



ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
«Κλινική Φαρμακολογία και Θεραπευτική»

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΝΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ
ΣΤΟΝ ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟ ΩΣ
ΣΤΟΧΟΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΩΝ
ΣΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ CROHN**

Παναγοπούλου Πανταζή Μαρία

Επιβλέπων:

Καθηγητής Φαρμακολογίας Γ. Κολιός

Εργαστήριο Φαρμακολογίας Δ.Π.Θ.

Εισαγωγή

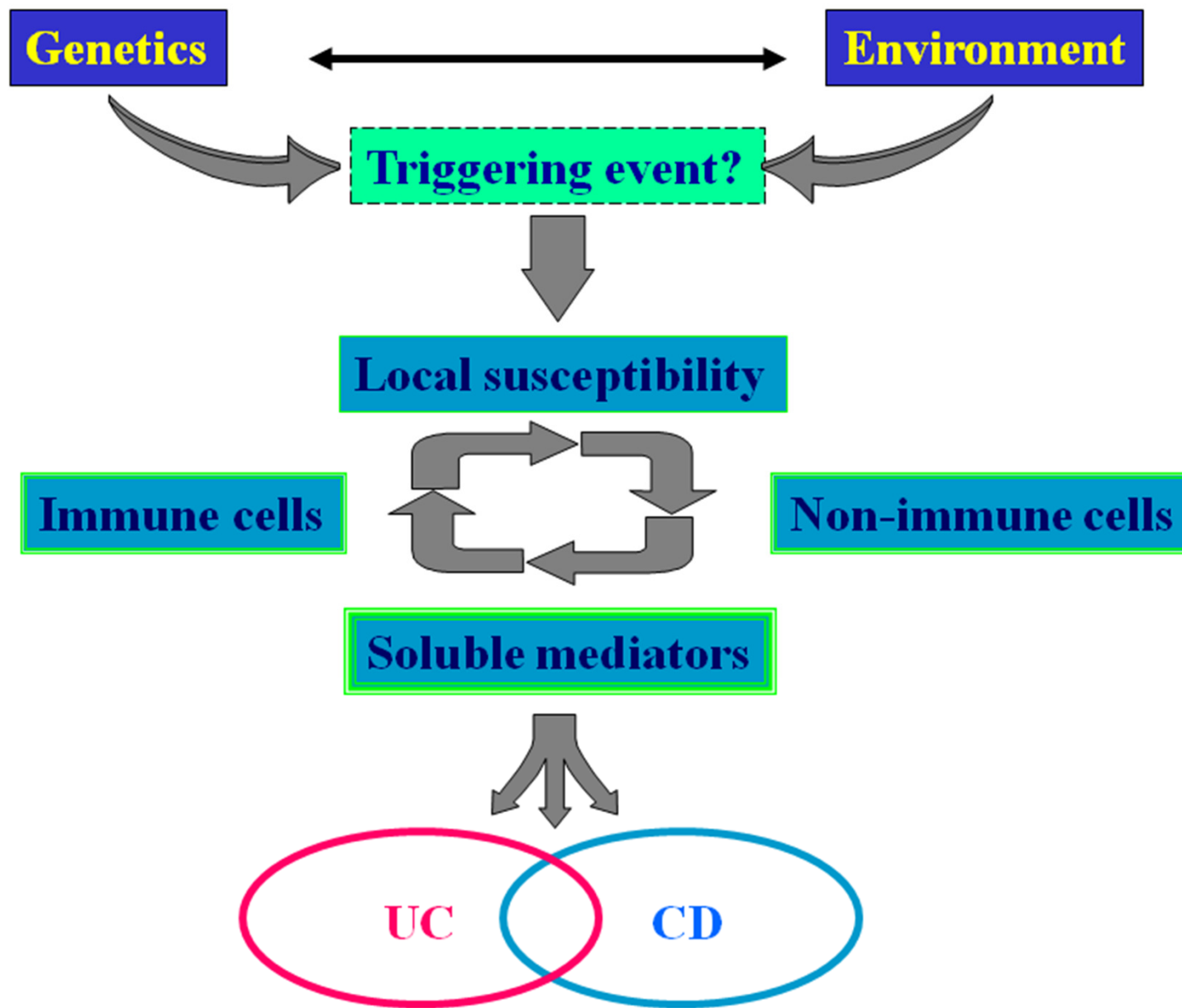
**Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις
Εντεροπάθειες**



Νόσος του Crohn
Ελκώδης Κολίτιδα

- Είναι αυτοάνοσα νοσήματα του γαστρεντερικού συστήματος τα οποία χαρακτηρίζονται από χρόνια φλεγμονή.
- Νόσος του Crohn: προσβάλλει ολόκληρο το γαστρεντερικό σωλήνα, αλλά κυρίως τον τελικό ειλεό¹
- Παγκόσμια αύξηση των περιστατικών: Εκβιομηχάνιση;/Δυτικός τρόπος ζωής;²

(¹Abraham et al, *N Engl J Med*, 2009; ²Molodecky et al, *Gastroenterology*, 2012)



(Kolios & Robertson, 1997; Strober et al, 2011)

Διατοιχωματική ίνωση

- Βασική διαφορά μεταξύ της νόσου του Crohn και ελκώδους κολίτιδας είναι η εμφάνιση της **διατοιχωματικής ίνωσης που αναπτύσσεται στη νόσο του Crohn**.¹
- Παθολογική κατάσταση η οποία εμφανίζεται σε περιπτώσεις με βαριά εκδήλωση της νόσου του Crohn²
- Απόρροια συνεχών και χρόνιων φλεγμονωδών αποκρίσεων

¹Abraham et al, *N Engl J Med*, 2009; ²Wynn et al, *Nat Med*, 2012

Διατοιχωματική ίνωση

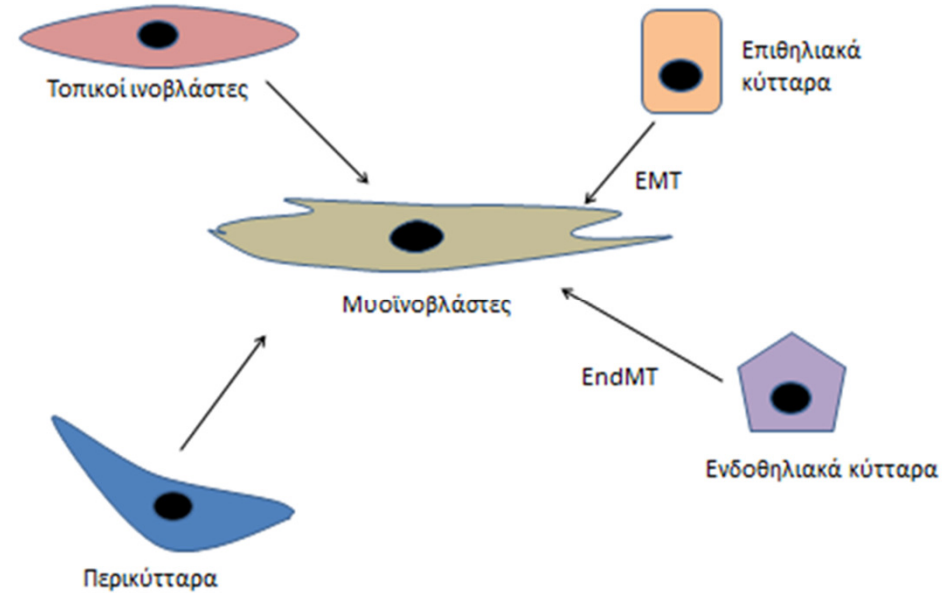
- Εξαπλώνεται στον βλεννογόνο, στον υποβλεννογόνιο χιτώνα, στον μυϊκό χιτώνα και στον ορογόνο^{2,1}
- Έντονη συσσώρευση συστατικών του εξωκυττάριου υποστρώματος (ECM) όπως το κολλαγόνο³.
- Η σύνθεση του νέου κολλαγόνου ξεπερνάει το ρυθμό με τον οποίο αυτό αποδομείται⁴

¹Abraham et al, *N Engl J Med*, 2009; ²Wynn et al, *Nat Med*, 2012; ³Rieder et al, *Gut*, 2007;

⁴Specia et al, *World J Gastroenterol*, 2012

Κολονικοί υποεπιθηλιακοί μυοϊνοβλάστες

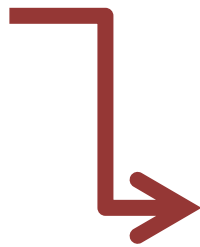
- Κύριο ρόλο στη **παθογένεια της ίνωσης**¹
- Προέλευση από ποικίλους κυτταρικούς πληθυσμούς^{2,3}
- Θετικοί στην έκφραση: α-smooth muscle actin (α-SMA), βιμεντίνης . Αρνητικοί στην έκφραση: δεσμίνης⁴



¹Micallef et al, *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2012; ²Lin et al, *Am J Pathol*, 2008; ³Lee et al, *Immunity*, 2012; ⁴Hinz et al, *J Invest Dermatol*, 2007

Κολονικοί υποεπιθηλιακοί μυοϊνοβλάστες

- Ενεργοποίηση από ινωτικούς παράγοντες (TGF- β 1)¹
- Υπέρμετρη παραγωγή συστατικών του εξωκυττάριου υποστρώματος (ECM) : κολλαγόνο, γλυκοζαμινογλυκάνες¹ φιβρονεκτίνη κ.α



**ΣΤΕΝΩΣΕΙΣ/ΑΠΟΦΡΑΞΕΙΣ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ
ΑΥΛΟΥ, ΣΥΡΙΓΓΙΑ**

¹McAnulty et al, *Int J Biochem Cell Biol*, 2007

Κολονικά επιθηλιακά κύτταρα

Ενεργή συμμετοχή στη φλεγμονή και στην ίνωση στη νόσο του Crohn

- Παραγωγή φλεγμονωδών (NO, IL-8) και ινωτικών παραγόντων (TGF-β1-2-3, TIMP-1), έπειτα από διέγερση με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που παράγονται στη νόσο του Crohn^{1,2,3}
- Μετατροπή σε μυοϊνοβλάστες μέσω της «επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης» (EMT)⁴
- Υπερκείμενα επιθηλιακών κυττάρων προκαλούν την έκφραση των ινωτικών παραγόντων (MMP-9, CTGF) και αύξηση του παραγόμενου κολλαγόνου σε μυοϊνοβλάστες³

¹Kolios et al, *Br J Pharmacol*, 1995; ²Kolios et al, *Br J Pharmacol*, 1996a; ³Drygiannakis et al, *J Crohns Colitis*, 2012; ⁴Rieder et al, *Gut*, 2011

Κυτταροκίνη TL1A (TNF-like ligand)

- Μέλος της TNF υπεροικογένειας ¹
- Κωδικοποιείται από το γονίδιο TNFS15
- Τύπου II διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία πιθανόν μπορεί να απελευθερώνεται σε εκκρινόμενη μορφή μέσω μεταλλοπρωτεϊνών
- Ασκεί τη δράση της μέσω του υποδοχέα της TNFR υπεροικογένειας DR3, ενώ προσδένεται και στον DcR3

¹Aiba et al, *Mediators Inflamm*, 2013

Κυτταροκίνη TL1A (TNF-like ligand)

Εκφράζεται ύστερα από διέγερση:

Ενδοθηλιακά κύτταρα²

Κύτταρα φυσικής ανοσίας³

T λεμφοκύτταρα⁴

Ο DR3 εκφράζεται σε:

Κύτταρα φυσικής ανοσίας⁴

T λεμφοκύτταρα³

B λεμφοκύτταρα έπειτα από διέγερση⁵

Δράσεις TL1A:

Συνδιέγερση T βοηθητικών
λεμφοκυττάρων και παραγωγή
φλεγμονωδών κυτταροκινών από
αυτά^{1,2}

¹Aiba et al, *Mediators Inflamm*, 2013; ²Migone et al, *J Clin Invest*, 2002; ³Pappou et al, *J Exp Med*, 2008; ⁴Meylan et al, *Immunity*, 2008; ⁵Cavallini et al, *PLoS One*, 2013

TL1A και νόσος του Crohn

Συμμετοχή TL1A στη νόσο του Crohn:

- TL1A, DR3:

- αυξημένη έκφραση σε ασθενείς με νόσο του Crohn
 - συνδέονται με ανάπτυξη εντερικής ίνωσης και φλεγμονής στη νόσο του Crohn
 - επίπεδα TL1A,DR3 ανάλογα τις σοβαρότητας των φλεγμονών^{1,2}
- Απλότυπος B του γονιδίου **TNFSF15** συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης, αλλά και με αυξημένη βαρύτητα της νόσου σε Εβραϊκής καταγωγής ασθενείς με νόσο του Crohn³
- Πειραματικά μοντέλα ποντικών με υπερέκφραση του TL1A, ανέπτυξαν εκτεταμένη εντερική ίνωση¹

¹Barrett et al, *Am J Pathol*, 2012; ²Zheng et al, *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 2013;

³Michelsen et al, *PLoS One*, 2009

Θεραπεία στη νόσο του Crohn

Αντιμετώπιση φλεγμονής

- Κορτικοστεροειδή
- Ανοσοκατασταλτικά (Αζαθειοπρίνη, Μεθοτρεξάτη)
- Ενώσεις 5-αμινοσαλυκυλικού οξέος, 5ASA
- Βιολογικές θεραπείες (anti-TNF- α -Infliximab, Adalimumab)

Αντιμετώπιση ίνωσης

- Μοναδική θεραπευτική επιλογή της ίνωσης στη νόσο του Crohn ➡ Χειρουργική επέμβαση
- Ανάγκη ανάπτυξης βιολογικών θεραπειών στην αντιμετώπιση της ίνωσης

Σκοπός της Μελέτης

- ❖ Η εμπλοκή του παράγοντα TL1A, μιας κυτταροκίνης που προάγει την ίνωση, στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις του εντερικού βλεννογόνου, που σχετίζονται με την ινωτική διεργασία, ως δυνητικού στόχου νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Υλικά και Μέθοδοι

- Απομόνωση υποεπιθηλιακών εντερικών μυοϊνοβλαστών

- Κυτταροκαλλιέργειες:

Εντερικοί υποεπιθηλιακοί μυοϊνοβλάστες

Κολονική επιθηλιακή κυτταρική σειρά HT-29

- Απομόνωση ολικού RNA
- cDNA σύνθεση
- Συμβατική PCR
- Real time PCR

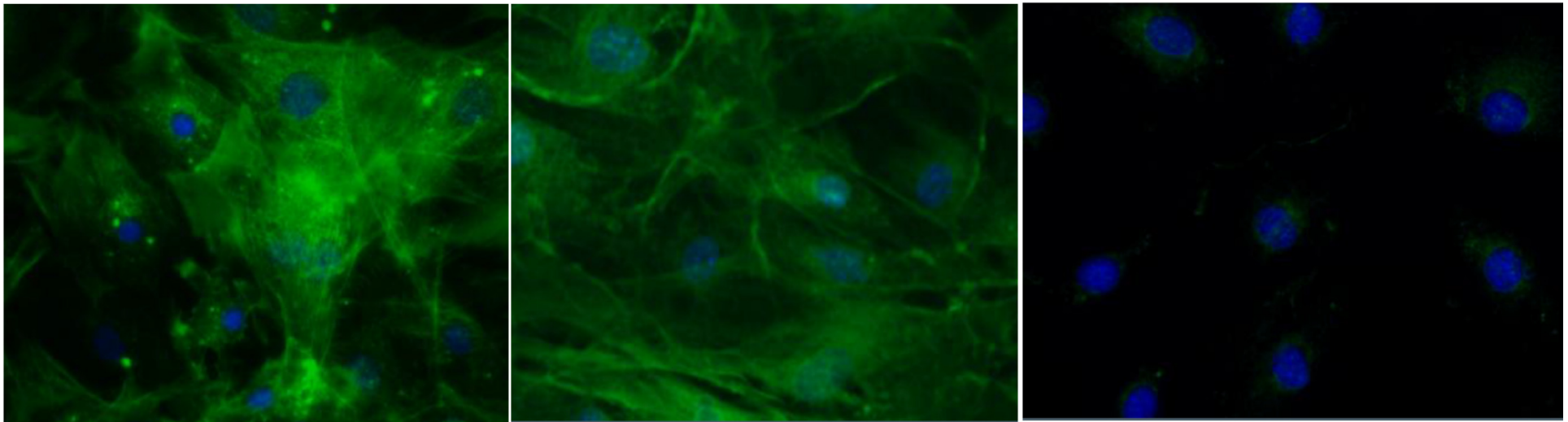
Ερευνητικό πρωτόκολλο

- Διέγερση των υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες **IL-1α και TNF-α** μόνες τους και σε συνδυασμούς (**1, 6 και 24 ώρες διέγερση**) και συλλογή των κυττάρων
- Διέγερση των HT-29 επιθηλιακών κυττάρων με τους φλεγμονώδεις μεταβιβαστές **TNF-α, IL-1α και IFN-γ** μόνες τους και σε συνδυασμούς (**6 ώρες διέγερση**) και συλλογή των κυττάρων και των υπερκειμένων
- Διέγερση των υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών με τα **υπερκείμενα** των διεγερμένων HT-29 (**6 ώρες διέγερση**) και συλλογή κυττάρων και υπερκειμένων
- Μελέτη έκφρασης του TL1A στους μυοϊνοβλάστες

Αποτελέσματα

Απομόνωση και χαρακτηρισμός κολονικών υποεπιθηλιακών μυοϊνοβλαστών.

- Λήψη βιοψιών φυσιολογικού παχέος εντέρου από ασθενείς.
- Καλλιέργεια βιοψιών για 3-4 εβδομάδες μέχρι να εμφανιστούν αποικίες μυοϊνοβλαστών.
- Χρώση και επιβεβαίωση ταυτότητας μυοϊνοβλαστών.

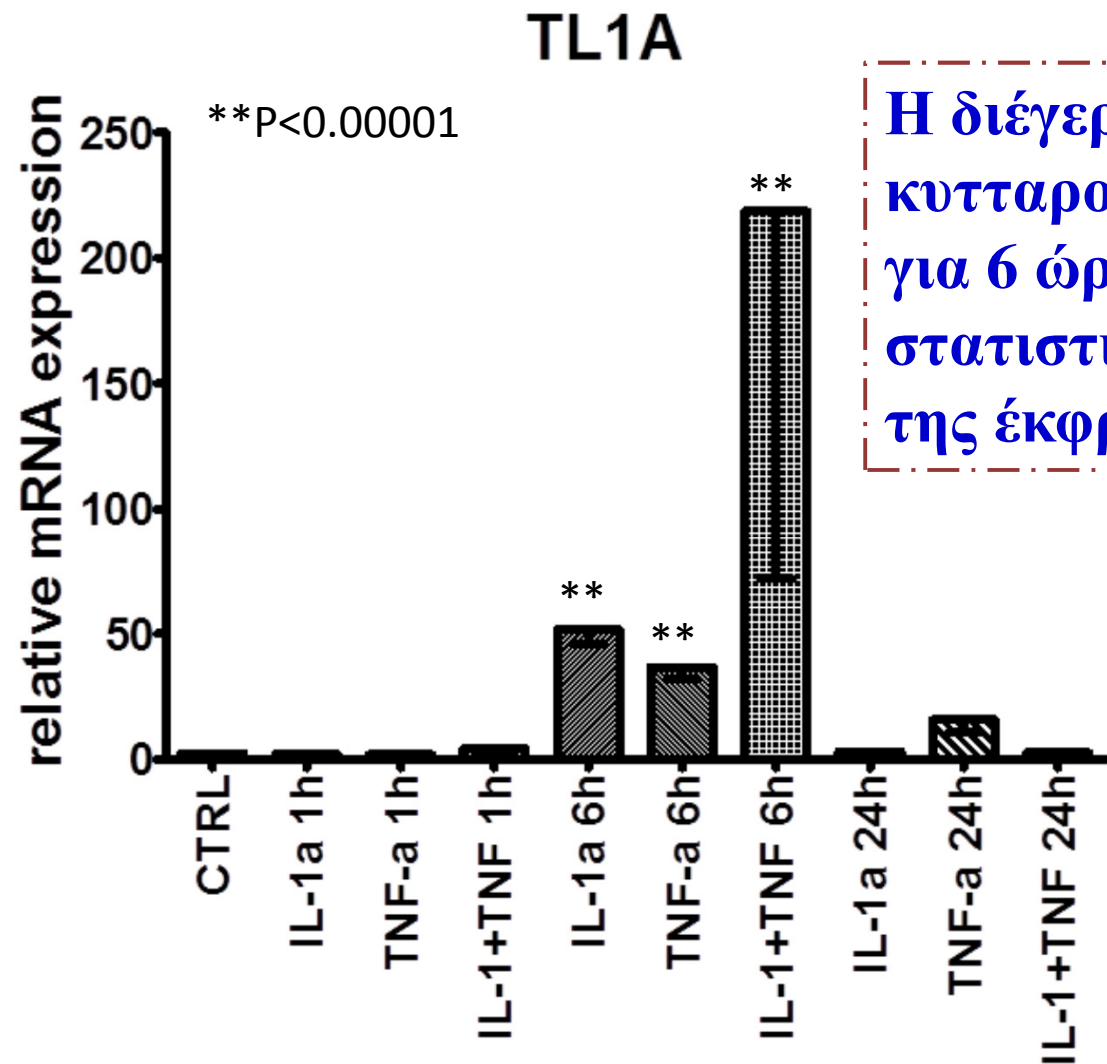


+ α -SMA

+ βιμεντίνη

- δεσμίνη

Η επίδραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1α και TNF-α στην επαγόμενη έκφραση TL1A από τους μυοϊνοβλάστες.

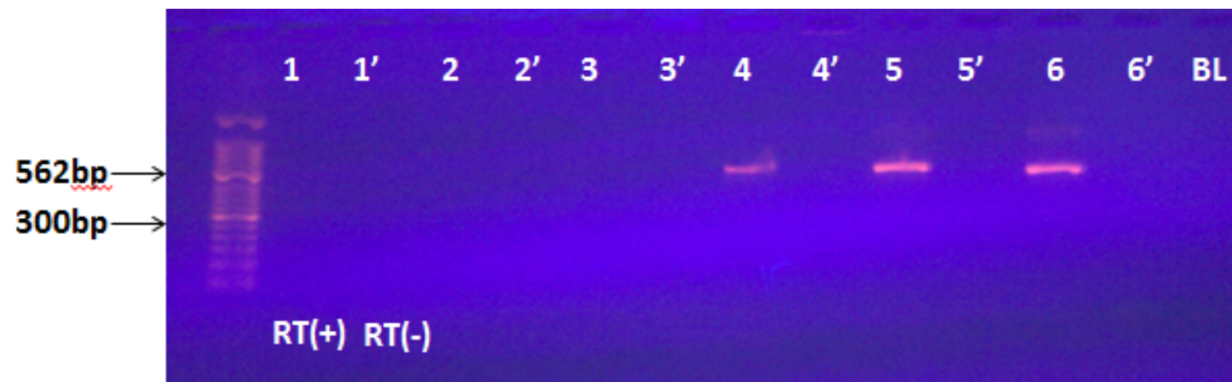


Η διέγερση μυοϊνοβλαστών με τις κυτταροκίνες IL-1α ή/και TNF-α, για 6 ώρες, προκάλεσε τη στατιστικώς σημαντική αύξηση της έκφρασης του TL1A.

Παραγωγή μεταβιβαστών φλεγμονής από κολονικά επιθηλιακά κύτταρα HT-29 σε in vitro συνθήκες φλεγμονής (διέγερση με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες).

❖ Διέγερση των HT-29 κυττάρων με: **IL-1 α , TNF- α & IFN- γ**

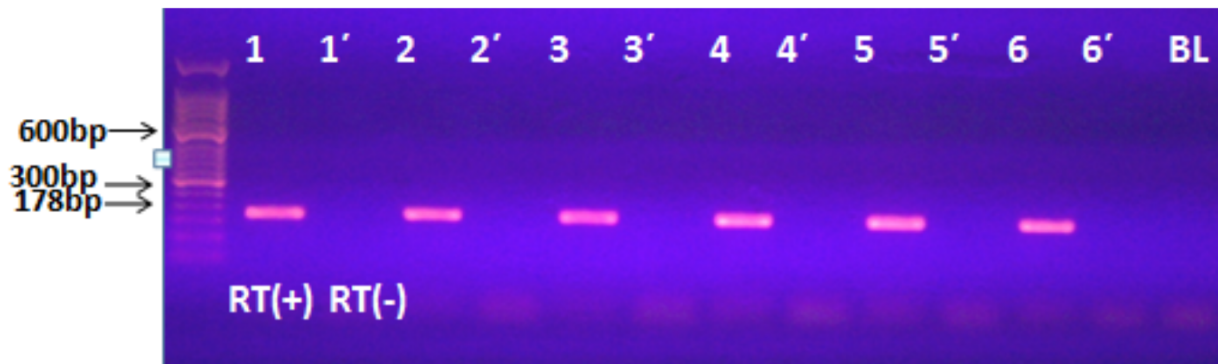
Ταυτοποίηση επιτυχημένης διέγερσης: παραγωγή μεταβιβαστών φλεγμονής (IL-8), όπως έχει περιγραφεί ^{1,2}



Έκφραση IL-8

1-3 → αδιέγερτα HT-29

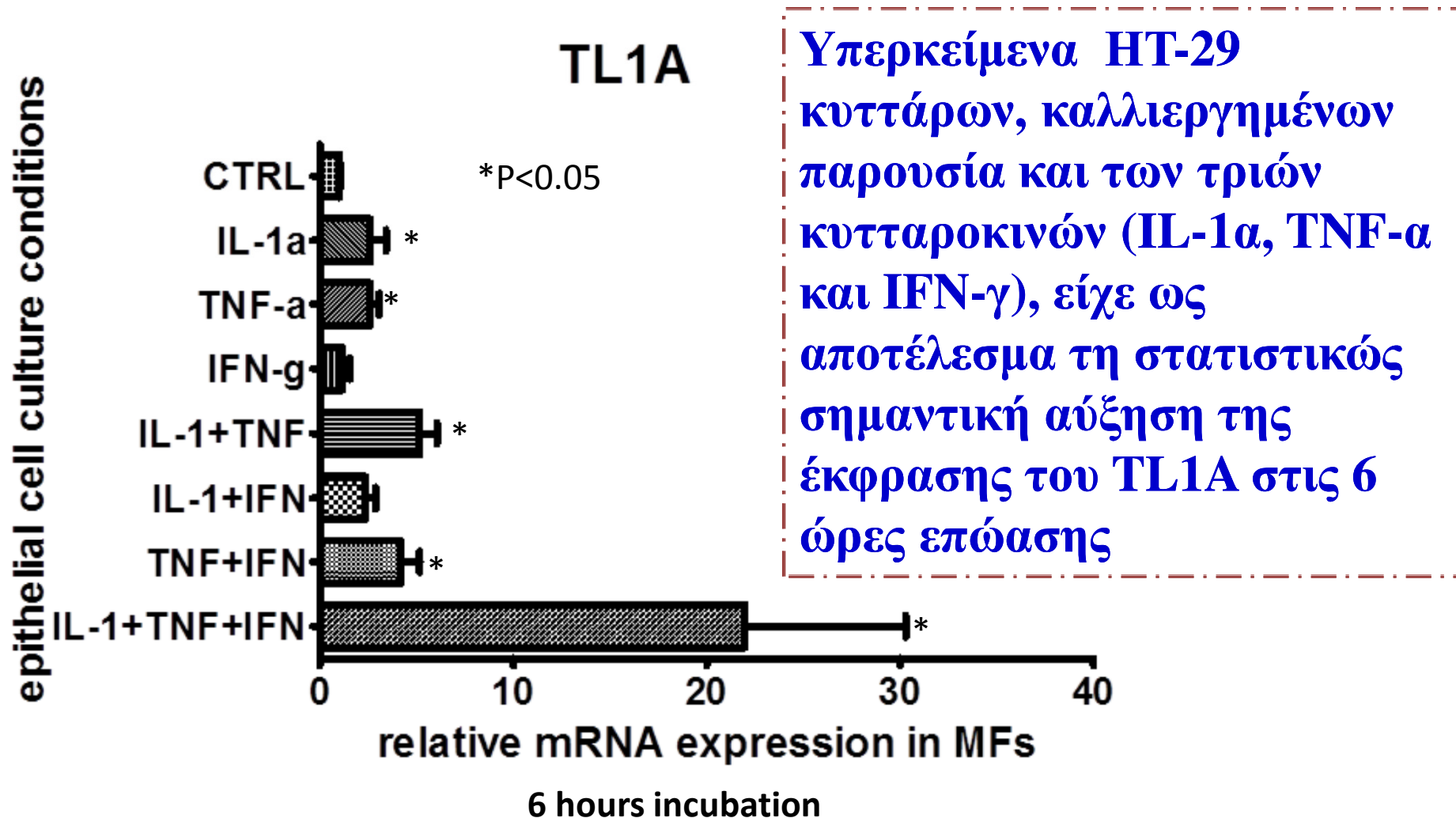
4-6 → διεγερμένα HT-29



Έκφραση GapdH

¹Kolios et al, Br J Pharmacol, 1995; ²Kolios et al, Br J Pharmacol, 1996a

Η επίδραση των υπερκειμένων των HT-29 κυττάρων στην επαγόμενη έκφραση TL1A από τους μυοϊνοβλάστες.



Συμπεράσματα

- ❖ Πρώτη *in vitro* μελέτη έκφρασης του TL1A στους μυοϊνοβλάστες
- ❖ Η διέγερση των μυοϊνοβλαστών με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επάγει την έκφραση του ινωτικού παράγοντα TL1A στους μυοϊνοβλάστες.
- ❖ Τα διεγερμένα με προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, HT-29 κύτταρα, συμμετέχουν στην ινωτική διεργασία, μέσω εκκρινόμενων παραγόντων, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες και προάγουν την έκφραση του TL1A σε αυτούς.

Συμπεράσματα

- ❖ Τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν την εμπλοκή των μυοϊνοβλαστών στην παραγωγή του ινωτικού παράγοντα TL1A όταν βρεθούν σε περιβάλλον φλεγμονής και επιβεβαιώνουν για μια ακόμη φορά την αλληλεπίδραση τους με τα κολονικά επιθηλιακά κύτταρα στην εντερική φλεγμονή.
- ❖ Λόγω του ότι η κυτταροκίνη TL1A εμπλέκεται στην ινωτική διεργασία στη νόσο του Crohn, η περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού επαγωγής και δράσης της, ευελπιστούμε να οδηγήσει στην εύρεση νέων θεραπευτικών στρατηγικών.

Μελλοντικοί στόχοι

- ❖ Μελέτη έκφρασης του TL1A σε μυοϊνοβλάστες έπειτα από διέγερση με ιστικά υπερκείμενα, προερχόμενα από κολονικές βιοψίες ασθενών με Crohn και από υγιή άτομα
- ❖ Μελέτη έκφρασης του TL1A και του DR3 σε HT-29 επιθηλιακά κύτταρα
- ❖ Διέγερση HT-29 κυττάρων με TL1A ή σε συνδυασμό με επιπλέον κυτταροκίνες, προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος του σε αυτά τα κύτταρα
- ❖ Διερεύνηση του κατά πόσο η έκφραση του TL1A στους μυοϊνοβλάστες προκαλεί την αύξηση του παραγόμενου κολλαγόνου

Pro-inflammatory cytokines induce the expression of TL1A/TNFSF15 in primary intestinal subepithelial myofibroblasts

Bamias G¹, Filidou E², Goukos³, Valatas V⁴, Arvanitidis K², Panagopoulou M², Kouklakis G⁵, Daikos G³, Ladas SD¹, Kolios G²

¹Laikon Hospital, Ethnikon & Kapodistriakon University of Athens, Academic Dpt of Gastroenterology, Athens, Greece

²Democritus University of Thrace, Laboratory of Pharmacology, Faculty of Medicine, Alexandroupolis, Greece

³Laikon Hospital, Ethnikon & Kapodistriakon University of Athens, 1st Dpt of Propaedeutic & Internal Medicine, Laboratory of Infectious Diseases, Athens, Greece

⁴University of Crete, Laboratory of Gastroenterology, Heraklion, Greece

⁵Democritus University of Thrace, Endoscopy Unit, Faculty of Medicine, University Hospital of Alexandroupolis, Alexandroupolis, Greece

BACKGROUND & AIMS

TL1A is a member of the TNF superfamily of cytokines (TNFSF15). It provides co-stimulatory signals for activated lymphocytes that express the functional receptor DR3 (Bamias G. et al. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013;29:597-602). TL1A and DR3 are highly upregulated in intestinal areas with active IBD-related inflammation (Bamias G. et al. *Clin Immunol.* 2010;137:242-9). Recently it was reported that transgenic mice with lymphoid- or myeloid-specific overexpression of TL1A develop colonic fibrosis (Meylan F. et al. *Immunol Rev.* 2011;244:188-96).

The aim of the present study, was to determine whether primary human intestinal subepithelial myofibroblasts (ISMF) express TL1A constitutively or under stimulation with IBD-associated pro-inflammatory cytokines.

METHODS AND RESULTS

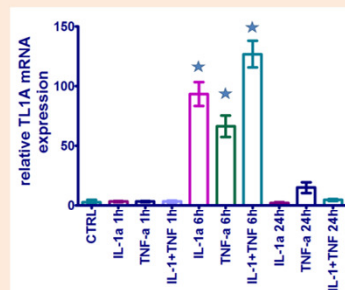


Figure 1. The pro-inflammatory cytokines IL-1α and TNF- α induce the expression of TL1A in cultured primary ISMFs.

ISMF were isolated from endoscopically-obtained colonic biopsies from healthy controls according to an established protocol (Orygiannakis I et al. *J Crohns Colitis* 2013, 7, 286-300). ISMF were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and antimicrobials. The myofibroblast phenotype (α-SMA+, vimentin+ and desmin-) was verified by immunofluorescence microscopy. ISMF at passages 3-7 were used in the experiments. ISMF were cultured unstimulated or stimulated with rhIL-1α (5 ng/ml), rhTNF-α (50 ng/ml) or their combination. ISMF were collected at 1, 6, or 24 h and total RNA was extracted from the cultured ISMF. The mRNA expression of TL1A was measured by real-time RT-PCR. The ΔΔCt method was used for the measurement of the relative TL1A mRNA transcript number. GAPDH expression in each sample was used as the internal control. Results include ISMF from 3 separate individuals. The baseline value (CTRL) corresponds to the 6h values of unstimulated ISMF obtained from 6 healthy controls. Asterisks indicate statistically significant differences in comparison to CTRL values. Data are presented as the mean±standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were performed using Mann-Whitney t-test. Statistical significance was established at P<0.05.

Figure 2. Epithelial-derived soluble factors induce the expression of TL1A in cultured primary ISMFs.

HT-29 cells (human colon cancer epithelial cell line) were cultured in 75cm² flasks with McCoy's medium enriched with 10% FBS and antimicrobials. HT-29 cells were cultured unstimulated (CTRL) or in the presence of various combinations of rhIL-1α (5 ng/ml), rhTNF-α (50 ng/ml) and rhIFN-γ (150U/ml). The supernatants of cultured HT-29 cells were collected and used in cultures of ISMFs that were isolated from healthy controls as indicated in Fig. Legend 1. SEMFs were passaged at a ratio of 1:3, whilst HT-29 at a ratio of 1:10. All experiments were performed with FBS-free media at 95% culture confluence with a stable ratio of supernatant:cell surface (1.5 ml:9.6 cm²). ISMF were collected at 6h, total RNA was extracted, and the mRNA expression of TL1A was measured by real-time RT-PCR. The ΔΔCt method was used for the measurement of the relative TL1A mRNA transcript number, using GAPDH as the internal control. Data are presented as the mean±standard error of the mean (SEM) from 3 individual samples. Asterisks indicate statistically significant differences in comparison to CTRL values (Mann-Whitney t-test)

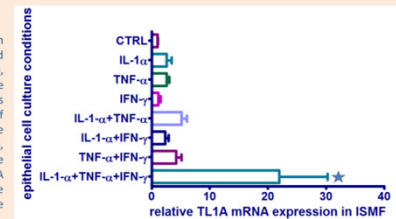
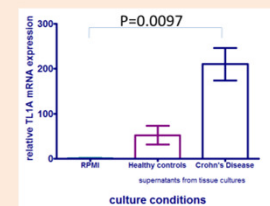


Figure 3. Soluble factors from intestinal tissue cultures of patients with Crohn's disease upregulate the expression of TL1A in primary ISMFs.

Tissue cultures were performed in endoscopically-obtained colonic biopsies from healthy controls and patients with Crohn's disease. Briefly, tissues were washed extensively with HBSS, transferred in 12-well plates in 1ml RPMI and incubated at 37°C, in 5% CO₂ atmosphere for 28-30h. Supernatants were centrifuged at 10.000rpm for 10min. ISMF from healthy controls were cultured in the presence of RPMI or supernatants from tissue cultures. After 6h, ISMF were collected, total RNA was extracted, and the mRNA expression of TL1A was measured by real-time RT-PCR. The ΔΔCt method was used for the measurement of the relative TL1A mRNA transcript number, using GAPDH as the internal control.



CONCLUSIONS

- Pro-inflammatory cytokines that are abundantly expressed in intestinal areas with active CD (TNF-α, IL-1α, IFN-γ) induce the expression of the co-stimulatory cytokine TL1A in ISMF either directly or through the induction of epithelial-derived mediators.
- Interactions between ISMF-derived TL1A and its receptor, DR3 on epithelial cells or lymphocytes may participate in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation.

Ευχαριστώ!