

**Jednodňová konferencia
Slovenskej imunologickej spoločnosti
a
Neuroimunologického ústavu
Slovenskej akadémie vied**

BIOLOGICKÁ LIEČBA V TEÓRII A PRAXI



Bratislava, Dúbravská cesta 9
4. september 2014



Organizátori

Slovenská imunologická spoločnosť – Slovenská akadémia vied
Neuroimunologický ústav – Slovenská akadémia vied

Prezident konferencie

Novák Michal Neuroimunologický ústav – Slovenská akadémia vied

Vedecký a organizačný výbor konferencie

Buc Milan	Imunologický ústav LFUK, Bratislava
Hrubiško Martin	OKIA OÚSA a ÚLM SZU & OÚSA, Bratislava
Čižnár Peter	I. detská klinika LFUK, Bratislava
Filipčík Peter	NIU-SAV, Bratislava

Adresa sekretariátu

Daniela Stiel Podmajerská
Neuroimunologický Ústav – Slovenská akadémia vied
Dúbravská cesta 9, Bratislava
Tel: 0254788100
Fax: 0254774276
Email: daniela.podmajerska@savba.sk



PROGRAM

8:00 – 8:05 Úvodné slovo
prof. MVDr. M. Novák, DrSc., Dr.h.c., predseda SIMS a riaditeľ NIU SAV

8:10 – 8:50 **NEUROIMUNOLÓGIA**
Koordinátor: prof. MVDr. M. Novák, DrSc., Dr.h.c.

Novák M (*NIU SAV Bratislava*). Biologická liečba Alzheimerovej choroby: aktuálny stav a budúce trendy

Kováčech B (*NIU SAV Bratislava*). Identifikácia cieľov pre biologickú terapiu Alzheimerovej choroby – patologické formy neuronálneho proteínu tau

8:55 – 10:55 **REUMATOLÓGIA**
Koordinátor: prof. MUDr. J. Rovenský, DrSc.

Rovenský J, Buc M, Kriška M (*NURCH Piešťany, LFUK Bratislava*): Biologické preparáty v reumatológii. História a súčasnosť

Lukáč J (*NURCH Piešťany*): Biologická liečba pri reumatoidnej artritíde

Žlnay M, Žlnay D (*NURCH Piešťany*): Biologická liečba pri ankylozujúcej spondylitíde

Košková E (*NURCH Piešťany*): Význam biologickej liečby pri juvenilnej idiopatickej artritíde

10:55 – 11:15 *Prestávka*

11.15 – 12:15 **ALERGOLÓGIA**
Koordinátor: Doc. MUDr. M. Hrubíško, PhD.

Hrubíško M (*Imunologická ambulancia, Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava*): Anti-IgE liečba respiračných chorôb

Hochmuth L (*Alergologická ambulancia, NsP Banská Bystrica*): Anti-IgE u nerespiračných chorôb

Záňová E (*NURCH Piešťany*): Nežiaduce prejavy biologickej liečby

12:20 – 13:20 NEUROLÓGIA

Koordinátor: prof. MUDr. M. Buc, DrSc.

Lisý Ľ (*Neurologická klinika SZU UN Bratislava*): Genetika a epigenetika *sclerosis multiplex* a smerovanie novej terapie

Buc M (*Imunologický ústav LFUK, Bratislava*): Imunopatogenéza *sclerosis multiplex* a jej odraz v biologickej liečbe

Klímová E, Smiešková A, Daňová M (*1. Klinika neurológie FZO PU a FNŠP J. A. Reimana a SM centrum, Prešov*): Naše skúsenosti s liečbou *sclerosis multiplex* imunomodulátormi druhej línie

13:20 – 14:15 Obed

14:15 – 15:15 AUTOZÁPALOVÉ CHOROBY

Koordinátor: Doc. MUDr. P. Čižnár, PhD.

Čižnár P (*I. detská klinika LFUK, Bratislava*): Klinické a laboratórne aspekty periodických horúčok

Dallos T (*II. detská klinika LFUK, Bratislava*): Monogénové autoinflamačné syndrómy

Vargová V (*Klinika detí a dorastu LF UPJŠ Košice*): Terapia syndrómov asociovaných s poruchou kryopyrínu

15:20 – 16:20 DERMATOLÓGIA

Koordinátor: Doc. MUDr. M. Hrubíško, PhD.

Šimaljaková M (*Dermatovenerologická fakulta LFUK a UN*): Možnosti biológii v dermatológii – perspektívne oblasti využitia

Kozub P (*Dermatovenerologická fakulta LFUK a UN, Bratislava*): Biologická liečba psoriázy

Raffayová H (*NURCH Piešťany*): Biologická liečba pri psoriatickej artritíde

16:25 – 17:25 ONKOLÓGIA A GASTROENTEROLÓGIA

Koordinátor: Doc. MUDr. M. Hrubíško, PhD.

Špánik S (*Interná onkologická klinika OÚSA*): Biologiká v onkológii – súčasnosť a budúcnosť

Sanisló L (*Onkologický ústav sv. Alžbety*): Imunorezistencia nádorov vo vzťahu k biologickej liečbe

Zelinková-Detková Z (*V. interná klinika Ružinov, FNŠP Bratislava*): Patofyziológia faktoru nekrotizujúceho nádory (TNF) a následky jeho blokády

17:30

Záver konferencie (prof. MVDr. M. Novák, DrSc., Dr.h.c.)

**ABSTRAKTY
PREDNÁŠOK**

NEUROIMUNOLÓGIA

BIOLOGICKÁ LIEČBA ALZHEIMEROVEJ CHOROBY: AKTUÁLNY STAV A BUDÚCE TRENDY

Michal Novák, Eva Kontseková, Branislav Kováčech
Neuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied, Bratislava

Alzheimerova choroba patrí medzi najčastejšie neurodegenerácie postihujúce ľudí v pokročilom veku. Klinicky je charakterizovaná poruchami pamäte a úpadkom kognitívnych funkcií vedúcich k demencii. Hlavnými histopatologickými znakmi sú neurofibrilárne kľbká a senilné plaky. Podstatnú zložku neurofibrilárnych kľbiek tvorí patologicky modifikovaný tau proteín, senilné plaky pozostávajú z amyloidu beta. Hoci prvý prípad bol opísaný Aloisom Alzheimerom už v roku 1907, väčší pokrok v klinickej aj v molekulárno-biologickej oblasti výskumu bol zaznamenaný až posledných 20 rokov. Aj napriek intenzívnemu výskumu doposiaľ nebol nájdený žiaden účinný liek, ktorý by zastavil alebo aspoň spomalil priebeh ochorenia. V súčasnosti sú veľké nádeje vkladané do rôznych imunoterapeutických prístupov či už pasívnej alebo aktívnej imunoterapie. Keďže kľúčovú úlohu v patogenéze ochorenia zohráva patologicky modifikovaný tau proteín, perspektívnym prístupom v boji s týmto ochorením je vývoj imunoterapie namierenej na patologické formy tau proteínu.

**IDENTIFIKÁCIA CIEĽOV PRE BIOLOGICKÚ TERAPIU ALZHEIMEROVEJ CHOROBY
– PATOLOGICKÉ FORMY NEURONÁLNEHO PROTEÍNU TAU**

Branislav Kováčech, Peter Baráth, Eva Kontseková, Michal Novák
Neuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied, Bratislava

V snahe poznať príčiny a mechanizmus neurofibrilárnej patológie v neurodegeneračných ochoreniach akými sú Alzheimerova choroba, frontotemporálna demencia, Pickova choroba, kortikobazálna degenerácia, progresívna supranukleárna obrna a iné tauopátie sa principiálna časť súčasného výskumu týchto ochorení orientuje na identifikáciu patologických foriem proteínov spôsobujúcich alebo podporujúcich postup patológie (Zilka et al., 2009a). Spoločným menovateľom tauopátií je výskyt abnormálnych foriem proteínu tau v mozgu pacientov. Tieto formy vytvárajú nerozpustné, striebrom farbiteľné agregáty, ktorých časo-priestorový výskyt koreluje s odumieraním neurónov a postupným kognitívnym úpadkom pacientov. Doterajší výskum ukazuje, že niektoré z týchto abnormálnych foriem tau proteínu majú toxické vlastnosti a priamo spôsobujú dysfunkciu neurónov. Experimenty s regulovateľnou expresiou transgénnych mutovaných tau proteínov vo zvieracích modeloch ľudských neurodegenerácií naznačili, že odstránenie abnormálnych a toxických tau proteínov zastaví postup ochorenia a umožní regeneráciu neuronálnych funkcií. Identifikácia týchto kľúčových toxických foriem tau proteínov v tauopátiách je preto prvým krokom na vytvorenie úspešnej terapie.

REUMATOLÓGIA

BIOLOGICKÉ PREPARÁTY V REUMATOLÓGII – HISTÓRIA A SÚČASNOSŤ

Rovenský J¹, Buc M², Kriška M¹

¹Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany

²LF UK Bratislava

V štúdiu uvádzame históriu a súčasnosť biologických preparátov využívaných hlavne v reumatológii. Z nového vývoja biologických liekov zo skupiny zápalových reumatických chorôb profituje hlavne reumatoidná artritída (RA). Z biologických liekov používaných v terapii RA sa z historického hľadiska používajú najdlhšie lieky, ktoré neutralizujú TNF (faktor nekrotizujúci nádory).

Poukazujeme na štruktúru biologických liekov a na možný manažment RA liekmi modifikujúcimi priebeh choroby (od konvenčných cez biologické lieky – originálne, alebo biosimilars). V stručnosti poukazujeme aj na terapeutické prístupy v liečbe RA.

BIOLOGICKÁ LIEČBA PRI REUMATOIDNEJ ARTRITÍDE

Lukáč J, Lukáčová O

Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany

Reumatoidná artritída (RA) je chronické autoimunitná zápalová reumatické choroba. Liečba konvenčnými antireumatikami modifikujúcimi chorobu (DMARDs) je účinná iba u časti pacientov s RA a často nevedie k zastaveniu progresie a dosiahnutiu nízkej aktivity choroby. Až zavedenie biologických liekov do klinickej praxe bolo skutočným prelomom v liečbe RA.

Biologický liek (biofarmaceutikum) je liek vyrobený jednou alebo viacerými biotechnologickými metódami. Vývoj biologickej liečby (BL) umožnili nové poznatky o patogenéze RA. Biologická liečba RA je cieleňá liečba, je zameraná na konkrétne ciele v patogenetickom procese pri RA. Sú ním cytokíny a bunky imunitného systému, ktoré sa uplatňujú v patogenéze RA.

Biologická liečba je účinná u viac ako 60 % pacientov, u ktorých štandardná liečba DMARDs nebola dostatočne účinná. Jej účinok nastupuje u väčšiny liekov do jedného mesiaca. Biologická liečba zastavuje a spomaľuje röntgenologickú progresiu choroby a až u tretiny chorých navodzuje remisiu choroby.

VÝZNAM BIOLOGICKEJ LIEČBY PRI JUVENILNEJ IDOPATICKEJ ARTRITÍDE

Košková E

Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany

Vznik pediatrickej reumatológie ako samostatného odboru v priebehu ostatných 20 rokov umožnil obrovský nárast nových poznatkov, ktoré významne ovplyvnili prognózu juvenilnej idiopatickej artritídy (JIA). K najdôležitejším míľnikom patrili konsenzus expertov Európy a USA na jednotnom názve JIA, vytvorenie klasifikačných kritérií v r. 1994, ktoré sa opakovane revidujú. Pre hodnotenie klinickej odpovede na liečbu bola v r. 1997 urobená štandardizácia ukazovateľov známych ako „core set“ a v r. 2004 sa definovala klinická remisia a inaktivita choroby. Napokon zavedenie biologickej liečby predstavuje revolúciu, ktorá zásadne ovplyvnila priebeh a prognózu JIA.

Autorka prezentuje 9-ročné skúsenosti liečby 63 pacientov s JIA vo veku do 18 rokov s polyartikulárnym postihnutím s etanerceptom (ETA), resp. adalimumabom (ADA). Remisia choroby sa dosiahla u 32 pacientov (51 %). Neúčinná anti-TNF liečba bola u 7 pacientov (11 %) a pre závažné vedľajšie účinky sme liečbu ukončili u 5 pacientov (8 %). Významným prínosom biologickej liečby je výrazné zrýchlenie rastu, ktoré je najväčšie po prvom roku liečby a kontinuálne pokračuje. Sledovanie bezpečnosti liečby z dlhodobého hľadiska zostáva stále v centre pozornosti klinikov. Cenným zdrojom informácií sú národné registre pacientov.

BIOLOGICKÁ LIEČBA PRI ANKYLOZUJÚCEJ SPONDYLITÍDE

Žlnay M, Žlnay D

Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany

Biologická liečba priniesla pre pacientov s ankylozujúcou spondylitídou (AS) nové perspektívy s víziou lepšej kvality ich života a súčasne pomohla bližšie pochopiť hlboké patogenetické procesy u tohto závažného reumatického ochorenia. V súčasnej dobe sa v liečbe AS uplatňujú inhibítory faktora nekrotizujúceho tumory (TNF), ktoré priaznivo ovplyvňujú axiálne, periférne i entezopatické prejavy základnej choroby. Biologická liečba je indikovaná u pacientov s AS, u ktorých zlyhala konvenčná liečba s nesteroidovými antiflogistikami (NSA), v prípade periférnej formy ochorenia aj sulfasalazinom, a pretrváva u nich vysoká zápalová aktivita. Autori sa v článku zaoberajú postavením TNF-inhibítorov v liečbe AS, ako aj pri jej včasných formách, tzv. non-rádiografickej axiálnej spondyloartritíde. Súčasnne poukazujú aj na ďalšie rysujúce sa možnosti biologickej liečby, ktoré by v budúcnosti mohli poslúžiť ako alternatíva k anti-TNF terapii, najmä u pacientov s nedostatočnou odpoveďou na TNF-inhibítory.

ALERGOLÓGIA

ANTI-IGE LIEČBA CHRONICKÝCH RESPIRAČNÝCH CHORÔB

Hrubiško M

OKIA OÚSA a ÚLM SZU & OÚSA, Bratislava

V predkladanom prehľade sa zameriame na choroby, ktoré sa radia medzi tzv. respiračné alergózy – priedušková astma, alergická rinokonjunktivitída a rinosinusitída s polypmi alebo bez tvorby polypov a možnosti ich ovplyvnenia anti-IgE liečbou. Vrodená dispozícia k nadmernej tvorbe špecifických IgE protilátok (šIgE) voči bežným antigénom prostredia sa považuje za najväčší rizikový faktor pre vznik perzistujúcich alergických ochorení. Špecifické IgE-protilátky sprostredkujú včasnú hypersenzitívnu reakciu na antigénny podnet a je od nich závislá aj oneskorená fáza alergickej reakcie. Eliminácia IgE z cirkulácie a z efektorových buniek alergie pomocou anti-IgE protilátok sa preto ponúka ako cielená liečba alergických chorôb. Za týmto účelom sa vyvinuli humanizované neanafylaktogénne anti-IgE protilátky, pri ktorých sa na kostru ľudskej protilátky napoja špecifické fragmenty myšacej protilátky ktoré sa viažu na molekulu IgE v oblasti jej konštantnej Fc ϵ 3-domény. Takáto anti-IgE protilátka nespôsobuje degranuláciu mastocytov / bazofilov a má nasledovné charakteristiky: (1) viaže sa na väzbové miesto Fc-fragmentu, ktorým sa IgE spája s vysokoafinitným receptorom – takto viazaná IgE-molekula nemôže reagovať ani s vysoko- (Fc ϵ RI), ani s nízko- (Fc ϵ RII) afinitnými receptormi na efektorových bunkách; (2) vytvára s IgE-molekulami triméry alebo hexaméry, ktoré neviažu komplement; (3) vzniknuté komplexy anti-IgE – IgE sú malé a z tela sa odstraňujú interakciou s Fc γ -receptormi leukocytov, doštičiek a retikulo-endotelového systému; (4) tým, že sa významne zníži množstvo cirkulujúcich IgE molekúl, dochádza k disociácii IgE z Fc ϵ RI na bunkách a takto k ich ďalšiemu vychytávaniu; (5) postupnou elimináciou IgE z cirkulácie aj receptorov strácajú Fc ϵ RI svoj substrát, a tak dochádza k ich deexpresii a B lymfocyty pôvodne nesúce IgE receptory prestávajú IgE produkovať.

Prototypom IgE-sprostredkovanej choroby sú alergická astma a alergická rinokonjunktivitída. Ide o chorobné stavy pri ktorých štandardne vychádzajú pozitívne testy na detekciu šIgE protilátok (prick test, laboratórne testy na detekciu šIgE). Avšak najmä v dospelom veku sa u takmer polovice pacientov trpiacich prejavmi alergickej nádchy a alebo astmy nedarí IgE sprostredkovaný mechanizmus dokázať – testy na detekciu šIgE protilátok vychádzajú negatívne. Napriek tomu je ale hladina celkového IgE faktorom, ktorý s dobre koreluje s prevalenciou aj „nealergickej“ astmy. Štúdia ktorá sa zamerala na *post-mortem* analýzu vzoriek pľúc prípadov fatálnej astmy ukázala významne vyššie množstvo Fc ϵ RI pozitívnych buniek v *lamina propria* v porovnaní

so vzorkami z pľúc pacientov, ktorí zomreli na inú príčinu, resp. s bioptickými vzorkami od pacientov s ľahšou formou astmy.

S anti-IgE liečbou (prípravok omalizumab) sú v klinickej praxi 10 ročné skúsenosti a máme k dispozícii celý rad randomizovaných kontrolovaných štúdií ktorých výsledky sú priaznivé z hľadiska účinnosti aj bezpečnosti. Liečba omalizumabom redukuje symptómy a spotrebu steroidov u pacientov s chronickou alergickou astmou. Zlepšenie pľúcnych funkcií sa pozoruje iba u časti pacientov. Jednoznačný a univerzálny deskriptor určujúci pacienta respondera nejestvuje, odporúča sa vyhodnotiť všetky aspekty ochorenia: hladina celkového IgE nad 75 IU/ml, prick testy a alebo špecifické IgE, symptómy, používanie záchranej medikácie, pľúcne funkcie, návštevy pohotovosti a hospitalizácie. Čím častejšie a závažnejšie exacerbácie sú u pacienta v predchorobí, tým väčší efekt anti-IgE liečby môžeme očakávať. Na základe relevantných dôkazov z kontrolovaných štúdií sa anti-IgE liečbu stala štandardnou súčasťou liečby najťažších astmatikov. Zatiaľ platí aj požiadavka dokázaného kauzálneho inhalačného alergénu, ale v priebehu ostatných rokov sa omalizumab skúša aj u pacientov s nealergickou astmou, prvé štúdie ukázali povzbudivé výsledky, a tak možno sa v budúcnosti budú indikačné kritériá upravovať – dôkaz kauzálneho inhalačného „celoročného“ alergénu nebude podmienkou indikácie. Ak sa stav pacienta hodnotí ako jednoznačne zlepšený, je vhodné v liečbe pokračovať. Zatiaľ nevieme ako dlho, ukazuje sa však, že u mnohých pacientov pôjde o celoživotnú liečbu. Skúšajú sa aj ďalšie indikácie. Anti-IgE liečba potenciuje efekt alergénovej imunoterapie. Výsledky štúdií u pacientov s atopickou dermatitídou sú nejednoznačné, naopak výsledky štúdií u pacientov s chronickou spontánnou urtikáriou viedli k registrácii omalizumabu v tejto novej indikácii.

Až na ľahko zvýšené riziko anafylaxie sa liečba omalizumabom ani pri dlhodobom podávaní nespája s významnými nežiaducimi účinkami. Anafylaxia sa vyskytuje u 0,1 % liečených, urtikária po podaní injekcie v 1,2 %. Nezistil sa zvýšený výskyt parazitových či iných infekcií, ani onkologických chorôb.

ANTI-IgE U NERESPIRAČNÝCH CHORÔB

Hochmuth Luděk

Alergologická ambulancia, II. interná klinika, FNŠP v Banskej Bystrici

Biologická liečba alergických ochorení sprostredkovaných IgE mechanizmom znamenala dôležitý krok v riešení dovedy ťažko ovplyvniteľných stavov. V klinickej praxi sa používa anti-IgE monoklonálna protilátka omalizumab, ktorá je indikovaná pre liečbu ťažkej astmy spĺňajúcej určené kritériá. Dá sa očakávať využitie omalizumabu aj pri ďalších ochoreniach sprostredkovaných IgE mechanizmom. V súčasnosti prebieha vyše 100 klinických štúdií s omalizumabom, z toho viac ako 40 u ochorení iných

než astma. Najviac prác sa týka chronickej spontánnej urtikárie (CSU), ktorá je od roku 2013 schválená ako indikácia liečby omalizumabom. V súčasnosti sa upresňujú kritériá na výber pacientov pre túto liečbu a liečebná stratégia (dávka lieku, interval podávania, dĺžka liečby, kritériá hodnotenia efektivity a iné). Ďalšie indikácie pre liečbu omalizumabom zatiaľ nie sú schválené. Publikované informácie sa zakladajú na prebiehajúcich kontrolovaných klinických štúdiách, otvorených štúdiách a prezentovaných kazuistikách. V práci referujeme o jednotlivých oblastiach potenciálneho použitia omalizumabu. Aj keď respiračné ochorenia nie sú témou práce, pre úplnosť treba spomenúť použitie anti-IgE liečby pri sezónnej aj celoročnej nádche, pri sínusitíde, pri riešení nosových polypov. Osobitnú úlohu môže mať omalizumab pri zlepšení tolerancie a výsledku alergenej imunoterapie, obzvlášť pri rizikovejších postupoch. Pri dermatologických ochoreniach okrem urtikárie sa hľadá miesto omalizumabu pri atopickej dermatitíde – výsledky zatiaľ nie sú jednoznačné. Zatiaľ len kauzistické referencie sa týkajú mastocytózy, bulózneho pemfigoidu a angioedému. V súčasnosti dramaticky narastá prevalencia potravinových alergií a intolerancií. Vo väčšine prípadov je riešením len striktné vylúčenie daných potravín z jedálneho líčka. V prípade anafylaktického typu alergie nikdy nemožno vylúčiť riziko závažnej reakcie pri ich náhodnom požití. Práve tu sa veľa očakáva od anti-IgE liečby a existujú už viaceré práce so sľubnými výsledkami. Eozinofilové ochorenia gastrointestinálneho traktu patria medzi významne narastajúce ochorenia. Aj keď sa dosiahli sľubné klinické výsledky pri ich liečbe omalizumabom, histologické a endoskopické výsledky doteraz neboli jednoznačné. Stručne referujeme o ďalších ochoreniach s možnosťou liečby omalizumabom: očné prejavy alergie, idiopatická anafylaxia, hyper-IgE syndróm, Churg-Straussovej syndróm, alergia na latex, aspirínová (a iná lieková) precitlivosť.

LATENTNÁ TUBERKULÓZA – NEŽIADÚCI ÚČINOK BIOLOGICKEJ ANTI-TNF LIEČBY

Záňová E^{1,3}, Kozáková D¹, Rybár I^{1,3}, Solovič I², Rovenský J^{1,3}

¹Národný ústav reumatických chorôb Piešťany,

²Národný ústav tuberkulózy, pľúcnych chorôb a hrudníkovej chirurgie, Vyšné Hágy,

³Slovenská zdravotnícka univerzita, Katedra reumatológie, Bratislava

Inhibícia faktora nekrotizujúceho tumorya (TNF) cestou podania anti-TNF protilátky vedie k potláčaniu patologickeho zápalového procesu na viacerých úrovniach, a je preto v súčasnosti najefektívnejšou liečebnou modalitou niektorých reumatických ochorení. Na druhej strane TNF5 predstavuje dôležitú súčasť odpovede ľudského imunitného systému na infekciu. Preparáty inhibujúce TNF potláčajú imunitný systém a tým vplývajú na imunitnú nerovnováhu. Dlhodobá terapeutická inhibícia TNF sa spája s vyšším rizikom závažných infekčných komplikácií, predovšetkým s aktiváci-

ou chronickej latentnej tuberkulózy (LTBI) , sepsy, mykotických a iných oportúnnych infekcií. U niektorých pacientov v liečbe TNF-blokátormi sa môže rozvinúť nádorový proces, kongestívne srdcové zlyhanie, emyelinizácia a iné neurologické poruchy, pancytopéniu (infiximab, etanercept) a „lupus-like“ syndróm. Objavujú sa aj reakcie na aplikáciu podávanej liečby (injekcia, infúzia). Podľa klasifikácie nežiaducich účinkov vzplanutie LTBI prebieha ako imunodeficientná reakcia, typ γ . Má zväčša veľmi rýchlu progresiu, nemá tendenciu ku ohraničeniu infekčných ložísk, a preto rýchlo diseminuje v pľúcnom parenchýme a okolí. Je známe, že prevládajú mimoplúcne lokalizácie. Štandardná diagnostika sa stáva limitovanou. Pri reaktivácii LTBI u pacientov liečených anti-TNF liečbou prevažujú viac ako 50 % formy mimoplúcnej TBC (lymfatická uzlina, postihnutie komplexu pečene a slezina, urogenitálny trakt) a viac ako štvrtinu tvorí diseminovaná forma. V porovnaní, u „normálnej, imunokompetentnej“ populácie sa extrapulmonálna forma manifestuje v 15 % a diseminovaná forma menej ako 1 % prípadov.

NEUROLOGIA

IMUNOPATOGENÉZA A IMUNOTERAPIA SCLEROSIS MULTIPLEX

Buc Milan

Imunologický ústav Lekárskej fakulty UK, Bratislava

Sclerosis multiplex (SM) je autoimunitná choroba, pri ktorej dochádza k deštrukcii myelínových obalov v CNS, periférny nervový systém ostáva neporušený. **Príčina choroby**, podobne ako pri väčšine autoimunitných chorôb, nie je známa; predpokladá sa interakcia faktorov vonkajšieho prostredia s genetickou predispozíciou k chorobe. Zo spúšťačích faktorov sa obviňujú vírusy, ktoré mechanizmom molekulového mimikri indukujú rozvoj imunopatologických procesov. Vzťah medzi vírusmi a SM podporujú aj údaje, že vírusové infekcie často predchádzajú záchvaty choroby.

Genetická predispozícia k chorobe vyniká najmä v porovnaní konkordancie vývoja choroby u monozygónnych dvojčiat s dizygótnymi; pomer je 26,0 : 2,4 %. Riziko choroby súrodencov, vyjadrené indexom λ_s , je 15,0. Riziko vývoja SM je u príbuzných pacienta tiež vyššie ako medzi nepríbuznými. Z génov, ktoré sa spolupodieľajú na vývoji SM sú najznámejšie gény HLA-komplexu, konkrétne druhý najznámejší ancestrálny haplotyp HLA-DRB1*15:01, DRB5*01:01, DQB1*06:02, DQA1*01:02; vyskytuje sa až u 70 % pacientov v porovnaní s 20 % u zdravých. Naopak, ako protektívna sa ukazuje alela HLA-A*02:01. Z iných génov, ktoré sa dávajú do súvisu so SM, sa uvádzajú gény pre apolipoproteín E (APOe). APOe3 a APOe4 sa spájajú so stratou neurónov; APOe2 je znakom miernejšieho a APOe4 progresívnejšieho priebehu choroby u žien; tento genotyp sa spája aj s kognitívnymi poruchami u mužov. Napokon najnovšie sa uvádza spojenosť medzi vývojom SM a génovým polymorfizmom receptora pre IL-17.

Imunopatologický proces sa začína aktiváciou autoreaktívnych T-lymfocytov na periférii. Ide o pomocné T-lymfocyty, ktoré patria T_H1 -subpopulácii. Aktivované T_H1 -lymfocyty následne začnú produkovať cytokíny, z ktorých najdôležitejší pri SM je IFN- γ . Tento jednak aktivuje monocyty a jednak stimuluje endotelové bunky CNS, aby do svojich membrán začali vbudovávať adhezívne molekuly, najmä VCAM-1. Tieto interagujú s adhezívnymi molekulami v membránach T-lymfocytov, ktoré sa tam tiež objavujú počas ich aktivácie, čo umožňuje priľnutie T-lymfocytov na povrch cievy a ich následný prestup do mozgu, do perivaskulárneho priestoru, kde sa začnú odohrávať iniciálne imunopatologické procesy. Tu sa dostávajú do kontaktu s myeloidnými dendritovými bunkami (nie je jasné, či pochádzajú z krvného obehu, alebo sú súčasťou CNS), ktoré prostredníctvom svojich HLA-molekúl druhej triedy prezentujú peptidy pochádzajúce z myelínu, čím sa reaktivujú, začnú prenikať do parenchýmu a produkovať prozápalové cytokíny (najmä IFN- γ a TNF). Tieto následne stimulujú parenchýmo-

vé mikrogliové bunky, ktoré produkciou svojich cytokínov (IL-12, IL-23, osteopontín) a toxických mediátorov (reaktívne intermediálne produkty dusíka a kyslíka) poškodzujú myelín, z ktorého sa uvoľňujú ďalšie autoantigény a „*circulus vitiosus*“ pokračuje ďalej (myelín tvorí asi 40 % proteínov a 60 % lipidov). Na deštrukcii myelínu sa podieľajú aj cytotoxické T-lymfocyty svojim perforínovo-granzýmovým mechanizmom. Súčasne dochádza aj k aktivácii B-lymfocytov; týchto je v plaku spočiatku málo, ich relatívny počet sa zvyšuje až keď sa ložisko stáva chronickým. Aktivácia B-lymfocytov sa prejaví intracerebrálnou syntézou IgG, ktoré sú typicky oligoklonové.

Okrem MBP ako autoantigény ešte sú aj PLP (proteolipidový proteín), MOG (myelínový oligodendrocytový glykoproteín), MAG (*myelin-associated glycoprotein*), α B-kryštalín a iné. Na polarizácii imunitnej odpovede do T_H1 -typu sa podieľa aj nedostatočná syntéza neuropeptidu Y (NPY). Ide o peptid, ktorý inhibuje sekréciu IFN- γ a zvyšuje syntézu IL-4, čo naznačuje, že posúva rovnováhu medzi T_H1 - a T_H2 -lymfocytmi smerom k T_H2 -lymfocytom. Pri SM, v porovnaní so zdravými, sa v cerebrospinálnej tekutine NPY nachádza v znížených hladinách. T-lymfocyty od chorých s SM vo zvýšenej miere exprimujú CD26, čo je peptidáza, ktorá dokáže degradovať aj NPY, čím by v sa mikroprostredí, v ktorom sa autoimunitný proces odohráva, vytváral jeho nedostatok. Následná nedostatočná aktivácia receptorov (Y1) podporí vývoj T_H1 -imunitnej odpovede.

Nepriamym dôkazom toho, že SM je autoimunitná choroba, v ktoré primárnu úlohu hrajú T_H1 -lymfocyty, sú aj údaje, že SM-pacienti netrpia, alebo len málo, alergiou. Naopak, zvýšená aktivita T_H1 -lymfocytov má zrejme svoj odraz v pozorovaní, že SM-chorí len zriedka vyvinú malígny proces. Napokon sa pri SM dokázala aj znížená aktivita prirodzených regulačných T-lymfocytov a regulačných NKT-buniek, ktoré za fyziologických okolností produkciou svojich cytokínov imunitné procesy tlmia.

Laboratórna diagnóza SM sa zakladá na dôkaze oligoklonového IgG v cerebrospinálnej tekutine (CSF). Zjavuje sa tu už zavčasu a typicky pretrváva dlhú dobu. V CSF, aj v sére od chorých, možno dokázať aj špecifické protilátky. Chorí, ktorí sú séropozitívni pre protilátky anti-MOG a anti-MBP majú väčšiu pravdepodobnosť druhého relapsu – v priebehu 8 mesiacov, v porovnaní so 45 mesiacmi u chorých bez uvedených protilátok. Prítomnosť IgM anti-lipidových protilátok v CSF sa spája s progresívnejšou formou choroby. S vážnosťou choroby koreluje aj hladina TNF v cerebrospinálnej tekutine.

Liečba SM je neľahká. Z imunoterapeutických prostriedkov používame najmä IFN- β , glatiramér-acetát, monoklonové protilátky (mAb) proti $\alpha 4$ -integrínu (natalizumab). Skúšala sa aj liečba s humanizovanými mAb anti-CD52 (alemtuzumab). Napriek úspešnosti liečby (remisia sa dosiahla v dĺžke 18 mesiacov po jej skončení, sa neosvedčila, lebo až tretina liečených pacientov vyvinula protilátky proti receptoru pre TSH a následne klinické prejavy hypertyreoidizmu. Najnovšie sa do liečby SM zavádza fingolimod (FTY720). Je to antagonist receptoru pre sfingozín-1 fosfát, ktorý bráni migrácii aktivovaných T-lymfocytov z lymfatických uzlín do periférie (t.j. miesta, kde prebieha zápal).

NAŠE SKÚSENOSTI S LIEČBOU SCLEROSIS MULTIPLEX IMUNOMODULÁTORMI DRUHEJ LÍNIE

Eleonóra Klímová¹, Alena Smiešková², Monika Daňová³

¹Klinika neurológie FZO PU a FNSP J.A. Reimana v Prešove, ²AdLA, alergologicko-imunologické laboratórium s.r.o, ³ProMagnet s.r.o, pracovisko FNSP J.A. Reimana, Prešov

Úvod. Liečbu natalizumabom (NTZ) pacientov s relapsujúcou/remitujúcou *sclerosis multiplex* (RRSM) komplikuje prítomnosť protilátok proti JC-vírusu (anti-JCV antibodies = anti-JCVAb) a s ňou spájané riziko vzniku progresívnej multifokálnej leukoencefalopatie (PML), ktoré potenciálne stúpa v závislosti od trvania liečby NTZ a v praxi je častým dôvodom jej ukončenia. Po ukončení liečby NTZ sa pozorovali klinické a/alebo neuro-zobrazovacie dôkazy reaktivácie, dokonca „rebound“ choroby. Určitú alternatívu pre pokračovanie liečby ponúka fingolimod (FTY720). Zmene liečby predchádza „wash-out period“ (W-O-P); na jej trvanie ani presné časovanie neexistuje doteraz jednoznačný konsenzus, aj keď určitú možnosť načasovania zmeny liečby ponúka lekárom pravidelné monitorovanie indexu anti-JCVAb, ktorý stratifikuje anti-JCVAb+ pacientov medzi chorých s nižším, resp. vysokým rizikom pre vznik PML.

Naším cieľom bolo zhodnotiť u RRSM-pacientov liečených natalizumabom s pozitívnymi anti-JCV protilátkami klinický a MR priebeh W-O-P ako aj efekt následnej terapie FTY720.

Pacienti a metodika. Od 10/2011 do 07/2014 sme uvedenú zmenu liečby realizovali u 14 RRSM pacientov (4 muži a 10 žien). Ich priemerný vek bol 38 rokov (26 až 53), priemerné trvanie definitívnej SM bolo 10 rokov, priemerné EDSS v čase ukončenia liečby NTZ 2,3 (1,5 až 4,0). Všetci pacienti pred zahájením liečby NTZ užívali niektorý z imunomodulátorov prvej línie, v priemere 4,2 roka (1 – 8 rokov). Pacientov sme rozdelili do troch skupín na základe klinického priebehu choroby za posledný rok pred spustením terapie a následne sme v rámci týchto skupín zhodnotili priebeh W-O-P a efekt novej liečby. Priemerné trvanie W-O-P bolo 4,2 mesiaca (2 – 6 mesiacov).

Výsledky. Nekomplikovaný priebeh W-O-P, ktorá netrvala dlhšie ako 3 mesiace, mali len 7 chorí. U všetkých ostatných sme v jej priebehu, resp. do 6 týždňov po zahájení liečby FTY720, zaznamenali reaktiváciu SM či už klinickú alebo rádiologickú. U jednej pacientky ťažký „rebound“ SM po ukončení liečby NTZ viedol aj napriek odporúčaným terapeutickým postupom k jej trvalej imobilite.

Záver. Ukončenie liečby natalizumabom má svoje riziká, trvanie W-O-P by bolo dobré presne definovať. Dostupné správy z literatúry upozorňujú aj napriek zvýšeným rizikám infekcií a Ukončenie liečby natalizumabom má svoje riziká, trvanie W-O-P by bolo dobré presne definovať. Dostupné informácie z literatúry upozorňujú na vhodnosť skrátenia tohto obdobia (menej ako tri mesiace) a to aj napriek zvýšeným rizikám infekcií a PML. Praktické skúsenosti v našom malom súbore chorých tieto tendencie podporujú.

AUTOZÁPALOVÉ CHOROBY

KLINICKÉ A LABORATÓRNE ASPEKTY PERIODICKÝCH HORÚČOK

Čižnár Peter

I. detská klinika LF UK a DFNSP, Bratislava

Syndrómy periodických horúčok sú heterogénnou skupinou chorôb, podstatou ktorých je chronicky sa opakujúca aktivácia systémovej zápalovej odpovede. Najčastejším klinickým prejavom je vzostup telesnej teploty v pravidelných intervaloch, sprevádzaný ďalšími klinickými príznakmi a vzostupom ukazovateľov zápalovej aktivity v plazme. Časť syndrómov je dedičná, s monogénovo podmienenými poruchami, časť má pravdepodobne komplexný dedičný základ, alebo sú dôsledkom viacerých bližšie neidentifikovaných vonkajších faktorov. Geneticky identifikované poruchy zasahujú gény kódujúce proteíny nevyhnutné pre rozpoznávanie cudzích štruktúr, alebo gény regulujúce zápalovú odpoveď. Na rozdiel od autoimunitne podmienených zápalových chorôb postihujú klasické syndrómy periodických horúčok mechanizmy vrodenej imunity. Zvýšenú aktivitu vykazujú mediátory akým je interleukín 1 a celulárne komponenty ako sú neutrofil, monocyt a makrofág. Existuje viacero klasifikácií týchto syndrómov podľa toho, či vychádzajú z klinických príznakov, alebo patogenetických mechanizmov. Najznámejšie a najlepšie preskúmané monogénové choroby sú familiárna stredomorská horúčka (FMF), hyper-IgD syndróm (HIDS), periodické syndrómy asociované s kryopyrínom (CAPS) a periodický syndróm spojený s defektom receptora pre TNF (TRAPS). K najčastejším získaným chorobám patrí PFAPA syndróm, čo je skratka pre syndróm periodickej horúčky, faryngitídy, aftóznej stomatitídy a lymfadenopatie. Diagnostiku komplikuje predovšetkým zriedkavý výskyt, nešpecifické príznaky a len relatívne nedávna identifikácia patomechanizmov a genetických defektov. Mnohí pacienti ostávajú z týchto dôvodov nediagnostikovaní alebo nezariadení do špecifickej kategórie. Bez liečby sa u väčšiny pacientov vyvíjajú chronické orgánové zmeny postihujúce najmä oči, kĺby, kožu a serózne povrchy. Závažnou komplikáciou je vývoj sekundárnej amyloidózy, najmä jej renálnej formy. V liečbe sa využívajú nešpecifické protizápalové farmaká nesteroidného a steroidného pôvodu. S pribúdajúcimi poznatkami sa dosiahol v posledných rokoch pokrok pomocou biologík. Najsľubnejšie výsledky dosiahla anticytokínová liečba blokujúca interleukín 1, alebo jeho receptor v liečbe syndrómov CAPS. Táto liečba sa postupne začína využívať aj u ďalších porúch a v súčasnosti prebiehajú viaceré väčšie klinické štúdie.

MONOGÉNOVÉ AUTOINFLAMAČNÉ SYNDRÓMY

Dallos Tomáš

II. detská klinika LFUK a DFNSP, Bratislava

Autoinflamačné syndrómy predstavujú rýchlo sa rozrastajúcu skupinu zriedkavých porúch fylogeneticky najstarších mechanizmov imunity. Ich spontánna, nadmerná a neprimeraná aktivácia sa prejavuje recidivujúcimi epizódami stereotypného súboru príznakov, často, ale nie vždy s horúčkami. Etiologicky sa uplatňujú mutácie kľúčových mechanizmov prirodzenej imunity; inflamazómu (familiárna stredozemská horúčka FMF, periodické syndrómy asociované s kryopyrínom CAPS), pôsobenia faktora nekrotizujúceho nádory (periodický syndróm asociovaný s TNF-receptorom, TRAPS), metabolizmu izoprenoidov (deficit mevalonát-kinázy), pôsobenia interleukínu 1beta (DIRA), odpovede na ubikvitárne bakteriálne antigény (Blauov syndróm) či degradácie proteínov (proteasomopatie). Pri väčšine týchto porúch sa teda jedná o poruchy mechanizmov imunity, ktoré sú dnes vďaka bežne dostupným biologickým preparátom terapeuticky ovplyvniteľné. Účinnosť takejto liečby vysoko prevyšuje efekt dosiahnuteľný pri liečbe komplexných porúch získanej imunity – autoimunitných chorôb a navyše predchádza rozvoju najobávanejšej komplikácie – systémovej amyloidózy. Aj napriek zriedkavosti jednotlivých syndrómov je preto dôležité, aby sa zvyšovalo povedomie odbornej verejnosti o týchto ochoreniach. V našej prezentácii ponúkame stručný prehľad celého spektra monogénových autoinflamačných syndrómov s dôrazom na tie, ktoré si v klinickej praxi na Slovensku najviac relevantné.

DERMATOLÓGIA

MOŽNOSTI BIOLOGÍK V DERMATOLÓGII – PERSPEKTÍVNE OBLASTI VYUŽITIA

Šimaljaková Mária

Dermatovenerologická klinika LFUK a UN Bratislava

Biologiká znamenajú veľký pokrok v liečbe zápalových chorôb. V dermatológii sú najväčšie skúsenosti s biologickou liečbou psoriázy. Nové poznatky o imunopatogenéze kožných chorôb vedú k terapeutickému „off label“ využitiu dostupných biologík, ale aj k vývoju nových prípravkov. Biologická liečba sa uplatňuje v súčasnosti najmä u tých pacientov, ktorí netolerujú štandardnú systémovú liečbu alebo u ktorých táto zlyhala. K diagnózam, u ktorých sa uplatnila biologická liečba patrí napr. chronická spontánna urtikária, bulózne dermatózy, *hidradenitis suppurativa*, malígne nádory kože a iné.

Chronickú spontánnu urtikáriu charakterizuje výsev urtík a angioedém bez známych vonkajších stimulov. Z biologickej liečby sa uplatňuje omalizumab, rekombinantná monoklonová protilátka (mAb) blokujúca väzbu IgE na FcεRI-receptor s následným poklesom produkcie zápalových cytokínov.

Bulózne dermatózy sú závažné autoimunitné mukokutánne choroby. V patogenéze *pemphigus vulgaris* sa uplatňujú cirkulujúce IgG autoprotiľátky proti dezogleínu 1 a 3. V liečbe sa overuje účinok rituximabu, chimérovej IgG1 mAb proti CD20 proteínu exprimovanému na povrchu B-lymfocytov.

Hidradenitis suppurativa (HS) je autoimunitná zápalová choroba vznikajúca na podklade dysregulácie vrodenej imunity. V liečbe sa indikujú rôzne protizápalové a imunomodulačné prípravky. Z biologík je to anakinra, antagonist IL-1 receptora a canakinumab, humánna mAb proti IL-1β. Zvýšené hladiny p19 IL-23 mRNA pri HS, poukazujú na vhodnosť liečby ustekinumabom, humánnou mAb proti p40-reťazcu IL-12 a IL-23. HuMab 10F8 je plne humánna mAb proti IL-8, ktorá blokuje aktiváciu a migráciu neutrofilov vo vysokej miere zastúpených v abscesoch HS.

Pyoderma gangrenosum je neutrofilná dermatóza charakterizovaná progresívne sa šíriacimi ulecaráciami. V polovici prípadov je asociovaná so zápalovým postihnutím čriev. V terapii sa uplatňujú anti-TNF preparáty.

Malígnym melanómom patrí medzi najzhubnejšie nádory. Z biologickej liečby sa podáva humánna mAb proti CTLA-4, ipilimumab. V klinickom skúšaní je aj tremelimumab, druhá mAb anti-CTLA-4.

Vemurafenib, selektívny inhibítor onkogénneho V600E-mutantného BRAF, je indikovaný na liečbu neresekovateľného alebo metastazujúceho melanómu. Dabrafenib je

ďalším selektívnym BRAF-inhibítorom. Perspektívnym biologikom na liečbu malígneho melanómu je trametinib a torafenib, multikinázový inhibítor, so širokým antineoplastickým efektom.

Pityriasis rubra pilaris je chronická idopatická, zápalová, papuloskvamózna dermatóza s nejasnou etiopatogenézou. Zvýšené hladiny TNF v leziovnej koži podporili myšlienku liečby anti-TNF biologikami.

Patofyziológia atopickej dermatitídy (AD) zahŕňa dysreguláciu imunitného systému a poruchu epidermálnej bariéry. Pri AD je zvýšená produkcia Th2 cytokínov, IL-4, IL-5 a IL-13 a klesá syntéza INF-gama, výsledkom čoho je, že hladina IgE sa zvyšuje. V liečbe sa čiastočne uplatnil alefacept, LFA-3/IgG1 fúzny proteín, rituximab, chimerová mAb mAb proti CD20 a omalizumab, mAb proti IgE. Ďalším biologikom v liečbe AD je mepolizumab, humanizovaná anti-IL-5 mAb, ktorá blokuje aktivitu IL-5 voči eozinofilom.

O biologickej liečbe sa uvažuje aj pri ložiskovej alopecii, sarkoidóze, nemelanomových nádoroch kože, vaskulitídach a ďalších autoimunitných dermatózach.

Biologická liečba nie je rovnako účinná u každého pacienta ani pri každej diagnóze. Príčin je viac. Dôležitú úlohu majú cytokíny. V patogenéze choroby sa nejedná o dysreguláciu a následné ovplyvnenie len jedného cytokínu. Cytokíny sa môžu navzájom pôsobiť synergicky alebo antagonisticky, pleiotropne a redundantne. V súčasnosti nie je preto možné pôsobiť len na jednu zložku bez ovplyvnenia celého cytokínového systému.

BIOLOGICKÁ LIEČBA PSORIÁZY

Kozub Peter

Dermatovenerologická klinika LFUK a UN, Bratislava

Psoriáza je imunitne podmienená zápalová choroba postihujúca kožu a kĺby. Vyskytuje sa u geneticky predisponovaných jedincov vždy však po pôsobení provokačných faktorov medzi ktoré patria napríklad bakteriálne infekcie a stres. V liečbe sa dlho uplatňovali len lokálne externá a fototerapia. Neskôr sa k nim pridala systémová liečba (metotrexát, acitretín a cyklosporín A). Systémová liečba (okrem retinoidov) pôsobí prevažne imunosupresívne, je len morbostatická a v mnohých prípadoch musí byť pre vedľajšie účinky predčasne ukončená. Z dlhodobého hľadiska teda nie je bezpečná. Preto sa začala hľadať liečba, ktorá by bola bezpečnejšia, pôsobila systémovo a zasahovala by selektívne do jednotlivých krokov zápalovej reakcie organizmu, ktoré sú pre patogenézu psoriázy najdôležitejšie. A práve tieto kritéria spĺňa biologická liečba. Na Slovensku sú aktuálne dostupné dve skupiny preparátov. Prvou skupinou sú TNF-blokátory (infiximab, adalimumab, etanercept), ktoré blokujú kľúčový cytokín

v patogenéze psoriázy – TNF. Sú účinné nielen na kožnú formu psoriázy, ale aj na postihnutie kĺbov. Druhú (mladšiu) skupinu biologík tvoria blokátory p40-podjednotky spoločnej pre cytokíny IL-12 a IL-23. Patrí sem zatiaľ iba ustekinumab. Pôsobí selektívnejšie a špecifickejšie. Blokuje aktiváciu a proliferáciu Th1 a Th17 lymfocytov. Je veľmi dobre účinný na kožnú formu psoriázy a nedávno bol schválený aj na kĺbovú formu. Onedlho očakávame príchod prvého zástupcu novej skupiny biologík – blokátorov IL-17 a receptorov pre IL-17. Bude ním secukinumab (blokátor IL-17A), ktorého účinok je ešte špecifickejší ako účinok ustekinumabu. Podľa výsledkov klinických štúdií sa zdá, že bude mať veľmi rýchly nástup účinku a dlhodobú účinnosť. Vo vývoji sú však aj ďalšie molekuly ako blokátory IL-22 a IL-23.

Biologická liečba predstavuje modernú, dlhodobu účinnú a relatívne bezpečnú liečbu psoriázy. Vzhľadom na vysokú cenu podlieha schváleniu revíznemu lekárovi. Schválená je v prípade, ak pacient prešiel dostupnou systémovou liečbou (prípadne bol závažný dôvod, pre ktorý systémová liečba nemohla byť nasadená respektíve musela byť predčasne ukončená) a má dostatočný rozsah choroby (stredne ťažká a ťažká psoriáza). Biologická liečba je nielen účinná, ale významne zlepšuje kvalitu života pacientov a umožňuje ich opätovné zaradenie do pracovného aj spoločenského života.

BIOLOGICKÁ LIEČBA PSORIATICKEJ ARTRITÍDY

Raffayová H., Rovenský J., Máliš F.

Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany

Psoriáza a psoriatická artritída (PsA) sú zápalové systémové choroby, ktoré sa súčasne vyskytujú asi u 11 – 15 % pacientov. V ich patogenéze hrajú ústrednú úlohu zápalové procesy asociované s vrodenou a adaptívnou imunitnou odpoveďou.

PsA je klinicky heterogénne a prognosticky závažná choroba s dopadom na invaliditu a mortalitu, ktorej nepriaznivú prognózu možno zvrátiť správne zvolenou terapiou. Všetky prejavy choroby sa dajú priaznivo ovplyvniť biologickou liečbou. Od r. 2003 postupne pribúdali na Slovensku biologiká namierené proti TNF, ktorý je hlavným prozápalovým cytokínom pri PsA. Dnes máme k dispozícii 4 anti-TNF preparáty (infiximab, etanercept, adalimumab, golimumab) s porovnateľným účinkom. Patria k prvoliniovej biologickej liečbe, pričom v praxi sa nimi dosahuje efektívnosť približne u 60 % pacientov. Liečba môže zlyhať primárne a sekundárne, pričom za sekundárne zlyhávanie je zodpovedná tvorba neutralizujúcich protilátok. Tie majú vplyv na dĺžku zotrávania pacientov na terapii (tzv. adherenciu). Prípady zlyhávania jednej anti-TNF liečby sa riešia výmenou za iný anti-TNF prípravok, ale ordinácia ďalšieho preparátu býva spravidla menej efektívna a s kratším trvaním účinku. Alternatívou v liečbe pa-

cientov, u ktorých zlyhala anti-TNF liečba je cielenejšia biologická terapia ustekinumabom s odlišným mechanizmom účinku. Táto plne humánna monoklonová protilátka sa viaže na p40-podjednotku IL-12 a IL-23 a podľa výsledkov štúdií je efektívna na psoriázu aj PsA v monoterapii, alebo v kombinácii s metotrexátom.

Úskalím anti-TNF terapie bývajú okrem možného zlyhania aj sprievodné vedľajšie účinky (napr. TNF indukovaný systémový lupus erythematosus, lupus like syndróm, paradoxné psoriaziformné reakcie, sclerosis multiplex, rekurentné infekcie), ako aj algoritmus ich riešenia.

Model psoriázy a PsA zahŕňajúci interakcie signalizačných dráh Th1 a Th17, nám v blízkej budúcnosti pravdepodobne pomôže odhaliť ďalšie terapeutické ciele. Priaznivý vplyv na psoriázu aj PsA sa v štúdiách potvrdil v prípade anti-IL-17 preparátov (secukinumab, brodalumab, ixekizumab), ale aj ďalších nových molekúl kľúčových v patogenéze choroby (apremilast – orálny inhibítor fosfodiesterázy PDE4, tofacitinib inhibítor Janusovej kinázy 3).

Perspektívou v liečbe PsA je personalizovaná medicína založená na poznatkoch farmakogenomiky a farmakogenetiky. Ideálna je predstava včasnej, komplexnej a čoraz cielenejšej terapie, ktorú by nesprevádzali nežiadúce účinky.

ONKOLÓGIA A GASTROENTEROLÓGIA

BIOLOGIKÁ V ONKOLÓGII – SÚČASNOSŤ A BUDÚCNOSŤ

Špánik Stanislav

Interná – onkologická klinika, Onkologický ústav sv. Alžbety,
I. Onkologická klinika OÚSA a LFUK

Moderná biologická liečba znamená nesporný pokrok v liečbe onkologických pacientov. Samotný pojem biologická liečba je aj v onkologických kruhoch veľmi „široko“ interpretovaný. Môžeme sem zaradiť aj liečebné postupy, ktoré už veľa rokov využívajú rôzne „biologiká“, ako sú interferóny, interleukíny, nádorové vakcíny, imunomodulátory, rastové faktory (erytropoetín, „rastové faktory stimulujúce kolónie – colony stimulating factors“). Zároveň sem patria nové, ciele, „targetové“, biologiká ako sú monoklonové protilátky, inhibitory tyrozínkináz (TKIs – tzv. malé molekuly) a mnohé ďalšie látky, ktoré inhibujú prenos signálu v nádorovej bunke, v širšom zmysle aj nové „imunomodulátory“.

Pokroky v biológii nádorov a poznaní mechanizmov onkogenézy umožnili identifikovať viaceré molekulové ciele použiteľné v liečbe nádorových chorôb, ktoré sú využívané pri cielej (biologickej) terapii. Biologická liečba pôsobí priamo na špecifické molekuly v nádorovej bunke alebo na signálne dráhy, ktoré sú nevyhnutné pre rast a proliferáciu nádorov, čím sa dá očakávať vyšší účinok a nižšia toxicita. Tieto biologické ciele sa nachádzajú aj na zdravých bunkách, avšak ich expresia je v nádorových bunkách zvýraznená, alebo sa vyskytujú v mutovanej forme. Vzhľadom na rozdielnu expresiu cieľových molekúl u rôznych pacientov s tou istou diagnózou aj s tým istým histologickým typom nádoru, je molekulový dôkaz prítomnosti cieľovej štruktúry (biomarkera) nevyhnutnosťou. Predpokladom použitia biologickej liečby sú špecifické molekuly v nádorovej bunke či signálne dráhy dôležité v procese karcinogenézy. Nádorové bunky obsahujú početné genetické a epigenetické abnormality, Viaceré onkogény sú kódované proteínmi, ktoré predstavujú aberantné tyrozínkinázy, ktorých aktivované formy spôsobujú zvýšenú proliferáciu buniek, rast buniek, potenciáciu angiogenézy a metastázovania. Aktivácia génov, ktoré kódujú rastové faktory a proteínkinázy, somatickými mutáciami je jedným z významných mechanizmov tumorigenézy. Jej nemenej dôležitou súčasťou sú signálne dráhy, zodpovedné za prenos signálov do bunkového jadra, v ktorých často amplifikácia ligandu, amplifikácia receptora, mutácia alebo aktivácia kinázy vedú k proliferácii nádorových buniek a inhibícii apoptózy.

Zjednodušene môžeme biologiká rozdeliť na monoklonové protilátky (inhibitory receptorov pre epidermálne rastové faktory – EGFR, inhibitory angiogenézy, monoklonové protilátky proti povrchovým antigénom lymfocytov), inhibitory tyrozínkináz

a veľmi početnú skupinu iných molekúl (napr. proteázomové inhibítory, inhibítory signálových dráh, PARP inhibítory a mnohé iné).

Biologická liečba znamená nesporný pokrok v liečbe onkologických pacientov. Jej výhodou je predovšetkým predĺženie prežívania pacientov s onkologickou chorobou, pozastavenie progresie ochorenia. Napriek dosiahnutým výsledkom je jej podanie spojené stále s mnohými limitáciami či už z hľadiska efektivity alebo toxicity. Nezanebateľné sú mnohé zatiaľ nezodpovedané otázky ako je stanovenie optimálnej dávky, dĺžky podávania, možnosti kombinácie, riešenie toxicity, rezistencie a mnohé ďalšie. Aby sme aspoň niektoré z nich zodpovedali, je nevyhnutné stále lepšie poznať biológiu nádorov, využívať biomarkery, nádorovú genetiku a epigenetiku a z hľadiska nových liekov farmakogenomiku. Biologická liečba sa veľmi dynamicky vyvíja. Vyžaduje si nesmierne náklady, a preto sa logicky žiadajú aj relevantné výsledky.

**PREHLÁDNÉ
ČLÁNKY**

BIOLOGICKÁ LIEČBA ALZHEIMEROVEJ CHOROBY: AKTUÁLNY STAV A BUDÚCE TRENDY

Michal Novák, Eva Kontseková, Branislav Kováčech
Neuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied, Bratislava

Abstrakt

Alzheimerova choroba patrí medzi najčastejšie neurodegenerácie postihujúce ľudí v pokročilom veku. Klinicky je charakterizovaná poruchami pamäte a úpadkom kognitívnych funkcií vedúcich k demencii. Hlavnými histopatologickými znakmi sú neurofibrilárne kľbká a senilné plaky. Podstatnú zložku neurofibrilárnych kľbiek tvorí patologicky modifikovaný tau proteín, senilné plaky pozostávajú z amyloidu beta. Hoci prvý prípad bol opísaný Aloisom Alzheimerom už v roku 1907, väčší pokrok v klinickej aj v molekulárno-biologickej oblasti výskumu bol zaznamenaný až posledných 20 rokov. Aj napriek intenzívnemu výskumu doposiaľ nebol nájdený žiaden účinný liek, ktorý by zastavil alebo aspoň spomalil priebeh ochorenia. V súčasnosti sú veľké nádeje vkladané do rôznych imunoterapeutických prístupov či už pasívnej alebo aktívnej imunoterapie. Keďže kľúčovú úlohu v patogenéze ochorenia zohráva patologicky modifikovaný tau proteín, perspektívnym prístupom v boji s týmto ochorením je vývoj imunoterapie namierenej na patologické formy tau proteínu.

Hlavné histopatologické znaky Alzheimerovej choroby

Z histopatologického hľadiska je choroba charakterizovaná akumuláciou dvoch nerozpustných depozitov: extracelulárnych senilných plakov pozostávajúcich z beta amyloidu (A β) a intracelulárnych neurofibrilárnych kľbiek tvorených tau proteínom (Grundke-Iqbal a kol., 1986; Ihara a kol., 1986; Kosik a kol., 1986). Senilné plaky sú charakteristickým znakom Ach i fyziologických procesov starnutia mozgu. Medzi množstvom senilných plakov a kognitívnym úpadkom pacienta však nebola preukázaná korelácia. Senilné plaky bez neuritického komponentu sa často vyskytujú v normálne starnúcom mozgu. Diagnosticky sú významné až senilné plaky obsahujúce zvyšky nervových buniek, tzv. neuritické plaky, s hustým amyloidovým jadrom, distrofickými neuritmi, fibrilárnymi astrocytmi a aktivovanou mikrogliou (Mena a kol., 1991). Druhým histopatologickým znakom Ach sú neurofibrilárne kľbká nachádzajúce sa v telách neurónov a v medzibunkovom priestore. Množstvo a vývojový stupeň neurofibrilárnej patológie priamo koreluje s demenciou postihnutých jedincov (Davies, 1994). Už v roku 1963 Kidd ukázal, že neurofibrilárne kľbká získané z mozgu pacientov s Ach pozostávajú z hustého vláknitého materiálu neznámeho pôvodu. Podľa ultraštruktúry boli označené ako párové špirálové vlákna (PHF). Molekulová analýza ukázala, že jedinou zložkou PHF je patologicky modifikovaný tau proteín (Novák a kol., 1993, Novák, 1994).

Terapeutické ciele: amyloid versus tau

Skoro 30 rokov neurobiológovia vedia, že A β a tau tvoria abnormálne štruktúry, ktoré sa nachádzajú v mozgu pacientov s Ach. Predmetom intenzívnej diskusie vo vedeckých kruhoch sa stala otázka, ktorý z uvedených proteínov je príčinou degenerácie neurónov. Favoritom sa stal A β a to vďaka mutáciám v géne kódujúcom amyloidový prekursorový proteín, z ktorého štiepením vzniká A β . Zistilo sa, že mutácie v tomto géne spôsobujú niektoré vrodené formy Ach. Tak vznikla tzv. amyloidová hypotéza, ktorá ovládla výskum Ach na niekoľko rokov. Stúpenci tejto hypotézy v tej dobe nepochybovali o tom, že A β je ústrednou molekulou, ktorá spúšťa celý patologický proces (Schenk a kol., 1999; Shenk, 2004; Selkoe, 1991; Solomon, 2002; 2007). Tejto hypotéze boli podriadené aj terapeutické prístupy. Hlavným cieľom pri vývoji liekov na Ach sa stal A β , prípadne jeho agregované formy v podobe senilných plakov. Nedávne výskumy však ukázali, že medzi výskytom amyloidových senilných plakov a klinickým progresom ochorenia nie je žiadna korelácia (Josephs a kol., 2008). Amyloidové plaky nie sú spojené so stupňom atrofie mozgu. Navyše, výsledky klinických testov potvrdili tieto zistenia. Imunoterapia síce viedla k úbytku amyloidových senilných plakov u pacientov, neboli však u nich pozorované žiadne zlepšenia klinických symptómov (Holmes a kol., 2008). Množstvo klinických testov zameraných na A β ako cieľ terapie bolo práve z týchto dôvodov zrušených.

Minoritná skupina vedeckej komunity sa sústredila na tau proteín ako ústrednú molekulu v patogenéze Ach. Viaceré vedecké kolektívy identifikovali mutácie v géne pre tau proteín, ktoré sú príčinou pomerne zriedkavého neurodegeneračného ochorenia spojeného so stratou pamäte (Frontotemporal lobal degeneration, FTLD) a inými neurologickými deficitmi. Tento objav poukázal na dôležitý fakt, že patologické formy tau proteínu sú dostatočné na spustenie neurodegeneračného procesu (Marx, 2007). Navyše, agregácia patologických foriem tau do PHF a následná tvorba a akumulácia neurofibrilárnej patológie v mozgu postihnutého jedinca koreluje s progresiou ochorenia (Braak and Braak, 1991). Tieto a mnohé ďalšie výsledky vo výskume tau poukázali na jeho kľúčovú úlohu v patogenéze Ach a tým zdôraznili jeho použitie ako cieľ pre vývoj terapeutík novej generácie.

Terapia atakujúca tau kaskádu

Už niekoľko rokov je dominantnou snahou vedeckého výskumu pochopiť mechanizmus premeny rozpustného prirodzene neusporiadaného tau na nerozpustnú patologickú formu s vysoko organizovanou štruktúrou v PHF. Mnohé štúdie ukázali, že posttranslačné modifikácie ako skrátenie (Novák a kol., 1991; 1993; Novák 1994) a abnormálna hyperfosforylácia (Grundke-Iqbal, 1986), vedú k zmene konformácie tau na patologickú formu s možnými toxickými vlastnosťami. Skrátenie a fosforylácia sú považované za hlavné modifikácie zodpovedné za vznik vysoko organizovaných patologických štruktúr (Binder a kol., 2005). Podľa súčasnej teórie prvotným krokom v tau kaskáde vedúcej k formovaniu PHF je jeho patologické skrátenie (Novák a kol., 1991;

1993, Novák 1994). Teória bola overená v podmienkach *in vitro* aj *in vivo* (Žilka a kol., 2006). Patologicky skráteneý tau proteín *in vitro* abnormálne stimuluje polymerizáciu mikrotubulov, čo poukazuje na jeho toxickú funkciu. Navyše, expresia skráteneého tau proteínu *in vivo* vedie k vývoju kompletnej neurofibrilárnej patológie vrátane abnormálnej fosforylácie tau. Keďže uvedené abnormality tau (skráteneie, fosforylácia, agregácia) vedú k neuronálnej degenerácii, naznačujú aj možné terapeutické stratégie.

Prevenia agregácie tau je považovaná za jeden z atraktívnych terapeutických prístupov. Naznačuje to aj množstvo prác, ktoré sú venované inhibícií patologickej agregácie. Jeden z prvých, kto prišiel s touto myšlienkou bol Wischik, ktorý ukázal, že metylénová modrá je schopná inhibovať agregáciu tau (Wischik a kol., 1996). Nasledovalo niekoľko vedeckých skupín, ktoré identifikovali nové zlúčeniny s potenciálom inhibovať tvorbu agregátov, prípadne rozrušiť už vytvorené agregáty tau (Taniguchi a kol., 2005, Pickhard a kol., 2005, 2007). Aktívna imunizácia P301L myši s fosforylovaným peptidom tau redukovala agregované formy tau v mozgu a zlepšila kognitívne funkcie (Asuni a kol., 2007).

Abnormálna fosforylácia tau proteínu zohráva významnú úlohu v patogenéze Ach. Fosforylácia niektorých rezidií tau proteínu ovplyvňuje jeho schopnosť interakcie s mikrotubulmi (Liu a kol., 2007). Navyše, fosforylované formy tau sú schopné vzájomnej interakcie a polymerizácie do filamentových štruktúr. Predpokladá sa, že redukcia fosforylovaných foriem tau proteínu prostredníctvom aktivity kináz a fosfatáz by mohla spomaliť alebo zastaviť progresiu neurofibrilárnej degenerácie. Súčasný intenzívny výskum poukázal na niektoré kinázové inhibítory, ktoré boli schopné redukovať hyperfosforyláciu tau ako aj agregáciu v transgénnych modeloch (Noble a kol., 2005).

Súčasnée trendy v terapii Alzheimerovej choroby

Doposiaľ neexistuje liek, ktorým by bolo možné túto chorobu zastaviť alebo spomaliť. Dostupná je len symptomatická liečba, ktorá dočasne zníži kognitívny úpadok pacientov, ale nezastaví postup ochorenia (Liu a kol., 2008). V rámci symptomatickej terapie sa najčastejšie používajú inhibítory mozgových acetylcholinesteráz. Keďže pri Ach dochádza k degenerácii cholinergných neurónov, je táto liečba do istej miery účinná.

Budúcnosť terapie Ach však spočíva vo vývoji terapeutických prístupov, ktoré atakujú podstatu ochorenia. Imunoterapia ako terapeutický prístup má pri vývoji liekov novej generácie už dlhšiu dobu významné postavenie. Mnohé predklinické štúdie totiž ukázali, že pri liečbe Ach je možné použiť aktívnu a pasívnu imunoterapiu (Lemere, 2013). Hlavným imunoterapeutickým cieľom sa vďaka amyloidovej hypotéze stal A β . Nádejné výsledky predklinických štúdií viedli k vývoju celej palety aktívnych a pasívnych vakcín, ktoré sa nachádzajú v rôznych fázach klinických testov (Tab.1, 2). Prvá klinická skúška s aktívnou vakcínou AN1792 mala negatívny efekt na liečených pacientov, čo malo za následok jej zastavenie. Výsledky ďalších klinických testov ukázali, že aj napriek zníženiu amyloidových depozitov nedošlo k zlepšeniu zdravotného stavu pa-

cientov (Holmes a kol., 2008; Mullard, 2012; Lemere, 2013). Tento fakt nastolil otázku relevantnosti A β ako terapeutického cieľa.

Aj napriek nejednoznačným výsledkom z A β vakcín v klinických skúškach, terapeutický prístup v podobe imunoterapie predstavuje stále veľký potenciál. Imunoterapia zameraná na patológiu tau môže byť klinicky veľmi efektívna. Prítomnosť fibrilárnych foriem tau proteínu totiž priamo koreluje s kognitívnym úpadkom postihnutého jedinca a stupňom neurodegenerácie (Ghoshal a kol., 2002). Preto sa venuje veľká pozornosť vývoju imunoterapie zameranej na patologické formy tau proteínu (skrátene, hyperfosforylované agregované), ako potencionálne ciele pre efektívnu biologickú liečbu Ach (Lemere, 2013). Najčastejším cieľom tau imunoterapie sú fosforylované reziduá na tau proteíne (Asuni a kol., 2007; Boutajangout a kol., 2010; Troquier a kol., 2012; Richter a kol., 2013). Keďže niektoré fosforylované reziduá sa nachádzajú aj na zdravom tau proteíne, problémom ostáva bezpečnosť takto navrhovaných vakcín. Navyše, funkčný význam targetovaných fosforeziduí nie je známy. Ani jedna z týchto vakcín však nie je v klinickom testovaní.

Nedávno bola uvedená do prvej fázy klinického testovania aktívna vakcína zameraná na inhibíciu patologickej agregácie tau proteínu (Kontseková a kol., 2014). Na rozdiel od vyššie uvedených vakcín, je to prvá vakcína svojho druhu v klinických testoch atakujúca doménu na tau proteíne, ktorá je zodpovedná za patologickú agregáciu tau. Predklinické testy na transgénnych zvieratách ukázali, že vakcína je schopná indukovať vysoké hladiny protilátok. Vakcinácia výrazne redukovala nielen agregáciu tau a neurofibrilárnu patológiu, ale aj patologickú hyperfosforyláciu.

Tab. č.1

Pasívna imunoterapia v klinických skúškach zameraná na A β .

Názov	Mechanizmus účinku	Sponsor	Klinická fáza
Bapineuzumab (AAB-001)	Humanizovaná protilátka viažúca N-koncovú oblasť A β	Wyeth/ELAN	III
Solanezumab (LY2062430)	Humanizovaná protilátka viažúca strednú oblasť A β	Eli Lilly and Company	III
Ponezumab (PF04360365)	Humanizovaná protilátka (IgG2), ktorá viaže 33–40. aminokyselínu peptidu A β 1–40	Pfizer Inc.	II
Gantenerumab (R1450, RO4909832)	Monoklonálna protilátka ktorá viaže A β	Hoffmann-La Roche, Inc.	II
Gammagard, IVIG	Prirodzené anti-amyloidové protilátky (polyklonálne protilátky)	Baxter International Inc.	III
GSK933776	Monoklonálna protilátka ktorá viaže A β	GlaxoSmithKline	I
Crenezumab (MABT5102A)	Humanizovaná protilátka viažúca A β	Genentech	II/IIa/IIb
PF-05236812 (AAB-003)	Humanizovaná protilátka viažúca A β	Pfizer Inc.	I
BAN2401	Humanizovaná protilátka viažúca protofibrily A β	Eisai Co, Ltd.	I
Octagam (IVIG)	Prirodzené anti-amyloidové protilátky (polyklonálne protilátky)	Octapharma AG	II
Newgam (IVIG)	Prirodzené anti-amyloidové protilátky (polyklonálne protilátky)	Sutter Health	II

Tab. č.2

Aktívna imunoterapia v klinických skúškach zameraná na A β .

Názov	Mechanizmus účinku	Sponsor	Klinická fáza
ACC-001 (vanutide crdificar)	Peptid A β 1-7 naviazaný na vysokomolekulový nosič	JANSSEN Alzheimer Immunotherapy Research & Development, LLC.; Pfizer Inc.	II
AD02	Peptid (6 aminokyselín) mimikujúci časť natívnej N- terminálnej sekvencie A β	AFFIRIS AG	II
CAD106	Peptid A β 1-6 naviazaný na bakteriofág Q β	CAD106 Novartis, Inc.	II
V950	Multivalentná vakcína	Merck & Co.	II

Záver

Intenzívny základný a aplikovaný výskumu zameraný na A β a dve dekády trvajúce klinické skúšky neprinesli očakávaný výsledok v podobe úspešnej terapie Ach. Amyloidová hypotéza tak stále ostáva nepotvrdenou hypotézou. Naopak, ako nádejný terapeutický cieľ sa do popredia vedeckého záujmu dostáva tau proteín, ktorý zohráva kľúčovú úlohu v patogenéze Ach. Množstvo a distribúcia neurofibrilárnej patológie obsahujúcej patologické formy tau koreluje s progresom ochorenia. Je možné predpokladať, že imunoterapeutické prístupy atakujúce tau prinesú dlho očakávaný progres vo vývoji efektívnej liečby Ach.

Literatúra

- Asuni AA, Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM: Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J Neurosci* 2007, 27:9115-9129.
- Binder L.I., A.L. Guillozet-Bongaarts, F. Garcia-Sierra and R.W. Berry. 2005. Tau, tangles, and Alzheimer's disease, *Biochim Biophys Acta* 1739, 216–223.
- Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM: Immunotherapy targeting pathological tau prevents cognitive decline in a new tangle mouse model. *J Neurosci* 2010, 30:16559-16566.
- Braak H and Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239-259.
- Davies P. 1994. Strategies for the development of therapeutics for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 15 Supp 2: S53-54.
- Ghoshal, N., Garcia-Sierra, F., Wu, J., Leurgans, S., Bennett, D.A., Berry, R.W., And Binder, L.I. 2002. Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Experimental neurology* 177(2): 475-493.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., And Wisniewski, H.M. 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261(13): 6084-6089.

8. Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, Jones RW, Bullock R, Love S, Neal JW, Zotova E, Nicoll JA. 2008. Long-term effects of A beta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* 372:216–223.
9. Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R., And Ogawara, M. 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem (Tokyo)* 99(6): 1807-1810.
10. Josephs KA, Whitwell JL, Ahmed Z, et al. 2008. Beta-amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy. *Ann Neurol*, 63, (2), Feb., 204-12.)
11. Kidd M. 1963. Paired helical filaments in electron microscopy in Alzheimer's disease. *Nature* 197: 192-193.
12. Kontsekova, E., Zilka, N., Kovacech, B., Novak, P., Novak, M. 2014. First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau-tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer's disease model. *Alzheimer's Research & Therapy* 6:44
13. Kosik, K.S., Joachim, C.L., And Selkoe, D.J. 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(11): 4044-4048.
14. Lemere CA: Immunotherapy for Alzheimer's disease: hoops and hurdles. *Mol Neurodegener* 2013, 8:36.
15. Liu F, Li B, Tung E J., Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong, C x. 2007. Site specific effect of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation.
16. Liu, G., Men, P., Perry, G., And Smith, M.A. 2008. Nanoparticle and iron chelators as a potential novel Alzheimer therapy. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 610: 123-144).
17. Marx, J. 2007. A New Take on Tau. *Alzheimer's disease. Science.* 316,(5830), Jun 8, 1416-7).
18. Mena R, Wischik Cm, Novak M, Milstein , Cuello Ac. 1991. A Progressive deposition of paired helical filaments (PHF) in the brain characterizes the evolution of dementia in Alzheimer's disease. An immunocytochemical study with a monoclonal antibody against the PHF core. *J Neuropathol Exp Neurol* 50(4): 474-490
19. Mullard, A. 2012. Sting of Alzheimer's failures offset by upcoming prevention trials. *Nat Rev Drug Discov.* 11:657-660.
20. Noble, W., Planel, E., Zehr, C., Olm, V., Meyerson, J., Suleman, F., Gaynor, K., Wang, L, LaF-rancois, J., Feinstein, B., Burns, M., Krishnamurthy, P., Wen, Y., Bhat, R., Lewis, J., Dickson D. and K. Duff. 2005. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo, *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 6990–6995.
21. Novak M, Jakes R, Edwards PC, Milstein C, Wischik CM. 1991. Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5837-5841.
22. Novak M, Kabat J, Wischik CM. 1993. Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *EMBO J* 12(1): 365-370.
23. Novak M. 1994. Truncated tau protein as a new marker for Alzheimer's disease. *Acta virologica* 38: 173-189.
24. Pickhardt, M., Gazova, Z., von Bergen, M., Khlistunova, I., Wang, Y., Hascher, A., Mandelkow, E.M., Biernat J. and E. Mandelkow. 2005. Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments in vitro and in cells, *J Biol Chem* 280, 3628–3635.

25. Pickhardt, M., Larbig, G., Khlistunova, I., Coksezen, A., Meyer, B., Mandelkow, E.M, Schmidt, B. and E. Mandelkow. 2007. Phenylthiazolyl-hydrazide and its derivatives are potent inhibitors of tau aggregation and toxicity in vitro and in cells, *Biochemistry* 46, 10016–10023.
26. Richter M, Hoffmann R, Singer D: T-cell epitope-dependent immune response in inbred (C57BL/6J, SJL/J), and C3H/HeN) and transgenic P301S and Tg2576 mice. *J Pept Sci* 2013, 19:441-451.
27. Selkoe, D.J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487–498.
28. Schenk, D. (2004). Hopes remain for an Alzheimer's vaccine. *Nature* 431, 398.
29. Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., et al. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173–177.
30. Solomon, B. 2002. Immunological concept in the treatment of Alzheimer's disease, *Drug Dev Res* 56, 163–167.
31. Solomon, B. 2007. Clinical immunologic approaches for the treatment of Alzheimer's disease, *Expert Opin Investig Drugs* 16, 819–828.
32. Taniguchi, S., Suzuki, N., Masuda, M., Hisanaga, S., Iwatsubo, T., Goedert M. and M. Hasegawa. 2005. Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins, *J Biol Chem* 280, 7614–7623.
33. Troquier L, Caillierez R, Burnouf S, Fernandez-Gomez FJ, Grosjean ME, Zommer N, Sergeant N, Schraen-Maschke S, Blum D, Buee L: Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY1Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach. *Curr Alzheimer Res* 2012, 9:397-405.
34. Wischik, C.M., Edwards, P.C, Lai, R.Y., Roth M. and C.R. Harrington. 1996. Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines, *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11213–11218
35. Zilka, N., Filipcik, P. Koson, L. Fialova, R. Skrabana, M. Zilkova, G. Rolkova, E. Kontsekova, and M. Novak. 2006. Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Lett.* 580:3582-3588.

IDENTIFIKÁCIA CIEĽOV PRE BIOLOGICKÚ TERAPIU ALZHEIMEROVEJ CHOROBY – PATOLOGICKÉ FORMY NEURONÁLNEHO PROTEÍNU TAU

Branislav Kováčech, Peter Baráth, Eva Kontseková, Michal Novák
Neuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied, Bratislava

Abstrakt

V snahe poznať príčiny a mechanizmus neurofibrilárnej patológie v neurodegeneračných ochoreniach akými sú Alzheimerova choroba, frontotemporálna demencia, Pickova choroba, kortikobazálna degenerácia, progresívna supranukleárna obrna a iné tauopátie sa principiálna časť súčasného výskumu týchto ochorení orientuje na identifikáciu patologických foriem proteínov spôsobujúcich alebo podporujúcich postup patológie (Zilka et al., 2009a). Spoločným menovateľom tauopatií je výskyt abnormálnych foriem proteínu tau v mozgu pacientov. Tieto formy vytvárajú nerozpuštné, striebrom farbiteľné agregáty, ktorých časo-priestorový výskyt koreluje s odumieraním neurónov a postupným kognitívnym úpadkom pacientov. Doterajší výskum ukazuje, že niektoré z týchto abnormálnych foriem tau proteínu majú toxické vlastnosti a priamo spôsobujú dysfunkciu neurónov. Experimenty s regulovateľnou expresiou transgénnych mutovaných tau proteínov vo zvieracích modeloch ľudských neurodegenerácií naznačili, že odstránenie abnormálnych a toxických tau proteínov zastaví postup ochorenia a umožní regeneráciu neuronálnych funkcií.

Identifikácia týchto kľúčových toxických foriem tau proteínov v tauopatiách je preto prvým krokom na vytvorenie úspešnej terapie.

Alzheimerova choroba – dva možné ciele terapie

Alzheimerova choroba (DAT, demencia Alzheimerovho typu) je najčastejšie sa vyskytujúcou formou tauopátie v ľudskej populácii. Je to progresívne, nevyliciteľné neurodegeneračné ochorenie. Prvé príznaky poškodenia mozgu sa objavujú v entorhinálnom kortexe a hippocampe (Braak and Braak, 1991a). Hlavnými histopatologickými abnormálnymi znakmi ochorenia sú proteínové depozity v mozgu pacientov postihnutých DAT vo forme senilných plakov tvorených β -amyloidom (A β) a neurofibrilárnych klobiek tvorených abnormálne zvinutými formami tau proteínu.

Jediná súčasná liečba Alzheimerovej choroby je založená na aplikácii inhibítorov acetylcholinesterázy, ktoré poskytujú v určitej fáze ochorenia dočasné potlačenie symptómov (Shah and Reichman, 2006), avšak neovplyvňujú samotný patologický proces ochorenia. Bez účinných liekov a s neustále sa zvyšujúcim vekom ľudskej populácie počet pacientov rýchlo rastie. Viac ako 30 miliónov ľudí je postihnutých demenciou, ktorej prevažnú časť tvorí DAT (60-80%), a počet pacientov dosiahne 100

miliónov do roku 2050 (Prince et al., 2013). Preto je vývoj liekov na DAT strategicky nevyhnutnou úlohou výskumu pre najbližšie desaťročie.

Najnovšie experimenty naznačujú, že DAT by mohlo byť možné liečiť imunoterapiou (Lemere, 2013). Akumulácia senilných plakov v mozgu pacientov s DAT a objavenie mutácií v géne pre amyloidový prekursorový proteín (APP) spojených s familiálnou formou DAT viedli k „amyloidovej hypotéze“, ktorá považovala ukladanie A β (1-42) za kľúčový štartovací mechanizmus patológie ochorenia (Hardy and Higgins, 1992). Na základe tejto hypotézy bolo pripravených niekoľko desiatok klinických testov, zameraných na odstraňovanie A β z mozgu pacientov pomocou aktívnej a pasívnej imunizácie, inhibítorov agregácie A β a použitím inhibítorov β - a γ -sekretázy zodpovedných za vznik najtoxickejšieho fragmentu A β (1-42) (Corbett et al., 2012; Giacobini and Gold, 2013; Mangialasche et al., 2010a). Všetky klinické skúšky zamerané na reguláciu metabolizmu A β však doposiaľ zlyhali v tretej fáze, keďže nevykazovali pozitívny vplyv na úpadok kognitívnych funkcií pacientov (Lemere, 2013; Mangialasche et al., 2010b; Mullard, 2012).

Tau proteín a jeho abnormálne modifikácie spôsobujúce neurofibrilárnu patológiu

So zlyhajúcimi testami zameranými na A β sa výskum postupne začína orientovať na druhý patologický znak DAT – agregované abnormálne formy tau proteínu. Tieto agregované nerozpustné formy tau boli po prvý krát nájdené v mozgu zosnulých pacientov diagnostikovaných na demenciu Aloisom Alzheimerom na začiatku minulého storočia (Alzheimer, 1907; Alzheimer, 1911), podľa ktorého bolo toto ochorenie neskôr pomenované. Nerozpustné abnormálne tau proteíny tvoriace neurofibrilárnu patológiu veľmi dobre korelujú s neuronálnou dysfunkciou, odumieraním neurónov a postupom kognitívneho úpadku pacientov (Braak and Braak, 1991b; Duyckaerts, 2011; Nelson et al., 2012). Preto sa očakáva, že medzi týmito abnormálnymi tau proteínmi treba hľadať tie, ktoré majú toxické vlastnosti a priamo spôsobujú dysfunkciu neurónov. Identifikácia týchto kľúčových toxických foriem tau proteínov v DAT a iných tauopátiách je preto prvým krokom na prípravu úspešnej terapie.

Tau je hlavným s mikrotubulami asociovaným proteínom v neuronálnych bunkách, podieľajúci sa na výstavbe mikrotubulárnej siete a vnútrobunkovom transporte molekúl (Iqbal et al., 2005). Z fyzikálno-chemického hľadiska patrí tau do osobitej rodiny vysoko rozpustných, vnútorne neusporiadaných proteínov, ktoré v roztoku nemajú stabilnú 3-D štruktúru (Skrabana et al., 2006a). V patologických podmienkach DAT je časť molekúl tau proteínu intenzívne post-translačne modifikovaná, najmä zvýšením množstva fosfátových skupín na ňom naviazaných (hyperfosforylácia, až 45 možných fosforylačných miest) a proteolytickým štiepením (Iqbal and Grundke-Iqbal, 1991; Novak et al., 1991). Takto patologicky modifikovaný tau proteín stráca schopnosť viazať sa na mikrotubuly, jeho abnormálna konformácia mu umožňuje interagovať s inými tau proteínmi, oligomerizovať a agregovať do vláknitých štruktúr párových špirálo-

vých vlákien (PHF z angl. „paired helical filaments“) ako hlavnej zložky neurofibrilárnych klbiek (Alonso et al., 2001; Kovacech et al., 2010; Mandelkow and Mandelkow, 1998; Skrabana et al., 2006a; Skrabana et al., 2006b; Skrabana et al., 2006c; Zilka et al., 2006; Zilkova et al., 2011). Čo je však priamym induktorom tvorby PHF a neurofibrilárnej patológie a aký je molekulárny mechanizmus, nie je zatiaľ objasnené.

Keďže nie je možné jednoducho použiť izolované formy tau agregátov na imunizáciu pacientov, treba identifikovať kľúčové charakteristiky patologických tau proteínov a tie potom použiť na dizajn aktívnej vakcíny.

Niekoľko pilotných štúdií ukázalo, že imunoterapia môže byť jedným zo spôsobov redukcie tau patológie v myšiacích modeloch tauopátií (Asuni et al., 2007; Bi et al., 2011; Boimel et al., 2010; Boutajangout et al., 2010; Chai et al., 2011; Theunis et al., 2013; Troquier et al., 2012). Vo všetkých prípadoch cieľom terapie bol fosfo-epitop na ľudskom tau proteíne exprimovanom vo zvierati ako transgén. Hoci experimenty splnili cieľ a naznačili možnosti liečby, jednoduché fosfo-tau epitopy nemôžu byť použité pre liečbu u ľudí, pretože tau je fosforylovaný aj vo fyziologických podmienkach a takéto imunoterapeutiká by mohli vyvolať autoimúnnu reakciu. Z tohto dôvodu je výskum zameraný na vyhľadávanie špecifických štruktúr abnormálnych tau proteínov v DAT, ktoré by mohli byť použité v aktívnej alebo pasívnej imunoterapii.

Detailná štruktúra neurofibrilárneho klbka pri DAT bola študovaná v šesťdesiatich rokoch 20. storočia pomocou elektrónovej mikroskopie tkanivových rezov. Michael Kidd publikoval obrázky štruktúrnych podjednotiek neurofibrilárnych klbiek, ktoré sa javili ako dve navzájom stočené vlákna, ktoré pod vplyvom nedávnych objavov štruktúry DNA nazval „paired helical filaments“, PHF (Kidd, 1963). Ich molekulárna podstata však bola odhalená až po 20-tich rokoch. Imunologické štúdie ukázali, že tau proteín je jedným z proteínov prítomných v PHF a neurofibrilárnych klbkách (Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986; Nukina and Ihara, 1986). Až detailné biochemická analýzy PHF dokázali, že tieto útvary sú tvorené samotným proteínom tau (Novak et al., 1989; Wischik et al., 1988a; Wischik et al., 1988b). Tieto experimenty tiež ukázali, že tau proteín v PHF je nielen vysoko fosforylovaný ale zrejme aj fragmentovaný (Jakes et al., 1991; Novak et al., 1991; Novak et al., 1989; Wischik et al., 1988a; Wischik et al., 1988b).

Patologické štiepenie neuronálnych proteínov je spoločným menovateľom niekoľkých neurodegeneračných ochorení

V rôznych neurodegeneračných ochoreniach je abnormálne proteolytické štiepenie neuronálneho proteínu javom, ktorý hrá kľúčovú úlohu v procese neurodegenerácie. Tieto ochorenia sa líšia klinickým prejavom, nástupom, trvaním a náhlynosťou rôznych typov neurónov. Na druhej strane však zdieľajú niekoľko spoločných znakov, akými sú agregácia bielkovín, oxidatívny stres, neurozápal a poruchy synapsí (Tarawneh and Galvin, 2010). Výskumy ukázali, že bielkoviny zapojené do procesu patogenezy DAT (tau) (Novak, 1994), Pickovej choroby (tau) (Mondragon-Rodriguez et al.,

2008), kortikobazálnej degenerácie (tau) , FTD (tau a TDP-43) (Rudas et al., 2003), Parkinsonovej choroby (α -synukleín) (Pohl et al., 2003) a Huntingtonovej choroby (Hch, huntingtín) (Janschek et al., 2001), sú proteolyticky štiepené. Proteolýza môže vytvoriť bielkovinové fragmenty, ktoré nadobúdajú toxické vlastnosti a vymykajú sa normálnej kontrole v neuróne. Patologicky štiepené bielkoviny tak zrejme spúšťajú kaskádu vedúcu k bunkovej smrti a tvoria nerozpustné agregáty.

Myšlienka, že skrátené bielkovinové fragmenty sú iniciátormi patologických procesov v neurodegeneračných ochoreniach je neustále potvrdzovaná experimentálnymi výsledkami. Podobne proteín TDP-43, ktorý je hlavnou zložkou tau-negatívnej and ubiquitín-pozitívnych agregátov pri amyotrofickej laterálnej skleróze (ALS) je proteolyticky štiepený. Štiepenie TDP-43 vedie k tvorbe C-koncových fragmentov, ktoré sú následne ubiquitinované, fosforylované a agregované (Rudas et al., 2003). Bolo ukázané, že C-koncovo skrátený α -synuclein dokáže v prípade Parkinsonovej choroby iniciovať agregáciu fyziologickej formy bielkoviny (Goedert et al., 1996). Taktiež, N-koncový fragment huntingtínu obsahujúci polyglutamínové sekvenencie inicializuje procesy vedúce k neuronálnej disfunkcii a patologickým abnormalitám pri Huntingtonovej chorobe (Litersky et al., 1996).

Bielkoviny indukujúce neurodegeneráciu sú substrátmi pre mnohé proteázy, ktoré zahŕňajú kaspázy, kalpaíny, katepsíny a metaloproteázy. Bolo ukázané, že huntingtín štiepený kaspázou-3 je detekovateľný v mozgoch pacientov s HCh pred jej klinickým nástupom (Goedert et al., 1995). V mozgoch pacientov s DAT boli tau fragmenty po štiepení kaspázou-3 a -6 asociované so skorými aj neskorými neurofibrilárnymi kľbkami a ich prítomnosť korelovala s kognitívnym úpadkom (Gamblin et al., 2003; Guo et al., 2004; Rissman et al., 2004). Podobne, kaspázové fragmenty α -synucleinu, ataxinu 3 a 7 boli identifikované v iných ľudských neurodegeneračných ochoreniach. Tieto zistenia dávajú podklad pre myšlienku, že proteolytické štiepenie bielkovín predstavuje najproduktívnejšiu postranlačnú modifikáciu a hrá kľúčovú úlohu v patogenéze ľudských neurodegenerácií.

Abnormálne štiepené tau proteíny nadobúdajú toxické vlastnosti

Prvý dôkaz o prítomnosti abnormálne proteolyticky štiepeného tau proteínu v mozgu pacientov s DAT bol poskytnutý za pomoci protilátky MN423. Mapovanie epitopu ukázalo, že protilátka rozpoznáva tau proteín iba ak je C-koniec odštiepený za Glu391 (Novak et al., 1993). Imunohistochemická analýza viedla k pozitívnej MN423 reaktivite neurofibrilárných kľbiek v tkanivách DAT pacientov, súčasne však k negatívnejmu farbeniu u kontrolných, zdravých vzoriek (Bondareff et al., 1990). Patologické štiepenie tau proteínu sa týmito pozorovaniami stalo definitívne súčasťou patologického procesu vedúceho k DAT. Odolnosť PHF jadra voči účinku proteáz viedla k domnienke, že tau proteíny v rámci PHF môžu mať podobné vlastnosti ako príony (Novak, 1994). Tieto skrátené tau proteíny boli pomenované „tauóny“ a očakáva sa, že by mohli samoagregovať do formy PHF vo vybraných neurónoch. Abnormálne štie-

penie tau proteínu a fosforylácia sú možné mechanizmy, ktoré vedú k transformácii molekúl tau proteínu na patologické a toxické formy – tauóny (Novak, 1994; Wang et al., 1996).

Neskôr boli identifikované ďalšie abnormálne štiepenia tau proteínu spolu s proteázami (Fasulo et al., 2000; Gamblin et al., 2003; Hanger and Wray, 2010; Rissman et al., 2004; Wang et al., 2010).

In vitro štúdie tau agregácie indikovali, že C-koncová oblasť tau proteínu má inhibičný účinok na tento proces, a že odštiepenie tejto časti molekuly tau proteínu vedie ku vzniku fragmentov, ktoré sú náchylnejšie na agregáciu ako intaktné, normálne tau bielkoviny (Abraha et al., 2000; Berry et al., 2003). Expresia abnormálne skrátenej tau molekuly 151-421, ktorá vzniká v mozgu pacientov s DAT, v hipokampálnych neurónoch viedla k spusteniu apoptózy (Fasulo et al., 2000). To naznačuje, že proteolytické štiepenie mení tau bielkovinu na toxickú so schopnosťou indukovať apoptotickú dráhu.

Tieto výsledky podporujú domnienku, že skrátenie tau vytvára molekuly podobné príonom so získanými toxickými vlastnosťami, ktoré vyplývajú z rozdielnej konformácie abnormálne skráteneho tau. Tento pohľad je podporený novou konformačne závislou protilátkou DC11, ktorá špecificky rozpoznáva abnormálne tau proteíny v DAT mozgoch, pričom farbenia kontrolných zdravých vzoriek ostávajú negatívne (Vechterova et al., 2003). Táto špecifita sa dá *in vitro* rekonštituovať na rekombinantných tau bielkovinách pomocou odštiepenia N- a C-koncových častí tau.

V snahe o potvrdenie patologickej aktivity abnormálne skrátenej tau proteínov *in vivo*, boli dva ľudské skrátenej tau proteíny (aa 151-391, 4R and aa 151-391, 3R) exprimované v neurónoch potkanieho mozgu (Filipcik et al., 2012; Zilka et al., 2006). Ukázali sme, že transgénne zvieratá vykazujú kompletnú tau patologickú kaskádu neurofibrilárnej degenerácie tak, ako ju pozorujeme u pacientov s DAT. Na histologickej úrovni boli pozorované neurofibrilárne kľbká tau proteínu, na biochemickej nerozpustné tau agregáty a na systémovej úrovni zvýšený oxidatívny stres (Cente et al., 2006) a neurozápal (Zilka et al., 2009b). Vytvorený model teda predstavuje jeden z najkompletnejších zvieracích modelov DAT v súčasnosti, ktorý verne reprodukuje tau neurodegeneráciu.

Zároveň potvrdil hypotézu, že takéto abnormálne skrátenej tau proteíny nadobúdajú toxické funkcie a mohli by byť cieľom terapie DAT.

Identifikácia nových patologických foriem tau ako cieľov pre terapiu

Abnormálne tau proteíny sú výrazne obohatené v nerozpustnej frakcii z mozgového tkaniva (Filipcik et al., 2012; Vechterova et al., 2003). Charakterizáciou týchto patologických proteínov je možné identifikovať molekuly s toxickými vlastnosťami priamo zodpovedné za zmeny vedúce k neurofibrilárnej degenerácii.

S cieľom identifikovať špecifické štruktúry patologických (toxických) tau proteínov v DAT, ktoré by mohli byť použité v aktívnej alebo pasívnej imunoterapii, sme uskutočnili komplexnú proteomickú analýzu abnormálnych, nerozpustných tau proteínov

vyizolovaných z mozgu pacientov s DAT (Zilka et al., 2012). Vyvinuli sme tandemovú imuno-frakcionáciu za pomoci troch špecifických anti-tau monoklonových protilátok, ktoré viažu N-koniec, C-koniec a strednú časť tau molekuly. To nám umožnilo oddeliť tau molekuly s intaktným N-koncom a/alebo intaktným C-koncom od tau molekúl, ktoré mali odštiepené oba konce. Protilátka rozpoznávajúca N-koncovú tau sekvenciu zachytila intaktné tau proteíny a rôzne vysokoagregované formy, ktoré tvoria typický biochemický podpis Alzheimerovej choroby – triplet A68 (Wolozin and Davies, 1987). To znamená, že žiadne N-koncové tau fragmenty s chýbajúcimi C-koncovými časťami sa v nerozpustných tau agregátoch nenachádzajú, čo je v súlade so zistením, že tendenciu agregovať majú oblasti zodpovedajúce za väzbu na mikrotubuly (R1-R4). Na druhej strane, nerozpustné tau pozostáva z množstva rôznych fragmentov tau s intaktným C-koncom, ktoré sa vyskytujú v diskretných molekulových hmotnostiach. To naznačuje, že patologické tau proteíny sú tvorené proteolytickým odštiepaním aminokyselín z N-konca molekuly a že tento proces je prebieha na niekoľkých preferovaných štiepených miestach, a teda sa nejedná o náhodný proteolytický proces. Tau proteíny v týchto klastroch sa navzájom líšia prítomnosťou ďalších posttranslačných modifikácií.

Poslednou skupinou sú tau proteíny, ktoré neobsahujú ani jeden intaktný koniec. Predstavujú rodinu bielkovín so širokým spektrom molekulových veľkostí od zhruba 10 kDa po vysokomolekulové oligoméry. Proteomická analýza za použitia hmotnostnej spektrometrie identifikovala nízkomolekulové tau polypeptidy, ktoré boli zhodné s tau polypeptidmi v minulosti popísanými ako súčasť jadra PHF (Jakes et al., 1991) a tak potvrdil prítomnosť skrátených foriem tau proteínu v jadre PHF (Wischik et al., 1988a; Wischik et al., 1988b).

Analýza pomocou hmotnostnej spektrometrie identifikovala početné ďalšie posttranslačné modifikácie abnormálne štiepených tau proteínov, akými sú hyperfosforylácia, ubiquitinácia, oxidácia, glykácia a acetylácia, ktoré sa nenachádzajú na normálnych tau proteínoch. Prítomnosť týchto modifikácií je dôsledkom už zmenenej konformácie tau (spôsobenej proteolytickým štiepením) a nezvyčajnou prístupnosťou týchto recipientských miest tau molekuly pre modifikujúce enzýmy.

Záver

Aj keď sa neurodegeneračné ochorenia líšia v príčine, nástupe, progresii a klinikom obraze, zdieľajú hlavnú spoločnú črtu – tvorbu toxických bielkovinových fragmentov. Bolo ukázané, že skrátenie bielkoviny môže výrazne zmeniť jej štruktúru a funkciu, ktorá môže konvertovať z normálnej na patologickú a môže byť schopná túto abnormálnu štruktúru propagovať viazaním na normálne tau proteíny. V prípade DAT sme identifikovali skrátené tau proteíny, ktoré sú obohatené v párových špirálových vláknach. Tieto vlákna tvoria makroskopické útvary v mozgu, tzv. neurofibrilárne kľbká, ktoré predstavujú hlavnú formu tau patológie pri DAT. Navyše sme ukázali, že skrakovanie tau nie je produktom náhodného procesu, ale skôr vysoko špecifického proteolytického štiepenia a/alebo neenzymatickej chemickej fragmentácie.

Súčasný dôkazy jasne ukazujú, že skrátené tau bielkoviny sú nielen hybnou silou neurofibrilárnej degenerácie, ale slúžia aj ako matrica pre tvorbu nových skrátených foriem, ktoré urýchľujú tvorbu špirálových vlákien a neurofibrilárnych klobiek. Preto sú prirodzeným cieľom pre terapiu neurodegeneračných ochorení a identifikáciou patologických štruktúrnych podjednotiek – determinantov bude možné zostaviť imunoterapeutiká so schopnosťou odstrániť tieto abnormálne a toxické formy z mozgu pacientov a tak zastaviť proces neurofibrilárnej patológie.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka financovaniu projektových agentúr APVV (projekt 0399-10), ICGEB (CRP/SVK 10-01) a VEGA (2/0162/10 a 2/0155/13).

Literatúra

1. Abraha, A., N. Ghoshal, T.C. Gamblin, V. Cryns, R.W. Berry, J. Kuret, and L.I. Binder. 2000. C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci.* 113 Pt 21:3737-3745.
2. Alonso, A., T. Zaidi, M. Novak, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 2001. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:6923-6928.
3. Alzheimer, A. 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiat. Psych.-Gerichtl. Med.* 64:146-148.
4. Alzheimer, A. 1911. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zbl. ges. Neurol. Psych.* 4:356-385.
5. Asuni, A.A., A. Boutajangout, D. Quartermain, and E.M. Sigurdsson. 2007. Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J Neurosci.* 27:9115-9129.
6. Berry, R.W., A. Abraha, S. Lagalwar, N. LaPointe, T.C. Gamblin, V.L. Cryns, and L.I. Binder. 2003. Inhibition of tau polymerization by its carboxy-terminal caspase cleavage fragment. *Biochemistry.* 42:8325-8331.
7. Bi, M., A. Ittner, Y.D. Ke, J. Gotz, and L.M. Ittner. 2011. Tau-targeted immunization impedes progression of neurofibrillary histopathology in aged P301L tau transgenic mice. *PLoS One.* 6:e26860.
8. Boimel, M., N. Grigoriadis, A. Loubopoulos, E. Haber, O. Abramsky, and H. Rosenmann. 2010. Efficacy and safety of immunization with phosphorylated tau against neurofibrillary tangles in mice. *Exp Neurol.* 224:472-485.
9. Bondareff, W., C.M. Wischik, M. Novak, W.B. Amos, A. Klug, and M. Roth. 1990. Molecular analysis of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. An immunohistochemical study. *Am J Pathol.* 137:711-723.
10. Boutajangout, A., D. Quartermain, and E.M. Sigurdsson. 2010. Immunotherapy targeting pathological tau prevents cognitive decline in a new tangle mouse model. *J Neurosci.* 30:16559-16566.
11. Braak, H., and E. Braak. 1991a. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82:239-259.

12. Braak, H., and E. Braak. 1991b. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82:239-259.
13. Cente, M., P. Filipcik, M. Pevalova, and M. Novak. 2006. Expression of a truncated tau protein induces oxidative stress in a rodent model of tauopathy. *Eur J Neurosci.* 24:1085-1090.
14. Corbett, A., J. Pickett, A. Burns, J. Corcoran, S.B. Dunnett, P. Edison, J.J. Hagan, C. Holmes, E. Jones, C. Katona, I. Kearns, P. Kehoe, A. Mudher, A. Passmore, N. Shepherd, F. Walsh, and C. Ballard. 2012. Drug repositioning for Alzheimer's disease. *Nat Rev Drug Discov.* 11:833-846.
15. Duyckaerts, C. 2011. Disentangling Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 10:774-775.
16. Fasulo, L., G. Ugolini, M. Visintin, A. Bradbury, C. Brancolini, V. Verzillo, M. Novak, and A. Cattaneo. 2000. The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *J Neurochem.* 75:624-633.
17. Filipcik, P., N. Zilka, O. Bugos, J. Kucerak, P. Koson, P. Novak, and M. Novak. 2012. First transgenic rat model developing progressive cortical neurofibrillary tangles. *Neurobiol Aging.* 33:1448-1456.
18. Gamblin, T.C., F. Chen, A. Zambrano, A. Abraha, S. Lagalwar, A.L. Guillozet, M. Lu, Y. Fu, F. Garcia-Sierra, N. LaPointe, R. Miller, R.W. Berry, L.I. Binder, and V.L. Cryns. 2003. Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:10032-10037.
19. Giacobini, E., and G. Gold. 2013. Alzheimer disease therapy--moving from amyloid-beta to tau. *Nat Rev Neurol.* 9:677-686.
20. Goedert, M., R. Jakes, M.G. Spillantini, M. Hasegawa, M.J. Smith, and R.A. Crowther. 1996. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature.* 383:550-553.
21. Goedert, M., R. Jakes, and E. Vanmechelen. 1995. Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett.* 189:167-169.
22. Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, M. Quinlan, Y.C. Tung, M.S. Zaidi, and H.M. Wisniewski. 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem.* 261:6084-6089.
23. Guo, H., S. Albrecht, M. Bourdeau, T. Petzke, C. Bergeron, and A.C. LeBlanc. 2004. Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 165:523-531.
24. Hanger, D.P., and S. Wray. 2010. Tau cleavage and tau aggregation in neurodegenerative disease. *Biochem Soc Trans.* 38:1016-1020.
25. Hardy, J.A., and G.A. Higgins. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256:184-185.
26. Chai, X., S. Wu, T.K. Murray, R. Kinley, C.V. Cella, H. Sims, N. Buckner, J. Hanmer, P. Davies, M.J. O'Neill, M.L. Hutton, and M. Citron. 2011. Passive immunization with anti-Tau antibodies in two transgenic models: reduction of Tau pathology and delay of disease progression. *J Biol Chem.* 286:34457-34467.
27. Iqbal, K., A. del C. Alonso, S. Chen, M.O. Chohan, E. El-Akkad, C.X. Gong, S. Khatoon, B. Li, F. Liu, A. Rahman, H. Tanimukai, and I. Grundke-Iqbal. 2005. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies *Biochimica et Biophysica Acta* 1739:198-210.

28. Iqbal, K., and I. Grundke-Iqbal. 1991. Ubiquitination and abnormal phosphorylation of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 5:399-410.
29. Jakes, R., M. Novak, M. Davison, and C.M. Wischik. 1991. Identification of 3- and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease. *Embo J.* 10:2725-2729.
30. Janschek, E., D. Kandioler-Eckersberger, C. Ludwig, S. Kappel, B. Wolf, S. Taucher, M. Rudas, M. Gnant, and R. Jakesz. 2001. Contralateral breast cancer: molecular differentiation between metastasis and second primary cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 67:1-8.
31. Kidd, M. 1963. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature (London).* 197:192-193.
32. Kosik, K.S., C.L. Joachim, and D.J. Selkoe. 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:4044-4048.
33. Kovacech, B., R. Skrabana, and M. Novak. 2010. Transition of tau protein from disordered to misordered in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis.* 7:24-27.
34. Lemere, C.A. 2013. Immunotherapy for Alzheimer's disease: hoops and hurdles. *Mol Neurodegener.* 8:36.
35. Litersky, J.M., G.V. Johnson, R. Jakes, M. Goedert, M. Lee, and P. Seubert. 1996. Tau protein is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II within its microtubule-binding domains at Ser-262 and Ser-356. *Biochem J.* 316 (Pt 2):655-660.
36. Mandelkow, E.M., and E. Mandelkow. 1998. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 8:425-427.
37. Mangialasche, F., A. Solomon, B. Winblad, P. Mecocci, and M. Kivipelto. 2010a. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet neurology.* 9:702-716.
38. Mangialasche, F., A. Solomon, B. Winblad, P. Mecocci, and M. Kivipelto. 2010b. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol.* 9:702-716.
39. Mondragon-Rodriguez, S., R. Mena, L.I. Binder, M.A. Smith, G. Perry, and F. Garcia-Sierra. 2008. Conformational changes and cleavage of tau in Pick bodies parallel the early processing of tau found in Alzheimer pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 34:62-75.
40. Mullard, A. 2012. Sting of Alzheimer's failures offset by upcoming prevention trials. *Nat Rev Drug Discov.* 11:657-660.
41. Nelson, P.T., I. Alafuzoff, E.H. Bigio, C. Bouras, H. Braak, N.J. Cairns, R.J. Castellani, B.J. Crain, P. Davies, K. Del Tredici, C. Duyckaerts, M.P. Frosch, V. Haroutunian, P.R. Hof, C.M. Hulette, B.T. Hyman, T. Iwatsubo, K.A. Jellinger, G.A. Jicha, E. Kovari, W.A. Kukull, J.B. Leverenz, S. Love, I.R. Mackenzie, D.M. Mann, E. Masliah, A.C. McKee, T.J. Montine, J.C. Morris, J.A. Schneider, J.A. Sonnen, D.R. Thal, J.Q. Trojanowski, J.C. Troncoso, T. Wisniewski, R.L. Wolter, and T.G. Beach. 2012. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol.* 71:362-381.
42. Novak, M. 1994. Truncated tau protein as a new marker for Alzheimer's disease. *Acta Virol.* 38:173-189.
43. Novak, M., R. Jakes, P.C. Edwards, C. Milstein, and C.M. Wischik. 1991. Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:5837-5841.

44. Novak, M., J. Kabat, and C.M. Wischik. 1993. Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *Embo J.* 12:365-370.
45. Novak, M., C.M. Wischik, P. Edwards, R. Pannell, and C. Milstein. 1989. Characterisation of the first monoclonal antibody against the pronase resistant core of the Alzheimer PHF. *Prog Clin Biol Res.* 317:755-761.
46. Nukina, N., and Y. Ihara. 1986. One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J Biochem (Tokyo).* 99:1541-1544.
47. Pohl, G., M. Rudas, S. Taucher, T. Stranzl, G.G. Steger, R. Jakesz, R. Pirker, and M. Filipits. 2003. Expression of cell cycle regulatory proteins in breast carcinomas before and after preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 78:97-103.
48. Prince, M., R. Bryce, E. Albanese, A. Wimo, W. Ribeiro, and C.P. Ferri. 2013. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.* 9:63-75 e62.
49. Rissman, R.A., W.W. Poon, M. Blurton-Jones, S. Oddo, R. Torp, M.P. Vitek, F.M. LaFerla, T.T. Rohn, and C.W. Cotman. 2004. Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest.* 114:121-130.
50. Rudas, M., M. Filipits, S. Taucher, T. Stranzl, G.G. Steger, R. Jakesz, R. Pirker, and G. Pohl. 2003. Expression of MRP1, LRP and Pgp in breast carcinoma patients treated with preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 81:149-157.
51. Shah, S., and W.E. Reichman. 2006. Treatment of Alzheimer's disease across the spectrum of severity. *Clin Interv Aging.* 1:131-142.
52. Skrabana, R., J. Sevcik, and M. Novak. 2006a. Intrinsically disordered proteins in the neurodegenerative processes: formation of tau protein paired helical filaments and their analysis. *Cell Mol Neurobiol.* 26:1085-1097.
53. Skrabana, R., M. Skrabanova-Khuebachova, P. Kontsek, and M. Novak. 2006b. Alzheimer's-disease-associated conformation of intrinsically disordered tau protein studied by intrinsically disordered protein liquid-phase competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Biochem.* 359:230-237.
54. Skrabana, R., M. Skrabanova, N. Csokova, J. Sevcik, and M. Novak. 2006c. Intrinsically disordered tau protein in Alzheimer's tangles: a coincidence or a rule? *Bratisl Lek Listy.* 107:354-358.
55. Tarawneh, R., and J.E. Galvin. 2010. Potential future neuroprotective therapies for neurodegenerative disorders and stroke. *Clin Geriatr Med.* 26:125-147.
56. Theunis, C., N. Crespo-Biel, V. Gafner, M. Pihlgren, M.P. Lopez-Deber, P. Reis, D.T. Hickman, O. Adolfosson, N. Chuard, D.M. Ndao, P. Borghgraef, H. Devijver, F. Van Leuven, A. Pfeifer, and A. Muhs. 2013. Efficacy and safety of a liposome-based vaccine against protein Tau, assessed in tau.P301L mice that model tauopathy. *PLoS One.* 8:e72301.
57. Troquier, L., R. Caillierez, S. Burnouf, F.J. Fernandez-Gomez, M.E. Grosjean, N. Zommer, N. Sergeant, S. Schraen-Maschke, D. Blum, and L. Buee. 2012. Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach. *Curr Alzheimer Res.* 9:397-405.
58. Vechterova, L., E. Kontsekova, N. Zilka, M. Ferencik, R. Ravid, and M. Novak. 2003. DC11: a novel monoclonal antibody revealing Alzheimer's disease-specific tau epitope. *Neuroreport.* 14:87-91.

59. Wang, J.Z., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1996. Restoration of biological activity of Alzheimer abnormally phosphorylated tau by dephosphorylation with protein phosphatase-2A, -2B and -1. *Brain Res Mol Brain Res.* 38:200-208.
60. Wang, Y., S. Garg, E.M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 2010. Proteolytic processing of tau. *Biochem Soc Trans.* 38:955-961.
61. Wischik, C.M., M. Novak, P.C. Edwards, A. Klug, W. Tichelaar, and R.A. Crowther. 1988a. Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:4884-4888.
62. Wischik, C.M., M. Novak, H.C. Thogersen, P.C. Edwards, M.J. Runswick, R. Jakes, J.E. Walker, C. Milstein, M. Roth, and A. Klug. 1988b. Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:4506-4510.
63. Wolozin, B., and P. Davies. 1987. Alzheimer-related neuronal protein A68: specificity and distribution. *Ann Neurol.* 22:521-526.
64. Zilka, N., P. Filipcik, P. Koson, L. Fialova, R. Skrabana, M. Zilkova, G. Rolkova, E. Kontsekova, and M. Novak. 2006. Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Lett.* 580:3582-3588.
65. Zilka, N., M. Korenova, and M. Novak. 2009a. Misfolded tau protein and disease modifying pathways in transgenic rodent models of human tauopathies. *Acta Neuropathol.* 118:71-86.
66. Zilka, N., B. Kovacech, P. Barath, E. Kontsekova, and M. Novak. 2012. The self-perpetuating tau truncation circle. *Biochem Soc Trans.* 40:681-686.
67. Zilka, N., Z. Stozicka, A. Kovac, E. Pilipcinec, O. Bugos, and M. Novak. 2009b. Human misfolded truncated tau protein promotes activation of microglia and leukocyte infiltration in the transgenic rat model of tauopathy. *J Neuroimmunol.* 209:16-25.
68. Zilkova, M., N. Zilka, A. Kovac, B. Kovacech, R. Skrabana, M. Skrabanova, and M. Novak. 2011. Hyperphosphorylated truncated protein tau induces caspase-3 independent apoptosis-like pathway in the Alzheimer's disease cellular model. *J Alzheimers Dis.* 23:161-169.

ŠTÚDIUM ŠTRUKTÚRY C-KONCOVEJ DOMÉNY TAU PROTEÍNU AKO MOŽNÉHO CIEĽA PRE BIOLOGICKÚ LIEČBU

Ondrej Cehlár, Rostislav Škrabana, Michal Novák

Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, Bratislava

Abstrakt

S mikrotubulmi asociovaný proteín tau (MAPT) hrá kritickú úlohu v etiopatogenéze tauopátií – doteraz neliečiteľných neurodegeneratívnych ochorení. Poznanie detailnej štruktúry a funkcie C-koncových fragmentov MAPT (C-MAPT) má mimoriadny význam pre pochopenie indukcie patologickej kaskády vedúcej k neurodegenerácii. Predpokladom je podrobná analýza C-MAPT prostredníctvom röntgenovej kryštalografie a biofyzikálnych metód využívajúc monoklonové protilátky ako interakčné sondy pre tau proteín. Objasnenie funkcie C-MAPT má potenciál prispieť k návrhu optimálnych liečebných stratégií pre Alzheimerovu chorobu.

Úvod

So zreteľom na celosvetový trend starnutia populácie predstavuje Alzheimerova choroba (demencia Alzheimerového typu – DAT), ktorej hlavným rizikovým faktorom je vek nad 65 rokov, závažný medicínsky, ekonomický a sociálny problém. DAT je jednou z 10 hlavných príčin úmrtia, ale doposiaľ nie je známy spôsob liečby alebo spomalenia postupu ochorenia. Hlavným znakom DAT je akumulácia prirodzene neusporiadaných proteínov tau a β -amyloidu vo forme toxických nerozpustných agregátov.

Prirodzene neusporiadané proteíny, ktoré za fyziologických podmienok nenadobúdajú pevnú trojrozmernú štruktúru, sú v prírode zastúpené vo veľkej miere, a ich funkčný repertoár dopĺňa funkcie globulárnych proteínov. Veľa prirodzene neusporiadaných proteínov však hrá úlohu aj v patogenéze ľudských ochorení, ako napríklad neurodegeneratívnych procesov, rakoviny alebo diabetu (Uversky et al., 2008).

Za fyziologických podmienok sa tau proteín viaže na mikrotubuly a reguluje ich dynamiku, zatiaľ čo za patologických podmienok Alzheimerovej choroby tau stráca schopnosť väzby na mikrotubuly a vytvára vysoko nerozpustné párové špirálové vlákna (PHF), ktoré sa usadzujú v tkanive. Príčina premeny prirodzene neusporiadanej formy proteínu tau na patologicky agregovanú formu nie je známa, ale rozhodujúcu úlohu môžu zohrávať posttranslačné modifikácie tau proteínu, a to najmä jeho proteolytické štiepenie (Novak et al., 1993; Wischik et al., 1988a; Wischik et al., 1988b) a hyperfosforylácia (Grundke-Iqbal et al., 1986; Ihara et al., 1986).

Spoznanie atómovej štruktúry patologických a fyziologických konformácií tau proteínu môže napomôcť pri objasňovaní základných otázok patogenézy DAT a iných taopátií. Medzi oblasti na ktoré je potrebné upriamiť pozornosť patrí osobitne jeho C-koncová doména, keďže sa zistilo, že C-terminálna časť tau molekuly významne in-

hibuje agregáciu tau proteínu do amyloidových štruktúr (Abraha et al., 2000; Gamblin et al., 2003).

Alternatívnym zozrihom MAPT génu vzniká v CNS 6 izoformiem tau proteínu, ktoré sa líšia zastúpením N-koncových insertov (žiadny, jeden alebo dva) a prítomnosťou troch alebo štyroch mikrotubuly viažúcich repetitívnych oblastí (Andreadis, 2005; Goedert et al., 1989). Najdlhšia izoforma proteínu tau v centrálnom nervovom systéme má 441 aminokyselín. V molekule tau proteínu môžeme identifikovať prevažne kyslú N-koncovú doménu nasledovanú bázičkou prolínovou doménou, mikrotubuly viažúcimi repetitívnymi oblasťami a C-koncovou doménou obsahujúcou kyslé aj bázičké aminokyselinové zvyšky.

Pomocou NMR meraní v roztoku bola pre aminokyseliny ⁴²⁸LADEVSASLA⁴³⁷ C-koncovej domény tau proteínu zistená preferencia pre α -helikálnu štruktúru, ktorá bola pozorovaná v 25 % sledovaného času (Mukrasch et al., 2009; Schwalbe et al., 2014). Úsek ⁴²⁹ADEVSASLA⁴³⁷ bol metódou phage display zároveň určený ako jedno z miest na molekule tau proteínu, ktoré zohrávajú úlohu pri väzbe tau na mikrotubuly (Cao and Mao, 2009).

Po agregácii tau proteínu sa C-koniec molekuly nachádza vo vnútornej vrstve relatívne neusporiadaného obalu, ktorý obklopuje kompaktné jadro párového špirálového vlákna (Wegmann et al., 2013). Za fyziologických podmienok v roztoku sa C-koncová doména tau vyskytuje vo vysokej frekvencii v blízkosti repetitívnych oblastí a 40-tich N-koncových aminokyselín tau, čo bolo označené ako „paperclip“ model konformácie tau molekuly (Jeganathan et al., 2006; Mukrasch et al., 2009).

Keďže tau proteín môže nadobudnúť štruktúru po interakcii s väzobným partnerom, je možné využitím tau-špecifických protilátok pripraviť kryštály komplexov, vďaka ktorým je možné určiť štruktúru tau metódou röntgenovej difrakčnej analýzy. Protilátky, ktorých epitopy ležia v C-koncovej oblasti tau proteínu, môžu poskytnúť informácie o rôznych štruktúrnych stavoch tau proteínu zodpovedných za jeho funkciu.

Postup pre skúmanie C-koncovej domény tau proteínu pomocou röntgenovej kryštalografie a kinetických meraní interakcií

Pri skúmaní C-koncovej domény tau proteínu sa využíva podobný prístup aký sme použili v našej predchádzajúcej práci pri kryštalizácii tau peptidu z prolínovej oblasti s protilátkou Tau5 (Cehlar et al., 2012). Rekombinantné tau proteíny pre biofyzikálne merania sa exprimujú v *E.Coli* a purifikujú z bakteriálneho lyzátu pomocou iónomeneičovej a gélovej chromatografie (Csokova et al., 2004; Krajciová et al., 2008). Fab fragmenty monoklónových protilátok s epitopmi v C-koncovej oblasti tau molekuly sa pripravujú papainovým štiepením molekuly protilátky a následnou purifikáciou štiepnej zmesi pomocou afinitnej a gélovej chromatografie a ich koncentrácia ako aj koncentrácia tau proteínov sa stanovuje pomocou nami validovanej metodiky merania absorbancie pri 205 nm, ktorá je v porovnaní s inými metódami využívajúcimi globulárny proteín ako kalibračný štandard (napr. BCA metóda) vhodnejšia pre stanovenie

koncentrácie prirodzene neusporiadaných proteínov. Primárna sekvencia protilátok sa odvodzuje z nukleotidovej sekvencie po naklonovaní obidvoch reťazcov Fab fragmentov a sekvenovaní PCR produktov.

Interakcia Fab fragmentov protilátok s tau proteínmi sa monitoruje metódou rezonancie povrchového plazmónu pomocou prístroja BIACORE3000 a čipov CM5 pri rôznych teplotách. Fab fragment sa imobilizuje na povrch čipu a tau proteín sa nastrekuje ako analyt v rôznych koncentráciách. Vyhodnotením senzogramov pomocou modelu pre interakciu 1:1 sa získavajú rýchlostné konštanty, z ktorých sa pomocou Eyringovej analýzy vyhodnocujú teplotne závislé termodynamické parametre prechodového stavu. Rovnovážne termodynamické parametre sa vypočítavajú z parametrov asociácie a disociácie prechodového stavu.

Kryštalizácia Fab fragmentov protilátok a ich komplexov s tau peptidmi prebieha metódou difúzie vodných pár vo formáte visiacej alebo sediacej kvapky, pri ktorých sa kvapka obsahujúca roztok proteínu a zrážadla ekvilibruje v uzavretej komore oproti rezervoáru zrážadla. Sediace kvapky sa pipetujú ručne do 96 jamkových kryštalizačných platničiek pomocou nami opísanej a validovanej metódy použitia motorizovaných pipiet (Skrabana et al., 2012), pomocou ktorej je možné pipetovať 200 nl kvapky, čo sa miniaturizáciou objemu blíži rozsahu automatických kryštalizačných robotov (Stewart and Mueller-Dieckmann, 2014), a umožňuje zníženie potrebného množstva proteínu a podstatné urýchlenie prípravy kryštalizačných experimentov. Na skrining počiatkových kryštalizačných podmienok sa používajú komerčné kryštalizačné sady roztokov zrážadiel. Pokiaľ sa počiatkovým skriningom nezískajú kryštály poskytujúce dostatočnú difrakciu, je možné podmienky v ktorých vyrástli slabo difraktujúce kryštály ďalej optimalizovať. A to buď úpravou zloženia roztoku vybraného zrážadla, zmenou počiatkovej koncentrácie proteínu, zmenou teploty, očkovaním kryštálov alebo oddelením nukleácie a rastu kryštálov. Prítomnosť peptidu v kryštáloch komplexov sa overuje analýzou príslušných kryštálov pomocou kvapalinovej chromatografie spojenej s detekciou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS).

Získané kryštály sa v prítomnosti kryoprotektantu zamrazujú v kvapalnom dusíku a difrakčné dáta sa merajú na synchrotrónovom zdroji röntgenového žiarenia. Dáta sa spracúvajú v programe XDS (Kabsch, 2010) a štruktúra sa rieši metódou molekulovej náhrady za použitia štruktúry sekvenčne podobnej protilátky ako modelu. Ďalšie spresňovanie štruktúry prebieha v opakovaných cykloch automatického spresňovania modelu v programe REFMAC5 (Murshudov et al., 2011) a manuálnych úprav modelu v grafickom programe COOT (Emsley et al., 2010). Štruktúra sa validuje analýzou modelu pomocou serveru MolProbity (Chen et al., 2010). Získaná konformácia tau sa porovnáva s výsledkami simulácie molekulovej dynamiky tau peptidu za použitia silového poľa vhodného pre simuláciu prirodzene neusporiadaných proteínov CHARMM22* (Piana et al., 2011).

Diskusia a záver

Navrhovaná metóda kryštalografickej analýzy C-koncovej domény tau proteínu, doplnená biofyzikálnou charakterizáciou jej interakčných schopností bola v minulosti úspešne využitá pri skúmaní štruktúry iných oblastí tau proteínu. Pomocou ko-kryštalizácie tau peptidu s Fab fragmentom protilátky sme získali informácie o konformácii tau v prolínovej oblasti a C-konci skráteneho proteínu tau151-391. V komplexe s protilátkou Tau5 bola určená štruktúra 16 aminokyselín tau peptidu z prolínovej oblasti pri rozlíšení 1.6 Å. Získaná štruktúra tau peptidu vykazuje prítomnosť niektorých sekundárnych štruktúr, ktoré podľa zistení NMR meraní v roztoku táto oblasť tau proteínu prechodne nadobúda. Po väzbe tau peptidu došlo v paratope protilátky k značným konformačným zmenám, čo bolo zistené porovnaním štruktúr voľného Fab fragmentu a Fab fragmentu v komplexe s tau peptidom (Cehlar, pripravované). Podobne, v komplexe tau fragmentu odvodeného z jadra párového špirálového vlákna s Fab fragmentom protilátky MN423, ktorá predstavuje odtlačok jeho trojrozmernej štruktúry pri Alzheimerovej chorobe, bola zistená konformácia C-koncového hexapeptidu ³⁸⁷TD-HGAE³⁹¹ (Sevcik et al., 2007; Skrabana et al., 2010).

Sledovanie kinetiky interakcie Fab fragmentu monoklónovej protilátky Tau5 so skrátеныmi tau proteínmi a s plnodĺžkovým tau proteínom pri rôznych teplotách a následné odvodenie rýchlostných konštánt asociácie a disociácie umožnilo analýzu rovnovážnej termodynamiky a termodynamiky prechodového stavu, ktorá poukázala na rozdielne vlastnosti epitopu v prolínovej oblasti molekuly skráteneho proteínu tau151-391 oproti zvyšným sledovaným formám tau proteínu. Preukázali sme, že N- a C-koncové skrátenie tau molekuly, ktoré spôsobuje v transgénnom potkaňom modeli patológiu Alzheimerového typu (Filipcik et al., 2012; Zilka et al., 2006), mení prístupnosť a termodynamické parametre interakcie prolínovej oblasti tau, čo môže zohrávať úlohu pri vzniku neurodegeneratívnych tauopatií (Cehlar, 2013).

Na dôležitosť C-koncovej oblasti pre funkciu tau proteínu poukazuje aj skutočnosť, že oslabenie prechodných interakcií dlhších vzdialeností (paperclip konformácia) následkom pseudofosforylácie v prolínovej a C-koncovej doméne molekuly tau proteínu dochádza k zrýchlenej agregácii tau proteínu (Bibow et al., 2011). Keďže prítomnosť 12 C-koncových aminokyselín tau zabraňuje jeho agregácii (Abraha et al., 2000), je podstatné zistiť informácie o štruktúre a interakčných vlastnostiach C-koncovej domény tau proteínu.

Podakovanie

Táto práca vznikla za podpory grantov agentúry APVV pod grantovými číslami LPP-0038-09 a APVV-0677-12.

Literatúra

1. Abraha, A., N. Ghoshal, T.C. Gambelin, V. Cryns, R.W. Berry, J. Kuret, and L.I. Binder. 2000. C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci.* 113 Pt 21:3737-3745.

2. Andreadis, A. 2005. Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases *Biochim Biophys Acta*. 1739:91–103
3. Bibow, S., V. Ozenne, J. Biernat, M. Blackledge, E. Mandelkow, and M. Zweckstetter. 2011. Structural Impact of Proline-Directed Pseudophosphorylation at AT8, AT100, and PHF1 Epitopes on 441-Residue Tau. *J Am Chem Soc*. 133:15842-15845.
4. Cao, B., and C. Mao. 2009. Identification of microtubule-binding domains on microtubule-associated proteins by major coat phage display technique. *Biomacromolecules*. 10:555-564.
5. Cehlar, O. 2013. Complementary structural investigation of intrinsically disordered protein tau involved in neurodegenerative diseases. In *Neuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied*. Vol. PhD. Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Bratislava. 121.
6. Cehlar, O., R. Skrabana, A. Kovac, B. Kovacech, and M. Novak. 2012. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of tau protein microtubule-binding motifs in complex with Tau5 and DC25 antibody Fab fragments. *Acta Crystallogr F*. 68:1181-1185.
7. Csokova, N., R. Skrabana, H.D. Liebig, A. Mederlyova, P. Kontsek, and M. Novak. 2004. Rapid purification of truncated tau proteins: model approach to purification of functionally active fragments of disordered proteins, implication for neurodegenerative diseases. *Protein Express Purif*. 35:366-372.
8. Emsley, P., B. Lohkamp, W.G. Scott, and K. Cowtan. 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 66:486-501.
9. Filipcik, P., N. Zilka, O. Bugos, J. Kucerak, P. Koson, P. Novak, and M. Novak. 2012. First transgenic rat model developing progressive cortical neurofibrillary tangles. *Neurobiol Aging*. 33:1448-1456.
10. Gamblin, T.C., F. Chen, A. Zambrano, A. Abraha, S. Lagalwar, A.L. Guillozet, M. Lu, Y. Fu, F. Garcia-Sierra, N. LaPointe, R. Miller, R.W. Berry, L.I. Binder, and V.L. Cryns. 2003. Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:10032-10037.
11. Goedert, M., M.G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, and R.A. Crowther. 1989. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*. 3:519-526.
12. Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, and L.I. Binder. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *P Natl Acad Sci USA*. 83:4913-4917.
13. Chen, V.B., W.B. Arendall, J.J. Headd, D.A. Keedy, R.M. Immormino, G.J. Kapral, L.W. Murray, J.S. Richardson, and D.C. Richardson. 2010. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D*. 66:12-21.
14. Ihara, Y., N. Nukina, R. Miura, and M. Ogawara. 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem*. 99:1807-1810.
15. Jeganathan, S., M. von Bergen, H. Brutlach, H.J. Steinhoff, and E. Mandelkow. 2006. Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry*. 45:2283-2293.
16. Kabsch, W. 2010. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 66:125-132.

17. Krajciová, G., R. Skrabana, P. Filipčík, and M. Novak. 2008. Preserving free thiols of intrinsically disordered tau protein without the use of a reducing agent. *Analytical Biochemistry*. 383:343-345.
18. Mukrasch, M.D., S. Bibow, J. Korukottu, S. Jeganathan, J. Biernat, C. Griesinger, E. Mandelkow, and M. Zweckstetter. 2009. Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol.* 7:e34.
19. Murshudov, G.N., P. Skubak, A.A. Lebedev, N.S. Pannu, R.A. Steiner, R.A. Nicholls, M.D. Winn, F. Long, and A.A. Vagin. 2011. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D.* 67:355-367.
20. Novak, M., J. Kabat, and C.M. Wischik. 1993. Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *Embo Journal*. 12:365-370.
21. Piana, S., K. Lindorff-Larsen, and D.E. Shaw. 2011. How robust are protein folding simulations with respect to force field parameterization? *Biophys J.* 100:L47-49.
22. Sevcik, J., R. Skrabana, R. Dvorsky, N. Csokova, K. Iqbal, and M. Novak. 2007. X-ray structure of the PHF core C-terminus: insight into the folding of the intrinsically disordered protein tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 581:5872-5878.
23. Schwalbe, M., V. Ozenne, S. Bibow, M. Jaremko, L. Jaremko, M. Gajda, M.R. Jensen, J. Biernat, S. Becker, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, and M. Blackledge. 2014. Predictive Atomic Resolution Descriptions of Intrinsically Disordered hTau40 and alpha-Synuclein in Solution from NMR and Small Angle Scattering. *Structure*. 22:238-249.
24. Skrabana, R., O. Cehlar, and M. Novak. 2012. Non-robotic high-throughput setup for manual assembly of nanolitre vapour-diffusion protein crystallization screens. *J Appl Crystallogr.* 45:1061-1065.
25. Skrabana, R., R. Dvorsky, J. Sevcik, and M. Novak. 2010. Monoclonal antibody MN423 as a stable mold facilitates structure determination of disordered tau protein. *J Struct Biol*.
26. Stewart, P.S., and J. Mueller-Dieckmann. 2014. Automation in biological crystallization. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 70:686-696.
27. Uversky, V.N., C.J. Oldfield, and A.K. Dunker. 2008. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu Rev Biophys.* 37:215-246.
28. Wegmann, S., I.D. Medalsy, E. Mandelkow, and D.J. Muller. 2013. The fuzzy coat of pathological human Tau fibrils is a two-layered polyelectrolyte brush. *P Natl Acad Sci USA*. 110:E313-E321.
29. Wischik, C.M., M. Novak, P.C. Edwards, A. Klug, W. Tichelaar, and R.A. Crowther. 1988a. Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *P Natl Acad Sci USA*. 85:4884-4888.
30. Wischik, C.M., M. Novak, H.C. Thogersen, P.C. Edwards, M.J. Runswick, R. Jakes, J.E. Walker, C. Milstein, M. Roth, and A. Klug. 1988b. Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *P Natl Acad Sci USA*. 85:4506-4510.
31. Zilka, N., P. Filipčík, P. Koson, L. Fialova, R. Skrabana, M. Zilkova, G. Rolkova, E. Kontseikova, and M. Novak. 2006. Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *febs letters*. 580:3582-3588.

NUKLEOVÉ KYSELINY AKO BIOLOGIKÁ PRE LIEČBU NEURODEGENERAČNÝCH CHORÔB

Peter Filipčík, Martin Čente, Alena Opattová, Michal Novák
Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, Bratislava

Abstrakt

Jedným z významných znakov neurodegenerácie je nadmerné hromadenie poškodených a nesprávne zvinutých proteínov v cytoplazme neurónov centrálného nervového systému (CNS). Je to súčasť patogenézy mnohých, klinicky rôzne sa prejavujúcich neurodegeneračných ochorení. Patrí k nim aj sporadická forma Alzheimerovej choroby (ACh) – najčastejšia forma demencie, za ktorou v početnosti prípadov nasleduje sporadická Parkinsonova choroba (PCh). Podobné narušenie proteostázy pozorujeme aj v genetických formách ACh a PCh, ale aj v prípade Huntingtonovej choroby, Amyτροφickej laterálnej sklerózy, Spinocerebelárnej ataxie a mnohých ďalších ochoreniach CNS. Pri všetkých týchto chorobách, ktoré sumárne nazývame „proteínové foldopatie“, dochádza k tvorbe vysokomolekulových proteínových agregátov, ktorých odbúranie pomocou proteázomového systému alebo autofágie, teda špecializovaných mechanizmov pre udržiavanie proteostázy, z rôznych dôvodov už ďalej nie je možné. Účinná liečba proteínových foldopatií doposiaľ neexistuje. Vo svojej práci sme sa zamerali na navrhnutie stratégie pre inhibíciu neurodegenerácie pomocou biologík na báze nukleových kyselín.

Úvod

Alzheimerova choroba patrí medzi tauopatie, ktoré sú charakterizované vnútro-bunkovou akumuláciou s mikrotubulami-asociovaného proteínu tau (MAPT) vo forme párových špirálových vlákien (PHF), ktorých hromadenie v cytoplazme neurónov vedie k tvorbe neurofibrilárnych klobiek (NFT) – jednému z dvoch hlavných histopatologických znakov definujúcich Alzheimerovu chorobu (Grundke-Iqbal a kol., 1986). Detailné histochemické štúdie ukázali, že lokalizácia a množstvo NFT v mozgu pacientov s ACh pozitívne koreluje s postupom choroby a teda aj s kognitívnym úpadkom pacientov (Braak & Braak, 1991). Preto sa tau proteín a jeho modifikované formy, ktoré sú hlavným komponentom NFT dostávajú stále viac do centra pozornosti biomedicínskeho výskumu. Je známe, že posttranslačné modifikácie tau proteínu, ako napríklad fosforylácia (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Iqbal *et al.*, 2005; Pevalová a kol., 2006, Kováčech a kol., 2007), glykácia (Yan a kol., 1994), glykozylácia (Wang a kol., 1996), ubikvitinácia (Bondareff a kol., 1990) a enzymatická alebo neenzymatická proteolýza v špecifických úsekoch tau proteínu (Novak a kol., 1993, Garcia-Sierra a kol., 2003) majú mimoriadny význam v etiopatogenéze ACh a príbuzných tauopatií. Niektoré z týchto modifikácií sú jej spúšťačím mechanizmom (Kováčech a kol. 2010).

Sporadická forma Alzheimerovej choroby je multifaktoriálne ochorenie, jej vznik a priebeh je viazaný na výskyt rôznych rizikových faktorov a v tom spočíva aj komplikovanosť pri hľadaní účinného lieku proti ACh. Napriek intenzívnemu výskumu doposiaľ nie je známe, v ktorej fáze vývinu ochorenia a do akej miery sa jednotlivé rizikové faktory uplatňujú. Je zrejmé, že rizikové faktory ako také (samy osebe), vznik ACh nespôsobujú, ale ak sú prítomné, pravdepodobnosť, že sa ochorenie prejaví, je vyššia. Najvýznamnejším rizikovým faktorom ACh je vek – mozog musí dosiahnuť určitý kritický vek aby sa sporadická ACh mohla objaviť. K ďalším patria hypertenzia, diabetes, depresia, fajčenie, nízka fyzická a mentálna aktivita, či obezita v strednom veku. Najvýznamnejšie však ku vzniku ACh prispievajú rôzne kombinácie rizikových faktorov.

Naším predpokladom je, že kritickým rizikovým faktorom pre vznik a vývin ACh je objavenie sa patologicky skráteneho MAPT. Môže k nemu dôjsť buď enzymaticky alebo aj spontánne, napríklad pri úrazoch hlavy (ale aj opakovaných úderoch do hlavy pri športe), po anestéze alebo hypoxii prípadne inak, pôsobením vyššie spomenutých rizikových faktorov. Predpokladáme, že prítomnosť patologicky skráteneho tau je spoločným menovateľom a výsledkom spoločného pôsobenia rôznych typov induktorov ACh.

Výsledky

Experimentálne dáta z nášho laboratória ukázali, že nadmerná expresia a intraneuronálna akumulácia modifikovaného (skráteneho) tau proteínu odvodeného z primárnej štruktúry ľudského patologického MAPT v mozgu pacientov s ACh vedie k neurodegenerácii Alzheimerovho typu aj u experimentálnych zvierat. Tento dej je sprevádzaný významným zvýšením hladiny reaktívnych kyslíkových intermediátov v neurónoch kultivovaných in vitro, silným neurozápalom in vivo, behavioralným deficitom, metabolickými poruchami a predčasným úmrtím experimentálnych zvierat. (Čente a kol. 2006; Zilka a kol. 2006, Filipčík a kol., 2006). Tieto výsledky naznačujú na prioritnú úlohu proteolytického skráteneho tau proteínu v skorých fázach, ako aj v ďalšom priebehu neurodegeneratívneho ochorenia. V experimentálnych podmienkach sme pozorovali nadobudnutie neurotoxickej funkcie komplexu transgénneho a endogénneho tau proteínu. Predpokladáme, že práve táto interakcia akceleruje patogenézu ACh u človeka. Štruktúra fyziologického tau sa mení, stáva sa „patogénom“ a interaguje s normálnymi molekulami MAPT, ktoré modifikuje podľa svojho vzoru a takto im zabraňuje vykonávať ich pôvodnú funkciu.

Predpokladáme, že toxickými molekulami v patogeneze tauopatií sú intermediáty pri tvorbe NFT a nie samotné NFT. Objasnenie tejto skutočnosti a zistenie, ktoré z týchto intermediátov sú pre bunku najškodlivejšie, ako aj určenie možností ich vnútrobunkovej degradácie by významne prispelo k návrhu nových terapeutických stratégií, ktoré by mohli viesť k liečbe tauopatií a ACh.

Vzhľadom k tomu, že premena fyziologického tau na patologickú formu a jeho následná interakcia s *de novo* sa syntetizujúcim MAPT je smrteľná kombinácia dejov,

je otázne či samotné zablokovanie resp. zníženie syntézy MAPT by nemalo pozitívny efekt a nevedlo by prinajmenej k spomaleniu patogenézy. V literatúre existujú náznaky, že tento proces by mohol byť úspešný, avšak dodnes túto myšlienku nikto experimentálne nepotvrdil ani nevyvrátil. Inhibícia expsie tau proteínu a príprava tau - deficientných neurónov pomocou interferujúcich RNA v dospelých resp. diferencovaných neurónoch by mohla viesť aj k identifikácii nových doposiaľ nepoznaných funkcií tau proteínu.

Predpokladáme, že biologiká na báze nukleových kyselín by mohli byť dobrým nástrojom na overenie tejto hypotézy v experimentálnom systéme. Za týmto účelom sme v našom laboratóriu vyvinuli špecifický vektor na báze rekombinantných parvovírusov (rAAV, adeno-asocované vírusy). Kombináciou niekoľkých komerčne dostupných plazmidových vektorov sme pripravili špecifický rAAV, nesúci cieľovú sekvenciu malých interferujúcich RNA (siRNA) pre inhibíciu expsie MAPT. Funkčnosť plazmidov exprimujúcich siRNA sme overili v ko-transfekcii buniek HEK293 s génovým konštruktom produkujúcim najdlhšiu izoformu tau proteínu (T40) spoločne s cieľovými sekvenciami pre siRNA. Western blotová analýza bunkových extraktov jednoznačne ukázala, že 5 zo 7 navrhnutých siRNA veľmi výrazne inhibuje expresiu tau proteínu. Hladina exprimovaného tau bola detegovaná pomocou vysokoafinitnej monoklonovej protilátky, rozpoznávajúcej všetky izoformy MAPT.

V nadväznosti na tieto experimenty sme optimalizovali transdukčné podmienky pre potkanie primárne neuróny izolované z cerebrálneho kortexu 18- dňových potkaních embryí. Je známe, že efektivita transdukcie adeno-asociovanými vírusmi „AAV“ v rôznych typoch tkanív významne závisí od serotypu AAV. Typickým príkladom sú bunky CNS. Niektoré serotypy preferenčne transdukujú gliové bunky, iné neuróny. Preto sme sa v prvom kroku zamerali na určenie optimálneho serotypu AAV pre transdukciu neurónov. Za týmto účelom sme použili rekombinantné AAV serotypu 1 a 2 (rAAV1 a rAAV2), obsahujúce sekvenciu pre zelený fluorescenčný proteín (GFP) pod cytomegalovírusovým promótorom, alebo pod promótorom pre ľudský synapsín (hSyn). Zistili sme, že rAAV1 prednostne transdukuje gliové bunky, kým rAAV2 neuróny, pričom (hSyn) výrazne zvyšuje hladinu expsie GFP.

V rámci optimalizácie vývoja špecifických rAAV vektorov ako transdukčného systému pre primárne cerebrokortikálne neuróny a *in vivo* aplikácie sme doposiaľ definovali podmienky pre prípravu rAAV v každej fáze produkcie špecifických vektorov: návrh vektora „in silico“, ko-transfekcie pre tvorbu rAAV v geneticky modifikovanej bunkovej línii AAV293, príprava primárnej suspenzie rAAV, afinitná purifikácia na HiTrap heparínovej kolóne, ultrafiltrácia rAAV, titrácia rAAV pomocou real time PCR, Western blotu a fluorescenčnej analýzy s GFP. Pomocou optimalizovaných metód sme pripravili dostatočné množstvo rAAV pre experimenty v systéme *in vitro* (približne $1-2 \times 10^9$ vírusových genómov/100 μ L). Naším cieľom je zvýšenie produkcie rAAV pre experimenty *in vivo* a pomocou bakulovírusovej technológie dosiahnuť titer minimálne $1-2 \times 10^{12}$ vírusových genómov/100 μ L.

Záver

V závere možno zhrnúť, že rekombinantné adeno-asociované vírusové vektory sú efektívnym nástrojom pri tvorbe bunkových a animálnych modelov závažných ľudských ochorení. Ich potenciál však siaha oveľa ďalej, a predpokladáme, že v blízkej budúcnosti budú vystupovať aj v úlohe biologík na báze nukleových kyselín vo forme rAAV. Predurčujú ich k tomu priaznivé vlastnosti, medzi ktoré patrí predovšetkým ich nepatogénnosť, extrachromozomálna lokalizácia a minimálna imunogénnosť. Významným míľnikom bol rok 2012, kedy bola v Európe po prvýkrát schválená génová terapia pre liečbu deficiencie lipoproteínovej lipázy u ľudí. Je možné, že v priebehu nasledujúceho desaťročia postúpi terapia na báze vyššie popísaných biologík na úroveň, v ktorej sa nachádzajú monoklonové protilátky, momentálne najúspešnejšie biologiká.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka financovaniu projektov APVV-0677-12 a LPP-0043-09

Literatúra

1. Bondareff, W., Wischik, C.M., Novak, M., Amos, W.B., Klug, A. & Roth, M. (1990). *Am. J. Pathol.*, 137, 711-723.
2. Braak, H. & Braak, E. (1991). *Acta Neuropathologica*, 82, 239 – 259.
3. Cente M, Filipcik P, Pevalova M, Novak M. (2006) Aug;24(4):1085-90.
4. Filipcik P, Cente M, Ferencik M, Hulin I, Novak M. (2006) Bratisl Lek Listy, 107(9-10):384-94. Review.
5. Garcia-Sierra, F., Ghoshal, N., Quinn, B., Berry, R. W. & Binder, L. I. (2003). *J. Alzheimers Dis.*, 5, 65-77.
6. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M. & Binder, L. I. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4913-4917.
7. Iqbal, K., Alonso Adel, C., Chen, S., Chohan, M. O., El-Akkad, E., Gong, C. X., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., Rahman, A., Tanimukai, H. & Grundke-Iqbal, I. (2005). *Biochim. Biophys. Acta*, 1739, 198-210.
8. Novak, M., Kabat, J. & Wischik, C. M. (1993). *Embo. J.* 12, 365-370.
9. Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (1996). *Nat. Med.*, 2, 871-875.
10. Yan, S.D., Chen, X., Schmidt, A.M., Brett, J., Godman, G., Zou, Y.S., Scott, C.W., Caputo, C., Frappier, T., Smith, M.A., Yen, S.H. & Stern, D. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 7787-7791.
11. Zilka, N., Filipcik, P., Koson, P., Vechterova, L., Skrabana, R., Zilkova, M., Rolkova, G., Kontsekova, E. & Novak, M. (2006). *FEBS Lett.* Jun 26;580(15):3582-3588.
12. Kovacech B a Novak M. 2010 *Curr Alzheimer Res.* 2010 Dec;7(8):708-16. Review.
13. Kovacech B, Kontsekova E, Zilka N, Novak P, Skrabana R, Filipcik P, Iqbal K, Novak M. *FEBS Lett.* 2007 Feb 20;581(4):617-22. Epub 2007 Jan 18
14. Pevalova M, Filipcik P, Novak M, Avila J, Iqbal K. *Bratisl Lek Listy.* 2006;107(9-10):346-53. Review.

BIOLOGICKÉ PREPARÁTY V REUMATOLÓGII: HISTÓRIA A SÚČASNOŠŤ

Rovenský, J.¹, Buc, M.², Kriška M¹

¹Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany
a ²Imunologický ústav LFUK, Bratislava

V historickom vývoji liečiv len máloktorá skupina priniesla tak významné zmeny v stratégii farmakoterapie vo viacerých medicínskych disciplínach ako biologické liečivá (BL). Azda najviac z tohto nového progresu profituje reumatológia kde novú pozíciu získala reumatoidná artritída (RA), ktorá celkovo v medicíne patrí na 3. miesto v počte klinicky skúšaných liečiv. Významný podiel biologických liekov ovplyvňujúcich systémové zápalové procesy patrí predovšetkým tým, ktoré neutralizujú alebo znižujú produkciu cytokínov. K dispozícii je už viac ako desiatka liečiv, ktoré ovplyvňujú aktivitu cytokínov na viacerých úrovniach (tab. 1). Sem na historicky prvé miesto patria najmä tie, ktoré neutralizujú TNF (faktor nekrotizujúci nádory).

Tab. 1 Prehľad biologík využívaných hlavne v reumatológii

- 1998 – infliximab (Remicade) – chimérová monoklonová protilátka (mAb) proti TNF, i.v. podanie každých 4 – 8 týždňov
- 1999 – etanercept (Enbrel) – anti-TNF receptor, s.c. aplikácia 1 – 2 x týždenne
- 2001 – anakinra (Kineret) – anti IL-1, aplikácia denne
- 2002 – adalimumab (Humira) – humánna protilátka anti-TNF, s.c. à 2 týždne
- 2005 – alefacept (Amenive) – LFA3-imunadhezín, aplikácia i.v. raz za týždeň
- 2007 – rituximab (Mabthera) v RA – chimérová myšia mAb – anti-CD20, i.v. aplikácia podľa odpovede
- 2007 – abatacept (Orencia) – CTLA-4 imunoahezín, i.v. à 4 týždne
- 2009 – tocilizumab (RoActemra) – humánna mAb anti-IL-6R, i.v. à 4 týždne
- 2009 – certolizumab pegol (Cimzia) , humanizovaná mAb anti-TNF, s.c. à 2 týždne
- 2009 – golimumab (Simponi) humanizovaná mAb anti-TNF mAb, s.c. aplikácia
- 2012 – tofacitinib (Xeljanz) – inhibítor Janusovej kinázy, aplikácia p.o.; registrácia pre RA aj od FDA aj od EMA

Biologické liečivá v záverečnom hodnotení III. fázy klinických skúšok

- 2012 – secukinumab – humánna mAb anti-IL-17, aplikácia s.c. raz mesačne
- 2012 – sarilumab – analóg tocilizumabu, aplikácia s.c.
- 2012 – pegsunercept – solubilný TNF-receptor; oproti etanerceptu má dlhšiu dobu účinku

Biologické liečivá v porovnaní s inými majú osobitné postavenie. Pri zovšeobecnení ich mechanizmov účinku na farmakodynamickom princípe založenom na interakcii protilátky s antigénom sa predpokladá, že tým, že sú vysokoselektívne sú aj bezpečnejšie. Podobné úvahy však často prispievajú k falošnej predstave bez výhrad o ich vysokej bezpečnosti. Reumatológovia však už majú nie tak dávnu skúsenosť s hypotézou proklamovanej selektivity a špecificity skupiny nesteroidových antiflogistík (NSA) – koxibov. Skúsenosti však tento všeobecne platný predpoklad nepotvrdili a stále platia staré pravdy farmakoepidemiológie:

- bezpečnosť sa dosahuje pri rešpektovaní individuálnych rizík pacientov,
- treba brať ohľad na adhérenciu pacientov k terapii najmä pri polymyorbidite,
- rešpektovať interakcie liekov pri polymorbidite,
- treba brať do úvahy aj zriedkavo (menej ako 1 : 10 000) sa vyskytujúce nežiaduce udalosti v dôsledku terapie, ktoré sa ale zato sa prejavujú veľmi intenzívne. Prípadne tiež v dôsledku prolongovanej hospitalizácie, komorbidity. Všetky vyššie spomínané udalosti môžu byť spojené s trvalými následkami a mortalitou (1).

Biologické lieky (bioterapeutiká) predstavujú skupinu liekov produkovaných živými bunkami pomocou technológie rekombinantnej DNA. Zvyčajne sa delia do troch kategórií:

1. lieky, ktoré sú takmer identické s prirodzenými látkami vytváranými v organizme sa používajú ako substitučná liečba alebo na zvýšenie tvorby týchto látok samotným organizmom,
2. monoklonové protilátky, ktoré sa viažu na solubilné alebo povrchové proteíny na bunkách a blokujú určité metabolické dráhy a funkcie bunky,
3. umelo vytvorené proteíny, ktoré napodobňujú receptory (solubilné receptory alebo antagonisti receptorov), ale sú rozpustné a navrhnuté tak, aby boli v ľudskom organizme stabilné.

Biologické lieky majú dôležité miesto v medicíne, v súčasnosti najmä v dermatológii, gastroenterológii, hematológii a v reumatológii. Od nízkomolekulových liekov sa odlišujú vo viacerých aspektoch (tab. 2).

Tab. 2. Porovnanie vlastností malých molekúl a biologických liekov

Vlastnosť	Malé molekuly	Biologické lieky
Hmotnosť (M _r)	100 – 1000	18 000 – 145 000
Výroba	Chemická syntéza	Produkované živými organizmami a izolované biotechnologickými procesmi
Štruktúra	Jednoduchá	Zložitá priestorová štruktúra citlivá na mnohé faktory

Základným rozdielom je veľkosť molekúl. Zatiaľ čo relatívna molekulová hmotnosť (M_r) syntetických liekov malých molekúl sa pohybuje v stovkách daltonov, v prípade proteínov hovoríme o desiatkach tisíc daltonov (napr. veľkosť IgG protilátok je 145 000 daltonov).

Biologické lieky, od jednoduchých hormónov až po komplexné monoklonové protilátky a rozpustné receptory, sú veľké zložité bielkoviny, s jedinečnou terciárnou a kvartérnou štruktúrou, ktorú nie je možné presne skopírovať. Primárnu štruktúru tvorí reťazec aminokyselín kódovaných sekvenciou nukleotidov v DNA. Sekundárna a terciárna štruktúra je založená na relatívne slabých väzbách a podlieha post-translačným zmenám. Kvartérna štruktúra je citlivá na vonkajšie podmienky. V závislosti od rôznych podmienok skladovania a distribúcie môže dochádzať k denaturácii a agregácii proteínov. Aj drobné rozdiely vo výslednej štruktúre dokážu významne ovplyvniť farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti finálneho produktu, s dopadom na jeho účinnosť a bezpečnosť. Proces výroby biologických liekov pozostáva z viacerých krokov, ktoré sú validované a štandardizované. Najprv sa príslušná sekvencia žiadaneho génu transfekuje do buniek do bunkovej línie. Potom nasleduje fermentácia požadovanej bielkoviny, jej separácia, extrakcia a purifikácia, až sa získa liek, ktorý má definovanú kvalitu, stabilitu a čistotu. Každý liek proteínovej povahy má aj riziko imunogénnosti, a preto môže navodiť nežiaduce účinky, ktoré zahŕňajú alergické, anafylaktické reakcie, sérovú chorobu, neutralizáciu proteínu, stratu účinku a pod. Hoci sú známe mnohé faktory, ktoré prispievajú k týmto reakciám, výskyt a klinický význam imunogénnosti zostáva pri konkrétnom lieku nepredvídateľný, pokiaľ nie je overený v klinických štúdiách (2).

Manažment reumatoidnej artritídy (RA) spočíva predovšetkým v používaní anti-reumatických liekov modifikujúcich chorobu (DMARDs). Tieto látky charakterizuje ich schopnosťou zmierniť alebo potlačiť príznaky a symptómy, postihnutie, zhoršenie kvality života, pracovnú neschopnosť a progresiu poškodenia kĺbov, a tým zasahovať do celého procesu choroby. DMARDs tvoria dve hlavné triedy: syntetické chemické zlúčeniny (sDMARDs) a biologické látky (bDMARDs). V tejto súvislosti sa nedávno navrhlo nové názvoslovie pre DMARDs, ktoré bude treba dodržiavať. V dôsledku toho bude pojem konvenčné sDMARDs (csDMARDs) zahŕňať chemické látky, ako je metotrexát (MTX), sulfasalazín a leflunomid, pričom tofacitinib, nový sDMARD, špeciálne zacielený na Janusove kinázy (JAKs), sa bude označovať ako cielený sDMARD (tsDMARD). Päť dostupných inhibítorov TNF (adalimumab, certolizumab pegol, etanercept, golimumab a infliximab), inhibítor kostimulácie T-lymfocytov, abatacept, inhibítor aktivity B-lymfocytov a ich počtu, rituximab, blokujúca monoklonová protilátka proti receptoru pre interleukín 6, tocilizumab, ako aj inhibítor pôsobenia IL-1, anakinra, budú zaradené ako biologický originálne lieky (boDMARDs), pričom biosimilárne lieky (bs) budú označované ako bsDMARDs, napr. bs-infliximab, ktorý nedávno schválila Európska agentúra pre lieky (EMA).

Špecifickejšie položky sa vzťahujú na začatie DMARD-liečby pomocou konvenčnej sDMARD (csDMARD) stratégie v kombinácii s glukokortikoidmi a následne pridaním bDMARD alebo inej csDMARD stratégie (po stratifikácii podľa prítomnosti alebo absencie nepriaznivých rizikových faktorov) v prípade, že sa terapeutický cieľ nedosiahne do 6 mesiacov (alebo ak nevidieť zlepšenie do troch mesiacov). Inhibítory TNF (adalimumab, certolizumab pegol, etanercept, golimumab, infliximab, biosimilárne lieky), abatacept, tocilizumab a za určitých okolností aj rituximab, sa v zásade považujú za podobne účinné a bezpečné. Ak prvá bDMARD stratégia zlyhá, môže sa použiť akákoľvek iná bDMARD stratégia. Odporúčania sa zaoberajú aj tofacitinibom ako cieľným sDMARD (tsDMARD), ktorý sa v prípade licencie odporúča po použití aspoň jedného bDMARD. Odporúčania sa zaoberajú aj biosimilárnymi liekmi. Cieľom týchto odporúčaní je informovať reumatológov, pacientov, národné reumatologické spoločnosti a iných zainteresovaných o najnovšom konsenze EULAR týkajúcom sa manažmentu RA pomocou sDMARDs, glukokortikoidov a bDMARDs. Sú založené na dôkazoch a názoroch odborníkov a ich cieľom je zlepšenie výsledkov liečby pacientov s RA (3).

Čitateľov, ktorí by sa chceli podrobnejšie oboznámiť s biologickými liečivami odporúčame na dve monografie Fusek et al. (4) a Buc (5).

Literatúra

1. Kriška M, Rovenský J, Nová legislatívna EÚ v hodnotení liekov s aspektom na biologické lieky. *Rheumatol* 2013; 27 (2): 107-12.
2. Rovenský J, Jurgoš Ľ, Pěč J, Štandardný diagnostický a terapeutický postup. Racionálna liečba biologicky podobnými liekmi v indikáciách bioterapeutík. 58. metodický list racionálnej farmakoterapie 2013; 16 (7): 1-4.
3. Smolen J S, Landewé R, Breedveld F C et al. Odporúčania EULAR pre manažment RA syntetickými a biologickými ochorení modifikujúcimi antireumatickými liekmi. *Rheumatol* 2014; 28(1): 1-25.
4. Fusek M, Víték L, Blahoš J et al. *Biologická léčivá*. Praha: Grada 2012, 234 s.
5. Buc M, *Základná a klinická imunológia*. Bratislava: Veda 2012, 831 s.

BIOLOGICKÁ LIEČBA PRI REUMATOIDNEJ ARTRITÍDE

Lukáč J, Lukáčová O.

Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany

Úvod

Reumatoidná artritída je chronická autoimunitná zápalová choroba neznámej etiológie. Prejavuje sa chronickou artritídou a vznikom kĺbových deštrukcií a deformít. Častým klinickým nálezom sú aj mimokĺbové prejavy – najčastejšie reumatoidné uzly, vaskulitída, serozitídy a postihnutie pľúc. Priebeh je chronický, často s obdobiami reaktívacie a nízkej aktivity. Postihuje 0,5 – 1 % populácie (1, 2, 3). Prežívanie pacientov s RA je skrátené o 5– 7 rokov v porovnaní s populáciou zdravých osôb.

Etiopatogenéza reumatoidnej artritídy

Predpokladá sa, že faktory vonkajšieho prostredia (infekcie, fajčenie) u geneticky predisponovaných osôb vyvolávajú aktiváciu buniek imunitného systému – najmä T- a B-lymfocytov a nadmernú produkciu prozápalových cytokínov, predovšetkým faktora nekrotizujúceho nádoru (TNF), interleukínu 1 (IL-1) a interleukínu 6 (IL-6). Dôsledkom týchto zmien je migrácia zápalových buniek do kĺbov a aktivácia osteoklastov. Dochádza k sekrécii tkanivových metaloproteináz, ktoré deštruuju kĺbové štruktúry – kostné tkanivo a kĺbovú chrupku.

Priebeh reumatoidnej artritídy

Priebeh RA u jednotlivých pacientov je rôzny, dôležité je preto včasné rozoznanie nepriaznivých prognostických faktorov RA. Pri výskyte stredne závažných a závažných faktoroch sa poškodenie na kĺboch postupne zväčšuje. Dôsledkom kĺbového poškodenia je disabilita a výrazné zníženie kvality života.

Liečba reumatoidnej artritídy

Liečba RA musí byť včasná a komplexná, spojená s pravidelným monitorovaním aktivity a možných nežiaducich účinkov (NÚ) liečby.

Cieľom liečby je:

1. dosiahnuť remisiu choroby, alebo
2. znížiť aktivitu choroby a
 - tým zmierniť bolesti
 - zachovať alebo zlepšiť funkčnú schopnosť pohybového aparátu
 - zlepšiť kvalitu života chorých – spomaliť alebo zastaviť progresiu

Základom správnej liečby RA je včasné stanovenie diagnózy, posúdenie klinickej aktivity choroby a funkčného stavu, vyšetrenie laboratórnych testov a autoprotílátok, vyhodnotenie štruktúrnych zmien, vyhodnotenie prognostických faktorov a priebehu

RA a včasné zavedenie adekvátnej liečby, ktorá môže byť nefarmakologická a farmakologická.

Nefarmakologická liečba pozostáva z poučenia pacienta, úpravy denného režimu, fyzikálnej a rehabilitačnej liečby, prípadne chirurgickej liečby.

Farmakologická liečba je komplexná. Na liečbu bolestivých stavov sa využívajú nesteroidové antiflogistiká a analgetiká. **Glukokortikoidy** sú indikované predovšetkým v období vysokej aktivity a akútnych prejavov – na preklenutie obdobia do začiatku účinku chorobu modifikujúcich liekov. **Antireumatiká modifikujúce chorobu** (DMARDs) sú skupinou liekov, ktorá má rôznu chemickú štruktúru a rôzny mechanizmus účinku. Nemajú priamy analgetický účinok, ich liečebný účinok nastupuje po niekoľkých týždňoch a pretrváva rôzne dlhý čas aj po ich vysadení. Antireumatiká modifikujúce chorobu zasahujú do imunopatologických procesov pri RA, znižujú proteíny akútnej fázy, znižujú klinickú aktivitu RA a môžu spomaľovať alebo zastavovať rtg progresiu RA. Rozdeľujú sa na syntetické DMARDs (sDMARDs) a biologické DMARDs (bDMARDs) (4). **Syntetické DMARDs** sa rozdeľujú na: a) konvenčné (cDMARDs) – napr. metotrexát, sulfasalazin, leflunomid, hydroxychlorochín, soli zlata, cyklosporín A b) cieleňé –targeted (tsDMARDs, napr. tofacitinib).

Biologické DMARDs (bDMARDs) sú originálne biologické (boDMARDs) a biologicky podobné lieky (biosimilars – bsDMARDs) (5, 6, 7).

Liečba aj biologickými liekmi aj syntetickými DMARDs je najúčinnnejšia pri včasnom podaní lieku. Včasným zavedením účinnej liečby predídeme vzniku ireverzibilných zmien na kĺboch a deformitám. Včasná liečba vedie spravidla k zastaveniu rtg progresie choroby, navodeniu remisie choroby a zlepšenie kvality života.

Biologická liečba RA

Biologická liečba účinkuje cielene na presne definované miesto v patogenetickom procese RA. Jej vývoj umožnilo poznanie patogenetických mechanizmov pri RA.

Biologická liečba RA sa v klinickej praxi začala v Slovenskej republike využívať začiatkom 21. storočia. Prvým liekom kategorizovaným pre liečbu RA bol infliximab.

Infliximab je monoklonová chimérická protilátka proti TNF, ktorá obsahuje v svojej molekule 25 % myšieho proteínu. Účinkuje proti solubilnému aj na membránu viazanému TNF. Používa sa v kombinácii s metotrexátom.

Adalimumab je humanizovaná monoklonová protilátka, ktorú možno podávať v monoterapii alebo v kombinácii s metotrexátom. V kombinácii s metotrexátom je účinnejšia ako v monoterapii. **Etanercept** je plne humánna rekombinantná molekula, ktorá sa skladá z Fc-fragmentu ľudského IgG1 a receptora pre TNF (p75). Viaže a neutralizuje solubilný aj na membrány viazaný TNF. Na rozdiel od monoklonových anti-TNF protilátok nevyvoláva lýzu a apoptózu buniek, ktoré exprimujú TNF, a čo je dôležitejšie, ani neutralizačné protilátky, ktoré by znižovali jeho účinnosť.

Certolizumab je modifikovaná monoklonová protilátka s anti-TNF účinkom, ide o jej Fab-fragment, na ktorý je nadviazaný pegol (polyetylénglykol). Certolizumab

neutralizuje solubilný aj membránovo viazaný TNF. Väzba monoklonovej protilátky na pegol zabezpečuje dlhší biologický polčas, preferenčnú distribúciu v zápalových tkanivách a vzhľadom na to, že neobsahuje Fc-fragment, nedochádza k fixácii komplementu. Certolizumab podobne ako etanercept nevyvoláva apoptózu monocytov a lymfocytov v periférnej krvi a neovplyvňuje degranuláciu lymfocytov. **Golimumab** je plne humánna monoklonová protilátka proti TNF, ktorá inhibuje solubilný aj transmembránový TNF. **Rituximab** je chimerická monoklonová protilátka, ktorá sa viaže na antigén CD20 na povrchu zreých B-lymfocytov a ich prekursorov. Rituximab spôsobuje prechodnú, takmer úplnú depléciu B-lymfocytov v krvi – jeho účinok koreluje so stupňom deplécie. Je účinný predovšetkým u pacientov so séropozitívnou RA, u pacientov s vysokou aktivitou RA a vaskulitídou. Rituximab možno indikovať u pacientov, u ktorých je liečba anti-TNF neúčinná alebo kontraindikovaná.

Tocilizumab je rekombinantná monoklonová protilátka proti receptoru pre interleukín 6 (IL-6). Viaže sa na solubilný aj na membrány viazaný receptor pre IL-6R. IL-6 sa uplatňuje v patogenéze akútneho a chronického zápalu, stimuluje tvorbu proteínov akútnej fázy a zvyšuje aktiváciu osteoklastov. **Abatacept** je fúzovaný proteín CTLA-4–IgG1, ktorý sa skladá z domény humánneho CTLA-4 a z Fc-fragmentu ľudského IgG1. Viaže sa na molekuly CD80 a CD86 na povrchu buniek prezentujúcich antigén (APC) a zabraňuje ich väzbe na molekuly CD28 na pomocných T-lymfocytoch. Tým zabráni prenosu kostimulačných signálov z APC na T-lymfocyty a zabráni tak ich aktivácii. **Anakinra** je rekombinantná neglykozylovaná forma humánneho receptoru IL-1RA. Vyvážuje interleukín 1 (IL-1) a tým bráni jeho väzbe na svoj receptor IL-1R prítomný na početných bunkách tkanív a orgánov; výsledkom je utlmenie zápalových procesov.

Tofacitinib je malá molekula syntetizovaná chemicky; aplikuje sa perorálne. Inhibuje Janusove kinázy, konkrétne JAK3, čím interferuje s transkripciou génov. Patrí takto medzi lieky, ktoré pôsobia cielene („targeted therapy“). Účinok tofacitinibu bola porovnateľná s adalimumabom a ďalšími biologickými DMARD (8, 9).

Indikácie biologickej liečby RA

Biologická liečba RA je indikovaná u pacientov s pretrvávajúcou vysokou aktivitou RA, u ktorých liečba štandardnými DMARDs nebola dostatočne účinná alebo bola kontraindikovaná. Podávanie BL možno zvážiť i v prípadoch pretrvávajúcej aktivity RA s progresiou štruktúrnych kĺbových zmien v rtg obraze. Aktivita RA sa hodnotí kompozitným indexom (disease activity score) DAS28. Skóre DAS 28 $\geq 5,1$ sa hodnotí ako vysoká aktivita RA (10, 11, 12).

Účinnosť biologickej liečby RA

Nezistil sa významný rozdiel v účinnosti jednotlivých biologických liekov na aktivitu RA. Väčšina biologických liekov (infiximab, golimumab, abatacept, rituximab, anakinra) sa môže podávať iba v kombinácii s metotrexátom, iba liečba adalimumabom, etanerceptom, certolizumabom a tocilizumabom si nevyžaduje súčasné podávanie me-

totrexátu. Na druhej strane BL v kombinácii s metotrexátom je účinnejšia ako v monoterapii. Výnimkou je tocilizumab; podľa klinických štúdií je účinnosť tocilizumabu v monoterapii rovnako účinná ako v kombinácii s metotrexátom.

Biologická liečba je účinná u viac ako 60 % pacientov rezistentných na liečbu štandardnými DMARDs. Remisia RA sa dosahuje až u tretiny pacientov na BL. Významný prínos BL je v tom, že účinok niektorých biologických liekov nastupuje už po niekoľkých dňoch, zriedkavo sa terapeutický efekt zaznamená až po niekoľkých mesiacoch. Biologická liečba zastavuje rádiografickú progresiu, dokonca aj u pacientov, u ktorých sa nedosiahne remisia alebo nízka aktivita základnej choroby. Biologická liečba znižuje hladiny proteínov akútnej fázy a celkove zlepšuje kvalitu života pacientov. V prípade neúčinnosti jedného biologického lieku je možná jeho zámena za iný biologický liek (13, 14). Okrem RA sa uvedené lieky užívajú aj v liečbe iných zápalových reumatických chorôb ale svoje uplatnenie našli aj v dermatológii a gastroenterológii (Tab. 1).

Nežiaduce účinky biologickej liečby

Najčastejším nežiaducim účinkom (NÚ) biologickej liečby sú infúzne reakcie pri infúzne podávanej BL a lokálne reakcie v mieste vpichu pri subkutánne podávanej látky. Vyskytnúť sa môžu i alergické reakcie. Liečba biologikami s anti-TNF účinkom je spojená s rizikom aktivácie latentnej tuberkulózy. Preto pred zavedením liečby biologickým liekom je potrebné vyšetrenie „QuantiFERON TB gold“ testom a pneumologické vyšetrenie vrátane rtg hrudníka a Mantoux testu (15). Ďalším NÚ je častejší výskyt infekcií – vrátane oportúnnych infekcií. Dôkazy o výskyte lymfómov alebo solídnych nádorov nie sú jednoznačné, pretože výskyt non-Hodgkinových lymfómov pri RA, osobitne pri RA s vysokou aktivitou, je zvýšený. Pri podávaní BL sa však preukázal vyšší výskyt nemelanómových kožných nádorov. Pri BL sa vyskytuje pozitívita ANA a anti-dsDNA protilátok. U niektorých pacientov s autoprotilátkami sa môžu zaznamenať i príznaky systémového lupus erythematosus (lupus indukovaný liekmi).

U časti pacientov s RA sa vytvárajú protilátky proti biologickým liekom. Táto imunitná odpoveď na biologické lieky (imunogénnosť) je jedným z hlavných dôvodov neúčinnosti liečby infliximabom alebo adalimumabom. Výsledky štúdií o imunogénnosti ostatných anti-TNF liekov nie sú jednoznačné.

Biosimilars

Po skončení patentovej ochrany originálnych biologických liekov sa v súčasnosti do klinickej praxe dostávajú lieky s podobnými biologickými účinkami ako originálne lieky- tzv. **biosimilars**. Nie sú to identické prípravky s pôvodnými originálnymi liekmi, pretože biologické lieky sú produkované živými systémami (baktérie, kvasinky, alebo bunky cicavcov). Sú to veľké molekuly, proteíny alebo polypeptidy. Sekvencia aminokyselín týchto makromolekúl je zhodná s originálnym liekom, rozdiel je v priestorovom usporiadaní molekuly a naviazanými oligosacharidovými postrannými skupinami (8).

Záver

Biologická liečba RA je účinná aj v prípadoch, ak je prítomná rezistencia na štandardné DMARDs. Je účinná i pri dlhodobom podávaní. V súčasnosti sú skúsenosti i s viac ako 10-ročným podávaním biologických liekov. Podáva sa v centrách biologickej liečby zápalových reumatických chorôb a ich preskripcia podlieha schváleniu revíznym lekárom.

Literatúra

1. Pavelka K., Vecovský J., Tegzová D.: TNF blokujuce lieky, in. Pavelka K.: Farmakoterapie revmatických onemocnení, Grada, Avicenum, 2005, s. 147 – 162.
2. Pavelka K.: Biologická léčba, in: Pavelka K., Vencovský J., Horák P., Šenolt L., Mann H., Štěpán J.: Revmatologie, Maxdorf-Jesenius, 2012, s. 191 – 226
3. Rovenský J. a kol.: Reumatoidná artritída. In: Rovenský J., Pavelka K. a spol.: Klinická reumatológia, Martin, vyd. Osverta, 2000, 1048 s.
4. Smolen J., Landewé R., Breedveld F.C. a kol.: EULAR recommendationsforthemangementofrheumatoidarthritiswithsynthetic and biologicaldisease-modifyingantirheumaticdrugs: 2013 update, *AnnRheumDis*, 2014, 73, s. 492 – 509
5. Smolen J.S., Aletaha D., Koeller M. a kol.: New therapiesforthetreatmentofrheumatoidarthritis. *Lancet*, 2007, 370, s.1861- 1874
6. Gaujoux-Viala c., Smolen J.S., Landewe R. a kol.: Currentevidenceforthemangementofrheumatoidarthritiswithsyntheticdisease-modifyingantirheumaticdrugs: a systemicliteraturereviewinformingthe EULAR recommendationforthemangementofrheumatoidarthritis. *AnnRheumDis*, 2010, 69, s. 1004-1009.
7. Smolen J.S., van der Heijde D., Machold K.P a kol.: Proposalfor a new nomenclatureofdisease-modifyingantirheumaticdrugs. *AnnRheumDis*, 2014, 73, s. 3-5
8. Gaujoux-Viala C., Nam J.L., Ramiro S. a kol.: Efficacyofconventionalsyntheticdisease-modifyingantirheumaticdrugs, glucocorticoids and tofacitinibe – a systemicliteraturereviewinformingthe 2013 updateofthe EULAR recommendationsforthemangementofrheumatoidarthritis. *AnnRheumDis*, 2014, 73, s 510 – 515
9. Smolen J.S., Aletaha D., Bijlsma J.W.J. a kol.: Treatingrheumatoidarthritis to target: recommendationofaninternationaltaskforce. *AnnRheumDis*, 2010, 69, s. 631-637
10. Smolen J., Landewé R., Breedveld F.C. a kol.: EULAR recommendationsforthemangementofrheumatoidarthritiswithsynthetic and biologicaldisease-modifyingantirheumaticdrugs. *AnnRheumDis*, 2010, 69, s. 964 – 975
11. Nam J.L., Winthrop K.L., vanVollenhoven R.F. a kol.: Currentevidenceforthemangementofrheumatoidarthritiswithbiologicaldisease-modifyingantirheumaticdrugs: a systemicliteraturereviewinformingthe EULAR recommendationsforthemangementof RA. *AnnRheumDis*, 2010, 69, s. 976 – 986
12. Gorter S.L., Bijlsma J.W., Cutulo M. a kol.: Currentevidenceforthemangementofrheumatoidarthritiswithglucocorticoids: a systemicliteraturereviewinformingthe EULAR recommendationforthemangementofrheumatoidarthritis. *AnnRheumDis*, 2010, 69, s. 1010-1014
13. Knevel R., Schoels M., huizinga T.W. a kol.: Currentevidencefor a strategicapproach to themangementofrheumatoidarthritiswithdisease-modifyingantirheumaticdrugs: a systemicliteraturereviewinformingthe EULAR recommendationsforthemangementofrheumatoidarthritis.

- darthritis. *AnnRheumDis*, 2010, 69, s. 987-994
14. Aletaha D., Smolen J.S.: Jointdamage in rheumatoidarthritisprogresses in remisionaccording to rhediseaseActivityScore in 28 jointsanitdriven by residualswoollenjoints. *ArthritisRheum*, 2011, 63, s. 3702-3711
15. Aletaha D., Landewe R., Karonitsch T a kol.: Reportingdiseaseactivity in clinicaltrialsotpatientswithrheumatoidarthritis: EULAR/ACR collaborativerecommendations. *AnnRheumDis*, 2008, 67, s. 1360 – 1364

Tab.1**Biologické lieky registrované v Slovenskej republike pre liečbu RA**

Liaky	Zloženie	Dávkovanie	Indikácie
Adalimumab	Humánna monoklonová protilátka proti TNF	40 mg á 2 týždne s.c.	RA, AS, PsA, JIA, axiálnaspondylartritída, MC, uveitída, psoriáza
Etanercept	Humánna rekombinantná molekula s 2 receptormi p75 viazaných na Fc-fragment IgG1	50 mg á 1 týždeň s.c.	RA, AS, PsA, JIA
Infliximab	Chimérová monoklonová protilátka proti TNF	3 – 7,5 mg/kg i.v. á 8 týždňov i.v.	RA, AS, PsA, MC, UC
Golimumab	Humánna monoklonová protilátka proti TNF	50 mg s.c. á 4 týždne	RA, AS, PsA,
Certolizumab	Humánna monoklonová protilátka bez Fc-fragmentu proti TNF	400 mg s.c. v týždni 0, 2, 4 a potom 200 mg á 2 týždne	RA, AS, PsA,
Rituximab	Chimérová monoklonová anti-CD20 protilátka	1000 mg i.v. 1. a 15. deň, následne kúru opakovať á 6 mesiacov	RA, ANCA asociované vaskulitídy
Abatacept	Fúzovaný proteín CTLA-4 s IgG1	10 mg/kg za 4 týždne i.v.	RA, JIA
Tocilizumab	Humanizovaná monoklonová protilátka proti receptoru pre IL-6	8 mg/ kg i.v. á 4 týždne	RA, JIA
Anakinra	Antagonista receptora pre interleukín 1 (IL-1RA)	s.c. denne	RA

RA – reumatoidná artritída, PsA – psoriatická artritída, JIA – juvenilná idiopatická artritída, AS – ankylozujúca spondylitída, MC – morbus Crohn, UC – ulcerózna kolitída

VÝZNAM BIOLOGICKEJ LIEČBY PRI JUVENILNEJ IDIOPATICKEJ ARTRITÍDE

Košková Elena

Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany

Úvod

V ostatných dvoch dekádach došlo k významnému rozvoju pediatrickej reumatológie. Podmienili ho hlavne tri skutočnosti. Prvým dôležitým činom bolo vytvorenie spoločného názvu juvenilná idiopatická aritída (JIA) konsenzom expertov z Európy a Ameriky a vytvorenie medzinárodnej klasifikácie. Nakoľko ide o heterogénnu chorobu, cieľom klasifikácie bolo ohraničiť čo najhomogénnejšie subtypy. Klasifikácia bola publikovaná v r.1995, jej prvá revízia bola urobená v r.1997, posledná, doteraz platná druhá revízia, v r.2001 a pracuje sa už na ďalšej revízii (1, 2).

Juvenilnú idiopatickú artritídu (JIA) definujeme ako najčastejšie sa vyskytujúcu artritídu neznámej etiológie, ktorá začína pred 16. rokom života a trvá najmenej 6 týždňov po vylúčení inej príčiny artritídy. Odlišujeme 7 kategórií choroby, ktoré sú presne definované. Systémová forma JIA (sJIA) je najzávažnejšia, nakoľko okrem artritídy a horúčok postihuje aj iné orgány. Závažnou komplikáciou asi u 5 – 8 % pacientov so sJIA môže byť syndróm aktivovaných makrofágov (MAS), ktorý sa najčastejšie podieľa na príčine smrti. Unikátna entita pre detský vek je oligoartritída, ktorá postihuje 1 až 4 kĺby do 6 mesiacov od začiatku choroby s relatívne dobrou prognózou. Polyartritída pri JIA postihuje 5 a viac kĺbov prvých 6 mesiacov od začiatku choroby. Môže mať prítomný reumatoidný faktor a najviac sa podobá reumatoidnej artritíde dospelých. Častejšie sa vyskytuje hlavne u dievčat polyartritída s negatívnym reumatoidným faktorom. Psoriatická artritída predstavuje ďalšiu kategóriu JIA Entezitída a artritída u chlapcov nad 6 rokov je spojená s prítomnosťou HLA-B27 antigénu. Napokon je nediferencovaná artritída, ktorá nespĺňa kritériá žiadnej z vyššie uvedených kategórií, resp. spĺňa kritériá dvoch a viac uvedených kategórií (1).

Ďalším dôležitým činom bolo vypracovanie klinických ukazovateľov tzv. „core set“ pre monitorovanie aktivity choroby, kvality života, ako aj definovanie zlepšenia resp. vzplanutia choroby (4,5,6). Validované merania odpovede na liečbu JIA tzv. ACR kritérií (American College of Rheumatology) akceptuje Food and Drug Administration (FDA) a European Medical Administration (EMA). Zavedenie špecifickej legislatívy pre vývoj terapie v pediatrii v Európe a USA zastrešuje veľká medzinárodná sieť PRINTO (The Pediatric Rheumatology International Trials Organization)/PRCSG (Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group). Klinické štúdie na medzinárodnej úrovni s etanerceptom, adalimumabom, tocilizumabom a abataceptom umožnili ich zavedenie do klinickej praxe (7).

Metódy

V Národnom ústave reumatických chorôb v Piešťanoch sme prvých pacientov začali liečiť etanerceptom (ETA) v novembri 2004 a do roku 2013 to bolo spolu 63 pacientov, z toho 19 chlapcov a 44 dievčat vo veku od 4 do 18 r. po predchádzajúcom písomnom súhlase rodičov. Tabuľka 1 uvádza rozloženie pacientov podľa typu JIA. Všetci pacienti museli spĺňať kritériá podľa odporúčania NHS (National Institute for Clinical Excellence) z r. 2002 a revidovaných v r. 2005. Išlo o pacientov s aktívnym polyartikulárnym postihnutím, s jednoznačne potvrdenou diagnózou JIA, u ktorých nebol dostatočný efekt liečby metotrexátom, resp. jeho intoleranciou. V r. 2011 ACR rozšírila indikácie biologickej liečby o faktory so zlou prognózou – pri oligoartikulárnej forme je to artritída bedrového kĺbu a krčnej chrbtice, artritída členkov alebo zápästí, pretrvávajúce vysokej zápalovej aktivity a rádiografické zmeny. Ďalšími indikáciami biologickej liečby bola dlhodobá liečba glukokortikoidmi v dávke >0.2 mg/kg a trvanie aktivity choroby viac ako 6 mesiacov. Podmienkou zaradenia bolo vylúčenie tuberkulózy po vyšetrení u pneumológa s negatívnym Mantoux II testom, neskôr aj s negatívnym Quantiferónovým testom. Okrem toho sa musela vylúčiť hepatitída typu B a HIV-infekcia, imunodefícia, premalígný stav a malignita.

Výsledky

Remisiu choroby dosiahlo 41 (58 %) pacientov, z ktorých remisiu pri liečbe MTX dosiahlo 13 pacientov a remisiu, kedy sa mohla kompletne vysadiť liečba dosiahlo 28 pacientov. Významne lepší efekt liečby mali pacienti s kratšou dĺžkou trvania choroby pred zavedením biologickej liečby. Remisia s vysadením liečby sa dosiahla pri priemernom trvaní choroby 3,9 roka oproti pacientom s 6,2 roka, u ktorých sa ponechala bazálna liečba.

Podľa typu JIA, remisia sa dosiahla u jediného pacienta s psoriatickou artritídou, u 4 zo 6 pacientov s entezitídou asociovanou s artritídou a u okolo polovice pacientov s inými formami JIA (tab. 2).

Liečbu anti-TNF sme predčasne ukončili u 12 pacientov (19 %), z toho pre neúčinnosť alebo stratu účinku u 7 pacientov (11 %), z ktorých až 5 malo polyartritídu so systémovým začiatkom. Pre pre závažné vedľajšie účinky sa liečba ukončila u 5 pacientov (2 pacienti mali autoimunitné komplikácie – trombocytopenickú purpura, výstup ANA a ENA protilátok s vaskulitídou, Crohnova choroba u jedného pacienta s pozitívou HLA- B27 antigénu, jeden pacient mal časté infekcie s uveitídou a jeden pacient mal alergický exantém) (tab. 3).

Nežiaduce účinky, pre ktoré sa liečba zmenila, sa objavili celkovo u 11 pacientov (26 %). Z nich u 10 sme zmenili liečbu na adalimumab (ADA) (pre uveitídu 6 pacientov, pre alergický exantém 3 pacientov a pre flu-like syndróm 1 pacientky). U jednej pacientky s hypervaskularizáciou močového mechúra sme zmenili liečbu na abatacept.

K vedľajším účinkom, ktoré viedli k dočasnému prerušeniu liečby patrili infekcie horných dýchacích ciest (streptokoková infekcia šarlach, angína 2x a asymptomatická

streptokoková infekcia), brochopneumónia 2x, z toho 1x vyvolaná *Chlamýdiou pneumoniae*, varicella, infekcia močových ciest, kožné nfekcie a to impetigo, flegmóna v mieste vpichu, infekcia herpes zoster. Infekčné komplikácie sa objavili väčšinou v prvý rok liečby.

U pacientov s dosiahnutou remisiou sa významne urýchlil rast s objavením rastového špurtu v 2. roku liečby, ktorý pokračoval rovnomerne do 18. roku života.

Diskusia

Juvenilná idiopatická artritída je prognosticky závažná choroba. JIA často perzistuje do dospelého veku, vedie k dlhotrvajúcej morbidite so závažným funkčným poškodením a častou retardáciou rastu (8). Najhoršiu prognózu mala polyartikulárna forma, pri ktorej sa dosiahla remisia len u 15 % pacientov v priebehu 10 rokov (13). V patogenéze predpokladané spúšťače JIA zahŕňajú genetické a environmentálne faktory ako sú infekcie a vakcinácia. Rôzne antigény spúšťajú zápalovú odpoveď autoreaktívnych T-lymfocytov v kĺbe. CD4⁺ T-lymfocyty majú kľúčovú úlohu v patogenéze JIA. Okrem špecifickej imunity sa zároveň aktivujú aj iné bunky nešpecifickej, vrodenej imunity ako sú makrofágy, synoviocyty a iné bunky. Výsledok tejto aktivácie je tvorba mnohých prozápalových mediátorov a cytokínov (9). Analýza cytokínov ukázala podobný profil v plazme a synoviavom výpotku pri oligoartikulárnej a polyartikulárnej forme JIA (11). Objavenie kľúčovej úlohy cytokínov ako sú faktory nekrotizujúce nádory (TNF) a IL-6 a IL-17 sa stalo východiskom biologickej liečby nielen dospelých pacientov s reumatoidnou artritídou, ale aj pre pacientov s JIA.

Navodenie aj klinickej aj laboratórnej remisie choroby zásadne mení jej prognózu a ovplyvňuje kvalitu života a ako ukázali naše výsledky zabezpečí normálny rast a vývoj dieťaťa.

V patogenéze sJIA má kľúčovú úlohu IL-6, čo vysvetľuje neúčinnosť anti-TNF liečby u časti našich pacientov so sJIA. Časť pacientov so sJIA má aktiváciu vrodenej imunity s nadmernou tvorbou IL-1 a spĺňa klasifikáciu autozápalovej choroby (10).

Hoci polyartritída s pozitívou RF sa nachádza iba 5 % populácie pacientov s JIA, pretrvávajúca aktivita choroby vedie k včasnému poškodeniu kĺbov. Patogenéza je podobná reumatoidnej artritíde u dospelých pacientov.

Aktivácia B-lymfocytov hrá úlohu v patogenéze oligoartritídy s ANA-pozitívou, ktorá postihuje najčastejšie dievčatá pred 6. rokom života. Napriek dobrej prognóze z hľadiska artritídy, u časti pacientiek sa vyvinie chronická iridocyklitída podobne ako pri polyartritíde RF negatívnej s ANA pozitívou (12). Incidencia uveitídy asociovanej s JIA sa odhaduje ročne na 11 prípadov na 100 000. Chronická uveitída má závažné následky ako poškodenie zraku až u tretiny a slepotu u desatiny postihnutých očí (14). Ukázalo sa, že IF-ANA pozitívny titer ≥ 320 (vyšetrenie imunofluorescenciou na HEp2-bunkách, nie ELISA metódou) možno považovať spolu s anthistónovými protilátkami (AHA) za riziko objavenia sa chronickej uveitídy (3).

Veľa sa polemizuje o objavení sa uveitídy v priebehu liečby etanerceptom. Ukazuje

sa, že liečba etanerceptom môže za určitých okolností viesť k jej indukcii alebo exacerbácii (15). Našich pacientov s uveitídou sme preto previedli na adalimumab s dobrým efektom, len u jednej pacientky liečba uveitídy zostala po dvoch rokoch neúčinná a vlni pre výrazné zhoršenie sme prešli na liečbu abataceptom (16).

Vývoj zápalovej choroby čriev (IBD) Crohnovej choroby sme zaznamenali u pacienta s entezitídou asociovanou s artritídou, ktorá môže vyústiť do spondyloartropatie. Francúzski autori popísali Crohnovu chorobu iba u 0,15 % pacientov so spondyloartropatiou liečených etanerceptom (17). Objavenie sa nových autoprotilátok v priebehu liečby etanerceptom sme zaznamenali u našich troch pacientov, popisuje sa však u pacientov s JIA zriedkavejšie ako u dospelých pacientov (18).

Zavedenie biologickej liečby oproti minulosti zamená vyššie požiadavky na ciele liečby vrátane bezpečnosti liečby tak z krátkodobého ako aj dlhodobého hľadiska. Biologiká sa líšia rôznou imunogénnosťou, ktorá sa považuje za príčinu straty efektu liečby. Pátra sa po prediktorech toxicity anti-TNF liečby. Z dlhodobého hľadiska určitou hrozbou zostáva riziko vývoja malignity. Veľmi cenným zdrojom sa stali veľké národné registre pacientov s JIA nastavených na biologickú liečbu.

Stále zostáva otvorená dĺžka trvania liečby a dávkovania lieku. Väčšina pacientov sa bráni vysadeniu biologickej liečby aj po navodení klinickej a humorálnej remisie choroby vzhľadom na podstatne zlepšenú kvalitu života. Záverom platí, že anti-TNF liečba je účinná u časti pacientov s JIA a je relatívne bezpečná.

Literatúra

1. Petty, R. E., Southwood T.R., Manners, P. a spol.: Internatinal League of Associations for Rheumatology Classification of Juvenile Idiopathic Arthritis: Second Revision , Edmonton, 2001. *J.Rheumatol* , 2004,č.31, s.390-392.
2. Martini, A: It tis thime to rethink juvenile idiopathic arthritis classification and nomenclature. *Ann Rheu Dis* 2012, č.71, s.1437- 1439
3. Gianni, E.H., Ruperto, N., Ravelli, A. a spol: Preliminary definition of improvement in juvenile arthriti. *Arthritis Rheum*, 1997 , č.7, s.1202—1209
4. Brunner,H.I., Lowell, D.J., Finck, B.K. a spol: Preliminary definition of disease flare in juvenile rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol.* 2002, č.5, s.1058-10647
5. Wallace, C.A., Rupperto,N. , Giannini, E.H.: Preliminary criteria for clinical remission for select categories of juvenile idiopathic arthritiis .*J.Rheumatology*, 2004, č..31, s.2290 -22904
6. Rupperto, N., Veselý R., Raymond A.S, Martini, A.:Impact of the European paediatric legislation in paediatric rheumatology: past, resnt end future. *Ann Rheum Dis* 2013, č.72, s.1893-1896
7. Minden, K, Niewerth M., Listing J. a spol.: Long-term outcome in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* , 2002, č.46, s.2392- 2401
8. Minden K., Kiessling U., Listing J. a spol: Prognosis of patients with juvenile idiopathic arthritis and juvenile spondyloarthropathy. *J Rheumatol* 2000, č.9, s.2256-2263
9. Prakken, B.J., Albani, S.,Charles a Suzanne Stephens.: Using biology of disease to understand and guide therapy of JIA. *Bes Practice Research Clinical Rheumatology*, 2009, č.23, s.599-608

10. Ham, H.J., Jager, W., Bijlsma J.W.J., a spol.: Differential cytokine profiles in juvenile idiopathic arthritis subtypes revealed by cluster analysis. *Rheumatology*, 2009, č.48, s.899- 905
11. Gattorno, M.,Martini, A.: Inherited autoinflammatory syndromes: An expanding new group of chronic inflammatory diseases. *Clin.Exp. Rheumatol*, 2005, č23, s.133-136
12. Barnes, M.G., Grom, A. A., , Thompson, S.D. a spol.:Biologic similarities based on age at onset in oligoarticular and polyarticular subtypes of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*,2010, .62,s.3249- 3258
13. Rosenberg A.M.: Uveitis associated with juvenile rheumatoid arthritis. *Sem Arthritis Rheum*, 1987, 16, s.158 -1733
14. Nordal, E.B., Songstad, N.T., Berntson, L. a spol.:Biomarkers of chronic uveitis in juvenile idiopathic arthritis: Predictive value of antihistone antibodies and antinuclear antibodies.*J Rheumatol* 2009, č.36, s.1737- 1743
15. Smith, J.R., Levinson, R.D., Holland G.N. a spol: Differential efficacy of tumor necrosis factor inhibition in the management of inflammatory eye disease and associated rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 2001, 45, s. 252-257
16. Kenawy, N., Cleary, G., Mewar, D. a spol.: Abatacept : a potential therapy in refractory cases of juvenile idiopathic arthritis- associated uveitis. *Graefes Arch. Clin. Exp.Ophthalmol.* 2011, 249 , s.297 – 300
17. Toussiro, É., Houvenagel , É., Goeb, V. a spol .: Development of inflammatory bowel disease during anti-TNF- α therapy for inflammatory rheumatic disease. A nationwide series. *Joint Bone Spine* , 2012, 79, s. 457- 463
18. Kanakoudi-Tsakalidou, F. , Tzimouli, V., Pratsidou-Gertsis, P. a spol: The significance of persistent newly developed autoantibodies in JIA patients under long-term anti-TNF treatment. *Cytokine* , 2008 , 42, s. 293-297

Tab. 1: Charakteristika súboru pacientov z hľadiska subtypu JIA

Typ JIA	Spolu	Chlapci	Dievčatá
Systémová	9	2	7
Polyartikulárna LFT-	22	3	19
Polyartikulárna LFT+	3	1	2
Extendovaná oligoartikulárna	22	8	14
Entezitída asociovaná s artritídou	6	5	1
Psoriatická	1	0	1
Spolu	63	19	44

Tab. 2: Hodnotenie remisie JIA podľa typu

Typ JIA	Klinická remisia	Na liečbe	Bez liečby
Systémová	4/9	2	2
Polyartikulárna LFT-	11/22	5	6
Polyartikulárna LFT+	0/3	0	0
Extendovaná oligoartikulárna	12/22	6	6
Entezitída asociovaná s artritídou	4/6	0	4
Psoriatická	1/1	0	1
Spolu	32/63	13	19

Tab 3: Dôvody ukončenia liečby

Dôvod	Počet	% súboru
Neúčinnosť alebo strata účinnosti	7	11
Autoimunitné komplikácie	2	3
Crohnova choroba	1	1,6
Alergický exantém	1	1,6
Uveitída a opakované infekcie	1	1,6

BIOLOGICKÁ LIEČBA PRI ANKYLOZUJÚCEJ SPONDYLITÍDE

Žlnay Martin, Žlnay Daniel

Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany

Ankylozujúca spondylitída (AS) je chronická zápalová reumatická choroba neznámej príčiny, ktoré primárne postihuje axiálny skelet. Fakultatívne môžu byť zápalom zasiahnuté aj periférne kĺby končatín a úpony šliach. U približne tretiny pacientov sa môžu vyskytnúť extra-spinálne manifestácie ako je akútne predná uveitída, psoriáza alebo zápalové črevné choroby (Crohnova choroba, ulcerózna kolitída). Choroba častejšie postihuje mužov ako ženy, začína v mladom veku, najčastejšie v druhom až treťom decéniu a v prípade oneskorenej diagnostiky a nesprávne zvolenej liečby môže viesť k trvalému štruktúrnemu postihnutiu chrbtice s vývojom typickej kyfotickej deformity, pri ktorej sa predsúva hlava a zaobljuje chrbát.

Termín „non-rádiografická axiálna spondyloartritída (nr-axSpA)“ označuje včasnú formu AS, pri ktorej sa deteguje zápal v oblasti sakroiliakálnych kĺbov a chrbtice pomocou MRI vyšetrenia, ale ešte sa nepozorujú typické štruktúrne zmeny na klasických rtg. snímkach. Nie všetci pacienti s nr-axSpA musia zákonite progredovať do AS. Predpokladá sa, že v priebehu prvých dvoch rokov sa môže vyvinúť typická AS asi u 20 % pacientov s pôvodne stanovenou diagnózou nr-axSpA, ale v prípade pretrvávajúcej vysokej zápalovej aktivity a nedostatočnej liečby môže v priebehu 6 – 9 rokov tento pomer narásť až na 60 % (1).

Liečba AS zvyčajne zahŕňa pravidelnú rehabilitáciu, dlhodobé kontinuálne užívanie nesteroidových antiflogistík (NSA) a v prípade extra-spinálnych manifestácií aj sulfasalazinu. Ostatné choroby modifikujúce lieky (DMARDs), účinné u pacientov s reumatoidnou artritídou alebo psoriatickou artritídou sa v terapii AS neosvedčili (2).

Biologická liečba AS

Biologická liečba predstavuje významný pokrok v terapii ankylozujúcej spondylitídy. Jej uplatnenie u pacientov s AS umožnilo dôkladnejšie pochopenie patogenézy samotného ochorenia. Podobne ako pri iných zápalových reumatických ochoreniach aj v patogenéze AS zohrávajú dôležitú úlohu imunopatologické deje – prezentácia antigénu pomocou antigén prezentujúcich buniek, aktivácia makrofágov, T- i B- lymfocytov a expresia rôznych prozápalových cytokínov. U pacientov s AS sa v bioptických vzorkách zo sakroiliakálnych kĺbov, v synoviálnej tekutine a v periférnej krvi našla zvýšená prítomnosť prozápalových cytokínov, najmä TNF a IL-6. Nerovnováha medzi prozápalovými a protizápalovými cytokínmi spúšťa a udržuje chronický zápalový proces. V prípade vysokých hladín TNF ich prirodzené solubilné receptory nie sú schopné neutralizovať celkovú prozápalovú aktivitu, TNF sa tak viaže na receptory rôznych buniek a spúšťa kaskádu zápalových dejov s následnou deštrukciou tkanív. Keďže TNF zohráva

dôležitú úlohu v imunopatogenéze AS, cieľená liečba proti tomuto cytokínu je u pacientov s týmto ochorením odôvodnená. Anti-TNF liečba môže neutralizovať zvýšené hladiny TNF a tým výrazne ovplyvniť zápalový proces pri AS (3).

Inhibítory TNF

Liečba AS pomocou inhibítorov TNF predstavuje najúčinnnejšiu formu jej terapie. V súčasnej dobe máme k dispozícii pre pacientov s AS štyri TNF-inhibítory, ktorých účinnosť potvrdili viaceré klinické štúdie (4, 5, 6, 7). *Infliximab* je chimerická monoklonová protilátka, ktorá má u pacientov s AS odporúčané dávkovanie 5mg/kg hmotnosti v intervale 0, 2, 6 a každých 6-8 týždňov v pomalej intravenózne infúzii. *Etanercept* je solubilný rekombinantný fúzny proteín, ktorý sa podáva v dávke 50mg 1x týždenne s.c. *Adalimumab* je plne humánna monoklonová protilátka, ktorá sa podáva v dávke 40mg každé 2 týždne s.c. a *golimumab* sa aplikuje v dávke 50mg 1x mesačne s.c. V dohľadnej dobe budeme mať k dispozícii ďalší TNF inhibítor, *certalizumab pegol* v dávke 200mg s.c. každých 14 dní s.c., ktorý je už registrovaný pre liečbu AS, avšak v čase publikácie ešte nie je pre pacientov s AS kategorizovaný.

Inhibítory TNF priaznivo ovplyvňujú axiálne, periférne i entezopatické prejavy axiálnej SpA. Výrazný protizápalový účinok anti-TNF liečby sa prejaví signifikantným poklesom reaktantov akútneho zápalu a tiež výrazným znížením intenzity zápalu v oblasti sakroiliakálnych kĺbov a chrčtice, ako to bolo preukázané použitím magnetickej rezonancie. Priaznivo pôsobí aj na zlepšenie fyzickej funkcie, pohyblivosti chrčtice a kvality života u pacientov s AS (8). Nástup účinku anti-TNF liečby je zvyčajne rýchly, pretrvávanie jej účinnosti býva dlhodobé a má menšiu tendenciu k poklesu ako u pacientov s RA (9). Po vysadení anti-TNF liečby dochádza zvyčajne v priebehu 12-14 týždňov k relapsu ochorenia až u 95 % pacientov s AS (10). V súčasnosti neexistuje žiadny dôkaz pre obligatórne použitie MTX alebo iného klasického DMARDs pri anti-TNF liečbe u pacientov s AS, ktoré by zvyšovalo jej účinnosť ako je to vidieť pri RA. V prípade straty účinnosti jedného anti-TNF preparátu je ho možné zameniť za druhý TNF-inhibítor s dostatočne dobrou odpoveďou (11). Doposiaľ neexistuje žiadny dôkaz, ktorý by podporoval rôznu účinnosť jednotlivých TNF-inhibítorov pri axiálnej alebo periférnej forme ochorenia. V prípade klinicky manifestného nešpecifického črevného zápalu, ktorý sa môže vyskytovať u 10-20% pacientov s AS, je preferované použitie monoklonových protilátok, etanercept môže zhoršiť prejavy zápalového črevného ochorenia (12). Anti-TNF terapia má tiež priaznivý vplyv na zníženie incidencie relapsov akútnej uveitídy u pacientov s AS. Existujú však dôkazy z klinických štúdií, ktoré poukazujú, že monoklonové protilátky majú v porovnaní so solubilným receptorom pravdepodobne lepšiu účinnosť pri znížení frekvencie uveitíd u pacientov s AS, ale tento rozdiel nie je taký výrazný ako v prípade idiopatického črevného zápalu (13). Vysvetlenie odlišnej účinnosti monoklonových protilátok a solubilného receptora pri chronickom črevnom zápale a akútnej uveitíde spočíva v charaktere samotných biologík. Zatiaľ čo solubilný receptor viaže len voľný TNF, monoklonové protilátky viažu a neutralizujú aj na

membrány viazaný TNF, ktorý sa vo zvýšenej miere môže vyskytovať v oblasti črevnej sliznice, očnej dúhovke, periférnych entézach a psoriatických plakoch (2).

Účinnosť anti-TNF liečby sa dokázala u pacientov s pokročilou formou AS, ktorí spĺňajú modifikované newyorské kritéria. Ukazuje sa však, že v prípade zavedenia anti-TNF terapie v skorších štádiách ochorenia je jej účinok vyšší. U pacientov s non-rádiografickou axiálnou SpA (včasnou AS) a trvaním ochorenia kratším ako 3 roky sa percentuálne dosahuje vyšší počet remisíí (až cca 50 % pri adalimumabe, infliximabe i etanercepte) ako pri dlhšom trvaní ochorenia alebo už pri rozvinutej forme AS (14). V súčasnosti sa predpokladá, že pri včasnom zavedení anti-TNF liečby pacientom s nr-axSpA by sa mohla zastaviť aj štruktúrna progresia ochorenia, ktorá sa už pri rozvinutej forme AS nedá spomaliť. Hoci sa pomocou MRI vyšetrenia zistil významný ústup akútnych zápalových zmien (edému kostnej drene, entezitídy, kapsulitídy a synovitídy) v oblasti sakroiliakálnych kĺbov a chrbtice, z dlhodobého hľadiska sa však nepreukázala schopnosť TNF-inhibítorov spomaliť štruktúrnú progresiu ochorenia v zmysle spomalenia tvorby rastu syndezmofytov (15). Uvedené diskrepančné nálezy dali vznik teórii rozpojeného zápalu a osifikácie, podľa ktorej vo včasných štádiách ochorenia prevažujú akútne zápalové procesy a následne v neskorších fázach ochorenia už reparačné zmeny v zmysle osifikácie. V prípade použitia biologickej liečby zlepšené MRI nálezy môžu odzrkadľovať dobrý efekt biologika na potlačenie akútneho zápalu a nový vývoj syndezmofytov zase dobiehajúce reparačné osifikačné zmeny. Uvedené podporuje aj už vyššie spomínaný rozdiel v expresii cytokínov získaných z biopsie sakroiliakálnych kĺbov, kde v skorých štádiách ochorenia prevažoval prozápalový TNF a v neskorších štádiách ochorenia zase TGF- β . Ideálne by teda bolo indikovanie biologickej liečby v skorších štádiách ochorenia, kedy nie sú rozvinuté osifikačné zmeny na chrbtici (16). Treba však podotknúť, že aj pacienti s rozvinutými formami ochorenia môžu mať okrem pokročilých osifikačných zmien na chrbtici aj akútne prejavy zápalu a tak môžu profitovať z biologickej liečby, čo potvrdila subanalýza klinickej štúdie u pacientov s AS a kompletnou ankylózou chrbtice (17).

Ostatné biologické lieky

V súčasnosti zatiaľ neexistuje žiadny dôkaz, ktorý by podporoval použitie iných biologických liekov ako TNF-inhibítorov u pacientov s AS. Účinnosť *anakinry*, receptového antagonistu interleukínu 1 (IL-1Ra) sa sledovala v dvoch klinických štúdiách, v ktorých sa zaznamenalo zmiernenie klinických symptómov AS, ale pre malý počet pacientov bez štatistickej významnosti v porovnaní s placebom (18). Veľké očakávania sa vkladali do *tocilizumabu*, inhibítora receptora pre IL-6. Pilotná klinická štúdia však nepotvrdila jeho významne lepšiu účinnosť u pacientov s AS oproti placebo (19). Podobne sa nepotvrdila účinnosť *rituximabu*, monoklonovej protilátky proti CD20+ B lymfocytom (20) a tiež *abataceptu*, inhibítora kostimulačnej kaskády medzi CD 80/86 na antigén prezentujúcich bunkách a CD28+ na T-lymfocytoch (21).

Z ostatných biologických liekov sa v súčasnosti sleduje účinnosť *sekukinumabu*, inhibítora IL-17A. Výsledky z pilotnej „proof-of-concept“ klinickej štúdie fázy II na malom počte jedincov poukazujú na lepšiu ASAS20 odpoveď *sekukinumabu* u pacientov s AS (59,2%) oproti placebo (24,5%). Dokonca sa preukázalo aj zmiernenie aktívneho zápalu v oblasti sakroiliakálnych kĺbov a chrbtice pri MRI vyšetrení (22). Podobne na sľubné výsledky poukázala otvorená „proof-of-concept“ klinická štúdia u pacientov s AS, v ktorej sa sledovala ASAS40 odpoveď pri liečbe s *ustekinumabom*, inhibítorom IL-23. Po 24 týždňoch liečby sa zistilo zlepšenie až u 64 % pacientov (23). Uvedené výsledky poukazujú na rysujúcu sa alternatívu k anti-TNF liečbe, najmä v prípade ich non-responderov.

Indikácia biologickej liečby

Podľa revidovaných ASAS odporúčaní je liečba inhibítormi TNF- α indikovaná pre pacientov spĺňajúcich modifikované newyorské kritéria pre istú diagnózu AS, alebo pre pacientov spĺňajúcich ASAS klasifikačné kritéria pre axiálnu SpA, u ktorých pretrváva vysoká zápalová aktivita a zlyhala konvenčná liečba. Vysoká zápalová aktivita je definovaná indexom aktivity BASDAI ≥ 4 ; zlyhanie konvenčnej liečby v prípade axiálnej formy ochorenia ako neúspešný terapeutický pokus s aspoň dvoma NSA v maximálne odporúčanej alebo tolerovanej dávke a pri periférnej forme ochorenia aj liečby sulfasalazínom v dávke 2-3 g/deň, prípadne intra-artikulárne aplikovanými glukokortikoidmi. Indikácia biologickej liečby pri AS a nr-axSpA je na Slovensku viazaná na centrá pre biologickú liečbu. Pacienti indikovaní na anti-TNF terapiu nesmú mať kontraindikácie k tejto liečbe (8, 24, 25).

V súčasnosti sa môžeme riadiť aj určitými prognostickými faktormi, ktoré nám naznačujú, akí pacienti budú lepšie profitovať z biologickej liečby. Medzi priaznivé prognostické faktory pre úspešnú anti-TNF liečbu patria: mladší vek pacientov pri zavedení biologickej liečby, vyššie hodnoty CRP, kratšie trvanie ochorenia, menšie funkčné postihnutie a prítomnosť aktívnych zápalových lézií (osteitídy) na chrbtici alebo panve pri MRI vyšetrení (26).

Bezpečnostné aspekty biologickej liečby

TNF plní v organizme významné fyziologické úlohy a tak jeho dlhodobé blokovanie môže mať aj negatívne dôsledky. Stále vieme veľmi málo o vplyve biologickej liečby na organizmus pri jej dlhodobom zásahu do zložitých imunitných dejov, stále pretrvávajú obavy z možnej straty imunologického dohľadu nad maligným bujením, prípadne z vysporiadaním sa s možnými infekciami, alebo ovplyvnenia imunitného systému autoreaktívnym smerom. Množstvo udávaných nežiaducich účinkov anti-TNF liečby je v svetle dôležitosti tohto cytokínu relatívne a možno aj prekvapivo malé. Najdôležitejšie nežiaduce účinky, ktoré sú asociované s anti-TNF liečbou zahŕňajú infekčné komplikácie aj so zvýšeným výskytom tuberkulózy, malignity, kardiovaskulárne, neurologické komplikácie, alergické a infúzne reakcie, ďalej autoimunitné prejavy a hematologické komplikácie (27).

Literatúra

1. Poddubnyy D. et al.: Rates and predictors of radiographic sacroiliitis progression over 2 years in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70: 1369-1374.
2. Sieper J.: Developments in therapies for spondyloarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2012; 8(5): 280-287.
3. Braun J. et al.: Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 1995; 38(4): 499-505.
4. Braun J. et al.: Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet.* 2002; 359(9313): 1187-1193.
5. Davis J. C. et al.: Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis: a randomised controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2003; 48(11): 3230-3236.
6. Van der Heijde D. et al.: Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(7): 2136-2146.
7. Inman R. D. et al: Efficacy and Safety of Golimumab in Patients with Ankylosing Spondylitis: results of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(11): 3402-3412.
8. Braun J. et al.: First update of the international ASAS consensus statement for the use of anti-TNF agents in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65 (3): 316-320.
9. Heiberg M. S.: The comparative one-year performance of anti-tumor necrosis factor alpha drugs in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: results from a longitudinal, observational, multicenter study. *Arthritis Rheum.* 2008; 59(2): 234-240.
10. Baraliakos X.: Safety and efficacy of readministration of infliximab after longterm continuous therapy and withdrawal in patients with ankylosing spondylitis. *J. Rheumatol.* 2007; 34(3): 510-515.
11. Pradeep D. J.: Switching anti-TNF therapy in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford).* 2008; 47(11): 1726 –1727.
12. Braun J. et al.: Differences in the incidence of flares or new onset of inflammatory bowel diseases in patients with ankylosing spondylitis exposed to therapy with anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Arthritis Rheum.* 2007; 57(4): 639 – 647.
13. Braun J.: Decreased incidence of anterior uveitis in patients with ankylosing spondylitis treated with the anti-tumor necrosis factor agents infliximab and etanercept. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(8): 2447 –2451.
14. Sieper J.: Efficacy and safety of adalimumab in patients with non-radiographic axial spondyloarthritis: results from a randomized placebo-controlled trial (ABILITY-1). *Ann Rheum Dis.* 2012; 72(6): 815-22.
15. Van der Heijde D. et al.: Radiographic findings following two years of infliximab therapy in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(10):3063-70.
16. Schett G., Landewé G., van der Heijde D.: Tumor necrosis factor blockers and structural remodelling in ankylosing spondylitis: what is reality and what is fiction? *Ann Rheum Dis.* 2007; 66(6): 709-711.
17. Van der Heijde D.: Adalimumab effectively reduces the signs and symptoms of active anky-

- losing spondylitis patients with total spinal ankylosis. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67(9): 1218-1221.
18. Haibel H. et al.: Open label trial of anakinra in active ankylosing spondylitis over 24 weeks. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64(2): 296-298.
 19. Sieper J. et al.: Tocilizumab (TCZ) is not effective for the treatment of ankylosing spondylitis (AS): results of a phase 2, international, multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71, suppl. 3: 110.
 20. Song I. H. et al.: Different response to rituximab in tumor necrosis factor blocker-naïve patients with active ankylosing spondylitis and in patients in whom tumor necrosis factor blockers have failed: a twenty-four-week clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(5): 1290-1297.
 21. Song I. H. et al.: Treatment of active ankylosing spondylitis with abatacept: an open-label, 24-week pilot study. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70(6): 1108-1110.
 22. Beaten D. et al.: Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secucinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2013; 382(9906): 1705-1713.
 23. Poddubnyy D. et al.: Ustekinumab for the treatment of patients with active ankylosing spondylitis: results of a 28-week, prospective, open-label, proof-of-concept study (TOPAS). *Ann Rheum Dis.* 2014; 73(5): 817-823.
 24. Van der Heijde D. et al.: 2010 Update of the international ASAS recommendations for the use of anti-TNF agents in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70(6): 905-908.
 25. Žlnay M., Žlnay D., Rovenský J.: Diagnostika a liečba spondyloartritíd. In 55. Metodický list racionálnej farmakoterapie, *Herba* 2013, roč. 16 (1): 1-8.
 26. Rudwaleit M. et al.: MRI in predicting a major clinical response to anti-tumour necrosis factor treatment in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67(9): 1276-81.
 27. Furst D. E. et al.: Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72, suppl. 1: ii2-ii34.

Adresa

MUDr. Martin Žlnay
Národný ústav reumatických chorôb,
Nábřežie I. Krasku
921 12 Piešťany
E-mail: martin.zlnay@nurch.sk

ANTI-IgE LIEČBA CHRONICKÝCH RESPIRAČNÝCH CHORÔB

Hrubiško Martin

OKIA OÚSA a ÚLM SZU & OÚSA, Bratislava

V predkladanom prehľade sa zameriame na choroby, ktoré sa radia medzi tzv. **respiračné alergózy** – priedušková astma, alergická rinokonjunktivitída a rinosinusitída s polypmi alebo bez tvorby polypov a možnosti ich ovplyvnenia anti-IgE liečbou. Kým si priblížime možnosti anti-IgE liečby, musíme si objasniť základné poznatky z etiopatogenézy respiračných alergóz.

Ako pri väčšine chorôb, aj respiračné alergózy sú chorobami s **genetickou dispozíciou**, ktorá sa demaskuje – vyvinie do klinicky manifestnej choroby v konkrétnom **prostredí**, pričom prostredie tu treba vnímať komplexne, počnúc intrauterinným životom, cez spôsob pôrodu, výživu v prvých mesiacoch života, prostredie v ktorom sa organizmus vyvíja, prekonávané infekcie a potrebu antibiotickej liečby až po očkovanie. Dedičné pozadie respiračných alergóz je multigénové, pričom u jednotlivých pacientov sa vyskytuje jedinečná kombinácia polymorfizmov génov modifikovaná jedinečnou kombináciou faktorov prostredia. Vrodená dispozícia k nadmernej tvorbe **špecifických IgE protilátok** (šIgE) voči bežným antigénom prostredia sa nazýva atopiou a **atopická konštitúcia**, t.j. stav kedy je už jedinec dokázateľne senzibilizovaný jedným či viacerými bežnými alergénmi sa považuje za najväčší rizikový faktor pre vznik perzistujúcich alergických chorôb (1, 2).

Špecifické IgE protilátky sprostredkujú včasnú hypersenzitívnu reakciu na antigénny podnet a je od nich závislá aj oneskorená fáza alergickej reakcie. Eliminácia IgE z cirkulácie a z efektorových buniek alergie pomocou anti-IgE protilátok sa preto ponúka ako cielená liečba alergických chorôb. Za týmto účelom sa vyvinuli **humanizované neanafylaktogénne anti-IgE protilátky**, pri ktorých sa na kostru ľudskej protilátky napoja špecifické fragmenty myšacej protilátky ktoré sa viažu na molekulu IgE v oblasti konštantnej domény Fcε3 (3). Takáto anti-IgE protilátka neúčinkuje ako antigén (nespôsobuje degranuláciu mastocytov / bazofilov) a má nasledovné charakteristiky, resp. vedie k nasledovným zmenám:

1. viaže sa na väzbové miesto Fc-fragmentu, ktorým sa IgE spája s vysokoafinitným receptorom – takto viazaná IgE molekula nemôže reagovať ani s vysoko (FcεRI), ani s nízko (FcεRII) -afinitnými receptormi na efektorových bunkách (väzbové časti týchto dvoch receptorov sa nachádzajú v tesnej blízkosti na rovnakej doméne);
2. viaže voľné IgE nezávisle na antigénovej špecifickosti, pričom vytvára s IgE molekulami triméry alebo hexaméry, ktoré neviažu komplement;
3. vzniknuté komplexy anti-IgE-IgE sú malé a z tela sa odstraňujú interakciou s Fcγ receptormi leukocytov, doštičiek a retikulo-endotelového systému;
4. „označuje“ B-lymfocyty predurčené k produkcii IgE, ktoré majú v svojich mem-

- bránach IgE-receptor, čo vedie k ich imunitnej likvidácii a v konečnom dôsledku k zníženiu produkcie IgE;
5. tým, že sa významne zníži množstvo cirkulujúcich IgE molekúl, dochádza k disociácii IgE z FcεRI na bunkách a takto k ich ďalšiemu vycyťovaniu;
 6. postupnou elimináciou IgE z cirkulácie aj receptorov strácajú FcεRI svoj substrát, a tak dochádza k ich deexpresii na všetkých bunkách na ktorých sa prirodzene exprimujú (4).

Prototypom IgE-sprostredkovanej choroby sú **alergická astma a alergická rinokonjunktivitída**. Ide o chorobné stavy pri ktorých štandardne vychádzajú pozitívne testy na detekciu šIgE protilátok (prick test, laboratórne testy na detekciu šIgE). Klinickým problémom je, že najmä v dospelom veku sa u takmer polovice pacientov trpiacich prejavmi alergickej nádchy a alebo astmy nedarí IgE sprostredkovaný mechanizmus dokázať – uvedené testy na detekciu šIgE protilátok vychádzajú negatívne – hovoríme potom o nealergickej astme a o perzistujúcej rinosinuitíde (5, 6). Napriek tomu je však hladina celkového IgE faktorom, ktorý dobre koreluje s prevalenciou aj „nealergickej“ astmy (7). Štúdiá ktorá sa zamerala na *post-mortem* analýzu vzoriek pľúc prípadov fatálnej astmy ukázala významne vyššie množstvo FcεRI pozitívnych buniek v *lamina propria* v porovnaní so vzorkami z pľúc pacientov, ktorí zomreli na inú príčinu, resp. s biopsickými vzorkami od pacientov s ľahšou formou astmy (8). Navyše, objavili sa práce, ktoré aj u „nealergických pacientov“, t.j. s negatívnymi štandardnými testami detekcie šIgE protilátok dokázali ich lokálnu tvorbu v nosovej sliznici, resp. v tkanive nosových polypov, a tiež v prieduškovej sliznici (9, 10). Preto sa o úlohe IgE protilátok aj pri tzv. nealergickej astme a perzistujúcej rinosinuitíde (s polypmi alebo bez polypov) stále diskutuje.

Obnovila sa tzv. „infekčne-alergická“ teória vzniku niektorých foriem respiračných alergóz. Mechanizmov, ktorými baktérie indukujú alergické symptómy, môžu byť viac. Niektoré baktérie môžu navodiť zvýšenú tvorbu histamínu priamo v neutrofiloch, ako sa to nedávno preukázalo s *Pseudomonas aeruginosa* (11). Tiež sa predpokladá, že disponovaní jedinci lokálne systémovo v respiračnej sliznici vytvárajú šIgE protilátky proti antigénom rôznych mikroorganizmov (napr. proti antigénom *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Trichophyton*), i keď na túto tému sa zatiaľ veľa diskutuje na odborných fórach, početné publikácie zaoberajúce sa úlohou šIgE voči mikroorganizmom sú však viac ako 2 desaťročia staré a novšie sa zatiaľ nepublikovali. Zvažuje sa aj úloha IgE autoprotlátok ktoré by mohli zodpovedať za perzistujúci „alergický zápal“, ich úloha sa však zatiaľ potvrdila iba pri autoimunitných bulózných dermatózach (12).

U akého typu pacienta možno očakávať efekt anti-IgE liečby? V každej odbornej ambulancii ostáva až ¼ pacientov, u ktorých sa ani kombinovanou antiastmatickou farmakoterapiou nedarí dosiahnuť stav optimálnej kontroly. Asi 5% tvoria pacienti, ktorých dlhodobá kontrola choroby je celkom nedostatočná – denne používajú záchrannú medikáciu, často potrebujú systémové steroidy, prakticky neustále sú ohrození fatálnou

exacerbáciou. A práve medzi týmito pacientmi treba hľadať kandidátov na anti-IgE liečbu. S priaznivou klinickou odpoveďou najviac koreluje celková hladina IgE a počet a závažnosť exacerbácií. Hladina celkového **IgE nad 75 IU/ml** sa ukázala ako hranica, nad ktorou je efekt jednoznačný. Tiež platí, že čím **častejšie a závažnejšie exacerbácie** sú u pacienta v predchorobí, tým väčší efekt anti-IgE liečby môžeme očakávať.

Po liečbe omalizumabom sa stav pacientov s alergickou astmou stabilizuje behom prvých 6 týždňov, pričom ani v dlhodobom horizonte sa nepozoruje tachyfyliaxia. Napriek starostlivému výberu pacientov aj pri tejto liečbe neodpovedajú všetci pacienti rovnako, podiel úplných nonresponderov je však malý (do 20%). Zo súhrnov štúdií vyplynulo, že okrem uvedenej „cut-off“ hodnoty celkového IgE jednoznačný a univerzálny deskriptor určujúci pacienta respondera nejestuje, ale je možné dať odporúčanie, ako pri indikácii tejto liečby postupovať: treba vyhodnotiť všetky aspekty choroby – hladina celkového IgE, prick testy a alebo špecifické IgE, symptómy, používanie záchranej medikácie, pľúcne funkcie, návštevy pohotovosti, hospitalizácie. Význam každého kritéria je však u jednotlivých pacientov rozdielny.

Po 16 týždňoch podávania treba zhodnotiť efekt liečby. Rozhodnutie o pokračovaní liečby vychádza z overeného zlepšenia celkovej kontroly astmy. Zlepšenie má byť sumarizáciou jednotlivých parametrov kontroly astmy: subjektívny pocit pacienta, objektívny stav (fyzické vyšetrenie, pľúcne funkcie, exacerbácie), spotreba záchranej medikácie. Ak sa stav pacienta hodnotí ako jednoznačne zlepšený, je vhodné v liečbe pokračovať. Ako dlho? V danom okamihu poznania nepoznáme na túto otázku odpoveď, predpokladáme však, že u mnohých pacientov pôjde o celoživotnú liečbu. Na druhej strane po dlhodobej stabilizácii sa skúša aj vynechanie liečby – hoci u väčšiny liečených dochádza následne k relapsu choroby, u časti pacientov sa pozoruje klinické zlepšenie aj 3 roky po vynechaní.

S anti-IgE liečbou (prípravok omalizumab) sú zatiaľ 10 ročné praktické skúsenosti a máme k dispozícii celý rad randomizovaných kontrolovaných štúdií ktorých výsledky sú priaznivé z hľadiska účinnosti aj bezpečnosti (13). Podávanie omalizumabu vedie k redukcii symptómov, spotreby základnej aj záchranej medikácie, k poklesu výskytu exacerbácií, a tiež k zlepšeniu pľúcnych funkcií, i keď toto nie je u každého pacienta vzhľadom k závažnosti a dĺžke trvania choroby signifikantné. Súčasne so zlepšením astmy sa pozoruje ústup symptómov perzistujúcej nádchy a u pacientov s nosovými polypmi ich redukcia.

V priebehu ostatných rokov sa omalizumab skúša aj u pacientov s ťažkou nealergickou astmou (bez dokázateľného kauzálneho alergénu navodzujúceho tvorbu IgE), ako aj u iných chronických respiračných chorôb, ako napr. nosové polypy. Uskutočnili sa aj prvé štúdie s povzbudzujúcimi výsledkami (14, 15), a tak možno sa v budúcnosti budú indikačné kritériá upravovať – dôkaz kauzálneho inhalačného „celoročného“ alergénu nebude podmienkou indikácie. Ostatné roky sa totiž spoznávajú **na antigéne nezávislé efekty imunoglobulínu E** ovplyvňujúce aktiváciu, migráciu, adhéziu a prežívanie mastocytov, a tiež produkciu ich mediátorov (16, 17), ktoré nám pomáhajú pochopiť účinnosť omalizumabu aj u pacientov bez dokázateľnej IgE-senzibilizácie.

Na základe relevantných dôkazov z kontrolovaných štúdií sa anti-IgE liečba omalizumabom stala **štandardnou súčasťou liečby ťažkých foriem astmy** u pacientov u ktorých zlyhali doteraz používané liečebné postupy (5). Dávkovanie omalizumabu pri astme sa odvíja od celkovej hladiny IgE a od hmotnosti pacienta. Zatiaľ platí aj požiadavka dokázaného kauzálneho inhalačného alergénu, ale ako som už uviedol, indikačné kritériá sa možno v budúcnosti prehodnotia (uvažovať nad tým núti aj nová indikácia omalizumabu – chronická spontánna urtikária, ktorá sa neradí medzi IgE-sprostredkované choroby!).

Vzhľadom k stále komplexnejšiemu pohľadu na mechanizmy účinku anti-IgE liečby sa objavujú ďalšie – **perspektívne indikácie**. Anti-IgE liečba potenciuje efekt alergénovej imunoterapie (AIT), čo možno využiť u polysenzibilizovaných pacientov, prvé štúdie s omalizumabom podávaným konkomitantne s AIT priniesli veľmi povzbudivé výsledky (18), a to dokonca aj pri orálnej imunoterapii s potravinovým alergénom (19). Predpokladá sa aj použitie u alergikov ktorí prekonalí anafylaxiu a pre obavy zo systémovej reakcie sa u nich alergénová imunoterapia zatiaľ neindikovala. Výsledky štúdií u pacientov s atopickou dermatitídou sú nejednoznačné, naopak priaznivé výsledky štúdií u pacientov s chronickou spontánnou urtikáriou viedli k registrácii omalizumabu v tejto novej indikácii.

Až na ľahko zvýšené riziko anafylaxie sa liečba omalizumab-om ani pri dlhodobom podávaní nespája s častými či významnými nežiaducimi účinkami. Podľa údajov z registrácie výrobcu sa anafylaktické reakcie vyskytujú iba u 0,1% liečených (v kontrolovaných štúdiách žiaden rozdiel oproti placebo), urtikária po podaní injekcie sa vyskytla v 1,2% (placebo 1,1%). Omalizumab sa dobre toleruje, častejšie ako pri placebe sa vyskytuje iba lokálna reakcia v mieste vpichu. Nezistil sa zvýšený výskyt parazitových či iných infekcií. Vzhľadom na teoretický predpoklad novej úlohy IgE v protinádorovej imunite sa registre liečených od samého začiatku podávania zamerali na výskyt onkologických chorôb. S potešením možno konštatovať, že ani po 10 rokoch v praxi sa zvýšené riziko vzniku malignít nezaznamenalo.

Súhrnom možno konštatovať, že anti-IgE liečba (omalizumab) sa stala štandardnou súčasťou liečby závažných respiračných alergóz a do budúcnosti možno očakávať jej nové indikácie pri ďalších respiračných, ale aj nerespiračných chorobách.

Literatúra

15. Johansson SG, Bieber T, Dahl R et al. Revised nomenclature for allergy for global use: report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 832–836.
16. Disease summaries. IgE in Clinical Allergy and Allergy Diagnosis. http://www.worldallergy.org/professional/allergic_diseases_center/ige/.
17. Holgate S, Casale T, Wenzel S, et al. The anti-inflammatory effects of omalizumab confirm the central role of IgE in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 459–65.

18. Fahy JV, Fleming HE, Wong, HH, et al. The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155: 1828-34.
19. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2014 (revision). http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2014_Jun11.pdf .
20. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps (EPOS 2012). *Rhinology* 2012; 50(23): 1-298.
21. Burrows B, Martinez FD, Halonen M et al. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989; 320: 271–6.
22. Powe DG, Jagger C, Kleinjanw C, et al. Entopy ' : localized mucosal allergic disease in the absence of systemic responses for atopy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:1374–1379.
23. Fregonese L, Patel A, van Schadewijk A, et al. Expression of the high-affinity IgE receptor (FcεRI) is increased in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: A297.
24. Rondón C, Canto G, Blanca M. Local Allergic Rhinitis: A New Entity, Characterization and Further Studies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010; 10(1): 1-7.
25. Xu X, Zhang H, Song Y, et al. Strain-dependent induction of neutrophil histamine production and cell death by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2011; 91(2): 275.
26. Dimson OG, Giudice J, Fu CL, Identification of a Potential Effector Function for IgE Autoantibodies in the Organ-Specific Autoimmune Disease Bullous Pemphigoid *Journal of Investigative Dermatology* 2003; 120: 784-788.
27. Rodrigo GJ, Neffen H, Castro-Rodriguez JA. Efficacy and safety of subcutaneous omalizumab vs placebo as add-on therapy to corticosteroids for children and adults with asthma: a systematic review. *Chest* 2011; 139(1): 28-35.
28. Gevaert P, Calus L, VanZelev T, et al. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131 (1): 110-116.
29. Phend C. Xolair May Work for Nonallergic Asthma, Too. *Medpage Today, Pulmonology*; <http://www.medpagetoday.com/Pulmonology/Asthma/40921> .
30. Bryce PJ, Oettgen HC. Antigen-independent effects of immunoglobulin E. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005; 5: 186–190.
31. Kawakami T, Kitaura J. Mast cell survival and activation by IgE in the absence of antigen: a consideration of the biologic mechanisms and relevance. *J Immunol* 2005; 175: 4167–4173.
32. Kopp MV, Hamelmann E, Zielen S, et al. Combination of omalizumab and specific immunotherapy is superior to immunotherapy in patients with seasonal allergic rhinoconjunctivitis and co-morbid seasonal allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 2009; 39(2): 271-9.
33. Harrison L. Omalizumab Appears to Improve Oral Immunotherapy. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI) 2014: Abstract L19. Presented March 2, 2014.*

Adresa

Doc. MUDr. Martin Hrubíško, PhD.
OKIA OÚSA a ÚLM SZU & OÚSA
Bratislava
E-mail: martin.hrubisko@ousa.sk

ANTI-IgE U NERESPIRAČNÝCH CHORÔB

Hochmuth Luděk

Alergologická ambulancia, II. interná klinika FNŠP, Banská Bystrica

Biologická liečba alergických ochorení sprostredkovaných IgE mechanizmom znamenala dôležitý krok v riešení dovtedy ťažko ovplyvniteľných stavov. V klinickej praxi sa používa anti-IgE monoklonálna protilátka omalizumab, ktorá je indikovaná pre liečbu ťažkej astmy spĺňajúcej určené kritériá. Dá sa očakávať využitie omalizumabu aj pri ďalších ochoreniach sprostredkovaných IgE mechanizmom. K uvedeniu lieku do klinickej praxe v ďalších indikáciách je potrebné doložiť jeho efektivitu a bezpečnosť kontrolovanými klinickými štúdiami. V súčasnosti prebieha vyše 100 klinických štúdií s omalizumabom, z toho viac ako 40 u ochorení iných než astma.

Najviac prác sa týka **chronickej spontánnej urtikárie** (CSU), ktorá je od roku 2013 schválená ako indikácia liečby omalizumabom. Aj na Slovensku sú už pacienti s CSU na tejto liečbe. V súčasnosti sa upresňujú kritériá na výber pacientov pre túto liečbu a liečebná stratégia (dávka lieku, interval podávania, dĺžka liečby, kritériá hodnotenia efektivity a iné).

Ďalšie indikácie pre liečbu omalizumabom zatiaľ nie sú schválené. Publikované informácie sa zakladajú na prebiehajúcich kontrolovaných klinických štúdiách, otvorených štúdiách a prezentovaných kazuistikách. V práci referujeme o jednotlivých oblastiach potenciálneho použitia omalizumabu.

Aj keď **respiračné ochorenia** nie sú témou práce, pre úplnosť treba spomenúť použitie anti-IgE liečby pri sezónnej aj celoročnej nádche, pri sínusitíde, pri riešení nosových polypov. Osobitnú úlohu môže mať omalizumab pri zlepšení tolerancie a výsledku alergénovej imunoterapie, obzvlášť pri rizikovejších postupoch („rush“ imunoterapia, imunoterapia pri alergii na hmyz).

Pri **dermatologických ochoreniach** okrem spomínanej urtikárie sa hľadá miesto omalizumabu pri atopickej dermatitíde – výsledky zatiaľ nie sú jednoznačné. Zatiaľ len kauzistické referencie sa týkajú kožnej (a systémovej) mastocytózy, bulózneho pemfigoidu a angioedému.

V súčasnosti dramaticky narastá prevalencia **potravinových alergií a intolerancií**. V prevažnej väčšine prípadov je riešením len striktné vylúčenie daných potravín z jedálneho líčka. V prípade anafylaktického typu alergie nikdy nemožno vylúčiť riziko závažnej reakcie pri ich náhodnom požití (arašidy). Práve tu sa veľa očakáva od anti-IgE liečby a existujú už viaceré práce s veľmi sľubnými výsledkami.

Eozinofilové ochorenia gastrointestinálneho traktu (EGIDs) patria medzi významne narastajúce ochorenia v poslednej dekáde. Aj keď sa dosiahli sľubné klinické výsledky pri ich liečbe omalizumabom, histologické a endoskopické výsledky doteraz neboli jednoznačné.

Stručne referujeme o **ďalších ochoreniach s možnosťou liečby omalizumabom**: očné prejavy alergie, idiopatická anafylaxia, hyper-IgE syndróm, Churg-Straussovej syndróm, alergia na latex, aspirínová (a iná lieková) precitlivosť.

Literatúra

1. Suresh Babu K, Polosa R, Morjaria JB. Anti-IgE – emerging opportunities for Omalizumab. *Expert Opin Biol Ther* 2013; 13(5): 765-777.
2. Baena-Cagnac CE, Gómez RM. Current status of therapy with omalizumab in children. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2014;14:149-154.
3. Chang TW, Chen C et al. The potential pharmacologic mechanisms of omalizumab in patients with chronic spontaneous urticaria. *JACI* 2014.
4. Maurer M, Rosén K, Hsieh HJ, et al. Omalizumab for the treatment of chronic idiopathic or spontaneous urticaria. *NEJM* 2013; 368: 924-35.
5. Casale T, Maurer M, Hsieh HJ, et al. Efficacy and safety of omalizumab in chronic idiopathic/spontaneous urticarial (CIU/CSU): results from a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *JACI* 2013; 131 (Suppl): 1A-4A.

LATENTNÁ TUBERKULÓZA – NEŽIADÚCI ÚČINOK BIOLOGICKEJ ANTI-TNF LIEČBY

Záňová, E.^{1,3}, Kozáková, D.¹, Rybár, I.^{1,3}, Solovič, I.², Rovenský, J.^{1,3}

¹Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany,

²Národný ústav tuberkulózy, pľúcnych chorôb a hrudníkovej chirurgie, Vyšné Hágy,

³Slovenská zdravotnícka univerzita, Katedra reumatológie, Bratislava

V liečbe systémových autoimunitných chorôb sa používa väčší počet liekov, vrátane nových biologických (1). Inhibítory faktoru nekrotizujúceho nádory (TNF) predstavujú prelomovú kapitolu v dejinách liečby autoimunitných zápalových chorôb spojiva (2). Inhibítory TNF v klinickej praxi sa používajú už viac ako 15 rokov. Kľúčovú úlohu TNF v patogenéze RA popísal kolektív vedený sirom R. Mainim v roku 1992 (3). Účinok TNF sa prejavuje lokálne a systémovo. Cytokín sa podieľa na mnohých autoimunitných i protektívnych reakciách organizmu (4, 5, 6). Inhibícia TNF cestou podania anti-TNF protilátky vedie ku potláčaniu patologického zápalového procesu na viacerých úrovniach, a je preto v súčasnosti najefektívnejšou liečebnou modalitou uvádzaných reumatických chorôb. Základným cieľom liečby (7, 1) je navodiť remisiu a znížiť aktivitu choroby. Na druhej strane TNF predstavuje dôležitú súčasť odpovede ľudského imunitného systému na infekciu (8,9). Preparáty inhibujúce TNF potláčajú imunitný systém, a tým vplývajú na imunitnú nerovnováhu. Dlhodobá terapeutická inhibícia TNF(68) sa spája s vyšším rizikom závažných infekčných komplikácií (10, 11,12), predovšetkým s aktiváciou chronickej latentnej tuberkulózy (LTBI) (13), sepsy, mykotických a iných oportúnnych infekcií. U niektorých pacientov v liečbe TNF-blokátormi sa môže rozvinúť nádorové choroba, kongestívne srdcové zlyhanie, demyelinizácia a iné neurologické poruchy, pancytopénia (IFNliximab, etanercept) a „lupus-like“ syndróm. Objavujú sa aj reakcie na aplikáciu podávanej liečby (injekcia, infúzia) (8, 6). Všeobecne, u pacientov nemáme k dispozícii komplexné údaje o infekčných komplikáciách pri liečbe imunosupresívami a kortikoidmi. Pľúcna tuberkulóza sa popisuje pri liečbe metotrexátom (14), po systémovej a pulznej kortikoterapii (15). Incidencia TBC v populácii pacientov liečených biologickou liečbou úzko súvisí so znalosťou celkovej incidence a TBC v populácii. Americké Centrum pre kontrolu a prevenciu chorôb udáva v období 1999 – 2000 incidenciu bežnej populácie 5,8 – 6,4 na 100 000 obyvateľov (nehispánska populácia 2,2/100 000) a zároveň nezistil narastajúci počet TBC-infekcie u pacientov v rámci RA (16, 17). U pacientov s RA bez anti-TNF liečby bola 95 prípadov na 100 000 pacientov s RA (v rokoch 1990 – 2000, EMECAR kohorta). Výpočet rizika TBC u pacientov s RA je 4,13 oproti bežnej populácii (20). Jej diferenciálna diagnostika býva zväčša náročná (18,19). Porucha bunkovej imunity pri základnom RA-chorôb tvorí podklad pre zvýšené riziko postihnutia pľúcnou TBC. To v prípade infliximabu v liečbe RA znamená kombináciu IFNliximabu s metotrexátom (etanercept v období

najvyššej reaktívacie LTBI nebol kombinovaný s metotrexátom). Zdá sa, že metotrexát môže podporovať imunosupresívny antigranulomatózny efekt infliximabu (14).

Základným mechanizmom ochrany proti infekcii *M. tuberculosis* je tvorba granulómov, v ktorých dochádza ku lokalizácii mikroorganizmov. Inhalované baktérie *M. tuberculosis* sú pohltené alveolárnymi makrofágmi, ktoré predstavujú prvú obrannú líniu. Takto aktivované makrofágy tvoria veľké množstvo cytokínov (21), chemokínov a antimikrobiálnych efektorových molekúl, ktoré ovplyvňujú indukciu špecifickej imunity (maturáciu buniek prezentujúcich antigén, ich transport do lymfatických uzlín, aktiváciu T-lymfocytov a ich transport do miesta infekcie). V optimálnom prípade je výsledkom tvorba granulómov (22) s centrálnymi infikovanými makrofágmi obklopenými aktivovanými T-lymfocytmi – primárny komplex. Takto vytvorené granulómy predstavujú spoľahlivú fyzikálnu aj imunitnú bariéru proti šíreniu sa patogénu. TNF reprezentuje dôležitý cytokín v niekoľkých krokoch tvorby a stabilizácie granulómov (22). Po nezládnutí tohto procesu organizmom môže dôjsť ku rozšíreniu do masívnej tuberkulózne infekcie. Na druhej strane, pri dobrej imunitnej odpovedi mykobaktérie sa zorganizujú do tzv. spiacej (latentnej) formy, v ktorej pretrvávajú nepoznané aj roky. Za určitých okolností (napr. dlhodobé znížené množstvo TNF) spôsobí reaktíváciu infekcie – postprimárna infekcia.

Človek s latentnou tuberkulóznou infekciou /LTBI (23)/ nie je infekčný, ale má prítomný pozitívny tuberkulínový kožný test (TST) a v organizme živé mykobaktérie, ktoré sú neaktívne. Ich prítomnosť je v tzv. „spiacej forme“. Takýto človek sa necíti byť chorý a nie je nákazlivý až do času, kým sa oslabí jeho imunitný systém. Mykobaktérie to využijú a aktivujú sa (24). Väčšina infikovaných ľudí zostáva iba v latentnej infekcii. Odhaduje sa, že do manifestujúceho choroby prejde len 10 – 12 % infikovaných (25). U 10 – 30 % osôb vystavených mykobaktériám sa prejaví LTBI a len u 10 % z týchto ľudí prepukne aktívna choroba (26). Tak vzniká veľký rezervoár neliečenej LTBI, ktorej reaktívacia je hlavným zdrojom choroby. Riziko progresie je najväčšie počas prvých dvoch rokov po infekcii a každým rokom sa znižuje (27). U pacientov infikovaných bacilom *M. tuberculosis* existuje rôzna miera ohrozenia progresiou do aktívnej choroby. Ďalšou veľkou skupinou sú osoby s rizikom imunosupresie, osoby pripravované na zahájenie imunosupresívnej a biologickej liečby.

Podľa klasifikácie nežiaducich účinkov (8) vzplanutie prebieha ako imunodeficientná reakcia, typ γ . LTBI má zväčša veľmi rýchlu progresiu, nemá tendenciu ku ohraničeniu infekčných ložísk, a preto rýchlo diseminuje v pľúcnom parenchýme a okolí. Je známe, že prevládajú mimopľúcne lokalizácie (28). Štandardná diagnostika sa stáva limitovanou. Pri reaktívácii LTBI u pacientov liečených anti-TNF liečbou prevažujú viac ako 50 % formy mimopľúcnej TBC (lymfatická uzlina, postihnutie komplexu pečene a slezina, urogenitálny trakt) a viac ako štvrtinu tvorí diseminovaná forma (28). Pre porovnanie v „normálnej, t.j. imunokompetentnej“ populácii sa extrapulmonálna forma manifestuje v 15 % a diseminovaná forma menej ako 1 % prípadov.

Nárast rizika TBC-infekcie bol dokumentovaný u antagonistu TNF-receptora – eta-

nerceptu, ale aj plne humánnej protilátky adalimumabu. Rozvoj aktívneho tuberkulózneho choroby pri infliximabe je popisovaný ako rýchly, s mediánom 12 týždňov a 98 % prípadov sa rozvinie do 6 mesiacov od začiatku blokovania TNF. Prevažujúce mimoplúcne formy a diseminované postihnutia môžu mať u imunosuprimovaných pacientov ťažký, život ohrozujúci priebeh. Vyšší výskyt bol zaznamenaný u monoklonových protilátok, hlavne infliximabu. To je dané samotným mechanizmom účinku (stabilná väzba na TNF, a tým jeho úplná neutralizácia, cytotoxický účinok). Väzba etanerceptu na membránovú TNF vytvára menej stabilné komplexy, prevažne sa viaže na solubilnú TNF a lymfotoxín. Uvoľnený TNF si ponecháva svoju bioaktivitu. Kompletná neutralizácia TNF infliximabom, preto môže viesť k rozpadu granulómov a tým k možnosti reaktivácie TBC. Naopak, etanercept ponecháva časť TNF neustále aktívnu (29), a tým by mohol umožňovať zachovanie štruktúry granulómov. Latentne infikovaní pacienti majú riziko vzplanutia TBC po začatí anti-TNF liečby (infliximab) 4 – 5 krát vyššie (29).

V skupine pacientov zaradených do Registra biologickej liečby na Slovensku (úplný do decembra 2008), liečených anti-TNF, sa potvrdila nízka prevalencia aktivácie latentnej tuberkulózy v priebehu liečby – 0,55 % s incidenciou 0,27 prípadu na 100 „pacientorokov“. Podľa údajov, išlo o 4 prípady zo 734 pacientov súboru. Postihnuté boli 3 ženy s RA, 1 muž s AS, 3 mimoplúcne (1 peritonitída, 1 urogenitálne postihnutie, 1 pleuritída) a 1 pľúcne postihnutie – miliárna TBC. Meridián vzplanutia LTBI bol 11,5 mesiaca (od 3,5 -22 mesiacov). Do konca roku 2008 sme u našich pacientov v anti-TNF liečbe zaznamenali 75 % prípadov mimoplúcnej TBC (32). Posledným zdokumentovaným prípadom je 55 ročný muž s RA a mimoplúcny postihnutím kolena s fistuláciou.

Dôsledný skrining pred zahájením biologickej liečby významne redukuje počet vzplanutí LTBI, a to až o 85 %. K štandardným diagnostickým postupom LTBI patrí anamnéza a klinické vyšetrenie, röntgenologické vyšetrenie hrudníka, tuberkulínový kožný test a vyšetrenie hladiny interferónu gama – IGRA testy. Pri odoberaní anamnézy je potrebné myslieť na to, že osoba s aktívnou TBC ohrozuje všetkých, s ktorými príde do kontaktu a tým „oživuje“ TBC cyklus (30). Vyšetrenie sa vykonáva za 2 – 3 mesiace po možnej expozícii a opakuje sa o rok. Na röntgenovej snímke hrudníka sú známky buď prekonanej masívnej tuberkulózne infekcie (vyhojené kavery, zhrubnuté hrotové oblasti, apikalizácia hrotov, kalcifikáty) alebo diskrétné zmeny (30). Tuberkulínový kožný test je u RA často sprevádzaný anergiou (až 43 % ku 2 % v zdravej populácii). Záťažou tohto testu zostáva neschopnosť rozlíšenia nepatogénnych mykobaktérií (NTM) a BCG vakcinácie od *M. tuberculosis*. Falošne negatívny výsledok TST u nedagnostikovanej LTBI, môže viesť ku prepuknutiu aktívneho TBC choroby (27).

V súčasnosti sa využívajú tzv. IGRA testy (interferon-Gamma Release Assays) – QuantiFERON TB Gold (QFT-G) a T.SPOT.TB. Tieto testy významnou mierou prispievajú k spresneniu a urýchleniu diagnostiky infekcií vyvolaných *M. tuberculosis* a identifikáciu osôb, ktorí by mohli mať úžitok z preventívnej liečby, u BCG vakcinovanej populácie a tam, kde je malá pravdepodobnosť spätného odčítania tuberkulínového kožného testu. Testy sú založené sú na schopnosti efektorových T lymfocytov produkovať

vať interferón gama (IFN- γ) po stimulácii špecifickými TBC antigénmi (ESAT-6, CFP-10 a u QFT-G aj TB-7).

Výšetrením QFT-G získame negatívny, pozitívny alebo neurčitý výsledok testu. Pozitívny výsledok znamená prítomnosť LTBI, negatívny jej neprítomnosť. Pozitívny výsledok testu by nemal byť jediným podkladom pre posúdenie infekcie *M. tuberculosis* a mal by byť konfrontovaný s ďalšími medicínskymi a diagnostickými výšetreniami. Test sa neodporúča na diagnostiku aktívneho TBC choroby (31), preferujú sa metódy molekulej biológie (PCR). Pri výšetrení QFT-G existuje možnosť falošne pozitívnych a falošne negatívnych výsledkov spôsobená nedodržaním procedurálnych postupov, vrátane vzťahu TST ku odberu krvi (32). Problém neurčitých výsledkov sa vynára u imunokompromitovaných pacientov. Druhým je test na určovanie počtu buniek produkujúcich IFN- γ – T. POT, založený na princípe tzv. „single cell method“, resp. ELISpot a umožňuje stanoviť celkový počet T-lymfocytov produkujúcich IFN- γ . Klinické okolnosti ukazujú, že T-SPOT.TB je viac citlivý u detí mladších ako 5 rokov. U imunokompromitovaných pacientov môžu byť malé odchýlky medzi testami. V diagnostike LTBI je senzitivita QFT-G testu (67 %) v porovnaní s T- spotom (99,4 %) nižšia, avšak v špecificite sa pomer obrátil (QFT-G 99,4 % ku T- spot – 98 %).

Vlastnými sledovaniami sme sa snažili zhodnotiť prínos diagnostiky QuantiFERON TB Gold in Tube test vo vyhľadávaní LTBI. Sledovanie sme zahájili rozpracovaním súboru 328 pacientov (2008 – 2010). Z výsledkov vyplynul častý nález nízkej pozitivity až anergie TST. Zistili sme, že žiadna zo štandardne používaných metódik (anamnéza, RTG hrudníka, TST) nebola schopná postrehnúť u 32,25 % QFT-G pozitívnych pacientov, teda driemajúcu LTBI. Prínos anamnézy v hlavnom súbore zaznamenal v korelácii ku LTBI (31 pacientov) len 3,20% úspešnosti. Nález na RTG snímke hrudníka sa stotožnil s LTBI v 32 %. Pozitívny výsledok TST súhlasil s LTBI v 29 %. Kombináciou týchto metódik ku pozitivite QFT-G klesá výťažnosť stanovenia LTBI. Nález na RTG snímke hrudníka v kombinácii s pozitivitou TST ku pozitivite QFT-G bol 21 %. Kombinácia kontaktovej anamnézy, RTG snímky hrudníka, TST a súhlasu s QFT-G sa zistila v 3,20 %. Celkovo sme v súbore zaznamenali 13 pozitívnych výsledkov TST, z ktorých 69 % sa odrazilo v diagnóze LTBI. 31 % nálezov bolo falošne pozitívnych. Tých sme uchránili pred zbytočnou aplikáciou chemoprophylaktickej liečby. 22 pacientov s LTBI malo výšetrenie TST negatívne, t. j. 71 % pacientov vykázalo falošnú negativitu TST. Hypoergia až anergia TST sa mohla viazať so známym faktom imunosupresie (liečba, samotné choroba) reumatologických pacientov.

V opisovanej práci sme kládli dôraz aj na prešetrenie neurčitých výsledkov. Tie vykázali dve základné skupiny hladín IFN- γ . Nízka hladina korelovala s mužským pohlavím štatisticky významnou väzbou ($p < 0,005$). Ženy tvorili súčasne nízke aj vysoké hodnoty. Štatisticky významne ($p < 0,005$) korelovala hladina vysokých hladín IFN – γ oproti mužom. Najväčšiu štatistickú významnosť rozdielu medzi meranými hladinami u mužov a žien vykázala hladina IFN- γ v mitogéne ($p=0,00038$), nasledoval NIL ($p=0,0089$) a TB antigén ($p=0,019$). Vplyv mužských a ženských hormónov na hladinu IFN- γ je známy dáv-

nejšie. Je dokázané, že testosterón priamo vplýva na zníženie množstva IFN- γ . Naproti tomu, fyziologické dávky estrogénov zvyšujú väzbu IFN- γ na lymfocyty. Po stimulácii 17 beta-estradiolom (33) dochádza ku zvýšeniu hladiny a počtu buniek exprimujúcich IFN- γ . Naproti tomu, testosterón znižuje alebo má sklon znižovať stimulovanú sekréciu cytokínov (IFN- γ , TNF). Prekvapivé je zistenie, že neurčitý výsledok QFT-G je štatisticky významne závislý od ročného obdobia, kedy sa vyšetrenie robí. Najviac bolo nameraných na jar ($n=10$) a v zime ($n=12$, $p < 0,005$). Prerátané na mesiace – február a máj. Beffa a kolektív (35) udáva že, transport vzoriek v zime a na jar ($p=0,0007$), je častejšie zaťažovaný následne neurčitými výsledkami, ako vzorky odobraté v lete a na jeseň. Pričom závislosť od vzdialenosti laboratória nie je významná. Pri opakovanom vyšetrení OFT-G po 3 mesiacoch a viac sme zo skupiny 31 neurčitých výsledkov dokumentovali opätovne 8 neurčitých (25,80 %), 1 pozitívny (3,23 %) a 22 negatívnych (70,97 %) výsledkov.

Postupom rokov a pribúdaním pacientov na biologickej liečbe sa začala ukazovať ako kľúčová otázka konverzie QFT-G z pôvodne negatívneho pred liečbou na pozitívny výsledok počas aplikácie biologickej liečby. Sledovanie sme uskutočnili na 924 pacientov vyšetrených v roku 2011 (poster č. FRI0158, EULAR 2012 Berlín). Negatívne výsledky sme zistili u 807 pacientov (87,34 %), pozitívne u 117 pacientov (12,66 %). Z nich konverzia QFT-G počas anti-TNF liečby bola u 23/924 pacientov s negatívnym vstupným testom. Podľa pohlavia prevažovali ženy (87 %). To nie je v súlade s percentom žien celkovo liečených anti-TNF liečbou (60 %). Podľa dekád veku konverziu tvorili 60 – 69 roční pacienti. Z anti-TNF preparátov sme zaznamenali najviac konverzií QFT-G u adalimumabu (9/23) a etanerceptu (8/23). Počet najčastejších konverzií u jednotlivých anti-TNF preparátov korešpondoval s množstvom používaných preparátov. Prekvapivé bolo vyššie percento konverzií u certolizumabu – zo 13,04 % celkových konverzií ku 5 % celkovo používaného preparátu v anti-TNF liečbe. Pri hlbšom pátraní príčin konverzie sme pokračovali v sledovaní aj v roku 2012 a zamerali sme sa na hladiny interferónu gama (IFN- γ). Do súboru bolo zaradených 930 testovaných pacientov. Sledovanie v parametri TB-*Nil* preukázalo u blokátora IL-6 14,4-násobný nárast hladiny IFN- γ a pri anti-TNF súborne 91,1-násobný. V parametri Mit-*Nil* bolo zvýšenie hladín IFN- γ takmer konštantné pri všetkých hodnotených preparátoch. Tieto výsledky naznačujú možný prínos sledovania hladín IFN- γ u pacientov s konverziou QFT-G IT počas biologickej liečby, príp. pri posúdení efektu jednotlivých biologických preparátov. Vzhľadom k tomu, že ide o prvé pozorovanie takýchto vzťahov, treba ich ďalej dokumentovať a overiť vo väčších zostavách (AB012, EULAR Madrid 2013). Príčinami konverzie môže byť samotná reaktivácia LTBI podávanou anti-TNF liečbou (narušenie granulómov), kontakt pacienta s aktívnou TBC počas biologickej liečby (novodiagnostikovaná tuberkulózná infekcia), vplyv konkomitant zvyšujúcich hladiny IFN- γ v plazme a ich alternatívne cesty produkcie (IL, chemokíny), prítomnosť heterofilných protilátok, vplyv pohlavných hormónov na hladinu IFN- γ , vplyv buniek s potenciálom uvoľňovať IFN- γ v periférnej krvi, chyby v preanalytickej a analytickej fáze, napr. po chemoprophylaxii (od pol roka do 2 rokov po preliečení negativita QFT-G, potom poziti-

vita pretrváva celý život – opätovne nepreliečovať, nesprávny odber a manipulácia so skúmavkou, nedosiahnutie indikačnej čiary, nesprávna inkubácia a postup).

Vzplanutie LTBI u pacientov v anti-TNF liečbe je tak vážna vec, že vo viacerých krajinách boli v posledných rokoch prijaté národné smernice pre prevenciu reaktivácie LTBI. Na Slovensku je platné od apríla 2007 Metodické usmernenie hlavného odborníka MZ SR pre pneumológiu a ftizeológiu zjednocujúce pravidlá diagnostiky, dispenzarizácie a liečby LTBI pred a počas biologickej liečby s použitím štandardnej diagnostiky obohatenej o IGRA testy (QFT-G používaný od apríla 2007 a T-spot od júla 2011). Smernica odporúča hybridný, dvojstupňový postup vychádzajúci z dlhoročných skúseností s používaním testov TST. Základom sú tuberkulínové testy, ktorých pozitivitu (diagnozu LTBI) je potrebné potvrdiť pozitívnym IGRA testom. Cieľom je obmedzenie výskytu „falošne pozitívnych“ LTBI, a tým spresnenie indikácie ku následnej chemoprophylaxii. Podobné postupy boli zavedené v roku 2006 vo Veľkej Británii, 2007 v Nemecku a Švajčiarsku (33).

QFT-G sa vyšetruje pred zahájením biologickej liečby, potom pravidelne 1x ročne počas jej podávania. Podľa úvahy pneumológa pri podozrení na možné vzplanutie alebo rozvoj novej infekcie kedykoľvek v priebehu liečby. Kontroly pneumológom sú pred zahájením biologickej liečby, potom každé 3 mesiace v prvom roku aplikácie a následne 1x ročne. V poslednom doplnení Vestníka MZ SR zo dňa 01.07.2011 sa odporúča zavedenie chemoprophylaxie aj pri hyperreaktívnom TST (nad 18mm) pri súčasnej negatívite QFT-G pred zahájením liečby za štandardných podmienok. Biologická liečba sa môže začať aplikovať po 2 mesiacoch chemoprophylaxie, pričom tá dobehne podľa schémy podávania do 6 (izoniazid) alebo 4 (izoniazid + rifampicín) mesiacov. Pri zmene negativity na pozitivitu QFT-G počas podávanej liečby sa odporúča pokračovať v biologickej liečbe bez prerušenia a súčasne chemoprophylakticky pacienta preliečiť podľa schémy. Od r. 2011 sa na Slovensku ukončila plošná vakcinácia našej populácie. Tým sme sa priradili medzi kombinované populácie s BCG-vakcináciou a bez nej. V roku 2013 preto môžu byť na biologickú liečbu indikované prvé deti bez BCG vakcinácie.

Záverom môžeme konštatovať, že v záujme zvyšovania benefitu a znižovania rizika anti-TNF liečby (36, 37) je treba, aby aj naďalej pokračovala dobrá medziodborová spolupráca reumatológa, pneumológa a imunológa.

Literatúra

1. Pavelka, K., Rovensky, J., Szilasiova, A. a spol. Reumatoidná artritída In: Pavelka, K., Rovensky, J. Klinická revmatologie. Praha. Galen. 2003, 181-215 ISBN 80-7262-174-2
2. Pavelkova, A. Biologická liečba. In: Pavelkova, A. Reumatoidní artritida a biologická liečba. Praha. Maxdorf Jesenius, 2009, sv. 40, 42- 83 ISBN 978-80-7345-192-9
3. Pavelka, K. TNF liečbe reumatoidnej artritídy. In: Pavelka, K. a kolektiv. Farmakoterapie revmatických onemocneni. Grada. 2005, 215-227 ISBN 80-247-0459-5
4. Pavelka, K., Vencovsky, J., Tegzova, D. TNF blokujúce lieky. In: Pavelka, K. a kolektiv. Farmakoterapie revmatických onemocnení. Grada. 2005, 147-162 ISBN 80-247-0459-5
5. Bucova, M. Úloha cytokínov v rozvoji lokálneho a systémového zápalu pri septickom šoku. Vnitri lekarstvi, 48, 2002, 8, 755-762

6. Vilcek J. First demonstration of the role of TNF in the pathogenesis of disease. *J Immunol.* 2008 Jul 1;181(1): 5-6
7. Pavelka, K. Chorobu modifikujúce léky a revmatoidní artritída. In: Pavelka, K. a kolektiv. *Farmakoterapie revmatických onemocnění.* Grada. 2005, 63-65 ISBN 80-247-0459-5
8. Pichler WJ. Adverse side-effects to biological agents. *Allergy.* 2006 Aug, 61(8): 912-20
9. Ellerin, T., Rubin, R. H., Weinblatt, M. E. IFN γ and anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Arthritis Rheum* 2003, 48: 3013-22
10. Bocchino, M., Bellofiore, B., Matarese, A., Galati, D., Sanduzzi, A. IFN γ release assays in tuberculosis management in selected high-risk populations. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2009, 9:2, 165-177
10. Vourlekis, J. S., Brown, K. K. Poststudy Questions Review the pulmonary complications of common antirheumatic drugs. *Thoracic complication of rheumatoid arthritis*, 14, 1998, Lesson 17
11. Libby, D., White, D. A. Pulmonary toxicity of drugs used to treat systemic autoimmune diseases. *Clin. Chest Med.* 1998, 19: 809-821
12. Diel, E., Wrighton-Smith, P., Zellweger, J-P. Cost-effectiveness of IGRA testing for the treatment of latent tuberculosis in Switzerland, *Eur Respir J* 2007, 30: 321- 332
13. Tailleux, L., Schwartz, O., Herrmann, J. L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A. et al. DC-SIGN Is the Major Mycobacterium tuberculosis Receptor on Human Dendritic Cells. *J Exp Med* 2003, 197: 121-7
14. Clay, H., Volkman, H. E., Ramakrishnan, L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity* 2008, 29: 283-294
15. Carmona, L., Gomez-Reino, J. J., Rodriguez-Valverde, V., Montero, D., Pascual-Gomez, E., Mola, E. M., Carreo, L., Figueroa, M., BIOBADASER Group. Effectiveness of recommendations to prevent reactivation of latent tuberculosis infection in patients treated with tumor necrosis factor antagonists. *Arthritis Rheum.* 2005, 52(6): 1766-72
16. Lalvani, A., Millington, K. A. Screening for tuberculosis infection prior to initiation of anti-TNF therapy. *Autoimmunity Reviews* 2008, 8: 147-152
17. Spira, A., Carroll, J. D., Liu, G., Aziz, Z., Shah, V., Kornfeld, H. et al. Apoptosis genes in human alveolar macrophages infected with virulent or attenuated Mycobacterium tuberculosis: a pivotal role for tumor necrosis factor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003, 29: 545-51
18. Imperato, A.K., Bingham, C.O., Abramson, S.B. Overview of benefit/risk of biological agents. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2004, 22 (Suppl. 35): 108-114
19. Geijtenbeek, T. B., Van Vliet, S. J., Koppel, E. A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Appelmek, B. et al. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* 2003, 197: 7-17
20. Engele, M., Stossel, E., Castiglione, K., Schwerdtner, N., Wagner, M., Bolcskei, P. et al. Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 2002, 168: 1328-37
21. Keane, J., Remold, H. G., Kornfeld H. Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol* 2000, 164: 2016-20
22. MedIFN γ – The clinical view of tuberculosis, differential diagnosis. 2002. [http:// www.medifn.sk/%3Fs%3Dheslo%26id%3D673](http://www.medifn.sk/%3Fs%3Dheslo%26id%3D673)
23. Tuberkulóza-Verejnosť- Glaxo SmithKlein. Project – tuberculosis. May 13, 2010. <http://>

- www.gsk.sk/verejnost_svet_tuberkuloza.html
24. Anonymous. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva, Switzerland: WHO; 2008
 25. Pratt, A., Nicholl, K., Kay, L. Use of the QuantiFERON TB Gold test as part of a screening programme in patients with RA under consideration for treatment with anti-TNF-alpha agents: the Newcastle (UK) experience. *Rheumatology (Oxford)* 2007, 46: 1035-6
 26. Cellestis developed QuantiFERON Gold. Accessed July 04, 2007. <http://www.cellestis.com//>
 27. Mayordomo, L., Marenco, J. L., Gomez-Mateos, J., Rejon, E. Pulmonary military tuberculosis in a patient with anti-TNF-alpha treatment. *Scand. J. Rheumatol.* 2002, 31: 44
 28. Scallon, B., Cai, A., Solowski, N., Rosenberg, A., Song, X. Y., Shealy, D. et al. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 301: 418–26
 29. Wolfe, F., Michaud, K., Anderson, J., Urbansky, K. Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of IFNliximab therapy. *Arthritis Rheum.* 2004, 50: 372-379
 30. British Thoracic Society Standards of Care Committee. BTS recommendations for assessing risk and for managing Mycobacterium tuberculosis infection and disease in patients due to start anti-TNF-alpha treatment. *Thorax.* 2005, 60(10): 800-5
 31. Kharbanda, P, Dagaonkar, R., Balakrishnan, C., Udawadia, Z.F. Tumor necrosis factor – a blocker induced tuberculosis. *J. Rheumatol* 2010, 37: 7-11
 32. Panchanathan, R., Shen, H., Zhang, X., Ho, S. M., Choubey, D. Mutually positive regulatory feedback loop between interferons and estrogen receptor-alpha in mice: implications for sex bias in autoimmunity. *PLoS One.* 2010 May 28, 5: e10868
 33. Janelle, D., Lang, T., Capellino, S., Cutolo, M., Pereira da Silva, J.A., Straub, R. H. Effects of testosterone, 17beta-estradiol, and downstream estrogens on cytokine secretion from human leukocytes in the presence and absence of cortisol. *Ann N Y Acad Sci.* 2006, 1069: 168-82
 34. Bongartz, T., Sutton, A. J., Sweeting, M. J., Buchan, I., Matteson, E. L., Montori, V. Anti-TNF Antibody Therapy in Rheumatoid Arthritis and the Risk of Serious Infections and Malignancies. Systematic Review and Meta-analysis of Rare Harmful Effects in Randomized Controlled Trials. *JAMA.* 2006, 295: 2275-2285
 35. Záhová, E., Solovič, I., Poľanová, M., Rovenský, J., Rybár, I., Raffayová, H. Diagnostika latentnej formy tuberkulózy u pacientov s reumatoidnou artritídou pred biologickou (anti-TNF) liečbou. *Respiro.* 2007, 3: 15-19
 36. Rybár, I., Rozborilová, E., Záhová, E., Mičeková, D., Solovič, I., Rovenský, J. Prínos prevencie tuberkulózy u pacientov so zápalovými reumatickými chorobami v anti-TNF liečbe. *Bratisl. Lek. Listy.* 2008, 109, 4: 164-167

Adresa

MUDr. Elizabeth Zanova, PhD.
Národný ústav reumatických chorôb
Nábřežie I. Krasku 4
921 12 Piešťany
E-mail: piestanka@yahoo.com

IMUNOPATOGENÉZA SCLEROSIS MULTIPLEX A JEJ ODRAZ V BIOLOGICKEJ LIEČBE

Buc Milan

Imunologický ústav lekárskej fakulty UK, Bratislava

Sclerosis multiplex (SM) je autoimunitná choroba, pri ktorej dochádza k deštrukcii myelínových obalov v CNS, periférny nervový systém ostáva neporušený. Chorobu ako klinickú jednotku prvý raz opísal r. 1868 francúzsky neurológ J. M. Charcot. Postihuje prevažne mladšie osoby kaukazoidnej populácie vo veku 16 – 40 rokov, viac ženy ako mužov (3:1 až 4:1). Prevalencia je 5:10 000, incidencia sa zvyšuje smerom od rovníka k severu, v Európe je dvakrát častejšia ako v Afrike, pričom najviac postihnutých je v Škandinávii a Škótsku. Presťahovalci vo veku do 15 rokov nesú so sebou riziko vývoja choroby, ktoré je charakteristické pre oblasť v ktorej žili, starší majú riziko vývoja choroby typické pre oblasť, do ktorej sa prisťahovali (1).

Etiológia a genetická determinácia

Príčinu choroby, podobne ako pri väčšine autoimunitných chorôb, nepoznáme. Predpokladá sa interakcia faktorov vonkajšieho prostredia s genetickou predispozíciou k chorobe. Zo spúšťacích faktorov sa obviňujú vírusy, ktoré mechanizmom molekulového mimikri indukujú rozvoj imunopatologických procesov. V skutočnosti, početné vírusy obsahujú proteíny, ktoré majú príbuznú štruktúru s principiálnym autoantigénom pri SM – myelínovým základným proteínom (MBP). Ide o vírus osýpok, CMV, EBV, HBV, HSV, humánny herpetický vírus 6 alebo 7, koronavírusy a iné. Vzťah medzi vírusmi a SM podporujú aj údaje, že vírusové infekcie často predchádzajú záchvaty choroby. Pravdepodobne IFN- γ , ktorý sa produkuje počas vírusovej infekcie, spustí do pohybu imunopatologické procesy vrcholiace demyelinizáciou (2). Túto predstavu podporuje aj skutočnosť, že ak sa chorým podá IFN- γ , vyprovokuje to záchvat choroby. Ďalší dôkaz o spojitosti environmentálnych faktorov a vývojom SM poskytujú experimenty na myšiach. Transgénové myši, ktoré majú T-lymfocyty so špecifickým anti-MBP receptorom, vyvinú autoimunitnú encefalomyelitídu (EAE = *experimental autoimmune encephalomyelitis*) len ak sa chovajú v nesterilnom prostredí, ale nie ak sa držia za sterilných, bezmikrobných podmienok.

Prvotná príčina indukcie imunopatologických procesov vedúcich k rozvoju SM môže byť aj v samotnom MBP. Existujú údaje, že MBP izolovaný od pacientov, ktorí zomreli na SM, je menej kationický, t. j. jeho pozitívny náboj je menší ako ho má MBP zdravých. Pretože schopnosť MBP vytvárať stabilné, kompaktné mnohovrstvové útvary závisí od jeho pozitívneho náboja, dá sa predpokladať, že menej kationický MBP túto svoju funkciu nebude môcť dôsledne spĺňať. Výsledkom by bola vrodená nestabilita myelínu, čím by sa súčasne stal terčom pre efektorové mechanizmy imunity.

Iná možnosť je porucha indukcie tolerancie na myelín počas diferenciácie tymocytov v týmuse. Väčšina aj zdravých osôb má vo svojej krvi antimyelínové T-lymfocyty (proti peptidu 83 – 89), ale ich aktivácii u zdravých bránia mechanizmy periférnej tolerancie. Čo u chorých so SM takéto autoreaktívne lymfocyty aktivuje nevieme, možno superantigény. Poranenie jedinca elektrickým prúdom vývoj choroby podporuje a zhoršuje jej priebeh.

Genetická predispozícia k chorobe vyniká najmä v porovnaní konkordancie vývoja choroby u monozygotných dvojčiat s dizygotnými, pomer je 26:2,4 %. Riziko vývoja SM je u príbuzných pacienta tiež vyššie ako medzi nepríbuznými. Z génov, ktoré sa spolupodieľajú na vývoji SM sú najznámejšie gény HLA-komplexu, konkrétne druhý najznámejší ancestrálny haplotyp HLA-A*03:01, -Cw*07, -B*07:02, -DRB1*15:01, -DRB5*01:01, -DRB6*02:01, -DQA1*01:02, -DQB1*06:02, -DPA1*01, -DPB1*04:01, ktoré determinujú molekuly HLA-A3, -Cw7, -B7, -DR15, -Dw2, -DQ6, -DP4; vyskytujú sa až u 70 % pacientov v porovnaní s 20 % u zdravých (3). Z iných génov, ktoré sa spájajú s predispozíciou k chorobe sa uvádzajú CCR5, IL-10, INF- γ , IL-4R α , IL-12R β , IL-21, VLA-4 a iné.

Patologicko-anatomický obraz a patogenéza

Patologicko-anatomicky pozorujeme v akútnej fáze tvorbu demyelinových plakov v okolí malých cievok v bielej hmote mozgu a akumuláciu zápalových buniek; staršie ložiská o veľkosti od 1 mm až po niekoľko cm tento zápalových infiltrát nemajú, myelín a oligodendrocyty nahrádza mikrogliá. Výsledkom zbavenia nervových vlákien svojich obalov spôsobuje poruchu prenosu vzruchu. Pôvodne sa myslelo, že k prerušeniu nervových vlákien nedochádza, avšak konfokálne mikroskopické vyšetrenia odhalili, že prerušené axóny sa v mozgových léziách vyskytujú pravidelne a že ich počet závisí od stupňa zápalového procesu.

Sclerosis multiplex je typická autoimunitná choroba. Imunopatologický proces sa začína aktiváciou autoreaktívnych T-lymfocytov na periférii. Okrem MBP ako autoantigény vystupujú ešte aj PLP (proteolipidový proteín), MOG (myelinový oligodendrocytový glykoproteín), MAG (*myelin-associated glycoprotein*), α B-krystalín a iné (4). Antigénovo-špecifické T-lymfocyty patria T_H1- a najmä T_H17-subpopuláciám (5). Aktivované T-lymfocyty následne začnú do svojej bunkovej membrány zabudovávať adhezívne molekuly (najdôležitejšie sú α 4 β 1-integríny), čo im umožní viazať sa na adhezívne molekuly na endotelových bunkách CNS (najmä VCAM-1, ktorý sa tu v malých množstvách konštitutívne exprimuje; po stimulácii cytokínmi sa jeho expresia zvyšuje) a následne prechádzať do parenchýmu mozgu. Tento mechanizmus prechodu využívajú T_H1-lymfocyty, kým T_H17-lymfocyty využívajú interakciu medzi ich chemokínovým receptorom CCR6 a jeho ligandom CCL20, ktorý sa tiež konštitutívne exprimuje na endotelových bunkách; do CNS preferenčne vstupujú v oblasti *plexus chorioideus* (6, 7). V niektorých prípadoch väčšiu úlohu ako pomocné zohrávajú cytotoxické T-lymfocyty; na svoj vstup využívajú PSGL1 a jeho receptor na endotelových bunkách.

Najnovšie sa zistilo, že na prestupe lymfocytov do CNS sa podieľa aj S1PR2, čo je receptor pre sfingozín-1-fostát (S1P) (pozri ďalej). Tento receptor reguluje permeabilitu medziednotelových spojení. Dokázalo sa, že sa vo zvýšenej miere nachádza v membránach endotelových buniek v zápalových ložiskách pacientov so SM, viac u žien ako u mužov. Okrem ovplyvňovania priepustnosti HEB zodpovedá aj za translokáciu chemokínu CXCL12 z abluminálnej do luminálnej lokalizácie, čo uľahčuje autoreaktívnym T-lymfocytom rozpoznávať ho svojim CXCR4 receptorom a následne priľnúť a prestúpiť do parenchýmu mozgu (8, 9).

Po prechode autoreaktívnych T-lymfocytov, v perivaskulárnom priestore, sa začínú odohrávať iniciálne imunopatologické procesy. Tu sa dostávajú do kontaktu s myeloidnými dendritovými bunkami, ktoré prostredníctvom svojich HLA-molekúl druhej triedy prezentujú peptidy pochádzajúce z myelínu, čím sa reaktivujú, začínú prenikať do parenchýmu a produkovať prozápalové cytokíny (najmä IFN- γ , IL-17 a TNF). Tieto následne stimulujú parenchýmové mikrogliové bunky, ktoré produkciou svojich cytokínov (IL-12, IL-23, osteopontín¹) a toxických mediátorov (reaktívne intermediálne produkty dusíka a kyslíka) poškadzujú myelín; z neho sa uvoľňujú ďalšie autoantigény a „*circulus vitiosus*“ pokračuje (10). Cytotoxické T-lymfocyty poškadzujú myelín svojím perforínovo-granzýmovým mechanizmom. Dochádza aj k aktivácii B-lymfocytov; týchto je v plaku spočiatku málo, ich relatívny počet sa zvyšuje, až keď sa ložisko stáva chronickým. Aktivácia B-lymfocytov sa prejaví intracerebrálnou syntézou IgG, ktoré sú typicky oligoklonové². U niektorých pacientov sa zdá, že v patogenéze zohrávajú významnejšiu úlohu ako T-lymfocyty. Svedčí o tom tvorba terciárnych lymfoidných folikulov v meningoch, ktoré sa dokázali u pacientov so sekundárne progresívnou formou SM (SP-SM). Ich prítomnosť sa spája so skorším nástupom choroby a horším klinickým priebehom (2, 11, 12).

Na vývoji autoimunitných chorôb môžu mať svoj podiel aj nTreg-lymfocyty a to tým, že chýbajú, ich funkcia je znížená, alebo že efektorové T-lymfocyty na ich pôsobenie neodpovedajú. Aká je situácia pri *sclerosis multiplex* (SM)? Viaceré práce poukazujú na nedostatočnú funkciu nTreg-lymfocytov (13-16), i keď sú aj práce, ktoré udávajú pokles počtu týchto buniek v periférnej krvi (17). Aká je príčina ich nedostatočnej funkcie? Zrejme pôjde o komplexnú poruchu, ako je znížená expresia koinhibičných molekul (CLTA4, TIM-3, TIGIT) v membránach buniek, znížená syntéza imunosupresívnych cytokínov a pod. (15, 18). Nedostatočná tlmivá aktivita nTreg-lymfocytov umožní na periférii aktivovaným autoreaktívnym T-lymfocytom prechádzať do CNS a rozvíjať tu imunopatologický proces (19).

- 1 Osteopontín je cytokín, ktorý pôsobí chemotakticky na makrofágy, aktivuje T_H1-lymfocyty (ale nepriamo, tlmením syntézy IL-10) a má aj antiapoptotický účinok.
- 2 IgG, ktorý sa nachádza v cerebrospinálnej tekutine (CSF) môže pochádzať z plazmy alebo sa vytvorí v mozgu. Z tohto dôvodu sa koncentrácia IgG v CSF vždy vzťahuje ku koncentrácii iného proteínu, najčastejšie albumínu; oba sa stanovujú rovnakou metódou. Ak sa IgG syntetizuje v CNS, je pomer IgG : albumín vyšší, ak pochádza z plazmy, tento pomer sa nemení, lebo hematoencefalickou bariérou prestupujú oba.

Na polarizácii imunitnej odpovede do T_H1 -typu sa podieľa aj nedostatočná syntéza neuropeptidu Y (NPY). Ide o peptid skladajúci sa z 36 aminokyselinových jednotiek; *in vitro* inhibuje sekréciu IFN- γ a zvyšuje syntézu IL-4, čo naznačuje, že posúva rovnováhu medzi T_H1 a T_H2 smerom k T_H2 . Pri SM v porovnaní so zdravými sa NPY v CSF nachádza v znížených hladinách. T-lymfocyty od chorých s SM vo zvýšenej miere exprimujú CD26, čo je peptidáza, ktorá dokáže degradovať aj NPY, čím by v sa mikroprostredí, v ktorom sa autoimunitný proces odohráva, vytváral jeho nedostatok. Následná nedostatočná aktivácia receptorov (Y1) podporí vývoj T_H1 -imunitnej odpovede (20).

Klinický obraz a laboratórna diagnóza choroby

Klinicky sa choroba v 60 % manifestuje ako relapsujúco-remitentná (RR-SM), t. j. obdobia exacerbácie klinických príznakov (relaps) nasledujú rôzne dlhé obdobia relatívneho pokoja (remisia), čo trvá 15 – 20 rokov až kým pacient nie je trvalo pripútaný na lôžko, resp. na invalidný vozík a absolútne závisí od pomoci ošetrojúcej osoby. Takýto priebeh sa prejavuje až približne u 85 – 90 % chorých, u ostatných 10 – 15 % je priebeh choroby od samého začiatku progresívny (primárne-progresívna SM /PP-SM/, na rozdiel od sekundárne progresívnej formy, ktorá sa môže vyvinúť z RR-SM, s vývojom invalidity za 5 – 6 rokov. Pacienti s PP-SM zle odpovedajú na biologickú liečbu, ktorá sa bežne dáva pacientom s RR-SM, čo naznačuje, že za chorobu zodpovedajú iné imunopatologické procesy ako pri RR-SM (21). U žien je častejší remitujúco-relapsový, u mužov skôr progresívny priebeh. Choroba sa prejavuje motorickými a senzorkými výpadmi funkcie periférnych nervov, chorí trpia psychickými poruchami a u niektorých sa vyvinie zápal optického nervu. K zlepšenie klinického stavu dochádza počas tehotenstva, po pôrode však dôjde k prepuknutiu príznakov v rovnakej alebo horšej podobe ako predtým.

Sclerosis multiplex je choroba, ktorá postihuje mladých dospelých a obyčajne trvá 10 až 20 rokov. Na rozdiel od *diabetes mellitus* prvého typu, ktorý sa klinicky manifestuje až keď absolútna väčšina beta-buniek Langerhansových ostrovčekov zanikne, prvé príznaky SM sa objavia ešte keď tieto sú reverzibilné a poškodenie CNS je minimálne, čo poskytuje určitú dobu na včasnú terapeutickú intervenciu.

Neuromyelitis optica (NMO) sme až donedávna sa považovali za variant SM. Dnes predstavuje samostatnú chorobnú jednotku. Ide pri nej o autoimunitný zápal spôsobujúci demyelinizáciu optického nervu a miechy. Hoci môže postihnúť aj mozog, lézie sú rozdielne od tých, ktoré sa pozorujú pri SM. Pre syndróm sú charakteristické protilátky proti aquaporínu 4 v membráne astrocytov (AQP4)³ (22, 23). Dominantnými bunkami infiltrujúcimi lézie sú neutrofilny, bunky, ktoré pri SM prakticky chýbajú. Ďalšia odlišnosť od SM je, že v cerebrospinálnej tekutine (CSF) sú vysoké hladiny IL-17. Tie pravdepodobne zodpovedajú za indukciu produkcie chemokínov (IL-8, G-CSF a CXCL1), ktoré priťahujú a aktivujú granulocyty (24). IFN- β , ktorý sa používa v liečbe SM, pri NMO sa nesmie podávať. Nielenže sú pacienti, ktorí na túto liečbu neodpovedajú, ale

3 Aquaporíny sú integrálne proteíny bunkových membrán, ktoré regulujú tok vody.

u niektorých liečba indukuje ťažké relapsy a exacerbácie choroby (25, 26). Tu však sa tiež ukazuje, že biologická liečba by mohla značne prispieť k liečbe choroby – vyvinuli sa monoklonové protilátky (aquaporumab), ktoré sa viažu na AQP4 (ale neaktivujú ani komplement ani K-bunky, takže k poškodeniu buniek, na ktoré sa viažu, nedochádza), čím sa zabráni anti-AQP4 protilátkam, aby uplatnili svoju patogenetickú úlohu (27).

Celkom nedávno (2013) sa zistilo, že AQP4-molekuly sa nachádza aj v membránach buniek syncytiotrofoblastu. Anti-AQP4 protilátky (sú triedy IgG) sa takto môžu nadviazať, aktivovať komplement a jeho štiepne produkty (C3a, C5a, C5b67) následne priťahovať neutrofilné leukocyty. Vyvíja sa takto zápal placenty, ktorý, ak je značného rozsahu, môže spôsobiť deštrukciu syncytiotrofoblastu a potrat, ktorý sa pozoruje asi u 13 % žien trpiacich NMO (28).

Laboratórna diagnóza SM sa zakladá na dôkaze oligoklonového IgG v CSF; zjavuje sa tu už zavčasu a typicky pretrváva dlhú dobu. Pomer IgG k albumínu je viac ako 22 %. V CSF aj v sére od chorých možno dokázať aj špecifické protilátky. Chorí, ktorí sú séropozitívni pre protilátky anti-MOG a anti-MBP majú väčšiu pravdepodobnosť druhého relapsu – v priebehu 8 mesiacov, v porovnaní so 45 mesiacmi u chorých bez uvedených protilátok. Prítomnosť IgM anti-lipidových protilátok v CSF sa spája s progresívnejšou formou choroby (4). U niektorých pacientov so SM sa v ich plazme nachádzajú aj anti-dsDNA protilátky, ale bez akýchkoľvek príznakov SLE. Ale naopak, niektorí pacienti s jasným SLE vyvinú príznaky typické pre SM. Podobne ako autoprotilátky možno v sérach od pacientov nájsť zvýšené hladiny solubilných adhezívnych molekúl PECAM-1 a E-selektín (29).

Klasická a biologická liečba

Liečba SM nie je ľahká. Lieky, ktoré sa používajú pre liečbu zápalových a malígnych chorôb, ako cyklofosamid, metotrexát, kladribín, mitoxantrón, intravenózne imunoglobulíny, cyklosporín A sú úspešné aj pri liečbe SM, aj keď nie vždy s väčším úspechom, pravdepodobne pre ich ťažší prienik do CNS v dôsledku hematoencefalickej bariéry. Intravenózne podanie metylprednizolonu môže urýchliť odznenie akútnych záchvatov, ale ďalší počet relapsov neovplyvňuje. Špecifickejšiu terapiu predstavuje biologická liečba, resp. látky, ktoré zasahujú do biologického cyklu buniek, ktoré sa zúčastňujú na imuno-patologických procesoch (tab. 10.2).

Ako prvé biologikum, ktoré sa pri liečbe SM začalo podávať, bol IFN- β , neskôr do hry vstúpil glatiramér-acetát, monoklonové protilátky, FTY-720 a iné. Každé z uvedených imunoterapeutík má svoje vlastné mechanizmy, ktorými ovplyvňuje prebiehajúce imunopatologické procesy a pokúša sa o návrat do fyziologických podmienok. Treba však hneď povedať, že ani jednému v súčasnosti používaných biologík sa to doteraz nepodarilo, vždy ide iba o úpravu – zlepšenie klinického stavu pacientov, ale nie o vyliečenie.

Interferón beta (IFN- β) svoje imunosupresívne pôsobenie uplatňuje viacerými spôsobmi. Pôsobí na bunky prezentujúce antigén, t. j. makrofágy a mikroglia, tým,

že znižuje v ich membránach množstvo HLA-molekúl druhej triedy a indukuje objavenie sa inhibičných molekul PDL-2, ktoré po interakcii s PD1-receptormi na T-lymfocytoch navodia v nich apoptotický proces. IFN- β znižuje aj proliferáciu makrofágov, čím znižuje ich počet a tým aj schopnosť aktivovať ďalšie a ďalšie autoreaktívne T-lymfocyty (26).

Významnú úlohu má podávanie IFN- β aj na pôsobenie Treg-lymfocytov. IFN- β v membránach dendritových buniek (DC) zvyšuje množstvo ligandov pre GITR-receptory (GITRL). Interakcia medzi GITR na Treg-lymfocytoch s GITRL na dendritových bunkách podmieni v Treg-lymfocytoch prenos stimulačného signálu, ktorý spôsobí, že tieto začnú proliferovať a tým zvyšovať svoje počty a následne aj svoju tlmivú aktivitu. Tejto proliferácii napomáha aj druhý efekt IFN- β pôsobenia na Treg-lymfocyty, a to v podobe zníženia množstva ich CTLA4-molekúl, ktoré potláčajú aktivitu Treg-lymfocytov. Tieto sa takto stávajú vnímavejšie na pôsobenie stimulačných podnetov, najmä na IL-2, ktorý je ich základným homeostatickým cytokínom (30).

Glatiramer acetát (GA) je druhým imunopreparátom liečby prvej línie. Ide o zmes syntetických peptidov, ktoré sa skladajú z 50 až 90 aminokyselinových jednotiek. Konkrétne ide o L-glutámovú kyselinu, L-lyzín, L-alanín a L-tyrozín, ktoré sú v peptide zastúpené náhodne. Tieto aminokyseliny sa na tvorbu peptidov nevybrali náhodne, ale cielene, lebo sa v myelíne vyskytujú najčastejšie. Mechanizmus účinku GA môže byť v blokáde žliabku HLA-molekúl, ale ukazuje sa, že GA má aj imunomodulačné vlastnosti. Dokázalo sa, že GA indukuje produkciu sIL-1Ra, prirodzeného inhibítora IL-1, čím znižuje jeho pôsobenie a aj jeho syntézu. Navyše monocyty, resp. makrofágy pod jeho vplyvom produkovali aj menej IL-1, TNF, teda najdôležitejších mediátorov zápalu a IL-12, ktorý podporuje T_H1 -imunitnú odpoveď; naopak, GA zvyšoval ich syntézu imunosupresívneho IL-10 (31). Predpokladá sa, že GA-aktivované T-lymfocyty vstupujú aj do CNS a tu presadzujú svoj protizápalový a neuroprotektívny účinok (32). GA zlepšuje aj imunosupresívne pôsobenie regulačných T-lymfocytov a to zvyšovaním expzie koinhibičných molekul TIGIT a TIM-3, ktoré sú u pacientov so SM v membránach ich Treg-lymfocytov znížené (15, 18, 33).

K biologickej liečbe druhej línie pacientov so SM patrí natalizumab a FTY720.

Natalizumab sú monoklonové protilátky (mAb) proti $\alpha4$ -reťazcu adhezívnej molekuly VLA4 ($\alpha4\beta1$ -integrín), ktorý sa exprimuje v membránach T-lymfocytov; jeho partnerská molekula na endotelových bunkách ciev v CNS je VCAM-1. Podávaním týchto mAb sa zabraňuje prechodu autoreaktívnych T-lymfocytov do CNS, pretože T-lymfocyty nemôžu priľnúť na endotelovú výstelku ciev a tak sa následne preplaziť do parenchýmu mozgu, čo makroskopicky vnímame ako lymfocytózu. Na regulačné T-lymfocyty nemá vplyv, neovplyvňuje ani ich počty ani ich funkciu. Po prerušení liečby sa však u niektorých pacientov po troch až šiestich mesiacoch pozoruje relaps choroby. U jedincov, ktorým sa choroba vrátila (relaps), alebo mali zhoršené prejavy MRI, sa pozorovala menšia lymfocytóza oproti tým, u ktorých sa relaps nevyskytol. Jedna z možných príčin tohto javu je aj v genetickom polymorfizme génu pre antiapoptotický proteín Akt. Jedna jeho

forma, rs2498804T⁴, sa spája s jeho zníženou aktivitou a teda zvýšenou apoptózou aktivovaných T-lymfocytov a teda aj nižšou lymfocytózou (34, 35).

Jedna z komplikácií liečby SM natalizumabom je indukcia progresívnej multifokálnej leukoencefalopatie (PML) vyvolanej John Cunninghamovým vírusom (JCV) (36). Je to vírus, ktorý sa replikuje v oligodendrocytoch, spôsobuje ich zánik a tým aj demyelinizáciu. Odhaduje sa, že až polovica populácie je nosičom JCV, často v obličkách a vylučuje ho močom. Výsledkom infekcie JCV je prerušenie liečby, ktoré však u niektorých pacientov vyvolá IRIS-syndróm (*immune reconstitution inflammatory syndrome*). Tento sa prejavuje masívnou infiltráciou lymfocytov do mozgu a intenzívnym zápalom. Môže sa prejavovať za niekoľko dní až týždňov s mortalitou 20 až 30 %. Jediná účinná liečba je podávanie glukokortikoidov vo vysokých dávkach.

Ďalší liek v druholiniovej liečbe SM predstavuje **FTY720 (fingolimod)**. Je derivát myricínu, ktorý sa izoluje z čínskej huby *Iscaria sinclairii*. FTY720 je štruktúrnym analógom sfingozínu, ktorý sa fosforyluje sfingozínovou kinázou a následne pôsobí ako veľmi silný agonista receptorov pre sfingozín 1-fosfát⁵ (37, 38). Zníženie, resp. vymiznutie S1P1-receptorov na T- a B-lymfocytoch spôsobí poruchu ich vycestovania zo sleziny, lymfatických uzlín a Peyerových plakov. Reverzibilná sekvestrácia sa týka až 80 % lymfocytov za 3 – 5 hodín po aplikácii (39).

Pôsobenie FTY720 na regulačné T-lymfocyty nie je ešte úplne objasnené. Existujú literárne údaje, ktoré poukazujú, že FTY720 podporuje ich proliferáciu a imunosupresívnu aktivitu, i keď mechanizmus akým to dosahujú autori neuvádzajú (39). Tejto vlastnosti FTY720 by zodpovedali aj klinické údaje, ktoré dokumentujú, že po prerušení liečby týmto preparátom dochádza k relapsu a k indukcii príznakov, ktoré sa podobajú IRIS-syndrómu vznikajúcom po prerušení liečby natalizumabom (40, 41). Naznačovalo by to, že o. i. došlo aj k poklesu aktivity regulačných a zvýšeniu aktivity efektorových T-lymfocytov. Naopak, iné práce dokazujú, že FTY720 znižuje aktivitu regulačných T-lymfocytov, a to aj ich proliferačnú aj funkčnú aktivitu. Spôsob ktorým to FTY720 dosahuje sa zakladá na jeho interferencii s fosforyláciou a tým aktiváciou transkripčného faktora STAT5, ktorý je potrebný na transkripciu FOXP3-génu a vznik nTreg-lymfocytov (42). Klinické skúsenosti v súvislosti s vyššie uvedeným relapsom po prerušení liečby však tomu nenasvedčujú, resp. získané poznatky v predklinických štúdiách nie vždy musia korelovať s účinkom preparátu pri samotnej liečbe pacientov. Pripomína to udalosť z r. 2006, kedy sa použila super-agonistická monoklonová protilátka anti-CD28, ktorá v klinickom použití viedla k cytokínovej búrke a k ťažkým klinickým príznakom, ktoré hraničili s prežitím. Bolo to neočakávané, lebo v predklinických štúdiách táto mAb podporovala expanziu práve nTreg-lymfocytov (43).

V ostatnej dobe sa do klinických skúšok dostávajú **monoklonové protilátky, ktoré rozpoznávajú CD20** na povrchu B-lymfocytov a pomocou komplementu alebo akti-

4 Jedná sa o polymorfizmus na úrovni jednotlivého nukleotidu – SNP (*single nucleotide polymorphism*)

5 Ide o receptory S1P1 až S1P5, na S1P2 sa neviaže. T-lymfocyty využívajú najmä S1P1 a B-lymfocyty zase S1P3.

váciou K-buniek ich likvidujú. Vychádza sa tu z poznatkov o inej biologickej funkcii B-lymfocytov ako len buniek, ktoré zodpovedajú za syntézu protilátok. Už vyššie sme písali, že existuje subpopulácia B-lymfocytov, ktorá má imunosupresívne vlastnosti. Podobne začína sa zisťovať, že B-lymfocyty majú významnú úlohu aj pri prezentácii antigénov. B-lymfocyty totiž majú v svojich membránach HLA-molekuly druhej triedy a pohltené antigény, ktoré predtým rozpoznali a viazali svojim antigénovým receptorm, dokážu spracovať, nadviazať na HLA-molekuly a prezentovať T-lymfocytom. Monoklonové protilátky anti-CD20 znižujú počet B-lymfocytov, čím sa znižuje možnosť ich interakcie autoreaktívnymi T-lymfocytmi a k útlmu imunitných procesov. Súčasne dochádza k zmene cytokínového mikroprostredia, ktoré podmieni vznik a expanziu Treg-lymfocytov čím sa autoimunitný proces ďalej tlmí (44-46). Prečo sa vybral práve CD20-antigén? Odpoveď je pomerne jednoduchá – nachádza sa v membránach prakticky všetkých vývojových štádií B-lymfocytov, od pre-B-lymfocytov až po pamäťové B-lymfocyty (47). Anti-CD20 mAb existujú v troch prevedeniach – rituximab, ocrelizumab a ofatimumab. Rituximab a ofatimumab ničia B-lymfocyty prostredníctvom aktivácie komplementu, ocrelizumab aktiváciou K-buniek, čo je výhodnejšie, lebo oproti prvým nevznikajú prozápalové fragmenty komplementového systému, ktoré vyvolávajú prozápalové komplikácie, ale apoptotické telieska, ktoré likvidujú makrofágy bez akejkoľvek indukcie zápalových procesov (48). Rituximab sa osvedčil aj pri zvládaní *neuromyelitis optica* (NMO) (23, 49).

V štádiu klinických skúšok sa nachádzajú aj ďalšie dve monoklonové protilátky – alemtuzumab a daclizumab. **Alemtuzumab** sú monoklonové protilátky proti CD52. Táto glykozylovaná molekula, ukotvená v membráne buniek (lymfocytov, monocytov a granulocytov) GPI-kotvou má kostimulačné účinky; jej ligandom je Siglec-10 (50). Alemtuzumab aktiváciou komplementu a K-buniek vedie k rýchlej deštrukcii T-, B-lymfocytov, NK-buniek a monocytov. Hoci má biologický polčas len 6 dní a neovplyvňuje prekursorové bunky, aj pomocné (CD4⁺) aj cytotoxické (CD8⁺) lymfocyty sa vracajú k východiskovým hodnotám až za 61, resp. 30 mesiacov; navyše dochádza k expanzii nTreg-lymfocytov, čo všetko môže vysvetliť jeho pozitívne účinky v liečbe SM (51). Prečo po aplikácii anti-CD52 mAb pretrváva lymfopénia? Jednak je to nedostatočný prísun nových lymfocytov, lebo tymocyty sa sú ničené tiež a jednak je to je homeostatická proliferácia; novovznikajúce T_H-lymfocyty sú veľmi náchylné na apoptózu, takže ich biologický polčas je veľmi krátky a lymfopénia pretrváva.

V protiklade s pretrvávajúcim poklesom T-lymfocytov, B-lymfocyty sa dostávajú na pôvodnú úroveň už za tri mesiace a potom ich počty dokonca aj stúpajú (48, 51). Táto skutočnosť (t. j. zvýšená aktivita B-lymfocytov a nedostatočná tlmivá funkcia regulačných T-lymfocytov) môže vysvetliť aj sklon takto liečených pacientov vyvinúť autoimunitné komplikácie (fatálna autoimunitná trombocytopenia, Gravesova choroba a oportunistické infekcie) (52, 53). Práve pre nepriaznivé účinky FDA neschválila alemtuzumab pre klinické používanie, hoci predtým EMA ho schválila (54). Zrejme bude treba ďalšie skúšky, kým sa dospeje k definitívnemu rozhodnutiu.

Daclizumab sú monoklonové protilátky proti alfa-reťazcu pre IL-2 (CD25). Mechanizmus ich účinku je zaujímavý – indukujú vznik NK-buniek, ktoré prechádzajú do intratekálneho priestoru a tu zabíjajú autoreaktívne T-lymfocyty (55).

Napokon, v súvislosti s úlohou Treg-lymfocytov v rozvoji a terapii SM sa treba zmieniť aj o možnosti **indukcie a expanzie vlastných Treg-lymfocytov** pacienta *in vitro* a následné ich spätné podanie pacientovi. Tento spôsob zvládania imunitných procesov sa úspešne odskúšal pri zvládaní GvHD u ľudí (56) a pri liečbe experimentálnej autoimunitnej encefalitídy (EAE) indukovanej podaním MOG (57).

Ďalšie prípravky, ktoré sú v štádiu klinických skúšok sa uvádzajú v tab. 10.1. Perspektívna bude aj liečba blokádou S1PR2-receptora, ktorý sa najnovšie ukazuje ako principiálny faktor pre prestup autoreaktívnych T-lymfocytov do mozgu (8).

Literatúra

1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008; 372(9648): 1502-17.
2. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 683-747.
3. Buc M. The major histocompatibility complex in man. *Folia Biol*. 1995;41(3-4): 119-22.
4. Ehling R, Lutterotti A, Wanschitz J et al. Increased frequencies of serum antibodies to neurofilament light in patients with primary chronic progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2004; 10(6): 601-6.
5. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature Rev Immunol*. 2009;9(6): 393-407.
6. Engelhardt B, Ransohoff RM. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol*. 2012;3 3(12): 579-89.
7. Krumbholz M, Theil D, Steinmeyer F et al. CCL19 is constitutively expressed in the CNS, up-regulated in neuroinflammation, active and also inactive multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol*. 2007; 190(1-2): 72-9.
8. Cruz-Orengo L, Daniels BP, Dorsey D et al. Enhanced sphingosine-1-phosphate receptor 2 expression underlies female CNS autoimmunity susceptibility. *J Clin Invest* 2014; 124(6): 2571-84.
9. Bordon Y. Autoimmunity: A breakthrough to explain sex bias? *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(6): 355.
10. Platten M, Steinman L. Multiple sclerosis: trapped in deadly glue. *Nat. Medicine*. 2005; 11(3): 252-3.
11. Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2012; 122(4): 1180-8.
12. Peelen E, Damoiseaux J, Smolders et al. Th17 expansion in MS patients is counterbalanced by an expanded CD39+ regulatory T cell population during remission but not during relapse. *J Neuroimmunol*. 2011; 240-241: 97-103.

13. Haas J, Hug A, Viehover A, et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 2005; 35(11): 3343-52.
14. Kumar M, Putzki N, Limmroth V et al. CD4+CD25+FoxP3+ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2006; 180(1-2): 178-84.
15. Lowther DE, Hafler DA. Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunol Rev.* 2012; 248(1): 156-69.
16. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004; 199 (7): 971-9.
17. Praksova P, Stourac P, Bednarik J et al. Immunoregulatory T cells in multiple sclerosis and the effect of interferon beta and glatiramer acetate treatment on T cell subpopulations. *J Neurol Sci.* 2012; 319(1-2): 18-23.
18. Joller N, Peters A, Anderson AC, Kuchroo VK. Immune checkpoints in central nervous system autoimmunity. *Immunol Revi* 2012; 248(1): 122-39.
19. Buc M. Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 963748.
20. Bedoui S, Miyake S, Straub RH et al. More sympathy for autoimmunity with neuropeptide Y? *Trends Immunol.* 2004; 25(10): 508-12.
21. Simmons SB, Pierson ER, Lee SY, Goverman JM. Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. *Trends Immunol* 2013; 34(8): 410-22.
22. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet.* 2004; 364(9451): 2106-12.
23. Jarius S, Paul F, Franciotta D et al. Mechanisms of disease: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *Nat Clin Practice Neurol.* 2008; 4(4): 202-14.
24. Wang HH, Dai YQ, Qiu W et al. Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J Clin Neurosci.* 2011; 18(10): 1313-7.
25. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin 4 and neuromyelitis optica. *Lancet Neurol.* 2012; 11(6): 535-44.
26. Palace J, Leite MI, Nairne A, Vincent A. Interferon Beta treatment in neuromyelitis optica: increase in relapses and aquaporin 4 antibody titers. *Archives Neurol.* 2010; 67(8): 1016-7.
27. Tradtrantip L, Zhang H, Saadoun S et al. Anti-aquaporin-4 monoclonal antibody blocker therapy for neuromyelitis optica. *Ann Neurol.* 2012; 71(3): 314-22.
28. Saadoun S, Waters P, Leite MI et al. Neuromyelitis optica IgG causes placental inflammation and fetal death. *J Immunol.* 2013; 191(6): 2999-3005.
29. Kuenz B, Lutterotti A, Khalil M et al. Plasma levels of soluble adhesion molecules sPECAM-1, sP-selectin and sE-selectin are associated with relapsing-remitting disease course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005; 167(1-2): 143-9.
30. Chen M, Chen G, Deng S et al. IFN-beta induces the proliferation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells through upregulation of GITRL on dendritic cells in the treatment of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2012; 242(1-2): 39-46.
31. Burger D, Molnarfi N, Weber MS et al. Glatiramer acetate increases IL-1 receptor antagonist

- but decreases T cell-induced IL-1beta in human monocytes and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(11): 4355-9.
32. Lalive PH, Neuhaus O, Benkhoucha M et al. Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis: emerging concepts regarding its mechanism of action. *CNS drugs*. 2011; 25(5): 401-14.
 33. Haas J, Korporal M, Balint B, Fritzsching B, Schwarz A, Wildemann B. Glatiramer acetate improves regulatory T-cell function by expansion of naive CD4(+)/CD25(+)/FOXP3(+)/CD31(+) T-cells in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009; 216(1-2): 113-7.
 34. Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D et al. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Bioch Bioph acta*. 2012; 1823(12): 2168-78.
 35. Rossi S, Motta C, Studer V et al. A genetic variant of the anti-apoptotic protein Akt predicts natalizumab-induced lymphocytosis and post-natalizumab multiple sclerosis reactivation. *Mult Scler*.2013;19(1):59-68.
 36. Mancini N, Clementi M, Burioni R. Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *New Engl J Med*. 2012; 367(9): 871-2.
 37. Girkontaite I, Sakk V, Wagner M et al. The sphingosine-1-phosphate (S1P) lysophospholipid receptor S1P3 regulates MAdCAM-1+ endothelial cells in splenic marginal sinus organization. *J Exp Medicine*. 2004; 200(11): 1491-501.
 38. Cinamon G, Matloubian M, Lesneski MJ, Xu Y, Low C, Lu T, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat. Immunol*. 2004; 5(7): 713-20.
 39. Sawicka E, Dubois G, Jarai G et al. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 differentially affects the sequestration of CD4+/CD25+ T-regulatory cells and enhances their functional activity. *J Immunol*. 2005; 175(12): 7973-80.
 40. Rigau V, Mania A, Befort P al. Lethal multiple sclerosis relapse after natalizumab withdrawal. *Neurol*. 2012 ; 79(22): 2214-6
 41. Marousi S, Travasarou M, Karageorgiou CE et al. Simultaneous pml-iris after discontinuation of natalizumab in a patient with MS. *Neurol*. 2012; 79(21): 2160.
 42. Wolf AM, Eller K, Zeiser R et al. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 potently inhibits regulatory T cell proliferation in vitro and in vivo. *J Immunol*. 2009; 183(6): 3751-60.
 43. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *New Engl J Med*. 2006; 355(10): 1018-28.
 44. Barun B, Bar-Or A. Treatment of multiple sclerosis with anti-CD20 antibodies. *Clin Immunol*. 2012; 142(1): 31-7.
 45. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity. *Nat. Rev Immunol*. 2010; 10(4): 236-47.
 46. Ray A, Basu S, Williams CB, Salzman NH, Dittel BN. A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *J Immunol*. 2012;188(7):3188-98.
 47. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol*. 1980; 125(4): 1678-85.

48. Saidha S, Eckstein C, Calabresi PA. New and emerging disease modifying therapies for multiple sclerosis. *Ann New York Acad Scie.* 2012; 1247: 117-37.
49. Yamamura T, Miyake S. B-cell-directed therapy: which B cells should be targeted and how? *Immunotherapy.* 2012; 4(5): 455-7.
50. Bandala-Sanchez E, Zhang Y et al. T cell regulation mediated by interaction of soluble CD52 with the inhibitory receptor Siglec-10. *Nat Immunol.* 2013; 14(7): 741-8.
51. Zhang X, Tao Y, Chopra M et al. Differential reconstitution of t cell subsets following immunodepleting treatment with alemtuzumab (anti-cd52 monoclonal antibody) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Immunol.* 2013; 191(12): 5867-74.
52. Thompson SA, Jones JL, Cox AL et al. B-cell reconstitution and BAFF after alemtuzumab (Campath-1H) treatment of multiple sclerosis. *J Clin Immunol.* 2010; 30(1): 99-105.
53. Coles AJ, Wing M, Smith S et al. Pulsed monoclonal antibody treatment and autoimmune thyroid disease in multiple sclerosis. *Lancet.* 1999; 354(9191): 1691-5.
54. Mullard A. FDA's rejection of alemtuzumab divides neurologists. *Lancet.* 2014; 383(9920): 859.
55. Bielekova B. Daclizumab Therapy for Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.* 2012.
56. Brusko T, Bluestone J. Clinical application of regulatory T cells for treatment of type 1 diabetes and transplantation. *Eur J Immunology.* 2008; 38(4): 931-4.
57. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2002;169(9):4712-6.

Adresa

Prof. MUDr. Milan Buc, DrSc.
Imunologický ústav LFUK
Odborárske nám 14, 813 72 Bratislava
E-mail: milan.buc@fmed.uniba.sk

Tab. 1

Súhrn mechanizmov pôsobenia, účinnosti a nepriaznivých účinkov nových a perspektívnych liekov v terapii *sclerosis multiplex* (podľa Saidha el al. 2012, modifikované)

Liek	Mechanizmus účinku	Účinnosť	Nepriaznivé účinky
Fingolimod	Blokuje S1P-receptor; zabraňuje vycestovaniu T-lymfocytov zo sekundárnych lymfoidných orgánov. Možný neuro-protektívny a remyelinizačný účinok.	54 – 60 % ARR-redukcia, znížené riziko progresie k invalidite. Menej nových a zväčšujúcich sa T2-lézií a spomalenie úbytku objemu mozgu (štúdia FRREDOM, fáza 3).	Infekcie herpetickými vírusmi, bradykardia, atrio-ventrikulárny blok, hypertenzia, zvýšenie hladiny pečeňových enzýmov, edém makuly, infekcie respiračného traktu, lymfopénia, možné malignity.
Cladribín	Analóg adenosínu. Inkorporuje sa do DNA deliacich sa buniek, prerušujú tak syntézu DNA a jej opravu. Výsledkom je trvalý a progresívny úbytok aj CD4 ⁺ aj CD8 ⁺ T-lymfocytov.	55 – 58 % ARR-redukcia, 86 – 88 % redukcia Gd ⁺ -lézií, redukované riziko vývoja invalidity (štúdia CLARITY, fáza 3).	Lymfopénia, neutropénia, trombocytopenia, pancytopenia, reaktivácia <i>herpes zoster</i> , možné malignity.
Teriflunomid	Aktívny metabolit leflunomidu. Inhibuje mitochondriovú dihydro-orát dehydrogenázu. Zabraňuje <i>de novo</i> syntéze pyrimidínov, inhibuje proliferáciu a efektorové funkcie aktivovaných B- a T-lymfocytov.	Spomalenie vyvíjajúcej sa invalidity. 61 % redukcia Gd ⁺ -lézií. 31 % ARR-redukcia, spomalenie progresie choroby (štúdia TEMSO, fáza 3).	Hnačky, nauzea, zvýšené hladiny pečeňových enzýmov, alopecía, kožné vyrážky, infekcie, neutropénia, parestézie, hypertenzia.
Liek	Mechanizmus účinku	Účinnosť	Nepriaznivé účinky

BG12	Demetyt-fumarát. Antioxidačný a imunomodulačný účinok. Môže pôsobiť neroprotektívne.	53 % ARR-redukcia, 85 % redukcia nových, resp. zväčšujúcich sa T2-lézií, 90 % redukcia Gd ⁺ -lézií, 38 % redukcia progresie k invalidite (štúdia DEFINE, fáza 3).	Začervenanie, bolesti hlavy, brucha, nauzea, zvracanie, hnačky, zvýšenie hladiny pečenejých enzýmov (v závislosti od dávky).
Laquinimod	Druhá generácia quinolón-3-karboxamidu, príbuzný linomidu. Podporuje posun T _H 1- na T _H 2-mediovanú imunitnú odpoveď. Pôsobí neuro-protéktívne podporou syntézy neuroprotektívnych látok.	21 % ARR-redukcia, 33 % redukcia progresie k invalidite, 27 % zníženie progresie k atrofii mozgu (štúdia BRAVO, 3. fáza)	Zvýšenie hladiny pečenejých enzýmov (v závislosti od dávky), artralgia, lokálna reaktivácia herpetických vírusov.
Alemtuzumab	Humanizovaná mAb anti-CD52. Spôsobuje komplementom alebo K-bunkami mediovanú lýzu CD4 ⁺ CD8 ⁺ T-lymfocytov, B-lymfocytov, NK-buniek a monocytov. Pretrvávanie znížených počtov B-lymfocytov je kratšie ako T-lymfocytov.	74 % redukcia RR, 71 % zníženie rizika vývoja trvalej invalidity, signifikantné zníženie straty objemu mozgu (štúdia CAMMS223, 2. fáza).	Autoimunitné choroby štítnej žľazy, autoimunitná trombocytopenia, neutropénia, hemolytická anémia, Goodpasturov syndróm, postinfúzne problémy, infekcie respiračného traktu, rekurentný orálny herpes, možno meningitída a malignity.
Daclizumab	Humanizovaná mAb anti-CD25. Inhibuje proliferáciu aktivovaných T-lymfocytov a vedie k expanzii CD56 ^{bright} NK-buniek.	Redukcia počtu nových alebo zväčšujúcich sa Gd ⁺ -lézií.	Kožné vyrážky, infekcie, lymfadenopatia, zvýšenie hladiny pečenejých enzýmov, horúčka, únava.
Liek	Mechanizmus účinku	Účinnosť	Nepriaznivé účinky

Rituximab	Chimérová mAb anti-CD20. Spôsobuje depléciu B-lymfocytov a potláča ich prozápalové funkcie (<i>k poklesu hladín IgG nedochádza ani v plazme ani v CSF</i>)	91 % redukcia počtu Gd ⁺ -lézií, zníženie počtu relapsov (2. fáza klinických skúšok)	Postinfúzne reakcie, infekcie urogenitálneho traktu, sinusitída, PML.
Ocrelizumab	Humanizovaná mAb anti-CD20. Účinkuje podobne ako rituximab.	73 – 80 % ARR-redukcia, 89 – 96 % zníženie Gd ⁺ -lézií	Postinfúzne reakcie (najmä po prvom podaní), oportunistické infekcie (u SLE- a RA-pacientov po predchádzajúcej liečbe metotrexátom)
Ofatumumab	Humánna mAb anti-CD25. Účinkuje podobne ako rituximab.	99,8 % redukcia počtu nových Gd ⁺ -lézií a aj podobné zníženie nových či zväčšujúcich sa T2-lézií	Nedostatočné údaje.

Legenda: ARR – ročný výskyt relapsov (annualized relapse rate), mAb – monoklonová protilátka (monoclonal antibody), Gd – gadolínium, PML – progresívna multifokálna encefalopatia, RR – frekvencia relapsov (relapse rate)

NAŠE SKÚSENOSTI S LIEČBOU SCLEROSIS MULTIPLEX IMUNOMODULÁTORMI DRUHEJ LÍNIE

Eleonóra Klímová¹, Alena Smiešková², Monika Daňová³

¹Klinika neurológie FZO PU a FNsP J.A. Reimana v Prešove,

²AdLA, alergologicko-imunologické laboratórium s.r.o.,

³ProMagnet s.r.o, pracovisko FNsP J.A. Reimana, Prešov

Úvod

Väčšina literárnych zdrojov sa nevyhýba štandardne definovať *sclerosis multiplex* (SM) ako chronickú chorobu centrálného nervového systému (CNS), ktorej podstatou je demyelinizácia axónov, ktoré môžu strácať svoju integritu už vo včasnej fáze ochorenia a postupne dochádza k ich nezvratnému zániku. Zdá sa, že v zložitej a doteraz iba čiastočne objasnenej patogenéze SM, sú kľúčovým hráčom autoimunitné mechanizmy, ktorých cieľovým antigénom je myelín nervových vlákien a nimi spúšťaná kaskáda aktivácie prozápalových a protizápalových imunitných dejov, ktorých výsledkom je ložiskové poškodenie mozgu a miechy – v klinickom obraze chorého vyjadrené jeho fyzickou a, alebo, psychickou invaliditou [1].

V liečbe SM sa v súčasnosti opierame o tri piliere – liečbu ataku, liečbu imunomodulačnú / profylaktickú, zameranú na ovplyvnenie prirodzeného priebehu SM a liečbu symptomatickú, vrátane rehabilitácie. Manažment imunomodulačnej liečby (disease modifying treatment, DMT) nie je v praxi jednoduchý. Lekár aj pacient musia rešpektovať platné indikačné obmedzenia Vestníka MZ SR, pretože len pri ich splnení je liečba pacientovi hrazená z prostriedkov verejného zdravotného poistenia. Imunomodulátory prvej línie sú injekčné prípravky, podávané i.m. alebo s.c. v rôznych dávkovacích režimoch. Patria k nim všetky interferóny beta (IFN β) a glatirameracetát (GA). Z imunomodulátorov druhej línie máme v súčasnosti voľbu medzi i.v. podávaným natalizumabom (NTZ) alebo perorálnym fingolimodom (FTY720). V blízkej budúcnosti sa očakávajú nové prípravky v rôznych liekových formách (dimetylfumarát, teriflunomid, laquinimod, atemuzumab), ktoré rozšíria spektrum našich terapeutických možností.

Pozadie problému

Liečbu NTZ-pacientov s relapsujúcou/remitujúcou sclerosis multiplex (RRSM) komplikuje prítomnosť protilátok proti JC-vírusu (anti-JCV antibodies = anti-JCVAb) a s ňou spájané riziko vzniku progresívnej multifokálnej leukoencefalopatie (PML), ktoré potenciálne stúpa v závislosti od trvania liečby NTZ a v praxi je aj častým dôvodom jej ukončenia. Po ukončení liečby NTZ sa pozorovali klinické a, alebo, neurozobrazovacie dôkazy reaktivácie ochorenia [2]. Určitú alternatívu pre pokračovanie liečby ponúka pacientom fingolimod (FTY720). Zmene liečby predchádza obdobie potrebné na eli-

mináciu NTZ z organizmu, tzv. W-O-P (wash-out period). Na jeho trvanie ani presné časovanie doteraz neexistuje jednoznačná zhoda [3], aj keď určitú možnosť časovania nám umožňuje sledovanie indexu anti-JCVAb, ktorý stratifikuje anti-JCVAb⁺ pacientov medzi chorých s nízkym, resp. vysokým rizikom pre vznik PML [4].

Cieľ práce

Naším cieľom bolo zhodnotiť klinický a MR priebeh W-O-P u RRSM- pacientov s dokázanými anti-JCV protilátkami po ukončení NTZ s plánovanou zmenou liečby na FTY720 a ďalšieho priebehu ochorenia na novej liečbe.

Súbor chorých a metodika

Od 10/2011 do 07/2014 sme takúto zmenu liečby realizovali u 14 RRSM-pacientov (4 muži, 10 žien). Ich priemerný vek bol 38 rokov (26 – 53 rokov), priemerné trvanie definitívnej SM bolo 10 rokov, priemerné EDSS (expanding disability status scale) [5] v čase ukončenia liečby NTZ 2,3 (1,5 – 4,0). Všetci pacienti pred zahájením liečby NTZ užívali niektorý z imunomodulátorov prvej línie, v priemere 4,2 roka (1 – 8 rokov). Pacientov sme na základe klinického priebehu choroby za posledný rok pred spustením terapie NTZ rozdelili do troch skupín (I – III) (tab. 1); počas nej bol ich klinický a MR-nález stabilizovaný. Po nasadení NTZ sme u všetkých pacientov sledovali hladiny anti-JCV protilátok. Po dôkaze anti-JCVAb (vyšetrené po prvý raz) bola, s prihliadnutím k želaniu pacientov a po zvážení *rizika vs. benefitu*, ďalšia liečba vysadená šiestim z nich, v priemere po 18 infúziách (12 – 26). Sérokonverziu anti-JCVAb sme v priebehu liečby NTZ zaznamenali aj u ďalších 6 chorých, priemerne po 27 infúziách (6 – 48), čo nás donútilo liečbu tiež ukončiť. S aplikáciou NTZ sme prestali aj u dvoch pacientok pre postupne stúpajúci titer anti-JCV protilátok, celkovo po 26, resp. 39 infúziách. Získané výsledky sme štatisticky vyhodnotili.

Výsledky

Priebeh W-O-P po NTZ, ako aj “správanie sa” SM-pacientov na novej liečbe (follow-up) bolo rôzne (tab. 2). W-O-P trvala v priemere 4,2 mesiaca (2 – 6 mesiacov). Jej nekomplikovaný priebeh do 3 mesiacov mali 7 chorí (50 %), vo väčšine pacienti skupiny II. Okrem jedinej pacientky, ktorej liečbu FTY720 sme po 33 mesiacoch ukončili pre pomalú, ale kontinuálnu progresiu neurologického deficitu (v priebehu liečby uroinfekcia s pseudoatakom SM), bola u ďalších 6 pacientov kontrola choroby novým liekom úspešná, ich klinický nález je stabilizovaný. V prípade pacientky zo skupiny III viedol závažný rebound SM medzi 2. – 3. mesiacom W-O-P aj napriek uvedeným terapeutickým postupom v tab. 2. k jej trvalej invalidite, liečbu FTY720 sme ukončili.

Atak SM medzi 1. – 5. mesiacom W-O-P prekonalí 4 chorí (29 %), sú to pacienti skupiny I (2x) a skupiny II (2x). Všetci štyria mali exacerbáciu SM do 6 týždňoch po zahájení liečby FTY720, v súčasnosti sú liečení s dobrým terapeutickým efektom lieku v priemere 22 mesiacov. MR reaktiváciu SM medzi 5. – 6. mesiacom W-O-P a po 6 me-

siacoch liečby FTY 720 konštatujeme u dvoch chorých (14 %), obaja sú zo skupiny II. Prvému z nich pribudlo na kontrolnej MR mozgu po 5 mesiacoch W-O-P 23 aktívnych demyelinizačných lézií (DL), do mesiaca po zahájení liečby FTY 720 prekonáva závažný atak SM. Pokračuje v liečbe FTY720 naďalej, v súčasnosti so stabilizovaným nálezom a bez nežiaducich účinkov 23 mesiacov. Druhá pacientka má pri stabilizovanom klinickom náleze počas liečby FTY720 po 6 mesiacoch v rámci pravidelnej MR kontroly zistenú progresiu známeho nálezu s disemináciou nových DL periventrikulárne, subkortikálne a v oblasti mezencefala do takej miery, že vzhľadom na jej predchádzajúcu liečbu NTZ a anti-JCVAb-pozitivitu zvažujeme aj možnú PML. JCV nebol PCR-výšetrením v mozgovomiechovom moku dokázaný. Aj napriek vylúčeniu PML pacientka v liečbe FTY720 nepokračuje. Progresia MR-nálezu svedčí pre nedostatočnú kontrolu choroby liekom, okrem toho sme u nej za posledné dva mesiace liečby FTY720 zaznamenali stúpajúce abnormálne výsledky testov pečenej funkcie.

Diskusia

Natalizumab je prvá rekombinantná humanizovaná monoklonová protilátka proti alfa-reťazcu $\alpha 4\beta 2$ -integrínu. Na liečbu pacientov s RISM bola schválená po výsledkoch dvojročnej klinickej štúdie AFFIRM (Natalizumab Safety and Efficacy in Relapsing Remitting MS). Po jej ukončení bolo 37 % pacientov bez známok aktivity choroby, za sledované obdobie sa dokázala 68 % redukcia atakov SM, v porovnaní s placebom, zníženie rizika progresie následnej invalidity o 42 %, ako aj ďalšie priaznivé výsledky posudzujúce vplyv lieku na zabránenie rozvoja mozgovej atrofie v MR obraze [6,7].

Úspech terapie NTZ komplikuje riziko vzniku PML, ktoré sa spoja s jeho prolongovaným užívaním, predovšetkým u anti-JCV⁺ pacientov. Určitou alternatívou pre pokračovanie DMT je pre týchto chorých fingolimod. Je to selektívne imunosupresívum, modulátor receptora pre sfingozín 1-fosfát (S1P). Blokuje schopnosť lymfocytov vystupovať z lymfatických uzlín, a tak znižuje aj infiltráciu efektorových T-lymfocytov do CNS. V klinických štúdiách sa potvrdil jeho priaznivý efekt v znížení priemerného počtu relapsov za rok v porovnaní s placebom o 54 % a o 52 % v porovnaní s IFN β 1a podávaným i.m. Potvrdilo sa aj zníženie rizika progresie následnej invalidity o 37 % po 6 mesiacoch liečby a po prepočítaní podľa kritérií, ktoré boli použité v štúdiách s NTZ o 43 %. FTY720 preukázal konzistentný vplyv na atrofiu mozgu v troch veľkých klinických štúdiách v porovnaní s placebom aj IFN β 1a aplikovanom i.m. po 6 mesiacoch a aj po 7 rokoch sledovania [8,9].

Krízovým obdobím pre pacientov po ukončení NTZ s plánovanou zmenou liečby na FTY720 je W-O-P, obdobie potrebné na elimináciu NTZ z organizmu. Ako dlho má trvať a kedy je ten správny čas na zmenu liečby (switch), nie je doteraz úplne jasné. Nápomocným v tomto rozhodovaní môže byť pre lekárov aj monitorovanie indexu anti-JCAb [4], pre overenie jeho významu však treba viac ďalších praktických skúseností. Správy z literatúry upozorňujú na potrebu skrátenia W-O-P na dobu kratšiu než sú tri mesiace aj za cenu infekcií a zvýšeného rizika PML [10]; tento trend sme postupne

uplatnili aj u našich pacientov. Dôvodom sú práve ťažké prejavy reaktívacie SM v tomto období, či už klinické alebo rádiologické, dostupnými terapeutickými metódami zvládnuteľné s variabilným úspechom a invalidita chorých narastá. Prečo k tomu dochádza je zatiaľ na úrovni hypotéz, ale dá sa predpokladať, že fingolimod nie je schopný rovnomerne a efektívne kontrolovať reaktíváciu SM, ak sa ním liečba zahájí 3 – 4 mesiace po vynechaní NTZ. Ďalej sa predpokladá, že FTY720 interferuje ešte niekoľko mesiacov s prebiehajúcimi reziduálnymi mechanizmami kontroly choroby navodenej NTZ po ukončení jeho podávania. S rešpektom k tomuto poznatku existujú prvé dôkazy o tom, že reaktívacia choroby je menej častá u tých pacientov, ktorí majú 3 – 6 mesiacov po ukončení liečby NTZ rôzny stupeň natalizumabom navodenej periférnej lymfocytózy, ktorá je v kontraste s účinkom FTY720 (v našom súbore chorých zaznamenané len u dvoch pacientov). Na druhej strane môže FTY720 spôsobiť závažný relaps SM *per se*, pretože pravdepodobne mení imunosupresívne vlastnosti regulačných T-lymfocytov, ktorých aktivita môže byť po zastavení liečby NTZ dôležitá na zabránenie alebo zmiernenie priebehu reboundu SM [2, 11].

S plným rešpektom k výsledkom vedeckého výskumu SM, v praxi sa zatiaľ pohybujeme na úrovni pokusov a omylov, vybavení sme údajmi z klinických štúdií (evidence based medicine), ktoré ale skúmajú geneticky nesúrodé populácie pacientov a poskytujú nám ako výsledok priemer ich správania sa pri liečbe. Sú preto len hrubou orientáciou v terapeutických postupoch [12].

V liečbe imunomodulátormi druhej línie pacientov s RISM sa pohybujeme na veľmi tenkom ľade, nepochybne však mnohým prinášajú tieto lieky podstatné zlepšenie kvality života. Pacient aktívne vstupuje do manažmentu svojej liečby, musí byť dôkladne informovaný o všetkých jej rizikách a benefitoch a lekár môže prijať terapeutické rozhodnutie len po konzultácii s pacientom. Kontrola bezpečnosti liečby je multidisciplinárna. NTZ je pod dohľadom lekára podávaný sestrou špecialistkou v problematike SM každých 28 dní, neurologické hodnotenie majú chorí každé tri mesiace, každých 6 mesiacov absolvujú kognitívny test MOCA (**M**ontreal **C**ognitive **A**ssessment), kontrolnú MR mozgu majú každoročne, JCV-pozitívni každých 6 mesiacov. Konvenčné imunologické vyšetrenie sa odporúča jedenkrát za rok, odber krvi na vyšetrenie anti-JCVAb pacientom liečeným NTZ realizujeme každých 6 mesiacov (Unilabs Dánsko). Pravidelné sú laboratórne kontroly krvného obrazu a hepatošpecifických enzýmov. Rovnako dôsledný manažment (okrem sledovania anti-JCVAb) vrátane oftalmologického a kardiologického sledovania si vyžaduje aj pacient liečený FTY720.

Záver

Ukončenie liečby NTZ má svoje riziká, trvanie W-O-P by bolo dobré presne definovať. Dostupné správy z literatúry upozorňujú aj napriek zvýšeným rizikám infekcií a PML na skrátenie tohto obdobia (menej ako 3 mesiace). Praktické skúsenosti v našom malom súbore chorých tieto tendencie podporujú.

Literatúra

1. Taláb R. Roztroušená skleróza mozkomíšni v detském věku. Vybrané klinické charakteristiky a léčba. Habilitační práce. Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové 2012: 6-8.
2. Sempere AP., Martin-Medina P, Berenquer-Ruiz L., Perez-Ramona N., Sanchez –Perez R., Polache- Vengud J., Feliu-Rey, E. Switching from natalizumab to fingolimod: an observational study. *Acta Neurol Scand* 2013, Suppl.4: 1-5.
3. Centoze D., Rossi S., Rinaldi F., Gallo P. Severe relapses under fingolimod treatment prescribed after natalizumab. *Neurology* 2012, 79: 2004-2006.
4. Plavina T., Subramanyam M., Bloomgren G., Richman S. et al. Anti-JCV antibody index further defines PML risk in natalizumab-treated MS patients (2013). Poster No DX51. The 22nd Annual Meeting of the Consortium of Multiple Sclerosis Centers, May 29-June 1, 2013, Orlando, Florida, USA
5. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An Expanded Disability Status Scale (EDSS). *Neurology* 1983, 33: 1444-1452.
6. Polman Ch., O'Connor P.W., Havrdova E. et al. A randomized, placebo- controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006, 354: 899-910.
7. Rinaldi F., Calabrese M., Seppi D., Puthenparampil M, Perini P., Gallo P. Natalizumab strongly suppresses cortical pathology in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012, 18(12): 1760 -1767.
8. Kappos L., Radue E.W., O'Connor P. et al. A placebo – controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010, 362 : 387 -401.
9. Cohen A., Barkhof F., Comi G. et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010, 362: 402-415.
10. Laroni A., Brogi D., Milesi V., Abate L., Uccelli A., Mancardi GL. Early switch to fingolimod may decrease the risk of disease recurrence after natalizumab interruption. *Mult Scler* 2012. Published online, DOI: 10.1177 / 1352458512468498, msj. sagepub.com
11. Rinaldi F, Seppi D, Calabrese M, Perini P, Gallo P. Switching therapy from natalizumab to fingolimod in relapsing-remitting multiple sclerosis: clinical and magnetic resonance imaging findings. *Mult Scler* 2012, 18 (11): 1640-1643.
12. Havrdová E. Roztroušená skleróza. Farmakoterapie pro praxi, Praha, Maxdorf 2009, 2. vyd., 68-69.

Adresa

Doc. MUDr. Eleonóra Klímová, CSc.
Klinika neurologie FZO PU a FNŠP J.A. Reimana
Jána Hollého,
080 01 Prešov
Mail: neurologia@pobox.sk

Tab.1
Súbor chorých, základné informácie

Počet pacientov	N = 14,4 muži, 10 žien
Priemerný vek	Všetci: 38 rokov (26-53) Muži: 36,5 roka (30-50) Ženy: 38,6 roka (26-53)
Priemerné trvanie definitívnej SM	10 rokov
Priemerné trvanie DMT 1. línie	4,2 roka (1 – 8 rokov)
Priemerné EDSS v čase ukončenia NTZ	2.3 (1.5 – 4.0)
Klinický priebeh SM za predchádzajúci rok pred liečbou NTZ / 3 skupiny	
I. Dva závažné ataky vyžadujúce hospitalizáciu a liečbu MP	N = 3
II. Jeden alebo dva závažné ataky vyžadujúce hospitalizáciu a liečbu MP + MR potvrdená DIT a DIS	N = 10
III. Tri závažné ataky vyžadujúce hospitalizáciu a liečbu MP + MR potvrdená DIS a DIT	N = 1
Pozitivita anti-JCVAb – dôvod na ukončenie NTZ/ riziko vs. benefit, želanie pacienta, index anti-JCVAb	
1. anti-JCVAb vyšetrené po prvýkrát	N = 6, Ø počet infúzií 18,3 (12 – 26)
2. sérokonverzia anti-JCVAb v priebehu liečby NTZ	N = 6, Ø počet infúzií 27,6 (6 – 48)
3. známa anti-JCVAb +, stúpajúci index anti JCVAb	N = 2, Ø počet infúzií 32,5 (26 – 39)

Legenda: MP – methylprednizolón, MR – magnetická rezonancia, DIT – Dissemination in Time (diseminácia demyelinizačných lézií v MR náleze v čase), DIS – Dissemination in Space (diseminácia demyelinizačných lézií v MR náleze do ďalších častí CNS), EDSS – „Expanded Disability Status Scale“ podľa Kurtzkeho, 1983

Tab. 2

Priebeh a trvanie W-O-P po ukončení liečby natalizumabom, sledovanie dynamiky choroby (MS follow-up) po zahájení liečby FTY720

W-O-P / Ø trvanie 4,2mesiaca (2 – 6 mesiacov)	MS follow-up, trvanie liečby FTY720 v mesiacoch, nežiaduce účinky – NÚ
1. Nekomplikovaný, W-O-P 2 – 3 mes., N=7 (50 %) skupina pacientov I (1x), II (6 x)	<ul style="list-style-type: none"> • N=5, Ø trvanie FTY 12,8 mes., stabilizovaný klinický a MR nález, NÚ – 0 • N=1, po 32 mes.FTY MR aktivita 1DL, NÚ- 0 • N=1, po 33 mes. ukončenie FTY / EDSS 6.5, NÚ – infekcia
2. Rebound SM medzi 2. – 3. mes. W-O-P, N = 1 (7 %), pacientka skupiny III	EDSS 4.0 → 7.0, MP, PLEX, IVIG, 6 mes. FTY bez efektu
3. Atak SM medzi 1. – 5. mes. W-O-P, N = 4 (29 %), skupina pacientov I (2 x), II (2x)	N = 4, atak do 6 týždňov po zahájení FTY, Ø trvanie FTY 22 mes., stabilizovaný klinický a MR nález, NÚ – 0
4. MR reaktivácia SM , N=2 (14%), skupina pacientov II	N = 1, medzi 5.- 6. mes. W-O-P, do 4 týždňov po zahájení FTY atak SM, trvanie liečby 22 mes., stabilizovaný klinický a MR nález, NÚ – 0 N = 1, 6 mes. po zahájení FTY, NÚ – ↑↑↑ HE, liečba ukončená

Legenda: HE – hepatošpecifické enzýmy, PLEX – plazmaferéza, IVIG – intravenózne imunoglobulíny

INDEX AUTOROV

Baráth P.	9, 35	Lukáč J.	10, 60
Buc M.	10, 16, 56, 93	Lukáčová O.	10, 60
Cehlár O.	46	Máliš F.	23
Čente M.	52	Novák M.	8, 9, 28, 35, 46, 52
Čižnár P.	19	Opattová A.	52
Dallos T	20	Raffayová H.	23
Daňová M.	18, 108	Rovenský J.	10, 24, 23, 56, 85
Filipčík P.	52	Rybár I.	14, 85
Hochmuth L.	13, 83	Smiešková A.	18, 108
Hrubiško M.	12, 78	Solovič I.	14, 85
Klímová E.	18, 108	Šimaljaková M.	21
Kontseková E.	8, 9, 28, 35	Škrabana R.	46
Košková E.	11, 66	Špánik S.	25
Kováčech B.	8, 9, 28, 35	Záňová E.	14, 85
Kozáková D.	14, 85	Žlnay D.	11, 72
Kozub P.	22	Žlnay M.	11, 72
Kriška M.	10, 56		



**Jednodňová konferencia Slovenskej imunologickej spoločnosti
a Neuroimunologického ústavu Slovenskej akadémie vied**

BIOLOGICKÁ LIEČBA V TEÓRII A PRAXI

Bratislava, Dúbravská cesta 9, 4. september 2014

Konferencia bola zorganizovaná s podporou grantovej agentúry APVV ako aktivita formálneho a neformálneho vzdelávania v rámci projektu číslo APVV-0677-12.

V zmysle zákona NR SR č. 578/2004 Z. z. o poskytovateľoch zdravotnej starostlivosti, zdravotníckych pracovníkoch, stavovských organizáciách v zdravotníctve a o zmene a doplnení niektorých zákonov, nariadenia vlády Slovenskej Republiky č. 322/2006 Z. z. o spôsobe ďalšieho vzdelávania zdravotníckych pracovníkov, sústave špecializačných odborov a sústave certifikovaných pracovných činností bolo Slovenskou komorou iných zdravotníckych pracovníkov konferencii pridelených 8 kreditov.

Vydalo vydavateľstvo AHO4, Dunajská Lužná,
v septembri 2014 ako svoju 2. publikáciu.

Spoluvydavateľ:
Neuroimunologický ústav SAV

Editor: Peter Filipčík

Sadzba: Peter Blaho

ISBN 978-80-971608-1-4

