

*Dagmara Mirowska, Aleksandra Paż, Janusz Skierski,
Mirosława Koronkiewicz, Jacek Zaborski, Wojciech Wicha,
Andrzej Członkowski, Anna Członkowska*

Cytometryczna analiza zmian parametrów profilu immunologicznego we krwi obwodowej chorych na stwardnienie rozsiane. 12-miesięczna obserwacja podczas leczenia preparatem copaxone

II Klinika Neurologiczna Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie
Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Akademii Medycznej w Warszawie
Samodzielna Pracownia Cytometrii Przepływowej Instytutu Leków w Warszawie

Streszczenie

Stwardnienie rozsiane (s.r.) jest przewlekłą chorobą demielinizacyjną ośrodkowego układu nerwowego, prawdopodobnie o etiologii autoimmunologicznej. Jak do tej pory nie dysponujemy skutecznymi metodami leczenia tej choroby. Jednym z preparatów budzącym coraz większe zainteresowanie jest preparat copaxone (octan glatirameru), chociaż mechanizm jego działania nie został jak do tej pory jednoznacznie wyjaśniony. Celem naszego badania było określenie czy roczna terapia glatiramerem wywołuje zmiany w zakresie parametrów profilu immunologicznego krwi obwodowej u chorych na stwardnienie rozsiane. Badanie przeprowadzono z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej.

Summary

Multiple sclerosis (SM) is a chronic demyelinating central nervous system disease, probably of autoimmune origin. Up till now there is no specific treatment for SM. Copaxone (glatiramer acetate) is one of the drug of great interest however its mechanism of action remains not fully known. The aim of our study was to evaluate if one-year glatiramer therapy affects immune parameters of peripheral blood in MS patient. The analysis was carried out using two-colour flow cytometry.

Wstęp

Stwardnienie rozsiane (s.r.) jest przewlekłą chorobą demielinizacyjną, w której zmiany patologiczne, choć zlokalizowane w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), prawdopodobnie biorą swój początek we krwi obwodowej. Z nieznanych dotąd przyczyn, prawdopodobnie w reakcji na jakieś antygeny wirusowe dochodzi do całego łańcucha reakcji immunologicznych, prowadzących m.in. do uszkodzenia bariery krew-mózg oraz produkcji przeciwciał przeciwko antygenom mielinowym. Ze względu na kluczowy udział odpowiedzi immunologicznej w niszczeniu mieliny s.r. jest zaliczane do kręgu chorób autoimmunologicznych.

Jak dotąd nie ma skutecznego leczenia przyczynowego s.r. Grupą preparatów, które choć nie leczą choroby to jednak mogą korzystnie wpływać na jej przebieg

i hamować postęp niesprawności u pacjentów z s.r. są środki immunomodulujące. Należą do nich między innymi interferony oraz budzący coraz większe zainteresowanie octan glatirameru (Johnson i wsp. 1998, Tselis i Lisak 1999). Wprowadzenie tego leku zawdzięczamy pracom prowadzonym przez Arnona i Selę od wczesnych lat 90. (Arnon i wsp. 1996). Skuteczność glatirameru została potwierdzona w badaniach klinicznych (Bornstein i wsp. 1987, Johnson i wsp. 2000)

Ze względu na swój skład lek ten wykazuje podobieństwo do zasadowego białka mieliny (MBP – myelin basic protein), które jest jednym z docelowych miejsc „ataku” komórek immunologicznych w s.r. (Neuhaus i wsp. 2001). Mimikra antygenowa między MBP i glatiramerem warunkuje reakcje krzyżowe z przeciwciałami monoklonalnymi i limfocytami T skierowanymi przeciwko MBP. Jednym z proponowanych mechanizmów działania glatirameru jest hamowanie aktywności limfocytów T swoistych dla białek mieliny. Początkowo uważano, że dotyczy to tylko odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko MBP (Wolinsky 1995). Ostatnie badania wykazały jednak podobne działanie glatirameru w odniesieniu do białka proteolipidowego (PLP – proteolipid protein) i glikoproteiny mieliny oligodendrocytów (MOG – myelin oligodendrocytes glycoprotein). Mechanizm ten opiera się na hamowaniu łączenia lub usuwania z miejsc wiązania białek mieliny z antygenami układu HLA (DR2, DR4 – ich udział postuluje się w etiopatogenezie s.r.) na powierzchni komórek prezentujących antygen (Gran i wsp. 2000).

Uważa się również, że korzystne działanie glatirameru w s.r. jest wynikiem wpływu na komórki układu immunologicznego – limfocyty T ($CD4^+$). Powołując się na uproszczony model można założyć, że dzielą się one na dwie subpopulacje: limfocyty Th1 i Th2, które wydzielają cytokiny o działaniu pro- i przeciwzapalnym. Cytokiny wytwarzane przez komórki Th2 stymulują uruchomienie kaskady mechanizmów przeciwzapalnych i rozejście się procesu zapalnego (Miller i wsp. 1998). W warunkach fizjologicznych między aktywnością limfocytów Th1 i Th2 istnieje stan równowagi dynamicznej. Stwardnienie rozsiane powoduje zaburzenie tego układu z nadmierną aktywacją limfocytów Th1. Badania wykazały, że glatiramer przywraca właściwe proporcje poprzez zwiększenie aktywności populacji Th2 (Neuhaus i wsp. 2000). Komórki te dzięki produkowanym cytokinom (IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β) hamują działanie czynników prozapalnych wydzielanych przez limfocyty Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ i TNF- α) oraz ograniczają powstawanie reakcji nadwrażliwości typu późnego (Milo i Panitch 1999). W badaniach prowadzonych na szczurach odnotowano również, że aktywność komórek Th2 indukowana w odpowiedzi na podanie GA ma działanie neuroprotektyjne w doświadczalnym zmiążdżeniu nerwu wzrokowego. Wydaje się więc, że korzystny efekt GA jest związany nie tylko z działaniem cytokin o właściwościach neuroprotektyjnych (IL-4, TGF- β), ale także z uwalnianiem czynników neurotroficznych, takich jak czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF – brain-derived neurotrophic factor). Poza tym uważa się, że preparat zwiększa aktywność supresorowych limfocytów T ($CD3^+CD8^+$). Mają one zdolność do hamowania reakcji immunologicznej w odpowiedzi na MBP *in vitro*. Ta linia

komórkowa okazała się także odpowiedzialna za zahamowanie rozwoju EAE wywoływanego u myszy (Lea i Goa 1996). Dzięki powyższym mechanizmom glatiramer ogranicza rozprzestrzenianie i nasilenie odczynu zapalnego, który prowadzi do demielinizacji włókien nerwowych w ośrodkowym układzie nerwowym.

Celem pracy było określenie wpływu preparatu Copaxone na parametry profilu immunologicznego leukocytów krwi obwodowej u chorych na stwardnienie rozsiane w trakcie 12-miesięcznej obserwacji.

Material

Do badania zakwalifikowano 7 (2 mężczyzn, 5 kobiet) chorych na stwardnienie rozsiane o przebiegu zwalniająca. Średni wiek pacjentów wynosił 30 lat (zakres od 22 do 38 lat). Stopień niesprawności w skali EDSS (Expanded Disability Status Scale) czyli Skali Kurtzkiego mieścił się w granicach od 1,5 do 4,0 punktów. Wszyscy chorzy otrzymywali preparat copaxone przez okres 12 miesięcy codziennie w formie iniekcji podskórnych w standardowej dawce jednorazowej 20 mg.

Metoda

Od każdego pacjenta pobrano ok. 7 ml krwi obwodowej do heparynizowanych probówek (Sarstedt, Niemcy). Krew rozcieńczono w stosunku 1:1 roztworem soli fizjologicznej, a następnie nawarstwiono na preparat *Lymphoprep*[®] (Nycomed, Germany) w stosunku 3:1. W procesie wirowania (20 min 1200 obr/min) w gradiencie stężeń uzyskano zawiesinę monocytów i limfocytów. Stosując mysie antyludzkie przeciwciała monoklonalne (Becton Dickinson USA) sprzężone z odpowiednimi barwnikami fluorescencyjnymi (FITC – izotiocyjanianem fluoresceiny lub PE – fikoerytryną) oceniono następujące fenotypy komórkowe: CD3⁺CD19⁻ (limfocyty T), CD3⁻CD19⁺ (limfocyty B), CD3⁺CD4⁺ (limfocyty Th), CD3⁺CD8⁺ (limfocyty Ts), CD3⁻CD56⁺16⁺ (komórki NK), CD3⁺CD25⁺ (zaktywowane limfocyty T), CD19⁺CD25⁺ (zaktywowane limfocyty B), CD14⁺CD25⁺ (zaktywowane monocyty), CD14⁺CD86⁺ (monocyty z ekspresją cząstek kostymulujących), CD19⁺CD80⁺ (limfocyty z ekspresją cząstek kostymulujących), CD3⁺IL-4 (limfocyty T produkujące IL-4), CD14⁺IL-10 (monocyty produkujące IL-10), CD3⁺IL-10 (limfocyty T produkujące IL-10), CD3⁺IFN- γ (limfocyty T produkujące IFN- γ) oraz CD14⁺IL-12 (monocyty produkujące IL-12). Barwienia przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta (Becton Dickinson, USA, Pharmingen, USA) zawartymi w ulotkach dołączonych do przeciwciał. Badanie komórek wykazujących ekspresję antygenów różnicowania przeprowadzono przed rozpoczęciem terapii oraz po 3, 6, 9 i 12 miesiącach od włączenia leczenia, badanie komórek produkujących interleukiny wykonano przed leczeniem oraz po roku stosowania glatirameru.

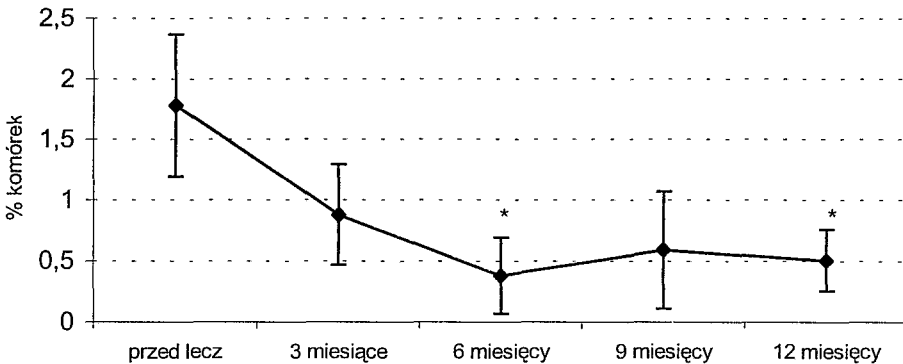
Analizę cytometryczną przeprowadzono za pomocą dwukolorowej cytometrii przepływowej wykorzystując aparat Vantage (Becton Dickinson, USA) stosując program komputerowy CellQuest (Becton Dickinson, USA).

Uzyskane wyniki poddano obróbce statystycznej z wykorzystaniem programu Statistica (StatSoft). Przeprowadzono analizę wariancji dla wyników powtarzalnych, a następnie test post-hoc typu najmniejszych istotnych różnic (NIR). Za istotne statystycznie uznano $p=0,05$.

Wyniki

W trakcie stosowania octanu glatirameru odnotowano znamienne statystycznie zmiany w zakresie odsetka komórek $CD19^+CD80^-$ ($p=0,03$), komórek $CD14^+CD86^+$ ($p=0,00$) oraz $CD14^+CD25^+$ ($p=0,03$).

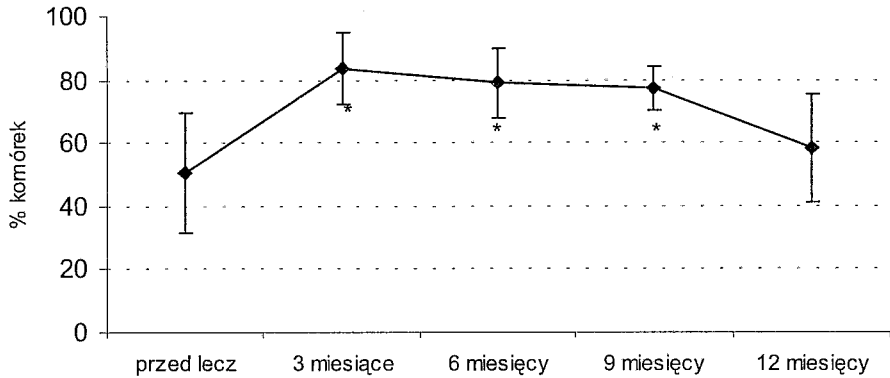
W teście NIR po 6 i 12 miesiącach leczenia stwierdzono istotne zmniejszenie odsetka komórek $CD19^+CD80^+$. Wyjściowo wynosił on średnio $1,13 \pm 0,46$, po 6 miesiącach $0,38 \pm 0,31$ ($p=0,01$), a po 12 miesiącach $0,51 \pm 0,25$ ($p=0,01$) (rys. 1).



Rysunek 1. Zmiany odsetka komórek o fenotypach $CD19^+CD80^+$ u chorych na stwardnienie rozsiane w trakcie 12-miesięcznej terapii octanem glatirameru
* $p < 0,05$ w porównaniu z okresem sprzed terapii

Zaobserwowano jednocześnie znamienne statystycznie wzrost odsetka komórek $CD14^+CD86^+$ po 3, 6 i 9 miesiącach terapii. Wartość początkowa monocytów z ekspresją cząstek kostymulujących wynosiła średnio $50,70 \pm 18,99$, po 3 miesiącach kuracji $83,42 \pm 11,36$ ($p=0,00$), po 6 miesiącach $78,86 \pm 10,97$ ($p=0,00$) i 9 miesiącach $77,22 \pm 7,02$ ($p=0,00$). Jednak już po 12 miesiącach leczenia galtiramerem uzyskano spadek odsetka tych komórek ($58,07 \pm 17,09$), który osiągnął wartość porównywalną z wartością wyjściową czyli tą przed leczeniem (rys. 2).

Odsetek komórek o fenotypie $CD14^+CD25^+$ (zaktywowanych monocytów) to przed terapią średnio $0,45 \pm 0,39$, a po 12 miesiącach leczenia $2,61 \pm 0,13$ ($p=0,00$).



Rysunek 2. Zmiany odsetka komórek o fenotypach $CD14^+CD86^+$ u chorych na stwardnienie rozsiane w trakcie 12-miesięcznej terapii octanem glatirameru
* $p < 0,05$ w porównaniu z okresem sprzed terapii

Wartości odsetkowe komórek o pozostałych fenotypach nie uległy w trakcie badania znamiennej statystycznie zmianom.

Omówienie

Cząstki $CD80^+$ (B7.1) i $CD86^+$ (B7.2) są zaangażowane w różnicowanie oraz aktywowanie dwóch odmiennych subpopulacji limfocytów Th. Cząstki kostymulujące łączą się z cząstką CD28, która znajduje się na powierzchni komórek prezentujących antygeny komórkom i jest odpowiedzialna za odpowiedź immunologiczną. W modelu s.r., jakim jest EAE B7.1 i B7.2, aktywowały odpowiednio subpopulację Th1 lub Th2 limfocytów T (Monteyne i wsp. 1998). Z tego względu zmniejszenie liczby komórek z ekspresją CD80 pozwala, poprzez względne zwiększenie liczby komórek z ekspresją CD86⁺, na uzyskanie przewagi przez komórki Th2. Uzyskany w badaniu efekt zmniejszenia odsetka komórek $CD19^+CD80^+$ przy jednoczesnym wzroście procentowym $CD14^+CD86^+$ jest korzystny z punktu widzenia powyższej teorii. Choć zmiany odsetka komórek B7.2, uzyskiwane w trakcie leczenia nie były trwałe (w 12 miesiącu ich odsetek był porównywalny z odsetkiem sprzed kuracji) to wydaje się, że zmiany dotyczące komórek B7.1 mogą być wystarczające aby uzyskać przesunięcie na korzyść odpowiedzi warunkowanej aktywnością limfocytów Th2. Utrudnienie interpretacji uzyskanych wyników stanowi fakt, że do tej pory nie ustalono wartości preferencyjnych odsetków komórek B7.1 i B7.2. W związku z tym możemy jedynie porównywać rezultaty uzyskane w trakcie leczenia do tych przed jego rozpoczęciem. W badaniu nie wykazaliśmy zmian dotyczących odsetka komórek $CD3^+CD25^+$, które reprezentują zaktywowane formy limfocytów T. Trzeba jednak pamiętać że ten fenotyp komórkowy obejmuje nie tylko limfocyty Th, ale także wiele innych jak np. limfocyty Ts.

Warto również pamiętać, że nie dysponujemy, jak do tej pory, markerem powierzchniowym, który z odpowiednią swoistością mógłby różnicować fenotypy Th1 i Th2. Obecnie takie różnicowanie można przeprowadzić na podstawie profilu wydzielanych cytokin, jednak po 12 miesiącach terapii glatiramerem nie odnotowaliśmy znamienych statystycznie zmian w zakresie odsetków komórek wytwarzających interleukiny. Prawdopodobnie jest to wynikiem zbyt krótkiego okresu obserwacji w zbyt małej populacji chorych na s.r. Warto odnotować, że dopiero po 12 miesiącach leczenia zaobserwowano istotny wzrost odsetka zaktywowanych monocytów, co być może w dalszej kolejności doprowadzi do nasilonego wytwarzania interleukin przez te komórki.

Z drugiej strony wyniki naszego badania potwierdzają rezultaty uzyskane w badaniach *in vitro* przez wielu badaczy, którzy wykazali, że jednym z najważniejszych mechanizmów działania glatirameru jest przesunięcie równowagi w zakresie populacji limfocytów Th na korzyść komórek Th2. Być może to, co udało się zaobserwować w naszym badaniu jest dopiero początkiem zmian indukowanych przez lek. Jednocześnie w piśmiennictwie światowym pojawiły się prace sugerujące, że tylko w czasie krótkiego stosowania glatirameru (do 9 miesięcy) można odnotować przesunięcie w profilu wydzielanych cytokin na korzyść produkowanych przez populację Th2 limfocytów. Już w 12 miesiącu terapii nastąpił powrót do produkcji cytokin sprzed rozpoczęcia leczenia wytwarzanych głównie przez subpopulację Th1 (Neuhaus i wsp. 2000).

Wnioski

Nasze badanie wykazało, że roczna terapia glatiramerem wywiera wybiórczy, dotyczący głównie komórek z ekspresją cząstek kostymulujących, wpływ na parametry układu immunologicznego. Warto jednak pamiętać, że badanie przeprowadzono z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej, co może nie odzwierciedlać procesów przebiegających w ośrodku podczas terapii. Mimo małej populacji chorych na s.r. oraz dość ograniczonych zmian w zakresie badanych fenotypów komórkowych, wyniki naszych badań potwierdzają korzystny wpływ glatirameru na parametry profilu immunologicznego.

Piśmiennictwo

1. Arnon R., Sela M., Teitelbaum D.: New insights into the mechanism of action of copolymer 1 in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J. Neurol.* 1996, 243, supl.1, S8–S13.
2. Bornstein M.B., Miller A., i wsp.: A pilot trial of Copolimer – 1 in exacerbating – remitting multiple sclerosis. *New England J. Med.* 1987, 317, 408–414.
3. Gran B., Tranquill L.R., i wsp.: Mechanisms of immunomodulation by glatiramer acetate. *Neurology*, 2000, 55, 1704–1714.

4. Johnson K.P., Brooks B.R., and the Copolymer – 1 study group: Extended use of glatiramer acetate (Galtiramer) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. *Neurology*, 1998, 50, 701–708.
5. Johnson K.P., Brooks B.R., and the Copolymer – 1 study group: Sustained clinical benefits of glatiramer acetate in relapsing multiple sclerosis patients observed for 6 years. *Multiple sclerosis*, 2000, 6, 255–266.
6. Lea A.P., Goa K.L.: Copolymer – 1. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in multiple sclerosis. *Clin Immunother.* 1996, 6, 319–331.
7. Miller A., Shapiro S. i wsp.: Treatment of multiple sclerosis with Copolymer – 1 (Galtiramer): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune deviation. *J. Neuroimmunol.* 1998, 92, 113–121.
8. Milo R., Panitch H.: Glatiramer acetate or interferon-b for multiple sclerosis? A guide to drug choice. *CNS drugs*, 1999, 11, 289–306.
9. Monteyne P., Guillaume B., Sindic Ch.: B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), interleukin-12 and transforming growth factor-b mRNA expression in CSF and peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 1998, 91, 198–203.
10. Neuhaus O., Farina C. i wsp.: Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology*, 2001, 56, 702–708.
11. Neuhaus O., Farina C. i wsp.: Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1-reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. *PNAS*, 2000, 97, 7452–7457.
12. Tselis A. C., Lisak R. P.: Multiple sclerosis. Therapeutic update. *Arch. Neurol.* 1999, 56, 277–280.
13. Wolinsky J. S.: Copolymer 1: A most reasonable alternative therapy for early relapsing – remitting multiple sclerosis with mild disability. *Neurology*, 1995, 45, 1245–1247.