

KONTROLA AUTOAGRESIVNÍCH PROCESŮ POMOCÍ PŘIROZENÝCH A DALŠÍCH PRO ORGANISMUS NEŠKODNÝCH POSTUPŮ

PEKÁREK J., ČECH K., ¹NEVŠÍMAL O.

THE CONTROL OF AUTOAGGRESSIVE PROCESSES BY MEANS OF NATURAL AND OTHER ORGANISM-FRIENDLY PROCEDURES

At present an increase of some autoaggressive diseases can be observed. The commonly used treatment consists of the administration of some immunosuppressive drugs or some hormonal preparations. This type of therapy is accompanied by some undesired side effects, as these drugs influence also some other cell systems besides the actively active cells. These drugs are also known to lower the resistance to some intercurrent infections.

Due to these undesired side effects some naturally occurring factors are introduced into the therapy. These are, e.g. TGF- β , or some interleukins (IL-10 etc.).

In our department an immunosuppressively acting substance was isolated from DHL which has the ability to inhibit the AA (adjuvant arthritis) in rats. In humans this SF (suppressor factor) stimulates the CD 8⁺ cells which are known to have suppressor activity.

This SF was successfully applied in some autoaggressive diseases, e.g. atopic eczema, multiple sclerosis, some polyradiculoneuritis, amyotrophic lateral sclerosis etc. In this paper the results in the ALS patients are given.

Amongst other possibilities of the therapy the application of antilymphocyte sera, monoclonal antibodies to some CD markers of lymphocytes and some methods of hyposensitization or tolerance induction are mentioned.

Further, an original method using antigen bound to insoluble carrier is described. This administration of encephalitogen bound onto Sforon (polyacrylate spheres) did not only inhibit the EAE manifestations but also enable the survival of guinea-pigs which had already manifested the clinical signs of EAE. (Tab. 8, Fig. 1, Ref. 8.)

Key words: autoaggressive diseases, therapy, immunosuppression, EAE, hyposensitization, suppressor factor.

Bratisl Lek Listy 1997; 98: 315–320

V poslední době přibývá chorob v jejichž patogenезi hraje podstatnou úlohu autoagresivita. Dosavadní způsoby léčby spočívají v potlačení imunity většinou pomocí léků chemické povahy, nebo hormonální preparáty. Tato léčba bývá spojena s nežádoucími projevy neboť se jedná většinou o látky inhibující metabolismus i jiných buněčných systémů než jen buněk imunitního systému. Další nepříjemnou komplikací je snížená odolnost vůči interkurentním infekcím.

Z důvodu těchto nežádoucích komplikací se v poslední době uvažuje o použití přirozeně se vyskytujících látek s imunopresivními vlastnostmi. Jedná se na př. o TGF- β nebo o některé interleukiny (IL-10 ap.).

Na našem pracovišti byla izolovaná látka z DHL (dialyzátu homogenátu leukocytů) se schopností potlačit AA (adjuvantní artritidu) u krys. U lidí stimuluje tato látka CD8⁺-lymfocyty, nebo lymfocyty tvořící E-rozety citlivé na vliv teofylinu. Tento imunopresivní faktor (SF) se uplatnil v léčbě celé řady autoagresivních chorob (atopický ekzém, roztroušená skleróza, u některých polyradikuloneuritid, amyotrofické laterální skleróze ap.). V práci jsou podány výsledky léčby pacientů s ALS, u kterých došlo ke zpomalení průběhu nemoci a prodloužení života.

Z dalších možností léčby se uvádí podávání antilymfocytárních sér, monoklonálních protilátek proti různým znakům lymfocytů (CD) a některé metody hyposenzibilizace a navození tolerance k příslušným autoantigenům.

Dále se uvádí způsob aplikace autoantigenů navázaného na nerozpuštěný nosič. Podání takto navázaného encefalitogenu na polyakrylátový preparát Sforon dokázalo nejen zabránit vzniku EAE u morčat, ale i zabránit uhynutí těch morčat, u kterých se již projevíly známky EAE. (Tab. 8, obr. 1, lit. 8.)

Klíčová slova: autoagresivní choroby, léčba, imunoprese, EAE, hyposenzibilizace, supresorický faktor.

Bratisl. lek. Listy, 98, 1997, č. 6, s. 315–320

SEVAC a.s. v Praze a ¹Neurologická klinika Fakulty všeobecného lékařství Karlovy university v Praze

SEVAC a.s., Prague, and ¹Neurological Clinic, Faculty of Medicine, Charles University, Prague

Address for correspondence: J. Pekárek, MD, SEVAC a.s., Korunní 108, 101 03 Praha 10, Česká republika.

Phone: +420.2.67310907, Fax: +421.2.67311297

V poslední době přibývá chorob, v jejichž patogenезi hraje podstatnou úlohu různé imunopatologické mechanismy. K poškození buněk, tkání nebo orgánů dochází z mnoha příčin. Nejznámější příčinou je reakce různých složek imunitního systému proti tělu vlastním strukturám. V těchto případech je důsledkem autoimunitních reakcí autoagresivita. V jiných případech je poškození organismu vyvoláno původně obrannými mechanismy, jako je zá-

Tab. 1. Účinek supresorického faktoru na adjuvantní artritidu u kryš.
Tab. 2. The effect of suppressoric factor on the adjuvant arthritis in rats.

Způsob ovlivnění Treatment	Otok tlapky Foot pad oedema	Albumin	Hyaluronová kyselina Hyaluronic acid	Biopterin	Nukleoly Nucleoli	RTG nálež RTG finding
neovlivněné non-treated	0,70±0,13	29,0±3,4	148,2±54,4	56,0±15	9,5	0
AA neovlivněné AA non-treated	1,53±0,31	20,5±3,8	230,7±94,6	108,0±24	22,8	5,0
AA 250 µl DLE	1,28±0,30	25,7±2,8 ^b	188,0±92,7	82,0±12	15,3	3,5
AA 250 µl SF	1,02±0,30 ^a	29,4±2,3 ^a	146,6±41,2 ^a	54,0±15 ^a	8,5 ^a 1,0 ^a	

Poznámky: AA - kryšy s adjuvantní artritidou

^a - statisticky významná odchylka od AA kryš $p < 0,01$

^b - statisticky významná odchylka od AA kryš $p < 0,05$

Notes: AA - rats with adjuvant arthritis

^a - statistically significant difference from AA rats $p < 0.01$

^b - statistically significance difference from AA rats $p < 0.05$

nět, destruktivní činnost cytotoxických T-lymfocytů (vůči buňkám obsahujícím virové antigeny, nebo antigeny dalších infekčních agens, nádorové antigeny ap.). Je proto třeba si uvědomit, že tyto původně obranné mechanismy mají svoje opodstatnění pouze v určitém stadiu obranné reakce. Přetrvávání zánětu může např. vést k chronicitě procesu, nebo může dokonce iniciovat autoagresivitu. Léčebný zásah vyžaduje proto utlumení těchto pro organismus nežádoucích imunitních pochodů, a to navíc pouze v době, kdy jejich původně obranný charakter přechází již v patologickou reakci.

K utlumení nežádoucích imunitních reakcí se běžně používá celé řady inhibitorů různých buněčných pochodů, nebo různých látek hormonální povahy. Většina léčebně používaných inhibitorů jsou látky chemické povahy, které se v organismu přirozeně nevyskytují. Tyto látky mají navíc tu nevýhodu, že kromě buněk imunitního systému postihují i další buněčné systémy v organismu. Z toho důvodu je tato léčba většinou spojena s nežádoucími vedlejšími projevy, jako je porucha funkce některých orgánů, snížená odolnost proti interkurentním infekcím, porucha zpětné vazebného systému (např. u kortikosteroidů) ap.

V poslední době se proto objevuje snaha používat k utlumení nežádoucích reakcí imunitního systému látek nebo mechanismů vyskytujících se v organismu přirozeně, nebo manipulací postihujících pouze buňky imunitního systému. Při této příležitosti je třeba si uvědomit, že v průběhu fylogenetického vývoje mohly přežít jen ty druhy organismů, které se dokázaly vypořádat s různými „výstřelky“ normálních životních pochodů a které si dokázaly vytvořit patřičné přirozené regulační mechanismy zaručující udržení homeostázy. Již na počátku vývoje mnohobuněčných organismů z různých samostatných kolonií jednobuněčných organismů bylo nejprve třeba zajistit vzájemnou komunikaci těchto jednotlivých buněčných systémů. Tak se jednotlivé typy buněk (organismů) musely vzájemně přizpůsobit účinku metabolitů nebo produktů ostatních buněčných systémů. V pokračujícím vývoji se tyto metabolity stávaly buď inhibitory nebo naopak stimulatory funkcí jednotlivých sousedních buněčných systémů.

V průběhu evoluce se tak vytrídila celá řada přirozených působků, které jsou schopné ovlivnit různé funkce imunitního systé-

mu. Z inhibičních látek uvádíme namátkou TGF- β (transformační růstový faktor beta), který má schopnost potlačit proliferaci lymfocytů T závislou na IL-1, IL-2, IL-4, a tím pádem dokáže např. potlačit vznik autoimunitního onemocnění v experimentu (Fučíková a spol., 1994). Imunosupresivní účinek mají i další faktory, jako např. IL-10 ap. Zde je třeba poznamenat, že i některé vyslovené podpůrné faktory mohou při nadbytečné produkci vyvolat rovněž útlum různých imunitních, včetně obranných mechanismů. Existuje však celá řada dalších, dosud neidentifikovaných látek, které dokáží rovněž inhibovat některé reakce imunitního systému. Tak např. Borkowski s Lawrencem (Borkowski a spol., 1983) popsali specificky i nespecificky účinkující faktory izolované z dialyzátu homogenátu leukocytů (DHL) schopné inhibovat některé projevy buněčné imunity.

Vlastní studie

Podobný faktor jsme popsali i my (Pekárek a spol., 1990). Tento faktor izolovaný rovněž z DHL byl připraven ultrafiltrací z komerčního preparátu IMMODYN SEVAC a obsahuje biologicky aktivní látky o molekulové hmotnosti nižší jak 5000 D. V pokusech na zvířatech dokázal stimulovat odpověď morčecích nebo kryšických tymocytů na Con A v testu kostimulace. Za in vivo pod-

Tab. 2. Vliv supresorického faktoru na teofylin senzitivní E-rozety u pacientů s autoagresivními chorobami.

Tab. 2. The effect of suppressoric factor on the theophylline sensitive E rosettes in patients with some autoaggressive diseases.

Subpopulace T-lymfocytů Subpopulation of T-lymphocytes	Před podáním SF Before SF administration	Po podání SF After SF administration
celkový počet T Ly Total T lymphocytes	49,3±9,12	52,5±8,97
teofylin rezistentní theophylline resistant	29,7±8,89	25,0±7,89
teofylin senzitivní theophylline sensitive	19,6±3,94	27,0±6,14

Tab. 3. Vliv SF na hladinu lymfocytů T_H a T_S u pacientů s ALS.
Tab. 2. The effect of SF on the level of T_H and T_S lymphocytes in patients with ALS.

Pac. Věk Pat. Age	T _H		T _S		
	před before	po after	před before	po after	
1.	36	45	40	28	45
2.	47	28	41	21	28
3.	53	56	59	38	31*
4.	47	59	59	39	45
5.	56	40	29	23	31
6.	63	52	52	30	40
7.	58	54	55	23	26
8.	58	48	37	30	22*
9.	40	54	49	29	27
10.	65	44	45	26	27
11.	54	62	57	25	39
12.	62	39	36	26	32

* - výsledky odečteny za 8 týdnů místo za obvyklý 1 týden po poslední injekci SF

- results read after 8 weeks instead of 1 week after the last SF administration

Tab. 4. Účinek SF u pacientů s pozitivní odpovědí na CD8⁺-lymfocyty.

Tab. 4. The effect of SF in the ALS patients with a positive reactivity on the CD 8⁺ lymphocytes.

Patient Patients	Věk Age	Pohlaví Sex	Délka nemoci Duration of the disease	Doba léčení Duration of the treatment	Exitus
1.	46	M	10	8	+
2.	42	F	11	10	+
3.	53	M	7	6	+
4.	64	M	7	6	+
5.	46	M	8	7,5	
6.	58	M	6	5	
7.	52	M	5	4,5	+
8.	53	M	4	3	+
9.	64	F	4	3,5	+
10.	62	F	4	2	
11.	62	M	4	x	+

M - muž
- men

F - žena
- women

x - přerušil léčbu

- interruption of treatment

Průměrné přežití této skupiny 6,4 roku.

Average survival of this group 6.4 years.

mínek dokázal tento faktor výrazně omezit klinické i laboratorní projevy adjuvantní artritidy (AA) u kryš (Stančíková a spol., 1994). AA je modelové onemocnění některých lidských chorob pojiva. Po aplikaci CFA (kompletního Freundova adjuvans) kryšám se přibližně za 18–21 dní objeví u těchto zvířat otoky kloubů s charakteristickým RTG nálezem, omezenou pohyblivostí ap. Klinické projevy jsou provázeny biochemicky prokazatelnými známkami zánětu. Tabulka 1 uvádí vliv tohoto faktoru na některé

projevy AA u kryš. Výsledky jasně dokumentují výraznou schopnost tohoto faktoru ovlivnit průběh a projevy tohoto modelového onemocnění.

Při aplikaci tohoto faktoru lidem bylo prokázáno, že dochází jeho působením k výraznému ovlivnění toho typu lymfocytů považovaného za „supresorické“. Tabulka 2 uvádí vliv tohoto faktoru na lymfocyty charakterizované schopností tvořit E-rozety vnímavé na účinek teofylinu. Zatímco buňky schopné tvořit teofylin senzitivní E-rozety byly tímto faktorem výrazně stimulovány, neměl tento faktor prakticky žádný účinek na lymfocyty tvořící teofylin rezistentní E-rozety (považované za T_H-pomocné lymfocyty). V pozdější práci, kdy již byly k dispozici monoklonální protilátky proti znakům CD, jsme mohli prokázat, že tento faktor aplikovaný lidem dokáže výrazně stimulovat hladinu CD8⁺-lymfocytů (tab. 3). Hladina CD4⁺-lymfocytů zůstávala přitom prakticky beze změn, nebo docházelo spíše k jejich poklesu, což se projevvalo změnou IR indexu.

Tyto výsledky nás vedly k pokusu o aplikaci tohoto faktoru v léčbě těchto chorob, v jejichž mechanismu se vyskytovala autoagresivita a které byly charakterizovány změnami v CD8⁺-lymfocytech v závislosti na aktivitě choroby. Prokázalo se totiž, že u celé řady autoagresivních chorob je stadium remise charakterizováno normalizací CD8⁺-lymfocytů, zatímco stadium exacerbace se vyznačuje poklesem tohoto subtypu T-lymfocytů a vzestupem IR indexu (Zaffaroni a spol., 1985).

Na podkladě povolení rozšířené klinické studie SKIP (subkomise pro imunitní preparáty) MZ ČR jsme tento faktor použili v léčbě následujících chorob: u pacientů s atopickým ekzémem (Červenková a spol., 1994; Pekárek a spol., 1990), u těžkých forem roztroušené sklerózy, u různých polyradikuloneuritid, u nervových komplikací lymské choroby (Pekárek a spol., 1990) a u pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou (ALS).

Výrazné výsledky byly zaznamenány hlavně u pacientů s ALS. U tohoto dosud nevléčitelného onemocnění s průměrnou dobou přežití 2, maximálně 3 roky se podařilo prodloužit život pacientů, a to především u těch, u nichž v důsledku léčby došlo k vzestupu CD8⁺-lymfocytů. U některých pacientů jsme díky této léčbě zaznamenali přežití až 9 let (Nevšímal a spol., 1991). Výraznější výsledky byly zaznamenány u pacientů bez bulbárních příznaků (tab. 4). Částečný úspěch bylo možné pozorovat i u pacientů s rozvinutými bulbárními příznaky (tab. 5). Účinnost léčby tímto faktorem lze dokumentovat i průběhem onemocnění u pacientů, u nichž byla léčba přerušena z důvodu neschopnosti tohoto faktoru ovlivnit u nich hladinu CD8⁺-lymfocytů (tab. 6). Naproti tomu bylo možné prokázat, že pokračování v léčbě u těchto neodpovídajících pacientů (vzhledem k CD8⁺-lymfocytům) přineslo rovněž kladné výsledky (tab. 7).

Za významné je třeba rovněž považovat výrazné zlepšení klinického stavu u některých pacientů s ALS (obnovení schopnosti dorozumívání se a schopnosti pohybovat končetinami) - Nevšímal a spol. 1994.

I když se dosud nepodařilo vyléčit ALS, dosavadní kladné výsledky u části pacientů nasvědčují možnosti objasnění patogenese tohoto onemocnění.

Neobjasněnou zůstává dosud otázka mechanismu účinku tohoto faktoru. Skutečnost, že jeho podávání lidem dokáže ovlivnit CD8⁺-lymfocyty a spolu s tím i průběh některých autoagresivních chorob, nasvědčuje možnosti potenciace „supresorických buněk“.

Jak již bylo výše uvedeno, dokáže tento faktor výrazně zabránit vzniku AA u krys. Protože ani dlouhodobé podávání tohoto faktoru pacientům s ALA a dalšími imunopatologickými stavy nedvedlo ke snížení obranyschopnosti vůči interkurentním infekcím (i když na druhé straně výrazně utlumilo nežádoucí imunitní pochody), lze předpokládat, že došlo vlivem tohoto faktoru k potenciaci určitých kontrolních a regulačních mechanismů.

Nejpravděpodobnější vysvětlení se nabízí v tom, že „supresorické“ CD8⁺-lymfocyty jsou vlastně cytotoxické T-lymfocyty, jejichž specifická aktivita je zaměřena proti idiotypům těchto lymfocytů, které jsou zodpovědné za vlastní autoagresivitu. Jednalo by se o mechanismus zodpovědný za udržení homeostázy. Nedostatek, nebo nadbytek jakékoliv reaktivity musí být v zájmu zachování organismu co nejrychleji vyregulován, aby nedocházelo k nežádoucímu „přestřelení“ jakýchkoliv, i původně účelových a pro organismus výhodných reakcí. Potvrdilo-li by se toto konstatování, pak by úloha CD8⁺-buněk spočívala jak v likvidaci buněk nescoucích virus (popřípadě jiné infekční agens), tak i v likvidaci buněk zaměřených proti tělu vlastním antigenům, pokud by se vyskytl nadbytek a nárůst těchto buněk. Domníváme se, že výše popsaný „supresorický faktor“ schopný aktivovat CD8⁺-lymfocyty by mohl přispět i k rozřešení této kardinální otázky. Nelze ovšem vyloučit ani další mechanismy účinku tohoto faktoru. Jako další eventualita se nabízí možnost, že tento faktor stimuluje T_C2-lymfocyty. Je totiž dobře známo, že produkty lymfocytů T_H1 a T_H2 spolu interferují. V nejnovější době byla prokázána i existence buněk T_C1 a T_C2. Podstatné je, že námi popsaný „supresorický faktor“ má schopnosti utlumit některé nežádoucí imunitní reakce vedoucí k autoagresivitě a co je rovněž podstatné, že tato tlumivá (supresorická) aktivita nikterak neovlivní obranyschopnost organismu vůči interkurentním infekcím.

Selektivní ovlivnění imunitního systému

Vedle těchto „přirozeně“ se vyskytujících faktorů lze k utlumení nežádoucích imunitních pochodů použít i jiné způsoby, které na rozdíl od uměle připravených inhibitorů dokáží ovlivnit pouze buňky imunitního systému. Mezi nejznámější léčebné postupy této skupiny patří různá antiséra. Původní antilymfocytární a antitymocytyární séra jsou nyní nahrazována monoklonálními protilátkami zaměřenými proti těm antigenním strukturám příslušných typů a subtypů imunitních buněk, které jsou pro ně charakteristické a které zaručují jejich selektivitu. Řada těchto monoklonálních protilátek proti znakům CD-lymfocytů se uplatnila v klinice při zvládání různých autoagresivních chorob nebo reječních krizí po transplantaci různých orgánů. Tento způsob však není úplně ideální, neboť v důsledku likvidace značného množství lymfocytů (a v důsledku indukce produkce některých cytokinů) může dojít k nežádoucím reakcím v organismu jako odpověď na aktivní a rozpadové produkty lymfocytů a pochopitelně i ke snížení odolnosti vůči interkurentním infekcím. Navíc je tento způsob nespecifický, neboť nerozlišuje mezi likvidací nežádoucích buněk imunitního systému a buněk potřebných pro zajišťování obrany organismu.

Specifičtější v tomto směru jsou ty imunologické postupy, které jsou schopné „zabrzdit“ skutečně specifické imunitní reakce proti vybraným antigenním strukturám. Jedná se např. o postupy směřující formou desensibilizace k navození tolerance na určitou

Tab. 5. Účinek SF u pacientů s pozitivní odpovědí na CD8⁺-lymfocyty u pacientů s bulbární formou.

Tab. 5. The effect of SF in the ALS patients with a positive reactivity on the CD 8⁺ lymphocytes in patients with bulbar form.

Pacient Patients	Věk Age	Pohlaví Sex	Délka nemoci Duration of the disease	Doba léčení Duration of the treatment	Exitus
1.	56	F	3	2	+
2.	59	F	2,5	2	+
3.	57	F	2,5	2	+
4.	63	M	2,5	0,5	+
5.	65	F	3	2	+
6.	64	M	2	1	+
7.	65	F	2	1	+
8.	63	M	2	2	+
9.	46	F	x		
10.	61	M	x		

M - muž F - žena

- men - women

x - přerušil léčbu

- interruption of treatment

Průměrné přežití této skupiny 2,4 roku.

Average survival of this group 2.4 years.

Tab. 6. Pacienti s negativní reakcí na CD8⁺-lymfocyty, u nichž byla léčba přerušena.

Tab. 6. Patients with negative reactivity on the CD 8⁺ lymphocytes in which the treatment was discontinued.

Pacient Patients	Věk Age	Pohlaví Sex	Délka nemoci Duration of the disease	Doba léčení Duration of the treatment	Exitus
1.	64	M	2,5	x	+
2.	59	M	2	x	+
3.	55	M	2	x	+
4.	67	F	2	x	+
5.	44	F	2	x	+
6.	61	F	2	x	+
7.	58	F	2	x	+
8.	68	F	2	x	+
9.	69	F	2	x	+
10.	64	F	3	x	+
11.	51	F	3	x	+
12.	52	F	4	x	+

M - muž F - žena

- men - women

x - léčba přerušena

- the treatment was discontinued

Průměrné přežití této skupiny 2,5 roku.

Average survival of this group 2.5 years.

antigenní strukturu. Řada takových postupů nese s sebou riziko aktivace nežádoucího imunitního procesu v důsledku vpravení specifického autoantigeny. Hledaly se proto další postupy a kombinace této specifické desensibilizace, popřípadě tolerance. V poslední době se např. osvědčilo perorální podávání specifického antigenu, neboť tento způsob minimalizuje případné nežádoucí reakce.

Tab. 7. Pacienti s negativní reakcí na CD8⁺-lymfocyty, u nichž bylo pokračováno v léčbě SF.**Tab. 7. Patients with negative reactivity on the CD 8⁺ lymphocytes in which continue in the treatment with SF.**

Pacient Patients	Věk Age	Pohlaví Sex	Délka nemoci Duration of the disease	Doba léčení Duration of the treatment	Exitus
1.	51	F	6	4	
2.	56	M	5	4	
3.	47	M	5	4	
4.	51	M	4	3	
5.	55	M	3,5	2	
6.	54	M	3	2	+

M - muž F - žena
- men - women

Průměrné přežití této skupiny 4,4 roku.

Average survival of this group 4.4 years.

Tab. 8. Vliv podání nerozpustného encefalitogenu na průběh alergické experimentální encefalitidy.**Tab. 8. The effect of the Sferon-bound encephalitogen on the course of the EAE.**

Způsob ovlivnění Treatment	Den podání The day of administration	EAE ^a
EAE neovlivněné EAE non-treated	19/20	
Sferon bez antigenu Sferon without antigen	5	9/10
Sferon s antigenem Sferon with antigen	0	0/10
-"-	5	0/20
-"-	12 ^b	0/10

^a - počet zvířat uhynulých na příznaky EAE

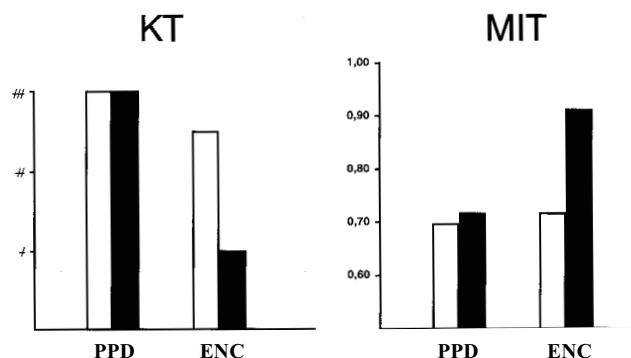
- number of animals which died with the EAE clinical signs

^b - 12. den se již začaly projevovat příznaky EAE

- on the 12th day the clinical signs of EAE became manifestant

Vlastní pokusy s EAE

Experimentální alergická encefalitida (EAE) je modelové onemocnění vyvolané u zvířat, nejčastěji morčat a krys, podáváním autoantigenu — encefalitogenu, způsobem zaručujícím vznik autoimunitní reakce buněčného typu imunity. Aplikace mikrogramových množství encefalitogenu v CFA vyvolá u morčat typické závažné onemocnění bílé hmoty CNS projevující se klinicky parezami končetin, inkontinencí stolice s typickým histologickým nálezem charakterizovaným kulatobuněčným infiltrátem. V závislosti na způsobu imunizace (v našem případě aplikace 0,1 mg encefalitogenu v CFA na morče) lze od 10. dne po vpravení encefalitogenu pozorovat u morčat parezy končetin a inkontinenci stolice a moče jako typické známky tohoto onemocnění. K úhynu zvířat dochází od 12. dne a ve většině případů dojde k úhynu všech postižených zvířat do 21. dne. EAE je považována za model lidské roztroušené sklerozy (RS) a slouží proto k ověřování různých léčebných postupů používaných u pacientů s RS a podobnými záněty CNS.



Obr. 1. Výsledky kožního testu a testu inhibice migrace s encefalitogenu u morčat ovlivněných Sferonem. KT — kožní test, MIT — migračně inhibiční test, bílé sloupce — výsledky u morčat neovlivněných Sferonem, černé sloupce — výsledky u morčat ovlivněných navázaným encefalitogenu, PPD — tuberkulin, ENC — encefalitogen.

Fig. 1. Results of the skin test and the migration inhibition test with encephalitogen performed in guinea pigs influenced with Sferon. KT — skin test, MIT — migration inhibition test, white columns — results in guinea-pigs non-involved with Sferon, black columns — results in guinea-pigs involved with Sferon-bound encephalitogen, PPD — tuberculin, ENC — encephalitogen.

Na tomto modelu byla vyzkoušena např. účinnost různých léčebných antisér, použití různých imunosupresivních farmaceutických preparátů, metoda specifické desensibilizace encefalitogem ap.

Na našem pracovišti jsme např. prověřovali účinnost antilymfocytárního séra. Zatímco v tomto pokuse uhynulo v kontrolní, neovlivněné skupině 35 krys z 37, uhynulo ve skupině morčat, kterým bylo preventivně podáno antilymfocytární sérum pouze 6 morčat z 34. Navíc ze skupiny morčat, kterým bylo podáno antilymfocytární sérum až v době počátku výskytu parez (tj. 12. den) uhynulo 9 morčat z 18. Účinnost podávání antilymfocytárního séra byla kontrolována rovněž histologicky a výsledky prokázaly podstatné omezení výskytu infiltrátu u zvířat chráněných antilymfocytárním sérem. Dále jsme prověřovali na tomto modelu vliv imunní deviace, tj. aplikace encefalitogenu v různém časovém intervalu a v různé dávce bez CFA. Také v tomto případě dokázala předchozí dávka encefalitogenu podaná bez CFA zabránit vzniku EAE u poloviny zvířat.

Závěrem bychom se rádi zmínili o originálním způsobu, který jsme použili v léčbě a prevenci EAE u morčat. Tento způsob spočíval v použití encefalitogenu vázaného na nerozpustný nosič. Pevná vazba na tento nosič zaručovala, že nedojde v organismu k uvolnění navázaného encefalitogenu a tudíž, že nedojde k reakci buněk imunitního systému s tímto antigenem na jiném místě než v místě vpravení nerozpustného nosiče. Tento způsob tudíž vyloučil možnost případné aktivace nežádoucích imunitních pochodů. Vůdčí myšlenkou tohoto postupu bylo, že v místě „plomby“ nerozpustného encefalitogenu dojde k vychytání těch buněčných elementů, které jsou specificky zaměřené proti autoantigenu-encefalitogenu. Předpokládali jsme, že vychytáním těchto potenciálně patologicky působících buněk snížíme riziko vzniku infiltrátu ve strukturách obsahujících tento autoantigen, konkrétně v CNS.

Výsledky pokusů s EAE (Pekárek a spol., nepublikované pozorování) nám potvrdily naše předpoklady. Ukázalo se, že podání encefalitogenu vázaného na akrylátový nosič — sféron (Ústav makromolekulární chemie ČSAV) dokázalo zabránit vzniku EAE u morčat (tab. 8). Samostatný nosič — sféron — byl v tomto smyslu neúčinný. Sféronové částice s navázaným encefalitogenem v množství 10 mg encefalitogenu na zvíře dokázaly nejen zabránit vzniku EAE při podání v časných fázích senzibilizace, ale byly dokonce účinné v léčbě již vzniklých paréz, kdy docházelo vlivem této léčby k ústupu paréz a k přežití zvířat. Pro specifitu tohoto postupu svědčila naopak pozitivní reakce těchto zvířat na PPD tuberkulin prokazovaná v testu inhibice migrace a kožním testu. Pozitivita k PPD tuberkulinu byla totiž vyvolána použitím CFA (obsahujícího mykobakteria) k vyvolání EAE. Na druhé straně reaktivita takto ovlivněných morčat k encefalitogenu byla výrazně snížena (obr. 1).

Vlastním mechanismem této „desenzibilizace,, resp. navození neschopnosti reagovat vůči specifickému antigenu — encefalitogenu, byla skutečnost, že kolem sféronových partikulí (mikrokuliček) s navázaným encefalitogenem bylo možné histologicky prokázat podobný infiltrát jako kolem struktur v bílé hmotě CNS u zvířat s rozvinutou EAE.

Protože v současnosti jsou již k dispozici látky schopné účinkovat jako nerozpustný nosič specifického antigenu ve formě gelu, který lze podle potřeby do organismu vpravovat a popřípadě i odstraňovat (odsáním), slibuje tato metodika dobrou perspektivu. Její použití nemusí být omezeno pouze na poruchy spojené s autoimunitou vůči encefalitogenu, ale lze ji využít i u dalších chorobných stavů u nichž autoagresivita hraje podstatnou úlohu v patogeneze nemoci a u nichž je příslušný autoantigen dobře definován.

Závěrem bychom chtěli zdůraznit, že již v současnosti disponuje imunologie různými metodikami, které jsou schopné zabrzdit, nebo dokonce utlumit nežádoucí imunitní pochody vedoucí k poškození těla vlastních struktur, resp. k autoagresivitě. Na rozdíl od „umělých“ inhibitorů postihujících vedle imunologicky aktivních buněk i další buněčné systémy v organismu, je většina „přirozených“ faktorů schopna postihnout výhradně vlastní imunitní systém a tudíž prosta vedlejších nežádoucích reakcí. K těmto přirozeným látkám patří různé regulační faktory typu cytokinů a interleukinů a řada dalších dosud neidentifikovaných látek včetně

námi popsaného supresorického faktoru. Účinnými se ukázala také některá antiséra a zvláště monoklonální protilátky schopné omezit účinnost některých typů a subtypů imunologicky aktivních buněk, popřípadě jejich produktů. Perspektivně lze uvažovat o cíleném odstraňování buněčných elementů schopných reagovat s příslušnými autoantigeny. Tento způsob lze realizovat pomocí „odstranitelných“ plomb příslušných autoantigenů vázaných na nerozpustný nosič, které umožní vychytání buněk schopných reakce s příslušným autoantigenem a schopných vyvolat příslušné autoagresivní onemocnění.

Literatura

Borkowski W., Berger J., Pilon R., Lawrence R.S.: Antigen specific suppressor factor in human leukocyte dialysates. *Immunobiology of transfer factor*. New York, Academic Press 1983, s. 91–115.

Červenková D., Keleová A., Jahnová E., Rovenský J., Nyulassy Š.: Léčba atopické dermatitidy specifickým supresorovým transfer faktorem. *Klin. Imunol. Alergol.*, 13, 1994.

Fučíková T., Šterzl I., Nouza K., Barták P., Štork J.: Funkční oblasti imunitního systému. *Fórum Imunol.*, 2, 1994, s. 179–182.

Nevšímal O., Pekárek J., Koubek K., Čech K., Šonková Z.: Nízkomolekulární transfer faktor a jeho využití při léčení amyotrofické laterální sklerózy. *Čs. Neurol. Neurochir.*, 54/87, 1991, s. 220–222.

Nevšímal O., Kalous J., Pekárek J., Čech K.: Ústup příznaků u osob s amyotrofickou laterální sklerózou při léčbě nízkomolekulárním leukocytárním dialyzátem. *Čs. Neurol. Neurochir.*, 57/90, 1994, s. 60–61.

Pekárek J., Čech K., Nevšímal O., Barnet K., Doulík S., Červenková D.: The use of DLE-TF fraction with the suppressive effect in some autoaggressive diseases. Recent advances in transfer factor and dialyzable leukocyte extracts. Tokyo, Maruzen Co. Ltd. 1990, s. 326–332.

Stančíková M., Rovenský J., Pekárek J., Orviský E., Blažičková S., Čech K.: Influence of various forms of dialyzable leukocyte extracts on rat adjuvant arthritis. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 42, 1994, s. 295–299.

Zaffaroni M., Caputo D., Ghezzi A., Cazzulo C.L.: T cell subsets in multiple sclerosis: relationships between peripheral blood and cerebrospinal fluid. *Acta Neurol. Scand.*, 71, 1985, s. 242–248.

Do redakcie došlo 22.10.1996.