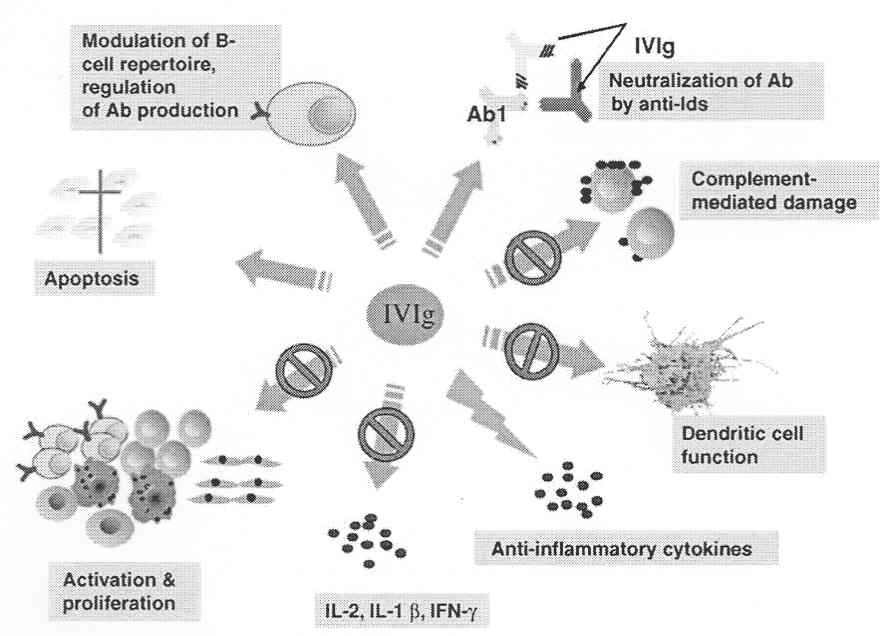
**КЛИНИЧКА ИМУНОЛОГИЈА – НАСТАВНА ЈЕДИНИЦА 14-15**

**Превенција и терапија имунолошких болести**

**ИНТРАВЕНСКИ ИМУНОГЛОБУЛИНИ (ЕНГЛ. INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULINES, IVIG) – ФАРМАКОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ, МЕХАНИЗАМ ДЕЈСТВА И НЕЖЕЉЕНА ДЕЈСТВА**

Пре више од 70 година је запажено да фракција хуманог серума изолована етанолом може да послужи у терапији неких инфекција. Усавршавањем ове методе показано је да су имуноглобулини активни принцип ове терапије и да су нарочито ефикасни ако су добијени од особа које су преболеле неку инфекцију. Такви имуноглобулини могу спречити или ублажити исто инфективно обољење код друге особе заражене истим инфективним агенсом. Пречишћавањем имуноглобулина из серума добијен је препарат који се може давати и интравенски (од тога долази име интравенски имуноглобулини). Препарати имуноглобулина могу бити добијени од здравих људи као „пул“ већег броја даваоца (интравенски имуноглобулини) или од давалаца који имају висок титар релевантних антитела у серуму (хиперимуни гамаглобулини) који се могу давати у профилакси специфичних инфекција.

Интравенски имуноглобулини су пуловани имуноглобулини IgG класе сакупљени из плазме преко 1000 донора. У траговима могу бити присутни и IgМ и IgА имуноглобулини. Примењени у терапијске сврхе, IVIG остварују бројне имуномодулаторне и антиинфламаторне ефекте (Слика 1.).



**Слика 1.**

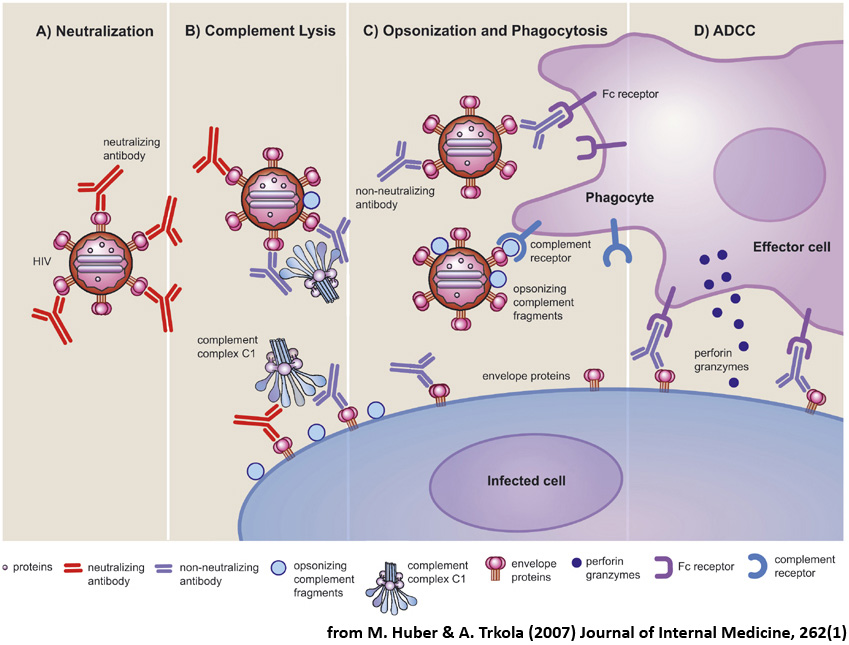
**МЕХАНИЗАМ ДЕЈСТВА ИНТРАВЕНСКИХ ИМУНОГЛОБУЛИНА**

Интравенски имуноглобулини своје ефекторске функције остварују преко **Fab** или **Fc** фрагмента имуноглобулина.

Функције које остварују преко Fab фрагмента су неутралишуће и то:

**Неутрализација микроорганизама и токсина**

Механизам неутрализације приказан је на Слици 2. Најчешће се примењује за лечење имунодефицијенција.



**Слика 2.**

**Неутрализација С3а и С5а анафилотоксина**

Експериментално је показано да примена IVIG може да неутралише анафилатоксине С3а и С5а. Механизам дејства IVIG остварују посредством Fab фрагмента. Резултати повољног терапијског ефекта забележени су ипак само на анималним моделима и то: на експерименталном моделу астме (миш) и на експерименталном моделу шока (свиња).

Ипак, у клиничким студијама терапије астме примена IVIG није показала задовољавајуће резултате.

Функције које остварују преко Fсфрагмента су анти-инфламаторне и то:

**Модулација сазревања и функције В лимфоцита**

Овај механизам дејства IVIG остварују посредством Fс фрагмента имуноглобулина који се везује за FcγRII (CD32) исказан на В лимфоцитима. На тај начин покрећу се инхибиторни сигнали активацијом SHIP (*SH2-containing inositide phosphatase*) фосфатазе која хидролизује фосфатифилинозитол и ремети функцију унутарћелијске сигнализације која се одвија посредством BTK (*Bruton’s tyrosine kinase*) и PLCγ (*phospholipase Cγ*). Инхибицијом BTK и PLCγ ремети се сазревање и активација В лимфоцита.

**Компетитивна инхибиција везивања антитела за FcRn**

Својим Fc рецептором имуноглобулини се везују за неонатални Fc рецептор (FcRn), експримиран на ендотелним ћелијама и ентероцитима. Антитела се интернализују у ћелију и на тај начин је спречена њихова протеолитичка разградња што за последицу има продужен век антитела.

Један од механизама дејства IVIG је компетитивна инхибиција за FcRn са аутоантителима.

Након примене IVIG један број антитела, присутан у IVIG ,,коктелу”, се везује за FcRn чиме онемогућава везивање антитела присутних у крви пацијента. На овај начин могуће је лечити аутоимунске болести посредоване аутоантителима.

**Инхибиција таложења C3b и C4b компоненте комплемента**

За овај ефекат IVIG је одговоран Fс фрагмент. IVIG се везују за C3b и C4b и на тај начин спречавају депоновање имунских комплекса у ткиву као и инфламацију. Још увек се користи само у претклиничким истраживањима и дискутабилно је да ли се овај механизам дејства може применити у клиничким студијама

**Инхибиција активације макрофага**

За овај ефекат IVIG је одговоран Fc фрагмент. Ефекат се остварује:

1. блокирањем активационих Fcγ рецептора макрофага чиме се спречава њихова активација и продукција проинфламаторних цитокина: TNF-α, IL-12 и IL-1;
2. подстицањем експресије инхибиторног FcγRII на мембрани макрофага.

Показано је да примена IVIG ,,обогаћених сијаличном киселином” (SA-IVIG) може да инхибира макрофаге тако што повећава експресију инхибиторног FcγRII на њиховој мембрани.

**Активација регулаторних Т лимфоцита**

У последњих неколико година на основу резултата у експерименталним моделима аутоимунских болести као и клиничких истраживања сматра се да је вероватно главни механизам терапијског ефекта имуноглобулина активација Т (CD4+CD25+FoxP3+ регулаторних ћелија).

**ТЕРАПИЈСКА ПРИМЕНА ИНТРАВЕНСКИХ ИМУНОГЛОБУЛИНА**

Интравенски имуноглобулини се користе као супституциона терапија (пасивна имунизација) за лечење инфекција код имунодефицијентних пацијената. Најчешћи терапијски протокол примене је у дози од 100-400mg/kg ТТ у трајању од 3-4 недеље. Захваљујући свом антиинфламаторном дејству могу се користити у лечењу аутоимунских болести и то у дози од 1-2g/kg ТТ пет дана, једном месечно у трајању од 3 до 6 месеци. Након тога се дају на 3-4 недеље у дози од 100-400mg/kgТТ. Најчешћа клиничка стања и обољења где је индикована примена интравенских имуноглобулина су:

* трансплантација алогене костне сржи;
* хронична лимфоцитна леукемија;
* идиопатска тромбоцитопенична пурпура;
* HIV инфекција код деце;
* примарне имунодефицијенције;
* Kawasaki синдром;
* хронична инфламаторна демијелинизарујућа полинеуропатија.

**НЕЖЕЉЕНА ДЕЈСТВА ИНТРАВЕНСКИХ ИМУНОГЛОБУЛИНА**

Јављају се у мање од 5% пацијената. Најчешће се јављају **одмах после инфузије**, у виду црвенила образа, главобоље, језе, вртоглавице, појачаног знојења, грчева, бола и осетљивости на месту убода, умора, бола у мишићима и у доњем делу леђа, мучнине и пада крвног притиска. Ако се нежељена дејства јаве током третмана, инфузија треба да буде успорена или прекинута. У могуће нежељене реакције након примене интравенских имуноглобулина спадају и:

* **анафилакса** се јавља у1 на 500-1000 случајева и обично је последица сензибилизације на IgA пацијената који су IgA дефицијентни. Јавља се или непосредно након, или у току терапије IVIG. Превенција је примена IVIG који су ,,пречишћени” од IgA;
* **асептични менингитис** се јавља ретко и манифестује се главобољом, ригидитетом врата, мучнином, повраћањем и фотофобијом;
* **кардиоваскуларни поремећаји** се јављају ретко и манифестују се појавом екстрасистола, поремећајима срчаног ритма и падом крвног притиска;
* **поремећај функције бубрега** је чешћи код пацијената који већ имају неко обољење бубрега.Уколико се након терапије IVIG јаве отоци на ногама и скочним зглобовима, анурија или олигурија, неопходно је прекинути терапију и консултовати нефролога;
* **остала нежељена дејства:** пост-инфузиона хиперпротеинемија, псеудо-хипонатремија, тромбоза, васкулитис или екцеми.

За лечење ових стања пацијенту се могу дати антихистаминици и /или интравенски хидрокортизон.

**КОРТИКОСТЕРОИДИ – ФАРМАКОКИНЕТИКА, МЕХАНИЗАМ И НЕЖЕЉЕНА ДЕЈСТВА**

Кортикостероиди су велика група стероидних хормона који се синтетишу у току метаболизма холестерола, у кори надбубрежне жлезде. Укључени су у регулацију бројних процеса као што су: реакција на стрес, имунски одговор, запаљење, метаболизам угљених хидрата и протеина и баланс воде и електролита. Постоје две групе кортикостероида:

* гликокортикоиди (кортизол) који имају антиинфламаторно дејство и контролишу метаболизам угљених хидрата, масти и протеина;
* минералокортикоиди (алдостерон) који контролишу ниво воде и електролита.

**Кортикостероиди су снажни анти-инфламаторни лекови који мењају транскрипцију многих гена.**

**Фармакокинетика кортикостероида**

Већина кортикостероида се добро апсорбује након оралног уношења. Већина синтетских кортикостероида, са изузетком преднизолона, имају мали афинитет за кортикостероид-везујуће глобулине и везују се доминантно за албумине. Само мали проценат циркулишућих кортикостероида који нису везани за протеин су слободни да испоље биолошке функције, док су они везани за протеине заштићени од метаболичке разградње.

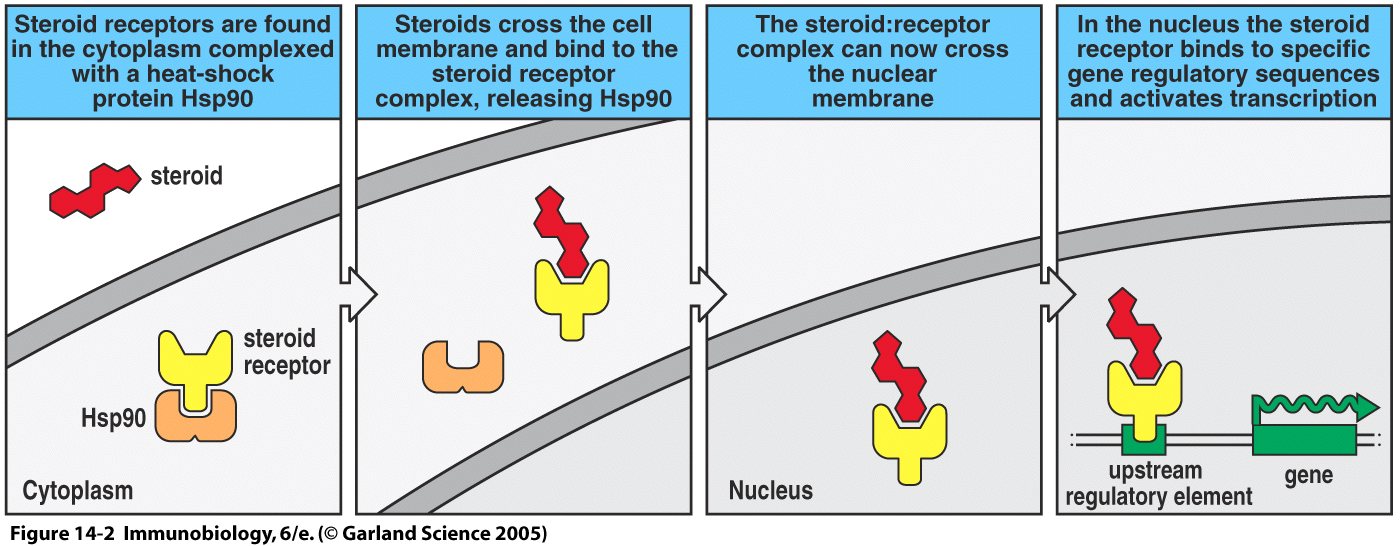
Кортикостероиди се метаболишу у јетри. Преко бубрега се екскретује 95% метаболита кортикостероида а остатак дигестивним системом.

Два најчешће употребљавана кортикостероида су кортизон и преднизон који су инактивни док се *in vivo* не конвертују у одговарајуће активне форме: кортизол и преднизолон.

**Механизам дејства кортикостероида**

Гликокортикоиди свој ефекат остварују помоћу специфичног интраћелијског гликокортикоидног рецептора (GR). Дифундују кроз ћелијску мембрану и везују се за GR у цитоплазми што за последицу има промену конформације рецептора и одвајање од HSP (Heat Shock Protein) за кога је претходно био везан. Формира се хомодимер који улази у једро и везује се за кратке ДНК секвенце и индукује или активацију или репресију транскрипције регулисаног гена (Слика 3).

Тако гликокортикоид/ GR кoмплекс узрокује репресију транскрипционих фактора NFkB и АP1 и на тај начин спречава индукцију инфламаторних процеса.



**Слика 3.** Кортикостероиди су липосолубилни молекули који у ћелију улазе дифузијом кроз плазма мембрану и везују се за своје рецепторе у цитоплазми. Везивањем кртикостероида за димер рецептор-HSP90, HSP90 се одваја и ослобађа ДНК-везујуће место на рецептору. Комплекс кортикостероид-рецептор улази у једро и везује се за промотер циљног гена чију експресију регулише.

**Имуносупресивни и антиинфламаторни ефекти кортикостероида (Табела 1.)**

|  |  |
| --- | --- |
| **Кортикостероидна терапија** | |
| **Дејство кортикостероида на:** | **Физиолошки ефекат** |
| **IL-1, TNF-α, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, CXCL8** | **Инфламација посредована цитокинима** |
| **INOS** | **NO** |
| **Фосфолипаза А2**  **COX-2**  **Липокортин-1** | **Простагландини Леукотријени** |
| **Адхезиони молекули** | **Смањена миграција леукоцита из крвних судова** |
| **Ендонуклеазе** | **Индукција апоптозе лимфоцита и еозинофила** |

**Табела 1.**

* Под утицајем гликокортикоида, ћелије синтетишу и ослобађају **липомодулин** (гликопротеин који инхибира дејство фосфолипазе А2). **Инхибицојом фосфолипазе А2** смањује се ослобађање арахидонске киселине и на тај начин се **успорава продукција метаболита (простагландина и леукотријена)** са проинфламаторним дејством.
* Након само једне примењене дозе гликокортикоида, смањује се **миграција** и **акумулација неутрофила** на место запаљења, што редукује симптоме акутне инфламације.
* Могу и да директно супримирају активност ћелија које учествују у запаљенској реакцији: **инхибирају фагоцитну способност неутрофила и моноцита, продукцију ензима колагеназа**, цитокина као што су **IL-1 и TNF-alpha**.
* Гликокортикоиди **коче активност NО-синтетазе** а која је одговорна за ширење крвих судова у инфламацији.
* Збирно гликокортикоиди **супримирају имунски одговор** и **ублажавају** или **прекидају инфламаторни процес**.

**Нежељена дејства кортикостероида**

Два главна облика нежељених ефеката кортикостероида настају услед дуготрајног узимања високих доза или услед наглог прекида терапије. Ако се кортикостероиди користе непрекидно месец дана са њиховим узимањем се не сме престати нагло због појаве озбиљних проблема. Најчешћа нежељена дејства су: негативан баланс калцијума и следствен настанак остеопорозе, појачан апетит, центрипетална гојазност, отежано зарастање рана, повећан ризик од инфекција и поремећај раста код деце. Друге честе последице су: миопатија, аваскуларна некроза, хипертензија, пурпуре, хиперлипидемија, еуфорија или депресија, дијабетес и катаракта.

**НЕСТЕРОИДНИ АНТИИНФЛАМАТОРНИ ЛЕКОВИ – МЕХАНИЗАМ И НЕЖЕЉЕНА ДЕЈСТВА**

Нестероидни антиинфламаторни лекови су најчешће коришћени лекови који испољавају три главна ефекта:

* антиинфламаторни: ублажавају инфламаторну реакцију;
* аналгетички: ублажавају бол;
* антипиретички: снижавају повишену телесну температуру.

Најпознатији лекови из ове групе су аспирин, ибупрофен и напроксен.

Сви поменути ефекти ових лекова су последица блокаде ензима, циклооксигеназе (COX, од енгл. cyclooxigenase), што резултира смањењем продукције простагландина и тромбоксана:

* антиинфламаторни ефекат: смањују вазодилатацију и индиректно смањују едем, али при томе не смањују акумулацију инфламаторних ћелија;
* аналгетички ефекат: смањују сензитизацију ноцицептивних нервних завршетака, а који су под утицајем медијатора инфламације (брадикинин и 5-хидрокситриптамин);
* антипиретички ефекат: смањују синтезу простагландина који утичу на центар за терморегулацију у хипоталамусу.

Ензим циклооксигеназа (COX) има бар две различите изоформе: COX-1 је конститутивна изоформа, присутна у многим ткивима, и конвертује арахидонску киселину у класе простагландина који у метаболизму стимулишу физиолошке функције. COX-2 је индуцибилна изоформа, настаје у запаљењским стањима, а индукују је медијатори инфламације.

Већина нестероидних анти-инфламаторних лекова делује неселективно, па се сматра да је анти-инфламаторно дејство нестероидних анти-инфламаторних лекова резултат инхибиције COX-2, а да су нежељени ефекти последица инхибиције конститутивне COX-1 изоформе ензима. Заједнички нежељени ефектинестероидних антиинфламаторних лекова су: диспепсија, дијареја/опстипација, мучнина и повраћање, а у неким случајевима крварење из желуца и улцерације, осип, уртикарија, фотосензитивне реакције, акутна бубрежна инсуфицијенција, аналгетска нефропатија (код хроничне употребе).

**ИМУНОМОДУЛАТОРНЕ СУПСТАНЦЕ – МЕХАНИЗАМ И НЕЖЕЉЕНА ДЕЈСТВА**

Имуномодулатори су супстанце које модулишуактивност имунског система тако што делују **имуносупресивно** (супримирају имунски одговор) или **имуностимулаторно** (појачавају имунски одговор).

Код трансплантације и аутоимунских обољења циљ терапије је да се сузбије имунски одговор. Код тумора и имунодефицијенција циљ терапије је да се поспеши имунски одговор.

Супстанце изоловане из неких врста гљива и бактерија показале су се као одлични имуносупресивни лекови, без нежељених токсичких дејстава ако се дају у мањим дозама. Ове супстанце су од посебно великог значаја у спречавању трансплантационох реакција као што је одбацивање калема. Највише коришћени су циклоспорин А и такролимус који инхибирају пролиферацију и активност у првом реду Т лимфоцита, али и других леукоцита. Најважнији имунски ефекти циклоспорина А и такролимуса су приказани у Табели 2.

|  |  |
| --- | --- |
| **Имунски ефекти циклоспорина А и такролимуса** | |
| **Тип ћелије** | **Ефекат** |
| Т лимфоцити | Смањење експресије IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, TNF-α  Смањење пролиферације као последица смањене продукције  Смањена Ca2+–зависна егзоцитоза гранула  Инхибиција апоптозе индуковане антигеном |
| В лимфоцити | Инхибиција пролиферације као последица смањене продукције цитокина од стране Т лимфоцита  Инхибиција пролиферације након везивања површинских имуноглобулина  Индукција апоптозе као последица активације В лимфоцита |
| Гранулоцити | Смањена Ca2+–зависна егзоцитоза гранула |

**Табела 2.**

**МОНОКЛОНСКА АНТИТЕЛА ПРОТИВ МЕМБРАНСКИХ МОЛЕКУЛА**

Моноклонска антитела су скуп имуноглобулина, произведених in vitro или in vivo, који имају иста физичко-хемијска својства и само једну специфичност за антиген тј. један клон B лимфоцита производи антитела исте специфичности (моноспецифична).

Поступак њихове производње се заснива на стварању хибридома фузијом плазмоцита жељене специфичности и ћелија мултиплог мијелома због њихове бесмртности. Моноклонска антитела су много ефикаснија (имају већи афинитет) и специфичнија за антиген од стандардних антисерума па се могу давати у мањим количинама што смањује опасност од серумске болести и других облика алергијских реакција. Будући да су специфична само за један, одабрани, лимфоцитни антиген, могућа је селективна инактивација појединих популација лимфоцита. Моноклонска антитела могу деловати на два начина:

* уништавањем циљних лимфоцита механизмом цитотоксичности посредоване антителима или активацијом фагоцита и NК ћелија;
* супримирањем функције лимфоцита након везивања за функционалне лимфоцитне молекуле, чиме је онемогућено везивање активационих молекула.

У клиничкој пракси се најчешће користе антитела против лимфоцитних маркера свих или појединих популација Т лимфоцита, лимфоцитног рецептора за антиген, костимулаторних и адхезивних молекула, MHC молекула, цитокина и цитокинских рецептора.

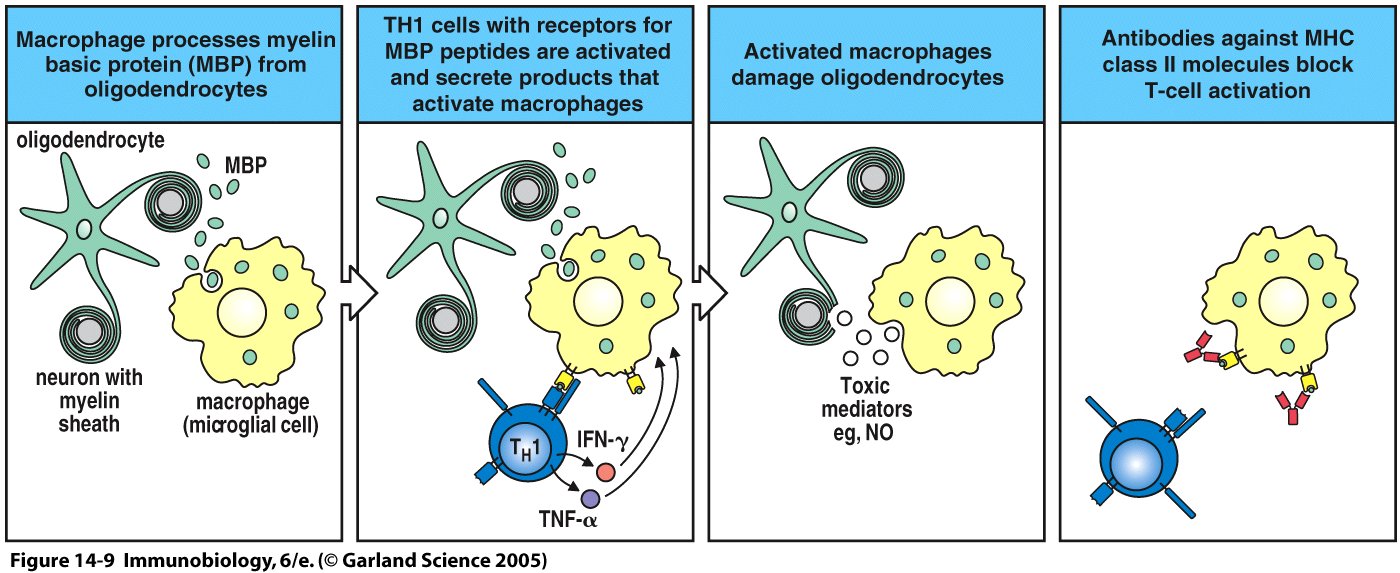
Бројна моноклонска антитела су тестирана у експерименталним условима, док су нека од њих примењена и у клиничкој пракси. Антитела против молекула CD52 су прва тестирана за клиничу употребу. Овај маркер исказују Т и В лимфоцити и макрофаги, а ова антитела се користе у лечењу тешких аутоимунских болести (мултипла склероза, васкулитиси, реуматоидни артритис). У клиничким пресађивањима органа задовољавајућа имуносупресија се постиже применом моноклонског антитела против Т лимфоцитног маркера CD3, чиме се уништавају зрели Т лимфоцити. Ефикасна су и атитела против α-ланца високоафинитетног рецептора за IL-2 (анти-CD25), јер уништавају активиране лимфоците. У трансплантацији костне сржи користе се антитела која уклањају све или само неке подврсте зрелих Т лимфоцита из калема (нпр. анти-CD3, анти-CD4, анти-CD8). Интензивно се истражује могућност употребе антитела против различитих адхезивних и костимулаторних молекула (нпр. анти-CD40L, анти-LFA-1, CTLA-4 молекул везан за Fc фрагмент IgG антитела, анти-ICAM-1, анти-CD45 итд.). Антитела против молекула CD20 делују на В лимфоците и користе се за лечење неких врста лимфома, леукемија и аутоимунских болести. Неутралишућа моноклонска антитела против цитокина, цитокинских рецептора и костимулаторних молекула користе се у лечењу аутоимунских болести и терапији одбацивања трансплантата, за усмеравање усмеравање имунске реакције (Тh2 насупрот Тh1) и диференцијацију супресорних лимфоцитних популација. Антитела против фактора раста користе се у лечењу малигних тумора.

На почетку клиничке употребе моноклонска антитела су се производила имунизацијом мишева или пацова одређеним антигеном, тако да су се након примене ксеногених имуноглобулина стварала антитела која су прекидала њихово деловање и изазивала алергијске реакције. Осим тога, антитела могу понекад изазвати веома озбиљне пропратне ефекте, као што је цитокинска олуја – нагло ослобађање велике количине цитокина након активације макрофага и NК ћелија ксеногеним Fc фрагментом. Ти проблеми су превазиђени генетским манипулацијама при производњи моноклонских антитела. Мишја моноклонска антитела се могу поступком тзв. хуманизације прерадити тако да се ксеногени делови који одређују класу антитела вежу за костур људског имуноглобулина. Химерично антитело се добија генетском фузијом варијабилних региона мишијих антитела са константним регионима хуманог антитела. Хуманизовано антитело се добија спајањем хиперваријабилних делова мишијег антитела са осталим регионима хуманог антитела. Другим речима у варијабилне регионе хуманог антитела се инсертују мишији хипеваријабилни региони. Моноклонска антитела се могу клонирати из одабраних секвенци ДНК људких имуноглобулинских гена. Оне се затим преносе у људске плазмоците које стварају рекомбинантна антитела жељене специфичности. Коначно, у мишеве са недостатком имуноглобулинских гена убацују се људски гени за тешке и лаке ланце антитела, тако да миш ствара хуманизована антитела на жељене епитопе. Тако произведена антитела нису имуногена за човека, а имају жељену специфичност.

У новије време се развија и поступак производње **имунотоксина**. Имунотоксини служе за постизање селективне цитотоксичности и најчешће се користе у терапији тумора. Укратко, на Fc фрагмент произведених моноклонских антитела против одабраних антигена (најчешће туморских) вежу се различите цитотоксичне супстанце (нпр. рицин А и псеудомонас-токсин, егзотоксин А) које се помоћу тих антитела усмеравају на ћелије које носе тај антиген. Антитела обезбеђују селективност, а токсини токсичност. Последица њихове примене је уништавање нападнутих ћелија након везивања антитела. Слично се на моноклонска антитела могу везати радиоактивни молекули, лекови, отрови или ензими. Најчешће се користе у терапији тумора. Ови поступци су још увек у фази испитивања, мада постоји неколико антитуморских моноклонских антитела која су одобрена за клиничку употребу:

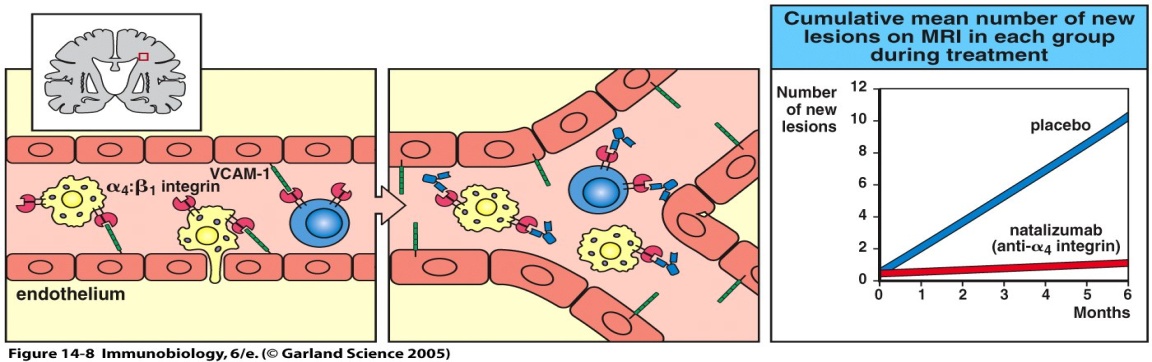
* антитела против онкогена Her-2/Neu за лечење карцинома дојке
* анти-CD20 и анти-CD10 за лечење В-лимфоцитног лимфома
* анти-CEA (канцероембрионални антиген) за лечење карцинома дебелог црева и плућа
* анти-CA125 за лечење карцинома јајника и др.

Терапијске могућности моноклонских антитела илустроване су на четири примера из експерименталне клиничке имунологије.

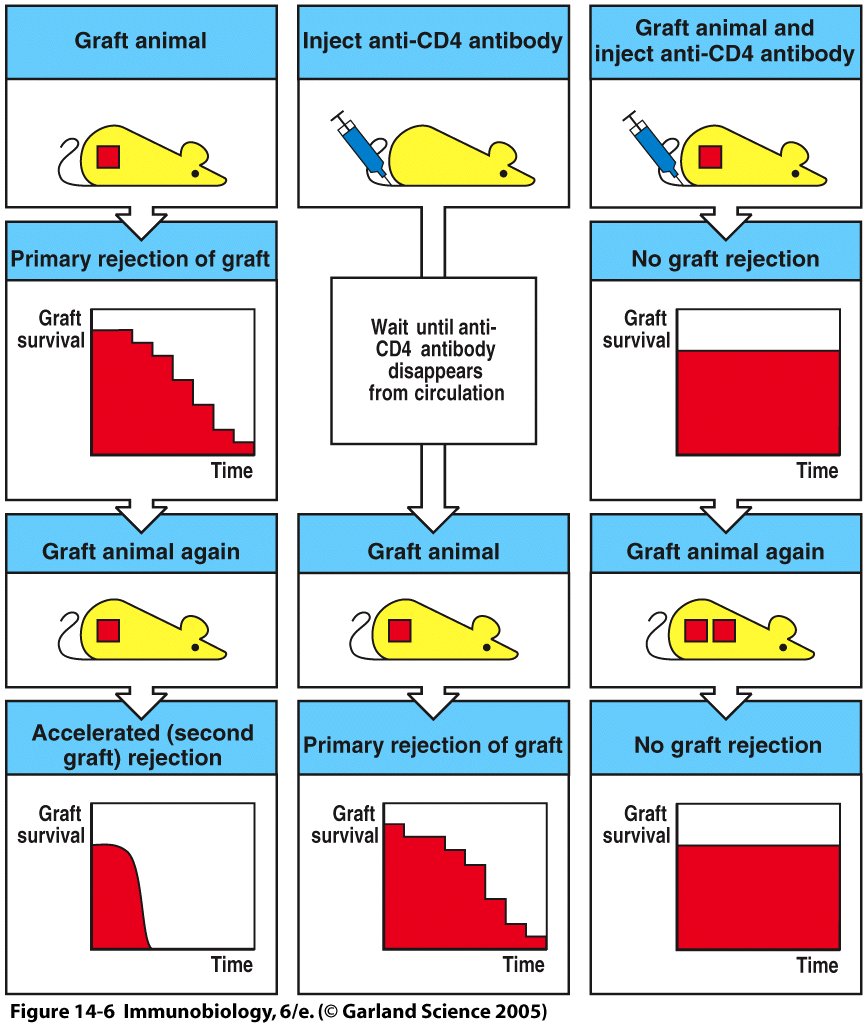
1. Антитела против MHC молекула II класе могу инхибирати индукцију експерименталног аутоимунског енцефалитиса на тај начин што се везују за MHC молекул на антиген-презентујућим ћелијама (макроглијална ћелија) и спречавају активацију Т лимфоцита (Слика 4.).

Слика 4. У мишијем моделу експериментанлног аутоимунског енцефаломијелитиса, макрофаги разлажу мијелински базни протеин (MBP) и презентују MBP пептиде Th1 лимфоцитима. Активирани Th1 лимфоцити секретују цитокине који активирају макрофаге, који даље оштећују олигодендроците. Антитела против MHC молекула II класе блокирају активацију лимфоцита.

1. Антитела против α4 интегрина онемогућавају адхезију ефекторских ћелија за ендотел и на тај начин онемогућавају њене ефекте на нервне елементе и индукцију инфламације (Слика 5.)



Слика 5. Леви панел: интеракција између α4:β1 интегрина (VLA-4) на лимфоцитима и макрофагима и VCAM-1 на ендотелним ћелијама, омогућава адхезију и олакшава миграцију ових ћелија у инфламаторне плакове у мултиплој склерози. Централни панел: моноклонско антитело натализумаб се везује за α4 ланац интегрина и блокира поменуту везу. На тај начин превенира улазак лимфоцита и макрофага у мождано ткиво и егзацербација инфламације. Десни панел: број нових лезија у мозгу након примене натализумаба је значајно смањен у односу на контролу која је примила плацебо.

1. Анти-CD4 антитела дата заједно са графтом могу спречити имунски одговор и индуковати дуготрајну имунску толеранцију посредовану антиген специфичним Т регулаторним ћелијама (Слика 6.).

Слика 6. Миш коме је пресађено ткиво генетски различитог миша одбацује калем. Након поновног пресађивања идентичног ткива калем се одбацује много брже (леви панел). Миш коме је дато анти-CD4 антитело, након његове елиминације из циркулације, је повратио примарну динамику одбацивања калема (централни панел). Када се калем пресади истовремено са давањем анти-CD4 антитела нема одбацивања калема. Када се идентично ткиво пресади касније, чак и у одсуству антитела, нема одбацивања. Миш је постао толерантан на антигене калема (десни панел).

**ТЕРАПИЈСКА ПРИМЕНА ЦИТОКИНА, АНТИТЕЛА НА ЦИТОКИНЕ И СОЛУБИЛНИХ РЕЦЕПТОРА**

Цитокини су велика фамилија протеина коју чине лимфокини, монокини, интерферони и хемокини. Представљају важне компоненте имуног система које заједно са специфичним инхибиторима цитокина и солубилним цитокинским рецепторима учествују у регулацији имунског одговора. Њихова улога, пре свега у настанку инфламације, је добро позната. Дизбаланс у продукцији цитокина или експресији цитокинских рецептора, као и премећаји у њиховом деловању, доводе до различитих патолошких стања. Испитивања цитокина као могућих терапијских агенаса напредују веома брзо. Терапијска примена цитокина подразумева два приступа: администрацију пречишћених рекомбинантних цитокина или коришћење њихових антагониста у различитим запаљенским болестима. Међутим, имајући у виду велики број цитокина, разочаравајућа је чињеница да само релативно мали број може да се користи клинички сврхе.

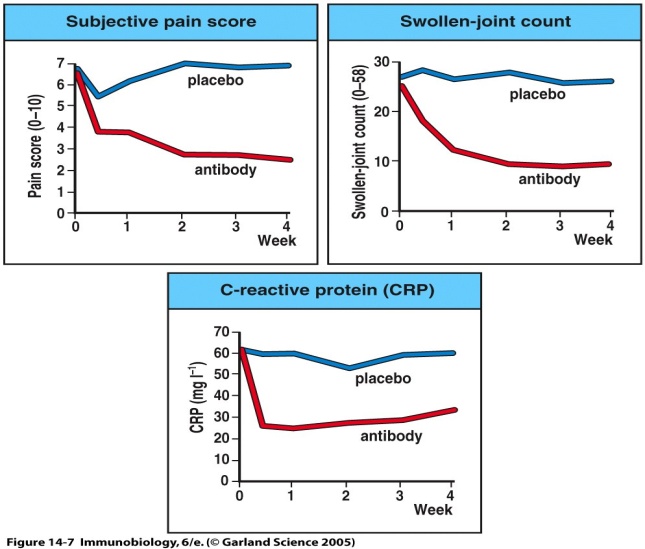
Следећи цитокини су недавно одобрени за терапију људи.

**IFN-α:** вирусни хепатитис (хепатитис B и C), condylomata acuminata, папиломатоза гркљана, херпетични кератоконјуктивис, мултипли мијелом, не-Хоџкинов лимфом, малигни меланом, карцином бубрега, бешике и јајника.

**IFN-β:** мултипла склероза и глиом.

**IFN-γ:** AIDS (Капошијев сарком и опортунистичке инфекције) и идиопатска плућна фиброза.

У најширој клиничкој употерби су анти-TNF агенси (анти-TNF антитела и солубилни TNF рецептор). Прва и најбоље документована, али не и једина терапијска индикација је реуматоидни артритис (Слика 7). Слична терапија се успешно користи и у улцеративном колитису и Кроновој болести. **Infliximab** је хуманизовано мишје моноклонско антитело које се везује за TNF-α и на тај начин блокира његово везивање за рецептор. С обзиром да TNF-α игра важну улогу у инфламацији и у заштити, инхибиција овог цитокина може да повећава ризик за инфекције и малигна обољења.

Слика 7. 24 пацијента је праћено 4 недеље након лечења моноклонским антителом против TNF-α (10mg/kg) или плацебом. Анти- TNF-α терапија је довела до редукције симтома и знакова болести (бола и отока), као и системске инфламације (С-реактивни протеин акутне фазе).

**Нежељена дејства цитокинске терапије** су: синдром сличан грипу, анорексија, грозница, артралгија, мијалгија и поремећај у функционисању јетре.

**ВАКЦИНЕ**

**ИМУНИЗАЦИЈА**

Особа може постати имуна на одређено инфективно обољење уз помоћ два артефицијелна метода:

**Активна имунизација** представља давање (инокулацију) антигена који индукују специфични имунски одговор.

**Пасивна имунизација**, којом пацијент стиче привремену отпорност на одређену инфекцију, подразумева трансфер преформираних антитела из друге јединке (људских или анималних).

Активна имунизација усмерена на специфични микроорганизам назива се **вакцинација**. Име је добила у част пионирског открића Edward-a Janner-a из 1796. године да се превенција појаве великих богиња може спровести инокулацијом вируса крављих богиња (Vaccinia, лат. Vacca – крава). Иако је Lui Paster 1980. године показао да је могућа имунизација и против других инфективних обољења, термин вакцинација се одржао до данас. Развој специфичног имунског одговора након вакцинације базиран је на особини ћелија стечене имуности (В и Т лимфоцитити) да након контакта са антигеном диференцирају у меморијске ћелије. Функција вакцине је да индукује меморијски имунски одговор без изазивања обољења, тако да микроорганизам након првог контакта са пацијентом индукује ефикаснији, секундарни, пре него примарни имунски одговор. Вакцине могу деловати на активацију и диференцијацију или Т или В лимфоцита, иако већина индукује одговор обе врсте лимфоцита. Имунски одговор који индукују вакцине подразумева:

* продукцију антитела (IgG и IgM) за екстрацелуларне бактерије (опсонизација, фагоцитоза, активација система комплемента), бактеријске егзотоксине (неутрализација) и вирусе;
* продукцију антитела мукоза (IgA) за екстрацелуларне бактерије (неутрализација, инхибиција адхеренције) и вирусе;
* индукцију целуларне имуности (Т лимфоцит - макрофаг) за интрацелуларне бактерије и вирусе.

**ОСОБИНЕ ВАКЦИНА**

Не постоје вакцине против свих болести, а разлог томе је што вакцина, да би била у употреби, мора да задовољава следеће критеријуме. Вакцина мора бити:

**Ефикасна**

Идеална вакцина је високо имуногена и обезбеђује комплетну и дуготрајну (доживотну) заштиту од инфекције. Захваљујући успешној вакцинацији, неке болести као што су велике богиње и дифтерија су данас проглашене искорењеним. За друге болести, као што су мале богиње, рубела, заушке, полиомијелитис или тетанус, се очекује ерадикација у блиској будућности. Ипак, и поред постојећих вакцина, бројне инфективне болести остају и даље значајан медицински проблем. Као пример наводе се инфлуенца, беснило и туберкулоза. Разлози за смањену ефикасност вакцина против ових болести су различити. На пример, вирус инфлуенце подлеже интензивним антигенским варијацијама, тако да је веома тешко ускладити примењену вакцину са актуелним сојем изазивача обољења. Коначно, за велики број инфективних болести данас, још увек не постоје ефикасне вакцине (нпр. прехлада, стафилококне инфекције, као и практично све гљивичне и паразитарне ифекције) (Табела 1).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **ВИРУСИ** | **БАКТЕРИЈЕ** | **ГЉИВЕ** | **ПАРАЗИТИ** |
| **Вакцине у општој употреби** | Poliomyelitis | Difteria  Tetanus  Pertussis |  |  |
|  | Morbili  Mumps  Rubella | BCG (у неким земљама) |  |  |
|  | Hepatitis B |  |  |  |
| **Вакцине које се дају особама које су у повећаном ризику од обољевања** | Influenza | BCG |  |  |
|  | Жута грозница | Тифус |  |  |
|  | Hepatitis A | Pneumococcus |  |  |
|  | Rabies | Meningococcus |  |  |
|  | Varicella-zoster virus | Haemophilus |  |  |
|  |  | Antrax |  |  |
| **Вакцине које још нису доступне за употребу** | Adenovirus | Staphylococcus | Candida | Маларија |
|  | Rhinovirus | Streptococcus | Pneumocystis | Leishmania |
|  | Herpes virusi | Gonococcus |  | Schistosomiasis |
|  | Respiratory syncicial virus (RSV) | Syphilis |  | Filaria |
|  | HIV | Лепра |  |  |

Табела 1.

**Безбедна**

Давање вакцина је једини медицински третман који се спроводи на здравим људима. Отуда, сваки акцидент повезан са вакцинацијом представља веома важан и скуп здравствени проблем. Главни нежељени ефекти и ограничења за примену вакцина су приказани у Табели 2.

|  |
| --- |
| **Ограничења и проблеми од стране вакцина** |
| Инактивисане вакцине – микроорганизми нису адекватно убијени |
| Атенусани микроорганизми могу да се трансформишу у дивљи тип и поврате вируленцију (нпр. типови 2,3 полиовируса) |
| Инклузија токсичног материјала (нпр. тифус, велики кашаљ) |
| Контаминација анималним вирусима |
| Контаминација протеинима јаја (хиперсензитивност, алергија) |
| Крос реакција са сопственим (аутоимунске болести) |
| **Ограничења и проблеми од стране пацијента** |
| Имунодефицијенција (живи микроорганизми могу изазвати озбиљна обољења) |
| Локална инфламаторна реакција, често на адјуванс |
| Преосетљивост на вакцину (нпр. тетанус) |
| Интерференција између вакцина које се дају истовремено (не увек) |

Табела 2.

Најчешћи проблем повезан са вакцинама је њихова блага токсичност. Неке вакцине, нарочито целе вакцине које садрже адјуванс, могу изазвати бол на месту инокулације неколико сати или дана након апликације. У ретким случајевима, токсичност може довести до појаве системске реакције праћене лошим општим стањем и појавом грознице. Много озбиљнији проблем је могућа појава анафилактичке реакције на неку од компонената вакцине, као што су протеини јаја (нпр. вакцина против грипа где се узрочници узгајају у пилећем ембриону), адјуванси или презервативи. Трећи значајан проблем повезан са имунизацијом је резидуална вируленција узрочника. Атенуисани вируси могу повремено да изазову обољење не само код имунодефицијентних особа или фетуса, већ и код здраве деце и одраслих. Добар пример за то је атенуисана жива вакцина против полиомијелитиса. Иако се ради о веома ефикасној вакцини, једно од 2 милина деце развије клинички манифестну болест након вакцинације. Овај проблем је превазиђен увођењем инактивисане, мртве вакцине у употребу.

**Стабилна**

Стабилност вакцина је нарочито важна, с обзиром да се вакцине најчешће примењују у срединама удаљеним од места њихове производње. Овај проблем је нарочито значајан када су у питању живе вакцине.

**Јефтина**

Већина вакцина је веома јефтина, па се вакцинација као вид превенције инфективних болести сматра најисплативијом. Ипак, у многим деловима света, примена вакцина је и даље значајан економски проблем. Такође постоје и вакцине чија је производња и даље веома скупа (нпр. вакцина против хепатитиса В).

**ВРСТЕ ВАКЦИНА**

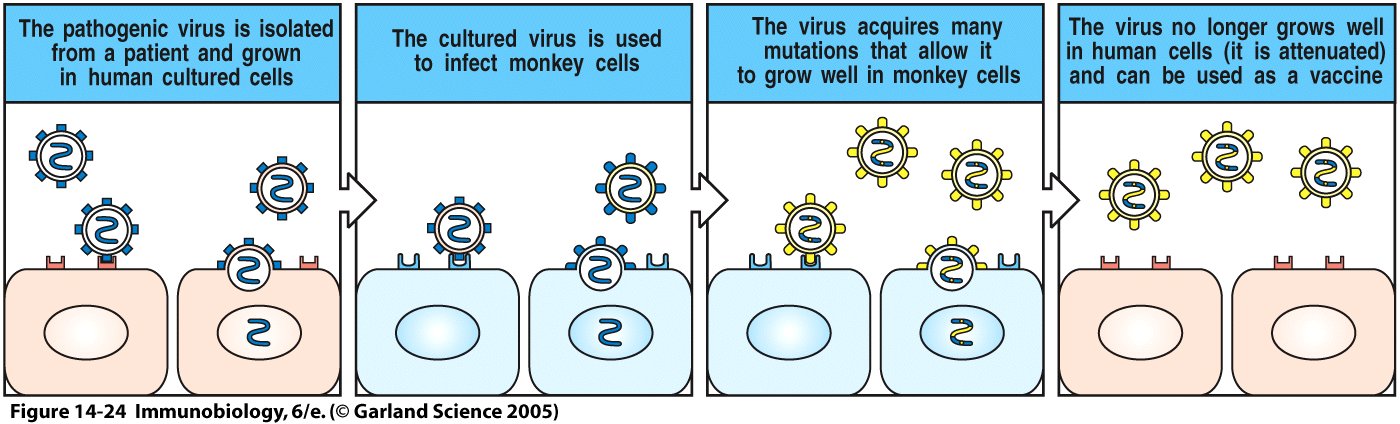
Научници непрестано теже справљању максимално ефикасне и безбедне вакцине. У сваком случају, патоген бива измењен или инактивисан тако да не може да изазове болест. Ипак, нису све вакцине једнако ефикасне и безбедне. Ефикасност може бити праћена одређивањем титра антитела (IgG и IgM) у крви. Уколико је ниво антитела низак, он може бити рестимулисан давањем веће количине антигена – бустер (енгл. booster) имунизација.

Вакцине, од којих свакa има своје предности и недостатке, подељене су према врсти антигена које садрже. Примери су приказани у Табели 3.

|  |  |
| --- | --- |
| **Тип вакцине (антигена)** | **Примери** |
| Атенуисане (живе) вакцине | Велике богиње, морбили, мумпс, рубела, полиомијелитис (Sabin-ова вакцина), жута грозница, варичела, BCG, колера |
| Инактивисане (мртве) вакцине које садрже целе узрочнике | Беснило, инфлуенца, полиомијелитис (Salk-ова вакцина), хепатитис А, пертузис, тифус, колера |
| Инактивисане субјединичне вакцине које садрже антигенске фрагменте | Meningococcus, Pneumococcus, Haemophilus influenzae, хепатитис В, \*Gonococcus, \*E. coli |
| Токсоиди као вакцине | Тетанус, дифтерија |
| Рекомбиноване вакцине | Хепатитис В, \*маларија, \*HIV, \*инфлуенца |

Табела 3. (\*Вакцине још увек у фази експерименталног и клиничког испитивања)

**Атенуисане вакцине** садрже атенуисане микроорганизме и називају се и модификоване живе вакцине. Садрже активне (живе), али авирулентне микроорганизме, тако да у нормалним условима могу проузроковати благе инфекције, али не и клинички развијену болест. Атенуација микроорганизма представља процес индукције спонтаних мутација генома патогена након излагања неповољним условима средине (нпр. ниска температура, недостатак хранљивих материја и сл.) и селекцију мутантних сојева који су изгубили вируленцију, а сачували антигеност (Слика 8).



Слика 8. Да би се добио атенуисани вирус, најпре се узгаја у култури хуманих ћелија. Након тога, исти сој се адаптира на раст у култури ћелија друге врсте све док му не ослаби способност раста у хуманим ћелијама. Адаптација је резултат поинт мутација вирусног генома. Атенуисани вирус расте споро у култури хуманих ћелија – индукује имунски одговор, али не и болест.

С обзиром да живе вакцине садрже активне микроорганизме, велики број антигена је у могућности да индукује ефикасан имунски одговор, али су знатно мање стабилне. Такође, вакцинисане особе могу бити инфективне за друге у окружењу, тзв. контактни имунитет.

Иако су веома ефикасне, атенуисане вакцине могу бити веома опасне за имунокомпромитоване пацијенте, тј. модификовани микроорганизми могу задржати резидуалну вируленцију и изазвати болест код особа са имунодефицијенцијом. Живе вакцине не треба давати трудницама због могућности да патогени прођу плаценталну баријеру и изазову инфекцију плода. Понекад, модификовани вируси могу да поврате вируленцију или да мутирају у форму која може да изазове болест, тако да се препоручује строга процена ризика за примену ових вакцина.

**Инактивисане (мртве) вакцине** су подељене на две подврсте: **целе вакцине**, које садрже инактивисане целе микроорганизме и **субјединичне** **вакцине** које се састоје од антигенских фрагмената микроорганизама. Ове вакцине су безбедније од живих зато што се мртви патогени или њихови антигени не могу репликовати, немају резидуалну вируленцију и не могу да мутирају у дивљи сој. Ипак, с обзиром да инактивисани микроорганизми не могу да се репликују често је потребно неколико бустер доза да би се развио комплетан имунски одговор. Примена мртвих вакцина не може да проузрокује контактни имунитет. Неантигенски делови микроорганизама могу понекад да допринесу појави болне инфламације. Због тога се данас употреба мртвих узрочника изазивача пертузиса замењује субјединичном вакцином.

Приликом инактивације патогена је важно да антигени за имунизацију остану што сличнији онима код живих микроорганизама. Најчешће се за инактивацју користи топлота или формалдехид за денатурацију протеина и нуклеинскух киселина.

С обзиром да мртви микроорганизми у инактивисаним вакцинама не могу да се репродукују, они презентују мањи број антигена од живих вакцина. Овакве вакцине су антигенски слаби стимулатори имунског одговора, па се зато морају давати у већим или понављаним дозама, што може довести до појаве алергијских реакција. Посебан приступ овом проблему је додавање хемијских једињења која се називају **адјуванси,** који повећавају имуногеност антигена и користе се као адитиви за справљање инактивисаних вакцина.Адјуванси повећавају ефикасност (антигеност) вакцине стимулацијом и активацијом Toll-like рецептора. Сами по себи, неки цитокини као што су IL-1, IL-2 и IFN-γ, могу имати адјувансну активност. Артефицијелне липидне везикуле познате као липозоми се користе за транспорт антигена до антиген-презентујућих ћелија. Нежељена реакција која настаје као последица повећања антигености вакцине је могућност појаве локалне инфламације.

С обзиром да имунски систем препознаје мртве узрочнике инактивисаних вакцина као егзогене антигене, оне пре свега стимулишу развој хуморалне имуности и продукцију антитела.

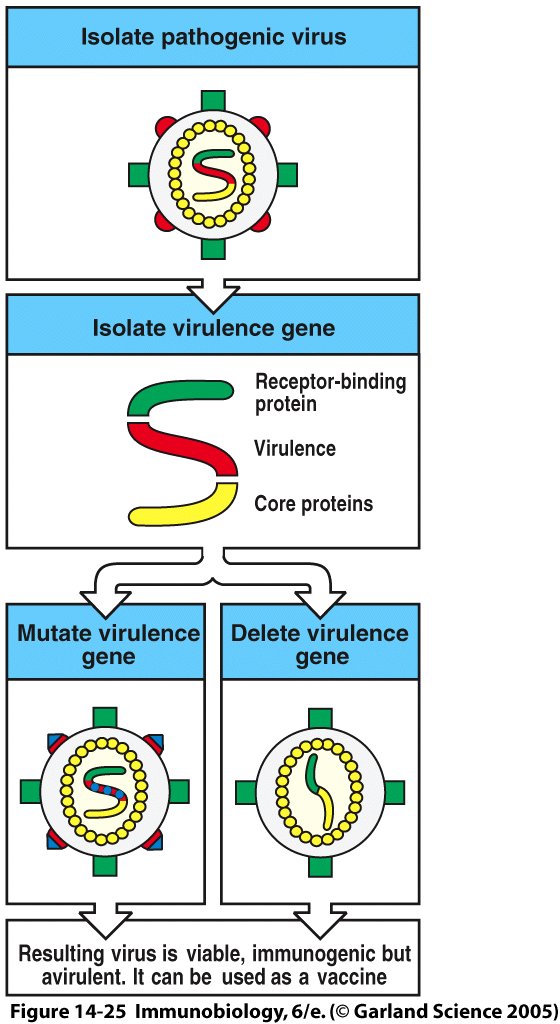
**Токсоиди као вакцине**

За неке бактеријске инфекције је ефикаснија индукција имунског одговора применом токсина него целуларним антигенима (нпр. тетанус и дифтерија). Токсоиди су хемијски и температурно модификовани бактеријски токсини који су задржали антигеност. Као и код мртвих вакцина, токсоиди индукују хуморални имунски одговор и продукцију специфичних антитела. С обзиром да токсоиди имају мање антигенских детерминанти, ефикасна имунизација захтева понављане дозе вакцинације у детињству, као и ревакцинације на сваких 10 година током живота.

**Комбиноване вакцине** се састоје од комбинације неколико токсоида и инактивисаних патогена који се дају симултано. Неколико комбинованих вакцина је у општој употреби. Примери су MMR вакцина која садржи атенуисане узрочнике morbila, mumps-a и rubelle, или DiTePer вакцина која садржи токсоиде дифтерије и тетануса, као и мртве узрочнике пертузиса.

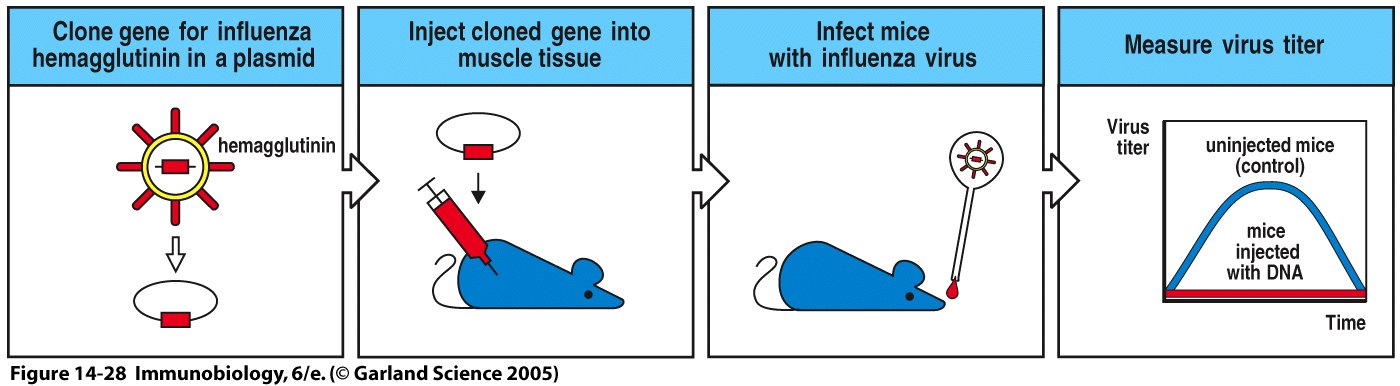
**Вакцине добијене генском рекомбинацијом**

Иако су се до сада коришћене вакцине показале ефикасним, научници непрестано трагају за ефикаснијом, безбеднијом и јефтинијом вакцином, као и справљањем вакцина које још увек нису доступне у медицинској пракси. Тако је на пример развијена рекомбинантна ДНК вакцина против гљиве Blastomyces, прва вакцина против гљиве као узрочника инфективне болести. Различите технике генске рекомбинације су данас у употреби за поправљање квалитета вакцина. Овим техникама је могуће уклонити гене који кодирају факторе вируленције узрочника и произвести иреверзибилно атенуисан микроорганизам (Слика 9).

Слика 9. Уколико се идентификује вирусни ген одговоран за вируленцију, али не и за раст и имуногеност, рекомбинантним ДНК техникама може бити мутиран или уклоњен. Овакав вирус је авирулентан и може се користити као вакцина. 

Рекомбинантне технике се такође користе за производњу великих количина веома чистих вирусних или бактеријских антигена. У овом процесу, изоловани вирусни циљни ген се инсертује у геном бактерије, кваснице или неке друге ћелије, које онда експримирају његов продукт. На овај начин се производи вакцина против хепатиса В у ћелијама квасница. Алтернативно, могу бити коришћени цели генетски измењени микроорганизми као носиоци циљног гена (живе рекомбинантне вакцине). Пример за то је Vaccinia virus (poxvirus) који је због свог великог генома погодан за инсерцију новог гена (нпр. вакцине против аденовируса, херпесвируса, поксвируса и салмонеле).

Најновији метод имунизације подразумева инокулацију ДНК секвенце која кодира антиген, уместо примене самог антигена (нпр. хемаглутинин вируса инфлуенце). ДНК која кодира антиген патогена се инсертује у плазмид, који се као вектор инокулира у тело пацијента. Ћелије организма преузимају плазмид и транскрибују га. Продукт гена који кодира антиген индукује ћелијски имунски одговор (Слика 10.).



Слика 10.