

IMUNOPATOGENEZE ROZTROUŠENÉ SKLERÓZY

doc. RNDr. Jan Krejssek, CSc.¹, MUDr. Otakar Kopecký, CSc.¹, MUDr. Radomír Taláb, CSc.²

¹Ústav klinické imunologie a alergologie, FN Hradec Králové

²Neurologická klinika, FN Hradec Králové

V patogenezi roztroušené sklerózy sehraje klíčovou úlohu autoimunitní imunopatologická reaktivita. V geneticky disponovaném jedinci vlivem neznámých vnějších faktorů, které velmi pravděpodobně zahrnují působení infekčních agens, dojde v CNS k uvolnění autoantigenů. Ty jsou po zpracování a vazbě na molekuly HLA prezentovány autoreaktivním T lymfocytům. Antigen prezentující buňky identifikují nebezpečné vzory, produkuje pluripotentní prozánětové cytokiny (TNF α) a poskytují nezbytné kostimulační signály T lymfocytům. Krevně-mozková bariéra se stává propustnou pro lymfocyty a mononukleární fagocyty, které migrují do CNS vlivem C-C chemokinů. V poškozující zánětové reakci dominuje působení TH1 T lymfocytů a aktivovaných makrofágů. Hlavním terčem poškozujícího zánětu jsou imunodominantní epitopy strukturních molekul myelinové pochvy. Postupně dochází k intramolekulovému a intermolekulovému rozšiřování terčů autoimunitní imunopatologické reaktivity. Složky zánětu pozitivně regulují reparační procesy v CNS. Znalost patogeneze roztroušené sklerózy umožnila zavedení léků, které pozitivně moduluji poškozující zánět. Jedná se o interferon β a glatirameracetát. V preklinických testech jsou zkoušeny další nadějně preparáty.

Klíčová slova: roztroušená skleróza, imunopatogeneze, modulace.

Úvod

Roztroušená skleróza (RS) je chronické zánětové neurologické onemocnění, které je charakterizováno infiltrací leukocytů do CNS, lokální destrukcí myelinových obalů nervových vláken a postupnou ztrátou oligodendrocytů a axonů. V patogenezi onemocnění se budou vedle sebe promítat genetické dispozice a environmentální faktory (16). Genetická dispozice pro vznik RS je nepochybná. Většina genů, které se uplatňují v imunitní odpovědi, jsou polymorfni. Z mnohých studovaných genetických systémů na rozvoj RS zatím prokazatelně působí pouze HLA systém. Zvýšené riziko rozvoje RS mají osoby nesoucí haplotypy HLA DRB1*1501, DRB5*0101, DQA1*0102 a DQB1*0602 (1).

Rovnocenný podíl přirozené a specifické imunity v iniciaci roztroušené sklerózy

RS patří mezi autoimunitní imunopatologické nemoci, jejichž patogeneze je poměrně dobře prozkoumána. Důvodem je nejen mimořádná klinická závažnost RS, ale také skutečnost, že pro RS je vytvořen již několik desítek roků experimentální zvířecí model. Experimentální zvířecí model je nazýván EAE (Experimental Autoimmune Encephalitis). EAE je indukována v geneticky vnímavém kmeni imbredních myši parentální aplikací imunogenních složek myelinu spolu s tzv. Freundovým adjuvans. Freundovo adjuvans je suspenze usmrčených mykobakterií kmene BCG v purifikovaném rostlinném oleji. U ovlivněných zvířat se vyvíjí onemocnění, které se histopatologicky i klinickým průběhem podobá RS člověka. Výsledky modelu EAE můžeme pouze obezřetně extrapolovat na RS.

Podle klasické koncepce fungování imunitního systému je za vznik a rozvoj autoimunitní imunopatologické reakce zodpovědné narušení principu tolerance vlastního. Podle této koncepce sehraávají ústřední úlohu v udržení tolerance vlastního T lymfocyty. V procesu intrathymové diferenciaci T lymfocytů vzniká základní repertoár TcR. Protože proces přeskupení vede teoreticky i prakticky ke

vzniku ohromného množství TcR s různou specifitou, obsahuje základní repertoár nepochybně i autoreaktivní klonny T lymfocytů, jejichž reaktivita je namířena proti vlastním strukturám.

Vyžívající T lymfocyty, které přeskupily genové segmenty kódující TcR, prodělávají následné selekční procesy. V prvním kroku je realizována tzv. pozitivní selekce. V ní je testována schopnost vyžívajícího T lymfocyty interagovat s vlastními molekulami HLA. Vzniklý repertoár stále obsahuje autoreaktivní T lymfocyty. Jejich přítomnost je identifikována v procesu negativní selekce. Vzniklý definitivní repertoár T lymfocytů obsahuje klonny T lymfocytů schopné reagovat s „non-self“. Neobsahuje klonny T lymfocytů s vysokou afinitou k „self“ antigenům. Nízkoafinní autoreaktivní klonny T lymfocytů však v procesu v negativní selekce nemohou být eliminovány a zůstávají součástí fyziologického imunitního repertoáru (7).

Zdánlivý paradox, totiž že fyziologický repertoár T lymfocytů zahrnuje nízkoafinní autoreaktivní klonny T lymfocytů, je řešen v současné koncepci fungování imunitního systému. Ta je postavena na představě, že T lymfocyt potřebuje ke své aktivaci a následné klonální expanzi jednak I. signál, zprostředkovaný TcR, doplněný o řadu akcesorních II. signálů, označovaných jako kontext rozpoznávání. K aktivaci T lymfocyty a jeho klonální expanzi dojde pouze v těch případech, kdy obdrží v dostatečné míře I. i II. signály. Výsledek je diametrálně odlišný pokud T lymfocyt je stimulován pouze prostřednictvím TcR a není mu poskytnuta dostatečná úroveň II. signálů. V tom případě je v nich místo aktivace a klonální expanze indukován proces apoptózy nebo je funkčně vyřazen, tzv. anergizován.

Kontext rozpoznávání je specifické buňkami zprostředkované imunitě poskytován přirozenou imunitou. Buňky prezentující antigen, tj. makrofágy a dendritické buňky, jsou schopny identifikovat mikrobiální agens, která mají mozaiku povrchových, nitrobuněčných i secerovaných molekul označovanou jako s patogenem asociované molekulové vzory (PAMP – Pathogen Associated Molecular Pattern). Po

identifikaci nebezpečných vzorů dochází k aktivaci antigen prezentujících buněk prostřednictvím signální cesty NFκB. Výsledkem je zesílená tvorba prozánětových cytokinů (TNFα, IL-1, IL-6) a zvýšená exprese molekul HLA II. i I. třídy, kostimulačních molekul, adhezních a akcesorních molekul. Právě úroveň membránových interakcí spolu s lokálním cytokinovým mikrostředím je klíčová pro úspěšné rozpoznání antigenních fragmentů vázaných na molekuly HLA T lymfocyty a jejich klonální expanzi.

Zcela recentně je tato koncepce dále propracovávána. Podle ní imunitní systém nerozlišuje mezi „nonself“ a „self“, ale rozlišuje mezi neškodnými a škodlivými signály. Uvedená koncepce je označována trefně jako tzv. „danger model“. Tvorbou nebezpečných signálů reagují buňky, tkáňe a orgány našeho těla na poškození (17).

Soudobé pochopení fungování imunitního systému vysvětluje do nedávna obtížně interpretovatelné nálezy u nemocných s RS. Při porovnávání přítomnosti autoreaktivních T lymfocytů u nemocných s RS a zdravých osob byla nalezena prakticky totožná frekvence výskytu T lymfocytů reagujících s autoantigeny CNS. Dnes je jasné, že samotná exprese receptoru TcR, který rozpoznává antigenní fragmenty a zajišťuje pro T lymfocyt první kognitivní signál, nestačí k jeho aktivaci. Naopak je velmi pravděpodobné, že takovéto T lymfocyty budou v nepřítomnosti kontextu rozpoznávání v posthymickém vývoji eliminovány apoptózou. Ukazuje se rovněž, že krevně-mozková bariéra není až tak neprostupná pro buňky imunitního systému, jak se v minulosti soudilo. I za fyziologických okolností je výměna lymfoidních elementů z periferie do kompartmentu CNS a opačně běžnou událostí. Je tedy pravděpodobné, že autoreaktivní T lymfocyty se dostávají do kontaktu s mozgovými strukturami. Protože však fyziologicky není v tomto kompartmentu přítomen kontext rozpoznávání, nedochází k rozvoji zánětové reakce. K zánětové reakci může dojít pouze za určitých okolností, kdy je autoreaktivním T lymfocytům v CNS poskytnut kontext rozpoznávání. Těmito okolnostmi jsou velmi pravděpodobně infekční procesy, které postihují CNS (2).

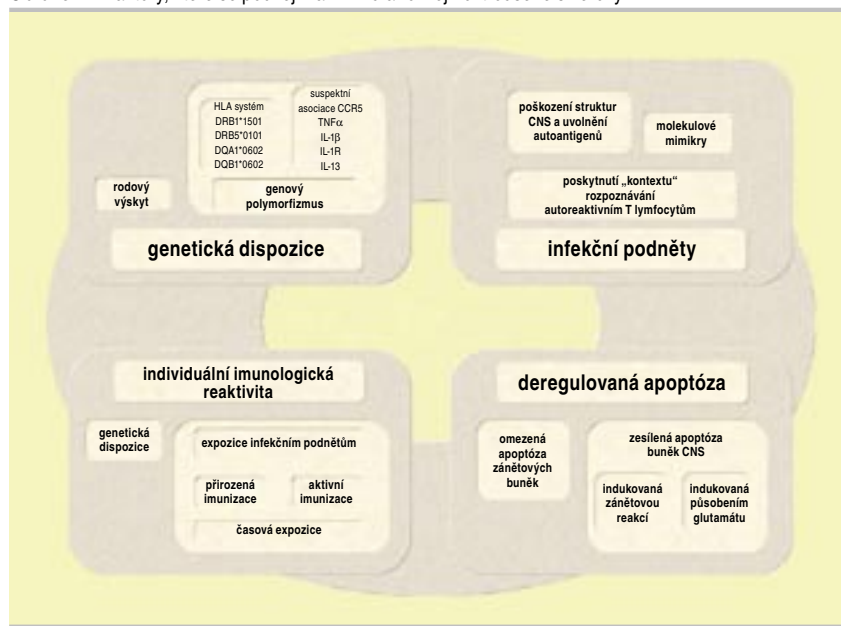
Přítomnost infekčních agens, především virových, není v CNS vzácnou událostí. Mnohá virová agens mají dokonce tropismus k nervovým tkáním. Do CNS prostupují přes krevně mozkovou bariéru. Jsou tam přenášeny buňkami imunitního systému nebo se šíří centripetálně po nervových vláknech. Jejich přítomnost samozřejmě vede k indukci imunitní odpovědi (6). Kontext specifického rozpoznávání je pochopitelně nespecifický a přítomnost složek obranného zánětu v CNS tedy může poskytnout kontext rozpoznávání pro autoreaktivní T lymfocyty. Patogenetické mechanismy infekcí spolu s poškozujícími prvky obranného zánětu jsou příčinou narušení buněčných struktur CNS. Ta se projeví jako vznik nebezpečných signálů, na které rovněž reaguje imunitní systém. Lze tedy shrnout, že současný náhled na imunopatogenetické mechanismy RS se stále více odvrací od představy, že autoreaktivní T lymfocyty jsou klíčové v patogenezi této nemoci. Naopak je stále více doceňována úloha přirozené imunity (obrázek 1).

Regulační a efektorové složky imunopatologického zánětu v CNS nemocných s roztroušenou sklerózou

Prostup krevně mozkové bariéry aktivovanými lymfocyty a mononukleárními fagocyty je vícestupňový proces. Výstelka cévních kapilár v CNS je tvořena specializovanými endotelovými buňkami, které nejsou fenestrovány a jsou spojeny pevnými spoji. V průběhu zánětové reakce se působením cytokinů, např. TNFα, INFγ (interferon γ), IL-1 a IL-6, zvyšuje exprese molekul HLA II. třídy a adhezních molekul na povrchu endotelových buněk mozkových cévních kapilár i na leukocytech. Na endotelových buňkách je zesílená exprese adhezních molekul ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) a VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule). Na lymfocytech je zvýšená exprese L-selektinů a integrinových molekul VLA-4 (Very Late Antigen). Adhezní interakce mezi VLA-4 a VCAM-1 je velmi důležitá, protože zablokování integrinového heterodimeru VLA-4 monoklonálními protilátkami zabránilo rozvoji experimentální EAE. Dokonce po úspěšném skončení II. fáze klinického zkoušení probíhá realizace III. fáze klinického zkoušení, které má určit klinický význam blokování molekul VLA-4 pomocí monoklonálních protilátek u nemocných s RS.

Po průniku vrstvou aktivovaných endotelových buněk musí lymfoidní buňky překonat bariéru vláken mezibuněčné hmoty, tvořících bazální membránu kapilár. Jejich prostup je umožněn působením proteolytických enzymů označovaných jako matrixové metaloproteinázy (MMP). Význam adhezních interakcí a působení MMP v patogenezi RS je možné doložit zvýšenými hladinami solubilních forem adhezních molekul (sICAM-1, sVCAM-1), matrixových metaloproteináz a jejich inhibitorů v mozkomíšním moku nemocných s RS. Zánětové buňky v aktivním plaku exprimují několik odlišných MMP. V mozkomíšním moku byla zatím prokázána zvýšená koncentrace MMP-9 (gelatináza B) (8).

Pohyb invadujících buněk imunitního systému v CNS není nahodilý, naopak, je velmi přesně regulovaný prostřednictvím cytokinů. Nejvýznamnějšími cytokiny, usměrňujícími pohyb buněk v našem těle jsou chemokiny, usměrňujícími pohyb buněk v našem těle jsou chemokiny. Většina chemokinů je řazena mezi α-chemokiny (C-X-C chemokiny) nebo β-chemokiny (C-C chemokiny). Chemokiny jsou účinné po vazbě na membránové receptory. Společnou pro chemokinové receptory je jejich struktura a také fakt, že využívání receptorů pro chemokiny je degerované tj. na jeden receptor se může vázat více různých chemokinů a opačně jeden chemokin může reagovat s více receptory pro chemokiny (4). Chemokiny jsou tvořeny především buňkami imunitního systému. Výjimečné postavení mezi nimi zaujímají makrofágy a dendritické buňky, které produkují řadu odlišných cytokinů a chemokinů. Hovoříme o tzv. polyspeirismu. Chemokiny mohou v CNS produkovat i další buněčné typy, např. mikroglie, a astrocyty. Receptory pro chemokiny byly nalezeny na všech buněčných komponentách CNS, včetně neuronů. Chemokiny regulují migraci buněk CNS v otogenetickém vývoji. Chemokiny tvořené v průběhu zánětové reakce budou jistě ovlivňovat

Obrázek 1. Faktory, které se podílejí na vzniku a rozvoji roztroušené sklerózy

následné reparační procesy v nervových tkáních. V mozkomíšním moku u nemocných s RS je zvýšena koncentrace C-C chemokinů RANTES (Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted) a MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein) (3).

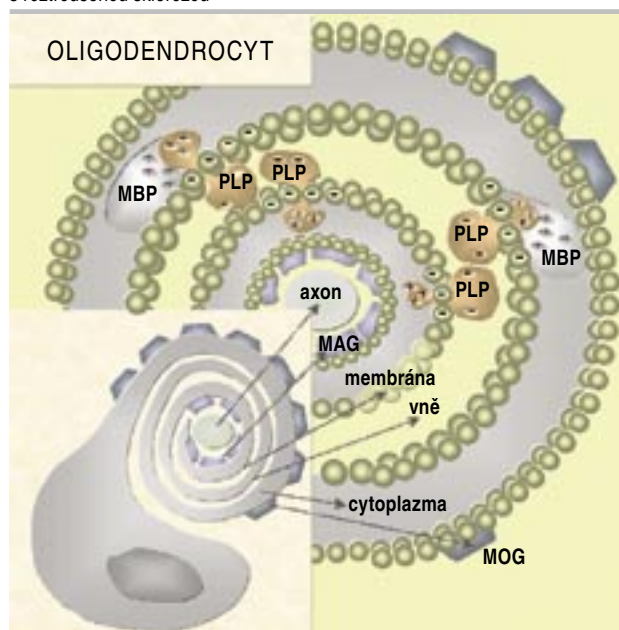
Některé struktury v CNS jsou pravděpodobným terčem autoreaktivních T lymfocytů. Třebaže absolutní důkazy nejsou k dispozici, nálezy z modelu EAE i získané u nemocných s RS implikují, že terčem imunopatologické reaktivity jsou součástí obalů axonů. Myelinové obaly nervových vláken jsou produkovány oligodendrocyty. Myelin je rozšířenou membránou oligodendrocytů, která mnohonásobně obaluje axon. Jeden oligodendrocyt poskytne myelinizaci zhruba 50 segmentům určitého axonu. Při obalování nervového vlákna je většina cytoplazmy oligodendrocytů absorbována. Prostory mezi vrstvami myelinu jsou extracelulární. Na extracelulární straně myelinové vrstvy nejbližší axonu, tj. v periaxonálním prostoru, je lokalizován MAG (Myelin-Associated Protein), považovaný za jeden z terčů autoreaktivity u nemocných s RS. Na vnější straně myelinové vrstvy se nachází MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein). Uvnitř je i lokalizován i hlavní terč autoimunitní imunopatologické reaktivity, myelinový bazický protein (MBP). Poslední z terčů, PLP (Proteolipid Peptide), je transmembránovým proteinem, který má negativně nabitý konec v extracelulárním prostoru a část kladně nabitou v cytoplazmě. Především na molekule MBP se nacházejí imunodominantní epitopy vůči kterým je autoreaktivita zaměřena (obrázek 2).

U myelinového bazického proteinu (MBP), pokládá se za nejdůležitější autoantigen v patogenezi sclerosis multiplex, jsou prokázány shody v aminokyselinových sekvencích na pozicích 84-101 tohoto proteinu se sekvencemi hemaglutininu viru chřipky, dřevovým proteinem adenovirů, polymerázou HBV, proteiny virů spalniček, HSV a EBV. V experimentální autoimunitní encefalitidě, která

je modelem roztroušené sklerózy, byla zjištěna shoda mezi úsekem Thr-Gly-Ser-Leu-Pro-Gln proteinu MBP s polymerázou viru hepatitidy B. Je zajímavé, že k indukcii onemocnění postačí shoda ve čtyřech aminokyselinách v proteinu MBP.

Autoimunitní imunopatologické procesy nemoci jsou výsledkem dlouhodobého patogenetického procesu. V průběhu velmi pravděpodobně roků až mnoha let dochází k jevu, který byl popsán u člověka teprve nedávno. Nazývá se rozšiřování terčů imunopatologické reaktivity. Autoimunitní imunopatologický proces je podle této koncepce zahájen narušením tolerance vlastního v jejím nejslabším místě. V případě EAE je to zahájení reaktivity vůči imunodominantnímu epitopu MBP na pozicích aminokyselin 80–

100. Zahájený imunopatologický proces vede k destrukci nervových tkání a uvolnění většího množství autoantigenů. Tím je poskytován stále většímu množství autoreaktivních T lymfocytů první signál zprostředkovaný TcR. Poškozující zánětlivá reakce zajistí zesílené cytokinové mikroprostředí a zvýšenou expresi kostimulačních a akcesorních molekul na antigen prezentujících buňkách. Tím je zabezpečena dostatečná úroveň „kontextu rozpoznávání“ tj. druhých aktivačních signálů. Při dlouhodobém sledování nemocných s RS je možné vidět, že se postupně začínají objevovat autoreaktivní T lymfocyty zaměřené proti dalším imunodominantním epitopům MBP. Tomuto jevu říkáme intramolekulové rozšiřování terčů (intramolecular spreading).

Obrázek 2. Hlavní terče autoimunitní imunopatologické reaktivity u nemocných s roztroušenou sklerózou

Funkčně významné molekuly jsou v buňce velmi obvykle součástí nadmolekulárních komplexů. Podobně membránové molekuly nejsou izolovány, ale jsou ve funkčním propojení s dalšími povrchovými strukturami. Při imunopatologické autoimunitní reakci není tedy překvapivé, že reaktivita původně zaměřená vůči dominantní složce nadmolekulového komplexu se postupně rozšiřuje i na další složky uvedeného komplexu. Tento jev označujeme jako intermolekulové rozšiřování terčů autoimunitní imunopatologické reaktivity. V typické podobě je ho možné nalézt právě u nemocných s RS. Tam je imunopatologická autoimunitní reaktivita v úvodu zaměřena proti MBP. Postupně se rozšiřuje i vůči MAG, MOG a PLP. Z uvedeného je patrné, že autoimunitní imunopatologické procesy mají sebezsilující potenciál. Po prolomení tolerance vlastních struktur zahrnují další a další terče a nakonec se manifestují jako klinicky zřetelné poškození (19).

Zralé pomocné induktorové T lymfocyty a zřejmě také tlumivé cytotoxické T lymfocyty prodělávají po antigenní stimulaci pod vlivem mnohých proměnných faktorů další vyžívání. Výsledkem je diferenciací do funkčně odlišných subsetů pomocných (TH) a tlumivých cytotoxických (Ts/c) T lymfocytů. Funkční odlišnosti jsou podmíněny odlišným spektrem cytokinů, které tyto buňky po stimulaci antigenem tvoří. Subset TH1 T lymfocytů je odpovědný za rozvoj cytotoxické reaktivity, tvorbu protilátek v třídě IgG₂. Za abnormálních okolností určuje imunopatologickou reakci IV. typu. TH1 T lymfocyty tvoří INF γ , TNF β (Tumor Necrosis Factor β) a IL-2. Subset TH2 T lymfocytů reguluje diferenciaci B lymfocytů, izotypové přepnutí syntézy imunoglobulinů a tvorbu protilátek v třídě IgG1 a IgE. Za abnormálních okolností je aktivita TH2 určující pro rozvoj imunopatologické reakce prvního typu – atopické reakce. Typickými cytokiny, které produkují TH2 T lymfocyty je IL-4, IL-13 a rovněž IL-2. Imunoregulační subsety T lymfocytů jsou vzájemně v antagonistickém vztahu. Aktivita subsetu TH1 prostřednictvím INF γ omezuje funkci subsetu TH2. Opačně, TH2 T lymfocyty tlumí aktivitu subsetu TH1 T lymfocytů prostřednictvím IL-4.

Okolnosti, které rozhodnou, do kterého subsetu budou vyžívat TH0 T lymfocyty, jsou velmi obtížně definovatelné. Zjednodušeně řečeno, k vyžívání do subsetu TH1 dochází, jsou-li antigeny mikrobiálního původu. Enviromentální antigeny, které nejsou mikrobiálního původu, stimuluji vyžívání do subsetu TH2. Je-li mikroprostředí, ve kterém dochází k rozpoznání bohaté na IL-12, dochází k preferenčnímu vyžívání do subsetu TH1. V přítomnosti zvýšeného množství IL-13 nebo IL-4 TH0 T lymfocyty vyžívají do subsetu TH2. Podobnou funkci jako IL-12 má rovněž IL-18. O vlivu odlišných kostimulačních interakcí mezi antigen prezentující buňkou a TH0 T lymfocytem na vyžívání do funkčních subsetů T lymfocytů není zatím u člověka dostatek informací. Lze extrapolovat, že kostimulační interakce zprostředkovaná vazbou B7.1 s CD28 na T lymfocytech stimuluje vyžívání do TH1 T lymfocytů. Interakce s molekulou B7.2 (CD86), vede k tvorbě subsetu TH2 T lymfocytů. Konečně, proměnnou je i využívání odlišných

nitrobuňčných signálních molekul. Je-li aktivována dráha využívající transkripční faktor STAT-6 (Signal Transducer and Activator), vyžívají TH0 T lymfocyty v subset TH2. Aktivace přes faktor STAT-4 preferenčně stimuluje vyžívání do subsetu TH1. Je třeba zdůraznit, že zatím platí, že proces vyžívání do funkčně odlišných subsetů je od určitého okamžiku nezvratný.

Do procesu vyžívání odlišných subsetů jsou zapojeny významnou měrou i další membránové molekuly. Jedná se např. o interakci mezi molekulou CD40 na antigen prezentující buňkách a molekulou CD40L (CD154) na aktivovaných T lymfocytech (18). Mimo jmenované cytokiny se v procesu vyžívání uplatňují i chemokinové molekuly. Zatím nejvíce informací o významu chemokinových signálních cest pro vývoj funkčně odlišných subsetů T lymfocytů je pro C-C chemokiny.

Výsledky studia myšího modelu jasně ukazují, že existují ještě další imunoregulační subsety T lymfocytů. Jejich přítomnost implikují výsledky dosavadních studií i u člověka. Imunoregulační T lymfocyty jsou nazývány jako subset TH3 T lymfocytů nebo možná lépe jako subset Tr T lymfocytů. Subset Tr produkuje po své aktivaci cytokiny IL-10 a TGF β . Prostřednictvím těchto cytokinů zasahují Tr T lymfocyty negativně do funkce subsetu TH1 T lymfocytů. Zesílená aktivita Tr T lymfocytů by tedy měla být u nemocných RS žádoucí. Je jí pravděpodobně dosahováno léčbou interferonem β . Nežádoucí imunopatologická reaktivita je tlumena i v případě, že dojde k interakci mezi molekulou CTLA-4 (CD152), vyjádřenou na aktivovaném T lymfocyty a molekulou B7 antigen-prezentující buněk. Výsledkem takovéto interakce je utlumení, případně anergizace autoreaktivního T lymfocyty. Geneticky je CTLA-4 polymorfni (9, 12).

Třebaže je RS považována za autoimunitní imunopatologické onemocnění, ve kterém dominantní úlohu sehrává buňkami zprostředkovaná imunitní reaktivita, nelze pominout ani podíl humorálních složek imunity na poškozující zánětové reakci. U nemocných s RS dochází velmi pravděpodobně k intrathekální produkci protilátek. Na zvýšené hladině imunoglobulinů v likvoru nemocných s RS se největší měrou podílejí protilátky v třídě IgG. Imunoelktroforetickou analýzou vzorku likvoru lze u nemocných s RS nalézt tzv. oligoklonální proužky. Tyto proužky jsou považovány za důkaz oligoklonální expanze B lymfocytů, které se nacházejí přímo v CNS. Oligoklonální proužky v likvoru je možno nalézt u více než 90 % nemocných s RS.

Protilátky přítomné v likvoru u nemocných s RS byly intenzivně studovány, aby byla určena jejich specifita. Jsou namířeny proti mnohým virovým agens např. viru EBV, CMV, HSV a VZV. Jsou mezi nimi i protilátky proti antigenům strukturám Haemophilus influenzae, Streptococcus pyogenes a dalším. Vždy je však možné prokázat, že specifické protilátky proti mikrobiálním agens tvoří pouze minoritní frakci imunoglobulinů v likvoru nemocných s RS.

Část protilátek má svoji specifitu zaměřenu proti rozmanitým autoantigenům, které mají původ v CNS. Přítom-

nost autoprotilátek proti MBP je prakticky pravidlem v likvoru u nemocných s RS. Autoprotilátky jsou však namířeny i proti dalším antigenům např. PLP, MOG. U nemocných s RS je v likvoru možné nalézt protilátky proti τ -proteinu. To naznačuje přítomnost probíhajících neurodegenerativních procesů.

Úloha autoprotilátek v poškozujícím zánětu u nemocných s RS je protichůdná. Vazba specifických protilátek na imunodominantní epitopy molekul CNS může negativně modulovat jejich funkci. Komplexy imunoglobulinů s antigeny jsou jednou z podmínek aktivace komplementového systému, který svou cytolytickou aktivitou může přispět k poškození buněčných struktur CNS. Specifické protilátky se uplatňují v cytotoxické reakci závislé na protilátce (ADCC – Antibody Dependent Cytotoxicity). Na druhou stranu specifické protilátky mohou vyvazovat a tak neutralizovat autoantigeny, které se uvolňují v průběhu poškození nervových struktur. Protilátky usnadňují odstranění poškozených struktur v CNS a pozitivně moduluji reparační procesy.

Z dosavadního poznání imunopatogenetických mechanismů RS vyplývá, že prakticky žádná aktivita poškozujícího zánětu se neobejde bez regulačního nebo efektorového přispění buněk makrofágového původu. Makrofágy jsou velmi početně zastoupeny v buněčném substrátu aktivních plaků. Aktivované makrofágy jsou nejvydatnějším zdrojem pluripotentních prozáněťových cytokinů TNF α a IL-1 β . Jejich prostřednictvím se zvyšuje propustnost krevně mozkové bariéry pro leukocyty. Jsou klíčové v poskytování kontextu rozpoznávání T lymfocytům. Určují, jakým směrem se bude ubírat vyžívání TH0 T lymfocytů. Prostřednictvím chemokinů MCP-1 (Macrophage Chemoattractive Protein), MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10 a RANTES ovlivňují migrační aktivitu lymfocytů a zajistí jejich akumulaci v místě patologického procesu v CNS. Makrofágy jsou i významnými efektorovými buňkami. Mohou přímo poškozovat myelinovou pochvu a negativně ovlivňovat buňky CNS, např. oligodendrocyty, astrocyty a neurony tvorbou matrixových metaloproteináz. V aktivovaných makrofázích dochází k sestavení enzymatických komplexů NADPH oxidázy a NO syntázy. Na konci působení NADPH oxidázy jsou vysoce toxické produkty kyslíkového metabolismu. NO syntáza katalyzuje tvorbu oxidu dusnatého, který je substrátem pro vznik vysoce reaktivních produktů dusíku. Jak kyslíkové, tak dusíkové mediátory mají mimořádný cytotoxický potenciál (5).

Prostřednictvím TNF α je v buněčných elementech CNS a v buňkách imunitního systému, které jsou součástí záněťového procesu, indukován proces apoptózy. Vnější cesta apoptózy je stimulována vazbou TNF α na receptory pro TNF α p55 a p75. Indukci apoptózy zajistí i další membránové receptory patřící do rodiny TNFR/NGFR (Nerve Growth Factor Receptor). Z nich můžeme jmenovat receptor Apo/Fas (CD95), jehož ligandem je Apo/FasL. Stimulovat proces apoptózy mohou nitrobuněčné molekuly cytotoxických buněk označované jako granzymy. Společně pro všechny složky vnější cesty indukce apoptózy je aktivace

latentních nitrobuněčných proteolytických enzymů označovaných jako kaspázy. Aktivací iniciační kaspázy-8 začíná ireverzibilní sled nitrobuněčných reakcí spojených s aktivací pozdních kaspáz. Výsledkem je aktivace endonukleáz, které štěpí genetický aparát buňky na nukleosomální fragmenty. Negativně ovlivněny jsou i další regulační bílkoviny buňky. Vnitřní cesta apoptózy je spojena s aktivitou cytochromoxidázového systému. Za jednu z hlavních regulačních molekul vnitřní cesty apoptózy je považován Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor 1). Proapoptoticky působí produkty rodiny homologických genů např. bak. Protichůdně působí produkty antiapoptotických genů, především z rodiny bcl-2 (20).

Ukazuje se, že příčinou poškození nervových tkání u nemocných s RS není pouze bezprostřední působení infiltrujících záněťových elementů. Buňky imunitního systému zvláště T lymfocyty jsou v místě zánětu významným zdrojem glutamátu. Glutamát se váže na své receptory na povrchu oligodendrocytů a neuronů. Abnormální metabolismus glutamátu je považován za příčinu poškození, či přímo smrti uvedených buněčných elementů.

Poškozující faktory v mozkové lézi u nemocných s RS nejen narušují myelinové obaly nervových vláken, ale jsou odpovědní za jejich konečné přerušení a ztrátu. Axonální ztráta je ireverzibilní proces a velmi pravděpodobně určuje míru neurologického deficitu u nemocných s RS. V akutním plaku, kde probíhají aktivní demyelinizační procesy, je možné vidět poškození axonu včetně jejich transektce. V chronických plakách lze prokázat ztrátu 50–80 % axonů. Mechanismus axonálního poškození je neznámý. Někteří autoři nacházejí korelaci mezi mírou akutního axonálního poškození, počtem makrofágů a CD8+ T lymfocytů. Zapojeny jsou i excitotoxické mechanismy vyvolané zvýšenou přítomností glutamátu (11).

Úloha imunitního systému je u demyelinizačních onemocnění tradičně vnímána jako negativní. Imunitní systém je bezpochyby součástí poškozujícího záněťového procesu v CNS nemocných s RS. Každá záněťová reakce však v sobě zahrnuje regulační prvky, které jsou nezbytné pro proces hojení, případně remodelace. Stejně tomu je nepochybně v případě poškozujícího imunopatologického zánětu u nemocných s RS. Buňky imunitního systému, které jsou přítomny v CNS, se aktivně zapojují do odstranění poškozených nervových struktur. Tato úloha imunitního systému je jednoznačně prokázána v experimentálních modelech poškození nervových tkání traumatem (15). Navíc aktivované buňky imunitního systému produkcí cytokinů a membránovými interakcemi stimulují buněčné složky CNS k zvýšené aktivitě včetně zvýšené proliferace. O této fázi záněťového procesu nejsou dostatečné informace ani v případě EAE. Z pochopitelných důvodů prakticky úplně chybějí u nemocných s RS. Už charakter většiny případů RS zřetelně ukazuje, že procesy poškození jsou u nemocných s RS střídány aktivitou reparačních mechanismů. Lepší znalost reparačních mechanismů by mohla být využita k hledání cest, jak posílit procesy reparace u nemocných s RS léčebně (obrázek 3).

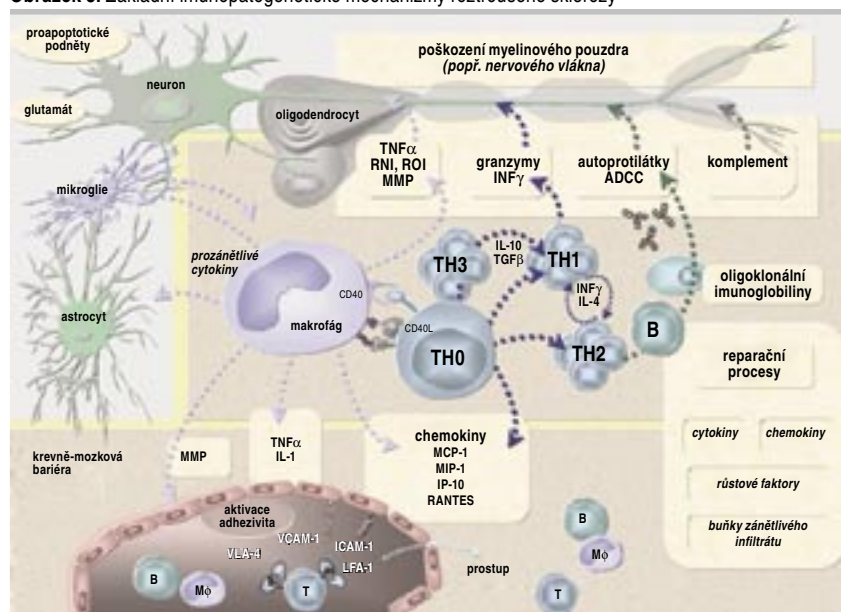
Iniace poškozeního zánětu v CNS nemocných s RS je velmi pravděpodobně spojena s poškozením nervových tkání infekcí nebo aberovanou apoptózou. Makrofágy a mikroglie identifikují endogenní či exogenní nebezpečné vzory pomocí membránových receptorů. Po aktivaci zpracují autoantigeny a prezentují je T lymfocytům, kterým poskytnou i odpovídající kontext rozpoznávání. Dále tvorbou prozánětlivých cytokinů a chemokinů ovlivní vlastnosti krevně-mozkové bariéry. Jejich působením se zvýší adheze endotelových buněk pro buňky imunitního systému s následným zvýšeným vstupem do kompartmentu CNS. Proces migrace buněk imunitního systému je selektivně řízen chemokiny. Subset TH0 T lymfocytů vyzrává do subsetu TH1, který je charakterizován tvorbou $INF\gamma$. Subset TH2 je odpovědný za regulaci tvorby protilátek. Myelinové obaly a buněčné komponenty CNS jsou poškozovány několika imunitními mechanismy jak humorálními, tak buněčnými. Do poškození i reparačních procesů, které jsou nedílnou součástí imunopatologického zánětu v CNS, jsou kromě buněk imunitního systému zapojeny i buněčné komponenty CNS, zvláště mikroglie, ale také astrocyty a vlastní neurony.

Modulace poškozeního zánětu u nemocných s roztroušenou sklerózou

Jak již bylo řečeno, relativně solidní znalosti patogenních mechanismů RS a výhodný experimentální model EAE umožnil vývoj léků, které pozitivně ovlivňují průběh onemocnění a patří do skupiny léků modifikujících průběh nemoci (Disease Modifying Drug; DMD). V klinické praxi jsou již několik roků velmi úspěšně užívány dva léky. Prvním je interferon β ($INF\beta$), druhým glatirameracetát (GA). Tyto léky mají naprosto odlišnou strukturu a rovněž mechanismem působení se od sebe odlišují. Navíc je třeba dodat, že detailní mechanismy působení nejsou u obou léků známy. Interferon β byl původně zkoušen jako lék s protivirovými účinky. U nemocných s RS pravděpodobně tlumí aktivitu subsetu TH1 T lymfocytů. Děje se tak indukcí tvorby IL-10 (13). Působením $INF\beta$ se snižuje propustnost krevní mozkové bariéry. Dochází totiž k zablokování adhezních interakcí, tlumení účinku matrixových metaloproteináz a migrace leukocytů. Výsledky posledních studií však ukazují, že mechanismus působení $INF\beta$ nebude tak schématický, jak bylo uvedeno. Bylo totiž prokázáno, že $INF\beta$ stimuluje i tvorbu cytokinů a chemokinů typických pro subset TH1 (IP-10). Způsobuje zvýšenou expresi β řetězce IL-12. Uvedené nálezy nejsou překvapivé, uvědomíme-li si, že aktivita T lymfocytů je nezbytná pro optimální průběh reparačních fází zánětu. Není vyloučeno, že $INF\beta$ má i přímé protivirové účinky a omezuje replikaci virových agens v CNS (11).

Glatirameracetát je směs syntetických polypeptidů obsahující L-aminokyseliny, kyselinu glutamovou, alanin, ly-

Obrázek 3. Základní imunopatogenetické mechanismy roztroušené sklerózy



sin a tyrosin. Paradoxní je, že původně byl syntetizován s cílem získat látku, která bude schopna indukovat EAE. GA způsobuje přesmyk od aktivity subsetu TH1 k aktivitě subsetu TH2. Kompenzuje s imunogenními fragmenty MBP o receptory na autoreaktivních T lymfocytech. Ty pravděpodobně anergizuje nebo způsobuje jejich apoptózu, protože není přítomna dostatečná úroveň kontextu rozpoznávání.

Za terapeutický postup s velkým teoretickým i praktickým potenciálem je možné považovat indukci tolerance. Té je možné dosáhnout perorálním podáváním antigenů vůči kterým chceme toleranci indukovat. Imunitní systém sliznic má tendenci neodpovídat na podněty, kterým je vystaven. Slizniční tolerance je základem systémové tolerance. Makromolekuly, které jsou požitý, jsou degradovány pouze částečně, zvláště pokud je požitá velká dávka antigenů. Intaktní antigeny se mohou na sliznici vstřebávat. Zde zjednodušeně řečeno indukují proliferaci regulačního subsetu Tr T lymfocytů, který prostřednictvím IL-10 a TGF β tlumí imunitní odpověď na daný antigen. Orální tolerance je nejsnáze navoditelná v časných údobích života těsně po narození. V tomto období je fyziologicky nastavena imunologická reaktivita k indukci tolerance. Daleko snazší je navodit orální toleranci u těch antigenů, vůči kterým není jedinec ještě sensitizován. Oba předpoklady neplatí u nemocných s RS. Zde se jedná o dospělé osoby, u kterých již patologický proces probíhá. Zřejmě proto jsou výsledky dosavadních klinických studií, kdy byla indukována orální tolerace podáním MBP, málo úspěšné. Bude zapotřebí optimalizovat výběr tolerizujících látek, jejich dávkování i časování. Velmi netrpělivě se očekávají výsledky klinických studií, ve kterých je podáván GA orálně. Podle teoretického předpokladu by se mělo jednat o účinný postup (10).

Za velmi nadějný lze považovat výsledky, kterých zatím bylo dosaženo především v modelu EAE. V těchto poku-

sech se aplikují imunogeni peptidy, které byly získány z autoantigenů. Uvedené peptidy mají epitopy, kterými interagují s CDR (Complementarity Determining Region) oblastmi TcR změněny tak, že nezpůsobují stimulaci autoreaktivních T lymfocytů. Naopak tyto tzv. altered peptide ligands (APL) stimulují anergii autoreaktivních T lymfocytů. Navíc indukují mechanismus tzv. bystander suppression, kdy se zmnožují TH2-like buňky, reagující s nativními autogeny a tlumící patogenetickou reaktivitu TH1 subsetu. Postupy využívající APL jsou již zkoušeny v klinických experimentech. Nelze zapomenout na zatím spíše teoretic-

kou možnost, že poškozené tkáně u nemocných s RS budou modulovány působením cytokinů ke zvýšené reparaci či dokonce budou poškozené léze nahrazovány transplantací neuronálních kmenových buněk (14).

V patogenetických mechanismech RS zůstává ještě mnohé k objasnění. Je však nepochybné, že rychlý pokrok molekulové biologie a imunologie dává dobrou naději, že v blízké budoucnosti budou k dispozici klinicky využitelné postupy, které daleko účinněji a s daleko menšími vedlejšími účinky budou schopny tlumit poškozující zánět u nemocných s roztroušenou sklerózou.

Literatura

1. Al-Omaishi J, Bashir R, Gendelman HE. The cellular immunology of multiple sclerosis. *J. Leukoc. Biol.*, 1999; 65: 444–452.
2. Antel JP, Owens T. Immune regulation and CNS autoimmune disease. *J. Neuroimmunol.*, 1999; 100: 181–189.
3. Bacon KB, Harrison JK. Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *J. Neuroimmunol.*, 2000; 104: 92–97.
4. Bennetts BH, Teutsch SM, Buhler MM, et al. The CCR5 deletion mutation fails to protect against multiple sclerosis. *Human Immunol.*, 1997; 58: 52–59.
5. Bogdan Ch. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunol.*, 2001; 2 (10): 907–916.
6. Di Rosa F, Barnaba V. Persisting viruses and chronic inflammation: understanding their relation to autoimmunity. *Immunol. Rev.*, 1998; 164: 17–27.
7. Goodnow ChC. Pathways for self-tolerance and the treatment of autoimmune diseases. *Lancet*, 2001; 357: 2115–2121.
8. Hartung HP, Kieseier BC. The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. *J. Neuroimmunol.*, 2000; 107: 140–147.
9. Martin R, Ruddle NH, Reingold S, et al. T helper cell differentiation in multiple sclerosis and autoimmunity. *Immunol. Today*, 1998; 19 (11): 495–498.
10. Martin R, Stürzebecher CS, McFarland HF. Immunotherapy of multiple sclerosis: Where are we? Where should we go? *Nature Immunol.*, 2001; 2 (9): 785–788.
11. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, et al. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 2000; 343 (13): 938–952.
12. O'Connor KC, Bar-Or A, Hafler DA. The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J. Clin. Immunol.*, 2001; 21 (2): 81–92.
13. Özenci V, Koutenkov M, Huang YM, et al. Multiple sclerosis: levels of interleukin-10-secreting blood mononuclear cells are low in untreated patients but augmented during interferon- β treatment. *Scand. J. Immunol.*, 1999; 49: 554–561.
14. Peakman M, Dayan CM. Antigen-specific immunotherapy for autoimmune disease: fighting fire with fire? *Immunol.*, 2001; 104: 361–366.
15. Schwartz M. T cell mediated neuroprotection is a physiological response to central nervous system insults. *J. Mol. Med.*, 2001; 78: 594–597.
16. Steinman L. Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nature Immunol.*, 2001; 2(9): 762–764.
17. Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacol.*, 2001; 1: 625–635.
18. Teleshova N, Bao W, Kivisäkk P, et al. Elevated CD40 ligand expressing blood T-cell levels in multiple sclerosis are reversed by interferon-beta treatment. *Scand. J. Immunol.*, 2000; 51: 312–320.
19. Wucherpfennig KW. Structural basis of molecular mimicry. *J. Autoimmunity*, 2001; 16: 293–302.
20. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 2000; 407: 802–809.