LIVELLI DI NFkB, IkBα e IkBγ NELLA MUCOSA INTESTINALE E PRODUZIONE DI CITOCHINE DA PBMC IN PAZIENTI CON MORBO DI CROHN TRATTATI CON ANTICORPO MONOCLONALE ANTI-TNFα (INFLIXIMAB).

Dottorando Dott.ssa Maria Ciarniello

Lôinfiammazione della mucosa intestinale nella Malattia di Crohn (MC) è lô*end point* di una cascata di eventi che iniziano da una stimolazione antigenica, appropriatamente diretta contro un patogeno non riconosciuto, oppure una risposta inappropriata verso un antigene altrimenti innocuo della flora batterica intestinale, in un ospite geneticamente predisposto. La risposta infiammatoria mucosale è mediata da processi Th1-dipendenti attraverso la produzione di citochine, quali IL1β, IL6 e TNFα. Il TNFα è il target della sperimentazione clinica, dato il suo ruolo di effettore pro-infiammatorio nella mucosa intestinale. Esso induce apoptosi attivando lôNFkB che transloca nel nucleo dove promuove la trascrizione di vari geni coinvolti nella risposta infiammatoria immuno-mediata. Lôattivazione dellôNF-kB è stata dimostrata nelle cellule mucosali di Pazienti affetti da MC e la sua inibizione è uno dei meccanismi attraverso cui i corticosteroidi ed altri agenti anti-infiammatori esercitano il proprio effetto. Le più recenti acquisizioni sulle citochine proinfiammatorie ed il loro ruolo nelle IBD hanno condotto allo sviluppo di un potenziale approccio terapeutico per manipolare queste citochine e quindi inibire lôinfiammazione nelle IBD. Di recente, il trattamento con Infliximab è stato utilizzato con successo nei Pazienti con MC che non rispondono alle terapie convenzionali, anche se i predittori della sua efficacia sono ancora oggetto di studio. Obiettivo del nostro studio è valutare la produzione di TNFα da parte delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) ed i livelli di NFkB nella mucosa intestinale durante trattamento con Infliximab in 12 Pazienti con MC. Il TNFα è stato dosato nei sovranatanti di colture di PBMC stimolate con PHA ed LPS. Lôimmunoistochimica è stata effettuata anche sulle biopsie intestinali. In 6 Pazienti, lôanalisi Western blot della subunità RelA dellôNFkB e dei suoi inibitori IkBα e IkBγ è stata fatta su biopsie intestinali e su PBMC. La produzione di TNFα da parte di PBMC stimolate con LPS ha mostrato minime variazioni, mentre essa è incrementata in PBMC stimolate con PHA dopo trattamento con Infliximab. Il numero di cellule infiammatorie nella mucosa intestinale si è ridotto ($p<0.002$) dopo trattamento. In 5 dei 6 Pazienti abbiamo riscontrato un incrementato livello degli inibitori IkBα e IkBγ nelle biopsie intestinali dopo trattamento. Lôincremento degli IkBs potrebbe essere uno dei meccanismi attraverso cui lôInfliximab riduce lôattività dellôNFkB ed esercita la propria azione anti-infiammatoria.

LEVELS OF NFkB AND ITS INHIBITORS IkBα AND IkBγ IN THE INTESTINAL MUCOSA AND CYTOCHINE PRODUCTION BY PBMC IN CROHNôS DISEASE PATIENTS DURING INFLIXIMAB TREATMENT.

The mucosal inflammation in Crohnôs disease (CD) is the end point of a cascade of events initiated by antigen stimulation as appropriate one directed against a not recognised pathogen or an inappropriate response to an otherwise innocuous antigen., the normal luminal flora, in a genetically susceptible host. The mucosal activation of Th1 type lymphocytes is mediated by the increased production of proinflammatory cytokines including IL1β, IL6 and TNFα. TNFα is the target of clinical trials as proinflammatory cytokines in the intestinal mucosa. TNFα induces apoptosis and acts activating NFkB which translocates into nucleus where it promotes the transcription of several genes involved in the immuno-inflammatory response. Activation of NFkB has been demonstrated in cells of the gut mucosa of Patients affected by CD and its inhibition is considered one of the mechanisms by which corticosteroids and other anti-inflammatory agents exert their effects in these diseases. Recently, informations on pro-inflammatory cytokines and their role in IBD have led to development of potential therapeutic approch to manipulate these cytokines and there by inhibiting inflammation in IBD. The treatment with Infliximab is employed successfully in Crohnôs disease Patients unresponsive to conventional therapy, but predictors of efficacy are lacking. We evaluated the production of TNFa by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and the levels of NFkB family molecules in the intestinal mucosa during infliximab therapy in 12 CD Patients. TNFα was assayed on supernatants of PBMC culture stimulated with PHA or LPS. Immunohistochemistry was also done on intestinal biopsies. In six patients, Western blot analysis of the NFkB subunit Rel-A, and its inhibitors IkBα and IkBγ was performed on intestinal biopsies and PBMC. The TNFα production by LPS stimulated PBMC showed mild changes, while it was increased by PHA-stimulated PBMC after treatment. The number of inflammatory cells in the intestinal mucosa was reduced ($p<0.002$) by the treatment. In five out of six cases we detected an increase of the IkBα and IkBγ inhibitor levels in intestinal biopsies after treatment. An increase of IkB inhibitors levels could be one of the mechanisms by which infliximab decreases NFkB activity and exerts its anti-inflammatory effects.