

Biologická terapie ocrelizumabem (antiCD20) je překvapivě klinicky účinná u nemocných s roztroušenou sklerózou mozkomíšní

prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.

Ústav klinické imunologie a alergologie LF UK a FN, Hradec Králové

Roztroušená skleróza mozkomíšní (RS) je závažné zánětlivé neurodegenerativní onemocnění, které postihuje struktury mozku a míchy. Nepříznivý přirozený vývoj onemocnění lze ovlivnit několika léčivy s klinicky prokazatelnými efekty. Většina stávajících léků cílí především na T-lymfocytární systém, který podle současných názorů sehraává nejvýznamnější úlohu v patogenezi RS. Bylo překvapením, že v rozsáhlých klinických studiích byla prokázána výborná odpověď na léčbu monoklonální protilátkou antiCD20 (ocrelizumab), která cílí na strukturu specificky vyjádřenou pouze na zralých B-lymfocytech. Je to dokladem, že imunopatogenní procesy u nemocných s RS jsou komplexnější, než jsme předpokládali.

Klíčová slova: roztroušená skleróza mozkomíšní, imunopatogeneze, B-lymfocyty, biologická terapie, antiCD20, ocrelizumab.

Biological therapy by Ocrelizumab (antiCD20) is surprisingly clinically effective in multiple sclerosis patients

Multiple sclerosis (MS) is the severe inflammatory and neurodegenerative disease of central nervous system. Unfavorable natural course of MS is therapeutically changed by several effective drugs available. These drugs are in general targeting T cell system which is supposed to be critically involved in MS pathogenesis. It was surprising that very good clinical response was achieved in MS patients in large clinical trials using antiCD20 monoclonal antibody, ocrelizumab. CD20 molecule is specifically expressed on mature B cells only. It could be delineated from these results that MS immunopathogenesis is much complex as previously thought.

Key words: multiple sclerosis, immunopathogenesis, B cell, biological therapy, antiCD20, ocrelizumab.

Úvod

Roztroušená skleróza mozkomíšní (RS) je závažné zánětlivé neurodegenerativní onemocnění, které postihuje struktury mozku a míchy. Představuje individuální i společenský zdravotní problém v nejrozvinutějších zemích světa, kde žije populace západoevropského a středo-evropského původu, která je predisponována k rozvoji RS. Její patogeneze je komplexní. Je podrobně popsána v hlubokém detailu, protože roztroušená skleróza je studována již řadu desetiletí jak v rámci klinických studií, tak také s použitím experimentálního zvířecího modelu EAE (Experimental Autoimmune Encephalitis). RS je onemocnění, jehož diagnostika je v současné

době dobře zvládnuta. Je postavena na klinickém neurologickém vyšetření, nálezu získaném nukleární magnetickou rezonancí s podporou přítomnosti oligoklonálních proužků imunoglobulinů v mozkomíšním moku. U nemocných s RS je třeba včasné zahájit léčbu, aby se zabránilo nepříznivému přirozenému průběhu onemocnění. Léčebné možnosti se rychle vyvíjejí a zásadně proměňují životní perspektivy nemocných s RS. Doslova zlom v léčbě RS přineslo před zhruba dvaceti léty zavedení léčebných postupů, které relativně účinně zasahují do poškozujícího zánětu přinejmenším u formy remitující-relabující RS. Jednalo se o rekombinantní interferony β a glatiramer acetát. Tyto stále základní léky jsou postup-

ně doplňovány o další léčivé prostředky s klinicky prokázanou účinností, které působí jinými mechanismy. Velmi usilovně se hledají postupy, které by ovlivnily i „nebezpečnější“ formy RS, jakými je progresivní RS. Zde se ukázal překvapivě účinným lékem tzv. ocrelizumab. Jedná se o humanizovanou monoklonální protilátku cílící na molekulu CD20. Tato molekula je výlučně vyjádřena na B-lymfocytech. Léčebný efekt ocrelizumabu velmi zásadně ukázal, že naše předchozí chápání patogenetických mechanismů RS bylo omezené. Ukázal, že do našich úvah musíme doplnit také imunopatologické aktivity B-lymfocytů, které až donedávna byly u nemocných s RS spojovány pouze s tvorbou oligoklonálních imunoglobulinů

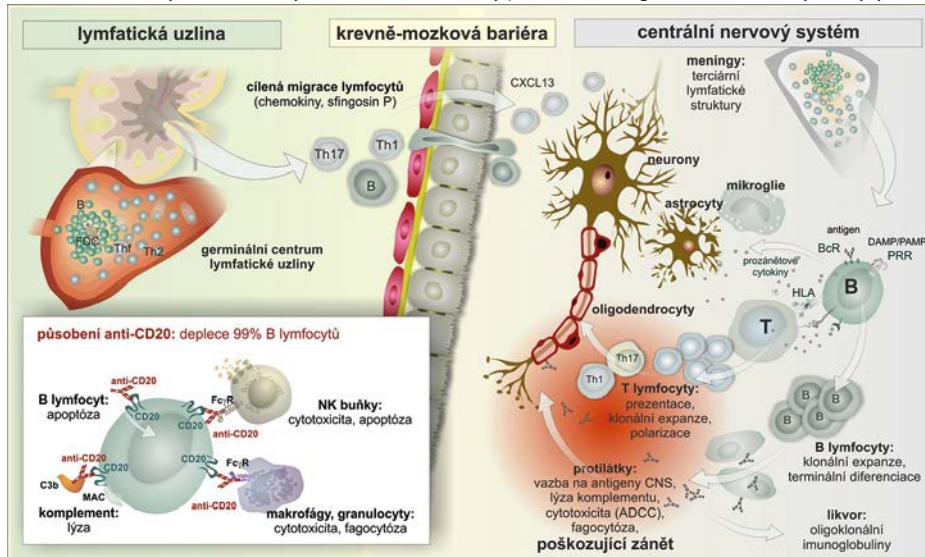


KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA: prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc., jan.krejsek@fnhk.cz
Ústav klinické imunologie a alergologie, LF UK a FN Hradec Králové
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

Cit. zkr: Neurol. praxi 2017; 18(6): 403–407
Článek přijat redakcí: 10. 7. 2017
Článek přijat k publikaci: 31. 8. 2017

Obr. 1. Podíl B lymfocytů v patogenezi roztroušené sklerózy

Antigenní stimulace B-lymfocytů, stejně jako T-lymfocytů, probíhá v sekundárních lymfatických orgánech. Aktivované B (T) lymfocyty migrují cíleně vlivem chemokinových a sfingosinfosfátových gradientů do CNS. Zde musí prostoupit krevně mozkovou bariérou. V CNS pacientů s RS lze nalézt terciární lymfatické struktury s nahromaděnými B-lymfocyty v různém stupni diferenciace. Tvorbou protilátek se B- u nemocných s RS zapojují do poškozujícího zánětu. Navíc B-lymfocyty slouží jako efektivní buňky prezentující antigeny T-lymfocytům. Tvorbou cytokinů a růstových faktorů ovlivňují také mikroglie, astrocyty, oligodendrocyty a samotné neurony. Jsou uvedeny základní mechanismy působení biologik antiCD20 na B lymfocyty



nalézáných v mozkomíšním moku. Jejich přítomnost v likvoru byla považována za epifenomén nesouvisející přímo s imunopatogenezi RS.

Imunopatogeneze roztroušené sklerózy

V průběhu zhruba 60 roků jsme nahromadili obrovské množství dokladů, že RS je imunopatologické autoimunitní onemocnění. V experimentu je EAE vyvolán aplikací mozkové tkáně nebo definovaných molekulových struktur mozku injikováním geneticky disponovaným zvířatům spolu s úplným Freundovým adjuvans. Následnými experimenty bylo prokázáno, že tato forma imunopatologie cílí na struktury myelinové pochvy nervových vláken. Konkrétně se jedná o imunodominantní epitopy myelinového bazického proteinu MBP (Myelin Basic Protein) a další složky. Tyto autoreaktivity jsou prokazovány i u nemocných s RS. Na základě genetické dispozice, která v případě RS není příliš silná, a v kontextu nepopsatelného množství proměnných faktorů vnějšího světa, dochází u nemocných s RS k prolomení autotolerance vlastních struktur CNS (Parnell et Booth, 2017). Následuje aktivace a klonální expanze autoreaktivních klonů T-lymfocytů. T-lymfocyty jsou aktivovány prostřednictvím dendritických buněk, které identifikují signály vnitřního poškození DAMP (Damage Associated Molecular Patterns) nebo vnějšího nebezpečí

PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns). Tyto signály jsou internalizovány, zpracovány do podoby antigenních peptidů a prezentovány autoreaktivním T-lymfocytům v kontextu HLA molekul. K plné aktivaci T-lymfocytů jsou zapotřebí kostimulační interakce s dendritickou buňkou. Nezbytné je také dosažení určité úrovně cytokinových signálních podnětů. Na základě těchto, u člověka velmi obtížně popsatelných proměnných, se klonálně expandované autoreaktivní T-lymfocyty dále funkčně polarizují. V případě RS se jedná o preferenční funkční vyhrávaní do subsetů Th1 a Th17. Abnormální aktivity subsetů Th1 a Th17 T-lymfocytů se současnou ztrátou regulačních subsetů Treg jsou nalézány v experimentu EAE a také u nemocných s RS. Výsledkem je neregulovaný vstup aktivovaných autoreaktivních T-lymfocytů přes krevně mozkovou bariéru. V samotném mozku se do poškozujícího zánětu významně zapojují rezidentní imunitní buňky, tj. mikroglie. Opomenout však nesmíme také podíl vlastních struktur mozku, především astrocytů. Stále více chápeme, že součástí poškozujícího zánětu je i dysfunkce oligodendrocytů, které nedokážou efektivně reparovat a remodelovat léze na myelinových pochvách poškozených zánětem. Je narušena i jejich obnova z kmenových buněk. Dochází i k poškození a smrti samotných neuronů. Především je omezena jejich schopnost reparace z neuronálních kmenových buněk. Poškozující

zánět v strukturách bílé hmoty mozku se neomezuje pouze na struktury bílé hmoty mozku. Jsou prokazatelné i kortikální léze. Mimořádnou úlohu sehrává v tomto patogenetickém procesu také dysfunkce, či přímo patologie mitochondrií, která vede ke zvýšenému oxidačnímu stresu. Na lipidové struktury bohatá mozková tkáň je mimořádně vnímavá k chemickým modifikacím, ke kterým dochází v přítomnosti oxidačního stresu. Lze tedy uzavřít, že podle současného konceptu probíhá ruku v ruce poškozující zánět a procesy neurodegenerace (Kempuraj, 2016).

Možnosti, jak zasáhnout do poškozujícího zánětu, jsou v současné době již poměrně rozsáhlé. Postrádáme však léčiva, která by ve větší míře současně podporovala procesy neuroreparace a oddalovala procesy neurodegenerace, které neoddelitelně provázejí RS. Již jsme poznamenali, že bylo překvapením, že biologika cílící na B-lymfocyty prostřednictvím molekuly CD20 zasahují léčebně do poškozujícího zánětu dokonce ještě efektivněji, než klasická léčiva nebo jiné nověji zaváděné léky, a to i u osob s primárně progresivní formou RS. Je tedy velmi užitečné, abychom podali cíleně informace, které se týkají imunobiologie B-lymfocytů a jejich úlohy v poškozujícím zánětu. Poukážeme také na bližší charakteristiky molekuly CD20 jako terče biologické léčby ocrelizumabem (Wekerle, 2017).

Imunobiologické charakteristiky B-lymfocytů

B-lymfocyty jsou součástí specifické větve imunity. Patří mezi klasicky studované složky imunity. Znalosti B-lymfocytů jsou velmi detailní. Zde se pokusíme o krátký souhrn. B-lymfocyty se vyvíjejí v primárních orgánech imunity, kterými jsou ve fetálním vývoji fetální játra, žloutkový vak. Později se B-lymfocyty diferencují v kostní dřeň. Diferenciaci B-lymfocytů můžeme účinně sledovat molekulárně biologickými postupy. Pomocí nich bylo prokázáno, že vývoj B-lymfocytů můžeme rozdělit na etapu, která je nezávislá na antigenním podnětu, a na etapu, která probíhá po antigenní stimulaci zralých B-lymfocytů. Na antigenu nezávislá fáze diferenciace se uskutečňuje v přesných vývojových krocích z kmenové buňky krvetvorby, která nese znak CD34. Velmi brzy po oddělení lymfoidní větve progenitorové buňky zadané ve vývoj v B-lymfocyty exprimují molekulu CD19. V mikroprostředí krvetvorných orgánů dochází k jejich proliferaci a další diferen-

ciaci, kterou můžeme sledovat prostřednictvím membránových CD molekul. Zde o těchto proměnách nebudeme uvádět podrobnosti, které jsou však dostupné a jsou i medicínsky významné, např. pro potřeby hematologie. Kritickým okamžikem ve vývoji B-lymfocytů je náhodné přeskupení genových segmentů, které kódují těžké a lehké řetězce imunoglobulinů. Přeskupení se uskutečňuje bez antigenní stimulace. Je to proces, který velmi zjednodušeně řečeno zajistí B-lymfocytům s pomocí několika set výchozích genových segmentů, které kódují těžké a lehké řetězce pro antigen a B-lymfocytech, obrovskou pestrost receptorů pro antigen BcR, které jsou na zralých B-lymfocytech vyjádřeny. Teoretický počet receptorových struktur BcR se odhaduje v řádu 10^{16} . Výsledkem genového přeskupení je základní repertoár B-lymfocytů, který je schopen reagovat teoreticky na všechny podněty, kterým bude v budoucnu člověk vystaven. Je samozřejmé, že při budování B-lymfocytárního repertoáru dochází z principů genového přeskupení ke vzniku autoreaktivních B-lymfocytů. Selektivní procesy, které velmi efektivně odstraňují autoreaktivní T-lymfocyty při jejich vyžívání v thymu, nejsou v B-lymfocytární větvi natolik přísné. Nezakládá to však za fyziologických okolností na zvýšené riziko rozvoje imunopatologií, protože převážná většina aktivit B-lymfocytů je regulována velmi přísně selektovanými T-lymfocyty. Uzavíráme, že na konci vývoje B-lymfocytu nezávislého na antigenu je zralý B-lymfocyt, který je charakterizován membránovou expresí receptorových struktur BcR. Ty se skládají z membránového imunoglobulinu, který určuje specifitu receptoru. Je spojen s membránovými molekulami, především CD79b a CD79a. Ty spolu s dalšími molekulami zajišťují po rozpoznání antigenu další imunobiologické aktivity B-lymfocytů. Na povrchu zralého B-lymfocytu se specificky nachází několik membránových molekul, které máme klasifikovány v CD systému. Jmenovat můžeme CD20, CD24, CD37, CD40 a další. Jsou tam také vyjádřeny receptory pro nejrozmanitější cytokiny, kostimulační a koinhibiční molekuly a mnoho dalších funkčních molekul. Jejich počet se různí i v závislosti na míře aktivace B-lymfocytů. Představují komplexní signální systém, který je nezbytný pro další fáze vývoje B-lymfocytů, které se uskutečňují po antigenní stimulaci.

Po diferenciaci v krvetvorných orgánech migruje zralý B-lymfocyt cíleně do sekundárních

lymfatických tkání a orgánů. Počtem největší je lymfatická tkáň spojená se sliznicí, zvláště sliznicí trávicí trubice. Zralé B-lymfocyty jsou však také nahromaděny v lymfatických uzlinách, slezině a dalších okřscích lymfatické tkáně. V sekundárních orgánech imunity B-lymfocyty čekají na antigenní stimulaci. Ta se uskutečňuje buď přímo antigenem, který se do těchto struktur dostává lymfatickými cévami nebo zprostředkovaně prostřednictvím rozmanitých prezentujících buněk. Mezi nimi významné místo zaujímají folikulární dendritické buňky a další subtypy dendritických buněk, které jsou v sekundárních lymfatických tkáních a orgánech přítomny. B-lymfocyty rozpoznávají antigeny v jejich nativní konformační struktuře. To je velký rozdíl od T-lymfocytů, které rozpoznávají pouze antigenní lineární peptidy prezentované v kontextu molekul HLA I. nebo II. třídy. Antigeny jsou rozpoznány receptory BcR. K tomuto kognitivnímu podnětu získává stimulovaný B-lymfocyt další informace prostřednictvím kostimulačních membránových molekul, z nichž zdůrazníme interakce CD40/CD40L. Výsledkem je aktivace B-lymfocytu, vzbuzení signálních drah, které vedou k aktivaci a translokaci transkripčních faktorů. Na konci těchto procesů je aktivace a klonální expanze B-lymfocytu specifického pro daný antigenní podnět. Tyto B-lymfocyty se v sekundárních lymfatických orgánech dále diferencují. Na konci této antigenem stimulované diferenciacie je tvorba plazmatických buněk. Ty tvoří protilátky stejné specifity, jakou má receptor BcR na počátku celé antigenní stimulace. Plazmatické buňky ztrácejí molekulu CD20.

Aktivity B-lymfocytů po antigenní stimulaci můžeme rozdělit na ty, které probíhají nezávisle na podpoře T-lymfocytárního systému a procesy, které vyžadují kooperaci s T-lymfocyty. Hovoříme o tvorbě protilátek nezávislých na T-lymfocytech. Takováto aktivita B-lymfocytů je typická pro časná ontogenetická stadia našeho života. Je typická také pro každou primární odpověď na antigenní podnět. Je charakteristická tvorbou protilátek třídy IgM, které jsou relativně málo specifické. Působí především lokálně. Nemohou procházet z cévního řečiště do tkání. Výhodou je naopak skutečnost, že produkce těchto do jisté míry přirozených protilátek je velmi rychlá a dochází k ní v průběhu několika málo dnů po antigenní stimulaci. Z tohoto pohledu na T-lymfocytech nezávislou tvorbu protilátek můžeme směle zařadit do pomezí

mezi vrozenou a specifickou imunitou. Nevzniká však během ní imunitní paměť.

Většina odpovědí po antigenní stimulaci B-lymfocytů je však závislá na přímé funkční podpoře T-lymfocytárního systému. Hovoříme o protilátkové odpovědi závislé na T-lymfocytech. Během ní dochází vedle klonální expanze B-lymfocytů po antigenní stimulaci také ke klonální expanzi odpovídajících T-lymfocytů. Ty se dále funkčně polarizují do subsetu Th2. Ten je odpovědný za interakce s B-lymfocyty, které mají rozsáhlé dopady na charakteristiku protilátkové odpovědi. Během ní dochází především k tzv. izotypovému přepnutí, kdy se vlivem cytokinů tvořených subsetem Th2 (IL-4) uskuteční další přeskupení, tentokrát genů, které nekódují vazebnou část imunoglobulinové molekuly. Při izotypovému přepnutí se k již přeskupené oblasti VDJ připojí těžký genový segment, který nahradí genový segment zajišťující tvorbu protilátek třídy IgM. Takto se tedy utvářejí protilátky ostatních tříd a podtříd imunoglobulinů. Na izotypovém přepnutí se podílejí také interakce mezi membránovými molekulami B-lymfocytů, např. CD40 a membránovými molekulami T-lymfocytů, např. CD40L. V procesu regulovaném T-lymfocyty dochází k dalšímu zásadnímu jevu, který označujeme jako somatická mutace. Velmi zjednodušeně se jejím prostřednictvím mění vazebné místo receptoru pro antigen BcR a následně dané protilátky vůči antigenu. Zvyšuje se tak specifita protilátek, které jsou tvořeny po antigenní stimulaci. Tyto okolnosti jsou uchovány ve formě paměťových buněk. Ty zajistí, že následné setkání se stejným antigenním podnětem vede k efektivnější a rychlejší tvorbě protilátek. Přežívání a proliferace B-lymfocytů po antigenní stimulaci je mimořádně delikátní proces. Bez přítomnosti řady růstových faktorů a antiapoptotických molekul, podléhají B-lymfocyty stimulované antigenem apoptóze. Z mnoha dalších interakcí nezbytných pro dlouhodobé přežívání B-lymfocytů a tvorbu protilátek zmíníme pouze interakce zprostředkované molekulami BAFF z rozsáhlé rodiny molekul TNFα a membránovými receptory BAFFR (Krejsek, 2016).

B-lymfocyty v patogenezi roztroušené sklerózy

Je paradoxní, že v diagnostice RS, která je stále ještě definována jako imunopatologické onemocnění s abnormální aktivitou T-lymfocytů, především subsetů Th1 a Th17, je

využíván průkaz oligoklonálních imunoglobulinů v mozkomíšním moku jako jedno ze silných diagnostických kritérií. Přítomnost oligoklonálních imunoglobulinů v likvoru ukazuje na intratékální syntézu protilátek. Přes intenzivní výzkum u nemocných s RS není dosud zřejmé, jaké postavení tyto imunoglobuliny v patogenezi sehrávají. S ohledem na hypotézu, že alespoň u části nemocných s RS se mohou na vzniku onemocnění podílet infekce, především virové, které zasahují struktury CNS, bylo pátráno jak v krvi, tak v likvoru po přítomnosti specifických protilátek proti virovým agens. Bylo prokázáno, že je zde ve zvýšené míře možné zachytit specifické protilátky reagující především s herpetickými viry HHV4 (EBV) a také HHV6. Převládá však názor, že protilátková aktivita představovaná imunoglobuliny oligoklonálních pruhů je zaměřena především proti vlastním strukturám mozku. Nepodařilo se prokázat významnou autoreaktivitu těchto protilátek, které by cílily na autoantigeny, které jsou prokazatelně terčem autoreaktivity T-lymfocytů. Podle současného názoru podloženého nejnáročnějšími experimenty je zatím dovozováno, že specifita protilátek tvořících imunoglobulinové proužky u nemocných s RS je zaměřena proti různým strukturám s původem v CNS, chemicky především lipidového původu. Tyto nálezy jsou interpretovány jako důkaz úklidových reakcí, které mají prostřednictvím vazby protilátek zajistit odstraňování poškozených struktur CNS (Winger et al., 2016).

Důkazy o zapojení B-lymfocytů do obranného i poškozujícího zánětu v CNS je velmi obtížné přinést. Jsou obvykle pouze implicitní, vycházející z analýzy periferní krve nebo mozkomíšního moku. Je nemožné tyto analýzy provést *intra vitam* přímo v mozkových strukturách. Proto jsme odkázáni zatím prakticky výlučně na histopatologická vyšetření vzorků tkání CNS získaných *post mortem*. Je pochopitelné, že nejběžnější forma R-R RS, která nemocné bezprostředně neohrožuje smrtí, není v tomto ohledu analyzována a histopatologické analýzy jsou prováděny u nemocných s progresivní formou RS. U nich bylo prokázáno, že v některých strukturách mozku, především na meningách, lze nalézt agregáty lymfoidních buněk tvořených B-lymfocyty v různém stupni diferenciaci, folikulárními dendritickými buňkami a dalšími buněčnými typy (Jones et al., 2016). Tyto struktury jsou za normálních okolností součástí struktur sekun-

dárních lymfatických orgánů, ve kterých probíhá B-lymfocytární odpověď po antigenní stimulaci. Nálezy těchto tzv. terciárních lymfoidních struktur v CNS nemocných s RS nejsou překvapivé. Jsou běžně prokazovány u jiných imunopatologických zánětlivých onemocnění, např. aterosklerózy, revmatoidní artritidy, vaskulitid. V nich je prokázáno, že aktivity B-lymfocytů z těchto struktur významně přispívají k imunopatologii. Léčba cílená na B-lymfocytární systém je v těchto indikacích prokazatelně účinná (Ludwig et al., 2017). Bylo však překvapením, že aplikace biologické léčby představované monoklonální protilátkou antiCD20 vedla k významné klinické odpovědi i u nemocných s RS, kde jsme účast B-lymfocytů nepředpokládali (Milo, 2016).

Můžeme si tedy klást otázku, jak je B-lymfocytární systém zahrnut do imunopatogeneze RS. Pro tyto úvahy musíme vyjít z kompartmentalizace imunitní odpovědi. Lze předpokládat, že B- i T-lymfocytární imunitní odpověď je indukována v sekundárních lymfatických orgánech mimo CNS, kde jsou pro ni vytvořeny podmínky. Aktivované případně klonálně zmnožené a funkčně polarizované T- (B-) lymfocyty následně migrují složitě řízenými procesy do CNS. Je třeba zdůraznit, že struktury CNS jsou velmi efektivně odděleny od těla krevně mozkovou bariérou. Ta za fyziologických okolností nepředstavuje nepropustnou bariéru, jak jsme předpokládali ještě v nedávné minulosti, kdy byly struktury CNS považovány za imunitně privilegovaný orgán. Jedná se o vysoce sofistikovanou strukturu, která zajistí přísně regulovaný pohyb buněk imunity, protilátek a cytokinů mezi tělem a CNS, který reflektuje momentální potřeby mozku. Tento regulovaný prostup je nutný nejenom pro zajištění ochrany mozku před infekčními agens, ale poskytuje mozku prokazatelně i mnohovrstevnou podporu, která je nutná pro průběžné odstraňování poškozených struktur a jejich náhradu z kmenových buněk v procesech neuroreparace. Jasně důkazy o těchto funkcích imunity nám dává vysoce účinná, ale i riziková terapie RS natalizumabem, který blokuje vstup lymfoidních buněk nesoucích integrinový adhezní heterodimer VLA4 do mozku (Radick et al., 2015).

Bylo by nesprávné považovat B-lymfocyty klasicky pouze za imunocyty, které se po antigenní stimulaci diferencují do plazmatických buněk, tvořících protilátky. Jejich úloha v obran-

ném i poškozujícím zánětu je komplexní. Stručně připomeneme, že B-lymfocyty slouží jako mimořádně účinné buňky schopné zpracovat antigenní podněty a prezentovat je v úplném kontextu rozpoznávání T-lymfocytům. B-lymfocyty jsou také výrazným zdrojem cytokinů, které tvoří velmi brzy po expozici antigenním podnětům. Nemusí se nutně jednat o aktivaci B-lymfocytů vyžadující antigenní stimulaci prostřednictvím BcR. B-lymfocyty exprimují bohatě na svém povrchu i v nitrobuněčných lokalizacích receptory PRR, např. z rodiny receptorů TLR, kterými identifikují celé spektrum vzorů PAMP/DAMP. Výsledkem je přepis genů, které kódují např. TNFα, IL-2, 6, 15, 17 a také chemokiny, s obecně prozánětlivými účinky (Krejsek, 2016).

V CNS nemocných s RS jsou přímé důkazy o zapojení protilátek tvořených B-lymfocyty do poškozujícího zánětu. Je možné detekovat depozita imunoglobulinů, často spolu se složkami komplementového systému, odpovědné za poškození struktur CNS. Je velmi pravděpodobné, že se protilátky uplatňují i v cytotoxických aktivitách T-lymfocytů a NK buněk zprostředkovaných mechanismy ADCC (Antibody Dependent Cytotoxicity). Prostřednictvím cytokinů B-lymfocyty abnormálně aktivují astrocyty a glie. Významnou úlohu v zapojení B-lymfocytů do poškozujícího zánětu v CNS sehrávají chemokiny. Ty zajistí selektivní migraci B-lymfocytů přes krevně mozkovou bariéru. Byly nalezeny abnormální hladiny chemokinů CXCL13, CXCL12, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL20. Mezi nimi zřejmě klíčové postavení zaujímá chemokin CXCL13. Ten reaguje s receptorem CXCR5, který je ve velké densitě vyjádřen na B-lymfocytech. Zajišťuje migraci B-lymfocytů do lymfatických folikulů, podílí se na jejich vývoji a určuje interakce s folikulárními dendritickými buňkami. Tento cytokin byl prokázán přímo v ektopických lymfoidních strukturách nalézáných v mozku u nemocných s RS a rovněž je ve zvýšené míře přítomen v likvoru. Přežívání B-lymfocytů je zásadním způsobem regulováno cytokiny z rodiny TNFα označovanými jako BAFF. Ty interagují s BAFFR na povrchu B-lymfocytů. BAFF byl prokázán v ektopických lymfoidních strukturách mozku a likvoru nemocných s RS (Bittner, 2017).

Imunobiologické charakteristiky molekuly CD20

Membránová molekula CD20 je specificky vyjádřena pouze v B-lymfoidní linii. Jedná se

o glykosylovaný fosfoprotein, který 4krát prochází cytoplazmatickou membránou. Řadíme ho tedy do rodiny tetraspanových molekul. Molekula CD20 je vyjádřena poměrně brzy v průběhu diferenciaci B-lymfocytů. Chybí jen na nejranějších vývojových stadiích. Tato molekula také není vyjádřena na plazmablastech a plazmatických buňkách. Neznáme její ligandy.

Molekula CD20 je rozpoznávána celou řadou monoklonálních protilátek antiCD20. Ty se používají k průkazu B-lymfocytů metodou imuno-fluorescence s vyhodnocením průtokovou cytometrií, např. pro diagnostiku lymfoproliferativních onemocnění vycházejících z B-lymfocytární větve. Do klinické praxe byla již před mnoha lety zavedena chimérická monoklonální protilátka antiCD20, rituximab. Používá se v léčbě nemocných s B-lymfoproliferativními onemocněními, B-NHL a B-CLL. Postupně byly konstruovány a v klinické praxi ověřeny i další monoklonální protilátky reagující s CD20. Jedná se o ocrelizumab, který je představován humanizovanou protilátkou. Nejnověji byla zavedena i plně humánní protilátka antiCD20 označovaná jako ofatumumab. Rituximab i ocrelizumab se váže na prakticky totožné části molekuly CD20. Ofatumumab má jiný cílový epitop. Jsou konstruovány i další antiCD20 monoklonální protilátky, které nebudeme blíže charakterizovat (Radick et Mehr, 2015).

Vazba antiCD20 na B-lymfocyty vede k jejich depleci, kterou může prokázat jak v periferní krvi, tak kostní dřeni, slezině a periferních lymfatických uzlinách. Deplece se uskutečňuje mechanismem na protilátce závislé cytotoxicity (ADCC), lýzou zprostředkovanou komplementem, zesílenou fagocytózou a také indukci apoptózy v B-lymfocytech. Tyto aktivity jsou do značné

míry určeny Fc částí monoklonálních protilátek (Lycke, 2015). Je rozsáhle dokumentováno, že biologická léčba antiCD20 nesnižuje významně hladiny protilátek. To je jistě vysvětlitelné skutečností, že molekula CD20 není vyjádřena na plazmatických buňkách. K depleci B-lymfocytů, která může zahrnout až 99% všech B-lymfocytů, dochází po 1–2 měsících po začátku terapie. Po přerušení terapie dochází k rekonstituci B-lymfocytárního systému s odstupem zhruba 7–10 měsíců. B-lymfocytární kompartment je aplikací biologické terapie antiCD20 trvale alterován. Při obnově prakticky chybějí nebo jsou silně potlačeny paměťové B-lymfocyty. Ve zvýšené míře jsou přítomny naivní B-lymfocyty a také regulační subtypy B-lymfocytů (Baker, 2017). Je prokázáno, že monoklonální protilátky pronikají v malé míře přes krevně mozkovou bariéru. Koncentrace antiCD20 v likvoru je však pouze cca 0,1 % v porovnání s periferní krví. Modulační efekt biologika v kompartmentu CNS není jasný. Nebyl totiž prokázán klinický efekt, pokud byla biologická léčba antiCD20 aplikována přímo do míšního kanálu.

S klinickou aplikací antiCD20, především rituximabu, je obrovská a dlouhodobá pozitivní klinická zkušenost. Používají se rutinně v hematologii již léta k léčbě lymfoproliferací vycházejících z B-lymfocytární větve. Aplikace je obvykle spojena pouze s nezávažnými vedlejšími účinky, které lze dobře zvládnout medikací. Jsou důkazy, že aplikace humanizované protilátky ocrelizumab bude spojena s ještě menším výskytem nežádoucích vedlejších účinků. Z dlouhodobého pohledu lze jednoznačně uzavřít, že léčbu antiCD20 je možné považovat za bezpečnou. Až na kazuistické výjimky ne-

jsou takto léčení nemocní ohroženi infekčními komplikacemi. Nejsou ani zdokumentovány případy nádorového bujení, které by ukazovaly na oslabení obranných protinádorových složek (Moreno et Garcia-Merino, 2017; Soelberg Sorensen, 2016). Biologika antiCD20 byla ověřena v řadě klinických indikací spojených s poškozu-jícím zánětem, jejichž imunopatogenezi dominuje tvorba autoproti-látek. V nich je tato léčba mimořádně účinná. Překvapivě to bylo jasně prokázáno i u nemocných s RS považované za imunopatologii zprostředkovanou T-lymfocyty. Není cílem tohoto přehledu poukazovat na výsledky kontrolovaných klinických studií, které ukázaly účinnost ocrelizumabu v léčbě RS. Nebudeme referovat ani o aplikacích rituximabu v těchto indikacích. Pouze shrnujeme, že u ocrelizumabu byla jednoznačně prokázána dobrá klinická účinnost u primárně progresivní formy RS. Jedná se o formu RS, která prakticky neodpovídá na v současné době používané léčivé prostředky. Ocrelizumab prokázal klinickou účinnost i u nemocných s relabující formou RS. Efekt přitom není provázen závažnými bezprostředními nebo dlouhodobějšími vedlejšími účinky léčby (Sorensen et Blinkenberg, 2016).

Závěr

Lze jednoznačně uzavřít, že biologická terapie humanizovanou monoklonální protilátkou antiCD20, ocrelizumabem, představuje zásadní rozšíření léčebných možností, které mohou ovlivnit přirozený průběh onemocnění RS. Výhodou je jeho účinnost u primárně progresivní formy, která není ovlivněna jinými dostupnými léky. Léčebný efekt je přitom provázen dobrým bezpečnostním profilem.

LITERATURA

1. Baker D, Marta M, Pryce G, Giovannoni G, Schmierer K. Memory B cells are major targets for effective immunotherapy in relapsing multiple sclerosis. *EBioMedicine* 2017; 16: 41–50.
2. Bittner S, Ruck T, Wiendl H, Grauer OM, Meuth SG. Targeting B cells in relapsing-remitting multiple sclerosis: from pathophysiology to optimal clinical management. *Ther Adv Neurol Disord.* 2017; 10(1): 51–66.
3. Jones GW, Hill DG, Jones SA. Understanding immune cells in tertiary lymphoid organ development: it is all starting to come together. *Front Immunol.* 2016; 7: 401. eCollection 2016.
4. Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, Zaheer S, Iyer SS, Zaheer A. Neuroinflammation induces neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine.* 2016; 1(1): pii: 1003.
5. Krejssek J, Andrys C, Krčmová I. *Imunologie člověka*, Garamon, Hradec Králové, 2016.
6. Ludwig RJ, Vanhoorelbeke K, Leyboldt F, Kaya Z,

- Bieber K, McLachlan SM, Komorowski L, Luo J, Cabral-Marques O, Hammers CM, Lindstrom JM, Lamprecht P, Fischer A, Riemekasten G, Tersteeg C, Sondermann P, Rapoport B, Wandinger KP, Probst C, El Beidaq A, Schmidt E, Verkman A, Manz RA, Nimmerjahn F. Mechanisms of autoantibody-induced pathology. *Front Immunol.* 2017; 8: 603.
7. Lycke J. Monoclonal antibody therapies for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: differentiating mechanisms and clinical outcomes. *Ther Adv Neurol Disord.* 2015; 8(6): 274–293.
8. Milo R. Therapeutic strategies targeting B-cells in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2016; 15(7): 714–718.
9. Moreno Torres I, García-Merino A. Anti-CD20 monoclonal antibodies in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 2017; 17(4): 359–371.
10. Parnell GP, Booth DR. The multiple sclerosis (MS) genetic risk factors indicate both acquired and innate immune

- cell subsets contribute to MS pathogenesis and identify novel therapeutic opportunities. *Front Immunol.* 2017; 8: 425.
11. Radick L, Mehr SR. The latest innovations in the drug pipeline for multiple sclerosis. *Am Health Drug Benefits* 2015; 8(8): 448–453.
12. Soelberg Sorensen P. Safety concerns and risk management of multiple sclerosis therapies. *Acta Neurol Scand.* 2016 Nov 27.
13. Sorensen PS, Blinkenberg M. The potential role for ocrelizumab in the treatment of multiple sclerosis: current evidence and future prospects. *Ther Adv Neurol Disord.* 2016; 9(1): 44–52.
14. Wekerle H. B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity* 2017; 50(1): 57–60.
15. Winger RC, Zamvil SS. Antibodies in multiple sclerosis oligoclonal bands target debris. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113(28): 7696–8.