



EVROPSKÁ UNIE



evropský
sociální
fond v ČR



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

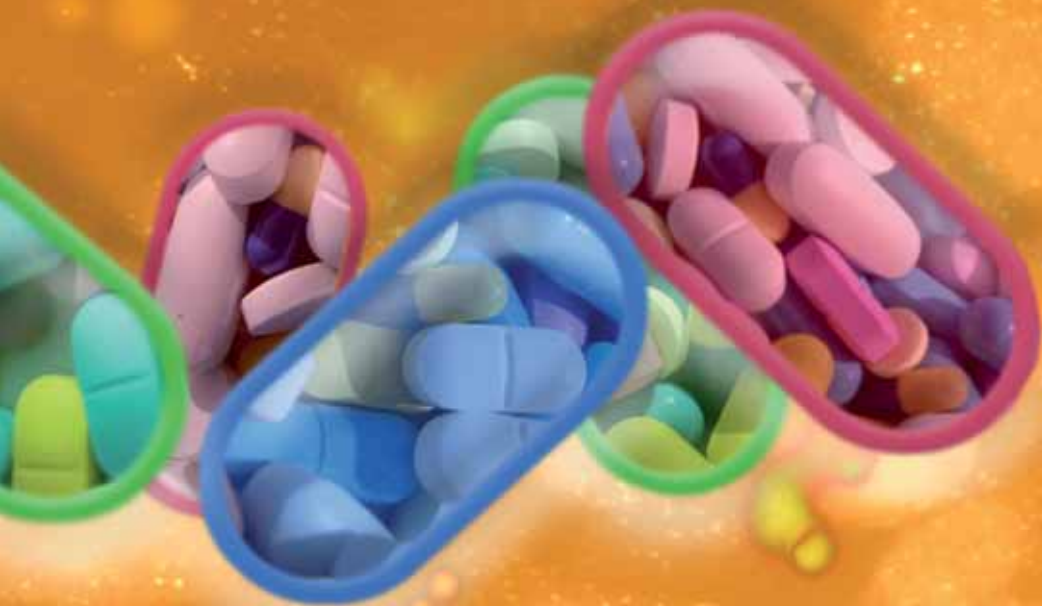


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



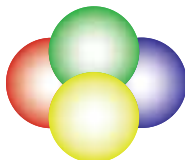
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Imunologie a imunomodulační terapie



Aleš Vrána
Ivana Fellnerová
Jarmila Vránová

*Milý čtenáři,
publikace, kterou držíte v ruce je součástí olomouckého cyklu vzdělávacích materiálů
vydávaných k projektu Od fyziologie k medicíně – integrace vědy, výzkumu odborného
vzdělávání a praxe. Projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním
rozpočtem České republiky.*



Od fyziologie k medicíně

– integrace vědy, výzkumu odborného vzdělávání a praxe

CZ.1.07/2.3.00/09.0219
<http://cit.vfu.cz/fyziolmed>



Trvání projektu:

červen 2009 – květen 2012

Řešitelská pracoviště:

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Univerzita Palackého v Olomouci

Cíl projektu:

Umožnit nadstandardní vzdělávání v oblasti fyziologie
a biomedicínských aplikací.

Projektová etapa 2011 region OLOMOUC



3. Téma

Imunologie a imunomodulační terapie

RNDr. Aleš Vrána • ales.vrana@tevapharm.cz

RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D. • fellneri@hotmail.com

RNDr. Jarmila Vránová • jarmila.vranova@ivax-cz.com

Místo konání semináře:

Teva Czech Industries s.r.o. výrobní závod Opava,
Ostravská 29, č.p. 305, Opava-Komárov, PSC 747 70
<http://www.teva.cz/kontakty/teva-v-cr.htm>

Termíny konání semináře:

15. dubna 2011

16. dubna 2011

Autor designu obálky a grafických úprav:

Vlastislav BIČ, Katedra zoologie, PřF UP Olomouc

Obrázky:

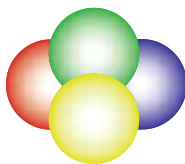
Pokud není uveden zdroj, jsou autory obrázků ©Ivana Fellnerová a Lukáš Hlaváček

OBSAH:

1. ÚVOD	5
1.1. Projekt od fyziologie k medicíně	6
1.2. Projektové diskusní semináře	7
1.3. Ohlédnutí za seminářem Kmenové buňky	8
1.4. Úvod k tématu imunologie a imunomodulační terapie	11
2. IMUNITNÍ SYSTÉM – OBECNÝ ÚVOD	13
2.1. Charakteristika a základní terminologie IS	14
2.1.1. Antigen a jeho stimulační účinky	14
2.1.2. Nespecifická imunitní odpověď	15
2.1.3. Specifická imunitní odpověď	16
2.2. Složky imunitního systému	17
2.2.1. Orgány a tkáně imunitního systému	17
2.2.2. Buňky imunitního systému	18
2.2.3. Molekuly imunitního systému	20
2.3. B lymfocyty a látková imunita	21
2.3.1. Obecné principy aktivace B lymfocytů	22
2.3.2. Protilátky (imunoglobuliny, Ig)	23
2.3.3. Vývoj B lymfocytů a časová posloupnost aktivačních dějů	26
2.4. T lymfocyty a buněčná imunita	28
2.4.1. Prezentace antigenu T lymfocytům	28
2.4.2. Subpopulace T lymfocytů	31
2.5. Základy transplantační imunologie	33
2.5.1. Základní terminologie	33
2.5.2. Éra transplantační chirurgie	33
2.5.3. Aloimunitní reakce a histokompatibilní systém	34
3. POLYKLONÁLNÍ A MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY	37
3.1. Polyklonální protilátky a jejich příprava	38
3.1.1. Všeobecná charakteristika polyklonálních protilátek	38
3.1.2. Příprava polyklonálních protilátek	38
3.2. Monoklonální protilátky a jejich příprava	39
3.2.1. Všeobecná charakteristika monoklonálních protilátek	39
3.2.2. Klasické hybridomové technologie přípravy monoklonálních protilátek	40
3.2.3. Rekombinantní monoklonální protilátky	41
3.3. Humanizace protilátek	42
3.3.1. Chimérické protilátky	43
3.3.2. Humanizované protilátky (CDR-grafted)	43
3.3.3. Plně lidské protilátky	43
3.4. Názvosloví monoklonálních protilátek	44
3.5. Hromadná výroba protilátek	45
3.5.1. Kultivační média	46
3.5.2. Práce s produkčními kmeny pro výrobu protilátek	46
3.5.3. Novější postupy ve fermentačních technologiích savých buněk	47
3.5.4. Kritické kroky výrobních procesů	50
4. IMUNOMODULAČNÍ TERAPIE	51
4.1. Imunosupresivní léčba	52
4.1.1. Tři režimy imunosupresivní léčby	52
4.1.2. Typy imunosupresiv	52
4.1.3. Nové přístupy k imunosupresi	54
4.2. Biomedicína a personalizovaná léčba	57
4.2.1. Co je to biologická léčba?	57
4.2.2. Charakteristika látek používaných v biologické léčbě	58
4.2.3. Základní mechanismy účinku bioléciv	59
4.2.4. Přehled bioléciv podle oblasti terapeutického využití	61
4.2.5. Nežádoucí účinky biologické léčby	65
4.2.6. Centra biologické léčby	65
4.3. Registrace lécv se zaměřením na přípravky obsahující monoklonální protilátky	66
4.3.1. Legislativa	66
4.3.2. Registrační dokumentace	67
4.3.3. Příklad klinického hodnocení nové monoklonální protilátky a poučení z chyb	69

3. téma

Imunologie a imunomodulační terapie



1. ÚVOD

Projekt Od fyziologie k medicíně
Projektové diskusní semináře
Ohlédnutí za seminářem Kmenové buňky
Předmluva k tématu Imunologie a imunomodulační terapie

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ
Integrace vědy, výzkumu, odborného, vzdělávání a praxe



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

1.1. Projekt Od fyziologie k medicíně

Projekt Od fyziologie k medicíně – integrace vědy, výzkumu, vzdělání a praxe je vzdělávací projekt, jehož cílem je nadstandardní vzdělávání v oblasti fyziologie a biomedicínských aplikací (<http://cit.vfu.cz/fyziolmed/>). Vzdělávání je vedeno jak v rovině teoretické (prezentace aktuálních poznatků v kontextu vzájemných souvislostí), tak v rovině praktické (experimentální praxe, metody efektivního zpracování dat, aplikace výsledků výzkumu, exkurze).

PRO KOHO je projekt určen?

- 1) **Akademické pracovníky VŠ** (školitele VŠ studentů na úrovni Bc., Mgr. a Ph.D.)
 - 2) **Studenty VŠ** (Bc., Mgr. a Ph.D.)
 - 3) **Studenty a pedagogy SŠ** (s hlubším zájmem o fyziologii a medicínu)
- Podmínkou účasti v projektu byla registrace prostřednictvím projektových webových stránek. (registrace byla uzavřena 31.12.2010)

CO projekt nabízí?

- 1) Odborné vzdělávání formou **diskusních seminářů (viz dále)** se zaměřením na aktuální fyziologicko-lékařskou problematiku a témata oceněná Nobelovými cenami za Fyziologii a medicínu
- 2) **Exkurze** na pracoviště vědy a výzkumu, **aktivní zapojení do experimentů**
- 3) Získání zkušeností s **atraktivní prezentací vlastních výsledků na odborných akcích** (konferencích)
- 4) Seznámení s možnostmi **mezinárodních kontaktů a uplatnění na světovém vědecko-výzkumném fóru**
- 5) Tištěné a interaktivní **publikace** k jednotlivým seminářům



Obr. 1.1. - Časový harmonogram projektu Od fyziologie k medicíně

1.2. Projektové diskusní semináře

Jednotlivé semináře probíhají v neformální přátelské atmosféře. Skládají se z části teoretické a navazující části praktické, kdy mají účastníci možnost uplatnit získané teoretické poznatky přímo v praxi.

První etapa projektových seminářů již úspěšně proběhla v regionu Brno v průběhu roku 2010. Byla garantována Veterinární a farmaceutickou univerzitou v Brně ve spolupráci s Ústavem živočišné fyziologie a genetiky AV ČR a řadou externích spolupracovníků.

V návaznosti na první cyklus projektových seminářů realizovaných v roce 2010 v regionu Brno, probíhá druhý cyklus seminářů v regionu Olomouc (únor-prosinec 2011). Podobně jako v brněnské etapě, probíhají olomoucké semináře ve dvou cyklech: jarním (4 semináře) a podzimním (3 semináře).

Olomoucké semináře jsou zaštiťovány odborníky z Přírodovědecké a Lékařské fakulty Uni-

verzity Palackého ve spolupráci s řadou externích spolupracovníků (vědci, lékaři, pedagogové i pracovníci biomedicínických institucí a provozů).

Všechny projektové materiály vydané pro účastníky k seminářům v regionu Brno, získají v tištěné podobě také účastníci seminářů v regionu Olomouc a naopak. Pro ostatní zájemce jsou materiály v elektronické podobě spolu s dalšími informacemi o projektu k dispozici na projektových webových stránkách: <http://cit.vfu.cz/fyziolmed/>

Časový harmonogram olomouckých seminářů je znázorněn na obrázku 1.2.a,b



Jaro 2012

Společná závěrečná konference všech účastníků projektu (brněnské i olomoucké skupiny registrovaných)

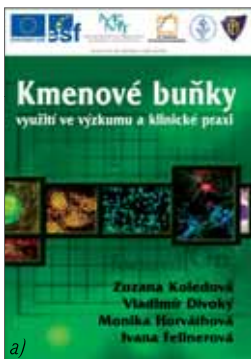
Obr. 1.2. - Časový harmonogram jarního (a) a podzimního (b) cyklu projektových seminářů v regionu Olomouc

1.3. Ohlédnutí za seminářem Kmenové buňky

V únoru 2011 proběhl v čtyřech termínech (18., 25., 26. a 27.2.) první projektový seminář v regionu Olomouc. Teoretická část proběhla v Ústavu biologie LF UP v Olomouci; praktická část proběhla jednak v laboratořích Ústavu biologie a dále v Centru pro práci s laboratorními zvířaty LF UP v Olomouci. Seminář vedl doc. V. Divoký spolu s dalšími lektory (Mgr. M. Horváthová, MVDr. D. Doležal a Ing. L. Piterková). Průběh seminářů je zachycen na obr. 1.3. – 1.4

Obr. 1.3. Seminář Kmenové buňky 18.2.2011

Titul doprovodné publikace (a); Výklad doc.V. Divokého-úvodní přednáška o kmenových buňkách (b);



Výklad MUDr. D. Doležala o zásadách intravenózních aplikací látek u myši (c); Praktická část výkladu MUDr. D. Doležal v Centru pro práci s laboratorními zvířaty-představení běžně používaných farmak (d)



Výklad zásad manipulace s laboratorními zvířaty-postup při fixaci laboratorní myši (e); Intravenózní aplikace do ocasní artérie myši umístěné ve fixační kleci (f)



Detail fixační klece používané při nitrožilních aplikacích nebo odběru krve z ocasní artérie myši (g); Příprava k pozorování kultur kmenových buněk pomocí světelného mikroskopu a zjišťování vitality buněčných kultur (h)

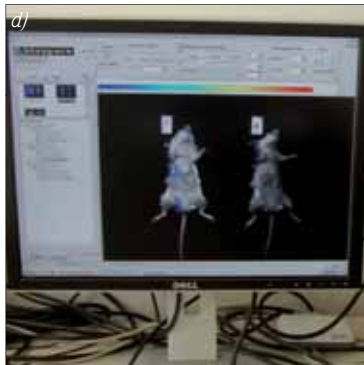
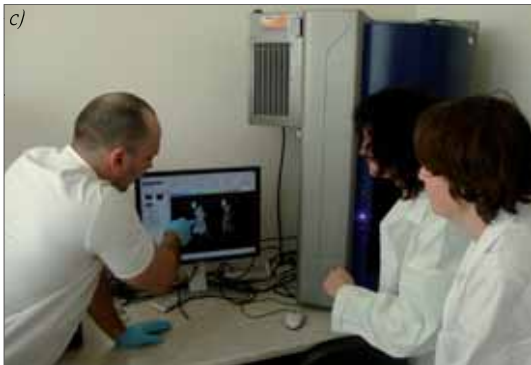


Obr. 1.4. Seminář Kmenové buňky 25.2.2011

Výklad MUDr. D.Doležala k anestezii laboratorních zvířat (a); Demonstrace tzv. metabolické klece určené k dávkování potravy, tekutin popř. experimentálně testovaných látek u myši (b).



Výklad MUDr. D.Doležala: Photon Imager – Bioluminescence myšího karcinomu mléčné žlázy po ortoptické transplantaci (c); Digitální zobrazení nádorového růstu: experimentální (vlevo) a kontrolní (vpravo) zvíře (d)



Pozorování růstu suspenzní buněčné linie v kultivační nádobě pomocí invertovaného mikroskopu. (e); Práce se světelným mikroskopem při pozorování buněčných kultur. (f)



Vstup na pracoviště Ústavu pro práci s laboratorními zvířaty LF UPOL (g); Laminární box pro manipulaci a jednoduché zákroky se zvířaty (odběry, aplikace). (h)



1.4. Úvod k tématu Imunologie a imunomodulační terapie

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům v těle. Obrovská diverzita imunitních buněk, resp. molekul na jedné straně, zajišťuje ochranu člověka proti širokému spektru infekčních patogenů, na druhé straně však komplikuje řadu léčebných zákroků (např. transplantací).

Výzkum v imunologii je směřován k maximálnímu poznání všech zákonitostí, které imunitní systém k obraně těla používá, a to jak rozpoznávacích, eliminačních i tolerančních procesů.

Nové poznatky získané v základním výzkumu dnes nacházejí stále širší uplatnění v moderní terapii např. biologické léčbě, boji proti nádorovým onemocněním, popř. léčbě zvyšujícího se počtu autoimunitních onemocnění a různých typů alergií...

Předkládaná publikace podává stručný přehled základních informací o imunitním systému. S ohledem na praktickou část semináře v provozu výroby cytostatik a imunosupresiv, je teoretický výklad zaměřením na problematiku specifické imunitní odpovědi a prezentace vybraných postupů imunomodulační terapie.

Praktická část semináře proběhne ve farmaceutickém výrobním závodě Teva Czech Industries s.r.o. Opava-Komárov (*obr. 1.5.*), dříve známém pod názvem Galena, jejíž historie sahá až do r. 1883. V r. 2006 se společnost stala součástí nadnárodní skupiny Teva se sídlem v Izraeli a je v současné době jednou z nejvýznamnějších domácích farmaceutických společností. Firma klade velký důraz na kontinuální celoživotní vzdělávání a rozvoj vzdělávacích aktivit ve spolupráci s různými odbornými společnostmi.

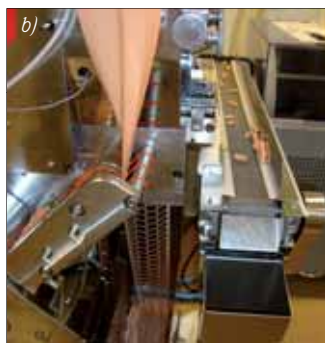


Obr. 1.5. - Letecký pohled na farmaceutický závod Teva Czech Industries s.r.o. Opava-Komárov

Opavský závod má ve svém širokém portfoliu generické léčivé přípravky – především antiastmatika, cytostatika, imunosupresiva, hypolipidemika, antihypertenziva aj. (v podobě tablet, tobolek i kapalných lékových forem), dále také volně prodejné léky (OTC), účinné farmaceutické látky (API) a rostlinné extrakty. Produkty splňují uznávané standardy kvality a jsou exportovány do řady zemí celého světa, včetně USA, Austrálie a západní Evropy.

Účastníci dubnového semináře Imunologie a imunomodulační léčba navštíví dva provozy:

- Výrobu měkkých želatinových tobolek (imunosupresivum Cyklosporin) – **obr. 1.6.**
- Závod NOSD (New Oral Solid Dosage Plant) – nejnovější výrobní část opavského závodu, který byl otevřen v r. 2010. Závod NOSD byl vybudován s využitím nejnovějších technologií a vyrábí léky především pro americký trh. (**obr. 1.7.**)



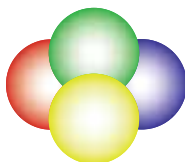
obr. 1.6. - Blistrovací linka – balení léčiva do primárního obalu (a), výroba měkké želatinové tobolky – formování želatinového obalu a jeho plnění léčivem (b)



Obr. 1.7. - Závod NOSD – nejnovější výrobní část opavské pobočky Teva (a), atraktivní prostory vstupní haly, kde se mimo jiné nachází moderní jídelna pro zaměstnance. (b)

3. téma

Imunologie a imunomodulační terapie



2. IMUNITNÍ SYSTÉM – OBECNÝ ÚVOD

Charakteristika a základní terminologie IS

Složky imunitního systému

B lymfocyty a látková imunita (protilátky)

T lymfocyty a buněčná imunita

Základy transplantační imunologie

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ

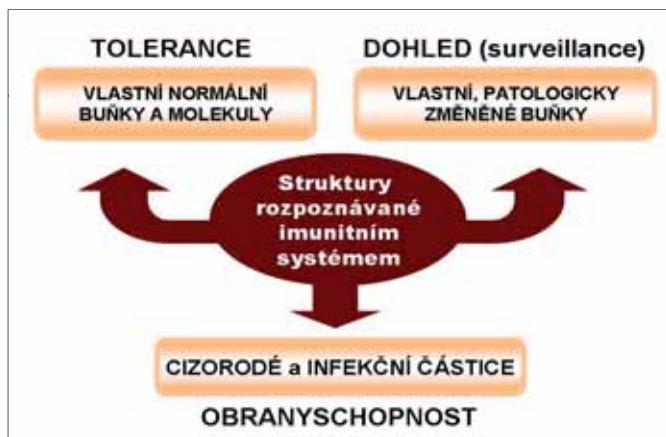
Integrace vědy, výzkumu, odborného, vzdělávání a praxe



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

2.1. Charakteristika a základní terminologie IS

Imunitní systém (IS) patří k základním homeostatickým mechanismům¹ v těle. Správně fungující IS chrání organismus před cizorodými a infekčními částicemi a odstraňuje vlastní odumřelé, zestárlé nebo poškozené buňky vč. nádorových (*obr. 2.1*). Základní vlastností správně fungujícího imunitního systému je schopnost rozeznat „vlastní“ od „cizího“. To je umožněno především extrémním polymorfismem² imunitních molekul, které jsou schopny od sebe rozlišit částice na základě i velmi malých rozdílů a následně s nimi specificky reagovat.



Obr. 2.1. - Tři skupiny částic rozpoznávaných IS. Identifikaci a eliminaci infekčních částic nazýváme obranyschopnost; vlastní nepoškozené struktury jsou IS tolerovány; identifikaci a eliminaci vlastních poškozených buněk a molekul označujeme jako imunitní dohled

2.1.1. Antigen a jeho stimulační účinky pro IS

Makromolekulární strukturu (patogen, buňka, molekula), která je imunitním systémem rozpoznána a která stimuluje komplexní specifickou imunitní odpověď, označujeme jako **antigen** (Ag), nebo také **imunogenní látka** (imunogen). Aby mohla být částice považována za antigen, musí splňovat určité chemické, fyzikální a biologické vlastnosti:

- **Liší se** svým složením od složení hostitelského organismu
- **Je rozpoznávána** povrchovými receptory buněk imunitního systému
- Jde o komplexní makromolekuly s **dostatečnou velikostí** (zpravidla molekulová hmotnost > 5000 Da)

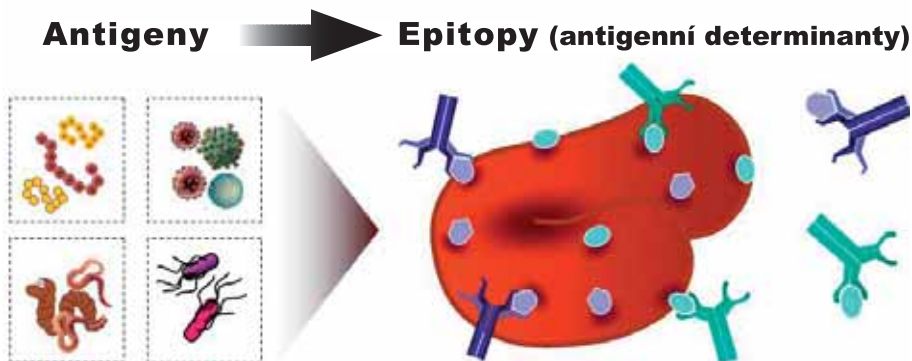
Z chemického hlediska jsou antigeny nejčastěji proteiny, lipoproteiny, lipopolysacharidy nebo nukleoproteiny.

Nízkomolekulární látky, které se váží na specifické receptory resp. protilátky, ale nejsou dostatečně velké, aby stimulovaly komplexní imunitní odpověď, nazýváme **hapteny**.

¹ udržují, resp. obnovují stálost a rovnováhu vnitřního prostředí

² poly= mnoho, morpho=tvar; buňky i molekuly IS se vyskytují v mnoha variantách

Část molekuly antigenu, na kterou se bezprostředně váže receptor, resp. protilátka IS, nazýváme **antigenní determinant (epitop)**. Jedna antigenní částice má zpravidla více epitopů (*obr.2.2.*)



Obr. 2.2. - Vztah Antigen-epitop. Jedna antigenní částice má více epitopů (zelený a fialový), z nichž každý je rozpoznáván jiným buněčným klonem, resp. protilátkou.

K tomu, aby byla iniciována komplexní imunitní reakce však nestačí jen jednoduchá vazba antigenu s receptorem, ale je nutné, aby byly současně aktivovány další **kostimulační vazby**. Tuto podmínku právě nesplňují nízkomolekulární hapteny, proto je označujeme jako nefunkční (nekompletní) antigeny.

Obrana organismu je zajišťována dvěma základními imunitními mechanismy, které se liší především rychlostí aktivace a specifičností zásahu. *Obr.2.3.*

2.1.2. Nespecifická imunitní odpověď

Je **prvotní časnou reakcí organismu** na přítomnost patogena nebo jiné nežádoucí částice. Označujeme ji také jako **vrozenou**, protože se její kvalita a účinnost během života nemění. Buňky nespecifické imunity jsou aktivovány především chemickými strukturami, které se nevyskytují u vlastních buněk, ale jsou společné skupinám mikroorganismů.

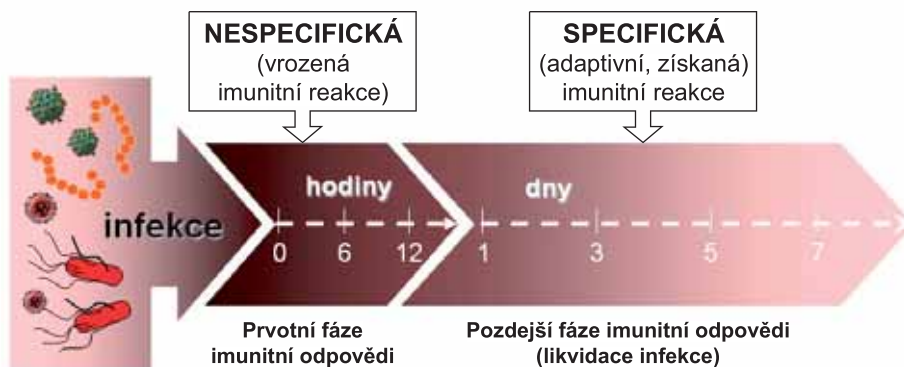
Typickým projevem nespecifické imunity je **zánět** – komplexní soubor reakcí ve vaskularizované tkáni, zajišťující v místě poškození maximální prokrvení, přísun imunocytů a dalších chemických regulátorů, které napomáhají zhojení. Nespecifická imunitní odpověď je realizována na úrovni orgánové, buněčné i molekulární. Uplatňují se především:

- **Fyzikální a chemické bariéry** organismu (kůže, řasinkové epitely, acidita žaludečních šťáv, antibakteriální složky slin, slz atd.)
- **Aktivace fagocytujících buněk** (dendritické b., neutrofilů a makrofágy)
- **Aktivace sérových proteinů komplementu** (viz dále)

2.1.3. Specifická imunitní odpověď

Bezprostředně navazuje na prvotní nespecifickou fázi obrany organismu. Je zajišťována specializovanými druhy bílých krvinek - B a T lymfocyty, které jsou aktivovány vysoce specifickou vazbou svých membránových receptorů s konkrétním antigenem (resp. epitopem). Plná aktivace adaptivních imunitních procesů trvá déle, protože je spojena s tzv. **klonální expanzí**³ konkrétních lymfocytárních klonů. Označení „adaptivní“ (získaná) se pro tento typ imunity používá proto, že se během života jedince vytváří náhodně stále nové varianty buněčných receptorů v komplikovaných procesech na úrovni DNA (např. přeskupování genů aj. – studuje imunogenetika).

B lymfocyty představují látkovou (humorální) složku adaptivní imunitní odpovědi; na setkání s antigenem reagují produkcí tzv. imunoglobulinů (protilátek). T lymfocyty představují buněčnou složku specifické imunity. Po stimulaci antigenem produkují chemické látky (cytokiny), jež ovlivňují chování řady dalších imunitních buněk směřující k eliminaci stimulačního antigenu. (více v samostatných kapitolách 2.3 a 2.4.)



Obr. 2.3. - Časová posloupnost vrozených (nespecifických) a adaptivních (specifických) obranných reakcí organismu.

Imunologická paměť

Zralé lymfocyty, které se dosud neseťkaly s antigenem, označujeme termínem **naivní lymfocyty**. Po vazbě antigenu s naivním lymfocyt, dochází k jeho aktivaci, proliferaci a vzniku **efektorových buněk**. Současně vzniká menší počet tzv. paměťových lymfocytů, které jsou schopny při opakovaném setkání s již známým antigenem produkovat efektorové buňky a protilátky mnohem rychleji a efektivněji, než při prvním setkání. Paměťové lymfocyty se v organismu uchovávají dlouhodobě z doby prvotního setkání s daným antigenem. Proces nazýváme **imunologickou pamětí** adaptivního imunitního systému.

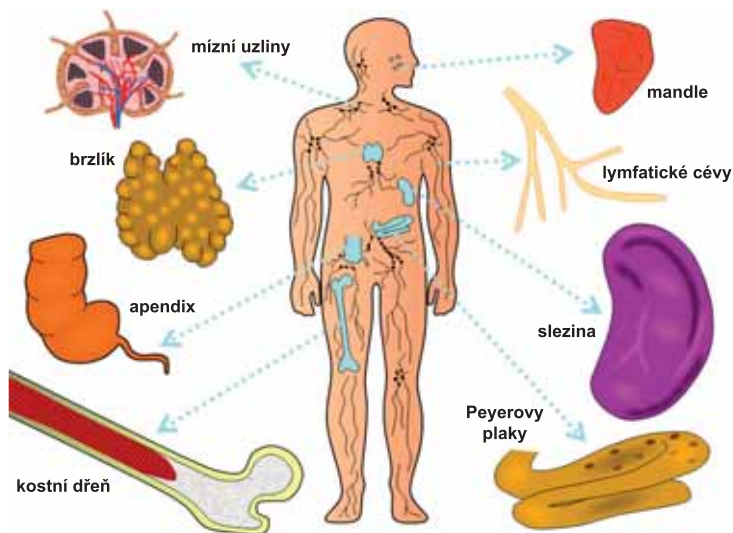
³ proces intenzivní proliferace (dělení) konkrétního klonu lymfocytu jako odpověď na specifické rozpoznání antigenu; pomnožený klon pak může ve velkém počtu efektivně zasáhnout při eliminaci antigenu

2.2. Složky imunitního systému

Ke složkám IS zahrnujeme struktury na úrovni orgánové, tkáňové, buněčné i molekulární. Imunitní systém je tvořen soustavou orgánů, tkání, buněk a celého spektra specifických molekul vázaných buď na membránu imuncytů, nebo volně cirkulujících v tělních tekutinách resp. tkáních.

2.2.1. Orgány a tkáně imunitního systému

Protože se většina tkání a orgánů imunitního systému podílí na růstu, vývoji, zrání či eliminaci lymfocytů, nazýváme je také jako lymfatické orgány (*obr. 2.4.*).



Obr. 2.4. - Přehled primárních a sekundárních lymfatických orgánů

Primární (centrální) lymfatické orgány jsou místem tvorby a dozrávání imunitních buněk (imuncytů):

- **Červená kostní dřeň** produkuje z tzv. hemopoetických kmenových buněk všechny krevní elementy vč. imuncytů (hemopoéza⁴) – *obr. 2.5.*
- **Brzlík** (thymus), uložený za sternem v dolní části krku, je místem dozrávání T lymfocytů a produkce lymfopoetických hormonů thymozinu a thymopoetinu

Sekundární (periferní) lymfatické orgány zprostředkovávají kontakt imuncytů s cizorodými částicemi a zajišťují transport a vhodné prostředí pro imuncytů

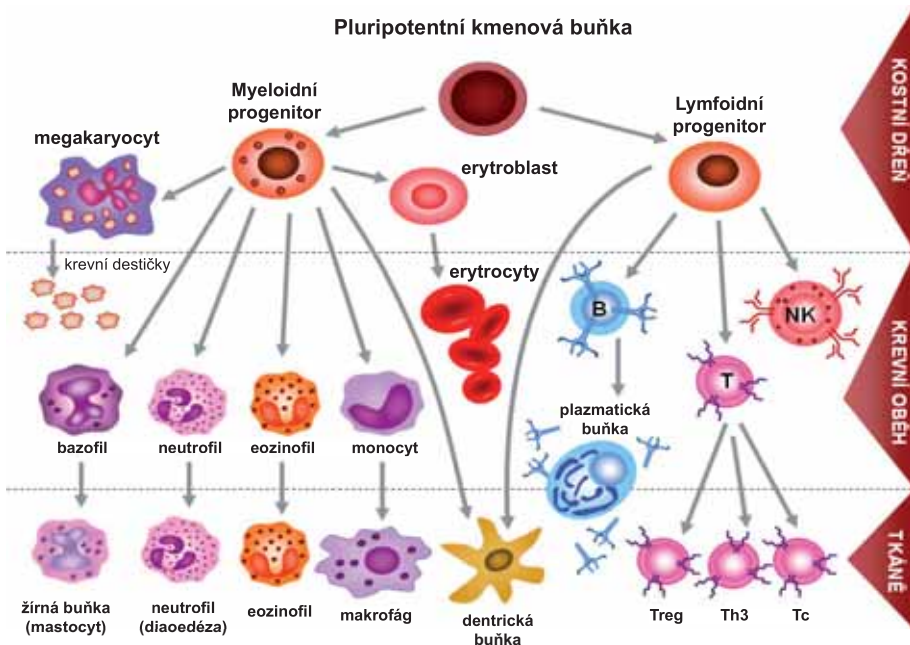
- **Lymfatické** (mizní) cévy jsou slepě končící cévy, které odvádí tkáňový mok (vzniklý filtrací z krevních vlásečnic) zpět do krve. Díky vysoké propustnosti svých stěn umožňují vstup virů, bakteriím popř. nádorovým buňkám.

⁴ v prenatalním období probíhá hemopoéza v játrech

- **Lymfatické uzliny** jsou orgány fazolovitého tvaru, filtrující sběrné lymfatické cévy. Zachycují antigeny z lymfy a brání jejich rozptýlení. Zprostředkují kontakt lymfocytů s antigenem a iniciují tak specifickou imunitní reakci (viz dále).
- **Slezina** je nepárový, na lymfocyty bohatý orgán umístěný v dutině břišní, v blízkosti žaludku. Je bohatě zásobená krví, kterou filtruje. Vychytává a likviduje poškozené a odumřelé červené krvinky; dále zachycuje z krve potenciální antigeny a iniciuje specifickou imunitní odpověď.
- **Mukózní lymfatická tkáň** dýchací (MALT) a trávicí (GALT) sliznice
- **Peyerovy plaky**: organizované shluky lymfatických uzlin ve střevě

2.2.2. Buňky imunitního systému

Imunitních reakcí se účastní celá řada buněk, tzv. imunocytů. Všechny vznikají v červené kostní dřeni z pluripotentní kmenové buňky, která se dělí na unipotentní kmenové buňky (tzv. myeloidní a lymfoidní progenitory) - **obr. 2.5**. Z hlediska místa výskytu můžeme imunocyty rozdělit na buňky cirkulující v krvi nebo v lymfatických cévách, buňky nacházející se v tkáních nebo lymfatických orgánech, popř. migrující mezi těmito prostředím. K buňkám cirkulujícím v krvi patří všechny bílé krvinky (leukocyty), přičemž některé z nich migrují mezi krví a tkáněmi (hl. neutrofilů) popř. se část populace vyskytuje jak v cirkulaci, tak v lymfatických orgánech (T a B lymfocyty). K typickým tkáňovým buňkám patří dendritické buňky a makrofágy.



Obr. 2.5. - Přehled hematopoézy

⁵ dává vznik jedné vývojové řadě krevních buněk

Morfologická a funkční klasifikace imunocytů se může zdát komplikovaná, protože řada buněk má více podtypů nebo naopak jeden druh buněk má více vývojových stádií a názvů. Jednotlivé funkční a morfologické kategorie se navíc často překrývají.

Klasické **morfologické členění** imunocytů:

- **Granulocyty:** buňky obsahující segmentované jádro a v cytoplasmě tzv. granula barvitelná neutrofilními, eozinofilními nebo bazofilními barvivy; podle toho jednotlivé granulocyty označujeme jako **neutrofilly, eozinofily a bazofily**. Granulocyty se účastní především první fáze nespecifické imunity. Jejich granula obsahují látky rozvíjející zánětlivou reakci (např. histamin)
- **Agranulocyty:** buňky s velkým oválným jádrem a cytoplazmou bez granula. Patří sem **monocyty** (nespecifická imunitní reakce) a **B a T lymfocyty** (typičtí představitelé specifické imunitní reakce)- podrobněji v samostatných kapitolách **2.3. a 2.4.**

Z hlediska funkce můžeme rozlišit následující hlavní skupiny imunocytů:

- Fagocyty: buňky schopné selektivně fagocytovat nežádoucí částice. Typickými fagocyty jsou **neutrofilly, dendritické buňky a makrofágy**
- **Cytotoxické buňky:** jedná se o buňky schopné likvidovat jiné buňky. Patří sem především **cytotoxické T lymfocyty, NK buňky a eozinofily**.
- **Schopnost prezentovat antigen:** tuto schopnost mají tzv. profesionální fagocyty, především **dendritické buňky a makrofágy**. Pohlcené antigenní částice jsou uvnitř fagocytu rozštěpeny a jejich fragmenty jsou ve vazbě na MHC molekulu prezentovány na povrch fagocytu. Buňky schopné prezentovat antigen označujeme jako APC (antigen presenting cell) – více viz. *Kapitola 2.4.*

				klasifikace	
	objem, který tvoří v buněčné složce krve (%)	podskupina a synonyma	funkce	morfologicky	funkčně
basofily	V krvi vzácně, více v epitelech kůže plic a trávicího traktu	tkáňové formy = žírné buňky (mastocyty)	Uvolňují histamin, podílejí se na zánětlivých a alergických reakcích	granulocyty	fagocyty cytotoxické b.
neutrofilly	50–70 %	polymorfonukleární leukocyty (PMN)	Fagocytují a ničí bakterie. Odumřelé neutrofilly vytvářejí hnis.		
eozinofily	1–3 %		Fagocytují a ničí cizí částice. Účastní se při likvidaci parazitů a spoluúčastní se alergických reakcí		
monocyty	1–6 %	Monocyty jsou prekurzory tkáňových makrofágů	Fagocytují mikroorganismy ale také odumřelé buňky vlastních tkání. Prezentují antigen	agranulocyty	antigen prezentující buňky cytologické b.
lymfocyty	20–35%, většina však v lymfatických tkáních	T-lymfocyty (cytotoxické b. a pomahači). B-lymfocyty (plazmatické buňky)	Specificky rozpoznávají antigen prezentovaný na povrchu APC. Vytvářejí protilátky		
dendritické buňky	Nevyskytují se volně v krvi, pouze v tkáních	Nazývány také Langerhansovy buňky	Prezentují antigen a tím aktivují lymfocyty		

Obr. 2.6. - Přehled imunocytů, jejich výskytu a funkce.

Každý typ imunitní buňky se vyznačuje typickou kombinací **povrchových membránových proteinů**. Tyto proteiny jsou označovány zkratkou CD, doplněnou číselným kódem⁶ (viz dále)

Přehled imunocytů, jejich výskytu a funkce ukazuje *tab. 2.6*.

2.2.3. Molekuly imunitního systému

V imunitním systému existuje široké spektrum nejrůznějších typů molekul, vázaných buď na membránu imunocytů nebo volně rozpuštěných v krevním séru, popř. dalších tělních tekutinách:

- **Imunoglobuliny (protilátky):** jsou sekretovány plazmatickými buňkami (efektorové B-lymfocyty). Vyskytují se v pěti izotypech, lišících se stavbou i funkcí (*více v samostatné kapitole 2.3.*)
- **Receptory imunitních buněk:** membránové proteiny schopné více nebo méně specificky rozpoznávat různé typy molekul v těle a následně iniciovat příslušnou imunitní odpověď, vedoucí k eliminaci stimulující částice:
 - ◊ **Nespecifické receptory vrozené imunity:** rozpoznávají struktury společné mnoha patogenům. Např. **TLR (Toll like receptor** - evolučně staré receptory rozpoznávající bakteriální lipopolysacharidy, lipoproteiny a flagelin), **manózový receptor** (váže se na bakteriální polysacharidy s terminální manózou), **scavengerové receptory** (tzv. „uklížeči“ – váží poškozené molekuly s volnými radikály)
 - ◊ **Specifické receptory adaptivní imunity:** receptory T a B lymfocytů, rozpoznávající molekuly lišící se i velmi nepatrnými rozdíly (*podrobněji v samostatných kapitolách 2.3. a 2.4.*).
 - ◊ **Koreceptorové molekuly** - jejich aktivace je nutná k iniciaci komplexní imunitní odpovědi.
- **Cytokiny (mediátory):** jsou mediátory, prostřednictvím kterých se imunitní buňky dohodávají. Existuje řada pohledů a snah, jak cytokiny přehledně klasifikovat. Aktuálně je nejčastěji používáno členění na:
 - ◊ **INTERLEUKINY** – heterogenní skupina látek glykopeptidové povahy označovaná zkratkou IL s číselným indexem. Jsou produkovány buňkami specifické i nespecifické imunity. Působí často společně a ovlivňují především různé fáze vývoje lymfocytů a makrofágů.
 - ◊ **INTERFERONY** – peptidické látky s protivirovými účinky např. IFN α , IFN β ,
 - ◊ **RŮSTOVÉ faktory (GF, z ang. growth factor)**– peptidové látky ovlivňující růst a proliferaci různých typů buněk, např. FGF (fibroblast growth f.), EFG (epidermal growth f.), VEGF (vascular endothelial growth f.)
 - ◊ **KOLONIE STIMULUJÍCÍ faktory (CSF, z angl. colony stimulation factor)** – stimulují v kostní dřeni růst a diferenciaci různých typů buněk, např. GM-CSF (růstový faktor stimulující růst granulocytů a makrofágů)
 - ◊ **NEKROTIZUJÍCÍ faktory (TNF, z angl. tumor necrosis factor)** – působí cytotoxicky, protizánětlivě a regulačně (např. TNF α , TNF β)
 - ◊ **CHEMOKINY** – nízkomolekulární peptidy s chemotaktickými účinky

⁶ CD = Cluster of Differentiation, mezinárodní nomenklatura povrchových membránových proteinů imunocytů. Přítomnost dané molekuly se označuje znaménkem +, absence znaménkem -

- **Proteiny komplementu:** Skupina přibližně **30 sérových proteinů** označovaných C1, C2 atd. Proteiny komplementu jsou hlavní látkovou složkou nespecifické imunitní odpovědi. Jsou aktivovány buď přímo vazbou s antigenem nebo prostřednictvím protilátek navázaných na antigen. Proteiny komplementu aktivují řadu imunitních reakcí a dokáží perforaci bakteriální stěny lýzovat bakterii.
- **MHC glykoproteidy**⁷ resp. HLA molekuly⁸. Molekuly exprimované profesionálními fagocyty (APC buňkami) a účastníci se stimulace T lymfocytů (*více v samostatné kapitole 2.4. – T lymfocyty*)
- **Adhézní molekuly** – způsobující vzájemné přilnutí (adhezi) buněk-nasměrování nositelských buněk k cílové tkáni, např. leukocytů k endotelu cév. Patří sem **selektiny** (P-, E- a L-selektiny; zprostředkovávají iniciální adhezi leukocytů k endotelu cév), **integriny** (VLA-váže se na VCAM-1, LFA-zprostředkovává vazbu na endotel přes ICAM-1), **ICAM-1** (intracelulární adhezní molekule – výskyt na epitelu, umožňuje přichycení leukocytů), **PECAM-1** (platelet endotelial cell adhesion molekule – adhezní molekula krevních destiček a endotelu cév).

CD molekuly - mezinárodní klasifikační systém buněk

Většina imunitních molekul má své označení v **mezinárodním klasifikačním systému Cluster of Differentiation (CD)**⁹

Jednotlivé molekuly jsou v tomto systému označovány zkratkou CD a příslušným číselným indexem (dosud bylo definováno cca 300 CD molekul). CD klasifikace je často jedinou možností, jak od sebe můžeme některé morfologicky stejné imunocyty od sebe odlišit. **CD molekuly představují buněčné diferenační markery** (human cell differentiation markers). Příklady CD molekul:

- CD1** - výskyt u dendritických buněk; molekula prezentující nebílkovinné antigeny (lipidy, glykolipidy) T-lymfocytům
- CD4** – koreceptor pro MHC-II na pomocných Th lymfocytech; zároveň poskytuje receptor pro uchycení HIV retroviru
- CD8** - koreceptor pro MHC-I na cytotoxických Tc lymfocytech
- CD25** – výskyt u skupiny regulačních T-lymfocytů (Treg)
- CD28** – koreceptorová molekula u T lymfocytů; realizuje tzv. 2. signál nezbytný k aktivaci T lymfocytů
- CD31** – adhezní molekula PECAM krevních destiček
- CD34** – výskyt u hemopoetických kmenových buněk

2.3. B lymfocyty a látková imunita

B lymfocyty představují humorální (látkovou) složku specifické imunitní odpovědi. Rozpoznávají přímo extracelulární antigen prostřednictvím vysoce specifického receptoru - BCR (**B-Cell Receptor**), který je typickou povrchovou molekulou všech B

⁷ Major Histocompatibility Complex

⁸ Human Leukocyte Antigen

⁹ Klasifikace byla zavedena v r. 1982 v Paříži. Jako nová CD molekula je považována každá povrchová molekula, která je detekována alespoň dvěma protilátkami.

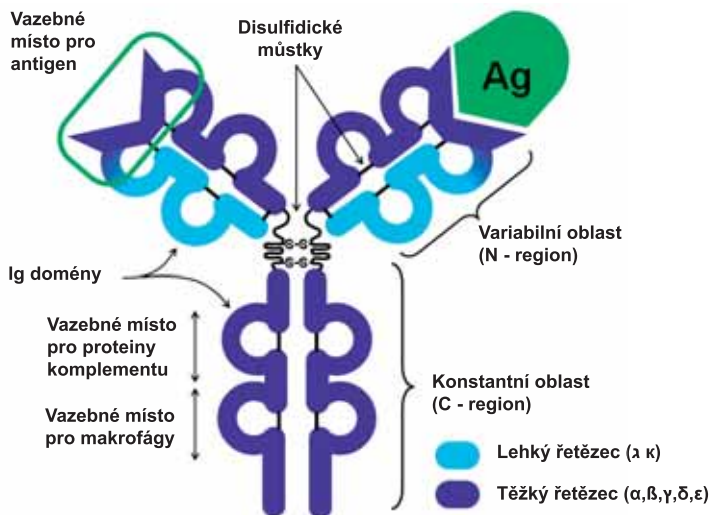
lymfocytů. Na povrchu B-lymfocyty se nachází asi 120 000. BCR, které se vyznačují těmito vlastnostmi:

- Struktura BCR se velmi podobá struktuře protilátky. Odlišnost je pouze v doměně, která kotví BCR do membrány B lymfocyty
- BCR se snadno v buněčné membráně pohybuje (plave) a v případě vazby s antigenem má afinitu přimykát se k ostrůvkům membránových lipidů (doslova „lipidové vory“, lipid rafts)¹⁰
- BCR má tendenci ke zdvojování, ztrojování - k oligomerizaci¹¹

Aktivace BCR zralého B lymfocyty antigenem stimuluje produkci protilátek (imunoglobulinů, Ig). B lymfocyty jsou schopny také prezentovat antigen T lymfocytům, které zpětně modifikují aktivitu prezentujícího B lymfocyty.

2.3.1. Protilátky (imunoglobuliny, Ig)

Molekula protilátky obsahuje 4 peptidové řetězce, dva identické **těžké řetězce** a dva identické **lehké řetězce**. Polypeptidové řetězce jsou navzájem spojené disulfidickými můstky a v prostoru zaujímají tvar písmete „Y“. Na peptidových řetězcích rozlišujeme, kromě variabilní oblasti pro vazbu s antigenem, řadu dalších vazebných míst (např. pro makrofágy, Fc receptor, proteiny komplementu) a domén¹² (*obr. 2.7.*)



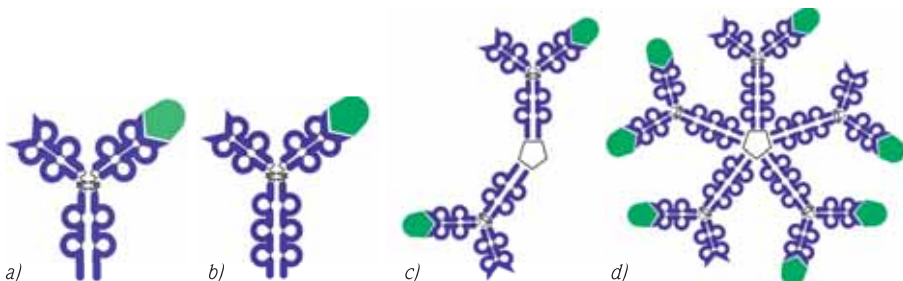
Obr. 2.7. - Struktura molekuly protilátky (imunoglobulinu Ig)

¹⁰ Lipid rafts and B-cell activation, Susan K. Pierce, Nature Reviews Immunology 2, 96-105 (February 2002)

¹¹ Oligomeric organization of the B-cell antigen receptor on resting cells, Jianying Yang & Michael Reth, NATU-RE, 2010, 467; Pages: 465–469

¹² Ig doména je fylogeneticky konzervovaná oblast poprvé definovaná u imunoglobulinů, ale nacházející se u řady dalších molekul. Je tvořena cca 101 AMK v prostoru uspořádaných do βbarelu

Existuje pět základních tříd (izotypů) lidských imunoglobulinů: IgG, IgA, IgM, IgD a IgE (*obr. 2.8.*). U imunoglobulinů IgG se rozlišují 4 podtřídy: IgG1 - IgG4. Všechny protilátky mají obdobnou základní strukturu. Malé rozdíly ve velikosti těžkého řetězce (počtu domén), počtu cystidinových můstků a počtu monomerních „Y“ jednotek, jsou příčinou rozdílných fyzikálně chemických a biologických vlastností.



Obr. 2.8. - Třídy (izotypy) imunoglobulinů: monomer se 2 páry Ig domény v konstantní oblasti :IgG, IgD (a), : monomer se 3 páry Ig domény v konstantní oblasti :IgE (b), dimer:IgA (c), pentamer:IgM (d)

Smícháme-li roztok antigenu s roztokem protilátky v přesném stechiometrickém poměru, vzniká precipitát (sraženina). Studium této interakce je možné zjistit údaje o:

- množství protilátky
- efektivním počtu vazebních míst v molekule antigenu

Stabilitu vzniklých imunokomplexů určují mezimolekulové síly. Jde o stejné síly, které se podílejí na stabilizaci prostorové struktury proteinů a jiných **makromolekul**:

vodíkové vazby, hydrofóbní interakce, elektrostatické síly, disperzní síly a prostorové odpudivé síly. Sílu vazebných interakcí lze charakterizovat dvěma pojmy:

- **AFINITA:** Charakterizuje intenzitu, s jakou se uskutečňuje interakce mezi **vazebným místem protilátky a determinantem antigenu (haptenu)**. Afinita je termodynamickým vyjádřením přímé vazebné energie protilátky pro jeden determinant antigenu. Protože antigeny obsahují několik determinantů, používá se výstižnější pojem avidita.
- **AVIDITA:** Charakterizuje vazebnou energii mezi **komplexním antigenem a protilátkou**. Avidita zahrnuje afinitu, která je dána příspěvkem všech vzniklých vazeb mezi antigenem a protilátkou a další nespecifické faktory, které ovlivňují vazbu mezi antigenem a protilátkou. Uplatňují se tedy nejen specifické interakce mezi vazebným místem protilátky a determinantní skupinou, ale i multivalentní interakce.

2.3.2. Obecné principy aktivace B lymfocytů

Setkání B-lymfocytu s antigenem vyústí ve sled reakcí v závislosti na tom, jak je B-lymfocyt zralý.

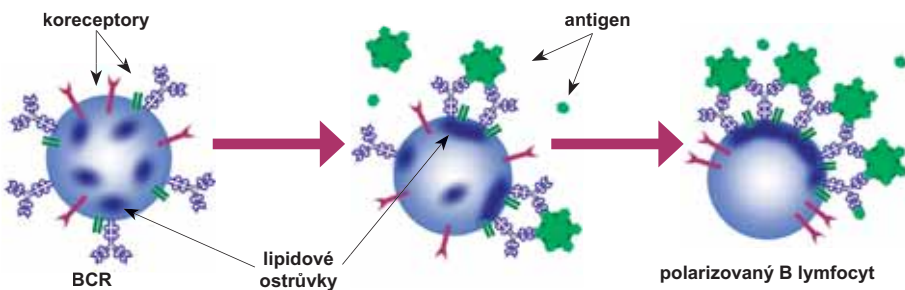
- Vazba antigenu na BCR nezralého B lymfocytu vede k jeho apoptóze.

- Vazba antigenu na BCR anergního¹³ B lymfocytu zůstává bez odpovědi
- Vazba antigenu na BCR zralého lymfocytu vede k jeho aktivaci, spouští kaskádu reakcí, které vyústí v sekreci protilátek

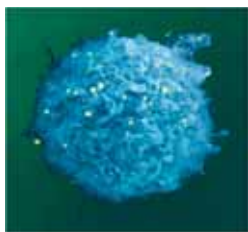
B-lymfocyt může být k tvorbě protilátek stimulován jednak přímo volným antigenem (tzv. antigen na T lymfocytu nezávislý), a jednak za účasti pomocných T-lymfocytů (stimulace antigenem na T lymfocytech závislým)

I. Stimulace B lymfocytu volným antigenem: Polarizace – proliferace – sekrece imunoglobulinů na T lymfocytech nezávislých

U zralého lymfocytu způsobí aktivace BCR volným antigenem nejprve oligomerizaci několika BCR a poté upevnění vazby na lipidové ostrůvky. V ostrůvcích lipidů vzniká vnitrobuněčný signál směrem k cytoskeletu, dochází ke shlukování lipidových ostrůvků k sobě a vytváření tzv. pólu na povrchu B lymfocytu (polarizace) **Obr. 2. 9 a,b**



Obr. 2.9a. - Polarizace-vznik „čepičky“ zralého B-lymfocytu po setkání s antigenem: a - naivní zralý B-lymfocyt; b-oligomerizace BCR, zvětšování lipidových ostrůvků, migrace; c-polarizovaný B- lymfocyt, aktivace.

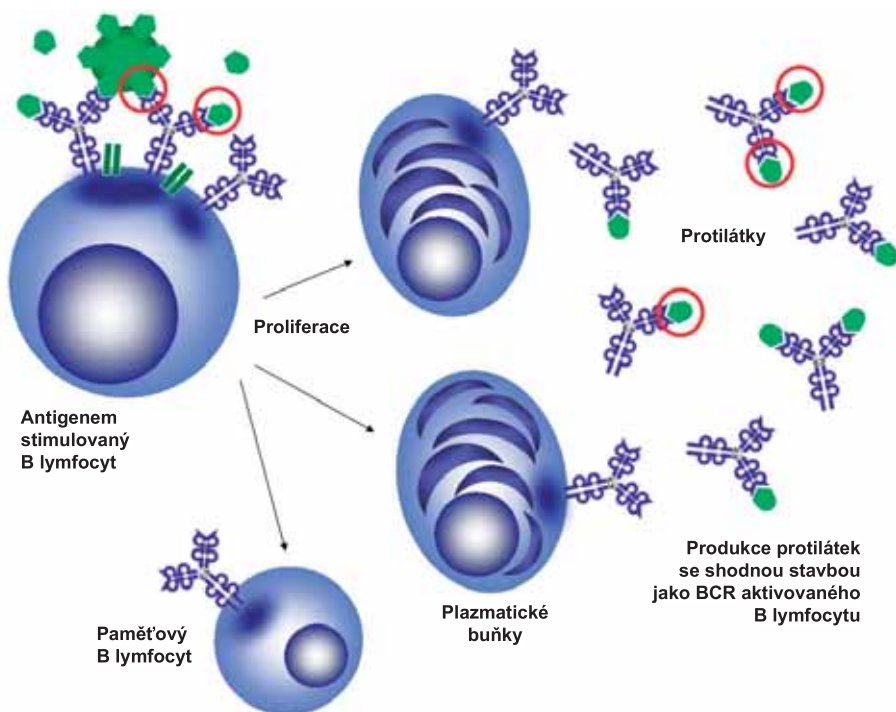


Obr. 2.9b. - Elektronmikroskopický snímek „čepičky“ zralého B-lymfocytu. (Žluté skvrny označují antigen)

Zdroj: Grassmé H.et al. (2001) CD95 Signaling via Ceramide-rich Membrane Rafts. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 20589–96

Polarizovaný B lymfocyt proliferuje (dělí se), a následně produkuje **efektorové plazmatické buňky**. Tyto efektorové buňky žijí jen několik dní a jsou specializované k intenzivní produkci protilátek na T lymfocytech nezávislých. Protilátky mají afinitu k antigenu, který stimuloval jejich produkci. BCR a protilátka se v základních morfolozických rysech shodují. Shoda především ve variabilní oblasti obou molekul zajišťuje schopnost dané protilátky vázat se na stimulující antigen a tím ho „zviditelnit“ ostatním imunocy-
tům, které ho pak mohou účinněji eliminovat (**obr. 2.10.**)

¹³ anergní=nedostatečně stimulovaný; u lymfocytů bývá nedostatečná stimulace způsobena chybějícími kostimulačními signály

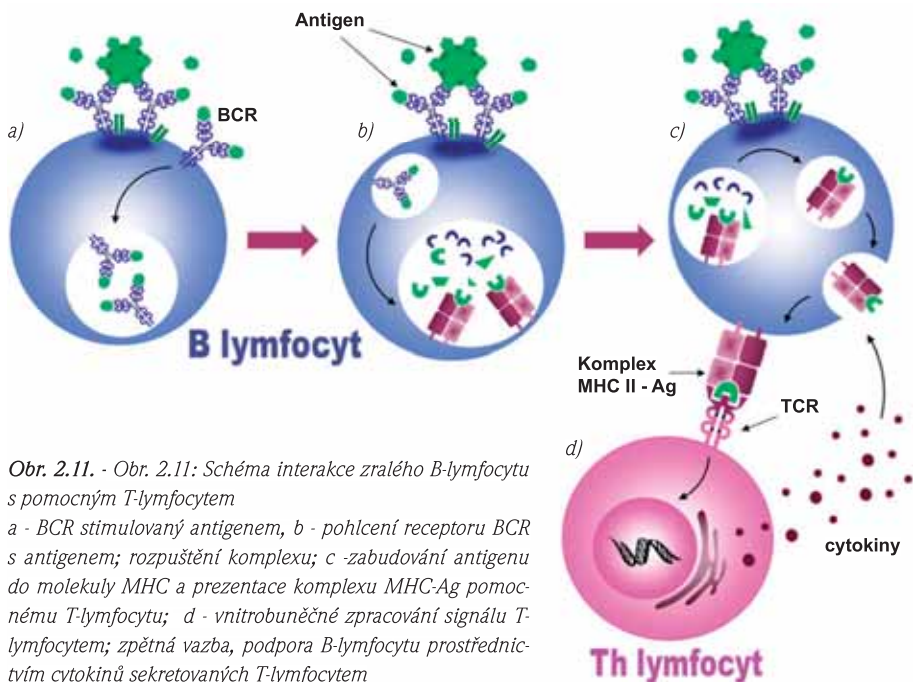


Obr. 2.10. - Obecný princip stimulace B lymfocytu antigenem, následná proliferace, vznik paměťových buněk, plazmatických buněk a sekrece T nezávislých protilátek (Ig) komplementárních s antigenem. Variabilní oblast BCR a Ig je totožná a specificky proto váže stejný antigen (červený kruh). BCR a Ig se od sebe liší jen doménou, která ukotvuje BCR do membrány B lymfocytu.

II. Stimulace B lymfocytu za účasti Th lymfocytu: Pohlcení komplexu BCR-Ag, prezentace Ag T lymfocytům a sekrece Ig na T lymfocytech závislých

Polarizace buňky a sekrece imunoglobulinů však není jedinou odezvou B lymfocytu na stimulaci antigenem.

Vazba antigenu na BCR zralého lymfocytu iniciuje také **pohlcení komplexu BCR-antigen** dovnitř buňky, ke zpracování (rozpuštění) komplexu, navázání antigenu na MHC-proteiny 2. třídy a k **prezentaci antigenu T-lymfocytům (více kap. 2.4.)**. Ty následně prostřednictvím cytokinů modifikují produkci určitého typu cytokinů aktivitu B lymfocytu v závislosti na typu prezentovaného antigenu. Stimulují B lymfocyt k intenzivnější proliferaci, během které dochází k **somatické hypermutaci** selekce těch variant Ig, s největší afinitou ke konkrétnímu antigenu. Zároveň dochází k tzv. izotypovému přesmyku, kdy se mění konstantní oblast Ig a dochází ke změně izotypu Ig. Tento proces dává vznik protilátkám závislým na T lymfocytech (tzv. T závislé Ig) – **obr. 2.11.**



Obr. 2.11. - Obr. 2.11: Schéma interakce zralého B-lymfocyty s pomocným T-lymfocytem
 a - BCR stimulovaný antigenem, b - pohlcení receptoru BCR s antigenem; rozpuštění komplexu; c - zabudování antigenu do molekuly MHC a prezentace komplexu MHC-Ag pomocnému T-lymfocytem; d - vnitrobuněčné zpracování signálu T-lymfocytem; zpětná vazba, podpora B-lymfocyty prostřednictvím cytokinů sekretovaných T-lymfocytem

2.3.3. Vývoj B lymfocytů a časová posloupnost aktivačních dějů

Z lymfoidního progenitoru (unipotentní kmenové buňky) vznikají v kostní dřeni nejprve **pre-B-lymfocyty**¹⁴ a následně **nezralé B lymfocyty**¹⁵.

Při vývoji pre-B-lymfocyty v B-lymfocyt se úseky genů, kódujících variabilní oblasti BCR resp. protlátěk, různě kombinují v procesu zvaném **přeskupování genových segmentů**. Velký počet genových úseků a počet možných kombinací jsou zdrojem obrovské diversity variabilní oblasti BCR. Každý nově vzniklý B lymfocyt má vlastní a jedinečnou variantu BCR, který svojí stavbou odpovídá imunoglobulinu třídy D, ukotveného na povrchu membrány B lymfocyty a funguje jako unikátní receptor antigenu.

Protože proces přeskupování genových segmentů je zcela náhodný, je třeba (ještě před uvolněním do periferie) eliminovat potencionálně autoreaktivní nebo naopak nefunkční B lymfocyty. To se děje v procesu zvaném **pozitivní a negativní klonální selekce**, kdy jsou nezralé B lymfocyty testovány s vlastními antigeny. Autoreaktivní, popř. nefunkční klony podléhají řízené buněčné smrti (apoptóze). Podobným procesem procházejí T-lymfocyty v brzlíku. B lymfocyty, které exprimují funkčně prověřený BCR, jsou uvolňovány z kostní dřeni do periferie. Tyto zralé lymfocyty migrují do lymfoidních orgánů. Dokud se nesetkají s antigenem, jsou označovány jako tzv. **naivní B lymfocyty**.

¹⁴ exprimují pouze těžký řetězec BCR

¹⁵ mají kompletní BCR, který ale zatím neprošel testováním s vlastními antigeny

Zralé, ale naivní B-lymfocyty mohou být aktivovány jednak antigeny na T lymfocytech nezávislými (TI, T lymfocyt – Independent), jednak antigeny na T lymfocytech závislými.

K první skupině antigenů patří především bakteriální lipopolysacharidy (LPS) a některé polymery sacharidů a proteinů. T-nezávislé antigeny stimulují přímo B lymfocyty k sekreci nízkoafinitních protilátek třídy IgM.

Stimulace antigeny závislými na T lymfocytech probíhá v různých částech sekundárních lymfatických orgánů (lymfatické uzliny, Peyerovy plaky...). Proces má dvě fáze (primární a sekundární), vyžaduje spolupráci Th lymfocytů a jeho výsledkem je produkce vysoce afinitních protilátek a paměťových buněk:

PRIMÁRNÍ FÁZE protilátková reakce vyvolaná antigeny závislými na T lymfocytech.

Probíhá v lymfatických uzlinách na rozhraní T-zóny a primárního folikulu (**B-zóny**) při prvním setkání obou typů lymfocytů s příslušným antigenem. Naivní B lymfocyt je v zóně primárního folikulu stimulován vazbou s Ag, který zároveň prezentuje na svém povrchu ve vazbě na MHC molekule (*obr. 2.11.c*)

Současně je Th lymfocyt stimulován stejným Ag (*viz kap. 2.4.*). Takto stimulované lymfocyty jsou k sobě přitahovány, a na hranici T-zóny a folikulu se dostávají do přímého kontaktu (*obr. 2.11.d*). T lymfocyt stimuluje u B lymfocytu tzv. izotypový přesmyk¹⁶ a sekreci vysoce afinitních protilátek k danému antigenu. Současně vznikají paměťové B lymfocyty, které mohou s větším či menším časovým odstupem dále pokračovat ve vývoji v sekundární fázi protilátkové odpovědi.

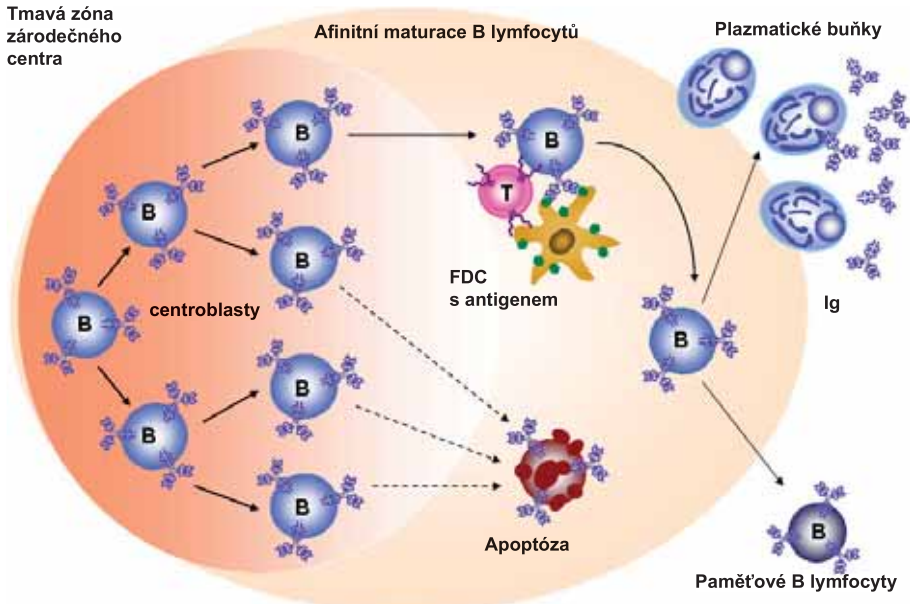
SEKUNDÁRNÍ (POZDNÍ) FÁZE protilátková reakce vyvolaná antigeny závislými na T lymfocytech.

Probíhá v zárodečných centrech sekundárních lymfoidních folikulů (*obr. 2.12*). Zárodečná centra jsou tvořena prolifерujícími B lymfocyty, které byly v primární fázi aktivovány T_h lymfocyty. Aktivované B lymfocyty se diferencují v tzv. **centroblasty**, u kterých během dělení probíhá proces tzv. **somatické hypermutace** genů kódujících variabilní oblast BCR. Při této afinitní maturaci jsou selekčním tlakem upřednostňovány ty nově vzniklé varianty, které mají největší afinitu k antigenu, rozpoznaného **na folikulárních dendritických buňkách** (FDC). Vybrané B-lymfocyty procházejí opakovanými cykly proliferace, mutace a selekce. V těchto následných cyklech dále dochází opět k **izotypovému přesmyku**, kdy se místo původních IgM mění třída imunoglobulinu. Nakonec buňky úspěšně produkující afinitní imunoglobuliny diferencují v plazmatické a částečně v paměťové buňky a opouštějí zárodečné centrum. Ty z centrocytů, které mají slabou nebo žádnou afinitu k danému antigenu, jsou odsouzeny k řízené smrti – apoptóze.

Plazmatické buňky jsou specializované k produkci velkého množství vysoce afinitních protilátek. V oběhu přežívají zpravidla jen několik dní. Paměťové buňky se naopak vyznačují dlouhou životností. Část z nich také migruje do kostní dřeně, kde pravděpodobně pomáhají při tvorbě plazmatických buněk s delší dobou života.

¹⁶ proces přestavby konstantních části těžkého řetězce protilátky a tím vytvoření příslušného vysoce afinitního izotopu protilátky v závislosti na typu antigenu)

Tmavá zóna
zárodečného
centra



Obr. 2.12. - Zárodečné centrum sekundárního folikulu lymfatické uzliny; schéma klonální expanze a selekce

2.4. T lymfocyty a buněčná imunita

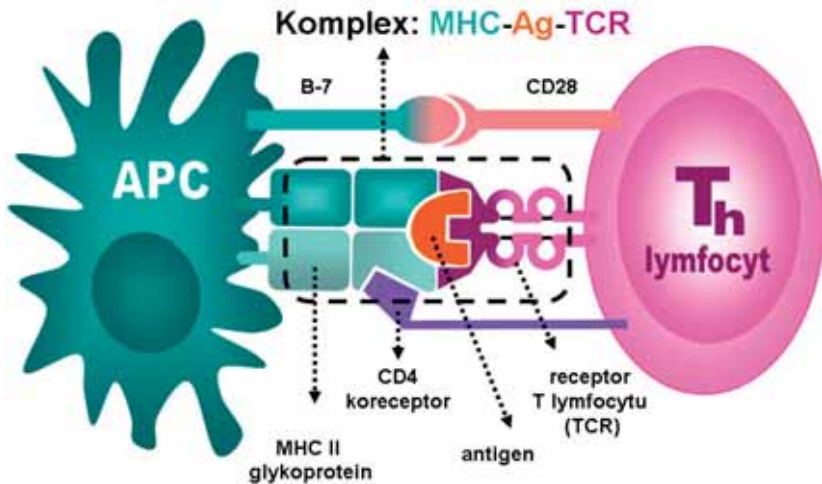
T lymfocyty jsou **představitelé tzv. buněčné složky specifické imunitní odpovědi**. Jejich prekursorů vznikají v kostní dřeni, ale dozrávají (až na výjimky) v thymu. Povrchový receptor T lymfocytů TCR (**T cell receptor**) je tvořen dvěma polypeptidovými řetězci ($\alpha\beta$, alternativně $\gamma\delta$ nebo jinou kombinací) a podobně jako BCR má jednak oblast konstantní a jednak vysoce variabilní oblast pro vazbu s antigenem. Jinak se ale strukturou i funkcí zásadně od receptoru B lymfocytů liší.

Na stimulaci antigenem reagují T lymfocyty především produkcí širokého spektra mediátorů (cytokinů), kterými působí na celou řadu dalších buněk a řídí jejich chování směrem vedoucím k eliminaci antigenu.

2.4.1. Prezentace antigenu T lymfocytům

T lymfocyty rozpoznávají **intracelulární antigeny** (většinou peptidy) prostřednictvím vysoce specifického receptoru TCR (T cell receptor). TCR není schopen (na rozdíl od BCR) s antigenem reagovat přímo, ale potřebuje spolupráci tzv. antigen prezentující buňky, APC¹⁷. T lymfocyt pak rozpoznává antigen ve vazbě na tzv. MHC protein, který je součástí antigen prezentující buňky (komplex MHC-antigen) – *obr. 2.13*.

¹⁷ APC – antigen presenting cell. Jde o tzv. profesionální fagocyty, např. dendritické buňky a makrofágy



Obr. 2.13. - Stimulace T lymphocytu komplexem Antigen-MHC. Na TCR je jednak vazebné místo pro Ag a zároveň vazebné místo pro MHC glykoprotein

MHC proteiny (z angl. **Major Histocompatible Complex**) jsou syntetizovány v endoplazmatickém retukulu všech jaderných buněk. Funkce MHC molekul spočívá ve dvou krocích:

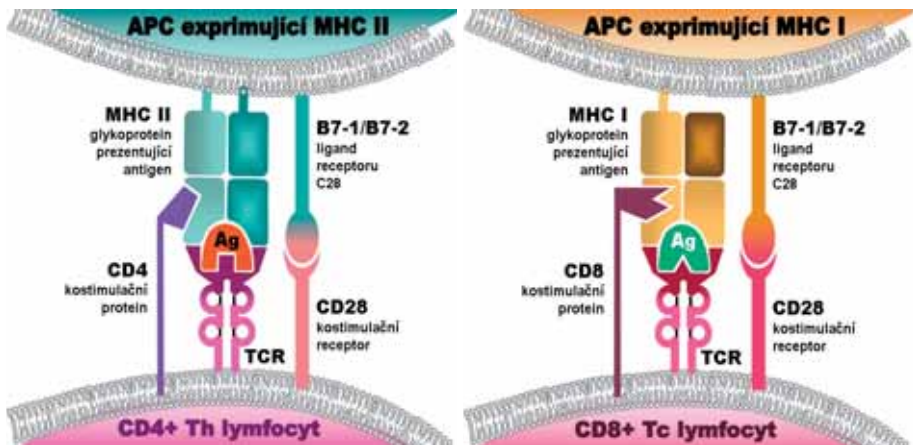
- **Vazba peptidových fragmentů proteinů** (potenciálních antigenů), nacházejících se v buňce
- **Prezentace (vynesení) peptidového fragmentu** na povrch buňky, kde může být komplex MHC-Ag analyzován T lymphocytu

Rozlišujeme dva základní typy MHC glykoproteinů:

- **MHC I (1. třídy)** – vyskytují se na všech jaderných buňkách těla. Specializují se na vazbu a prezentaci intracelulárně syntetizovaného proteinu (vírový nebo nádorový antigen). Stimulují T_c lymphocyt
- **MHC II (2. třídy)** – nacházejí se na „profesionálních“ fagocytech (makrofágy, dendritické buňky), vážou fagocytované antigeny a stimulují T_h lymphocyt

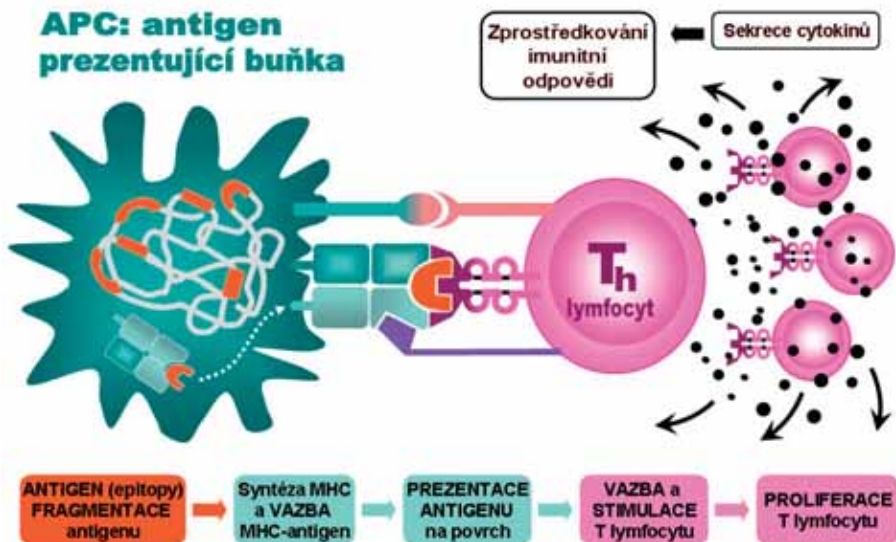
T lymphocyt k aktivaci potřebují nejen stimulaci TCR komplexem Ag-MHC. označ. jako tzv. 1. signál, ale ještě tzv. 2. signál, který musí proběhnout současně. Druhým signálem je zpravidla aktivace kostimulačního receptoru CD28¹⁸ proteinem B7, exprimovaným dendritickými buňkami, makrofágy a B lymphocytu (obr. 2.14).

¹⁸ membránový protein T lymphocytu, který je dominantním kostimulačním receptorem pro aktivaci T lymphocytů; v současnosti je známo několik dalších homologů, které společně tvoří CD28 rodinu



Obr. 2.14. - Kostimulační vazby uplatňující se při aktivaci CD4 pomocných lymfocytů (a) a CD8 cytotoxických lymfocytů (b)

Jestliže proběhnou oba signály, začne T lymfocyt proliferovat a efektorové T lymfocyty produkují různé spektrum cytokinů. Ty stimulují další imunocyty k imunitní reakci, zasahující proti danému antigenu. Základní obecné schéma tohoto procesu je znázorněno na obr. 2.15.



Obr. 2.15. - Obecné schéma aktivace T lymfocytu komplexem MHC-Ag

Toto obecné schéma aktivace T lymfocytů má řadu modifikací odrážející především:

- Chemické a biologické **vlastnosti antigenu** (proteiny, lipidy aj.; bakterie, virus, nádorový protein atd)
- **Typ buňky prezentující antigen** (profesionální fagocyt, ostatní tělní buňky)
- **Typ MHC molekuly** (viz kap. 2.5.3.)
- **Místo**, kde ke stimulaci dochází (lymfatické uzliny, periferní tkáň, sliznice)
- Druh **T lymfocytů**, zapojeného do stimulace

2.4.2. Subpopulace T lymfocytů

U člověka existuje několik subpopulací T lymfocytů, které se liší svojí funkcí, četností, lokalizací a především kombinací povrchových membránových markrů (CD molekul) Morfologicky se totiž jednotlivé subpopulace od sebe neliší a lze je separovat pouze imunohistochemicky.

Současná úroveň poznání popisuje čtyři druhy **pomocných T_H lymfocytů**, cytotoxické **T_c lymfocyty** a **regulační T_{reg} lymfocyty**

*Pomocné T_H lymfocyty*¹⁹

Společným znakem této podskupiny T lymfocytů je přítomnost koreceptorové molekuly CD4, proto bývají označovány také jako CD4+ lymfocyty. Rozpoznávají především antigeny fagocytované a prezentované ve vazbě na glykoprotein MHC 2. třídy. Podle spektra produkovaných cytokinů rozlišujeme následující podskupiny:

- **T_H1 buňky**: produkují především IL-2 a IFN- γ . Základní funkcí je aktivace makrofágů při zánětech, proto T_H1 označujeme také jako **zánětlivé T lymfocyty, pomocné makrofágům**
- **T_H2 buňky**: produkují především IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10 a **stimulují B lymfocyty, k produkci protilátek**.
- **T_H3 buňky**: populace produkující především TGF- β . Vyskytují se především **ve sliznicích** a reagují s **antigeny, přijímanými v potravě; spolupracují s B lymfocyty**
- **T_H17 buňky**: produkují IL-17. Podílí se na zánětlivých procesech proti bakteriím, ale také na patologických autoimunitních onemocněních, např. revmatoidní artritidě (vyskytují se např. v synoviální tekutině kloubů)

*Cytotoxické T_c lymfocyty*²⁰

Společným znakem je přítomnost koreceptorové molekuly CD8 (jsou proto označovány také jako CD8+ T lymfocyty). Rozpoznávají především intracelulárně syntetizovaný Ag (např. virový nebo nádorový protein), který je prezentován buňkou infikovanou virem nebo jiným intracelulárním parazitem, popř. buňkou poškozenou nádorovou transformací nebo stresem. T_c lymfocyty rozpoznávají Ag ve vazbě na glykoprotein MHC 1. třídy. Cílem T_c je eliminace zdroje antigenu (tj. vlastní infikované nebo poškozené buňky). Využívají k tomu tyto cytotoxické mechanismy:

¹⁹ Označení T_H pochází z angl. T helper a odráží „pomocnou“ funkci tohoto typu lymfocytů ostatním buňkám prostřednictvím cytokinů

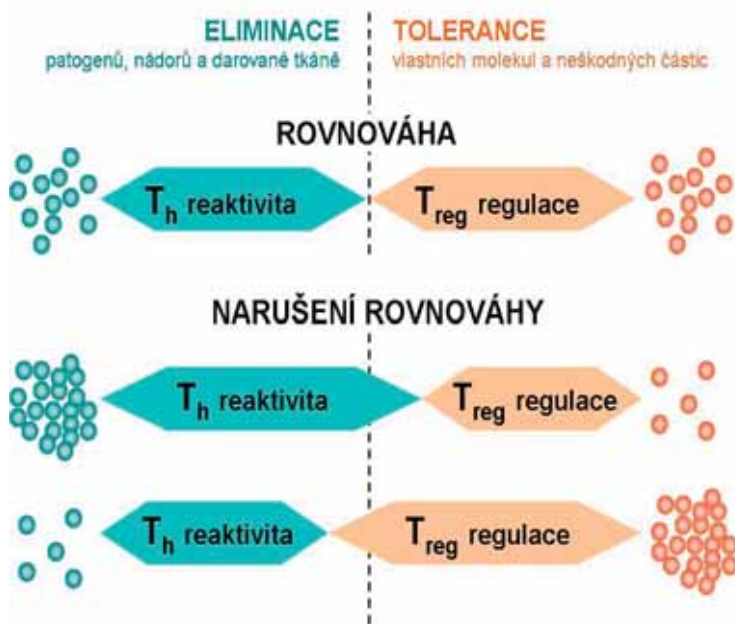
²⁰ Označení T_c pochází z angl. T cytotoxic a vyjadřuje schopnost zabíjet ostatní buňky

- Porušení membrány napadené buňky (nutný těsný kontakt obou buněk)
- Aktivace apoptózy přes tzv. Fas receptor cílové buňky (nutný kontakt obou buněk)
- Sekrece lymfotoxinu (působí také přes Fas receptor, ale i na větší vzdálenosti)

Regulační T_{reg} lymfocyty

Regulační T lymfocyty (dříve označované jako supresorové, tlumivé), jsou schopny potlačovat aktivitu jiných efektorových T lymfocytů. Existuje několik druhů regulačních lymfocytů; např. přirozené Treg potlačují autoreaktivní a imunopatologické reakce. Indukované Treg zajišťují periferní toleranci.

Celkově mají Treg pro organismus velký význam; Je však důležité zachování rovnováhy vzhledem k ostatním populacím T lymfocytů. Pokud totiž dojde k posílení funkce Treg, snižuje se schopnost organismu eliminovat patogeny, nádorové buňky popř. transplantovanou tkáň. Naopak, při jejich potlačení se zvyšuje riziko autoimunitních reakcí (obr. 2.16.)



Obr. 2.16 - Rovnováha mezi dvěma protikladnými póly: Vlevo: Boj proti patogenům, nádorům popř. cizím tkáním. Vpravo: Tolerance antigenů vlastního těla a antigenů pro tělo neškodných

2.5. Základy transplantační imunologie

Transplantací rozumíme terapeutický zákrok, jehož cílem je náhrada nefunkčního nebo chybějícího orgánu (tkáně, buněk) zdravým ekvivalentem, tzv. **štěpem**. Vzhledem k tomu, že u většiny typů transplantací dochází ke kontaktu příjemce s cizí tkání, hraje zde imunitní systém zásadní roli.

Rozvoj transplantační medicíny inicioval rozvoj imunologie a vedl k poznání řady obecných imunologických principů.

2.5.1. Základní terminologie

Podle vztahu dárce (poskytuje štěp) a příjemce (přijímá transplantát) rozeznáváme následující typy transplantací:

- **Syngenní:** přenos štěpu mezi geneticky identickými jedinci téhož druhu (jednovaječná dvojčata, imbrední linie živočichů)
- **Alogenní:** přenos štěpu mezi geneticky neidentickými jedinci téhož druhu (nejčastější typ transplantace) - alogenní transplantát - přenos tkáně nebo orgánu mezi dvěma lidmi nebo mezi dvěma kmeny zvířat
- **Autologní:** přenos štěpu z jednoho místa na druhé u téhož jedince
- **Xenogenní:** přenos mezi jedinci různých živočišných druhů

2.5.2. Éra transplantační chirurgie

- **Prvním transplantovaným orgánem na světě byla ledvina.** Transplantace **od zemřelého dárce** byla provedena 17. června **1950** ve Spojených státech 44leté pacientce v chicagské nemocnici ve státě Illinois. Žádná léčiva na potlačení imunitní reakce vedoucí k odvržení štěpu nebyla ještě k dispozici. Transplantovaná ledvina byla odvržena organismem pacientky po 10 měsících. Tato doba však pomohla ke zotavení druhé ledviny, takže pacientka žila ještě dalších 5 let.
- **První transplantace ledviny mezi živými pacienty** byla provedena v r. **1952**. 15letému chlapci, který přišel úrazem o jedinou svoji ledvinu, darovala orgán matka. Ihned po operaci byla ledvina funkční, ale 22 dní poté došlo k jejímu odvržení (reakci) a po dalších 10 dnech chlapec zemřel na selhání ledvin (dialyzační léčba nebyla tehdy ještě k dispozici).
- **První úspěšná transplantace ledviny mezi živými pacienty** byla provedena v r. **1954** v Bostonu. Proběhla mezi identickými dvojčaty. Příjemce zemřel 8 let po transplantaci. Transplantaci provedl Dr. Murray, který v roce 1990 obdržel za svoji práci Nobelovu cenu
- **První transplantace srdce** člověku byla provedena chirurgem Christianem Barnardem 3. prosince **1967** v Kapském Městě (Jihoafrická republika) 54 letému muži. Transplantace proběhla úspěšně, pacient ale zemřel 18. den po zákroku na zápal plic.

Transplantace v České republice

V prosinci r. 1905 provedl na oční klinice v Olomouci **první transplantaci oční rohovky** Eduard Konrád Zirm²¹. Byla to první úspěšná transplantace tkáně na světě (Obr. 2.17.)



Obr. 2.17. - Pamětní deska umístěná ke 100. výročí transplantace rohovky na oční klinice FN v Olomouci

1. transplantace orgánu (ledviny) v ČR byla provedena v Hradci Králové v roce 1961. Transplantace však byla neúspěšná vzhledem k rejekci darované ledviny imunitním systémem pacientky.

V roce 1966 byl zahájen transplantační program v Praze. **V roce 1971** byl založen **Institut experimentální medicíny (IKEM)** integrací šesti, do té doby samostatných institucí. V současnosti má IKEM tři specializovaná centra: Kardiocentrum, Transplant-centrum a Centrum diabetologie.

V r. 2011 v Bostonu (Massachusetts, USA) pod vedením českého chirurga Bohdana Pomahače²² provedli již druhou úplnou transplantaci obličeje.

2.5.3. Aloimunitní reakce a histokompatibilní systém

Klíčovou roli při transplantacích hraje imunitní systém. Alogenní transplantace (nejčastější typ) je zpravidla doprovázen silnou imunitní odpovědí příjemce – tzv. odvržení (rejekce) darovaného štěpu. Příčinou této reaktivity jsou rozdíly ve spektru membránových MHC glykoproteinů, vyskytujících se v buňkách dárce i příjemce.

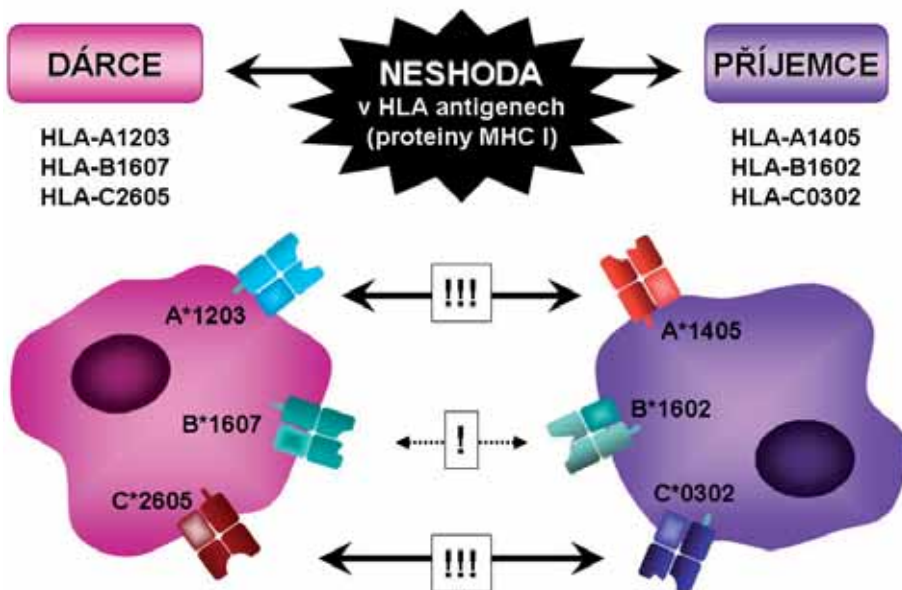
Geny kódující lidské MHC proteiny ležícími na 6. chromozomu a vyznačují se extrémním polymorfismem. V současné době je známo více než 4 720 alel MHC I genů a více než 1 350 alel v systému MHC II²³. Všechny jaderné buňky každého člověka exprimují kombinaci několika MHC proteinů 1. a 2. třídy, jejichž geny získal jedinec od obou rodičů. Vzhledem k obrovskému počtu existujících alel je proto každý člověk nositelem unikátní kombinace MHC proteinů.

²¹ *1863 ve Vídni; od r. 1892 působil na oční klinice v Olomouci, později jako její primář. Zemřel r. 1944 v Olomouci

²² ostravský rodák, absolvent Lékařské fakulty UP v Olomouci, od r. 1996 působí v Bostonu, kde v současné době provozuje vlastní praxi plastické, rekonstrukční a estetické chirurgie a je šéfem popáleninové kliniky

²³ Počet známých alel MHC genů neustále roste; aktuální informace lze získat v databázi <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>).

MHC glykoproteiny byly u člověka objeveny na leukocytech, právě v souvislosti s tkáňovou inkompatibilitou během transplantace. Proto byly pojmenovány HLA (**H**uman **L**eukocyte **A**ntigens).



Obr. 2.18. - Princip tkáňové inkompatibility mezi tkání dárce a příjemce.

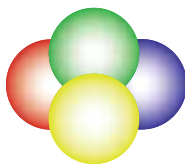
Při alogenním přenosu tkání dostává příjemce dárcovy MHC glykoproteidy, které jsou jeho vlastním imunitním systémem rozpoznávány jako cizí a tedy potenciálně škodlivé Ag. Příjemcův IS spouští systém reakcí, namířených proti dárcovské tkáni, jako nositeli cizích Ag. (obr. 2.18.)

Cílem transplantační medicíny je potlačení imunitní odpovědi příjemce proti dárcovskému štěpu. Toho je možné dosáhnout různými postupy:

- Výběrem vhodného dárce s co největší podobností v MHC glykoproteinech. Výběr se provádí tzv. **typizací HLA** molekul (v klinické praxi se provádí od konce 60. let 20. století). Alely MHC genů na lokusech HLA-A, B, C (= MHC I) a lokusech DP, DQ a DR (= MHC II) se identifikují pomocí PCR s použitím oligonukleotidových sond specifických pro určitou sekvenci.
- Oslabením imunitního systému příjemce tzv. **imunosupresivy**, což má však negativní dopad na celkovou odolnost příjemce k běžným infekčním onemocněním. Moderní terapie proto směřují k cílenému blokování jen některé složky IS např. využitím monoklonálních protilátek (*více kap. 3. a 4.*)

3. téma

Imunologie a imunomodulační terapie



3. POLYKLONÁLNÍ A MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

Polyklonální protilátky a jejich příprava
Monoklonální protilátky a jejich příprava
Humanizace protilátek
Názvosloví monoklonálních protilátek
Hromadná výroba protilátek

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ
Integrace vědy, výzkumu, odborného, vzdělávání a praxe



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

3.1. Polyklonální protilátky a jejich příprava

3.1.1. Všeobecná charakteristika polyklonálních protilátek

Polyklonální protilátky jsou **heterogenní směsí produktů mnoha aktivovaných klonů B lymfocytů**. Jsou namířeny proti více epitopům určitého antigenu nebo proti směsi antigenů.

Jestliže je do organismu savce vstříknuta cizí substance (antigen), aktivované B-lymfocyty proliferují v buňky plazmatické a začnou produkovat protilátky, jež se k tomuto antigenu vážou. Různé klony B-lymfocytů produkují strukturálně různé protilátky, které se vážou k různým epitopům antigenu. Tato přirozená směs protilátek je označována jako protilátka polyklonální.

Tím, že spektrum buněk i spektrum jimi tvořených protilátek je proměnlivé, je obtížné tak komplexní směs protilátek standardizovat. Specifita polyklonálních protilátek velice závisí na průběhu imunizace, resp. na tom, v jaké fázi imunitní odpovědi protilátky analyzujeme.

Výhody polyklonálních protilátek:

- Možnost přípravy protilátek proti zvolenému antigenu přímo v laboratoři bez složitých postupů
- Polyklonální protilátky mívají vyšší afinitu ve srovnání s monoklonálními protilátkami

Nevýhody polyklonálních protilátek:

- Zdlouhavá příprava
- Protilátky jsou heterogenní směsí lišící se ve své kvalitě
- Při každé imunizaci se získá směs protilátek o jiném složení

3.1.2. Příprava polyklonálních protilátek

Polyklonální protilátky se získávají imunizací laboratorních zvířat antigenem (nebo jejich směsí). Při imunizaci zvířete dochází ke stimulaci různých klonů B lymfocytů, k jejich proliferaci a diferenciaci na plazmatické buňky. Je produkováno spektrum protilátek proti různým epitopům příslušného antigenu s různou schopností se na něj vázat. Po úspěšné imunizaci se zvířeti odebere sérum obsahující protilátky proti původnímu imunogenu.

Ke stimulaci tvorby polyklonálních protilátek se využívají tzv. imunizační schémata. Jde o postupnou vakcinaci zvířete příslušným antigenem ve směsi s adjuvans²⁴.

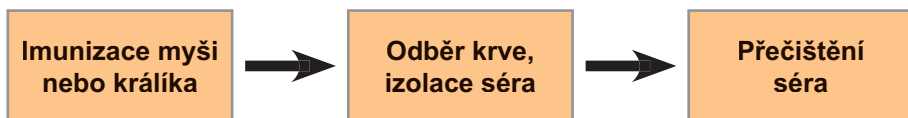
1. den – odběr předimunního séra z ucha zvířete a injekce první dávky antigenu subkutánně (0,2 až 0,5 mg v objemu 1 ml)
30. den – druhá injekce antigenu s FA (0,2 mg až 0,5 mg v objemu 0,5 ml)

²⁴ látka, která zesiluje imunitní reakci proti antigenu; k imunizaci živočichů je často používané Freudovo adjuvans FA = emulze oleje a vody s přídavkem usmrcených mykobakterií

- 40. den – odběr séra a kontrola titru odebraného séra
- 50. den – třetí injekce antigenu s FA (0,2 mg až 0,5 mg v objemu 0,5 ml)
- 65. den – čtvrtá injekce intravenózně (0,2 mg až 0,5 mg v objemu 0,5 ml)
- 75. den – kontrola titru séra, vykrvení a izolace antiséra.

Protilátky se získají z krevního séra imunizovaného zvířete, nejčastěji odběrem krve z ušních žil. Obecný postup se skládá z následujících kroků (*obr. 3.1.*):

1. **Izolace krevního séra:** Krev se nechá srazit a krevní koláč se odstraní centrifugací při 5 000g.
2. **Přečištění imunoglobulinové frakce séra**
 - ◇ precipitace síranem amonným
 - ◇ konvenční chromatografické techniky (IEC= ion exchange ch., GPC=gel permeation ch.)
 - ◇ afinitní chromatografie – metoda využívající schopnosti protilátky reagovat s antigenem. Jako stacionární fáze (SF) slouží imobilizované komponenty z buněčné stěny bakterie různých streptokokových kmenů vážící IgG v konstantních Fc regionech.



Obr.3.1. - Zjednodušené schéma přípravy klasických protilátek:

Touto technikou se ještě dnes získávají antiséra např. proti hadímu jedu.

3.2. Monoklonální protilátky a jejich příprava

3.2.1. Všeobecná charakteristika monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky (mAb) jsou = produktem jednoho klonu B lymfocytů a jsou specifické proti jediné antigenní determinantě.

Výhody monoklonálních protilátek:

- stále stejné složení, tj. určitá standardnost při jejich použití
- umožňují prokázat přítomnost nebo nepřítomnost jediného konkrétního antigenu resp. epitopu
- umožňují provádět vysoce specifické stanovení antigenů (imunoanalýza).

Nevýhody monoklonálních protilátek:

- dražší a pracnější příprava.
- nižší afinita oproti polyklonálním protilátkám, což snižuje citlivost stanovení při jejich využití v analytické chemii

3.2.2. Klasické hybridomové technologie přípravy monoklonálních protilátek

Poprvé byly protilátky z jednoho klonu B-lymfocytů připraveny standardizovaným postupem r. 1975 Kohlerem a Millsteinem²⁵.

K produkci monoklonální protilátky jsou potřeba dva základní kroky:

1. **Izolace buňky produkující specifickou protilátku** (příslušný klon B-lymfocyty). Získávají se ze sleziny nebo lymfatických uzlin zvířete, imunizovaného příslušným antigenem
2. **Imortalizace buňky produkující protilátku** (běžné aktivované B lymfocyty mají životnost jen několik málo dní). Provádí se fúzí normálního B lymfocyty produkujícího monoklonální protilátky s nádorovými buňkami myelomu (druh rakoviny B lymfocyty), které jsou nositeli neomezeného dělení, ale nejsou schopny tvořit vlastní protilátky. Fúzí normálního B lymfocyty s neoplastickou myelomovou buňkou vznikne **tzv. hybridom, který „zdědí“ po normálním aktivovaném B lymfocyty schopnost produkce protilátek a po buňce myelomu schopnost neomezeného dělení.**

K usnadnění fúze se buněčné membrány povrchově upraví v polyetylénglykolu tak, aby byly propustnější. I přesto je úspěšná fúze dvou buněk vzácná. Proto je třeba úspěšně zfúzované buňky (hybridomy) vyhledat kultivací na tzv.HATmédiu (screening). Buňky, které spolu úspěšně fúzovaly, se poznají tak, že:

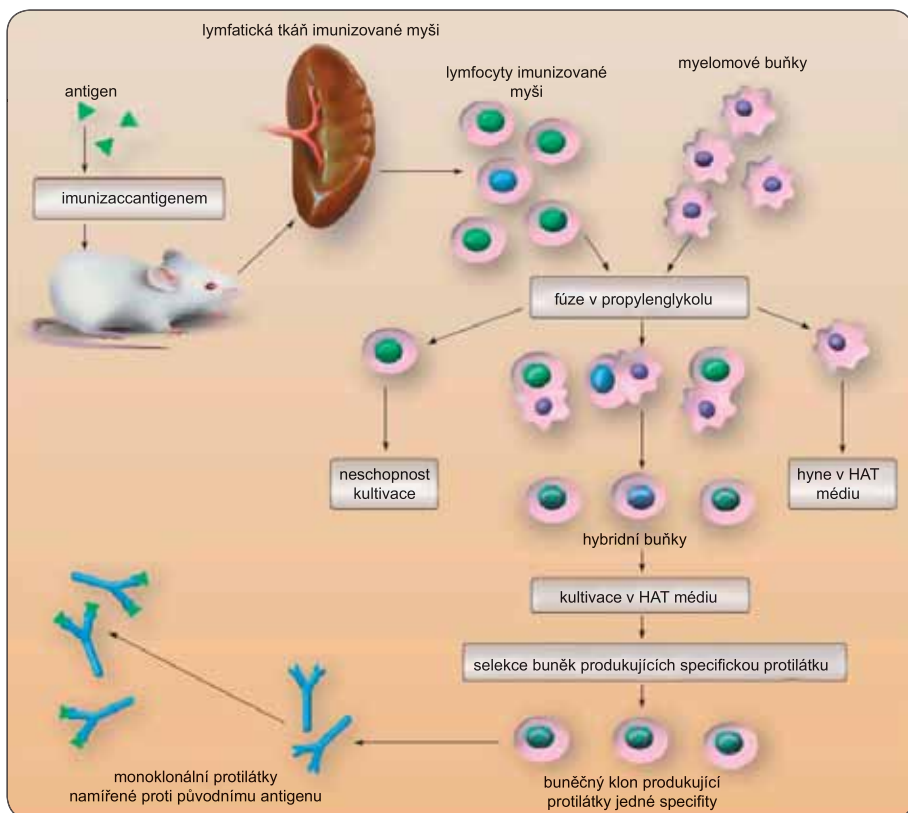
- mají schopnost neomezeně se dělit (tuto schopnost jim do výbavy přinesla myelomová buňka).
- mají schopnost růst na médiu, obsahujícím HAT (tuto schopnost jim do výbavy přinesla B-buňka ze sleziny lymfatických uzlin imunizovaného zvířete). Myelomové buňky totiž ztratily specifický enzym HGPRT (hypoxanthine-guanin phosphoribosyl transferáza). Díky tomu nejsou schopny růst na tzv. HAT médiu (obsahuje hypoxanthine-aminopterin-thymidine), protože nemohou využívat hypoxantin (purinová báze). (aminopterin blokuje hlavní cestu syntézy nukleotidů z cukrů a aminokyselin)

Hybridomy se vhodně rozředí a jejich kultivací vznikne množství různých kolonií, každá schopná produkovat jen jeden druh protilátky. Protilátky od různých kolonií jsou pak testované na jejich schopnost vázat se k antigenu a ten nejúčinnější klon je vybrán. (*obr. 3.2.*)

Monoklonální protilátky mohou být produkovány v buněčné kultuře nebo ve zvířatech. První kultivace hybridomálních buněk se prováděla v myších: Po napíchnutí buněk do břišní dutiny získaly buňky vhodné prostředí k růstu, vznikl myší-vyživovaný nádor, který produkoval protilátku - v peritoneální, pobřišniční dutině vznikala na protilátku bohatá tekutina, nazývaná ascit.

První monoklonální protilátka, které byla udělena licence jako léčivo, byl myší imunoglobulin IgG2a s názvem OrthoClone OKT3 (FDA schválení 1986). Protože ale myší protilátky mají sklon vyvolávat silnou imunitní odpověď příjemce, je zpravidla vyloučené opakované použití na jednom pacientovi.

²⁵ Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 1975; 256(5517):495-7 (Nobelova cena za medicínu 1984)



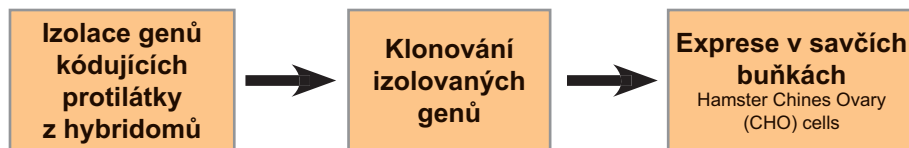
Obr. 3.2. - Schéma produkce hybridomů a monoklonálních protilátek (zdroj: Sobotková M, Bartůňková J. Monoklonální protilátky a další biologická léčiva užívaná v imunosupresivní léčbě. Remedica, 2008; 356-64)

3.2.3. Rekombinantní monoklonální protilátky

Myelomové buňky je obtížné dále manipulovat k ještě větším úrovním exprese proteinů, a kromě toho, v bioreaktorech se dá dosáhnout jejich nárůstu pouze do středních oblastí hustoty.

S rozvojem genetického inženýrství byly vyvinuty různé techniky produkce monoklonálních protilátek, s lepšími vlastnostmi, než mají hybridomální myší protilátky (vyšší afinita k antigenu, větší podobnost s lidskými protilátkami): Použitím technik rekombinantní DNA mohou být geny kódující jednotlivé části protilátky manipulovány *in vitro*; Exprimováním rekombinované DNA v bakteriofágu nebo kvasinkách můžeme získat obrovskou škálu **rekombinantních protilátek** („library of antibodies“), z nichž lze vybrat tu s nejvyšší afinitou k danému antigenu. DNA konstrukt kódující vybranou protilátku, je transfektován do vhodného typu buněk, který protilátky produkuje ve velkém. V současné době jsou k expresi rekombinantní DNA nejčastěji využívány buněčné linie, získané

z ováří čínského křečka (CHO – Chines Hamster Ovary cells) Výhodou této buněčné linie je snadná kultivace i to, že rostou v jedné vrstvě; jsou proto široce využívány v biologickém a lékařském výzkumu a komerčně k výrobě rekombinantních terapeutických proteinů-rekombinantních protilátek. (*obr. 3.3.*)



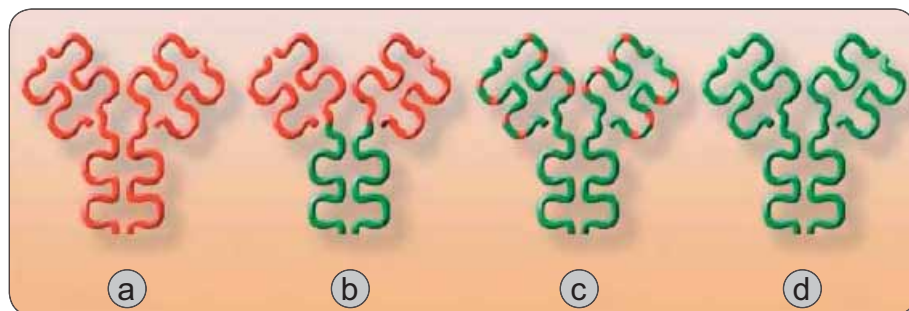
Obr. 3.3. - Zjednodušené schéma přípravy rekombinantních protilátek:

Výhody rekombinantních mAb oproti klasickým mAb:

- rychlejší příprava oproti monoklonálním protilátkám
- vyšší afinita a specifita
- možnost další modifikace vazebných vlastností protilátek
- větší počet vazebných míst

3.3. Humanizace protilátek

Samotná monoklonální protilátka může být v organismu pacienta během léčby rozpoznána jako cizorodý antigen. S tím souvisí vznik možných nežádoucích reakcí lidského imunitního systému: destrukce myších protilátek, vznik zánětlivé reakce a produkce vlastních imunoglobulinů proti myším protilátkám (HAMA-response: human **anti-murine** antibody response). Tato imunitní reakce vylučuje opakované použití zvířecí protilátky u jednoho pacienta. Takovým reakcím lze však předejít tzv. humanizací terapeuticky využívaných protilátek, kde je část molekuly, která neváže antigen, nahrazena úsekem lidského imunoglobulinu. Dosáhneme toho rekombinací genů kódujících zvířecí (myš, králík aj.) a lidské imunoglobuliny. Humanizované protilátky jsou méně imunogenní v porovnání se zvířecími protilátkami. Rozlišujeme několik úrovní humanizace protilátek (*obr. 3.4*):



Obr. 3.4. - Typy monoklonálních protilátek užívaných v terapii: myší mAb (a), chimérická mAb (b), humanizovaná mAb (c) a lidská mAb (d). (zdroj: Sobotková M, Bartůňková J. Monoklonální protilátky a další biologická léčiva užívaná v imunosupresivní léčbě. Remedia, 2008; 356-64)

3.3.1. Chimérické protilátky

U chimérických monoklonálních protilátek je konstantní oblast C těžkého řetězce lidská-tvoří 60-70%, zatímco variabilní oblast obou řetězců je původem myší-představuje 30-40%. To umožňuje, aby měla protilátka efektorové funkce lidské protilátky a současně se snižuje imunogenecita, která by byla jinak způsobena myšími oblastmi Fc. Poprvé zkonstruována v r. 1984-1985: Michael NEUBERGER a Terrence RABBITS.

Chimérické protilátky jsou v názvosloví zakončeny koncovkou „-ximab“ (*obr. 3.4,b*)

3.3.2. Humanizované protilátky (CDR-grafted)

Při konstrukci humanizovaných protilátek se využívá toho, že ve vysoce variabilní části řetězců imunoglobulinů je pouze 6 oblastí, které určují komplementaritu k antigenu. Tyto oblasti se jmenují **Complementarity Determining Region** (CDR). Humanizované protilátky jsou z 90-95% tvořeny lidským imunoglobulinem a jen CDR oblasti jsou tvořeny myší bílkovinou. Poprvé vytvořil v r. 1986: Greg WINTER.

V názvosloví jsou zakončeny koncovkou „-mumab“ (*obr. 3.4,c*)

3.3.3. Plně lidské protilátky

Jsou tvořeny 100% lidskou bílkovinou (*obr. 3.4,d*). K přípravě se využívají různé techniky genového inženýrství. Poprvé byla plně lidská protilátka vytvořena v r. 2000 (Michael NEUBERGER Marianna BRUGGEMANN) za pomoci transgenních myší, tj. myší, které mají do svých B-lymfocytů vloženy lidské geny:

Technologie Xenerex pro HuMAb využívá buněk od lidských dárců, kteří prodělali přirozenou infekci a zotavili se z ní. Lidské buňky se vpraví do imunodeficientní myši (SCID = **S**evere **C**ombined **I**mmuno **D**eficient), která nemá funkční vlastní imunitní systém. Myš je následně imunizována antigenem, který aktivuje zmnožení příslušného klonu B lymfocytů a tvorbu lidských protilátek. B lymfocyty jsou pak z těla myši izolovány a fúzovány s myelomovými buňkami. Získané hybridomy pak produkují plně lidské monoklonální protilátky.

Rovněž **technologie firmy Immunologix** využívá buněk od lidských dárců, ale není podmínkou, aby prodělali přirozenou infekci. Navíc, v celém procesu není zapotřebí žádný krok vyžadující přenos do myši:

- ze sliznice krčních mandlí (nebo z plné krve) jsou izolovány naivní B-buňky
- izolované B-buňky jsou nejprve sfúzovány s buňkami myelomu, takže vzniknou buňky hybridomální,
- hybridomální buňky jsou stimulovány k produkci (nahodilých) protilátek
- sekretující hybridomy jsou selektovány pomocí vhodně připravených malých rozpustných proteinů, nesoucích hlavní znaky (epitopy) cílového antigenu (viru, bakterie)

3.4. Názvosloví monoklonálních protilátek

Názvosloví monoklonálních protilátek v sobě nese informaci o původu, popř. i cílové tkáni, proti které je mAb určena. První část názvu je variabilní. Po ní následuje část, jež označuje cíl, proti kterému je protilátka určena. Např. spojení –li(m)-označuje imunitní systém, -vi(r)-virový antigen atd. Následuje písmeno nebo slabika ukazující na původ protilátky: např. -o- protilátky myšního původu, -u- protilátky lidské, -xi- protilátky chimérické atd. Název je zakončen příponou -mab. Např. „ximab“ ukazuje na chimérickou monoklonální protilátku, „zumab“ odkazuje na humanizovanou protilátku (*obr. 3.5.*)

předpona	cílová struktura	původ (typ) protilátky	přípona		
variabilní	-ba(c)-	bakterie	-mab		
	-ci(r)-	kardiovaskulární systém			
	-co(l)-	nádor tlustého střeva			
	-fu(ng)-	houba			
	-go(t)-	nádor varlete		-a-	krysa
	-go(v)-	nádor vaječníku		-axo-	hybrid krysa/křeček
	-ki(n)-	interleukin		-e-	křeček
	-le(s)-	ložisko infekce		-i-	primáti
	-li(m)-	imunitní systém		-o-	myš
	-ma(r)-	nádor prsu		-u-	humánní
	-me(l)-	melanom		-xi-	chimérický
	-mu(l)-	muskuloskeletální systém		-xizu-	chimérický/humanizovaný
	-neu(r)-	nervový systém		-zu-	humanizovaný
	-o(s)-	kost			
	-pr(o)-	nádor prostaty			
	-tox(a)-	toxin			
	-tu(m)-	libovolný nádor			
	-vi(r)-	viry			

Obr. 3.5. - Nomenklatura monoklonálních protilátek. (zdroj: Sobotková M, Bartůňková J. Monoklonální protilátky a další biologická léčiva užívaná v imunosupresivní léčbě. Remedica, 2008; 356-64)

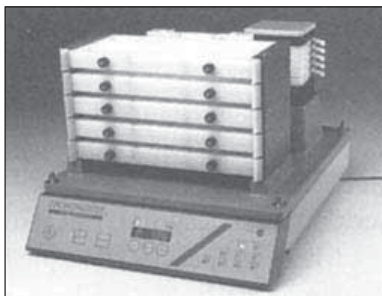
3.5. Hromadná výroba protilátek

Monoklonální protilátky se podávají převážně ve formě nitrožilní infúze. Musí proto splňovat dva základní požadavky kladené na parenterální²⁶ léčiva obecně:

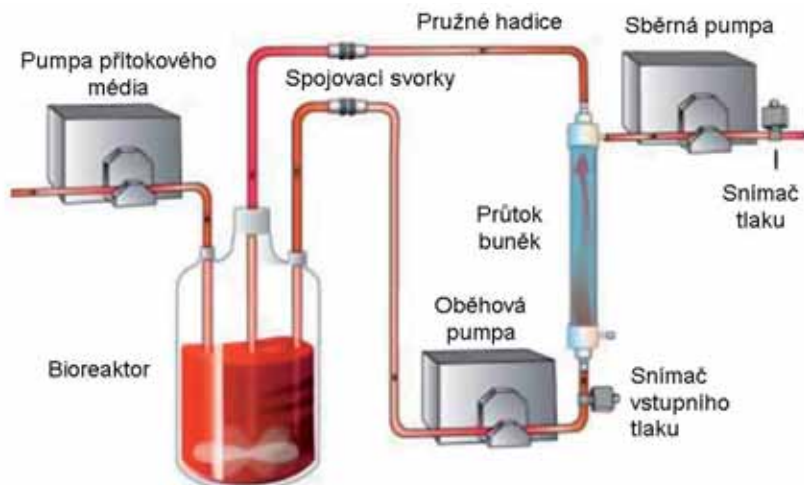
1. **Aseptický** výrobní proces, terminální sterilizace
2. Opatření proti **pyrogenům** (látky vyvolávající horečku).

Původní způsob přípravy protilátek *in vivo* v těle myši neodpovídá potřebám ani co do množství, ani co do čistoty získaných protilátek. Mnohem lépe se obou cílů může dosáhnout kultivací hybridomálních buněk *in vitro*. Byla vyvinuta celá řada technik, jak pěstovat buňky (v podstatě myelomové buňky B-lymfocytárního myelomu):

- Technická myš (Tecnomouse) – malý průtokový kultivační systém (*obr.3.6.*)
- Průtoková kultura (Perfusion technology) - průtočný reaktor (*obr.3.7.*)
- Přikrmovaná vsádka (Fed batch technology)- vsádkový reaktor s mícháním



Obr. 3.6. - Tecnomouse - umělá technická myš pro kultivaci hybridomů a produkci protilátek in vitro



Obr. 3.7. - Schéma kultivace buněk v průtokovém (perfúzním) reaktoru

²⁶ podáváný jinak než perorálně-ústý

Průtokové technologie jsou založeny na myšlence, že vhodně ukotvené buňky by mohly produkovat protilátky po několik týdnů, pokud se jim zajistí dostatečný přísun živin a odvod zplodin látkové výměny. Léta srovnávání zkušeností vedla nakonec k závěrům, že dlouhé doby kultivace nejsou vhodné. V důsledku stárnutí buněk, jejich různé kvality a proměnlivého mikrookolí dochází ke změnám v glykosylaci proteinů a v jiných post-translačních úpravách, takže výsledný produkt je více proměnlivý. Vyrůstá také riziko mikrobiální kontaminace buněčné kultury. V neposlední řadě brání většímu rozvíjení perfúzní technologie také to, že se dá jen obtížně zvětšovat její měřítko (ve srovnání se vsádkovou kulturou v míchaném bioreaktoru).

3.5.1. Kultivační média

Současné požadavky orgánů regulujících oblast léčiv buďto výrazně omezují nebo přímo zakazují používání takových složek kultivačního média, které by mohly být odvozeny ze zvířat, zejména z krav. Důvodem jsou potenciální kontaminace částicemi - priony - způsobujícími TSE/BSE onemocnění. Současná kultivační média tedy již nepoužívají např. BSA (bovine serum albumin) ani FCS (fetal calf serum), a pokud ano, tak jen v první fázi (oživení a pomnožení buněk). Současným trendem je tedy používání chemicky definovaných médií, a jako zdroj signálu nezbytného pro růst buněk se používají rekombinantní proteiny IGF-1, transferrin, inzulin apod.

3.5.2. Práce s produkčními kmeny pro výrobu protilátek

Při výrobě protilátek pomocí **živých buněk** je zvláště důležité zachovat produkční kmen a jeho vlastnosti, tj. hlavně: **životaschopnost, avirulenci a produkční stabilitu.**

Po vyvinutí produkčního kmene se tedy základním prvkem výroby protilátek stává bezpečné uchování základního (primárního) kmene hybridomálních buněk.

Na základě mnoha praktických zkušeností je dnes již jako standard zavedeno používání **dvou záloh produkčního kmene:**

- pracovní banka buněk - Working Cell Bank (WCB)
- vzorová banka buněk - Master Cell Bank (MCB)

Po oživení kultury ze základního kmene hybridomálních buněk následuje zpravidla dvou až tří krokový přenos do většího měřítka (analogie up-stream procesu v chemické výrobě). Finální kultivace je buďto vsádková nebo kontinuální. Po sklizni je od fermentačního média odloučeno buněčné debris, zpravidla centrifugací. Následují různé purifikační kroky, které mají za cíl odstranit nízkomolekulární látky (vysrážení síranem amonným, dialýza) a cizí proteiny (afinitní chromatografie).

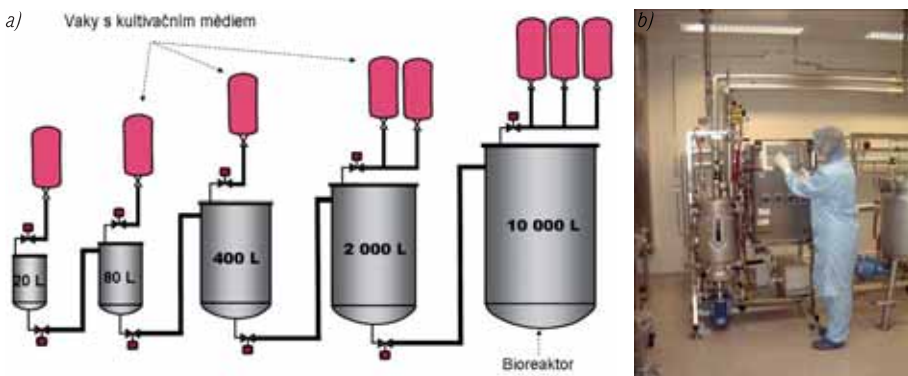
V celém biotechnologickém výrobním procesu se rozlišují tzv. up-stream procesy (zvětšení objemu) a down-stream procesy (zmenšování objemu zpracovávaného média).

Up-stream proces zahrnuje:

- základní kultivace (oživení) produkční buněčné linie po vytažení z banky
- fermentační proces (od malé laboratorní baňky až po velký bioreaktor) Výrobní měřítko fermentačního procesu je reprezentováno objemem kultivačních nádob:

< 1 ml	destičky s jamkami
10 ml	zkumavky
50 ml	rotující zkumavky, rollery
500 ml	buňky s míchadlem, spinnery
> 1000 ml	třepané kultivační vaky, fermentory

Buněčná kultura se do většího měřítka přenáší postupně. Klasická kaskáda za sebou zapojených fermentorů o zvětšující se velikosti se označuje jako seed-train (*obr. 3.8.*) (inokulační kaskáda, inokulační vlak). Pro kultivaci savčích buněk se nejčastěji používají fermentory o objemu 1001 - 5000l, ale už existují i výrobní zařízení pro 10000-25000 litrů. Kultivace savčích buněk se tak začíná blížit klasickým fermentačním technologiím pro bakterie, plísně, houby a kvasinky (50-100 m³).



Obr. 3.8. - Klasická fermentační kaskáda (a) a fotografie začátku kaskády - bioreaktor o objemu 10 až 20l (b)

Down-stream proces zahrnuje:

- Odstranění buněk, buněčného debris a vyčerení tekutiny (tzv. capture)
- Separace proteinové frakce srážením bílkovin síranem amonným, nebo dnes nejčastěji afinitní chromatografií (tzv. Polishing 1)
- Odstranění nízkomolekulárních látek ultrafiltrací, dialýzou, nebo membránovou chromatografií (tzv. Polishing 2)

3.5.3. Novější postupy ve fermentačních technologiích savčích buněk

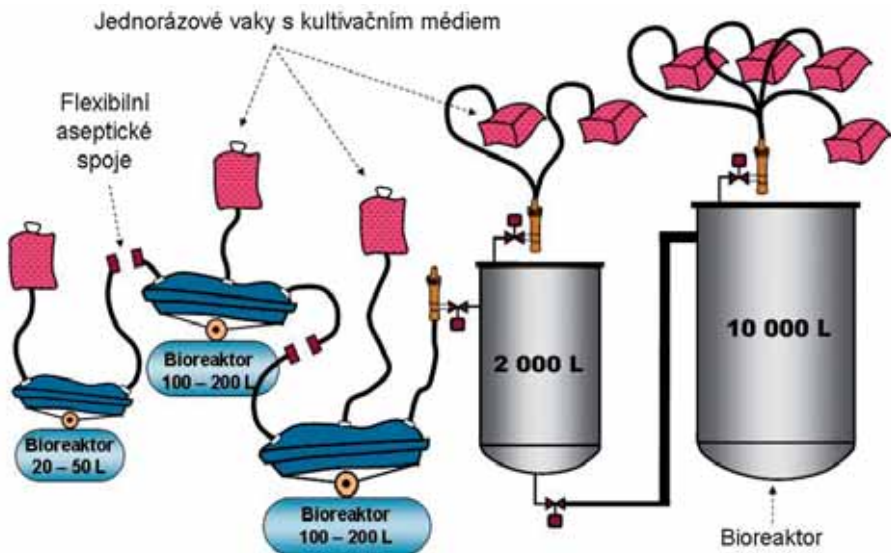
Klasická kaskáda vyžaduje nerezové tanky, které musí být sterilizovatelné (tlaková pára) - mají instalovaný SIP (steam-in-place, pevně zabudované sterilizační zařízení) a čistitelné automatizovaným čistícím procesem - mají instalovaný CIP (cleaning-in-place, pev-

ně zabudované čistící zařízení), přičemž účinnost čištění i sterilizace se musí prokazovat validací.

Rozsáhlá, jednoúčelová zařízení s klasickou fermentační kaskádou a s pevnými připojeními stojí \$100 - \$300 mil. dolarů a vyžadují 3-5 let na výstavbu, zprovoznění a validaci.

Proto se novější současné přístupy snaží snížit náklady fermentačního procesu používáním jednorázových pomůcek, jednorázových propojovacích hadic, jednorázových fermentačních vaků. Vzniklo celé nové technické odvětví označované souhrnně jako „disposables“ (z angl. „na jedno použití“).

Pro kultivační média se používají jednorázové vaky při kultivacích od 20 do 2500 l. Při menších výrobních objemech, typicky od 1 do 1000 l, může být jednorázový vak použit dokonce i pro finální produkční fázi kultivace, je ale třeba zajistit promíchávání. To se děje buď pomocí naklápěného podstavce (rocking platform) nebo pomocí ponorného míchadla (impeller). Vaky přicházejí do výroby již předsterilizované (gama-radiací) a často jsou už předem osazeny filtry pro vzduch a konektory (fittingy) pro připojení hadic.



Obr. 3.9. - fermentační kaskáda s využitím zařízení na jedno použití (vaky s kultivačním médiem, flexibilní hadicová propojení)

Jednorázové trasy pro přívod živného média nebo přenos inokula do většího fermentačního měřítka se také realizují prostřednictvím jednorázových plastových hadic a peristaltických pump.

Kromě flexibilního připojení reaktorů se používají i jednorázové vnitřní výstelky reaktorů - a to vaky na jedno použití (obr. 3.11 a 3.12.):



Obr. 3.10. - flexibilní hadicová propojení procesní nádoby v biotechnologickém provozu (Sicor Biotech, Litva)



Obr. 3.11. - jednorázová vnitřní výstelka bioreaktoru - vak na jedno použití

Také výrobní kroky v down-stream procesech zaznamenaly rozmach v používání zařízení na jedno použití. Zde se místo pevných připojení nerezovými trubkami mezi fermentorem a dalším procesním zařízením používají flexibilní hadicová propojení a mobilní nádoby. Je to však jen jedno z mála vylepšení v down-stream procesech. Klasické techniky přečišťování (tj. centrifugace, afinitní chromatografie, odsolování), zaostávají v rychlosti, kapacitě a hlavně ve snižování nákladů za technikami fermentačními.

Proto se firmy snaží o snížení nákladů alespoň při stavbě výrobních celků. Často se používá systém modulů - kontejnerů, které jsou současně již vnějším pláštěm a současně mají osazený vnitřní čistý prostor. Jejich složení, čištění, zprovoznění a validace je pak dosaženo za mnohem kratší dobu (*obr. 3.12.*).



Obr. 3.12 - skládání kontinuální centrifugy(a); skládání kontejnerového systému stavby čistých prostor(b) - Sicor Biotech, Litva

Aby se dosáhlo snížení nákladů na klimatizaci, filtraci vzduchu a udržování mikrobiální čistoty prostředí, jsou jak fermentory, tak i procesní zařízení pro down-stream zpracování uzavírány do těsného opláštění (*Obr. 3.13.*).



Obr. 3.13. - mobilní opláštění pro procesní zařízení (chromatografické kolony, centrifugy)

3.5.4. Kritické kroky výrobních procesů

Jako kritické (z hlediska vlivu na kvalitu produktu) bývají dnes identifikovány následující kroky výrobního procesu:

1. Příprava vody pro injekce (WFI - voda, Water For Injections)
2. Příprava filtračních souprav, finální sterilizující filtrace
3. Mytí rozplňovacího a uzavíracího zařízení
4. Sterilizace a provoz izolátoru Tř. "A" pro rozplňování do lékových

Při uvádění protilátky do **injekční lékové formy** je třeba mít na paměti, že se jedná o **nativní bílkovinu - protein**. Jako každé jiné proteiny, tak i protilátky mohou v roztoku podléhat různým procesům, které nežádoucím způsobem mění jejich vlastnosti:

Hydrolyze bílkovin se předchází volbou vhodných podmínek při down-strem zpracování: za chladu, v pufrch o vhodném pH a ionové síle.

Štěpení proteinové vazby se předchází opatřeními na vyloučení proteáz, příp. použitím inhibitorů proteáz.

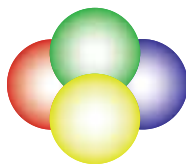
Denaturaci se vyvarujeme vyloučením tepla při konečném zpracování - terminální sterilizace je zajištěna filtrací.

Agregačním reakcím se brání především používáním tzv. biokompatibilních materiálů, dále PEG-ylací (syntetická úprava, dosyntetizování řetězce polyethylenglykolu) případně glykosylací.

Nejobtížněji se brání **polymerizačním reakcím**: často nestačí jen vhodné pH a iontová síla, ale jiné složení pufrů: jiné ionty = jiné mikrookolí.

3. téma

Imunologie a imunomodulační terapie



4. IMUNOMODULAČNÍ TERAPIE

Imunosupresivní léčba

Biomedicína a personalizovaná léčba

Registrace léčiv se zaměřením na přípravky
obsahující monoklonální protilátky

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ

Integrace vědy, výzkumu, odborného, vzdělávání a praxe



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

4.1. Imunosupresivní léčba

4.1.1. Tři režimy imunosupresivní léčby

Režimy potransplantační imunosupresivní léčby se liší podle toho, **v jakém operačním období se imunitní systém příjemce nachází:**

- **indukční imunosuprese** – používá se v časném období po transplantaci, kdy je nejvyšší riziko vzniku akutní rejekce.
- **udržovací imunosuprese** – navazuje na období indukční léčby. Její podávání je doživotní. S časovým odstupem od transplantace se množství léků snižuje. Jejím smyslem je zabránit vzniku pozdních akutních rejekcí a především chronických rejekcí.
- **antirejekční imunosuprese** – se používá jako razantní léčba tam, kde byla prokázána akutní rejekce.

4.1.2. Typy imunosupresiv

Imunosuprese je založena především na depleci (snížení počtu) aktivovaných lymfocytů, ovlivnění migrace lymfocytů nebo blokováním jejich odpovědi na stimulační signály. Imunosupresiva můžeme rozdělit do dvou základních skupin:

- Malé molekuly – jedná se o klasická imunosupresiva např. kortikosteroidy, inhibitory kalcineurinu, inhibitory mTOR (viz dále)
- Biologické proteinové preparáty – především protilátky a fúzní proteiny; jde o výjimečně novější imunosupresiva

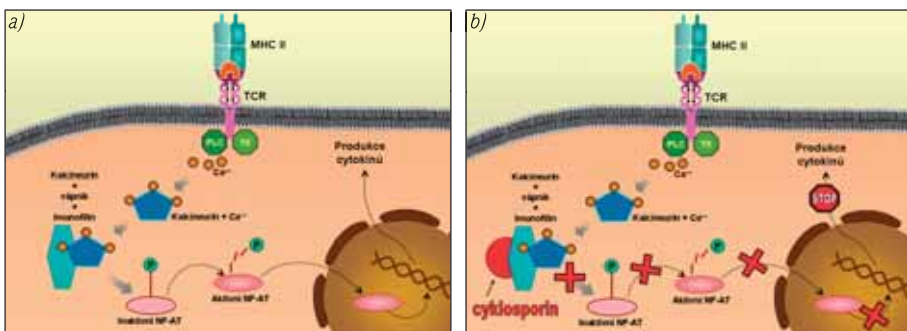
V následující části je podán přehled nejčastěji používaných klasických imunosupresiv, rozdělený podle mechanismu jejich účinku. Biologickým proteinovým preparátům bude věnována pozornost v *kap. 4.1.3.*

Kalcineurinové inhibitory

Mechanismus jejich účinku je takový, že po prostupu buněčnou membránou lymfocytů se váží na specifické vnitrobuněčné proteiny – *imunofiliny* a **blokuji enzymatickou aktivitu kalcineurinu** (odtud název kalcineurinové inhibitory). Díky blokaci kalcineurinu je znemožněna produkce některých cytokinů, zejména interleukinu – 2 (IL-2), který je hlavním cytokinem způsobujícím proliferaci T-lymfocytů. Protože je **proliferace T-lymfocytů ztížena**, je pro jejich populaci mnohem obtížnější zahájit a rozvíjet mechanismy vedoucí k rejekci cizí tkáně (obr. 4.1.) Kalcineurinové inhibitory **jsou nyní nejrozšířenějšími imunosupresivy na světě**. Tvoří základ všech imunosupresivních postupů jak ve fázi indukční, tak i ve fázi udržovací.

Patří sem **cyklosporin A** (Sandimmun Neoral®, český Equoral®) a **tacrolimus** (FK 506, Prograf®). V České republice byl cyclosporin A vysoké kvality a čistoty připraven biotechnologickými metodami (kultivace houby *Tolypocladium cylindosporum*) a chemickoizolačními metodami na přelomu 80. a 90. let 20. století. Pod názvem Equoral® je vyráběn v opavském závodě Teva.

Všechny kalcineurinové inhibitory mají však řadu nežádoucích účinků: nefrotoxicita, neurotoxicita, hypertenze, hyperlipidemie a diabetes mellitus.

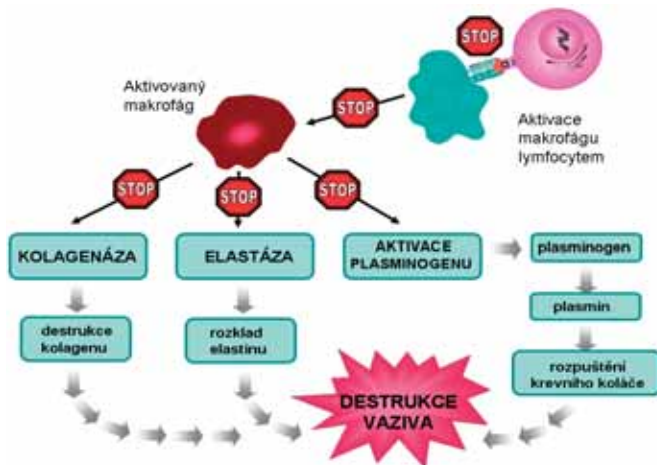


Obr. 4.1. - Mechanismus účinku kalcineurinového inhibitoru (cyklosporin, tacrolimus)
a - normální buňky, bez inhibice: kalcineurin po vazbě na imunoflin aktivuje jaderný faktor NF a spouští přístup ke genům pro cytokiny, zejména IL-2.
b - buňky pod vlivem inhibitoru kalcineurinové aktivace: vazba kalcineurinu na imunofliny a aktivace jaderného faktoru NF-AT je blokována. Nespouští se syntéza cytokinů (IL-2).

Kortikosteroidy

Jsou to syntetické analogy (např. prednison) tělu vlastních steroidních hormonů tvořených v kůře nadledvinek z cholesterolu. Kortikosteroidy mají celé spektrum **protizánětlivých a imunosupresivních účinků**, inhibují produkci celé řady cytokinů (IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, TNF- α , IFN- γ), které se účastní v rejekčních mechanismech. **Účinek kortikosteroidů je široký, nespecifický (obr. 4.2.)**. Používají se především pro indukční a antirejekční fázi terapie, v udržovacích fázích se jejich dávky snižují nebo se úplně vysazují. Důvodem jsou závažné nežádoucí účinky (hypertenze, hyperlipidemie, diabetes mellitus, Cushingoidní syndrom, katarakty, osteoporóza, poruchy růstu u dětí).

Kortikosteroidy se zpravidla používají v kombinaci s kalcineurinovými inhibitory a s antiproliferativními léky, jako tzv. **imunosupresivní triplet**.



Obr. 4.2. - místa účinku kortikosteroidů v supresi imunitní odpovědi

Antiproliferativní léky

Inhibují proliferaci (dělení) buněk tím, že zasahují do syntézy DNA. Nejčastěji používaným antiproliferativním lékem v současnosti je mykofenolát mofetil (přípravek s názvem CellCept®). **Inhibuje enzym inosit monofosfát dehydrogenázu (IMPDH)**, který je důležitý pro de-novo syntézu purinových bází. Takto je **blokováno dělení aktivovaných T-lymfocytů**.

V České republice byl mykofenolát rovněž připraven biotechnologickými a chemicko-izolačními metodami a je vyráběn v Opavě. Nežádoucími účinky jsou především leukopenie a dyspeptické potíže. Používají se v indukční a především v udržovací fázi, nejčastěji v kombinaci s kalcineurinovými inhibitory.

Rapamycin

Patří mezi makrocyclické laktony. Zabraňuje aktivaci lymfocytů blokadou enzymů, tzv. mTOR (**mammalian Target of Rapamycine**). mTOR je enzym ze skupiny kináz, který reguluje růst, dělení, pohyblivost a přežívání buněk a také syntézu proteinů a transkripci. Rapamycin se používá v udržovací terapii především v kombinaci s kalcineurinovými inhibitory. Jeho používání je však omezeno významnými nežádoucími efekty, především vysokým výskytem infekčních komplikací a hyperlipoproteinemií.

Protilátky

Polyklonální a monoklonální protilátky se řadí k **tzv. biologickým léčivům**. Princip jejich účinku spočívá ve vazbě na různé povrchové molekuly (receptory, koreceptory) imuncytů a tím zpravidla brání jejich proliferace nebo ovlivňují vzájemné interakce označené buňky s dalšími imuncyty. Podrobněji se bude terapeutickému využití protilátek věnovat kap. **4.1.3. a 4.2.**

4.1.3. Nové přístupy k imunosupresi

Nežádoucí účinky klasických imunosupresiv (inhibitorů kalcineurinu, kortikosteroidů a antiproliferativních látek) vedou ke snaze hledat alternativní léčebné postupy, které nejsou zatíženy tolika nežádoucími vedlejšími účinky. K takovým terapeutickým postupům patří např. **imunoadsorpce, imunotolerance** vůči štěpu a v neposlední řadě rychle se rozvíjející formy tzv. **biologické léčby**. Přesto, že nová **tzv. biologická léčiva** jsou zatím velmi drahá, nachází biomedicína stále širší uplatnění nejen v potransplantační imunosupresi, ale hlavně v onkologii a léčbě autoimunitních onemocnění (*viz dále kapitola 4.2.*).

Imunoadsorpce

Souběžně s vývojem účinnějších imunosupresiv existují v transplantační medicíně již cca 10 let postupy, jak provést transplantaci orgánu i mezi nekompatibilními dárči (nekompatibilita krevních skupin, nekompatibilita HLA). Jedná se o moderní léčebnou metodu, při které jsou semiselektivní eliminační metodou pomocí imunoadsorbentů vychytávány z krve člověka konkrétní proteiny (protilátky). K používaným imunoadsorbentům patří např. fenylalanin, tryptofan, stafylokokový protein A a ovčí protilátky proti lidským imunoglobulinům.

Imunoadsorpci lze provádět technikou afinitní chromatografie. Plazma je nejprve separátorem oddělena od krevních elementů a následně „čištěna“ od nežádoucích proteinů. Separátor se skládá ze 2 kolon s navázaným stafylokokovým proteinem A. Během opakovaných cyklů je vždy jedna kolona adsorbující a druhá je regenerována. Očištěná plazma je spolu s krevními elementy opět vrácena pacientovi.

Předpokladem pro takový postup je dostatek času na přípravu příjemce transplantovaného orgánu, tzn. že dárce orgánu musí být dopředu znám.

V ČR byla takto provedena např. transplantace ledviny fotbalistovi Petru Mikolandovi od jeho HLA-nekompatibilní matky (leden 2011).

Imunotolerance

V laboratorním měřítku a na laboratorních zvířatech dále existují postupy pro navození **imunotolerance vůči alogennímu štěpu** - orgánu přenesenému z jiného jedince. Tyto postupy jsou založeny na postupném podávání zprvu nízkých, postupně se zvyšujících množství antigenů dárce do těla příjemce (určitá obdoba desenzibilizační léčby, jak ji známe např. u senné rýmy). Tím se navozuje imunotolerance vůči antigenům dárce. Tento způsob však vyžaduje jednak předem známého dárce i příjemce, a navíc dlouhý čas přípravné fáze před transplantací. Není tedy možné jej zatím realizovat při transplantacích orgánů ze zemřelých dárců.

Principy navození imunotolerance, tj. neodpovědávosti organismu na určitý typ antigenu, jsou však dále intenzivně studovány a to nejen v souvislosti s transplantacemi, ale i v souvislosti se zhoubným dělením buněk - tzv. „**Cancer immunoeediting concept**“ (koncept imunitního upravování rakoviny).

Koncept imunitního upravování rakoviny vznikl při studiu mechanismu, jakým dochází k potlačení vzněšku dodaného tumoru. Mechanismus se spouští poté, co došlo k buněčné transformaci a mechanismy vnitřního potlačení tumoru selhaly. U imunoeeditingu rakovinného bujení můžeme rozlišit tři fáze: **eliminace, rovnováha a únik**.

V eliminační fázi pracují složky vrozené a získané imunity společně na odstranění tumoru dlouho před tím, než dojde ke klinickým projevům tumoru. Je-li tato fáze dovršena, hostitel zůstává bez postižení.

Jestliže však některé neobvyklé - vzácnější varianty rakovinných buněk nejsou během eliminační fáze zničeny, mohou vstoupit do tzv. **fáze rovnováhy**, v níž je imunologickými mechanismy brzděno jejich rozrůstání. K udržování rakovinných buněk ve stavu nečinnosti, dormance, jsou zapotřebí T lymfocyty, IL-12, a IFN- γ , zatímco přirození zabíječi (NK buňky), molekuly účastníci se rozpoznávání (protilátky) a efektorové funkce buněk vrozené imunity se nijak neúčastní. To naznačuje, že fáze rovnováhy je jen záležitostí získané imunity. Ve fázi rovnováhy se odehrává upravování a modifikace imunogenecity tumoru. Může dojít k tomu, že upravování imunogenecity se stane i konečnou fází tumoru, a že rozrůstání přfležitostně rakovinných buněk je potlačováno po celý zbytek života hostitele.

Následkem neustálého selekčního tlaku vyvíjeného na geneticky nestabilní nádorové buňky ve fázi rovnováhy s okolím se může stát, že:

- nádorové buňky přestanou být rozeznávány systémem získané imunity (varianty - buď úplná ztráta antigenu, a nebo nádorové buňky jsou příčinou chyb ve zpracování antigenu nebo jeho prezentaci),

- nádorové buňky se stanou necitlivými k imunitním efektorovým mechanismům nebo
- nádorové buňky navodí imunosupresivní stav ve svém mikrookolí. Právě tyto nádorové buňky mohou pak vstoupit do fáze **poslední - fáze úniku**, ve které jejich rozrůstání už není blokováno imunitním systémem. Tyto nádorové buňky se pak vynořují a působí klinicky pozorovatelné nádorové onemocnění.

Využití protilátek a fúzních proteinů v moderní terapii

Nežádoucí účinky dosavadních imunosupresiv vedly k vývoji imunosupresiv ze skupiny **tzv. biologických léčiv**. Vývoj v této oblasti pokročil zejména poté, co se začalo dařit překonávat úskalí spojená s imunitními reakcemi proti léčivům proteinové povahy, kam patří i protilátky a fúzní proteiny. Nové biologické látky úplně změnilly tradiční postupy v transplantační medicíně.

V této kapitole jsou uvedena některá novější léčiva z této kategorie biologických léčiv, která jsou dnes použitelná především pro fázi udržovací imunosuprese.

U názvů těchto léčiv se používá následující terminologie:

- všechny monoklonální protilátky končí příponou „-**mab**“ (viz kap. 3.4.)
- fúzní proteiny pak příponou „-**cept**“.

Tradiční protilátky se podávají zpravidla s cílem vyvolat **nеспецифické odstranění T-lymfocytů** pomocí polyklonálních protilátek nebo monoklonálních protilátek typu OKT3 (viz dále)

Nová generace biologických látek však cíleně, vysoce specificky potlačuje nežádoucí imunitní reakce a umožňuje udržovací imunosupresi. Dlouhodobá biologická léčba je možná hl. díky humanizaci protilátek, u kterých imunogenicita téměř vymizela i po dlouhodobém užívání. Typickým představitelem této nové generace bioléciv je blokátor kostimulace T lymfocytů – belatacept (viz dále).

Terapeutické využití polyklonálních protilátek

Připravují se nejčastěji ze séra králíků nebo koní, imunizovaných lidskými lymfocyty odebranými z thymu. Nejvíce používané jsou anti-thymocytární (ATG®) a anti-lymfocytární globuliny (ALG®).

V organismu pacienta po transplantaci se ATG váží na velké množství povrchových molekul aktivovaných lymfocytů. Taktéž opsonizované lymfocyty jsou lýzovány (prostřednictvím komplementu nebo prostřednictvím Fc receptoru). Dalším pozitivním účinkem je schopnost ATG zvyšovat tvorbu regulačních T lymfocytů, které jsou schopny potlačit funkci efektorových T lymfocytů zodpovědných za rejekci.

Používají se v indukční fázi a u závažných vaskulárních rejekcí. Mají však celou řadu nežádoucích účinků: zvýšený výskyt infekcí, anafylaktické reakce, riziko malignit, sérovou nemoc, leukopenii, trombocytopenii.

Terapeutické využití monoklonálních protilátek a fúzních proteinů

Blokují cíleně určité receptory na aktivovaných lymfocytech. V klinické praxi jsou nejvíce rozšířeny následující monoklonální protilátky:

anti CD 25 – proti receptoru pro IL-2. IL-2 se vyskytuje na lymfocytech a je důležitým proliferčním regulátorem. Anti CD 25 - daclizumab (**Zenapax®**) a basiliximab (**Simulect®**) - je humanizovaná protilátka vážící se na α řetězec receptoru IL-2a, a blokuje tak klonální expanzi aktivovaných lymfocytů.

anti CD 3 – proti koreceptoru T lymfocytů. CD 3 je membránový protein T lymfocytů kovalentně vázán s TCR. Při vazbě TCR s antigenem zesiluje koreceptor CD3 aktivační signál a to vede k proliferaci T lymfocytu. Muromonab-CD3 (**Orthoclone OKT3®**) je myší protilátka blokující funkci CD 3 koreceptoru. Je první klinicky používanou monoklonální protilátkou (od r. 1987). Používá se v léčbě akutních rejekcí. Má řadu nežádoucích vedlejších účinků, především intenzivní uvolňování cytokinů (cytokine release syndrom).

anti CD 20 – proti povrchovému znaku B lymfocytů (resp. jejich prekurzorů). Vysoce afinitní protilátka (obchodní název **Rituximab®**) se využívá především pro léčbu akutní rejekce, doprovázené uvolňováním protilátek např. po transplantaci ledvin.

anti CD 52 – humanizovaná protilátka **Alemtuzumab®,** namířená proti glykoproteidu CD 52, exprimovanému především makrofágy, NK buňkami a lymfocyty (je přítomen pouze na zralých T-lymfocytech, ale ne na zárodečných kmenových buňkách, proto se používá pro léčbu chronické lymfocytární leukémie (CLL). Protilátka má na dané buňky silné depleční účinky (snížení počtu).

Blokáda kostimulace CD28/B7 – **Belatacept®,** fúzní protein tvořený Fc fragmentem lidského IgG1 vázaného na protein CTLA4 (velmi podobný CD28): Pro trvalou aktivaci naivních T-lymfocytů je důležitá kostimulace neboli druhý signál. V mnoha modelech mechanismu transplantace nebo autoimunitní reaktivity je velmi důležitá signální cesta mezi receptorem CD28/B7 lymfocytů (*kap. 2.4.1., obr. 2.13*). Belatacept se váže na B7 (také označován jako CD80/CD/86) a tím kostimulaci blokuje. Jen o 2 aminokyseliny se od belataceptu liší další fúzní protein **Abatacept®**, který má podobné účinky a byl schválen pro léčbu revmatoidní artritidy.

Mnoho látek ze skupiny biologických léčiv bylo původně vyvinuto právě pro transplantace, ale nakonec tyto látky prokázaly svou účinnost v jiných indikacích, než v transplantologii.např.:

Rituximab® (antiCD20) - schválen FDA²⁷ pro léčbu revmatoidní artritidy, **Alemtuzumab®** (antiCD52) - schválen FDA pro léčbu chronické lymfatické leukémie - CLL).

Abatacept® (antiCD80/86) - schválen pro léčbu revmatoidní artritidy

4.2. Biomedicína a personalizovaná léčba

4.2.1. Co je to biologická léčba?

Biologickou léčbou rozumíme podávání látek různého složení a mechanismu účinku, které **zasahují do imunitních a zánětlivých dějů**, provávějících vznik a vývoj léčených

²⁷ Food and Drug Administration, Americký úřad pro potraviny a léky

chorob. Látky používané v biologické léčbě se nazývají **modifikátory imunitní odpovědi** nebo také **biologická léčiva (bioléčiva)**.

Biologická léčba, označována také jako **cílená léčba**, využívá obranyschopnosti organismu k boji proti autoimunitním a onkologickým onemocněním. Rozmach biologické léčby byl iniciován především vývojem poznatků v oblasti molekulární biologie buňky (povrchové molekuly, buněčná signalizace). Vědci nacházejí takové molekuly a pochody, které jsou specifické pouze pro buňky spojené s konkrétním nádorovým nebo autoimunitním onemocněním a v buňkách normálních tkání se buď nevyskytují vůbec, nebo jen v malé míře. Léčiva v rámci **této cílené biologické léčby** působí pouze na tyto molekuly a pochody a posilují či opravují schopnost sebeobranu organismu.

Proto u biologické léčby velmi záleží na přesné diagnostice onemocnění. Např. u onkologické terapie je nutné správně typizovat nádor a jeho růstovou fázi. Běžné histologické metody proto při typizaci doplňují stále více **molekulárně biologické metody**.

I když je doprovází rovněž řada nežádoucích účinků, ve srovnání s klasickou léčbou je jich daleko méně a méně významných.

Biologická léčba našla uplatnění v řadě lékařských oblastí:

- v alergologii, revmatologii a imunologii (revmatoidní artritida, juvenilní idiopatická artritida, psoriatická artritida, Bechtěrevova nemoc)
- gastroenterologii (léčba idiopatických střevních zánětů, tj. Crohnovy choroby, ulcerózní kolitidy a léčba kolorektálního karcinomu),
- hepatologii a urologii (po transplantaci jater, ledvin)
- dermatologii (psoriasis vulgaris)
- onkologii.

Nejrychleji získává biologická léčba uplatnění právě **v onkologii**. Mezi nádory, které je možné léčit pomocí biologické léčby, patří např.: nádory ledvin, prostaty, tlustého střeva, plic, prsu, nádory ženských pohlavních orgánů, melanom, a Kaposiho sarkom.

K dalším chorobám, které je možné léčit pomocí biologické léčby patří např.: Alzheimerova choroba, systémový lupus erytematos, pacienti po transplantaci jater a některé nežádoucí účinky protinádorové léčby.

4.2.2. Charakteristika látek používaných v biologické léčbě

Látky používané v biologické léčbě se nazývají modifikátory imunitní odpovědi. Většinou jsou to látky, které lidské tělo normálně vyrábí. Pro účely cílené léčby nádorů a autoimunitních chorob jsou však tyto látky vyrobeny mimo tělo - in vitro - a tělu dodávány. U některých typů biologické léčby se naopak podávají ke snížení nežádoucích účinků, které mohou nastat po použití jiných typů protinádorové terapie.

Tzv. **bioléčiva** neboli **biologická terapeutika** jsou látky **biologické povahy**. Biologickou povahou se přitom rozumí dva různé aspekty:

- bioléčiva jsou **organické makromolekuly** (charakteru bílkovinného, ale i charakteru DNA, lipopolysaharidů apod.)
- bioléčiva jsou získána **jinou než klasickou cestou syntetické chemie** nebo izolací látek z rostlinného (biologického) materiálu. Biologická terapeutika jsou získávána z biologického materiálu **většinou rekombinantní technologií**.

K biologické léčbě se podle FDA řadí také **terapeutická séra, toxiny, antitoxiny, produkty virů, bakterií a kvasinek** nebo jiných usmrcených či živých mikroorganismů.

Bioléčiva sdružují velmi různorodou skupinu látek s různým mechanismem účinku. Konkrétně se k biologickým léčivům řadí:

- blokátory angiogeneze
- inhibitory proteazomu, inhibitory tyrozinkinázy, inhibitory cytokinů,
- monoklonální protilátky,
- antagonisty různých receptorů a koreceptorových molekul
- růstové faktory,
- interferony a interleukiny,
- protinádorové vakcíny
- genová terapie

4.2.3. Základní mechanismy účinku bioléčiv

Antiangiogenní léčba (inhibice angiogeneze)

Tento druh biologické léčby využívaný v onkologii není cílený na nádorové buňky, ale na cévy, které nádor vyživují. Pokud dosáhne nádor určité velikosti a jeho buňky potřebují více živin a kyslíku, začne produkovat **vaskulární endoteliální růstový faktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)**, který aktivuje příslušný receptor a jeho signální kaskádu v endotelových buňkách. Protože však chybějí další faktory, jež by řídily vznik fyziologicky normální cévní sítě, je nádorová vaskulatura morfologicky i funkčně pozměněná - defektní. Mezi jednotlivými endotelovými buňkami zůstávají mezery, kterými do mezibuněčného prostoru unikají bílkoviny, což vede ke zvýšení mezibuněčného tlaku. Důsledkem je pak ztížené pronikání jiných látek včetně léků k nádorovým buňkám. Na druhé straně to usnadňuje průnik jednotlivých nádorových buněk do cév, což zvyšuje riziko metastáz. Při blokadě signální dráhy VEGF je brzděna tvorba cév v nádoru a dochází ke zpomalení či zastavení jeho růstu. Zároveň však může dojít i ke zpomalení růstu nových kapilár v organismu, což je podstatou nežádoucích účinků tohoto typu léčby.

Existují dvě skupiny antiangiogenních léků:

- Inhibitory tyrosinkinázy receptoru VEGF - uvnitř buňky blokují přenos signálu z receptorů na další molekuly signální kaskády a zpravidla současně blokují i jiné receptory v nádorové buňce
- Látky, které se váží přímo na VEGF a tím znemožňují aktivaci receptoru.

Příkladem antiangiogenních léků jsou např. bevacizumab, sorafenib, sunitinib, nebo temsirolimus.

Inhibice proteazomu

Proteazomy jsou buněčné organely, jejichž funkcí je odbourávání signálních molekul, které již předaly signál a mají být zničeny. Inhibitor specifického proteazomu brání odbourávání těchto signálních molekul, v buňce dochází k signálnímu chaosu a buňka zaniká. Inhibitorem proteazomu je např. **bortezomib**.

Inhibice tyrozinkinázy

Buňky přijímají z okolí signály prostřednictvím povrchových receptorů. Po přijetí signálu receptorem je aktivován enzym tyrozinkináza na vnitrobuněčné části receptoru a jeho prostřednictvím je signál předáván dále do buňky. Inhibitory tyrosinkinázy blokují tento enzym a tedy i přenos signálu dále do buňky. Buňka, která nemůže přijímat signály ze svého okolí přestává růst a hyne. Existuje mnoho druhů receptorů, jejichž tyrozinkináza se liší. Specifické léky mohou blokovat tyrozinkinázu jednoho druhu receptoru nebo několika málo druhů receptorů a neblokují příjem signálů jinými receptory. Příkladem blokátorů tyrozinkinázy jsou **erlotinib**, **imatinib** **mesylat** nebo **lapatinib**.

Diferenciační léčba

Diferenciací se nazývá zrání buňky se získáváním určitých funkcí, které je však spjata se ztrátou schopnosti buněčného dělení. Tento proces zabraňuje nekontrolovanému růstu buněk v organismu, a zajišťuje tak rovnováhu.

Totéž do jisté míry platí i pro nádorové buňky. Čím je nádorová buňka podobnější diferencované buňce příslušného orgánu, tím nižší bývá její schopnost dělit se a vytvářet metastázy (tím méně je zhoubná). Diferenciační léčba je založena na podpoře tohoto vyzrávání, takže nádorové buňky dozrají a ztrácejí schopnost se dále dělit. Proces buněčné diferenciace a tím omezení růstu nádorů ovlivňují látky ze skupiny retinoidů, např. **bexarote**, **tretinoin** nebo **kyselina α trans retinová**.

Inhibice TNF- α

TNF- α (tumor nekrotizující faktor, starší název kachektin) je **dominantním prozánětlivým cytokinem**. Je produkován zejména makrofágy a aktivuje řadu dalších imunitů (granulocyty, cytotoxické buňky a další makrofágy). TNF- α zvyšuje produkci dalších cytokinů, ničí buňky, aktivuje apoptózu a má výrazné systémové účinky (např. horečka, angiogeneze).

Hraje klíčovou úlohu v patogenezi zánětlivých procesů, proto se především u revmatických onemocnění, gastroenterologii a kožním lékařství používají protilátky proti TNF- α , které tlumí negativní destrukční změny, doprovázející zánět.

Léčba monoklonálními protilátkami

Základní přehled o využití monoklonálních protilátek v imunopresivní léčbě byl podán v **kapitole 4.1.3**.

Na využití protilátek mohou být založeny i některé **metody genové terapie**. Genová terapie je zatím pouze experimentální typ léčby, která opravuje přímo poškozené geny způsobující nádorové bujení, případně tyto poškozené geny vyřazuje z funkce.

Protilátky a genová terapie

Nádorové buňky, buňky přilehlé k nádoru a progenitory efektorových buněk nebo i diferencované efektorové buňky mohou být geneticky modifikovány k tomu, aby expihovaly různé typy proteinů strukturně podobných protilátkám. Postup začíná přípravou rozpustných protilátek - mohou to být např. fragmenty monospecifických protilátek proti buněčným povrchovým receptorům, růstovým faktorům, nebo proti proteinům extracelulární matrice, nebo fragmenty bispecifických protilátek schopné přeměrovávat nebo ze-

silovat aktivitu efektorových buněk proti buňkám nádorovým tím, že se jednou doměnou váží na antigeny spojené s nádorovými buňkami a druhou doměnou na aktivační vazebná místa efektorových buněk.

Konečně, molekuly vázané k buněčným povrchům a obsahující protilátku se skládají vlastně ze dvou nástrojů současně: jednak z chimérického imunitního receptoru (typu protilátky) a jednak z umělého ligandu. Umělý ligand plní vlastně funkci snadno rozpoznatelného antigenu. Chimérický imunitní receptor (CIR), který se zanoří do buněčné membrány efektorové buňky, obsahuje rozpoznávací místo, transmembránovou podjednotku a signální molekulu pro vnitrobuněčného cytoplasmatického posla. Umělým ligandem je taková konstrukce, která se váže na cílové buňky, ale současně nese vysokou afinitu pro chimérický imunitní receptor.

Také v případě tzv. **intrabodies** (z angl. Intracellular a antibody) jsou využívány metody genové terapie. Intrabodies představují protilátky, které se váží na specifické intracelulární proteiny a tím mohou ovlivňovat buněčné procesy. Protože intrabody jako protein se vzhledem ke své velikosti nemůže za normálních okolností dostat do buňky, využívá se exprese daného proteinu přímo buňkou, která byla geneticky modifikována.

Antisense oligonukleotidy

Molekula deoxyribonukleové kyseliny (DNA) nese genetickou informaci o složení určité bílkoviny, kterou buňka potřebuje.

Tato genetická informace se z DNA překopírovává na jinou formu nukleové kyseliny – mRNA – a v ribozomech je tato informace z mRNA přetvořena do sekvence jednotlivých aminokyselin. Antisense oligonukleotidy jsou „protisměrnou“ kopií části vlákna mRNA, na kterou se navážou a znemožní její čtení a vznik bílkoviny.

Ostatní

Blokátory růstu – blokováním nežádoucích růstových faktorů snižují tyto přípravky schopnost nekontrolovaného růstu, který je pro nádorové buňky typický.

Růstové faktory – žádoucí růstové faktory napravují nepříznivé účinky klasické protinádorové léčby tím, že zvyšují tvorbu krevních elementů, například krvinek nebo destiček.

Protinádorové vakcíny – signalizují organismu přítomnost nádorových buněk nebo zabraňují rozvoji nádoru v budoucnu.

Antagonisté receptorů – u autoimunitních chorob zabraňují navázání signálních molekul na jejich receptory, čímž přeruší jejich účinek a zabrání následné nežádoucí reakci.

4.2.4. Přehled bioléciv podle oblasti terapeutického využití

Revmatologie

- Rituximab (Mabthera, Rituxan) je chimérická IgG1 monoklonální protilátka proti povrchovému znaku CD20, který je přítomen na pre-B lymfocytech a na zralých B lymfocytech. Původně byl přípravek vyvinut pro imunosupresi (kap. 4.1.3.), ale později našel uplatnění v revmatologii. Molekula CD20 je přítomna u více než 95% lymfomů, které vycházejí z B-lymfocytů. Rituximab se váže na tuto molekulu a slouží jako „signál“, který buňku označí. Takto označené nádorové buňky jsou pak napadány a zabí-

jeny vlastními buňkami imunitního systému. Proto byl rituximab primárně schválen pro léčbu nonhodgkinského lymfomu (CLL - chronická lymfocytární leukémie) a později i k léčbě revmatoidní artritidy v případech, kde selhala léčba nejméně jedním TNF- α blokujícím lékem.

V revmatologii, gastroenterologii a kožním lékařství se používají protilátky proti TNF- α , který je dominantním cytokinem v patogenezi zánětu:

- **Infliximab** (Remicade) - je chimérická monoklonální protilátka proti TNF- α . Lék je určen v gastroenterologii pro léčbu Crohnovy choroby a ulcerativní kolitidy.
- **Adalimumab** (Humira) monoklonální, plně humánní protilátka proti TNF- α . V současné době má indikaci pro revmatoidní artritidu (RA), psoriatickou artritidu (PsA) a ankylozující spondylitidu (AS).
- **Etanercept** (Enbrel)- fúzní protein složený ze dvou identických řetězců rekombinantního lidského TNF receptoru p75 (TNFR p75) fuzovaného s Fc doménou lidského IgG1. Etanercept soutěží s TNF- α v místě zánětu o vazbu na povrchové buněčné receptory (je kompetitivním inhibitorem vazby TNF- α) a blokuje tak biologickou aktivitu TNF- α .

Onkologická léčba – protilátková

V léčbě karcinomu tlustého střeva se používá:

- **Bevacizumab** (Avastin), humanizovaná monoklonální protilátka proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (VEGF).
- **Cetuximab** (Erbix) chimérická monoklonální IgG protilátka proti extracelulární části receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR).
- **Panitumumab** (Vectibix), monoklonální, plně humanizovaná IgG2 protilátka produkována savčí buněčnou linií (CHO) za pomoci rekombinantní DNA technologie

V léčbě karcinomu prsu se používá:

- **Trastuzumab** (Herceptin) – rekombinantní humanizovaná IgG1 protilátka proti receptoru HER2/NEU.²⁸ Využití má jen v léčbě HER-2 pozitivních nádorů prsu.
- **Bevacizumab** (Avastin), humanizovaná monoklonální protilátka proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (VEGF).

Některé další komerčně dostupné monoklonální protilátky pro protinádorovou léčbu:

- **Adecatumumab** (Cinvaxin) - rekombinantní plně humanizovaná monoklonální protilátka proti antigenu **CD326**, adhezni molekule na povrchu epitelálních buněk (Epithelial Cell Adhesion Molecule, EpCAM)
- **Alemtuzumab** (Campath) - rekombinantní plně humanizovaná monoklonální protilátka proti antigenu **CD52**, který je přítomen pouze na zralých T-lymfocytech, ale ne na zárodečných kmenových buňkách. Používá se proto k léčbě chronické lymfocytární leukémie. Zvyšuje však riziko infekcí, zejména virových, proto je zatím lékem druhé linie.
- **Gemtuzumab** (Mylotarg) monoklonální protilátka pro léčbu akutní leukémie, která však musela být v polovině r. 2010 stažena pro četné nežádoucí účinky a zvyšování úmrtnosti.

²⁸ HER-2/NEU je receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2, který je nadprodukovan (over-exprimován) v některých formách rakoviny prsu

Onkologická léčba nízkomolekulárními inhibitory proteinů

- **Imatinib, dasatinib, gefitinib, erlotinib** - inhibitory proteinů s tyrosinkinázovou aktivitou (TKI)
- **Lapatinib** - duální inhibitor EGFR a HER2/NEU
- **Pazopanib** - inhibitory VEGFR
- **Sunitini, sorafenib** - inhibitory multikináz
- **Lonafarnib, Zarnestra, Tipifarnib** - inhibitory farnesyltransferázy (farnesyl-transferase inhibitors, FTIs), které brání aktivaci Ras-proteinů²⁹ a které jsou studovány nejen pro léčbu nádorů, ale také jako aniparazitární léky proti *Trypanosoma brucei* (původce spavé nemoci) a *Plasmodium falciparum* (původce malárie), protože farnesyltransferázy těchto parazitů jsou mnohem citlivější k inhibici nežli lidské.
- **Rapamycin, temsirolimus, everolimus (Afinitor)** - inhibitory mTOR³⁰. Mezi přírodní inhibitory mTOR patří látky jako kofein, resveratrol a curcumin.
- **Geldanamycin** - inhibitory Hsp (heat shock proteins)³¹: Inhibice Hsp odvádí buňky z dráhy dělení na dráhu apoptózy.
- **Tamoxifen, ruboxistaurin** - inhibitory proteinkinázy C (PKC)³² Aktivace PKC spouští řadu buněčných procesů, závislých na typu buňky. Mezi substráty tohoto enzymu patří VEGF receptor
- **Bortezomib, carfilzomib** - inhibitory proteasomu.(také v případě inhibitorů proteasomu byly identifikovány čistě přírodní látky, které nejsou charakteru bílkovin: **lactacystin, salinosporamide A**, a další).

Imunosupresiva (viz kap. 4.1.3.)

Pro **transplantaci jater** se z biologické terapie užívá

- **Daclizumab** (Zenapax®) , humanizovaná monoklonální protilátka proti membránovému proteinu CD25. Používá se v transplantologii a testuje se i v autoimunitních onemocněních (sclerosis multiplex – viz dále).
- **Muromanab (Orthoclone OKT3)** - monoklonální protilátka proti povrchovému koreceptoru CD3 T lymfocytům
- **antilymfocytární sérum**

Léčba alergických onemocnění

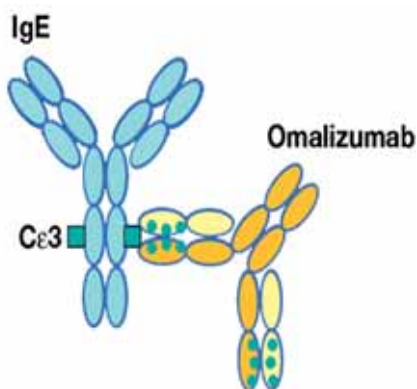
- **Omalizumab** - protilátka proti IgE (tělu vlastní protilátka). Omalizumab se váže na těžký řetězec IgE (**obr. 4.3.**) a tím brání jeho efektorové funkci na membránách mastocytů (žírných buněk) a eosinofilů.
- **Mepolizumab** - protilátka proti membránovému buněčnému receptoru pro interleukin IL-5. Vazbou na receptor brání aktivaci eosinofilů v kaskádě alergické reakce, i když množství IL-5 v krvi a ve tkáních narůstá.

²⁹ proteiny, které hrají důležitou roli v buněčné signalizaci; jsou kódovány protoonkogeny

³⁰ Mammalian Target Of Rapamycin - enzym ze skupiny kináz, který reguluje řadu buněčných procesů

³¹ proteiny tepelného šoku, podílející se na správném skládání proteinů; jsou také potřebné pro indukci růstového faktoru cévního endotelu (VEGF) a tedy pro angiogenezi

³² enzym ze skupiny kináz, zajišťující přenos fosfátu na protein



Obr. 4.3.a. - Epitop na C3 doměně těžkého řetězce IgE, vůči kterému je namířena humanizovaná monoklonální protilátka omalizumab. Stejná oblast imunoglobulinu IgE se s vysokou afinitou váže k α -řetězci receptoru pro IgE. Omalizumab této vazbě brání.

Zdroj: <http://qjmed.oxfordjournals.org/>



Obr. 4.3.b. - Léková forma protilátky Omalizumab - sterilní injekční přípravek

Zdroj: <http://www.pharmaceutical-technology.com>

Léčba roztroušené sklerózy (sclerosis multiplex)

- **Natalizumab (Tysabri)** - humanizovaná monoklonální protilátka proti povrchové adhezní molekule α 4 integrinu, který je potřebný pro migraci bílých krvinek do orgánů.
- **Daclizumab (Zenapax®)**, humanizovaná monoklonální protilátka proti membránovému proteinu CD25.

Léčba respiračních onemocnění

- **Palivizumab (Synagis)** - humanizovaná rekombinantní monoklonální protilátka proti respiračnímu viru (RSV - respiratory syncytial virus). Je využívána především v pediatrii, kde výrazně snižuje nutnost hospitalizace dětí nakažených RSV³³

³³ http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2002/palimed102302LB.pdf)

4.2.5. Nežádoucí účinky biologické léčby

Jako každá léčba, má i biologická léčba nežádoucí vedlejší účinky. Nejčastěji jsou však jen mírné a přetrvávají krátkou dobu. Z hlediska časového sledu můžeme nežádoucí účinky rozdělit na:

Infúzní, okamžité reakce nastupující v průběhu podání léčiva nebo bezprostředně po něm.

Reakce oddálené přecitlivělosti – nastupuje několik dní po podání léčiva

Nejčastější nežádoucí účinky:

- **Tzv. chřipkové příznaky** jsou nejčastějšími vedlejšími účinky při biologické léčbě. Zahrnují bolesti hlavy a svalů, horečku či třesavku.
- **Alergické reakce** mohou postihovat místo injekčního podání preparátu a pak se projevují otokem, vyrážkou, případně zarudnutím. Vzácně se po podání biologického léku může objevit celková těžká alergická reakce.
- Po dlouhodobém podávání látek, které se používají v léčbě autoimunitních chorob, může být **zvýšené riziko některých typů infekcí**.
- Ostatní nežádoucí účinky zahrnují **změny krevního tlaku, únavnost, nechutenství či zvracení**.

4.2.6. Centra biologické léčby

Vzhledem k tomu, že biologická léčba je drahá a že je třeba nemocné především správně diagnostikovat poměrně specializovanými metodami, je v České republice tato léčba soustředěna do specializovaných center biologické léčby, která vznikají pro jednotlivé obory (gastroenterologie, revmatologie, dermatologie aj.). Předností těchto center je praktická zkušenost s biologickou léčbou, jejími nežádoucími účinky, možnými komplikacemi a prognózou možného budoucího vývoje choroby.

V České republice je v současné době registrováno více než 60 center biologické léčby. V Olomouci se v rámci areálu Fakultní nemocnice v Olomouci (I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc) nachází následující centra:

- Komplexní onkologické centrum, lékař Prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.
- Hematoonkologické centrum, lékař Prof. MUDr. Karel Indrák, DrSc.
- Centrum pro revmatologická onemocnění, lékař Doc. MUDr. Pavel Horák, CSc.
- Centrum pro dermatologická onemocnění, lékař Doc. MUDr. Dagmar Ditrichová, CSc.

Více informací o biologické léčbě v České republice na:

<http://www.cilena-lecba.cz/home>

4.3. Registrace léčiv se zaměřením na přípravky obsahující monoklonální protilátky

4.3.1. Legislativa

Registrace léčivého přípravku je procedura, při které dochází **regulační autoritou**³⁴ k posouzení veškeré předložené dokumentace k danému léčivému přípravku. Úspěšné registrační řízení je ukončeno schválením přípravku a získáním **registračního výměru**, který je zásadním a nezbytným předpokladem pro uvedení přípravku na trh.

Registraci humánních léčivých přípravků uděluje v ČR **Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL www.sukl.cz) v Praze. Posuzuje 3 hlavní aspekty přípravku: **jakost, bezpečnost a účinnost.****

Při registraci je dále posuzováno, zda jsou předložené informace v souladu se současnými poznatky lékařské humánní vědy a s potřebami zdravotnictví a veterinární péče.

Legislativa v České republice

- Zákon č. 378/2007 Sb., o **léčivech** a o změnách některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů (zákon o léčivech) – platnost od 31.12.2007
- Vyhláška č. 228/2008 sb. o **registraci léčivých přípravků** – platnost od 1.7.2008
- **Nařízení Evropského společenství** (Evropského parlamentu a rady Evropy) č. 1394/2007 o **Léčivých přípravcích moderní terapie (LPMT)**

Registraci nepodléhají např. některé léčivé přípravky připravené v lékárně nebo na pracovištích, kde lze připravovat léčivé přípravky podle § 79 Zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech.

Legislativa v Evropské unii

V Evropské unii je **centrální regulační agenturou EMA (European Medicines Agency)**, která je zastřešujícím, dohlížecím, dozorčím a poradním orgánem pro národní regulační autority v EU. EMA koordinuje a harmonizuje laboratorní, výrobní, a klinické inspekční procedury a podílí se na přípravě, připomínkování a schvalování registračních pokynů. Je zodpovědná za posuzování a schvalování léčivých přípravků, které obsahují nové nebo inovativní léčivé látky a postupy, nebo jsou určeny pro zvláštní indikace.

V rámci Evropské Unie je vydávána řada předpisů, které mají různý stupeň závaznosti pro členské státy EU a rovněž odlišný stupeň právní síly (od zákona po doporučení).

- Regulations (nařízení) – jsou závazná pro všechny členské státy od stanoveného dne bez nutnosti implementace do národních legislativ
- Directives (směrnice) – jsou závazné pro všechny členské státy a musí být implementovány do národní legislativy
- Rules (pravidla), Guidelines (pokyny), Recommendations (doporučení) apod. – definují základní pravidla a principy pro provádění či plánování určitých činností

³⁴ existují národní regulační autority (v ČR Státní ústav pro kontrolu léčiv) a např. pro EU ještě centrální regulační agentura EMA

Čtyři základní typy registračních procedur v rámci EU

1. Centralizovaná procedura (CP) – jediná procedura, kterou je možno registrovat přípravky moderní terapie a přípravky obsahující monoklonální protilátky
2. Decentralizovaná procedura (DCP)
3. Procedura vzájemného uznávání (MRP)
4. Národní procedura (NP)

Pravidla podávání žádosti o registraci v EU

- Žádost o registraci podávají fyzické nebo právnické osoby („žadatel o registraci“).
- Registrace může být udělena pouze žadateli o registraci, který má stálou adresu na území některého z členských států
- V rámci EU je od 1.5.2004 povinný tzv. CTD formát dokumentace, který obsahuje 5 modulů.

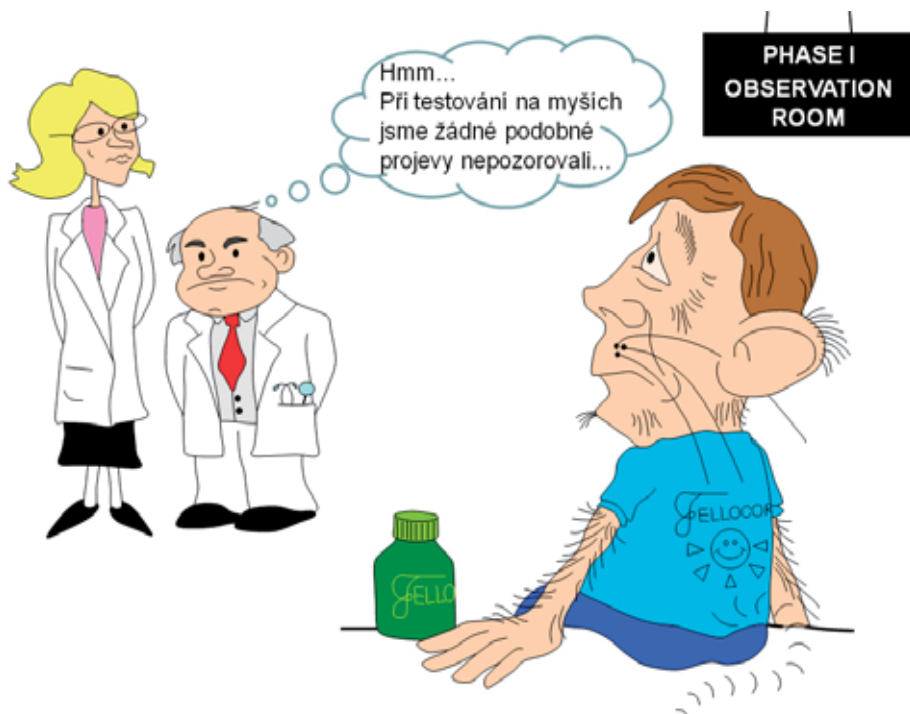
Země mimo EU se řídí vlastní legislativou.

4.3.2. Registrační dokumentace

- **Modul 1:** Administrativní údaje, doklady o farmaceutické firmě (doklady o dodržování Správné výrobní praxe), GMO, hodnocení vlivu na životní prostředí, návrhy textů Souhrnu údajů o přípravku, Příbalové informace pro pacienta, vnějších obalů (krabička, etiketa).
- **Modul 2:** Odborné zprávy expertů k farmaceutickým údajům o přípravku, preklinické dokumentaci a klinické dokumentaci.
- **Modul 3: Farmaceutická dokumentace**
 - ◇ **Dokumentace k léčivé látce** - obecné informace, výroba, specifikace, kontrola léčivé látky, referenční standardy, obal a systém uzavření, stabilita
 - ◇ **Dokumentace k léčivému přípravku** - popis a složení přípravku, farmaceutický vývoj, výroba, kontrola pomocných látek, kontrola konečného přípravku, referenční standardy, vnitřní obal a systém jeho uzavření, stabilita
- **Modul 4: Preklinická dokumentace:** Zahrnuje zkoušky in-vivo, in-vitro a zkoušky na zvířatech. Sleduje se zejména primární farmakologická aktivita léčivé látky, reakce na dávku a koncentraci dávky léčivého přípravku, potenciální způsoby aplikace (léková forma), farmakologie a farmakokinetika, toxikologie, genetická a reprodukční toxicita.
- **Modul 5: Klinická dokumentace:** Úplná klinická dokumentace se předkládá regulačním úřadům s cílem zaregistrovat novou molekulu. Takové přípravky označujeme jako „originální“ léčivé přípravky. Klinická studie je rozdělena do 4 fází:
 - ◇ **fáze klinického hodnocení – Human Pharmacology:** První podání léku člověku. Provádí se většinou na zdravých dobrovolnících a hlavním cílem je ověření výsledků preklinického hodnocení, to je ověření bezpečnosti, tolerance a chování léčiva.
 - ◇ **fáze klinického hodnocení – Therapeutic Exploratory:** První studie na pacientech. Průzkum terapeutické účinnosti, tedy hledání vhodné dávky a **cílové populace**.
 - ◇ **fáze klinického hodnocení – Therapeutic Confirmatory:** Průkaz účinnosti na cílové skupině pacientů, pro které bude lék registrován, stanovení profilu bezpeč-

nosti, tedy procento nežádoucích účinků. Často je vyžadováno (zejména regulační autoritou v USA), aby tato fáze probíhala v teritoriích, kde bude lék registrován.

- ♦ **fáze klinického hodnocení – Therapeutic Use:** Tato fáze probíhá po schválení přípravku ve schválené indikaci. Cílem je optimalizace použití, např. upřesnění dávkování.



U tzv. generických přípravků³⁵ se provádí **bioekvivalenční studie** (BE).

Smyslem BE studie je prokázání shodného působení dvou léčivých přípravků, originálního přípravku a generika (kopie originálu) obsahující stejné množství stejné účinné látky.

Bioekvivalenční studie jsou prováděny s cílem prokázat porovnáním farmakokinetických vlastností generických (testovaných) léčivých přípravků jejich terapeutickou srovnatelnost s originálním (referenčním) přípravkem. Tvoří v rámci klinického hodnocení specifickou skupinu a nelze je jednoznačně zařadit do žádné z typických fází klinického hodnocení. Klinické hodnocení v případě bioekvivalenčních studií je většinou prováděno na zdravých dobrovolnících a bývá nejčastěji jednorázové nebo krátkodobé.

³⁵ generický lék je odvozený z originálního léku, založený na stejné účinné látce

Změny v registraci

Vzhledem k tomu, že vědecký pokrok zasahuje do všech oblastí, včetně laboratorních metod, výrobních postupů apod., není dokumentace o léčivých přípravcích neměnná a neustále se vyvíjí a mění. Každá změna v registrační dokumentaci musí být předložena regulační autoritě, která ji buď pouze vezme na vědomí a firma tuto změnu implementuje do své dokumentace a výroby, nebo je změna posuzována regulační autoritou a následně schválena.

4.3.3. Příklad klinického hodnocení nové monoklonální protilátky a poučení z chyb

V roce 2006 byl ve Velké Británii testován **nový lék proti artritidě, leukémii a roztroušené skleróze** označovaný jako **TGN1412**. Testovaná protilátka patřila do třídy IgG4, jednalo se o humanizovanou monoklonální protilátku proti povrchovému receptoru CD28. Látka byla vyvinuta za účelem preferenční stimulace regulačních T-lymfocytů.

Dobrovolníci, na kterých byl lék zkoušen, se však dostali do přímého ohrožení života, takže další testování bylo okamžitě zastaveno a lék nemohl být nikdy uveden na trh. Průběh testování byl následující:

Preklinické hodnocení: Studie na laboratorních hlodavcích a na opicích (makak) neukazovaly na žádné vážnější známky toxicity.

I. fáze klinického hodnocení: 8 zdravých dobrovolníků

Randomizovaná, placebem kontrolovaná studie (někdo dostane injekci s léčivou látkou, někdo bez ní). Plánovaná doba sledování: 64 dní

Závažné nežádoucí účinky po prvním podání:

- **V prvních hodinách po podání:** bolest hlavy, bolest ve svalech (myalgie), horečnaté stavy (pyrexie), zvracení, otoky
- **Do 16 hodin:** problémy s dýcháním, infiltrace plic, plicní edém
- **Později:** cytokinová smršť, multiorgánové selhání, bezvědomí (jeden subjekt byl v bezvědomí 3 týdny)

Výsledky šokovaly lékaře i laickou veřejnou. Zkoušení bylo ihned zastaveno a byla ustanovena skupina 22 expertů s cílem, vyšetřit proč k tomu došlo.

Možné příčiny		výsledek
Kontaminace	Znečištění toxickou látkou (pyrogeny, mikroorganismy, křížová kontaminace).	Podezření, že došlo k chybě při výrobě nebo kontrole brzy vyvráceno, nebylo prokázáno žádné selhání farmaceutické firmy.
Chyba v dávkování	Subjekty obdržely vysokou dávku. Nesprávně vypočtená dávka, nesprávně připravená dávka, nesprávně podaná infúze	Dávku nebylo možno přesněji stanovit - pokusné osoby dostaly asi 500x nižší dávku než dávky, která by podle výsledků preklinického hodnocení byla nebezpečná pro makaky.
Chyba ve formulaci nebo při ředění	Nesprávně stanovená potence nebo nesprávné ředění na správnou koncentraci	Nebylo prokázáno.
Nový, neznámý biologický účinek	Dříve neznámý biologický účinek na člověka, který se neprojevil v žádné fázi testování na zvířatech.	?
Idiosynkratická reakce	Reakce vysoké citlivosti	?

Pátání v minulosti: stalo se něco podobného?

Rok 1985 - **Látka anti-CD3** (Orthoclone/OKT3)

Klinická praxe prokázala, že látka je účinná, ALE také velmi těžce snášena.

Další nevýhodou byla nutnost podávat současně vysoké dávky prednisolonu, idiosynkratická reakce (nadměrná citlivost) a vysoká imunogenecita (přičítána myšímú původu). Poprvé byl tehdy popsán **syndrom vysokého uvolňování cytokinů (cytokinová smršť)**

Pátání v laboratoři: stalo se něco zvláštního při testování TGN1412 na buňkách *in vitro*?

Přidání látky TGN1412 k PBMC (peripheral blood mononuclear cell) ani k plné krvi nestimulovalo uvolňování cytokinů, ani proliferaci lymfocytů.

Dramatický nežádoucí účinek nemůže být vysvětlen prostým navázáním protilátky TGN1412 na povrchový receptor CD28.

Pátání v laboratoři: můžeme udělat ještě nějaké jiné testy při testování TGN1412 na buňkách *in vitro*?

Pokus s TGN1412:

Rozpustná látka	Buněčná kultura PBMC, T-buněk, plná krev	Žádný efekt
Látka ukotvená na nosiči	Buněčná kultura PBMC, T-buněk, plná krev	Cytokinová smršť

Závěr:

Možné příčiny fatálních výsledků I. fáze klinického hodnocení:

- Podcenění rozdílu mezi opičím a lidským receptorem CD28
- Podcenění rozdílu v reaktivitě lidského a opičího imunitního systému (protilátka se na buňky makaků váže slaběji)
- Vyšší reaktivita lidských T-lymfocytů
- U lidí se molekuly CD28 vyskytují nejen na T-lymfocytech, ale také na eozinofilech a neutrofilech
- Na rozdíl od hlodavců a opic (ne-primátů) dochází u člověka in vivo k zesílení (nebo dimerizaci) volných molekul rozpuštěné látky, což má za následek prudkou cytokinovou smršť.
- Reakce imunitního systému zdravého jedince je odlišná od reakce u zvířete, ale také od reakce imunitního systému nemocného

Přesný mechanismus toxicity látky TGN1412 není dodnes znám. **Tragické následky tohoto testu však ihned iniciovaly návrh směrnice pro I. fázi klinického hodnocení** a již v únoru 2007 byla zavedena přísná opatření pro schvalování klinických zkoušek při prvním podání léku člověku s cílem minimalizovat rizika (např. postupné podávání léku subjektům, důraz na určení skutečně bezpečného množství při první dávce aj.)

Zvláštní pozornost musí být věnována novým přípravkům, pro něž primární farmakologický účinek nemůže být prokázán na zvířecím modelu.

RNDr. Aleš Vrána
RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D.
RNDr. Jarmila Vránová

Imunologie a imunomodulační terapie

Výkonný redaktor: Prof. RNDr. Tomáš Opatrný, Dr.
Odborný redaktor: RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D.
Odpovědná redaktorka: Mgr. Jana Kreiselová
Technický redaktor: Books print s.r.o., I.P.Pavlova 69, Olomouc 772 00,
www.booksprint.cz

Návrh obálky: Vlastislav Bič

Publikace je určena jako vzdělávací materiál pro účastníky projektu
Od fyziologie k medicíně – integrace vědy, výzkumu odborného vzdělávání a praxe
(CZ.1.07/2.3.00/09.0219)

© Univerzita Palackého v Olomouci, 2011
Křížkovského 8, 771 47
www.upol.cz/vup
e-mail: vup@upol.cz
Olomouc 2011

Neoprávněné užití tohoto díla je porušením autorských práv a může zakládat občanskoprávní, popř. trestněprávní odpovědnost.

Tato publikace neprošla redakční jazykovou úpravou.
© Aleš Vrána, Ivana Fellnerová, Jarmila Vránová 2011

1. vydání

ISBN 978-80-244-2748-5

Neprodejné

Teva Czech Industries s.r.o.,
Opava-Komárov

Katedra zoologie, Přírodovědecká
fakulta UP Olomouc



VYDALA UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI 2011
ISBN 978-80-244-2748-5