

# Sclerosis multiplex – úloha regulačných T-lymfocytov v patogenéze a biologickej liečbe choroby

## Multiple Sclerosis – a Role of Regulatory T Cells in the Pathogenesis and Biological Treatment of the Disease

### Súhrn

Každý biologický systém zahŕňa v sebe nielen efektorové, ale aj kontrolné mechanizmy, ktoré spôsobom spätnej väzby udržiavajú homeostázu organizmu. Najdôležitejšími imunitnými mechanizmami, ktoré bránia rozvoju autoagresívnych procesov (autoimunitných a alergických), sú tie, ktoré sprostredkujú regulačné B-lymfocyty (Breg), a predovšetkým regulačné T-lymfocyty (Treg). Sclerosis multiplex je autoimunitná choroba, ktorú podmieňuje prozápalová aktivita početných buniek imunitného systému pod „vedením“  $T_H1$ - a najmä  $T_H17$ -subpopulácie lymfocytov. V ostatnej dobe sa zistilo, že nadmernú prozápalovú aktivitu uvedených skupín lymfocytov umožňuje aj nedostatočná imunopresívna aktivita Treg-lymfocytov. Je prirodzené, že v liečbe SM sa snažíme ich funkciu obnoviť. Dokážu to už súčasné biologiká prvej línie, t.j. IFN- $\beta$  a glatiramér acetát. Biologiká druhej línie aktivitu Treg-lymfocytov ovplyvňujú rôzne – FTY720 podporuje aj ich proliferáciu, aj imunopresívnu aktivitu. Nasvedčujú tomu tiež klinické príznaky, kedy pri prerušení liečby týmito preparátmi môže dôjsť k indukcii IRIS-syndrómu. V súvislosti s úlohou Treg-lymfocytov v rozvoji a terapii SM sa poukazuje aj na možnosť indukcie a expanzie vlastných Treg-lymfocytov pacienta *in vitro* a následné ich spätné podanie pacientovi. Do štádií klinických skúšok sa dostávajú aj monoklonové protilátky rituximab, alemtuzumab a daclizumab, ktorých mechanizmus na zníženie imunopatologických procesov je rozdielny. Rituximab znižuje antigéno-predzentačnú funkciu B-lymfocytov, alemtuzumab pôsobí prostredníctvom hlbokkej deplécie T-lymfocytov, vrátane autoreaktívnych, a daclizumab indukuje vznik NK-buniek, ktoré ničia autoreaktívne T-lymfocyty. Napokon sa v článku uvádza, čo z hľadiska diagnostiky choroby a rozhodovania lekára, aký typ liečby má byť použitý, súčasná laboratórna imunológia môže poskytnúť.

### Abstract

Every biological system has its executive as well as control mechanisms that, by the means of feedback, maintain homeostasis within the organism. Regulatory B cells (Breg) and especially regulatory T cells (Treg) are of paramount importance in preventing auto-aggressive (allergic and autoimmune) processes. Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease driven by proinflammatory activities of various cell types led by  $T_H1$  and  $T_H17$  cells. Recently, it has been established that the over-activity of the involved cells is enabled by insufficient activity of regulatory T cells. It is, therefore, natural that, in MS, therapy aims to re-establish their physiological function. IFN- $\beta$  and glatiramer acetate, first line biological agents, are able to do so. The second line agents, natalizumab and FTY720, influence the activity of Treg cells in various ways – natalizumab does not affect T cells in any way, while FTY720 supports both, their proliferation and activity. It seems that it is an insufficient immunosuppressive activity after suspension of the 720 (FTY720) treatment that results in a development of the IRIS. With respect to the role of regulatory T cells in the development and therapy of MS it is worth mentioning that they can be induced and expanded *in vitro* and subsequently re-introduced to the patient. Recently, monoclonal antibodies rituximab, alemtuzumab and daclizumab have entered clinical tests as the treatments of MS. Their mechanisms of action are different. Rituximab down-regulates antigen-presentation function of B cells, alemtuzumab profoundly depletes T cells, including auto-reactive lines, and daclizumab induces NK cells that enter the intrathecal compartment and kill autoreactive T cells. The paper also discusses the support that laboratory immunology has to offer to physicians in terms of the diagnosis and biological treatment decision making.

Autor deklaruje, že v súvislosti s predmetom studie nemajú žiadne komerčné zájmy. The author declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakčná rada potvrdzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



prof. MUDr. Milan Buc, DrSc.  
Imunologický ústav LF UK  
Odborárske nám. 14  
813 72 Bratislava  
e-mail: milan.buc@fmed.uniba.sk

Prijato k recenzii: 11. 12. 2012

Prijato do tlače: 15. 1. 2013

### Kľúčové slová

glatiramér-acetát – interferón  $\beta$  – monoklonové protilátky – regulačné T-lymfocyty – sclerosis multiplex –  $T_H1$  a  $T_H17$ -lymfocyty

### Key words

glatiramer acetate – interferon  $\beta$  – monoclonal antibodies – regulatory T cells – multiple sclerosis –  $T_H1$  cells –  $T_H17$  cells

Článok vznikol v rámci riešenia grantovej úlohy MŠ SR VEGA 1/0810/12.

**Zoznam skratiek**

BLIMP-1	B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein (transkripčný represor)
CMV	cytomegalový vírus
CTLA	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen
DC	dendritové bunky
EBV	vírus Epstein a Barrovej
FO XO	Forkhead box O (transkripčný faktor)
FOXP3	Forkhead box P (transkripčný faktor)
GITR	Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor family related gene
HBV	vírus hepatitídy B
HLA	hlavný histokompatibilný komplex človeka
HSV	vírus herpes simplex
IFN-β/IFN-γ	interferón beta/gama
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
MBP	myelínový bázičný proteín
MOG	myelínový oligodendritový antigén
NK	NK-bunky (Natural Killer cells)
PD	Programmed Death
STAT5	Signal Transducer and Activator of Transcription 5
TIGIT	T cell Ig and ITIM domain
TIM	T cell Immunoglobulin Mucin protein

Principiálnou úlohou imunitného systému je likvidácia vonkajších i vnútorných narušiteľov integrity jedinca. Vonkajších „nepriateľov“ predstavujú predovšetkým mikroorganizmy, kým k vnútorným patria najmä potenciálne rakovinotvorné bunky, ktoré vznikajú v našom organizme ako výsledok poruchy v ich replikácii. Omnoho menej sa zdôrazňuje druhá, nemenej významná biologická funkcia imunitného systému, a to zábrana aktívacie autoreaktívnych T- a B-lymfocytov, ktoré môžu predstavovať hrozbu indukcie autoimunitných procesov. Dosahuje sa mechanizmami centrálnej (recesívnej) a periférnej (dominantnej) tolerancie. Centrálna tolerancia sa zabezpečuje deléciou autoreaktívnych T- a B-lymfocytov v týmusu, resp. v kostnej dreni počas ich dozrievania v týchto primárnych lymfoidných orgánoch [1,2]. Tak ako v každom biologickom systéme, ani mechanizmy centrálnej tolerancie nie sú 100%

**Tab. 1. Mechanizmus účinku biologík používaných pri liečbe SM.**

Mechanizmus účinku	Biologikum
zníženie počtu T-lymfocytov na periférii	alemtuzumab
bránenie indukcie a proliferácie autoreaktívnych T-lymfocytov	IFN-β a glatiramér acetát
blokáda prechodu autoreaktívnych T-lymfocytov do CNS	natalizumab
indukcia NK-buniek, ktoré následne zabíjajú autoreaktívne T-lymfocyty	daclizumab
prerušenie aktívacie autoreaktívnych T-lymfocytov	rituximab

a časť autoreaktívnych lymfocytov tomuto procesu unikne a dostáva sa na perifériu, do sekundárnych lymfoidných orgánov, kde po stretnutí sa s autoantigénmi, krížovo-reagujúcimi antigénmi, či pri dysregulácii imunitného systému sa môžu aktivovať a spustiť autoimunitné procesy, ktoré niekedy vedú aj k plne rozvinutým autoimunitným chorobám. Aby k tomu nedochádzalo, príroda vytvorila mechanizmy periférnej tolerancie, ktoré zabezpečujú predovšetkým regulačné lymfocyty. Tieto priamym kontaktom s autoreaktívnymi lymfocytmi alebo nepriamo, najmä syntézou imunosupresívnych cytokínov, zabránia ich aktivácii alebo utlmia ich efektorovú aktivitu [1,2]. Najdôležitejšie regulačné lymfocyty patria T-lymfocytom, kým regulačné B-lymfocyty zohrávajú síce tiež svoju významnú úlohu, ale skôr doplnkovú.

Regulačné T-lymfocyty (Treg) zaraďujeme do dvoch skupín – prirodzené a indukované. Prirodzené regulačné T-lymfocyty (nTreg) predstavujú samostatnú skupinu buniek, tak ako sú B-lymfocyty, NK-bunky atď. Naproti tomu indukované regulačné T-lymfocyty (iTreg) nepredstavujú samostatnú skupinu buniek, ale ide o subpopuláciu pomocných CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov, ktorá vzniká iba počas imunitnej odpovede [3–5].

nTreg-lymfocyty potláčajú aktivitu T- (aj αβ aj γδ), B-lymfocytov, NK-, NKT- a aj dendritových buniek (DC). Vyvíjajú sa dreni týmusu ako nezávislá, samostatná populácia buniek. Na ich diferenciáciu treba, aby rozpoznávali peptidy pochádzajúce z autoantigénov, ktoré im prezentujú HLA-molekuly dendritových buniek drene týmusu, kostimulačné interakcie medzi molekulami CD28 (nTreg) a CD80, resp. CD86 (DC) a napokon cytokíny

IL-2 alebo IL-15. Rozpoznávanie prezentovaných peptidov je vysokoafinitné [3,6].

Diferenciácia nTreg-lymfocytov si vyžaduje okrem iného aj aktiváciu špecifického génu – FOXP3 (Forkhead box P3; Xp11.23–q13.3.), ktorý kóduje rovnomený transkripčný faktor. O jeho veľkom biologickom význame svedčí skutočnosť, že ak dôjde k jeho mutácii, vznikne choroba, ktorá je nezlučiteľná so životom – **IPEX** (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy). Okrem FOXP3 sa na diferenciácii nTreg zúčastňujú aj iné transkripčné faktory, najmä BLIMP-1, IRF4, transkripčné faktory FOXP3-rodiny a STAT5, ktorý vzniká aktiváciou dráh, ktoré indukuje IL-2 [7,8]. nTreg predstavujú 5–10% CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ty-mocytov v periférii je ich približne 10% z celej populácie CD4<sup>+</sup>lymfocytov. Sú to dlhodobo žijúce bunky, ktoré charakterizujú viaceré membránové antigény. Problémom však je, že nie sú špecifické iba pre nTreg; typicky majú CD4 a CD25. CD25 (α-reťazec vysokoafinitného receptora pre IL-2) však vlastní aj aktivované T-lymfocyty. Neskôr sa ukázalo, že nTreg majú zníženú expresiu CD127 (α-reťazec receptora pre IL-7). Z iných znakov sa treba zmieniť o CD5, CD49d, CD69, CD103, CD152 (CTLA-4), AITR (CD357; skôr je známy jeho ekvivalent pri myšiach – GITR) a neuropilín [3,9].

nTreg sú prirodzene anergické, t.j. pri *in vitro* stimulácii monoklonovými anti-CD3 protilátkami (CD3 je súčasťou antigénového receptora T-lymfocytov), fytohemaglutinínom alebo alogénnymi bunkami neproliferujú a neprodujú ani IL-2. Výrazne však tlmia indukciu imunitnej odpovede. Mechanizmy, akým to robia, sú viaceré; v podstate ich možno rozdeliť do 4 skupín: 1. prostredníctvom inhibičných

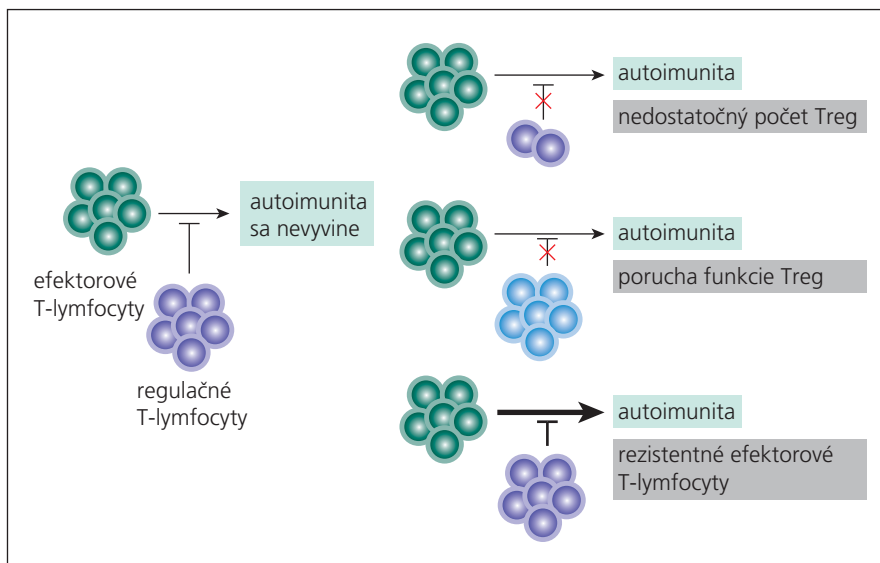
cytokínov; 2. indukciou apoptózy; 3. prostredníctvom indukcie zmien v metabolizme; 4. moduláciou dozrievania alebo funkcie DC [10–12].

**Indukované regulačné T-lymfocyty** sa diferencujú z naivných CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov počas imunitnej odpovede. Vznikajú najmä v slizničných priestoroch; najlepšie tieto udalosti poznáme v čreve. Ak na naivné CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty pôsobí TGF-β, IL-2 a kyselina retinová, ktorú spracovaním vitamínu A produkujú dendritové bunky, diferencujú sa na iTreg [2,4,13]. Na ich diferenciaciu tiež treba FOXP3-gén, ale rozdielne transkripčné gény a odlišnú promótorovú oblasť (CNS1). Pri ich úplnom chýbaní (v experimente) nevzniká nijaká systémová choroba, ktorá by sa podobala IPEX-syndrómu, ale zápalové procesy slizníc (kolitída, asthma bronchiale) [14,15]. Bol problém, ako ich odlišiť od nTreg. Vyriešilo sa to nedávno, keď sa zistilo, že na rozdiel od nTreg majú v svojich membránach iba málo neuropilínu [16]. iTreg svoju imunosupresívnu aktivitu presadzujú podobne ako nTreg, kontaktným alebo bezkontaktným (syntézou najmä TGF-β a IL-10) spôsobom [4,13].

Aký je zásadný rozdiel medzi nTreg- a iTreg-lymfocytmi? Oboje potláčajú aktivitu buniek imunitného systému, avšak principiálne nTreg-lymfocyty tlmia aktivitu autoreaktívnych T-lymfocytov, t.j. tých, ktoré unikli svojej delícii v týmuse, napr. lymfocytov, ktoré rozpoznávajú MBP, kým iTreg-lymfocyty obmedzujú aktivitu tých efektorových T-lymfocytov, ktoré vznikajú počas imunitnej odpovede na antigén, napr. na komenzálne baktérie, ktoré máme v čreve. nTreg- a iTreg-lymfocyty sa nezastupujú, ale dopĺňajú svoju aktivitu [14].

Funkciu imunosupresívnych buniek môžu zastávať aj B-lymfocyty. Svoju imunosupresívnu funkciu presadzujú či už priamym kontaktom, alebo prostredníctvom TGF-β a najmä IL-10, príp. indukujú apoptózu aktivovaných T-lymfocytov. Dokážu indukovať a potenciováť prirodzené regulačné T-lymfocyty. Charakteristiku ich membránových znakov pri myšiach už poznáme, u človeka zatiaľ nie. Označujú sa skratkou Breg- alebo B10-lymfocyty [17–19].

Vychádzajúc z indukcie autoimunitných procesov pre mutáciu vo FOXP3-géne, predpokladalo sa, že porucha funkcie či nedostatok nTreg-lymfocytov sa bude podieľať aj na imunopatologic-



**Obr. 1. Príčiny neúspešnej funkcie regulačných T-lymfocytov pri vývoji autoimunity.**

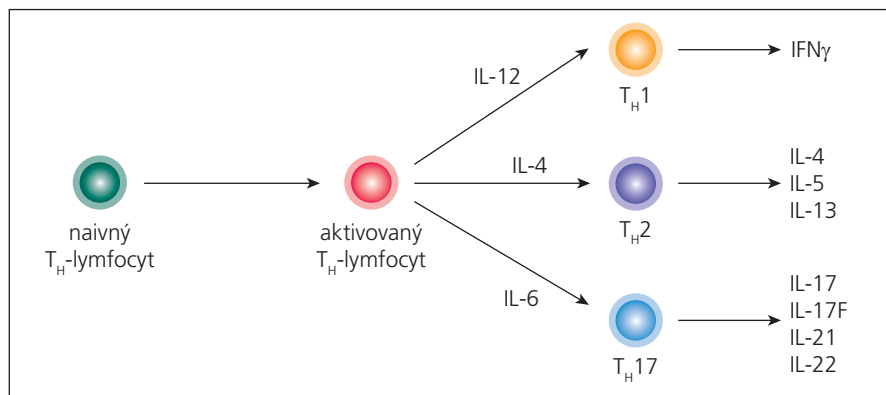
Regulačné T-lymfocyty neuplatnia svoju tlmivú funkciu pretože ich je málo v dôsledku určitej poruchy pri ich diferenciacii, ako je nedostatok cytokínov (IL-2, TGF-β), kostimulácie (CD28) a pod. Ďalej Treg-lymfocyty môžu byť v norme, ale nie sú plne funkčné, napr. neprodukujú dostatok imunosupresívnych cytokínov (IL-10, IL-35, TGF-β), alebo dochádza k poruche kontaktnej imunosupresívnej interakcie. Napokon aj počty aj funkcia Treg-lymfocytov sú v norme, ale terčová skupina buniek na ich imunosupresívne pôsobenie neodpovedá, napr. pre veľké množstvo cytokínov, ktoré produkujú (IL-2, IL-4, IL-6, IL-15) alebo pre svoj výslovne prozápalový charakter (T<sub>H</sub>17-subpopulácia).

kých procesoch „bežných“ autoimunitných chorôb. Tento predpoklad sa potvrdil. nTreg-lymfocyty môžu mať svoj podiel na vývoji autoimunitných chorôb tým, že chýbajú, ich funkcia je znížená alebo že efektorové T-lymfocyty na ich pôsobenie neodpovedajú (obr. 1). Aká je situácia pri sclerosis multiplex (SM)? Viaceré práce poukazujú na nedostatočnú funkciu nTreg-lymfocytov [20–22], i keď sú aj práce, ktoré udávajú pokles počtu týchto buniek v periférnej krvi [23]. Aká je príčina ich nedostatočnej funkcie? Zrejme pôjde o komplexnú poruchu, ako je znížená expresia ko-inhibičných molekúl (CLTA4, TIM-3, TIGIT) v membránach buniek, znížená syntéza imunosupresívnych cytokínov a pod. [22,24]. Nedostatočná tlmivá aktivita nTreg-lymfocytov umožní na periférii aktivovaným autoreaktívnym T-lymfocytom prechádzať do CNS a rozvíjať tu imunopatologický proces.

Sclerosis multiplex je typická autoimunitná choroba. Poznatky o jej imunopatogenéze v posledných rokoch podstatne vzrástli, čo umožnilo aj lepšiu, adresnejšiu biologickú liečbu. V súčasnosti, pri SM dochádza k deštrukcii myelínových obalov v mozgu, periférny nervový systém ostáva

neporušený. Príčinu choroby nepoznáme. Predpokladá sa interakcia faktorov vonkajšieho prostredia s genetickou predispozíciou k chorobe. Zo spúšťačích faktorov sa obviňujú vírusy, ktoré mechanizmom molekulového mimikri (t.j. podobnosť vlastných a mikrobiálnych antigénov) indukujú rozvoj imunopatologických procesov. V skutočnosti, početné vírusy obsahujú proteíny, ktoré majú príbuznú štruktúru s principiálnym autoantigénom pri SM – myelínovým bázickým proteínom (MBP). Ide o vírus osýpok, CMV, EBV, HBV, HSV, humánnu herpesovú infekciu 6 alebo 7, koronavírusy a iné. Vzťah medzi vírusmi a SM podporujú aj údaje, že vírusové infekcie často predchádzajú záchvaty choroby. Pravdepodobne IFN-γ, ktorý sa produkuje počas vírusovej infekcie, spustí do pohybu imunopatologické procesy vrcholiace demyelinizáciou [25].

Imunopatologický proces sa začína aktiváciou autoreaktívnych T-lymfocytov na periférii, ktoré patria T<sub>H</sub>1 a najmä T<sub>H</sub>17-subpopuláciám (obr. 2). Aktivované T-lymfocyty následne začnú do svojej bunkovej membrány zabudovávať adhezívne molekuly (najdôležitejšie sú α4β1-integríny), čo im umožní viazať sa



**Obr. 2. Diferenciácia naivných pomocných T-lymfocytov do jednotlivých subpopulácií.**

Pomocný T-lymfocyt ( $T_H$ ), ktorý opúšťa týmus, ešte nie je vydifferentovaný pre určitú špecifickú funkciu; označuje sa ako naivný ( $T_H0$ ). Špecializáciu získava až pri interakcii s bunkami prezentujúcimi antigén, ktoré podľa charakteru antigénu, ktorý spracúvajú, syntetizujú rozdielne cytokíny. Ak takýmto cytokínom je IL-12, naivný  $T_H$ -lymfocyt sa bude diferencovať do subpopulácie  $T_H1$ , ak IL-4, tak vzniká subpopulácia  $T_H2$ , a napokon ak sa v mikroprostredí nachádza IL-1 alebo IL-6, diferenciácia ide do línie  $T_H17$ .

na adhezívne molekuly na endotelových bunkách CNS (najmä VCAM-1, ktorý sa tu v malých množstvách konštitutívne exprimuje; po stimulácii cytokínmi sa jeho expresia zvyšuje) a následne prechádzať do parenchýmu mozgu. Tento mechanizmus prechodu využívajú  $T_H1$ -lymfocyty, kým  $T_H17$ -lymfocyty využívajú interakciu medzi ich chemokínovým receptorom CCR6 a jeho ligandom CCL20, ktorý sa tiež konštitutívne exprimuje na endotelových bunkách [26,27]. Po prechode autoreaktívnych T-lymfocytov, v perivaskulárnom priestore, sa začnú odohrávať iniciálne imunopatologické procesy. Tu sa dostávajú do kontaktu s myeloidnými dendritovými bunkami, ktoré prostredníctvom svojich HLA-molekúl druhej triedy prezentujú peptidy pochádzajúce z myelínu, čím sa reaktivujú, začnú invadovať do parenchýmu a produkovať prozápalové cytokíny (najmä IFN- $\gamma$ , IL-17 a TNF). Tieto následne stimulujú parenchýmové mikrogliové bunky, ktoré produkujú svojich cytokínov (IL-12, IL-23, osteopontín) a toxických mediátorov (reaktívne intermediálne produkty dusíka a kyslíka) poškodzujú myelín; z neho sa uvoľňujú ďalšie autoantigény a „circulus vitiosus“ pokračuje. Na deštrukcii myelínu sa podieľajú aj cytotoxické T-lymfocyty svojím perforínovo-granzýmovým mechanizmom. Súčasne dochádza aj k aktivácii B-lymfocytov; týchto je v plaku spočiatku málo, ich relatívny počet sa zvyšuje, až keď sa ložisko stáva chronickým. Aktivá-

cia B-lymfocytov sa prejaví intracerebrálnou syntézou IgG, ktoré sú typicky oligoklonové [25,28,29].

Neuromyelitis optica (NMO) sme až donedávna považovali za variant SM. Dnes predstavuje samostatnú chorobnú jednotku. Pri tejto chorobe ide o autoimunitný zápal spôsobujúci demyelinizáciu optického nervu a miechy. Hoci môže postihnúť aj mozog, lézie sú rozdielne od tých, ktoré sa pozorujú pri SM. Pre syndróm sú charakteristické protilátky proti aquaporínu 4 v membráne astrocytov (AQP4) (aquaporíny sú integrálne proteíny bunkových membrán, ktoré regulujú tok vody) [30,31]. Dominantnými bunkami infiltrujúcimi lézie sú neutrofil, bunky, ktoré pri SM prakticky chýbajú. Ďalšia odlišnosť od SM je, že v cerebrospinálnej tekutine sú vysoké hladiny IL-17. Tie pravdepodobne zodpovedajú za indukciu produkcie chemokínov (IL-8, G-CSF a CXCL1), ktoré priťahujú a aktivujú granulocyty [32]. IFN- $\beta$ , ktorý sa používa v liečbe SM, pri NMO sa nesmie podávať. Nielenže sú pacienti, ktorí na túto liečbu neodpovedajú, ale u niektorých liečba indukuje ťažké relapsy a exacerbácie choroby [33,34]. V súčasnosti sa na liečbu NMO používa azatioprin, prednizon, rituximab, cyklofosfamid, metotrexát, mitoxantron, mykofenolát mofetil, intravenózne imunoglobulíny (IVIG) či výmenná plazmaferéza. Tu však sa tiež ukazuje, že biologická liečba by mohla tiež značne prispieť k liečbe choroby – vyvinuli

sa monoklonové protilátky (aquaporu-mab), ktoré sa viažu na AQP4, čím sa zabráni patogenetickým anti-AQP4 protilátkam, aby uplatnili svoju aktivitu [35,36]. Aquapuromab neaktivuje ani komplement ani K-bunky, takže k poškodeniu buniek, na ktoré sa viaže, nedochádza.

Ako sa zmienujeme vyššie, spoznanie imunopatogenézy SM sa odrazilo na rozmachu vývoja rôznych imunoterapeutických látok. Ako prvé biologikum, ktoré sa pri liečbe SM začalo podávať, bol IFN- $\beta$ , neskôr do hry vstúpil glitiramér acetát, monoklonové protilátky, FTY-720 a iné. Každé z uvedených imunoterapeutík má svoje vlastné mechanizmy, ktorými ovplyvňuje prebiehajúce imunopatologické procesy a pokúša sa o návrat do fyziologických podmienok (tab. 1). Treba však hneď povedať, že ani jednému v súčasnosti používaných biologík sa to doteraz nepodarilo, vždy ide iba o úpravu – zlepšenie klinického stavu pacientov, ale nie o vyliečenie.

**Interferón beta (IFN- $\beta$ )** svoje imunosupresívne pôsobenie uplatňuje viacerými spôsobmi. Pôsobí na bunky prezentujúce antigén, t.j. makrofágy a mikrogliu, tým, že znižuje v ich membránach množstvo HLA-molekúl druhej triedy a indukuje objavenie sa inhibičných molekúl PDL-2, ktoré po interakcii s PD1-receptormi na T-lymfocytoch navodia v nich apoptotický proces. IFN- $\beta$  znižuje aj proliferáciu makrofágov, čím znižuje ich počet, a tým aj schopnosť aktivovať ďalšie a ďalšie autoreaktívne T-lymfocyty. Ďalej IFN- $\beta$  znižuje ich vstup do mozgu tým, že znižuje množstvo VLA4-adhezívnych molekúl, na ktoré sa T-lymfocyty musia prostredníctvom svojich VCAM-1 molekúl pred vstupom do parenchýmu viazať [36].

Významnú úlohu má podávanie IFN- $\beta$  aj na pôsobenie Treg-lymfocytov. IFN- $\beta$  v membránach dendritových buniek zvyšuje množstvo ligandov pre GITR-receptory (GITRL). Interakcia medzi GITR na Treg-lymfocytoch s GITRL na dendritových bunkách podmieni v Treg-lymfocytoch prenos stimulačného signálu, ktorý spôsobí, že tieto začnú proliferovať, a tým zvyšovať svoje počty a následne aj svoju tlmivú aktivitu. Tejto proliferácii napomáha aj druhý efekt IFN- $\beta$  pôsobenia na Treg-bunky, a to v podobe zníženia množstva ich CTLA4-molekúl, ktoré potláčajú aktivitu Treg-lymfocytov; stávajú sa takto vnímavejšie na pôsobenie stimu-

lačných podnetov, najmä na IL-2, ktorý je ich základným homeostatickým cytokínom [37].

**Glatiramer acetát** (GA) je druhým imunopreparátom prvolíniovej liečby. Ide o zmes syntetických peptidov, ktoré sa skladajú z 50 až 90 aminokyselinových jednotiek. Konkrétne ide o L-glutámovú kyselinu, L-lyzín, L-alanín a L-tyrozín, ktoré sú v peptide zastúpené náhodne. Tieto aminokyseliny sa na tvorbu peptidov nevybrali náhodne, ale cielene, lebo sa v myelíne vyskytujú najčastejšie. Mechanizmus účinku GA môže byť v blokáde žliabku HLA-molekúl, ale ukazuje sa, že GA má aj imunomodulačné vlastnosti. Dokázalo sa, že GA indukuje produkciu sIL-1Ra, prirodzeného inhibítora IL-1, čím znižuje jeho pôsobenie a aj jeho syntézu. Navyše monocyty, resp. makrofágy pod jeho vplyvom produkovali aj menej IL-1, TNF, teda najdôležitejších mediátorov zápalu a IL-12, ktorý podporuje  $T_H1$ -imunitnú odpoveď; naopak, GA zvyšoval ich syntézu imunosupresívneho IL-10 [38]. Predpokladá sa, že GA-aktivované T-lymfocyty vstupujú aj do CNS a tu presadzujú svoj protizápalový a neuroprotektívny účinok [39]. GA zlepšuje aj imunosupresívne pôsobenie regulačných T-lymfocytov, a to zvyšovaním expície ko-inhibičných molekúl TIGIT a TIM-3, ktoré sú u pacientov so SM v membránach ich Treg-lymfocytov znížené [22,24,40].

K druholíniovej biologickej liečbe pacientov so SM patrí natalizumab a FTY720.

**Natalizumab** sú monoklonové protilátky (mAb) proti  $\alpha4$ -reťazcu adhezívnej molekuly VLA4 ( $\alpha4\beta1$ -integrín), ktorý sa exprimuje v membránach T-lymfocytov; jeho partnerská molekula na endotelových bunkách ciev v CNS je VCAM-1. Podávaním týchto mAb sa zabraňuje prechodu autoreaktívnych T-lymfocytov do CNS, pretože T-lymfocyty nemôžu prilnúť na endotelovú výstelku ciev, a tak sa následne nepreplazí do parenchýmu mozgu, čo makroskopicky vnímame ako lymfocytózu. Natalizumab redukuje tiež počet dendritových buniek v perivaskulárnom priestore mozgu poukazujúc na to, že sa jeho pôsobenie neobmedzuje iba na T-lymfocyty [36].

Po prerušení liečby sa u niektorých pacientov po troch až šiestich mesiacoch pozoruje relaps choroby. U jedincov, ktorí relabovali, alebo mali zhoršené prejavy

MR, sa pozorovala menšia lymfocytóza oproti tým, u ktorých sa relaps nevyskytol. Jedna z možných príčin tohto javu je aj v genetickom polymorfizme génu pre antiapoptotický proteín Akt. Jedna jeho forma, rs2498804T (jedná sa o polymorfizmus na úrovni jednotlivého nukleotidu – SNP, Single Nucleotide Polymorphism), sa spája z jeho zvýšenou aktivitou a teda zvýšenou apoptózou aktivovaných T-lymfocytov, a teda aj nižšou lymfocytózou [42,42].

Jedna z komplikácií liečby SM natalizumabom je aj indukcia progresívnej multifokálnej leukoencefalopatie (PML) vyvolanej JC-vírusom [43]. Ďalšia z komplikácií liečby pacientov natalizumabom je indukcia IRIS-syndrómu (Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome), ktorý poznáme aj ako syndróm z imunitnej obnovy, zotavenia. Pozoruje u niektorých pacientov po imunosupresii, keď imunitný systém sa pomaly vracia do pôvodného stavu a začína reagovať na predchádzajúce oportunistické infekcie, a to prehnanou hyperinflamačnou odpoveďou, čo paradoxne celú situáciu ešte zhoršuje. Na indukciu IRIS-syndrómu po prerušení liečby natalizumabom sa snáď podieľajú aj Treg-lymfocyty, skôr indukované ako prirodzené, pravdepodobne pre nedostatočné podmienky ich indukcie. Napriek tomu, natalizumab má svoje miesto v liečbe SM, keď lekár zvažuje riziko pacienta na rozvoj PML s ohľadom na predchádzajúcu imunosupresívnu liečbu v minulosti a pozitivitu anti-JCV protilátok v jeho plazme.

V druholíniovej liečbe SM máme ešte k dispozícii **FTY720 (fingolimod)**. Je to derivát myricocínu, ktorý sa izoluje z čínskej rastliny *Iscaria sinclairii*. FTY720 je štruktúrnym analógom sfingozínu, ktorý sa fosforyluje sfingozínovou kinázou a následne pôsobí ako veľmi silný agonista receptorov pre sfingozín 1-fosfát (ide o receptory S1P1 až S1P5, na S1P2 sa neviaže. T-lymfocyty využívajú najmä S1P1 a B-lymfocyty zase S1P3) [44,45]. Zníženie, resp. vymiznutie S1P1/S1P3-receptorov na T- a B-lymfocytoch spôsobí poruchu ich vycestovania zo sleziny, lymfatických uzlín a z Peyerových plakov. Reverzibilná sekvestrácia sa týka až 80 % lymfocytov za 3–5 hod po aplikácii [46–48].

Pôsobenie FTY720 na regulačné T-lymfocyty nie je ešte úplne objasnené. Exis-

tujú literárne údaje, ktoré poukazujú, že FTY720 podporuje ich proliferáciu a imunosupresívnu aktivitu, i keď mechanizmus, akým to dosahujú, autori neuvádzajú [46]. Tejto vlastnosti FTY720 by zodpovedali aj klinické údaje, ktoré dokumentujú, že po prerušení liečby týmto preparátom dochádza k indukcii príznakov, ktoré sa podobajú vyššie uvedenému IRIS-syndrómu [49,50]. Naznačovalo by to, že okrem iného došlo aj k poklesu aktivity regulačných a zvýšeniu aktivity efektorových T-lymfocytov. Naopak, iné práce dokazujú, že FTY720 znižuje aktivitu regulačných T-lymfocytov, a to aj ich proliferáciu aj funkčnú aktivitu. Spôsob, ktorým to FTY720 dosahuje, sa zakladá na jeho interferencii s fosforyláciou, a tým aktiváciou transkripčného faktora STAT5, ktorý je potrebný na transkripciu FOXP3-génu a vznik nTreg-lymfocytov [51]. Klinické skúsenosti v súvislosti s vyššie uvedeným IRIS-syndrómom po prerušení liečby však tomu nezasvedčujú, resp. získané poznatky v predklinických štúdiách nie vždy musia korelovať s účinkom preparátu pri samotnej liečbe pacientov. Pripomína to udalosť z r. 2006, kedy sa použila super-agonistická monoklonová protilátka anti-CD28, ktorá v klinickom použití viedla k cytokínovej búrke a k ťažkým klinickým príznakom, ktoré hraničili s prežitím dobrovoľníkov. Bolo to neočakávané, lebo v predklinických štúdiách táto mAb podporovala expanziu práve nTreg-lymfocytov [52].

V poslednej dobe sa do klinických skúšok dostávajú **monoklonové protilátky, ktoré rozpoznávajú CD20** na povrchu B-lymfocytov, a pomocou komplementu alebo aktiváciou K-buniek ich likvidujú. Vychádza sa tu z poznatkov o inej biologickej funkcii B-lymfocytov ako len buniek, ktoré zodpovedajú za syntézu protilátok. Už vyššie sme písali, že existuje subpopulácia B-lymfocytov, ktorá má imunosupresívne vlastnosti. Podobne začína sa zisťovať, že B-lymfocyty majú významnú úlohu aj pri prezentácii antigénov. B-lymfocyty totiž majú v svojich membránach HLA-molekuly druhej triedy a pohltené antigény, ktoré predtým rozpoznali a viazali svojim antigénovým receptorom, dokážu spracovať, nadviazať na HLA-molekuly a prezentovať T-lymfocytom. Monoklonové protilátky anti-CD20 znižujú počet B-lymfocytov, čím sa znižuje možnosť ich

interakcie autoreaktívnymi T-lymfocytmí, a tým aj k útlmu imunitných procesov. Súčasne dochádza k zmene cytokínového mikroprostredia, ktoré podmieni vznik a expanziu Treg-lymfocytov, čím sa autoimunitný proces ďalej tlmí [17,53,54]. Prečo sa vybral práve CD20-antigén? Odpoveď je pomerne jednoduchá – nachádza sa v membránach prakticky všetkých vývojových štádií B-lymfocytov, od pre-B-lymfocytov až po plazmablasty [55]. Anti-CD20 mAb existujú v troch prevedeniach – rituximab, ocrelizumab a ofatimumab. Rituximab a ofatimumab ničia B-lymfocyty prostredníctvom aktivácie komplementu, ocrelizumab aktiváciou K-buniek, čo je výhodnejšie, lebo nevznikajú prozápalové fragmenty komplementového systému, ktoré vyvolávajú prozápalové komplikácie, ale apoptotické telieska, ktoré likvidujú makrofágy bez akejkoľvek indukcie zápalových procesov [56]. Rituximab sa osvedčil aj pri zvládaní neuromyelitis optica (NMO) ako sa o tom píše vyššie [31,57].

Do štádií klinických skúšok sa dostávajú aj ďalšie dve monoklonové protilátky – alemtuzumab a daclizumab. **Alemtuzumab** sú monoklonové protilátky proti CD52. Táto molekula sa nachádza v membránach lymfocytov, monocytov a granulocytov. Biologickú úlohu CD52 zatiaľ ešte nepoznáme. Alemtuzumab aktiváciou komplementu vedie k rýchlej lýze T-, B-lymfocytov, NK-buniek a monocytov. Hoci má biologický polčas len 6 dní a neovplyvňuje prekursorové bunky, aj pomocné (CD4<sup>+</sup>) aj cytotoxické (CD8<sup>+</sup>) lymfocyty sa vracajú k východiskovým hodnotám až za 61, resp. 30 mesiacov, čo môže vysvetliť jeho pozitívne účinky v liečbe SM. V protiklade s tým B-lymfocyty sa dostávajú na pôvodnú úroveň už za 3 mesiace a potom ich počty dokonca aj stúpajú [56]. Táto skutočnosť (t.j. zvýšená aktivita B-lymfocytov a nedostatočná tlmivá funkcia regulačných T-lymfocytov) môže vysvetliť aj sklon takto liečených pacientov vyvinúť autoimunitné komplikácie [58,59].

**Daclizumab** sú monoklonové protilátky proti alfa-reťazcu pre IL-2 (CD25). Mechanizmus ich účinku je zaujímavý – indukujú vznik NK-buniek, ktoré prechádzajú do intratrakálneho priestoru a tu zabíjajú autoreaktívne T-lymfocyty [60].

Napokon, v súvislosti s úlohou Treg-lymfocytov v rozvoji a terapii SM

sa treba zmieniť aj o možnosti **indukcie a expanzie vlastných Treg-lymfocytov** pacienta *in vitro* a následne ich spätné podanie pacientovi. Tento spôsob zvládania imunitných procesov sa úspešne odskúšal pri zvládaní GvHD u ľudí [61] a pri liečbe experimentálnej autoimunitnej encefalitídy (EAE) indukovanej podaním MOG [62].

V poslednej dobe pribudlo množstvo poznatkov o jednotlivých imunopatologických procesoch pri SM. Našli si odraz aj v lepšej terapii, ktorú sme v stručnosti vyššie načrtli, ale stále nemáme odpoveď, ktoré (laboratórne) ukazovatele by nám mali naznačiť, aký typ liečby máme použiť, resp. kedy zameniť jeden typ liečby za druhý. Určovanie jednotlivých subpopulácií T-lymfocytov v periférnej krvi na základe ich rozdielnych membránových znakov informuje o odpovedi pacienta na daný preparát, ale vzhľadom na najnovšie poznatky o ich veľkej plasticite a schopnosti rediferenciácie z jednej subpopulácie na druhú (napr. T<sub>H</sub>2 na T<sub>H</sub>1 a pod.) [63] sa zrejme v budúcnosti presunieme na určovanie cytokínového profilu – ak je posunutý v smere prozápalových cytokínov (IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i.) a v neprospech protizápalových (IL-10, IL-4, TGF- $\beta$  a i.), zrejme bude patologický proces intenzívnejší a liečba asi menej úspešná. Napr. pomer hladín imunosupresívneho IL-10 k prozápalovému IL-12 koreluje s aktivitou choroby a u pacientov, ktorí odpovedajú na IFN- $\beta$ , sa zlepšuje, t.j. stúpa. Podobný zmysel má aj sledovanie hladín adhezívnych a ko-inhibičných molekúl (VLA-4, LFA-1, VCAM-1, CTLA-4, TIM-3) a niektorých chemokínov (RANTES, MIP-1 $\alpha$ ). Napr. ak úspešne liečime pacienta IFN- $\beta$ , hladiny jeho adhezívnych molekúl v periférnej krvi stúpajú a v membránach lymfocytov klesajú; hladiny uvedených chemokínov tiež klesajú [64]. Ako liečiť, kedy terapiu meniť, či použiť kombináciu liečiv, zostáva teda zatiaľ vždy na rozhodnutí lekára, a to už aj vzhľadom k tomu, že SM tiež nie je jednotná choroba, ale má svoje odtiene, podmienené prevahou jedných alebo druhých imunopatologických procesov, ktoré u každého pacienta rozdielne dominujú. Samozrejme teoretický výskum bude lekárom v ich rozhodovaní pomáhať, a to tým viac, čím budeme lepšie poznať podstatu týchto procesov a ich vzájomnú prepojenosť.

V článku sa uvádzajú základné údaje o lymfocytoch, ich subpopuláciách, cytokínoch, povrchových molekulách buniek imunitného systému. Samozrejme charakter článku neumožňuje podrobnejšie sa týmito poznatkami zaoberať, vysvetľovať ich, resp. poukazovať na ich súvislosti. Rád by som preto odporučil čitateľov, ktorí by sa radi hlbšie ponorili do tejto oblasti imunológie na knižné publikácie, ktoré vyšli v ČR [65], SR [66] alebo v zahraničí [67]. Problematika autoimunitných chorôb je tiež fascinujúca a opäť možno o nej nájsť podrobnejšie informácie v monografiách, ktoré vyšli v ČR [65,68], v SR [69] alebo v zahraničí [70]. Napokon pre neuropatológov, ktorí by radi hlbšie prenikli do tajov ako sa imunitné mechanizmy uplatňujú na rozvoji autoimunitných procesoch postihujúcich nervový systém, možno odporučiť monografiu neuroimunológie [71].

## Literatúra

1. Liu YJ. A unified theory of central tolerance in the thymus. *Trends Immunol* 2006; 27(5): 215–221.
2. Lan RY, Ansari AA, Lian ZX, Gershwin ME. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2005; 4(6): 351–363.
3. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(7): 490–500.
4. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 531–564.
5. Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol* 2006; 176(2): 705–710.
6. Park SG, Mathur R, Long M, Hosh N, Hao L, Hayden MS et al. T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing gammadelta T cells. *Immunity* 2010; 33(5): 791–803.
7. Ohkura N, Sakaguchi S. Maturation of effector regulatory T cells. *Nat Immunol* 2011; 12(4): 283–284.
8. Ouyang W, Li MO. Foxo: in command of T lymphocyte homeostasis and tolerance. *Trends Immunol* 2011; 32(1): 26–33.
9. Langier S, Sade K, Kivity S. Regulatory T cells: the suppressor arm of the immune system. *Autoimmun Rev* 2010; 10(2): 112–115.
10. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009; 30(5): 636–645.
11. Cvetanovich GL, Hafler DA. Human regulatory T cells in autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(6): 753–760.
12. Tejera-Alhambra M, Alonso B, Teijeiro R, Ramos-Medina R, Aristimuno C, Valor L et al. Perforin expression by CD4+ regulatory T cells increases at multiple sclerosis relapse: sex differences. *Int J Mol Sci* 2012; 13(6): 6698–6710.
13. Hori S. Developmental plasticity of Foxp3+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(5): 575–582.
14. Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, Treuting P, Chinen T, Zheng Y et al. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* 2012; 482(7385): 395–399.

15. Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 733–758.
16. Weiss JM, Bilate AM, Gobert M, Ding Y, Curotto de Lafaille MA, Parkhurst CN et al. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J Exp Med* 2012; 209(10): 1723–1742.
17. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(4): 236–247.
18. Vitale G, Mion F, Pucillo C. Regulatory B cells: evidence, developmental origin and population diversity. *Mol Immunol* 2010; 48(1–3): 1–8.
19. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* 2012; 491(7423): 264–268.
20. Haas J, Hug A, Viehöver A, Fritzsching B, Falk CS, Filser A et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25 high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 2005; 35(11): 3343–3352.
21. Kumar M, Putzki N, Limmroth V, Remus R, Lindemann M, Knop D et al. CD4+CD25+FoxP3+ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2006; 180(1–2): 178–184.
22. Lowther DE, Hafler DA. Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunol Rev* 2012; 248(1): 156–169.
23. Praksova P, Stourac P, Bednarik J, Vlckova E, Mikulkova Z, Michalek J. Immunoregulatory T cells in multiple sclerosis and the effect of interferon beta and glatiramer acetate treatment on T cell subpopulations. *J Neurol Sci* 2012; 319(1–2): 18–23.
24. Joller N, Peters A, Anderson AC, Kuchroo VK. Immune checkpoints in central nervous system autoimmunity. *Immunol Rev* 2012; 248(1): 122–139.
25. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 683–747.
26. Engelhardt B, Ransohoff RM. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol* 2012; 33(12): 579–589.
27. Krumbholz M, Theil D, Steinmeyer F, Cepok S, Hemmer B, Hofbauer M et al. CCL19 is constitutively expressed in the CNS, up-regulated in neuroinflammation, active and also inactive multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 2007; 190(1–2): 72–79.
28. Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2012; 122(4): 1180–1188.
29. Peelen E, Damoiseaux J, Smolders J, Knippenberg S, Menheere P, Tervaert JW et al. Th17 expansion in MS patients is counterbalanced by an expanded CD39+ regulatory T cell population during remission but not during relapse. *J Neuroimmunol* 2011; 240–241: 97–103.
30. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004; 364(9451): 2106–2112.
31. Jarius S, Paul F, Franciotta D, Waters P, Zipp F, Hohlfeld R et al. Mechanisms of disease: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *Nat Clin Pract Neurol* 2008; 4(4): 202–214.
32. Wang HH, Dai YQ, Qiu W, Lu ZQ, Peng FH, Wang YG et al. Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J Clin Neurosci* 2011; 18(10): 1313–1317.
33. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin 4 and neuromyelitis optica. *Lancet Neurol* 2012; 11(6): 535–544.
34. Palace J, Leite MI, Nairne A, Vincent A. Interferon Beta treatment in neuromyelitis optica: increase in relapses and aquaporin 4 antibody titers. *Arch Neurol* 2010; 67(8): 1016–1017.
35. Tradtrantip L, Zhang H, Saadoun S, Phuan PW, Lam C, Papadopoulos MC et al. Anti-aquaporin-4 monoclonal antibody blocker therapy for neuromyelitis optica. *Ann Neurol* 2012; 71(3): 314–232.
36. Graber JJ, McGraw CA, Kimbrough D, Dhib-Jalbut S. Overlapping and distinct mechanisms of action of multiple sclerosis therapies. *Clin Neurol Neurosurg* 2010; 112(7): 583–591.
37. Chen M, Chen G, Deng S, Liu X, Hutton GJ, Hong J. IFN-beta induces the proliferation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells through upregulation of GITRL on dendritic cells in the treatment of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2012; 242(1–2): 39–46.
38. Burger D, Molnarfi N, Weber MS, Brandt KJ, Benkhoucha M, Gruaz L et al. Glatiramer acetate increases IL-1 receptor antagonist but decreases T cell-induced IL-1beta in human monocytes and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(11): 4355–4359.
39. Lalive PH, Neuhaus O, Benkhoucha M, Burger D, Hohlfeld R, Zamvil SS et al. Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis: emerging concepts regarding its mechanism of action. *CNS Drugs* 2011; 25(5): 401–414.
40. Haas J, Korporal M, Balint B, Fritzsching B, Schwarz A, Wildemann B. Glatiramer acetate improves regulatory T-cell function by expansion of naive CD4(+)CD25(+) FOXP3(+) CD31(+) T-cells in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009; 216(1–2): 113–117.
41. Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, Ognibene A, Goto K, Cocco L et al. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823(12): 2168–2178.
42. Rossi S, Motta C, Studer V, Monteleone F, De Chiara V, Buttari F et al. A genetic variant of the anti-apoptotic protein Akt predicts natalizumab-induced lymphocytosis and post-natalizumab multiple sclerosis reactivation. *Mult Scler* 2013; 19(1): 59–68.
43. Mancini N, Clementi M, Burioni R. Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 2012; 367(9): 871–872.
44. Girkontaite I, Sakk V, Wagner M, Borggrete T, Tedford K, Chun J et al. The sphingosine-1-phosphate (S1P) lysophospholipid receptor S1P3 regulates MAdCAM-1+ endothelial cells in splenic marginal sinus organization. *J Exp Med* 2004; 200(11): 1491–1501.
45. Cinamon G, Matloubian M, Lesneski MJ, Xu Y, Low C, Lu T et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat Immunol* 2004; 5(7): 713–720.
46. Sawicka E, Dubois G, Jarai G, Edwards M, Thomas M, Nicholls A et al. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 differentially affects the sequestration of CD4+/CD25+ T-regulatory cells and enhances their functional activity. *J Immunol* 2005; 175(12): 7973–7980.
47. Havla JB, Pellkofer HL, Meinel L, Gerdes LA, Hohlfeld R, Kumpfel T. Rebound of disease activity after withdrawal of fingolimod (FTY720) treatment. *Arch Neurol* 2012; 69(2): 262–264.
48. Gross CM, Baumgartner A, Rauer S, Stich O. Multiple sclerosis rebound following herpes zoster infection and suspension of fingolimod. *Neurology* 2012; 79(19): 2006–2007.
49. Rigau V, Mania A, Béfort P, Carlander B, Jonquet O, Lassmann H et al. Lethal multiple sclerosis relapse after natalizumab withdrawal. *Neurology* 2012; 79(22): 2214–2216.
50. Marousi S, Travasarou M, Karageorgiou CE, Gheuens S, Koralnik JJ. Simultaneous PML-IRIS after discontinuation of natalizumab in a patient with MS. *Neurology* 2012; 79(21): 2160.
51. Wolf AM, Eller K, Zeiser R, Dürr C, Gerlach UV, Sixt M et al. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 potently inhibits regulatory T cell proliferation in vitro and in vivo. *J Immunol* 2009; 183(6): 3751–3760.
52. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006; 355(10): 1018–1028.
53. Barun B, Bar-Or A. Treatment of multiple sclerosis with anti-CD20 antibodies. *Clin Immunol* 2012; 142(1): 31–37.
54. Ray A, Basu S, Williams CB, Salzman NH, Dittel BN. A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *J Immunol* 2012; 188(7): 3188–3198.
55. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol* 1980; 125(4): 1678–1685.
56. Saidha S, Eckstein C, Calabresi PA. New and emerging disease modifying therapies for multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1247: 117–1137.
57. Yamamura T, Miyake S. B-cell-directed therapy: which B cells should be targeted and how? *Immunotherapy* 2012; 4(5): 455–457.
58. Thompson SA, Jones JL, Cox AL, Compston DA, Coles AJ. B-cell reconstitution and BAFF after alemtuzumab (Campath-1H) treatment of multiple sclerosis. *J Clin Immunol* 2010; 30(1): 99–105.
59. Coles AJ, Wing M, Smith S, Coraddu F, Greer S, Taylor C et al. Pulsed monoclonal antibody treatment and autoimmune thyroid disease in multiple sclerosis. *Lancet* 1999; 354(9191): 1691–1695.
60. Bielekova B. Daclizumab therapy for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 2013; 10(1): 55–67.
61. Brusko T, Bluestone J. Clinical application of regulatory T cells for treatment of type 1 diabetes and transplantation. *Eur J Immunol* 2008; 38(4): 931–934.
62. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002; 169(9): 4712–4716.
63. Nakayama S, Takahashi H, Kanno Y, O'Shea JJ. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr Opin Immunol* 2012; 24(3): 297–302.
64. Graber JJ, Dhib-Jalbut S. Biomarkers of disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2011; 305(1–2): 1–10.
65. Krejssek J, Kopecký O. Klinická imunologie. Nucleus: Hradec Králové 2004.
66. Buc M. Základná a klinická imunológia. Veda: Bratislava 2012.
67. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 7th ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier 2012.
68. Schoenfeld Y, Fučíková T, Bartůňková J. Autoimunita – vnitřní nepřítel. Grada Publishing: Praha 2007.
69. Buc M. Autoimunita a autoimunitné choroby. Veda: Bratislava 2007.
70. Rich RR. Clinical Immunology. Principles and Practice. 3rd ed. Philadelphia: Mosby, Elsevier 2008.
71. Havrdová E. Neuroimunologie. Praha: Maxdorf 2001.