



Akademie věd České republiky

Teze disertace
k získání vědeckého titulu "doktor věd"
ve skupině věd MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ A LÉKAŘSKÉ

IMUNODEFICIENCE SE ZVLÁŠTNÍM ZAMĚŘENÍM NA PERIODICKÉ HOREČKY

Prof. MUDr. Anna Šedivá, CSc.

Ústav imunologie UK 2. LF a FN Motol
(V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 – Motol)

Komise pro obhajoby doktorských disertací v oboru IMUNOLOGIE

Praha 3.11.2009

1. ÚVOD

Disertační práce shrnuje mé působení v oblasti pediatrie, se zaměřením na imunodeficiencie. Základ předložených prací zahrnuje přibližně 15leté období, které se překrývá s mým přechodem od obecné pediatrie k užší specializaci v oboru Alergologie a klinická imunologie. V průběhu let se zároveň dynamicky rozvíjel celý obor, což se odráží ve skladbě předložených prací. Základem disertace je přehledné pojednání o skupině onemocnění nazývaných Periodické horečky a “autoinflammatory syndromes”. Jedná se o zcela novou problematiku, která se ve světové literatuře teprve formuje a v České republice nebyla nikdy souhrnně pokryta. Tento přehled vznikl ve snaze zaplnit tuto mezeru a dát současné informace k dispozici našim lékařům. Takový krok je důležitý také proto, že nové znalosti základní vědy se právě v této oblasti velmi rychle promítají do praktických možností léčby a konkrétně blokádu IL-1 představují úplný průlom v terapii zánětlivých stavů spadajících do této kapitoly. Zcela recentní vývoj preparátu Canakinumab, monoklonální protilátky proti IL-1, který je nyní uváděn do klinické praxe, dokumentuje aktuální časování předložené publikace. Přehledný souhrn je určený k vydání pro potřeby lékařské praxe. Skupina onemocnění, která tvoří obsah tohoto souhrnu, je nejnovější kapitolou v oblasti primárních imunodeficiencí, kam spadá svým charakterem, poruchou imunitních funkcí na podkladě vrozených mutací. Vzhledem k velmi krátké době, kdy jsou tato onemocnění známa, nevznikla v České republice žádná původní vědecká publikace na toto téma. Podkladem dizertace je také rukopis článku “B lymphocytes in Schnitzler syndrome”, který je s mým prvním autorstvím nyní připravován k publikaci. Je to zatím první práce, která ukazuje i na naši vědeckou aktivitu na tomto poli.

Kromě skupiny periodických horeček je oblast imunodeficiencí pokryta dalšími články, které dokumentují naši vzrůstající erudici ve výzkumu poruch imunitního systému. Stěžejní prací je publikace v časopise Blood z roku 2007, kde s doc.Špíškem sdílím úlohu korespondujícího autora. Výzkum funkce TLR systému na buňkách pacientů s Brutonovou agamaglobulinémií tématicky spojuje tuto práci s uvedeným okruhem periodických stavů a dalších poruch regulace zánětu. Další práce v seznamu článků pokrývajících imunodeficitní problematiku dokumentují i naše zařazení do mezinárodních struktur.

Komplex prací je spojen základní tematikou primárních imunodeficiencí, se zvláštním zaměřením na poruchy mechanismů vrozené imunity. Je odrazem části práce Ústavu imunologie UK2.LF a FN v Motole, který v roce 2010 bude slavit 15 let od svého založení. Právě primární imunodeficiencie tvoří od počátku jednu z os klinické i výzkumné práce ústavu. Předložený soubor je uceleným shrnutím celé problematiky. Věříme, že řadí náš Ústav imunologie mezi přední pracoviště v daném oboru v České republice a ukazuje také naši mezinárodní reputaci.

2. RESUMÉ

Periodic fevers and autoinflammatory syndromes

Primary immunodeficiencies (PIDs) represent inherited disorders of immune function caused by mutations in genes coding for immune relevant molecules. The number of well characterized PIDs is rapidly growing, as is apparent also from a textbook Primary Immunodeficiency Diseases: A Molecular and Genetic Approach, by Hans D. Ochs, C.I. Edvard Smith, Jennifer M. Puck, Oxford University Press.

In a short interval between first (1999) and second edition (2006) the number of covered nosological entities almost doubled and is currently around 150. One of the most dynamic areas within PIDs is represented by disorders of innate immunity. The development of this topic was greatly fostered by discoveries of the interactions between pathogens and immune system, namely the discovery of Toll like receptors and related classes of molecular patterns on microbes interacting with pattern recognition molecules on immune system components. These discoveries enabled explanation of many aspects of immune response, however, on the other hand raised also many new and exciting questions and whole research areas.

Disorders of innate immunity are classically represented by defects of phagocytosis and complement. With the above mentioned discoveries, new entities started to complement that field and now several diseases in TLR associated pathways and in interferon pathways are securely established and described (for review, refer to full text of dissertation and list of publications and references). Simultaneously, another field of diseases with overlapping pathogenesis was under intensive research and investigation. These diseases were originally classed as periodic fevers, but with the elucidation of their pathogenesis it became obvious that the group comprises many more entities than only periodic fevers. These disorders are now grouped under the name of "autoinflammatory diseases". This particularly lucky name very precisely describes the cause of these states. All so far included diseases represent different forms of unregulated inflammation caused by numerous, usually miniscule causes. The research activity associated with the field led to additional numerous discoveries. Besides above mentioned TLRs, the family of NLRs was discovered. NLR is a family of receptors belonging also to PRRs (pattern recognition receptors), that are localized intracellularly and guard the organism against the danger signals. NLRs, in contrast to so far known ligands of TLRs that are derived from pathogens, bind also

pathogen associated ligands, but beside that NLRs are also activated in response to other danger signals, coming from our body as well as from the environment.

All these processes are tightly regulated. Majority of periodic fevers and autoinflammatory states are the result of mistakes in these processes.

Disertation discussed here is based on a review of this emerging field. The work comprises two major parts, one theoretical, describing mechanisms and pathogenesis of diseases, and the second part with the description of clinical conditions (Tab.1).

„Autoinflammatory syndromes“	
<i>Periodic fevers</i>	MF, <i>Familial Mediterranean Fever</i>
	HIDS, <i>mevalonate kinase deficienty - hyperIgD syndrom</i>
	TRAPS, <i>TNF Receptor Associated Periodic Syndrome</i>
	CAPS, <i>cryopyrin associated periodic syndrome, kryopyrinopatie</i>
<i>Pyogenic disorders</i>	PAPA, <i>pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum and acne</i>
	CRMO, <i>chronic recurrent multifocal osteomyelitis</i> SAPHO, <i>synovitis, acne, pustulosis, hyperostitis, osteitis</i> Majeed syndrom
<i>Granulomatous disorders</i>	m.Crohn
	m.Blau, early onset sarcoidosis
<i>others</i> <i>(NALP3 inflammasoem)</i>	gout
	Silicosis, asbestosis
<i>Aquired syndromes</i>	PHAPA syndrom, <i>periodic fever, pharyngitis, cervical adenitis and aphthous stomatitis</i> Schnitzler syndrome

The review includes paragraphs on the structure and function of NLRs and related inflammasomes, the issue so far not described in national literature. In the clinical part, the list of nosological entities includes the latest news, as is the recent description and characterization of DIRA, IL-1RN deficiency leading to the newest autoinflammatory condition. This crucial part of dissertation is planned also for separate editing and will be printed in a form suitable for distribution to pediatricians and other interested clinical specialists.

Dissertation is complemented with a series of articles on primary immunodeficiencies, with the latest manuscript on Schnitzler syndrome, documenting our own research work in this area.

3. TEZE

Primární imunodeficiencie – poruchy mechanismů vrozené imunity

Primární imunodeficiencie představují jasně definovanou skupinu onemocnění, u kterých dochází k poruše imunitních funkcí na vrozeném podkladě. Klasicky se primární imunodeficiencie dělí na deficiencie humorální, buněčné a kombinované, deficiencie fagocytární a deficiencie komplementu (Primary Immunodeficiency Diseases: A Molecular and Genetic Approach, by Hans D. Ochs, C.I. Edvard Smith, Jennifer M. Puck, Oxford University Press. 1999, 2006). Dynamický rozvoj poznatků o primárních imunodeficiencích však mění toto základní dělení a zařazuje celé skupiny nových onemocnění, jako jsou právě poruchy mechanismů vrozené imunity. Do této kategorie se kromě klasických poruch fagocytárních a komplementu nově zařazují deficity postihující receptory a signální cesty účastníci se iniciálních, vrozených kroků imunitní reakce a dále celá skupina periodických zánětlivých stavů.

Deficity v TLR systému a asociovaných signálních drahách

K defektům receptorů a signálních cest patří poruchy spojené s TLR receptory a následnými signálními cestami. Dosud jsou popsány deficity TLR3 a UNC93B, které jsou klinicky asociovány s projevy herpetické encefalidity. Objevy mutací právě v těchto molekulách logicky zapadají do současného pohledu na rozvoj imunitní odpovědi, neboť TLR3, TLR7 a TLR9 jsou receptory účastníci se v obraně proti virovým infekcím. Nedávno bylo popsáno, že úlohou UNC93B je právě podpora nitrobuněčného transportu TLR7 a TLR9 na místo jejich exprese v endolysosomech, což logicky spojuje patogenetické podklady a úlohu těchto signálních cest v obraně proti virům. Ztráta funkce všech zmíněných molekul hraje zásadní roli v rozvoji těžké herpetické encefalidity, která se tímto řadí do kategorie primárních imunodeficiencí. Do stejné skupiny deficitů TLR systému spadají mutace v molekule IRAK4 a zcela nedávno objevené mutace v MyD88, které vedou k opakovaným a těžkým pneumokokovým infekcím a zasahují stejně jako výše popsané mutace do drah prvního rozpoznání patogenu rodinou TLR molekul.

Deficity v oblasti interferonů

Na rozhraní mezi vrozenou a získanou imunitou stojí další skupina onemocnění postihující vrozené deficiencie imunitních funkcí zprostředkovaných interferony.

S IFN γ a spojenými drahami je asociována skupina zvýšené vnímavosti k mykobakteriálním infekcím a infekcím atypickými mykobakteriemi, která zahrnuje kromě IFN γ řadu molekul z oblasti cytokinů, jejich receptorů a signálních molekul, IFN γ R, IL12, IL12R, IL23, STAT1, NEMO. Deficity v produkci IFN α/β byly prokázány v souvislosti s výše zmíněnými mutacemi v TLR3 a UNC93B, vedoucími ke klinickým projevům virových onemocnění.

Poruchy v regulaci zánětu, periodické horečky a „autoinflammatory syndromes“

Poslední jasně definovanou skupinou poruch vrozené imunity je celá oblast periodických horeček a zánětlivých stavů. I tato se nyní již rozděluje na klasické periodické horečky se základními jednotkami Familiární středozevní horečka, HyperIgD syndrom, TRAPS (tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome) a chladem vyvolané zánětlivé stavy CINCA (chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome), Muckle-Wells syndrom a chladovou urtikou. Kromě těchto klasických nosologických jednotek se nyní objevují i poruchy v intracelulárních molekulách, které rozpoznávají patogeny a řídí zánětlivou odpověď vůči nim. Mutace v těchto molekulách přispívají k rozvoji dalších onemocnění, jejichž seznam velmi rychle vzrůstá a objevují se tam jednotky, které nikdy nebyly s oblastí imunodeficiencí spojovány, jako je například Crohnova nemoc.

Právě tato oblast je nosným tématem disertační práce, hlavně pro svou aktuálnost a spojení poznání patogenetických mechanismů s klinickými projevy i s inovativními možnostmi terapie.

Periodické horečky a další syndromy s poruchou regulace zánětlivé odpovědi

První publikace specifikující hyperIgD syndrom (HIDS) a blíže vymežující oblast nazývanou „periodické horečky“ se objevila v devadesátých letech minulého století. S postupným odkrýváním příčin těchto onemocnění došlo v samém závěru století k objevu genu, jehož mutace jsou zodpovědné za toto onemocnění. Poslední desetiletí od objevení genu pro HIDS představuje období mimořádného nahromadění objevů a znalostí o etiologii a patogeneze stavů, jejichž společným jmenovatelem se staly poruchy v regulaci zánětlivé odpovědi. Periodické horečky se postupně zařadily jako podskupina těchto jednotek, nazývaných v anglicky psané literatuře

„autoinflammatory syndromes“. „Autoinflammatory syndromes“ mají již ve svém názvu obsaženu podstatnou informaci, která říká, že k vzplanutí zánětlivého stavu dochází bez jasné vnější příčiny. Podstata onemocnění tkví ve složitých mechanismech, které regulují větev nespecifické imunity, vedoucí k spuštění zánětlivé odpovědi. Tyto velmi účinné mechanismy jsou za normálních okolností pečlivě koordinovány, nicméně u diskutovaných patologických stavů dochází na genetickém podkladě k mutacím genů a následným poruchám molekul účastnících se v procesech aktivace zánětu. Znalosti těchto procesů se postupně získávaly u prvních jasně definovaných onemocnění ze skupiny periodických horeček, postupně se přidávaly i další nozologické jednotky. Přehled onemocnění v současné době zařazovaných do této kategorie je v tabulce 1., další onemocnění mohou být volněji přiřazena.

Z imunologického hlediska je celá oblast nesmírně zajímavá pro svou ucelenou logickou strukturu, která spojuje nové poznatky v patogeneze onemocnění s klinickými projevy a vede i velmi rychle k aplikaci základních poznatků do terapie. Léčebné použití blokády IL-1 je u některých skupin těchto nemocí mimořádně úspěšné a podtrhuje výjimečnost této kapitoly.

Z uvedených důvodů je patogenezi „autoinflammatory syndromes“ v disertační práci věnována celá kapitola, v souhrnu podstatných údajů je problematika prezentována i v této tezi.

Tab.1.

„Autoinflammatory syndromes“	
<i>periodické horečky</i>	FMF, <i>Familiar Mediterranean fever</i>
	HIDS, <i>mevalonate kinase deficiency - hyperIgD syndrom</i>
	TRAPS, <i>TNF Receptor Associated Periodic Syndrome</i>
	CAPS, <i>cryopyrin associated periodic syndrome, kryopyrinopatie</i>
<i>pyogenní onemocnění</i>	PAPA, <i>pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum and acne</i>
	CRMO, <i>chronic recurrent multifocal osteomyelitis</i> SAPHO, <i>synovitis, acne, pustulosis, hyperostitis, osteitis</i> Majeed syndrom
<i>granulomatózní záněty</i>	m.Crohn
	m.Blau, early onset sarcoidosis
<i>další</i> <i>(NALP3 inflammasom)</i>	dna
	silikóza a azbestóza
<i>získané syndromy</i>	PHAPA syndrom, <i>periodic fever, pharyngitis, cervical adenitis and aphthous stomatitis</i> Schnitzlerův syndrom

„Autoinflammatory syndromes“ - patogeneze

Patogeneze celé skupiny onemocnění je spojena s mechanismy vrozené imunity. Jednou z hlavních úloh vrozené imunity je rozpoznání patogenů a zahájení odpovídající imunitní reakce. Tyto mechanismy jsou evolučně velmi staré a pro přežití organismu zásadní. Jsou zabezpečeny sofistikovaným systémem reakcí, ve kterém se účastní řada molekul, buněk a tkání.

TLR

Nedávno byl rozpoznán jeden z klíčových systémů, zabezpečujících rozpoznání patogenů, který je shrnován pod názvem TLR, Toll like receptory. V současné době 11 známých TLR exprimovaných na membránách zajišťuje rozpoznání prakticky celé mikrobiální říše pomocí detekce tak zvaných PAMP, pathogen associated molecular patterns. Kromě TLR na membránách buněk jsou obdobné receptory lokalizovány i intracelulárně. Molekulární specifikace těchto intracelulárních receptorů odhalila shody ve strukturální stavbě TLR a těchto proteinů právě v doméně rozpoznávající patogeny, tak zvané LRR doméně (leucin rich repeats).

NLR

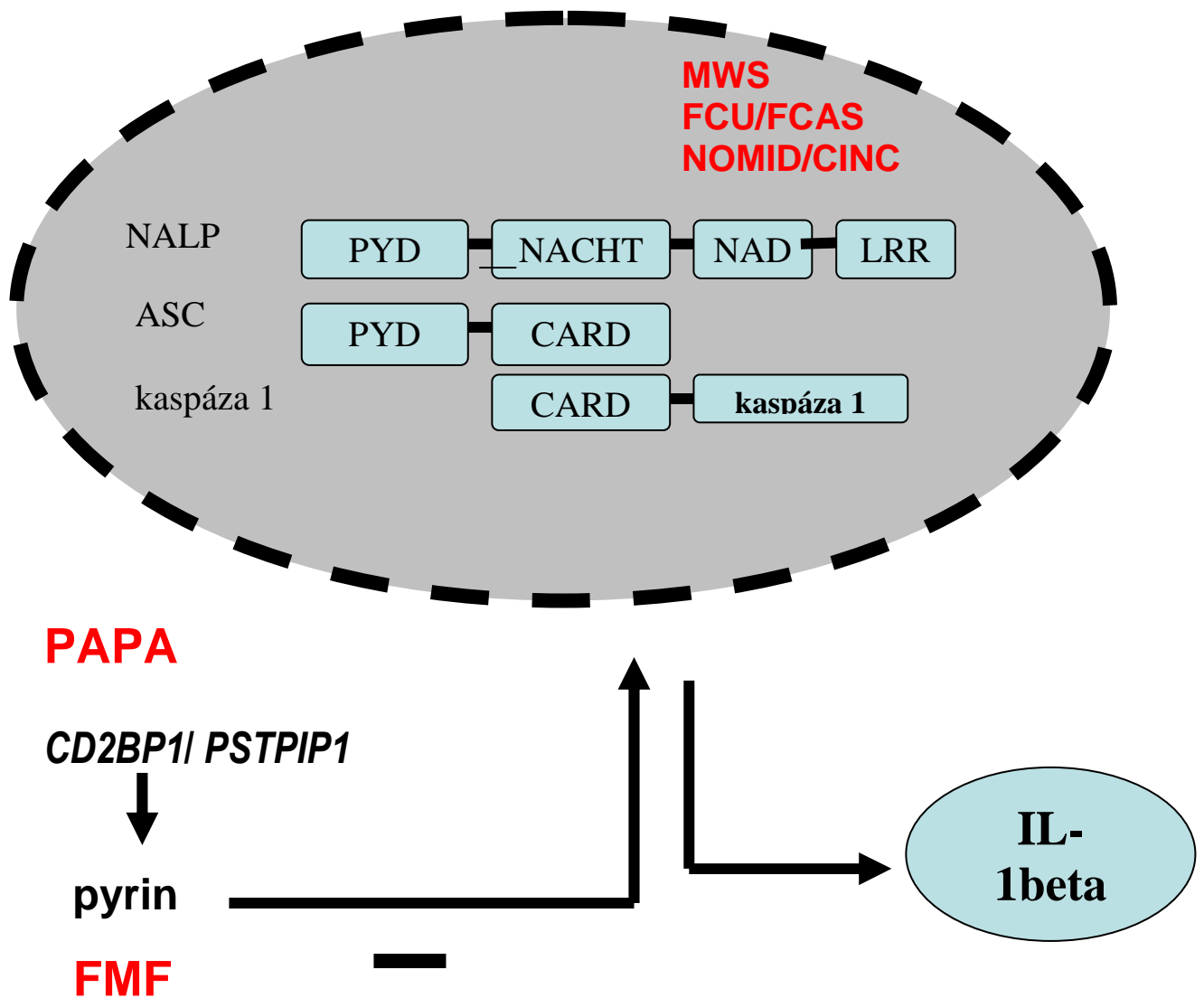
Ukázalo se také, že molekul s obdobnou funkcí je v buňce celá řada, daleko více než 11 dosud známých TLR. Tyto molekuly, které jsou na rozdíl od TLR lokalizovány intracelulárně, bez vazby na membrány, se také více diverzifikují podle své struktury a funkce, která posléze vede k aktivaci zánětu. Celá rodina těchto molekul se potom nazývá PAN proteiny, pyrin and NACHT domain containing proteins. Jedná se o novou oblast výzkumu, kde ještě panují určité nejasnosti v názvosloví. Rodiny proteinů se mohou v různých citacích překrývat či skrývat pod jiným jménem. PAN se překrývají s dalším souhrnným názvem NLR, zkratka z NACHT-LRRs, což určuje rodinu proteinů obsahujících NACHT doménu a již výše citovanou LRR doménu, která je zodpovědná za rozpoznání patogenu. NACHT má složitý název odvozený podle prvních molekul, kde byla tato doména nalezena (neuronal apoptosis inhibitory proteins NAIP, CIITA, HET-E, TP-1). NACHT-LRRs neboli NLR je oblíbenou zkratkou pro tuto rodinu proteinů, neboť je velmi blízká TLR a implikuje obdobnou funkci, kterou tyto rodiny molekul hrají v rozpoznání patogenu.

Po počáteční iniciaci se tyto molekuly aktivují a váží se v kaskádě s dalšími členy své rodiny, což posléze vede k zahájení zánětlivé odpovědi. Tyto kaskádovité reakce se odehrávají za pečlivé regulace uvnitř buňky a mají své zákonitosti. Celý pochod potom probíhá za místního seskupení molekul v intracelulární oblasti, které se nazývá v anglické literatuře „inflammasome“. Inflamasom jako místo iniciace zánětu začíná být středem pozornosti výzkumu a pro pořádek je inflammasom číslován či nazýván podle klíčové molekuly. V souvislosti s výše popsanými onemocněními je důležitý inflammasom asociovaný s NALP3 neboli kryopyrinem a dále NOD2 komplex.

Kryopyrin = NALP3 a inflamasom

Protein nazývaný kryopyrin, nebo podle struktury a klasifikace NALP3, je klíčovým a nyní nejlépe prozkoumaným členem výše diskutovaných rodin proteinů. Za normálních okolností je exprimován v buněčné cytoplasmě, většinou v imunokompetentních buňkách, hlavně monocytech. Jeho fyziologickým ligandem jsou součásti bakterií, vzešlé z procesu fagocytózy. Následná aktivace spustí kaskádovitý děj vazby a aktivace dalších molekul.

Obr. 1. NALP3 inflamasom



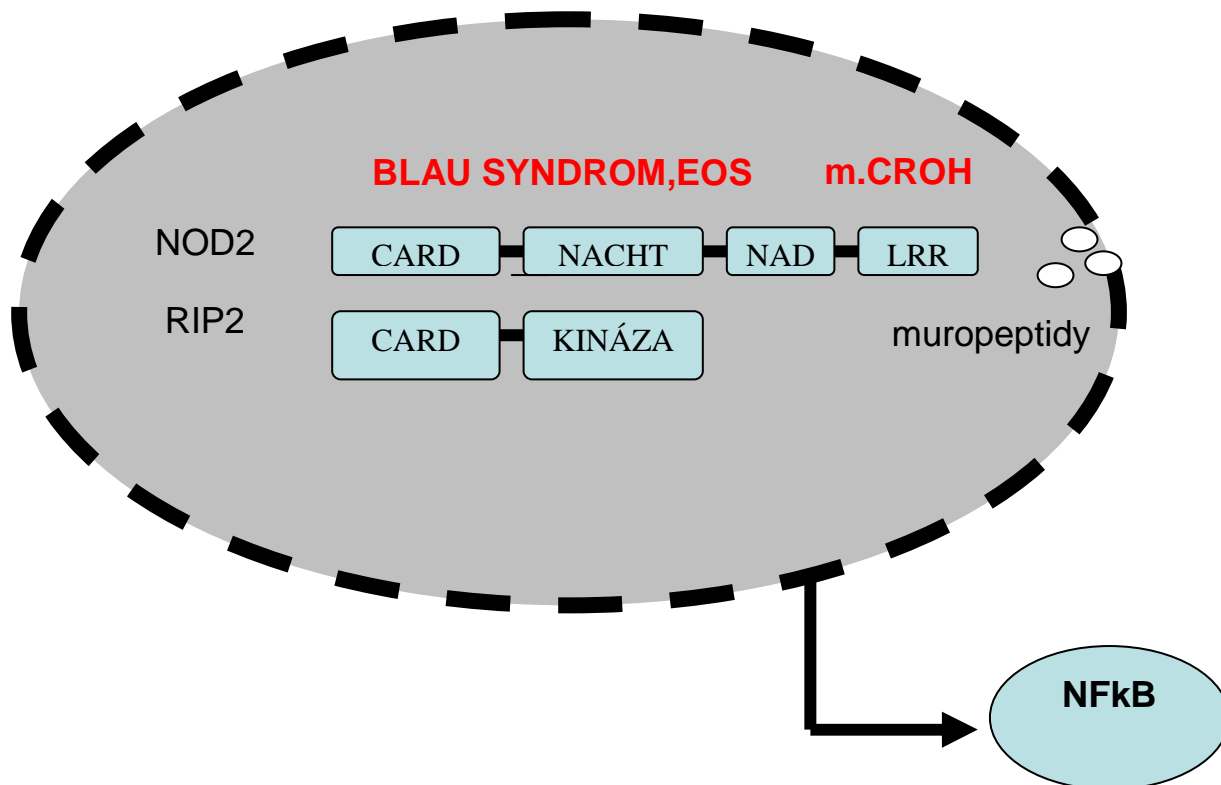
Partnery NALP3 v inflamasomu jsou adaptorový protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) a klíčová poslední složka kaspáza 1 (Obr.1). Kaspázy jsou známé hlavně z procesů apoptózy, nicméně v souvislosti s popisovaným směrem výzkumu se pozornost soustřeďuje na podskupinu v rodině kaspáz, které jsou asociovány se zánětem a odpovědí buňky na mikrobiální patogeny. Jedná se o tak zvané „inflammatory caspases“, kam se zahrnují kaspázy 1, 4 a 5. Kaspáza 1 jako klíčová složka NALP3 inflamasomu aktivuje sekreci IL1beta. NALP3 inflamasom je za normálních okolností přítomen v buňce v klidovém stavu, zajištěném i sférickým uspořádáním zúčastněných molekul. K jeho aktivaci vede vazba na mikrobiální součásti. Za patologických okolností spojených s periodickými stavy MWS, FCU/FCSA a NOMID/CINCA na podkladě mutovaného genu a alterovaného proteinu dochází ke spontánním aktivacím systému a ke spuštění atak onemocnění.

Do reakcí NALP3 inflamasomu zasahuje i pyrin, protein zodpovědný za FMF, který se přímo váže na kryopyrin. Je velmi zajímavé, že za fyziologických okolností je pyrin inhibičním prvkem této kaskády, a tudíž snižuje konečnou sekreci IL1beta. K rozvoji patologických stavů tudíž vedou mutace, které ruší funkce pyrinu, ale naopak mutace, které vedou ke spontánní aktivaci kryopyrinu. Do stejné cesty se zapojuje i PSTPIP1, protein spojený se syndromem PAPA (Obr.1).

NOD2 komplex

Velmi obdobný mechanismus je spojen s aktivací NOD2 komplexu. NOD2 se aktivuje vazbou s muramyl dipeptidy (MDP), složkami bakterií. NOD2 se obdobnými mechanismy váže na RIP2 a vede k aktivaci NFkB a následně k sekreci IL1beta. Jak již bylo popsáno výše, mutace v NOD2 jsou podkladem poruchy regulace této cesty a rozvoje Crohnovy nemoci a Blau syndromu (Obr.2).

Obr.2 NOD2 komplex



Periodické horečky a „autoinflammatory syndromes“ – nosologické jednotky

Familiární středozevní horečka (Familiar Mediteranean Fever, FMF)

FMF je nejdéle známým onemocněním z celé skupiny, zmínky o této jednotce byly publikovány již před 70 lety. FMF je autozomálně recesivní onemocnění, charakterizované opakovanými atakami horeček a serositidami. Epizody horečky bývají relativně kratší, od několika hodin do několika dní. U naprosté většiny pacientů bývá udávána bolest břicha, postiženy bývají klouby, změny mohou být i na kůži v podobě exantému. Nejzávažnějším příznakem, který může u části pacientů komplikovat průběh onemocnění a který určuje prognózu onemocnění, je amyloidóza. Kromě genetického průkazu mutací nejsou pro diagnostiku FMF k dispozici žádná specifická laboratorní vyšetření.

Gen, jehož mutace způsobují FMF, byl objeven v roce 1997, tab.1. Gen pro *MEFV* je lokalizován na krátkém raménku 16 chromozomu. Frekvence mutací v populaci lze jen těžko stanovit, neboť se výrazně liší v jednotlivých populacích. Alespoň některé z dosud identifikovaných mutací daného genu mají základ v původních mutacích, vzniklých přibližně před 2500 lety na Středním Východě. Z této lokality docházelo ke stěhování národů včetně větve směřující na severozápad a tudíž není vyloučen výskyt onemocnění i v našich krajích. Gen kóduje protein nazývaný pyrin. Pyrin v buňkách asociován se strukturami cytoskeletu a zasahuje do tří velmi důležitých funkčních celků buňky - moduluje apoptózu, produkci cytokinů, hlavně IL-1 a účastní se na funkci cytoskeletu. Funkce pyrinu byla v poslední době blíže objasněna na molekulární úrovni a bude diskutována v kontextu s ostatními molekulami s rolí v patogeneze periodických horeček v zvláštním odstavci.

HyperIgD syndrom (HIDS)

HyperIgD syndrom byl poprvé popsán v roce 1984. Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění, způsobené mutacemi genu pro mevalonát kinázu. Onemocnění poněkud vybočuje z řady ostatních jednotek. Jde vlastně o vrozenou poruchu metabolismu, která sdílí genový defekt s mevalonovou aminoacidurií, OMIM 251170. Podstatou jsou mutace v genu pro mevalonát kinázu, *MVK*, která řídí jeden z kroků biosyntézy cholesterolu a isoprenoidů. Mevalonová acidurie a HIDS jsou vlastně totožná onemocnění, s rozdílně vyjádřeným fenotypem, způsobené mutacemi v totožném genu. Zatímco mutace způsobující HIDS jsou rozptýleny po celém genomu, ty, které způsobují mevalonovou acidurii, jsou soustředěny do oblasti která kóduje oblast mezi aminokyselinami 243-334 mevalonát kinázy.

Patogeneze HIDS úplně vybočuje z naznačených mechanismů. Mutace v *MVK* vedou ke klasickému obrazu metabolické vady, s hromaděním substrátů před blokem a naopak chyběním produktů pod úrovní bloku. V tomto případě je zvýšena kyselina mevalonová a naopak sníženy produkty cholesterolu a isoprenoidů pod blokem. Obě situace byly v modelových podmínkách spojeny s patologií odpovídající HIDS, nicméně jasný mechanismu vedoucí ke klinickým příznakům a k laboratorním nálezům není zcela objasněn.

Horečky jsou přítomny u obou jednotek, jsou však dominantním znakem u HIDS. Horečky a další klinické příznaky HIDS vznikají většinou v útlém dětství. Bývají velmi vysoké, trvají většinou několik dní. Ataka bývá provázena krční lymfadenitidou, někdy

exantémem, bolestmi břicha, bolestmi svalů a kloubů, někdy i zvracením. U části pacientů se mohou objevit i slizniční ulcerace, hlavně v dutině ústní. Vysoká hladina IgD je sice typická pro onemocnění, nicméně hlavně u malých dětí může být hladina IgD v mezích normy, na druhou stranu vyšší IgD se může vyskytnout i u jiných typů periodických horeček. Zvýšení IgD bývá provázeno i zvýšením IgA. Ataky se mohou vyskytovat celý život, ale většinou jsou nejčastější v dětství a dospívání. Amyloidóza provází HIDS spíše výjimečně.

Periodické horečky spojené s defektem receptoru pro TNF (TNF-receptor associated periodic syndrome, TRAPS)

Autozomálně dominantně je děděna skupina nemocí nazývaných nyní TRAPS. TRAPS shrnuje již dříve popisovaná onemocnění jako je například Familal Hybernian Fever či Familiar Periodic Fever. První popis této jednotky byl zveřejněn právě pod názvem Familiar Hybernian Fever. Popis rozsáhlé rodiny umožnil také zjištění autozomálně dominantní dědičnosti. Další výzkum v této oblasti postupně přibližoval lokalizaci a posléze umožnil identifikaci genu, ležícího v tomto případě na krátkém raménku 12 chromozomu. Onemocnění je způsobeno mutacemi v genu kódujícího podjednotku receptoru pro TNF, nyní nazývanou TNFRSF1A. Mutace jsou soustředěny v extracelulární části 55kD podjednotky TNFRSF1A. S funkcí tohoto receptoru souvisí i patogeneze onemocnění. TRAPS je asociován s TNFRSF1A receptorem. V původních hypotézách se myslelo, že porucha tkví v nedostatečném odštěpení molekuly z povrchu buňky a tudíž nízkém inhibičním potenciálu této odštěpené části, která extracelulárně váže TNF. Nové směry výzkumu však tuto hypotézu zcela nepotvrdily a porucha odštěpování není přítomna u všech pacientů. Uvažuje se také o možném problému ve sférickém uspořádání molekuly, tak zvané „missfolding“ hypotéze. Ani tato není jednoznačně prokázána, v každém případě se jedná o poruchu v regulaci zánětlivé odpovědi na podkladě uvedených mutací.

Klinický obraz TRAPS zahrnuje opakované ataky horeček provázené u většiny pacientů stěhovavými myalgiemi. Bývá přítomna bolest břicha, dále konjunktivitida a periorbitální edém. Kožní projevy ve formě makul a erytému jsou taktéž velmi častou manifestací. Nicméně klinické projevy mohou být velmi variabilní a u některých pacientů jen velmi mírně či částečně vyjádřeny. Na rozdíl od hyper IgD syndromu TRAPS může být provázen amyloidózou. V laboratorním obraze bývají nespecifické

známky zánětu, vyšší CRP, vyšší FW. Může být i mírná aktivace komplementu. I při tomto onemocnění můžeme zaregistrovat zvýšení IgD či IgA.

Kryopyrinopatie - MWS, FCU a NOMID/CINCA

Muckle-Wells syndrom (MWS), familiární chladová urtika (FCU, někdy také FCAS, familiar cold autoinflammatory syndrome) a systémové zánětlivé onemocnění se začátkem v novorozeneckém věku, charakterizované neurologickým, kožním a kloubním postižením (neonatal onset multisystem inflammatory disease NOMID, se synonymem chronic infantile neurologic cutaneous and articular syndrom, CINCA)

Tato 3 autozomálně dominantní zdánlivě odlišná onemocnění jsou spojena svou genovou podstatou. Jsou způsobena mutacemi v jednom genu nazývaném *CIAS1* (zkratka z cold induced autoinflammatory syndrome), v současné době spíše citovaný pod synonymem *NALP3* (viz odstavec Patogeneze). Patogeneze MWS, FCU a NOMID/CINCA je úzce spojena s funkcí proteinu kódovanému uvedeným genem, jímž je kryopyrin, klíčová molekula v iniciálních fázích zánětlivé odpovědi. Buněčné pochody vedoucí k projevům těchto onemocnění jsou shrnuty v odstavci „Patogeneze“. Gen *CIAS1/NALP3* byl původně spojen s MWS, dále s FCU a posléze s NOMID/CINCA.

MWS

MWS je syndrom opakovaných horeček spojený často s artralgiemi, bolestmi břicha, urtikou a v pozdějším věku se sensorineurální hluchotou. Nemoc může také být komplikována amyloidózou hlavně s renálním postižením. Začátek onemocnění je variabilní, může být kdykoli v průběhu dětství a dospívání, vzácněji i v dospělosti. Někdy mohou být přítomny i další klinické příznaky, jako jsou konjunktivitidy a uveitidy, únava a afty. Hluchota je pro MWS velmi typická a vzniká u více než 70% pacientů.

FCU (FCAS)

FCU je velmi podobné onemocnění, včetně možné přítomné hluchoty, navíc však s chladem jako jasným precipitujícím faktorem urtiky a dalších popsanych klinických příznaků. Ataky vyvolává celková expozice chladu, ale na rozdíl od získané chladové urtiky pouze lokální expozice chladu nevyvolá typické klinické symptomy. Typickým

nálezem jsou výrazné známky zánětu v době ataky, hlavně velmi výrazná leukocytóza.

NOMID/CINCA

Syndrom NOMID/CINCA je spojen s chronickým postižením kůže ve formě urtikariálních až vaskulitických lézí, s meningitidou, posléze stejně jako u předchozích jednotek se sensorineurální hluchotou a dále s deformující arthropatií. Typickým projevem je začátek v neonatálním či velmi časném věku. Často se jedná o nedonošené děti, u kterých se velmi časně objevuje kožní postižení, s pozdějším rozvojem dalších typických neurologických, kloubních a kostních příznaků. Typické známky časně osifikace pately a epifýz dlouhých kostí mohou pomoci ve složitém diagnostickém procesu. Onemocnění je nejzávažnější formou z celé skupiny periodických horeček a má významnou úmrtnost již v dětském věku.

Pyogenní sterilní artritida, pyoderma gangrenosum a akné (PAPA)

Poslední z autozomálně dědičných poruch regulace zánětu je PAPA. Jak je již obsaženo v názvu, jedná se o pyogenní sterilní artritidu, pyoderma gangrenosum a akné. Zařazení do této skupiny onemocnění umožnilo objevení genové podstaty v roce 2002. Mutace byly objeveny v genu *CD2BP1*, zkratka z CD2 binding protein1. Myší analog tohoto genu je *PSTPIP1* (proline-serine-threonin phosphatase interacting protein), gen je tedy někdy nazýván *CD2BP1/PSTPIP1* a odpovídající protein CD2BP1/PSTPIP1. Tento protein se přímo váže na pyrin, protein spojený s FMF, a stejně jako pyrin je spojený s cytoskeletárním aparátem buňky. Patogeneze onemocnění je opět probrána v příslušném odstavci.

Crohnova nemoc, Blau syndrom, EAS (early onset sarcoidosis)

Výzkumné směry vedoucí k odhalení patogeneze těchto onemocnění odhalují složité pochody, ve kterých složky nespecifické imunity zahajují zánětlivou odpověď. Složité uspořádání těchto procesů a jejich kontrolní kroky jsou jemně regulovány. V genezi i v regulaci zánětu se podílí celá řada molekul. Při postupném odhalování těchto pochodů dochází i k dalším objevům s návazností na klinické jednotky. Ve spojitosti s objevem NOD2, který je jedním z rodiny NOD proteinů (nucleotide-binding oligomerization domain proteins), se do celé skupiny zařadila dvě onemocnění spojená právě s NOD2, a to Blau syndrom, onemocnění, které nyní prakticky

splynulo s jednotkou nazývanou EOS, early onset sarcoidosis, a Crohnova nemoc. NOD2 je zapojen podobně jako cryopyrin do iniciace zánětlivé odpovědi, jejíž porucha je již delší dobu dávána do souvislosti s patogenezí Crohnovy nemoci.

Blau syndrom, či EOS je familiární granulomatózní artritida, neuropatie, urtika. Právě trias arthritida, uveitida a dermatitida je typickým znakem těchto onemocnění. Většinou se m.Blau považuje za familiární formu a EOS za případy na podkladě de novo mutací, ale toto rozdělení lze někdy jen těžko sledovat.

PFAPA

Nejasnosti panují kolem syndromu nazývaného „periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical lymphadenopathy (PFAPA)“, který není asociován dosud se žádným genem z dané skupiny a jehož patogenéze není známa, ale dá se očekávat, že doplní diskutované spektrum onemocnění. PFAPA je definován pouze na klinickém podkladě a zahrnuje opakované horečky s lymfadenitidou a přítomností aft. Při takovém popisu je však spektrum stavů spadajících pod danou definici široké a syndrom stále čeká na své upřesnění.

Schnitzlerův syndrom

Ještě větší záhadou je onemocnění nazývané Schnitzlerův syndrom, také zařazené do periodických horeček. Jedná se o onemocnění spíše dospělého věku, charakterizované typickým spojením horeček, kožního postižení ve formě urtikariální dermatitidy a monoklonální gamapatie IgM. Molekulární podstata není vůbec známa, což komplikuje terapeutické zásahy. Jedná se o vzácné onemocnění, na celém světě bylo pospáno pouze několik desítek pacientů.

Periodické horečky a „autoinflammatory syndromes“ – terapie

Terapie uvedených stavů je složitá a vedla dosud pouze k omezenému efektu. V léčbě byla zkoušena celá řada preparátů s cílem zabránit atakám aktivace zánětu. Zprávy o těchto léčebných strategiích ukazují na omezený a individuální efekt terapie. Uvedená nová fakta o patogenetických podkladech onemocnění otevřela cestu biologickým terapiím, a to v první řadě blokádě IL-1. Anakinra, rekombinantní antagonist lidského IL-1beta receptoru, je v současné době nejúspěšnější strategií v prevenci atak a nese příslib do budoucna v možném omezení rizika vzniku amyloidózy. Léčebné použití bylo dokumentováno u skupiny MWS, FCU a

NOMID/CINCA, dále u TRAPS a PAPA u jednotlivých pacientů. Vzhledem k dominantní úloze IL-1beta v patogeneze onemocnění lze očekávat další zprávy o léčebném potenciálu této terapie. Podobný mechanismu má látka nazývaná IL-1 Trap, inhibitor IL-1, a nejnověji i canacinumab, monoklonální protilátka se stejnou specificitou.

Pozitivní efekt byl zaznamenán i u inhibice TNF, hlavně u použití etanerceptu, p75TNFR:Fc fúzního proteinu, u TRAPS. Nadějný je hlavně preventivní účinek v rozvoji amyloidózy, který se ukazuje u některých léčených pacientů. Stejná léčba se podle literárních údajů používala i u HIDS, kde jsou možnosti terapie omezené, s částečným individuálním efektem. U HIDS byl též zkoušen Simvastatin, zasahující do stejné metabolické cesty. Efekty léčby HIDS jsou velmi rozporuplné.

Klasicky uznávanou léčbou je použití kolchicinu u FMF, kde se s úspěchem využívá k potlačení akutních atak i k prevenci amyloidózy. Kolchicin se váže na beta-tubulin a inhibuje tvorbu mikrotubulů v buňce. Kromě toho má nezávislé protizánětlivé účinky, přesný mechanismus ovlivnění patogeneze FMF však znám není.

Souhrn

Skupina periodických horeček se s novými poznatky výzkumu rozšířila na širší nově definovanou oblast „autoinflammatory syndromes“. Výzkum přinesl řadu poznatků v teoretické i praktické rovině. Byly objeveny nové cesty, kterými oblast nespecifické imunity řídí další směry imunitní odpovědi organismu. Nově jsou definovány celé soubory molekul a systémů, které uvnitř buňky reagují na patogeny a zahajují zánětlivou reakci. Detailní poznání těchto cest zároveň otevřelo nové možnosti léčby těchto chronických stavů, kdy obzvláště inhibice IL-1 vedla k výborným klinickým výsledkům. Nové poznatky v této dynamicky se rozvíjející oblasti se objevují prakticky neustále, jak dokazuje například onemocnění, jehož popis se objevil v polovině roku 2009. DIRA, neboli deficit antagonisty IL-1, je zatím poslední nosologickou jednotkou z této skupiny. Deficit IL-1RN vede ke komplexu klinických projevů, kterým dominují kožní, kloubní a neurologické problémy spojené se zánětem, vzniklým díky neregulované sekreci IL-1. V současné atmosféře tvořivého výzkumu v této oblasti se popisy dalších jednotek dají očekávat v blízké budoucnosti.

4. ZÁVĚR

Souhrn všech předložených prací odráží dynamiku výzkumu a vývoje v oboru imunologie. Právě oblast imunodeficiencí je jasným příkladem rozvoje oboru zvláště v posledních desetiletích. Za dobu, kterou mapuje souhrn našich publikací, došlo ke stěžejním objevům. Byly nalezeny genetické podstaty řady z těchto onemocnění. Bylo dosaženo nebývalého pokroku v objasnění patogeneze imunodeficiencí. V poslední dekádě byly objeveny mechanismy rozpoznání patogenu imunitním systémem, které velmi výrazně změnily pohled na pochody vrozené imunity. V této souvislosti byla také specifikována úplně nová kapitola nemocí zahrnovaných pod název „autoinflammatory syndromes“, kterých se týká právě stěžejní práce celé dizertace.

Popsaný vývoj jsme se snažili v průběhu uvedených let zachytit. V devadesátých letech minulého století jsme začali sledovat kohortu pacientů se syndromem diGeorge (publikace 1,4). Postupně jsme se začlenili jako pracoviště do mezinárodních struktur (publikace 2. a 5.). Rozvinuli jsme vlastní výzkumné projekty u pacientů s Brutonovou agamaglobulinémií (publikace 3. a 5.) a u celých skupin pacientů s běžnou variabilní imunodeficiencí (publikace 6.). V posledních letech jsme začali pracovat i na novém poli periodických stavů (rukopis 7.). Kromě vědeckých poznatků si ceníme hlavně zlepšené péče o naše pacienty, kterou velmi dobře demonstruje právě příklad popsáný v posledním sdělení (7.).

Naším dlouhodobým cílem je trvalé budování našeho pracoviště tak, aby dosahovalo vědecké úrovně evropských a světových center v oboru imunologie a aby poskytovalo odpovídající péči našim pacientům.

Odlesk této snahy je vyjádřen v komplexu dizertační práce.

5. PUBLIKACE , které jsou podkladem disertace

Knihy:

1. **Šedivá A.**: Imunodeficiencie. V: Lékařské repetitorium, Galén, 2003.
2. Bartůňková J., **Šedivá A.**, Janda A.: *Imunodeficiencie*. Druhé vydání, Grada 2007

Články v mezinárodním tisku:

1. **Šedivá A.**, Bartůňková J., Zachová R., Poloučková A., Hrušák O., Janda A., Kočárek E., Novotná D., Novotná K., Klein T.: Early development of immunity in diGeorge syndrome. *Med Sci Monit.* 2005 11(4):182-7
2. Cavadini P., Vermi W., Facchetti F., Fontana S., Nagafuchi S., Mazzolari E., **Šedivá A.**, Marrella V., Villa A., Fischer A., Notarangelo LD., Badolato R.: AIRE deficiency in thymus of 2 patients with Omenn syndrome. *J Clin Invest.* 2005 115(3):728-32, IF 14.20
3. Sochorová K., Horváth R., Rožková D., Litzman J., Bartůňková J., **Šedivá A.**, Špíšek R.: Impaired Toll-like receptor 8-mediated IL-6 and TNF production in antigen presenting cells from patients with X-linked agammaglobulinaemia. *Blood* 2007, 109(6):2553-6, IF 10.13
4. Janda A., Sedláček P., Mejstříková E., Zdráhalová K., Hrušák O., Kalina T., Žižková H., Formánková R., Keslová P., **Šedivá A.**, Bartůňková J., Dlask K., Starý J.: Unrelated partially matched lymphocyte infusions in a patient with complete DiGeorge/CHARGE syndrome. *Pediatric Transplantation*, 2007, 11(4):441-7, IF 1.42
5. **Šedivá A.**, Smith CI, Asplund AC, Hadač J, Janda A, Zeman J, Hansíková H, Dvořáková L, Mrázová L, Velbri S, Koehler C, Roesch K, Sullivan KE, Futatani T, Ochs HD. Contiguous X-chromosome Deletion Syndrome Encompassing the BTK, TIMM8A, TAF7L, and DRP2 Genes. *J Clin Immunol.*, 2007, 27(6):640-6, IF 2.78
6. Kalina T, Stuchlý J, Janda A, Hrušák O, Růžičková S, **Šedivá A.**, Litzman J, Vlková M. Profiling of polychromatic flow cytometry data on B-cells reveals patients' clusters in common variable immunodeficiency. *Cytometry A*, 2009, 75A(11):902-909, IF 3.259

7. **Šedivá A.**, Poloučková A., Podrazil M., Froňková E., Kalina T.: B lymphocytes analysis in a patient with Schnitzler syndrome. Manuscript, 2009.

Články v českém tisku:

1. **Machoninová A. (Šedivá)**, Rychter Z., Holub M., Kořínková L., Mandi B.: Influence of Thymosin and Levamisole on Dysgenetic Thymus of the Nude Mouse, *Folia Biologica*, Vol. 24, 1978:424-425
2. Bartůňková J., Litzman V., Thon V., **Šedivá A.**: Těžké kombinované defekty imunity: existují tyto choroby v České republice? *Čs.pediat.* 51,10, 1996:604-607
3. **Šedivá A.**: Vývoj imunitního systému v dětském věku, *Medicína v praxi* 3, 2001:41-43
4. Kočárek E, Krutílková V, Puchmajerová A, **Šedivá A**, Bartůňková J, Němečková M, Klein T, Zapletal R, Novotná K, Strnad M, Sálková M, Novotná D, Hlavovicová M, Hejtmánková M, Malíková M, Maříková T, Baxová A, Simandlová M, Vejvalková Š, Goetz P: Vztah genotypu a fenotypu u pacientů s mikrodeleci chromozomu 22q11. *Čs.pediat.* 2001, 56,8:427-437
5. **Šedivá A.**, Bartůňková J., Zachová R., Hrušák O., Kočárek E., Novotná D., Novotná K., Klein T.: Vývoj imunity u syndromu DiGeorge. *Alergie* 1, 2003: 8-13
6. **Šedivá A.**, Skalická A.: Periodické horečky u dětí. *Čs.revmatologie* 1, 2003:35-42
7. **Šedivá A.**: Poruchy regulace zánětu a periodické horečky. *Alergie* 2006, 8, 1: 48-53
8. Sobotková M., Bartůňková J., Litzman J., Zachová R., Jílek D., Kryštůfková O., Němeček V., Vernerová E., **Šedivá A.**: Výskyt infekce virem hepatitidy G u recipientů intravenózních imunoglobulinů v České republice. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie* 2006,4:136-139
9. Formánková R., Bartůňková J., **Šedivá A.**, Hrušák O., Mejstříková E., Sedláček P., Šrámková L., Keslová P., Vávra V., Janda A., Litzman J., Pařízková E., Dlask K., Starý J. Problematika včasného stanovení diagnózy

těžkého kombinovaného imunodeficitu. *Česko-slovenská pediatrie* 2007, 62, 1:5-15

10. **Šedivá A.: Primární imunodeficiencie v České republice.** Immunotech, In Vitro Diagnostika, 2008, 9, str. 6-9.

OBSAH

1. Úvod	2
2. Resumé	4
3. Tese	7
4. Závěr	21
5. Publikace	22