

Nové poznatky v patogenezi Crohnovy choroby

B. Ambrůzová¹, M. Rádová^{1,2,3}, J. Michálek¹, M. Šachlová⁴, O. Slabý^{1,2,3}

¹ Advanced Cell Immunotherapy Unit, Lékařská fakulta MU Brno, vedoucí doc. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D.

² Klinika komplexní onkologické péče, MOÚ Brno, přednosta prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.

³ Výzkumná skupina Molekulární onkologie II – solidní nádory Středoevropského technologického institutu Brno, vedoucí RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.

⁴ Gastroenterologické oddělení, MOÚ Brno, vedoucí MUDr. Milana Šachlová, CSc. et Ph.D.

Souhrn: Crohnova nemoc je komplexní chronické zánětlivé onemocnění trávicí soustavy, na jehož patogenezi se podílí celá řada faktorů. Incidence Crohnovy nemoci v posledních letech zaznamenala poměrně prudký nárůst, a přestože je tato nemoc známa již delší dobu, její příčinu se doposud nepodařilo odhalit. Nové poznatky v patogenezi onemocnění přinesly studie zabývající se genetickou podstatou Crohnovy nemoci. Výsledky těchto studií poukazují na selhání mechanismů symbiózy střevní mikroflóry a střevního slizničního imunitního systému. Zdá se, že Crohnova nemoc vzniká nepřiměřenou reakcí imunitního systému na střevní mikroflóru u geneticky predisponovaných jedinců. S Crohnovou nemocí byla asociována celá řada genů. Mnohé z nich souvisejí s funkcí nespecifické imunitní odpovědi, jejíž nedostatky jsou v dnešní době považovány za klíčové v patogenezi Crohnovy nemoci. Cílem tohoto přehledového článku je shrnout nové poznatky v patogenezi Crohnovy nemoci na úrovni polymorfizmů v genech *NOD2*, *ATG16L1* a v genech signální dráhy IL23-Th17-lymfocyty a zmínit další směry výzkumu v problematice tohoto onemocnění.

Klíčová slova: Crohnova nemoc – patogeneze – *NOD2* – *ATG16L1* – IL23-Th17-lymfocyty

New knowledge of the pathogenesis of Crohn's disease

Summary: Crohn's disease is a complex chronic inflammatory disease of the gastrointestinal tract with multifactorial pathogenesis. Over the recent years, there has been rather a sharp increase in the incidence of Crohn's disease and, even though this disease had been known for some time, the cause remains unknown. Studies exploring genetic basis of Crohn's disease have provided new knowledge of the pathogenesis of this disease, suggesting that this may be associated with a failure of mechanisms behind symbiosis of gut microflora and intestinal mucosal immune system. Crohn's disease seems to be caused by inadequate immune response to intestinal flora in genetically predisposed individuals. Crohn's disease has been linked to a number of genes. Many of them are related to the modulation of non-specific immune response, defects of which are considered to be key in Crohn's disease pathogenesis. The aim of this review paper is to summarize the new knowledge on the pathogenesis of Crohn's disease at the level of polymorphisms of the *NOD2*, *ATG16L1* genes and the IL23-Th17-lymphocytes signalling pathway genes and to consider further research directions in this disease.

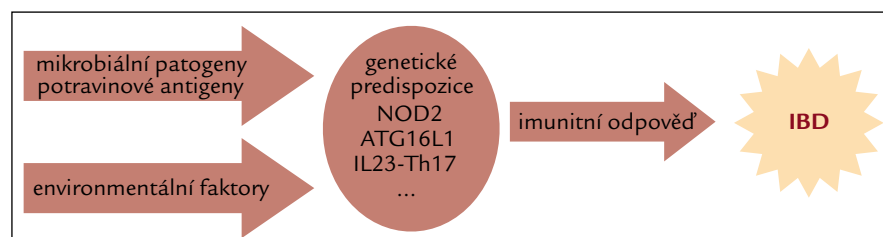
Key words: Crohn's disease – pathogenesis – *NOD2* – *ATG16L1* – IL23-Th17-lymphocytes

Úvod

Crohnova nemoc patří mezi nespecifické střevní záněty. Jedná se o chronické zánětlivé onemocnění trávicí soustavy. Přestože je tato choroba známa již několik desítek let, etiologii onemocnění se stále nepodařilo objasnit a ani patogenetické mechanismy nejsou uspokojivě popsány. Dříve se předpokládalo, že je Crohnova nemoc způsobena agresivní zánětlivou odpovědí a nekontrolovanou produkcí prozánětlivých mediátorů, což bylo později částečně potvrzeno úspěšným použitím biologické terapie namířené proti TNF α (tumor necrosis factor α) [1]. Hromadí se důkazy z posledních let však naznačují, že nemoc vzniká v důsledku nepřiměřené reakce na střevní mikroflóru u geneticky predisponova-

ných jedinců [2]. Hlubší porozumění patogenezi tohoto onemocnění přinesly v poslední době tzv. GWAS (genome-wide association studies), na jejichž základě byla identifikována řada genů asociovaných s touto nemocí [3–6]. V současné době je potvrzeno více než 30 genů majících spojitost s patogenézí Crohnovy nemoci a je pravděpodobné,

že se jejich počet bude zvyšovat [7]. Některé z nich jsou shrnuty v tab. 1. Crohnova nemoc je tedy komplexní onemocnění s polygenním základem. Je však zřejmé, že pro vznik a vývoj nemoci je nutná nejen přítomnost genetických predispozic, ale jejich kombinace s vlivy vnějšího prostředí (obr. 1). Bylo navrženo několik teorií, jejichž cílem je od-



Obr. 1. Crohnova nemoc vzniká kombinací genetických predispozic a vlivů vnějšího prostředí. Bylo dokázáno, že kouření, užívání orální hormonální antikoncepce a nesteroidních antirevmatik má negativní vliv na průběh Crohnovy nemoci. Mezi další vlivy vnějšího prostředí patří složení stravy, očkování, užívání antibiotik.

Tab. 1. Shrnutí některých genů, které jsou asociovány s Crohnovou nemocí (CD) a/nebo s ulcerózní kolitidou (UC).

Gen	Oblast genomu	CD	UC	Funkce
Detekce patogenů				
<i>NOD2</i> (nucleotide-binding oligomerization domain 2)	16q12	ano	ne	intracelulární detektor MDP
<i>TLR4</i> (toll-like receptor 4)	9q33.1	ano	?	povrchový detektor LPS
Autofagie				
<i>ATG16L1</i> (autophagy related 16-like 1)	2q37	ano	ne	účastní se procesu autofagie
<i>IRGM</i> (immunity-related GTPase M)	5q33	ano	?	účastní se procesu autofagie, vyžadován při odstraňování intracelulárních patogenů (zejména <i>Mycobacterium tuberculosis</i>) pomocí <i>IFNγ</i>
Signální dráha IL23-Th17-lymfocyty				
<i>IL23R</i> (interleukin-23 receptor)	1p31	ano	ano	specifická složka heterodimerního receptoru pro interleukin-23
<i>IL12B</i> (interleukin-12B, p40 subunit)	5q33	ano	ano	společná podjednotka IL23 a IL12
<i>STAT3</i> (signal transducer and activator of transcription)	17q21	ano	ano	pod vlivem STAT3 dochází k transkripci různých cytokinů (IL6, 10, 17, 21, 22 a 23)
<i>CCR6</i> [chemokín (C-C motif receptor 6)]	6q27	ano	ne	membránově vázaný protein, zprostředkovává migraci a chemotaxi buněk imunitního systému
Další geny				
<i>PTGER4</i> (prostaglandin E receptor 4)	5p13	ano	ne	jeden z receptorů zánětlivého mediátoru PGE2
<i>ZNF365</i> (zinc finger protein 365)	10q21	ano	ne	souvisí s mitózou
<i>SLC22A4</i> (solute carrier family 22, organic cation transporter)	5q31	ano	?	membránový přenašeč organických kationtů
<i>OCTN</i> (the carnitine/organic cation transporter)	5q31	ano	?	ovlivňuje přenos karnitinu, souvisí s oxidativním vzplanutím a eliminací patogenů
<i>CDH1</i> (E-cadherin)		ano	ano	exprimován buňkami střevního epitelu, ligand intraepiteliálních lymfocytů
<i>PTPN2</i> (T-cell protein tyrosine phosphatase)	18p11	ano	ne	různorodé interakce se STAT proteiny, bývá spojován s diabetem typu 1
<i>MHC</i> (Major histocompatibility komplex)	6p21	ano	ano	odlišné MHC gp II spojení mezi ulcerózní kolitidou a Crohnovou nemocí
<i>NKX2-3</i> (NK-2-transcription-factor-related, locus 3)	10q24	ano	ano	transkripční faktor ovlivňující vývoj sleziny a lymfatických uzlin
<i>MST1</i> (macrophage stimulating 1)	3p21	ano	ano	účastní se chemotaxe makrofágů a aktivuje následující prozánětlivé signály
<i>PLA2G2E</i> (secretory phospholipase A2)	1p36	ne	ano	uvolňuje arachidonovou kyselinu z fosfolipidové membrány
<i>IL10</i> (interleukin-10)	1q32	?	ano	imunosupresivní cytokin, reguluje střevní zánět
<i>IFNγ</i> (interferon γ)	12q15	ne	ano	rozhodující cytokin nespecifické a specifické odpovědi proti intracelulárním patogenům

halit takový faktor, popřípadě kombinaci více faktorů, jejichž působení by mělo vliv na vznik a průběh Crohnovy nemoci. Nejčastěji bývá v této souvislosti zmiňována hygienická hypotéza, která předpokládá, že na vzniku nemoci má značný podíl nedostatečný kontakt s enterickými patogeny v dětství. Takový jedinec je pak v dospělosti přecitlivělý na setkání s běžnou infekcí a může se u něj Crohnova nemoc vyvinout. Svou roli podle hypotézy sehrávají přehnané hygienické návyky. Teorie

také zohledňuje rodinné zázemí, způsob porodu, počet sourozenců, zda byla prodělána infekce *Helicobacter pylori*, kontakt s domácími zvířaty a další. Z výsledků epidemiologických studií také vyplývá, že Crohnovou nemocí jsou častěji postiženy osoby žijící ve vyspělých hustě osídlených oblastech, na rozdíl od venkovské populace, kde je Crohnova nemoc méně častá [8].

Četné důkazy upozorňují na pozmeněnou odpověď imunitního systému na mikrobiální motivy jako na jeden

z nejdůležitějších příspěvků v patogenezi onemocnění [9]. To bylo prokázáno dalšími studiemi, které ukazují, že chronický zánět typický pro Crohnovu nemoc se odvíjí od přítomnosti střevní mikroflóry [10,11]. Bakteriální druh, který by mohl být příčinou vzniku Crohnovy nemoci, však doposud nebyl identifikován. Podařilo se zjistit, že tenké střevo, obzvláště ileum, pacientů s Crohnovou nemocí je kolonizováno patogenním druhem bakterie *Escherichia coli*. Bakterie tohoto druhu jsou

schopny adherovat ke střevním epiteliálním buňkám a pronikat do nich. Nedávná Chassainova studie se zabývá způsobem, jakým tyto a jiné invazivní bakterie mohou způsobovat vznik časných lézí v ileu pacientů s Crohnovou nemocí [12].

Střevní mikroflóra a také potravinové antigeny jsou v neustálém kontaktu se střevní sliznicí. Jednovrstevný epitel, který odděluje dutinu střeva a střevní slizniční imunitní systém, funguje jako fyzikální bariéra proti potravinovým antigenům a mikrobům, ale aktivně se také podílí na zpracování případných antigenů a následné regulaci imunitní reakce [13]. Enterocyty plní funkci vstřebávání vody a živin, ale např. pohárkové buňky produkují hlen, který vytváří vrstvu na povrchu epitelu, a omezují tak nadměrný kontakt sliznice se střevní mikroflórou [14]. Některé buňky střevního epitelu produkují defenziny. Defenziny fungují jako endogenní antibiotika s mikrobicidní aktivitou proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Přirozená produkce defenzinů a dalších antimikrobiálních peptidů v trávicím traktu pomáhá omezovat invazi a adhezenci komenzálních a patogenních bakterií a napomáhá regulovat složení střevní mikroflóry. V tenkém střevě je, na rozdíl od tlustého střeva, mnohem méně bakterií. Podílí se na tom zřejmě nadprodukce α -defenzinů Panethovými buňkami [15]. Defenziny jsou v Panethových buňkách uloženy v sekrečních váčcích, k jejichž uvolnění do lumen střeva dochází až po stimulaci bakteriálními produkty. Kromě α -defenzinů existují i β -defenziny uvolňované specializovanými epiteliálními buňkami tlustého střeva. Za normálních okolností je konstitutivně produkován β -defenzin HBD1. Jen během zánětu nebo infekce dochází k syntéze i jiných defenzinů, např. indukibilního β -defenzinu HBD2 [16].

Dalším specializovaným typem enterocytů jsou M buňky. Ty pohlcují antigeny z lumen střeva a přenášejí je na opačnou stranu, kde případné an-

tigeny předávají ke zpracování dendritickým buňkám, nebo jsou přímo rozpoznány antigenně specifickými receptory B-lymfocytů [17]. M buňky se vyskytují v těsné blízkosti Peyerových plátů. V Peyerových plátech jsou T- a B-lymfocyty, dendritické buňky a makrofágy. Ve sliznici se nacházejí dendritické buňky, které vysílají své výběžky mezi epiteliální buňky až do lumen zažívacího traktu a aktivně vychytávají antigeny. Přímo v epiteliální vrstvě střeva jsou přítomny i tzv. intraepiteliální T-lymfocyty morfologicky podobné dendritickým buňkám, které monitorují poškozené buňky střevního epitelu [18]. Slizniční lymfocyty ovlivňují funkci epiteliálních buněk a epiteliální buňky mohou expresí MHC gp II fungovat jako buňky prezentující antigen a ovlivňovat imunkompetentní buňky [19]. Je zřejmé, že jakákoli změna v rozpoznávání bakterií a nedostatky v procesech vedoucích k jejich zneškodnění mohou způsobit selhání přirozené symbiózy mezi slizničním imunitním systémem a střevní mikroflórou [20,21].

Detekce patogenů, *NOD2*

V roce 2001 byl jako první gen vykazující predispozici ke vzniku Crohnovy choroby identifikován *NOD2* (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2, známý též jako *IBD1* nebo *CARD15*) [22,23]. *NOD2* se uplatňuje jako vnitrobuněčný receptor MDP (muramyl dipeptid) [24]. MDP je odvozen od peptidoglykanu, který tvoří strukturu buněčné stěny grampozitivních i gramnegativních bakterií. *NOD2* je exprimován monocyty, makrofágy, dendritickými buňkami, buňkami střevního epitelu (obzvláště Panethovými buňkami), ale i T_{reg} (T regulační) lymfocyty. *NOD2* za normálních okolností odpovídá na setkání s MDP aktivací NF- κ B (nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells) a MAPK (mitogen activated protein kinase), což vede k produkci prozánětlivých cytokinů a antimikrobiálních peptidů [25]. Charakteristickým znakem

NOD2 jsou repetice bohaté na leucin v C koncové oblasti proteinu, které se účastní vnitrobuněčného rozpoznávání patogenů [26]. Změny v genu *NOD2* vyskytující se v této oblasti jsou reprezentovány 3 polymorfismy (R702W, G908R, 1007fs) [27]. Přestože je *NOD2* v souvislosti s Crohnovou chorobou nejvíce prostudovaný, stále není úplně jasné, jakým způsobem polymorfismy v tomto genu ovlivňují náchylnost ke vzniku Crohnovy nemoci. U nositelů polymorfismu v genu *NOD2* byla zjištěna snížená aktivace NF- κ B po stimulaci *NOD2* bakteriálním peptidoglykanem [28] a také snížená produkce α -defenzinů Panethovými buňkami [29]. Pokles α -defenzinů, např. HD5 a HD6, byl prokázán u pacientů s ileální formou Crohnovy nemoci, kteří nesli polymorfismus v genu *NOD2*, zatímco hladiny TNF α a IL8 byly nezávislé na přítomnosti polymorfismu. Expres α -defenzinů v případě pacientů s Crohnovou nemocí tlustého střeva zůstala nezměněna. Funkčním následkem nízké hladiny α -defenzinů byla zeslabená antibakteriální obrana. Přestože přibližně jen 1/3 všech pacientů nese polymorfismus v genu *NOD2*, snížená produkce α -defenzinů byla nalezena v podstatě u všech pacientů. Musí tedy existovat ještě další mechanismus. Diferenciace Panethových buněk je řízena Wnt signalizační dráhou, která je transdukována prostřednictvím β -cateninu a transkripčního faktoru Tcf-4. Tato dráha udržuje progenitorové buňky v nediferencovaném stavu, ale zároveň indukuje maturaci Panethových buněk v intestinálních kryptách. Narušení této dráhy bylo pozorováno u pacientů s ileální formou Crohnovy nemoci. Hladiny Tcf-4 byly sníženy stejně jako hladiny defenzinů HD5 a HD6. Podobné snížení ale nebylo zřejmé u pacientů s postižením tlustého střeva. Bylo také zjištěno, že spojení mezi poklesem defenzinů Panethových buněk a Tcf-4 je nezávislé na genotypu *NOD2* [30]. Pozorován byl také pokles β -defenzinů. Hladiny HBD1 i HBD2

jsou nižší v tkáni tlustého střeva postiženého Crohnovou nemocí. Tento pokles je ale zřejmě způsoben sníženým počtem genů pro β -defenziny a nesouvisí s přítomností polymorfismu v genu *NOD2*. Vadná produkce defenzinů vede k postupnému přemnožení bakterií, jejich pomalé invazi střevní sliznicí a následně k imunologické odpovědi na střevní mikroflóru. Určité probiotické kmeny mají schopnost stimulovat produkci defenzinů. Užití probiotik má pozitivní vliv na průběh ulcerózní kolitidy, ale v případě Crohnovy nemoci mají probiotika omezené užití a jsou spíše méně užitečná [31].

Nedávno bylo také dokázáno, že N-glykolovaný MDP, který se vyskytuje u mykobakterií a některých aktinomyket, mnohem účinněji aktivuje NF- κ B než běžně se vyskytující N-acetylovaný MDP. Je tak možné, že polymorfismy v genu *NOD2* znemožňují správnou identifikaci mykobakterií. Pokud mykobakterie nejsou imunitním systémem rozpoznány, lidské tělo nedokáže infekci účinně čelit. Přestože je souvislost mezi Crohnovou nemocí a mykobakteriální infekcí známa už delší dobu [32],

není stále jasné, jestli je přítomnost mykobakterií příčinou, nebo důsledkem tohoto onemocnění [33].

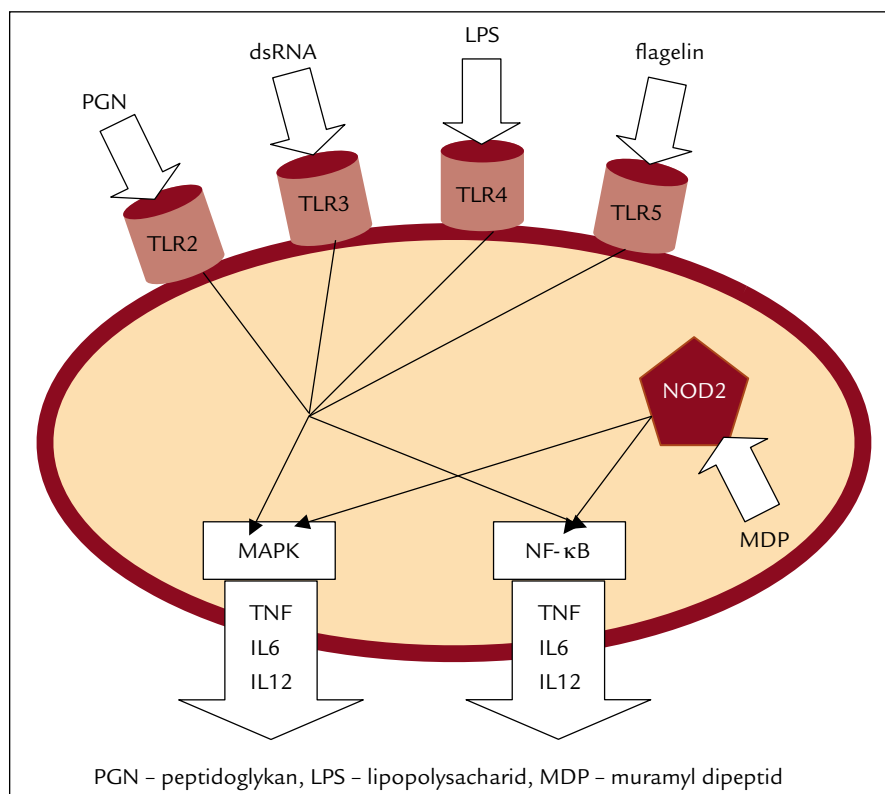
Rahmanova studie se zabývá vztahem *NOD2* a T_{reg} lymfocytů. Bylo dokázáno, že tyto lymfocyty jsou po stimulaci MDP chráněny před apoptózou zprostředkovanou ligandy Fas receptoru. Tato ochrana ale nebyla patrná u MDP-stimulovaných T_{reg} buněk pacientů s Crohnovou chorobou, u kterých byl prokázán polymorfismus v genu *NOD2*. Studie tak odhalila, že jednou z funkcí, kterou může *NOD2* v T_{reg} lymfocytech zastávat, je jejich ochrana proti apoptóze, k níž může docházet v prostředí bohatém na ligandy Fas receptoru (např. TNF α), jako je tomu např. v místě zaníceného střevního epitelu. To by mohlo být důvodem sníženého množství T_{reg} lymfocytů, které bylo již dříve pozorováno u pacientů s Crohnovou nemocí [34].

Studie jednovaječných dvojčat prokázala, že v 63,6 % trpí obě dvojčata Crohnovou nemocí [35], což ukazuje na významný podíl genetických predispozic pro vznik Crohnovy nemoci. Polymorfismy v genu *NOD2* se vysky-

tují s vyšší frekvencí u evropské populace, kde nese nejméně jeden z výše jmenovaných 3 polymorfismů přibližně 30 % všech pacientů [36]. Četnost jednotlivých variant se ale značně liší napříč populacemi. V České republice se u 46 % pacientů vyskytuje alespoň jedna forma genu *NOD2* a nejsilněji je s Crohnovou nemocí asociovan polymorfismus 1007fs. 42 % pacientů, kterým byla Crohnova nemoc diagnostikována v dětství, nese právě tuto variantu genu *NOD2*. Frekvence 1007fs v Čechách je 20 %, zatímco v severní Evropě jsou tyto hodnoty nižší (2,7–3 % Norsko, 4,8 % Finsko) [37]. Jak již bylo zmíněno, přítomnost polymorfismu v genu *NOD2* vykazuje spojitost s postižením ilea a s tvorbou fibrosenóz [38].

Detekce patogenů, TLR

TLR (toll-like receptors) fungují jako vnější receptory některých bakteriálních znaků (obr. 2) a jsou exprimovány na povrchu monocytů, makrofágů, dendritických a epiteliálních buněk. Dendritické buňky a makrofágy aktivované TLR produkují prozánětlivé cytokiny a chemokiny a exprimují vysoké hladiny kostimulačních molekul. Na rozdíl od toho signalizace prostřednictvím TLR ve střevních epiteliálních buňkách zabráňuje rozvoji zánětlivé odpovědi a podporuje navození homeostázy [39]. Střevní epiteliální buňky za normálních okolností exprimují ve větší míře *TLR3* a *TLR5*, zatímco *TLR2* a *TLR4* jsou na povrchu těchto buněk přítomny v mnohem menších množstvích [40]. U pacientů s nespecifickými střevními záněty vykazují buňky střevního epitelu změny v expresi *TLR3* a *TLR4*. V aktivní fázi onemocnění je patrné menší množství *TLR3* pouze v případě Crohnovy nemoci. Na rozdíl od toho je zvýšená exprese *TLR4* jak v případě Crohnovy nemoci, tak ulcerózní kolitidy. Expresce *TLR2* a *TLR5* zůstává nezměněná [41]. TLR jsou exprimovány i na povrchu Th-lymfocytů, jejich funkce ale není detailně prozkoumána. Přitom TLR a TCR (T cell re-



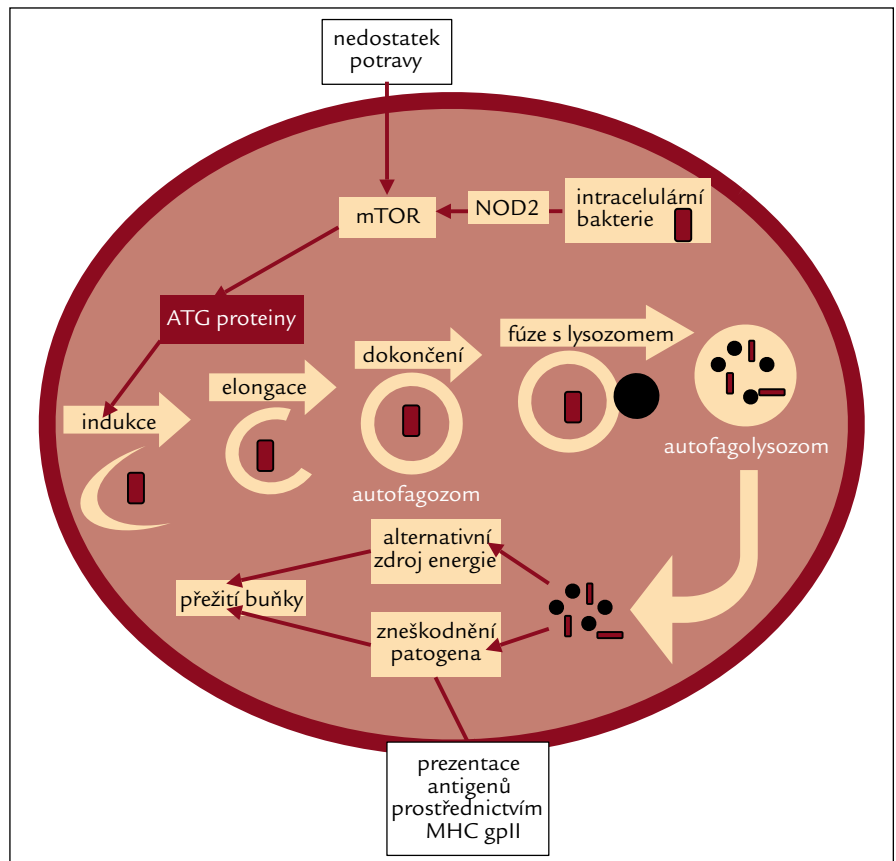
Obr. 2. Funkce *NOD2* a TLR.

ceptor) sdílejí podobnou signální dráhu, např. MAPK. Výsledky Gonzales-Navajasovy studie prokázaly, že TLR4 exprimované na povrchu efektorových Th-lymfocytů upravují po stimulaci LPS (lipopolysacharid) následnou aktivaci TCR a omezují zánětlivé procesy [42].

V souvislosti s Crohnovou nemocí byl potvrzen polymorfismus v genu pro *TLR4*. Tento polymorfismus je charakteristický záměnou asparaginu na 299. pozici za glycin (D299G) [43]. *TLR4* váže kromě jiných ligandů hlavně LPS, který je hlavní složkou vnější membrány gramnegativních bakterií. Arbour et al prokázali, že nositelé polymorfismu Asp299Gly mají oslabenou imunitní odpověď na inhalovaný LPS [44]. V jiné studii, kde byly LPS stimulované vzorky plné krve, byla prokázána vyšší prozánětlivá odpověď za uvolnění velkého množství TNF α [45]. Důležité také je, že mezi signálními drahami *NOD2* a TLR existuje propojení. Zdá se, že za normálních okolností *NOD2* negativně reguluje aktivitu TLR2. V případě chybějícího *NOD2* nebo v přítomnosti polymorfismu souvisejícího s Crohnovou nemocí (1007fs) v genu *NOD2* může docházet ke ztrátě této regulace, tím pádem k intenzivnější aktivaci NF- κ B prostřednictvím *TLR2* a k nadměrné zánětlivé odpovědi Th1-lymfocytů [46]. Později bylo dokázáno, že takto *NOD2* reguluje aktivitu i *TLR4* [47].

Autofagie, *ATG16L1*

Autofagie je proces, díky kterému má buňka schopnost trávit a recyklovat své vlastní orgány v období hladovění. Pro Crohnovu nemoc je však důležitější, že autofagie hraje významnou roli v boji proti vnitrobuněčným mikroorganismům, které pronikly do cytosolu. Autofagie je důležitou součástí nespecifické imunitní odpovědi z toho důvodu, že odstraňuje intracelulární bakterie a viry, ale je to také proces spojený se specifickou imunitou, protože degradované vnitrobuněčné proteiny může buňka vystavit



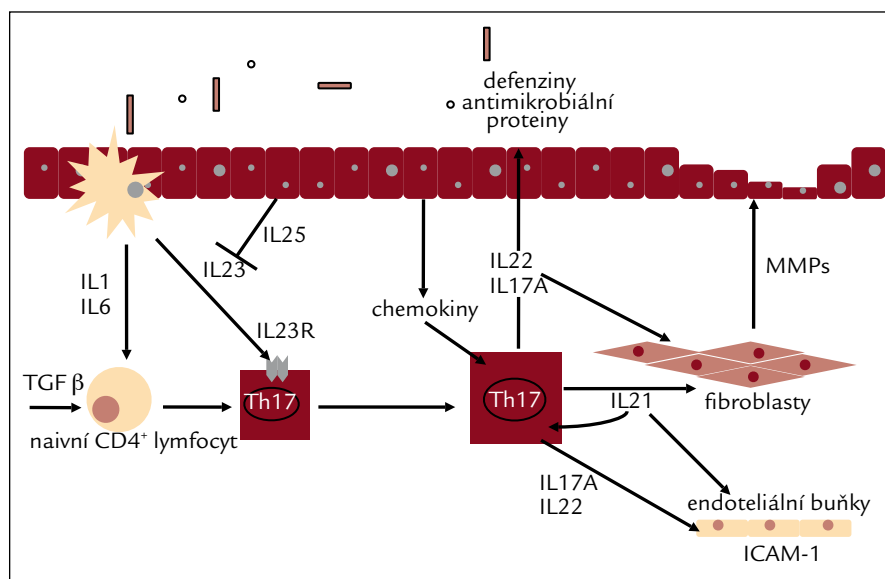
Obr. 3. Vnitrobuněčné orgány nebo invadující patogeny jsou nejprve postupně obkloповány dvojvrstevnou membránou, až dojde k vytvoření autofagozomu. Autofagozom pak splývá s lysozomem za vzniku autofagolysozomu, což usnadňuje degradaci, zpracování a recyklaci obsahu autofagozomu. Lysozomální enzymy nejprve rozloží vnitřní membránu autofagolysozomu a pak zpracují jeho obsah. Nakonec dojde k uvolnění aminokyselin do cytoplazmy, kde mohou být využity, a nebo, jak již bylo zdůrazněno, mohou být vystaveny na povrchu buněk pomocí MHC gp II.

na svém povrchu jako antigeny pomocí MHC gp II. Ty pak mohou být rozpoznány Th-lymfocyty a dendritickými buňkami. Tento způsob prezentace antigenů propojující autofagii a MHC gp II je nejlépe popsán v souvislosti s profesionálními antigen-prezentujícími buňkami, jako jsou např. dendritické buňky nebo makrofágy. Přesto může mít význam i v epiteliálních buňkách, které exprimují MHC gp II v místě zánětu, a stávají se tak neprofesionálními antigen-prezentujícími buňkami [48].

Autofagie je regulována různými podněty, např. cytokinovými receptory nebo TLR, a její průběh je znázorněn na obr. 3. K navození autofagie dochází také prostřednictvím *NOD2* v přítomnosti MDP. Bylo však zjištěno, že

varianty genu *NOD2* spojené s Crohnovou nemocí narušují průběh autofagie [49].

Několik GWAS potvrdilo spojitost mezi genem *ATG16L1* a Crohnovou nemocí. *ATG16L1* je jedním z klíčových proteinů potřebných pro správné vytvoření autofagozomu. Výsledky analýz naznačují, že riziko vzniku Crohnovy nemoci souvisí s polymorfismem T300A [27]. Pouze tato varianta *ATG16L1* má za následek specifickou poruchu autofagie v přítomnosti bakterií [50] a zeslabuje antibakteriální funkce v epiteliálních buňkách odvíjející se od *NOD2* [49]. U myši s defektními *ATG16L1* proteiny byly pozorovány změny v sekreci IL1 β [51]. Cadwell et al ve své studii zaznamenali abnormality v Panethových buňkách, jako



Obr. 4. Diferenciace a funkce Th17-lymfocytů (upraveno podle [60]). Th17-lymfocyty diferencují pod vlivem TGFβ v kombinaci s IL1β, IL6 a na rozdíl od Th1-lymfocytů nevyžadují pro diferenciaci své efektorové cytokiny, pro jejich diferenciaci není nutná přítomnost IL17. IL21 reguluje diferenciaci Th17 buněk autokrinním způsobem. IL23 slouží k amplifikaci zánětlivé odpovědi odvozené od Th17-lymfocytů. Th17-lymfocyty produkují prozánětlivé cytokiny, ale i látky ovlivňující funkci střevní bariéry.

jsou např. degenerující mitochondrie a ztráta lysozymových granulí [52].

V posledních letech bylo navození autofagie často považováno za následek aktivace nespecifické imunitní odpovědi. Existují však přesvědčivé důkazy, že mezi autofagií a nespecifickou imunitou je vzájemný vztah. Cytokiny specifické i nespecifické imunity různými způsoby ovlivňují autofagii. Předpokládá se také, že autofagie reguluje sekreci cytokinů u pacientů s Crohnovou nemocí [53].

Signální dráha IL23-Th17-lymfocytů

Tradičně bývá Crohnova nemoc spojována s převažujícím podtypem Th1-lymfocytů, a tím pádem zvýšeným množstvím cytokinů, které tyto lymfocyty produkují. Hlavním z nich je IFNγ (interferon γ), jehož úkolem je stimulace makrofágů k fagocytóze, a tedy obrana proti intracelulárním mikrobům [54]. Tento koncept byl změněn poté, co byly popsány T_{reg} lymfocyty a prozánětlivé Th17-lymfocyty. Již několik studií prokázalo, že na patogenezi Crohnovy nemoci se kromě Th1

buněk podílejí i Th17-lymfocyty [55]. Populace Th17-lymfocytů je charakteristická produkcí prozánětlivých cytokinů IL17A, IL17F, IL21, IL22, IL26, TNFα, IFNγ a CCL20 [56]. Zvýšené hladiny IL17A, IL17F, IL22 byly potvrzeny u pacientů s aktivní formou Crohnovy choroby [57].

Th1-lymfocyty diferencují pod vlivem IL12. Tento prozánětlivý cytokin byl dlouho považován za rozhodující v patogenezi Crohnovy nemoci. Avšak zjištění, že IL23, který je třeba pro diferenciaci Th17-lymfocytů, je heterodimerní cytokin skládající se ze specifické p19 podjednotky a p40 řetězce, který také tvoří součást IL12 [58], nutně vede k přehodnocení jejich vzájemných vztahů v patogenezi Crohnovy nemoci. Dalším důkazem je skutečnost, že užití monoklonálních protilátek (ustekinumab) proti p40 podjednotce, kterou sdílí IL12 a IL23, vyvolalo klinickou odpověď u pacientů s Crohnovou nemocí [59]. IL23 je secernován dendritickými buňkami a makrofágy po setkání s antigenem a přispívá k proliferaci Th17-lymfocytů. Signalizace zprostředkovaná IL23 je zajištěna

jeho interakcí s receptorem exprimovaným na povrchu Th17-lymfocytů, který je také heterodimerní a skládá se ze 2 podjednotek – IL23R a IL12RB1 [2].

Na základě GWAS byl v souvislosti s Crohnovou nemocí objeven polymorfismus v genu kódujícím IL23R (interleukin 23 receptor) [55]. Bylo také prokázáno, že kromě IL23R vykazují souvislost s patogenezi Crohnovy nemoci polymorfismy i v dalších genech zapojených v diferenciaci Th17-lymfocytů. Jsou to IL12B, JAK2 a STAT3, u kterých bylo později prokázáno i spojení s ulcerózní kolitidou [27].

Aktivita Th17-lymfocytů má vliv na biologickou funkci střevní bariéry (obr. 4), protože buňky střevního epitelu exprimují receptory pro některé interleukiny uvolňované Th17 buňkami. IL17A, IL21 a IL22 podporují hromadění prozánětlivých buněk ve střevní sliznici díky jejich schopnosti zvyšovat syntézu chemoatraktantů epiteliálními buňkami a adhezivních molekul (např. ICAM-1) endoteliálními buňkami [60]. IL21 a IL22 stimulují fibroblasty k tvorbě tkáňových metaloproteináz, tedy enzymů, které mohou přispívat k poškození a remodelaci tkáně [61,62]. IL17A a IL22 dále podporují syntézu antibakteriálních proteinů (např. defensinů) epiteliálními buňkami [63], a tak mají kromě svých prozánětlivých vlastností i pozitivní vliv na funkci střevní bariéry. IL17 udržuje integritu střevní bariéry modulací „tight junctions“ (těsných spojení) mezi enterocyty a IL22 zvyšuje migrační a proliferační potenciál intestinálních epiteliálních buněk [57]. Dalším cytokinem produkovaným Th17-lymfocyty je IL26. Na rozdíl od proliferativních účinků IL22, IL26 snižuje buněčnou proliferaci [64], a tudíž potenciálně zhoršuje hojení střevních poranění. Th17-lymfocyty dále uvolňují chemokin CCL20. Receptorem tohoto chemokinu je CCR6, který je exprimován na povrchu Th17-lymfocytů. CCL20 tak může přispívat k udržování zánětu, protože autokrinně reguluje diferenciaci Th17-lymfocytů [57].

T regulační lymfocyty

Podstatnou roli v patogenezi Crohnovy nemoci sehrávají také supresivní T_{reg} lymfocyty. Jak již bylo výše zmíněno, při diferenciaci Th17-lymfocytů hraje roli TGF β . Tento cytokin je ale také nezbytný pro diferenciaci T_{reg} . Nízká koncentrace TGF β navozuje diferenciaci do Th17 buněčné linie, zatímco vysoké hladiny tohoto cytokinu podporují vznik T_{reg} [65]. Zajímavé je i to, že v přítomnosti prozánětlivého IL6 může docházet k přeměně T_{reg} na Th17-lymfocyty [66]. Vzájemný vztah mezi T_{reg} a Th17 podporuje také fakt, že IL2, který je růstovým faktorem pro T_{reg} , inhibuje vývoj Th17-lymfocytů [67].

Shrnutí

Je zřejmé, že v patogenezi Crohnovy nemoci se uplatňují změny na úrovni imunitního systému. Důležitým mechanismem je s největší pravděpodobností selhání koexistence střevní mikroflóry a střevního slizničního imunitního systému. Složení střevní mikroflóry není stálé a mění se pod vlivem vnějších podmínek. Podle nových poznatků vzniká zánět typický pro Crohnovu nemoc nepřiměřenou reakcí na střevní mikroflóru u geneticky predisponovaných jedinců. Nejdéle známým genem vykazujícím predispozici ke vzniku Crohnovy nemoci je *NOD2*. Je exprimován v různých typech buněk a zastává v organismu komplexní úlohu – ovlivňuje sekreci cytokinů, průběh autofagie a apoptózy. Je tedy těžké jednoznačně posoudit jeho význam v patogenezi onemocnění. U nositelů polymorfismů v genu *NOD2* byla zjištěna snížená produkce α -defenzinů Panethovými buňkami. Tento typ buněk je také postižen v souvislosti s polymorfizmy v genu *ATG16L1*, který se podílí na autofagii. S Crohnovou nemocí byl také asociován polymorfismus v genu pro *TLR4*. *TLR4* podobně jako *NOD2* funguje jako detektor bakteriálních znaků. Studie zabývající se polymorfizmem v *TLR4* ale podávají rozporuplné výsledky. Dále bylo zjištěno, že kromě Th1-lymfocytů, které

byly dlouhou dobu považovány za klíčové v patogenezi Crohnovy nemoci, se v průběhu nemoci uplatňuje i poměrně nedávno objevená populace Th17-lymfocytů. Th17-lymfocyty produkují prozánětlivé mediátory (TNF α , IFN γ), ale i cytokiny, které ovlivňují funkci střevní bariéry. Navíc kromě změn v imunitním systému byly pozorovány i poruchy střevního epitelu, např. narušení vrstvy hlenu, dysregulace těsných spojení mezi buňkami epitelu, zvýšená propustnost epitelu či zvýšená bakteriální přilnavost k epiteliálním buňkám. Není však jasné, zda jsou tyto změny primární příčinou vzniku zánětu, nebo jestli vznikají až v reakci na již probíhající zánět. Velkou výzvou do budoucna zůstává zjistit, jaké další funkční následky mají změny v genech souvisejících s Crohnovou nemocí a do jaké míry přispívají k patogenezi onemocnění.

Práce byla podpořena grantem Ministerstva zdravotnictví ČR IGA IGA NS/10352-3/2009 a výzkumným záměrem MZ0MOU2005.

Literatura

1. Kozuch PL, Hanauer SB. Treatment of inflammatory bowel disease: a review of medical therapy. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 354–377.
2. Abraham C, Cho JH. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* 2009; 361: 2066–2078.
3. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447: 661–678.
4. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in *ATG16L1*. *Nat Genet* 2007; 39: 207–211.
5. Massey DC, Parkes M. Common pathways in Crohn's disease and other inflammatory diseases revealed by genomics. *Gut* 2007; 56: 1489–1492.
6. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007; 39: 596–604.
7. Van Limbergen J, Wilson DC, Satsanagi J. The genetics of Crohn's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009; 10: 89–116.
8. Molodecky NA, Kaplan GG. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol* 2010; 6: 339–346.
9. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627–1640.

10. Rutgeerts P, Goboos K, Peeters M et al. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 1991; 338: 771–774.
11. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004; 126: 1620–1633.
12. Chassaing B, Rolhion N, de Vallé A et al. Crohn disease – associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J Clin Invest* 2011; 121: 966–997.
13. Henderson P, Van Limbergen JE, Schwarze J et al. Function of intestinal epithelium and its dysregulation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 382–395.
14. Gaudier E, Hoebler C. Physiological role of mucins in the colonic barrier integrity. *Gastroenterol Clin Biol* 2006; 30: 965–974.
15. Ramasundara M, Leach ST, Lemberg DA et al. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 202–208.
16. Wehkamp J, Stange EF, Fellermann K. Defensin-immunology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterologie Clin Biol* 2009; 33 (Suppl 3): 137–144.
17. Kyd JM, Cripps AW. Functional differences between M cells and enterocytes in sampling luminal antigens. *Vaccine* 2008; 26: 6221–6224.
18. Ismail AS, Behrendt CL, Hooper LV. Reciprocal interactions between commensal bacteria and gamma delta intraepithelial lymphocytes during mucosal injury. *J Immunol* 2009; 182: 3047–3054.
19. Yoshida M, Claypool SM, Wagner JS et al. Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity* 2004; 20: 769–778.
20. Marchesi J, Shanahan F. The Normal intestinal microbiota. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20: 508–513.
21. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427–434.
22. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al. Association of *NOD2* leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599–603.
23. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N et al. A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603–606.
24. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through *NOD2*. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003; 278: 5509–5512.
25. Abraham C, Cho JH. Functional consequence of *NOD2* (*CARD15*) mutations. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 641–650.
26. Tanabe T, Chamaillard M, Ogura Y et al. Regulatory regions and critical residues of *NOD2* involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J* 2004; 23: 1587–1597.
27. Lees CW, Satsanagi J. Genetics of inflammatory bowel disease: implications for disease pathogenesis and natural history. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 3: 513–534.
28. van Heel DA, Ghosh S, Butler M et al. Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity

- in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet* 2005; 365: 1794–1796.
29. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E et al. Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18129–18134.
30. Wehkamp J, Wang G, Kübler I et al. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol* 2007; 179: 3109–3118.
31. Wehkamp J, Stange EF, Fellermann K. Defensin-immunology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterologie Clin Biol* 2009; 33 (Suppl 3): 137–144.
32. Sartor RB. Does *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut* 2005; 54: 896–898.
33. Coulombe F, Divangahi M, Veyrier F et al. Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. *J Exp Med* 2009; 206: 1709–1716.
34. Rahman MK, Midtling EH, Svingen PA et al. The Pathogen Recognition Receptor NOD2 Regulates Human FOXP3+ T Cell Survival. *J Immunol* 2010; 184: 7247–7256.
35. Jess T, Riis L, Jespersgaard C et al. Disease concordance, zygosity, and NOD2/CARD15 status: follow-up of a population-based cohort of Danish twins with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2486–2492.
36. Cho JH, Weaver CT. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007; 133: 1327–1339.
37. Hradsky O, Lenicek M, Dusatkova P et al. Variants of CARD15, TNFA and PTPN22 and susceptibility to Crohn's disease in the Czech population: high frequency of the CARD15 1007fs. *Tissue Antigens* 2008; 71: 538–547.
38. Lesage S, Zouali H, Cézard JP et al. EPW-IBD Group; EPIMAD Group; GETAID Group. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 845–857.
39. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118: 229–241.
40. Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK. Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5577.
41. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; 68: 7010–7017.
42. González-Navajas JM, Fine S, Law J et al. TLR4 signaling in effector CD4+ T cells regulates TCR activation and experimental colitis in mice. *J Clin Invest* 2010; 120: 570–581.
43. Browning BL, Huebner C, Petermann I et al. Has Toll-like receptor 4 been prematurely dismissed as an inflammatory bowel disease gene? Association study combined with meta-analysis shows strong evidence for association. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2504–2512.
44. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25: 187–191.
45. Ferwerda B, McCall MB, Alonso S et al. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 16645–16650.
46. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ et al. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 800–808.
47. Kullberg BJ, Ferwerda G, De Jong DJ et al. Crohn's disease patients homozygous for the 3020insC NOD2 mutation have a defective NOD2/TLR4 cross-tolerance to intestinal stimuli. *Immunology* 2008; 123: 600–605.
48. Schmitz D, Dengel J, Schoor O et al. Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *J Mol Med* 2006; 84: 194–202.
49. Homer CR, Richmond AL, Rebert NA et al. ATG16L1 and NOD2 Interact in an Autophagy-Dependent Antibacterial Pathway Implicated in Crohn's Disease Pathogenesis. *Gastroenterology* 2010; 139: 1630–1641.
50. Kuballa P, Huett A, Rioux JD et al. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One* 2008; 3: e3391.
51. Saitoh T, Fujita N, Jang MH et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* 2008; 456: 264–268.
52. Cadwell K, Liu JY, Brown SL et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16L1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 2008; 456: 259–263.
53. Hussey S, Travassos LH, Jones NL. Autophagy as an emerging dimension of adaptive and innate immunity. *Semin Immunol* 2009; 21: 233–241.
54. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F et al. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 1997; 150: 823–832.
55. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314: 1461–1463.
56. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 950–957.
57. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 2009; 58: 1152–1167.
58. Oppmann B, Lesley R, Blom B et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000; 13: 715–725.
59. Sandborn WJ, Feagan BG, Fedorak RN et al. Ustekinumab Crohn's Disease Study Group. A randomized trial of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2008; 135: 1130–1141.
60. Monteleone I, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-23 and Th17 Cells in the Control of Gut Inflammation. *Mediators Inflamm* 2009; 2009: 297645.
61. Andoh A, Zhang Z, Inatomi O et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005; 129: 969–984.
62. Monteleone G, Caruso R, Fina D et al. Control of matrix metalloproteinase production in human intestinal fibroblasts by interleukin 21. *Gut* 2006; 55: 1774–1780.
63. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; 203: 2271–2279.
64. Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K et al. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 2009; 58: 1207–1217.
65. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. *Nat Immunol* 2008; 9: 641–649.
66. Xu L, Kitani A, Fuss I et al. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25–Foxp3– T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- β . *J Immunol* 2007; 178: 6725–6729.
67. Laurence A, Tato CM, Davidson TS et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007; 26: 371–381.

RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.

www.mou.cz

e-mail: slabý@mou.cz

Doručeno do redakce: 12. 7. 2011

Přijato po recenzi: 5. 1. 2012