

Rola czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF-alfa) w patogenezie stwardnienia rozsianego

The role of the tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in the pathogenesis of multiple sclerosis

ANITA GEPPERT, JACEK LOSY

Z Katedry i Kliniki Neurologii AM w Poznaniu

STRESZCZENIE. *Wiele danych sugeruje, że cytokiny odgrywają istotną rolę w patofizjologii stwardnienia rozsianego, zarówno przez regulację nieprawidłowych odpowiedzi immunologicznych, jak również przez pośrednictwo w uszkodzeniu mieliny. TNF-alfa, jako jeden z głównych mediatorów odpowiedzi zapalnej, pełni ważną rolę w patogenezie stwardnienia rozsianego. W tym artykule omówiono rolę TNF-alfa w stwardnieniu rozsianym.*

SUMMARY. *Numerous data suggest that cytokines play an important role in the multiple sclerosis pathophysiology, both through regulation of inappropriate immunological reactions and through mediation in myelin damage. The TNF-alpha, as one of the main mediators of the inflammatory reaction, plays an important role in the pathogenesis of multiple sclerosis. The role of TNF-alpha in the multiple sclerosis is discussed in the paper.*

Słowa kluczowe: TNF-alfa / stwardnienie rozsiane

Key words: TNF-alpha / multiple sclerosis

Patogeneza stwardnienia rozsianego (s.r.) jest nadal nierozwiązanym problemem. Próby znalezienia bezpośredniego czynnika infekcyjnego nie powiodły się. Istnieje coraz więcej danych przemawiających za hipotezą wieloczynnikowej etiologii s.r., opartej o wczesne zakażenie jednym lub kilkoma wirusami, szczególne podłoże genetyczne oraz złożony odczyn autoimmunizacyjny. Być może słuszny jest pogląd, iż infekcja wirusowa (odra, ospa wietrzna, grypa) może wywołać na drodze krzyżowej uczulenie na własne białko zasadowe mieliny (MBP), doprowadzając w procesie autoimmunizacji do demielinizacji w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (o.u.n.). Zwrócono więc uwagę na cytokiny, głównie o właściwościach cytotoksycznych. Są one uwalniane przez uczulone komórki immunokompetentne organizmu, które po przejściu z krwiobiegu do o.u.n.

mogą powodować uszkodzenie mieliny i oligodendrogleju [26]. Nie istnieje również żaden biologiczny parametr mogący służyć jako specyficzny marker aktywności s.r. Temat cytokin stał się ostatnio jednym z głównych zagadnień w badaniach nad s.r. Wiele danych sugeruje, że cytokiny odgrywają istotną rolę w patofizjologii s.r. zarówno przez regulację nieprawidłowych odpowiedzi immunologicznych, jak też przez pośrednictwo w uszkodzeniu mieliny i oligodendrocytów [9, 20, 22, 23, 26]. TNF-alfa i inne cytokiny (TNF-beta, interferon (IFN) gamma) są uważane za czynniki sprzyjające rozwojowi s.r. Ostatnie badania nad TNF-alfa *in vitro* i *in vivo* podkreślają jego rolę w patogenezie s.r. [1, 20]. Cytokiny jako wolne glikoproteiny bez właściwości immunoglobulin, działając na drodze nieenzymatycznej, regulują funkcję innych komórek [4].

TNF-alfa został odkryty w 1975 r. jako czynnik wywołujący martwicę krwotoczną niektórych linii komórek nowotworowych [5]. TNF-alfa nie posiada swoistości gatunkowej. Gen dla ludzkiego TNF-alfa znajduje się w krótkim ramieniu chromosomu 6 w obrębie genów głównego układu zgodności tkankowej. Prekursor TNF-alfa pojawia się na powierzchni komórki jako białko transbłonowe i w wyniku działania proteinaż uwalniany jest do środowiska. Zbudowany jest ze 157 aminokwasów. Aktywny biologicznie TNF-alfa występuje w postaci trimerów połączonych niekowalencyjnie. Produkowany jest głównie przez makrofagi i monocyty, ale także przez neutrofile, keratynocyty, komórki tuczne, limfocyty T (zarówno CD4+ jak i CD8+) oraz limfocyty B. Najsilniejszym bodźcem do jego produkcji przez makrofagi są lipopolisacharydy ścian bakteryjnych (endotoksyny). Produkcję TNF-alfa stymulują: interleukina (IL) 2, IFN-gamma, czynniki mitogenne, swoiste antygeny i sam TNF-alfa (autokrynowo). Inhibitorami wydzielania TNF-alfa są glikokortykosteroidy, IL4, IL10, prostaglandyna (PG) E2. TNF-alfa działa na komórki efektorowe przez aktywację swoistych receptorów występujących prawie na wszystkich jądrzastych komórkach ssaków. Stwierdzono obecność dwóch rodzajów receptorów dla TNF-alfa: TNF RI (55 kDa) i TNF RII (75 kDa). TNF-alfa, jako jedna z głównych cytokin odpowiedzi zapalnej i immunologicznej, może wzmacniać proliferację i różnicowanie limfocytów B, proliferację limfocytów T, stymulować cytotoksyczność komórek NK i makrofagów [14, 20]. Indukuje uwolnienie wielu cytokin np. IFN-gamma (z limfocytów) oraz IL1, IL6, NGF (*nerve growth factor*), IFN-beta, prostaglandyn, leukotrienów (z makrofagów). Wzmaga też ekspresję na powierzchni komórek antygenów zgodności tkankowej klasy pierwszej i współdziała z IFN-gamma w indukcji antygenów zgodności tkankowej klasy drugiej. Jednym z najistotniejszych efektów działania TNF-alfa jest jego działanie prozapalne.

W tym zakresie nasila przyleganie monocytów, limfocytów oraz neutrofilów do komórek endotelium. Odbywa się to przez nasilenie ekspresji ICAM1 (*intracellular adhesion molecule-1*). Stymuluje wzrost fibroblastów, astrocytów, komórek mięśni gładkich i naczyń krwionośnych [14]. Należy też podkreślić, że makrofagi przez uwalnianie TNF-alfa uszkadzają śródbłonki naczyń żylnych mózgu. Obserwowano również późniejsze „trawienie” MBP przez makrofagi [6]. Najbardziej znanym działaniem TNF-alfa jest efekt cytotoksyczny względem niektórych linii komórek nowotworowych [5]. Na drodze apoptozy (rodzaj śmierci komórki polegający na uszkodzeniu jej jądra bez pierwotnej destrukcji błony cytoplazmatycznej, powolnym niesynchronicznym tempie obumierania komórki) prowadzi do ich destrukcji prawdopodobnie przez aktywację endogennych nukleaz [6, 11, 14].

Upraszczając nasze spojrzenie na skomplikowaną sieć interakcji między cytokinami dzielimy je na prozapalne, związane z fenotypem limfocytów Th1 (TNF-alfa, IFN-gamma, IL1b, IL2) i antyzapalne, związane z fenotypem limfocytów Th2 (IFN-beta, IL4, IL10, TGF – *transforming growth factor*) [20]. Substancjami, które potrafią hamować prozapalne właściwości cytokin Th1 są m.in. ich rozpuszczalne receptory i przeciwciała przeciw nim skierowane. Liczne dane sugerują pośrednictwo cytokin z grupy Th1 w wielu reakcjach na terenie układu nerwowego u chorych na s.r. [1, 17, 20]. Cytokiny wykrywane w o.u.n. mogą być produkowane przez komórki o.u.n. lub pochodzić z układu krążenia. Cytokiny jako hydrofilne peptydy nie są w stanie przekroczyć bariery krew-mózg bez związania się z receptorem błonowym. Wspomniany powyżej fakt, iż TNF-alfa aktywuje ICAM1 na powierzchni endotelium wskazuje na jego istotną rolę w adhezji, która jest wymagana do przekroczenia przez komórki bariery krew-mózg. Mechanizm zapoczątkowujący uszkodzenie tej bariery i intratekalne zapalenie w s.r. nie został jednoznacznie wyjaśniony. Udowodniono, iż po-

ziom TNF-alfa w płynie mózgowo-rdzeniowym, surowicy, koreluje z uszkodzeniem bariery u pacjentów z aktywną postacią s.r. [4, 17, 27, 28, 30, 33].

Laboratoryjne metody pomiaru poziomu TNF-alfa w surowicy, innych płynach ustrojowych i tkankach, stają się ostatnio ważną częścią repertuaru badań paraklinicznych. Wiele badań wykazuje wyższy poziom TNF-alfa w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na s.r. w czasie występowania rzutu oraz w okresie 2 tygodni poprzedzających jego wystąpienie, w żadnym przypadku u chorych ze stacjonarnym s.r. [29]. U chorych z aktywnym s.r. średni poziom TNF-alfa w płynie mózgowo-rdzeniowym bywa wyższy niż w odpowiedniej surowicy [29]. Zaobserwowano dodatnią korelację między poziomem TNF-alfa w płynie mózgowo-rdzeniowym a pogarszającym się stanem chorych [29]. Obserwowano też większą częstość występowania TNF-alfa w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych z aktywnym s.r. niż w grupie kontrolnej [10]. W badaniach tych nie obserwowano korelacji między pleocytozą płynu mózgowo-rdzeniowego a poziomem TNF-alfa, co sugeruje produkcję tej cytokiny przez komórki w o.u.n., a nie w płynie mózgowo-rdzeniowym. Dane wskazujące na wzrost produkcji TNF-alfa w czasie świeżego rzutu i w okresie 2 tygodni przed sugerują, iż TNF-alfa może brać udział w powstaniu nowych ognisk demielinizacji [10, 18, 29, 31]. Istnieją jednak badania, w których TNF-alfa nie był wykrywalny w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych z aktywnym s.r., nawet gdy udowodniona była rozległa demielinizacja [8]. W badaniach dotyczących produkcji TNF-alfa przez komórki immunokompetentne stwierdzono, iż niestymulowane makrofagi krwi obwodowej i płynu mózgowo-rdzeniowego chorych na s.r., podobnie jak w grupach kontrolnych, nie produkują TNF-alfa [18]. Po ich stymulacji wytwarzanie tej cytokiny w grupach chorych na s.r. było zdecydowanie wyższe niż w grupie kontrolnej [18]. Inne dane wykazały nato-

miast zwiększone spontaniczne wytwarzanie TNF-alfa przez niestymulowane monocyty krwi chorych na s.r. w okresie rzutu choroby, jak też w remisji [21]. Stymulacja monocytów przez lipopolisacharyd nie wpływa w sposób istotny na produkcję TNF-alfa [21]. Dobrze znany związek stwardnienia rozsianego z fenotypem HLA-DR2 może być częściowo wyjaśniony przez skłonność komórek T z HLA-DR2+ do zwiększonej produkcji TNF-alfa [34].

Wiele cytokin jest uważanych za cząsteczki efektorowe i immunomodulatory zarówno w s.r., jak i w EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*). EAE, reprezentujący model s.r., jest szeroko używany do analizowania różnych aspektów reakcji zapalnych w o.u.n., również w celu wyjaśnienia roli cytokin. Detekcja cytokin z udziałem mRNA wykazała, iż pierwszymi cytokinami pojawiającymi się w o.u.n. podczas EAE są TNF-beta, IL12, następnie IFN-gamma i TNF-alfa [15]. Wykazano, iż MBP specyficzne komórki T lub klony komórek zdolne do transferowania EAE należą do podtypu Th1 [32]. W pewnych badaniach, używając przeciwciał przeciwko TNF-alfa lub rozpuszczalnego receptora TNF RI, hamowano wystąpienie EAE [12, 24]. Liczne więc dane jednoznacznie sugerują rolę TNF-alfa i innych cytokin w wyzwalaniu EAE. TNF-alfa został zidentyfikowany w ostrych i przewlekłych ogniskach demielinizacyjnych. Nie stwierdzono jej obecności w starych, nieczynnych ogniskach [24]. Wyniki te sugerują, że TNF-alfa może być wytwarzany w obrębie ogniska demielinizacyjnego. Stwierdzono obecność TNF-alfa na astrocytach w różnych miejscach plaki, na makrofagach w jej centrum oraz w komórkach endotelium na brzegach bardzo aktywnych ognisk demielinizacji [4, 11, 19, 24, 25].

W niektórych badaniach podjęto próby oceny wpływu terapii steroidami na produkcję cytokin, w tym TNF-alfa. Uzyskane dane wykazały, iż Methyloprednisolon hamuje produkcję TNF-alfa indukowaną lipopolisacharydem w sposób zależny od dawki [13].

Dane z eksperymentalnego modelu s.r. pośrednio świadczą o udziale TNF-alfa w uszkodzeniu układu nerwowego. TNF-alfa uwalniany przez autoreaktywne komórki T, makrofagi lub inne komórki może brać udział w zapalnym procesie demielinizacyjnym m.in. przez stymulowanie sekrecji innych mediatorów zapalenia, przez cytotoksyczne działanie w stosunku do endotelium, czy też przez bezpośrednie uszkodzenie osłonki mielinowej i oligodendrocytów. Interpretacja roli cytokin w s.r. jest więc sprawą niezwykle złożoną i nie do końca poznaną. Jak cytokiny ogólnie, tak i TNF-alfa nie może być obecnie uznany za pierwotny czynnik w rozwoju uszkodzeń na terenie układu nerwowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Arnason B.: The role of cytokines in multiple sclerosis. *Neurology* 1995, 45, suppl. 6, S54.
2. Beck J. i wsp.: Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: Do cytokines trigger off exacerbations? *Acta Neurol. Scand.* 1988, 78, 318.
3. Beutler B., Cerami A.: Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N. Engl. J. Med.* 1987, 316, 379.
4. Brosnan C.F. i wsp.: Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: Correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. *Neurology* 1995, suppl. 6, S16-S21.
5. Carswell E.A. i wsp.: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 3666.
6. Cendrowski W.: Stwardnienie rozsiane. PZWL, 1993, 68.
7. Franciotta D.M. i wsp.: Tumor necrosis factor in serum and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 1989, 26, 787.
8. Gallo P. i wsp.: Tumor necrosis factor (TNF-alpha) and neurological diseases. Failure in detecting TNF-alpha in the cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. AIDS dementia complex, and brain tumors. *J. Neuroimmunol.* 1989, 23, 41.
9. Hartung H.P.: Immune-mediated demyelination. *Ann. Neurol.* 1993, 33, 563-567.
10. Hauser S.L. i wsp.: Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients: Frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6. *Neurology* 1990, 40, 1735.
11. Hofman F.M. i wsp.: Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J. Exp. Med.* 1989, 170, 607.
12. Hohlfeld R.: Inhibitors of tumor necrosis factor alpha: Promising agents for the treatment of multiple sclerosis? *Multiple Sclerosis* 1996, 1, 376-378.
13. Imamura K. i wsp.: Cytokine production by peripheral blood monocytes/macrophages in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol. Scand.* 1993, 87, 4, 281-285.
14. Imamura K. i wsp.: Cytokine production by peripheral blood monocytes/macrophages in the patients with multiple sclerosis and its suppression by methylprednisolone. *Rinsho-Shinkeigaku* 1992, 33, 3, 276-280.
15. Issazadeh S. i wsp.: Dynamics of mRNA expression for Interleukin 10, Interleukin 12, cytolisin, tumor necrosis factor alpha and beta in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. In preparation.
16. James B. i wsp.: Serum and CSF levels of IL-2, sIL-2R, TNF-alpha, and IL-1beta in chronic progressive multiple sclerosis: Expected lack of clinical utility. *Neurology* 1991, 41, 121-123.
17. Lucas K., Hohlfeld R.: Differential aspects of cytokines in the immunopathology of multiple sclerosis. *Neurology* 1995, 45, suppl. 6, S4-S5.
18. Meril J.E. i wsp.: In vitro study of mediators of inflammation in multiple sclerosis. *J. Clin. Immunol.* 1989, 9, 84.
19. Nathan C., Sporn M.: Cytokines in context. *J. Biol.* 1991, 113, 981.
20. Olsson T.: Role of cytokines in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. Neurology* 1994, 1, 7-19.
21. Piotrowska K. i wsp.: Wydzielanie czynnika nekrotycznego guza alfa (Tumor necrosis factor alpha, TNF-alpha) przez monocyty krwi obwodowej pacjentów ze stwardnieniem rozsianym i podoстрыm stwardniającym zapaleniem mózgu. *Neur. Neurochir. Pol.* 1991, 25, 455.

22. Robbins D.S. i wsp.: Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. *J. Immunol.* 1987, 139, 6, 156.
23. Selmaj K. i wsp.: Multiple sclerosis: effects of activated T-lymphocyte-derived products on organ cultures of nervous tissue. *J. Neuroimmunol.* 1988, 18, 255.
24. Selmaj K., Raine C.S.: Experimental autoimmune encephalomyelitis: Immunotherapy with anti-tumor necrosis factor antibodies and soluble tumor necrosis factor receptors. *Neurology* 1995, 45, suppl. 6, S44-S49.
25. Selmaj K. i wsp.: Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J. Clin. Invest.* 1991, 87, 949.
26. Selmaj K., Raine C.S.: Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann. Neurol.* 1988, 23, 339.
27. Sharief M.K. i wsp.: Increased levels of circulating ICAM-1 in serum and cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis. Correlation with TNF-alpha and blood-brain barrier damage. *J. Neuroimmunol.* 1993, 43, 15-22.
28. Sharief M.K., Thompson E.J.: In vivo relationship of tumor necrosis factor-alpha to blood-brain barrier damage in patients with active multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 1992, 38, 27-34.
29. Sharif M.K., Hentges R.: Association between tumor necrosis factor and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1991, 325, 467.
30. Tsukada N. i wsp.: Increased levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and tumor necrosis factor receptor in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1993, 43, 2679-2682.
31. Tsukada N. i wsp.: Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the CSF and sera of patients with multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 1991, 102, 230-234.
32. Voskuhl R.R. i wsp.: T helper 1 (TH1) functional phenotype of human myelin basic protein-specific T lymphocytes. *Autoimmunity* 1993, 15, 137-143.
33. Woodroffe M.N.: Cytokine production in the central nervous system. *Neurology* 1995, 45, suppl. 6, S6-S10.
34. Zipp F. i wsp.: Genetic control of multiple sclerosis: increased production of lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha by HLA-DR2+ T cells. *Ann. Neurol.* 1995, 38, 5, 723-730.

*Adres: Dr Anita Geppert, Katedra i Klinika Neurologii AM,
ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań*