje się tzw. zjawisko tolerancji immunologicznej wobec antygenów pokarmowych lub komensalnej flory bakteryjnej. Za odpowiedni poziom reakcji odpornościowej odpowiadają komórki znajdujące się w blaszce właściwej, czyli limfocyty T i B, makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki tuczne, eozynofile, neutrofile oraz komórki NK. U osób z NZJ tolerancja na pewne, słabo jeszcze poznane czynniki środowiskowe jest zaburzona, co prowadzi do rozwoju stanu zapalnego charakteryzującego się skłonnością do remisji i nawrotów. Aktywacja procesów zapalnych może być uwarunkowana genetycznie i wiąże się z nadprodukcją cytokin prozapalnych przez limfocyty T $CD4^+$, które aktywują pozostałe komórki odpornościowe [7, 13, 34, 43, 89, 100, 101, 103, 108].

Istotną rolę w kontrolowaniu stanu zapalnego w błonie śluzowej jelit odgrywają limfocyty T regulatorowe (Treg), które wpływają na reakcje immunologiczne wywoływane przez różnego rodzaju antygeny. Wśród limfocytów Treg wyróżniamy powstające w grasicy, czyli naturalne komórki T (nTreg) oraz indukowane na obwodzie (iTreg), do których zaliczamy limfocyty Th3 i Tr1. Częsteczką powierzchniową występującą we wszystkich typach komórek Treg jest CD4, ale najbardziej charakterystycznym markerem limfocytów Treg jest czynnik transkrypcyjny FoxP3, który nie występuje w subpopulacji komórek Tr1. Działanie immunosupresyjne nTreg oraz iTreg opiera się na uwalnianiu cytokin przeciwzapalnych, czyli TGF- β i IL-10 lub na bezpośrednim kontakcie z komórką docelową. U chorych na NZJ stwierdzono spadek liczby limfocytów Treg $CD4^+FoxP3^+$ we krwi obwodowej, zaś w obrębie zmienionej zapalnie błony śluzowej jelita grubego zaobserwowano wzrost ilości komórek Treg w porównaniu do kontroli. Zjawisko to można tłumaczyć przechodzeniem limfocytów Treg z krwi obwodowej do zmienionych chorobowo miejsc w okresie aktywnej fazy NZJ w celu utrzymania miejscowej homeostazy. Jednym

z czynników blokujących ekspresję FoxP3 podczas przewlekłego stanu zapalnego jelit jest IL-6, która hamuje działanie supresorowe komórek Treg względem limfocytów T. Prowadzi to do zaburzenia kontroli nad prawidłowym funkcjonowaniem tych komórek, czego efektem jest wzmożona aktywacja odpowiedzi typu Th1, Th2 i Th17 [34, 101, 132, 133].

W przebiegu NZJ następuje zakłócenie równowagi pomiędzy limfocytami Th1 i Th17 przeważającymi w ChLC oraz komórkami typu Th2 dominującymi we WZJG [7, 13, 34, 100, 101, 110, 112]. Limfocyty Th1 syntetyzujące: IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, TNF i IFN- γ , biorą udział głównie w odpowiedzi komórkowej, zaś komórki Th2 produkujące: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 i IL-15 - w humoralnej odpowiedzi odpornościowej. Kolejną różnicą pomiędzy tymi jednostkami chorobowymi jest klasa przeciwciał syntetyzowana w błonie śluzowej jelita grubego. I tak, we WZJG produkowane są przede wszystkim IgG₁, zaś w ChLC - IgG₂ [7, 13, 50, 91, 101, 112].

Cytokiny prozapalne takie jak: IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, IL-27, IFN- γ i TNF uwalniane w zdrowej tkance głównie jako odpowiedź na czynniki infekcyjne, u chorych na NZJ wytwarzane są w sposób słabo kontrolowany. Taka sytuacja prowadzi do zachwiania równowagi pomiędzy cytokinami pro- i przeciwzapalnymi, do których zaliczamy IL-10 oraz IL-11 [13, 43, 61, 68, 91, 101].

W wyniku długotrwałych i intensywnych badań nad udziałem cytokin w etiopatogenezie NZJ okazało się, że jednym z głównych czynników patogenetycznych jest TNF. Fakt ten potwierdza skuteczność terapii anty-TNF z wykorzystaniem monoklonalnych przeciwciał, z których najskuteczniejszy wydaje się być infliksimab, stosowany u chorych na NZJ niepoddających się standardowemu leczeniu pochodnymi kwasu 5-aminosalicylowego i glikokortykosteroidami [90]. Zaburzeniom immunologicznym w przebiegu NZJ towarzyszy synteza szeregu innych cytokin o charakterze immunomodulacyjnym, zaś jedną z nowo odkrytych, która może odgrywać istotną rolę w patomechanizmie NZJ jest interleukina 33.

1.5. Charakterystyka interleukiny 33

Interleukina 33 została odkryta w 2005 roku jako cytokina należąca do rodziny IL-1. U ludzi, gen kodujący to białko zbudowane z 270 aminokwasów, zlokalizowany jest na chromosomie 9. Wydzielanie tej interleukiny potwierdzono w osteoblastach, osteocytach, adipocytach, keratynocytach, fibroblastach, komórkach śródbłona, miocytach, komórkach tucznych, astrocytach, makrofagach, limfocytach B, komórkach dendrytycznych, komórkach

nabłonkowych jelit i płuc. Oprócz tego, ekspresję tej cytokiny zanotowano w żołądku, sercu, centralnym układzie nerwowym, śliniankach, wątrobie, węzłach chłonnych, tarczycy i nerkach. Postać nieaktywna IL-33 jest produkowana jako 30 kDa prekursor, który pod wpływem kaspazy-1 ulega przekształceniu do formy dojrzałej o masie 18 kDa [37, 79, 81, 98, 99, 107, 134, 138]. Niektórzy autorzy twierdzą jednak, że to właśnie postać 30 kDa IL-33 jest funkcjonalnym białkiem, zaś kaspaza-1 odpowiada za jej inaktywację. Świadczy o tym fakt, że po połączeniu się postaci 30 kDa IL-33 ze swoistym receptorem dochodzi do jego aktywacji [19, 120].

Receptorem dla IL-33 jest białko ST2/IL-1RL1, występujące jako ST2L (receptor błonowy) oraz sST2 (postać rozpuszczalna). ST2 pojawia się na limfocytach Th2, makrofagach, limfocytach B, komórkach dendrytycznych, bazofilach, osteoblastach, komórkach mikrogleju, astrocytach, komórkach NKT, eozynofilach, komórkach NK, komórkach tucznych oraz komórkach NH (ang. Natural Helper Cells) [20, 21, 25, 48, 64, 75, 79, 80, 81, 138]. Obecność receptora dla IL-33 na powierzchni eozynofili umożliwia IL-33 aktywowanie tych komórek, co wiąże się z uwalnianiem czynników prozapalnych, m.in. IL-8. Dodatkowo IL-33 przedłuża czas przeżycia eozynofili w hodowlach komórkowych [21, 110]. IL-33 stymuluje także sekrecję IL-6 przez mysią linię komórkową mastocytomy (P815) i BMMC oraz IL-1, MCP-1, PGD2 i TNF przez BMMC [75, 110]. Doświadczenia na hodowlach komórek dendrytycznych po stymulacji IL-33 wykazały, że są one w stanie syntetyzować TNF, IL-1, IL-6 i CCL17. Aktywowane w ten sposób komórki dendrytyczne pobudzają limfocyty Th2 do produkcji IL-5 oraz IL-13 [11]. Inne badania dowiodły właściwości chemotaktycznych IL-33, zarówno in vitro, jak i in vivo, względem ludzkich oraz mysich limfocytów Th2 [49].

Jedną z wyjątkowych cech IL-33 jest pełnienie przez nią podwójnej roli: oprócz aktywności prozapalnej jest wewnątrzkomórkowym czynnikiem jądrowym (NF- κ B) posiadającym możliwość regulacji na poziomie transkrypcji i uwalnianym w żyłkach z wysokim śródbłonkiem (HEV) [18].

Układ IL-33/ST2 ma istotne znaczenie w schorzeniach cechujących się przewlekłymi lub nagłymi stanami zapalnymi, takimi jak: NZJ [86], astma, alergię, reumatoidalne zapalenie stawów, zakażenia pasożytnicze, zapalenie wątroby, łuszczyca, rak żołądka czy wstrząs anafilaktyczny [24, 38, 39, 44, 55, 63, 70, 80, 81, 116, 119]. Ponadto IL-33, na co wskazują badania na myszach, obniża ekspresję rezystyny, polipeptydu odpowiedzialnego za rozwój insulinooporności, cukrzycy typu 2 oraz indukującego komórki śródbłonka do

magazynowania lipidów [56]. W odpowiednim stężeniu IL-33 może regulować ilość tkanki tłuszczowej poprzez zmniejszanie rozmiarów adipocytów i obniżenie poziomu cholesterolu we krwi. Wykazano również, że IL-33 indukując odpowiedź typu Th2 i cytokiny związane z tym rodzajem odpowiedzi, czyli IL-4, IL-5 i IL-13, hamuje progresję zmian miażdżycowych [56, 70, 81].

W stanach zapalnych jelit IL-33 jest jedną z dominujących cytokin pobudzających limfocyty Th2, które biorą udział w rozwoju WZJG. Przy czym progresja ChLC, sprzężona z odpowiedzią Th1 i Th17, nie wydaje się być powiązana z aktywnością IL-33 [110].

W doświadczeniach przeprowadzonych na myszach, którym podawano zrekombinowaną IL-33 zaobserwowano splenomegalię oraz zmiany zapalne w obrębie układu oddechowego i pokarmowego. Nacieki eozynofili, neutrofilii i komórek jednojądrzastych pojawiały się m.in. w błonie śluzowej przełyku, zaś w jelicie cienkim i grubym widoczna była hiperplazja komórek kubkowych. We krwi badanych zwierząt wzrosła ilość eozynofili, limfocytów oraz przeciwciał klasy E i A. Ponadto okazało się, że myszy otrzymujące zwiększone dawki IL-33 wykazują wyraźny wzrost ekspresji mRNA dla IL-13 w śledzionie, jelicie cienkim, płucach, wątrobie i grasicy. W przypadku IL-4 oraz IL-5 podwyższony poziom mRNA zauważalny był jedynie w płucach, śledzionie, grasicy i wątrobie. Również surowica wykazywała wysokie wartości dla IL-5 i IL-13 [104]. Z kolei na innym mysim modelu zauważono hamujący wpływ TGF- β na ekspresję IL-33, co prowadziło do osłabienia stanu zapalnego w doświadczalnym zapaleniu jelit [93].

1.5.1 Rola interleukiny 33 w nieswoistych zapaleniach jelit

W ciągu ostatnich 3 lat pojawiły się prace wskazujące na podwyższone stężenie IL-33 w surowicy krwi chorych na NZJ [6, 87, 110] oraz zwiększoną ekspresję tej cytokiny w błonie śluzowej jelita grubego u tych osób [47, 87, 110, 111]. Zwiększona ekspresja IL-33 u chorych z aktywną postacią NZJ zachodzi w komórkach nabłonka, komórkach jednojądrzastych i miofibroblastach zlokalizowanych w blaszce właściwej błony śluzowej jelit [47, 87, 110, 111]. W komórkach nabłonkowych w obrębie tkanki zmienionej zapalnie pochodzącej od chorych na WZJG, IL-33 dominowała w formie pierwotnej (30 kDa), zaś w surowicy stwierdzono występowanie tylko formy dojrzałej białka (20 kDa) zarówno w ChLC, jak i WZJG [87, 110].

Ekspresja i wydzielanie IL-33 w błonie śluzowej jelita grubego u chorych na NZJ mogą być powiązane z poziomem ekspresji TNF. Regularne podawanie tym osobom infliksimabu, przeciwciała blokującego TNF, systematycznie obniżało stężenie IL-33 w surowicy krwi [87]. Badania na liniach komórkowych HT29 i SGBS, stymulowanych przez kilkanaście godzin w obecności TNF, ujawniły wzrost ilości mRNA dla IL-33 oraz IL-33 o masie 30 kDa [87, 134]. W doświadczeniach innej grupy badawczej także stwierdzono stopniowy wzrost ilości mRNA dla IL-33 w hodowlach ludzkich SEMF po dodawaniu coraz większych dawek TNF i IL-1. Wykazano również, że indukcja ekspresji IL-33 przez TNF oraz IL-1, odbywa się za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych NF- κ B i AP-1 [47].

Słabo poznanym zagadnieniem jest udział IL-33 w gospodarce mineralnej w przebiegu NZJ. Istnieją sprzeczne dane [77, 98, 107] dotyczące wpływu tej cytokiny na proces osteoklastogenezy, dlatego postanowiono ocenić jej ekspresję w błonie śluzowej chorych oraz stężenie w surowicy krwi w kontekście innych cytokin, które pełnią kluczową rolę w metabolizmie tkanki kostnej.

1.6. Charakterystyka oraz funkcja w metabolizmie kostnym i procesach zapalnych ligandu receptora aktywującego jądrocy czynnik NF- κ B (RANKL), receptora aktywującego jądrocy czynnik NF- κ B (RANK) i osteoprotegeryny (OPG)

1.6.1. Mechanizm regulacji osteoklastogenezy

W ciągu jednego roku ok. 10% tkanki kostnej dorosłego człowieka ulega całkowitej wymianie. Za proces ten, nazywany remodelingiem kości, odpowiadają komórki kościotwórcze (osteoblasty) i wielojądrzaste komórki kościogubne (osteoklasty), będące odmianą makrofagów. Osteoblasty oprócz sekrecji składników organicznych, takich jak kolagen typu I czy proteoglikany, kontrolują dojrzewanie prekursorów osteoklastów poprzez syntezę RANKL i OPG. Funkcjonowanie osteoklastów regulowane jest również przez inne czynniki, sprzyjające różnicowaniu komórek kościogubnych, do których zaliczamy: TNF, IL-1, IL-6, IL-11 i IL-17 oraz hamujące ten proces: IL-4, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- γ i GM-CSF [62, 118, 121, 123]. Formowanie komórek kościogubnych z prekursorowych komórek monocytarnych szpiku kostnego jest inicjowane przez M-CSF, który łącząc się z receptorem c-fms na powierzchni prekursora osteoklasta, umożliwia wiązanie się RANKL

z RANK. Aktywacja RANK prowadzi do stymulacji białek adaptorowych takich jak TRAF i kaskady sygnałów obejmujących NF- κ B, PI-3K i MAPK. Aktywowane kinazy MAP regulują czynniki transkrypcyjne pochodzące z rodziny AP-1, które odpowiadają za transkrypcję genów aktywujących osteoklastogenezę [15, 62, 118, 131].

1.6.2. Receptor aktywujący jądrowy czynnik NF- κ B (RANK)

Funkcję receptora dla RANKL pełni RANK, który jest transbłonową glikoproteiną, należącą do rodziny receptorów TNF. W piśmiennictwie obecne są także inne nazwy tego białka: TRANCE-R i ODAR. U ludzi za kodowanie tego receptora, zbudowanego z 616 aminokwasów, odpowiada gen zlokalizowany na chromosomie 18 [125]. Ekspresja RANK zachodzi w prekursorach i dojrzałych osteoklastach, chondrocytach, fibroblastach, limfocytach T i B, komórkach dendrytycznych, makrofagach, komórkach nowotworowych (m.in. czerniak, rak piersi i prostaty). Występowanie RANK potwierdzono w kościach, szpiku kostnym, grasicy, jelitach, mózgu, sercu, nerkach, nadnerczach, wątrobie, płucach, gruczołach sutkowych, prostatie, trzustce, mięśniach szkieletowych i skórze [14, 45, 125]. Do czynników zwiększających syntezę RANK należą m.in.: IL-1, TGF- β , VEGF, IFN- γ , OSM, VIP, 1,25(OH) $_2$ D $_3$ oraz deksametazon, zaś IL-4, IGF-1, FGF2 obniżają produkcję RANK [14, 45, 62, 71, 76, 125].

Myszy transgeniczne nie posiadające genu kodującego RANK cechują: osteopetroza, spowodowana całkowitym deficytem aktywnych osteoklastów, a także hipokalcemia, hipofosfatemia oraz podwyższone stężenie PTH w surowicy krwi [45, 62].

1.6.3. Ligand receptora aktywującego jądrowy czynnik NF- κ B (RANKL)

RANKL, cytokina która stymuluje proces różnicowania prekursorów osteoklastów i blokuje apoptozę komórek kościogubnych zaliczana jest do rodziny białek TNF i była również opisywana jako TRANCE [137], ODF [58] lub OPGL [58]. Ligand RANK występuje zarówno w formie rozpuszczalnego monomeru (sRANKL/RANKL3), jak i w postaci transbłonowej (RANKL1 i RANKL2). U ludzi, gen tej glikoproteiny zlokalizowany jest na 13 chromosomie, zaś u myszy na 14 i koduje on białka zbudowane odpowiednio z 317 i 316 reszt aminokwasowych [40, 125].

Kluczową rolę RANKL w osteoklastogenezie wykazały doświadczenia na myszach pozbawionych genu tej cytokiny. Stwierdzono u nich osteopetrozę, wynikającą z nieobecności funkcjonalnych osteoklastów. Ponadto obserwowano poważne zaburzenia na wczesnym etapie różnicowania limfocytów T i B oraz brak węzłów chłonnych [45, 62]. Z kolei myszy z nadprodukcją RANKL wykazywały zwiększoną liczbę aktywnych komórek kościogubnych i zredukowaną gęstość mineralną kości [62].

RANKL uwalniany jest przez osteoblasty, komórki zrębu szpiku, odontoblasty, chondrocyty, fibroblasty, komórki nabłonkowe, limfocyty T i B oraz niektóre rodzaje komórek nowotworowych. Obecność RANKL potwierdzono w tkance kostnej, szpiku, mózgu, sercu, nerkach, wątrobie, gruczołach sutkowych, łożysku, mięśniach szkieletowych, śledzionie, grasicy, węzłach chłonnych, tarczycy, płucach i jądrach [14, 42, 45, 62, 125]. Zwiększoną ekspresję RANKL indukują: 1,25(OH)₂D₃, PGE₂, PTH, PTHrP, IGF-1, IFN-γ, leki immunosupresyjne, glikokortykosteroidy, progesteron, prolaktyna, onkostatyna M, LIF, TNF, IL-1, IL-6, IL-7, IL-11 i IL-17 [15, 42, 62, 96, 102, 118, 125]. W przewlekłych schorzeniach zapalnych, takich jak NZJ, dochodzi do podwyższonej ekspresji cytokin prozapalnych, które mogą zwiększać ilość RANKL. W efekcie mogłoby dochodzić do wzmożonej resorpcji kości prowadzącej do osteopenii, a w dłuższej perspektywie do osteoporozy [126]. Zweryfikowanie tej hipotezy stanowiło jeden z celów podjętych badań.

Schemat działania RANKL, a także główne rodzaje komórek, które wydzielają w tkance kostnej tę cytokinę przedstawiono na ryc. 5A.

1.6.4. Osteoprotegeryna (OPG)

Inhibitorem RANKL jest OPG, która pełniąc rolę jego rozpuszczalnego receptora blokuje osteoklastogenezę na wczesnym etapie dojrzewania osteoklasta. OPG należy do rodziny receptorów TNF (TNFR). Cytokina ta była też określana jako OCIF [127], TR-1 [57] lub FDCR-1 [139]. Dojrzała postać tej glikoproteiny składa się z 380 aminokwasów i u człowieka jest kodowana przez gen obecny na 8 chromosomie. OPG może być uwalniania jako 60 kDa monomer lub 120 kDa homodimer [125].

Działanie osłonowe OPG na tkankę kostną zostało pośrednio potwierdzone u osób z homozygotyczną delecją genu *opg*, cierpiących na młodocianą postać choroby Paget'a. Schorzenie to charakteryzuje niedosłuch, podwyższony remodeling kości, osteopenia i częste złamania [14, 129]. Ponadto, badania na myszach transgenicznym z nadekspresją OPG

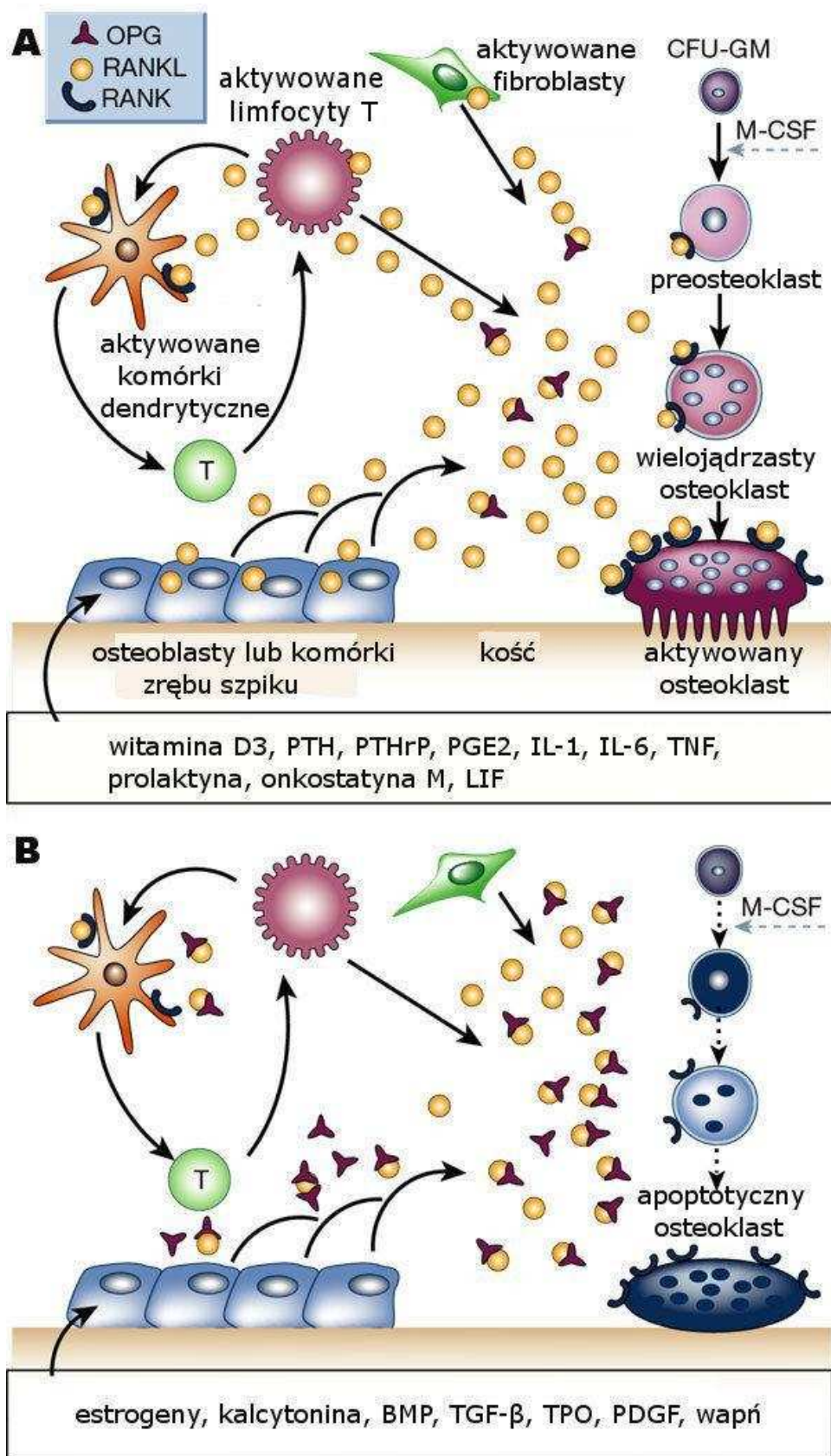
wykazały, że zwierzęta te charakteryzowały się zwiększoną gęstością kości i ograniczoną pulą osteoklastów [62].

OPG produkowana jest m.in. przez osteoblasty w odpowiedzi na obciążenia mechaniczne działające na kość oraz w reakcji na działanie szeregu czynników takich jak: IL-13, IL-18, estrogeny, kalcytonina, TGF- β , TNF, IFN- γ , FGF2, białka z rodziny BMP, TPO, LIF, OSM, PDGF, VIP, wapń. Natomiast PTH, PTHrP, PGE₂, bFGF, IGF-1, IL-17, glikokortykoidy, leki immunosupresyjne oraz 1,25(OH)₂D₃ przyczyniają się do obniżania syntezy OPG. Oprócz osteoblastów, OPG uwalniana jest przez komórki zrębu szpiku, komórki śródbłonna, odontoblasty, chondrocyty, miocyty aorty, fibroblasty, megakariocyty, komórki dendrytyczne, monocyty oraz limfocyty T i B. Ekspresję tego chroniącego kości białka wykryto w szpiku kostnym, płucach, sercu, aorcie, nerkach, wątrobie, żołądku, jelitach, gruczołach sutkowych, łożysku, prostatie, skórze, śledzionie, grasicy, węzłach chłonnych, tarczycy, nadnerczach, jajnikach, jądrach, kościach, tchawicy, mózgu i rdzeniu kręgowym [14, 15, 45, 62, 96, 106, 124, 125].

W kilku złośliwych nowotworach, np. raku prostaty, OPG ogranicza hiperkalcemię, osteolizę kości, a także obniża proliferację komórek nowotworowych oraz blokuje ich migrację. OPG pełni również funkcję czynnika przeżyciowego w stosunku do komórek raka prostaty i szpiczaka mnogiego [5, 115, 125].

OPG zabezpiecza również aortę i duże naczynia krwionośne nerki przed nadmiernym zwapnieniem i rozwojem miażdżycy, co wykazały testy na myszach transgenicznym pozbawionych genu kodującego OPG. U takich zwierząt rozwijała się ciężka hiperkalcemia, prowadząca do odkładania się wapnia m.in. w aorcie, zaś podawanie egzogennej OPG chroniło zwierzęta przed nasileniem patologicznych zmian [16]. Z kolei w surowicy krwi ludzi wykazano silną, dodatnią korelację pomiędzy poziomem OPG a progresją zmian miażdżycowych [46, 106]. Te pozornie sprzeczne dane mogą wskazywać na OPG jako inhibitor wapnienia, którego zwiększona ekspresja stanowi odpowiedź na postępującą miażdżycę naczyń.

Schemat działania OPG, a także główne rodzaje komórek, które ją wydzielają przedstawiono na ryc. 5B.



Ryc. 5. Schemat przedstawiający działanie czynników a) proresorpcyjnych i b) protekcyjnych na kość. Zmodyfikowano na podstawie Boyle i wsp. [15].

1.6.5. Nieswoiste zapalenia jelit i inne schorzenia charakteryzujące się brakiem równowagi w systemie RANKL/OPG

W NZJ [73], zapaleniu przyzębia, reumatycznym zapaleniu stawów następuje aktywacja szeregu komórek jednojądrzastych, m.in. limfocytów T i B, które stają się źródłem RANKL. Potwierdzono, że indukowane limfocyty T ($CD4^+$), oddziałują z prekursorami osteoklastów i przyczyniają się do powstawania dojrzałych komórek kościogubnych [22, 51, 62, 72, 122, 129]. Podobnie, limfocyty B biorą udział w stymulacji osteoklastogenezy poprzez nadmierną ekspresję: RANKL, TNF, IL-6, MIP-1 α i MCP-3 [22, 36].

Szpiczak mnogi [82, 97, 109, 115] i rak piersi [85] to przykłady nowotworów, gdzie zaobserwowano obniżoną ekspresję OPG, przy nadprodukcji RANKL. Komórki szpiczaka mnogiego są zdolne syntetyzować RANKL i degradować OPG, przez co wpływają bezpośrednio na proces powstawania komórek kościogubnych. Dodatkowo, uwalniając takie czynniki jak: IL-1, IL-6, IL-11, TNF, PTHrP czy MIP-1 α , komórki nowotworowe pobudzają osteoblasty do produkcji RANKL. Ponadto, pacjenci z zaawansowanym rakiem piersi bardzo często są narażeni na przerzuty do kości, wpływające w znaczący sposób na wzrost ich resorpcji oraz częstotliwość patologicznych złamań. Wzmoczona osteoliza powoduje uwalnianie z macierzy kości czynników wzrostu (TGF- β , BMP i IGF-1), co pobudza proliferację komórek nowotworowych i syntezę: PTHrP, IL-1, IL-6 oraz TNF, które aktywując osteoblasty do produkcji RANKL, tworzą kolejne obszary zmian osteolitycznych [23, 32, 78, 129, 130].

1.7. Powikłania towarzyszące nieswoistym zapaleniom jelit

W długotrwałym i rozległym przebiegu NZJ rośnie ryzyko powstawania raka jelita grubego w tym gruczolakoraka. Dość często jako stan przedrakowy określa się obecność gruczolaków, czyli łagodnych nowotworów pochodzących z nabłonka gruczołów jelitowych. Zmiany przedrakowe charakteryzuje m.in. brak polaryzacji komórek nabłonkowych oraz zmniejszona liczba komórek kubkowych. Bardzo istotne są więc regularne kolonoskopie i badanie histopatologiczne pobranych biopsji w celu rozpoznania dysplazji nabłonka [3, 29, 41, 50, 54].

Najczęstszym lokalnym powikłaniem WZJG jest polipowatość zapalna, tzw. pseudo-polipowatość, występująca u ok. 15% pacjentów. Pozostałymi poważnymi komplikacjami

jelitowymi we WZJG są: zwężenie jelita grubego, ostre rozdęcie oraz perforacja okrężnicy [50].

Rumień guzowaty jest zmianą skórą, której obecność i stopień zaawansowania koreluje z poziomem aktywności NZJ. Innymi patologiami dermatologicznymi związanymi z WZJG i ChLC są: zgorzelinowe zapalenie skóry, przewlekła piodermia brodawkowata, ropne przerostowe zapalenie jamy ustnej, łuszczyca [29, 50].

U prawie 10% pacjentów dochodzi do pogarszania się zdolności widzenia. Do schorzeń oczu obecnych w przebiegu NZJ zaliczamy: zapalenie spojówek, zapalenie tęczówki, zapalenie błony naczyniowej przedniego odcinka oka [29, 50].

Poważnym powikłaniem jest stłuszczenie wątroby występujące u ok. 50% chorych [29]. Odpowiada za to przede wszystkim przewlekły proces zapalny, przyjmowanie sterydów oraz niedożywienie. Zapalenie drobnych dróg żółciowych oraz rak dróg żółciowych mogą także wystąpić w przebiegu NZJ [3, 29, 50].

W trakcie choroby dochodzi do wielu dodatkowych komplikacji, m.in. niedrożności moczowodów, kamicy moczowej, zakrzepicy żyłnej i tętniczej, zapalenia wsierdza, zapalenia opłucnej, śródmiąższowej choroby płuc, amyloidozy [29, 50, 92].

Przewlekły stan zapalny ma również niekorzystny wpływ na stawy i wywołuje: zapalenie stawów obwodowych, zeszytniające zapalenie stawów kręgosłupa, zapalenie stawów krzyżowo-biodrowych [3, 29, 50].

Żywnienie pozajelitowe, wiek powyżej 40 lat, stosowanie glikokortykosteroidów, mała aktywność fizyczna oraz nawracający stan zapalny zwiększają resorpcję tkanki kostnej u osób z NZJ. Według danych pochodzących z wielu ośrodków klinicznych i badawczych, problem ten dotyka od 4 do 60% osób z ChLC i ok. 18% pacjentów z WZJG [12, 60]. U chorych obserwuje się częstsze złamania kości długich, stawu biodrowego, żeber, kręgow i nadgarstka. Poważnym problemem jest również istotny deficyt witaminy D, który dotyka ok. 65% dorosłych pacjentów [12, 29, 50, 94]. Wyniki badań ukazujące obniżoną gęstość kości wśród dzieci z NZJ pokrywają się z analogicznymi danymi odnoszącymi się do dorosłych [12, 83].

1.8. Czynniki wpływające na obrót kostny w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit

Istnieje ścisły związek pomiędzy funkcjonowaniem jelit a prawidłową gospodarką wapniową organizmu. Tkanka kostna nie tylko pełni rolę rusztowania dla mięśni, ale jest

także magazynem związków mineralnych uwalnianych w celu utrzymania mineralnej homeostazy. Z kolei stan jelit, szczególnie jelita cienkiego, decyduje o ilości wchłanianego wapnia, dostarczanego na drodze transportu biernego lub aktywnego, w kontroli którego uczestniczą witamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) oraz jej receptor VDR [12].

Enterocyty, komórki absorpcyjne jelit, charakteryzujące się obecnością na szczycowej powierzchni rąbka prążkowanego, posiadają kanały wapniowe TRPV5 i TRPV6. Białkami zależnymi od witaminy D i również odpowiedzialnymi za wiązanie jonów wapnia są kalbindyna-D9K oraz PMCA1b. Do pozostałych czynników wpływających na stopień wchłaniania wapnia należy m.in. zaliczyć: ciążę, stężenie estrogenów, przyjmowanie glikokortykosteroidów, wysokotłuszczową dietę, spożywanie alkoholu [12]. Nie do końca jednoznaczne są informacje dotyczące stosowania glikokortykosteroidów i ich wpływu na obrót kostny w NZJ. Niektórzy autorzy uznają nawet, że nie ma korelacji pomiędzy dawkami aplikowanych sterydów lub aktywnością choroby a stanem tkanki kostnej [95]. Z drugiej strony, glikokortykosteroidy stymulują ekspresję RANKL i M-CSF przy równoczesnym hamowaniu produkcji OPG przez osteoblasty, indukują apoptozę komórek kościotwórczych oraz zwiększają uwalnianie wapnia przez nerki [2, 94, 95, 129].

Kluczową funkcję w utrzymaniu prawidłowego poziomu wapnia w surowicy krwi pełni stan równowagi między PTH i $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Aktywna biologicznie postać witaminy D syntetyzowana jest przez nerki w wyniku hydroksylacji 25-OH D_3 , przy czym PTH, hipofosfatemia oraz hipokalcemia, pobudzają i zwiększają ten proces. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wraz z PTH nasilają resorpcję kości, w jelitach i kanalikach nerkowych stymulują wchłanianie wapnia i fosforu, a ponadto witamina D_3 blokuje uwalnianie PTH przez przytarczycę. Wpływ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na tkankę kostną jest związany z aktywacją ekspresji RANKL przez osteoblasty i stymulacją osteoklastogenezy. Niedobór witaminy D prowadzi do obniżenia gęstości kości oraz osteoporozy [2, 12, 118].

W przebiegu nieswoistych zapaleń jelit następuje redukcja funkcjonalnej błony śluzowej, a co za tym idzie obniża się poziom wchłanianego wapnia i witaminy D. Resekcje jelit, biegunki, zmniejszone spożycie nabiału dodatkowo ograniczają ilość niezbędnych składników odżywczych. W NZJ zaobserwowano wzrost ekspresji m.in. TNF, IL-1, IL-6, EGF czy PGE_2 [2, 9, 12, 83]. Celem obniżenia poziomu cytokin prozapalnych (IL-6, TNF) uwalnianych w przebiegu choroby skuteczne może być stosowanie probiotyków w połączeniu z lekami przeciwzapalnymi (sulfasalazyna) [35].

Mimo wysuwanych od kilkunastu lat sugestii, że w przebiegu NZJ dochodzi do zaburzeń metabolizmu kostnego, w piśmiennictwie dostępne są zaledwie 3 prace, w których w sposób pośredni [10, 27] lub bezpośredni [73] badano równowagę w układzie RANKL/OPG, cytokin będących łącznikiem pomiędzy gospodarką wapniową a systemem odpornościowym. W żadnej pracy nie zbadano też potencjalnego wpływu IL-33 na metabolizm kostny chorych na WZJG i ChLC. Sytuacja taka stała się punktem wyjścia do podjęcia przedstawianych badań, w których postanowiono sprawdzić, czy miejscowa ekspresja wymienionych cytokin powiązana jest z parametrami obrotu metabolicznego kości u chorych na nieswoiste zapalenia jelit.

2. Cele pracy

W świetle przedstawionych powyżej informacji o patomechanizmie NZJ, postanowiono ustalić zależności pomiędzy miejscową ekspresją cytokin RANKL i OPG oraz niedawno odkrytej IL-33 a metabolizmem tkanki kostnej u pacjentów z kilkunastoletnim przebiegiem choroby. Badań takich nie przeprowadzano dotąd u chorych na NZJ w populacji polskiej.

Cel realizowano poprzez:

1. Ocenę poziomu resorpcji tkanki kostnej u chorych na NZJ w oparciu o pomiary densytometryczne oraz stężenie C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I (CTX) w surowicy krwi.
2. Określenie ekspresji RANKL, OPG i IL-33 na poziomie mRNA i białka u osób z NZJ oraz w grupie kontrolnej.
3. Zlokalizowanie w biopsjach pacjentów oraz osób zdrowych komórek odpowiedzialnych za syntezę badanych cytokin.
4. Ustalenie zależności pomiędzy wartościami ekspresji RANKL, OPG i IL-33 a parametrami opisującymi metabolizm kostny u chorych na NZJ.

3. Pacjenci i materiały

3.1. Badane grupy

Badaniami objęto 56 chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego (łac. colitis ulcerosa, CU), 9 osób w stanie remisji WZJG, 12 osób z chorobą Leśniowskiego-Crohna (ang. Crohn's Disease, CD) oraz 37 osób zdrowych. W projekcie brała udział Klinika Chorób Wewnętrznych, Endokrynologii i Zaburzeń Hemostazy Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik: dr hab. Krzysztof Sworczak, prof. nadzw. będący też kierownikiem grantu Narodowego Centrum Nauki N402.121.32/3989). Diagnozowanie i leczenie pacjentów przeprowadzano w Klinice Gastroenterologii i Hepatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik: prof. dr hab. Marian Smoczyński), w przyklinicznej poradni gastroenterologicznej oraz w Klinice Gastroenterologii z Pracownią Endoskopową w Samodzielnym Publicznym Szpitalu Klinicznym nr 4 w Lublinie (kierownik: prof. dr hab. Maria Słomka).

Za kryterium rozpoznania choroby oraz stopnia zaawansowania posłużyły: obraz endoskopowy, badania histopatologiczne oraz 21-punktowa skala MTWSI (ang. Modified Truelove and Witts Severity Index) [136] dla WZJG i 600-punktowa skala CDAI (ang. Crohn's Disease Activity Index) [114] dla osób z ChLC.

Grupę kontrolną stanowiły osoby, u których badania endoskopowe i histopatologiczne wykluczyły zmiany chorobowe w obrębie jelita grubego, bez zmian obrazu białokrwinkowego i bez cech klinicznych procesu zapalnego czy nowotworowego w dniu badania.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Wszystkie badane osoby zostały poinformowane o założeniach oraz przebiegu badań i pisemnie potwierdziły zgodę na udział w projekcie.

3.2. Materiał do badań

Materiał do badań stanowiły biopsje błony śluzowej jelita grubego o wymiarach 4x4x4 mm, które uzyskiwano dzięki badaniom endoskopowym (kolonoskopia). Materiał po umieszczeniu w krioprobówkach zanurzano w ciekłym azocie (-195,8°C). Przechowywanie biopsji do izolacji RNA i badań immunohistochemicznych odbywało się w temperaturze -80°C.

Po badaniu endoskopowym pacjentom pobierano 5 ml krwi obwodowej do probówki na skrzep. Następnie krew wirowano przy 2500 obrotach na minutę przez 15 minut, zaś otrzymaną surowicę przechowywano w temperaturze -80°C.

3.3. Materiały jednorazowego użytku

- 96-dółkowe płytki do PCR (4 Titude, Wielka Brytania)
- końcówki do pipet (Medlab, Polska)
- matowione szkiełka mikroskopowe (ChemLand, Polska)
- Opti-Seal Optical Disposable Adhesive, folia na płytkę do PCR (BIOplastics, Holandia)
- probówki typu corning 15 ml (Sarstedt, Niemcy)
- probówki typu eppendorf 1,5ml (Medlab, Polska)
- probówki mrożeniowe 2 ml (Sarstedt, Niemcy)
- szkiełka nakrywkowe (Menzel-Glaser, Niemcy)

3.4. Odczynniki

- agaroz (Fermentas, St. Zjedn.)
- akrylamidy, bis-akrylamidy (Roth, Niemcy)
- alkohol etylowy absolutny (POCh, Polska)
- alkohol metylowy (POCh, Polska)
- bromek etydyny (Sigma-Aldrich, St. Zjedn.)
- chloroform (POCH, Polska)
- fenozol (A&A Biotechnology, Polska)
- hematoksylina (Sigma-Aldrich, St. Zjedn.)
- iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, St. Zjedn.)
- izopropanol (A&A Biotechnology, Polska)
- ksylene (POCh, Polska)
- kwas borowy (Serva, Niemcy)
- medium do zatapiania biopsji mrożeniowych (CellPath, Wielka Brytania)
- medium DPX do zatapiania skrawków mikroskopowych (POCH, Polska)

- medium UltraCruz™ z DAPI do zatapiania skrawków mikroskopowych (Santa Cruz Biotechnology, St. Zjedn.)
- M-MuLV odwrotna transkryptaza (Fermentas, St. Zjedn.)
- 10 mM mix dNTPs (Fermentas, St. Zjedn.)
- nadsiarcezan amonu (APS) (Roth, Niemcy)
- oligo (dT)₁₈ (Sigma-Aldrich, St. Zjedn.)
- RiboLock™ RNase inhibitor (Fermentas, St. Zjedn.)
- roztwór płuczący A1 (A&A Biotechnology, Polska)
- startery do PCR dla β-aktyny (Sigma-Aldrich, St. Zjedn.)
- startery do PCR dla IL-33 (Sigma-Aldrich, St. Zjedn.)
- startery do PCR dla OPG (Oligo.pl, Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN, Polska)
- startery do PCR dla RANKL (Oligo.pl, Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN, Polska)
- streptawidyna sprzężona z Texas Red (Vector Laboratories, St. Zjedn.)
- substrat dla peroksydazy chrzanowej- 3,3'-diaminobenzzydina (DAB) (Vector Laboratories, St. Zjedn.)
- SYBR Gold, barwnik do kwasów nukleinowych w żelu (Invitrogen, St. Zjedn.)
- TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametyloetylenodiamina) (Sigma-Aldrich, St. Zjedn.)
- tris (Serva, Niemcy)
- triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Zjedn.)
- woda wolna od nukleaz (A&A Biotechnology, Polska)

3.5. Bufory i roztwory

- bufor obciążający do elektroforezy (błękit bromofenylowy- 0,25%, sacharoza- 40%)
- bufor PBS, pH=7,4 (NaCl- 0,8%, KH₂PO₄ - 0,02%, 8,1 mM Na₂HPO₄, KCl- 0,02%)
- 5x stężony bufor do odwrotnej transkrypcji (Fermentas, St. Zjedn.)
- 5x stężony bufor TBE (kwas borowy- 27,5 g, Tris- 54 g, 0,5 M EDTA- 20 ml, do 1000 ml woda destylowana)
- 30% roztwór akrylamidów (akrylamidy- 29,2%, bis-akrylamidy- 0,8%)
- 0,3% roztwór H₂O₂ w metanolu
- roztwór SYBR Gold (10 µl SYBR Gold (10000x) w 100 ml 1xTBE)

3.6. Wzorce molekularne

- pBR322 DNA/BsuRI (Hae III) (Fermentas, St. Zjedn.)
- pUC mix marker (Fermentas, St. Zjedn.)

3.7. Przeciwciała i zestawy do detekcji białek

- przeciwciała pierwotne królicze monoklonalne anti-CD3 (Abcam, St. Zjedn.)
- przeciwciała pierwotne królicze poliklonalne anti-IL-33 (Sigma-Aldrich, St. Zjedn.)
- przeciwciała pierwotne mysie monoklonalne anti-OPG (Imgenex, St. Zjedn.)
- przeciwciała pierwotne mysie monoklonalne anti-RANKL (R&D Systems, St. Zjedn.)
- przeciwciała wtórne kozie anti-królicze znakowane Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, St. Zjedn.)
- zestaw ELISA do oznaczania C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I (Immunodiagnostic Systems Ltd, Wielka Brytania)
- zestaw ELISA do oznaczania IL-33 (BioLegend, St. Zjedn.)
- zestaw ELISA do oznaczania OPG (BioVendor, Czechy)
- zestaw ELISA do oznaczania total sRANKL (Immundiagnostik AG, Niemcy)
- zestaw Vectastain ABC Kit (Mouse IgG) (Vector Laboratories, St. Zjedn.)
- zestaw Vectastain ABC Kit (Rabbit IgG) (Vector Laboratories, St. Zjedn.)

3.8. Aparatura

- aparat do analizy żeli (Gel Doc™ XR, Bio-Rad Laboratories, St. Zjedn.)
- aparat do elektroforezy agarozowej (Kucharczyk, Polska)
- aparat do elektroforezy akrylamidowej (Life Sciences, Wielka Brytania)
- czytnik płytek 96-dołkowych (FL 600 Microplate Fluorescence Reader, BioTek Instruments Inc., St. Zjedn.)
- homogenizator do tkanek (MagNA Lyser, Roche, Szwajcaria)
- kamera cyfrowa Hamamatsu (C 4742-95, Japonia)
- kamera cyfrowa Panasonic (GP-KR222, Japonia)
- kriostat Leica (CM 1900, Niemcy)

- mikroskop świetlny i fluorescencyjny Nikon (Eclipse E800, Japonia)
- pH-metr (Beckmann, Niemcy)
- spektrofotometr do pomiaru stężeń kwasów nukleinowych NanoDrop (ND-1000, St. Zjedn.)
- termoblok (JW Electonic, Polska)
- termocykler iCycler iQ (Multicolor Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories, St. Zjedn.)
- termocykler T3 (Biometra, Niemcy)
- wytrząsarka typu wortex (IKA, Niemcy)
- waga elektroniczna WPE 70 (Radwar, Polska)
- wirówka 5804 R (Eppendorf, Niemcy)
- wytrząsarka S 421 (MLW, Polska)
- zasilacz aparatu do elektroforezy (Biometra, Niemcy)

3.9. Programy komputerowe

- ICycler Optical System Software, wersja 3.1 (Bio-Rad Laboratories, St. Zjedn.)
- KC4, wersja 2.5 (BioTek Instruments Inc., St. Zjedn.)
- Lucia G, wersja 4.51 (Nikon, Japonia)
- Primer3Plus (online)
- Statistica, wersja 8.0 (StatSoft Inc., St. Zjedn.)
- VectorNTI, wersja 3.1 (Invitrogen, St. Zjedn.)

4. Metody

4.1. Izolacja całkowitego RNA z biopsji jelita grubego według zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego

Biopsję przenoszono z -80°C do temperatury pokojowej i dodawano 0,8 ml fenozolu. Materiał poddawano homogenizacji w homogenizatorze do tkanek (MagNA Lyser, Roche, Szwajcaria) przez 90 sekund, przy amplitudzie 7000 na minutę. Następnie próbkę z homogenatem umieszczano w termobloku (50°C , 10 minut). W kolejnym etapie, po dodaniu 0,2 ml chloroformu i wymieszaniu próbki, próbkę wirowano przez 10 minut, przy 12000 obrotach na minutę. Po zwirowaniu, pobierano górną frakcję do minikolumny do izolacji RNA (A&A Biotechnology, Polska) i dodawano 0,25 ml izopropanolu. Wirowano przez 1 minutę, przy 12000 obrotach na minutę. Kolumnę przenoszono do nowej próbki i dodawano 0,5 ml roztworu płuczącego A1 (A&A Biotechnology, Polska). Ponownie wirowano próbkę przez 1 minutę, przy 12000 obrotach na minutę. Kolumnę wyjmowano z próbki, wylewano przesącz i dodawano 0,5 ml roztworu płuczącego A1. Wirowano przez 1 minutę, przy 12000 obrotach na minutę. Przenoszono kolumnę do nowej próbki i po dodaniu 0,2 ml roztworu płuczącego A1, wirowano przez 2 minuty, przy 12000 obrotach na minutę. Następnie kolumnę umieszczano w nowej próbce i do złoza znajdującego się na dnie kolumny dodawano 50 μl wody wolnej od nukleaz. Wirowano przez 1 minutę, przy 12000 obrotach na minutę, po czym usuwano kolumnę, a oczyszczone RNA znajdujące się w próbce badano spektrofotometrycznie, w celu określenia jego stężenia oraz czystości. Po pomiarze wyizolowane RNA przechowywano w -80°C .

4.2. Określenie stężenia i czystości oczyszczonego RNA

Pomiary parametrów RNA wykonywano przy użyciu spektrofotometru NanoDrop (ND-1000, St. Zjedn.). Na detektor nanoszono 2 μl wyizolowanego RNA i mierzono stężenie (określone w $\text{ng}/\mu\text{l}$) oraz czystość badanego RNA. Jeżeli wartość stosunku absorbancji przy dwóch długościach fali ($\text{OD}_{260\text{nm}}$ i $\text{OD}_{280\text{nm}}$) wynosiła od 1.7 do 2.0, świadczyło to o odpowiedniej czystości RNA.

4.3. Odwrotna transkrypcja

Do 2 µg RNA dodawano 1 µl oligo (dT)₁₈ i uzupełniano do 11,5 µl wodą wolną od nukleaz. Probówkę z mieszaniną umieszczano na 5 minut w 70°C w termocyklerze T3 (Biometra, Niemcy). Następnie próbkę schładzano i wirowano przez 15 sekund, przy 3700 obrotach na minutę w temperaturze 4°C. Dodawano 8,5 µl roztworu Master Mix (tab. 1) i po szybkim zwirowaniu (15 sekund) umieszczano ją w termocyklerze. Profil temperaturowo-czasowy reakcji wynosił: 42°C przez 45 minut i 95°C przez 5 minut. Otrzymane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

Tab. 1. Skład 1x stężonego roztworu Master Mix

5x stężony bufor do odwrotnej transkrypcji	4 µl
RiboLock™ RNase inhibitor	0,5 µl (20 u)
10 mM mix dNTPs	2 µl
M-MuLV odwrotna transkryptaza	2 µl (40 u)
	8,5 µl

4.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR)

Przygotowano cztery rodzaje mieszanin reakcyjnych (tab. 2) i przy użyciu aparatu iCycler (Bio-Rad Laboratories, St. Zjedn.) określano przyrost ilości produktu reakcji PCR obserwując wzrost poziomu fluorescencji w momencie niespecyficznego łączenia się barwnika SYBR Green do dwuniciowego DNA. Profil temperaturowo-czasowy reakcji wynosił: 95°C przez 3 minuty, 40 cykli: 94°C przez 15 sekund, temperatura przyłączania starterów (tab. 3) przez 20 sekund, 72°C przez 20 sekund i 77°C przez 5 sekund. Po reakcji PCR, kolejny profil temperaturowo-czasowy (95°C przez 60 sekund, 55°C przez 30 sekund i 150 cykli: 65°C przez 5 sekund, $\Delta t=0,2^{\circ}\text{C}$) umożliwił wyznaczenie krzywych topnienia, których analiza pozwoliła na ocenę specyficzności produktów reakcji amplifikacji. Każdą

reakcję PCR dla badanej próby wykonano dwukrotnie, zaś za kontrolę negatywną posłużyła próba pozbawiona cDNA.

W oparciu o wzorce masowe: pBR322 DNA/BsuRI (Hae III) oraz pUC mix marker, możliwe było dodatkowe sprawdzenie jakości produktów PCR w 8% żelu poliakrylamidowym lub 1% żelu agarozowym. Po skończonym rozdzieleniu, żel podbarwiano przez 10 minut w roztworze SYBR Gold i dokonywano jego oceny za pomocą aparatu do analizy żeli. Pojedynczy prążek widoczny w żelu odpowiadał specyficznemu produktowi PCR.

Tab. 2. Skład 1x stężonych mieszanin reakcyjnych dla β -aktyny, RANKL, OPG i IL-33

	β -aktyna [μ l]	RANKL [μ l]	OPG [μ l]	IL-33 [μ l]
IQ SYBR Green Supermix*	9	9	9	9
cDNA	0,45	0,9	0,9	0,9
30 μ M Starter 1	0,11	0,11	0,11	0,11
30 μ M Starter 2	0,11	0,11	0,11	0,11
woda wolna od nukleaz	8,33	7,88	7,88	7,88
	18	18	18	18

* skład: 2x stężony bufor z dNTPs, iTaq- polimeraza DNA, 6 mM MgCl₂, SYBR Green I i fluoresceina

Tab. 3. Temperatury przyłączania starterów β -aktyny, RANKL, OPG i IL-33

	Temperatura [°C]
β -aktyna [88] 5' TGTGCCCATCTACGAGGGGTATGC 3' 5' GGTACATGGTGGTGCCGCCAGACA 3'	60
RANKL* 5' GCAGAGAAAGCGATGGTGGA 3' 5' GGGAACCAGATGGGATGTCTG 3'	56
OPG [105] 5' AAAGCACCTGTAGAAAACACA 3' 5' GTTGCCGTTTTATCCTCTCTAC 3'	52
IL-33 [111] 5' GTGGAAGAACACAGCAAGCA 3' 5' AAGGCAAAGCACTCCACAGT 3'	63

* zaprojektowane z wykorzystaniem programów: Primer3Plus i VectorNTI

4.5. Określenie stężenia sRANKL, OPG, IL-33 i C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I w surowicy krwi z wykorzystaniem testów immunoenzymatycznych (ELISA)

Szczegółowe etapy oceny stężenia poszczególnych białek w badanych surowicach dostępne są w protokołach producentów. W testach przeprowadzonych na opłaszczonych przeciwciałami 96-dołkowych płytkach użyto przeciwciał biotynylowanych, kompleksu peroksydazy chrzanowej ze streptawidyną, zaś za substrat dla enzymu posłużyła tetrametylobenzydyna (TMB). Po zakończonej reakcji immunoenzymatycznej zmierzono ilość produktów przy długości fali 450 nm, przy pomocy czytnika płytek 96-dołkowych (BioTek Instruments Inc., St. Zjedn.). Każda próba była badana w dwóch powtórzeniach. Równocześnie przeprowadzono kontrolę jakości testu ELISA oraz podwójną kontrolę negatywną (ślepa próba). Dane oceniano na podstawie wyliczonych krzywych standardowych w programie KC4. Minimalny poziom detekcji wynosił odpowiednio: 1,56 pg/ml dla sRANKL, 12 pg/ml dla OPG, 4,14 pg/ml dla IL-33 oraz 0,02 ng/ml dla C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I.

4.6. Techniki immunohistochemiczne

Biopsje jelita grubego skrawano przy użyciu kriostatu Leica w temperaturze -30°C . Po nałożeniu skrawka o grubości $10\text{ }\mu\text{m}$ na szkiełko podstawowe inkubowano je przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie szkiełko z tkanką umieszczano na 10 minut w buforze PBS, po czym przez 30 minut blokowano aktywność endogennej peroksydazy, traktując skrawki $0,3\%$ roztworem H_2O_2 w metanolu (mikroskopia świetlna, metoda ABC). Skrawki płukano buforem PBS i inkubowano przez 60 minut w 5% roztworze odpowiednio gatunkowej surowicy w PBS (tab. 4, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, St. Zjedn.). Następnie dodawano roztwór przeciwciał pierwotnych z 5% surowicą w PBS (tab. 4) i po 2-godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej płukano w buforze PBS. Kolejnym etapem było dodawanie roztworu PBS z przeciwciałami wtórnymi biotynylowanymi (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, St. Zjedn.) lub znakowanymi fluorochromami (tab. 4). Po 90 minutach tkankę przepłukiwano buforem PBS i nakraplano kompleks awidyny i biotynylowanej peroksydazy chrzanowej (mikroskopia świetlna, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, St. Zjedn.). 30 minut później, po przepłukaniu skrawków buforem PBS, dodawano substrat dla peroksydazy chrzanowej - $3,3'$ -diaminobenzydynę (DAB) (mikroskopia świetlna, Vector Laboratories, St. Zjedn.). Po 10 minutach skrawki płukano w wodzie destylowanej i podbarwiano jądra komórkowe hematoksyliną (mikroskopia świetlna) lub DAPI (mikroskopia fluorescencyjna). Skrawki zamykano w medium UltraCruz™ z DAPI (mikroskopia fluorescencyjna) albo po odwodnieniu tkanki alkoholem etylowym w medium DPX (mikroskopia świetlna). Za kontrolę negatywną posłużyły skrawki mrożeniowe, które nie były inkubowane z przeciwciałem pierwotnym, ale poddane zostały wszystkim następnym etapom procedury barwienia. Oceny i dokumentacji wyników dokonywano przy wykorzystaniu mikroskopu Nikon (Eclipse E800, Japonia) oraz programu Lucia G.

Do podwójnego barwienia stosowano przeciwciała drugorzędowe biotynylowane znakowane fluorochromem Texas red, które tworzyły kompleks z przeciwciałami pierwotnymi (anty-RANKL, anty-OPG i anty-IL-33). Drugi typ przeciwciał wtórnych wyznakowanych fluorochromem Alexa 488, łączył się z przeciwciałem pierwotnym anty-CD3. Nałożenie fluorochromów: Texas red (czerwone świecenie) i Alexa 488 (zielone świecenie), prowadziło do wybarwienia komórek na żółto i potwierdzało kolokalizację. Dodatkowo jądra komórkowe podbarwiano DAPI (niebieskie świecenie), co po nałożeniu

komórek po kolokalizacji (żółty kolor) w programie do analizy obrazu prowadziło do zmiany barwy na białą.

Tab. 4. Rodzaje surowic, przeciwciał pierwszorzędowych i drugorzędowych użytych w doświadczeniach immunohistochemicznych

Surowica	Przeciwciała pierwotne (stężenia końcowe)	Przeciwciała wtórne
Końska	mysie monoklonalne anty-OPG (10 µg/ml)	końskie, biotynyłowane anty-mysie + streptawidyna z Texas Red
Końska	mysie monoklonalne anty-RANKL (25 µg/ml)	końskie, biotynyłowane anty-mysie + streptawidyna z Texas Red
Kozia	królicze monoklonalne anty-CD3 (1:50)*	kozie, anty-królicze znakowane Alexa Fluor® 488
Kozia	królicze poliklonalne anty-IL-33 (0,9 µg/ml)	kozie, biotynyłowane anty-królicze + streptawidyna z Texas Red

* producent nie podał wyjściowego stężenia przeciwciał

4.7. Densytometryczny pomiar gęstości kości**

U 40 osób z nieswoistymi zapaleniami jelit (32 z WZJG i 8 z ChLC) oraz 7 osób w stanie remisji WZJG określono gęstość mineralną kości za pomocą densytometru, którego działanie opierało się na metodzie DXA (ang. Dual energy X-ray Absorptiometry), czyli absorpcjometrii podwójnej energii promieniowania rentgenowskiego. Pomiary pozwoliły na obliczenie dwóch parametrów określających poziom resorpcji kości: T-score i Z-score (wg Światowej Organizacji Zdrowia: WHO ang. World Health Organization). T-score to stosunek gęstości tkanki kostnej (BMD) pacjenta do średniej gęstości kości osób młodych. Wartość T-score > -1,0 odpowiada zdrowej kości, T-score pomiędzy -1,0 a -2,5 oznacza osteopenię, zaś T-score < -2,5 wskazuje na osteoporozę. Kolejny parametr Z-score jest stosunkiem gęstości kości (BMD) badanego do średniej gęstości kości osób w tym samym wieku.

** Wyniki pomiarów densytometrycznych udostępniono do celów niniejszej rozprawy dzięki uprzejmości dr hab. Krzysztofa Sworcza, prof. nadzw. GUMed.

4.8. Analiza statystyczna

Do opracowania wyników doświadczeń zastosowano program Statistica, wersja 8.0. Obliczenia przeprowadzono z użyciem testów nieparametrycznych, a za istotne statystycznie przyjęto wartości dla których $p < 0,05$. Do porównania zmiennych między grupami wykorzystano test U Manna-Whitney'a, zaś analizę danych w obrębie grupy przeprowadzono przy pomocy testu kolejności par Wilcoxon. W celu określenia zależności pomiędzy zmiennymi w badanej grupie zastosowano korelację porządku rang Spearmana.

5. Wyniki

5.1. Charakterystyka badanych grup

Rozkład płci wykazywał podobieństwo w grupach z ChLC, WZJG oraz w grupie osób z remisją WZJG i był zbliżony lub wynosił 1:1. Z kolei w grupie kontrolnej przeważała liczba kobiet (62%). Średnia wieku w grupach z ChLC i WZJG była przybliżona i równa ok. 50 lat, nieco niższa od średniego wieku osób zdrowych (57 lat). Chorych w stanie remisji WZJG charakteryzowała średnia wieku równa 43 lat.

Średni czas trwania choroby był zróżnicowany i wynosił dla ChLC - prawie 13 lat, dla WZJG - ok. 16 lat i dla grupy osób w stanie remisji WZJG - ok. 9 lat. Aktywność kliniczną ChLC i WZJG określano na podstawie 600-punktowej skali CDAI (ang. Crohn's Disease Activity Index) oraz 21-punktowej skali MTWSI (ang. Modified Truelove and Witts Severity Index), których charakterystyka została opisana we wstępie niniejszej rozprawy w rozdziałach 1.2 i 1.3. Średnia aktywność wynosząca 164 punkty dla ChLC i ok. 5 punktów dla WZJG wskazywała na łagodny stopień zaawansowania obydwu postaci NZJ.

Stężenia białka C-reaktywnego (CRP) oraz hemoglobiny nie odbiegały od normy, chociaż w przypadku CRP stwierdzono jego nieco podwyższony poziom w grupie pacjentów z NZJ, szczególnie w grupie z ChLC.

Leczenie chorych oparte było na stosowaniu pochodnych kwasu 5-aminosalicylowego (sulfasalazyna) a w zaostrzonej fazie choroby - glikokortykosteroidów lub/i azatiopryny. Dodatkowo, 4 osoby z powodu obniżonej gęstości kości wymagały przyjmowania leków antyresorpcyjnych z grupy bisfosfonianów.

Pomiary densytometryczne pozwoliły określić gęstość mineralną kości u chorych na NZJ oraz wyliczyć T-score i Z-score. Uśrednione wartości T-score dla szyjki kości udowej w grupach z ChLC i WZJG wynosiły odpowiednio -1,66 i -1,58, co wskazuje na osteopenię.

W tabeli 5 zestawiono przedstawione powyżej dane kliniczne dotyczące niektórych parametrów stanu zdrowia badanych osób.

Tab. 5. Podstawowe dane kliniczne dotyczące przebadanych grup

			ChLC (n=12)	WZJG (n=56)	Grupa kontrolna (n=37)	Osoby w stanie remisji WZJG (n=9)
Płeć (n)			K(7)/M(5)	K(28)/M(28)	K(23)/M(14)	K(5)/M(4)
Wiek (lata)			48,16 ± 15,5	51,48 ± 15,94	57,12 ± 10,54	43 ± 11,91
Czas trwania choroby (lata)			12,81 ± 10,32	16,2 ± 7,31	-----	9,25 ± 4,99
Aktywność kliniczna choroby			163,5 ± 125,15 <i>skala CDAI</i>	4,8 ± 4,26 <i>skala MTWSI</i>	-----	1,25 ± 0,95 <i>skala MTWSI</i>
Stężenie CRP [mg/l]			7 ^A ± 4,64	4,05 ± 5,84	0,66 ± 0,3	3,3 ± 2,08
Stężenie hemoglobiny [g/dl]			12,65 ± 2,13	13,09 ± 1,83	13,8 ± 1,44	11,9 ± 1,14
Leki	Sulfasalazyna (sulfonamid)		8/12	51/56	-----	4/9
	Encorton (glikokortykosteroid)		5/12	17/56	-----	2/9
	Entocort, Metypred (glikokortykosteroidy)		4/12	5/56	-----	0/9
	Alendronian (bisfosfonian)		0/12	3/56	-----	0/9
	Ibandronian (bisfosfonian)		0/12	1/56	-----	0/9
	Imuran (azatiopryna)		3/12	7/56	-----	0/9
Wyniki pomiarów densytometrycznych	Kręgi L1-L4	T _{score}	-0,107 ± 1,45	-0,66 ± 1,19	-----	0,106 ± 1,93
		Z _{score}	0,12 ± 1,39	-0,33 ± 1,18	-----	0,22 ± 1,94
	Szyjka kości udowej	T _{score}	-1,66 ± 1,54	-1,58 ± 1,46	-----	-0,72 ± 1,07
		Z _{score}	-0,48 ± 1,2	0,002 ± 1,21	-----	0,12 ± 1,21

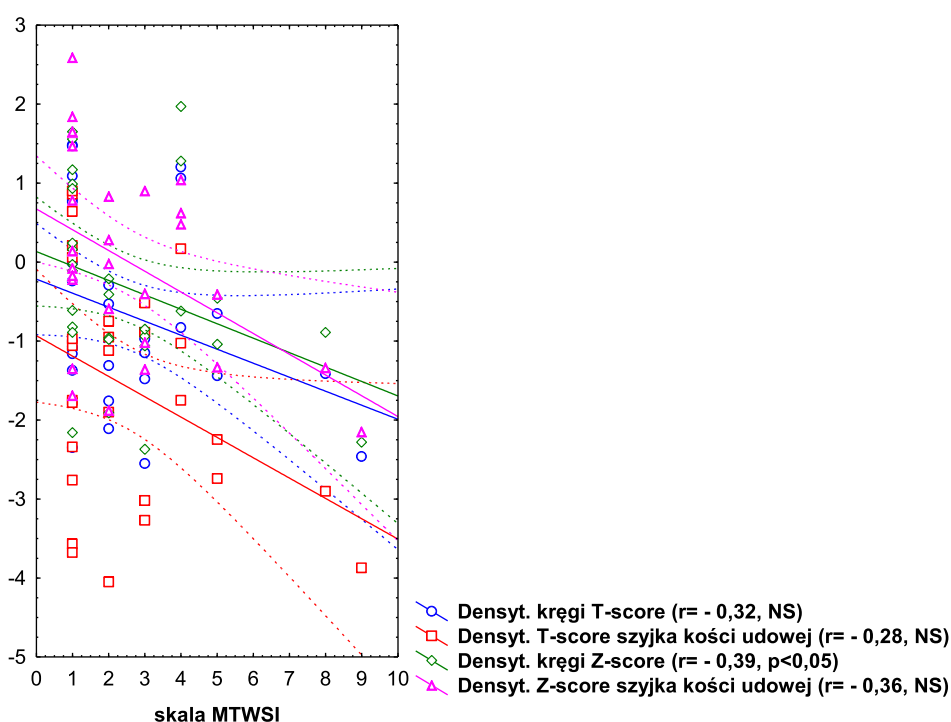
Dane przedstawiono w postaci średniej z uwzględnieniem odchylenia standardowego (SD)

^Aznamiennie różne względem grupy kontrolnej, p<0,05. Pomiary densytometryczne przeprowadzono u 32 chorych na WZJG, 8 osób z ChLC i 7 osób w stanie remisji WZJG.

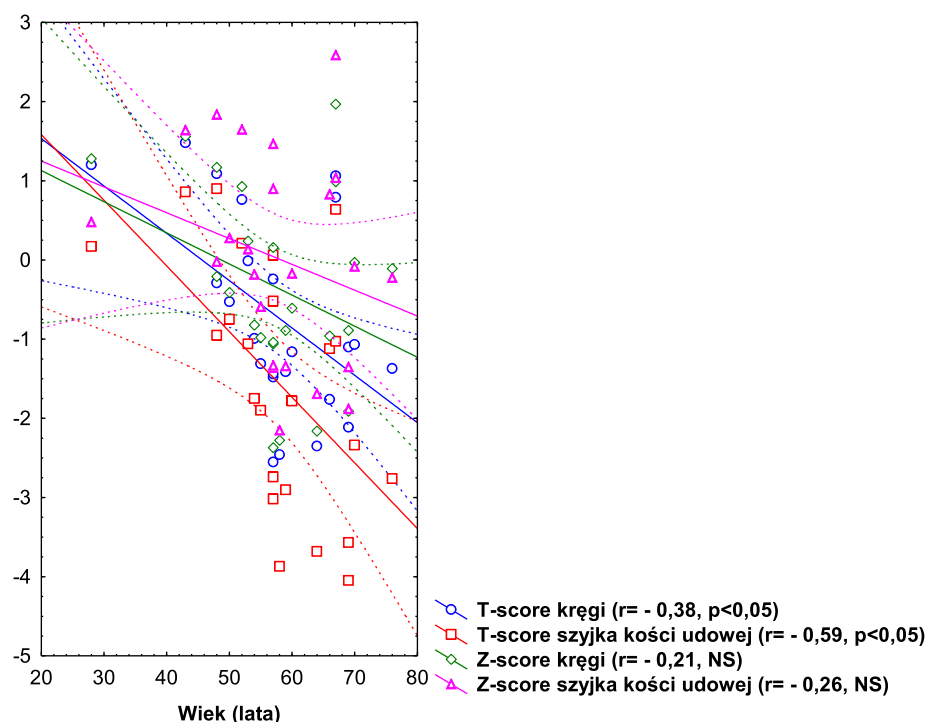
Na podstawie wyników pomiarów densytometrycznych oraz aktywności klinicznej WZJG (ryc. 6) i wieku chorych (ryc. 7 i 8), określano wzajemne zależności.

Zaobserwowano wystąpienie statystycznie znaczącej ujemnej korelacji pomiędzy aktywnością WZJG a wartościami Z-score dla kręgów lędźwiowych ($r=-0,39$; $p<0,05$), ale nie dla szyjki kości udowej (ryc. 6).

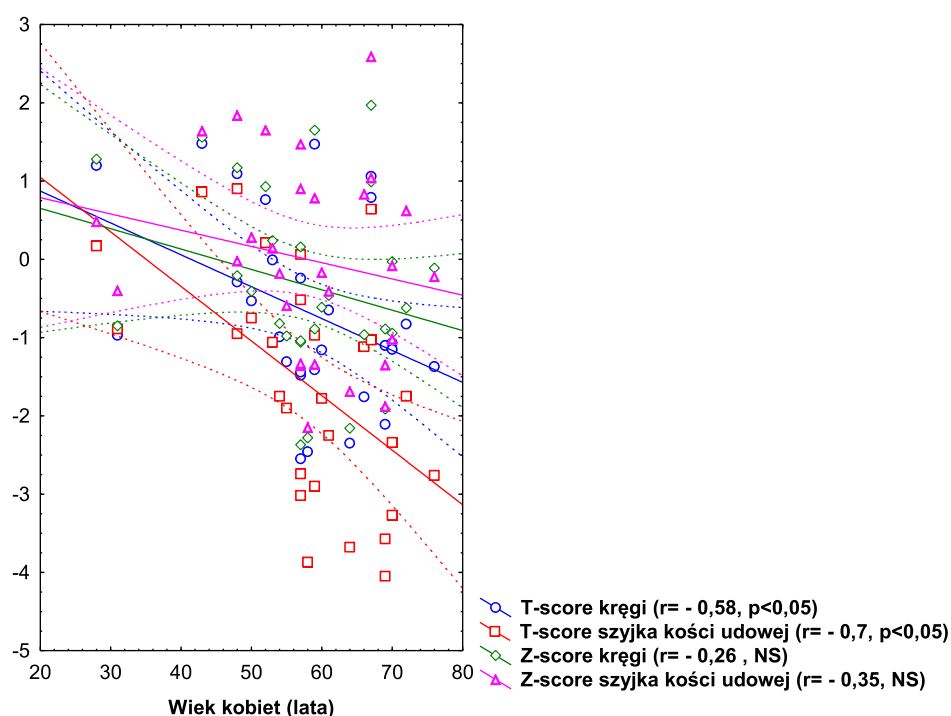
Natomiast wiek chorych był ujemnie skorelowany z wartościami T-score obliczonymi dla szyjki kości udowej i kręgów lędźwiowych (ryc. 7). Korelacja ta była znacznie silniej zaznaczona w grupie kobiet chorych na WZJG (ryc. 8) w porównaniu do całej grupy chorych (ryc. 7).



Ryc. 6. Korelacja pomiędzy wynikami pomiarów densytometrycznych (T i Z-score) chorych na WZJG a skalą aktywności choroby (skala MTWSI) (korelacja porządku rang Spearmana). NS - nieistotnie statystycznie.



Ryc. 7. Korelacja pomiędzy wynikami pomiarów densytometrycznych (T i Z-score) chorych na WZJG a wiekiem chorych (korelacja porządku rang Spearmana). NS - nieistotne statystycznie.



Ryc. 8. Korelacja pomiędzy wynikami pomiarów densytometrycznych (T i Z-score) kobiet chorych na WZJG a wiekiem (korelacja porządku rang Spearmana). NS - nieistotne statystycznie.

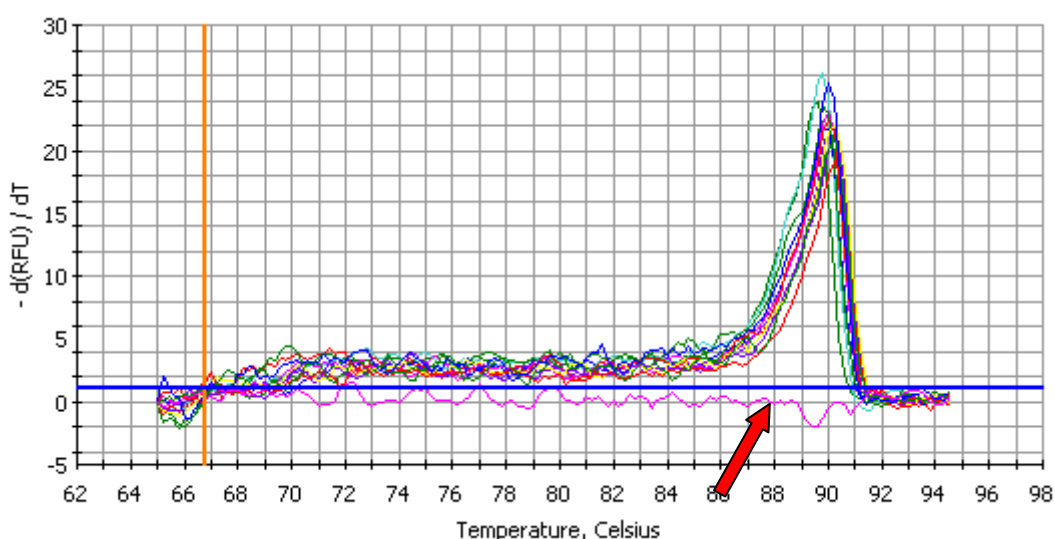
Podsumowanie

- Wartości indeksów CDAI oraz MTWSI wskazują na łagodny stopień zaawansowania ChLC i WZJG.
- Stężenie CRP w surowicy krwi u osób z ChLC było znamienne wyższe względem grupy kontrolnej.
- U chorych na ChLC i WZJG stwierdzono osteopenię w oparciu o obniżoną wartość T-score.
- Wiek chorych (szczególnie kobiet) był ujemnie skorelowany z wartościami T-score obliczonymi dla szyjki kości udowej i kręgów lędźwiowych.

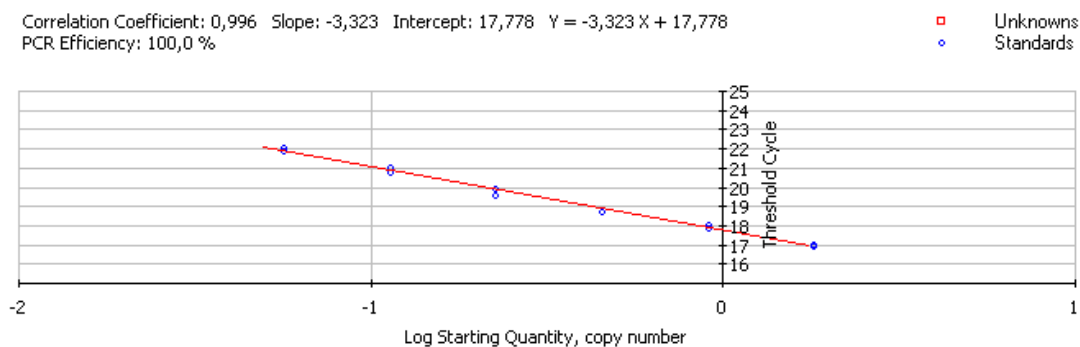
5.2. Ekspresja RANKL, OPG i IL-33 w odniesieniu do ekspresji β -aktyny na poziomie mRNA u chorych na ChLC, WZJG oraz w grupie kontrolnej

5.2.1. Ocena specyficzności uzyskanych produktów reakcji PCR w czasie rzeczywistym

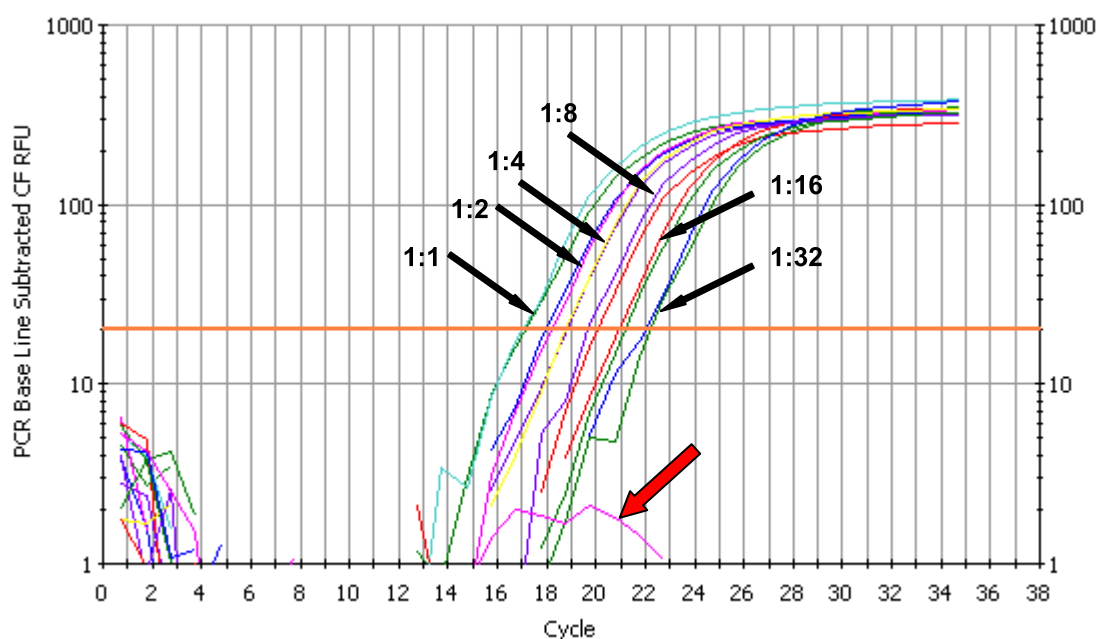
Ekspresję cytokin (RANKL, OPG i IL-33) oraz β -aktyny w biopsjach na poziomie mRNA określono z wykorzystaniem pośredniej metody ilościowej real-time PCR z użyciem barwnika fluorescencyjnego SYBR Green. Wykazanie obecności produktów specyficznych umożliwiła analiza krzywej topnienia produktów PCR po zakończeniu reakcji amplifikacji (ryc. 9, 12, 14 i 16) oraz analiza produktów reakcji PCR w 8% żelu poliakrylamidowym lub 1% żelu agarozowym. Do obliczenia ekspresji badanych genów (RANKL, OPG i IL-33) względem genu referencyjnego (β -aktyna) wykorzystano odmianę metody Livak'a [88]. Metoda ta polega na analizie wartości C_t genu dla β -aktyny w stosunku do C_t badanego genu i przedstawia się następująco: $\text{ratio}(\beta\text{-aktyna/RANKL, OPG lub IL-33}) = 2^{(C_t \beta\text{-aktyny} - C_t \text{RANKL, OPG lub IL-33})}$ (tab. 6). Wyznaczono także krzywe standardowe dla RANKL, OPG, IL-33 i β -aktyny określone na podstawie amplifikacji seryjnych rozcieńczeń mieszaniny 30 prób cDNA (pula standaryzacyjna) pochodzących od 15 osób zdrowych i 15 chorych na NZJ (ryc. 10, 13, 15 i 17). Dodatkowo, dla seryjnych rozcieńczeń cDNA przedstawiono wykres zmian fluorescencji dla β -aktyny w poszczególnych cyklach reakcyjnych (ryc. 11). Za kontrolę negatywną posłużyła próba pozbawiona cDNA.



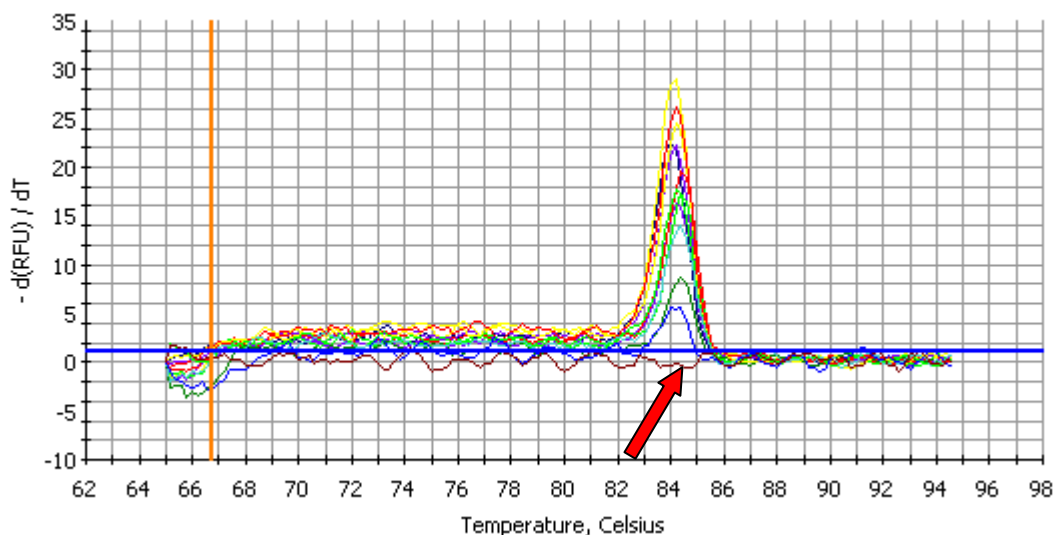
Ryc. 9. Krzywa topnienia dla β -aktyny przedstawiająca kinetykę zmian poziomu fluorescencji ($-d(RFU)/dT$) zależnie od temperatury ($^{\circ}\text{C}$). Pojedynczy pik na wykresie odpowiada specyficznemu produktowi po reakcji PCR dla różnych stężeń użytej matrycy cDNA z puli standaryzacyjnej. Strzałka wskazuje kontrolę negatywną.



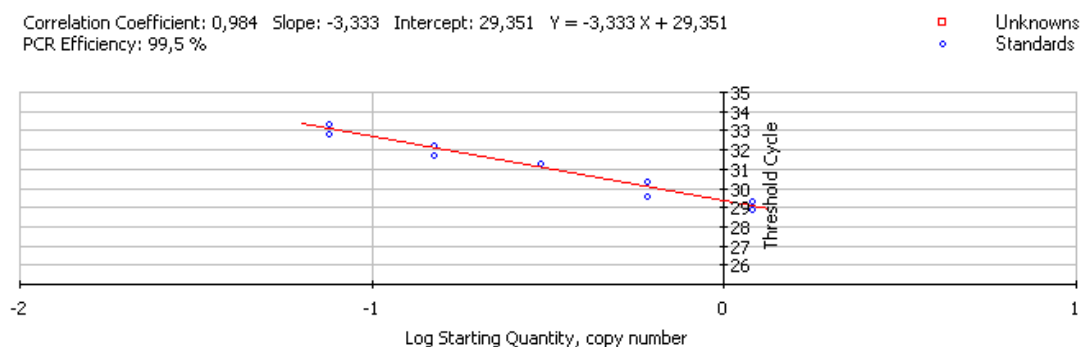
Ryc. 10. Krzywa standardowa dla β -aktyny wyznaczona na podstawie amplifikacji seryjnych rozcieńczeń od 1:1 do 1:32 („Standards”) cDNA pochodzącego od 30 osób. Otrzymaną krzywą cechowały: współczynnik korelacji 0,996; współczynnik nachylenia krzywej -3,323; wydajność reakcji PCR 100%.



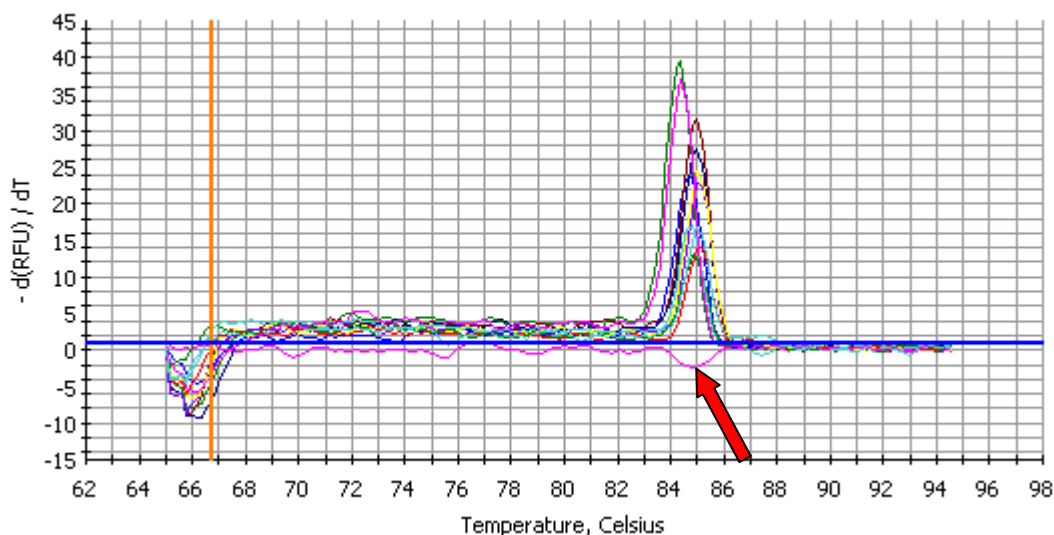
Ryc. 11. Wykres zmian fluorescencji dla seryjnych rozcieńczeń β -aktyny (od 1:1 do 1:32) w poszczególnych cyklach reakcyjnych. Oś odciętych przedstawia ilość cykli reakcji amplifikacji, oś rzędnych to intensywność fluorescencji produktów amplifikacji. Czerwona strzałka wskazuje kontrolę negatywną.



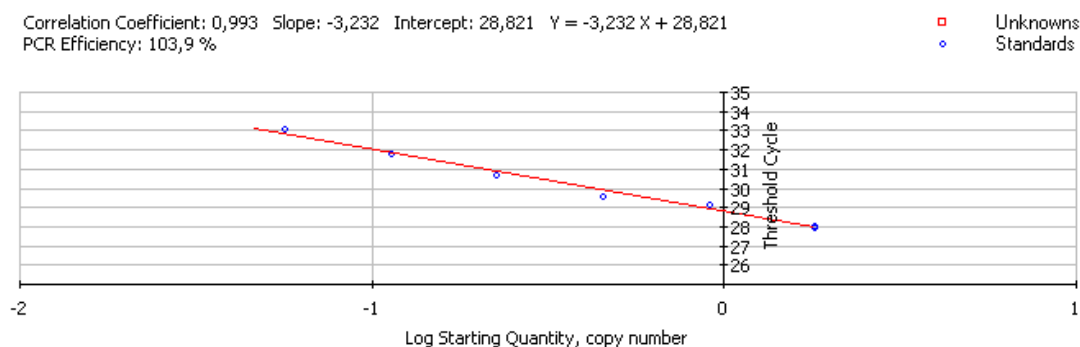
Ryc. 12. Krzywa topnienia dla RANKL przedstawiająca kinetykę zmian poziomu fluorescencji ($-d(RFU)/dT$) zależnie od temperatury ($^{\circ}C$). Pojedynczy pik na wykresie odpowiada specyficznemu produktowi po reakcji PCR. Strzałka wskazuje kontrolę negatywną.



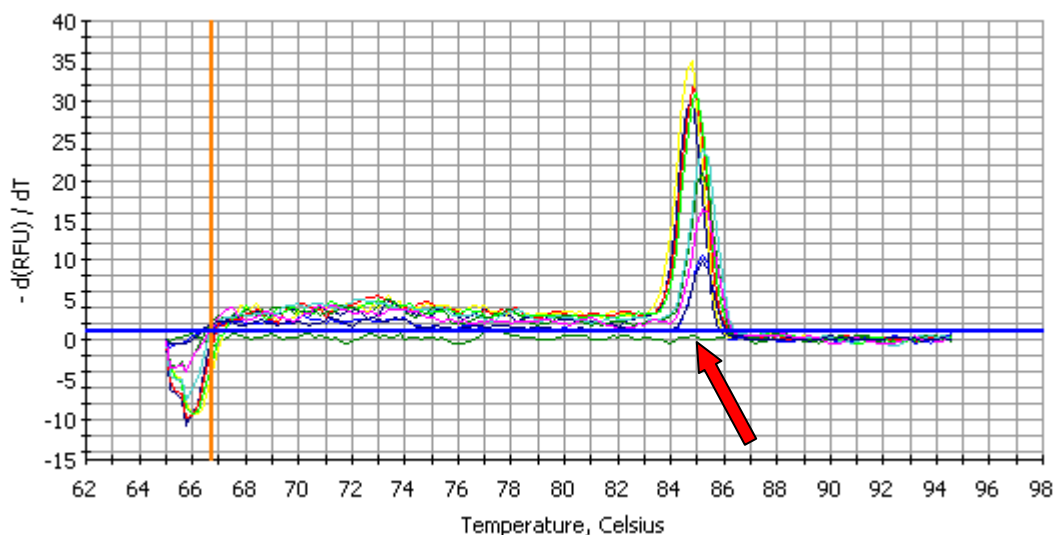
Ryc. 13. Krzywa standardowa dla RANKL wyznaczona na podstawie amplifikacji seryjnych rozcieńczeń od 1:1 do 1:16 („Standards”) cDNA pochodzącego od 30 osób. Otrzymaną krzywą cechowały: współczynnik korelacji 0,984; współczynnik nachylenia krzywej -3,333; wydajność reakcji PCR 99,5%.



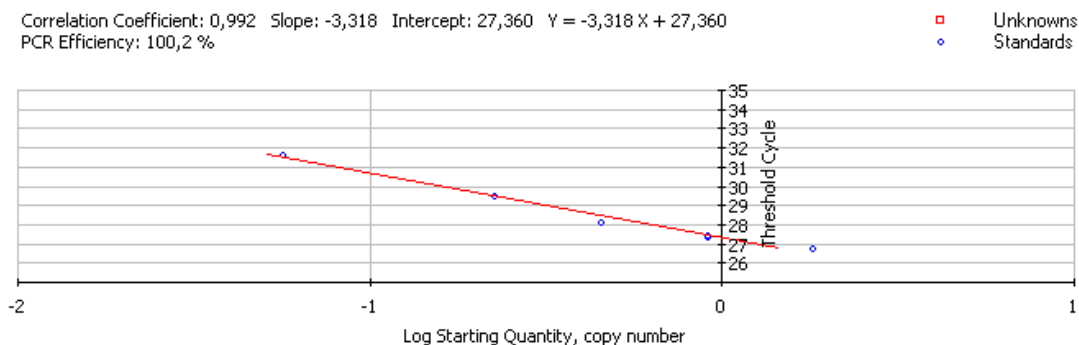
Ryc. 14. Krzywa topnienia dla OPG przedstawiająca kinetykę zmian poziomu fluorescencji ($-d(RFU)/dT$) zależnie od temperatury ($^{\circ}C$). Pojedynczy pik na wykresie odpowiada specyficznemu produktowi po reakcji PCR. Strzałka wskazuje kontrolę negatywną.



Ryc. 15. Krzywa standardowa dla OPG wyznaczona na podstawie amplifikacji seryjnych rozcieńczeń od 1:1 do 1:32 („Standards”) cDNA pochodzącego od 30 osób. Otrzymałą krzywą cechowały: współczynnik korelacji 0,993; współczynnik nachylenia krzywej -3,232; wydajność reakcji PCR 103,9%.



Ryc. 16. Krzywa topnienia dla IL-33 przedstawiająca kinetykę zmian poziomu fluorescencji ($-d(RFU)/dT$) zależnie od temperatury ($^{\circ}C$). Pojedynczy pik na wykresie odpowiada specyficznemu produktowi po reakcji PCR. Strzałka wskazuje kontrolę negatywną.



Ryc. 17. Krzywa standardowa dla IL-33 wyznaczona na podstawie amplifikacji seryjnych rozcieńczeń od 1:1 do 1:32 („Standards”) cDNA pochodzącego od 30 osób. Otrzymałą krzywą cechowały: współczynnik korelacji 0,992; współczynnik nachylenia krzywej -3,318; wydajność reakcji PCR 100,2%.

Przedstawione dane (ryc. 9-17) świadczą o ustaleniu optymalnych warunków przebiegu reakcji ilościowej PCR (QPCR), które pozwoliły na pomiar względnej ilości mRNA genów badanych cytokin praktycznie ze 100% wydajnością i czystością.

5.2.2. Ocena ekspresji mRNA badanych cytokin pomiędzy grupami chorych na NZJ a grupą kontrolną

Wykorzystanie metody Livak'a oraz wiarygodność uzyskanych krzywych standardowych i topnienia pozwoliło obliczyć ekspresję RANKL, OPG i IL-33 względem ekspresji β -aktyny na poziomie mRNA w badanych próbach klinicznych (tab. 6).

Nie stwierdzono znamiennych różnic zestawiając wyniki ekspresji RANKL pomiędzy grupami chorych na NZJ a grupą osób zdrowych lub będących w remisji WZJG (ryc. 18, tab. 6), przy czym z wartościami grupy kontrolnej porównywano dane chorych uzyskane z tkanki zmienionej i niezmienionej zapalnie.

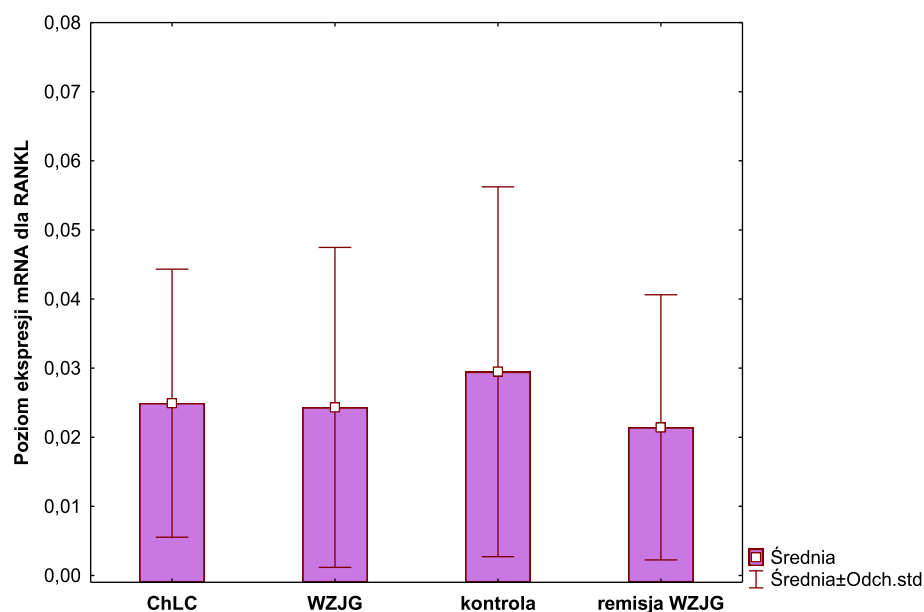
Analizując dane między badanymi grupami, stwierdzono, że najwyższa ekspresja OPG występuje w tkance zmienionej we WZJG w porównaniu do kontroli ($p < 0,0001$) i chorych w remisji WZJG ($p < 0,01$) (ryc. 19, tab. 6). Ekspresja OPG w tkance niezmienionej zapalnie we WZJG również była wyższa niż w kontroli ($p < 0,001$) i remisji WZJG ($p < 0,01$) (tab. 6). W ChLC nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji OPG zarówno w grupie chorych, jak i pomiędzy grupami (tab. 6).

Zestawiając poszczególne jednostki chorobowe z grupą kontrolną stwierdzono, że największa ekspresja IL-33 występuje u osób z WZJG i ChLC (ryc. 20, tab. 6), przy czym najwyższy poziom zanotowano nie tylko u chorych na WZJG (gdzie p względem grupy osób zdrowych wynosiło 0,0001), ale również w porównaniu do grupy osób w stanie remisji WZJG, gdzie także wykazano istotność statystyczną ($p < 0,05$) (ryc. 20, tab. 6). Nie stwierdzono znamiennych różnic pomiędzy tkanką niezmienioną pochodzącą od chorych a grupą kontrolną (tab. 6).

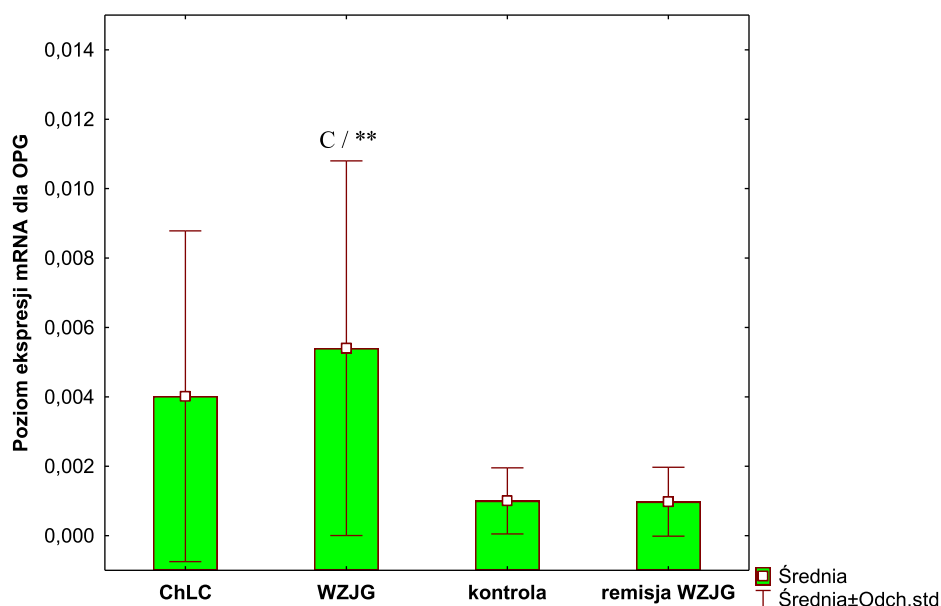
Tab. 6. Ekspresja RANKL, OPG i IL-33 na poziomie mRNA w tkance zmienionej i niezmienionej zapalnie w grupie chorych na ChLC, WZJG, osób zdrowych i osób z remisją WZJG

Ekspresja genu względem β -aktyny, średnia $\pm$ SD	ChLC (n=8)	WZJG (n=43)	Kontrola (n=31)	Chorzy na WZJG w stanie remisji (n=7)
RANKL (tkanka zmieniona)	0,02493 $\pm$ 0,01939	0,02431 $\pm$ 0,02314	-----	-----
RANKL (tkanka niezmieniona)	0,02269 $\pm$ 0,01546	0,01898 $\pm$ 0,01794	0,02947 $\pm$ 0,02676	0,02143 $\pm$ 0,01918
OPG (tkanka zmieniona)	0,00401 $\pm$ 0,00476	0,00540 ^{C / **} $\pm$ 0,00539	-----	-----
OPG (tkanka niezmieniona)	0,00116 $\pm$ 0,00095	0,00246 ^{B / **} $\pm$ 0,00239	0,001 $\pm$ 0,00095	0,00097 $\pm$ 0,00099
IL-33 (tkanka zmieniona)	0,00104 ^A $\pm$ 0,00087	0,00161 ^{C / *} $\pm$ 0,00152	-----	-----
IL-33 (tkanka niezmieniona)	0,00039 $\pm$ 0,00032	0,00051 $\pm$ 0,00049	0,0003 $\pm$ 0,00027	0,00053 $\pm$ 0,00055

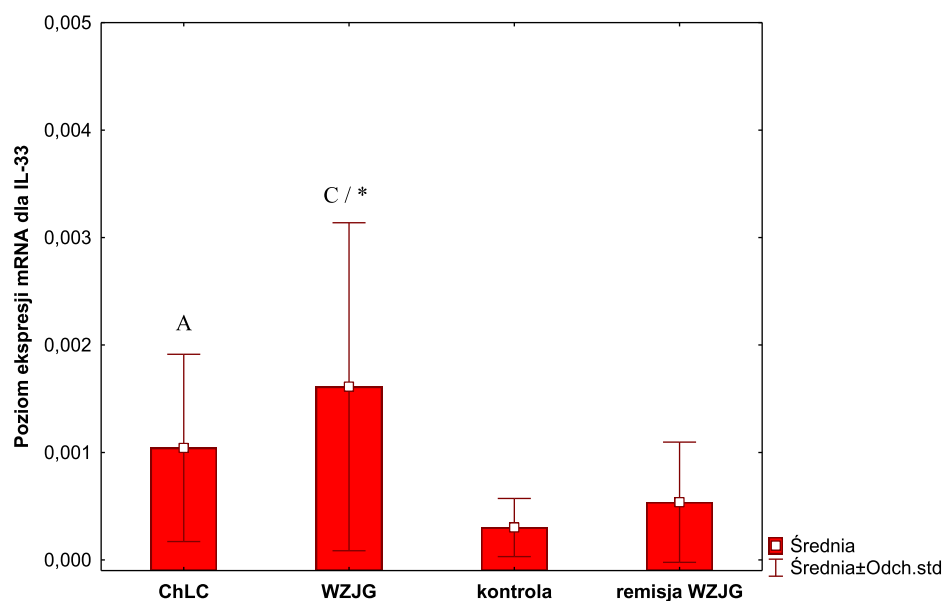
Wyniki przedstawiono w postaci średniej z uwzględnieniem odchylenia standardowego (SD),
^A p<0,01, ^B p<0,001, ^C p<0,0001 względem grupy kontrolnej. * p<0,05, ** p<0,01 względem
grupy chorych na WZJG w stanie remisji. Analizy wykonano za pomocą testu
U Manna-Whitney'a.



Ryc. 18. Ekspresja mRNA dla RANKL w tkance zmienionej w grupie chorych na ChLC (n=7), WZJG (n=43) i w tkance niezmiennionej w grupie kontrolnej (n=31) i w grupie z remisją WZJG (n=7). Wyniki przedstawiono w postaci średniej z uwzględnieniem odchylenia standardowego (SD) (test U Manna-Whitney'a). Pomiędzy grupami nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie.



Ryc. 19. Ekspresja mRNA dla OPG w tkance zmienionej w grupie chorych na ChLC (n=7), WZJG (n=35) i w tkance niezmiennionej w grupie kontrolnej (n=28) oraz w grupie z remisją WZJG (n=7). Wyniki przedstawiono w postaci średniej z uwzględnieniem odchylenia standardowego (SD) (test U Manna-Whitney'a), ^C $p < 0,0001$ względem grupy kontrolnej, ^{**} $p < 0,01$ względem grupy z remisją WZJG.



Ryc. 20. Ekspresja mRNA dla IL-33 w tkance zmienionej w grupie chorych na ChLC (n=7), WZJG (n=40) i w tkance niezmienionej w grupie kontrolnej (n=30) oraz w grupie z remisją WZJG (n=7). Wyniki przedstawiono w postaci średniej z uwzględnieniem odchylenia standardowego (SD) (test U Manna-Whitney'a), ^A $p < 0,01$ oraz ^C $p < 0,0001$ względem grupy kontrolnej, ^{*} $p < 0,05$ względem grupy z remisją WZJG.

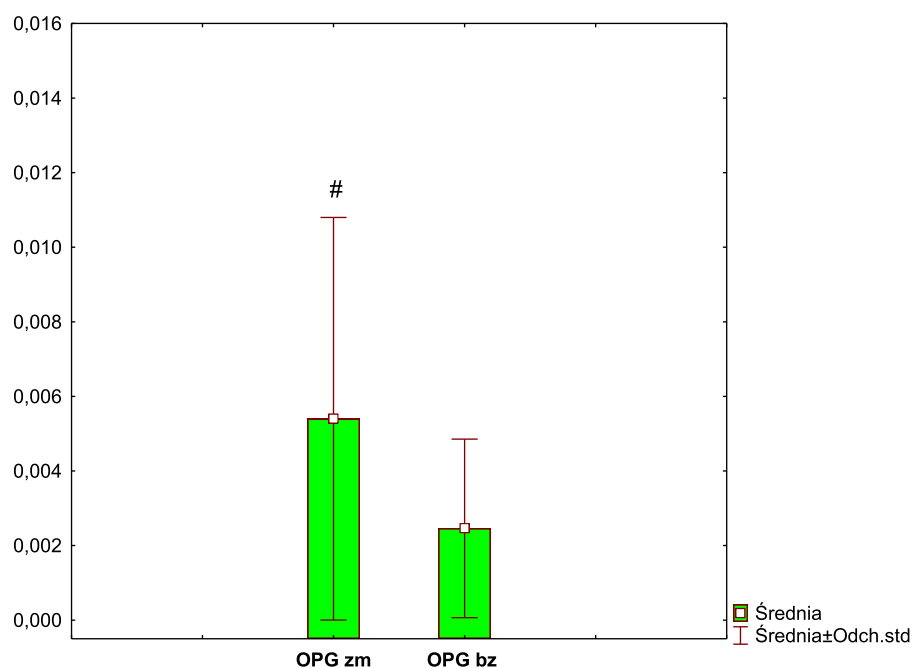
5.2.3. Ocena ekspresji mRNA badanych cytokin w tkance zmienionej i niezmienionej zapalnie u chorych na NZJ

Dla ustalenia zakresu zmian ekspresji cytokin w błonie śluzowej chorych na NZJ postanowiono zbadać materiał pobrany z miejsc określonych w badaniu endoskopowym jako zmieniony zapalnie (aktywny proces chorobowy) i niezmieniony zapalnie.

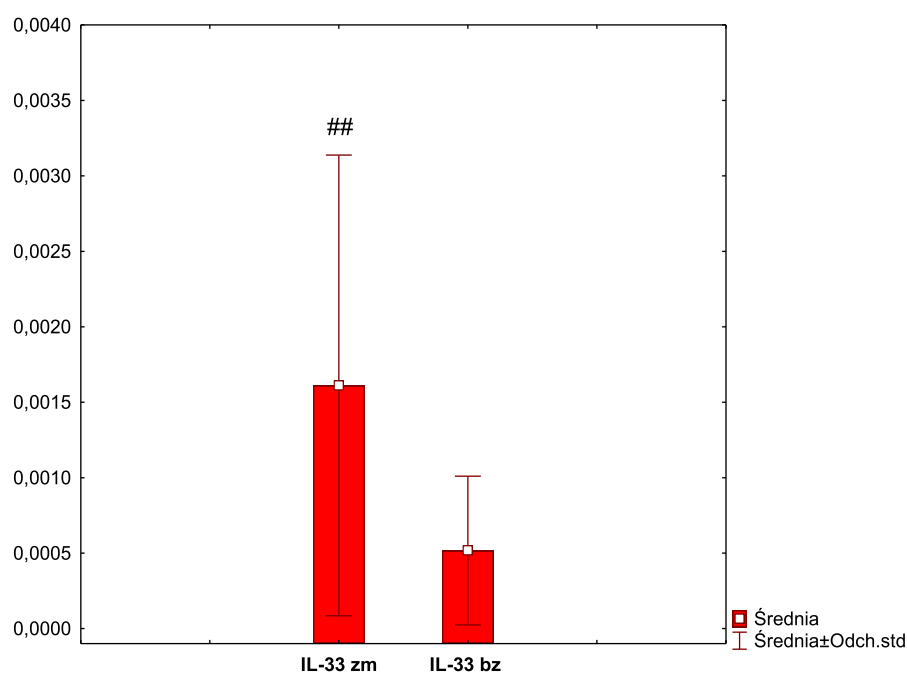
Ekspresja RANKL w obrębie grupy osób z WZJG, jak i ChLC (tab. 6), porównując tkankę zmienioną do niezmienionej zapalnie, nie wykazywała różnic istotnych statystycznie.

Pomiar względnej ekspresji OPG w biopsjach błony śluzowej wykazał znaczne różnice ($p < 0,05$) pomiędzy tkanką zmienioną zapalnie a niezmienioną, ale tylko w grupie chorych na WZJG (ryc. 21, tab. 6).

Poziom ekspresji IL-33 był wyższy w tkance zmienionej zapalnie względem tkanki niezmienionej, ale tylko w obrębie grupy chorych na WZJG i wykazywał wysoką istotność statystyczną ($p = 0,0001$) (ryc. 22, tab. 6).



Ryc. 21. Ekspresja mRNA dla OPG w tkance zmienionej (zm) i niezmienionej (bz) zapalnie w grupie chorych na WZJG (n=26). Wyniki przedstawiono w postaci średniej z uwzględnieniem odchylenia standardowego (SD), # $p=0,039$ względem tkanki niez zmienionej zapalnie (test Wilcoxona).

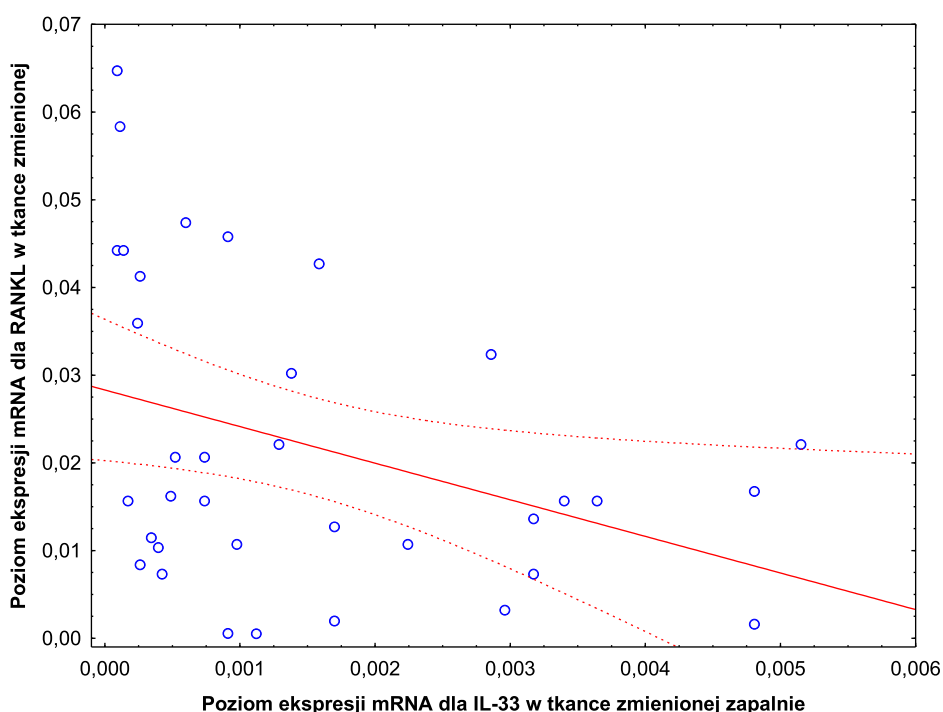


Ryc. 22. Ekspresja mRNA dla IL-33 w tkance zmienionej (zm) i niezmienionej (bz) zapalnie w grupie chorych na WZJG (n=27). Wyniki przedstawiono w postaci średniej z uwzględnieniem odchylenia standardowego (SD), ## $p=0,0001$ względem tkanki niez zmienionej zapalnie (test Wilcoxona).

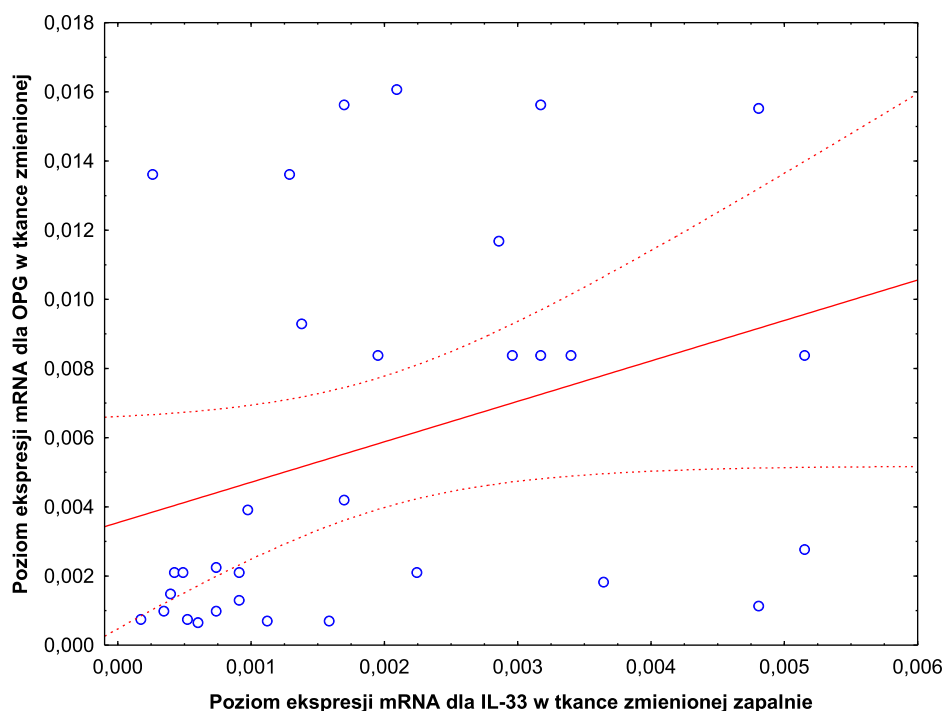
Analizując ekspresję badanych genów w tkance zmienionej i niezmienionej zapalnie, wyznaczono również zależności pomiędzy ekspresją genu dla RANKL a ekspresją genu dla IL-33 w tkance zmienionej zapalnie w grupie chorych na WZJG (ryc. 23), RANKL a IL-33 w tkance niezmienionej u osób zdrowych (Aneks, ryc. A1), OPG a IL-33 w tkance zmienionej u chorych na WZJG (ryc. 24), OPG a IL-33 w tkance niezmienionej u chorych w remisji WZJG (ryc. 25) i u osób zdrowych (Aneks, ryc. A2).

Zestawiając ekspresję mRNA dla RANKL względem ekspresji mRNA dla IL-33 w tkance zmienionej zapalnie w grupie chorych na WZJG uzyskano ujemną korelację ($r=-0,38$; $p<0,05$) (ryc. 23). Świadczy to o miejscowym spadku ekspresji RANKL wraz z nasileniem stanu zapalnego, którego wskaźnikiem jest IL-33.

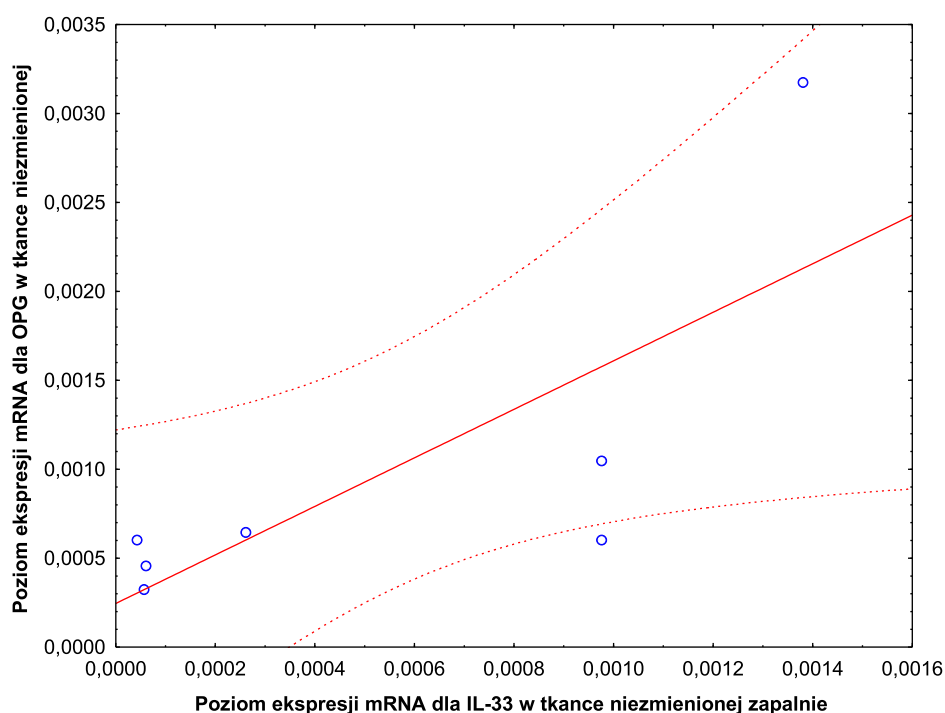
Odwrotną sytuację zaobserwowano w przypadku ekspresji OPG w tkance zmienionej, którą zestawiono z ekspresją IL-33. Wzmożony proces zapalny, któremu towarzyszył wzrost ekspresji IL-33, dodatnio korelował z poziomem mRNA dla OPG ($r=0,43$; $p<0,05$) (ryc. 24). Także w grupie z WZJG w stanie remisji stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy ekspresją OPG i IL-33 w tkance niezmienionej zapalnie ($r=0,75$; $p<0,05$) (ryc. 25). Nie zaobserwowano korelacji pomiędzy ekspresją mRNA dla RANKL i OPG względem IL-33 w tkance niezmienionej zapalnie w grupie osób zdrowych (Aneks, ryc. A1 i ryc. A2).



Ryc. 23. Wykres korelacji ekspresji mRNA dla RANKL względem ekspresji mRNA dla IL-33 w tkance zmienionej zapalnie w grupie chorych na WZJG ($n=35$) ($r=-0,38$; $p<0,05$) (korelacja porządku rang Spearmana).



Ryc. 24. Wykres korelacji ekspresji mRNA dla OPG względem ekspresji mRNA dla IL-33 w tkance zmienionej zapalnie w grupie chorych na WZJG ($n=32$) ($r=0,43$; $p<0,05$) (korelacja porządku rang Spearmana).



Ryc. 25. Wykres korelacji ekspresji mRNA dla OPG względem ekspresji mRNA dla IL-33 w tkance niezmienionej zapalnie w grupie chorych na WZJG w stanie remisji ($n=7$) ($r=0,75$; $p<0,05$) (korelacja porządku rang Spearmana).

Podsumowanie

- Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w ekspresji mRNA dla RANKL pomiędzy grupami chorych na NZJ a grupą osób zdrowych i będących w remisji WZJG.
- Poziom ekspresji mRNA dla OPG w grupie chorych na WZJG (tkanka niezmienniona i zmieniona zapalnie) był wyższy w porównaniu do osób zdrowych i grupy chorych w stanie remisji WZJG.
- Poziom ekspresji mRNA dla IL-33 w grupie chorych na WZJG i ChLC (tkanka zmieniona zapalnie) był wyższy w porównaniu do grupy osób zdrowych i grupy osób w stanie remisji WZJG.
- Analiza ekspresji OPG i IL-33 na poziomie mRNA w tkance zmienionej i niezmiennionej zapalnie u chorych na WZJG wykazała istotny statystycznie wzrost ekspresji zarówno OPG, jak i IL-33 w tkance zmienionej zapalnie. Nie stwierdzono różnic w ekspresji RANKL pomiędzy tkanką zmienioną i niezmienną w błonie śluzowej chorych na WZJG i ChLC.
- Wykazano ujemną korelację pomiędzy ekspresją mRNA dla RANKL względem ekspresji genu dla IL-33 w tkance zmienionej zapalnie w grupie chorych na WZJG.
- Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy ekspresją mRNA dla OPG względem ekspresji genu dla IL-33 w tkance zmienionej zapalnie w grupie chorych na WZJG oraz w tkance niezmiennionej zapalnie w grupie chorych na WZJG w stanie remisji.

5.3. Stężenie całkowitego sRANKL, OPG, IL-33 i C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I w surowicy krwi chorych na ChLC, WZJG oraz w grupie kontrolnej

Do określenia stężenia badanych cytokin w surowicy krwi użyto testu immunoenzymatycznego ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay), zaś wyniki zestawiono w tabeli 7.

Stężenia całkowitego sRANKL w grupach chorych na NZJ w porównaniu do kontroli nie wykazywały istotnych różnic (ryc. 26, tab. 7).

Stężenie OPG było znamienne wyższe w grupach chorych na ChLC oraz WZJG, odpowiednio o 59% i 44%, w stosunku do grupy osób zdrowych (ryc. 27, tab. 7).

Średnie wartości stężenia IL-33 (20-22 kDa) w surowicy krwi we wszystkich przebadanych grupach oscylowały wokół granicy czułości testu, która wynosiła 4,14 pg/ml (tab. 7).

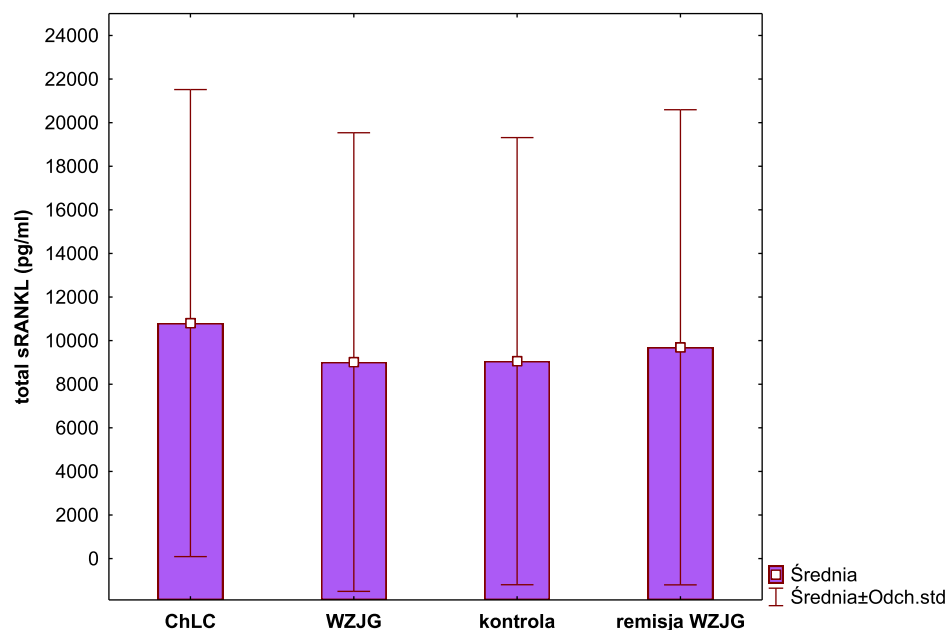
Grupa kontrolna, do której odnoszono dane chorych na NZJ, składała się z 24 zdrowych osób, zaś średnie stężenie C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I (CTX), markera resorpcji kości, wynosiło 0,191 ng/ml (tab. 7). Uzyskana wartość była zbliżona z ustalonymi przez producenta (Immunodiagnostic Systems Ltd, Wielka Brytania) wynikami dla przebadanych 351 zdrowych osób, gdzie średnia wynosiła 0,29 ng/ml.

Średnie stężenie C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I było 2,5-krotnie oraz 3-krotnie wyższe, odpowiednio u chorych na ChLC i WZJG, w porównaniu do grupy kontrolnej. Mimo, że grupa chorych z remisją WZJG była nieliczna, również u tych pacjentów zaobserwowano blisko 3-krotny wzrost stężenia C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I (ryc. 28, tab. 7).

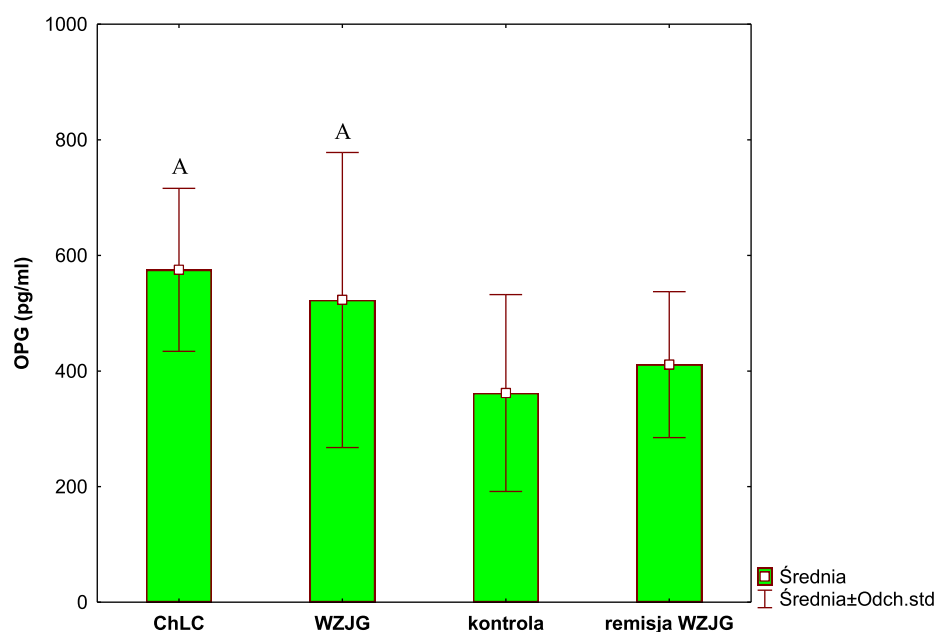
Tab. 7. Stężenie całkowitego sRANKL, OPG, IL-33 i C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I (CTX) w surowicy krwi w grupie chorych na ChLC, WZJG, osób zdrowych oraz osób z remisją WZJG

Stężenie badanego białka, średnia ± SD	ChLC (n=10)	WZJG (n=46)	Kontrola (n=24)	Chorzy na WZJG w stanie remisji (n=7)
sRANKL [pg/ml]	10804 ± 10713	9015 ± 10520	9055 ± 10257	9694 ± 10897
OPG [pg/ml]	575 ^A ± 141	523 ^A ± 255	362 ± 170	411 ± 126
IL-33 [pg/ml]	< 4,14	< 4,14	< 4,14	< 4,14
CTX [ng/ml]	0,505 ^C ± 0,323	0,572 ^D ± 0,460	0,191 ± 0,175	0,541 ^B ± 0,157

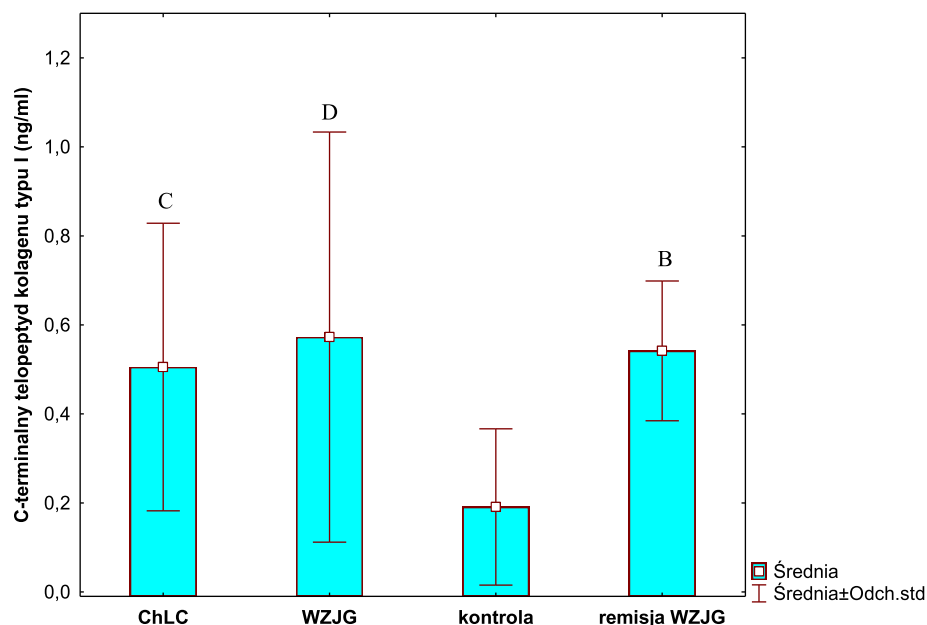
Wyniki przedstawiono w postaci średniej z uwzględnieniem odchylenia standardowego (SD), ^A p<0,05, ^B p<0,01, ^C p<0,005, ^D p<0,0005 względem grupy kontrolnej. Analizy wykonano za pomocą testu U Manna-Whitney'a.



Ryc. 26. Stężenie sRANKL w surowicy chorych na ChLC (n=10), WZJG (n=44), osób zdrowych (n=24) oraz w grupie z remisją WZJG (n=7). Wyniki przedstawiono w postaci średniej z uwzględnieniem odchylenia standardowego (SD) (test U Manna-Whitney'a). Brak różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupami.



Ryc. 27. Stężenie OPG w surowicy chorych na ChLC (n=7), WZJG (n=46), osób zdrowych (n=23) oraz w grupie z remisją WZJG (n=7). Wyniki przedstawiono w postaci średniej z uwzględnieniem odchylenia standardowego (SD) (test U Manna-Whitney'a), ^A $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej.



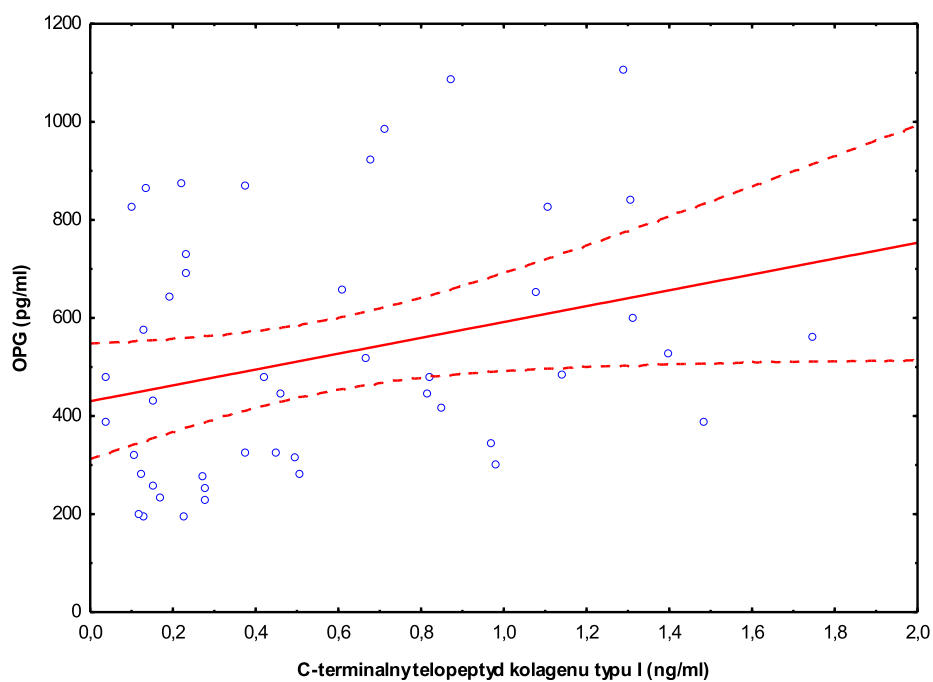
Ryc. 28. Stężenie C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I w surowicy chorych na ChLC ($n=10$), WZJG ($n=46$), osób zdrowych ($n=24$) oraz w grupie z remisją WZJG ($n=7$). Wyniki przedstawiono w postaci średniej z uwzględnieniem odchylenia standardowego (SD) (test U Manna-Whitney'a), ^B $p<0,01$, ^C $p<0,005$, ^D $p<0,0005$ względem grupy kontrolnej.

W oparciu o uzyskane wyniki przeanalizowano zależności pomiędzy stężeniem OPG a poziomem C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I (marker resorpcji kości) w grupie chorych na WZJG, ChLC i w grupie kontrolnej (ryc. 29, A3 i A4).

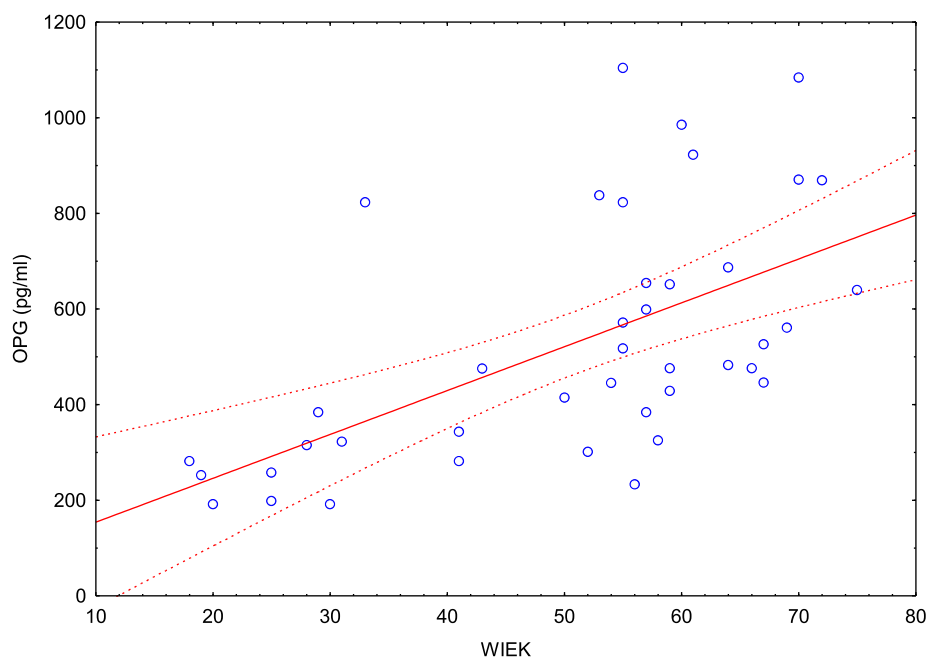
W grupie chorych na WZJG uzyskano dodatnią korelację między stężeniem OPG a poziomem C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I ($r=0,31$; $p<0,05$) (ryc. 29). Natomiast u osób z ChLC (Aneks, ryc. A3) oraz w grupie kontrolnej (Aneks, ryc. A4) nie stwierdzono jakiegokolwiek zależności pomiędzy poziomem OPG a stężeniem C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I w surowicy krwi.

Analiza zależności pomiędzy stężeniami sRANKL i C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I w grupie chorych na WZJG, ChLC oraz w grupie kontrolnej nie wykazała istnienia istotnych statystycznie korelacji (Aneks, ryc. A5, A6 i A7).

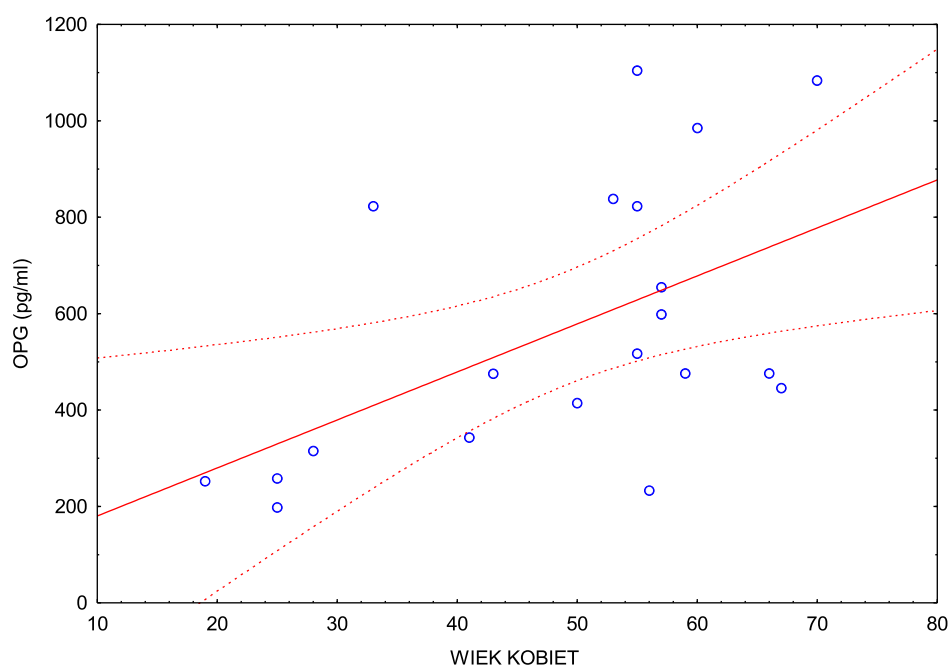
Przeanalizowano również zależność pomiędzy stężeniem OPG a wiekiem w grupie chorych na WZJG i otrzymano istotną statystycznie dodatnią korelację (ryc. 30 i 31). Korelacja ta była równie silnie zaznaczona w grupie kobiet chorych na WZJG (ryc. 31). Z kolei zestawienie stężenia OPG i wieku w grupie kontrolnej nie wykazało istnienia korelacji (Aneks, ryc. A8).



Ryc. 29. Wykres korelacji stężenia OPG (pg/ml) względem stężenia C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I (ng/ml) w grupie chorych na WZJG ($n=46$) ($r=0,31$; $p<0,05$) (korelacja porządku rang Spearmana).



Ryc. 30. Wykres korelacji stężenia OPG (pg/ml) względem wieku w grupie osób z WZJG ($n=41$) ($r=0,66$; $p<0,05$) (korelacja porządku rang Spearmana).



Ryc. 31. Wykres korelacji stężenia OPG (pg/ml) względem wieku w grupie kobiet z WZJG ($n=20$) ($r=0,52$; $p<0,05$) (korelacja porządku rang Spearmana).

Podsumowanie

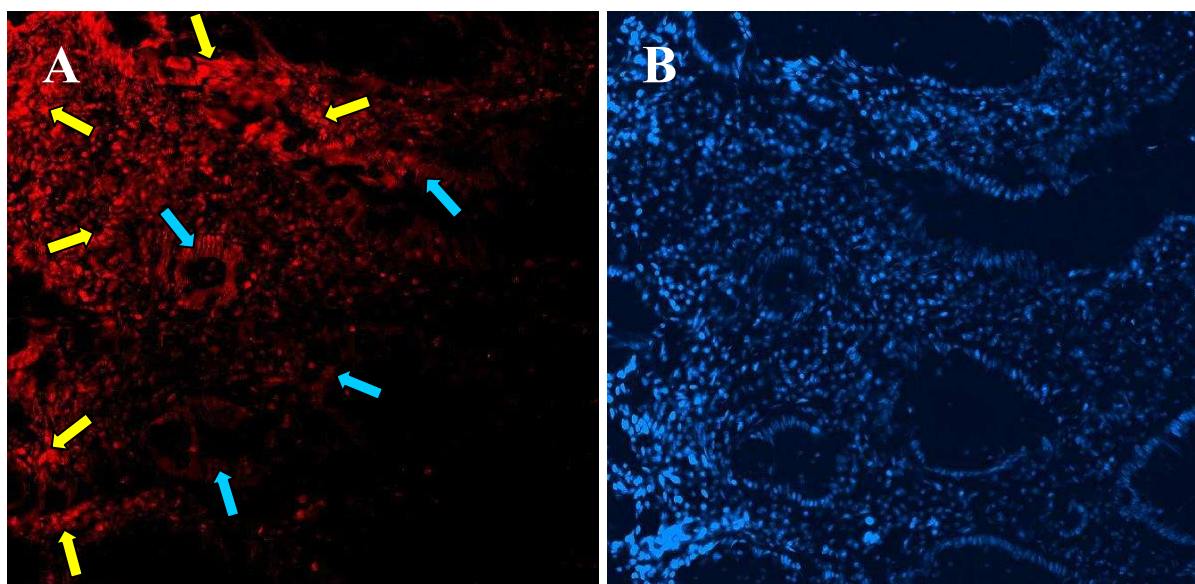
- Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w stężeniu całkowitego sRANKL w surowicy krwi pomiędzy przebadanymi grupami.
- Stężenie OPG w surowicy krwi w grupie chorych na ChLC i WZJG było wyższe w porównaniu do grupy osób zdrowych.
- Stężenie IL-33 w surowicy przebadanych grup było na granicy detekcji lub poniżej tego poziomu.
- Stężenie C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I w surowicy chorych na ChLC, WZJG oraz osób w stanie remisji WZJG było kilkakrotnie wyższe w porównaniu do stężenia tego białka w surowicy osób zdrowych.
- Zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem OPG a poziomem C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I w surowicy krwi w grupie chorych na WZJG.
- Wykazano istnienie silnej, dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem OPG w surowicy krwi a wiekiem chorych na WZJG oraz brak takiej zależności w przypadku osób zdrowych.

5.4. Lokalizacja ekspresji RANKL, OPG oraz IL-33 na poziomie mikroskopu w skrawkach mrożeniowych u chorych na WZJG oraz w grupie kontrolnej

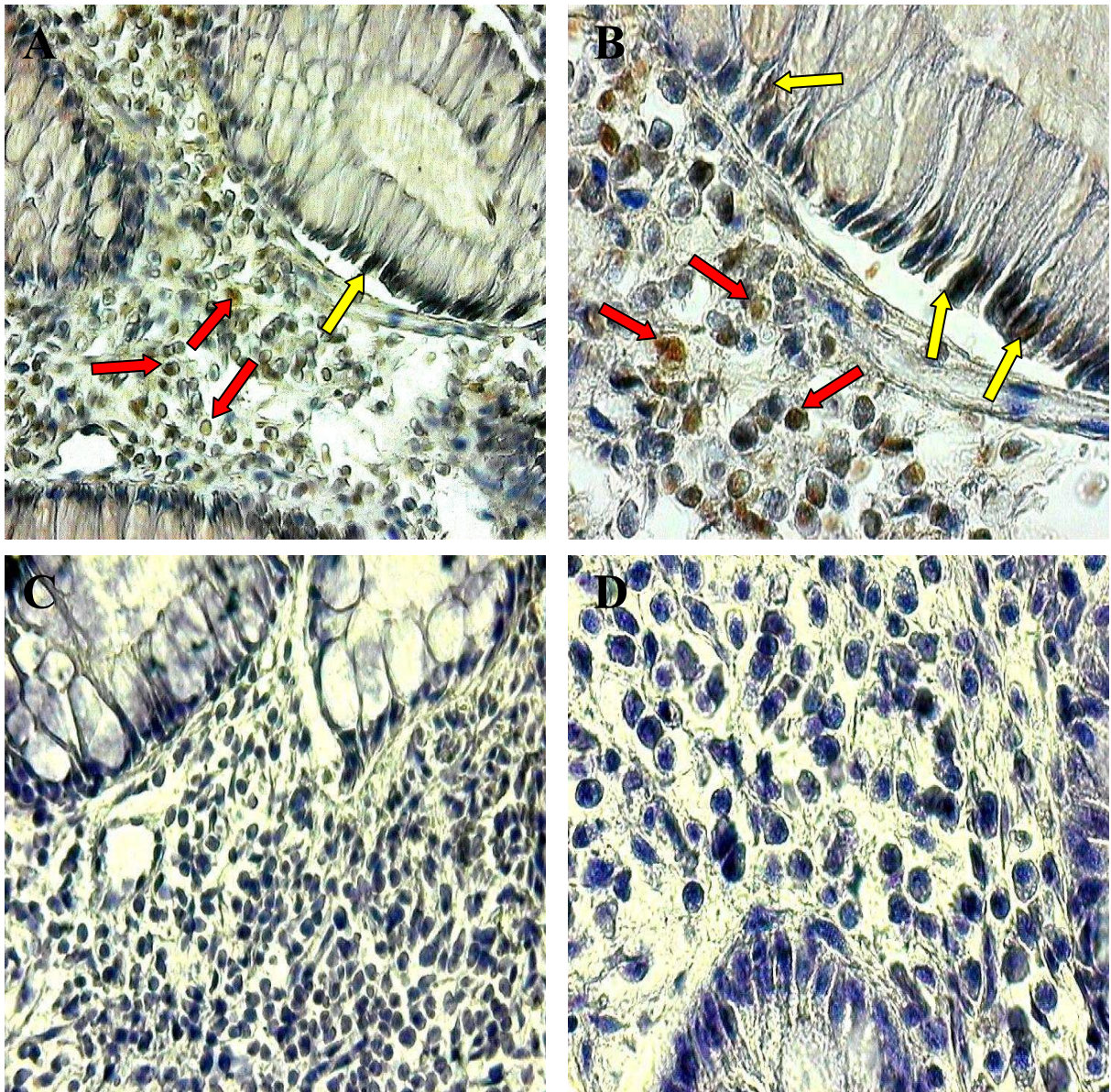
W celu określenia lokalizacji ekspresji badanych cytokin w biopsjach błony śluzowej zastosowano techniki immunohistochemiczne (immunofluorescencję, ryc. 32, 34, 35, 37, 39, 41 oraz metodę ABC w przypadku mikroskopu świetlnego, ryc. 33, 36, 38, 40). Procedurze immunohistochemicznej poddano tylko tkankę pochodzącą od chorych na WZJG, ponieważ ilość materiału od osób z ChLC była niewystarczająca. Kontrolę negatywną stanowiły skrawki mrożeniowe, które nie były inkubowane z przeciwciałami pierwotnymi.

5.4.1. Obecność RANKL w biopsjach chorych na WZJG i w grupie kontrolnej

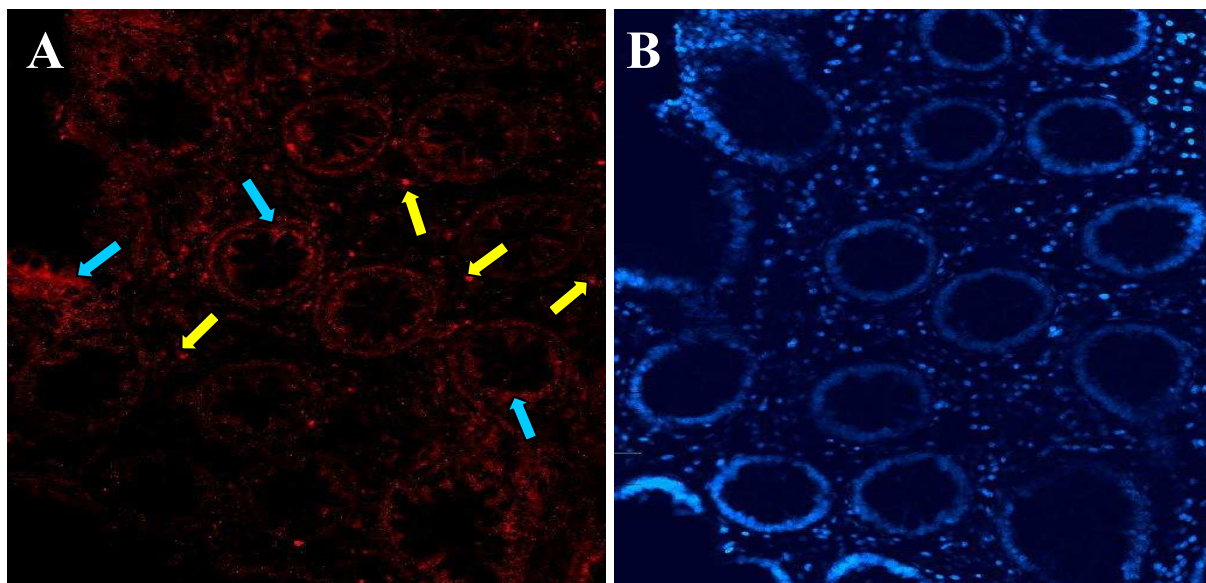
Błaszczkę właściwą (lamina propria mucosae) błony śluzowej chorych na WZJG charakteryzowała obecność dużej ilości komórek jednojądrzastych (ryc. 32, 33, 35, 36, 39, 40). Komórki syntetyzujące RANKL zaobserwowano w blaszce właściwej błony śluzowej zarówno w grupie chorych na WZJG, jak i w grupie kontrolnej (ryc. 32-34). Kolejnym źródłem RANKL, w obu przebadanych grupach, był nabłonek gruczołów jelitowych (ryc. 32-34).



Ryc. 32. Ekspresja RANKL (Texas red - czerwony kolor) w błonie śluzowej zmienionej zapalnie u chorego na WZJG. A) Reakcję immunopozytywną zaobserwowano pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej (żółte strzałki) oraz w nabłonku krypt (niebieskie strzałki). B) Ten sam skrawek z podbarwionymi jądrami komórkowymi (DAPI - niebieski kolor). W błonie śluzowej widoczne są nacieki komórek jednojądrzastych. A) i B) - powiększenie - 200X.



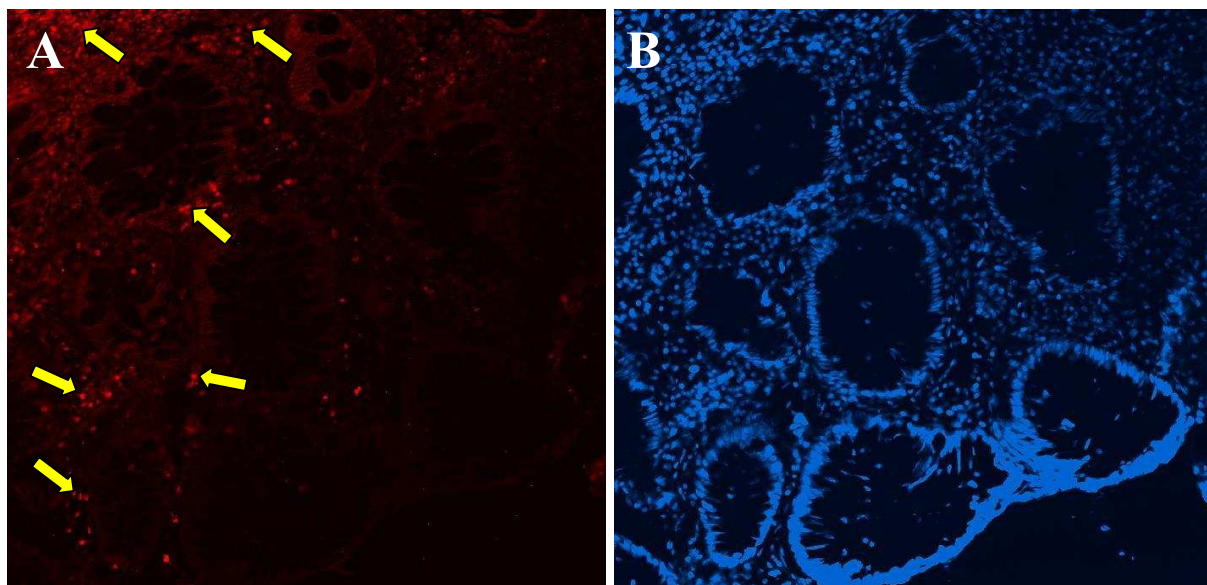
Ryc. 33. Ekspresja RANKL (brązowy kolor) w błonie śluzowej zmienionej zapalnie u chorego na WZJG. A) Widoczne są nacieki komórek jednojądrzastych. Reakcję immunopozytywną zaobserwowano pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej (czerwone strzałki) oraz w nabłonku krypt (enterocyty) (żółte strzałki), powiększenie - 400X, B) powiększenie - 1000X, C) i D) kontrola negatywna, brak reakcji pozytywnej (powiększenia odpowiednio: 400X i 1000X), A), B), C) i D) jądra komórkowe zostały podbarwione hematoksyliną.



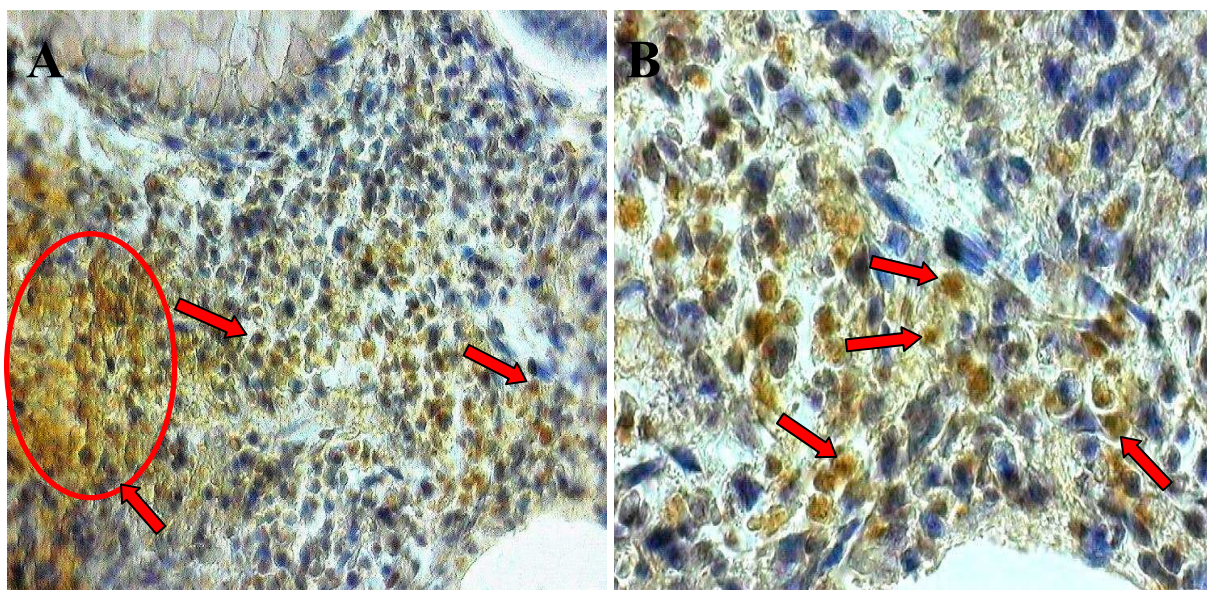
Ryc. 34. Ekspresja RANKL (Texas red - czerwony kolor) w błonie śluzowej niezmiętej zapalnie u osoby zdrowej. A) Reakcję immunopozytywną zaobserwowano pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej (żółte strzałki) oraz w nabłonku krypt (niebieskie strzałki). B) Ten sam skrawek z podbarwionymi jądrami komórkowymi (DAPI - niebieski kolor). Brak nacieków komórek jednojądrzastych w błonie śluzowej. A) i B) - powiększenie - 200X.

5.4.2. Obecność OPG w biopsjach chorych na WZJG i w grupie kontrolnej

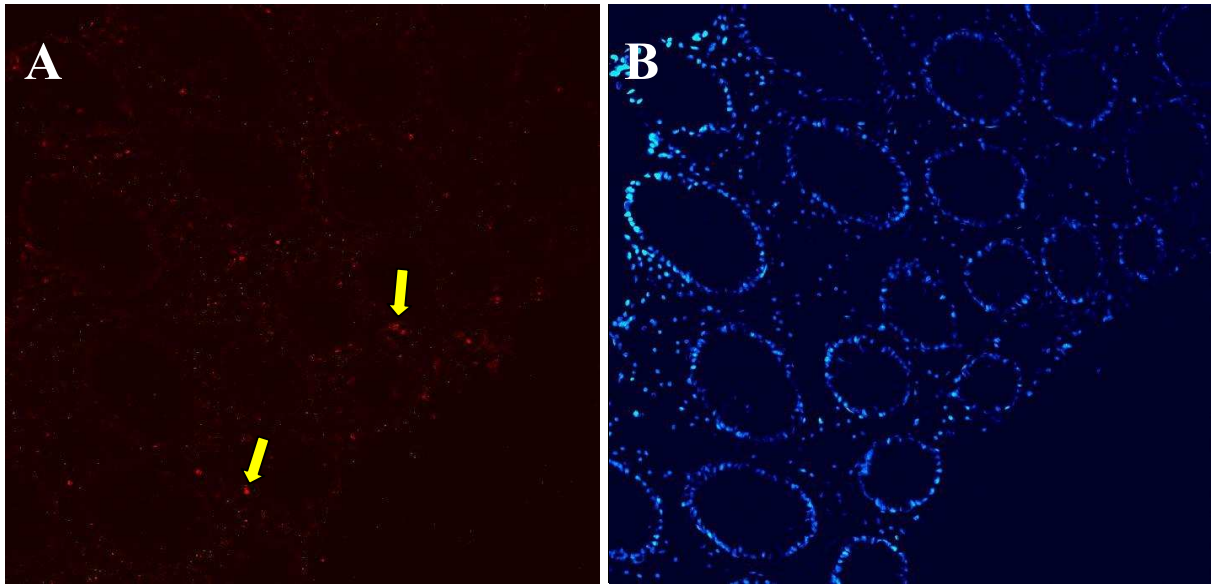
Komórki syntetyzujące OPG widoczne były w blaszce właściwej błony śluzowej zarówno w grupie chorych na WZJG, jak i w grupie kontrolnej (ryc. 35-38). Ilość komórek jednojądrzastych wykazujących immunoreaktywność była zdecydowanie większa w grupie chorych na WZJG (ryc. 35 i 36) w porównaniu do grupy osób zdrowych (ryc. 37 i 38).



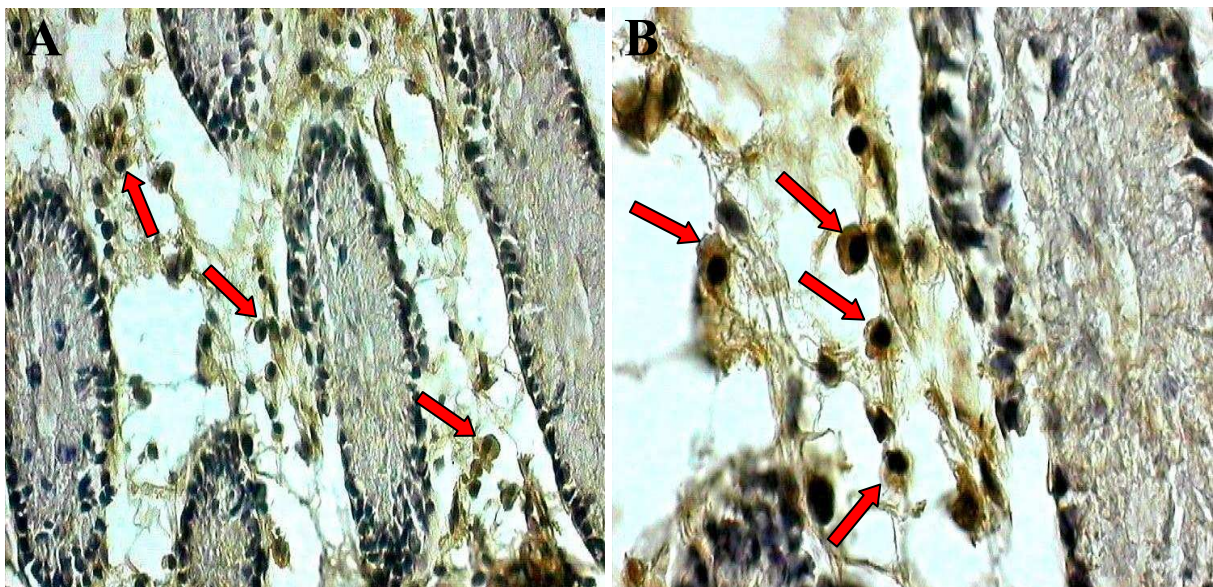
Ryc. 35. Ekspresja OPG (Texas red - czerwony kolor) w błonie śluzowej zmienionej zapalnie u chorego na WZJG. A) Reakcję immunopozytywną zaobserwowano pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej (żółte strzałki). B) Ten sam skrawek z podbarwionymi jądrami komórkowymi (DAPI - niebieski kolor). W błonie śluzowej widoczne są nacieki komórek jednojądrzastych. A) i B) - powiększenie - 200X.



Ryc. 36. Ekspresja OPG (brązowy kolor) w błonie śluzowej zmienionej zapalnie u chorego na WZJG. A) Widoczne są nacieki komórek jednojądrzastych. Reakcję immunopozytywną zaobserwowano pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej (czerwone strzałki), powiększenie - 400X, B) powiększenie - 1000X, A) i B) jądra komórkowe zostały podbarwione hematoksyliną.



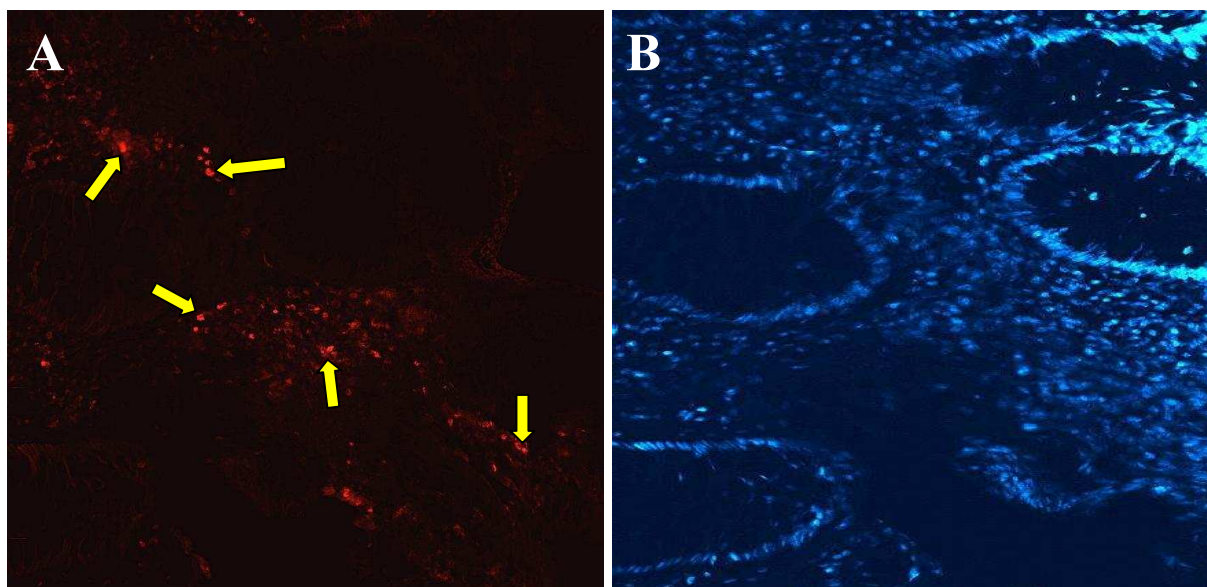
Ryc. 37. Ekspresja OPG (Texas red - czerwony kolor) w błonie śluzowej niezmiętej zapalnie u osoby zdrowej. A) Reakcję immunopoztywną zaobserwowano pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej (żółte strzałki). B) Ten sam skrawek z podbarwionymi jądrami komórkowymi (DAPI - niebieski kolor). W błonie śluzowej nie zaobserwowano nacieków komórek jednojądrzastych. A) i B) - powiększenie - 200X.



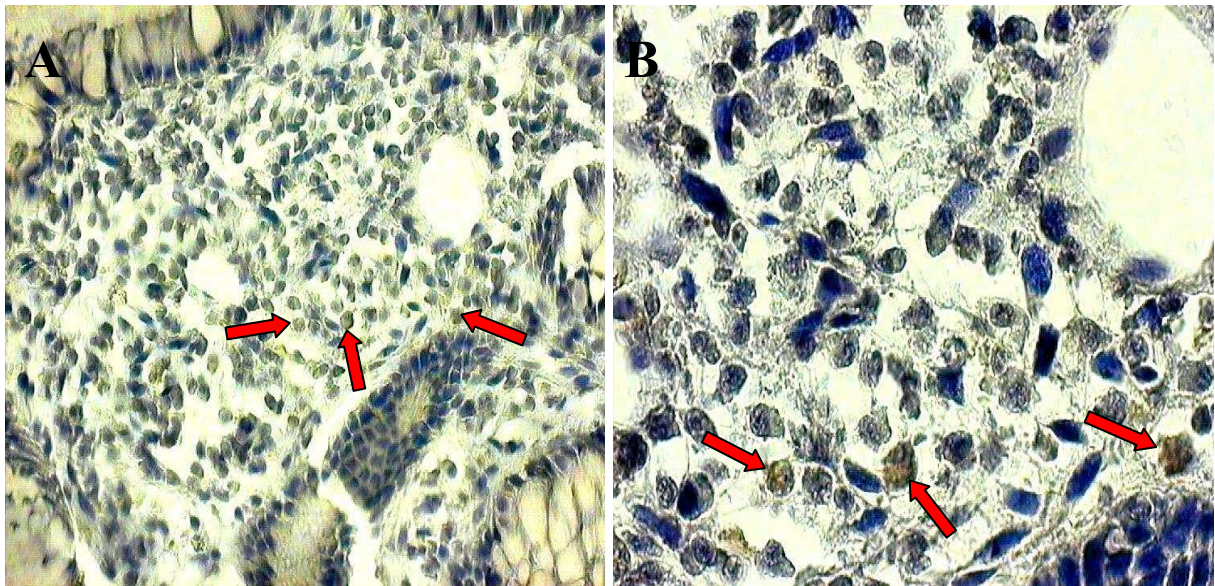
Ryc. 38. Ekspresja OPG (brązowy kolor) w błonie śluzowej niezmiętej zapalnie u osoby zdrowej. A) Reakcję immunopoztywną zaobserwowano pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej (czerwone strzałki), powiększenie - 400X, B) powiększenie - 1000X, A) i B) jądra komórkowe zostały podbarwione hematoksyliną.

5.4.3. Obecność IL-33 w biopsjach chorych na WZJG i w grupie kontrolnej

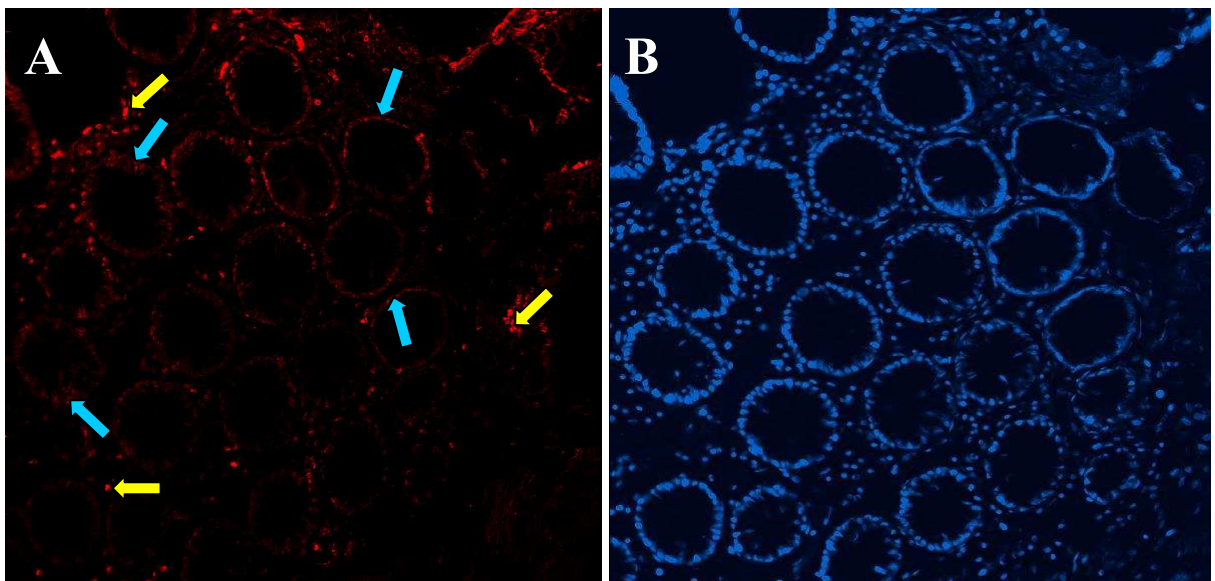
Komórki wykazujące immunoreaktywność zaobserwowano w blaszce właściwej błony śluzowej w grupie chorych na WZJG i w grupie kontrolnej (ryc. 39-41). Reakcję immunopozytywną stwierdzono także w nabłonku gruczołów jelitowych, ale tylko w biopsjach niezmiennionych zapalnie pochodzących od osób zdrowych (ryc. 41).



Ryc. 39. Ekspresja IL-33 (Texas red - czerwony kolor) w błonie śluzowej zmienionej zapalnie u chorego na WZJG. A) Reakcję immunopozytywną zaobserwowano pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej (żółte strzałki). B) Ten sam skrawek z podbarwionymi jądrami komórkowymi (DAPI - niebieski kolor). W błonie śluzowej widoczne są nacieki komórek jednojądrzastych. A) i B) - powiększenie - 200X.



Ryc. 40. Ekspresja IL-33 (brązowy kolor) w błonie śluzowej zmienionej zapalnie u chorego na WZJG. A) Widoczne są nacieki komórek jednojądrzastych. Reakcję immunopozytywną zaobserwowano pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej (czerwone strzałki), powiększenie - 400X, B) powiększenie - 1000X, A) i B) jądra komórkowe zostały podbarwione hematoksyliną.



Ryc. 41. Ekspresja IL-33 (Texas red - czerwony kolor) w błonie śluzowej niezmienionej zapalnie u osoby zdrowej. A) Reakcję immunopozytywną zaobserwowano pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej (żółte strzałki) oraz w nabłonku krypt (niebieskie strzałki). B) Ten sam skrawek z podbarwionymi jądrami komórkowymi (DAPI - niebieski kolor). W błonie śluzowej brak nacieków komórek jednojądrzastych. A) i B) - powiększenie - 200X.

Podsumowanie

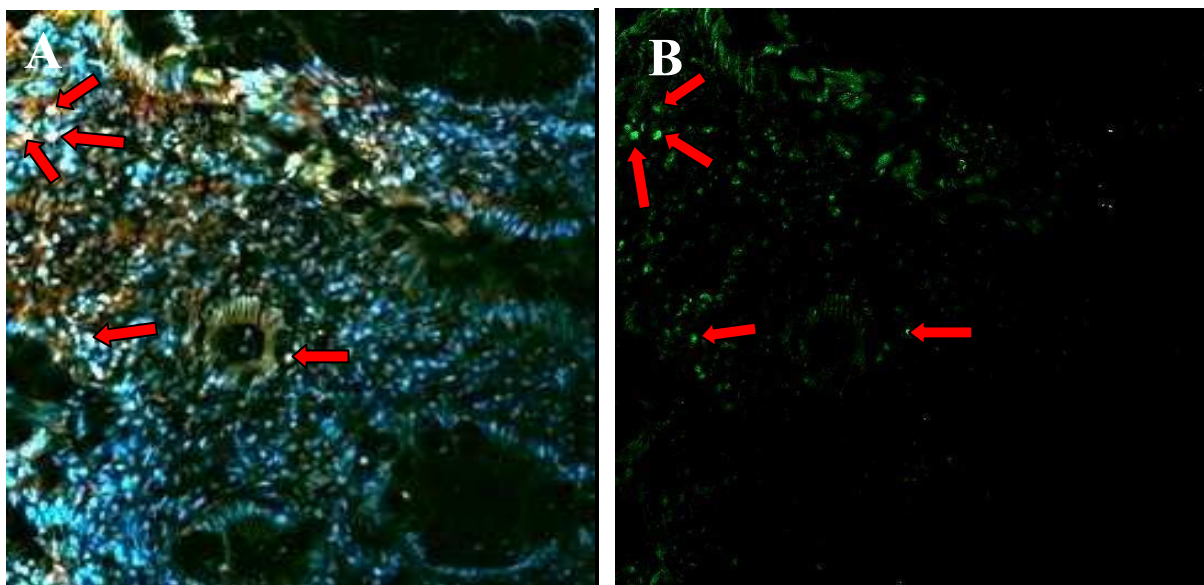
- W obrębie błony śluzowej u osób chorych na WZJG stwierdzono liczne nacieki komórek jednojądrzastych. Poza tym, architektura krypt nie wykazywała istotnych różnic w porównaniu do tkanki niezmienionej zapalnie.
- Zarówno u chorych na WZJG, jak i u osób zdrowych, ekspresję RANKL zaobserwowano w błonie śluzowej pomiędzy gruczołami jelitowymi, w obrębie blaszki właściwej (lamina propria mucosae) oraz w nabłonku krypt. Lokalizacja RANKL u chorych na WZJG ograniczała się głównie do komórek nacieku zapalnego, zaś u osób zdrowych obecność tej cytokiny charakteryzowała przede wszystkim komórki nabłonka krypt, czyli enterocyty.
- Głównym źródłem OPG są komórki jednojądrzaste obecne w nacieku zapalnym błony śluzowej, zlokalizowane pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej. Ilość komórek OPG⁺ zdecydowanie przeważała u chorych na WZJG w porównaniu do grupy kontrolnej.
- U chorych na WZJG ekspresja IL-33 obejmowała w większości komórki jednojądrzaste stanu zapalnego, obecne w błonie śluzowej, pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej. Liczba komórek IL-33⁺ u chorych na WZJG była wyraźnie większa w zestawieniu do osób zdrowych. Ponadto, w grupie kontrolnej stwierdzono reakcję immunopozytywną dla IL-33 zlokalizowaną w nabłonku krypt.

5.5. Kolokalizacja RANKL, OPG, IL-33 i CD3 na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego w skrawkach mrożeniowych u chorych na WZJG

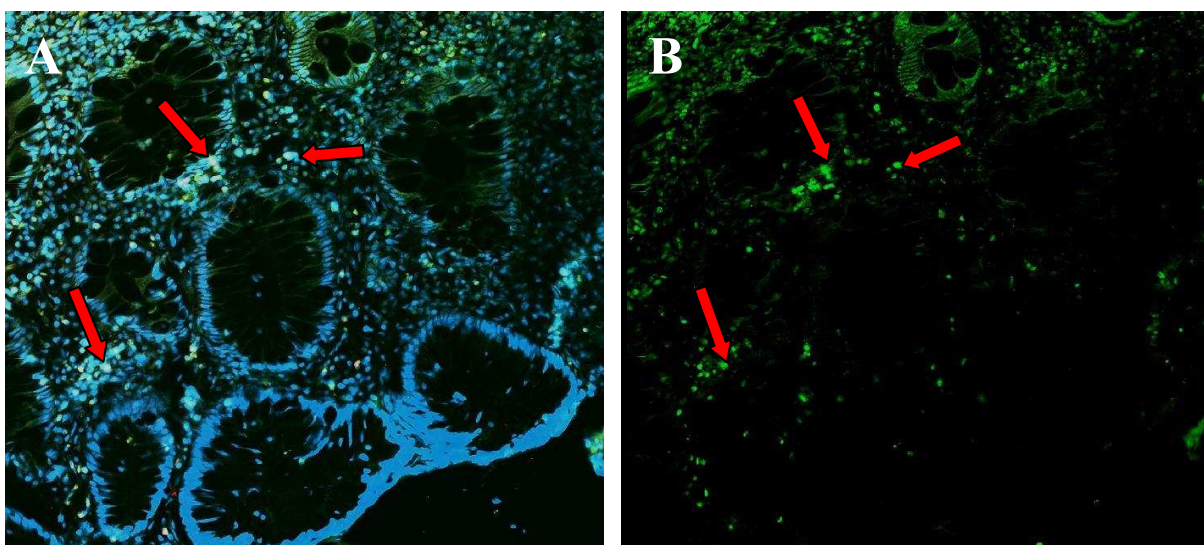
W oparciu o dane z piśmiennictwa postanowiono sprawdzić, jaka rolę w sekrecji badanych cytokin odgrywają limfocyty T. Z tego względu wykonano podwójne barwienia metodą fluorescencyjną, wykorzystując przeciwciała anty-CD3, przeciwko uniwersalnemu markerowi limfocytów T, oraz przeciwciała swoiste dla badanych cytokin (ryc. 42-45).

Jednym ze źródeł RANKL i OPG są limfocyty T obecne w zgrupowaniu komórek jednojądrzastych nacieku zapalnego zlokalizowanego w blaszce właściwej błony śluzowej. Wskazuje na to wynik podwójnego barwienia, którego rezultatem była kolokalizacja tych białek razem z markerem limfocytów T (ryc. 42-44).

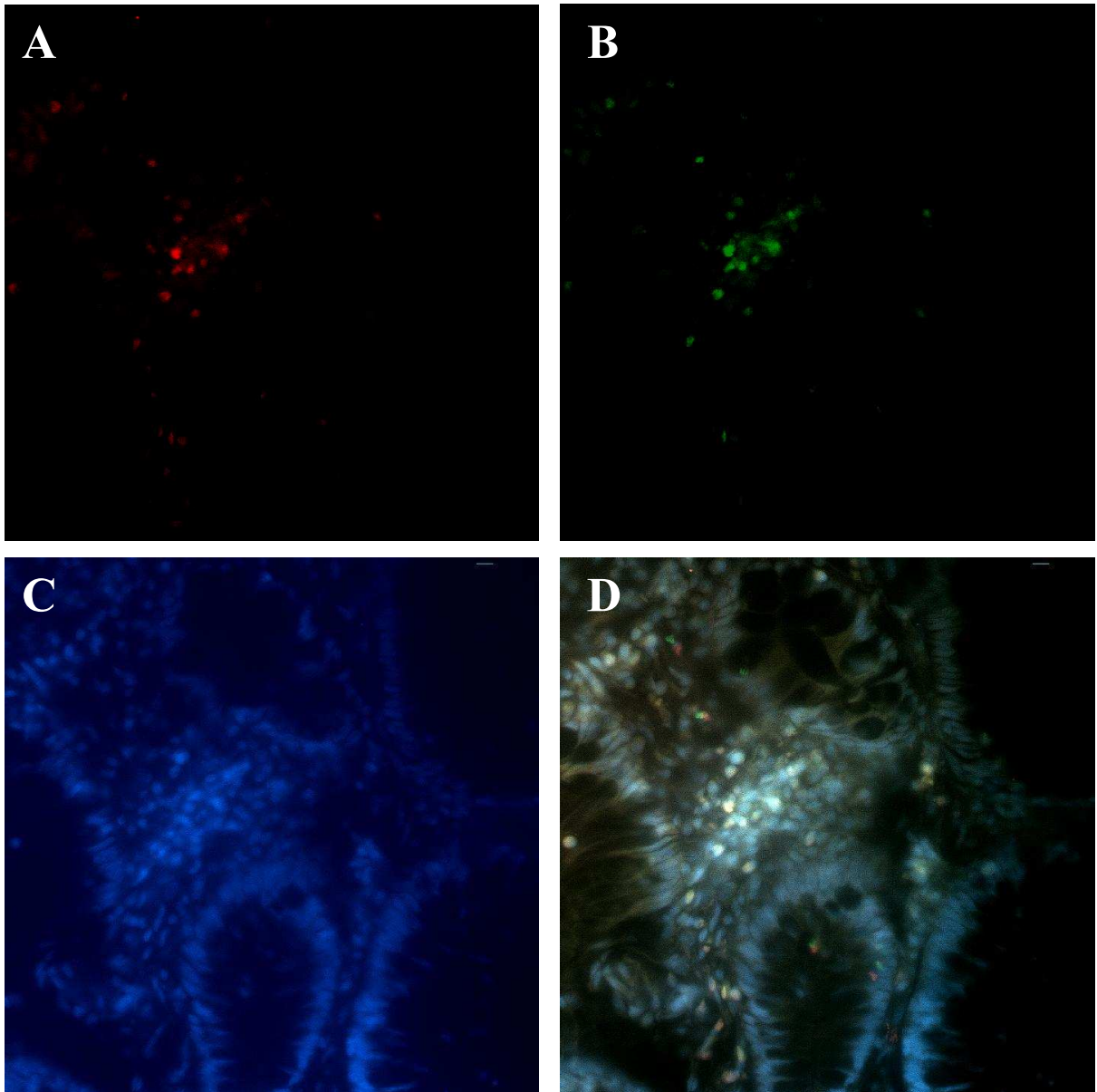
Natomiast ocena kolokalizacji IL-33 i CD3 nie była jednoznaczna, ponieważ zaobserwowano tylko pojedyncze komórki, które wykazywały specyficzne świecenie (ryc. 45).



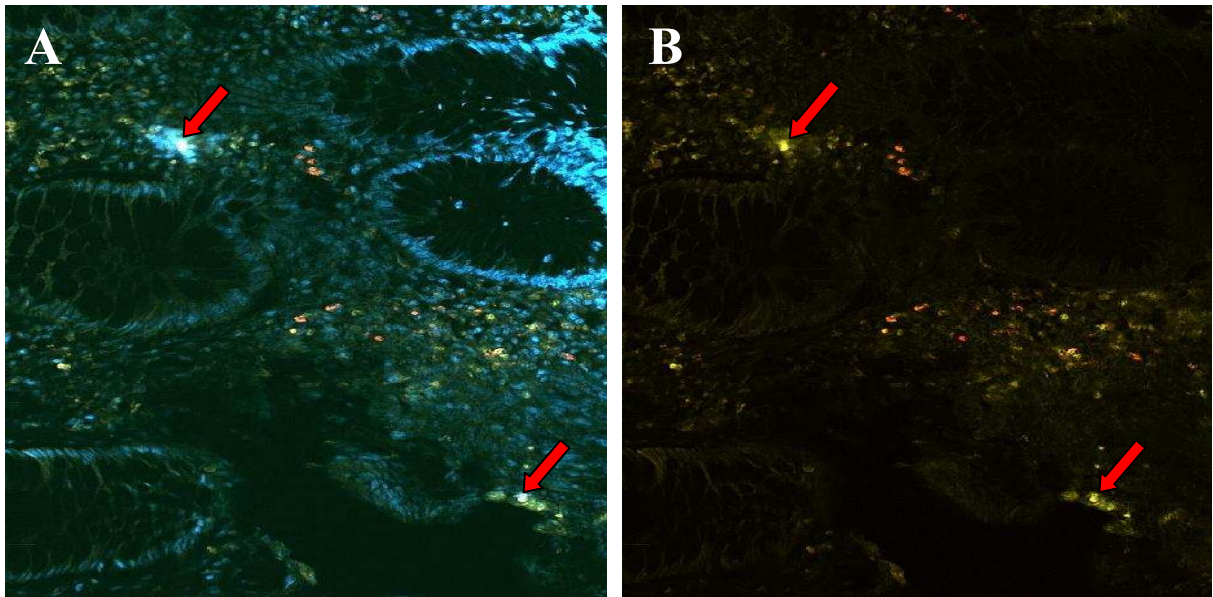
Ryc. 42. A) RANKL (Texas red - czerwony kolor), CD3 (Alexa 488 - zielone świecenie) oraz jądra komórkowe (DAPI - niebieski kolor) w błonie śluzowej zmienionej zapalnie u osoby z WZJG. Kolokalizację (białe świecenie, czerwone strzałki) zaobserwowano w nacieku komórek jednojądrzastych pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej. B) CD3 (Alexa 488 - zielone świecenie, czerwone strzałki) w tym samym skrawku. A) i B) - powiększenie - 200X.



Ryc. 43. A) OPG (Texas red - czerwony kolor), CD3 (Alexa 488 - zielone świecenie) oraz jądra komórkowe (DAPI - niebieski kolor) w błonie śluzowej zmienionej zapalnie u osoby z WZJG. Kolokalizację (białe świecenie, czerwone strzałki) zaobserwowano w nacieku komórek jednojądrzastych pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej. B) CD3 (Alexa 488 - zielone świecenie, czerwone strzałki) w tym samym skrawku. A) i B) - powiększenie - 200X.



Ryc. 44. A) OPG (Texas red - czerwony kolor), B) CD3 (Alexa 488 - zielone świecenie), C) jądra komórkowe (DAPI - niebieski kolor) w błonie śluzowej zmienionej zapalnie u osoby z WZJG. D) Kolokalizację (białe świecenie) zaobserwowano w nacieku komórek jednojądrzastych pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej. A), B), C) i D) powiększenie - 400X.



Ryc. 45. A) IL-33 (Texas red - czerwony kolor), CD3 (Alexa 488 - zielone świecenie) oraz jądra komórkowe (DAPI - niebieski kolor) w błonie śluzowej zmienionej zapalnie u osoby z WZJG. Zaobserwowano kolokalizację (białe świecenie, czerwone strzałki) w nacieku komórek jednojądrzastych pomiędzy kryptami w obrębie blaszki właściwej. B) CD3 (Alexa 488 - zielone świecenie, czerwone strzałki) oraz IL-33 (Texas red - czerwony kolor) w tym samym skrawku. Kolokalizacja (żółte świecenie, czerwone strzałki) w blaszce właściwej błony śluzowej. A) i B) - powiększenie - 200X.

Podsumowanie

- Na podstawie ekspresji cząsteczki CD3, markera limfocytów T, wykazano, że limfocyty T stanowiły istotną komponentę nacieku zapalnego w zmienionej zapalnie błonie śluzowej chorych na WZJG.
- Zaobserwowano, że w błonie śluzowej zmienionej zapalnie u chorych na WZJG jednym ze źródeł RANKL i OPG są limfocyty T, przy czym prawdopodobnie nie są one miejscem uwalniania IL-33.

6. Dyskusja

W Polsce na nieswoiste zapalenia jelit (NZJ) choruje ok. 50 tys. osób. Zdecydowaną większość stanowią chorzy na wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) oraz chorobę Leśniowskiego-Crohna (ChLC). Wspólną cechą obu jednostek chorobowych jest fakt, że ich objawy i kliniczne następstwa nie ograniczają się wyłącznie do jelit. Powikłania pozajelitowe rozwijają się u ok. 20-40% chorych na NZJ i dotyczą narządu wzroku, skóry, wątroby i dróg żółciowych, układu naczyniowego (żylna choroba zakrzepowo-zatorowa), stawów kręgosłupa, stawów obwodowych oraz kości [29].

Pacjenci z przewlekłymi chorobami zapalnymi jelit są szczególnie predysponowani do rozwoju zaburzeń metabolizmu kostnego. Składa się na to wiele mechanizmów negatywnie wpływających na funkcjonowanie kości, tj. upośledzone wchłanianie witaminy D3 (związane z aktywnością choroby lub przebytą resekcją jelita), zmniejszona podaż i wchłanianie wapnia, niedożywienie, terapia glikokortykosteroidami, nadprodukcja cytokin w przewlekłym stanie zapalnym oraz zmniejszona aktywność fizyczna. Czynniki te mogą prowadzić do rozwoju osteopenii i osteoporozy, które przez wiele lat przebiegają bezobjawowo, zaś pierwszą manifestacją kliniczną często jest złamanie kości przy niewielkim urazie lub nawet samoistnie [29].

Obserwacje kliniczne poczynione w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat wskazywały na zaburzenia metabolizmu kostnego u chorych na NZJ, jednak mechanizm tego zjawiska nie był znany. Postulowano istnienie krążącego we krwi tzw. czynnika aktywującego osteoklasty (osteoclast-activating factor), którego rolę mogłyby pełnić prozapalne cytokiny, zaś ogniwem łączącym reakcje immunologiczne z metabolizmem tkanki kostnej - szlak sygnałowy RANKL/OPG/RANK [13, 14]. Ponieważ w przebiegu NZJ zmieniona zapalnie błona śluzowa jelita grubego stanowi główne miejsce syntezy takich mediatorów zapalenia jak TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, w podjętych badaniach postanowiono sprawdzić, czy obok nich wydzielane są cytokiny regulujące homeostazę kostną, czyli RANKL i osteoprotegeryna, oraz nowo scharakteryzowana cytokina, czyli interleukina-33.

Etapami pracy były: określenie ekspresji RANKL, OPG i IL-33 na poziomie mRNA oraz białka, a także ustalenie zależności pomiędzy parametrami obrotu kostnego a miejscową ekspresją badanych cytokin i ich stężeniem w surowicy krwi w badanych grupach chorych na NZJ i osób zdrowych. Parametrami charakteryzującymi obrót kostny były wartości pomiarów densytometrycznym kości oraz stężenia w surowicy krwi markera resorpcji kości,

C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I (CTX). Ostatnim punktem badań było określenie lokalizacji w błonie śluzowej jelita grubego komórek odpowiedzialnych za syntezę wymienionych cytokin. Uzyskane wyniki mają charakter pionierski w odniesieniu do populacji polskiej i należą do nielicznych w piśmiennictwie.

6.1. Ogólny stan zdrowia i ocena gęstości mineralnej kości chorych na nieswoiste zapalenia jelit

W omawianej pracy badaniom poddano chorych na NZJ o długotrwałym przebiegu choroby, który wynosił od 9 do 16 lat. Pomimo przewlekłego charakteru schorzenia i długoletniego przebiegu aktywność kliniczna NZJ wskazywała na umiarkowany stopień zaawansowania choroby. U chorych na ChLC wskaźnik CDAI wynosił 163,5, zaś u osób z WZJG - ok. 5 punktów według skali MTWSI. Tak niska aktywność choroby mogła wynikać z systematycznego monitoringu postępu zmian zapalnych w obrębie jelita oraz skutecznego sposobu leczenia.

Wyniki uzyskane w przedstawionych badaniach do pewnego stopnia korespondują z danymi otrzymanymi przez Moschen i wsp. [73]. Autorzy ci przebadali biopsje błony śluzowej jelita grubego pochodzące od 40 chorych na ChLC, 28 chorych na WZJG oraz od 30 zdrowych osób. Analizowane grupy różniły się parametrami od chorych badanych w niniejszej pracy: średni wiek chorych wynosił ok. 33 i 36 lat, długość trwania choroby wynosiła 3,1 i 4,7 lat, zaś wskaźniki aktywności choroby 257 i 7,7 punkta odpowiednio w grupie ChLC i WZJG. Ponadto w pracy Moschen i wsp. ok. 20% chorych nie przyjmowało żadnych leków w momencie przeprowadzania badań [73], a w grupie chorych na NZJ, analizowanej w niniejszej rozprawie, prawie wszyscy przyjmowali leki.

Potwierdzeniem wzmożonego obrotu kostnego u przebadanych osób z NZJ było wysokie stężenie CTX w surowicy krwi oraz wyniki pomiarów densytometrycznych szyjki kości udowej, których uśrednione wartości T-score dla chorych na ChLC i WZJG wynosiły odpowiednio -1,66 i -1,58. Uzyskane dane dowodzą zwiększonego poziomu resorpcji kości odpowiadającego osteopenii nie tylko u osób z łagodną postacią NZJ, ale także w grupie chorych na WZJG w fazie remisji. W pracy Moschen i wsp. [73], gdzie także posłużono się metodami densytometrycznymi, przebadano 43 chorych na NZJ (29 z ChLC i 14 z WZJG), u których stwierdzono średnią wartość T-score dla szyjki kości udowej równą -1,5, a więc na granicy osteopenii.

Uzyskane wyniki świadczą o tym, że mimo niskiej aktywności choroby Leśniowskiego-Crohna i WZJG u znacznej części polskich pacjentów zaobserwowano zwiększenie resorpcji kości, co niewątpliwie stanowi istotny czynnik ryzyka rozwoju osteoporozy. Wydaje się zatem, że ze względu na zagrożenie osteoporozą i jej skutkami chorzy z wieloletnim przebiegiem NZJ powinni przyjmować preparaty zwiększające masę kostną, takie jak witamina D [8, 69] i leki antyresorpcyjne z grupy bisfosfonianów [30, 84, 113]. W ciężkich przypadkach osteoporozy towarzyszącej NZJ powinno się rozważyć stosowanie infliksimabu [90], ponieważ, jak to dalej jest sugerowane, TNF odgrywa prawdopodobnie istotną rolę w redukcji gęstości kości w przebiegu WZJG i ChLC.

6.2. Miejscowa ekspresja genu dla RANKL oraz stężenie sRANKL w surowicy krwi chorych na nieswoiste zapalenia jelit oraz w grupie kontrolnej

Ocena ekspresji RANKL w biopsjach błony śluzowej chorych na NZJ dostarczyła nieoczekiwanych wyników. Nie stwierdzono istotnych różnic, gdy porównano wartości względnej ekspresji mRNA dla RANKL pomiędzy grupami chorych na NZJ a grupą kontrolną lub chorych w remisji WZJG. Ponadto, poziom ekspresji mRNA dla RANKL w grupie z WZJG i ChLC, zestawiając tkankę zmienioną i niezmienioną zapalnie, był zbliżony i nie wykazywał istotnych statystycznie różnic. W piśmiennictwie, jak dotąd, nie oceniano ekspresji RANKL u chorych na NZJ na poziomie mRNA, jedynie Moschen i wsp. [73] badali obecność immunoreaktywnego RANKL w biopsjach chorych na NZJ. Ze względu na ubogą wiedzę na temat ekspresji RANKL i OPG na poziomie mRNA u osób z NZJ uzyskane w przedstawionej pracy dane zestawiono z wynikami badań na mysim modelu zapalenia jelita grubego.

Istnieje kilka mysich modeli transgenicznych, u których możliwe jest wywołanie zmian zapalnych w obrębie jelita grubego na skutek usunięcia genów kodujących IL-2, IL-10 i TGF [29, 135]. W pracy Ashcroft i wsp. [4] badano myszy pozbawione genu kodującego IL-2, u których dochodziło do rozwoju zapalenia jelita grubego oraz osteoporozy. Progresja zmian kostnych, mierzona m.in. metodami densytometrycznymi, była ściśle związana z samoistną aktywacją limfocytów T, które były jednym ze źródeł RANKL. Jednak znaczny wzrost ekspresji RANKL był obserwowany tylko w początkowych 7 tygodniach zmian zapalnych i osteolitycznych, po czym gwałtownie obniżał się do normalnego poziomu. Pomimo oczywistej odmienności tego modelu badawczego i własnych obserwacji u chorych

na NZJ, intrygujący wydaje się brak wzmożonej ekspresji genu dla RANKL mimo występującej osteoporozy.

Stężenie całkowitego sRANKL w surowicy krwi w grupie chorych na NZJ w zestawieniu z grupą kontrolną, nie różniło się w istotny sposób. Wynik ten jest zgodny z danymi uzyskanymi w badaniach przeprowadzonych przez Moschen i wsp. [73]. Mimo większej liczby pacjentów i osób zdrowych, od których uzyskali oni surowicę krwi (71 chorych na ChLC, 41 chorych na WZJG i 45 zdrowych osób) i wyższym stopniem aktywności klinicznej choroby, nie zaobserwowano różnic w stężeniu sRANKL między grupami chorych a grupą kontrolną. Także Bernstein i wsp. [10] nie stwierdzili różnic w poziomie RANKL między jeszcze bardziej licznymi grupami chorych na NZJ (287 chorych na ChLC, 166 chorych na WZJG oraz 368 osób zdrowych).

Ponadto, w badaniach Moschen i wsp. [73], w grupie chorych na NZJ gęstość mineralna szyjki kości udowej oraz kręgow na odcinku lędźwiowym nie wykazywały korelacji ze stężeniem sRANKL, co wskazuje, że stężenie sRANKL nie wpływa zasadniczo na metabolizm kostny. Podobne wyniki uzyskano w niniejszej rozprawie stwierdzając u chorych na NZJ brak zależności pomiędzy stężeniami C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I a sRANKL w surowicy krwi.

Zaprezentowane wyniki dowodzą, że zarówno lokalna ekspresja mRNA dla RANKL, jak i stężenie sRANKL w surowicy krwi nie zmieniają się pomiędzy grupami chorych na NZJ a grupą kontrolną. Ta obserwacja oraz brak zależności między stężeniem sRANKL w surowicy a parametrami resorpcji kości wskazują, że RANKL nie może odgrywać zasadniczej roli w zaburzeniach metabolizmu kostnego, które towarzyszą WZJG i ChLC.

6.3. Miejscowa ekspresja genu dla OPG oraz stężenie OPG w surowicy krwi chorych na nieswoiste zapalenia jelit oraz w grupie kontrolnej

Najwyższą ekspresję mRNA dla OPG stwierdzono w tkance zmienionej i niezmienionej zapalnie u chorych na WZJG w zestawieniu do grupy kontrolnej i grupy z remisją WZJG. Różnice w ekspresji OPG pomiędzy tkanką zmienioną a niezmienioną w grupie chorych na WZJG były również istotne statystycznie. Jednak u chorych na ChLC nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji OPG. W piśmiennictwie nie oceniano ekspresji genu dla OPG u chorych na NZJ na poziomie mRNA, tylko w pracy Moschen i wsp. [73] badano występowanie immunoreaktywnej OPG w biopsjach chorych na NZJ. Wyniki

porównano więc do cytowanej wcześniej pracy Ashcroft i wsp. [4], gdzie badano myszy transgeniczne IL-2^{-/-}. Doświadczenia na tym modelu demonstrują znaczny wzrost ekspresji mRNA dla OPG w 7 tygodniu życia w porównaniu do grupy kontrolnej i wyników otrzymanych w 4 tygodniu. Przedstawione dane mogą tłumaczyć fakt wysokiego poziomu ekspresji mRNA dla OPG w przebadanych próbach pochodzących od chorych na WZJG.

Zaskakujące rezultaty przedstawia zestawienie stężenia OPG w surowicy krwi chorych na NZJ z poziomem tej cytokiny w grupie kontrolnej. Okazuje się, że stężenie OPG było wyższe u chorych na ChLC i WZJG w porównaniu do osób zdrowych. Zbieżne wyniki uzyskał Moschen i wsp. [73], którzy najwyższą wartość stężenia OPG zanotowali w surowicy krwi chorych na ChLC (2111 pg/ml, n=83), nieco niższą w grupie chorych na WZJG (ok. 1600 pg/ml, n=41), zaś najniższą w grupie kontrolnej (867 pg/ml, n=48). Uzyskane przez Moschen i wsp. stężenia OPG, zarówno w ChLC, jak i we WZJG, były znamienne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej. Autorzy ci stwierdzili także, że najwyższe stężenie OPG występuje w grupie chorych o najbardziej zaawansowanym obrocie kostnym. Wyrazem tego był poziom T-score ≤ -2,5, który wskazywał na osteoporozę. Wartości stężeń OPG w grupie z NZJ przedstawione w niniejszej pracy różnią się od tych uzyskanych przez Moschen i wsp., co może być związane z różną aktywnością kliniczną NZJ. U Moschen i wsp. [73] średni poziom CDAI w przypadku ChLC wynosił 257 punktów, zaś w analizowanej w niniejszej rozprawie grupie chorych tylko 163,5, co odpowiada umiarkowanej postaci choroby. Jednak zasadnicze zgodności pomiędzy obiema pracami dotyczą znacznego wzrostu stężenia OPG w surowicy krwi chorych na NZJ w porównaniu do osób zdrowych z grupy kontrolnej.

Równie nieoczekiwane było wykazanie w niniejszej pracy dodatniej zależności pomiędzy stężeniem OPG a poziomem C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I w surowicy krwi chorych na WZJG. Z kolei w pracy Moschen i wsp. [73] średnia gęstość mineralna (BMD) kręgów w odcinku lędźwiowym oraz w szyjce kości udowej wykazywała istotną statystycznie, ujemną korelację względem stężenia OPG w grupie chorych na NZJ. Tak więc, w obu omówionych przypadkach, progresja resorpcji tkanki kostnej, czego dowodem są wzrost stężenia C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I oraz spadek gęstości kości, była powiązana ze wzrostem poziomu OPG w surowicy krwi chorych na NZJ.

Kolejnym potwierdzeniem przedstawionych wyników są dane uzyskane przez Franchimont i wsp. [27]. U przebadanych 25 pacjentów mediana aktywności ChLC wynosiła 283 punkty, zaś stężenie OPG w surowicy krwi chorych było dwukrotnie większe niż

w grupie kontrolnej. Ponadto, Bernstein i wsp. [10] odnotowali wzrost stężenia OPG w surowicy kobiet chorych na ChLC (ale nie w grupie chorych na WZJG) względem kontroli, przy czym przyjmowanie estrogenów związane było ze znacznym wzrostem poziomu tej cytokiny w surowicy.

W przeprowadzonych w niniejszej rozprawie analizach stwierdzono silną zależność między stężeniem OPG a wiekiem w grupie chorych na WZJG oraz brak takiej korelacji w grupie osób zdrowych. Jest to oryginalna obserwacja, ponieważ inni badacze nie rozpatrywali takiej zależności w NZJ. Zbliżone wyniki przedstawił Findlay i wsp. [26] w badaniach dotyczących zapalenia stawów i kości w pierwotnej chorobie zwyrodnieniowej stawów, w których zaobserwowano pozytywną korelację między poziomem OPG w surowicy krwi a wiekiem chorych ($n=40$; $r=0,4$; $p<0,05$).

Chorobą o podłożu autoimmunologicznym, cechującą się wysokim stężeniem OPG w surowicy krwi, nawracającymi odczynami zapalnymi oraz osteoporozą, jest pierwotna żółciowa marskość wątroby. Szalay i wsp. [117] stwierdzili zwiększone stężenie C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I oraz istotne podwyższenie poziomu OPG w surowicy krwi 41 chorych na to schorzenie w porównaniu do 44 osób zdrowych oraz dodatnią korelację między poziomem OPG a stężeniem markera resorpcji kości. Moschen i wsp. [74] także przedstawili wyniki badań dotyczące 193 pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby, w tym 87 osób z wirusowym zapaleniem wątroby typu B i C oraz 56 osób zdrowych. Stężenie OPG w surowicy krwi chorych było wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej, przy czym chorzy z marskością wątroby wykazywali wyższy poziom OPG w porównaniu do osób bez potwierdzonej marskości. Wzrostowi stężenia OPG w surowicy towarzyszył spadek gęstości kości oraz ich zwiększona resorpcja prowadząca do osteoporozy. Podwyższony poziom OPG wykazywał dodatnią korelację z aktywnością choroby, zaś ta z podwyższonym obrotem kostnym.

Przytoczone obserwacje wskazują, że nie tylko w NZJ, ale również w przebiegu innych przewlekłych zapaleń występuje wzrost stężenia OPG w surowicy krwi, któremu towarzyszy resorpcja kości.

Podsumowując, miejscowa ekspresja inhibitora osteoklastogenezy, czyli OPG oraz stężenie tej cytokiny w surowicy krwi w grupie osób z NZJ są podwyższone i skorelowane ze zwiększoną resorpcją tkanki kostnej. Znaczący wzrost ekspresji OPG w błonie śluzowej i wzrost stężenia tej cytokiny w surowicy krwi może stanowić odpowiedź w kierunku skorygowania zaburzonej homeostazy tkanki kostnej u chorych na NZJ.

6.4. Miejscowa ekspresja genu dla IL-33 oraz stężenie IL-33 w surowicy krwi chorych na nieswoiste zapalenia jelit oraz w grupie kontrolnej

W porównaniu do grupy kontrolnej znacznie zwiększoną ekspresję IL-33 na poziomie mRNA stwierdzono u chorych na WZJG oraz ChLC. W grupie chorych na WZJG ekspresja mRNA dla IL-33 była wyższa w tkance zmienionej zapalnie w porównaniu do tkanki niezmienionej. Nie znaleziono istotnych statystycznie różnic pomiędzy tkanką niezmienioną pochodzącą od chorych na NZJ a grupą kontrolną. Wyniki te są zbieżne z danymi używanymi przez Pastorelli i wsp. [87], którzy wykazali wyższy poziom ekspresji IL-33 w tkance zmienionej we WZJG niż w grupie kontrolnej oraz brak różnic w ekspresji w tkance niezmienionej zapalnie od chorych na WZJG i ChLC oraz od osób zdrowych. Podobnie Seidelin i wsp. [111] wykazali 13-krotny wzrost ekspresji mRNA dla IL-33 w tkance zmienionej zapalnie we WZJG w porównaniu do grupy kontrolnej oraz 6-krotny wzrost w zestawieniu do tkanki niezmienionej zapalnie, a także podwyższoną ekspresję IL-33 w nieaktywnej postaci WZJG. Nieco odmienne wyniki otrzymał Kobori i wsp. [47], którzy także potwierdzili wyższą ekspresję mRNA dla IL-33, ale tylko w aktywnej postaci WZJG, ale nie w ChLC i nieaktywnej postaci WZJG.

Sporną kwestią pozostaje określenie, która z form IL-33 wykazuje największą aktywność biologiczną oraz jaki efekt wywiera na metabolizm kostny. W 2009 roku Cayrola i wsp. [19] oraz Talabot-Ayer i wsp. [120] udowodnili, w doświadczeniach na hodowlach komórkowych, że prekursor IL-33 o masie 30 kDa jest bardziej aktywną postacią w stosunku do skróconych form tej cytokiny (20-22 kDa). Ponadto, Pastorelli i wsp. [87] stwierdzili brak obecności formy niedojrzałej, 30 kDa, w surowicy osób chorych na NZJ i zdrowych. Wykryto jedynie 20-22 kDa białko, które odpowiadało dojrzałej, ale mniej aktywnej postaci IL-33. Wynika z tego, że potencjalny wpływ IL-33 na metabolizm kostny jest dość ograniczony, ponieważ systemową obecność stwierdzono jedynie w przypadku mało aktywnej formy IL-33. Nie do końca jasne jest również oddziaływanie IL-33 na osteoklastogenezę. Według Mun i wsp. [77] IL-33 indukuje monocyty do łączenia się w wielojądrzaste komórki wykazujące aktywność TRAP, charakterystyczną dla osteoklastów, przy czym proces ten był niezależny od sRANKL. Potwierdzono to dodając do hodowli OPG lub przeciwciała anty-RANKL, które nie hamowały procesu dojrzewania osteoklastów. Jedynie inkubacja komórek z przeciwciałami skierowanymi przeciwko receptorowi IL-33, czyli przeciwciałami anty-ST2, blokowała osteoklastogenezę. Z drugiej strony, Schulze i wsp. [107] wykazali,

że osteoblasty hodowane w obecności IL-33 wykazują zwiększoną ekspresję genu *Tnfsf11* kodującego RANKL oraz obniżoną aktywność genu *Tnfrsf11b*, na matrycy którego powstaje OPG. Dodanie do pożywki IL-33 prowadziło do zahamowania dojrzewania komórek TRAP⁺, przy czym na proces ten nie miała wpływu obecność w hodowli znanych stymulatorów osteoklastogenezy, czyli RANKL i M-CSF [107]. Inni autorzy również wskazują na IL-33 jako potencjalnego supresora aktywacji osteoklastów poprzez wzrost stężenia GM-CSF, IL-4 i IFN- γ w surowicy krwi transgenicznych myszy [140]. Ponadto, IL-33 pośrednio uczestnicząc w przekształcaniu prekursorów komórek kościogubnych w makrofagi lub komórki dendrytyczne redukuje pulę powstających osteoklastów [102, 140]. U myszy z nadekspresją TNF, u których dochodziło do wzmożonej resorpcji kości, podawanie IL-33 wyraźnie redukowało liczbę osteoklastów oraz stopień degradacji tkanki kostnej [140]. Z kolei Saidi i wsp. [98] wykazali, że IL-33 jest cytokiną nie mającą bezpośredniego wpływu na dojrzewanie osteoklastów. Doświadczenia na hodowlach ludzkich monocytów dowiodły, że nawet wzrastające stężenia IL-33 nie oddziałują na proces osteoklastogenezy i to niezależnie od obecności lub nieobecności RANKL w hodowli.

We własnych badaniach we wszystkich przeanalizowanych grupach chorych na NZJ oraz kontroli, uśrednione wartości stężenia w surowicy krwi dojrzałej postaci IL-33 (20-22 kDa) oscylowały wokół granicy detekcji (4,14 pg/ml). Z kolei, Pastorelli i wsp. [87] wykryli w surowicy osób chorych i zdrowych 20-22 kDa formę IL-33, której stężenie we WZJG i ChLC było znacznie podwyższone w porównaniu do zdrowej kontroli. Autorzy ci nie stwierdzili obecności w surowicy krwi chorych na NZJ i osób zdrowych postaci prekursorowej IL-33 (o masie 30 kDa). Wynika z tego, że to właśnie skrócona wersja IL-33 (20-22 kDa) reprezentuje systemową postać IL-33 u chorych na NZJ.

Porównywalne wyniki uzyskał Beltran i wsp. [6] badając surowice pochodzące od 13 chorych na ChLC, 71 na WZJG i 20 osób zdrowych. Najwyższe stężenia IL-33 (20-22 kDa) otrzymano w grupach chorych na ChLC oraz WZJG w porównaniu do grupy kontrolnej. Wartości median stężenia IL-33 w surowicy były jednak na niskim poziomie, pokrywającym się z poziomami uzyskanymi we własnych badaniach, gdyż wynosiły: 1.341, 3.159 i 2.023 pg/ml, odpowiednio dla grup: kontrolnej, ChLC i WZJG. Dodatkowo przebadano poziom IL-33 w biopsjach jelita uzyskanych od chorych na NZJ i osób zdrowych. Okazało się, że mediany stężenia tej cytokiny były tutaj prawie 10-krotnie większe niż w surowicy krwi w grupie kontrolnej i grupie chorych na WZJG oraz blisko 5-krotnie wyższe w grupie osób z ChLC [6].

Średnia, niska wartość stężenia IL-33 w surowicy we własnych badaniach może wynikać z niewielkiej aktywności klinicznej NZJ, zaś chorzy przebadani przez Pastorelli i wsp. [87] oraz Beltran i wsp. [6] mogli charakteryzować się bardziej zaawansowanym stopniem aktywności NZJ. Może to tłumaczyć uzyskanie przez tych autorów wyższego stężenia IL-33 w surowicy chorych w porównaniu do zaprezentowanych danych. Jednak jednoznaczna ocena takiego zestawienia jest utrudniona, ponieważ charakterystyka chorych, przedstawiona w niniejszej pracy, opierała się na skalach MTWSI i CDAI, zaś Pastorelli i Beltran posłużyli się odmiennymi opisami stanu zdrowia chorych na NZJ. Następnym wyjaśnieniem różnicy w wynikach był fakt, iż Beltran [6] w swoich oznaczeniach IL-33 wykorzystywał zestawy, które cechowała większa czułość detekcji, co pozwalało na pomiar stężenia nawet bardzo małych ilości IL-33.

Zaprezentowane prace [19, 120], opisujące badania na liniach komórkowych, sugerują, że najbardziej aktywną formą IL-33 jest jej postać prekursorowa o masie 30 kDa. Ponieważ Pastorelli i wsp. [87] nie wykryli jej obecności ani w surowicy krwi chorych na NZJ, ani w grupie kontrolnej, należy przypuszczać, że systemowy wpływ tej prozapalnej cytokiny jest bardzo ograniczony. W przytoczonych pracach [6, 87] wykazano wzrost stężenia mniej aktywnej postaci dojrzałej IL-33 (20-22 kDa) w surowicy chorych na NZJ w porównaniu do osób zdrowych. Podwyższony poziom IL-33 u tych chorych był prawdopodobnie związany z wyższym stopniem aktywności klinicznej NZJ, niż ten, który charakteryzował pacjentów analizowanych w niniejszej rozprawie. Ewentualny mechanizm oddziaływania na tkankę kostną obecnej w surowicy krwi dojrzałej formy IL-33 nie jest do końca wyjaśniony, a uzyskane na ten temat informacje prowadzą do rozbieżnych wniosków. Z kolei lokalnie podwyższony poziom ekspresji mRNA dla IL-33, który wykazano w niniejszej pracy, wskazuje na rolę tej cytokiny w patomechanizmach miejscowych zmian zapalnych w obrębie błony śluzowej jelita grubego nawet przy umiarkowanej aktywności NZJ.

6.5. Lokalizacja komórek odpowiedzialnych za ekspresję RANKL, OPG oraz IL-33 u chorych na WZJG i w grupie kontrolnej

U chorych na WZJG blaszka właściwa (*lamina propria mucosae*) błony śluzowej jelita grubego charakteryzowała się obecnością dużej ilości komórek jednojądrzastych. Nie

zaobserwowano istotnych różnic w obrazie mikroskopowym w porównaniu do tkanki niezmienionej zapalnie u tych samych chorych.

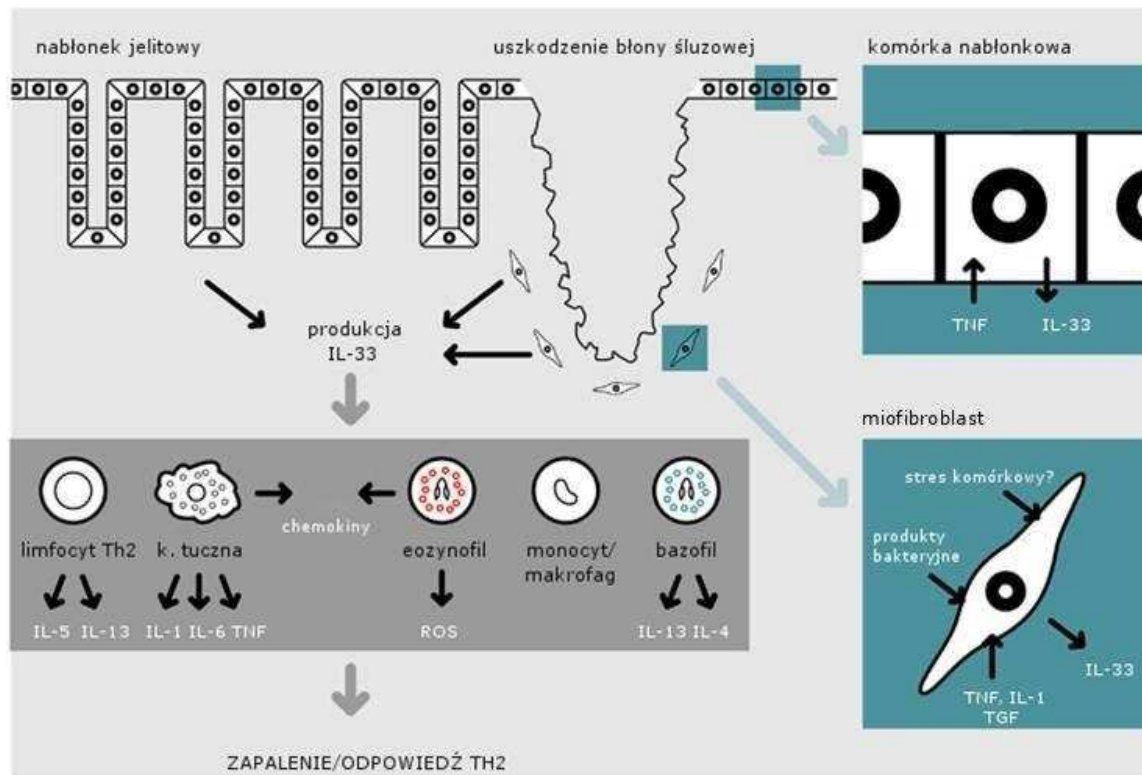
Stwierdzono, że w grupie osób z WZJG podstawowym źródłem RANKL i OPG są jednojądrzaste komórki nacieków zapalnych zlokalizowane w blaszce właściwej błony śluzowej. Dodatkowym miejscem uwalniania RANKL u chorych na WZJG jest nabłonek krypt. Ustalono, że jedną z populacji komórek występujących w miejscu zmienionym zapalnie są limfocyty T, które syntetyzują RANKL i OPG. Natomiast w materiale tkankowym pochodzącym od grupy kontrolnej reakcja immunopozytywna wskazuje na nabłonek krypt jako podstawowe miejsce uwalniania RANKL. Otrzymane wyniki porównano do tych uzyskanych przez Moschen i wsp. [73]. Autorzy ci również posłużyli się metodą immunohistochemiczną do oceny lokalizacji RANKL i OPG w biopsjach chorych na ChLC i WZJG. Reakcję immunopozytywną dla OPG zaobserwowano przede wszystkim w zgrupowaniach komórek jednojądrzastych oraz w mniejszym stopniu w nabłonku krypt jelitowych. W błonie śluzowej niezmienionej zapalnie zauważono jedynie niewielką ilość komórek OPG⁺. Umieszczenie komórek RANKL⁺ w grupie kontrolnej ograniczało się głównie do błony podśluzowej (nieдоступnej do analizy we własnym materiale), zaś w próbach od chorych na ChLC i WZJG, dodatkowo w blaszce właściwej pomiędzy kryptami, w obszarach nacieków zapalnych. Dzięki podwójnemu barwieniu immunofluorescencyjnemu, w którym obok RANKL i OPG oznaczano m.in. markery charakteryzujące makrofagi (CD163), komórki dendrytyczne (DC-LAMP) oraz limfocyty T (CD3), Moschen i wsp. [73] stwierdzili, że OPG w błonie śluzowej obecna była głównie w makrofagach i komórkach dendrytycznych, zaś immunoreaktywność RANKL wykazywały przede wszystkim limfocyty T.

Własne dane oraz wyniki przedstawione przez Moschen i wsp. [73], wskazują na jednojądrzaste komórki stanu zapalnego zlokalizowane w blaszce właściwej błony śluzowej, jako zasadnicze miejsce syntezy RANKL i OPG w przebiegu NZJ. Ciekawą obserwacją, nie stwierdzoną w pracy Moschen i wsp. jest obecność reakcji immunopozytywnej dla RANKL w nabłonku krypt zarówno w tkance zmienionej zapalnie, jak i niezmienionej pochodzącej od zdrowych osób.

Wykazano, że u chorych na WZJG istotnym źródłem IL-33 również są komórki jednojądrzaste obecne w blaszce właściwej błony śluzowej. Z kolei u osób zdrowych pozytywną reakcję immunoenzymatyczną uzyskano w nabłonku krypt. Wynik podwójnego barwienia immunofluorescencyjnego nie wskazywał na limfocyty T jako odpowiedzialne

za syntezę tej cytokiny. Zaobserwowano wprowadzić pojedyncze komórki wykazujące kolokalizację, jednak wytłumaczeniem tego faktu może być obecność receptora dla IL-33 (ST2/IL-1RL1) na powierzchni limfocytów T.

Potwierdzeniem otrzymanych wyników jest m.in. praca Pastorelli i wsp. [87], w której, przy pomocy metody immunohistochemicznej, wykazano obecność IL-33 w cytoplazmie i jądrach komórek nacieku zapalnego w blaszce właściwej błony śluzowej oraz w obrębie nabłonka jelitowego u chorych na WZJG. W tkance pochodzącej od chorych na ChLC i osób zdrowych stopień intensywności reakcji immunopoztywnej był słabszy w porównaniu do chorych na WZJG. Analiza z wykorzystaniem cytometrii przepływowej pozwoliła zidentyfikować rodzaje komórek jednojądrzastych odpowiedzialnych za produkcję IL-33. Wykazano, że były to makrofagi (CD11b⁺) i limfocyty B (CD19⁺) zmienionej zapalnie blaszki właściwej błony śluzowej [87]. Seidelin i wsp. [111] również stwierdzili, wykorzystując technikę immunohistochemiczną, obecność komórek IL-33⁺ w nabłonku krypt oraz w blaszce właściwej błony śluzowej chorych na WZJG. Dodatkowo, Kobori i wsp. [47], dzięki metodzie immunohistochemicznej, wskazują na miofibroblasty błony śluzowej jako komórki uwalniające IL-33 w aktywnej postaci WZJG, ale nie u chorych na ChLC i osób zdrowych.



Ryc. 46. Kaskada sygnałów w przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Zmodyfikowano na podstawie Seidelin i wsp. [110].

Wydaje się, że własne wyniki wspierają hipotezę zaproponowaną przez Seidelin i wsp. [110] odnośnie roli IL-33 w patogenezie WZJG. Pierwotnym miejscem syntezy IL-33 może być nabłonek jelita grubego, jednak wraz z progresją zmian chorobowych, związaną m.in. z uszkodzeniami błony śluzowej, pojawia się kolejne źródło tej prozapalnej cytokiny, czyli miofibroblasty. Zwiększony poziom IL-33 może stymulować m.in. komórki tuczne i makrofagi do uwalniania TNF, który nie tylko aktywuje stan zapalny, ale również indukuje komórki nabłonkowe i miofibroblasty do syntezy dodatkowych ilości IL-33. To „błędne koło” wzajemnych zależności przedstawiono na ryc. 46.

6.6. Hipoteza: niezależny od RANKL mechanizm zwiększonego obrotu kostnego u chorych na nieswoiste zapalenia jelit

Alternatywnym mechanizmem prowadzącym do resorpcji kości u chorych na NZJ może być miejscowo zwiększona ekspresja czynników stymulujących osteoklastogenezę przez komórki tuczne, limfocyty T i makrofagi. Komórki jednojądrzaste obecne w nacieku zapalnym w obrębie błony śluzowej jelita grubego są źródłem szeregu cytokin prozapalnych, m.in. IL-1, IL-6 i TNF. Ponadto, w części prac wykazano, że ekspresja wymienionych cytokin w błonie śluzowej jelita oraz ich stężenia w surowicy krwi, są zależne od stopnia aktywności choroby [68, 91, 101, 102, 126].

Doświadczenia przeprowadzone przez Kudo i wsp. [52] wskazują, że IL-6 aktywuje powstawanie i różnicowanie osteoklastów w sposób niezależny od RANKL, zaś OPG nie blokuje tego procesu. Kudo i wsp. posłużyli się monocytami uzyskanymi z krwi obwodowej zdrowych osób, które stymulowano przy pomocy M-CSF i IL-6. Za kontrolę pozytywną posłużyły komórki traktowane M-CSF i sRANKL. Receptor dla kalcytoniny, będący markerem dojrzałych osteoklastów, był obecny tylko w przypadku komórek TRAP⁺ inkubowanych z M-CSF i IL-6/sRANKL. Prekursory osteoklastów traktowane tylko M-CSF nie ulegały przekształceniu w komórki kościogubne. Dodanie OPG do hodowli komórkowych zawierających M-CSF i IL-6 nie hamowało osteoklastogenezy, co jest potwierdzeniem, że proces dojrzewania osteoklastów w obecności IL-6 nie był zależny od RANKL. Z kolei zablokowanie receptora dla IL-6 za pomocą przeciwciał anti-gp130 w hodowli z M-CSF i IL-6 wydatnie obniżało osteoklastogenezę [52].

W podobnych badaniach Kudo i wsp. [53] wykazali stymulujący wpływ IL-1 i TNF na osteoklastogenezę. W przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystano jednojądrzaste

komórki krwi obwodowej, które inkubowano z M-CSF i IL-1/TNF lub M-CSF i IL-1+TNF. Kontrolę pozytywną stanowiła hodowla zawierająca M-CSF i sRANKL, zaś kontrolą negatywną były komórki traktowane wyłącznie M-CSF. Największa intensywność resorpcyjna cechowała komórki inkubowane z M-CSF i TNF oraz IL-1; niższy poziom aktywności stwierdzono w hodowli z M-CSF i TNF, zaś w przypadku komórek traktowanych M-CSF i IL-1, nie zaobserwowano aktywności resorpcyjnej. W celu potwierdzenia niezależnego od RANKL mechanizmu funkcjonowania TNF, do hodowli z M-CSF i TNF dodawano OPG. Tak jak zakładano, OPG nie obniżyła ilości komórek TRAP⁺. Ograniczenie ich liczby możliwe było jedynie po dodaniu przeciwciał anty-TNF [53].

Fuller i wsp. [31] badali wpływ TNF na osteoklastogenezę na modelu zwierzęcym, a uzyskane przez nich wyniki były zbieżne z otrzymanymi przez Kudo i wsp. [53]. Potwierdzono, że TNF aktywuje dojrzewanie osteoklastów bez obecności RANKL. Zaobserwowano także znaczący synergizm pomiędzy funkcjonowaniem RANKL i TNF, zaś aktywność resorpcyjna obu cytokin była zbliżona.

Rezultaty badań Kudo i wsp. [52, 53] oraz Fuller i wsp. [31] pozwalają przypuszczać, że mechanizm resorpcji kości w przebiegu NZJ jest procesem niezależnym od ekspresji RANKL i może być uwarunkowany zwiększoną produkcją IL-1, IL-6 oraz TNF. W tej sytuacji zwiększone uwalnianie OPG w przebiegu NZJ, obserwowane we własnych badaniach, nie prowadzi do efektywnej ochrony kości, ponieważ obecność tej glikoproteiny nie ma wpływu na pobudzenie osteoklastogenezы przez IL-1, IL-6 i TNF. Czynnikiem, który w jelicie grubym aktywuje syntezę wymienionych cytokin jest IL-33. Istotny wzrost ekspresji IL-33 na poziomie mRNA zaobserwowany w tkance zmienionej zapalnie u chorych na NZJ może się przekładać na zwiększoną ekspresję innych cytokin prozapalnych, potwierdzoną przez wielu autorów we wcześniejszych badaniach dotyczących patomechanizmów NZJ [68, 91, 101, 102, 126]. Możliwe jest więc pośrednie stymulowanie osteoklastogenezы przez miejscową nadprodukcję IL-33, która indukując uwalnianie IL-1, IL-6 i TNF wpływa na niezależny od RANKL zwiększony obrót kostny obserwowany w przebiegu NZJ.

6.7. Podsumowanie

Przedstawiona analiza wyników w kontekście współczesnego piśmiennictwa wskazuje na jednojądrzaste komórki stanu zapalnego zlokalizowane w blaszce właściwej błony śluzowej jako główne źródło RANKL, OPG i IL-33 w przebiegu NZJ. Dane te są zgodne

z wynikami dotyczącymi lokalnej ekspresji badanych cytokin na poziomie mRNA. Wyjątek stanowi ekspresja RANKL, która nie zmienia się u chorych na NZJ pomimo zwiększonej liczby komórek RANKL⁺. Wy tłumaczeniem tej sytuacji może być obecność dodatkowego miejsca syntezy RANKL, a mianowicie nabłonka krypt, który ulega degradacji na skutek zmian chorobowych, zaś u osób zdrowych pozostaje nienaruszony. Prawdopodobnie dzięki temu możliwe jest utrzymanie ekspresji mRNA dla RANKL na podobnym poziomie zarówno w grupie chorych na NZJ, jak i w zdrowej kontroli. Również stężenie sRANKL w surowicy krwi chorych nie wykazuje znamiennych różnic w porównaniu do grupy osób zdrowych. Brak korelacji pomiędzy poziomem sRANKL w surowicy pochodzącej od chorych na NZJ a stężeniem markera resorpcji kości, czyli C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I, wskazuje na inny mechanizm decydujący o zwiększonym obrocie kostnym, niż ten klasyczny oparty na podwyższonej ekspresji RANKL.

Z kolei IL-33 nie ma bezpośredniego wpływu na metabolizm tkanki kostnej u chorych na NZJ, ponieważ miejscowa ekspresja tej cytokiny nie ma przełożenia na jej stężenie w surowicy krwi. Jednak podwyższona ekspresja IL-33 w zmienionej zapalnie błonie śluzowej jelita grubego może lokalnie stymulować komórki jednojądrzaste blaszki właściwej do syntezy czynników aktywujących osteoklastogenezę, takich jak IL-1, IL-6 i TNF. Przedstawione dane literaturowe dowodzą zwiększonej ekspresji tych cytokin nie tylko w błonie śluzowej zmienionej zapalnie, ale także wzrostu ich stężenia w surowicy chorych na NZJ. W ten pośredni sposób IL-33 może przyczyniać się do niezależnych od RANKL zaburzeń gospodarki mineralnej kości towarzyszących NZJ.

Natomiast ekspresja OPG na poziomie mRNA i białka u chorych na NZJ jest znacznie podwyższona w porównaniu do grupy kontrolnej, zaś w przypadku stężenia OPG w surowicy dodatnio koreluje z wiekiem chorych oraz poziomem markera resorpcji kości. Zjawisko to może stanowić swoistą adaptację do zaburzeń metabolizmu kostnego obserwowanych w przebiegu NZJ.

7. Podsumowanie wyników i wnioski

1. Wyniki pomiarów densytometrycznych i wysokie stężenie C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I wskazują na obniżoną gęstość kości oraz ich zwiększoną resorpcję w grupie chorych na NZJ.
2. Nie stwierdzono różnic w ekspresji RANKL zarówno na poziomie mRNA, jak i białka u chorych na NZJ oraz w porównaniu do osób zdrowych.
3. Ekspresja OPG na poziomie mRNA i białka była wyższa u chorych na NZJ niż w kontroli, co wskazuje na możliwość oddziaływania tej cytokiny na metabolizm kostny w kontekście zaobserwowanego zwiększonego obrotu kostnego u tych chorych.
4. Ekspresja mRNA dla IL-33 w zmienionej zapalnie błonie śluzowej jelita grubego w grupie chorych na WZJG i ChLC była wyższa w porównaniu do osób zdrowych i chorych w stanie remisji WZJG.
5. Miejscowy wzrost ekspresji IL-33 nie wpływał na jej stężenie w surowicy krwi przebadanych osób, ponieważ było ono na granicy detekcji lub poniżej tego poziomu.
6. Głównym źródłem RANKL, OPG i IL-33 w błonie śluzowej zmienionej zapalnie są komórki jednojądrzaste obecne w nacieku zapalnym, zaś w przypadku RANKL i IL-33 także komórki nabłonka krypt jelitowych.
7. Zwiększona resorpcja kości u osób z NZJ nie jest wynikiem zwiększonej sekrecji RANKL, ale może być spowodowana znacznie podwyższoną lokalną ekspresją IL-33, która może indukować komórki błony śluzowej do uwalniania cytokin stymulujących osteoklastogenezę niezależną od RANKL, takich jak IL-1, IL-6 i TNF.
8. Wykazanie dodatnich korelacji pomiędzy stężeniem OPG a poziomem C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I w surowicy krwi oraz wiekiem chorych na WZJG wskazuje, że stężenie OPG w surowicy może odzwierciedlać stopień zaburzeń metabolizmu kostnego u chorych na WZJG.
9. Chorzy z długotrwałym przebiegiem NZJ powinni być monitorowani pod kątem zwiększonej resorpcji kości, a w przypadku podwyższenia jej markerów w surowicy krwi, powinni być poddani suplementacji preparatami zwiększającymi mineralizację kości.

8. Streszczenie

Nieswoiste zapalenia jelit (NZJ), które obejmują głównie wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) i chorobę Leśniowskiego-Crohna (ChLC) są przewlekłymi schorzeniami z okresami remisji, mającymi swoje źródło w uwarunkowaniach genetycznych, środowiskowych oraz w lokalnych zaburzeniach układu odpornościowego. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu miejscowej odpowiedzi immunologicznej prowadzą do przewlekłych stanów zapalnych w obrębie jelita grubego, co wywołuje zmiany morfologiczne w ścianie jelita oraz może prowadzić do syntezy licznych czynników mających negatywny wpływ na metabolizm tkanki kostnej. Do cytokin uwalnianych przez komórki jednojądrzaste, obecne w zmienionej zapalnie błaszce właściwej błony śluzowej, oraz enterocyty, należą regulatory obrotu kostnego, tj. RANKL i osteoprotegeryna (OPG) oraz nowo odkryta cytokina - interleukina 33. RANKL jest glikoproteiną odpowiedzialną za aktywację osteoklastogenezy, zaś inhibitorem tego procesu i rozpuszczalnym receptorem dla RANKL jest OPG. Udział IL-33 w regulacji metabolizmu kostnego u chorych na NZJ, jak dotąd, nie był badany.

Celem pracy było określenie w błonie śluzowej chorych na NZJ ekspresji cytokin RANKL, OPG oraz IL-33, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, w kontekście zaburzeń metabolizmu kostnego. Ocena ekspresji RANKL, OPG i IL-33 w odniesieniu do ekspresji β -aktyny na poziomie mRNA, możliwa była dzięki wykorzystaniu reakcji PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR). Do określenia stężenia badanych cytokin oraz poziomu C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I, markera resorpcji kości, w surowicy krwi posłużyły testy immunoenzymatyczne (ELISA). Dodatkowo, pomiary densytometryczne pozwoliły na ustalenie gęstości mineralnej kości u chorych na NZJ. Wykorzystanie technik immunohistochemicznych umożliwiło lokalizację komórek odpowiedzialnych za uwalnianie RANKL, OPG i IL-33 w błonie śluzowej jelita grubego.

Badaniami objęto 56 chorych na WZJG, 9 osób w stanie remisji WZJG, 12 osób z ChLC oraz 37 osób zdrowych. Średni czas trwania chorób wynosił dla ChLC - ok. 13 lat, dla WZJG - ok. 16 lat i dla grupy osób w stanie remisji WZJG - ok. 9 lat. Aktywność kliniczna WZJG i ChLC wskazywała na łagodny stopień zaawansowania obydwu postaci NZJ.

Na podstawie analizy wyników pomiarów densytometrycznych oraz wysokiego stężenia C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I w surowicy krwi stwierdzono

zwiększony obrót kostny u chorych na NZJ. Nie był on powiązany ze zmianami „kanonicznego” mediatora resorpcji kości, czyli RANKL, ponieważ ekspresja tej cytokiny na poziomie mRNA i białka nie zmieniała się u chorych na NZJ w porównaniu do grupy kontrolnej. Zaobserwowano natomiast paradoksalny wzrost ekspresji OPG i to nie tylko lokalnie, ale również w surowicy krwi chorych. Głównym źródłem RANKL i OPG w błonie śluzowej zmienionej zapalnie były komórki jednojądrzaste obecne w nacieku zapalnym, a w przypadku RANKL także komórki nabłonka krypt jelitowych. Stwierdzono też zwiększony poziom mRNA dla IL-33 w zmienionej zapalnie błonie śluzowej jelita grubego u chorych na NZJ i wykazano, że za syntezę IL-33 odpowiadają komórki jednojądrzaste nacieku zapalnego blaszki właściwej błony śluzowej oraz nabłonek krypt jelitowych. Zmiany te nie wpłynęły na stężenie IL-33 w surowicy krwi chorych na NZJ, które było na niskim poziomie.

Zaobserwowany fenomen zwiększonej resorpcji kości u chorych na NZJ przebiegający bez zmiany stężenia RANKL i przy wzroście poziomu OPG w surowicy krwi mógłby być spowodowany aktywacją osteoklastów na drodze niezależnej od RANKL. Mechanizm ten może być oparty na aktywacji poprzez IL-33 szeregu komórek biorących udział w rozwoju stanu zapalnego, które uwalniają prozapalne cytokiny, takie jak IL-1, IL-6 i TNF, mogące indukować powstawanie funkcjonalnych osteoklastów w sposób niezależny od RANKL.

9. Bibliografia

1. Ahmad T., Tamboli C. P., Jewell D., Colombel J. F.: Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology*. 2004; 126: 1533-1549
2. Ali T., Lam D., Bronze M. S., Humphrey M. B.: Osteoporosis in inflammatory bowel disease. *Am J Med*. 2009; 122: 599-604
3. Arora G., Singh G., Vadavkar S., Shah S. B., Mannalithara A., Mithal A., Triadafilopoulos G.: Incidence and risk of intestinal and extra-intestinal complications in Medicaid patients with inflammatory bowel disease: a 5-year population-based study. *Dig Dis Sci*. 2010; 55: 1689-1695
4. Ashcroft A. J., Cruickshank S. M., Croucher P. I., Perry M. J., Rollinson S., Lippitt J. M., Child J. A., Dunstan C., Felsburg P. J., Morgan G. J., Carding S. R.: Colonic dendritic cells, intestinal inflammation, and T cell-mediated bone destruction are modulated by recombinant osteoprotegerin. *Immunity*. 2003; 19: 849-861
5. Baud'huin M., Duplomb L., Velasco C. R., Fortun Y., Heymann D., Padrines M.: Key roles of the OPG–RANK–RANKL system in bone oncology. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2007; 7: 221-232
6. Beltran C. J., Nunez L. E., Diaz-Jimenez D., Farfan N., Candia E., Heine C., Lopez F., Gonzalez M. J., Quera R., Hermoso M. A.: Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010; 16: 1097-1107
7. Bene L., Falus A., Baffy N., Fulop A. K.: Cellular and molecular mechanisms in the two major forms of inflammatory bowel disease. *Pathol Oncol Res*. 2011; 17: 463-472
8. Bernstein C. N.: Inflammatory bowel diseases as secondary causes of osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*. 2006; 4: 116-123
9. Bernstein C. N., Leslie W. D.: The pathophysiology of bone disease in gastrointestinal disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003; 15: 857-864
10. Bernstein C. N., Sargent M., Leslie W. D.: Serum osteoprotegerin is increased in Crohn's disease: a population-based case control study. *Inflamm Bowel Dis*. 2005; 11: 325-330
11. Besnard A.-G., Togbe D., Guillo N., Erard F., Quesniaux V., Ryffel B.: IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol*. 2011; 41: 1675-1686
12. Bianchi M. L.: Inflammatory bowel diseases, celiac disease, and bone. *Arch Biochem Biophys*. 2010; 503: 54-65
13. Bouguen G., Chevaux J.-B., Peyrin-Biroulet L.: Recent advances in cytokines: therapeutic implications for inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2011; 17: 547-556

14. Boyce B. F., Xing L.: Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 473: 139-146
15. Boyle W. J., Simonet W. S., Lacey D. L.: Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003; 423: 337-342
16. Bucay N., Sarosi I., Dunstan C. R., Morony S., Tarpley J., Capparelli C., Scully S., Tan H. L., Xu W., Lacey D. L., Boyle W. J., Simonet W. S.: Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998; 12: 1260-1268
17. Cao Q., Si J. M., Gao M., Zhou G., Hu W. L., Li J. H.: Clinical presentation of inflammatory bowel disease: a hospital based retrospective study of 379 patients in eastern China. *Chin Med J (Engl).* 2005; 118: 747-752
18. Carriere V., Roussel L., Ortega N., Lacorre D.-A., Americh L., Aguilar L., Bouche G., Girard J.-P.: IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *PNAS.* 2007; 104: 282-287
19. Cayrola C., Girarda J.-P.: The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *PNAS.* 2009; 106: 9021-9026
20. Chen Q., Carroll H. P., Gadina M.: The newest interleukins: recent additions to the ever-growing cytokine family. *Vitam Horm.* 2006; 74: 207-228
21. Cherry W. B., Yoon J., Bartemes K. R., Iijima K., Kita H.: A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121: 1484-1490
22. Choi Y., Woo K. M., Ko S.-H., Lee Y. J., Park S.-J., Kim H.-M., Kwon B. S.: Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8⁺T cells. *Eur J Immunol.* 2001; 31: 2179-2188
23. De Leenheer E., Mueller G. S., Vanderkerken K., Croucher P. I.: Evidence of a role for RANKL in the development of myeloma bone disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2004; 4: 340-346
24. Eiwegger T., Akdis C. A.: IL-33 links tissue cells, dendritic cells and Th2 cell development in a mouse model of asthma. *Eur J Immunol.* 2011; 41: 1535-1538
25. Enoksson M., Lyberg K., Möller-Westerberg Ch., Fallon P. G., Nilsson G., Lunderius-Andersson C.: Mast cells as sensors of cell injury through IL-33 recognition. *J Immunol.* 2011; 186: 2523-2528
26. Findlay D., Chehade M., Tsangari H., Neale S., Hay S., Hopwood B., Pannach S., O'Loughlin P., Fazzalari N.: Circulating RANKL is inversely related to RANKL mRNA levels in bone in osteoarthritic males. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10: R2

27. Franchimont N., Reenaers C., Lambert C., Belaiche J., Bours V., Malaise M., Delvenne P., Louis E.: Increased expression of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), its receptor RANK and its decoy receptor osteoprotegerin in the colon of Crohn's disease patients. *Clin Exp Immunol.* 2004; 138: 491-498
28. Freeman H. J.: Use of the Crohn's disease activity index in clinical trials of biological agents. *World J Gastroenterol.* 2008; 14: 4127-4130
29. Friedman S., Blumberg R. S.: Nieswoiste zapalne choroby jelit. *Interna Harrisona* 2009; wydanie XVII, tom III, Wydawnictwo Czelej: 2105-2118
30. Fuller K., Kirstein B., Chambers T. J.: Regulation and enzymatic basis of bone resorption by human osteoclasts. *Clin Sci (Lond).* 2007; 112: 567-575
31. Fuller K., Murphy Ch., Kirstein B., Fox S. W., Chambers T. J.: TNF α potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology.* 2002; 143: 1108-1118
32. Grimaud E., Soubigou L., Couillaud S., Coipeau P., Moreau A., Passuti N., Gouin F., Redini F., Heymann D.: Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol.* 2003; 163: 2021-2031
33. Hampe J., Cuthbert A., Croucher P. J., Mirza M. M., Mascheretti S., Fisher S., Frenzel H., King K., Hasselmeyer A., MacPherson A.J., Bridger S., van Deventer S., Forbes A., Nikolaus S., Lennard-Jones J. E., Foelsch U. R., Krawczak M., Lewis C., Schreiber S., Mathew C. G. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet.* 2001; 357: 1925-1928
34. Hardenberg G., Steiner T. S., Levings M. K.: Environmental influences on T regulatory cells in inflammatory bowel disease. *Semin Immunol.* 2011; 23: 130-138
35. Hegazy S. K., El-Bedewy M. M.: Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF- κ B activation in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2010; 16: 4145-4151
36. Hildebrand D., Heeg K., Kubatzky K. F.: *Pasteurella multocida* toxin-stimulated osteoclast differentiation is B cell dependent. *Infect Immun.* 2011; 79: 220-228
37. Hsu Ch.-L., Neilsen C. V., Bryce P. J.: IL-33 is produced by mast cells and regulates IgE dependent inflammation. *PLoS One.* 2010; 5: e11944
38. Hueber A. J., Alves-Filho J. C., Asquith D. L., Michels C., Millar N. L., Reilly J. H., Graham G. J., Liew F. Y., Miller A. M., McInnes I. B.: IL-33 induces skin inflammation with mast cell and neutrophil activation. *Eur J Immunol.* 2011; 41: 2229-2237
39. Humphreys N. E., Xu D., Hepworth M. R., Liew F. Y., Grencis R. K.: IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J Immunol.* 2008; 180: 2443-2449

40. Ikeda T., Kasai M., Suzuki J., Kuroyama H., Seki S., Utsuyama M., Hirokawa K.: Multimerization of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2003; 278: 47217-47222
41. Itzkowitz S. H., Harpaz N.: Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2004; 126: 1634-1648
42. Jones D. H., Kong Y. Y., Penninger J. M.: Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61: ii32-39
43. Jump R. L., Levine A. D.: Mechanisms of natural tolerance in the intestine: implications for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2004; 10: 462-478
44. Kageyama Y., Torikai E., Tsujimura K., Kobayashi M.: Involvement of IL-33 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the effect of etanercept on the serum levels of IL-33. *Mod Rheumatol.* 2012; 22: 89-93
45. Khosla S.: Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001; 142: 5050-5055
46. Kiechl S., Schett G., Wenning G., Redlich K., Oberhollenzer M., Mayr A., Santer P., Smolen J., Poewe W., Willeit J.: Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation.* 2004; 109: 2175-2180
47. Kobori A., Yagi Y., Imaeda H., Ban H., Bamba S., Tsujikawa T., Saito Y., Fujiyama Y., Andoh A.: Interleukin-33 expression is specifically enhanced in inflamed mucosa of ulcerative colitis. *J Gastroenterol.* 2010; 45: 999-1007
48. Komai-Koma M., Gilchrist D.S., McKenzie A. N. J., Goodyear C. S., Xu D., Liew F. Y.: IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity. *J Immunol.* 2011; 186: 2584-2591
49. Komai-Koma M., Xu D., Li Y., McKenzie A. N. J., McInnes I. B., Liew F.Y.: IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol.* 2007; 37: 2779-2786
50. Konturek S. J., Bartnik W.: Choroby jelita grubego. *Gastroenterologia i hepatologia kliniczna* 2006; wydanie V, Wydawnictwo Lekarskie PZWL: 364-402
51. Kotake S., Udagawa N., Hakoda M., Mogi M., Yano K., Tsuda E., Takahashi K., Furuya T., Ishiyama S., Kim K.-J., Saito S., Nishikawa T., Takahashi N., Togari A., T. Tomatsu, Suda T., Kamatani N.: Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes. Possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 1003-1012
52. Kudo O., Sabokbar A., Pocock A., Itonaga I., Fujikawa Y., Athanasou N.A.: Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone.* 2003; 32: 1-7

53. Kudo O., Fujikawa Y., Itonaga I., Sabokbar A., Torisu T., Athanasou N. A.: Proinflammatory cytokine (TNF α /IL-1 α) induction of human osteoclast formation. *J Pathol.* 2002; 198: 220-227
54. Kulaylat M. N., Dayton M. T.: Ulcerative colitis and cancer. *J Surg Oncol.* 2010; 101: 706-712
55. Kurokawa M., Matsukura S., Kawaguchi M., Ieki K., Suzuki S., Odaka M., Watanabe S., Homma T., Sato M., Yamaguchi M., Takeuchi H., Adachi M.: Expression and effects of IL-33 and ST2 in allergic bronchial asthma: IL-33 induces eotaxin production in lung fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011; 155: 12-20
56. Kurowska-Stolarska M., Hueber A., Stolarski B., McInnes I. B.: Interleukin-33: a novel mediator with a role in distinct disease pathologies. *J Intern Med.* 2011; 269: 29-35
57. Kwon B. S., Wang S., Udagawa N., Haridas V., Lee Z. H., Kim K. K., Oh K., Greene J., Li Y., Su J., Gentz R., Aggarwal B. B., Ni J.: TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J.* 1998; 12: 845-854
58. Lacey D. L., Timms E., Tan H.-L., Kelley M. J., Dunstan C. R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y.-X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J., Boyle W. J.: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998; 93: 165-176
59. Lala S., Ogura Y., Osborne C., Hor S. Y., Bromfield A., Davies S., Ogunbiyi O., Nuñez G., Keshav S.: Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for Paneth cells. *Gastroenterology.* 2003; 125: 47-57
60. Lee N., Radford-Smith G., Taaffe D. R.: Bone loss in Crohn's disease: exercise as a potential countermeasure. *Inflamm Bowel Dis.* 2005; 11: 1108-1118
61. Leon A. J., Gomez E., Garrote J. A., Bernardo D., Barrera A., Marcos J. L., Fernandez-Salazar L., Velayos B., Blanco-Quiros A., Arranz E.: High levels of proinflammatory cytokines, but not markers of tissue injury, in unaffected intestinal areas from patients with IBD. *Mediators Inflamm.* 2009; Article ID 580450
62. Lerner U. H.: New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15: 64-81
63. Liew F. Y., Pitman N. I., McInnes I. B.: Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10: 103-110
64. Lingel A., Weiss T. M., Niebuhr M., Pan B., Appleton B. A., Wiesmann Ch., Bazan J. F., Fairbrother W. J.: Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors - insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes. *Structure.* 2009; 17: 1398-1410

65. Lix L. M., Graff L. A., Walker J. R., Clara I., Rawsthorne P., Rogala L., Miller N., Ediger J., Pretorius T., Bernstein Ch. N.: Longitudinal study of quality of life and psychological functioning for active, fluctuating, and inactive disease patterns in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2008; 14: 1575-1584
66. Marteau P., Chaput U.: Bacteria as trigger for chronic gastrointestinal disorders. *Dig Dis.* 2011; 29: 166-171
67. Marteau P., Lepage P., Mangin I., Suau A., Doré J., Pochart P., Seksik P.: Review article: gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004; 20: 18-23
68. Matsuda R., Koide T., Tokoro Ch., Yamamoto T., Godai T., Morohashi T., Fujita Y., Takahashi D., Kawana I., Suzuki S., Umemura S.: Quantitive cytokine mRNA expression profiles in the colonic mucosa of patients with steroid naive ulcerative colitis during active and quiescent disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15: 328-334
69. McClung J. P., Karl J. P.: Vitamin D and stress fracture: the contribution of vitamin D receptor gene polymorphisms. *Nutr Rev.* 2010; 68: 365-369
70. Miller A. M.: Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflamm.* 2011; 8: 22
71. Min J.-K., Kim Y.-M., Kim Y.-Mi, Kim E.-Ch., Gho Y. S., Kang I.-J., Lee S.-Y., Kong Y.-Y., Kwon Y.-G.: Vascular endothelial growth factor up-regulates expression of receptor activator of NF- κ B (RANK) in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2003; 278: 39548-39557
72. Miranda-Carus M.-E., Benito-Miguel M., Balsa A., Cobo-Ibanez T., De Ayala C. P., Pascual-Salcedo D., Martin-Mola E.: Peripheral blood T lymphocytes from patients with early rheumatoid arthritis express RANKL and interleukin-15 on the cell surface and promote osteoclastogenesis in autologous monocytes. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 1151-1164
73. Moschen A. R., Kaser A., Enrich B., Ludwiczek O., Gabriel M., Obrist P., Wolf A. M., Tilg H.: The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel disease and relates to the state of bone loss. *Gut.* 2005; 54: 479-487
74. Moschen A. R., Kaser A., Stadlmann S., Millionig G., Kaser S., Mühllechner P., Habior A., Graziadei I., Vogel W., Tilg H.: The RANKL/OPG system and bone mineral density in patients with chronic liver disease. *J Hepatol.* 2005; 43: 973-983
75. Moulin D., Donze O., Talabot-Ayer D., Mezin F., Palmer G., Gabay C.: Interleukin 33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine.* 2007; 40: 216-225
76. Mukohyama H., Ransjö M., Taniguchi H., Ohyama T., Lerner U. H.: The inhibitory effects of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on osteoclast formation are associated with upregulation of osteoprotegerin and downregulation of RANKL and RANK. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 271: 158-163

77. Mun S. H., Ko N. Y., Kim H. S., Kim J. W., Kim D. K., Kim A-Ram, Lee S. H., Kim Yong-Gil, Lee Ch. K., Lee S. H., Kim B. K., Beaven M. A., Kim Y. M., Choi W. S.: Interleukin-33 stimulates formation of functional osteoclasts from human CD14⁺ monocytes. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67: 3883-3892
78. Mundy G. R.: Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 584-593
79. Murphy G. E. J., Xu D., Liew F. Y., McInnes I. B.: Role of interleukin 33 in human immunopathology. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: i43-i47
80. Oboki K., Nakae S., Matsumoto K., Saito H.: IL-33 and airway inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011; 3: 81-88
81. Oboki K., Ohno T., Kajiwarra N., Saito H., Nakae S.: IL-33 and IL-33 receptors in hostdefense and diseases. *Allergol Int.* 2010; 59: 143-160
82. Oyajobi B. O.: Multiple myeloma/hypercalcemia. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9: S4
83. Paganelli M., Albanese C., Borrelli O., Civitelli F., Canitano N., Viola F., Passariello R., Cucchiara S.: Inflammation is the main determinant of low bone mineral density in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007; 13: 416-423
84. Pan B., Farrugia A. N., To L. B., Findlay D. M., Green J., Lynch K., Zannettino A. C. W.: The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF- α converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res.* 2004; 19: 147-154
85. Park H.-R., Min S.-K., Cho H.-D., Kim D.-H., Shin H. S., Park Y. E.: Expression of osteoprotegerin and RANK ligand in breast cancer bone metastasis. *J Korean Med Sci.* 2003; 18: 541-546
86. Pastorelli L., De Salvo C., Cominelli M. A., Vecchi M., Pizarro T. T.: Novel cytokine signaling pathways in inflammatory bowel disease: insight into the dichotomous functions of IL-33 during chronic intestinal inflammation. *Therap Adv Gastroenterol.* 2011; 4: 311-323
87. Pastorelli L., Garg R. R., Hoang S. B., Spina L., Mattioli B., Scarpa M., Fiocchi C., Vecchi M., Pizarro T. T.: Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *PNAS.* 2010; 107: 8017-8022
88. Pedersen S. B.: Multiplex relative gene expression analysis by real- time RT- PCR using the iCycler iQ detection system. Tech note 2696, Bio- Rad Laboratories, Inc.
89. Perminow G., Reikvam D. H., Lyckander L. G., Brandtzaeg P., Vatn M. H., Carlsen H. S.: Increased number and activation of colonic macrophages in pediatric patients with untreated Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15: 1368-1378
90. Pithadia A. B., Jain S.: Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Rep.* 2011; 63: 629-642

91. Polińska B., Matowicka- Karna J., Kemonia H.: Cytokiny w nieswoistych zapalnych chorobach jelit. *Postepy Hig Med Dosw (online)*. 2009; 63: 389-394
92. Quera R., Shanahan F.: Thromboembolism- an important manifestation of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2004; 99: 1971-1973
93. Rani R., Smulian A.G., Greaves D. R., Hogan S. P., Herbert D. R.: TGF-beta limits IL-33 production and promotes the resolution of colitis through regulation of macrophage function. *Eur J Immunol*. 2011; 41: 2000-2009
94. Reinshagen M.: Osteoporosis in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2008; 2: 202-207
95. Rodriguez-Bores L., Barahona-Garrido J., Yamamoto-Furusho J. K.: Basic and clinical aspects of osteoporosis in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007; 13: 6156-6165
96. Rogers A., Eastell R.: Review: Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor κ B ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90: 6323-6331
97. Roodman G. D.: Pathogenesis of myeloma bone disease. *J Cell Biochem*. 2010; 109: 283-291
98. Saidi S., Bouri F., Lencel P., Duplomb L., Baud'huin M., Delplace S., Leterme D., Miellot F., Heymann D., Hardouin P., Palmer G., Magne D.: IL-33 is expressed in human osteoblasts, but has no direct effect on bone remodeling. *Cytokine*. 2011; 53: 347-354
99. Saidi S., Magne D.: Interleukin-33: A novel player in osteonecrosis of the femoral head? *Joint Bone Spine*. 2011; 78: 550-554
100. Salim Sa'ad Y., Söderholm J. D.: Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17: 362-381
101. Scaldaferri F., Correale C., Gasbarrini A., Danese S.: Mucosal biomarkers in inflammatory bowel disease: Key pathogenic players or disease predictors? *World J Gastroenterol*. 2010; 16: 2616-2625
102. Schett G.: Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest*. 2011; 41: 1361-1366
103. Schirbel A., Fiocchi C.: Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. *J Dig Dis*. 2010; 11: 266-276
104. Schmitz J., Owyang A., Oldham E., Song Y., Murphy E., McClanahan T. K., Zurawski G., Moshrefi M., Qin J., Li X., Gorman D. M., Bazan J. F., Kastelein R. A.: IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005; 23: 479-490

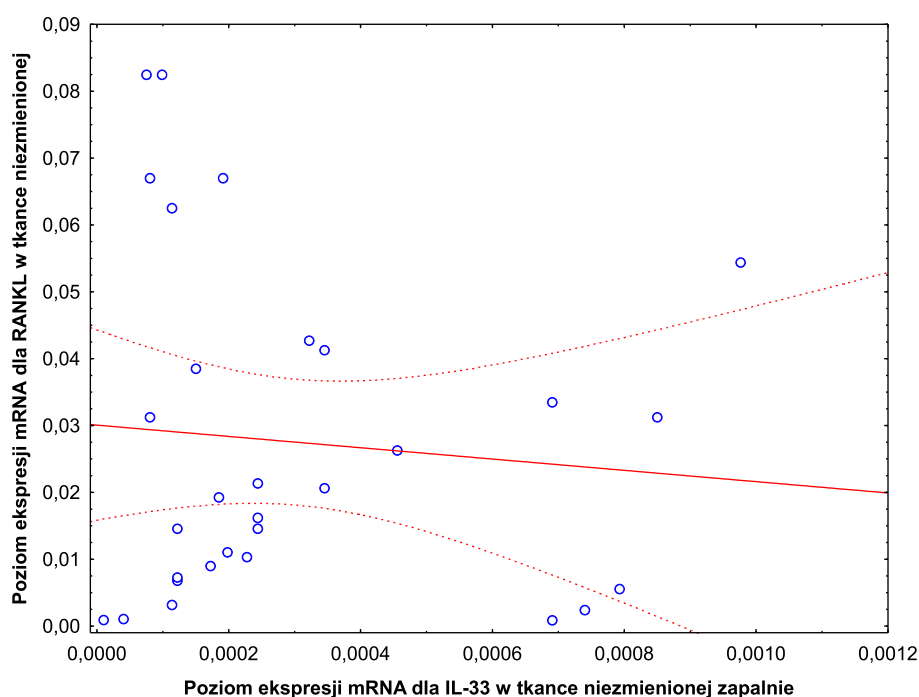
105. Schoppet M., Henser S., Ruppert V., Stübiger T., Al-Fakhri N., Maisch B., Hofbauer L. C.: Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF- κ B-dependent. *J Cell Biochem.* 2007; 100: 1430-1439
106. Schoppet M., Preissner K. T., Hofbauer L. C.: RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 549-553
107. Schulze J., Bickert T., Beil F. T., Zaiss M. M., Albers J., Wintges K., Streichert T., Klaetschke K., Keller J., Hissnauer T.-N., Spiro A. S., Gessner A., Schett G., Amling M., McKenzie A. N. J., Horst A. K., Schinke T.: Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells. *J Bone Miner Res.* 2011; 26: 704-717
108. Schwarz A., Tutsch E., Ludwig B., Schwarz E. C., Stallmach A., Hoth M.: Ca²⁺ signaling in identified T-lymphocytes from human intestinal mucosa. Relation to hyporeactivity, proliferation, and inflammatory bowel disease. *J Biol Chem.* 2004; 279: 5641-5647
109. Seidel C., Hjertner Ø., Abildgaard N., Heickendorff L., Hjorth M., Westin J., Nielsen J. L., Hjorth-Hansen H., Waage A., Sundan A., Børset M.: Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease. *Blood.* 2001; 98: 2269-2271
110. Seidelin J. B., Rogler G., Nielsen O. H.: A role for interleukin-33 in T_H 2-polarized intestinal inflammation? *Mucosal Immunol.* 2011; 4: 496-502
111. Seidelin J. B., Bjerrum J. T., Coskun M., Widjaya B., Vainer B., Nielsen O. H.: IL-33 is upregulated in colonocytes of ulcerative colitis. *Immunol Lett.* 2010; 128: 80-85
112. Shih T.-Ch., Hsieh S.-Y., Hsieh Y.-Y., Chen T.-Ch., Yeh Ch.-Y., Lin Ch.-J., Lin D.-Y., Chiu Ch.-T.: Aberrant activation of nuclear factor of activated T cell 2 in lamina propria mononuclear cells in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2008; 14: 1759-1767
113. Shoback D.: Update in osteoporosis and metabolic bone disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 747-753
114. Sostegni R., Daperno M., Scaglione N., Lavagna A., Rocca R., Pera A.: Review article: Crohn's disease: monitoring disease activity. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003; 17: 11-17
115. Stanisławowski M., Kmiec Z.: Udział RANK, RANKL i OPG w osteolizie towarzyszącej nowotworom. *Postepy Hig Med Dosw (online).* 2009; 63: 234-241
116. Sun P., Ben Q., Tu S., Dong W., Qi X., Wu Y.: Serum interleukin-33 levels in patients with gastric cancer. *Dig Dis Sci.* 2011; 56: 3596-3601
117. Szalay F., Hegedus D., Lakatos P. L., Tornai I., Bajnok E., Dunkel K., Lakatos P.: High serum osteoprotegerin and low RANKL in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 2003; 38: 395-400

118. Takayanagi H.: Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 292-304
119. Talabot-Ayer D., McKee T., Gindre P., Bas S., Baeten D. L., Gabay C., Palmer G.: Distinct serum and synovial fluid interleukin (IL)-33 levels in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 2012; 79: 32-37
120. Talabot-Ayer D., Lamacchia C., Gabay C., Palmer G.: Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem.* 2009; 284: 19420-19426
121. Tanaka H., Mine T., Ogasa H., Taguchi T., Liang C.T.: Expression of RANKL/OPG during bone remodeling in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 411: 690-694
122. Tanaka S., Nakamura K., Takahasi N., Suda T.: Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL– RANK signaling system. *Immunol Rev.* 2005; 208: 30-49
123. Tanaka Y., Nakayamada S., Okada Y.: Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005; 4: 325-328
124. Tat S. K., Pelletier J.-P., Velasco C. R., Padrines M., Martel-Pelletier J.: New perspective in osteoarthritis: The OPG and RANKL system as a potential therapeutic target? *Keio J Med.* 2009; 58: 29-40
125. Theoleyre S., Wittrant Y., Kwan Tat S., Fortun Y., Redini F., Heymann D.: The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15: 457-475
126. Tilg H., Moschen A. R., Kaser A., Pines A., Dotan I.: Gut, inflammation and osteoporosis: basic and clinical concepts. *Gut.* 2008; 57: 684-694
127. Tsuda E., Goto M., Mochizuki S., Yano K., Kobayashi F., Morinaga T., Higashio K.: Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 234: 137-142
128. Turner J. R.: The Gastrointestinal Tract. Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease 2009; Professional VIII Edition, Saunders Elsevier: 807-814
129. Vega D., Maalouf N. M., Sakhaee K.: The role of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 4514-4521
130. Virk M. S., Lieberman J. R.: Tumor metastasis to bone. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9: S5
131. Wada T., Nakashima T., Hiroshi N., Penninger J. M.: RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.* 2006; 12: 17-25
132. Wang Y., Liu X. P., Zhao Z. B., Chen J. H., Yu C. G.: Expression of CD4+ forkhead box P3 (FOXP3)+ regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *J Dig Dis.* 2011; 12: 286-294

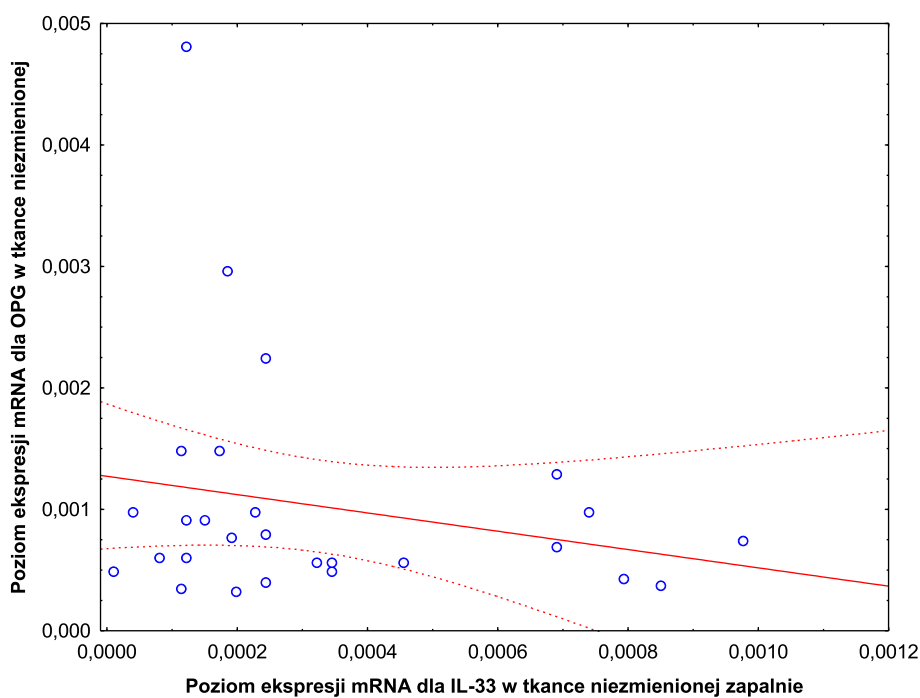
133. Wojas J., Pajtasz-Piasecka E.: Oddziaływanie komórek dendrytycznych z limfocytami T regulatorowymi. *Postepy Hig Med Dosw* (online). 2010; 64: 167-174
134. Wood I. S., Wang B., Trayhurn P.: IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 384: 105-109
135. Xavier R. J., Podolsky D. K.: Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007; 448: 427-434
136. Yamamoto S., Nakase H., Mikami S., Inoue S., Yoshino T., Takeda Y., Kasahara K., Ueno S., Uza N., Kitamura H., Tamaki H., Matsuura M., Inui K., Chiba T.: Long-term effect of tacrolimus therapy in patients with refractory ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008; 28: 589-597
137. Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Mochizuki S., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N., Suda T.: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *PNAS*. 1998; 95: 3597-3602
138. Yasuoka S., Kawanokuchi J., Parajuli B., Jin S., Doi Y., Noda M., Sonobe Y., Takeuchi H., Mizuno T., Suzumura A.: Production and functions of IL-33 in the central nervous system. *Brain Res*. 2011; 1385: 8-17
139. Yun T. J., Chaudhary P. M., Shu G. L., Frazer J. K., Ewings M. K., Schwartz S. M., Pascual V., Hood L. E., Clark E. A.: OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J Immunol*. 1998; 161: 6113-6121
140. Zaiss M. M., Kurowska-Stolarska M., Böhm Ch., Gary R., Scholtysek C., Stolarski B., Reilly J., Kerr S., Millar N. L., Kamradt T., McInnes I. B., Fallon P. G., David J.-P., Liew F. Y., Schett G.: IL-33 shifts the balance from osteoclast to alternatively activated macrophage differentiation and protects from TNF- α -mediated bone loss. *J Immunol*. 2011; 186: 6097-6105

10. Aneks

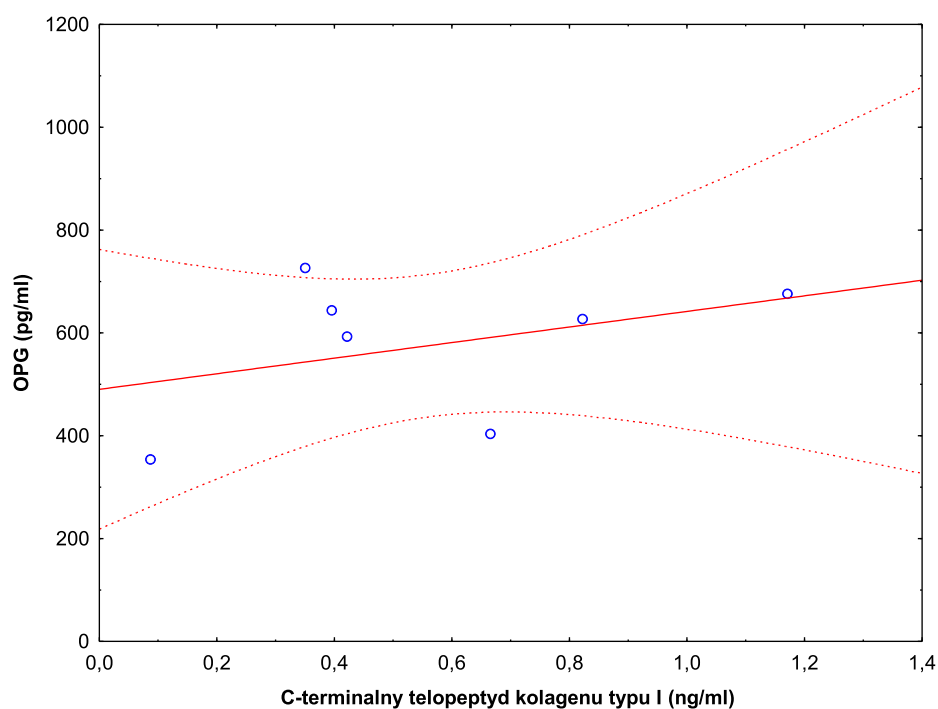
W Aneksie przedstawiono zestawienia zbadanych zależności pomiędzy zmiennymi, dla których nie zaobserwowano znamienności statystycznej.



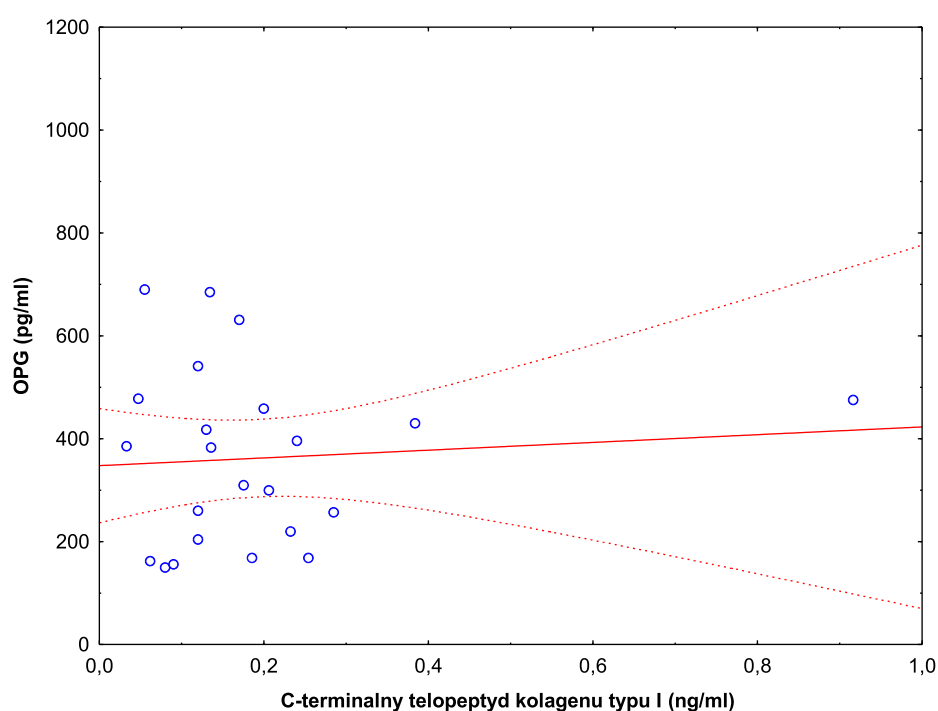
Ryc. A1. Wykres rozrzutu ekspresji mRNA dla RANKL względem ekspresji mRNA dla IL-33 w tkance niezmięnionej zapalnie w grupie osób zdrowych ($n=30$) ($r=-0,02$; brak istotności statystycznej) (korelacja porządku rang Spearmana).



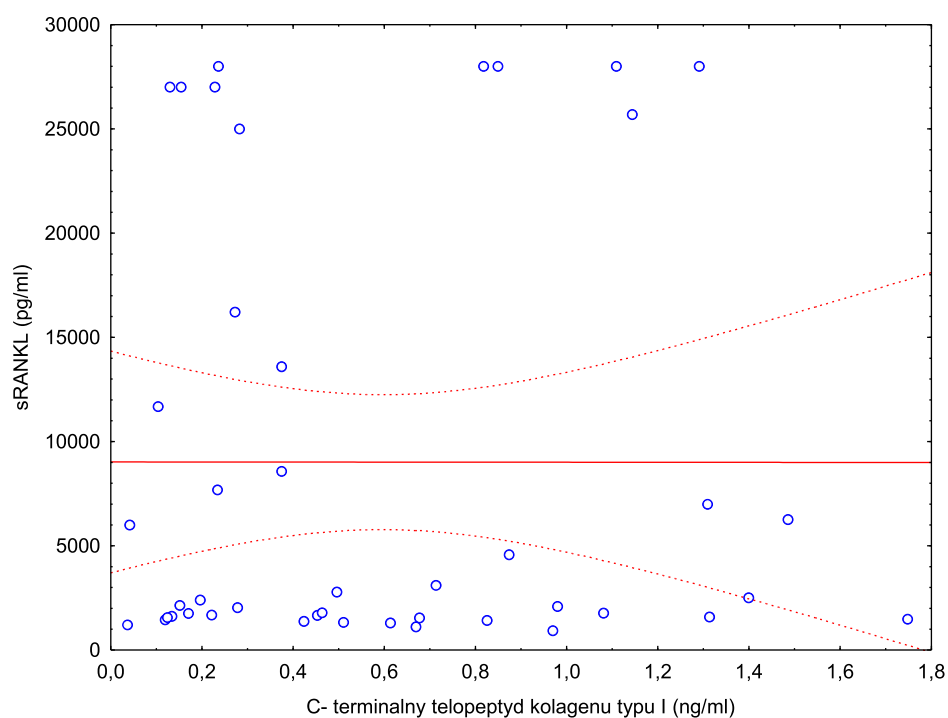
Ryc. A2. Wykres rozrzutu ekspresji mRNA dla OPG względem ekspresji mRNA dla IL-33 w tkance niezmięnionej zapalnie w grupie osób zdrowych ($n=27$) ($r=-0,2$; brak istotności statystycznej) (korelacja porządku rang Spearmana).



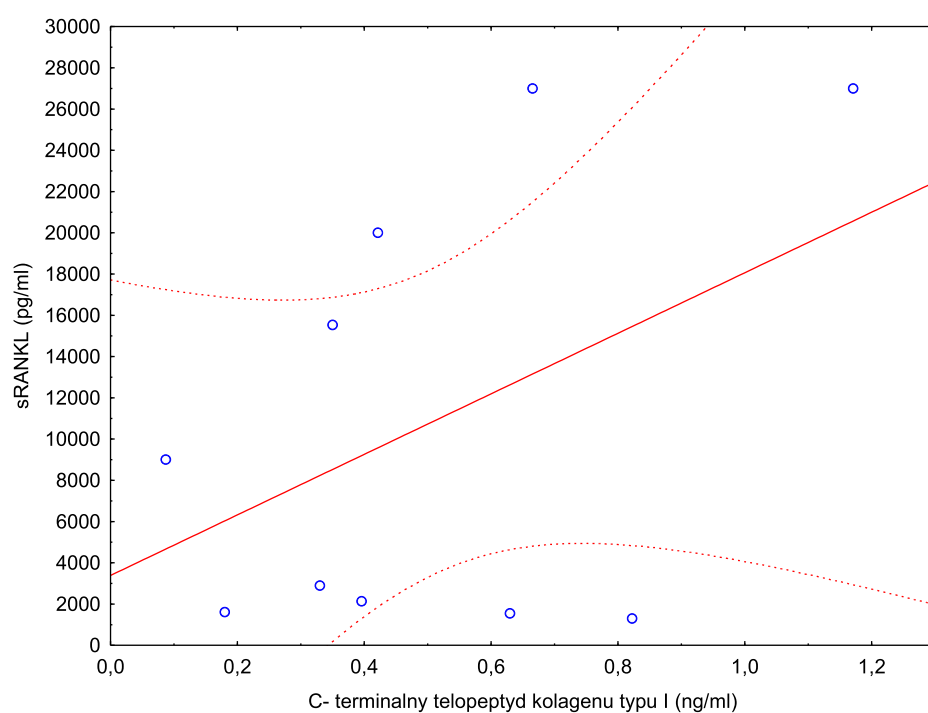
Ryc. A3. Wykres rozrzutu stężenia OPG (pg/ml) względem stężenia C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I (ng/ml) w grupie chorych na ChLC ($n=7$) ($r=0,21$; brak istotności statystycznej) (korelacja porządku rang Spearmana).



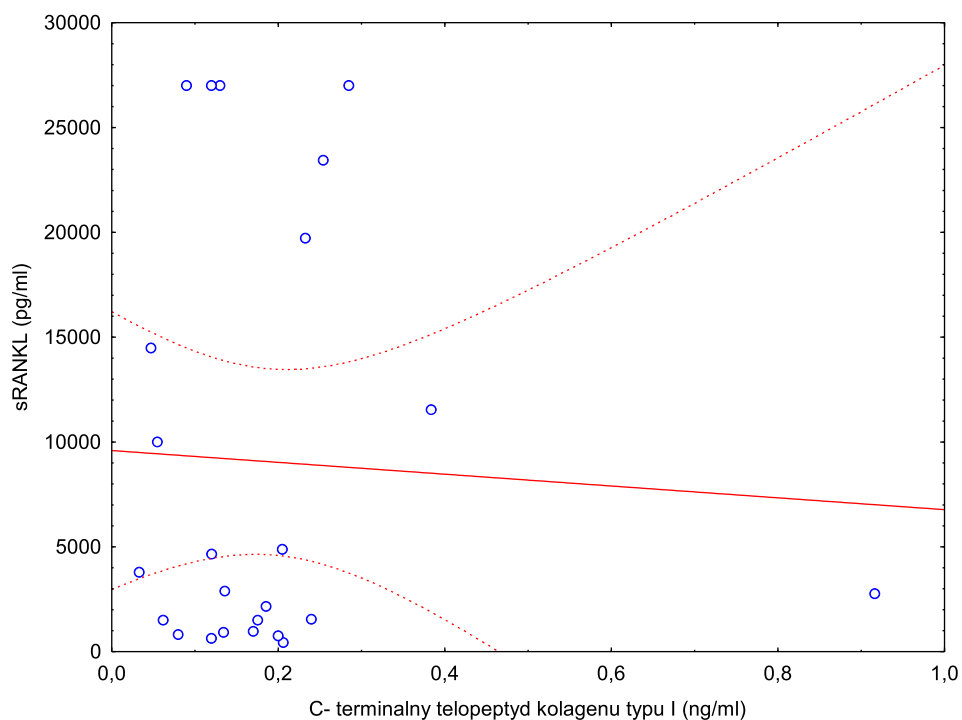
Ryc. A4. Wykres rozrzutu stężenia OPG (pg/ml) względem stężenia C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I (ng/ml) w grupie osób zdrowych ($n=23$) ($r=-0,002$; brak istotności statystycznej) (korelacja porządku rang Spearmana).



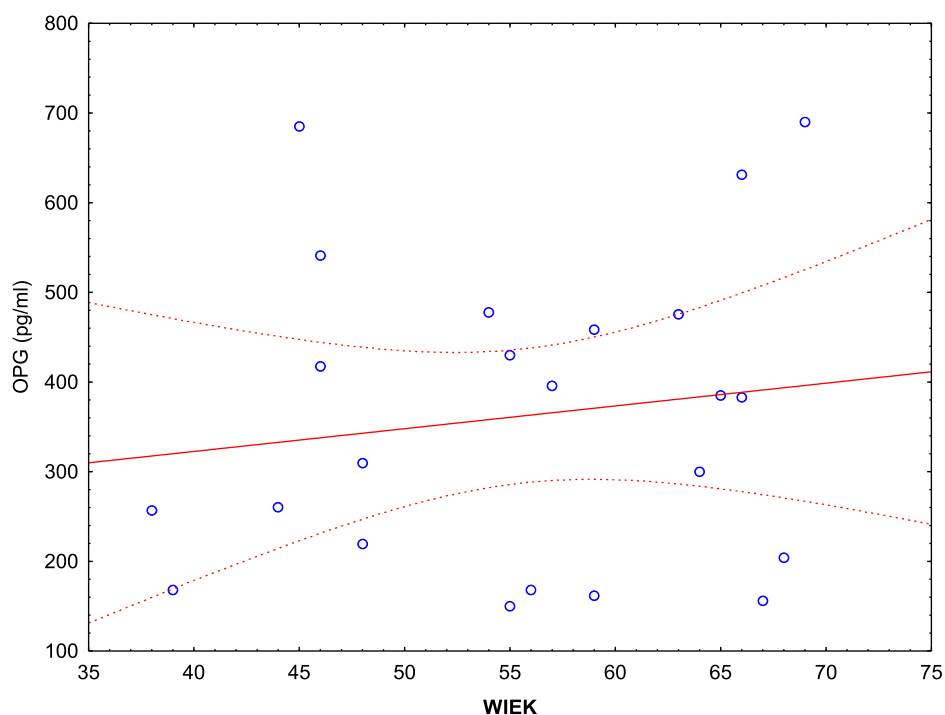
Ryc. A5. Wykres rozrzutu stężenia sRANKL (pg/ml) względem stężenia C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I (ng/ml) w grupie chorych na WZJG ($n=44$) ($r=0,025$; brak istotności statystycznej) (korelacja porządku rang Spearmana).



Ryc. A6. Wykres rozrzutu stężenia sRANKL (pg/ml) względem stężenia C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I (ng/ml) w grupie chorych na ChLC ($n=10$) ($r=0,176$; brak istotności statystycznej) (korelacja porządku rang Spearmana).



Ryc. A7. Wykres rozrzutu stężenia sRANKL (pg/ml) względem stężenia C-terminalnego telopeptydu kolagenu typu I (ng/ml) w grupie osób zdrowych ($n=24$) ($r=0,022$; brak istotności statystycznej) (korelacja porządku rang Spearmana).



Ryc. A8. Wykres rozrzutu stężenia OPG (pg/ml) względem wieku w grupie kontrolnej ($n=23$) ($r=0,06$; brak istotności statystycznej) (korelacja porządku rang Spearmana).

