

BIOLOGICKÁ LIEČBA V TEÓRII A PRAXI



SLOVENSKÁ
IMUNOLOGICKÁ
SPOLOČNOSŤ



III. ročník
zborník prednášok

Bratislava, Dúbravská cesta 9
8. september 2016

BIOLOGICKÁ LIEČBA V TEÓRII A PRAXI

zborník prednášok

III. ročník

Bratislava, Dúbravská cesta 9
8. september 2016

Organizátor

Neuroimunologický ústav – Slovenská akadémia vied

Spoluorganizátori

Slovenská imunologická spoločnosť – Slovenská akadémia vied
Slovenská spoločnosť pre alergológiu a klinickú imunológiu

Programový a organizačný výbor

NOVÁK Michal	Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava
BUC Milan	Imunologický ústav LFUK, Bratislava
ČENTE Martin	Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava
FILIPČÍK Peter	Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava
HRUBIŠKO Martin	OKIA OÚSA a ÚLM SZU & OÚSA, Bratislava
KOVÁČECH Branislav	Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava
REVICKÁ Zuzana	Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava
ŠKRABANA Rostislav	Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava
TIBENSKÁ Elena	Medirex a. s., člen MEDIREX GROUP, Bratislava

Adresa sekretariátu

Martina Ježovičová
Neuroimunologický ústav – Slovenská akadémia vied
Dúbravská cesta 9, Bratislava
Tel: 0254788100
Fax: 0254774276
Email: martina.jezovicova@savba.sk

OBSAH

BIOLOGIKÁ V NEUROIMUNOLÓGII

Michal Prčina

Čo vieme o imunosenescencii? 6

Martin Čente

miRNA ako biomarkery neurodegeneračných ochorení 12

Milan Buc

Nové biologické preparáty v liečbe *sclerosis multiplex* 24

Luděk Hochmuth

Liečba intravenóznymi imunoglobulínmi u žien
so *sclerosis multiplex* počas gravidity a laktácie. 33

Mária Bucová

HMGB-1 ako nový marker aktivity *sclerosis multiplex*. 38

BIOLOGIKÁ V REUMATOLÓGII

Jozef Rovenský

Reumatoidná artritída – klinický obraz, diagnostika, liečba 44

Jozef Rovenský

Biologická liečba systémového *lupus erythematosus*
zameraná na ovplyvnenie lymfocytov B 48

BIOLOGIKÁ V DERMATOLÓGII

Mária Šimaljaková

Secukinumab – anti IL-17 – prvé skúsenosti v liečbe psoriázy 60

Mária Šimaljaková

Omalizumab v liečbe chronickej spontánnej urtikárie. 67

Jana Nemšovská

Možné postupy pri alergénovej imunoterapii včelím a osím extraktom 74

VARIA

Žaneta Dzurillová

Praktické využitie IVIG v liečbe porúch plodnosti z imunologických príčin 86

Martin Hrubíško

Malé molekuly – inhibítory rozhodujúcich zápalových dráh:
cesta späť môže byť aj cestou vpred 93

Peter Čižnár

Biologiká v liečbe primárnych imunodeficiencií. 100

Miroslava Matúšková

Mezenchýmové strómové bunky v génovej terapii onkologických ochorení. 104

BIOLOGIKÁ V NEUROIMUNOLÓGII

ČO VIEME O IMUNOSENESCENCIÍ?

Prčina M, Vince-Kázmérová Z, Kontseková E, Novák M.

Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava

Abstrakt

Je dlhodobo známe, že starší ľudia už nie sú schopní v plnej miere reagovať na nové imunitné stimuly kvôli javu, ktorý sa nazýva imunosenescencia. Ide o starnutie imunitného systému, z ktorého ubúdajú tzv. naivné bunky, zodpovedné za rozpoznávanie nových antigénov a hromadia sa bunky, ktoré produkujú prozápalové cytokíny. Imunosenescencia je asociovaná so zvýšeným výskytom ochorení ako osteoporóza, Alzheimerova choroba, rakovina a rôzne autoimunitné ochorenia. Pre spoločnosť predstavuje imunosenescencia záťaž aj v podobe častejších infekcií u starších ľudí. Navyše, v porovnaní s mladými ľuďmi starší ľudia slabšie reagujú na vakcináciu. Neodpovedavosť na vakcináciu je veľkým problémom pri očkovaní proti chrípke, ale výrazne sťažuje aj vývoj vakcín proti chorobám typickým pre starších ľudí, ako je napríklad Alzheimerova choroba.

Identifikácia nových a spoľahlivých T/B bunkových markerov imunosenescencie a neurodegenerácie v kombinácii s detekciou množstva antigén špecifických protilátok po bežnom očkovaní v krvi, by mohla priniesť nové informácie o stave imunitného systému jedinca trpiaceho napríklad Alzheimerovou chorobou, ako aj následne predikovať jeho odpovedavosť na prípadnú vakcináciu. Zároveň identifikácia B bunkových deficiencií, prípadne biomarkerov súviacich s vekom by mohla výrazne pomôcť pri výbere vhodných, prípadne nových adjuvantných látok, ktoré by boli schopné zvýšiť efektivitu imunitnej odpovede na vakcináciu starších ľudí.

Imunosenescencia – charakterizácia a hlavné znaky

Imunosenescencia je všeobecne charakterizovaná ako nezvratný proces starnutia buniek imunitného systému. V prvom rade dochádza k zmenám na prirodzených epitelových bariérach- na koži, pľúcach a gastrointestinálnom trakte, takže patogény ľahšie prenikajú do organizmu. Ďalšou vlastnosťou starnúceho imunitného systému je masívna produkcia prozápalových cytokínov-hlavne vďaka expanzii monocytov, čo vedie k celkovému prozápalovému fenotypu. V rámci vrodenej imunity je ďalším problémom znížená schopnosť fagocytózy, zvýšená produkcia reaktívnych kyslíkových radikálov a nefunkčná bunková signalizácia.

S vekom klesá aj produkcia naivných B-buniek, čo znižuje kapacitu na odpovedavosť voči novým antigénom. Akumulujú sa pamäťové bunky špecifické voči malému množstvu dominantných antigénov. Celé je to spôsobené ukladaním tuku v kostnej dreni a následným znížením počtu b-bunkových progenitorov. Starnúci organizmus má často v periférii normálne počty B-buniek, ale so zníženým repertoárom proti-

látok, dochádza k produkcii protilátok triedy IgM namiesto IgG, produkuje sa množstvo nízkoafinitných protilátok a ich špecificita často prechádza od cudzích antigénov k vlastným antigénom.

Podobné zmeny nastávajú aj pri T-bunkách. Tieto zmeny sa sa prejavujú vo všeobecnej zakrpatievaní sleziny, výrazným znížením počtu naivných T-lymfocytov (CD45RA+ CD62L+, CD95+) v periférii (Aspinall et al., 1998), stratou expresie kostimulačnej molekuly CD28 a diferenciaciou do efektorového fenotypu. Ďalej dochádza k zníženej odpovedavosti na signalizáciu cez T-bunkové receptory (TCR). To vedie k zníženej schopnosti T-bunkovej proliferácie a následne k zníženej produkcii IL-2. Znamené boli aj zmeny súvisiace so znížením, prípadne zmenou pomeru pomocných T-lymfocytov k cytotoxickým T-lymfocytom, expanzia pamäťových T-buniek (CD45RO+) v periférii, skrátenie telomér a v neposlednom rade výrazné zníženie variability TCR (Goronzy et al., 2007). Zdá sa, že práve zníženie variability TCR v kombinácii s ostatnými zmenami spôsobenými zvýšeným vekom je zodpovedné za menej efektívnu odpovedavosť cytotoxických T-lymfocytov na vírusové infekcie (Monteiro a kol., 1996; Čičin-Šain a kol., 2010). Niektoré štúdie ukázali, že zvýšená expresia niektorých cytokínov, napríklad TNF- α , indukovala stratu CD28 (Bryl a kol., 2001; Borthwick a kol., 2000). Zdá sa, že CD28 negatívne bunky vznikajú práve v prozápalovom prostredí a tieto bunky vzápätí produkujú ďalšie prozápalové cytokíny, čím podporujú rozvoj a udržanie prozápalového fenotypu v starnúcom organizme. Okrem iného, analýza sér tiež poukázala na zvýšený prozápalový fenotyp u starších ľudí, a to namerným zvýšeného množstva C-reaktívneho proteínu, cytokínov TNF, IL6 a transthyretinu v krvi (Wikby et al., 2005).

Iné štúdie poukazujú na zmeny v počte CD4+CD25+ T-regulačných buniek, ktorých počet s vekom stúpa, avšak ich supresívna aktivita na cytotoxické CD8+ T-bunky a NK-bunky je oslabená (Tsaknaridis et al, 2003; Gregg et al, 2005; Wang et al, 2010).

Vakcinácia v procese neurodegenerácie a vplyv imunosenescencie na jej efektívnosť

Imunosenescencia je všeobecne asociovaná so zvýšeným výskytom ochorení ako osteoporóza, Alzheimerova choroba, rakovina a rôzne autoimunitné ochorenia (Chou a Effros, 2013). Pre spoločnosť predstavuje imunosenescencia záťaž aj v podobe častejších infekcií u starších ľudí, pričom len malé percento týchto ľudí (17-53%) je schopných aktívne reagovať na vakcináciu tvorbou špecifických protilátok (u mladých ľudí je to 70-90%) (Goodwin a kol., 2006). Nízka odozva na vakcináciu je veľkým problémom pri očkovaní proti chrípke, zároveň však výrazne sťažuje aj vývoj nových vakcín proti chorobám postihujúcich hlavne staršiu populáciu, ako je napríklad Alzheimerova choroba. Súčasné dáta potvrdzujú, že nízka imunitná odpoveď na vakcináciu proti chrípke súvisí so zvýšeným výskytom cytotoxických T-lymfocytov, ktoré neexprimujú kostimulačnú molekulu CD28 (Goronzy a kol., 2001; Saurwein-Teissl a kol., 2002; Trzonkowski a kol., 2003). Podobná situácia bola preukázaná aj u ľudí infikovaných HIV. Tí vyka-

zovali vysoké percento cytotoxických T-lymfocytov so skrátenými telomérmi a bez expresie CD28, čo naznačuje, že práve absencia CD28 môže byť kľúčom k imunitným deficienciám. Navyše sa ukázalo, že bunky kultivované bez CD28 produkovali veľké množstvo prozápalových cytokínov TNF- α a IL-6.

Tieto dáta naznačujú, že identifikácia nových a spoľahlivých T/B bunkových markerov imunosenescencie a neurodegenerácie v kombinácii s detekciou množstva antigén špecifických protilátok po bežnom očkovaní v krvi, by mohla priniesť nové informácie o stave imunitného systému jedinca, ako aj následne predikovať jeho odpovedavosť na prípadnú vakcináciu.

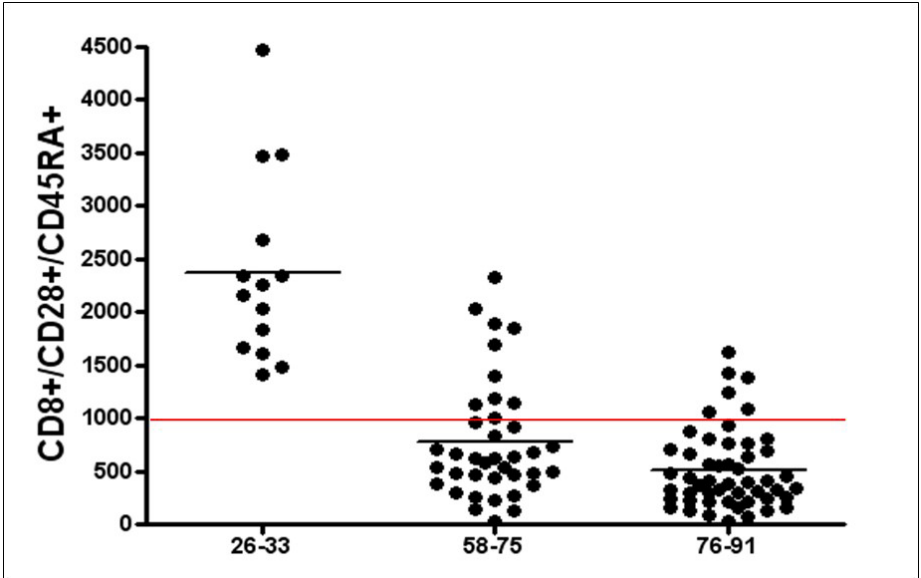
Markery imunosenescencie

Ak chceme skúmať imunosenescenciu alebo ju dokonca v klinickej praxi obísť, mali by sme si zadefinovať dobré markery, aby sme s čo najväčšou presnosťou vedeli odlíšiť fenotyp, ktorý bude reagovať na nové podnety od toho, ktorý reagovať nebude. Dobrý marker by mal byť ľahko a pokiaľ možno aj lacno merateľný a malo by byť jednoduché odlíšiť pozitívny stav od negatívneho. Jedným z takýchto markerov je CD57, zvyčajne používaný ako marker pre NK bunky, ale s vekom sa objavuje a zvyšuje jeho expresia aj na T-bunkách. T-bunky s masívnou expresiou CD57 majú podobný fenotyp ako NK bunky, ale vykazujú všetky znaky senescentných buniek-skrátené teloméry, nízka aktivita telomerázy, nízka expresia génov kontrolujúcich bunkový cyklus a znížená schopnosť proliferácie.

Ďalším z dobrých markerov je CD28, ktorý je azda aj najviac využívaný. S vekom expresia CD28 klesá a tak vidno akumuláciu fenotypovo naivných buniek, ktoré sú CD45RA pozitívne, ale bez expresie kostimulačnej molekuly CD28, ktorá je pre správne fungovanie T-buniek esenciálna. Tieto bunky nie sú schopné odpovedať na antigény, nedokážu proliferovať a produkujú prozápalové cytokíny. Strata CD28 je výraznejšia na cytotoxických bunkách a tie sú teda výhodnejšie pre posudzovanie imunologického statusu jedinca.

Veľkým problémom pri štúdiu imunosenescencie je nedostatok vhodných modelov. Imunitný systém hlodavcov je v mnohých aspektoch veľmi odlišný od ľudského a často aj jednotlivé kmene myší alebo potkanov sa veľmi navzájom líšia. Kvôli tomu je takmer nemožné skúmať aspekty senescencie ľudského imunitného systému na hlodavcoch a jedinou možnosťou je skúmať ľudské vzorky. Nevýhodou takéhoto prístupu je nemožnosť kontroly nad „experimentálnym objektom.“ Od približne 100 zdravých dobrovoľníkov rôzneho veku sme získali krvné vzorky a pomocou prietokovej cytometrie sme zisťovali počty buniek s expresiou CD28. Zamerali sme sa hlavne na bunky, ktoré sú zároveň naivné (CD45RA+). Zistili sme, že relatívne množstvo týchto buniek dramaticky klesá s vekom. Zároveň je však zaujímavé, že v každej vekovej kategórii sa nájde určité percento jedincov (okolo 20%) s počtom buniek podobným, ako majú mladí pacienti. Ak zoberiem do úvahy údaje z metaanalýz, kde na vakcíny reagovalo v niektorých prípadoch len 20% starších pacientov, približne sa to prekrýva s počtom

starších ľudí, ktorí majú aj napriek vyššiemu veku dostatok naivných T-buniek exprimujúcich CD28. Tento prístup je samozrejme vysoko intuitívny, avšak v budúcnosti plánujeme použiť krvné vzorky od pacientov, ktorí boli očkovaní a následne počty ich naivných T-buniek korelovať s titrami špecifických protilátok v krvnej plazme.



Obr. 1: Relatívne zastúpenie naivných cytotoxických T-lymfocytov exprimujúcich CD28 v krvi mladých a starších ľudí. Počty sú vzťahnuté na 50 000 leukocytov. Zdá sa, že hranica „mladého fenotypu“ by mohla ležať okolo 1000 naivných buniek/50 000 leukocytov.

Záver

Imunosenesencia dnes predstavuje jeden z najzávažnejších, ale zároveň jeden z najprehľadanejších problémov modernej medicíny. Súvisí s ňou množstvo civilizačných ochorení a tiež výrazne komplikuje priebeh bežných infekčných ochorení. Hľadanie vhodných markerov imunosenesencie môže pomôcť pri účinných vakcinačných programoch pre starších ľudí, pri vývoji nových vakcín a v neposlednom rade pri zavádzaní personalizovanej liečby ochorení súvisiacich s vysokým vekom.

Práca autorov je podporená z operačného programu Výskum a vývoj pre projekt ITMS 26240220008, spolufinancovaného zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Recenzent

1. MUDr. Mgr. Tomáš Hromádka, PhD. Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava
2. doc. RNDr. Ivana Shawkatová, PhD., LFUK, Bratislava

PREHĽAD CITOVANEJ LITERATÚRY:

Goodwin K, Viboud C, Simonsen L: Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. *Vaccine* 2006; 24: 1159-69

Aspinall R, Carroll J, Jiang S: Age-related changes in the absolute number of CD95 positive cells in T cell subsets in the blood. *Exp Gerontol* 1998; 33: 581-591

Goronzy JJ, Lee WW, Weyand CM: Aging and T-cell diversity. *Exp Gerontol* 2007; 42: 400-6

Monteiro J, Batliwalla F, Ostrer H, Gregersen PK: Shortened telomeres in clonally expanded CD28-CD8+ T cells imply a replicative history that is distinct from their CD28+CD8+ counterparts. *J Immunol* 1996; 156: 3587-90

Cicin-Sain L, Smyk-Pearson S, Currier N, Byrd L, Koudelka C, Robinson T, Swarbrick G, Tackitt S, Legasse A, Fischer M, Nikolich-Zugich D, Park B, Hobbs T, Doane CJ, Mori M, Axthelm MK, Lewinsohn DA, Nikolich-Zugich J: Loss of naive T cells and repertoire constriction predict poor response to vaccination in old primates. *J Immunol* 2010; 184: 6739-45

Bryl E, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ: Down-regulation of CD28 expression by TNF-alpha. *J Immunol* 2001; 167: 3231-8

Borthwick NJ, Lowdell M, Salmon M, Akbar AN: Loss of CD28 expression on CD8(+) T cells is induced by IL-2 receptor gamma chain signaling cytokines and type I IFN, and increases susceptibility to activation-induced apoptosis. *Int Immunol* 2000; 12: 1005-1013

Wikby A, Ferguson F, Forsey R, Thompson J, Strindhall J, Löfgren S, Nilsson BO, Ernerudh J, Pawelec G, Johansson B: An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60: 556-65

Tsaknaridis L, Spencer L, Culbertson N, Hicks K, LaTocha D, Chou YK, Whitham RH, Bakke A, Jones RE, Offner H, Bourdette DN, Vandenbark AA: Functional assay for human CD4+CD25+ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity. *J Neurosci Res* 2003; 74: 296-308

Gregg R, Smith CM, Clark FJ, Dunnion D, Khan N, Chakraverty R, Nayak L, Moss PA: The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 540-6

Wang L, Xie Y, Zhu LJ, Chang TT, Mao YQ, Li J: An association between immunosenescence and CD4(+)CD25(+) regulatory T cells: a systematic review. *Biomed Environ Sci* 2010; 23: 327-32

Chou JP, Effros RB: T cell replicative senescence in human aging. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 1680-98

Goronzy JJ, Fulbright JW, Crowson CS, Poland GA, O'Fallon WM, Weyand CM: Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. *J Virol* 2001; 75: 12182–7

Saurwein-Teissl M, Lung TL, Marx F, Gschösser C, Asch E, Blasko I, Parson W, Böck G, Schönitzer D, Trannoy E, Grubeck-Loebenstein B: Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. *J Immunol* 2002; 168: 5893-9

Trzonkowski P, Mysliwska J, Szmit E, Wieckiewicz J, Lukaszuk K, Brydak LB, Machala M, Mysliwski A: Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination—an impact of immunosenescence. *Vaccine* 2003; 21: 3826–36

miRNA AKO BIOMARKERY NEURODEGENERATÍVNYCH OCHORENÍ

Košíková N, Čente M, Filipčík P, Novák M.

Neuroimunologický ústav SAV

Tauopatie tvoria skupinu neurodegeneratívnych ochorení asociovaných s patologickou agregáciou tau proteínu v mozgu. Najznámejšou a najčastejšie sa vyskytujúcou tauopatiou je Alzheimerova choroba. Alzheimerova choroba (AD, Alzheimer's disease) je nevratné, fatálne neurodegeneratívne ochorenie charakterizované progresívnou stratou pamäte a kognitívnych funkcií. Toto ochorenie je najčastejšie sa vyskytujúcou formou demencie. Postihuje hlavne ľudí starších ako 65 rokov. So zvyšujúcou sa životnou úrovňou sa zvyšuje priemerný vek populácie, s čím súvisí i nárast počtu pacientov trpiacich AD. V súčasnosti žije na svete približne 46,8 milióna ľudí trpiacich demenciou. Každý rok pribudne na svete viac ako 9,9 milióna nových prípadov (Prince a kol., 2015). Tieto údaje poukazujú na to aký závažný problém neurodegeneratívne ochorenia predstavujú, preto je potrebný výskum v tejto oblasti. V súčasnosti je AD neliečiteľným ochorením. Dostupná liečba je hlavne symptomatická, čo znamená, že sa sústreďuje na zmiernenie symptómov sprevádzajúcich ochorenie a nie na samotnú príčinu ochorenia. Výskum sa sústreďuje na objavenie účinných terapeutík a taktiež na stanovenie biomarkerov, ktoré by prispeli kčasnej diagnostike ochorenia.

Nekódujúce RNA

Až 98,8 % ľudského genómu tvorí nekódujúca DNA. Na základe veľkosti nekódujúcich RNA rozlišujeme malé nekódujúce RNA (menej ako 200 nukleotidov) a dlhé nekódujúce RNA (viac ako 200 nukleotidov). Medzi nekódujúce RNA patria infraštruktúrne RNA a regulačné RNA. Infraštruktúrne RNA zahŕňajú ribozomálne RNA (rRNA), transferové RNA (tRNA) a malé jadrové RNA (snRNA). Regulačnými RNA sú malé interferujúce RNA (siRNA), malé jadierkové RNA (snoRNA) a mikro RNA (miRNA). Dlhé nekódujúce RNA môžu pozostávať až z 100 000 nukleotidov, zahŕňajú heterogénne regulačné molekuly akými sú prirodzené antisense transkripty, ktoré predstavujú 3'-5' vlákná intrónov alebo exónov. Tieto RNA regulujú transkripciu mRNA, zostrih, transláciu, epigenetické modifikácie a sú prekuzormi endogénnych siRNA (Mattick, 2011). K dlhým nekódujúcim RNA patria taktiež expandujúce RNA opakovania (RNA expansion repeats), ktoré zohrávajú úlohu v epigenetických reguláciách (Nakamori a Thornton, 2010).

Dlhé nekódujúce RNA sú spomedzi nekódujúcich RNA v súčasnosti najmenej charakterizovanou skupinou. Pozostávajú z viac ako 200 nukleotidov. Sú lokalizované v jadre alebo v cytozole. Môžu ale nemusia byť polyadenylované. Tieto RNA sa rozdeľujú do 5 kategórií : sense, antisense, obojsmerné (bidirectional), intrónové, inter-

génové. Pôvod týchto RNA nie je stále presne definovaný. Najskôr boli považované za vedľajší produkt RNA polymerázy, ktorý nemá žiadnu funkciu. Avšak v súčasnosti sa im venuje zvýšená pozornosť pre ich funkciu ako epigenetických, transkripčných a post-transkripčných regulátorov (Mercer a kol., 2009).

Súčasný výskum sa vo veľkej miere zameriava na malé nekódujúce RNA, a to predovšetkým siRNA a miRNA. Tieto RNA sa podieľajú na post-transkripčnej regulácii génovej expzie. Pri rôznych ochoreniach dochádza k disregulácii hladiny expzie špecifických miRNA, čo robí z týchto molekúl vhodné kandidátne biomarkery pre diagnostiku ochorení. Tento typ biomarkerov je stabilnejší, a tým aj vhodnejší, v porovnaní s proteínovými markermi, ktoré podliehajú rôznym post-translačným modifikáciám.

MiRNA

MiRNA sú nekódujúce RNA, ktoré regulujú génovú expziu na post-transkripčnej úrovni. Prvou objavenou miRNA bola lin-4, ktorá reguluje vývin *Caenorhabditis elegans* väzbou na lin-14 mRNA (Lee a kol., 1993). Tento objav odštartoval výskum v oblasti nekódujúcich RNA. Tak ako proteíny-kódujúce gény, aj gény pre miRNA sú kódované v genóme (Lagos-Quintana a kol., 2001). Gény pre miRNA sa nachádzajú v intrónoch génov kódujúcich proteíny alebo v intrónoch a exónoch génov pre iné nekódujúce RNA (Du a Zamore, 2005). V bunkovom jadre sú gény pre miRNA transkribované RNA polymerázou II na primárny transkript (pri-miRNA) (Lee a kol., 2004). Niektoré miRNA, ktoré sú kódované v oblastiach Alu sekvenčných opakovaní ľudského genómu, sú transkribované RNA polymerázou III (Borchert a kol., 2006). Primárny transkript má na 5' konci 7-methylguanozínovú čiapočku a na 3' konci je polyadenylovaný (Cai a kol., 2004). Pri-miRNA sú následne štiepené enzýmovým komplexom Drosha-DGCR8, známym ako mikroprocesorový komplex. Tento komplex obsahuje RNázu III – endonukleázu Drosha a proteín DGCR8, ktorý sa viaže na dvojláknovú RNA (Gregory a kol., 2004). Prítomnosť DGCR8 je potrebná pre špecifické štiepenie pri-miRNA, pretože enzým Drosha samostatne má nešpecifickú aktivitu k substrátu (Han a kol., 2004). Štiepením vznikajú 60-70 nukleotidov dlhé prekurzorové miRNA (pre-miRNA) s 5' fosfátovým koncom a na 3' konci s dvomi prečnievajúcimi nukleotidmi. Táto štruktúra je dôležitá pre rozpoznanie pre-miRNA enzýmom Dicer a následné špecifické štiepenie.

Prekurzorová miRNA je transportovaná z jadra do cytoplazmy pomocou exportínu-5, ktorý vyžaduje prítomnosť Ran proteínu, závislého od GTP (Lund a kol., 2004). Interakcia medzi pre-miRNA a exportínom-5 a následný transport vyžadujú špecifickú vlásenkovú sekundárnu štruktúru a štruktúru, ktorá zodpovedá štiepeniu pomocou enzýmu Drosha.

V cytoplazme je pre-miRNA štiepená ďalšou RNázou III, endonukleázou Dicer. PAZ doména enzýmu Dicer rozoznáva 2 prečnievajúce nukleotidy na 3' konci, nachádzajúce sa na báze ramena slučky. Dicer štiepi pre-miRNA tak, že vzniká 21-23 nukleotidov dlhá, dvojláknová miRNA s 5' fosfátovým koncom a 2 prečnievajúcimi nukleotidmi na 3' konci (Lee a kol. 2002).

Maturovaná miRNA je následne inkorporovaná do inaktívneho RISC komplexu (RISC, RNA-induced silencing complex). Hlavnými zložkami tohto komplexu sú endonukleáza Dicer, Ago2 z proteínovej rodiny Argonaut a dsRNA viažuci proteín TRBP. Vlákna duplexu miRNA sú rozoznávané týmto komplexom. Helikázovou aktivitou Ago2 dochádza k oddeleniu vlákien. Nukleázovou aktivitou Ago2 je sense vlákno odstránené z RISC komplexu (Peters a Meister, 2007). Antisense vlákno miRNA je viazané k Ago2, pre tento proces je potrebná interakcia medzi TRBP a Dicerom, takto vzniká aktívny RISC komplex. Antisense vlákno miRNA v aktivovanom RISC komplexe rozpoznáva cieľovú, komplementárnu mRNA a viaže sa na ňu. Dlhé obdobie bola 3' oblasť mRNA, ktorá nepodlieha translácii (3' UTR, untranslated region), považovaná za jediné väzobné miesto pre miRNA. V roku 2007 Lytle a kolektív dokázali, že miRNA sa môže viazať aj na 5' UTR mRNA. Neskôr bolo dokázané, že miRNA sa môže okrem 3' a 5' UTR viazať aj na kódujúcu oblasť mRNA. Na základe stupňa komplementarity miRNA k cieľovej mRNA dochádza k inhibícii translácie alebo k úplnej degradácii danej mRNA (Obr.1). Ak je komplementarita úplná dochádza k degradácii cieľovej mRNA. Práve preto môže konkrétna miRNA regulovať viaceré mRNA a zároveň určitá mRNA môže byť regulovaná viacerými miRNA.

Normálny vývin a funkcia mozgu závisí na miRNA, ktoré udržujú rovnováhu medzi transkriptomom a proteómom. Mozgovo-špecifické miRNA sú potrebné pre správny vývin neurónov, synaptickú plasticitu a taktiež ovplyvňujú fyziologické procesy spájané s neurodegeneráciou (Bian a Sun, 2011).

Pri neurodegeneratívnych ochoreniach dochádza k zmenám profilu mozgovo-špecifických miRNA. Disfunkcia miRNA môže byť príčina, ale aj následok ochorenia. K narušeniu normálnych biologických funkcií miRNA dochádza v prípade, ak nastávajú zmeny v komponentoch zahrnutých v biogenéze miRNA, ako napríklad v enzýmoch Dicer, Drosha-DGCR8, RISC komplexe (Tan a kol., 2015). Pri Alzheimerovej chorobe dochádza k disregulácií mnohých miRNA, ktoré sa podieľajú na regulácií tvorby peptidu A β , tau proteínu, zápalového procesu, apoptóze. V roku 2007 bola publikovaná prvá štúdia o abnormálnej expresii miRNA pri AD. V tejto štúdii pozorovali zvýšenú hladinu expresie miR-9, miR-125b, miR-128 v hipokampe pacientov s Alzheimerovou chorobou v porovnaní s vekovo korelujúcimi zdravými jedincami (Lukiw a kol., 2007). Výsledky analýz miRNA profilov z telových tekutín, *post-mortem* vzoriek AD mozgov od pacientov, myších modelov a z experimentov na bunkových líniách ukazujú, že pri AD dochádza k disregulácii množstva špecifických miRNA. Odlišná hladina expresie určitých miRNA v krvi a mozgovo-miechovom moku môže indikovať zmeny, ktoré nastávajú pri ochorení. Tieto miRNA spolu s mozgovo-špecifickými miRNA sú potenciálnymi biomarkermi pre Alzheimerovu chorobu.

MiRNA biomarkery

Telové tekutiny predstavujú vhodný zdroj pre analýzu potenciálnych biomarkerov pre Alzheimerovu chorobu. MiRNA prechádzajú hematoencefalickou bariérou, čím

dokážu na periférii signalizovať zmeny, ktoré nastávajú pri ochorení v CNS (Karnati a kol., 2015). Vďaka tomu, že sú miRNA v telových tekutinách stabilné, sú vhodné pre analýzu v klinickej praxi. Vhodným zdrojom pre analýzu cirkulujúcich miRNA sú CSF, krvné sérum, plazma, moč alebo sliny. Výskum neurodegeneratívnych ochorení sa sústreďuje najmä na analýzu miRNA z krvi a CSF. Odber CSF je pomerne invazívny a častokrát pre pacienta traumatický proces, pričom môže dôjsť pri odbere ku kontaminácii CSF krvou. Kontaminácia krvnými bunkami môže meniť zastúpenie určitých miRNA, avšak na druhej strane, na expresný profil niektorých miRNA nemá kontaminácia CSF krvou žiaden vplyv (Muller a kol., 2015). CSF má však v porovnaní s krvou veľkú výhodu v tom, že je priamo v kontakte s mozgovým tkanivom a obsahuje teda väčšiu paletu miRNA pochádzajúcich priamo z mozgu v porovnaní s krvou. Na druhej strane je odber krvi, prípadne plazmy alebo séra z AD pacientov oveľa dostupnejší a štandardnejší, čo ho robí preferovaným zdrojom materiálu pri výskume biomarkerov. Pri AD dochádza k disregulácii mnohých miRNA, ktoré sú zahrnuté v regulácii tau proteínu, tvorby amyloidu- β cez procesing APP prostredníctvom BACE1, v oxidatívnom strese, apoptóze a ďalších dráhach asociovaných s AD. V niektorých prípadoch je expresia miRNA regulovaná prostredníctvom epigenetických modifikácií, ako DNA metyláciou a modifikáciou histónov, ktoré sa výrazne menia s pribúdajúcim vekom (Fraga, 2009; Chouliaras a kol., 2011). Hyper- a hypo-metylácia miRNA promóterov mení hladinu expresie daných miRNA. Zmeny v DNA metylácii nastávajú pri mnohých neurodegeneratívnych ochoreniach, taktiež pri AD (Van den Hove a kol., 2014).

Jednou z kandidátnych miRNA pre diagnostiku AD je miR-107. Znížená hladina expresie pri AD bola potvrdená vo viacerých štúdiách, v ktorých analyzovali vzorky temporálneho kortexu a CSF (Wang a kol., 2008; Nelson a Wang, 2010; Peter a kol., 2010). Porovnanie expresie miR-107 u štyroch rôznych skupín pacientov, s pokročilou AD, s miernymi kognitívnymi zmenami, pacientov bez diagnostikovanej demencie so začínajúcou AD patológiou a zdravých jedincov ukázali výrazné zníženie expresie už v ranných štádiách ochorenia (Wang a kol., 2008). Keďže hladina expresie miR-107 odráža progresiu ochorenia, môže byť potenciálne použitá ako marker pre rozlíšenie štádií AD.

V ďalšej štúdii identifikovali panel 4 kandidátnych miRNA (miR-31, miR-93, miR-143 a miR-146a), ktorý by bol vhodný na rozlíšenie AD od vaskulárnej demencie. V krvnom sére 127 AD pacientov, 30 pacientov s miernymi kognitívnymi poruchami a 30 pacientov s vaskulárnou demenciou pozorovali signifikantné zníženie hladiny expresie tohto panelu miRNA u AD pacientov (Dong a kol., 2015).

Ďalší panel miRNA bol identifikovaný celogenómovou expresnou analýzou miRNA v krvnom sére na vzorkách 158 AD pacientov a 155 kontrol. Panel tvorili: miR-98-5p, miR-885-5p, miR-483-3p, miR-342-3p, miR-191-5p, miR-let7d-5p, pričom tieto miRNA zaznamenali signifikantne zníženie hladiny expresie u pacientov s AD v porovnaní s kontrolami. Najvyššiu senzitivitu (81,5 %) a špecificitu (70,1 %) mala miR-342-3p. Zvýšená expresia, ale nie štatisticky signifikantná, bola pri miR-26b-3p, miR-3158-3p a miR-36. Analýza panelu 6 miRNA mala senzitivitu 80,6 % a špecificitu 68,3 % (Tan

a kol., 2014). Panel miRNA alebo samostatne miR-342-3p predstavujú potenciálne nové biomarkery pre AD.

Na diagnostiku začínajúcej AD s miernymi kognitívnymi poruchami bol identifikovaný panel miRNA pozostávajúci z rodiny miR-132 (miR-128, miR-132, miR-874) rodina miR-134 (miR-134, miR-323-3p, miR-382). Tieto miRNA analyzované z plazmy dokázali s vysokou presnosťou odlíšiť medzi pacientami s kognitívnymi poruchami a kontrolami. Analýza biomarkerov rodiny miR-132 mala špecifickosť 96-98 % a senzitivitu 84-94 % a rodina miR-134 74-88 % senzitivitu a 80-92 % špecifickosť. Pri kombinovanej analýze miRNA z daných rodín bola senzitivita 96 % a špecifickosť 87 %. Identifikované miRNA úspešne detegovali kognitívne zmeny u väčšiny pacientov v pre-symptomatickom štádiu, 1-5 rokov pred klinickou diagnostikou ochorenia (Sheinerman a kol., 2012).

Ako potenciálny biomarker sú zaujímavé miRNA rodiny miR-34, a to miR-34a a miR-34c. Hladina expresie miR-34a je zvýšená v mononukleárných periférnych bunkách krvi pacientov s AD. Expresia sesterskej miR-34c je tiež zvýšená v týchto bunkách a taktiež v plazme pacientov s AD v porovnaní s kontrolami. Zmena hladiny expresie miR-34c je ale výraznejšia ako miR-34a. Vysoké hodnoty senzitivity a špecifickosti analýzy miR-34c robia z tejto miRNA vhodný kandidátny biomarker. Test hladiny expresie miR-34c ukázal 92 % senzitivitu a 96 % špecifickosť. V prípade miR-34a bola senzitivita 84 % a špecifickosť 74 % (Bhatnagar a kol., 2014).

V inej štúdií bolo poukázane na fakt, ako ovplyvňuje odber CSF hladiny expresie miRNA. Skúmali sa vzorky CSF odobrané *post-mortem* a zo žijúcich ľudí. Na skupine 35 AD pacientov a 35 kontrol detegovali zníženú expresiu miR-27a-3p, pričom hladiny expresie sa odlišovali v závislosti od pôvodu vzorky CSF. V *post-mortem* vzorkách detegovali vyššie hladiny miRNA, preto pri analýze dát z *post-mortem* vzoriek by sa malo dať pozor na ich interpretáciu. Avšak je potrebná analýza na väčšej skupine, ktorá by potvrdila, že stanovenie hladiny expresie miR-27a-3p je potenciálny diagnostický biomarker pre klinickú prax (Sala Frigerio a kol., 2013).

Vhodným potenciálnym biomarkerom je taktiež miR-125b. Hladina expresie tejto miRNA nie je ovplyvnená kontamináciou krvou v CSF (Muller a kol., 2015). Analýza v krvnom sére ukázala vysoké hodnoty senzitivity a špecifickosti pri samostatnej analýze a taktiež pri analýze v pároch. V krvnom sére pacientov s AD bola stanovená signifikantne znížená expresia, pričom samostatná analýza miR-125b dosiahla špecifickosť nad 68,3 % a senzitivitu 80,8 % (Tan a kol., 2014). Pri analýze miR125 v páre spolu s miR-181c boli hodnoty senzitivity a špecifickosti podobné ale diagnostická hodnota miR-125b samostatne bola lepšia. Skúmali taktiež akú senzitivitu a špecifickosť dosiahne analýza v páre s miR-9, pričom senzitivita bola 80 % a špecifickosť 71,4 %. (Tan a kol., 2014). Čiže analýza v pároch nepreukázala výrazne odlišnú špecifickosť a senzitivitu v porovnaní s analýzou samostatne.

Pri väčšine štúdií sa používa na analýzu expresného profilu miRNA metóda NGS (sekvenovanie novej generácie) a následná validácia pomocou kvantitatívnej PCR. Ta-

bulka č.1 sumarizuje aktuálne najpreskúmanejšie a najčastejšie reportované miRNA v klinických vzorkách u AD pacientov.

Tabuľka 1 Identifikované miRNA v klinických vzorkách pacientov s Alzheimerovou chorobou

miRNA	Úloha v AD patofyziológii	Zmena pri AD	Referencie
miR-107	Zapojená v dráhe produkcie amyloiduβ (reguluje expresiu enzýmu BACE1, ktorý štiepi APP na Aβ).	Znížená expresia už v ranných štádiách AD v temporálnom kortexe a CSF	Wang a kol., 2008 Nelson a Wang, 2010
miR-9	Reguluje produkciu amyloiduβ, je asociovaná s neurogenézou a proliferáciou mozgových buniek, reguluje serínpalmytoiltransferázu, ktorá sa zúčastňuje fosforylácietau proteínu.	Znížená expresia v sére, plazme, CSF Zvýšená hladina expresie v neokortexe a v krvnom sére	Geekiynage a Chan, 2011 Tan a kol., 2014
miR-29a miR-29b	Zapojené v dráhe produkcie amyloiduβ (reguluje expresiu BACE1, ktorý štiepi APP na Aβ). Zohráva úlohu pri maturácii neurónov a pri apoptóze. Regulujú serínpalmytoiltransferázu, ktorá fosforylujetau proteín. MiR-29b reguluje expresiu transkripčného faktora Sp1, ktorý reguluje expresiu APP a tau proteínu. Sp1 je regulovaný oxidatívnym stresom. Rodina miR-9 reguluje expresiu metyltransferáz 3A a 3B, ktoré sú zodpovedné za abnormálnu metyláciu pri AD patológii.	Znížená expresia v kortexe a hipokampe, CSF, moči, plazme, BMC Zvýšená expresia v CSF	Hebert a kol., 2009 Shioya a kol., 2010 Geekiyanage a kol., 2012 Villa kol., 2013 Kiko a kol., 2014 Muller a kol., 2015
miR-124	Zohráva úlohu pri diferenciácii neurónov. Je zapojená v dráhe produkcie amyloiduβ prostredníctvom regulácie expresie BACE1.	Znížená expresia v mozgu, moči a CSF	Melkonyan a kol., 2008, Smith a kol., 2011, Patz a kol., 2013
miR-128	Je dôležitá pre diferenciáciu neurónov. Po vystavení oxidatívnemu stresu dochádza k jej deregulácii.	Disregulovaná po oxidatívnom strese v plazme, moči a CSF	Melkonyan a kol., 2008 Alexandrov a kol., 2012 Patz a kol., 2013
miR-134	Je dôležitá pri synapsii a neurónovej plasticite.	Znížená expresia v plazme MCI pacientov	Sheinerman a kol., 2012 Patz a kol., 2013
miR-137	Zapojená v dráhe produkcie amyloiduβ. Je dôležitá pre maturáciu neurónov a morfogenézu dendritových buniek.	Znížená expresia v plazme, moči a CSF	Melkonyan a kol., 2008 Geekiyanage a kol., 2012

miRNA	Úloha v AD patofyziológii	Zmena pri AD	Referencie
miR-34a	Zapojená v dráhe apoptózy (reguluje Bcl2), v epigenetických reguláciách (SIRT1), reguluje Psen1 zodpovedný za familiárnu AD.	Zvýšená expresia v BMC Znížená expresia v plazme a CSF	Bhatnager a kol., 2014 Kiko a kol., 2014
miR-34c	Zapojená v dráhe apoptózy (reguluje Bcl2), v epigenetických reguláciách (SIRT1), reguluje Psen1 zodpovedný za familiárnu AD	Zvýšená expresia v plazme, BMC	Bhatnager a kol., 2014
miR-27a-3p	Zapojená v dráhe produkcie amyloiduβ (regulácia BACE1), vo fosforyláciitau proteínu (regulácia kinázy GSK3β), reguluje hladinu tau proteínu (gén MAPT) a PSEN1	Znížená expresia v CSF	Frigerio a kol., 2013
miR-9 miR-125b miR-146a miR-155	Zapojené v dráhe produkcie amyloiduβ. Sú asociované s neurogenézou a proliferáciou mozgových buniek, regulujú serínpalmytoiltransferázu, ktorá fosforylujetau proteín.	Zvýšená expresia v mozgu a CSF	Alexandrov a kol., 2012
miR-146a	Zohráva úlohu pri vrodenej imunitnej odpovedi, bunkovej proliferácii a apoptóze.	Znížená expresia v plazme a CSF Znížená expresia v hipokampe a CSF	Kiko a kol., 2014 Muller a kol., 2014
miR-125b	Zohráva úlohu pri metabolizme lipidov. Je disregulovaná pri obezite, čo je jedným z rizikových faktorov AD. Asociovaná s kognitívnymi zmenami.	Znížená expresia v plazme, sére a CSF Zvýšená expresia v mozgu a CSF	Sethi a kol., 2009 Galimberti a kol., 2014 Kiko a kol., 2014 Tan a kol., 2014 Muller a kol., 2015
miR-342-3p	Zúčastňuje sa regulácie bunkového cyklu, apoptózy, endocytózy a regulácie axonálneho transportu.	Znížená expresia v plazme a sére	Tan a kol., 2014 Lugli a kol., 2015
miR-125b miR-181c	MiR-125b zohráva úlohu pri metabolizme lipidov. Je disregulovaná pri obezite, čo je jedným z rizikových faktorov AD. Je asociovaná s kognitívnymi zmenami. MiR-181c reguluje serínpalmytoiltransferázu, ktorá fosforylujetau proteín.	Znížená expresia v sére	Tan a kol., 2014
miR-181c	Zapojená v dráhe produkcie Aβ. Je zapojená v metabolizme lipidov prostredníctvom regulácie ceramidov.	Znížená expresia v sére	Geekiyanae a kol., 2012
miR-23a	Zúčastňuje sa regulácie expresie transkripčných faktorov	Znížená expresia v sére	Galimberti a kol., 2014

miRNA	Úloha v AD patofyziológii	Zmena pri AD	Referencie
miR-26b	Regulácia aktivity proteín kináz, ktoré fosforylujútau proteín a regulácia mTOR dráhy.	Znížená expresia v sére a CSF	Galimberti a kol., 2014
miR-98-5p miR-885-5p miR-483-3p miR-342-3p miR-191-5p miR-let7d-5p	Sú súčasťou dráhy apoptózy, bunkového cyklu, axonálneho transportu, neurotrofnej signálnej dráhy, endocytózy, imunitnej odpovede, inzulínovej signálnej dráhy, mTOR dráhy.	Znížená expresia v sére	Tan a kol., 2014
miR-31 miR-93 miR-143 miR-146a	Zapojené v metabolizme lipidov, imunitnej odpovede, bunkovej proliferácie a apoptóze.	Znížená expresia v sére	Dong a kol., 2015
miR-34a miR-181b miR-200a miR-let7f	Zapojená v dráhe apoptózy (reguluje Bcl2), v epigenetických reguláciách (SIRT1), regulujú Psen1 zodpovedný za familiárnu AD, vezikulárny transport a regulujú expresiu transkripčných faktorov.	Zvýšená expresia miR-34a miR-181 u pacientov s MCI v BMC	Schipper a kol., 2007
miR-342-3p miR-342-5p miR-150-5p miR-23b-3p miR-29b-3p	Zapojené v inzulínovej signálnej dráhe, endocytóze, apoptóze, imunitnej odpovedi, v regulácii bunkového cyklu, mTOR dráhy a v regulácii neurotrofnej signálnej dráhy.	Znížená expresia v plazme	Lugli a kol., 2015
miR-9 miR-29a miR-29b miR-34a miR-125b miR-146a	Zapojené v dráhe produkcie amyloidu β (reguluje expresiu BACE1, ktorý štiepi APP na A β). Zohráva úlohu pri maturácii neurónov a pri apoptóze. Regulujú serínpalmytoiltransferázu, ktorá fosforylujetau proteín. MiR-29b reguluje expresiu transkripčného faktora Sp1, ktorý reguluje expresiu APP a tau proteínu. Sp1 je regulovaný oxidatívnym stresom. Rodina miR-9 reguluje expresiumetyltransferáz 3A a 3B, ktoré sú zodpovedné za abnormálnu metyláciu pri AD patológii. Zapojené v epigenetických reguláciách (SIRT1), regulujú Psen1 zodpovedný za familiárnu AD.	Znížení expresia v plazme a CSF	Kiko a kol., 2014

Záver

Na základe doterajších poznatkov z iných oblastí medicínskeho výskumu, ako napr. onkológia, kde sa miRNA používajú ako prognostické biomarkery pri liečbe niektorých druhov leukémií (Avigad a kol., 2016) vyplýva, že miRNA molekuly predstavujú veľmi sľubnú oblasť, ktorá skrýva mnohé potenciálne biomarkery rôznych ľudských ochorení. V prípade Alzheimerovej choroby je vysoko pravdepodobné, že použitie jednotlivých miRNA nebude dostatočne citlivé ani špecifické pre určenie správnej diagnózy, a práve preto sa v budúcnosti budú pravdepodobne používať panely miRNA molekúl kombinujúce niekoľko rozličných mikro RNA, čím sa spoločne s inými biomarkermi môže dosiahnuť lepšia a presnejšia diagnostika neurodegeneratívnych ochorení a ich subtypizácia.

Poďakovanie

Táto práca bola podporená výskumným grantom APVV-0677-12 a VEGA 2/0141/15.

Recenzent

1. Mgr. Marián Baldovič, PhD., Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Bratislava
2. Mgr. Branislav Kováčech, PhD., Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava

LITERATÚRA

- Alexandrov, P.N., Dua ,P., Hill, J. M., Bhattacharjee, S., Zhao, Y., Lukiw, W.J. 2012. microRNA (miRNA) speciation in Alzheimer's disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF) and extracellular fluid (ECF). *Int J Biochem Mol Biol.* 3(4), 365-373.
- Avigad, S., Verly, I. R., Lebel, A., Kordi, O., Shichrur, K., Ohali, A., Hameiri-Grossman, M., Kaspers, G. J., Cloos, J., Fronkova, E., Trka, J., Luria, D., Kodman, Y., Mirsky, H., Gaash, D., Jeison, M., Avrahami, G., Elitzur, S., Gilad, G., Stark, B., Yaniv, I. 2016. MiR expression profiling at diagnosis predicts relapse in pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 55(4), 328-39.
- Bhatnagar, S., Chertkow, H., Schipper, H. M., Yuan, Z., Shetty, V., Jenkins, S., Jones, T., Wang, E. 2014. Increased microRNA-34c abundance in Alzheimer's disease circulating blood plasma. 7:2. doi: 10.3389/fnmol.2014.00002. eCollection 2014.
- Bian, S., Sun, T. 2011. Functions of noncoding RNAs in neural development and neurological diseases. *Mol Neurobiol.* 44(3), 359–373.
- Borchert, G.M., Lanier, W., Davidson, B.L. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 13(12), 1097–1101.
- Cai, X., Hagedorn, Ch., Cullen, B.R. 2004. Human micro-RNA are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 10, 1957-1966.
- Dong, H., Li, J., Huang, L., Chen, X., Li, D., Wang, T., Hu, C., Xu, J., Zhang, C., Zen, K., Xiao S., Yan, Q., Wang, C., Zhang, C. Y. 2015 Serum MicroRNA Profiles Serves as Novel Biomarkers for the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Dis Markers.* 2015:625659. doi: 10.1155/2015/625659.

- Du, T., Zamore, P.D. 2005. MicroPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*. 132, 4645–4652.
- Fraga, M.F. 2009. Genetic and epigenetic regulation of aging. *Curr Opin Immunol* 21(4), 446–453.
- Galimberti, D., Villa, C., Fenoglio, C., Serpente, M., Ghezzi, L., Cioffi, S. M., Arighi, A., Fumagalli, G., Scarpini, E. 2014. Circulating miRNAs as potential biomarkers in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 42(4), 1261-1267.
- Geekiyana, H., Chan, C. 2011. MicroRNA-137/181c regulates serine palmitoyl-transferase and in turn amyloid beta, novel targets in sporadic Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 31(41), 14820–14830.
- Geekiyana, H., Jicha, G.A., Nelson, P. T., Chan, C. 2012. Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 235(2), 491-496.
- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., Shiekhattar, R. 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 432, 235-240.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., Kim, V.N. 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 18, 3016–3027.
- Hebert, S.S., Horré, K., Nicolai, L., Bergmans, B., Papadopoulou, A.S., Delacourte, A., De Strooper, B. 2009. MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression. *Neurobiol Dis*. 33(3), 422-428.
- Chouliaras, L., van den Hove, D. L., Kenis, G., Dela Cruz, J., Lemmens, M. A., van Os, J., Steinbusch, H. W., Schmitz, C., Rutten, B. P. 2011. Caloric restriction attenuates age-related changes of DNA methyltransferase 3a in mouse hippocampus. *Brain Behav Immun*. 25(4), 616–623.
- Karnati, H. K., Panigrahi, M. K., Gutti, R.K., Greig, N.H., Tamargo, I.A. 2015. miRNAs: Key Players in Neurodegenerative Disorders and Epilepsy. *J Alzheimers Dis*. 48(3), 563-80.
- Kiko, T., Nakagawa, K., Tsuduki, T., Furukawa, K., Arai, H., Miyazawa, T. 2014. MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 39(2), 253-259.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 294(5543), 853–858.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75(5), 843–854.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., Kim, V.N. 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 21, 4663-4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 23, 4051-4060.
- Lugli, G., Cohen, A. M., Bennett, D. A., Shah, R. C., Fields, C. J., Hernandez, A. G., Smalheiser, N. R. 2015. Plasma Exosomal miRNAs in Persons with and without Alzheimer Disease: Altered Expression and Prospects for Biomarkers. *PLoS One*. 10(10):e0139233.

- Lukiw, W.J. 2007. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport*. 18(3), 297-300.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 303, 95-98.
- Mattick, J.S. 2011. The central role of RNA in human development and cognition. *FEBS Lett*. 585(11), 1600-1616.
- Melkonyan, H.S., Feaver, W.J., Meyer, E., Scheinker, V., Shekhtman, E.M., Xin, Z., Umansky, S. R. 2008. Transrenal nucleic acids: from proof of principle to clinical tests. *Ann N Y Acad Sci*. 1137, 73-81.
- Mercer, T.R., Dinger, M.E., Mattick, J. S. 2009. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*. 10(3), 155-159.
- Müller, M., Kuiperij, H. B., Claassen, J. A., Küsters, B., Verbeek, M. M. 2014. MicroRNAs in Alzheimer's disease: differential expression in hippocampus and cell-free cerebrospinal fluid. *Neurobiol Aging*. 35(1), 152-158.
- Müller, M., Jäkel, L., Bruinsma, I. B., Claassen, J. A., Kuiperij, H.B., Verbeek, M. M. 2015. MicroRNA-29a Is a Candidate Biomarker for Alzheimer's Disease in Cell-Free Cerebrospinal Fluid. *Mol Neurobiol*. 2015 Apr 21.
- Nakamori, M., Thornton, C. 2010. Epigenetic changes and non-coding expanded repeats. *Neurobiol Dis*. 39(1), 21-27.
- Nelson, P.T., Wang, W.X. 2010. MiR-107 is reduced in Alzheimer's disease brain neocortex: validation study. *J Alzheimers Dis*. 21(1), 75-79.
- Patz, S., Trattnig, C., Grünbacher, G., Ebner, B., Güllly, C., Novak, A., Rinner, B., Leitinger, G., Absenger, M., Tomescu, O. A., Thallinger, G.G., Fasching, U., Wissa, S., Archelos-Garcia, J., Schäfer, U. 2013. More than cell dust: microparticles isolated from cerebrospinal fluid of brain injured patients are messengers carrying mRNAs, miRNAs, and proteins. *J Neurotrauma*. 30(14), 1232-1242.
- Peters, L., Meister, G. 2007. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell*. 26(5), 611-623.
- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G., Wu, Y. T., Prina, M. 2015. Alzheimer's disease international: World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia an analysis of prevalence, incidence, cost and trends.
- Sala Frigerio, C., Lau, P., Salta, E., Tournoy, J., Bossers, K., Vandenberghe, R., Wallin, A., Bjerke, M., Zetterberg, H., Blennow, K., De Strooper, B. 2013. Reduced expression of hsa-miR-27a-3p in CSF of patients with Alzheimer disease. *Neurology*. 81(24), 2103-2116.
- Sethi, P., Lukiw, W.J. 2009. Micro-RNA abundance and stability in human brain: specific alterations in Alzheimer's disease temporal lobe neocortex. *Neurosci Lett*. 459(2), 100-104.
- Sheinerman, K.S., Tsivinsky, V. G., Crawford, F., Mullan, M. J., Abdullah, L., Umansky, S.R. 2012. Plasma microRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment. *Ageing*. 4, 590-605.

Shioya, M., Obayashi, S., Tabunoki, H., Arima, K., Saito, Y., Ishida, T., Satoh, J. 2010. Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neuron navigator 3. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 36(4), 320-330.

Schipper, H. M., Maes, O. C., Chertkow, H. M., Wang, E. 2007. MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells. *Gene Regul Syst Bio.* 1, 263-74.

Tan, L., Yu, J. T., Tan, M. S., Liu, Q. Y., Wang, H. F., Zhang, W., Jiang, T., Tan, L. 2014. Genome wide serum microRNA expression profiling identifies serum biomarkers for Alzheimer's disease. *JAlzheimersDis.* 40(4), 1017-1027.

Tan, L., Yu, J. T., Liu, Q. Y., Tan, M. S., Zhang, W., Hu, N., Wang, Y.L., Sun, L., Jiang, T. 2014. Circulating miR-125b as a biomarker of Alzheimer's disease. *J Neurol. Sci.* 336, 52-56.

Tan, L., Yu, J.T., Tan, L. 2015. Causes and Consequences of MicroRNA Dysregulation in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 51(3), 1249-1262.

Van den Hove, D.L., Kompotis, K., Lardenoije, R., Kenis, G., Mill, J., Steinbusch, H. W., Lesch, K.P., Fitzsimons, C.P., De Strooper, B., Rutten, B.P. 2014. Epigenetically regulated microRNAs in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 35(4), 731-745.

Villa, C., Ridolfi, E., Fenoglio, C., Ghezzi, L., Vimercati, R., Clerici, F., Marcone, A., Gallone, S., Serpente, M., Cantoni, C., Bonsi, R., Cioffi, S., Cappa, S., Franceschi, M., Rainero, I., Mariani, C., Scarpini, E., Galimberti, D. 2013. Expression of the transcription factor Sp1 and its regulatory hsa-miR-29b in peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 35(3), 487-94.

Wang, W.X., Rajeev, B.W., Stromberg, A.J., Ren, N., Tang, G., Huang, Q., Rigoutsos, I., Nelson, P.T. 2008. The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme1. *J Neurosci.* 28(5), 1213-1223.

NOVÉ BIOLOGICKÉ PREPARÁTY V LIEČBE SCLEROSIS MULTIPLEX

Buc M.

Imunologický ústav Lekárskej fakulty UK, Bratislava

Sclerosis multiplex je autoimunitná choroba, ktorú podmieňuje prozápalová aktivita početných buniek imunitného systému pod „vedením“ T_H1 - a najmä T_H17 -subpopulácie lymfocytov a nedostatočná imunosupresívna aktivita regulačných T-lymfocytov. Je prirodzené, že v liečbe SM sa snažíme ich funkciu obnoviť. Dokážu to už súčasné biologiká prvej línie, t. j. IFN- β a glatiramér acetát. Biologiká druhej a tretej línie pôsobia však už cielenejšie. **Natalizumab** je monoklonová protilátka proti alfa-4 reťazcu adhezívnej molekuly VLA4 T-lymfocytov, čím zabraňuje ich prechodu do parenchýmu mozgu. **Fingolimod** spôsobuje reverzibilnú sekvestráciu lymfocytov v lymfatických uzlinách za 3 – 5 hodín po aplikácii, čo im tiež znemožní prechod do mozgu; sekvestrácia sa týka až 80 % lymfocytov. K biologickým liekom tretej generácie patrí monoklonová protilátka **alemtuzumab**. Jej terčovou štruktúrou je molekula CD52 a 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 prekurzorové bunky, aj pomocné ($CD4^+$) aj cytotoxické ($CD8^+$) lymfocyty sa vracajú k východiskovým hodnotám až za 61, resp. 30 mesiacov.

Nedávno sa do klinickej praxe dostali monoklonové protilátky, ktoré rozoznávajú molekulu CD20 v membránach B-lymfocytov a pomocou komplementu, alebo aktiváciou K-buniek ich likvidujú. Patrí sem **rituximab**, **ofatumumab** a **ocrelizumab**. V štádiu klinických skúšok je aj **daclizumab**. Táto monoklonová protilátka je namierená proti CD25-molekule, ktorá sa exprimuje na aktivovaných T-lymfocytoch. **Dimetylfumarát**, podobne ako fingolimod, síce biologická látka nie je, ale tiež má výrazné imunomodulačné výsledky; navyše pôsobí aj antioxidačne, čo ju umožnilo od r. 2013 zaradiť medzi terapeutickú pre liečbu RR SM.

Liečba SM biologikami nie je bez vedľajších účinkov. Z najzávažnejších treba uviesť možný vývoj progresívnej multifokálnej leukoencefalopatie, IRIS- a „rebound“-syndrómu.

Kľúčové slová: alemtuzumab, daclizumab, fingolimod, IRIS, natalizumab, rituximab, PML, *sclerosis multiplex*

Sclerosis multiplex (SM) je chronická zápalová choroba podmienená autoimunitnými procesmi, pri ktorej dochádza k deštrukcii myelínových obalov v CNS, periférny nervový systém ostáva neporušený; navyše dochádza k astroglióze a poruche axónov. V dôsledku autoimunitného charakteru choroby sa jej liečba v ostanej dobe koncentruje na zasiahnutie jednotlivých imunopatologických procesov, t. j. používajú sa imunoterapeutické postupy. Ako prvé biologikum, ktoré sa pri liečbe SM začalo podávať bol IFN- β , neskôr do hry vstúpil glatiramér-acetát. Tieto preparáty sa stále používajú a patria k tzv. prvólínovej liečbe. Medzičasom, ako sa zlepšili poznatky o patogenéze SM, pribudli nové prípravky, ktoré špecifickejšie zasahujú do imunopatologických procesov s cieľom ich prerušiť alebo aspoň stlmiť. Schematicky ich zaraďujeme k biologickej liečbe druhej a tretej línie. Cieľom tohto prehľadného článku je podať stručný prehľad o mechanizme ich účinku.

K biologickej liečbe druhej línie pacientov so SM patrí natalizumab a fingolimod. **Natalizumab** sú monoklonové protilátky (mAb) proti α 4-reťazcu adhezívnej molekuly VLA4 (α 4 β 1-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; makroskopicky to vnímame ako lymfocytózu. Natalizumab na regulačné T-lymfocyty nemá vplyv, neovplyvňuje ani ich počty ani funkciu. Blokáda vstupu T-lymfocytov do CNS je vysoko efektívna. Prejavuje sa to viac ako 65 % redukciami relapsov počas dvoch rokov mesačne podávaných infúzií a viac ako 90 % redukciami zápalových lézií zisťovaných magnetickou rezonanciou (MRI) (1). U jedincov, ktorým sa choroba vrátila (relaps), alebo mali zhoršené prejavy MRI, sa pozorovala menšia lymfocytóza oproti tým, u ktorých sa relaps nevyskytol (2).

Jednou z komplikácií liečby SM natalizumabom je indukcia **progressívnej multifokálnej leukoencefalopatie** (PML) vyvolanej JC vírusom (Johnov Cunninghamov vírus, JCV) (3, 4). Patrí medzi polyomavírusy (dsDNA vírus). Spôsobuje lytickú infekciu v oligodendrocytoch, astrocytoch a aj nervových buniek. Odhaduje sa, že až polovica populácie je nosičom JCV, často v obličkách a vylučuje ho močom. Jeho aktivácia u pacientov liečených natalizumabom (a aj iných, kde je potlačená či nefunkčná imunita, typicky u AIDS-pacientov, pacientov trpiacich malígnym procesom, sarkoidózou, transplantáciách a pod.) ide pravdepodobne na vrub potlačenej aktivity T_H1-lymfocytov. 70 – 80 % pacientov infekciu prežíva, ale u niektorých z nich s trvalými následkami. Výsledkom infekcie pacientov infikovaných JCV, čo dokážeme stanovením špecifických protilátok, resp. DNA vírusu v CSF, je prerušenie liečby, ktoré však u niektorých pacientov vyvolá **IRIS-syndróm** (*immune reconstitution inflammatory syndrom*). Ten sa prejavuje masívnou infiltráciou lymfocytov mozgu a intenzívnym zápalom. Môže sa prejaviť o niekoľko dní až týždňov s mortalitou 20 až 30 %. Spôsobuje ho prehnaná imunitná odpoveď na vírusové antigény. Nadmerný zápal ničí nielen infikované, ale aj neinfikované nervové bunky a gliu. Prerušenie liečby natalizumabom z iných príčin indukuje

u niektorých pacientov nové vzplanutie choroby, ktoré je však vážnejšie ako keby išlo o „bežný“ relaps, bez predchádzajúcej liečby (tzv. „rebound“ fenomén). Zrejme ho zapríčiňuje nadmerný presun autoreaktívnych T-lymfocytov do mozgu, pretože im v tom zrazu nikto nebráni; navyše ich počet pravdepodobne počas doby liečby vzrástol, lebo natalizumab nebráni aktivácii nových T-lymfocytov. Ako orientačný bod, biologický marker, sa ukazuje úroveň dosiahnutej lymfocytózy. Pravdepodobnosť vývoja uvedených komplikácií je väčšia, ak lymfocytóza počas liečby natalizumabom je menšia ako 200 % predliečebných počtov. Vývoj IRIS podmieňuje aj SNP (*single nucleotide polymorphisms*) ATK-génu – varianty rs2498804 TT a GT ATK-génu sa spájajú s nižšou indukciou apoptózy, o. i. aj autoreaktívnych T-lymfocytov (2, 5). IRIS, resp. „rebound“-fenomén sa môže prejaviť za niekoľko dní až týždňov po prerušení liečby s mortalitou 20 až 30 %. Jedinou účinnou liečbou je podávanie glukokortikoidov vo vysokých dávkach (3).

Ďalší liek v druholínovej liečbe SM predstavuje **fingolimid** . Je to derivát myricocínu, ktorý sa izoluje z čínskej huby *Iscaria sinclarii*. Fingolimid je štruktúrnym analógom sfingozínu, ktorý sa fosforyluje sfingozínovou kinázou a následne pôsobí ako veľmi silný antagonist receptorov pre sfingozín 1-fosfát (S1PR1 až S1PR5, na S1PR2 sa neviaže. T-lymfocyty využívajú najmä S1PR1 a B-lymfocyty zase S1PR3) – väzbou na receptor (S1PR1) na lymfocytoch spôsobí ich internalizáciu a následnú degradáciu (6, 7). Zníženie, resp. vymiznutie S1P-receptorov z membrán T- a B-lymfocytov zabráni ich vycestovaniu (viac T- ako B-lymfocytov) zo sleziny, lymfatických uzlín a Peyerových plakov. Reverzibilná sekvestrácia sa týka až 80 % lymfocytov za 3 – 5 hodín po aplikácii (8). Pôsobenie fingolimidu na T-lymfocyty je selektívne, inhibuje vycestovanie naivných a centrálnych pamäťových (T_{CM}), ale nie efektorových pamäťových buniek (T_{EM}), čo má veľký význam pre imunitný dohľad a ochranu pred infekciou.

Pôsobenie fingolimidu na regulačné T-lymfocyty nie je ešte úplne objasnené. Existujú údaje, ktoré poukazujú, že podporuje ich proliferáciu a imunosupresívnu aktivitu, i keď mechanizmus, akým to dosahujú, autori neuvádzajú (7). Tejto vlastnosti fingolimidu 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, vznikajúcemu po prerušení liečby natalizumabom (9).

Najčastejšími vedľajšími príznakmi liečby fingolimodom sú bolesti hlavy, bradykardia a átrio-ventrikulárny blok. Niektorí uvádzajú aj vývoj edému makuly a nádorov kože (10). V kontraste s tým, že fingolimid neovplyvňuje efektorové pamäťové T-lymfocyty (T_{EM}), sú údaje o fatálnych infekciách, encefalitídach, vyvolaných vírusmi *herpes zoster* a *herpes simplex*. Zaznamenal sa aj vývoj B-lymfocytového lymfómu, ktorý sa spája s infekciou vírusom Epstein a Barrovej; našťastie sú tieto komplikácie zriedkavé (11). Pre vedľajšie účinky fingolimidu sa hľadali jemu podobné lieky a vskutku dnes ich máme až tri: **ponesimod** (blokuje S1PR1), **siponimod** a **ozanimod** (oba blokujú aj S1PR1 aj S1PR5); momentálne sú v štádiu klinických skúšok, výsledky sa očakávajú v rokoch 2017 a 2018 (12). Veľkou výhodou fingolimidu je, že sa podáva perorálne.

Nedávno sa do klinickej praxe dostali monoklonové protilátky, ktoré rozpoznávajú CD20 na povrchu B-lymfocytov a pomocou komplementu, alebo aktiváciou K-buniek ich likvidujú. Vychádza sa tu z poznatkov o inej biologickej funkcii B-lymfocytov ako len buniek, ktoré zodpovedajú za syntézu protilátok. Zistilo sa, že hrajú významnú úlohu aj pri prezentácii antigénov. B-lymfocyty totiž majú vo svojich membránach HLA-molekuly druhej triedy a pohltené antigény, ktoré predtým rozpoznali a viazali svojím antigénovým receptorom, dokážu spracovať, nadviazať na HLA-molekuly a prezentovať pomocným T-lymfocytom. Monoklonové protilátky anti-CD20 znižujú počet B-lymfocytov, čím sa znižuje možnosť ich interakcie autoreaktívnymi T-lymfocytmi a dochádza k útlmu imunitných procesov. Súčasne dochádza k zmene cytokínového mikroprostredia, ktoré podmienuje vznik a expanziu Treg-lymfocytov, čím sa autoimunitný proces ďalej tlmí (13). Prečo sa vybral práve CD20-antigén? Odpoveď je pomerne jednoduchá – nachádza sa v membránach prakticky všetkých vývojových štádiách B-lymfocytov, od pre-B-lymfocytov až po pamäťové B-lymfocyty (14). Pre liečbu pacientov máme k dispozícii tri druhy anti-CD20 mAb: rituximab, ocrelizumab a ofatumumab. **Rituximab** a **ofatumumab** 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 (15). Rituximab sa osvedčil aj pri zvládaní *neuromyelitis optica* (14).

K biologickým liekom tretej generácie sa dostala monoklonová protilátka **alemtuzumab**. Je terčovou štruktúrou je CD52. Je to glykozylovaná molekula, ukotvená v membráne buniek (lymfocytov, monocytov a granulocytov) pomocou GPI-kotvy (16). Má kostimulačné účinky; jej prirodzeným ligandom je Siglec-10. 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 prekurzorové 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 (17). Prečo po aplikácii anti-CD52 mAb pretrváva lymfopénia? Jednak je to nedostatočný prísun nových lymfocytov, lebo tymocyty sa ničia tiež a jednak je to je homeostatická proliferácia; novovznikajúce T_H-lymfocyty sú totiž 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 (17, 18). Táto skutočnosť (t. j. zvýšená aktivita B-lymfocytov, nedostatočná tlmivá funkcia regulačných T-lymfocytov a homeostatická proliferácia T-lymfocytov) môže vysvetliť aj sklon takto liečených pacientov vyvinúť autoimunitné komplikácie (fatálna autoimunitná trombocytopenia, Gravesova choroba a oportunistické infekcie) (19). Práve pre nepriaznivé účinky FDA (**F**ood and **D**rug **A**dministration v USA) spočiatku alemtuzumab pre klinické používanie neschválila, hoci predtým EMA (**E**uropean **M**edical **A**gency) ho

schválila. Neskôr však FDA prehodnotila svoj postoj a dnes jeho aplikácia je povolená v 40 krajinách, vrátane Slovenska (20).

Od r. 2013 FDA povolila pre liečbu RR SM aj liečbu **dimetyl-fumarátom (DMF)**. Tento ester kyseliny fumarovej podporuje diferenciáciu naivných T_H -lymfocytov do T_H 2-línie, ktorá svojou aktivitou vyvažuje a blokuje pôsobenie T_H 1-subpopulácie; navyše podporuje apoptózu autoreaktívnych T-lymfocytov (21). Za najdôležitejšiu vlastnosť DMF sa však považujú jeho antioxidantné vlastnosti, ktoré sprostredkúva prostredníctvom indukcie transkripčného faktora NRF2. Tento sa z cytoplazmy presúva do jadra buniek a stimuluje transkripciu viacerých génov s detoxikačnými a cytoprotektívnymi účinkami(22) (Suneetha a Raja Rajeswari 2016). Z vážnejších nepriaznivých účinkov sa treba zmieniť, že u niektorých pacientov (asi 3 %) spôsobuje lymfopéniu, ktorá je rizikovým faktorom vývoj PML.

V štádiu klinických skúšok je **daclizumab**. Ide o monoklonové protilátky proti alfa-reťazcu receptora pre IL-2 (CD25). Mechanizmus ich účinku je zaujímavý – značne indukujú vznik NK-buniek (až 400 % vzostup), ktoré prechádzajú do intratekálneho priestoru a tu zabíjajú autoreaktívne T-lymfocyty (23). Liečbu daclizumabom však sprevádzajú pomerne vážne vedľajšie účinky. Je to v dôsledku toho, že blokovaním alfa-receptora pre IL-2 sa blokuje aj aktivita regulačných T-lymfocytov, ich prirodzené imunosupresívne pôsobenie. V tejto súvislosti prichádza do úvahy liečba SM nízkymi dávkami IL-2, ktoré aktivitu regulačných T-lymfocytov zvyšujú.

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 (*graft versus host disease*) u ľudí (24) a pri liečbe experimentálnej autoimunitnej encefalitídy indukovanej podaním MOG (*myelínový oligodendrocytový glykoproteín*) (25). Prehľad uvedených a aj ďalších prípravkov, ktoré sú v štádiu klinických skúšok, sa uvádzajú v tab. 1.

Recenzent

1. doc. MUDr. Eleonóra Klímová, CSc., Klinika neurológie FZO PU v Prešove a FNSP J. A. Reimana Prešov, SM centrum Prešov
2. prof. RNDr. Eva Kontseková, DrSc., Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava

LITERATÚRA

Literatúra mimo databázy PubMed

- Buc M. Sclerosis multiplex – úloha regulačných T-lymfocytov v patogenéze a biologickej liečbe choroby. Čes Slov Neurol N 2013; 76/109(3): 293 – 299.
- Buc M. Autoimunita a autoimunitné choroby. 2. Bratislava. VEDA 2016, 1-668.
- Cortese I., McFarland HF. Multiple sclerosis. 963 – 975. In: Rich RR (Ed). *Clinical Immunology. Principles and Practice*. Philadelphia: Mosby, Elsevier, 2008.

Ebringer A. *Multiple sclerosis, Mad cow disease and Acinetobacter*. Heilderberg, New York, London: Springer, 2015.

Havrdová E. *Neuroimmunologie*. Praha: Maxdorf, 2001: 1 – 451.

Havrdová E. et al. *Roztroušená skleróza*. Praha: Mladá fronta, 2013: 1 – 488.

Suzumura A. Future directions in the study of fingolimod in multiple sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol* 2014; 5: 55 – 60.

Suneetha A, Raja Rajeswari K. Role of dimethyl fumarate in oxidative stress of multiple sclerosis: A review. *J Chromatography B* 2016; 1019: 15–20.

Literatúra z databázy PubMed

1. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006; 354(9):899-910.
2. Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, Ognibene A, Goto K, Cocco L, et al. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1823(12):2168-78.
3. McGuigan C, Craner M, Guadagno J, Kapoor R, Mazibrada G, Molyneux P, et al. Stratification and monitoring of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy risk: recommendations from an expert group. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016; 87(2):117-25.
4. Mancini N, Clementi M, Burioni R. Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med*. 2012; 367(9):871-2.
5. Rossi S, Motta C, Studer V, Monteleone F, De Chiara V, Buttari F, 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.
6. 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.
7. Sawicka E, Dubois G, Jarai G, Edwards M, Thomas M, Nicholls A, 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.
8. Rigau V, Mania A, Befort P, Carlander B, Jonquet O, Lassmann H, et al. Lethal multiple sclerosis relapse after natalizumab withdrawal. *Neurology*. 2012; 79(22):2214-6.
9. Marousi S, Travararou M, Karageorgiou CE, Gheuens S, Koralnik IJ. Simultaneous PML-IRIS after discontinuation of natalizumab in a patient with MS. *Neurology*. 2012; 79(21):2160.
10. Uccelli A, Ginocchio F, Mancardi GL, Bassetti M. Primary varicella zoster infection associated with fingolimod treatment. *Neurology*. 2011; 76(11):1023-4.

11. Gross CM, Baumgartner A, Rauer S, Stich O. Multiple sclerosis rebound following herpes zoster infection and suspension of fingolimod. *Neurology*. 2012; 79(19):2006-7.
12. Radick L, Mehr SR. The Latest Innovations in the Drug Pipeline for Multiple Sclerosis. *Am Health Drug Benefits*. 2015; 8(8):448-53.
13. Barun B, Bar-Or A. Treatment of multiple sclerosis with anti-CD20 antibodies. *Clin Immunol*. 2012; 142(1):31-7.
14. Yamamura T, Miyake S. B-cell-directed therapy: which B cells should be targeted and how? *Immunotherapy*. 2012; 4(5):455-7.
15. Saidha S, Eckstein C, Calabresi PA. New and emerging disease modifying therapies for multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1247:117-37.
16. Bandala-Sanchez E, Zhang Y, Reinwald S, Dromey JA, Lee BH, Qian J, et al. T cell regulation mediated by interaction of soluble CD52 with the inhibitory receptor Siglec-10. *Nat Immunol*. 2013; 14(7):741-8.
17. Zhang X, Tao Y, Chopra M, Ahn M, Marcus KL, Choudhary N, 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.
18. Thompson SA, Jones JL, Cox AL, Compston DA, Coles AJ. B-cell reconstitution and BAFF after alemtuzumab (Campath-1H) treatment of multiple sclerosis. *J Clin Immunol*. 2010; 30(1):99-105.
19. Coles AJ, Wing M, Smith S, Coraddu F, Greer S, Taylor C, et al. Pulsed monoclonal antibody treatment and autoimmune thyroid disease in multiple sclerosis. *Lancet*. 1999;354(9191):1691-5.
20. Mullard A. FDA's rejection of alemtuzumab divides neurologists. *Lancet*. 2014; 383(9920):859.
21. Totaro R, Di Carmine C, Marini C, Carolei A. Multiple sclerosis--new treatment modalities. *Indian J Med Res*. 2015; 142(6):647-54.
22. Linker RA, Lee DH, Ryan S, van Dam AM, Conrad R, Bista P, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain*. 2011;134(Pt 3):678-92.
23. Bielekova B. Daclizumab therapy for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2013; 10(1):55-67.
24. Brusko T, Bluestone J. Clinical application of regulatory T cells for treatment of type 1 diabetes and transplantation. *Eur J Immunol*. 2008; 38(4):931-4.
25. 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.

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 neuroprotektívny a remyelizačný účinok.	54 – 60 % ARR-redukcia, znížené riziko progresie k invalidite. Menej nových a zväčšujúcich sa T2-lézií a spomalenie úbytku objemu mozgu (štúdia FRREDOM).	Infekcie herpetickými vírusmi, bradykardia, atrio-ventrikulárny blok, hypertenzia, zvýšenie hladiny pečeňových enzýmov, edém makuly, infekcie respiračného traktu, lymfopénia, možné malignity.
Cladribín	Analog adenozínu. Inkorporuje sa do DNA deliacich sa buniek, prerušujúc 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).	Lymfopénia, neutropénia, trombocytopénia, pancytopénia, reaktivácia <i>herpers 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).	Hnačky, nauzea, zvýšené hladiny pečeňových enzýmov, alopecía, kožné vyrážky, infekcie, neutropénia, parestézie, hypertenzia.
Tecfidera	Dimetyt-fumarát. Antioxidačný a imunomodulačný účinok. Môže pôsobiť neuroprotektívne.	53 % ARR-redukcia, 85 % redukcia nových, resp. zväčšujúcich sa T2-lézií, 90 % redukcia Gd ⁺ -lézií, 38 % redukcia progresie k invalidite (štúdia DEFINE).	Začervenanie, bolesti hlavy, brucha, nauzea, zvracanie, hnačky, zvýšenie hladiny pečeňových enzýmov (v závislosti od dávky).

Liek	Mechanizmus účinku	Účinnosť	Nepriaznivé účinky
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 neuroprotéktívnych látok.	21 % ARR-redukcia, 33 % redukcia progresie k invalidite, 27 % zníženie progresie k atrofii mozgu (štúdia BRAVO, 3. fáza)	Zvýšenie hladiny pečňových 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).	Autoimunitné choroby štítnej žľazy, autoimunitná trombocytopenia, neutropénia, hemolytická anémia, Goodpasturov syndróm, poinfúzne problémy, infekcie respiračného traktu, rekurentný orálny herpes, možno meningitída a malignity.
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	Poinfúzne reakcie, infekcie urogenitálneho traktu, sinusitída, PML.
Ocrelizumab	Humanizovaná mAb anti-CD20. Účinkuje podobne ako rituximab.	73 – 80 % ARR-redukcia, 89 – 96 % zníženie Gd ⁺ -lézií	Poinfúzne 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)

LIEČBA INTRAVENÓZNYMI IMUNOGLOBULÍNMI U ŽIEN SO SCLEROSIS MULTIPLEX POČAS GRAVIDITY A LAKTÁCIE

Hochmuth L¹, Donáth V², Smiešková A³, Klimová E⁴.

¹II. Interná klinika, KIA, FNŠP FDR v Banskej Bystrici,

²II. Neurologická klinika, FNŠP FDR v Banskej Bystrici,

³ADLA, Prešov, ⁴II. Neurologická klinika, Prešov

Úvod

Sclerosis multiplex (SM) je jedným z najčastejších chronických ochorení mladých ľudí. Celosvetovo postihuje najmenej 2,5 milióna mladých dospelých, pričom ženské pohlavie voči mužskému prevažuje približne v pomere 3:1. Prevalencia postihnutia mladých žien má špecifický význam s ohľadom na fertilitu a potenciálne riziká závažného ochorenia a jeho liečby.

Tehotenstvo a sclerosis multiplex

Názory na vplyv tehotenstva na priebeh sclerosis multiplex prešli svojim vývojom. Do konca roku 1990 sa ženám so SM odporúčalo nemať deti vzhľadom k skreslenému presvedčeniu, že tehotenstvo zhorší priebeh choroby (1). Až prvá veľká prospektívna štúdia v roku 1998 (Pregnancy in multiple sclerosis - PRIMS) radikálne zmenila odporúčania pre ženy so SM. V štúdiu PRIMS sa ukázalo, že ročná miera relapsov (ARR) sa významne znížila počas tehotenstva v porovnaní s východiskovým stavom rok pred tehotenstvom. Riziko postpartálnych relapsov sa zvyšuje počas prvých troch mesiacov po pôrode. Po pôrode má relapsy asi 30% pacientok s relaps remituujúcou formou SM (2).

Patogenéza sclerosis multiplex

Sclerosis multiplex patrí medzi závažné ochorenia s postihnutím centrálného nervového systému autoimunitnými mechanizmami. Táto chronická zápalová neurologická choroba je charakterizovaná infiltráciou leukocytov do centrálného nervového systému (CNS), lokálnou deštrukciou myelínových obalov nervových vlákien, postupnou stratou oligodendrocytov a axónov s následným klinickým obrazom. Dochádza k narušeniu princípu tolerancie vlastného, autoreaktívne T-lymfocyty prenikajú cez narušenú hemato-encefalickú bariéru, ktorá má zvýšenú permeabilitu a poškodzujú tkanivá CNS. Uplatňujú sa ďalšie mechanizmy, postupne sa poznáva úloha B-lymfocytov, CD8-lymfocytov, úloha prirodzenej imunity a humorálnych zložiek imunity. Kritickú úlohu v progresii sclerosis multiplex hrá rovnováha medzi poškodením CNS a reparačnými mechanizmami (3,4).

Moderné lieky modifikujú priebeh ochorenia (DMT – Disease-modifying Treatment) a výrazne zlepšujú jej priebeh a prognózu. Používajú sa viaceré skupiny liekov,

ktoré sa rozdeľujú na lieky prvej voľby (interferón beta 1a, interferón beta 1b, glatirameracetát) a lieky druhej voľby (natalizumab, fingolimod) a niektoré ďalšie. Liečba má však aj svoje riziká a potenciálne nežiaduce účinky.

Medzi mimoriadne citlivé situácie u pacientok so sclerosis multiplex patrí gravidita a následné popôrodné obdobie. V gravidite, ktorá predstavuje Th2 stav (ide o komplexnejšie mechanizmy imunitných mechanizmov medzi Th1 / Th2 / Treg / T17), dochádza väčšinou k stabilizácii choroby. Po pôrode, keď dochádza k preladeniu smerom k Th1, obzvlášť v období prvých šiestich mesiacov, dochádza k zvýšenému počtu relapsov SM (5).

Prediktory aktivity SM v postpartálnom období

Najsilnejšími prediktormi aktivity choroby po pôrode je aktivita SM v predtehotenskom období a aktivita v priebehu tehotenstva (6,7,8). V štúdií PRIMS sa ukázalo, že vyššie skóre aktivity (EDSS – expanded disability status scale) na začiatku tehotenstva malo prediktívny význam pre recidívy po pôrode (2). Tiež sa potvrdilo, že zvýšené koncentrácie prozápalových cytokínov v priebehu tehotenstva sa spájali s vyšším počtom relapsov po pôrode (9). Výsledky v nedávnej štúdií 893 tehotných pacientok so SM ukázali, že aplikácia ochorenia modifikujúcej liečby (DMT) pred počatím sa spájala s nižšou frekvenciou relapsov po pôrode (8). Vysvetlenie môže spočívať buď v možnosti priaznivého účinku DMT na aktivitu ochorenia, alebo išlo o skupinu žien s miernejším priebehom SM, ktoré boli schopné a ochotné prerušiť liečbu a otehotnieť (10).

Liečba SM v gravidite a počas dojčenia

Vzhľadom k riziku nežiaducich účinkov a nedostatku údajov o bezpečnosti liekov používaných v liečbe SM (DMT) sa v gravidite a počas dojčenia liečba prerušuje.

Liekom, ktorým je potenciálne možné výrazne znížiť riziko relapsov a aták SM, sú intravenózne imunoglobulíny (IVIG) (11). Táto liečba je považovaná za bezpečnú pre dieťa aj matku a niektorými autormi je považovaná za liečbu voľby, nie je však zahrnutá do štandardných odporúčaní pre liečbu SM. Názory na túto liečbu nie sú jednoznačné, dostupné dáta sú limitované malým počtom súborov pacientok (12,13).

Podstatou účinku IVIG pri SM je protizápalové pôsobenie, sprostredkované viacerými mechanizmami:

- modulácia pôsobenia T-lymfocytov v prospech remyelinizácie,
- inhibícia diferenciacie naivných CD4 lymfocytov smerom k Th1 a Th17,
- podpora aktivity prirodzených regulačných lymfocytov,
- zníženie produkcie prozápalových cytokínov,
- modulácia expresie viacerých génov (gény pre chemokíny a ich receptory, CXCL3, CXCL5, CCL1), ktoré obmedzujú vcestovanie leukocytov do CNS (14).

Ukazuje sa, že liečba IVIG-mi neovplyvňuje rozsah lézií, môže však spomaliť progresiu mozgovej atrofie a rozvoj dizability (15).

Účinnok IVIG v liečbe relapsov SM sa dokumentoval vo viacerých prácach (16). Jednotlivé štúdie sa nedajú medzi sebou porovnávať, pretože použili odlišný a neporovnateľný dizajn. Väčšina z nich potvrdila priaznivý vplyv IVIG na redukcii postpartálnych relapsov. Podľa dostupných zdrojov len jediná práca brazílskych autorov nepotvrdila protektívny účinok IVIG na frekvenciu postpartálnych relapsov (17). Išlo o retrospektívne multicentrické sledovanie žien so SM liečených pomocou IVIG. V tejto publikovanej práci sa však nenachádza popis režimu dávkovanie lieku.

Názory na režim dávkovania a načasovanie aplikácie IVIG v pôrodnom, či popôrodnom období nie sú jednotné.

Odporúčanie EFNS (European Federation of Neurological Societies, v súčasnosti EAN – European Academy of Neurology) inštitucionalizuje použitie IVIG v redukcii postpartálnych relapsov, napriek tomu, že sa táto indikácia v SPC (súhrn charakteristických vlastností liekov) priamo neuvádza. Odporúčania EFNS pre použitie IVIG pri neurologických chorobách pripúšťajú jeho význam v redukcii postpartálnych relapsov SM (18).

Naše skúsenosti

V práci prezentujeme kazuistiky siedmich pacientok so SM s úspešnou aplikáciou IVIG s cieľom redukcii postpartálnych relapsov. Každéj pacientke sa aplikoval imunoglobulín do 24 hodín po pôrode a potom po mesiaci ambulantne v imunologicko-alergologickej ambulancii za kontroly imunologických laboratórnych parametrov. Ani jedna pacientka nezaznamenala klinický relaps v kritickom postpartálnom období. U jednej pacientky sme dokumentovali progresiu pri vyšetrení MRI mozgu, bez sprievodných klinických príznakov. V žiadnom prípade sme nezaznamenali nežiaduce účinky liečby IVIG. Nedostatkom nášho súboru je, že sme v uvedených prípadoch nepoužili jednotný postup. Pre indikáciu redukcii postpartálnych relapsov v súčasnosti neexistujú jednotné a všeobecne akceptované smernice. V každom prípade naša skúsenosť potvrdzuje v literatúre publikované skúsenosti úspešného využitia IVIG v prevencii postpartálnych relapsov pacientok so SM. Aj keď ide o malý súbor, domnievame sa, že naše skúsenosti podporujú používanie IVIG počas laktácie a gravidity ako bezpečnú možnosť udržania stabilizovaného stavu bez rizika nežiaducich účinkov liekov zo skupiny DMT.

Záver

U žien so SM dvadsaťštyri hodín po pôrode je vhodné zvážiť podanie IVIG a v spolupráci s imunológom v priebehu nasledujúcich piatich mesiacov raz mesačne ambulantne opakovať túto liečbu. Zatiaľ nie sú jednotné odporúčania režimu a frekvencie podávania. V práci prinášame prehľad názorov na túto problematiku a formou kazuistik naše skúsenosti.

Recenzent

1. MUDr. Radovan Košturiak, Ambulancia klinickej imunológie a alergológie, Poliklinika Klokočina, Nitra
2. MUDr. Peter Kosoň, PhD., Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava

LITERATÚRA

1. Vukusic S, Marignier R. Multiple sclerosis and pregnancy in the ‘treatment era’. *Nat Rev Neurol* 2015; 11(5):280-9.
2. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. N Engl J Med* 1998; 339:285-9.
3. Frohman EM, Monson NL et al. Characterizing the Mechanisms of Progression in Multiple Sclerosis. Evidence and New Hypotheses for Future Directions. *Arch Neurol* 2005; 62(9):1345-56.
4. Kerschensteiner M, Bareyre FM et al. Remodeling of Axonal Connections Contributes to Recovery in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *J Exp Med* 2004; 200:1027-38.
5. Portaccio E, Ghezzi A et al. Breastfeeding is not related to postpartum relapses in multiple sclerosis. *Neurology* 2011; 77(2):145-150.
6. McCombe PA, Greer JM. Female reproductive issues in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013; 19:392-402.
7. Vukusic S, Hutchinson M, Hours M, Moreau T, Cortinovis-Tourniaire P, Adeleine P, et al. Pregnancy and multiple sclerosis (the PRIMIS study): clinical predictors of post-partum relapse. *Brain* 2004; 127:1353-60.
8. Hughes SE, Spelman T, Gray OM, Boz C, Trojano M, Lugaresi A, et al. Predictors and dynamics of postpartum relapses in women with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2014; 20(6):739-46.
10. Langer-Gould A, Gupta R, Huang S, et al. Interferon- γ -producing T cells, pregnancy, and postpartum relapse of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2010; 67:51-7.
11. Jalkanen A. Multiple sclerosis and pregnancy: clinical and immunological aspects. *Annales Universitatis Turkuensis Sarja - ser. D osa - tom. 1146. Medica – Odontologica. Turku* 2014. p.70.
12. Achiron A, Kishner I, Dolev M, et al. Effect of intravenous immunoglobulin treatment on pregnancy and postpartum-related relapses in multiple sclerosis. *J Neurol* 2004; 251(9):1133–37.
13. Sorensen PS, Fazekas F, Lee M. Intravenous immunoglobulin G for the treatment of relapsing–remitting multiple sclerosis: a meta-analysis. *European Journal of Neurology* 2002; 9:557-563.
14. Ruzhansky K, Brannagan TH. Intravenous immunoglobulin for treatment of neuromuscular disease. *Neurology Clin Pract* 2013; 3:440-445.

15. Havrdová E. a kol. Roztroušená skleróza. Mladá fronta Praha 2013, s. 488.
16. Zare-Shahabadi A et al. Potential role of immunoglobulin replacement therapy on MRI measures in multiple sclerosis: a systematic review. *Expert Rev Clin Immunol* 2015; 11(12):1291-95.
17. Elovaara I, Kuusisto H, Wu X, Rinta S, Dastidar P, Reipert B. Intravenous Immunoglobulins Are a Therapeutic Option in the Treatment of Multiple Sclerosis Relapse. *Clin Neuropharm* 2011; 34:84- 89.
18. Fragoso YD, Adoni T, Alves-Leon SV et al. Postpartum Treatment With Immunoglobulin Does Not Prevent Relapses of Multiple Sclerosis in the Mother. *Health Care for Women International* 2015; 36(10):1072-1080.
19. Elovaara I, Apostolski S, van Doorn P, Gilhus NE, Hietaharju A, Honkaniemi J et al. EFNS guidelines for the use of intravenous immunoglobulin in treatment of neurological diseases. EFNS task force on the use of intravenous immunoglobulin in treatment of neurological diseases. *Eur J Neurol* 2008; 15(9):893–908.,

HMBG1 AKO NOVÝ MARKER AKTIVITY *SCLEROSIS MULTIPLEX*

Bucová M¹, Gajdošechová B¹, Ďurmanová V¹, Suchánková M¹, Cudráková D²,
Turčáni P², Lisá I³, Klimová E⁴, Gmitterová K³, Buc M¹.

¹Imunologický ústav LFUK, Bratislava,

²I. Neurologická klinika LF UK a UN Bratislava,

³II. Neurologická klinika LF UK a UN Bratislava,

⁴Centrum pre liečbu a diagnostiku sclerosis multiplex, FNsP J.A Raimana, Prešov

Abstrakt

Sclerosis multiplex je chronická zápalová a neurodegeneratívna choroba. Cieľom práce bolo zistiť, či plazmové hladiny HMGB1 (High mobility group box 1 protein) ako nového zápalového markeru by mohli odrážať aktivitu choroby a byť tak vhodným biomarkerom na jej monitorovanie. HMGB1 sa za fyziologických okolností nachádza v jadre buniek, má množstvo intracelulárnych funkcií (stabilizácia chormatínu, ohyb DNA, oprava DNA,...). Za patologických okolností sa dostáva extracelulárne, či už pasívnym vylúčením počas nekrózy buniek alebo aktívnou tvorbou aktivovanými makrofágmi a v tomto prípade funguje ako alarmín, molekula DAMPs (Damage associated molecular patterns) a má prozápalový charakter. Keďže extracelulárne pôsobí podobne ako cytokíny, avšak uvoľňuje sa o niečo neskôr, označuje sa ako neskorý prozápalový cytokín. Zistili sme, že pacienti so SM majú cca 4,5 – násobne vyššie plazmové hladiny HMGB1 ako zdravé kontroly a koncentrácie u žien sú o niečo vyššie ako u mužov. Hladiny HMGB1 korelovali s aktivitou choroby, a to s počtom postihnutých oblastí, prítomnosťou aspoň jedného aktívneho ložiska a počtom aktívnych ložísk v mozgu a EDSS skóre. Výsledky dokazujú prítomnosť chronického zápalu nízkeho stupňa aj u stabilizovaných pacientov so sclerosis multiplex a poukazujú na význam merania plazmových hladín HMGB1 u pacientov so sclerosis multiplex.

Úvod

Sclerosis multiplex (SM) je chronická zápalová neurodegeneratívna choroba s multifaktorovou etiológiou. V imunopatogenéze choroby má centrálnie postavenie zlyhanie tolerancie a narušená funkcia regulačných T- buniek, čo má za následok rozvoj autoimunity s účasťou Th1 a Th17 buniek, dokázaná je účasť autoreaktívnych T-cytotoxických lymfocytov, makrofágov, dendritových buniek a v ostatnom čase sa poukazuje na účasť B - lymfocytov a autoprotlátok (1, 2). Dochádza aj k poruche rovnováhy medzi prozápalovou a protizápalovou aktivitou buniek imunitného systému v prospech rozvoja nadmerného zápalu, ktorý potom môže pretrvávať v podobe chronického zápalu nízkeho stupňa a viesť k narušeniu hemo-encefalickej bariéry (HEB), prechodu zápalových buniek do mozgu a rozvoju nekontrolovaného zápalu a demy-

elinizačného procesu. V imunopatogenéze SM tak súbežne prebiehajú dva vzájomne sa potencujúce imunopatologické procesy – autoimunita a chronický zápal nízkeho stupňa.

Z imunologického hľadiska sa u pacientov so SM preto ukazuje byť veľmi užitočné sledovanie aktivity zápalu. V našej práci sme na monitorovanie zápalu a aktivity SM použili ako biomarker molekulu HMGB1 (High mobility group box-1 proteín).

HMGB1 sa za fyziologických okolností vyskytuje v jadre buniek ako vnútrojadrový nehistónový proteín s množstvom intranukleárných funkcií (3). HMGB1 sa však môže vyskytovať aj extracelulárne. Aktívne sa tvorí v aktivovaných monocytoch, makrofágoch, v mikroglíách mozgu, a to pod vplyvom prozápalových stimulov infekčného aj neinfekčného pôvodu. Uvoľnený HMGB1 pôsobí ako prozápalový cytokín, indukuje tvorbu ďalších prozápalových cytokínov, čím sa potencuje zápalový proces. Okrem toho sa pasívne uvoľňuje z nekrotických buniek. Extracelulárny výskyt HMGB1 už nie je fyziologický a pre organizmus predstavuje signál ohrozenia, ktorý vyvoláva zápal (4, 5).

HMGB1 patrí medzi najmodernejšie zápalové markery a na rozdiel od včasných prozápalových cytokínov TNF- α , IL-1 β , IL-6, ktoré sa uvoľňujú 2-4-6 hodín po inzulte a majú krátky polčas rozpadu, sa HMGB1 uvoľňuje neskôr (za 16-24 hodín) a pretrváva dlhšiu dobu. Preto sa aj označuje aj ako neskorý prozápalový cytokín. Z hľadiska jeho dlhšieho pretrvávania v organizme je lepším markerom na monitorovanie zápalových chorôb.

Súbor pacientov a metodika

V našom súbore sme mali 165 pacientov s diagnózou SM, z toho 110 žien (66,7%) a 56 mužov, ktorí boli klinikmi zadelení do jednotlivých foriem SM. 137 pacientov malo relaps remitujúcu formu SM (RRF SM), 6 pacientov sekundárne progresívnu formu SM (PF SM) a dvaja pacienti mali izolovaný klinický syndróm (CIS). Pacienti pochádzali z centier pre liečbu SM pri I. Neurologickej klinike LFUK UNB, Staré mesto, Bratislava, II. Neurologickej klinike LFUK, Dérerova UNB, Kramáre, a Neurologickej kliniky FNsP J. A. Reimana v Prešove. Plazmovú hladinu HMGB1 sme vyšetřovali sendvičovou Elisou (Human HMGB1 ELISA) presne podľa návodu výrobcov. Projekt bol schválený etickou komisiou Lekárskej fakulty UK a všetci pacienti podpísali informovaný súhlas.

Kontrolný súbor tvorilo 51 zdravých dobrovoľníkov bez SM, akýchkoľvek prejavov autoimunity, alergie, zápalu, nádorov a iných chorôb. Priemerný vek, ako aj zastúpenie oboch pohlaví v kontrolnej skupine sa zhodovalo so skupinou pacientov s SM.

Štatistika

Na štatistické vyhodnotenie sme použili program Instat a v rámci neho viaceré testy (Mann-Whitneyho U-test, Kolmogorovov-Smirnovov, Kruskalov-Wallisov test a Spearmanov test.

Výsledky

1. Porovnanie plazmových hladín HMGB1 u pacientov so SM a zdravých kontrol, mužov a žien. Porovnanie plazmových hladín HMGB1 u jednotlivých foriem SM.

Pacienti so SM mali signifikantne vyššie plazmové hladiny HMGB1 ako kontrolný súbor zdravých osôb (Med. SM: 13,53 ng/ml; Med. K: 2,99 ng/ml; $P < 0,0001$). Ženy (66,67%) mali o niečo vyššie hladiny HMGB1 ako muži (33,33%), ale rozdiel nebol signifikantný. Napriek naznačenému rozdielu u jednotlivých foriem SM (RRF, PF a CIS), tento rozdiel nebol výrazný.

2. Plazmové hladiny HMGB1 a počet postihnutých oblastí v mozgu (MRI nález) – korelácie a rozdiely v jednotlivých skupinách.

Plazmové hladiny HMGB1 signifikantne korelovali s počtom postihnutých oblastí (Tabuľka č. 1; $P < 0,0001$), so stúpajúcim počtom postihnutých oblastí sa zvyšovali plazmové koncentrácie HMGB1. Pri rozdelení súboru na pacientov s počtom postihnutých oblastí 1-3 a pacientov so 4-5 postihnutými oblasťami sme našli vysoko signifikantný rozdiel.

Tabuľka č. 1: Plazmové hladiny HMGB1 a počet postihnutých oblastí.

Počet postihnutých oblastí	N	Medián (HMGB1) ng/ml	IQR	Mann-Whitneyho test (2-chvostový)
(0) Kontrola	31	2,999	1,686 – 9,844	1 vs 5: $P < 0,05$
1 oblasť	4	4,205	2,330 – 11,080	2 vs 5: $P < 0,01$
2 oblasti	11	5,020	2,557 – 21,989	3 vs 5: $P < 0,05$
3 oblasti	9	6,784	4,627 – 17,255	4 vs 5: $P > 0,05$
4 oblasti	8	7,161	3,693 – 77,765	
5 oblastí	73	17,843	3,255 – 113,45	
Kruskal-Wallisov test		$P < 0,0001$		$P < 0,0001$
1-3 oblastí	24	5,209	2,330 – 21,989	
4-5 oblastí	89	17,373	3,255 – 113,45	

3. Plazmové hladiny HMGB1 u pacientov so SM a prítomnosť aspoň jedného aktívneho ložiska v mozgu. Korelácia plazmových hladín HMGB1 s EDSS skóre.

Pacienti, ktorí mali prítomné aspoň jedno aktívne ložisko v mozgu mali v porovnaní s pacientmi bez aktívnych ložísk signifikantne vyššie hladiny HMGB1 (Tabuľka č. 2; $P < 0,0235$). Koncentrácie HMGB1 v plazme pacientov so SM vysoko výrazne korelovali s EDSS skóre. Pri porovnaní hladín HMGB1 u pacientov s EDSS do 2,5 a nad 3 sme zistili, že pacienti s vyšším EDSS skóre mali vyššie hladiny HMGB1 (Tabuľka č.2).

Tabuľka č. 2: Plazmové hladiny HMGB1 a prítomnosť aktívnych ložísk. Plazmové hladiny HMGB1 a EDSS.

	N	Medián (HMGB1) (ng /ml)	IQR	Mann-Whitney 2- chvostový (P)
Aktívne ložisko prítomné	25	20,118	3,693 – 100,12	P<0,0235
Aktívne ložisko neprítomné	78	16,695	3,255 – 113,45	
EDSS do 2,5	51	11,648	2,557– 99,725	P=0,01151
EDSS ≥ 3,0 – 5,5	62	17,549	2,330 – 113,45	
Kruskal-Wallisov test		P< 0,0001		

Diskusia

HMGB1 má dôležitú úlohu v mozgu, podporuje migráciu a rast neurónov, reguluje neuroendokrinnú odpoveď, má úlohu v neuropatológii, podporuje amyloidogézu, súvisí s tvorbou senilných plakov u M. Alzheimer, u ktorých sa v mozgu našli zvýšené expresie HMGB1. Okrem toho má kľúčovú úlohu pri ischemickom poškodení mozgu, jeho zvýšené hladiny sa našli u pacientov po cerebrálnej ischemii, kde ďalej prispieva k potenciácii cerebrálnej ischemie. V patogenéze SM nie je úloha HMGB1 preštudovaná, naše výsledky sme tým pádom nemali ako porovnať s výsledkami iných autorov.

Výsledky našich vyšetrení ukázali, že pacienti so SM majú cca 4,5 – násobne vyššie plazmové hladiny HMGB1 ako zdravé kontroly. Zistili sme tiež, že ženy majú o niečo vyššie hladiny HMGB1 ako muži, avšak nie štatisticky signifikantné. Nezaznamenali sme ani signifikantný rozdiel v koncentrácii HMGB1 u jednotlivých foriem SM, čo bolo s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobené nerovnomerným zastúpením pacientov v jednotlivých skupinách. Zaujímavé bolo zistenie, že koncentrácie HMGB1 korelovali s aktivitou choroby – a to s počtom postihnutých oblastí. Pacienti so 4-5 postihnutými oblasťami v mozgu mali signifikantne vyššie hladiny HMGB1 ako skupina pacientov s jedným až tromi postihnutými oblasťami ($p < 0,0001$). Zistili sme tiež, že pacienti, ktorí mali v mozgu aspoň jedno aktívne ložisko, mali v porovnaní s pacientmi bez aktívneho ložiska v mozgu vyššie plazmové hladiny HMGB1 ($p < 0,0235$). Zaznamenali sme tiež koreláciu hladín HMGB1 v plazme pacientov s ich EDSS skóre ($p < 0,0001$). Pacienti s EDSS ≥ 3 mali vyššie hladiny HMGB1 ako pacienti s EDSS $\leq 2,5$ ($p=0,01151$).

Uvedené výsledky dokazujú prítomnosť chronického zápalu nízkeho stupňa aj u stabilizovaných pacientov so sclerosis multiplex a poukazujú na význam merania plazmových hladín HMGB1 u pacientov so sclerosis multiplex. Výsledky sú prvé svojho druhu. Doteraz sa úlohou HMGB1 pri SM a tiež ako markera aktivity choroby nik nezaoberal.

PodĎakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a inovácie pre projekt: Univerzitný vedecký park Univerzity Komenského v Bratislave – 2. fáza, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.“ Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ.



Recenzent

1. MUDr. Katarína Babinská, PhD., Fyziologický ústav LFUK, Bratislava

LITERATÚRA

1. Buc M. Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:963748. doi: 10.1155/2013/963748. Epub 2013 May 12. Review.
2. Zindler E, Zipp F. Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2010 Dec;24(4):551-62. doi: 10.1016/j.bpa.2010.11.001. Epub 2010 Nov 29.
3. Landsman D, Bustin M. A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins. *Bioessays.* 1993 Aug;15(8):539-46. Review.
4. Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, Stenfors J, Tuominen RK, Lepäntalo M, Carpén O, Parkkinen J, Rauvala H. Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1). *Blood.* 2004 Aug 15;104(4):1174-82. Epub 2004 May 6.
5. Liesz A, Dalpke A, Mrcscko E, Antoine DJ, Roth S, Zhou W, Yang H, Na SY, Akhissaroglu M, Fleming T, Eigenbrod T, Nawroth PP, Tracey KJ, Veltkamp R. DAMP signaling is a key pathway inducing immune modulation after brain injury. *J Neurosci.* 2015 Jan 14;35(2):583-98. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2439-14.2015.

BIOLOGIKÁ V REUMATOLÓGII

REUMATOIDNÁ ARTRITÍDA – KLINICKÝ OBRAZ, DIAGNOSTIKA, LIEČBA

Rovenský J.

Národný ústav reumatických chorôb Piešťany

Abstrakt

Reumatoidná artritída (RA) je časté, závažné zápalové ochorenie kĺbov, ktoré postihuje všetky vekové skupiny s maximálnym výskytom u mladých ľudí a premenopauzálnych žien. Ochorenie má multifaktorové príčiny vrátane určitej genetickej predispozície a je preň charakteristický chronický zápal, ktorý je iniciovaný a udržiavaný autoimunitnými mechanizmami. Priebeh RA je veľmi variabilný. Akútne exacerbácie môžu vystriedať obdobia remisie. Celkovo je však priebeh progresívny a často vedie k invalidite. Ochorenie skracuje život až o desať rokov. Reumatoidná artritída je heterogénne ochorenie, má rozdielnu aktivitu choroby aj rozdielnu rýchlosť rozvoja štruktúrnych zmien. Pritom býva diferencované vnímanie subjektívnych ťažkostí a vplyvu disability na kvalitu života. Cieľom liečby je dosiahnutie remisie, liečba však musí byť včasná, agresívna. V terapii sú k dispozícii lepšie liečebné prostriedky okrem tradičných DMARDs. Je to hlavne biologická liečba, hodnotenie aktivity je presnejšie, pričom treba brať do úvahy aj kontinuálne monitorovanie a bezpečnosť liečby pri RA.

Kľúčové slová

Klinické prejavy, etiopatogenéza, klinický obraz a diagnostika, liečba

Jednou zo zápalových reumatických chorôb najčastejšie postihujúcich ženy medzi 35. až 50. rokom života je reumatoidná artritída. Táto pomerne častá autoimunitná choroba sa prejavuje zápalmi kĺbov vyúsťujúcimi do ich deštrukcie a deformácie. Zápal postupne preniká do hĺbky, postihuje chrupku a príľahlú kosť, a pomaly ich rozrušuje. Kĺby opúchajú a obmedzuje sa ich pohyblivosť. Následkom postupujúceho ochorenia ochabujú aj svaly, chorý sa cíti celkovo slabý, môže mať zvýšenú teplotu. Nezriedka býva postihnutý aj obehový a dýchací systém. Priebeh choroby je kolísavý – obdobia zhoršenia sa striedajú s obdobiami pokoja, kedy sa chorý cíti lepšie.

Reumatoidná artritída je choroba moderných čias, hoci jej prvý popis urobil už v roku 1800 parížsky lekár A. Landre-Bavais. V Európe a Severnej Amerike sa vyskytuje asi v 2 až 3% populácie, menej trápi obyvateľov Číny a Ázie a ešte menší výskyt je v Afrike. Častejšie postihuje ženy ako mužov (v pomere 3:1). Pri jej vzniku sa uplatňuje genetická predispozícia. Pravú príčinu nepoznáme, a preto nie je k dispozícii ani liek, ktorým by sa reumatoidná artritída dala úplne vyliečiť. Pomocou antireumatík, liekov utišujúcich bolesť a zmierňujúcich zápalový proces, možno zabezpečiť miernejší

priebeh choroby. Podmienkou však je, aby sa liečba začala čo najskôr, a aby pri nej pacienti spolupracovali.

Začiatkové príznaky reumatoidnej artritídy môžu byť kĺbové alebo systémové. Typickým kĺbovým príznakom je bolesť. Býva rôznej intenzity a výrazne horšia ráno. Nepostihuje iba kĺby, ale niekedy vyžaruje aj do tkanív a svalov okolo kĺbov. Spravidla má pokojový charakter. Druhým dôležitým príznakom je ranná stuhnutosť. Spôsobuje ju opuch vzniknutý v zápalovom tkanive počas spánku. Niekedy môže predchádzať i vznik kĺbovej bolesti. Trvá spravidla dlhšie ako hodinu, čím sa líši od rannej stuhnutosťi pri osteoartróze, ktorá býva krátkodobá. Medzi systémové príznaky sa zaradujú celkový pocit ochorenia, únava, slabosť, zvýšená telesná teplota, úbytok hmotnosti, poruchy spánku. Pacienti mávajú niekedy príznaky úzkosti a depresie. Systémové príznaky môžu predchádzať kĺbovým príznakom, vyskytovať sa súčasne s nimi, alebo nastúpiť po nich.

Pri reumatoidnej artritíde môže byť postihnutý ktorýkoľvek kĺb, aj keď najčastejšie sú postihnuté hánky (MCP - metakarpofalangeálne kĺby) a stredné na prstoch rúk (PIP proximálne interfalangeálne kĺby). Po ústupe zápalových príznakov pretrváva zhrubnutie kĺbov, deformácie s osovou odchýlkou, obmedzená pohyblivosť, nestabilita či dokonca môže prísť k ľahkému vyklbeniu postihnutých kĺbov. Charakteristický je náhly vznik choroby s výraznými celkovými prejavmi, bolestivým stuhnutím svalov, postihnutím ramien a vysokou zápalovou aktivitou.

Priebeh reumatoidnej artritídy

Priebeh choroby je rozmanitý a ťažko predvídateľný. Pri stredne závažných a závažných formách dochádza k deštrukcii kĺbov, ktorej dôsledkom je porušenie schopnosti hybnosti a zníženie kvality života pacientov. Cieľom liečby je preto dosiahnutie remisie - stavu, pre ktorý je charakteristické zmiernenie až vymiznutie príznakov choroby. Rozhodujúce pre dosiahnutie tohto cieľa je **včasnú zavedenie liečby a potlačenie aktivity choroby**. Progresia štruktúrnych zmien na kĺboch je najvýraznejšia v prvých rokoch trvania reumatoidnej artritídy. Preto je potrebné včas zahájiť intenzívnu liečbu, aby kĺbové postihnutie nepostupovalo.

Liečba reumatoidnej artritídy

Liečba musí byť včasná a komplexná, spojená s pravidelným monitorovaním aktivity a možných nežiaducich účinkov. Cieľom liečby je dosiahnuť remisiu, vymiznutie alebo zmiernenie príznakov choroby a znížiť aktivitu choroby a tým zmierniť bolesti, zachovať alebo zlepšiť funkčnú schopnosť pohybového aparátu, zlepšiť kvalitu života chorých a spomaliť alebo zastaviť progresiu ochorenia.

Aké spôsoby liečby má pacient k dispozícii?

Nefarmakologická liečba zahŕňa úpravu denného režimu, fyzikálnu, rehabilitačnú a chirurgickú liečbu.

Farmakologická liečba pozostáva z podávania nesteroidových antiflogistík a analgetík. Glukokortikoidy sa zavádzajú do liečby predovšetkým v období vysokej aktivity a akútnych prejavov na preklenutie obdobia do začiatku účinku chorobu modifikujúcich liekov. Chorobu modifikujúce antireumatiká (DMARDs - Disease modifying antirheumatic drugs)

sú skupinou liekov s rôznym mechanizmom účinku, ktorý nastupuje po niekoľkých týždňoch a pretrváva rôzne dlhý čas aj po ich vysadení. Nemajú priamy analgetický účinok. Rozdeľujú sa na syntetické DMARDs a biologické DMARDs. Medzi syntetické DMARDs zaradujeme hlavne tzv. konvenčné syntetické DMARDs akými sú napr. metotrexát, antimalariká, sulfasalazín, leflunomid, soli zlata, ako i imunosupresíva. Na trh prichádzajú už i cieľené syntetické DMARDs – tofacitinib.

Biologická liečba

Je založená na podávaní látok rôzneho zloženia a mechanizmu účinku, ktoré zasahujú do imunitných a zápalových dejov spôsobujúcich vznik choroby. Na vývoji prvého biologického lieku, ktorý sa používal na liečbu reumatoidnej artritídy, sa podieľal aj významný americký vedec slovenského pôvodu, profesor Ján Vilček.

Účinnosť biologickej liečby na reumatoidnú artritídu

Biologická liečba je účinná vo viac ako 60% prípadov pacientov rezistentných na liečbu štandardným ochorením modifikujúcimi liekmi (DMARDs). Do bezpríznakového štádia sa dostane až tretina pacientov. Významný prínos biologickej liečby je v tom, že jej účinok nastupuje už po niekoľkých dňoch, zriedkavo sa terapeutický efekt znamená až po niekoľkých mesiacoch. Biologická liečba znižuje hladiny látok, ktoré sa podieľajú na rozvoji zápalového procesu, a celkove zlepšuje kvalitu života pacientov. Na Slovensku je registrovaných viac biologických liekov, ktoré sa používajú v liečbe reumatoidnej artritídy. Základom koncepcie biologickej liečby je poznatok, že zápaly v ľudskom tele vyvolávajú alebo zosilňujú tzv. cytokíny. Jedným z nich je aj tumor nekrotizujúci faktor (TNF-alfa). Najčastejšie a najdlhšie používané biologické lieky sú práve lieky tlmiace TNF alfa, akými sú etanercept, adalimumab, infliximab, certolizumab a golimumab. Ďalšie schválené biologické lieky sú zamerané na iné biologické pôsobky, bunkové elementy, alebo mechanizmy podieľajúce sa na zápale (tocilizumab, rituximab, abatacept, anakinra). V prípade neúčinnosti jedného biologického lieku je možná jeho zámena za iný. Biologiká sa používajú aj v liečbe ďalších zápalových reumatických chorôb. Svoje uplatnenie našli aj v dermatológii či v gastroenterológii.

Komu je biologická liečba určená?

Biologickú liečbu môže predpisovať iba lekár v špecializovanom centre pre liečbu biologikami. Je určená pacientom s pretrvávajúcou vysokou aktivitou choroby, ktorým liečba štandardnými, chorobu modifikujúcimi antireumatikami (DMARDs) nezaberá dostatočne, nie je účinná alebo nie je vhodná.

Má biologická liečba aj nežiaduce účinky?

Biologické lieky môžu spôsobovať nežiaduce účinky. Ich výskyt, miera aj závažnosť sa v prípade rôznych liekov môžu líšiť.

Prečo sa netreba báť biologickej liečby?

Výskyt jednotlivých nežiaducich účinkov je opísaný v príbalovom letáku každého lieku a ošetrojúci lekár každému pacientovi starostlivo vysvetlí pozitíva aj riziká každej liečby. Na ich minimalizovanie vykonáva viacero potrebných vyšetrení, a na ich základe vyberá najvhodnejší biologický liek. V súčasnosti sú k dispozícii biologické lieky, ktoré sa používajú v klinickej praxi viac ako 20 rokov. Každý lekár vie využiť poznatky z dlhodobých štúdií a vlastnej klinickej praxe na to, aby pre pacienta vybral najvhodnejší liek s maximálnym vplyvom na účinnosť a s minimalizovaním nežiaducich účinkov. Pri výbere zohľadňuje nielen progresiu ochorenia, ale aj vek pacienta, jeho ďalšie ochorenia a životný štýl tak, aby liečba bola účinná, pohodlná a čo najmenej obmedzovala životné aktivity pacienta. (1,2)

Recenzent

1. Ing. Mária Stančíková, CSc., Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany.
2. prof. RNDr. Eva Kontseková, DrSc., Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava

LITERATÚRA

1. Kozák, I., Rovenský, J., Štvrtinová, V.: Reumatoidná artritída a očné prejavy. Oftalmo-reumatológia II., SAP, 2015 s. 68-85
2. Zadražil, J., Horák, P., Karásek, D.: Moderní farmakoterapie autoimunitních chorob. Maxdorf Jessenius, 2015, s. 116-123

BIOLOGICKÁ LIEČBA SYSTÉMOVÉHO LUPUS ERYTHEMATOSUS ZAMERANÁ NA OVPLYVNENIE LYMFOCYTOV B

Rovenský J, Blažičková S.

*Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany
a Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce Trnavskej univerzity*

Abstrakt

Patogenéza systémového lupuserythematosus (SLE) zahŕňa zmeny vo viacerých zložkách imunitného systému vrátane buniek B, buniek T, cytokínov, ich vzájomných interakcií. Nové terapie SLE by mali byť zamerané na zvýšenie efektivity liečby a na zníženie rizika vypuknutia choroby. Tento prehľad zhrnul nové formy biologickej terapie, ktorá sa používa u pacientov s SLE, a tie, ktoré sú predmetom klinických štúdií.

Kľúčové slová: systémový lupuserythematosus – biologická liečba – lymfocyty B.

Summary

The pathogenesis of systemic lupus erythematosus involves aberrancy in multiple components of the immune system including B cells, T cells, cytokines and their interactions. New therapies of SLE should aim at increasing the effectiveness of therapy and reduce the risk of outbreak of the disease. This review summarized the recent biological therapies, which have been used in patients with SLE and those which are undergoing clinical trials.

Keywords: systemic lupus erythematosus, biological therapy, B lymphocytes

Systémový lupus erythematosus (SLE) je autoimunitná imunopatologická choroba, ktorej dôsledky môžu postihnúť prakticky všetky tkanivá a orgány v tele. Všeobecne sa považuje za chorobu, pri ktorej za vývoj klinických príznakov zodpovedajú priamo alebo nepriamo protilátky.

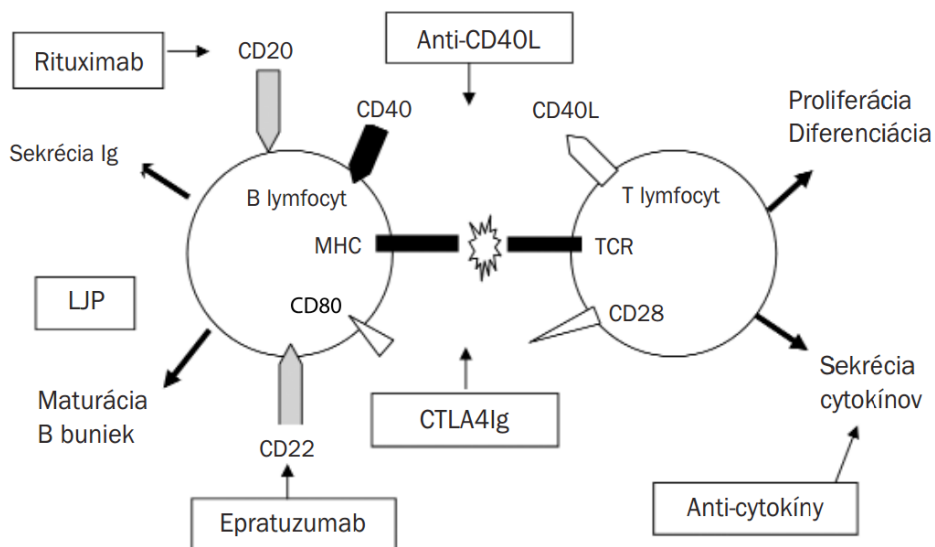
V skutočnosti pri SLE ide o komplexnejšiu poruchu imunitného systému. Abnormality funkcií, regulácie a interakcií buniek imunitného systému (lymfocytov T, lymfocytov B, makrofágov, dendritických buniek) vedú k ukladaniu vznikajúcich imunokomplexov a k následnému poškodeniu tkanív a orgánov. Najnovšie výskumy poukazujú i na možné prepojenie prirodzenej a adaptívnej imunity. Vzhľadom k veľkej klinickej rozmanitosti, ktorá vychádza zo širokého spektra abnormalít, sa terapia SLE riadi aktivitou choroby a typom orgánového postihnutia. K tradičnej terapii SLE patria kortikoidy, cyklofosfamid a cyklosporín A, pri ťažkých formách nachádzajú uplatnenie okrem azatioprínu i vysoké dávky imunoglobulínov. Intenzívny výskum patogenézy SLE ob-

javil v ostatných rokoch ďalšie možné ciele pre terapeutický zásah (obr. 1). Pre SLE je charakteristická nielen polyklonová hyperaktivita lymfocytov B, ale aj výrazná porucha ich homeostázy. Pacienti so SLE majú v periférnej krvi znížený počet B-lymfocytov, ale ich abnormálny fenotyp poukazuje na výraznú aktiváciu týchto buniek. Zistilo sa, že je výrazne znížený počet najmä naivných B lymfocytov (CD27-bunky), kým počet pamäťových buniek je zvýšený (CD27+ bunky B) (22). Cielená terapia na ovplyvnenie lymfocytov B (tab. 1) je zameraná na depléciu lymfocytov B blokádou receptorov na lymfocytoch B, inhibíciou kostimulačných receptorov, inhibíciou produkcie cytokínov ovplyvňujúcich B-lymfocyty a na elimináciu autoreaktívnych lymfocytov B.

Tabuľka 1. Biologická terapia SLE zameraná na lymfocyty B.
MP – myšia protilátka

Table 1. Biological therapy in SLE

Terapeutický cieľ	Cieľ lieku	Forma	Liek
Deplécia lymfocytov B	CD20 CD22	Humanizovaná MP Humanizovaná MP	Rituximab, Ocrelizumab Epratuzumab
Inhibícia cytokínov	BAFF April	Humanizovaná MP TACI-Ig receptor Peptidofusionprotein	Belimumab Atacicept A623
Blokáda kostimulačných molekúl	CD154	Humanizovaná MP	Ruplizumab, Toralizumab – ukončené štúdie pre vedľajšie účinky
Tetramérový oligonukleotidový preparát, ktorý výrazne redukuje hladiny anti-dsDNA protilátok			Abetimus sodný LJP 394



Obrázok 1. Potenciálne terapeutické ciele pri systémovom lupus erythematosus

Deplécia lymfocytov B

V ostatných rokoch sa skrátilo časové obdobie, ktoré uplynie medzi objavom nových cieľových molekúl, vývojom liekov proti takýmto terčom a zavedením týchto liekov do klinickej praxe. Pri SLE sa začali klinické skúšky s monoklonovými protilátkami namierenými proti diferenciačnému antigénu B-lymfocytov. CD20 je kostimulačná molekula exprimujúca sa na nezrelých, naivných i pamäťových lymfocytoch B, ale nenachádza sa na skorých lymfocytoch pre-B alebo plazmatických lymfocytoch B.

Anti-CD20 monoklonová protilátka

Rituximab (monoklonová protilátka anti-CD20) je chimerická monoklonová protilátka (MoAb), ktorá bola prvýkrát použitá v r. 1997 pri liečbe nonhodgkinových lymfómov. Úspešná deplécia lymfocytov B u takmer 300 000 pacientov s lymfómom predurčila túto protilátku na experimentálne využitie i pri terapii ďalších autoimunitných chorôb s účasťou lymfocytov B v patogenéze. Prvou autoimunitnou chorobou, kde sa s úspechom použila, bola chronická idiopatická trombocytopenia. Ďalej sa využíva pri liečbe autoimunitnej hemolytickej anémie neodpovedajúcej na konvenčnú terapiu, pri dermatomyozitíde a vaskulitíde.

Prvé štúdie s monoterapiou rituximabom pri liečbe SLE dávali povzbudivé výsledky. Prvé štúdie z I. a II. fázy terapeutických skúšok uvádzali dobrú klinickú odpoveď u 16 z 18 pacientov (20). Úspešná deplécia lymfocytov B (počet CD19 < 5 B-lymfocytov/ μ l) sa pozorovala u 10 pacientov a korelovala s klinickým zlepšením meraným pomocou

SLAM skóre. Naproti tomu u 6 pacientov, u ktorých sa nedosiahla deplécia B lymfocytov, sa nepozorovala štatisticky významná zmena v skóre SLAM. Koncentrácia komplementu a koncentrácia anti-dsDNA protilátok počas terapie rituximabom v celej skupine 18 pacientov sa výraznejšie nemenila. Podobne v ďalšej štúdii, pri monoterapii rituximabom, sa pozorovala 99% deplécia lymfocytov B u 6 zo 7 liečených pacientov a korelovala s klinickým zlepšením, ale nie so sérologickými parametrami (1).

V štúdii Looneya a spoluprac. (21) u väčšiny pacientov s efektívnou depléciou lymfocytov B pretrvávalo zlepšené skóre SLAM 12 mesiacov po jednorazovej aplikácii rituximabu. Rituximab pacienti dobre tolerovali. Následne dlhotrvajúce otvorené štúdie u 24 pacientov s refraktérnou formou SLE a kombinovanou imunosupresívnou terapiou (cyklofosamid, perorálne kortikoidy) s rituximabom zistili signifikantné zlepšenie hodnotené pomocou skóre BILAG, poklesom koncentrácie zložky komplementu C3 a dsDNA 6 mesiacov po dosiahnutí depléciou lymfocytov B. Súčasne bolo možné znížiť dávku kortikoidov (17).

Podobné výsledky dosiahol i Lindholm a spoluprac. (19). Vo svojej 22 mesiacov trvajúcej štúdii sledovali 31 SLE pacientov s aktívnou lupusovounefritídou, trombocytopéniou a hemolytickou anémiou, ktorí neodpovedali na konvenčnú terapiu. U všetkých dosiahli úplnú depléciou lymfocytov B. U 11 zo 17 pacientov s lupusovounefritídou sa pozorovala úplná alebo čiastočná odpoveď po 6 – 12 mesiacoch. Anti-CD20 terapia bola vysokoúčinná u pacientov s autoimunitnou trombocytopéniou, ktorým štatisticky významne stúpol počet trombocytov do 6 mesiacov od začiatku terapie. Terapiu rituximabom pacienti dobre tolerovali. Reakcia po infúzii sa pozorovala u 10 % pacientov, u 4 % pacientov sa opakovala i pri druhej infúzii (25). Vhodná je premedikácia metylprednizolónom i.v., resp. perorálnymi kortikoidmi. Plne humanizovaná anti-CD20 MoAb je v súčasnosti vo vývine. Frekvencia výskytu infekcií (35 %) je porovnateľná s výskytom infekcií v skupine pacientov s placebom (28 %) (9).

Monoklonová protilátka anti-CD22

Najnovšie sa do liečby zavádza humanizovaná MoAb anti-CD22, epratuzumab. Podobne ako anti-CD20, MoAb je asociovaná s depléciou lymfocytov B. Môže aj znižovať aktivačnú funkciu molekuly a tým tlmíť proliferáciu a diferenciáciu B-lymfocytov. V otvorenej pilotnej štúdii u 14 SLE pacientov s humanizovanou MoAb anti-CD22 sa dosiahla 60 % deplécia lymfocytov B a > 50% zlepšenie vyjadrené skóre BILAG, bez zmien koncentrácií v sledovaných autoprotilátkach (16). Rituximab a epratuzumab pôsobia na lymfocyty B rozdielne, čo umožní ich vzájomnú kombináciu.

Inhibícia cytokínov

V ostatných rokoch sa záujem sústredil na ovplyvnenie produkcie cytokínov, ktoré ovplyvňujú lymfocyty B, resp. blokujú ich aktiváciu. Pozornosť sa sústredila na neutralizáciu rastového faktora lymfocytov B (BAFF – B cell activating factor) syntetizovaného makrofágmi. BAFF, známy aj ako BLyS (B-lymfocytový stimulátor), patrí do rodiny TNF

a spolu s ligandom indukujúcim proliferáciu (APRIL) má efekt na prežívanie lymfocytov B, stimuluje diferenciáciu plazmatických buniek, môže vplývať aj na diferenciáciu autoreaktívnych lymfocytov B, ovplyvňuje od CD40L nezávislú produkciu protilátok a izotypové prepnutie (8). BAFF sa exprimuje ako proteín na povrchu buniek, potom je rozdelený do triméru, následne štiepený a uvoľnený do obehu vo forme aktívneho homotriméru (3). Hoci stála koncentrácia BAFF je generovaná konštitutívne, jeho vylučovanie môže byť zosilnené prostredníctvom zápalových cytokínov, ako napr. IL-2, TNF- α , IFN- γ (23).

BAFF, sa môže viazať až na tri receptory:

- BAFF receptor 3 (Br3, známy aj ako BAFF-R),
- transmembránový aktivátor-1 a modulátor vápnika a cyclophilinligand-interactor (TACI),
- antigén zrenia B-lymfocytov (B cell maturation antigen BCMA).

BAFF je jediný ligand pre Br3, kým TACI a BCMA môžu viazať BAFF aj APRIL. Tieto interakcie ligand – receptor sa líšia v afinite: BAFF sa viaže najsilnejšie k BAFF-R, nižšiu afinitu má k TACI alebo BCMA, kým APRIL má opačne najnižšiu afinitu k BAFF-R a najsilnejšiu k TACI a BCMA (2). Rodina troch BAFF receptorov sa líši v ich expresii na rôznych vývojových štádiách

B-lymfocytov. BAFF väzbová kapacita sa zvyšuje na prechodných štádiách lymfocytov B (12) a najvyššia expresivita BAFF-R sa nachádza vo folikulárnej a marginálnej zóne subpopulácii lymfocytov B (3). Aktivácia zrelých buniek B vedie k zvýšeniu alebo zníženiu TACI a BAFF-R v závislosti od aktivačného podnetu. Dlhožijúce plazmatické bunky exprimujú predovšetkým BCMA. Úloha receptorov a ligandov rodiny BAFF v aktivácii efektorových B-lymfocytov nie je ešte úplne známa, ale majú úlohu v prežívaní, diferenciácii lymfocytov B a následne v produkcii protilátok B-lymfocytmi.

Polyklonová hyperaktivita lymfocytov B má v patogenéze SLE významnú úlohu. Ako sme už uviedli, interakcia BAFF a BAFF-R je rozhodujúca pre prežívanie B-lymfocytov. V prípade poruchy by autoreaktívne alebo polyreaktívne lymfocyty B mohli mať zvýšené prežívanie, dochádzalo by k poruche ich odstránenia apoptózou. Primárnym zdrojom sekrécie BAFF sú dendritické bunky, ktoré sa často nachádzajú v sliznici a koži (15). Pretože SLE sa prejavuje kožnými a sliznicovými zmenami, je rozumné predpokladať, že hyperaktivita dendritických buniek sa môže podieľať i na zvýšení sérovej koncentrácie BAFF u pacientov so systémovým lupus erythematosus.

Jednou z dôležitých úloh bolo preskúmanie kontinuálne nadmerne zvýšenej expresie BAFF u pacientov so SLE, ktorú dokázali viacerí autori. Stohl a spoluprac. (27) zistili, že u zdravých osôb sa koncentrácia BAFF nezmenila, ale pri SLE bola výrazná heterogenita, pričom 50 – 61 % pacientov malo stále zvýšenú koncentráciu BlyS a v krvi BAFF mRNA fenotyp. Povrchová expresia BAFF na mononukleárných leukocytoch periférnej krvi bola tiež zvýšená. Terapia u pacientov s takto zvýšenými parametrami po-

mocou kortikoidov dokázala redukovať koncentráciu BAFF, na druhej strane zníženie dávky kortikoidov malo za následok často zvýšenie koncentrácií BAFF. Výsledky zistili všeobecne dobrú koreláciu medzi zvýšenými hodnotami BAFF a koncentraciami protilátok anti-dsDNA. Na druhej strane sa zistilo, že koncentrácie BAFF so zmenou aktivity choroby nekorelujú u individuálnych pacientov. Podobne i sérové koncentrácie BAFF fenotypu nekorelujú so špecifickým orgánovým poškodením.

Chu a spoluprac. (6) zistili, že nadmerná aktivácia B-lymfocytov u pacientov so SLE môže byť spojená s preukázateľným zvýšením expresie BAFF v naivných pamäťových a plazmatických bunkách. Výrazná expresia BAFF a APRIL sa našla v plazmatických bunkách lymfatických uzlín, kostnej drene a obličiek. Koncentrácie BAFF a APRIL mRNA v CD19+ B-bunkách korelovali s titrom protilátok anti-dsDNA a s aktivitou choroby. Ďalej sa zistilo, že bunky B uvoľňujú BAFF/APRIL po ich aktivácii.

Carter a spoluprac. (5) sledovali receptory pre BAFF, a snažili sa zodpovedať otázku, či tieto sú zmenené pri systémovej lupuserythematosus. Počty BAFF receptorov sa analyzovali v periférnej krvi u 36 pacientov so SLE, u 29 zdravých osôb a u 10 pacientov s inými chorobami. Protilátky proti BAFF receptorom, BCMA a TACI sa použili v snahe určiť expresiu BAFF receptorov na paneli buniek B získaných z krvi, sleziny a tonzíl. Celkový počet BAFF receptorov sa našiel znížený u pacientov so SLE bez ohľadu na zmeny imunokompetentných buniek v ich krvi. Stupeň poklesu koreloval s aktivitou choroby. Rozdiel v expresii BAFF-R nebol síce preukázateľný medzi zdravými kontrolami a pacientmi so SLE, ale receptory BAFF-R boli u pacientov so SLE obsadené. Z tohto dôvodu imunokompetentné bunky u pacientov so SLE odpovedali menej na exogénny BAFF. Obsadenie BAFF-R na lymfocytoch B z periférnej krvi sa môže zúčastňovať na mechanizme vývoja SLE a môže slúžiť ako jeden z biomarkerov aktivity choroby.

Všetky uvedené zistenia viedli k hľadaniu možnosti inhibície týchto regulačných proteínov buniek B a následne k príprave monoklonovej protilátky proti BAFF s možnosťou klinického použitia v liečbe systémovej lupuserythematosus. Anti-BAFF (belimumab) je plne humánna monoklonová protilátka (IgG1) viažuca solubilný BAFF a inhibuje jeho väzbu na TACI, BCMA a BAFF-R. Polčas rozpadu je 11 – 14 dní. V experimentálnej štúdií podávanie belimumabu počas 24 týždňov opiciam *Cynomolgus* malo za následok pokles počtu buniek B o 50 – 60 %, ktorý sa začínal po 4 týždňoch. Výrazný pokles sa zaznamenal v subpopulácii zrejých buniek B s poklesom veľkosti lymfatických folikulov v slezine. U myší pokles pretrváva mnoho týždňov po prerušení liečby a úprava na normu 52 týždňov. Aj koncentrácia sérového IgG klesne mierne a malý účinok sa pozoroval aj na koncentrácie IgM, IgA alebo IgE (11).

V II. fáze klinického skúšania, v dvojito zaslepenej, placebom kontrolovanej, dávkovo ohraničenej štúdií, sa podával belimumab 449 pacientom so stredne aktívnou formou systémovej lupuserythematosus. Pacienti liečení placebom boli v 56. týždni prevedení do skupiny pacientov, ktorí dostávali aktívnu látku – belimumab. Všetci liečení pacienti z prvej skupiny pokračovali v štúdií. Niektorí pacienti dostávali belimumab počas 2,5 roka. Od 56. týždňa však nebola už skupina pacientov, ktorým by sa

aplikovalo placebo. Belimumab bol všeobecne dobre tolerovaný, ale v prvom roku zlyhal primárny cieľ štúdie: zníženie exacerbácie choroby a sledovanie aktivity choroby (Selena SLEDAI aktivity index). V čase výberu pacientov do štúdie bolo 28,5 % ANA-negatívnych. Výsledky zo štúdie zistili, že séropozitívna skupina ANA pacientov mala lepšie odpovede na liečbu a mala menej atakov exacerbácie ako pacienti, ktorí dostávali placebo. Dosiahlo sa 12 – 47% zníženie počtu lymfocytov CD20+ (7).

Výsledky ďalších štúdií ukazujú, že belimumab znižuje počet naivných a aktivovaných buniek B a cirkulujúcich plazmablastov, ale nie plazmatických buniek. Zaznamenal sa preukázateľný vzostup frekvencie pamäťových buniek CD27+, ktorý bol kompatibilný s nálezom u myši, u ktorých sú pamäťové lymfocyty B rezistentné proti blokáde BAFF. Z ďalších laboratórnych parametrov sa zaznamenal mierny pokles koncentrácií sérového IgM a IgE s malým efektom na koncentrácie sérového IgG alebo IgA. Koncentrácie protilátok proti ds-DNA klesli o 30 %. V 52. týždni pacienti, ktorí boli liečení belimumabom, mali negatívne ANA, ale tento počet bol malý (10 – 20 % liečených pacientov oproti 2 – 5 % liečených placebo) (28). Zaznamenal sa aj vzostup koncentrácie C4 oproti kontrolnej skupine. Tento vzostup nastal aj u pacientov, ktorí z placebovej skupiny prešli do skupiny liečenej belimumabom (26).

Petrieová a spoluprac. (24) sledovali vzťah plazmatickej koncentrácie BAFF s aktivitou systémového lupuserythematosus. V súbore 245 pacientov, ktorí boli prospektívne sledovaní počas 2 rokov v 4 centrách, s priebežne sledoval dotazník aktivity SELENA-SLEDAI, koncentrácia protilátok anti-dsDNA a koncentrácia plazmatického BAFF. Z multivariačnej analýzy vyplynulo, že najvyšší vzostup SELENA-SLEDAI skóre z predchádzajúcich vizít úzko koreloval so vzostupom BAFF koncentrácie ($p = 0,0007$). Výsledky štúdie poukázali na to, že existuje vzťah medzi cirkulujúcim BAFF a SLE aktivitou. Naznačili aj, že BAFF je vhodným kandidátom pre cieľovú biologickú terapiu pri systémovom lupuserythematosus.

Podľa doteraz publikovaných výsledkov a najnovších výsledkov dvoch veľkých dvojito zaslepených, placebo kontrolovaných štúdií (14), ktorých sa zúčastnilo 865 séropozitívnych a 826 séronegatívnych pacientov, pacienti belimumab dobre tolerovali. Pacienti boli randomizovaní a dostávali belimumab v dvoch dávkach 10 mg/kg a 1 mg/kg alebo placebo. Belimumab výrazne zvyšoval čas vzplanutia, resp. zhoršenia choroby oproti placebovej skupine a signifikantne znižoval dávky kortikoidov. Výskyt infekcií a ostatných závažných nežiaducich udalostí bol porovnateľný s placebovou skupinou.

Cieľová terapia antagonistami BAFF môže byť prelomová, pretože ovplyvňuje včasné štádium buniek B v periférnej krvi bez toho, že by ovplyvňovala bunky B v neskorom štádiu a v kompartmente kostnej drene, plazmatických buniek, pamäťových buniek ani iných buniek patriacich k imunitnému systému. Z tohto dôvodu cieľnú terapiu belimumabom je potrebné uvítať, pretože je založená na experimentálnych výsledkoch, ktoré potvrdzujú, že inhibícia nezrelých krátkožijúcich buniek B vedie k potlačeniu aktivity SLE s dobrou toleranciou lieku. Preparát Belimumab je v súčasnosti registrovaný na Slovensku.

Inhibícia kostimulácie

Ďalšou možnosťou selektívnej deplécie B-lymfocytov je inhibícia dráhy CD40 – CD40L, najmä u pacientov s proliferatívnu lupusovou nefritídou. Molekula CD40 je exprimovaná na bunkách B a ostatných bunkách prezentujúcich antigén a molekula CD40L (CD154) na T-lymfocytoch. Interakcie CD40-CD40L sú dôležité pre prešmyk imunoglobulínových tried, vývoj pamäťových lymfocytov B a formovanie zárodočných centier. Výsledky štúdií s terapeutickým zásahom pomocou MoAb anti-CD40L (anti-CD154, ruplizumab) s malým počtom pacientov (n = 5) uvádzajú úspešné zníženie autoreaktívnych lymfocytov B produkujúcich anti-dsDNA a výrazné zníženie abnormálnych populácií lymfocytov B (10, 13). Priaznivé výsledky týchto liečiv boli však potlačené výskytom tromboembolických príhod a zvýšenou aktiváciou expresie CD154 na trombocytoch. Z tohto dôvodu boli klinické štúdie u pacientov s SLE ukončené (4).

Alternatívou na inhibíciu kostimulácie u pacientov so SLE je blokáda molekuly CD80 na lymfocytoch. Zatiaľ využívaný iba v terapii reumatoidnej artritídy je inhibítor kostimulačnej dráhy abacept, ktorý inhibuje spojenie CD28 a jeho B-lymfocytového ligandu CD80.

Eliminácia autoreaktívnych lymfocytov

Okrem selektívnej deplécie buniek B sa pozornosť venuje i eliminácii autoreaktívnych lymfocytov. **Edratid TV4710** je peptid odvodený zo 16/6 CDR1 sekvencie, inhibuje antigéno-špecifickú proliferáciu, IL-2 produkciu periférnych lymfocytov pacientov so systémovým lupuserythematosus. **Abetimusodný LJP 394** je tetramérový oligonukleotidový preparát, ktorý výrazne redukuje hladiny anti-dsDNA protilátok, čo ho predurčovalo na liečbu lupusovej nefritídy pri SLE. Výsledky III. fázy randomizovanej, kontrolovanej štúdie ukazujú, že abetimus štatisticky nevýznamne predlžuje čas remisierneho postihnutia pri SLE, odďaľuje použitie vysokých dávok kortikoidov alebo cyklofosfamidu, znižuje koncentráciu protilátok anti-dsDNA, ale imunopatologický proces nedokáže oddialiť. Redukcia koncentrácie autoprotlátok je asociovaná so zvýšením koncentrácie C3-zložky komplementu. Terapia abetimusom trvala 22 mesiacov a bola dobre tolerovaná (18).

Záver

Nezávisle od budúcich perspektív v liečbe SLE si bude zložitosť a heterogénna povaha tejto choroby vždy vyžadovať individuálne prispôbenú liečbu. Kombinovaná terapia rôznymi biologickými látkami môže zvyšovať pravdepodobnosť úspešného zásahu do siete poškodených imunitných mechanizmov pri systémovom lupuserythematosus. Nové terapie, ktoré sú prv opísané, predstavujú špičku ľadovca terapie tejto choroby. Veľké množstvo štúdií o diagnóze a liečbe SLE vytvorilo nepreberné množstvo dát, ktoré je potrebné systematicky preskúmať a formulovať do odporúčania na použitie v každodennej praxi. Mnoho iných biologických látok s rôznymi mechanizmami účinku je alebo čoskoro bude uvedené do klinických štúdií pri systémovom lupuse-

rythematosus. Patrí medzine okrem terapie namierenej na B-lymfocyty i terapia proti cytokínom, receptorom Toll-like a zložkám komplementu. Sme ešte ďaleko od toho, aby sme vedeli, ktorý z týchto prístupov bude najefektívnejší. Analýza klinického obrazu pacienta so SLE ostane aj v budúcnosti ústredným bodom pri voľbe správnej liečby.

Recenzent

1. Ing. Mária Stančíková, CSc., Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany.
2. RNDr. Michal Prčina, PhD., Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava

LITERATÚRA

1. ALBERT, D.A., KHAN, K., STANSBERRY, S., TSAI, D., EISENBERG, R.: A phase I trial of rituximab (anti-CD20) fortreatment of systemic lupus erythematosus [poster]. American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, 2003:LB9, 518.
2. ALLMAN, D.M., FERGUSON, S.E., LEMTZ, V.M., CANCRO, M.P.: Peripheral B cell maturation II. Heat-stable antigen (hi) splenic B cell are an immature development intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J Immunol*, 151, 1993, s. 4431-4444.
3. CANERO, M., D'CRUZ, D., KHAMASHTA, M.A.: The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 119, 2009, č. 5, s. 1066-1073.
4. CARDIEL, M.H., TUMLIN, J.A., FURIE, R.A., WALLACE, D.J., JOH, T., LINNIK, M.D.; LJP 394-90-09 Investigator Consortium: Abate immuno modulator for renal flare in systemic lupus erythematosus: results of a randomized, controlled phase III trial. *Arthritis Rheum*, 58, 2008, č. 8, s. 2470-2480.
5. CARTER, R.H., ZHAO, H., LIU, X., PELLETIER, M., CHATHAM, W., KIMBERLY, R., ZHOU, T.: Expression and occupancy of BAFF-R on B cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 52, 2005, č. 12, s. 3943-3954.
6. CHU, V.T., ENGHARD, P., SCHÜRER, S.: Systemic activation of the immune system induces aberrant BAFF and APRIL expression in B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 60, 2009, č. 7, s. 3083-3093.
7. D'CRUZ, D.P., KHAMASHTA, M.A., HUGHES, G.R.: Systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 369, 2007, s. 587-596.
8. DILLON, S.R., GROSS, J.A., ANSELL, S.A.Z., NOVAK, A.J.: An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *N Rev Drug Discov*, 5, 2006, s. 235-246.
9. EMERY, P., FLEISCHMANN, R., FILIPOWICZ-SOSNOWSKA, A., SCHECHTMAN, J., SZCZEPANSKI, L., KAVANAUGH, A., RACEWICZ, A.J., van Vollenhoven, R.F., LI, N.F., AGARWAL, S., HESSEY, E.W., SHAW, T.M.: The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum*, 54, 2006, s. 1390-1400.

10. GRAMMER, A.C., SLOTA, R., FISCHER, R., GUR, H., GIRSCHICK, H., YARBORO, C., ILLEI, G.G., LIPSKY, P.E.: Abnormalgerminal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions. *J Clin Invest*, 112, 2003, č. 10, s. 1506-1520.
11. HALPEM, W.G., LAPPIN, P., ZANARDI, T., Cai, W., Corcoran, M., Zhong, J., Baker, K.P.: Chronic administration of belimumab, a BlyS antagonist, decreases tissue and peripheral blood B-lymphocyte populations in cynomolgus monkeys: pharmacokinetic, pharmacodynamic, and toxicologic effects. *Toxicol Sci*, 91, 2006, č. 2, s. 586-599.
12. HSU, B.L., HARLESS, S.M., LINDSLEY, R.C., HILBERT, D.M., CANCRO, M.P.: Cutting edge: BlyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. *J Immunol*, 168, 2002, s. 5993-5996.
13. HUANG, W., SINHA, J., NEWMAN, J., REDDY, B., BUDHAI, L., FURIE, R., VAISHNAW, A., DAVIDSON, A.: The effect of anti-CD40 ligand antibody on B cells in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 46, 2002, č. 6, s. 1554-1562.
14. Human Genome Sciences and GlaxoSmithKline announce full presentation at ACR of positive results of phase 3 study for Benlysta™ in systemic lupus erythematosus. <http://www.hgsic.com/latest/human-genome-sciences-and-glaxosmithkline-announce-full-presentation-at-acr-of-positive-phase-3-study-results-for-benlysta-in-systemic-lupus-erythema-5.html>. Accessed February 20, 2010
15. JEGO, G., PASCUAL, V., PALUCKA, A.K., BANCHERAU, J.: Dendritic cells control B growth and differentiation. *Curr Dir Autoimmun*, 8, 2005, s. 3370-3375.
16. KAUFMANN, J., WEGENER, W.A., HORAK, I.D., QIDWAI, M.U., DING, C., GOLDENBERG, D.M.: Initial clinical study of immunotherapy in SLE using epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody). *Arthritis Rheum*, 50, 2004, s. S447.
17. LEANDRO, M.J., CAMBRIDGE, G., EDWARDS, J.C., EHRENSTEIN, M.R., ISENBERG, D.A.: B-cell depletion in the treatment of patients with systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis of 24 patients. *Rheumatology (Oxford)*, 44, 2005, č. 12, s. 1542-1545.
18. LEVESQUE, M.C.: Translational mini-review series on B cell-directed therapies: Recent advances in B cell-directed biological therapies for autoimmune disorders. *Clin Exp Immunol*, 157, 2009, s. 198-208.
19. LINDHOLM, C., BÖRJESSON-ASP, K., ZENDJANCHI, K., SUNDQVIST, A.C., TARKOWSKI, A., BOKAREWA, M.: Long-term clinical and immunologic effects of anti-CD20 treatment in patients with refractory systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 35, 2008, č. 5, s. 826-833.
20. LOONEY, R.J., ANOLIK, J., SANZ, I.: B lymphocytes in systemic lupus erythematosus: lessons from therapy targeting B cells. *Lupus*, 13, 2004, č. 5, s. 381-390.

21. LOONEY, R.J., ANOLIK, J.H., CAMPBELL, D., FELGAR, R.E., YOUNG, F., AREND, L.J., SLOAND, J.A., ROSENBLATT, J., SANZ, I.: B celldepletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum*, 50, 2004, č. 8, s. 2580-2589.
22. ODENDAHL, M., JACOBI, A., HANSEN, A., FEIST, E., HIEPE, F., BURMESTER, G.R., LIPSKY, P.E., RADBRUCH, A., DÖRNER, T.A.: Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 165, 2000, č. 10, s. 597-599.
23. OGDEN, C.A., POUND, J.D., BATTH, B.K., OWENS, S., JOHANNESSEN, I., WOOD, K., GREGORY, C.D.: Enhanced apoptotic cell clearance capacity and B cell survival factor production by IL-10-activated macrophages: implications for Burkitt's lymphoma. *J Immunol*, 174, 2005, č. 5, s. 3015-3023.
24. PETRI, M., STOHL, W., CHATHAM, W.: Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 58, 2008, č. 8, s. 2453-2459.
25. SABAH, R., ANOLIK, J.H.: B-cell-targeted therapy for systemic lupus erythematosus. *Drugs*, 66, 2006, č. 15, s. 1933-1948.
26. STOHL, W., CHATHAM, W., MCKAY, J., WEISMAN, M.H., MERRILL, J.T., PETRI, M., CONDEMI, J., ARANOW, C., McCUNE, J., DISKIN, K., ZHONG, J., PINEDA, L., FREIMUTH, W.: Progressive normalization of autoantibody, immunoglobulin, and complement levels over 2.5 years of belimumab (fully human monoclonal antibody to BlyS) therapy in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Arthritis Rheum*, 56, 2007, (SUPPL) abstract 426.
27. STOHL, W., METYAS, S., TAN, S.M., CHEEMA, G.S., OAMAR, B., XU, D., ROSCHKE, V., WU, Y., BAKER, K.P., HILBERT, D.M.: B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations. *Arthritis Rheum*, 48, 2003, č. 12, s. 3475-3486.
28. STOHL, W., WALLACE, D.J., MERRILL, J.T., CHATHAM, W., GRUHN, W., ARANOW, C., BURNETTE, M., POGUE, B., McCUNE, J.T., PETRONE, D., ZHONG, J., MIGONE, T.S., FREIMUTH, W., CHEVRIER, M., LBSL02 STUDY GROUP: Changes in circulating B-cell counts, autoantibody levels and immunoglobulins that associate with therapeutic responsiveness in SLE to BlyS protein antagonism by belimumab. *Arthritis Rheum*, 54, 2006, Suppl. 7, s. 586.
29. MOK, M.Y., SHOENFELD, Y.: Recent advances and current state of immunotherapy in systemic lupus erythematosus. *Expert Opin Biol Ther*, 2016;16(7), 927-39

BIOLOGIKÁ V DERMATOLÓGII

SEKUKINUMAB – ANTI IL17 – PRVÉ SKÚSENOSTI V LIEČBE PSORIÁZY

Šimaljaková M.

Dermatovenerologická klinika LFUK a UN Bratislava

Súhrn

Psoriáza je chronické zápalové ochorenie s vrodenou predispozíciou s multifaktoriálnymi rysmi postihujúce 2-4% kaukazskej populácie. Vyskytuje sa v chronickej ložiskovej

forme alebo ako akútne exantematické ochorenie. Ochorenie vzniká na základe pôsobenia genetických a enviromentálnych faktorov, ktoré spúšťajú zápalovú odpoveď. IL 17A je centrálny faktor pri vzniku psoriatických ložísk, stimuluje keratinocyty ku proliferácii a zvyšuje migráciu zápalových buniek do kože, podporuje epidermálnu hyperpláziu a zápal.

Sekukinumab je plne humánna monoklonálna IgG1k protilátka selektívne pôsobiaca proti IL-17A v liečbe chronickej ložiskovej psoriázy.

Kľúčové slová: psoriáza –etiopatogenéza - liečba

Summary

Psoriasis is a common chronic inflammatory skin disorder with predisposition inherited as a multifactorial trait affecting approximately 2-4% Caucasian. Psoriasis may present as chronic plaque form or acute exanthematic disease. The disease results from interplay between genetic and environmental factors that trigger an excessive inflammatory response in the skin. IL 17-A is central key in the development of the psoriatic lesion, stimulate keratinocytes to proliferate and increase the migration of inflammatory cells into the skin, promoting epidermal hyperplasia and inflammation. Secukinumab, fully human IgG1k anti-interleukin-17A monoclonal antibody for the treatment of plaque psoriasis.

Key words: Psoriasis – ethiopathogenesis - treatment

Úvod

Psoriáza je chronické zápalové neinfekčné autoimunitné ochorenie s vrodenou predispozíciou s multifaktoriálnymi rysmi postihujúce 2-4% kaukazskej populácie v rovnakom pomere u oboch pohlaví. Vyskytuje sa v chronickej ložiskovej forme alebo ako akútne exantematické ochorenie. Postihuje kožu, nechty, sliznice a v 20-30% kĺby. Typickým klinickým obrazom sú erytematózne, ostro ohraničené ložiská s rôzne vyznačenou infiltráciou, pokryté suchými, bielymi, lesklými šupinami. Ložiská, rôznej veľkosti, sa najčastejšie lokalizujú na lakťoch, na kolenách, v lumbosakrálnej oblasti

a v kapilícii. Pri ťažkom priebehu môžu pokryť celý povrch tela. Psoriáza je ochorenie, ktoré výrazne znižuje kvalitu života pacienta, zhoršuje jeho, pracovné, sociálne aj rodinné uplatnenie. Celkový stav pacienta zhoršuje nedostatočný efekt a nežiaduce účinky štandardnej liečby. Pacienti so psoriázou trpia rôznymi komorbiditami, najmä kardiovaskulárneho systému, ktorých liečba môže provokovať výsev psoriázy. Na druhej strane, sprevádzajúce komorbidity bývajú neraz kontraindikáciou liečby psoriázy štandardnými liekmi (metotrexátom, cyklosporínom a acitretínom).

Patogenéza psoriázy

Na vzniku psoriatických ložísk sa významne podieľa imunitná reakcia. Antigén, predpokladá sa, že baktériový, najčastejšie streptokokový proteín alebo doteraz neznámy autoantigén spúšťa celú reakciu, ktorá vyúsťuje k vylučovaniu sekrécii zápalových cytokínov s následným zvýšeným delením buniek a zápalovou reakciou vedúcou k vytvoreniu psoriatických ložísk.

Patomechanizmus psoriázy a asociovaných zápalových ochorení je veľmi blízky. T bunkami mediované autoimunitné ochorenia sú stimulované endogénnymi a exogénnymi faktormi. Sprievodným znakom je cytokínová dysregulácia a iniciácia produkcie kaskády cytokínov . Výsledkom je zápalová odpoveď, ktorá postihuje rôzne systémy aj mimo miesta uvoľnenia cytokínov a vedie ku zvýšenej incidencii zápalových ochorení ako psoriáza, artritída, diabetes mellitus, kardiovaskulárne choroby, metabolický syndróm a iné.

Dôkazom imunopatogenetického mechanizmu psoriázy je prítomnosť T lymfocytov v perivaskulárnych infiltrátoch a v epiderme psoriatických ložísk a ich redukcia po imunosupresívnej liečbe. Poznatok, že základom psoriatickej odpovede je prepojenie vrodeneho a získaného imunitného systému (1) viedol k dôkladnejšiemu objasneniu zápalovej podstaty psoriázy. Z vrodeneho imunitného systému, v psoriatickej koži prevažujú mastocyty a neutrofile produkujúce IL17 nad IL 17 pozitívnymi T Ly (2). Zo získaného imunitného systému sú IL-17A–produkujúce T-Ly aktuálne považované za relevantných účastníkov v patogenéze psoriatických prejavov. IL 17A je v kožných léziách tvorený aj ďalšími typmi T Ly, čo vedie ku zintenzívneniu zápalovej reakcie (3).

Na prítomnosť IL 17A reagujú aj ďalšie bunky vrodenej aj adaptívnej imunity produkciou ďalších zápalových cytokínov v kožných léziách. Na zápalovom precese sa IL 17A a TNF- α podieľajú synergicky (4).

Pôvodný predpoklad, že keratinocyty, kľúčové bunky psoriatických prejavov, sú pasívne sa nepotvrtil. Naopak, keratinocyty reagujú na cytokíny produkované dendritickými bunkami a mastocytmi extrémnou proliferáciou (1) a rovnako ako iné bunky vrodeneho aj získaného imunitného systému produkujú prozápalové cytokíny (5)

Tieto prozápalové cytokíny zasa môžu stimulovať ďalšie uvoľňovanie IL 17 z T Ly, neutrofylov a mastocytov a tak podporovať kolobeh zápalu (2).

Biologická liečba psoriázy.

Biologiká sú určené na liečbu stredne ťažkej až ťažkej ložiskovej psoriázy. Podmienkou liečby biologikami je postihnutie minimálne 10% povrchu kože a PASI skóre, ktoré vyjadruje závažnosť ochorenia, vyššie ako 10. Na liečbu biologikami sú indikovaní pacienti, ktorí nereagujú, majú kontraindikovanú alebo majú nežiaduce prejavy po štandardnej systémovej terapii (cyklosporín, metotrexát, retinoidy, PUVA).

Biologiká založené na inhibícii tumor nekrotizujúceho faktora (TNF-alfa), ktorý aktivuje antigén prezentujúce bunky a tak spúšťa imunitnú odpoveď, poukazovali na prioritnú funkciu imunitných buniek v patogenéze psoriázy. Po objavení prvých dvoch subpopulácií T lymfocytov, Th1 a Th2, sa pozornosť sústredila na subpopuláciu Th1 na základe zvýšenej expresie IL-12. Objavením interleukínu IL-23 sa ukázalo, že stimuluje diferenciáciu nezrelých T lymfocytov na Th 17, ktorej základným cytokínom je IL-17.

Výskum potvrdil, že v patogenéze psoriázy má hlavnú úlohu IL-17 a Th17 bunky, ktoré sa nachádzajú vo veľkom množstve v infiltráte psoriatických ložísk (3,6).

Terapia psoriázy sekukinumabom

Najnovšie poznatky o patogenéze psoriázy sa uplatnili aj v liečbe sekukinumabom, plne humánnou monoklonálnou IgG1k protilátkou, selektívne pôsobiacou proti IL-17A (7), s polčasom rozpadu v sére 4 týždne. IL-17A je kľúčový patogenetický cytokín u psoriázy, ktorý pôsobí priamo na keratinocyty a vedie ich k stimulovaniu sekrécie prozápalových mediátorov. Pôsobenie IL 23 na keratinocyty je nepriame a závisí od IL 17A (8). Sekukinumab nemá väzbovú afinitu k ostatným členom rodiny cytokínov IL-17 ani ku akémukoľvek inému cytokínu, bráni väzbe IL-17A na jeho receptor IL-17Rs a inhibuje produkciu prozápalových mediátorov.

V porovnávacích štúdiách sekukinumabu s ustekinumabom sa ukázala výrazne vyššia účinnosť IL17A inhibítora v porovnaní s IL 12/23 blokátorom. V menších štúdiách zameraných na patogenézu psoriázy, histologickou a molekulárnou analýzou sa zistilo, že inhibícia IL-17A nevedie len ku ovplyvneniu hyperplázie keratinocytov a akantózy, zablokovaním pôsobenia IL-17A na kožné tkanivové bunky, ale aj ku dramatickej redukcii samotných Th 17 buniek, ktoré produkujú IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 a faktory, ktoré riadia Th17, vrátane IL-23. IL-17A zvyšuje pozitívnu spätnú väzbu pre Th17 Ly a udržuje zápal (9). Klinický benefit pôsobenia doteraz používaných TNF-a inhibítorov súvisí so supresiou osy IL-23/IL-17 (10).

V klinických štúdiách sa preukázal rýchly nástup účinku sekukinumabu v dávke 300 mg na 50%-nej redukcii PASI skóre po 3 týždňoch liečby v porovnaní s etanerceptom po 7 týždňoch liečby (11).;

Podiel pacientov, ktorí splnili kritériá pre PASI 90 v 12. týždni bol signifikantne vyšší s každou dávkou sekukinumabu ako s placebom alebo etanerceptom (11).

Bez ohľadu na predchádzajúcu expozíciu biologickým liekom alebo terapeutickým úspech či neúspech prechádzajúcej biologickej liečby, sekukinumab 300 mg bol asociovaný so signifikantne vyššou mierou PASI 90 odpovede ako etanercept alebo placebo

Dávka 300 mg sekukinumabu preukázala vyšší benefit ako dávka 150 mg, bez ohľadu na predchádzajúcu biologickú liečbu(12).

Sekukinumab preukázal silnú a pretrvávajúcu účinnosť počas 2 rokov kedy 88% osôb, liečených sekukinumabom 300 mg si udržalo PASI 75.(13)

Pacienti so psoriázou môžu mať zvýšené riziko vzniku infekcie z dôvodu dlhotrvajúceho užívania imunomodulačnej terapie(14) .Preklinické pozorovania udávali, že, IL-17A je dôležitou ochranou voči kvasinkám a baktériám (15).

Incidencia infekcie, ktorá by viedla k hospitalizácii na 100 pacientorokov, bola dvakrát vyššia ako v kontrolnej skupine (16)

Po 2 rokoch liečby spomedzi špeciálne sledovanými nežiaducimi účinkami (NU) boli najčastejšie kandidové infekcie. V dlhodobom horizonte kandidové infekcie nepredstavujú signifikantný NU a ich incidencia dokonca klesá.

Kazuistiky

Sekukinumab je určený, v druhej línii, na liečbu chronickej ložiskovej psoriázy, ktorá spĺňa podmienky biologickej liečby. Na Dermatovenerologickej klinike v Bratislave je sekukinumabom liečených 12 pacientov, 9 mužov a 3 ženy vo veku od 23 do 73 rokov. Sekukinumab bol podávaný v 0.-4 týždni v dávke 300 mg sc./ týž. a ďalej sa podáva 300 mg raz mesačne.

Piati pacienti prešli na liečbu sekukinumabom, pre postupnú stratu účinnosti po predchádzajúcej liečbe jedným biologikom, ktorá trvala 2-4 roky.

Traja boli liečení adalimumabom, jeden etanerceptom a jeden ustekinumabom. Po postupnej strate účinnosti sa efekt liečby neobnovil ani v kombinácii s metotrexátom, ani pri zintenzívnení liečby u adalimumabu na 40 mg týždenne, resp. u etanerceptu na 50 mg 2x týždenne počas troch mesiacov.

Piati pacienti sú liečení sekukinumabom, ako tretím biologikom v poradí. Z nich sú traja po liečbe adalimumabom a ustekinumabom, z ktorých u jedného bola ukončená liečba adalimumabom z dôvodu NYHA IV, jeden po liečbe etanerceptom a ustekinumabom, kde bola liečba etanerceptom ukončená pre nežiaduci účinok. Jeden pacient bol liečený sekukinumabom v prvoliečbe v rámci klinickej štúdie a druhá biologická liečba, etanercept, mala len minimálny efekt.

Jedna pacientka prešla na liečbu sekukinumabom, po liečbe postupne štyrmi biologikami, ktoré mali slabú účinnosť. Po nasadení sekukinumabu v novembri 2015 sa klinický nález, v priebehu mesiaca upravil z PASI 15,3 na 3,5. Pre intenzívny zápal močových ciest bola ďalšia liečba kontraindikovaná. PASI do júla 2016 stúplo na 29,5. Po konzultácii s nefrológom bol sekukinumab znova nasadený v auguste 2016.

Posledná pacientka bola liečená etanerceptom v rokoch 2012-2014 pričom PASI kleslo z 25,5 na 0,5. posledný pol rok liečby si sťažovala na intenzívne bolesti nôh, ktoré po prerušení terapie ustali. Pre nežiaduce účinky sa pokračovalo v liečbe ustekinumabom, ktorá bola neefektívna, PASI stúplo v priebehu 3 mesiacov na 7,5. Liečba bola zmenená na adalimumab, po aplikácii ktorého PASI kleslo na 1,5, ale znova sa objavili

bolesti dolných končatín. Od októbra 2015 bol nasadený sekukinumab. Po týždni terapie si pacientka sťažovala na pocit pálivej hrče v krku, ktorý sa každou injekciou zvyšoval, Z dôvodu nežiaduceho účinku bola liečba sekukinumabom po mesiaci ukončená.

PASI po jednom mesiaci liečby sekukinumabom u 9 pacientov kleslo z 6,7 – 9,1 na 1,2 – 0,0, u dvoch pacientov sa počas prvého mesiaca prejavil len mierny efekt liečby, PASI kleslo len o 0,5 -1,0. U jednej pacientky bola liečba prerušená ukončená pre nežiaduce účinky.

Diskusia a záver

Z dvanástich pacientov zo sledovaného súboru 9 reagovalo na liečbu sekukinumabom počas indukčnej fázy výrazným poklesom PASI, podobne ako je to uvádzané v klinických štúdiách(11).

Uvádzané zvýšené riziko infekcií (14) sa potvrdilo u jednej pacientky .Rovnaký nežiaduci účinok, ako bol opisovaný pacientkou, nebol ešte opísaný.

Sekukinumab, prvý IL-17A inhibítor bol schválený ako prvá línia systémovej liečby pre stredne ťažkú až ťažkú psoriázu u dospelých European Medicines Agency (EMA)

V klinických štúdiách bola potvrdená účinnosť sekukinumabu a aj superiorita voči placebo aj etanerceptu v dosahovaní PASI 75(17).

Voči ustekinumabu, v dosahovaní čistej alebo takmer čistej kože PASI 90 a 100, sekukinumab preukázal signifikantne vyššiu účinnosť ako ustekinumab vo všetkých výsledných cieľových ukazovateľoch a časových bodoch (18).

Konzistentné výsledky pretrvávajúcej účinnosti boli po 52., 104. aj 156. týždňoch liečby (11)

Sekukinumab má priaznivý profil bezpečnosti porovnateľný s etanerceptom (19).

Bezpečnostné riziko liečby sekukinumabom je manažovateľné. Infekcie horných dýchacích ciest sú väčšinou mierne až stredne ťažké a prechodná reverzibilná neutropénia býva prevažne 1. a 2. stupňa(4).

Kandidové infekcie reagovali na štandardnú liečbu a nevyžadovali prerušenie liečby(17).

Genetický výskum a výsledky klinického skúšania terapeutického efektu inhibítora IL 17A dokazujú, že tento cytokín hrá centrálnu úlohu v patogenéze nielen psoriázy, ale mnohých imunomediovaných ochorení vrátane reumatoidnej artritídy, ankylozujúcej spondylitídy, psoriatickej artritídy a sclerosus multiplex (20)

Sekukinumab je v liečbe psoriázy signifikantne účinnejší v porovnaní s anti-TNFalfa (etanerceptom) a anti-IL12/23 (ustekinumabom) a dosahuje takmer čistú až čistú kožu (PASI 90/100) . Má rýchly nástup účinku u 50% pacientov sa dosiahlo PASI 75 v 4. týž. liečby s pretrvávajúcou vysokou účinnosťou aj po 3 rokoch liečby. Kandidové infekcie reagovali na štandardnú liečbu a nevyžadovali prerušenie liečby(17).

Sekukinumab vykazuje priaznivý bezpečnostný profil a nízku imunogenitu.

Recenzent

1. Doc. MUDr. Dušan Buchvald, CSc., Detská Dermatovenerologická klinika LFUK a DFNSP
2. RNDr. Martin Čente PhD., Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava

LITERATÚRA

1. Nestle F, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009;361:496-509.
2. Lin A, et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol*. 2011;187:490-500
3. Cai Y, et al. Pivotal role of dermal IL-17-producing gd T cells in skin inflammation. *Immunity*. 2011;35:1-15.
4. Chiricozzi A, et al. Integrative responses to IL-17 and TNF- α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2011;131:677-687
5. Res PC, et al. Overexpression of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis. *PLoS*. 2010;5:e14108.
6. Zaba LC, et al. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/ Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2009;129:79-88
7. Hueber W, et al. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci Transl Med*. 2010;2:52ra72.
8. Kim J, Krueger JG. The immunopathogenesis of psoriasis. *Dermatol Clin*. 2015;33:13-23.
9. Hueber, W., et al; Psoriasis Study Group; Rheumatoid Arthritis Study Group; Uveitis Study Group (2010). Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci. Transl. Med.* 2, 52-72.
10. Zaba LC, et al.: Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med*. 2007;204:3183-3194.
11. Langley RG, et al; ERASURE Study Group; FIXTURE Study Group. Secukinumab in plaque psoriasis results of two phase 3 trials. *N Engl J Med*. 2014; 371:326-338.
12. Griffiths CEM, et al. AAD 2015; San Francisco, CA (Poster presentation)
13. Blauvelt A et al. AAD 2015; San Francisco, CA (Oral presentation)
14. Kimball AB et al. *Br J Dermatol*. 2014;170:366-373; 2. Baddley JW et al. *Ann Rheum Dis*. 2014;73;1942-1948;
15. Puel A, , et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 2011;332:65-8.
16. Wakke M et al. Increased risk of infectious disease requiring hospitalization among patients with psoriasis: a population-based cohort *Am Acad Dermatol*. 2011;65:1135-1144;

17. Richard G. Secukinumab in Plaque Psoriasis —Results of Two Phase 3 Trials, *n engl j med* 2014, 24, 371-4
18. Thaci, D: Secukinumab is superior to ustekinumab in clearing skin of subjects with moderate to severe plaque psoriasis: CLEAR, a randomized controlled trial *J Am Acad Dermatol* 2015, 73, 3 400-409
19. Mrowietz et al :Secukinumab retreatment-as-needed versus fixed-interval maintenance regimen for moderate to severe plaque psoriasis: A randomized, double-blind, noninferiority trial (SCULPTURE) 2015, *J Am Acad Dermatol* 2015, 73, 1, 27-36
20. Martin DA, et al. The emerging role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis: pre-clinical and clinical findings. *J Invest Dermatol* 2013; 133:17-26.

OMALIZUMAB V LIEČBE CHRONICKEJ SPONTÁNEJ URTIKÁRIE

Šimaljaková M.

Dermatovenerologická klinika LFUK a UN Bratislava

Abstrakt

Chronická spontánna urtikária (CSU) je časté ochorenie charakterizované výsevom urtík, angioedémom alebo oboma, pretrvávajúcimi dlhšie ako 6 týždňov. Omalizumab je rekombinantná humanizovaná monoklonálna anti-IgE protilátka proti C3 doméne Fc fragmentu IgE, redukuje množstvo voľných IgE. Omalizumab nepriamo znižuje počet Fc ϵ RI receptorov na povrchu buniek, tak redukuje uvoľňovanie histamínu a následne aj symptómy CSU. Päť prípadov z dermatovenerologickej kliniky v Bratislave podporuje výborný efekt omalizumabu u pacientov s CSU.

Abstract

Chronic spontaneous urticaria (CSU) is a common disease characterized by the presence of wheals, angioedema, or both, repeated episodes for more than 6 weeks. Omalizumab is a recombinant, humanized, monoclonal, anti-IgE antibody that targets the C3 domain of the Fc region of IgE, reducing the levels of free IgE by sequestration. Omalizumab can also indirectly cause the downregulation of cell-surface FcRI receptors, which may

reduce the potential for histamine release and the subsequent symptoms of CSU.

Five cases from Department of Dermatovenerology in Bratislava support excellent effect of omalizumab in patients suffering from CSU.

Úvod

Urtikária je ochorenie podmienené rýchlo vznikajúcimi a rýchlo zanikajúcimi, svrbivými plochými bielymi až ružovočervenými urtikami, na podklade edému papilárnej vrstvy kória. V patogenéze urtikárie hrajú hlavnú úlohu mastocyty a bazofily. Stimulácia týchto buniek vedie k ich degranulácii a k uvoľneniu histamínu, bradykinínu, leukotriénov, prostaglandínu a ďalších vazoaktívnych látok s následnou vazodilatáciou a tvorbou urtík. Súčasne sú uvoľňované aj chemoatraktanty pre neutrofile, eozinofily a pod., ktoré sa zúčastňujú urtikariálnej reakcie. Podľa priebehu delíme urtikáriu na akútnu a chronickú. Chronická urtikária je charakterizovaná intermitentným alebo kontinuálnym výsevom urtík, ktorý trvá dlhšie ako 6 týždňov. Urtikária môže, ale nemusí byť sprevádzaná angioedémom, opuchom kože, podkožia a slizníc.

Chronická spontánná urtikária (CSU)

Pod pojem chronická urtikária sa zaraďujú tri podtypy ochorenia, indukovateľná urtikária, urtikária na podklade zistiteľných príčin, zmien a ochorení organizmu a chronická spontánná urtikária.

Pri chronickej urtikárii je cieľom zistiť vyvolávajúci faktor ochorenia, ktorými môžu byť fyzikálne príčiny, vírusy, baktérie, parazity a podobne. Pri chronickej spontánnej urtikárii sa v súčasnosti, aj napriek snahe, príčina vzniku urtík a/alebo angioedému nedá úplne zistiť.

Prevalencia CSU je asi 1%, dvakrát – trikrát častejšie sú postihnuté ženy s priemerným vekom 42 rokov.(1) Diagnostika chronickej spontánnej urtikárie sa opiera o dôslednú anamnézu a typický klinický obraz ochorenia. Odporúča sa vyšetriť sedimentáciu erythrocytov, CRP, krvný obraz a diferenciál. Ďalšie vyšetrenia sa indikujú na základe anamnézy.

Spoluúčasť v patogenéze CSU majú aj ďalšie mediátory, čo podporuje aj fakt, že u časti pacientov s týmto ochorením sú antihistaminiká neúčinné. V rámci nových poznatkov, pod chronickú spontánnu urtikáriu zaraďujeme aj autoimunitný proces s histamín uvoľňujúcimi autoprotilátkami. Pri CSU sú asi v 35-40% prípadov bazofily a mastocyty aktivované IgG autoprotilátkami proti alfa podjednotke na Fc receptore IgE tj. anti –FcεR(2) alebo v 5-10% prípadov anti IgE autoprotilátkami. (3) Táto reakcia môže byť rozšírená aktiváciou komplementu a produkciou C5a štepov, ktorých receptory C5aR sa nachádzajú na mastocytoch v koži. C5a nevedú len k aktivácii mastocytov, ale pôsobia tiež aj ako chemoatraktant neutrofilov a eozinofilov a prispievajú k ich štepovakumulácii v kožných léziách.

Ďalším novým poznatkom, v etiopatogenéze CSU je dysregulácia vnútrobunkovej signálnej cesty v bazofiloch a v mastocytoch, porušená odpoveď vrodenej imunity, aktivácia vonkajšej koagulačnej dráhy (4) a aj pravdepodobný zápalový pôvod CSU, ktorého dôkazom sú signifikantne vyššie zápalové markery, korelujúce so závažnosťou ochorenia (5)

Autoimunitný pôvod chronickej spontánnej urtikárie sa dá dokázať skriningovým kožným testom s autológnym sérom (ASST), ktorého pozitivita dokazuje cirkulujúce autoprotilátky zodpovedné za uvoľnenie histamínu z mastocytov a z bazofilov. (6)

Vzhľadom na súčasné obmedzené možnosti dôkazu etiológie CSU, hlavným cieľom jej liečby je odstránenie symptómov ochorenia, výsevov urtík, pruritu, edémov a bolesti, ktoré výrazne obmedzujú pacienta a zhoršujú kvalitu jeho života. Na hodnotenie aktivity ochorenia sa odporúča jednoduchý bodový systém UAS7, pri ktorom pacient hodnotí počet urtík a intenzitu pruritu počas siedmich po sebe nasledujúcich dní.

Terapia CSU

Liečba CSU podľa odporúčaní EAACI/GA²LEN/EDF/WAO z roku 2014

V liečbe chronickej spontánnej urtikárie sa v prvej línii podávajú druhogeneračné H1 antihistaminiká v schválenej dávke. V druhej línii, ak symptómy ochorenia pretrvávajú

vajú dlhšie ako 2 týždne, sa dávka antihistaminík zvyšuje až štvornásobne V tretej línii, ak symptómy pretrvávajú 1-4 týždne, sa k liečbe z druhej línie pridáva omalizumab, cyklosporín A alebo montelukast. Pri exacerbácii prejavov sa odporúča krátkodobo, počas desiatich dní, podávať systémové kortikosteroidy. Druhá línia liečby a terapia cyklosporínom A alebo montelukastom z tretej línie je v indikácii chronickej urtikárie mimo rámca ich SPC. Druhoheneračné antihistaminiká sú prvou voľbou pri terapii urtikárie pre ich dobrú účinnosť, minimálny resp. žiadny sedatívny účinok a minimálne nežiaduce účinky a interakcie. Dlhodobo podávané antihistaminiká sú účinné skoro u 50% pacientov s CSU (7).

V prípade, že symptómy ochorenia neustupujú, dávka antihistaminík sa zvyšuje až štvornásobne z čoho profitujú ¾ pacientov s CSU, bez výskytu nežiaducich účinkov (8).

Omalizumab

V tretej línii liečby CSU má indikačné schválenie omalizumab. Omalizumab je rekombinantná, humanizovaná monoklonálna protilátka proti IgE. Omalizumab formuje malé IK s voľnými IgE protilátkami, ktoré sa viažu špecificky k oblasti IgE (Cε3), ktorá reaguje s FcεRI, receptorom na bazofiloch a mastocytoch. Preferenčná väzba k omalizumabu znamená, že IgE nedokážu reagovať s FcεRI a nemôžu spustiť alergickú kaskádu. Tým, že omalizumab je zacielený proti IgE, prerušuje niektoré kľúčové zložky zápalovej kaskády. Viaže sa na voľný IgE, čím dochádza k zníženiu jeho hladiny, s následným výrazným znížením expresie FcεRI receptora na mastocytoch a bazofiloch. Výsledkom je znížená aktivácia a senzitivita mastocytov a redukcia prívlu a aktivácie eozinofilov. Následkom je podstatný pokles uvoľňovania zápalových mediátorov a výrazná redukcia zápalu(9,10). Okrem jasného modulovania IgE-FcεRI osy omalizumabom, ostávajú nevyjasnené ďalšie cesty jeho pôsobenia, ku ktorým patrí klinická odpoveď u ostatných subtypov CU nezávisle na hladine IgE. Približne 1/3 pacientov s chronickou urtikáriou má antithyreoglobulínové alebo antimikrozomálne protilátky a asi 1/5 má abnormálnu funkciu štítnej žľazy. (11)

Pozitívny anti-FcεR test potvrdzuje autoimunitný pôvod ochorenia, ale neurčuje, ktoré protilátky sa v organizme nachádzajú (6).

Dávkovanie omalizumabu, na základe výsledkov klinických štúdií, pre diagnózu CSU je 300 mg sc raz mesačne.

Pri liečbe CSU omalizumabom sa stretávame s non respondermi, ktorí v minulosti reagovali na liečbu kortikoidmi (12). Niektorí pacienti sú postupne na omalizumab rezistentní (12) čo môže poukazovať na fakt, že patogenéza ochorenia prebieha viacerými cestami. Bol dokázaný efekt omalizumabu na redukciu hladiny D-diméru v plazme (13) čo nepriamo potvrdili klinické štúdie o kladnom efekte antikoagulačnej liečby na CSU (14). Efekt omalizumabu ustáva jeden mesiac po ukončení terapie a nezanecháva žiadny vplyv na bunkami podmienenú zápalovú reakciu (15).

Diferenciálna diagnostika

Diagnostika CSU je založená najmä na anamnéze, ku ktorej priradujeme základné rutinné vyšetrenie zápalových parametrov a diferenciál krvného obrazu. V diferenciálnej diagnostike je nevyhnutné vylúčiť ochorenia, u ktorých sa vyskytuje urtikám podobný výsev. K tomuto klinickému obrazu patria viaceré autoimunitné ochorenia. Urticaria vasculitis má bolestivé pretrvávajúce urtiky, modriny, pigmentácie, celkové príznaky a diagnóza sa potvrdí histologickým vyšetrením. Lupus erythematosus sa prejavuje celkovými príznakmi, teplotou, chudnutím, bolesťami kĺbov a zhoršením nálezu vplyvom UV žiarenia. Pre Schnitzler syndróm okrem výsevov urtik sú typické bolesti kĺbov, teplota, monoklonálna gammapatia (IgM, IgG) hepatosplenomegália. Pri kryoglobulinémii je prítomný výsev urtik, purpura, artralgie, lymfadenopatia, hepatosplenomegália, periferná neuropatia, Raynaudov fenomén a glomerulonefritída. Polymorfná erupcia v gravidite vzniká v poslednom trimestri gravidity. Výsevy urtik sprevádzajú aj mastocytózu a hypereozinofilný syndróm. Pri angioedéme treba odlíšiť hereditárny angioedém, ktorého podkladom je deficitom/defektom inhibítora C1 komplementového systému (C1-INH) alebo bez jeho deficitu.

Kazuistiky

Na Dermatovenerologickej klinike LFUK a UN v Bratislave liečime omalizumabom 5 pacientov s diagnózou CSU. V súbore sú dvaja muži a 3 ženy vo veku od 29 do 72 rokov s trvaním ochorenia od 6 mesiacov do 12 rokov.

Kazuistika 1. 30-ročný muž, ktorého matka má astmu a brat má rhinitis alergica

Pacient mával časté tonzilitídy a v 10-r. mu zistili poruchu celulárnej imunity, na liečbu si nepamätá. Je precitlivý na penicilín acylpyrín a leukoplast.

Výsevy urtik mal od r. 2004 so záverom tlaková urtikária. Od januára 2014 mal denne výsevy urtik. Základné vyšetrenia boli v norme. Užíval antihistaminiká 1-2 tbl denne

V júni 2014 bol podaný depotný kortikoid im, po ktorom bol 4 dni bez výsevu. Následne sa stav náhle zhoršil, opuchol na tvári, mal generalizovanú urtikáriu, bol hospitalizovaný. Z vyšetrení mal leukocytózu, bolesti kĺbov. Bol vyšetrený reumatológom pre susp.- Schnitzlerov sy., Imunologické vyšetrenie bolo negatívne. Štvornásobná dávka antihistaminík, bola bez efektu. Pred liečbou omalizumabom mal UAS7 42 a opakované edémy tváre.

Vo februári 2015 podaný omalizumab v dávke 300 mg sc./mes., po 4 dňoch bolo UAS7 – 0 a edémy nevznikli. Počas 6 mesiacov liečby bol bez klinických prejavov ochorenia a bez bolestí kĺbov. V júli 2015 bola ukončená liečba omalizumabom. Od augusta 2015 mával výsevy urtik a angioedémy, ktoré sa od septembra 2015 opakovali denne.

Vo februári 2016 znova nasadený omalizumab v dávke 300 mg sc / mes., po týždni bol bez klinických prejavov CSU a tento stav počas liečby pretrváva.

Kazuistika 2. 62-ročná žena, ktorej matka mala diabetes mellitus a rakovinu hrubého čreva.

Pacientka má astmu, hypotyreózu a artériovú hypertenziu. Udáva alergiu na penicilín, Ibalgin, Supralip, anopyrín, Bioparox, Symbicort, z jedla na jablko, citrusy, orechy a med.

Od r. 2010 má výsevy urtik a edémy tváre. V roku 2013 užívala 9 mesiacov omarit v schválenom dávkovaní a bola bez výsevov. Od januára 2014 má denné výsevy urtik. Užívala kortikoidy a antihistaminiká bez efektu. Základné vyšetrenia boli negatívne. Eliminačná diéta bola bez efektu. Po antihistaminikách v 4 –násobnej dávke udávala len mierne zlepšenie klinického stavu.

Pred liečbou omalizumabom mala UAS7 – 37 a angioedémy 2-3-x týždenne.

V máji 2015 nasadený omalizumab 300 mg sc/mes.. Výsevy pretrvávali v menšom rozsahu

V júni 2015 bola 1x bez výsevu a bez edémov. V novembri 2015 mala urtiky ojedinele, angioedém nemala, pruritus bol minimálny. Omalizumab bol po 6 mesiacoch vysadený.

V júli 2016 bol pre diseminovaný výsev urtik znova nasadený omalizumab v dávke 300 mg sc/ mes. s následným ústupom klinických prejavov CSU.

Kazuistika 3. 59 ročná žena. Brat zomrel na karcinóm pľúc. Pacientka má hypotyreóza, artériovú hypertenziu a panickú poruchu. Má alergiu na Biseptol.

Od augusta 2014 mala denné výsevy urtik a edémy tváre. Po podaní depotného kortikoidu bola 10 dní bez prejavov. Základné vyšetrenia boli negatívne. Antihistaminiká v 4 –násobnej dávke a kortikoidy boli bez efektu. Pred liečbou omalizumabom mala UAS7 – 32, angioedémy tváre denne. V decembri 2015 bol podaný omalizumab 300 mg sc.. Do týždňa bola bez výsevu a bez edémov. 31. 12. 2015, pri zápale horných dýchacích ciest s teplotou 40°C, mala výsev urtik na celom tele, s angioedémom tváre s intenzívnym pruritom.

Užívala Klacid 700 mg denne po, z vyšetrení mala zvýšené zápalové parametre – CRP 79,98, FW 12/20, Leu 11,34. K liečbe bol pridaný Prednison v dávke 40 mg.

Od januára 2016 do mája 2016 užívala omalizumab v dávke 300 mg mesačne sc s postupným ústupom prejavov CSU. Terapia ukončená v máji 2016 na žiadosť pacientky. Žiadosť odôvodnila zvýšením hmotnosti od augusta 2015 o 25 kg v dôsledku retencie tekutín, ktorú mienila riešiť.

Kazuistika 4. 71 r. žena, ktorej otec zomrel na karcinóm pľúc, matka na infarkt. Pacientka je liečená na artériovú hypertenziu. Udáva alergiu na brezu, plesne a kandidy.

V rokoch 2007- 2010 mala intermitentne výsevy urtik, edémy tváre a dusenie. Od roku 2010 do 2015 bola bez ťažkostí, aj bez liečby. V júni 2015 sa náhle začala dusiť a mala výsevy urtik. Bola liečená antihistaminikami, diétou a v novembri 2015 mala nasadené kortikoidy celkovo. V decembri 2015 bola hospitalizovaná pre recidivujúci

angioedém pier, jazyka a tváre. V januári 2016 boli vysadené kortikoidy. Pretrvávalo svrbenie a edémy dlaní, stupajú a ojedinelé urtiky na tele. Od februára 2016 bol nasadený omalizumab 300 mg sc. V auguste 2016 bola bez prejavov, len ojedinele pociťovala svrbenie stupajú.

Kazuistika 5. 29 r., muž, ktorého matka zomrela na zlyhanie orgánov, otec má hypertenziu,

Pacient trpí od detstva na migrény s vertigom a so zrakovou aurou. Má alergiu na Fromilid.

Je fajčiar. Od marca 2016 má denne výsevy urtik. Bol liečený kortikoidmi, antihistaminikami s malým efektom. V máji 2016 z vyšetrení mal zvýšené hladiny triacylglycerolu, pečňových enzýmov a IgE mal 1846,5ug/l.

Pred liečbou omalizumabom mal UAS7 – 27. Od júla 2016 nasadený omalizumab 300 mg sc/mes. Pri kontrolnom vyšetrení v auguste 2016 výsevy pretrvávajú v minimálnom rozsahu.

Pacient sa sťažoval na intenzívnejšie vertigo, potenie a bolesti kĺbov a bol odoslaný na konziliárne endokrinologické vyšetrenie.

Diskusia a záver

CSU je ochorenie, ktoré postihuje približne 1% obyvateľstva, najmä ženy. V liečbe, pri neúčinnosti druhogeneračných H1 antihistaminík v 4-násobnom dávkovaní, je indikovaný omalizumab, ktorý sa vyznačuje rýchlym nástupom účinku a vysokou bezpečnosťou. Za rýchly účinok je zodpovedná väzba na Cε3 doménu solubilného IgE s následným zamedzením väzby na FcεRI na bazofiloch a mastocytoch. Rovnako, ako aj tvorba trimérových a hexamérových komplexov, ktorá vedie k zablokovaniu anti IgE protilátok(16). Rýchly nástup účinku omalizumabu, do 3-4 dní, sa prejavil aj u našich pacientov. Dve pacientky mali zníženú funkciu štítnej žľazy, čo sa tiež dáva do súvisu s CSU (11). Všetci naši pacienti boli precitlivení na jeden až viac liekov, resp. na potraviny a peľ, mali sami alebo v rodine migrénu, astmu, alergickú rinitídu, čo poukazuje na rizikový terén aj pre CSU. U všetkých pacientov približne 6 týždňov po vysadení omalizumabu sa postupne vrátili klinické prejavy CSU podobne, ako sa uvádza v literatúre. Omalizumab je liek, ktorý zmierňuje až eliminuje symptómy CSU, ale nie je schopný je vyliečiť.

Recenzent

1. Doc. MUDr. Dušan Buchvald, CSc., Detská Dermatovenerologická klinika LFUK a DFNSP
2. prof. RNDr. Eva Kontseková, DrSc., Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava

LITERATÚRA

1. Maurer M, et al. Questions and answers in chronic urticaria: where do we stand and where do we go? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016 30 Suppl 5, 7-15
2. Yadav S, et al. Chronic urticaria: An overview. *Indian J Dermatol* 2006;51(3):171–177
3. Kaplan AP Clinical practice. Chronic urticaria and angioedema. *N Engl J Med* 2002;346(3):175–179;
4. Jain S. Pathogenesis of chronic urticaria: an overview. *Dermatol Res Pract.* 2014:674-709.
5. Cugno M, Asero R, Tedeschi A, et al. Inflammation and coagulation in urticaria and angioedema. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012;10:653–658.
6. Ferrer, M. Immunological events in chronic spontaneous urticaria, *Clin. Trans Allergy* 2015, 5, 30
7. Maurer M, Weller K, Bindslev-Jensen C, et al. Unmet clinical needs in chronic spontaneous urticaria. A GA2LEN task force report. *Allergy.* 2011;66:317–330.
8. Maurer, M et al.: Current and future therapies for treating chronic spontaneous urticaria, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2016 10.1517/14656566.2016.1159298
9. Rabe KF, et al.: Can anti-IgE therapy prevent airway remodeling in allergic asthma? *Allergy* 2011,66, 1142–51.
10. Galli SJ, Tsai M.: IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012;18,693–704.
11. Altrichter S, et al. IgE Mediated Autoallergy against Thyroid Peroxidase – A Novel Pathomechanism of Chronic Spontaneous Urticaria? *PloS One* 2011; 6(4): e14794.
12. Sussman G, et al. Real-life experiences with omalizumab for the treatment of chronic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014;112:170-4.
13. Yalcin AD, Celik B, Gumuslu S. D-dimer levels decreased in severe allergic asthma and chronic urticaria patients with the omalizumab treatment. *Expert Opin Biol Ther* 2014;14:283-6.
14. Parslew R, Pryce D, Ashworth J, Friedmann PS. Warfarin treatment of chronic idiopathic urticaria and angio-oedema. *Clin Exp Allergy* 2000;30,1161-5.
15. Asero, R et al. Current challenges and controversies in the management of chronic spontaneous urticaria *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2015, 11(10), 1073–1082.
16. Hochhaus G et al. Pharmacodynamics of omalizumab: implications for optimised dosing strategies and clinical efficacy in the treatment of allergic asthma. *Curr Med Res Opin* 2003,19, 491-498.

MOŽNÉ POSTUPY PRI ALERGÉNOVEJ IMUNOTERAPII VČELÍM A OSÍM EXTRAKTOM

Nemšovská J.

Dermatovenerologická klinika LF UK a UN Bratislava

Súhrn

Precitlivenosť na jed blanokrídleho hmyzu je častou príčinou anafylaxie a môže viesť k život ohrozujúcemu stavu. Liečba alergie na jed blanokrídleho hmyzu zahŕňa liečbu akútnych reakcií a dlhodobé liečebné stratégie s cieľom minimalizovať riziko nasledujúcich reakcií. Kauzálnou liečbou ochorenia u pacientov so systémovou reakciou po bodnutí hmyzom je alergénová imunoterapia. Alergénová imunoterapia hmyzím jedom prebieha v dvoch fázach, iniciálnej a udržiavacej. Podľa frekvencie podávania zvyšujúcich sa dávok alergénu v iniciálnej fáze rozoznávame viaceré liečebné režimy: udržiavacia dávka môže byť dosiahnutá v priebehu jedného dňa (zrýchlený režim typu „ultra-rush“), po dvoch až piatich dňoch (zrýchlený režim typu „rush“), alebo v priebehu niekoľkých týždňov až mesiacov (režim typu „cluster“, štandardný režim). Výhodou zrýchlených režimov je rýchlejší nástup ochranného efektu liečby, nevýhodou je vyššie riziko anafylaxie navodenej s podávaným alergénom.

Kľúčové slová: alergia na jed blanokrídleho hmyzu, alergénová imunoterapia jedom hmyzu, zrýchlené režimy

Summary

Possible treatment protocols for venom immunotherapy

Venom allergy is a common cause of anaphylaxis and may be fatal. The management of hymenoptera venom allergy includes short-term interventions to treat acute reactions and long-term strategies to minimize the risk of consecutive reactions. Venom immunotherapy (VIT) is the only specific treatment, which is currently available for patients with a history of systemic reaction to a hymenoptera insect sting. There are 2 phases of VIT: the initial build-up phase and the maintenance phase. There are numerous protocols for dose increase during the initial phase of VIT: the maintenance dose may be reached within one day (ultra-rush), after two to five days (rush) or within weeks or months (cluster, conventional). The aim of rapid protocols is to achieve more rapid protection from repeated stings, but there is serious risk of anaphylaxis during the treatment.

Key words: venom allergy, venom immunotherapy, rapid protocols

Úvod

Alergia na jed blanokrídleho hmyzu predstavuje vzhľadom na riziko vzniku závažných až fatálnych reakcií vážny medicínsky problém. Aspoň raz za život je bodnutých 56,6 – 94,5 % ľudí. Prevalencia senzibilizácie na jed blanokrídleho hmyzu v dospeljej populácii kolíše medzi 9,3 % a 38,7 %. Prevalencia veľkej lokálnej reakcie sa pohybuje medzi 2,4 % a 26,4 % a systémovej reakcie medzi 0,3 % a 7,5 %. Fatálne reakcie po bodnutí hmyzom sú zriedkavé, vyskytujú sa v 0,03 – 0,48 prípadov na 100 000 obyvateľov za rok (2,9).

Terapia alergie na jed blanokrídleho hmyzu zahŕňa liečbu akútnych reakcií a dlhodobé liečebné stratégie s cieľom minimalizovať riziko nasledujúcich reakcií. Terapia akútnych reakcií je symptomatická. K dlhodobým liečebným stratégiám patrí eliminácia alergénu (edukáciou pacienta), preskripcia pohotovostného balíčka a špecifická alergénová imunoterapia, ktorá predstavuje kauzálnu liečbu precitlivenosti I. typu (15).

Alergénová imunoterapia

Alergénová imunoterapia hmyzím jedom (Venom immunotherapy - VIT) je vysoko efektívna: v 95 % prípadov pacientov alergických na jed osy a v 80 % prípadov pacientov alergických na jed včely zabráni pri opätovnom bodnutí systémovej reakcii (4,17). VIT sa indikuje u pacientov s anamnézou ťažkej systémovej reakcie po bodnutí (prítomnosť respiračných alebo kardiovaskulárnych symptómov) a dokázanou IgE sprostredkovanou precitlivenosťou. U pacientov s anamnézou miernej systémovej reakcie sa podľa odporúčaní EAACI (European Academy of Allergology and Clinical Immunology) a BSACI (British Society for Allergy and Clinical Immunology) VIT podáva vtedy, ak sú prítomné ďalšie rizikové faktory, ako vysoké riziko následného bodnutia (včelári, záhradníci), zvýšená bazálna hladina sérovej tryptázy, mastocytóza, alebo zhoršenie kvality života (9). Naopak, odporúčania v Severnej Amerike indikujú VIT u všetkých dospelých pacientov bez ohľadu na závažnosť systémovej reakcie (22). Rovnako Joint Council of Allergy, Asthma and Immunology odporúča VIT u všetkých pacientov nad 16 rokov nezávisle od stupňa systémovej reakcie a rizikových faktorov (10), vzhľadom na to, že vo viacerých štúdiách sa dokázalo, že predchádzajúca ľahká systémovej reakcia po bodnutí hmyzom predstavuje rizikový faktor pre neskoršiu ťažkú anafylaxiu (22).

Pri VIT sa používa výhradne injekčná alergénová imunoterapia, iné aplikačné cesty sa v súčasnej dobe považujú za neoverené. Vakcíny musia byť štandardizované, vyrábané modernými postupmi a s dokázanou liečebnou účinnosťou radom klinických štúdií (6). Vakcíny môžu byť depotné (alergénové extrakty viazané na hydroxid hliníty) alebo vodné. Depotné prípravky sa lepšie tolerujú a majú nižšie riziko anafylaxie. Vodné prípravky sú určené pre zrýchlené režimy (17). V udržiavacej fáze sa používajú výlučne depotné prípravky (25). V Slovenskej republike nie sú vodné alergénové prípravky na VIT registrované.

V Slovenskej republike máme k dispozícii prípravok určený na VIT s včelím (*Apis mellifera*) alebo osím jedom (*Vespa* spp) – extraktom viazaným na hydroxid hlinitý. V prípade dokázanej precitlivenosti na jed sršňa sa na základe signifikantnej skríženej reaktivity alergénov rôznych druhov ôs a sršňov na VIT používa osí extrakt, podobne pri precitlivenosti na jed čmeľa sa na VIT používa včelí extrakt. Alergénu jedu včely a čmeľa vykazujú vysokú skríženú reaktivitu, čo súvisí s vysokým stupňom homológie jednotlivých zložiek jedu (26). Pri dôkaze skutočnej dvojitej senzibilizácie sa, vzhľadom na možnosť vzniku celkovej reakcie po bodnutí ktorýmkoľvek hmyzom (včelou aj osou, prípadne čmeľom, sršňom), odporúča imunoterapia oboma jedmi (13).

Mechanizmus účinku

Mechanizmus účinku špecifickej alergénovej imunoterapie je založený na indukcii periférnej tolerancie (1). Alergénová imunoterapia zasahuje komplexne do celého reťazca alergickej reakcie, od prezentácie antigénu, cez zásah do dysbalancie cytokínovej produkcie Treg, T_H1 , T_H2 , až po zníženie počtu a aktivity efektorových buniek zápalu. Počas úspešnej alergénovej imunoterapie dochádza k normalizácii patologickej prevahy cytokínovej produkcie T_H2 lymfocytov smerom k zvýšeniu tvorby cytokínov produkovaných T_H1 lymfocytmi. Pozoruje sa skorá produkcia IL-10 a zvýšenie tvorby TGF- β , čo pretrváva viac ako rok po imunizácii a je sprevádzané zvýšenými hodnotami špecifických protilátok IgG4 a IgA. Pokles hladín IgE v sére je neskorý, relatívne malý a slabo koreluje s klinickým zlepšením. Najvýraznejšie zmeny sa pozorujú v pomere sIgG4 (špecifické IgG4) ku sIgE v prospech sIgG4. Napriek tomu výsledky *in vitro* a *in vivo* testov ako absolútna kontrola úspešnosti VIT nepostačujú (9).

Manažment

VIT prebieha v dvoch fázach, iniciálnej a udržiavacej. V iniciálnej fáze sa dávka alergénu postupne zvyšuje podľa odporúčaných schém až do dosiahnutia tzv. udržiavacej dávky. Odporúčaná udržiavacia dávka je 100 μ g jedu. Vzhľadom na to, že VIT včelím jedom je menej účinná ako VIT osím jedom, možno u dospelých pacientov s precitlivenosťou na jed včely s rizikovými faktormi zvýšiť udržiavaciu dávku na 150 – 200 μ g. Zvýšenie dávky sa odporúča u včelárov a pacientov s mastocytózou (3, 23). Podľa frekvencie podávania zvyšujúcich sa dávok alergénu rozoznávame viaceré liečebné režimy, od konvenčných až po ultra-rýchle. Výhodou zrýchlených režimov je skoršie dosiahnutie udržiavacej dávky a tým rýchlejší nástup ochranného efektu liečby, na druhej strane sú rýchle protokoly zaťažené vyšším rizikom anafylaxie. V rámci jednotlivých režimov je k dispozícii viacero protokolov.

- Štandardný režim – podáva sa jedna dávka alergénového extraktu 1 – 2x týždenne s postupne sa zvyšujúcim množstvom alergénu. Dosiahnutie udržiavacej dávky trvá priemerne 2 – 3 mesiace.

Príkladom je protokol používaný v Alergologickej ambulancii Dermatovenerologickej kliniky LF UK a UNB. Množstvo podávaného alergénu v jednotlivých dávkach sa zvyšuje podľa nasledujúcej schémy: 0,02 µg, 0,04 µg, 0,08 µg, 0,2 µg, 0,4 µg, 0,8 µg, 2 µg, 4 µg, 8 µg, 10 µg, 20 µg, 40 µg, 60 µg, 80 µg, 100 µg.

- Zrýchlený režim typu „cluster“ – podáva sa niekoľko dávok alergénového extraktu denne (zvyčajne 3 každých 30 – 45 min) s týždňovými intervalmi. Udržiaciu fázu dosiahneme o 5 – 7 týždňov.

Príkladom je protokol uvedený v dávkovaní a spôsobe podávania prípravku určitého na alergénovú imunoterapiu v SPC (Summary of product characteristics; súhrn charakteristických vlastností lieku) (Tab. 1), prípadne protokol používaný v Alergologickej ambulancii Dermatovenerologickej kliniky LF UK a UNB (Tab. 2), používaný na základe dlhoročných skúseností alergologickej ambulancie OKIA Podunajské Biskupice, neskôr OÚSA Bratislava.

Zrýchlený režim typu „cluster“ – protokol uvedený v SPC

týždeň	číslo injekcie	množstvo alergénu v µg
1	1	0,01
	2	0,1
	3	1
2	4	2
	5	4
3	6	6
	7	10
4	8	10
	9	20
5	10	30
	11	30
6	12	50
	13	50
7	14	100

Tab. 1 Zrýchlený režim typu „cluster“ – protokol uvedený v SPC

Alternatívny režim typu „cluster“

deň	číslo injekcie	množstvo alergénu v µg
1	1	0,02
	2	0,04
	3	0,08
8	4	0,2
	5	0,4
	6	0,8
15	7	2
	8	4
	9	8
22	10	10
	11	30
	12	60
29	13	100

Tab. 2 Alternatívny režim typu „cluster“

- Zrýchlený režim typu „rush“ – podáva sa niekoľko dávok alergénového extraktu denne (maximálne 4 jednotlivé dávky v intervale 30 – 45 min) niekoľko dní za sebou. Udržiavacia dávka sa dosiahne v priebehu niekoľkých dní.

Príkladom môže byť zrýchlený protokol používaný v Alergologickej ambulancii Dermatovenerologickej kliniky LF UK a UNB (Tab. 3).

Zrýchlený režim typu „rush“ – protokol používaný v Alergologickej ambulancii Dermatovenerologickej kliniky LF UK a UNB

deň	číslo injekcie	množstvo alergénu v µg
1	1	0,02
	2	0,2
	3	2
	4	6
2	5	10
	6	30
	7	60
8	8	100

Tab. 3 Zrýchlený režim typu „rush“ – protokol používaný v Alergologickej ambulancii Dermatovenerologickej kliniky LF UK a UNB

- Zrýchlený režim typu „ultra-rush“ – umožňuje dosiahnutie udržiavacej dávky za jeden deň (väčšinou do 12 hodín).

Príkladom je protokol používaný na Oddelení alergologie a imunologie FNOL v Olomouci v Českej republike, kedy sa každých 30 – 45 min sa podáva injekcia s postupne sa zvyšujúcim množstvom alergénu podľa nasledujúcej schémy: 0,02 µg, 0,2 µg, 2 µg, 10 µg, 30 µg, 60 µg.

V udržiavacej fáze sa v prvom roku interval medzi jednotlivými dávkami postupne predlžuje na 4 týždne, v nasledujúcich rokoch na každých 4 – 6 týždňov, pričom dávka alergénu ostáva rovnaká. Pri VIT včelím jedom u dospelých predĺženie intervalu na 8 týždňov neznížilo účinnosť terapie (19).

VIT sa realizuje v zdravotníckom zariadení, ktoré má skúsenosti a znalosti v danej oblasti, a ktoré je dostatočne personálne aj prístrojovo vybavené pre prípad nutnosti riešenia eventuálne vzniknutej akútnej anafylaktickej reakcie. Hoci viaceré štúdie potvrdili dobrú toleranciu zrýchlených schém, zrýchlené režimy typu „rush“ a „ultra-rush“ sa pre zvýšené riziko anafylaxie realizujú za nemocničných podmienok(16).

Kontraindikácie

Medzi dočasné kontraindikácie VIT patrí akútna infekcia, zle kompenzovaná astma a aktuálne prebehnuté očkovanie proti rôznym infekčným agensom (7). Dlhotrvajúcimi kontraindikáciami VIT sú ťažké imunodeficientné stavy, kardiovaskulárne ochorenia a respiračné ochorenia, závažné ochorenia obličiek, pečene a štítnej žľazy, hematologické ochorenia, malignity, epilepsia, psychické poruchy. Rozhodnutie pre a proti VIT v prípade týchto dlhotrvajúcich kontraindikácií je individuálne, v spolupráci s lekárom liečiacim sprievodné ochorenie pacienta, so starostlivým posúdením benefitov a rizík plánovanej liečby (11). Za kontraindikáciu sa považuje aj terapia betablokátormi a inhibítormi enzýmu konvertujúceho angiotenzín (12, 20).

Systémové reakcie v gravidite sú spojené s vysokým rizikom pre matku aj plod, čo môže vyústiť do potratu alebo poškodenia plodu. Preto by u žien v produktívnom veku mala byť začatá VIT pred tehotenstvom. Pokiaľ pacientka otehotnie počas VIT, nie je kontraindikované pokračovať v dobre tolerovanej udržiavacej liečbe, ale vzhľadom na riziko anafylaxie, ktoré je vyššie v iniciálnej fáze terapie, by sa VIT nemala v gravidite začínať.

Alergénová imunoterapia je kontraindikovaná aj pri alergických reakciách vyvolaných iným typom imunitnej reakcie ako IgE mechanizmom.

Nežiaduce účinky a riziká

Rizikom liečby je vznik nežiaducich reakcií, ktoré sa ničím nelíšia od reakcií po bodnutí blanokrídlym hmyzom. Stretáme sa s nimi častejšie v iniciálnej fáze liečby. Môžu byť lokálne alebo systémové, včasné (do 30 min) alebo neskoré (6 – 24 h).

Lokálne reakcie (erytém, edém) vzniknuté v mieste aplikácie alergénu, sú veľmi

časté na začiatku iniciálnej fázy terapie. Ich intenzita v priebehu VIT postupne klesá. V terapii sa využívajú ľadové obklady, topické kortikosteroidy, podľa potreby súčasná liečba antihistaminikami alebo montelukastom. Liečba antihistaminikami ani montelukastom neznižuje účinok VIT (14, 27).

Výskyt systémovej reakcie sa počas iniciálnej fázy VIT udáva medzi 3,1 % až 50 %. V literatúre sa často ako vedľajší účinok liečby opisuje únava a bolesti hlavy (18). Systémové reakcie sa vyskytujú osemkrát častejšie pri VIT včelím extraktom ako osím extraktom (21, 24). Výskyt celkových reakcií je častejší u pacientov so zvýšenou bazálnou hladinou sérovej tryptázy alebo mastocytózou (23). Prebehnuvšia systémová reakcia po podaní alergénovej vakcíny nie je absolútnou kontraindikáciou pokračovania v liečbe. Rozhodujeme sa individuálne, ale ak si aj pacient v liečbe želá pokračovať, skúšame v nej pokračovať – zvyčajne sa v schéme podávania vrátime na dávku alergénu 10-násobne nižšiu ako bola tá, pri ktorej vznikla reakcia. U väčšiny pacientov sa napokon podarí dosiahnuť potrebnú udržiavaciu dávku.

Opakované systémové reakcie v iniciálnej fáze, alebo počas udržiavacej fázy sú zriedkavé. V prípade, že sa vyskytnú, môžu viesť k ukončeniu liečby. Vychádza sa z toho, že u pacientov s opakujúcimi sa celkovými reakciami počas VIT nevznikne ochrana ani pred celkovou reakciou po bodnutí hmyzom. Návod ako postupovať pri opakovaných systémových reakciách počas VIT je zhrnutý v tabuľke 12 (Tab. 4).

Postup pri opakovaných systémových reakciách počas VIT

1.	Odhalenie a pokiaľ možno odstránenie kofaktorov anafylaxie: – lieky (ako betablokátory, ACE-inhibítory) – inhalačná alebo potravinová alergia – chronická infekcia, iné celkové ochorenie – mastocytóza/ zvýšená bazálna hladina sérovej tryptázy
2.	Sprievodná liečba antihistaminikami
3.	Približne šesť-mesačná liečba s najvyššou tolerovanou dávkou jedu v skrátených intervaloch, následne nový pokus o zvýšenie dávky
4.	Sprievodná alebo predchádzajúca liečba anti-IgE (omalizumab)

Tab. 4 Postup pri opakovaných systémových reakciách počas VIT (18)

V súčasnosti sa pri vzniku nežiaducich reakcií v súvislosti s VIT ako najslubnejšia javí terapia anti-IgE protilátkou (omalizumab). Odporúča sa u pacientov s opakovanými systémovými reakciami a u pacientov s rizikovými faktormi (Tab. 3), u ktorých zlyhala sprievodná liečba antihistaminikami (5, 8).

Dĺžka liečby

U pacientov bez rizikových faktorov možno liečbu ukončiť, ak je splnené nasledujúce:

- dĺžka trvania VIT je minimálne 3 až 5 rokov
- počas VIT sa nevyskytli systémové reakcie
- bodnutie príčinným hmyzom (prednostne provokačný test) nevedlo k systémovej reakcii.

V prípade, že nie je možné odsledovať splnenie 3. bodu, treba vo VIT pokračovať do ústupu kožnej reaktivity a negativizácie hladiny sIgE (9, 18). Negativizáciu sIgE sa však málokedy podarí dosiahnuť. Na pracovisku OKIA-OÚSA liečbu ukončujú, ak sa dosiahne minimálne 10-násobný vzostup sIgG4 a súčasne sIgE 10- a viac-násobne poklesne (nepublikované).

U pacientov s vysokým rizikom vzniku závažnej anafylaxie záleží dĺžka terapie od rizikového profilu. Celoživotná terapia sa v niektorých publikáciách odporúča u pacientov s mastocytózou alebo zvýšenou bazálnou hladinou sérovej tryptázy a u pacientov s kardiovaskulárnym zlyhaním alebo zástavou dýchania po bodnutí (18).

Aj po ukončení VIT je dôležité dodržiavať preventívne opatrenia zamerané na minimalizáciu rizika nasledujúceho bodnutia a nosiť pohotovostný balíček. V prípade náhodného bodnutia s dlhším časovým odstupom od ukončenej imunoterapie je vhodné pacienta pretestovať (kožný test aj vyšetrenie sIgE protilátok) a podľa potreby opakovať VIT.

Záver

Precitlivosť na jed blanokrídleho hmyzu je častou príčinou anafylaxie a môže viesť k život ohrozujúcim stavom. Prevencia týchto život ohrozujúcich stavov vychádza zo správnej diagnostiky a náležitej terapie choroby. Špecifická alergénová imunoterapia je, okrem eliminácie alergénu, jedinou kauzálnou liečbou alergie I. typu. Prebieha v dvoch fázach, iniciálnej a udržiavacej. Podľa frekvencie podávania zvyšujúcich sa dávok alergénu v iniciálnej fáze liečby rozoznávame viaceré liečebné režimy, od konvenčných až po ultra-rýchle. Výhodou zrýchlených režimov je skoršie dosiahnutie udržiavacej dávky a tým rýchlejší nástup ochranného efektu liečby.

Zrýchlený režim typu „rush“ sa v súčasnosti na Slovensku realizuje len na jednom pracovisku (Dermatovenerologická klinika LF UK a UN Bratislava), pre obavy z vysokého rizika vzniku anafylaktickej reakcie. Zlepšením osvedy o možnostiach zrýchlených režimov alergénovej imunoterapie, vypracovaním protokolov podávania liečby a reálnym posúdením skutočného rizika možno rozšíriť použitie tejto perspektívnej metódy aj na iné pracoviská.

Recenzent

1. Doc. MUDr. Martin Hrubíško, PhD., primár OKIA OÚSA, prednosta Ústavu laboratórnej medicíny SZU a OÚSA, Bratislava
2. Doc. RNDr. Peter Filipčík, PhD., Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava

LITERATÚRA

1. Akdis M, Akdis CA. Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8: 645-660.
2. Biló MB, Bonifazi F. The natural history and epidemiology of insect venom allergy: clinical implications. *Clin Exp Allergy.* 2009; 39: 1467-1476.
3. Bonadonna P, Zanotti R, Müller UR. Mastocytosis and insect venom allergy. *Cur Opin Allergy Clin Immunol.* 2010; 7: 61-67.
4. Bonifazi F, Jutel M, Biló BM et al. Prevention et treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy.* 2005; 60: 1459-1470.
5. Galera C, Soohun N, Zankar N et al. Severe anaphylaxis to bee venom immunotherapy: efficacy of pretreatment and concurrent treatment with omalizumab. *J Investig Alergol Clin Immunol.* 2009; 19: 225-229.
6. Hrubíško M a kol. *Alergológia.* Martin, Osveta 2003, 519 s.
7. Kleine-Tebbe J, Bufe A, Ebner C et al. Die spezifische Immunotherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen. *Allergo J.* 2009; 18: 508-537.
8. Kontou-Fili K. High omalizumab dose controls recurrent reactions to venom immunotherapy in indolent systemic mastocytosis. *Allergy.* 2008; 63: 376-378.
9. Krishna MT, Ewan PW, Diwakar L et al. Diagnosis and management of hymenoptera venom allergy: British Society for Allergy and Clinical Immunology (BSACI) guidelines. *Clin Exp Allergy.* 2011; 41: 1201-1220.
10. Moffitt JE, Golden DB, Reisman RE et al. Stinging insect hypersensitivity: a practice parameter update. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114: 869-886.
11. Müller UR. Hymenopterenangioedem und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. *Hautarzt.* 2008; 59: 206-211.
12. Müller UR, Haerberli G. Use of β -blockers during immunotherapy for Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 115: 606-610.
13. Müller UR, Johansen N, Petersen AB et al. Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespula* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy.* 2009; 64(4): 543-548.
14. Müller UR, Jutel M, Reimers A et al. Clinical and immunological effects of H1 antihistamine preventive medication during honeybee venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 122: 1001-1007.
15. Nemšovská J, Bakošová M, Švecová D. Diagnostika precitlivenosti na jed blanokřídeleho hmyzu. *Derma.* 2016; 1: 3-8.

16. Patella V, Florio G, Giuliano A et al. Hymenoptera Venom Immunotherapy: Tolerance and Efficacy of an Ultrarush Protocol versus a Rush and a Slow Conventional Protocol. *J Allergy*. 2012, Article ID 192192, 8 s., <http://dx.doi.org/10.1155/2012/192192>
17. Przybilla B, Ruëff F. Hymenoptera venom allergy. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2010; 8: 114-129.
18. Przybilla B, Ruëff F, Walker A et al. Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie. *Allergo J*. 2011; 20: 318-339.
19. Ring J, Messmer K. Incidence and severity of anaphylactic reactions to colloid volume substitutes. *Lancet*. 1977; 26: 466-469.
20. Ruëff F, Biló MB, Müller UR. Risk of severe anaphylaxis for patients with Hymenoptera venom allergy: Are angiotensin-receptor blockers comparable to angiotensin-converting enzyme inhibitors? Reply. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125: 1171-1172.
21. Ruëff F, Przybilla B. Nebenwirkungen und Erfolg der Insektengifthyposensibilisierung. *Allergo J*. 2005; 14: 560-568.
22. Ruëff F, Przybilla B, Biló MB et al. Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase. A study of the EAACI (European Academy of Allergology and Clinical Immunology) Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 124: 1047-1054.
23. Ruëff F, Przybilla B, Biló MB et al. Predictors of side effects during the build-up phase of venom immunotherapy for Hymenoptera venom allergy: the importance of baseline serum tryptase. A study of the EAACI (European Academy of Allergology and Clinical Immunology) Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 126: 105-111.
24. Ruëff F, Wenderoth A, Przybilla B. Patients still reacting to a sting challenge while receiving conventional Hymenoptera venom immunotherapy are protected by increased venom doses. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 1027-1032.
25. Ruëff F, Wolf H, Schnitker J et al. Specific immunotherapy in honeybee venom allergy: a comparative study using aqueous and aluminium hydroxide adsorbed preparations. *Allergy*. 2004; 59: 589-595.
26. Stern A, Wüthrich B, Müllner G, Successful treatment of occupational allergy to bumblebee venom after failure with honeybee venomextract. *Allergy*. 2005; 55: 88-91.
27. Wöhrl S, Gamper S, Hemmer W et al. Premedication with montelukast reduces local reactions of allergen immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007; 144: 137-142.

VARIA

PRAKTICKÉ VYUŽITIE IVIG V LIEČBE PORÚCH PLODNOSTI Z IMUNOLOGICKÝCH PRÍČIN

Dzurillová Ž^{1,2}, Dzurilla M.^{1,2}

¹ Ambulancia reprodukčnej imunológie, Medicentrum Dzurilla, Nitra, SR

² Laboratórium klinickej imunológie a alergológie, Medicentrum Dzurilla, Nitra, SR

Abstrakt

Imunomodulačná liečba v prípade potvrdenia imunologickej etiológie podieľajúcej sa na opakovaných potratoch alebo na opakovaných implantačných zlyhaniach sa v odbornej verejnosti plne akceptuje. Jednou z možných terapeutických modalít sú aj intravenózne imunoglobulíny (IVIG). Ich výhodou je nízka incidencia nežiaducich účinkov, možnosť podávania počas tehotenstva a nijaké dokumentované riziko vyššieho výskytu vrodených malformácií plodu.

Prvá randomizovaná štúdia s použitím IVIG v indikácii idiopatického, opakovaného implantačného zlyhania u žien bola publikovaná v roku 1994. Veľká metaanalýza štúdií z databáz PubMed, EMBASE a CNKI v roku 2013 preukázala pozitívny efekt liečby IVIG u žien s poruchami implantácie, avšak u žien s opakovanými potratmi sa klinický významný efekt nedokázal.

Opakované spontánne potraty (recurrent miscarriage – RM) sa definuje ako tri a viac spontánnych potratov do 14. týždňa gravidity a opakované implantačné zlyhanie (recurrent implantation miscarriage – RIF) ako zlyhanie počatia u žien, vrátane biochemických tehotenstiev, u ktorých sa transferujú dve a viac embryí s vysokou kvalitou.

In vitro aj *in vivo* sa preukázalo niekoľko mechanizmov účinku IVIG. Znižujú počet aj cytotoxicitu periférnych NK-buniek (CD56^{dim} a CD16⁺) sprostredkovanú cez FcγRIII receptor (CD16). Zvyšujú aj syntézu GM-CSF, dôležitého Th2 cytokínu s vplyvom na reparáciu chromozómových aberácií a perceptivity endometria. Dokázal sa tiež efekt zníženia expresie inhibičného receptoru CD94/NKG2 na periférnych NK-bunkách a potlačenie diferenciácie Th17-lymfocytov. Zároveň IVIG zvyšujú diferenciáciu Treg-lymfocytov.

Na použitie IVIG v spomínaných dvoch indikáciách zatiaľ neexistuje jednotný konsenzus o dávkovaní, načasovaní ani o dĺžke liečby. V niektorých krajinách sa vypracovali odporúčania pre liečbu IVIG, ktoré akceptujú lokálne gynekologické a imunologické spoločnosti.

Publikované štúdie preukázali klinicky významný efekt liečby IVIG len pri dôslednej selekcii pacientiek s dokázanou imunologickou príčinou podieľajúcou sa na poruche plodnosti. Tento typ liečby je vhodné zvážiť v prípade zlyhania inej formy imunomodulácie a v konkrétnych situáciách, kde aplikácia IVIG vedie k vyššej úspešnosti otehotnenia alebo udržania tehotenstva.

Úvod

Efektívnosť reprodukcie u ľudí v porovnaní s inými druhmi cicavcov je nízka. Odhaduje sa, že v jednom menštruačnom cykle je pravdepodobnosť otehotnenia 20 – 30 %. Pri iných cicavcoch, ako napr. pri paviánoch, či zajacoch je táto pravdepodobnosť až 90 % (Chard 1991, Foote et al. 1988, Stevens 1997). Umelé asistované reprodukčné techniky ako IVF (*in vitro* fertilizácia) majú priemernú úspešnosť len 20 – 25 % (Boomsma et al. 2009), čo často vedie ku fyzickej, emocionálnej i finančnej záťaži neplodných párov. Úspešnosť oplodnenia závisí od primeranej receptivity a selektivity endometria (Check 2011), kvality implantovaných embryí (Erenus et al. 1991) a aj od veku ženy (Templeton et al. 1998). Podrobnejšie pochopenie príčin zlyhávania implantačie embryí je však kľúčom ku zlepšovaniu techník asistovanej reprodukcie. Bazálny a klinický výskum je však limitovaný aj technickými problémami aj etickými limitmi (Macklon et al. 2014). Pre pochopenie fyziológie a patofyziológie porúch plodnosti sme tak odkázaní prevažne na kombináciu animálnych a *in vitro* modelov (Macklon et al. 2014). V prípadoch opakovaných nevysvetliteľných implantačných zlyhaní a opakovaných potratov sa mnohokrát vyslovili podozrenia, že sa na nich môžu podieľať abnormality v imunitnom systéme (Sanmarco et al. 2007). Táto hypotéza sa neskôr potvrdila aj poznatkami z bazálneho výskumu. Štúdie v klinickej praxi taktiež preukázali u žien s poruchou plodnosti prítomnosť patologických imunitných parametrov, ako je zvýšený počet a cytotoxicita periférnych NK-buniek, zvýšený pomer Th1/Th2 cytokínov, prítomnosť orgánovo- a systémovo-špecifických autoproti látok, znížený počet periférnych Treg-lymfocytov a antifosfolipidové protilátky (Dzurilová et al. nepublikované).

Embryo, receptivita a selektivita endometria

Pre ľudské embryo je charakteristická vysoká miera invazívnosti a chromozómových abnormalít v zmysle aneuploidii a mozaicizmu. Genómový skrining blastomér z vysoko kvalitných embryí preukázal chromozómové abnormality pochádzajúce skôr z mitotického ako meiotického delenia až v 70 % prípadov (Mertzanidou et al. 2013, Vanneste et al. 2009, Fragouli et al. 2013). Aneuploidia je u človeka až 10-násobne vyššia ako pri iných cicavcoch a klesá postupným vývojom do štádia blastocysty (Macklon et al. 2014). Invazívnosť embrya teda nezávisí od jeho kvality; embryo zároveň secernuje dostatok serínových proteáz (Macklon et al. 2014).

Na vzniku a udržaní tehotenstva sa zásadným spôsobom podieľa decidualizácia endometria, čo je transformácia strómových fibroblastov na sekrečné decíduové bunky pod vplyvom endokrinných faktorov (Gellersen et al. 2007). Decidualizované endometrium v procese implantačie embrya nie je pasívnym článkom procesu, pretože zahŕňa rozpoznanie a selekciu embrya (Macklon et al. 2014).

Vníímavosť (receptivitu) endometria zahŕňa rozpoznávanie signálov embrya (napr. serínových proteáz), čo vedie k produkcii prozápalových cytokínov, ako sú IL-1 β , IL-6, LIF (leukemický inhibičný faktor) a HB-EGF (heparín viažuci faktor podobný EGF)

(Macklon et al. 2014). Následne dochádza k enkapsulácii embrya, čo je dej typický pre aktívnu endometriovú selekciu. Trofoblast produkuje rastový faktor PDGF (*platelet derived growth factor*), ktorý pôsobí chemotakticky na migráciu endometriových stromových buniek (Macklon et al. 2014). Uvedené poznatky viedli k vývoju klinického testu ERA (*Endometrial Receptivity Analysis*), pri ktorom sa vykonáva personalizovaný genetický test pre detekciu vnímavosti endometria v implantačnom období (Carlos Simón- Igenomix CSO).

Feto-maternálne rozhranie

Po prilnutí blastocysty na epitel endometria trofoblast invaduje hlboko do decidualizovaného endometria. Diferencuje sa na vilózný trofoblast, ktorý zabezpečuje výživu plodu a extravilózný, ktorý preniká ešte hlbšie a podieľa sa na remodelácii špirálovitých artérií. Vilózný trofoblast neexprimuje žiadne MHC molekuly I ani II triedy. Extravilózný trofoblast exprimuje HLA-C, -E, -F a -G molekuly (Inada et al. 2015), (Le Bouteiller et al. 1999). Molekuly HLA-E a HLA-G sú dôležité pre inhibíciu cytotoxicity uterinných NK buniek (uNK) a T-lymfocytov. Indukcia tolerancie paternálnych antigénov špecifických HLA-C molekúl je nutná pre navodenie tolerancie plodu (Saito et al. 2016)

V decidue sa nachádzajú 4 typy imunitných buniek: uNK bunky (uterinné), makrofágy, dendritové bunky (DCs), pomocné, cytotoxické a regulačné T-lymfocyty. Charakteristickým rysom uNK buniek je tvorba imunosupresívnych cytokínov, prítomnosť znaku CD56 a CD9, chýba však expresia CD16 a L-selektínu. K diferenciácii uNK buniek dochádza pri každom menštruačnom cykle, 3 až 5 dní od vyplavenia luteinizačného hormónu. Uterinné NK-bunky sa nachádzajú v decidue a intraluminálne i intramurálne v špirálových artériách. Sú dôležité pri separácii buniek hladkého svalstva špirálovitých artérií, tvoria cytokíny ako je angiopoetín-2 a VEGF, matrixové metaloproteázy (MMP2, 7, 9) a aktivátor plazminogénu (uPA) (Saito et al. 2016, Naruse et al. 2009, Smith et al. 2009, Wallace et al. 2013). Táto premena vedie k nízkotlakovému vysokoobjemovému prietoku (Lash et al. 2010).

Makrofágy zabezpečujú imunitnú toleranciu plodu a zároveň chránia plod pred ascendentnou i hematogénnou infekciou. Dominantne je zastúpený M2-fenotyp, ktorý sa diferencuje pod vplyvom Th2-cytokínov a glukokortikoidov. Charakterizuje ho zvýšená expresia „upratovacích“ (scavenger) a manózoých receptorov, zvýšená aktivita arginázy II, ktorá spôsobuje zníženie tvorby oxidu dusnatého (NO), zvýšená produkcia antagonistu IL-1 receptora a znížená tvorba IL-12. Protiinfekčnú imunitu M2-makrofágy zabezpečujú pomocou vzorkových receptorov TLR (Toll like receptors) a CLR (C type lectin receptors). Narušenie fenotypovej M2-dominancie môže viesť k patologickým stavom ako je preeklampsia a predčasný pôrod. Dokázala sa tiež prítomnosť nezrelých myeloidných dendritových buniek (DCs) v decidue s nízkou expresiou kostimulačných molekúl CD80, resp. CD86 (Chen 2012). Opakovane sa ukazuje aj dôležitosť Treg-lymfocytov na vývoji imunitnej tolerancie. Treg-lymfocyty (CD4⁺CD25⁺

FOXP3⁺) tvoria približne 14 % z decidoových CD4 T-lymfocytov. V kooperácii s decidoovými DCs navodzujú tvorbu indolamín-2,3-dioxygenázy (IDO), ktorá znižuje hladinu tryptofánu v mikroprostredí a tým vedie k nižšej proliferácii efektorových T-lymfocytov (Miwa et al. 2005). Z hľadiska T-lymfocytových subpopulácií pre tehotenstvo je charakteristická dominancia Th2-lymfocytov, i keď v skorá fáza implantácie je pod vplyvom Th1-mikroprostredia (Macklon et al. 2014).

Mechanizmy účinku intravenózných imunoglobulínov (IVIG)

Intravenózne imunoglobulíny (IVIG) sú prípravky obsahujúce monomérové humánne IgG; pripravujú sa z plazmy najmenej 1000 zdravých darcov. IVIG neutralizujú autoprotilátky antiidiotypovými proti látkami, blokujú Fc γ 1-receptor na retikulo-endotelových bunkách, B-lymfocytoch a NKT- bunkách (Ballow 2011). V prípade B-lymfocytov, IVIG zvyšujú aktivitu receptora Fc γ IIb, čo následne znižuje schopnosť prezentácie antigénu a tvorbu protilátok (Jordan et al. 2011). Väzbou na lektínový receptor SIGN 1 aktivujú protizápalové dráhy, znižujú diferenciáciu Th17-lymfocytov a zvyšujú expresiu FOXP3; výsledkom je zvýšenie počtu i aktivity Treg-lymfocytov (Anthony et al. 2010). Znižujú aj počet a cytotoxicitu uNK- a NKT-buniek prostredníctvom inhibície Fc γ IIIa (CD16) receptora a znižujú expresiu inhibičného receptora CD94/NKG2 na uNK-bunkách (Szereday et al. 1999; Roussev et al. 2007). IVIG vplyvajú na zníženie produkcie cytokínov Th1 a pomeru Th1/Th2 (Winger et al. 2008) a zvyšujú syntézu GM-CSF, ktorý pozitívne vplyva na reparáciu chromozómových aberácií a zároveň zlepšuje implantačnú schopnosť endometria (Perricone et al. 2003)

Klinické indikácie použitia intravenózných imunoglobulínov

Účinnosť podávania IVIG v prípade opakovaných potratov (RM – *recurrent miscarriage*) sa nepreukázala, ak sa pacientky nevyberali na základe imunitných abnormalít. V rokoch 2010 a 2015 boli publikované randomizované štúdie kontrolované placebom, ktoré nepreukázali účinnosť liečby IVIG (Mekinian et al. 2016). V oboch štúdiách bola indikačným kritériom sekundárne opakované potraty. Je dôležité poznamenať, že v oboch prípadoch išlo o malú skupinu žien, používanie aj menej účinných preparátov a hlavne nebola prítomná selekcia na základe abnormalít v imunitnom systéme (Stephenson et al. 2010), (Christiansen et al. 2015). Metaanalýza piatich štúdií podávania IVIG v indikácii sekundárnej RM v prípade zvýšeného počtu periférnych NK buniek (> 12 %) preukázala úspešnosť pôrodu živonarodeného dieťaťa v 82,5 % prípadov (Clark 2011).

V r. 2013 publikovali čínski autori veľkú metaanalýzu štúdií z databáz PubMed, EMBASE a CNKI. Táto poukázala na pozitívny efekt liečby IVIG u žien s poruchami implantácie (Li et al. 2013). Porovnávali efekt IVIG v klinických štúdiách, pri ktorých bolo placebové rameno alebo rameno, v ktorom sa neaplikovala nijaká liečba. Všetky pacientky podstúpili IVF alebo ICSI (intracytoplazmová injekcia spermie). Celkový počet selektovaných relevantných štúdií bol 973. Na základe inklúzných a exklúzných kritérií

bolo 921 štúdií vylúčených pre metodické chyby. Ďalších 52 štúdií sa z metaanalýzy vyňalo pre nesplnenie inklúzných kritérií, chýbajúce dáta o selekcii pacientiek, niektoré publikácie tiež obsahovali dohady o výsledku. Do konečnej analýzy sa napokon vybralo 10 štúdií. Hlavné ukazovatele, ktoré sa sledovali boli úspešná implantácia verifikovaná ultrasonograficky (*implantation rate*), detekcia akcie srdca plodu (*clinical pregnancy rate*) a dosiahnutie aspoň 25. týždňa tehotenstva s pôrodom živého dieťaťa (*live birth rate*). V prípade vyhodnotenia „*implantation rate*“ bola úspešnosť v skupine s IVIG 34,3% oproti skupine bez IVIG 13, 7 %. Aj v prípade dosiahnutia „*clinical pregnancy rate*“ bola úspešnosť v skupine žien s IVIG 60,2% s porovnaním bez IVIG 39,3 %. V kohorte „*live birth rate*“ bola taktiež vyššia úspešnosť s IVIG 49.8 % (Tab. 1).

Záver

Poruchy plodnosti z príčin porúch v imunitnom systéme sú najčastejšie spôsobené autoimunitnou reakciou voči trofoblastu, plodovým a placentovým antigénom. Pozitívny účinok intravenózných imunoglobulínov sa rutinne využíva pri liečbe viacerých autoimunitných chorôb a úvaha o ich analogickom použití priviedla mnohé klinické tímy aj k ich využitiu v liečbe porúch plodnosti zapríčinených imunitnými procesmi. Niektoré publikované štúdie preukázali klinicky signifikantný efekt liečby IVIG len pri dôslednej selekcii pacientiek. Tento typ liečby treba zväziť najmä v prípade zlyhania inej formy imunomodulácie a v konkrétnych situáciách, kde aplikácia IVIG vedie k vyššej úspešnosti otehotnenia.

Recenzent

1. prim.MUDr. Karin Malíčková
Klinická imunológia a alergológia - laborať, Ústav lekárskej biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze a 1. lekárska fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česká republika
2. Mgr. Branislav Kováčech, PhD., Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava

LITERATÚRA

- Anthony, R. M., J. V. Ravetch (2010). A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *J Clin Immunol* 30 Suppl 1: S9-14.
- Ballow, M. (2011). The IgG molecule as a biological immune response modifier: mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol* 127(2): 315-323.
- Boomsma, C. M., A. Kavelaars et al. (2009). Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Hum Reprod* 24(6): 1427-1435.
- Clark, D. A. (2011). Intravenous immunoglobulin and idiopathic secondary recurrent miscarriage: methodological problems. *Hum Reprod* 26(9): 2586-2587.
- Erenus, M., C. Zouves et al. (1991). The effect of embryo quality on subsequent pregnancy rates after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 56(4): 707-710.

- Foote, R. H., E. W. Carney (1988). Factors limiting reproductive efficiency in selected laboratory animals. *Ann N Y Acad Sci* 541: 683-696.
- Fragouli, E., S. Alfarawati et al. (2013). The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum Genet* 132(9): 1001-1013.
- Gellersen, B., I. A. Brosens et al. (2007). Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives *Semin Reprod Med* 25(6): 445-453.
- Chard, T. (1991). Frequency of implantation and early pregnancy loss in natural cycles. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 5(1): 179-189.
- Check, J. H. (2011). The importance of sonographic endometrial parameters in influencing success following embryo transfer in the modern era and therapeutic options--part 1: the importance of late proliferative phase endometrial thickness. *Clin Exp Obstet Gynecol* 38(3): 197-200.
- Christiansen, O. B., E. C. Larsen et al. (2015). Intravenous immunoglobulin treatment for secondary recurrent miscarriage: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *BJOG* 122(4): 500-508.
- Inada, K., T. Shima et al. (2015). Helios-positive functional regulatory T cells are decreased in decidua of miscarriage cases with normal fetal chromosomal content. *J Reprod Immunol* 107: 10-19.
- Jordan, S. C., M. Toyoda et al. (2011). Regulation of immunity and inflammation by intravenous immunoglobulin: relevance to solid organ transplantation. *Expert Rev Clin Immunol* 7(3): 341-348.
- Lash, G. E., H. A. Otun et al. (2010). Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine natural killer cells is dependent on gestational age. *Hum Reprod* 25(5): 1137-1145.
- Le Bouteiller, P., C. Solier et al. (1999). Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Hum Reprod Update* 5(3): 223-233.
- Li, J., Y. Chen et al. (2013). Intravenous immunoglobulin treatment for repeated IVF/ICSI failure and unexplained infertility: a systematic review and a meta-analysis. *Am J Reprod Immunol* 70(6): 434-447.
- Macklon, N. S., J. J. Brosens (2014). The human endometrium as a sensor of embryo quality. *Biol Reprod* 91(4): 98.
- Mekinian, A., J. Cohen et al. (2016). Unexplained Recurrent Miscarriage and Recurrent Implantation Failure: Is There a Place for Immunomodulation? *Am J Reprod Immunol* 76(1): 8-28.
- Mertzaniidou, A., L. Wilton et al. (2013). Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Hum Reprod* 28(1): 256-264.
- Miwa, N., S. Hayakawa et al. (2005). IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-gamma increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod* 11(12): 865-870.
- Naruse, K., G. E. Lash et al. (2009). Localization of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy. *Hum Reprod* 24(3): 553-561.
- Perricone, R., C. De Carolis et al. (2003). GM-CSF and pregnancy: evidence of significantly reduced blood concentrations in unexplained recurrent abortion efficiently reverted by intravenous immunoglobulin treatment. *Am J Reprod Immunol* 50(3): 232-237.

- Roussev, R. G., S. C. Ng et al. (2007). Natural killer cell functional activity suppression by intravenous immunoglobulin, intralipid and soluble human leukocyte antigen-G. *Am J Reprod Immunol* 57(4): 262-269.
- Saito, S., Y. Nakabayashi et al. (2016). A new era in reproductive medicine: consequences of third-party oocyte donation for maternal and fetal health. *Semin Immunopathol*.
- Sanmarco, M., N. Bardin, et al. (2007). Antigenic profile, prevalence, and clinical significance of antiphospholipid antibodies in women referred for in vitro fertilization. *Ann N Y Acad Sci* 1108: 457-465.
- Smith, G. H., D. S. Salomon et al. (2009). Evidence that an early pregnancy causes a persistent decrease in the number of functional mammary epithelial stem cells-implications for pregnancy-induced protection against breast cancer. *Stem Cells* 27(5): 1223.
- Stephenson, M. D., W. H. Kutteh et al. (2010). Intravenous immunoglobulin and idiopathic secondary recurrent miscarriage: a multicentered randomized placebo-controlled trial. *Hum Reprod* 25(9): 2203-2209.
- Stevens, V. C. (1997). Some reproductive studies in the baboon. *Hum Reprod Update* 3(6): 533-540.
- Szereday, L., P. Spath et al. (1999). Natural killer cell activity and cytokine production after in vitro immunoglobulin treatment of lymphocytes derived from pregnant women with or without risk for spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 42(5): 282-287.
- Templeton, A., J. K. Morris (1998). Reducing the risk of multiple births by transfer of two embryos after in vitro fertilization. *N Engl J Med* 339(9): 573-577.
- Vanneste, E., T. Voet, et al. (2009). Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 15(5): 577-583.
- Wallace, A. E., A. J. Host et al. (2013). Decidual natural killer cell interactions with trophoblasts are impaired in pregnancies at increased risk of preeclampsia. *Am J Pathol* 183(6): 1853-1861.
- Winger, E. E., J. L. Reed (2008). Treatment with tumor necrosis factor inhibitors and intravenous immunoglobulin improves live birth rates in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 60(1): 8-16.

Adresa: MUDr. Ž. Dzurillová,
 Ambulancia reprodukčnej imunológie,
 Medicentrum Dzurilla, Nitra
 Mail.: zaneta@dzurilla.com

Tab. 1 Vyhodnotenie úspešnosti liečby IVIG (podľa Li et al. 2003)

Výsledok	Počet štúdií	Počet pacientiek	Liečba s IVIG	Liečba bez IVIG
„Implantation rate“	6	6	34,3 %	13,7 %
Klinické gravidity	10	2 455	60,2 %	39,3 %
„Live birth rate“	9	2 415	49,8 %	31,6 %

MALÉ MOLEKULY – INHIBÍTORY ROZHODUJÚCICH ZÁPALOVÝCH DRÁH: CESTA SPÄŤ MÔŽE BYŤ AJ CESTOU VPRED

Hrubiško M.

Oddelenie klinickej imunológie a alergológie, OÚSA, Bratislava

Abstrakt

Autor v svojom príspevku sumarizuje vývoj farmakoterapie za ostatných zhruba 100 rokov. Poukazuje na vývoj od účinných látok objavených náhodne alebo na základe empirie, cez postupné spoznávanie mechanizmov chorôb, na základe čoho sa farmaká začali vyvíjať cielene. Poukazuje na obmedzené možnosti ďalšieho vývoja klasických farmák zameraných na rôzne bunkové receptory – tu sú možnosti ďalšieho vývoja limitované. Ďalším krokom bol vývoj makromolekúl, ktoré imitujú alebo blokujú funkcie fyziologických molekúl ako sú cytokíny či ich receptory – práve pre túto skutočnosť sa nazvali biologické liečivá, tzv. biologiká. I keď tu sa vývoj zďaleka neskončil, ich užívanie limituje výskyt nežiaducich účinkov, neúčinnosť u všetkých pacientov trpiacich konkrétnou chorobou, ako aj potreba parenterálneho podávania. Vývoj smeruje k syntéze malých molekúl ovplyvňujúcich vnútrobunkové signalizačné dráhy umožňujúci cielenejšie zásahy a poskytujúci komfortné užívanie per os. Toto nové smerovanie medicíny autor približuje na príklade inhibítora JAK1- a JAK3-kinázy tofacitinibu a jeho využitia v liečbe reumatoidnej artritídy. Farmakologická liečba sa tak po rokoch vývoja makromolekulových liečiv znova vracia k malým molekulám, tentoraz však vyvíjaným cielene za účelom ovplyvnenia konkrétnych vnútrobunkových signálnych dráh.

Kľúčové slová: farmakoterapia, biologiká, malé molekuly, inhibítory JAK-kináz

Hrubiško M.: **Small molecules – inhibitors of principal inflammatory pathways: a way backwards can be a way forward.**

Summary

Author summarises the development of pharmacotherapy during the last 100 years. Progress from accidentally or due to empiricism discovered substances led through gradual discovery of disease mechanisms that enabled a more focused approach. The development of new drugs directed to classical cell receptors is limited. A next step was the development of macromolecules imitating or blocking functions of cytokines or their receptors – so called biological drugs. Despite continuing development, their utilisation is limited due to side effects, infectivity in all patients

suffering from the disease and the need of their parenteral application. Last evolution leads to the synthesis of small molecules affecting intracellular signalling pathways. Such drugs enable more targeted intervention and are suitable for oral usage. This new approach in medicine and pharmacotherapy is introduced on the example of JAK1 and JAK3 kinase inhibitor tofacitinib and its utilisation in the treatment of rheumatoid arthritis. So, after 100 years of development, the pharmacotherapy is coming back to small molecules, but nowadays in much more targeted manner to influence intracellular signalling pathways.

Key words: pharmacotherapy, biologic drugs, small molecules, JAK kinase inhibitors.

Vývoj farmakoterapie za ostatných 100 rokov

Farmakologická liečba prešla za ostatných zhruba 100 rokov prudkým vývojom. Celé stáročia, a nebolo tomu inak ani pred 100 rokmi, sa liečivá objavovali náhodne, respektíve na základe dlhoročných skúseností. Tak napríklad antipyretický účinok vrbovej kôry bol známy po stáročia a i keď sa neskôr spoznala jej hlavná účinná látka (kyselina acetylosalicylová), mechanizmus účinku známy nebol. Samozrejme, s nárastom poznania biologických vied (chémie, medicíny) a so vznikom novej disciplíny – farmakológie, sa situácia začala postupne meniť. Jednak sa spoznali mechanizmy už známych farmák (napr. spomínaného „aspirínu“), ale sa aj začali vyvíjať ciele farmaká zasahujúce ten – ktorý známy fyziologický mechanizmus. Takto sa postupne vyvíjali napríklad stimulatory alebo blokatory α - či β - receptorov (α -mimetká, β -blokatory), anticholinergiká, inhibitory angiotenzín-konvertujúceho enzýmu, inhibitory receptora pre angiotenzín II (sartány), H1-antihistaminiká, H2-blokatory, blokatory protónovej pumpy, ako aj ďalšie skupiny liekov ako diuretiká, psychofarmaká atď. Zvláštnu skupinu liečiv tvoria antibiotiká, ktoré sa po počiatočnom náhodnom objave vyvíjali cielene za účelom zasiahnuť konkrétny bod metabolizmu alebo množenie baktérií.

V druhej polovici 20. storočia sme zaznamenali prudký vývoj farmakoterapie – v uvedených skupinách sa syntetizovali stále nové a nové molekuly s cieľom zvýšiť ich účinnosť a obmedziť nežiaduce účinky. Z čisto biochemického hľadiska išlo prevažne o malé molekuly s molekulovou hmotnosťou pod 1 000 Da (týka sa to aj väčšiny antibiotík). Bolo však jasné, že tento vývoj raz skončí; pravdepodobne už nie je reálne mať ešte lepšie antihistaminikum, ešte lepší β -blokator a podobne. Aj vývoj klasických antibiotík sa dostal do slepej uličky.

Biologiká

Tak ako sa prehľbovali poznatky o patofyziológii chorôb, výskum a vývoj sa začal orientovať na kópie a modifikácie rôznych fyziologicky sa vyskytujúcich molekúl (cytokíny, ich receptory). Cieľ bol jasný: v prípade známeho dominantného patomechanizmu konkrétnej choroby ho cielene zasiahnuť – potenciovať alebo potlačiť či vyradiť. Tak nastala éra klinického využívania makromolekúl: cytokínov, monoklonových pro-

tilátok, fúzných proteínov či peptidov, tzv. biologických liečiv. Biologiká sú farmaceutické prípravky vyrábané biotechnológiami, získané zložitým výrobným procesom zo živých zdrojov (produkty živých makro- či mikro- organizmov, resp. bunkových kultúr). Zahŕňajú tradičné prípravky vyrobené z ľudskej z krvi, antitoxíny, klasické antiinfekčné a alergénové vakcíny, ako aj moderné biologiká ako monoklonové protilátky, cytokíny, rastové faktory, solubilné receptory, novodobé vakcíny a produkty prenosu génov (1).

Hoci sa používaním biologík zaznamenal v liečbe mnohých alergických, autoimunitných a onkologických chorôb obrovský pokrok, ukázalo sa, že aj táto liečba má svoje limity. Vyradením toho - ktorého cytokínu z jeho biologickej funkcie nie vždy dosiahneme dostatočný efekt – je to dané komplementárnosťou a redundanciou účinku viacerých cytokínov, a tiež tým, že choroba málokedy „beží iba po jednej dráhe“. Vzhľadom k rozsahu fyziologických účinkov cytokínov je výskyt nežiaducich účinkov sprevádzajúcich ich podávanie veľký, a tak sa až na výnimky (napr. interferóny v liečbe sclerosis multiplex) terapeuticky nepoužívajú. Nežiaduce účinky pri podávaní liečiv vyradujúcich konkrétny cytokín alebo inú fyziologickú molekulu z patologickej účinnosti sú miernejšie, a preto sa v súčasnosti rad takýchto liečiv využíva. Avšak vzhľadom k vyradeniu konkrétnej molekuly z jej fyziologickej účinnosti môže takúto liečbu sprevádzať výskyt komplikácií, aj vážnych, ktoré ohrozujú život. Napríklad pri anti-TNF- α liečbe sa spočiatku vyskytli smrteľné prípady následkom aktívovanej tuberkulózy (z týchto dôvodov každý pacient indikovaný na túto liečbu musí v súčasnosti najprv podstúpiť testy na TBC). Problémom je tiež skutočnosť, že tieto liečivá neúčinkujú u všetkých pacientov s konkrétnou diagnózou, pričom chýbajú biomarkery pomocou ktorých by sme vedeli vopred definovať jedinca ktorý bude z liečby profitovať najviac.

Malé molekuly

Veda a výskum však pokračujú ďalej a 21. storočie charakterizuje snaha poznať subcelulárne fyziologické mechanizmy, ako aj ich poruchy podmieňujúce jednotlivé choroby. V súvislosti s chorobami z porušenej imunitnej regulácie (alergické a autoimunitné choroby, čiastočne sem možno radiť aj onkologické choroby) sa skúmajú vnútrobunkové signalizačné dráhy (spúšťače alebo „vypínače“ proteosyntézy, bunkového delenia) cez ktoré prechádza informácia z extracelulárneho priestoru až do bunkového jadra. Pri porovnaní s doteraz používanými tzv. biologikami musí ísť o malé molekuly (menej ako 900 Da, optimálne dokonca pod 500 Da) – dôvodom je potreba prestupu liečiva do vnútra bunky. Benefitom pre pacientov je možnosť užívania cez ústa, odpadá potreba parenterálneho podávania charakteristická pre makromolekulové liečivá (2). Malé molekuly sú na rozdiel od biologík produktom priemyselnej chemickej syntézy. Možno teda konštatovať, že vývoj farmakoterapie chorôb sa v priebehu storočia otočil o 180° – od malých molekúl sa cez veľké proteínové molekuly opäť vracia k „mikromolekulám“, avšak tentoraz už cielene – syntetizujú sa látky s presným zámerom ovplyvniť tú ktorú signalizačnú dráhu. Tento trend liečby sa pokúsime priblížiť na príklade závažnej autoimunitnej choroby – reumatoidnej artritídy (RA).

Reumatoidná artritída ako príklad choroby z porušenej imunitnej regulácie

Reumatoidná artritída (RA) je zápalová choroba zhybov, ale aj iných orgánov (okrem kĺbov bývajú najčastejšie postihnuté pľúca), multifaktorovej genézy, iniciované a udržiavané autoimunitnými mechanizmami (3). Postihnuté zhyby infiltrujú viaceré druhy imunitných buniek, následkom čoho vzniká synovitída s následným poškodením jednotlivých štruktúr kĺbu (4). Synovitídu charakterizuje jej hyperplázia, zvýšený influx buniek zápalu (mastocyty, neutrofil, makrofágy, dendritové bunky, T- a B-lymfocyty) a extenzívna angiogenéza a aktivácia fibroblastov a endotelových buniek (5). Hoci iniciačný faktor ktorý spúšťa autoimunitný zápal stále nie je presne známy, vieme, že na samom začiatku dochádza k aktivácii zložiek neadaptívnej imunity, čo vedie k citrulinácii peptidov, ktoré potom dendritové bunky prezentujú T lymfocytom, ktorých významná časť sa diferencuje na Th1- a Th17-lymfocyty. B-lymfocyty sa diferencujú na plazmocytov produkujúce autoprotilátky. Jednou z charakteristík autoimunitného zápalu je dysregulovaná sieť pro- a proti- zápalových cytokínov a rovnako dysregulácia proteáz a antiproteáz produkovaných mezenchýmovými bunkami (6).

Prenos signálov indukovaných cytokínmi do bunkového jadra

Prvé poznatky o úlohe cytokínov v patogenéze RA viedli k sústreďeniu sa na pro-zápalový cytokín TNF- α . Skutočne, anti-TNF protilátka vedie k zníženiu produkcie pro-zápalových cytokínov ako IL-1 β , IL-6, IL-8 a GM-CSF (7). V súčasnosti však vieme, že pre cytokínovú sieť je charakteristická multiplicita, redundancia a synergia, čo je aj kľúč k pochopeniu čiastočných neúspechov pri anti-TNF, ale aj inej anti-cytokínovej liečby. Preto sa ďalší výskum sústredil na jednotlivé body, cez ktoré cytokíny odovzdávajú informáciu ďalej. Prenos informácie sa uskutočňuje prostredníctvom špecifických receptorov, ktoré potom prenášajú signál k transkripčným proteínom (ako napr. NF κ B, STAT) a ich prostredníctvom k bunkovému jadrú prostredníctvom rôznych vnútrobunkových signalizačných dráh. Medzi takéto cesty patria dráhy sprostredkované mitogénmi aktivovanými proteínovými kinázami (MAPK), slezinovou tyrozínovou kinázou (Syk), fosfoinozitolovou kinázou-3 (PI3K) a signalizačné dráhy sprostredkované Janusovými kinázami (JAK) (8).

Proteínové kinázy a možnosti ich blokovania tofacitinibom

Proteínové kinázy sú enzýmy modifikujúce iné proteíny pridaním fosfátovej skupiny do ich štruktúry (= fosforylácia). Fosforylácia zvyčajne vedie k funkčnej zmene cieľového proteínu (substrátu) zmenou jeho enzýmovej aktivity, lokalizácie v bunke, alebo asociáciou s inými proteínmi. Ľudský genóm obsahuje okolo 500 génov kódujúcich proteínové kinázy, čo je okolo 2% všetkých ľudských génov a až 30% všetkých humánnych proteínov sa kinázovou aktivitou môže zmeniť (9). Vieme, že kinázy regulujú väčšinu bunkových dráh, najmä dráh tzv. signalizačnej transdukcie.

Tyrozínkinázy sa aktivujú hormónmi a alebo cytokínmi a sú súčasťou mnohých signalizačných kaskád. Jednou rodinou z tyrozínkináz zviazaných s cytokínovými re-

ceptormi sú aj Janusove kinázy. Mnohé z nich odovzdávajú signál ďalej do bunkového jadra prostredníctvom proteínov STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). Signálna dráha JAK-STAT sprostredkúva extracelulárne chemické signály do bunkového jadra – výsledkom tejto signalizácie je transkripcia DNA a expresia génov zapojených do imunitnej odpovede, proliferácie, diferenciácie, apoptózy a onkogenézy. Celá kaskáda pozostáva z troch hlavných zložiek: povrchového bunkového receptora, kinázy JAK a dvoch proteínov STAT (10). Cez kombinácie JAK- a STAT- dráh vedú signály viacerých cytokínových rodín. Tofacitinib sa syntetizoval ako špecifický kompetitívny inhibítor JAK-kináz (11). Táto molekula znemožňuje väzbu adenosín trifosfátu na väzbovom mieste kinázy, a tak sa zabráni prenosu signálu pre proteosyntézu cez koncový prenášač signálu STAT do bunkového jadra (12).

Účinnosť sa testovala najprv na bunkových kultúrach a zvieracích modeloch, neskôr tofacitinib prešiel úspešne všetkými fázami klinického skúšania a v súčasnosti sa očakáva jeho zavedenie do každodennej praxe (samozrejme nateraz viazané na vysoko špecializované pracoviská). Predklinické štúdie potvrdili, že tofacitinib *in vitro* inhibuje diferenciáciu a počet Th1 aj Th17 lymfocytov (13, 14). Na myšacích modeloch RA sa potvrdil imunomodulačný účinok tofacitinibu na sekréciu viacerých zápal regulujúcich cytokínov: došlo k potlačeniu syntézy TNF, IFN, IL-1 β , IL6, IL12 a GM-CSF a naopak k vzostupu tvorby IL-10, súčasne sa potvrdil pokles CRP (13).

S prípravkom prebehli 4 kľúčové klinické skúšania fázy III (*ORAL Solo, ORAL Standard, ORAL Step, ORAL Scan*), na základe výsledkov ktorých v súčasnosti prebieha americká aj európska registrácia (15). Štúdia *ORAL Solo* ukázala rýchlu a pretrvávajúcu klinickú účinnosť monoterapie tofacitinibom u pacientov s nedostatočne kontrolovanou RA klasickými aj biologickými chorobu modifikujúcimi antireumatikami (DMARDs). Štúdia *ORAL Standard* potvrdila klinickú odpoveď kombinovanej liečby tofacitinib + metotrexát (MTX) u pacientov nedostatočne kontrolovaných samotným MTX. Štúdia *ORAL step* ukázala rýchlu klinickú odpoveď na kombináciu tofacitinib + MTX u pacientov ktorí neodpovedali dostatočne na liečbu antagonistami TNF. Štúdia *ORAL Scan* demonštrovala schopnosť kombinovanej liečby tofacitinib + MTX zastaviť rádiografickú progresiu a zlepšiť klinické parametre pacientov s RA. Najčastejšie pozorovanými nežiaducimi účinkami boli infekcie horných dýchacích ciest (nazofaragitída), bolesti hlavy a hnačka.

Na základe uvedeného súhrnu klinických štúdií fázy III výrobca podal žiadosti o registráciu na príslušné európske aj americké liekové inštitúcie a predpokladá sa jeho skoré schválenie do klinického používania.

Zhrnutie

V časoch pred biotechnológiami bol repertoár liečiv obmedzený na určité zhluky molekúl zameraných na konkrétne extracelulárne ciele v cytoplazme alebo na povrchu buniek. Bežne používané liečivá boli až na niektoré výnimky malé molekuly, ich vývoj sa však na prelome tisícročí dostal na svoj vrchol, a preto sa hľadali ďalšie možnosti vývoja nových liečiv. Spočiatku sa vývoj uberal cestou tvorby rôzne upravených ľudských a iných proteínov. Cieľom bolo aktivovať alebo blokovať nimi sprostredkované deje. Tieto makromolekulové liečivá priniesli v liečbe mnohých chorôb významný pokrok, ale ukázalo sa, že nie sú účinné u všetkých pacientov trpiacich tou-ktorou chorobou a ich podávanie sa spája s radom nežiaducich účinkov. Navyše, vzhľadom k ich makromolekulovému, väčšinou proteínovému charakteru, ich treba podávať parenterálne.

Súčasný priemysel biotechnológií otvára nové možnosti tým, že využíva vedecké poznatky molekulárnej biológie a syntetizuje látky viažuce sa na intracelulárne štruktúry. Využívajú sa poznatky o prirodzených vnútrobunkových induktoroch a blokátorech biologických funkcií bunky, čím sa terapeutické zásahy stávajú ešte sofistikovenejšími než tomu bolo dosiaľ. Rovnakým smerom ako výrobca tofacitinibu sa ubrali aj iní výrobcovia liekov, v klinickom skúšaní sú aj ďalšie molekuly inhibujúce tyrozín kinázovú signalizáciu: baricitinib (rovnako ako tofacitinib ide o selektívny JAK1 a JAK2 inhibítor), filgotinib (selektívny JAK1 inhibítor). V blízkej budúcnosti sa dá očakávať vývoj ďalších liečiv zo skupiny modifikátorov bunkovej signalizácie. Samozrejme, tak ako pri všetkých nových liekoch, bude nevyhnutné veľmi pozorne sledovať nie iba ich účinnosť, ale aj bezpečnosť, a to z krátkodobého aj dlhodobého hľadiska.

Recenzent

1. Prof. MUDr. Milan Buc, DrSc. Imunologický ústav LFUK, Bratislava
2. RNDr. Martin Čente, PhD., Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava

LITERATÚRA

1. Bauman A. *Early Development of Therapeutic Biologics –Pharmacokinetics. Current Drug Metabolism*, 2006; 7: 15-21.
2. Edwards, CJ. *Immunological therapies for rheumatoid arthritis. British Medical Bulletin*, 2005; 73-74: 71-82.
3. Rovenský J, *Reumatoidná artritída - klinický obraz, diagnostika a liečba. Via practica*, 2008; 5 (1): 6-13.
4. Otero M, et al. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, 2007; 9; 220.
5. Schett G et al. How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2008; 58: 2936-2948.
6. Chizzolini C, Dayer JM, Miossec P. *Cytokines in chronic rheumatic diseases: is everything lack of homeostatic balance? Arthritis Research & Therapy*, 2009; 11: 246.

7. Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol*, 2002; 2: 364–371.
8. Rommel C, Camps M, Ji H. *PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond?* *Nat Rev Immunol*, 2007; 7: 191–201.
9. Manning G, Whyte DB, et al. (2002). *The protein kinase complement of the human genome.* *Science*, 298 (5600): 1912–1934.
10. Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*, 2002; 296 (5573): 1653–5.
11. Meyer DM, et al. Anti-inflammatory activity and neutrophil reductions mediated by the JAK1/JAK3 inhibitor, CP-690,550, in rat adjuvant-induced arthritis. *Journal of Inflammation*, 2010; 7: 1-12.
12. Jiang JK, Ghoreschi K, Deflorian F, et al.: Examining the chirality, conformation and selective kinase inhibition of 3-((3R,4R)-4-methyl-3-(methyl(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)piperidin-1-yl)-3-oxopropanenitrile (CP-690,550). *J Med Chem*, 2008, 51: 8012–8018.
13. Ghoreschi K, Jesson MI, Li X, et al. Modulation of innate and adaptive immune responses by tofacitinib (CP-690,550). *J Immunol* 2011; 186: 1-11.
14. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* 2010; 467(7318): 967-71.
15. Salgado E, Gómez-Reino JJ. The JAK inhibitor tofacitinib for active rheumatoid arthritis: results from Phase III trials. *Int. J. Clin. Rheumatol* 2013; 8(3): 315–326.
16. Emery P, Gaich CL, DeLozier AM, et al. Patient-Reported Outcomes from a Phase 3 Study of Baricitinib in Patients with Rheumatoid Arthritis with Inadequate Response to Conventional Synthetic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs. *ACR/ARHP Meeting 2015*; Abstract Number: 2730.
17. Vermeire S, Schreiber S, Petryka R, et al. Filgotinib, a selective JAK1 inhibitor, induces clinical remission in patients with moderate-to-severe Crohn's disease: interim analysis from the Phase 2 FITZROY study. *ECCO 2016*; Oral presentation 020.

Adresa: Doc. MUDr. Martin Hrubisko, PhD.,
Oddelenie klinickej imunológie a alergológie, OÚSA,
Hajdukova 10, 812 50 Bratislava 1
Kontakt: martin.hrubisko@ousa.sk

BIOLOGIKÁ V LIEČBE PRIMÁRNYCH IMUNODEFICIENCIÍ

Čižnár P.

1. detská klinika LFUK a DFNSP Bratislava

Primárne imunodeficiencie (PID) sú všeobecne považované za zriedkavé choroby, postihujúce menej ako 1 na 2000 jedincov našej populácie. Jednotlivé poruchy majú výskyt $1:2 \times 10^4$ až $1:2 \times 10^5$, avšak prevalencia všetkých primárnych imunodeficitov súhrnne nie je až taká zriedkavá. Príčinou PID je intrinzický defekt v mechanizme imunitnej odpovede, podmienený zväčša monogénovým postihnutím. Rozvoj teoretických poznatkov v odbore imunológia výrazne prispel k nárastu nových PID, na druhej strane samotné PID pomohli pri pochopení patofyziologických a fyziologických funkcií imunity. Ku klasickým PID patria poruchy ako je hereditárna agamaglobulinémia, ťažká kombinovaná imunodeficiencia (SCID) podmienená defektom počtu alebo funkcie T lymfocytov, dedičná neutropénia, chronická granulomatózna choroba, poruchy zložiek komplementu alebo komplexné poruchy ako napr. ataxia telangiektázia alebo Di-Georgeov syndróm. Najčastejšia klinicky významná hypogamaglobulinémia – bežná variabilná imunodeficiencia sa považuje za heterogénnu skupinu porúch s rovnakým klinicko-imunologickým fenotypom. Vďaka lepšej diagnostiky sa v posledných rokoch z tejto skupiny odčlenilo približne 15% monogénových porúch, ktoré považujeme za samostatné klinické jednotky. Podobne aj v prípade ostatných skupín sa celkový počet klinických a molekulovo-genetických jednotiek výrazne rozšíril, napr. u ťažkej kombinovanej imunodeficiencie sa identifikovalo viac ako 20 rôznych génov z rôznych oblastí. Dôležitým poznáním je skutočnosť, že mutácie v tom istom gène môžu mať veľmi odlišnú klinickú prezentáciu a prognózu.

Klasické terapeutické postupy sú zamerané najmä na liečbu infekčných komplikácií. Patrí k nim antiinfekčná liečba (antibiotiká, antimykotiká), substitučná liečba imunoglobulínmi, imunostimulačná liečba rastovými faktormi, podávanie cytokínov, ďalej transplantácia krvotvorných buniek a v posledných rokoch génová terapia. So zlepšením konvenčných terapeutických postupov, najmä substitúciou imunoglobulínov sa stále väčší počet pacientov dožíva dospelosti a väčší význam nadobúda liečba neinfekčných komplikácií. Medzi takéto patria autoimúnne komplikácie, chronické zápalové zmeny alebo patologická lymfoproliferácia, v určitých prípadoch malígneho charakteru. Zdokonaľujúca sa diagnostika na molekulovej úrovni otvára priestor pre podstatne cielenejší zásah do patomechanizmu jednotlivých chorôb. Biofarmaceutickými postupmi syntetizované látky – monoklonové protilátky, fúzne proteíny, anti-cytokíny a pod., sú obvykle vyvíjané pre liečbu chorôb ako je reumatoidná artritída, nešpecifické zápalové ochorenia čreva (IBD) alebo onkologické choroby. Tieto biologiká postupne nachádzajú svoje uplatnenie aj v liečbe PID. Ako príklad môže slúžiť štúdium pacientov s defektmi v molekulách CTLA a LRBA

Deficiencia LRBA

Hypogamaglobulinémia s chýbaním B lymfocytov u detí v prvých rokoch života je z 80% spojená s X viazanou dedičnosťou a najčastejšou poruchou je deficit Btk tyrozínkinázy, známej aj pod názvom Brutonova tyrozínkináza. Na rozdiel od detí sú v dospelom veku najčastejšou primárnou hypogamaglobulinémiou bežná variabilná imunodeficiencia, v 99% s prítomnosťou normálneho počtu B lymfocytov. Zatiaľ čo v dospelom veku je takáto porucha často sprevádzaná autoimunitou, u detí je to zriedkavé. Lopez- Herrera a spol. (1) v roku 2012 identifikovali celkovo 4 rodiny s autozómovo recesívnym familiárnym výskytom hypogamaglobulinémie, autoimunity a lymfoproliferácie u 5 detí. Pomocou analýzy väzieb identifikovali ako suspektnú oblasť chromozómu 4q a následným sekvenovaním kandidátskych génov potvrdili homozygotné mutácie v proteíne LRBA (lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein) u postihnutých jedincov. Jedinci s heterozygotnými mutáciami boli zdraví. Už skôr bolo známe, že proteín LRBA má domény zhodné s proteínmi ovplyvňujúcimi pohyb vnútrobunkových vezikúl (2), ale jeho biologická funkcia a patofyziologický význam ostával neznámy. V imunologickom profile mali pacienti poruchu vývoja B lymfocytov. Chybnú aktiváciu a proliferáciu B lymfocytov v *in vitro* podmienkach sprevádzala porucha tvorby plazmablastov a nízka sekrécia imunoglobulínov. Autori konštatovali, že pravdepodobnou príčinou je porucha autofágie a vnímavosť na apoptotické signály. Všetci postihnutí jedinci boli pôvodne klinicky diagnostikovaní ako bežná variabilná imunodeficiencia s tým rozdielom, že autoimunita začínala vo včasnom detskom veku.

Interakcia CTLA-4 a LRBA

V roku 2015 Lo B a spol. (3) publikovala prácu, podľa ktorej sa pacientom s deficitom LRBA klinický stav dramaticky zlepšil po podaní farmaka abatacept, fúzneho proteínu imunoglobulínu a molekuly CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4). CTLA-4 je kľúčovým inhibičným proteínom, ktorý sa exprimuje na aktivovaných T lymfocytoch a regulačných T lymfocytoch (Treg) (4). Inhibuje imunitnú odpoveď pomocou negatívneho signálu, kompetíciou s kostimulačnou molekulou CD28 o väzbové miesta CD80 a CD86. CTLA-4 sa nachádza v endocytických vezikulách, ktoré sa uvoľňujú na povrch bunky po stimulácii T bunkového receptora. Túto molekulu je možné ovplyvniť tromi biologikami, ktoré ju nahradzujú alebo viažu. Abatacept, používaný na liečbu reumatoidnej artritídy (5); belatacept, používaný na prevenciu rejekcie štepu (6) a ipilimumab, určený na liečbu melanómu (7). Autori identifikovali 9 pacientov s bialelickou mutáciou génu LRBA, u ktorých potvrdili imunoblotovou analýzou a prietokovou cytometriou zníženú alebo chýbajúcu expresiu LRBA proteínu. Väčšina pacientov sa diagnostikovala v rannom detstve autoimúnnymi poruchami (diabetes mellitus typ 1), lymfoproliferatívnymi patológiami (Burkittov lymfóm), intersticiálnym pľúcnym postihnutím s histologicky preukázanými T lymfocytovými infiltrátmi. Abatacept, ktorý utlmil celulárnu odpoveď T lymfocytov, veľmi efektívne potlačil autoimúne

aj lymfoproliferatívne komplikácie a súčasne podstatne zlepšil protilátkovú odpoveď. Po dobu 5-8 rokov mali pacienti minimálne infekčné a neinfekčné komplikácie. Táto klinická odpoveď a vyššie uvedená zhoda LRBA s proteínmi intracelulárnych vezikulí viedla k hypotéze, že LRBA reguluje presun CTLA-4 vo vnútri bunky.

Deficiencia CTLA-4

Význam molekuly CTLA-4 v homeostáze lymfocytov a pri navodení tolerancie potvrdzujú experimenty s *knock-out* myšami. Vyradenie génu CTLA-4 viedlo k veľmi rýchlemu úmrtiu v dôsledku lymfocytovej infiltrácie mnohých orgánov (8). Táto molekula je kľúčovým inhibítorom proliferácie T lymfocytov. Autozomovo recesívna porucha CTLA-4 sa u ľudí nikdy nediagnostikovala, ale v 2014 roku publikovali dve pracovné skupiny údaje o pacientoch s parciálnym deficitom CTLA-4 (9, 10). Tento parciálny deficit, označovaný ako haploinsuficiencia sa identicky ako v prípade deficitu LRBA spája s lymfocytovými infiltrátmi mnohých orgánov a hypogamaglobulinémiou charakteru bežnej variabilnej imunodeficiencie, s nízkym počtom B lymfocytov. Na rozdiel od deficiencie LRBA išlo o dospelých pacientov nad 20 rokov. Klinický fenotyp deficitu LRBA a CTLA-4 haploinsuficiencie spája predovšetkým hyperaktívacia lymfocytov spojená s infiltráciou minimálne jedného nelymfoidného orgánu, obvykle pľúc alebo mozgu, ako aj častá enteropatia ako prejav zápalových zmien.

Molekula CTLA-4 viaže ligandy CD80 a CD86 s vyššiu afinitou ako molekula CD28 s ktorou súťaží o spoločné väzobné miesto na antigén prezentujúcich bunkách. Zatiaľ čo CD28 je dôležitým stimulačným signálom, CTLA-4 silným inhibičným signálom. Konštitučne je prítomná na povrchu T-regulačných buniek (Treg), na konvenčných T lymfocytoch len po ich aktivácii. CTLA-4 sa po väzbe dostáva do endozómov, kde sa recykluje pre ďalšie použitie. LRBA bráni degradácii CTLA-4, čím umožňuje jeho trvalú prítomnosť v intracelulárnych vezikulách. Deficit LRBA naopak vedie k vyčerpaniu zásob CTLA-4. Tvorba protilátok závisí od signalizácie cestou kostimulačnej molekuly CD28 a od pomoci T lymfocytov. Chronická stimulácia vedie k vyčerpaniu, resp. funkčnej neschopnosti odpovedať na signály a progresívnemu poklesu protilátok s obrazom hypogamaglobulinémie.

Liečba deficitu CTLA-4 a LRBA

Obidve genetické poruchy spôsobujú funkčnú stratu CTLA-4. Podobná situácia nastáva aj v prípade liečby monoklonovou protilátkou proti CTLA-4 (Ipilimumab), ktorá sa používa v liečbe metastazujúceho melanómu. U 1/3 takto liečených pacientov sa prejavia známky enteropatie resp. kolitídy. U pacientov s genetickým defektom je jednou z terapeutických alternatív liečba zameraná na ovplyvnenie dráhy CD28/CTLA-4 a ovplyvnenie funkcie Treg lymfocytov. Abatacept – fúzny proteín, slúži ako farmakologická náhrada CTLA-4 a nahrádza imunosupresívnu funkciu Treg. Inými postupmi sú imunosupresíva typu mTOR inhibítorov (mechanistic target of rapamycin) alebo transplantácia krvotvorných buniek. Tento príklad ilustruje akým spôsobom sa môžu

podieľať biologická na nových poznatkoch o mechanizme imunitných reakcií a akým spôsobom sa bude uberať terapia zriedkavých porúch imunity v budúcnosti.

Recenzent

1. doc. MUDr. Vladimír Bzdúch PhD., 1.detská klinika LFUK a DFNSP, Bratislava
2. RNDr. Rostislav Škrabana, PhD., Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava

LITERATÚRA

- 1) Lopez-Herrera, G. a spol. Deleterious Mutations in LRBA Are Associated with a Syndrome of Immune Deficiency and Autoimmunity *The American Journal of Human Genetics* 90, 986–1001, June 8, 2012.
- 2) N. de Souza a spol. SEL-2, the *C. elegans* neurobeachin/LRBA homolog, is a negative regulator of lin-12/Notch activity and affects endosomal traffic in polarized epithelial cells. *Development* 134, 691–702, 2007.
- 3) Takahashi T a spol. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* Jul 17;192(2):303-10, 2000.
- 4) Atzeni F a spol. Long-term safety of abatacept in patients with rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 12 (12): 1115-7, 2013.
- 5) Wojciechowski D, Vincenti F. Belatacept in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 17 (6): 640-7, 2012.
- 6) Wolchok JD a spol. Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Ann N Y Acad Sci.* 1291: 1-13, 2013.
- 7) Lo B, Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science* 24; 349 (6246): 436-40, 2015.
- 8) Tivol EA a spol. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 3 (5):541-547, 1995.
- 9) Kuehn HS a spol. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science.* 345 (6204): 1623-1627, 2014.
- 10) Schubert D. a spol. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med.* 20 (12): 1410-1416, 2014.

MEZENCHÝMOVÉ STRÓMOVÉ BUNKY V GÉNOVEJ TERAPII ONKOLOGICKÝCH CHORÔB

Matúšková M, Ďuriníková E, Altaner Č, Kučerová L.

Laboratórium molekulárnej onkológie, Ústav experimentálnej onkológie,
Biomedicínske centrum SAV, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava

Abstrakt

Mezenchýmové strómové bunky (MSC) boli identifikované pred niekoľkými desaťročiami. Majú viacero unikátnych vlastností a jednou z nich je afinita k nádorovému tkanivu. Vďaka tomuto fenoménu je ich možné využiť ako nosiče terapeutických molekúl pri cielej protinádorovej liečbe, napríklad pri génovej terapii využívajúcej enzymatickú konverziu netoxického „predliečiva“ na účinné chemoterapeutikum *in situ*. Na našom pracovisku sa protinádorovej génovej terapii pomocou mezenchýmových stromálnych buniek izolovaných z tukového tkaniva venujeme viac ako desať rokov a na niekoľkých predklinických modeloch sme ukázali jej účinnosť. V tejto prehľadnej práci definujeme MSC ako unikátny nástroj génovej terapie. Na druhej strane by sme chceli poukázať aj na faktory, ktoré je treba brať do úvahy pri využití MSC v klinickej praxi.

Úvod

Onkologické choroby sú stále jednou z hlavných príčin úmrtia napriek pokrokom v diagnostike, terapii a preventívnym programom. Súčasná liečba je sprevádzaná vedľajšími účinkami, ktoré majú negatívny dopad na kvalitu života onkologických pacientov. Stretávame sa s chemorezisteniou nádorových buniek, stále aktuálnym problémom je metastatické ochorenie, lebo práve ono je častou príčinou úmrtia pacientov. Je nevyhnutné hľadať nové, účinnejšie a cielejšie spôsoby liečby. Jednou z možností je génová terapia.

Protinádorová terapia využívajúca enzymatickú konverziu netoxického „predliečiva“ je známa niekoľko desaťročí. Na vnesenie terapeutického génu do cieľových buniek sa používali a dodnes stále používajú vírusové vektory, rôzne typy nanonosičov alebo fyzikálne metódy. Napriek veľmi sľubným výsledkom predklinických experimentov veľa klinických štúdií nespĺnilo očakávanie. Príčinou bola nízka účinnosť prenosu genetickej informácie do cieľových buniek, nedostatočná infiltrácia nádorového tkaniva vektorom, prípadne nízka expresia terapeutického génu.

Mezenchýmové strómové bunky

Mezenchýmové strómové bunky (MSC) boli identifikované pred niekoľkými desaťročiami [Friedenstein et al., 1970]. MSC sú nehematopoetické multipotentné stró-

mové bunky fibroblastovej morfológie, ktoré boli pôvodne identifikované v kostnej dreni, ale nachádzajú sa takmer vo všetkých tkanivách na vonkajšej strane cievnych kapilár, odkiaľ putujú na miesto určenia na základe chemických signálov. K najčastejšie využívaným zdrojom vo výskume a čoraz častejšie aj v klinickej praxi, hlavne v regeneratívnej medicíne, sú kostná dreň, tukové tkanivo, zubná dreň, pupočník alebo pupočníková krv. Prirodzenou funkciou MSC je podpora homeostázy, prispievajú k regenerácii a hojeniu rán. Medzinárodná spoločnosť pre bunkovú terapiu (ISCT, International Society for Cellular Therapy) určila minimálne kritériá charakterizujúce MSC. *Ex vivo* sú definované schopnosťou adhérencie na povrch plastových kultivačných nádob, schopnosťou diferencovať na osteoblasty, adipocyty a chondrocyty a panelom povrchových markerov. Viac ako 95% analyzovaných buniek musí na svojom povrchu exprimovať CD73, CD90 a CD105, zároveň musia byť negatívne na CD45, CD34, CD14 alebo CD11b, CD79 α alebo CD19 a HLA-DR [Dominici et al., 2006]. Nové kritériá založené na použití pokročilých metód ako stanovenie transkriptómu, proteómu alebo sekretómu by umožnili presnejšiu definíciu MSC [Keating, 2012], [Ranganath et al., 2012] prehľadne v [Durinikova et al., 2014].

Génová terapia sprostredkovaná mezenchýmovými stromovými bunkami

Zistenie, že tieto bunky majú popri iných unikátnych vlastnostiach aj vysokú afinitu k nádorovému tkanivu a môžu byť využité ako ciele nosiče terapeutických molekúl vrátane génov umožnila výrazný pokrok v protinádorovej génovej terapii. Nádor vyšiel podobné chemické signály ako poškodené tkanivo, môžeme ho prirovnať k nehojacej sa rane [Dvorak, 1986]. Tieto signály MSC rozpoznávajú, usídľujú sa v nádore a stávajú sa súčasťou nádorovej strómy. Génová terapia s využitím MSC ako nosičov terapeutických génov výrazne pomohla eliminovať vyššie uvedené prekážky súvisiace s limitmi vírusových alebo nevírusových vektorov. Geneticky modifikované MSC dopravujú terapeutický gén priamo na miesto určenia.

Na našom pracovisku dlhodobo využívame MSC izolované z tukového tkaniva, (adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells, AT-MSC). Tukové tkanivo je veľmi vhodným zdrojom MSC, je možné získať ho v dostatočnom množstve ako vedľajší produkt kozmetických liposukcií alebo plastických operácií. Ďalšou výhodou je pomerne vysoké zastúpenie MSC. Bunky po izolácii geneticky modifikujeme retrovírusovými vektormi, ktoré sa integrujú do genómu hostiteľskej bunky a zabezpečia jej trvalú genetickú modifikáciu a stálu expresiu transgénu. V protinádorovej génovej terapii je možné potlačiť expresiu aktivovaných onkogénov, obnoviť expresiu nádor-supresorových génov, aktivovať protinádorovú imunitu, inhibovať nádorovú angiogénu alebo metastatický potenciál nádorových buniek. Samostatnú skupinu tvoria gény indukujúce samodeštrukciu nádoru – takzvané toxické gény kódujúce enzýmy konvertujúce netoxické „predliečivo“ na toxický produkt [Portsmouth et al., 2007]. Práve na posledný typ génov sa zameriavame na našom pracovisku. AT-MSC geneticky modifikujeme enzýmom, ktorý nemá v cicavčích bunkách ekvivalent, a preto bežné cicavčie

bunky nie sú schopné „predliečivo“ aktivovať. Konvertovať ho dokážu len geneticky modifikované bunky. Takýto prístup sa nazýva aj „samovražedná génová terapia, suicide gene therapy“. Ak sú na terapiu využívané bunkové nosiče, nie je prvoradá smrť geneticky modifikovanej bunky (aj keď je to jav, ktorý zvyšuje bezpečnosť terapie), ale indukcia apoptózy okolitých nádorových buniek spôsobená uvoľňovaním konvertovaného liečiva do okolia. Tento fenomén sa nazýva „bystander efekt“. Na rozdiel od konvenčnej chemoterapie dochádza k toxickému efektu len v nádore, kde sa stretne aktívny enzým so systémovo podaným predliečivom, ktoré následne konvertuje na aktívne chemoterapeutikum. Dokázali sme, že terapeutické systémy využívajúce fúzny kvasinkový gén cytozindeamináza::uracil fosforibozyl transferáza (CD::UPRT) s „predliečivom“ 5-fluorocytosín (5-FC) a tymidín kináza vírusu *Herpes simplex* (HSVtk) s „predliečivom“ ganciklovir (GCV) sa vyznačujú vysokou účinnosťou na rôzne typy nádorových buniek *in vitro*, ako aj na modeli imunodeficientných myší. Po systémovom podaní terapeutických MSC sme pozorovali výraznú inhibíciu rastu subkutánnych nádorov odvodených od nádoru hrubého čreva [Kucerova et al., 2007] alebo melanómu [Kucerova et al., 2008]. Na tomto modeli sme ukázali, že viac ako 80 % myší dlhodobo preživa bez návratu ochorenia [Kucerova et al., 2014].

Významné výsledky dosiahlo naše pracovisko na ortotopickom modeli glioblastómu. Na toto najagresívnejšie nádorové choroba mozgu s veľmi zlou prognózou doteraz neexistuje účinná liečba. Experimenty ukázali, že geneticky modifikované AT-MSC si zachovávajú nádorový tropizmus aj v prípade intrakraniálneho podania relatívne ďaleko od xenotransplantátu. Použitie osmotických púmp pre kontinuálne podávanie 5-FC a opakované podanie terapeutických buniek predĺžilo dobu prežívania experimentálnych zvierat [Altanerova et al., 2012].

Experimenty, ktoré simulovali klasický terapeutický postup pri liečbe pacientov trpiacich glioblastómom ukázali, že liečba systémom CD::UPRT-MSC/5-FC má kuraatívny účinok a výsledkom je dlhodobé prežívanie zvierat, ktoré podstúpili chirurgickú resekciu nádoru a následne génovú terapiu dávkovanú pomocou osmotických púmp [Altaner et al., 2014].

Zameriavame sa aj na štúdium účinnosti tohto terapeutického prístupu na metastatické choroba. Karcinóm ovária patrí medzi nádorové ochorenia s nepriaznivou prognózou pre rezistenciu voči konvenčnej liečbe a častému metastatickému rozsevu buniek v brušnej dutine. Pomocou gébovej terapie sprostredkovanej terapeutickými AT-MSC sme dosiahli dlhodobé prežívanie u 33% myší s metastatickým rozsevom modelových buniek [Toro et al., 2016].

Na modeli pľúcnych metastáz indukovaných bunkami nádoru prsníka sme dokázali, že systémy CD::UPRT-MSC/5-FC a HSVtk-MSC/GCV pôsobia synergicky a ich kombináciou je možné eliminovať nádorové bunky, ktoré sa vyznačujú určitým stupňom rezistencie voči jednotlivým systémom [Matuskova et al., 2015].

Na druhej strane sme však zistili, že pre účinnosť terapie sú dôležité vlastnosti nádorových buniek. Významným faktorom je ich schopnosť komunikovať pomocou

„gap junctions“, tento spôsob komunikácie je kritický najmä pri systéme HSVtk-MSVC/GCV, kedy fosforylovaný GCV nie je schopný difúzie cez bunkové membrány a z terapeutickú do cieľovej bunky prechádza práve cez tento typ medzibunkových spojení. Dôležitá je i hladina expzie enzýmov zapojených do metabolizmu nukleotidov a ABC transportérov schopných vylúčiť chemoterapeutiká alebo ich metabolity do medzibunkového priestoru [Matuskova et al., 2012].

Zistili sme, že rôzne typy nádorových buniek sa odlišujú v schopnosti pritiahnúť k sebe MSC. Napriek sľubným výsledkom v *in vitro* podmienkach sme u jednej modelovej bunkovej línie nedosiahli signifikantný účinok *in vivo*. Predpokladáme, že príčinou bola nedostatočná infiltrácia nádoru terapeutickými bunkami [Matuskova et al., 2010].

V súčasnej dobe už prebiehajú prvé klinické štúdie s využitím génovej terapie pomocou bunkových nosičov. V USA prebieha štúdia využívajúca neuronálne progenitory exprimujúce cytozín-deaminázu na liečbu glioblastómu. Cieľom prvej európskej štúdie TREAT-ME1 je stanovenie bezpečnosti a účinnosti terapie pomocou autológnych MSC izolovaných z kostnej drene transdukovaných retrovírusovým vektorom kódujúcim HSVtk [Niess et al., 2015].

Doteraz však nebola publikovaná práca, ktorá by priamo definovala účinnosť génovej terapie pomocou predliečiva a enzýmu na chemorezistentné populácie nádorových buniek alebo na nádorové kmeňové bunky. Chemorezistencia nádorových buniek je však veľmi častý jav komplikujúci alebo znemožňujúci protinádorovú liečbu, preto sa zaoberáme účinnosťou tohto prístupu na chemorezistentné populácie nádorových buniek. Kultiváciou chemosenzitivných buniek odvodených od kolorektálneho karcinómu v postupne sa zvyšujúcej koncentrácii 5-fluorouracilu (5-FU) sme pripravili chemorezistentný derivát schopný proliferácie v klinicky relevantnej koncentrácii 5-FU. S počtom pasáží v prítomnosti chemoterapeutika sa chemorezistencia zvyšovala, rovnako ako expresia génov poukazujúcich na agresívny fenotyp tohto derivátu. Zistili sme, že rezistencia voči 5-FU významným spôsobom negatívne ovplyvňuje účinnosť systému CD::UPRT-MSVC/5-FC. Poukázali sme na skutočnosť, že predchádzajúca chemoterapia a možná rezistencia nádoru by mala byť braná do úvahy pri definovaní kritérií pre pacientov vstupujúcich do klinických štúdií [pripravovaný rukopis Durinkova et al.].

Pri klinickom využití mezenchýmových strómových buniek treba pamätať aj na skutočnosť, že MSC, alebo z nich odvodené bunky, sú súčasťou nádorového mikroprostredia, kde ovplyvňujú vlastnosti nádorových buniek - môžu mať podporný vplyv na ich proliferáciu, invazivnosť a znižovať citlivosť na chemoterapiu. Ukázali sme že, MSC kultivované v prítomnosti Cis-platiny (CisPt) majú odlišné vlastnosti ako bunky kultivované bez prítomnosti chemoterapeutika. Zmeny v sekrečnom a fosforylačnom profile MSC následne negatívne ovplyvnili chemosenzitivnosť buniek odvodených z nádoru prsníka a zároveň tieto bunky získali niektoré vlastnosti nádorových kmeňových buniek [Skolekova et al., 2016].

Záver

Terapeutický potenciál MSC je nespochybniteľný. Prebieha čoraz viac klinických štúdií, kde sú MSC využívané pri liečbe autoimunitných ochorení, reakcie štetu proti hostiteľovi (GVHD), regeneratívnej medicíne, plastickej a rekonštrukčnej chirurgii. Umožnili výrazný pokrok v protinádorovej gémovej terapii. Je však potrebné stále myslieť na skutočnosť, že MSC môžu mať podporný účinok na nádorové bunky a môžu znížiť účinnosť konvenčnej protinádorovej liečby.

Recenzent

1. RNDr. Zuzana Kozovská, PhD., Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, Bratislava
2. RNDr. Monika Žilková, PhD., Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava

LITERATÚRA

Altaner C, Altanerova V, Cihova M, Ondicova K, Rychly B, Baciak L, Mravec B: Complete regression of glioblastoma by mesenchymal stem cells mediated prodrug gene therapy simulating clinical therapeutic scenario. *Int J cancer* 2014; 134: 1458-1465.

Altanerova V, Cihova M, Babic M, Rychly B, Ondicova K, Mravec B, Altaner C: Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells expressing yeast cytosinedeaminase::Uracil phosphoribosyltransferase inhibit intracerebral rat glioblastoma. *Int J cancer* 2012; 130: 2455-2463.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.

Durinikova E, Kucerova L, Matuskova M: Mesenchymal stromal cells retrovirally transduced with prodrug-converting genes are suitable vehicles for cancer gene therapy. *Acta Virol* 2014; 58:1-13.

Dvorak HF: Tumors: Wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New Engl J Med* 1986; 315: 1650-1659.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS: The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinetics* 1970; 3: 393-403.

Keating A: Mesenchymal stromal cells: New directions. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 709-716.

Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M, Tyciakova S, Altaner C: Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res* 2007; 67: 6304-6313.

Kucerova L, Matuskova M, Pastorakova A, Tyciakova S, Jakubikova J, Bohovic R, Altanerova V, Altaner C: Cytosine deaminase expressing human mesenchymal stem

cells mediated tumour regression in melanoma bearing mice. *J Gene Medicine* 2008; 10: 1071-1082.

Kucerova L, Skolekova S, Demkova L, Bohovic R, Matuskova M: Long-term efficiency of mesenchymal stromal cell-mediated cd-msc/5fc therapy in human melanoma xenograft model. *Gene Therapy* 2014; 21: 874-887.

Matuskova M, Baranovicova L, Kozovska Z, Durinikova E, Pastorakova A, Hunakova L, Waczulikova I, Nencka R, Kucerova L: Intrinsic properties of tumour cells have a key impact on the bystander effect mediated by genetically engineered mesenchymal stromal cells. *J Gene Med* 2012; 14:776-787.

Matuskova M, Hlubinova K, Pastorakova A, Hunakova L, Altanero V, Altaner C, Kucerova L: Hsv-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells. *Cancer Lett* 2010; 290:58-67.

Matuskova M, Kozovska Z, Toro L, Durinikova E, Tyciakova S, Cierna Z, Bohovic R, Kucerova L: Combined enzyme/prodrug treatment by genetically engineered at-msc exerts synergy and inhibits growth of mda-mb-231 induced lung metastases. *J Exp & Clin Cancer Research: CR* 2015; 34: 33.

Niess H, von Einem JC, Thomas MN, Michl M, Angele MK, Huss R, Gunther C, Nelson PJ, Bruns CJ, Heinemann V: Treatment of advanced gastrointestinal tumors with genetically modified autologous mesenchymal stromal cells (treat-me1): Study protocol of a phase i/ii clinical trial. *BMC Cancer* 2015; 15: 237.

Portsmouth D, Hlavaty J, Renner M: Suicide genes for cancer therapy. *Mol Aspects Med* 2007; 28: 4-41.

Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM: Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 244-258.

Skolekova S, Matuskova M, Bohac M, Toro L, Durinikova E, Tyciakova S, Demkova L, Gursky J, Kucerova L: Erratum to: Cisplatin-induced mesenchymal stromal cells-mediated mechanism contributing to decreased antitumor effect in breast cancer cells. *Cell Commun Signal: CCS* 2016; 14: 7.

Toro L, Bohovic R, Matuskova M, Smolkova B, Kucerova L: Metastatic ovarian cancer can be efficiently treated by genetically modified mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Devel* 2016, in press.

PodĎakovanie

Časť prác citovaných v tomto príspevku vznikla vďaka finančnej podpore agentúry APVV – granty APVV-0052-12 a APVV-0230-11; agentúry VEGA – granty 2/0171/13, 2/0130/13; Nadácii Výskum rakoviny a Lige proti rakovine.

Adresa:

Miroslava Matúšková, Ústav experimentálnej onkológie,
Biomedicínske centrum SAV, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava

INDEX AUTOROV

Altaner, Č.	104	Hrubiško, M.	93
Blažičková, S.	48	Klimová, E.	33, 38
Buc, M.	24, 38	Kontseková, E.	6
Bucová, M.	38	Košíková, N.	12
Cudráková, D.	38	Kučerová, L.	104
Čente, M.	12	Lisá, I.	38
Čižnár, P.	100	Matúšková, M.	104
Donáth, V.	33	Nemšovská, J.	74
Đuriníková, E.	104	Novák, M.	6, 12
Đurmanová, V.	38	Prčina, M.	6
Dzurilla, M.	86	Rovenský, J.	44, 48
Dzurillová, Ž.	86	Smiešková, A.	33
Filipčík, P.	12	Suchánková, M.	38
Gajdošechová, B.	38	Šimaljaková, M.	60, 67
Gmitterová, K.	38	Turčáni, P.	38
Hochmuth, L.	33	Vince-Kázmérová, Z.	6

Neuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied

**Slovenská imunologická spoločnosť
Slovenská spoločnosť pre alergológiu a klinickú imunológiu**

BIOLOGICKÁ LIEČBA V TEÓRII A PRAXI III.

zborník prednášok

Bratislava, Dúbravská cesta 9,
8. september 2016

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 6 kreditov.

Vydalo vydavateľstvo AHO5, Dunajská Lužná,
v decembri 2016 ako svoju 4. publikáciu.

Spoluvydavateľ:
Neuroimunologický ústav SAV

Editor: Peter Filipčík, Milan Buc

Sadzba: Peter Blaho

ISBN 978-80-971357-3-7