

Klinická gastroenterológia a súčasná genetika Crohnovej choroby: riešime moderný alebo iba módny problém?

Marian Bátovský¹, Ladislava Bartošová²

¹III. interná klinika FNŠP akademika Ladislava Dérera, Bratislava

²Ústav humánnej farmakológie a toxikológie Farmaceutickej fakulty Veterinárnej a farmaceutickej univerzity, Brno

Súhrn

Záujem o geneticky podmienenú etiológiu Crohnovej choroby (CD) sa zvyšuje najmä od objavu mutácií génu NOD2, ktorý má zrejmy vzťah k tejto chorobe. Početné klinicko-genetické štúdie dokazujú vysokú geografickú a etnickú variabilitu výskytu mutácií tohto génu a poukazujú na ich prelínanie sa medzi oboma nešpecifickými črevnými zápalmi. V centre pozornosti klinických gastroenterológov stoja najmä dôsledky nositeľstva mutácií génu NOD2 vo vzťahu k veku vzniku, lokalizácii a k chovaniu CD.

Ciele práce: 1. Zistiť frekvenciu mutácií génov NOD2, ICAM 1 a CCR5 v súbore slovenských pacientov s CD a s ulceróznou kolitídou (UC). 2. Potvrdiť proklamovanú úlohu fajčenia pri týchto zápaloch a ďalej vzťah mutácií génu NOD2 k predpokladanému nižšiemu veku vzniku, ileocekálnaj lokalizácii a k prevažne fistulujúcej forme CD. 3. Zistiť frekvenciu prelínania mutácií génu NOD2 medzi oboma vyšetrovanými podskupinami

pacientov s nešpecifickými črevnými zápalmi.

Súbor pacientov a metóda: Spolu 27 pacientov (15 s CD a 12 s UC) bolo vyšetrených na prítomnosť 3 najčastejších mutácií génu NOD2 (v génoch R702W, G908R a 1007fs), ako aj mutácie K469E v géne ICAM 1 a posunovej mutácie CCR5d32 v géne CCR5. Zachytené rozdiely vo výskyte génových mutácií boli štatisticky vyhodnotené z hľadiska významnosti pomocou chí-kvadrátového testu a Fisherovho exaktného testu so stanovením Cohehovo d kvocientu, ako aj rm kvocientu.

Výsledky: Mutácie génu NOD2 boli zistené pri 10/15 CD a iba pri 3/12 UC. Bol vyrátaný štatisticky významný rozdiel vo výskyte mutácií génu NOD2 u pacientov s CD v porovnaní s UC - chí-kvadrát (1) = 0,09, Fisherov test $p = 0,019$, 66,6 CI 95 % (16,7–80,0). Ďalšie predpoklady o nosičoch mutácií tohto génu: vek vzniku CD do 40 rokov (chí-kvadrát $p = 0,268$, Fisherov test $p = 0,467$) a prevažne ileocekálna lokalizá-

cia (chí-kvadrát $p = 0,292$, Fisherov test $p = 0,525$) spolu s fistulujúcou formou CD (chí-kvadrát $p = 0,268$, Fisherov test $p = 0,467$) sa nepotvrdili. Štatisticky významný vzťah fajčenia ako rizikového činiteľa pri CD a jeho protektívna úloha vo vzťahu k UC neboli zistené (chí-kvadrát $p = 0,535$, Fisherov test $p = 0,662$). Prelínanie výskytu NOD2 mutácií pri oboch nešpecifických črevných zápaloch potvrdzuje 16,6 % výskyt NOD2 mutácií u pacientov s UC.

Záver: Medzi genotypom a CD je pravdepodobne vzťah, ktorý si zasluhuje pozornosť v podobe ďalších klinicko-genetických štúdií. Avšak zrejme rovnakú snahu treba vyvinúť aj pri hľadaní ďalších environmentálnych faktorov modifikujúcich vznik a priebeh nešpecifických črevných zápalov.

Kľúčové slová: NOD2, ICAM 1, CCR5, GENETICKÉ MUTÁCIE, CROHNOVA CHOROBA, ULCERÓZNA KOLITÍDA

Summary

Clinical gastroenterology and current genetics of Crohn's disease – are we tackling a modern or just a trendy problem?

Background of study: Interest in genetically determined aetiology of Crohn's disease (CD) has been growing particularly since the discovery of NOD2 gene mutations, which are evidently involved in the development of the disease. A number of clinical genetic studies have demonstrated a high degree of ethnic and geographic variation in the occurrence of NOD2 gene mutations and shown their overlap between the two non-specific bowel inflammations. Clinical gastroenterologists have focused on the consequences of being a NOD2 gene mutation carrier with respect to age, inception, localisation and behaviour of CD.

Objective of study: a) Evaluate the frequency of NOD2, ICAM 1 and CCR5 gene mutations (homozygous and heterozygous) in a sample of Slovak CD and UC patients, b) Confirm the assumed role of smoking in inflammatory bowel disease and the link between NOD2 gene mutations and the supposedly lower age at inception, ileo-caecal

localisation and the predominantly fistulising form of CD. c) Assess the frequency of the overlap of NOD2 gene mutations between the two subgroups of CD and UC patients.

Patient sample and methods: The study group comprised 27 consecutive patients with inflammatory bowel disease (of which 15 with CD and 12 with UC) who were examined for the three most frequent NOD2 gene mutations (in R702W, C908R, 1007 fs genes), as well as for the K469E in ICAM 1 gene and for the CCR5d32 in CCR5 gene mutations. The differences in observed gene alterations between CD and UC patients were statistically analysed by means of chi-square and Fisher's exact tests with assessment of Cohen's d quotient and rm quotient.

Results: NOD2 gene mutations were observed in 10/15 of CD patients and only in 3/12 of UC patients. A statistically significant difference was observed between the rate of NOD2 gene mutation in patients with CD and those with UC: chi-square test (1) $p = 0.09$, Fisher's test $p = 0.019$, 66.6 95 % CI (16.7–80.0). Additional assumptions concerning NOD2 gene mutation car-

riers were not confirmed either, i.e. the age of CD inception under 40 years (chi-square test (1) $p = 0.268$, Fisher's test $p = 0.467$), mostly ileo-caecal localisation (chi-square test (1) $p = 0.292$, Fisher's test $p = 0.525$) and predominantly fistulising form of CD (chi-square test (1) $p = 0.268$, Fisher's test $p = 0.467$). Smoking as a risk factor in CD and as a protective factor in UC was not recorded either (chi-square test (1) $p = 0.535$, Fisher's test $p = 0.662$). The presence of NOD2 gene mutations in 16.6 % of UC patients confirms the overlap of these alterations between the two inflammatory bowel diseases, i.e. CD and UC.

Conclusions: A relationship is likely to exist between genetic alterations and CD, which should be further investigated in larger clinical and genetic studies. Equal attention should be paid, however, to research in other environmental factors modifying the inception and course of inflammatory bowel diseases.

KEY WORDS: NOD2, ICAM 1, CCR5, GENE MUTATIONS, CROHN'S DISEASE, ULCERATIVE COLITIS

ÚVOD

Zdá sa, že incidencia morbus Crohn (CD) na Slovensku v posledných rokoch dramaticky stúpa. Podľa zatiaľ nepublikovaných údajov prieskumu, vykonaného Pracovnou skupinou pre nešpecifické kolitídy (vedúci prim. MUDr. M. Greguš), za posledných 6 rokov sa incidencia CD zvýšila viac ako trojnásobne na 7,6/100 000. Z hľadiska takéhoto prudkého nárastu sa stávajú zaujímavými aj genetické „korene“ tohto ochorenia a ich rozloženie v našej populácii. Pútajú pozornosť už od roku 2001, kedy boli z 27 identifikovaných mutácií génu NOD2/CARD15 označené 3 mutácie – R702W, G908R a posunová mutácia L1007fsinsC – za najčastejšie spájané s CD, keďže tvoria vyše 80 % mutácií [3, 12]. Mutácie ďalších 2 génov – ICAM 1 a CCR5 – súvisia s CD iba okrajovo prostredníctvom lokálnej migrácie zápalových buniek. Mutácia Lys469Glu v géne ICAM 1 vedie k poklesu migrácie leukocytov a asociuje sa nielen s nešpecifickými črevnými zápalmi, ale signalizuje aj prítomnosť zápalového ochorenia ako takého (býva spájaná napr. s reumatoidnou artritídou). Delečná mutácia CCR5d32 v géne CCR5 sa odráža v zníženej migrácii lymfocytov do miesta zápalu, čím sa jeho ďalšie príznaky zmiernujú.

ČO JE NOD2/CARD15?

Gén CARD15 (Caspase Activation and Recruitment Domain) sa nachádza na 16. chromozóme a kóduje receptor NOD2. NOD2 receptor je súčasťou skupiny poznávacích receptorov NOD obsahujúcich nukleotidy viažucu oligomerizačnú doménu (NOD), ktorej intracelulárne cytozolové proteíny zohrávajú dôležitú úlohu pri rozpoznávaní patogénnych mikroorganizmov. Indukujú totiž špecifickú prenosovú signálovú kaskádu, ktorá vedie k odpovedi voči týmto patogénom. Dosiaľ najlepšie preskúmaný člen rodiny NOD receptorov, NOD2, sa vyskytuje v epiteliálnych bunkách tenkého

i hrubého čreva, v monocytoch, v makrofágoch, v T a B lymfocytoch, ako aj v Panethových a v dendritických bunkách. NOD2 je špecifický receptor určený na rozoznávanie muramyldipeptidu, ktorý je súčasťou črevných bakteriálnych peptidoglykánov. Väzba NOD2 na muramyldipeptid aktivuje sekréciu antibakteriálnych substancií, akými sú alfa-defenzíny, a tiež aktivuje nukleový faktor kappa B (NF-κB), ktorý spúšťa prozápalovú imunitnú odpoveď. Či vedú mutácie génu CARD15 k strate alebo k nárastu funkcie NOD2 receptoru, je predmetom diskusie, rovnako ako aj presný mechanizmus, akým zmena tejto funkcie vyústi práve do obrazu CD [15]. To však v tejto chvíli nie je pre klinického gastroenterológa dôležité – stačí si zafixovať, že od roku 2001 molekulárni biológovia veria, že aktivácia NF-kappaB s následnou tvorbou agensov proti črevným baktériám je geneticky podmienená. Mutácia NOD2/CARD15 vedie podľa nich k vytvoreniu defektného NOD2 proteínu, ktorý zodpovedá za nedostatočnú aktiváciu NF-κB, a tým aj za zníženú produkciu prozápalových proteínov. Alebo inými slovami a ešte jednoduchšie, za vznik CD zodpovedá neprimeraná imunitná odpoveď organizmu na komezálné bakteriálne osídlenie vlastného čreva [1,6]. A čo my, gastroenterológovia? Máme im túto vieru zobrať? Alebo máme hľadať v našom klinickom materiáli podporné dôkazy? Táto cesta je zrejme najrozumnejšia – a vydalo sa ňou už nemalo pracovísk z celého sveta [1, 7 – 9] – pretože iba klinicko-genetické štúdie dokážu predpoklady genetikov potvrdiť alebo vyvrátiť. Je dnes jasné, že pre lepšie porozumenie NOD2 mediovanej patogenéze CD majú údaje získané z humánnych štúdií zásadný význam.

SÚBOR PACIENTOV A METÓDA

Spolu 27 pacientom so známou a histologicky potvrdenou diagnózou nešpecifickej kolitídy – 12 pacientom

s ulceróznou kolitídou (UC) a 15 pacientom s CD – boli odobrané vzorky krvi do nátriumcitrátových skúmaviek na stanovenie prítomnosti mutácií troch génov NOD2 – R702W, G908R a 1007fs, ako aj mutácie K469E v géne ICAM 1 a delečnej mutácie CCR5d32 v géne CCR5. Pacienti odpovedali na otázky o svojom veku v čase vzniku ochorenia, ďalej o fajčiarskom habite (fajčiar – nefajčiar – bývalý fajčiar) a v protokole boli vyplnené aj rubriky o lokalizácii, aktivite a predchádzajúcej (aj chirurgickej) i terajšej liečbe. V prípade CD pacientov išlo vlastne o ich zaradenie podľa Viedenskej klasifikácie. Poznámková časť protokolu sa týkala napr. intolerancie liekov, kortikodependencie a ďalších pozoruhodností. Keďže sa na Slovensku zatiaľ nerobí molekulárna biológia nešpecifických kolitíd, bol oslovený Ústav humánnej farmakológie a toxikológie Farmaceutickej fakulty Veterinárnej a farmaceutickej univerzity v Brne, kde ochotne vyšetrili aj vzorky krvi slovenských pacientov. DNA bola izolovaná z periférnej krvi a jej úsek s hľadaným polymorfizmom bol amplifikovaný pomocou polymerázovej reťazovej reakcie s následným štiepením špecifickými reštrikčnými endonukleázami. Štiepne produkty sa rozdelili na agarózovom géli a vizualizovali ethidium bromidom [4]. Asociácia prítomnosti mutantnej alely s CD alebo UC bola štatisticky vyhodnotená chí kvadrátovým a Fisherovým exaktným testom. Na stanovenie hladiny významnosti sa okrem p hodnoty použil aj Cohenov kvocient d, kde sa za vysokú korelačnú mieru vecnej signifikancie považuje hodnota nad 0,6 a rm kvocient s významne vysokou hodnotou nad 0,5.

VÝSLEDKY

1. Výskyt homozygótnych a heterozygótnych mutácií vo vyšetrovaných génoch v podskupinách CD a UC pacientov (tab. 1): Iba 3 pacienti – 2 s UC a 1 s CD – boli **bez mutácií vyšetrova-**

Tab. 1. Rozloženie mutácií v podsúboroch CD a UC pacientov.

Table 1. Distribution of mutations in subsets of CD and UC patients.

R702W		G908R		1007fs		NOD2 spolu NOD2together		ICAM 1		CCR5	
CD	UC	CD	UC	CD	UC	CD	UC	CD	UC	CD	UC
5	1	0	0	5 (2)	1	10	2	10 (1)	7(1)	3	4

V zátvorke sú uvedené počty pacientov s bialelovými mutáciami. Štatisticky významný rozdiel medzi CD a UC pacientmi sa potvrdil iba v počte mutácií génu NOD2. The numbers of patients with biallelic mutations are in brackets. A statistically significant difference between CD a UC patients was verified in the number of NOD2 gene mutations only.

ných génov. Jeden CD pacient mal mutácie až v 4 vyšetrovaných génoch (R702W + 1007fs + ICAM 1 + CCR5) - bol to tzv. **štvoritý heterozygót**. Ďalšia CD pacientka bola tzv. **trojitým heterozygótom** s mutáciami génov R702W, 1007fs a ICAM 1. 4 CD pacienti boli tzv. **dvojitými heterozygótmi**, ktorými boli aj ďalší 3 UC pacienti (avšak vo všetkých 3 prípadoch išlo o kombináciu mutácií iba v génoch ICAM 1 a CCR5). V tejto skupine UC pacientov sa našla aj 1 žena s bi-alelovou mutáciou génu ICAM 1 kombinovanou s heterozygótnou mutáciou génu CCR5. **Aspoň 1 mutáciu** malo 8 CD pacientov, z nich boli 2 homozygóti a 6 UC pacienti, ktorí boli všetci heterozygóti.

2. Rozloženie mutácií vo vyšetrovaných génoch v podskupinách CD a UC pacientov (tab. 1): **Mutácie génu NOD2** boli zachytené u 10 pacientov s CD a u 3 pacientov s UC, **mutácie génu ICAM 1** sa našli u 10 pacientov s CD a u 8 pacientov s UC. Najnižšia frekvencia mutácií bola odhalená v **géne CCR5** - iba u 3 CD pacientov a u 4 UC pacientov. Podrobnejšie rozloženie diagnostikovaných mutácií v oboch podsúboroch CD a UC pacientov ukazuje tab. 1.

Štatisticky významný rozdiel medzi pacientmi s CD a UC sa našiel iba vo výskyte mutácií génu NOD2 - chí-kvadrát (1) = 0,009, Fisherov test $p = 0,019$, 66,6 CI 95 % (16,7-80), Cohen d = 1,07, rm = 0,44. Rozdiel vo výskyte mutácií génu ICAM 1 nebol štatisticky významný (chí-kvadrát i Fisherov test $p = 1$), rovnako ako rozdiel vo výskyte mutácií génu CCR5 (chí-kvadrát (1) = 0,43, Fisherov test

Tab. 2. Fajčenie a nešpecifické črevné zápal.

Table 2. Smoking and inflammatory bowel disease.

	fajčiari/smokers	nefajčiari/non-smokers
CD - rizikový faktor CD - risk factor	4	11
UC - ochranný faktor UC - protective factor	2	10

Tvrdenie, podľa ktorého je fajčenie ochranný faktor pred vznikom UC a rizikový faktor vzniku CD, sa štatisticky nedokázalo.

The predictin that smoking acts as a protective factor in UC and risk factor in CD, was not confirmed.

$p = 0,66$). Ani rozdiel v počte zistených homozygótnych mutácií nebol štatisticky významný (chí-kvadrát (1) = 0,39, Fisherov test $p = 0,60$).

3. Fajčenie a nešpecifické kolitídy (tab. 2): Keďže v podskupine UC pacientov boli iba 2 fajčiari a v podskupine CD pacientov iba 4 fajčiari, predpoklad protektívneho vplyvu fajčenia pri UC a rizikového vplyvu fajčenia pri CD sa pre chybu malých čísiel nepodarilo potvrdiť (chí-kvadrát test (1) $p = 0,535$, Fisherov test $p = 0,662$).

4. Vek pacientov v čase vzniku CD vo vzťahu k mutáciám génu NOD2 (tab. 3): Všetci CD pacienti s mutáciami génu NOD2 mali v čase vzniku ochorenia menej ako 40 rokov. Avšak aj takmer všetci CD pacienti bez mutácií génu NOD2 mali v tomto čase menej ako 40 rokov - s výnimkou 1 pacientky, u ktorej bolo ochorenie diagnostikované vo veku 53 rokov. Vznikla teda od počiatku a na prvý pohľad štatisticky nerovnovážna situácia s nesplnenou podmienkou početnosti. Predpoklad, že mutácie génu NOD2 vedú k vzniku CD u pacientov vo veku do 40 rokov, sa nepotvrdil (chí-kvadrát test (1) $p = 0,268$, Fisherov test $p = 0,467$).

5. Lokalizácia CD a mutácie génu NOD2 (tab. 4): O nositeľoch mutácie génu NOD2 sa tvrdí, že ich predilekčnou lokalizáciou postihnutia je ileo-cékalna oblasť. Východiskové rozdelenie sa zdalo pozitívne pre potvrdenie tohto predpokladu - až u dvojnásobného počtu pacientov (u 8) s mutáciami génu NOD2 ochorenie prepuklo v tejto oblasti v porovnaní so 4 pacientami, ktorí neboli nositeľmi tejto mutácie. Štatistický rozbor však vyznel v neprospech tohto tvrdenia (chí-kvadrát test (1) $p = 0,292$, Fisherov test $p = 0,525$).

6. Priebeh CD a mutácie génu NOD2 (tab. 5): Predpoklad, podľa ktorého pacienti s mutáciami génu NOD2 trpia predovšetkým stenotizujúcou formou CD, sa nepotvrdil (chí-kvadrát test (1) $p = 0,268$, Fisherov test $p = 0,467$ pri nesplnenej podmienke početnosti). Všetci 8 nositelia NOD2 mutácie boli postihnutí stenotizujúcou formou ochorenia. Stenotizujúca forma ochorenia prevládala aj u pacientov bez mutácie génu NOD2 (5 pacienti zo 7).

DISKUSIA

Samozrejme, že s najväčšou zve-

davosťou bol očakávaný rozdiel vo výskyte mutácií génu NOD2 u CD a UC pacientov, ktorý mal napokon i jasnú štatistickú silu napriek neveľkému súboru vyšetovaných pacientov. V tejto súvislosti je zaujímavé, že nebola zachytená ani 1 mutantná alela polymorfizmu G908R, 1 z 3 sledovaných nukleotidových polymorfizmov génu NOD2. Pravdepodobne ide o polymorfizmus, ktorého mutantná alela sa v našich podmienkach vyskytuje iba zriedkavo. Štatisticky nevýznamným rozdielom vo frekvencii mutácií génov ICAM 1 a CCR5 v oboch podskupinách pacientov nie je potrebné prikladať zásadný význam vzhľadom na to, že sa vyskytujú iba ako „sprievodcovia“ chronického zápalového ochorenia, bez závažnejšej špecificity pre CD alebo UC. Predpoklady o nižšom veku vzniku CD u nositeľov mutácie génu NOD2 a o predilekčnom postihnutí ileocekalnej oblasti u týchto pacientov sa v predkladanom súbore pacientov nespĺnili. Rovnako aj tvrdenie o protektívnom účinku fajčenia pri UC a o jeho rizikovom vplyve pri CD sa nedočkalo štatistickej validizácie. Predpokladaný vzťah medzi nositeľstvom mutácie génu NOD2 a stenotizujúcou formou CD sa štatisticky nepotvrdil.

Čo zatiaľ vieme?

Prvostupňoví príbuzní pacientov s nešpecifickým črevným zápalom majú 4- až 20-násobne vyššie riziko akvizície tohto ochorenia než ostatná populácia. Najmä pri CD sa ukázalo, že nešpecifické črevné zápalové ochorenie sa vyskytuje významne častejšie u monozygótnych ako u dizygótnych dvojčiat. Osoby, ktoré sú nositeľmi homozygótny varianty mutácie NOD2 s postihnutím oboch alel, majú 20-násobne vyšší sklon k vzniku CD, pričom len okolo 10 % pacientov s CD sú homozygóti. Heterozygóti majú 10-násobne nižšiu pravdepodobnosť vzniku CD v porovnaní s homozygótmi [10, 12]. O čom vypovedajú tieto skutočnosti? Nehovoria nič viac ani nič

Tab. 3. Vek vzniku CD a mutácie génu NOD2.

Table 3. Age of rise of CD and NOD2 gene mutations.

	pacienti s mutáciami NOD2 patients with NOD2 gene mutations	pacienti bez mutácií NOD2 Patients without NOD2 gene mutations
vek do 40 rokov age under 40 years	8	6
vek nad 40 rokov age over 40 years	0	1

Tvrdenie, podľa ktorého u pacientov s mutáciami génu NOD2 vzniká CD častejšie vo veku do 40 rokov, sa štatisticky nedokázalo.

The affirmation that CD often occurs under the age of 40 in patients with NOD2 gene mutations

Tab. 4. Lokalizácia CD a mutácie génu NOD2.

Table 4. CD localization and NOD2 gene mutations.

	pacienti s mutáciami NOD2 patients with NOD2 gene mutations	pacienti bez mutácií NOD2 Patients without NOD2 gene mutations
ileocekálna oblasť ileo-caecal region	8	4
kolon the large intestine	1	2

Tvrdenie, podľa ktorého pacienti s mutáciami génu NOD2 majú častejšie postihnutie ileocekalnej oblasti, sa nepodarilo štatisticky preukázať.

The affirmation that patients with NOD2 gene mutations often suffered from ileocecal localization of CD was not confirmed.

Tab. 5. Priebeh CD a mutácie génu NOD2.

Table 5. CD course and NOD2 gene mutations.

	pacienti s mutáciami NOD2 patients with NOD2 gene mutations	pacienti bez mutácií NOD2 Patients without NOD2 gene mutations
stenotizujúca forma stenotizing form	8	5
fistulujúca forma fistulising form	0	1
nestenotizujúca + nefistulujúca forma non-stenotizing + non-fistulising form	0	1

Tvrdenie, podľa ktorého pacienti s mutáciami génu NOD2 majú častejšie fistulujúcu formu CD, sa štatisticky nedokázalo.

The affirmation that patients with NOD2 gene mutations have often fistulising form of CD was not confirmed.

menej ako iba to, že medzi CD a genetikou je určitý vzťah. A to je asi tak všetko, čo o tomto vzťahu s istotou vieme a môžeme povedať.

Mnoho otázok zostáva nezodpovedaných. Napríklad, prečo CD dostane „iba“ 45 % identických párov dvojčiat? Prečo má bi-alelové mutácie NOD2/CARD15 „len“ 10–15 % pacientov s CD? Prečo až vyše 80 % homozygó-

tov nemá CD? A je teda CD vôbec genetickým ochorením?

Prečo to vždy nefunguje?

Teória o genetickej mutácii štruktúry proteínu NOD2 logicky vedie k predstave, podľa ktorej sa naruší aktivácia NF-κB, a tým sa zníži aj produkcia prozápalových cytokínov. Z tohto hľadiska znamená mutácia NOD2 jedno-

značne stratu jeho funkcie. Súčasne sa však objavila i predstava, podľa ktorej prítomnosť mutácie NOD2 vedie k nárastu jeho funkcie. Stimulácia antigénnych buniek (makrofágov alebo dendritických buniek) bakteriálnymi komponentmi viažucimi NOD2 by totiž podľa tejto hypotézy mohla priamo viesť k produkcii prozápalových cytokínov. Ukázalo sa však, že expresia NOD2 je odlišná v monocytoch a v makrofágoch. Štúdie dokazujúce stratu alebo nárast funkcie NOD2 boli uskutočnené na myšiach a každá na iných bunkách, čo viedlo k dezinterpretácii výsledkov. A navyše, špecifické lokálne zápalové milieu, v ktorom tieto bunky reagujú s bakteriálnou flórou, nemožno plne napodobiť v podmienkach in vitro [15]. A preto je nutné opakovane zdôrazniť potrebu ďalších klinicko-genetických štúdií vyhodnocovaných v rozličných geografických a etnických prostrediach, v ktorých sa ich výsledky budú zrejme líšiť. V európskej štúdií dosiahol výskyt mutácií NOD2 u pacientov s CD 23,9 %, v severoamerickej kohorte až 37,3 % [1, 11]. Najmenej často sa vyskytovali v Dánsku (iba 6,9 %), najfrekvencnejšie v Španielsku (40,0 %). Čo bolo interesantné, vôbec nekorelovali s incidenciou CD ani so severojužnou osou rozloženia Crohnovej choroby v Európe. Viaceré štúdie totiž dokázali nárast incidencie nešpecifických črevných zápalov od roku 1980, ktorý nemožno vysvetliť genetickými príčinami. Práve v škandinávskych krajinách, kde je najvyšší výskyt CD, sa, paradoxne naopak, našla iba nízka frekvencia mutácií NOD2.

Možno považovať za plauzibilné, že CD a UC pacienti si rozdelia niektoré spoločné genetické abnormality, čo sa napokon ukázalo pri géne IBD5. Mutácie tohto génu sa nachádzajú najčastejšie u pacientov s UC [10]. Avšak kanadskí, nemeckí a španielski autori preukázali ich prítomnosť aj u pacientov s CD s absentujúcimi mutáciami NOD2/CARD15. Naopak

v britskej a v japonskej štúdií sa spojenie mutácií génu IBD5 s CD nenašlo. Zdá sa, že NOD2/CARD15 môže pôsobiť ako gén modifikujúci ochorenie v synergizme s rizikovými alelami IBD5 u pacientov s UC [3, 13]. V európskej kohorte 1164 UC a CD pacientov dosiahol výskyt mutácií NOD2 9,6 % u UC pacientov [11]. V predkladanej práci to bolo až 16,6 % pacientov. Navyše, NOD2/CARD15 a HLA systém predstavujú 2 nezávislé genetické riziká vzniku CD [13]. Už dávnejšie práce uvádzali, že mutácie NOD2/CARD15 sa spájajú s ileocekálnou lokalizáciou CD, ako aj s včasným vznikom ochorenia v mladšom veku [10]. Tento fakt sa potvrdil v nórskej a v nemeckej populačnej vzorke. Naopak v britskej, v španielskej [9] a tiež v slovenskej štúdií sa toto tvrdenie nedokázalo, rovnako ako predominantné zastúpenie fistulujúcej formy CD. Treba mať na zreteli, že CD nemá znaky jednoduchej mendelovskej dedičnosti a podobne ako iné imunologické ochorenia ju možno považovať za heterogénnu a polygénnu chorobu, pri vzniku a priebehu ktorej hrajú dôležitú úlohu okrem genetických aj faktory vonkajšieho prostredia.

A čo environmentálne faktory?

Silnú pozitívnu koreláciu medzi fajčením a CD a rovnako významnú negatívnu koreláciu medzi fajčením a UC dopĺňa aj apendektómia ako protektívny faktor pred vznikom a progresiou UC [9, 14]. V predkladanej práci sa vzťah medzi fajčením a nešpecifickými črevnými zápalmi nepotvrdil. Vo vzťahu k porušenej intestinálnej bariére sa pri zhoršení priebehu ochorenia môžu uplatniť aj nesteroidné antiflogistiká [10]. Ďalšie, podobne štatisticky významné faktory vonkajšieho prostredia sa zatiaľ nenašli. Je zrejme, že penzum doteraz potvrdených premenných nepostačuje na vysvetlenie ich podielu v etiológii CD a možno ešte veľa z nich iba čaká na svoje odhalenie.

Čo bude nasledovať alebo kam sa uberá genetický výskum CD?

Mutácia NOD2/CARD15 vedie okrem iného aj k defektnému uvoľňovaniu interleukínu-10 (IL-10) z monocytov po stimulácii tzv. toll-like receptormi, čo môže prispievať k vysokej zápalovej aktivite pri CD. Je známe, že IL-10 inhibuje vývoj Th1 lymfocytov, aktivuje makrofágy a ich produkty: interleukín-12, tumor necrosis faktor-alfa a interferón-gama, s ktorými sa často možno stretnúť najmä v aktívnom štádiu CD [9, 14]. Ďalšími horúcimi kandidátmi na vzťah k CD sú gén IL-23R na chromozóme 1p31, o ktorom budeme v budúcnosti ešte zrejme veľa počuť, ďalej gény ATG 16L1, IRGM, HBD2 a ďalšie [2, 5, 12].

ZÁVERY

Tento príspevok bol koncipovaný ako zamyslenie sa nad 2 veľkými podsubormi pacientov s nešpecifickými črevnými zápalmi, genetické vyšetrenie ktorých umožnilo konfrontáciu so súčasnými literárnymi poznatkami. Zo záverov prevažnej väčšiny recentných štúdií a z logiky overených i citovaných faktov vyplýva, že CD môže mať aj genetický rys. Avšak za jeho vznikom stoja s veľkou prevahou okolnosti, ktoré sa z nedostatku sofistikovanejších znalostí dnes často zahŕňajú pod pojem environmentálne faktory vzniku. Perspektívne objavy na poli molekulárnej biológie a najmä ich transpozícia do ďalších klinicko-genetických štúdií zrejme v budúcnosti dokážu s väčšou presnosťou určiť podiel genetických mutácií v etiológii nešpecifických črevných zápalov, zatiaľ najmä CD.

Experimentálna časť tejto práce bola finančne podporená grantovým projektom IGA MZ ČR č. NR9342-3/2007.

Literatúra

1. Devlin SM, Yang H, Ippoliti A et al. NOD2 variants and antibody response to microbial agents in Crohn's dis-

ease patients and their unaffected relatives. *Gastroenterology* 2007; 132: 576-586.

2. Duerr H, Cho J. Study identifies a gene for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007; 132: 5.

3. Henckaerts L, Vermeire S. NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 235-241.

4. Hošek J, Bartošová L, Svobodová J et al. Frequency of gene polymorphisms associated with inflammatory bowel disease - study of patients in Czech and in Slovak Republic. *Inflamm Bowel Dis*, in press.

5. Cho J. Genetic polymorphisms in the IL-23R locus and susceptibility to IBD. Falk Workshop „Mechanisms of intestinal inflammation“. October 9.-10. 2007, Dresden. (Abstract 17-18).

6. Karban A, Dagan E, Eliakim R et al. Prevalence and significance of mutations in the familial Mediterranean fever gene in patients with Crohn's disease. *Genes Immun* 2005; 6: 134-139.

7. Koutroubakis IE, Sfiridaki A, Tsiolkidou G et al. Genetic risk factors in

patients with inflammatory bowel disease and vascular complications: case-control study. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 410-415.

8. Matsuzawa J, Sugimura K, Matsuda Y et al. Association between K468E allele of intracellular adhesion molecule 1 gene and inflammatory bowel disease in a Japanese population. *Gut* 2003; 52: 75-78.

9. Mendoza JL, Urcelay E, Lana R et al. Polymorphisms in interleukin-10 gene according to mutations of NOD2/CARD15 gene and relation to phenotype in Spanish patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 443-448.

10. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 417-422.

11. Riis, L, Vind I, Vermeire S et al. The prevalence of genetic and serologic markers in an unselected European population-based cohort of IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 24-32.

12. Schreiber S. New genetic defects in IBD and their relation to epithelial barrier function. Falk Workshop

„Mechanisms of intestinal inflammation“. October 9.-10. 2007, Dresden. (Abstract 15-16).

13. Urcelay E, Mendoza JL, Fernández L et al. IBD5 polymorphisms in inflammatory bowel disease: association with response to infliximab. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1187-1192.

14. Wine E, Reif, SS, Leshinski-Silver E et al. Pediatric Crohn's disease and growth retardation: the role of genotype, phenotype, and disease severity. *Pediatrics* 2004; 114: 1281-1286.

15. Zelinkova Z, Stokkers P, Hommes DW. NOD2 in Crohn's disease - loss or gain of function mutations. *Netherlands J Med* 2005; 63: 286-287.

Adresa pre korešpondenciu/
correspondence to:

prof. MUDr. Marian Bátovský, CSc.

III. interná klinika

FNSP akademika Ladislava Déreera

Limbová 5, 833 05 Bratislava,

Slovenská republika

E-mail:

marian.batovsky@kramare.fnspsba.sk