

Mechanizmy działania inhibitorów czynnika martwicy nowotworów α

Blockers of tumour necrosis factor- α : mechanisms of action

Piotr Eder, Liliana Łykowska-Szuber, Kamila Stawczyk-Eder, Iwona Krela-Kaźmierczak, Krzysztof Linke

Katedra i Klinika Gastroenterologii, Żywienia Człowieka i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Przegląd Gastroenterologiczny 2011; 6 (5): 290–298

DOI: 10.5114/pg.2011.25377

Słowa kluczowe: nieswoiste zapalenia jelit, przeciwciała anti-TNF- α , cytokiny, cytotoksyczność, apoptoza.

Key words: inflammatory bowel diseases, anti-TNF- α agents, cytokines, cytotoxicity, apoptosis.

Adres do korespondencji: lek. med. Piotr Eder, Katedra i Klinika Gastroenterologii, Żywienia Człowieka i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Szpital Kliniczny im. H. Święcickiego, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań, tel.: +48 61 869 13 43, 869 11 42, faks: +48 61 869 16 86, e-mail: piotr.eder@op.pl

Streszczenie

Nieswoiste zapalenia jelit należą do kręgu przewlekłych chorób zapalnych, w których od kilku lat z dobrym efektem stosuje się leki biologiczne będące inhibitorami czynnika martwicy nowotworów α . Pomimo coraz większych doświadczeń z tą nową grupą leków, nadal nie do końca poznane są mechanizmy molekularne, jakie decydują o ich skuteczności. W niniejszej pracy podjęto próbę przedstawienia aktualnej wiedzy na ten temat, a także zaprezentowano wynikające z tego implikacje kliniczne.

Abstract

Inflammatory bowel diseases belong to a group of chronic inflammatory disorders. These disorders can be treated by using biological therapy, such as TNF inhibitors – TNF- α blockers, which have been in use for several years. Despite growing expertise in using these drugs, the molecular mechanisms which determine their efficiency are still not fully explained. In this paper we present the current status of this topic and we try to indicate its clinical implications.

Wprowadzenie

Nieswoiste zapalenia jelit (NZJ) należą do kręgu przewlekłych chorób zapalnych o nie w pełni poznanej patogenezie. Zarówno w przypadku wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (WZJG), jak i choroby Leśniowskiego-Crohna (ChLC) dochodzi u predysponowanej genetycznie osoby w obecności określonych czynników środowiskowych do nieadekwatnie wyrażonej odpowiedzi immunologicznej. Prowadzi to do powstania nacieku zapalnego złożonego zarówno z komórek nieswoistej odpowiedzi immunologicznej (głównie granulocytów i monocytów), jak i komórek swoiście zaangażowanych w kaskadę zjawisk zapalnych (limfocytów T i B). Strukturalnym efektem tych procesów patofizjologicznych jest uszkodzenie ściany przewodu pokarmowego z upośledzeniem jego funkcji. Powszechnie uważa się, że w przypadku WZJG dochodzi głównie do stymulacji odpowiedzi Th2-zależnej z uwalnianiem takich cytokin, jak interleukina 4 (IL-4), IL-5 czy IL-10, natomiast w ChLC

przeważa odpowiedź z udziałem limfocytów Th1 oraz Th17, współuczestniczących w wydzielaniu IL-2, IL-6, czynnika martwicy nowotworów α (*tumour necrosis factor- α* – TNF- α) oraz IL-17, IL-21 czy IL-22 [1, 2]. Zahamowanie tego cyklu procesów powinno stanowić istotę leczenia NZJ. Do niedawna w terapii tych schorzeń stosowano głównie preparaty kwasu 5-aminosalicylowego, steroidy, leki immunosupresyjne z grupy tiopuryn (azatiopryna, 6-merkaptopuryna), rzadziej cyklosporynę czy metotreksat [2].

W ostatniej dekadzie doszło do istotnych zmian w filozofii podejścia do leczenia NZJ, przede wszystkim z uwagi na fakt pojawienia się leków, które w sposób celowany ingerują w błędne koło zjawisk immunologicznych i tym samym skutecznie hamują odpowiedź zapalną. Tymi terapeutykami są leki biologiczne, w szczególności inhibitory TNF- α . Pierwsze badania sugerujące, że neutralizacja tej podstawowej cytokiny prozapalnej może wpływać pozytywnie na przebieg schorzeń z kręgu chorób autoimmunologicznych, pochodzą z końca lat 80.

ubiegłego wieku. Wówczas to Brennan i wsp. udowodnili, że inhibicja aktywności TNF- α skutkuje zmniejszeniem syntezy innych cytokin w reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS) [3]. Następnie Elliott wraz z zespołem wykazali w pilotażowym badaniu, że zastosowanie chimerycznego monoklonalnego przeciwciała anti-TNF- α o nazwie cA2 prowadzi do istotnej redukcji objawów i zmniejszenia aktywności choroby u osób z RZS [4]. Kolejne badania przeprowadzone w większych grupach chorych potwierdziły skuteczność inhibitorów TNF- α w RZS. Okazało się także, że substancje te mogą być z powodzeniem stosowane w innych schorzeniach reumatologicznych (m.in. w łuszczycowym zapaleniu stawów – ŁZS, zeszytniejącym zapaleniu stawów kręgosłupa – ZZSK), dermatologicznych (m.in. w łuszczycy), a także gastroenterologicznych (NZJ), ziarniniaku Wegenera czy nawet sarkoidozie [5–8]. Obecnie na świecie stosuje się 5 inhibitorów TNF- α : infliksymab (IFX), adalimumab (ADA), etanercept (ETA), certolizumab pegol (CER) i golimumab (GOL), z czego najczęściej pierwsze trzy wymienione. Z teoretycznego punktu widzenia podstawowym zjawiskiem zachodzącym w organizmie chorego leczonego tymi terapiami jest inhibicja aktywności rozpuszczalnej i/lub związanej z błoną komórkową formy TNF- α , co blokuje mediowane przez te cząsteczki procesy. Jak pokazują jednak badania, procesy indukowane przez inhibitory TNF- α odpowiedzialne za efektywność tej grupy leków są o wiele bardziej skomplikowane.

Kolejnym interesującym zagadnieniem jest fakt różnej skuteczności poszczególnych terapeutów w danych jednostkach chorobowych. Przykładowo większość inhibitorów TNF- α jest z powodzeniem stosowana w leczeniu RZS, ale w przypadku ChLC ETA okazał się nieskuteczny [8]. Poszukuje się przyczyn tych różnic poprzez analizę mechanizmów molekularnych działania inhibitorów TNF- α .

Niniejsza praca ma na celu przedstawienie aktualnej wiedzy na ten temat. Przybliżenie tego zagadnienia wymaga jednak krótkiego przypomnienia podstaw dotyczących budowy leków biologicznych oraz biologii TNF- α i jego receptorów.

Budowa inhibitorów czynnika martwicy nowotworów α

Inhibitory TNF- α to głównie przeciwciała monoklonalne (IFX, ADA, GOL), fragmenty przeciwciał (CER) lub białka fuzyjne (ETA). Przeciwciała to białka mające zdolność swoistego wiązania antygeny docelowego, co pozwala na jego inaktywację. Każda immunoglobulina zbudowana jest z 4 łańcuchów polipeptydowych – 2 łańcuchów lekkich L (*light*) oraz 2 łańcuchów ciężkich H (*heavy*), które są ze sobą połączone wiązaniami disiarcz-

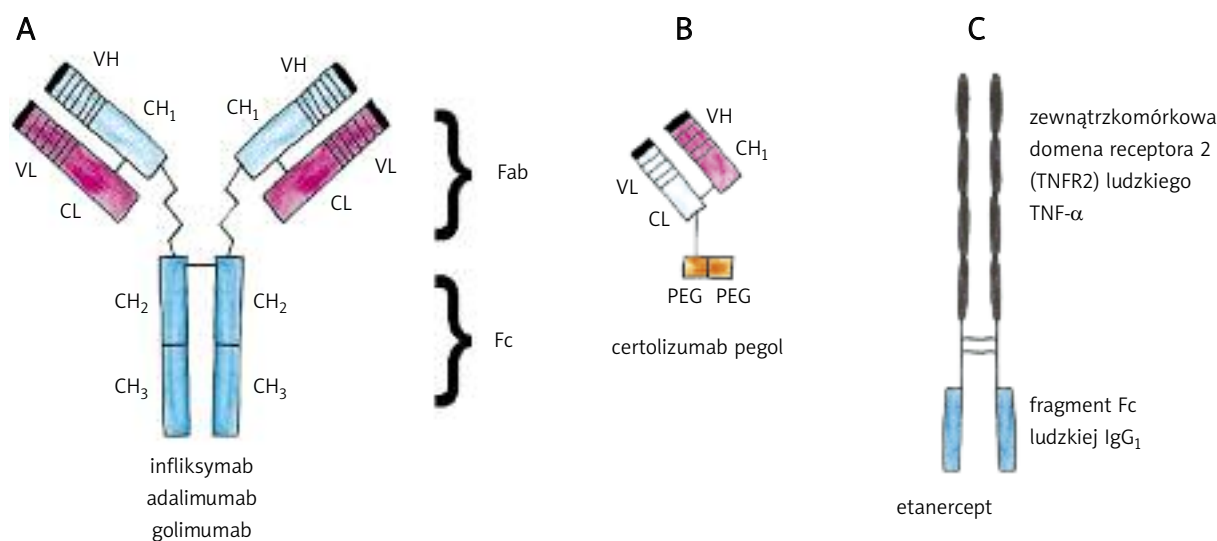
kowymi. W obrębie zarówno łańcuchów L, jak i H wyróżnia się części zmienne V (znajdują się w odcinkach N-końcowych) i części stałe C (leżące w odcinkach C-końcowych). Istnieje kilka podtypów łańcuchów ciężkich: alfa (α), delta (δ), epsilon (ϵ), gamma (γ) i mi (μ). W zależności od rodzaju łańcucha ciężkiego budującego dane przeciwciało dzieli się je na poszczególne klasy – odpowiednio: IgA, IgD, IgE, IgG i IgM. Dodatkowe różnice w budowie łańcuchów ciężkich w obrębie danej klasy pozwalają na wyodrębnienie podklas immunoglobulin, np. IgG₁, IgG₂, IgG₃ czy IgG₄. Łańcuchy lekkie występują natomiast w dwóch odmianach – kappa (κ) i lambda (λ). W przeciwciałach wyróżnia się ponadto dwa fragmenty funkcjonalne: Fab – odpowiedzialny za swoiste wiązanie danego antygeny, oraz Fc – odgrywający rolę na etapie efektorowym odpowiedzi immunologicznej (m.in. bierze udział w aktywacji układu dopełniacza oraz umożliwia wiązanie się danej immunoglobuliny z komórką efektorową, np. makrofagiem). Białka fuzyjne natomiast składają się z dwóch części – fragmentu Fc przeciwciała (zazwyczaj klasy IgG) oraz wybranej cząsteczki o określonych właściwościach (np. cząsteczki o właściwościach receptora wiążącego daną cytokinę).

Infliksymab to monoklonalne, chimeryczne, ludzko-mysie (komponenta ludzka stanowi 75% struktury białka) przeciwciało klasy IgG₁ o masie cząsteczkowej 149 kDa. Adalimumab i GOL natomiast to immunoglobuliny czysto ludzkie klasy IgG₁ o masie cząsteczkowej odpowiednio 148 kDa oraz 146 kDa. Certolizumab pegol jest z kolei humanizowanym fragmentem Fab (czyli w ok. 90% ludzkim) przeciwciała monoklonalnego skoniugowanym z polietylenoglikolem (PEG). Pegylacja wpływa korzystnie na farmakokinetykę leku, wydłużając jego okres półtrwania. Etanercept jest natomiast białkiem fuzyjnym zbudowanym z części zewnątrzkomórkowej receptora TNFR2/p75 (ta część wiąże TNF- α) połączonej z fragmentem Fc immunoglobuliny IgG₁ [8, 9].

Strukturę poszczególnych leków biologicznych przedstawiono na rycinie 1.

Biologia czynnika martwicy nowotworów α

Czynnik martwicy nowotworów α jest kluczowym elementem odpowiedzi immunologicznej. Jego pleiotropowe działanie obejmuje m.in. indukcję syntezy innych cytokin, pobudzanie uwalniania przeciwciał przez limfocyty B, stymulację produkcji białek ostrej fazy w wątrobie, zwiększenie ekspresji cząsteczek adhezji na komórkach endotelium czy indukcję apoptozy komórek nowotworowych [9]. Występuje w formie rozpuszczalnej (*soluble TNF- α* – sTNF) i związanej z błoną komórkową (*transmembrane TNF* – tmTNF). Forma rozpuszczalna jest cząsteczką o masie 17 kDa i powstaje w wyniku



Ryc. 1. Budowa inhibitorów TNF- α . **A** – przeciwciało monoklonalne zbudowane jest z dwóch łańcuchów ciężkich (kolor niebieski) – w ich obrębie znajduje się domena zmienna VH oraz domeny stałe CH₁, CH₂ i CH₃, oraz dwóch łańcuchów lekkich (kolor czerwony) – w ich obrębie znajduje się domena zmienna VL i stała CL. Każde przeciwciało monoklonalne ma fragment wiążący antygen – Fab, i fragment Fc – odpowiedzialny za funkcje efektorowe przeciwciała. Infliximab jest przeciwciałem ludzkim chimerycznym – w 25% składa się z komponenty mysiej, a adalimumab i golimumab są przeciwciałami czysto ludzkimi. **B** – certolizumab pegol to humanizowany (czyli w ok. 90% ludzki), pegylowany fragment Fab przeciwciała monoklonalnego. **C** – etanercept to białko fuzyjne zbudowane z części zewnątrzkomórkowej receptora TNFR2 oraz fragmentu Fc przeciwciała IgG₁

Fig. 1. The structure of TNF- α inhibitors. **A** – monoclonal antibody is made of two heavy chains (blue colour), which consists of variable domain VH, constant domains CH₁, CH₂ and CH₃, and two light chains (red colour), which consist of variable domain VL and constant domain CL. Each monoclonal antibody contains a region that binds the antigen (Fab), and a region responsible for effectors' functions (Fc). Infliximab is a human chimeric monoclonal antibody (25% mouse protein), while adalimumab and golimumab are fully human monoclonal antibodies. **B** – certolizumab pegol is a pegylated, humanised (90% human protein) fragment Fab of IgG₁ monoclonal antibody. **C** – etanercept is a fusion protein, which consists of a fragment of TNFR2 linked to a Fc fragment of IgG₁

uwolnienia fragmentu tmTNF (masa cząsteczkowa 26 kDa) z błony komórkowej makrofagów, limfocytów T, komórek NK, a także wielu innych komórek na skutek działania enzymu konwertującego TNF- α (*TNF- α converting enzyme* – TACE) [8]. Zarówno sTNF, jak i tmTNF mają tendencję do formowania homotrimerów. Receptorami, które reagują z sTNF i tmTNF, są cząsteczki TNFR1 i TNFR2 (*tumour necrosis factor receptors*). Pierwsza cząsteczka znajduje się na większości komórek ludzkiego organizmu i wiąże przede wszystkim sTNF. Ekspresja TNFR2 jest natomiast indukowana w wyniku aktywacji odpowiedzi immunologicznej i obserwuje się ją głównie na komórkach krwi i endotelium. Ten typ receptora reaguje w największej mierze z tmTNF, w mniejszym stopniu wiąże sTNF. W tym drugim przypadku opisuje się jednak zjawisko tzw. przekazywania liganda (*ligand-passing*), polegające na przeniesieniu interakcji ligand-

-receptor na inny receptor znajdujący się w pobliżu, do którego dany ligand ma naturalnie większe powinowactwo (sTNF reagujący z TNFR2 „przekazywany” jest sąsiadnym receptorom TNFR1) [8, 10]. Jak wspomniano wyżej, pobudzenie TNFR może prowadzić do aktywacji komórki, pobudzenia jej do syntezy cytokin, zwiększenia ekspresji cząsteczek adhezji czy do śmierci komórki w mechanizmie apoptozy. Ostateczny efekt molekularny zależy od wielu czynników – m.in. od stanu metabolicznego danej komórki, wpływu innych cytokin, obecności czynników kostymulujących itp. Co ciekawe, tmTNF może funkcjonować nie tylko jako ligand reagujący z TNFR, lecz także sam może pełnić funkcję receptora [11]. Wówczas rolę liganda odgrywa TNFR lub np. przeciwciało anti-TNF- α mające zdolność wiązania tmTNF. Zagadnienie to zostanie rozwinięte w dalszej części artykułu.

Mechanizmy działania inhibitorów czynnika martwicy nowotworów α

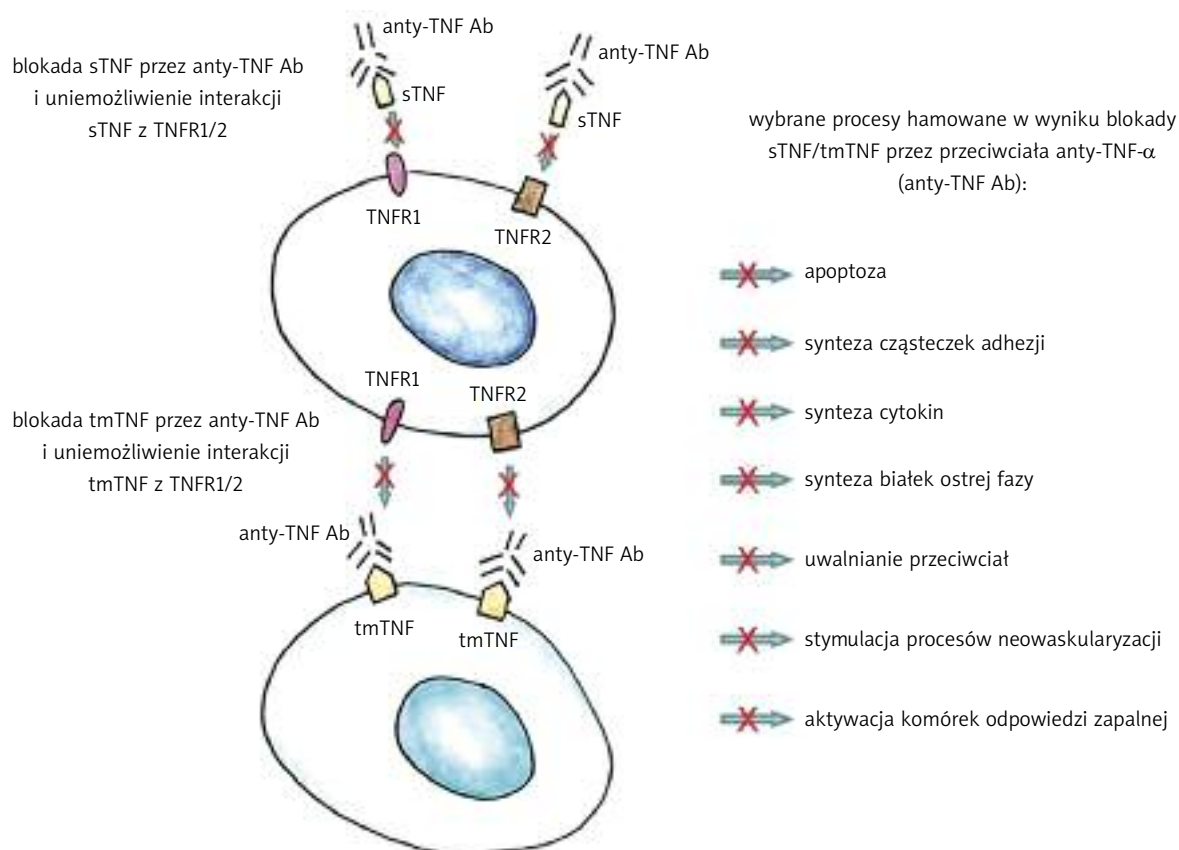
Tracey i wsp. podzielili mechanizmy działania inhibitorów TNF- α na związane z zablokowaniem reakcji mediowanych poprzez TNFR (brak możliwości połączenia liganda, jakim jest sTNF i/lub tmTNF, a w przypadku ETA także limfotoksyna α – LT α , z receptorem) oraz na związane z bezpośrednim wpływem leków na tmTNF [8]. Podział ten jest nieco uproszczony i umowny, ponieważ wciąż istnieje bardzo wiele wątpliwości co do szczegółów zjawisk zachodzących *in vivo*. Najprawdopodobniej wszystkie te mechanizmy są ze sobą w dużej mierze sprzężone, a wielu procesów indukowanych przez leki biologiczne nadal nie umiemy odpowiednio zdefiniować i wytłumaczyć.

Mechanizmy związane z blokadą reakcji mediowanych przez TNFR1 i TNFR2

Jak wspomniano wyżej, TNF- α jest główną cytokiną stanu zapalnego. Uczestniczy ona w wielu procesach

zaangażowanych w indukcję i podtrzymanie wzbudzonej odpowiedzi immunologicznej. Zablokowanie sTNF oraz tmTNF (w przypadku ETA również blokada LT α) uniemożliwia połączenie się liganda z receptorami TNFR, co tłumi właściwości prozapalne tej cytokiny (ryc. 2.). Biorąc jednak pod uwagę fakt, że w każdym przypadku stymulacji układu odpornościowego organizmu uczestniczy wiele cytokin (tworzących tzw. sieć cytokin), które wzajemnie ze sobą reagują, neutralizacja sTNF/tmTNF doprowadza nie tylko do zmniejszenia lokalnego stężenia tych cząsteczek, lecz także do redukcji stężenia wielu innych mediatorów prozapalnych. Analizując dotychczasowe badania na ten temat, należy wymienić przede wszystkim takie cytokiny, jak IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, czy czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor* – GM-CSF).

Innym ważnym zjawiskiem molekularnym wynikającym wtórnie z zablokowania TNF- α jest zmniejszenie ekspresji cząsteczek adhezji oraz chemokin uczestniczą-



Ryc. 2. Mechanizmy działania inhibitorów TNF- α (anti-TNF Ab) związane z uniemożliwieniem połączenia liganda (rozpuszczalnej i związanej z błoną komórkową formy TNF- α – odpowiednio sTNF i tmTNF) z receptorami (TNFR1 i TNFR2)

Fig. 2. The mechanisms of action of TNF- α inhibitors (anti-TNF Ab), related to blocking a ligand binding (sTNF or tmTNF) with its receptors (TNFR1 or TNFR2)

cych w procesach wzbudzenia leukocytów krążących we krwi i ich migracji przez ścianę naczynia do miejsca, w którym toczy się zapalenie. Udowodniono m.in., że po podaniu inhibitorów TNF- α zmniejsza się ekspresja cząsteczki adhezyjnej komórek śródbłonka (*vascular cell adhesion molecule-1* – VCAM-1), cząsteczki adhezji międzykomórkowej (*intercellular adhesion molecule-1* – ICAM-1), E-selektyny oraz białka przyciągającego monocytu 1 (*macrophage chemoattractant protein-1* – MCP-1), białka zapalnego makrofagów 1 (*macrophage inflammatory protein* – MIP-1 α), białka RANTES (*regulated on activation normal T cells expressed and secreted*), CXCL10 czy CCL20 [12–15]. Tym mechanizmem próbuje się tłumaczyć gwałtowną redukcję nacieku zapalnego, którą obserwowano w krótkim czasie (24–48 godz.) po podaniu IFX u osób z RZS, ŁZS czy łuszczycą. W badaniach wykazano istotne zmniejszenie liczby przede wszystkim limfocytów T i makrofagów w obrębie maziówki w przypadku schorzeń reumatologicznych oraz w naskórku zmienionym w przebiegu łuszczycy. Nie zanotowano jednak, wbrew przewidywaniom, zwiększenia się liczby komórek apoptotycznych. Świadczy to o tym, że do redukcji nacieku zapalnego w ciągu kilkunastu godzin od podania leku dochodzi w innym mechanizmie, niż wcześniej postulowano. Wydaje się więc obecnie, że to właśnie zmniejszenie rekrutacji i migracji leukocytów jest zjawiskiem odpowiedzialnym w fazie wczesnej za efekt terapeutyczny na poziomie komórkowym inhibitorów TNF- α w RZS, ŁZS czy łuszczycy [8, 16].

Nieodłącznym elementem każdej reakcji zapalnej jest wzmożona lokalnie angiogeneza (tzw. neowaskularyzacja), która umożliwia zwiększenie napływu leukocytów. Także ten proces jest hamowany w wyniku zastosowania inhibitorów TNF- α . Wykazano istotną redukcję ekspresji głównego czynnika wpływającego na tworzenie się sieci naczyń krwionośnych – czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), a także innych zaangażowanych w te zjawiska cząsteczek po podaniu IFX czy ETA w tkankach zmienionych chorobowo [17].

Innym zjawiskiem obserwowanym w przewlekłych schorzeniach zapalnych, takich jak RZS czy ChLC, jest zaburzenie równowagi między mechanizmami pobudzającymi i hamującymi odpowiedź immunologiczną. Udowodniono, że TNF- α może hamować aktywność limfocytów regulatorowych Treg zarówno bezpośrednio, jak i w procesach zależnych od czynnika transformującego wzrostu β 1 (*transforming growth factor β 1* – TGF- β 1) [18]. Komórki Treg stanowią podstawowy element supresji reakcji immunologicznych, dzięki czemu m.in. zapewniona jest homeostaza w organizmie. W RZS czy ChLC obserwuje się duże stężenia TNF- α i zmniejszoną aktywność limfocytów Treg. Wyniki dotychczas przepro-

wadzonych badań pokazują, że zastosowanie IFX czy ADA prowadzi do przywrócenia przytłumionego przez procesy zapalne potencjału immunosupresyjnego komórek Treg [19].

Analizując mechanizmy działania zależne od blokady procesów mediowanych przez TNFR w wyniku interakcji z sTNF/tmTNF i/lub LT α (w przypadku ETA), można – oprócz wielu podobieństw – wskazać także kilka różnic między poszczególnymi lekami biologicznymi. Przede wszystkim IFX, ADA, CER, GOL wiążą zarówno sTNF, jak i tmTNF, podczas gdy ETA blokuje głównie sTNF oraz LT α . Niektórzy autorzy spekulują, że ETA – wiążąc duże ilości LT α – może tracić zdolność do wystarczającej neutralizacji TNF- α . To z kolei może być przyczyną braku skuteczności tej cząsteczki np. w ChLC [8]. Koncepcja ta wydaje się jednak dość kontrowersyjna. Innym badaniem zagadnieniem, które wskazuje na pewne różnice między poszczególnymi lekami biologicznymi, jest proces wiązania liganda z receptorem (tworzenie kompleksów anty-TNF – sTNF/tmTNF). Okazuje się, że IFX i ADA mogą wiązać sTNF/tmTNF występujący zarówno w postaci monomeru, jak i trimery, natomiast ETA wiąże jedynie trimeryczną formę sTNF [10, 20]. Co więcej, IFX i ADA mogą wiązać jednocześnie dwa trimery sTNF/tmTNF (ponadto jeden homotrimer TNF- α może być jednocześnie związany przez 3 cząsteczki IFX), co umożliwia kaskadowe tworzenie większych kompleksów w wyniku krzyżowych reakcji w układzie ligand-receptor (tzw. zjawisko *cross-linking*).

Z drugiej strony wykazano, że jeśli w tkankach, w których stwierdza się duże stężenia sTNF, potencjał wiązania się z tą cząsteczką poszczególnych inhibitorów TNF- α jest podobny, to w przypadku niewielkich stężeń sTNF ETA wykazuje nawet 20-krotnie większe do niego powinowactwo [8]. Praktyczne znaczenie tych obserwacji pozostaje jednak nadal nieznane.

Innym ciekawym aspektem jest eliminacja leku i kompleksu lek biologiczny – cel molekularny z organizmu człowieka. Jak pokazują badania doświadczalne i częściowo potwierdzają badania z udziałem ludzi, kompleksy ETA–sTNF są eliminowane z organizmu zdecydowanie dłużej niż IFX–sTNF czy ADA–sTNF. Warto zauważyć, że połączenie leku z jego celem molekularnym w żywym organizmie ma charakter dynamiczny, czyli w jednostce czasu zachodzą równoległe procesy wiązania i uwalniania cząsteczek sTNF [20, 21]. Może to mieć implikacje kliniczne – mianowicie sugeruje się, że ETA, wiążąc sTNF w danej lokalizacji anatomicznej, może z uwagi na długi czas eliminacji z organizmu przenosić tę cytokinę do odległych narządów i tam ją uwalniać (*TNF-carrier effect*). Z badań doświadczalnych wiadomo także, że zjawisko to jest mniej zaznaczone w przypadku innych inhibitorów TNF- α , np. IFX tworzy bardziej sta-

bilne kompleksy z sTNF niż ETA [8, 20]. Ten proces był rozpatrywany jako hipotetyczna przyczyna zwiększającej się, zależnie od dawki leku, śmiertelności u chorych z posocznicą leczonych ETA, u których stwierdzano bardzo duże stężenia sTNF [22]. Obecnie wydaje się jednak, że takie rozważania, z uwagi na skąpe dane, są trudne do weryfikacji i potwierdzenia.

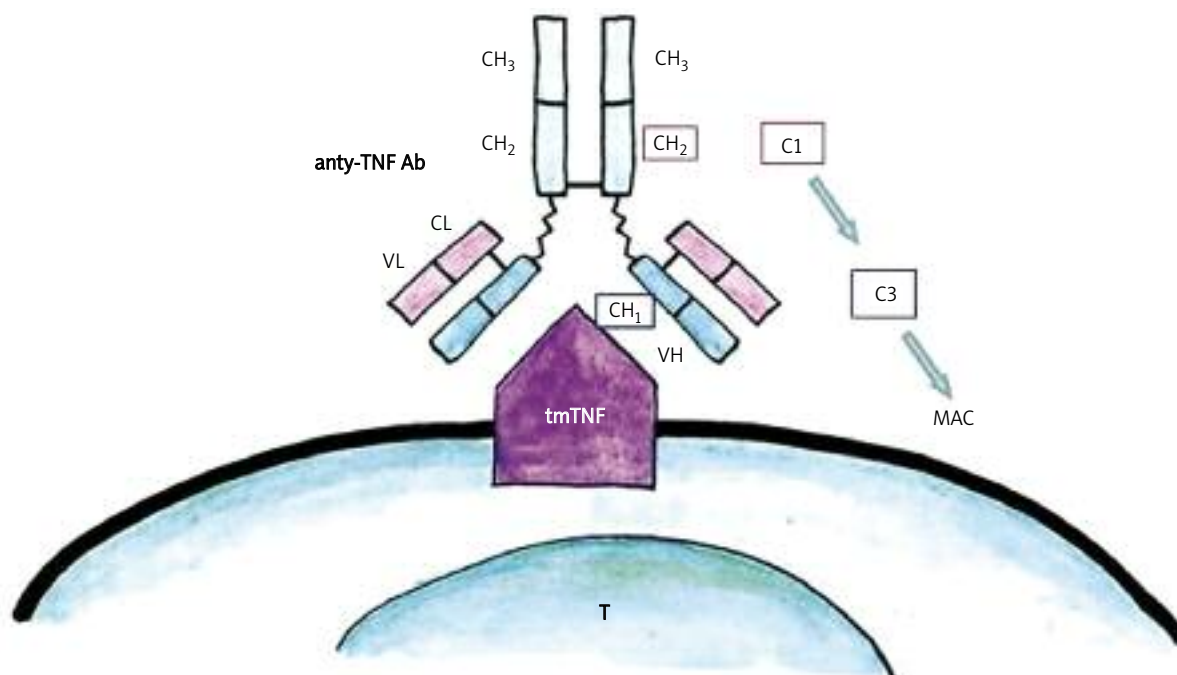
Mechanizmy związane z wpływem na tmTNF

Jak wspomniano wyżej, tmTNF funkcjonuje nie tylko jako ligand dla receptora TNFR, lecz może pełnić funkcje receptorowe. Ligandem dla tmTNF jest TNFR albo inna cząsteczka reagująca z nim, np. przeciwciało anti-TNF- α [11]. Aktywacja receptora tmTNF prowadzi m.in. do wzrostu ekspresji cząsteczek adhezji (np. E-selektyny w wyniku wzbudzenia limfocytu T), zwiększenia wrażliwości na kolejne sygnały pobudzające daną komórkę (tzw. prestymulacja) czy produkcji innych cytokin (np. TNF- α przez monocyty lub makrofagi), a także indukcji reakcji cytotoksyczności (komórki NK). Jak wiadomo, IFX, ADA i CER reagują bezpośrednio z tmTNF, natomiast o wiele słabsze właściwości wiązania tmTNF ma ETA. Horiuchi i wsp. wskazują na co najmniej cztery mechanizmy, w których inhibitory TNF- α modulują odpowiedź immunologiczną, reagując z tmTNF. Przede wszystkim – blokując tmTNF, uniemożliwiają jego interakcję z TNFR, a tym samym hamują procesy wzbudzone przez aktywację tmTNF. Mogą ponadto stymulować mechanizmy cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza (*complement dependent cytotoxicity* – CDC) i przeciwciał (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity* – ADCC) [8, 11, 23]. Fragment Fab leku biologicznego reaguje z receptorem tmTNF na komórce docelowej, natomiast w indukcję zjawiska cytotoksyczności zaangażowany jest jego fragment Fc. W przypadku CDC do aktywacji układu dopełniacza niezbędna jest obecność domeny CH₂ w obrębie fragmentu Fc, co warunkuje pobudzenie składowej C1 komplementu. Taką domenę mają zarówno IFX, ADA, jak i ETA. Do pełnej aktywacji układu dopełniacza wymagana jest jednak także domena CH₁, która umożliwia pobudzenie składowej C3, co jest zjawiskiem podstawowym dla ostatecznego uformowania kompleksu atakującego błonę (C5b – C9), co prowadzi do zniszczenia komórki docelowej. Domeny CH₁ nie ma jednak białko fuzyjne, jakim jest ETA, w przeciwieństwie do przeciwciał monoklonalnych, takich jak IFX czy ADA. Efektem jest znacznie słabsza indukcja mechanizmów CDC *in vitro* w wyniku zastosowania ETA. Może to wg niektórych autorów w pewnym stopniu tłumaczyć różną skuteczność inhibitorów TNF- α w poszczególnych jednostkach chorobowych (ryc. 3.).

Zdolność do wzbudzania ADCC wydaje się natomiast podobna w przypadku IFX, ADA i ETA. Inhibitor TNF- α po

związaniu fragmentem Fab receptora tmTNF na komórce docelowej może fragmentem Fc (tu niezbędna jest obecność na nim domen CH₂ i CH₃) połączyć się z receptorem Fc na komórce NK, co pobudza tą ostatnią do wydzielania granzymu B i perforyny. Białka te niszczą błonę komórkową komórki docelowej i prowadzą do jej lizy (ryc. 4.). Żadnego z efektów cytotoksyczności nie odnotowano natomiast w przypadku stosowania CER, co jest zrozumiałe, biorąc pod uwagę fakt, że lek ten w swojej strukturze nie zawiera fragmentu Fc.

Kolejnym – czwartym – mechanizmem generowanym przez połączenie się inhibitora TNF- α z receptorem tmTNF są tzw. procesy odwrotnej sygnalizacji (*reverse signalling*) lub sygnalizacji z zewnątrz do wewnątrz (*outside-to-inside signalling*) [24]. Procesy te polegają przede wszystkim na zahamowaniu podziałów komórkowych, supresji wydzielania cytokin oraz indukcji apoptozy komórki docelowej mającej receptor tmTNF. U podstaw tych efektów leży wzbudzenie wielu wewnątrzkomórkowych szlaków, w których uczestniczą głównie białka z rodziny bcl-2 (np. Bax, Bak), ponadto obserwuje się wzrost ekspresji białka p21, dochodzi do akumulacji wolnych rodników tlenowych i zwiększenia stężenia w cytoplazmie jonów wapnia [11]. Warto w tym miejscu nieco szerzej przedstawić rolę apoptozy jako jednego z podstawowych mechanizmów molekularnych decydujących o skuteczności inhibitorów TNF- α . Jak wiadomo, jest to proces programowanej śmierci komórek współdecydujący o zachowaniu homeostazy tkankowej (m.in. eliminacja komórek nowotworowych czy reaktywnych leukocytów). Z punktu widzenia patofizjologicznego natomiast nadmiernie lub zbyt słabo wyrażona apoptoza może prowadzić do znacznego ubytku komórek (np. enterocytów, co skutkuje uszkodzeniem bariery jelitowej) lub przeciwnie – do nagromadzenia nieprawidłowych komórek (np. pobudzonych limfocytów w naciekach zapalnych) [9]. Jest to jedna z głównych koncepcji etiopatogenetycznych przewlekłych chorób zapalnych, takich jak ChLC czy RZS. Potwierdzeniem istotności tych zjawisk jest obserwowana w wielu badaniach wzmożona apoptoza leukocytów w tkankach zmienionych zapalnie po podaniu inhibitorów TNF- α . Sugeruje to, że właśnie indukcja programowanej śmierci komórek odgrywa zasadniczą rolę na poziomie molekularnym w skuteczności leków biologicznych [25, 26]. Najbardziej spójną teorią okazuje się ta mówiąca, że podstawowym mechanizmem zaangażowanym w indukcję apoptozy jest pobudzenie szlaków odwrotnej sygnalizacji w wyniku oddziaływań z receptorem tmTNF, w mniejszym stopniu w wyniku reakcji cytotoksyczności [8]. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że chociażby sTNF/tmTNF może wzbudzać lub rzadziej hamować apoptozę na skutek interakcji z TNFR, trudno wykluczyć, iż sama inaktywacja sTNF/tmTNF przez leki

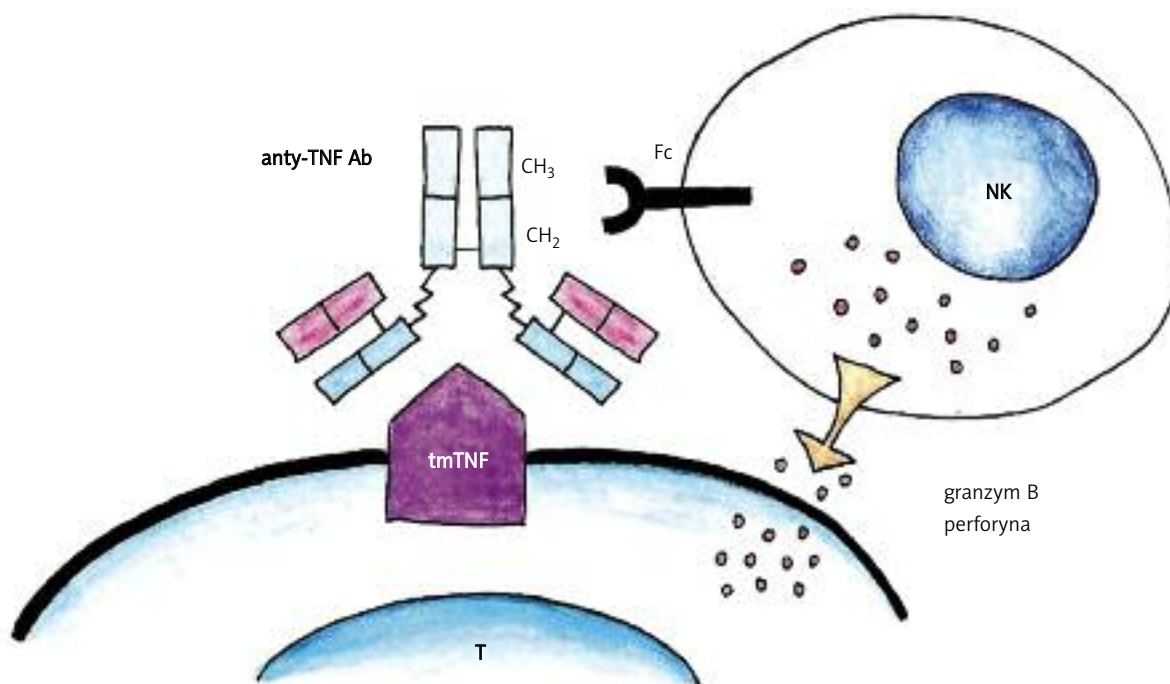


Ryc. 3. Mechanizmy działania inhibitorów TNF- α związane z funkcją receptorową tmTNF – indukcja zjawiska cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza (CDC). Przeciwciało anti-TNF- α (anti-TNF Ab), wiążąc się z tmTNF na komórce docelowej, może aktywować układ dopełniacza dzięki obecności domeny CH₂ w obrębie fragmentu Fc (aktywacja składowej C1 układu dopełniacza). Niezbędną domeną do pełnej aktywacji tej kaskady, z udziałem składowej C3, jest domena CH₁ w obrębie fragmentu Fab przeciwciała monoklonalnego. Ostatecznie prowadzi to do uformowania kompleksu atakującego błonę C5b–C9 (*membrane attacking complex* – MAC), co skutkuje zniszczeniem komórki docelowej T (*target cell*). Pełny opis w tekście **Fig. 3.** *The mechanisms of action of TNF- α inhibitors connected to receptor's function of tmTNF – induction of complement dependent cytotoxicity (CDC) which leads to formation of membrane attacking complex C5b – C9 (MAC) with lysis of a target cell (T – target cell). The full description can be found in the article*

biologiczne także nie wpływa na zjawisko programowanej śmierci komórek. Warto w tym miejscu nadmienić, że najwięcej dowodów na kluczowe znaczenie apoptozy jako procesu decydującego o efektywności inhibitorów TNF- α dotyczy ChLC, natomiast w przypadku pozostałych jednostek chorobowych dane raczej potwierdzają postawioną wyżej hipotezę, ale są bardziej rozbieżne. Co więcej, w ostatnich latach skuteczne zastosowanie CER w ChLC, który przynajmniej na podstawie dotychczasowych analiz nie wzbudza apoptozy, częściowo zakwestionowało rzeczywiste znaczenie tego procesu dla efektywności inhibitorów TNF- α . Należy jednak podkreślić, że wciąż nie ma badań przeprowadzanych *in vivo* (obecnie dysponujemy próbami z bardzo małymi grupami pacjentów), a protokoły doświadczeń *in vitro* cechowały się bardzo dużą różnorodnością. Dlatego też potrzebne są kolejne badania, które pozwolą rzucić więcej światła na to fascynujące, ale i skomplikowane zagadnienie.

Podsumowując – należy z całą mocą podkreślić, że przedstawione powyżej pokrótce mechanizmy działania

inhibitorów TNF- α nie tłumaczą w pełni skuteczności różnych leków biologicznych bądź jej braku w leczeniu poszczególnych jednostek chorobowych. Pozwalają jednak nieco dokładniej przyjrzeć się wpływowi, jaki wywierają na układ immunologiczny, a także umożliwiają formułowanie ważnych z praktycznego punktu widzenia hipotez. Przykładowo postuluje się, że jednym z głównych powodów braku skuteczności ETA w chorobach z kręgu schorzeń ziarniniakowych, takich jak ChLC, sarkoidoza czy ziarniniak Wegenera, jest jego słabe powinowactwo do tmTNF [11]. Uważa się bowiem, że bezpośrednia stymulacja tmTNF odgrywa zasadniczą rolę w formowaniu ziarniniaków na poziomie tkankowym. Istnieją jednak dowody na to, że tmTNF uczestniczy w reakcjach obronnych organizmu przeciw *Mycobacterium tuberculosis* – głównie chodzi o funkcję limfocytów T pamięci umożliwiających sprawną eliminację prątków gruźlicy [27]. Istnieje kilka praktycznych dowodów potwierdzających prawdziwość tych hipotez. Przede wszystkim uaktywnienie gruźlicy jest jednym



Ryc. 4. Mechanizmy działania inhibitorów TNF- α związane z funkcją receptorową tmTNF – indukcja reakcji cytotoxycywności zależnej od przeciwciał (ADCC). Przeciwciało anti-TNF- α (anti-TNF Ab) może, po związaniu tmTNF na komórce docelowej, aktywować komórkę NK. Dochodzi do tego w wyniku interakcji domen CH₂ i CH₃ w obrębie fragmentu Fc przeciwciała z receptorem Fc na komórce NK. Ostatecznie może to prowadzić do indukcji wydzielania granzymu B czy perforyny z komórek NK, co skutkuje zniszczeniem komórki docelowej T (*target cell*). Pełny opis w tekście

Fig. 4. The mechanisms of action of the TNF- α inhibitors connected to a receptor function of tmTNF – induction of antibody cell-mediated cytotoxicity (ADCC). The full description can be found in the article. T – target cell

z najpoważniejszych powikłań terapii biologicznej, ale udowodniono, że potencjał wywołania tej choroby bakteryjnej jest kilkakrotnie większy przy stosowaniu IFX niż ETA [11]. Czy dlatego, że ETA znacznie słabiej reaguje z tmTNF i mniej upośledza odpowiedź przeciwpłatkową organizmu? Ponadto – jak pokazuje jedno z badań przeprowadzonych u chorych na RZS, u których doszło do rozwoju gruźlicy po zastosowaniu IFX – nie obserwowano obecności typowych ziarniniaków w materiałach tkankowych [28]. Czy to potwierdza silny efekt hamowania tworzenia się ziarniniaków przez IFX, w którym uczestniczy tmTNF?

Na zakończenie jeszcze raz należy podkreślić, że większość danych na temat mechanizmów molekularnych działania inhibitorów TNF- α pochodzi z badań *in vitro*, gdzie stosowano różne linie komórkowe. Ma to swoje istotne ograniczenia, nie pozwala bowiem przenieść wniosków badawczych bezpośrednio na zjawiska zachodzące *in vivo*. Wyniki niektórych badań są nieco rozbieżne, a innych nawet sprzeczne. Nie dyskwalifikuje to dotychczas sformułowanych hipotez, niemniej jednak

świadczy o tym, że nasza wiedza na temat poszczególnych mechanizmów molekularnych jest spekulatywna i pokazuje, jak wiele jeszcze pytań pozostaje bez odpowiedzi.

Piśmiennictwo

1. Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Trans Res* 2007; 149: 173-86.
2. Bartnik W. Wytyczne postępowania w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. *Przegl Gastroenterol* 2007; 2: 215-29.
3. Brennan FM, Chantry D, Jackson A, et al. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1989; 2: 244-7.
4. Elliott M, Maini R, Feldmann M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1681-90.
5. Elliott M, Maini R, Feldmann M, et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994; 344: 1105-10.
6. Sandborn W. New concepts in anti-tumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2005; 5: 10-8.

7. Utz JP, Limper AH, Kalra S, et al. Etanercept for the treatment of stage II and III progressive pulmonary sarcoidosis. *Chest* 2003; 124: 177-85.
8. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Therapeut* 2008; 117: 244-79.
9. *Immunologia*. Gotąb J, Jakóbsiak M, Lasek W (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004.
10. Chowers Y, Sturm A, Sans M, et al. Report of the ECCO workshop on anti-TNF therapy failures in inflammatory bowel diseases: biological roles and effects of TNF and TNF antagonists. *J Crohns Colitis* 2010; 4: 367-76.
11. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, et al. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 2010; 49: 1215-28.
12. Maini R, Feldmann M. How does infliximab work in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res* 2002; 4: S22-8.
13. Charles P, Elliott M, Davis D, et al. Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1999; 163: 1521-8.
14. Ulfgren AK, Andersson U, Engström M, et al. Systemic anti-tumor necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis down-regulates synovial tumor necrosis factor alpha synthesis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2391-6.
15. Gottlieb AB, Chamian F, Masud S, et al. TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J Immunol* 2005; 175: 2721-9.
16. Kruithof E, De Rycke L, Roth J, et al. Immunomodulatory effects of etanercept on peripheral joint synovitis in the spondylarthropathies. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3898-909.
17. Agarwal A, Panda S, Misra R. Effect of etanercept on matrix metalloproteinases and angiogenic vascular endothelial growth factor: a time kinetic study. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 891-92.
18. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, et al. TNF down-modulates the function of human CD4+ CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 2006; 108: 253-61.
19. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004; 200: 277-85.
20. Scallon B, Cai A, Solowski N, et al. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301: 418-26.
21. Kaymakcalan Z, Beam C, Salfeld J. Murine model for assessing adalimumab, infliximab, and etanercept to prevent polyarthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62 (Suppl 1): 136-7.
22. Fisher CJ, Agosti JM, Opal SM, et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. *N Engl J Med* 1996; 334: 1697-702.
23. Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, et al. Mechanisms for cytotoxic effects of anti-TNF agents on transmembrane TNF-expressing: comparison among infliximab, etanercept and adalimumab. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 1248-57.
24. Mitoma H, Horiuchi T, Hatta N, et al. Infliximab induces potent anti inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF-alpha. *Gastroenterology* 2005; 128: 376-92.
25. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cinque B, et al. Defective mucosal T cell death is sustainably reverted by infliximab in a caspase dependent pathway in Crohn's disease. *Gut* 2004; 53: 70-7.
26. Van den Brande J, Braat H, van den Brink G, et al. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003; 124: 1774-85.
27. Bruns H, Meinken C, Scauenberg P, et al. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *J Clin Invest* 2009; 119: 1167-77.
28. Keane J, Gershon S, Wise RP, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor-alpha neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001; 345: 1098-104.