

Vliv polymorfismů genů pro interleukin-6 a tumor nekrotizující faktor α na vnímání akutní bolesti

Hrazdilová O.¹, Šerý O.², Ševčík P.¹

¹Anesteziologicko-resuscitační klinika, LF Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice, Brno

²Laboratoř neurobiologie a molekulární psychiatrie, Katedra srovnávací fyziologie živočichů a obecné zoologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykovy univerzity, Brno

Souhrn

Cíl studie: Cílem studie bylo ověřit předpokládanou závislost mezi -174 polymorfismem genu pro interleukin-6 (IL-6) a vnímáním akutní bolesti a dále ověřit vztah mezi -308 polymorfismem genu pro tumor nekrotizující faktor α (TNF- α) a akutní bolestí.

Soubor pacientů a metoda: Tonzilektomie a turniketový test představovaly modely akutní bolesti. Soubor pacientů jsme rozdělili do skupin podle intenzity pooperační a turniketové bolesti měřené vizuální analogovou škálou (VAS) a podle tolerance pooperační bolesti v hodinách. Intenzitu a toleranci bolesti jsme měřili v 5hodinovém intervalu po tonzilektomii a porovnávali s -174 polymorfismem genu pro IL-6 a -308 polymorfismem genu pro TNF- α . Pro statistické zhodnocení závislosti jsme použili Spearmannův korelační koeficient a potom Mann-Whitney U test.

Výsledky: Do asociační studie bylo zařazeno 284 pacientů bělošské populace – 178 žen a 106 mužů, kteří se podrobili plánované tonzilektomii. Závislost mezi průměrnou intenzitou pooperační bolesti ($p = 0,96$), tolerancí pooperační bolesti ($p = 0,17$) a intenzitou bolesti naměřenou v turniketovém testu ($p = 0,78$) na -174 polymorfismu genu pro IL-6 nebyla statisticky významná.

Dále jsme nepotvrdili závislost průměrné intenzity pooperační bolesti ($p = 0,54$), tolerance pooperační bolesti ($p = 0,60$) a intenzity bolesti v turniketovém testu ($p = 0,59$) na -308 polymorfismu genu pro TNF- α .

Závěr: Z našich výsledků je patrné, že zkoumané polymorfismy genů pro IL-6 a TNF- α nehrají statisticky významnou roli ve vnímání akutní bolesti u jedinců české populace.

Číslová slova: akutní bolest – genetika – interleukin – IL-6 – tumor nekrotizující faktor – TNF- α – polymorfismus

Abstract

Influence of interleukin-6 and tumor necrosis factor α gene polymorphisms on acute pain perception

Objective: The aim of the study was to analyze the association between acute pain and -174 interleukin-6 (IL-6) and -308 tumor necrosis factor α (TNF α) gene polymorphisms.

Material and methods: The tonsillectomy and tourniquet tests were taken as acute pain perception models. The study population of patients was divided into groups according to pain intensity based on visual analogue scale (VAS) and according to pain tolerance. Both pain intensity and tolerance were measured immediately after the tonsillectomy and tourniquet tests, and compared with -174 IL-6 and -308 TNF α gene polymorphisms. The Spearman correlation followed by the Mann-Whitney U test were used for statistical analysis.

Results: We examined 284 Czech subjects (Caucasians; 178 women and 106 men). No association of single gene allelic variants (-174 IL-6 and -308 TNF α gene polymorphisms) with pain intensity and tolerance was found.

Conclusion: Our results indicate that -174 IL-6 and -308 TNF α gene polymorphisms play no significant role in acute pain perception in the Czech population.

Key words: acute pain – genetics – interleukin – IL-6 – tumor necrosis factor – TNF α – polymorphism

Anest. intenziv. Med., 16, 2005, č. 4, s. 181–184.

Úvod

Bolest je nepříjemný senzorický a emoční zážitek spojený se skutečným nebo potenciálním poškozením tkání. Ve vnímání bolesti existují interindividuální rozdíly i mezi zdravými jedinci.

Tyto rozdíly mají psychobiologický základ. Vnímání bolesti je komplexní děj podmíněný genotypem a fenotypem jedince. Zkušenost, prostředí, osobnost, po-

hlaví a genová výbava jedince jsou faktory, které se navzájem doplňují a nelze je úplně osamostatňovat.

Je známo jen málo příkladů jednotlivých monogenně podmíněných onemocnění souvisejících s bolestí (např. dědičná forma migrény a hereditární familiární dysautonomie neboli kongenitální necitlivost bolesti). Z výše uvedeného lze usuzovat, že vnímání bolesti není podmíněno monogenně, ale větším počtem genů – jedná se tedy o polygenní (multifaktoriální) dědičnost.

V současné době jsou známy geny, které se pro-

střednictvím svých produktů podílejí na nervovém přenosu a zpracování bolestivých stimulů. Geneticky podmíněná je nejen funkce proteinů podílejících se na přenosu signálu (receptory, enzymy metabolismu neurotransmiterů, neuropeptidy), ale také funkce proteinů modulujících bolest (interleukiny, neuropeptidy, enzymy metabolických drah kyseliny arachidové atd.) či funkce proteinů zasahujících do vývoje CNS (neuropeptidy, interleukiny, receptory pro neurotrofiny atd.).

Interleukin 6 (IL-6) a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α)

Těsný vztah mezi nervovým systémem, endokrinním systémem a imunitním systémem je dobře znám. Bylo zjištěno, že cytokiny hrají důležitou roli v centrálním nervovém systému nejen v imunitních procesech a v prostupnosti krevně-mozkové bariéry [1, 2], ale také v regulaci endokrinního systému a v regulaci růstu a diferenciaci neuronů a astrocytů, jako i v modulaci dopaminergních, serotonergních, noradrenergických a cholinergních neurotransmisí. Přítomnost cytokinových receptorů na povrchu neuronů naznačuje, že cytokiny přímo ovlivňují nervové funkce [3].

Interleukin 6 a tumor nekrotizující faktor α patří mezi multifunkční cytokiny [4, 5, 6, 7, 8].

TNF- α společně s IL-6 a IL-1b ovlivňují vývoj monoaminových neuronů [9, 10]. Cílem naší studie bylo zjistit, zda polymorfismus -174 genu pro interleukin-6 a -308 polymorfismus genu pro tumor nekrotizující faktor α ovlivňují vnímání akutní pooperační bolesti.

Soubor pacientů a metodika

Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

Do asociační studie byli zařazeni pacienti bělošské populace České republiky, kteří se podrobili plánované tonzilektomii v naší nemocnici v letech 2002 až 2004. Do studie byli zařazeni pouze pacienti s ASA I, ve věku od 18 do 35 let. Nebyli zařazeni jedinci se zkušeností s bolestí (zkreslené vnímání bolesti), pacienti s diagnózou diabetes mellitus, hypertonicí (možný blízký genetický podklad s vnímáním bolesti), pacienti s nádorovými onemocněními (možný podobný genetický podklad, pravděpodobná zkušenost s bolestí). Ze studie byli vyloučeni psychiatřičtí pacienti, dále osoby trpící depresivními či úzkostnými poruchami. Zařazeni též nebyli pacienti pravidelně užívající nesteroidní protizánětlivé léky a kortikoidy pro možnost zkresleného vnímání pooperační bolesti.

Jako model akutní bolesti byl vybrán turniketový test a tonzilektomie.

Jako první byl s pacienty proveden turniketový test považovaný za model ischemické bolesti [1]. Test spočívá v nafouknutí manžety tonometru o 50 mm Hg

nad hodnotu naměřeného systolického tlaku na dominantní horní končetině. Pacienti hodnotili intenzitu vzniklé bolesti pomocí 100milimetrové vizuální analogové škály (VAS).

Tonzilektomie byla prováděna v celkové anestezii. Z opioidů během celkové anestezie byl vždy použit pouze sufentanil v dávce 25 μ g pro pacienty s tělesnou hmotností do 60 kg a v dávce 35 μ g pro pacienty nad 60 kg, podaný nejpozději 30 minut před koncem operačního výkonu. Pooperační bolest byla u všech pacientů léčena metamizolem v jednotlivé dávce 1g podané pomalou infuzí. První dávka analgetika byla pacientovi podána, jakmile intenzita jeho bolesti dosáhla hodnoty VAS 30. Délka časového intervalu od extubace do VAS = 30 byla zaznamenávána a hodnocena jako tolerance pooperační bolesti. Intenzita bolesti byla hodnocena pacientem prostřednictvím VAS poprvé ihned po jeho extubaci a dále každou hodinu v 5hodinovém pooperačním období. Intenzita bolesti v turniketovém testu, intenzita pooperační bolesti a tolerance pooperační bolesti byly porovnávány s -174 polymorfismem genu pro IL-6 a -308 polymorfismem genu pro TNF α .

Peroperačně byly pacientům z periferního žilního katétru odebrány 2 ml nesrážlivé žilní krve, potřebné pro izolaci DNA z leukocytů.

Laboratorní analýza

Detekce -174 polymorfismu genu pro IL-6

Detekce tohoto polymorfismu byla provedena podle metodiky navržené v Laboratoři neurobiologie a molekulární psychiatrie.

Pro PCR reakci polymorfismu genu pro IL-6 byly použity primery: 5'-ACT TTT CCC CCT AGT TGT GTC TTG C-3' a 5'-AGA ATG AGC CTC AGA CAT CTC CAG-3'.

Reakční směs o celkovém objemu 50 μ l obsahovala: 50 mM KCl; 10 μ M Tris-HCl, pH 8,4; 5 mM MgCl₂; 1 μ M každého z primerů; 0,5 mM dNTP; 100 ng genomové DNA; 1 U Taq-Purple DNA polymerázy (Top-Bio, ČR).

Amplifikační reakce byla prováděna v termálním cykleru Techne PROGENE. Po počáteční denaturaci, trvající 2,5 minuty při 94°C, byla DNA amplifikována v 3krokových cyklech: denaturace 30 s při 94°C; annealing 30 s při 60°C; extenze 30 s při 72°C. Po 32 cyklech byla použita finální extenze 7 minut při 72 °C. Celková délka amplifikovaného fragmentu byla 204 bp.

Následovala restriční analýza: 10 μ l PCR amplifikátu bylo smícháno s 1 μ l pufru Taq+ (Fermentas, Litva) a dále s 8 U restričního enzymu TaqI (Fermentas, Litva). Poté následovala inkubace na vodní lázni při 65 °C po dobu 5 hodin.

Gelová elektroforéza restričních fragmentů byla provedena na 2% agarózovém gelu (EliPhore) barveném ethidium bromidem při 100 V po dobu jedné hodiny. Výsledný gel byl prosvícen transiluminátorem a vyfotografován digitálním fotoaparátem Olympus (CAMEDIA C-3030). Byly detekovány následující fragmenty: 204 bp, který značil genotyp CC; 180 bp (fragment o délce 24 bp na gelu nerozlišitelný) cha-

rakterizoval genotyp GG; 204 bp, 180 bp (a 24 bp) identifikovaly genotyp GC; fragment 24 bp nebylo možné na gelu odlišit.

Detekce -308 polymorfismu genu pro TNF- α

Detekce tohoto polymorfismu byla provedena podle metodiky navržené v Laboratoři neurobiologie a molekulární psychiatrie.

Pro PCR reakci polymorfismu genu pro TNF- α byly použity primery: 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GGC AT-3' a 5'-CGG GGA AAG AAT CAT TCA ACC AG-3'.

Reakční směs o celkovém objemu 50 μ l obsahovala: 50 mM KCl; 10 μ M Tris-HCl, pH 8,4; 5 mM MgCl₂; 1 μ M každého z primerů; 0,5 mM dNTP; 100 ng genomové DNA; 1 U Taq-Purple DNA polymerázy (Top-Bio, ČR).

Amplifikační reakce byla prováděna v termálním cyklu Techne PROGENE. Po počáteční denaturaci trvající 2,5 minuty při 94 °C byla DNA amplifikována v 3krokových cyklech: denaturace 30 s při 94 °C; annealing 30 s při 66 °C; extenze 30 s při 72 °C. Po 32 cyklech byla použita finální extenze 7 minut při 72 °C. Celková délka amplifikovaného fragmentu byla 284 bp.

Následovala restrikční analýza: 20 μ l PCR amplifikátu bylo smícháno s 2 U restrikčního enzymu NcoI (Fermentas, Litva). Poté následovala inkubace na vodní lázni při 37 °C po dobu 16 hodin.

Gelová elektroforéza restrikčních fragmentů byla provedena na 2% agarózovém gelu (EliPhore) barveném ethidium bromidem při 100 V po dobu jedné hodiny. Výsledný gel byl prosvícen transiluminátorem a vyfotografován digitálním fotoaparátem Olympus (CAMEDIA C-3030). Byly detekovány následující fragmenty: fragment 264 bp, který značil genotyp 11; fragmenty 264 bp a 284 bp charakterizovaly genotyp 12 a fragment 284 bp identifikoval genotyp 22.

Statistická analýza

Výskyt alel byl vypočten z pozorovaných (zkoumaných) genotypů a dán do korelace s intenzitou bolesti měřené pooperačně i během turniketového testu a dále s tolerancí pooperační bolesti. Výpočet byl proveden Spearmanovou korelací a Mann-Whitney U-testem, statistickým programem CSS Statistica (Statsoft, Tulsa, USA). Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

Výsledky

Do studie bylo zařazeno 284 pacientů, 106 mužů a 178 žen bělošské populace. Střední hodnota věku pacientů byla 28 let, průměrná hodnota intenzity pooperační bolesti byla 4 (měřeno pomocí VAS), průměrná tolerance pooperační bolesti byla 1 hodina a průměrná hodnota intenzity bolesti v turniketovém testu byla 2 (měřeno pomocí VAS) – tabulka 1.

Tabulka 1. Charakteristika souboru

Medián věku (roky)	28
Průměrná intenzita pooperační bolesti (VAS)	4
Průměrná tolerance pooperační bolesti (hod)	1
Průměrná intenzita bolesti – turniketový test (VAS)	2

Rozložení genotypů pro IL-6 a TNF- α byly v Hardy-Weinbergově rovnováze (tab. 2, 3).

Tabulka 2. Rozložení genotypů -174 polymorfismu genu pro IL-6

Genotyp	Četnost výskytu	Četnost výskytu (%)
Homozygot CC	97	34
Heterozygot CG	146	51
Homozygot GG	44	15

Tabulka 3. Rozložení genotypů -308 polymorfismu genu pro TNF- α

Genotyp	Četnost výskytu	Četnost výskytu (%)
Homozygot CC	197	69
Heterozygot CG	84	29
Homozygot GG	6	2

Na základě statistické analýzy jsme našli závislost tolerance pooperační bolesti na věku – čím byl pacient starší, tím lépe toleroval bolest ($p = 0,02$). Nepotvrdili jsme závislost průměrné intenzity pooperační bolesti ($p = 0,45$), tolerance pooperační bolesti ($p = 0,27$) a intenzity bolesti v turniketovém testu ($p = 0,70$) na pohlaví.

Nepotvrdili jsme předpokládaný vliv -174 polymorfismu genu pro IL-6 na průměrnou intenzitu pooperační bolesti ($p = 0,96$), na toleranci pooperační bolesti ($p = 0,17$) a na intenzitu bolesti naměřenou v turniketovém testu ($p = 0,78$).

Dále jsme nepotvrdili závislost průměrné intenzity pooperační bolesti ($p = 0,54$), tolerance pooperační bolesti ($p = 0,60$) a intenzity bolesti v turniketovém testu ($p = 0,59$) na -308 polymorfismu genu pro TNF- α (tab. 4).

Tabulka 4. Interakce genotypu se zkoumanými faktory: INT 0–5 = intenzita bolesti v nulté až páté hodině po operaci (Mann-Whitney U test)

	-174	-308
	IL-6	TNF- α
INT-0	0,70	0,59
INT-1	0,85	0,19
INT-2	0,89	0,91
INT-3	0,74	0,41
INT-4	0,93	0,85
INT-5	0,80	0,99
INT – průměr	0,96	0,54
Tolerance pooperační bolesti (průměr)	0,17	0,60
Intenzita bolesti – turniketový test (průměr)	0,78	0,59

Vnímání bolesti je komplexním jevem závislým na genetické výbavě, osobnosti a zkušenosti daného jedince. Rozdílnost vnímání bolesti není zapříčiněna jedním genem (monogenně), ale větším počtem genů (polygenně). Nalezli jsme závislost mezi tolerancí akutní bolesti a věkem. Ze závislosti vyplývá: čím je jedinec starší, tím trpělivěji snáší bolest. Statisticky významná závislost mezi některým z genotypů pro -174 polymorfismus genu pro IL-6 (CC, CG, GG), ani závislost některého genotypu -308 polymorfismu (11,12,22) TNF- α a intenzitou či tolerancí akutní bolesti se nám nepodařilo potvrdit. Tuto možnou závislost jsme předpokládali, protože interleukin 6 a tumor nekrotizující faktor α jsou multifunkčními cytokiny. IL-6 je uvolňován z různých typů krevních buněk (makrofágy, monocyty, T a B lymfocyty) a z astrocytů, mikroglie a neuronů. Současné poznatky ukazují, že IL-6 je produkován v nervové tkáni nejen za patologických podmínek, ale hraje významnou roli jako fyziologický neuromodulátor, který je ovlivňován neuronální aktivitou a sám reguluje mozkové funkce. IL-6 posiluje dopaminergní a serotonergní neurotransmise a ovlivňuje růst a diferenciaci neuronů a astrocytů v centrálním nervovém systému [11, 12]. Nedávné objevy ukazují na roli cytokinů jako je TNF- α nejen na vznik zánětu, ale i neuropatické bolesti [13]. TNF- α je hlavním činitelem pro vznik hyperalgezie, jak pro modely bolesti, tak v klinické praxi. Zablokováním TNF rec-1 protilátky proti receptoru bylo u myši dosaženo signifikantního poklesu v termální hyperanalgezi a mechanické alodynii [14]. TNF- α spolu s interleukiny IL-1 beta, IL-6 přispívá k indukci a trvání neuropatické bolesti [15, 16]. Navíc se předpokládá vliv TNF na regeneraci nervů. Z tohoto hlediska se nám gen pro IL-6 a gen pro TNF- α jeví jako možné kandidátní geny pro ovlivnění variability vnímání bolesti.

Naše negativní výsledky si vysvětlujeme malým souborem pacientů a nutností studia interakce více polymorfismů jednotlivých kandidátních genů pro vnímání bolesti na větších souborech osob. Samostatný vliv jednoho polymorfismu na vnímání bolesti nejspíš nebude rozhodující, nutná bude interakce více polymorfismů.

Závěr

Ve studii jsme našli závislost vnímání akutní bolesti na věku. Z našich výsledků je patrné, že zkoumané polymorfismy genů pro IL-6 a TNF- α samostatně nehrají statisticky významnou roli ve vnímání akutní bolesti u jedinců naší populace.

1. Nancy, L., Costello, N. L., Bragdon, E. E., Light, K. C., Sigurdsson, A. et al. Temporomandibular disorder and optimism: relationships to ischemic pain sensitivity and interleukin-6. *Pain*, 2002, p. 99–110.
2. Burke, R., Watson, R. W. G. et al. Intervertebral discs which cause low back pain secrete high levels of proinflammatory mediators. *J. Bone Joint Surg. Br.*, 2002, p. 196–201.
3. Hajeer, A. H. et al. Influence of TNF alpha gene polymorphisms on TNF alpha production and disease. *Hum. Immunol.*, 2001, 62, 11, p. 1191–1199.
4. Chou, R. C. et al. Adrenergic regulation of macrophage-derived tumor necrosis factor-alpha generation during a chronic polyarthritis pain model. *J. Neuroimmunol.*, 1998, 82, 2, p. 140–148.
5. Schafers, M. et al. Cyclooxygenase inhibition in nerve-injury- and TNF-induced hyperalgesia in the rat. *Exp. Neurol.*, 2004, 185, 1, p. 160–168.
6. Hayley, S. et al. Sensitization to the neuroendocrine, central monoamine and behavioural effects of murine tumor necrosis factor-alpha: peripheral and central mechanisms. *Eur. J. Neurosci.*, 2002, 15, 6, p. 1061–1076.
7. Hayley, S. et al. Murine tumor necrosis factor-alpha sensitizes plasma corticosterone activity and the manifestation of shock: modulation by histamine. *J. Neuroimmunol.*, 2002, 131, 1–2, p. 60–69.
8. McGuire, S. O. et al. Tumor necrosis factor alpha is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons. *Exp. Neurol.*, 2001, 169, 2, p. 219–230.
9. Jarskog, L. F. et al. Cytokine regulation of embryonic rat dopamine and serotonin neuronal survival in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 1997, 15, 6, p. 711–716.
10. Gilmore, J. H. et al. Exposure to infection and brain development: cytokines in the pathogenesis of schizophrenia. *Schizophr. Res.*, 1997, 24, 3, p. 365–367.
11. Kroeger, K. M. et al. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol. Immunol.*, 1997, 34, 5, p. 391–399.
12. Li, J. et al. Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 24, p. 17325–17333.
13. DeLeo, J. A. Transgenic expression of TNF by astrocytes increases mechanical allodynia in a mouse neuropathy model. *NeuroReport*, 2000; 11, p. 599–602.
14. Lindenlaub, T. Effects of neutralizing antibodies to TNF-alpha on pain-related behavior and nerve regeneration in mice with chronic constriction injury. *Brain Research*, 2000, 866, p. 15–22.
15. Sommer, C. Neutralizing antibodies to interleukin 1-receptor reduce pain associated behavior in mice with experimental neuropathy. *Neurosci. Lett.*, 1999; 23, p. 25–28.
16. Wagner, R. Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF-alpha expression. *Pain*, 1998; 74, p. 35–42.

Tato práce byla podporována grantem IGA MZ ČR č. NM 7146-3/2002.

Došlo 17. 1. 2005.

Přijato 7. 5. 2005.

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Olga Hrazdilová
LF MU, ARK FN u sv. Anny
Pekařská 53
656 91 Brno
e-mail: ohrazdil@yahoo.fr