

Terapie eksperymentalne w leczeniu zmian stawowych u chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów

Marek Libura¹, Ignacy Jan Nowogrodzki¹, Piotr Kopiński², Ewelina Wędrowska²

¹ Centrum Medyczne, Kraków

² Zakład Genoterapii, Collegium Medicum, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Bydgoszcz

Libura M, Nowogrodzki IJ, Kopiński P, Wędrowska E. Terapie eksperymentalne w leczeniu zmian stawowych u chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Med Og Nauk Zdr. 2016; 22(2): 98–103. doi: 10.5604/20834543.1208213

Streszczenie

Wprowadzenie i cel pracy. Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest jedną z najczęstszych chorób tkanki łącznej o podłożu autoimmunologicznym. Charakteryzuje się zwłaszcza stanem zapalnym stawów, prowadzącym do postępującego uszkodzenia i utraty ich czynności, czego następstwem jest niepełnosprawność motoryczna chorego. Celem pracy jest zestawienie wybranych nowoczesnych metod leczenia zmian stawowych w RZS, będących obecnie we wczesnych i zaawansowanych fazach badań klinicznych.

Skrócony opis stanu wiedzy. Obecnie leczenie RZS opiera się przede wszystkim na postępowaniu objawowym, stosowaniu biologicznych i syntetycznych leków modyfikujących przebieg choroby, a także na rehabilitacji oraz chirurgicznym leczeniu powikłań. Prowadzone są badania nad nowymi, obiecującymi metodami leczenia, jak immunoterapia i terapia genowa, dostawowe podawanie osocza bogatopłytkowego (*platelet-rich plasma*, PRP), mezenchymalnych komórek macierzystych, a także nad łączeniem ww. metod.

Podsumowanie. Szybki postęp w leczeniu RZS obserwowany w ostatnich latach zawdzięczamy głównie wprowadzeniu leczenia biologicznego. Jednak nadal nie obserwuje się zadowalającej odpowiedzi klinicznej u istotnej grupy chorych, pomimo długotrwałego leczenia konwencjonalnego. Istnieje nadzieja, że opisane w pracy metody, wymierzone precyzyjnie w molekularne patomechanizmy choroby, istotnie przybliżą rozwiązanie problemu leczenia zmian stawowych w RZS.

Słowa kluczowe

eksperymentalna technika leczenia, immunoterapia, osocze bogatopłytkowe, reumatoidalne zapalenie stawów, terapia genowa

WPROWADZENIE I CEL PRACY

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest jedną z najczęstszych chorób tkanki łącznej o podłożu autoimmunologicznym. W tej jednostce chorobowej charakterystyczny jest stan zapalny stawów objawiający się bólem, obrzękiem, gromadzeniem się płynu w jamach stawowych, zaburzeniami ruchomości stawów oraz pogorszeniem jakości życia. Proces ten prowadzi do postępującego uszkodzenia i utraty czynności stawów, skutkując niepełnosprawnością motoryczną pacjenta.

Obecnie leczenie RZS polega przede wszystkim na stosowaniu leczenia objawowego, syntetycznych i biologicznych leków modyfikujących przebieg choroby, rehabilitacji oraz miejscowego ortopedycznego leczenia powikłań. Niestety, konwencjonalne techniki terapeutyczne w najlepszym przypadku powstrzymują rozwój choroby, nie powodują jednak całkowitego wyleczenia. Często brak też zadowalającej remisji. W ostatnich latach dokonano znaczącego postępu w leczeniu RZS, gdyż wprowadzono leczenie immunologiczne, precyzyjnie skierowane na ważny element patomechanizmu choroby, jakim jest czynnik martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor- α* , TNF- α) [1]. Wdrożenie leczenia przeciwciałami anty-TNF nie rozwiązało jednak problemu RZS. W dalszym ciągu konieczne są prace nad nowymi lekami,

które mogłyby istotnie poprawić stan chorych. Obecnie prowadzone są badania nad wieloma nowymi, dobrze zapowiadającymi się metodami leczenia, najczęściej dotyczącymi immunoterapii, terapii genowej, a także stosowania – w iniekcjach dostawowych – osocza bogatopłytkowego (*platelet-rich plasma*, PRP) [2] oraz mezenchymalnych komórek macierzystych [3]. Badana jest też możliwość użycia egzosomów [4] oraz łączenia różnych rodzajów terapii, w szczególności wymienionych wyżej.

W niniejszej pracy dokonano zwięzłego przeglądu wybranych, obiecujących najnowszych metod leczenia zmian stawowych w RZS. Zawarto tu informacje dotyczące doświadczeń przedklinicznych, jak również eksperymentów klinicznych w różnych fazach badań. Zwrócono szczególną uwagę na metody leczenia miejscowego powodujące – w przeciwieństwie do terapii ogólnoustrojowej – zdecydowanie mniejszą liczbę powikłań.

OPIS STANU WIEDZY

Osocze bogatopłytkowe

Bardzo obiecującą metodą leczenia zmian stawowych w przebiegu RZS jest stosowanie osocza bogatopłytkowego (PRP). PRP uzyskuje się w układzie autologicznym, poprzez odpowiednią preparatykę uprzednio pobranej krwi chorego, co niweluje ryzyko zakażenia dawca-biorca, związane z zastosowaniem preparatów krwiopochodnych. Technikę tę z powodzeniem stosuje się w chorobie zwyrodnieniowej stawów.

Adres do korespondencji: Piotr Kopiński, Zakład Genoterapii, Collegium Medicum, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, E-mail: kizgenoter@cm.umk.pl

Nadesłano: 2 marca 2016; zaakceptowano do druku: 16 maja 2016

W wielu badaniach doświadczalnych wykazano, że może ona stanowić wartościową alternatywę w razie braku poprawy w przebiegu standardowego leczenia [5]. Mechanizm działania nie został jednak do końca poznany, brak też badań opisujących jej skuteczność w leczeniu RZS u ludzi. Bierze się pod uwagę wpływ czynników wzrostu zawartych w PRP na regenerację chrząstki stawowej oraz immunomodulujący wpływ obecnych w PRP cytokin [6]. Zwraca się również uwagę na obecność rozpuszczalnych cząstek układu zgodności tkankowej klasy I (*soluble* HLA-I, sHLA-I) w PRP, których obecność mogłaby stymulować ekspresję błonowej cząsteczki Fas, zwiększoną produkcję rozpuszczalnego ligandu Fas (*soluble Fas Ligand*, sFasL) oraz TGF- β 1. W efekcie wzrasta częstość apoptozy autoreaktywnych limfocytów T uczestniczących w patogenezie RZS, gdyż przyłączenie ligandu Fas do receptora powierzchniowego Fas może powodować zaprogramowaną śmierć komórek Fas+. PRP upośledza też prawdopodobnie chemotaksję, cytotoksyczność i odpowiedź na antygen limfocytów T; sam tylko TGF- β 1 jest ważnym mediatorem limfocytów regulatorowych, działających miejscowo immunosupresyjnie [7].

W 2011 roku opisano korzystny wpływ PRP na przebieg zapalenia stawów indukowanego antygenem (*antigen-induced arthritis*, AIA) u świń, uważanego za dogodny model doświadczalny ludzkiego RZS. Dziesięć zwierząt immunizowano wołową albuminą, a następnie wstrzykiwano ją dostawowo w celu wywołania zapalenia stawu. Po dwóch tygodniach 5 świom podano dostawowo PRP, natomiast 5 zwierząt stanowiło grupę kontrolną. W badanych stawach oceniono ekspresję genów dla interleukiny 6 (IL-6) oraz czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (*Vascular-Endothelial Growth Factor*, VEGF), a także zawartość interleukiny 1 (IL-1), IL-6, VEGF i czynnika martwicy nowotworu α (*Tumor Necrosis Factor α* , TNF α) w różnych tkankach; oceniono także obraz histologiczny chrząstek stawowych. W stawach zwierząt z indukowanym AIA wzrosło stężenie wszystkich ww. białek w osoczu i chrząstce stawowej, dodatkowo w tej ostatniej stwierdzono wzrost ekspresji genów dla IL-6 i VEGF. Po podaniu PRP stwierdzono w objętych zapaleniem stawach spadek zawartości IL-1, IL-6, VEGF i IGF-I do poziomów porównywalnych z grupą kontrolną. Zarówno w chrząstce stawowej, jak i w błonie maziowej stwierdzono zmniejszenie zawartości wszystkich ww. białek, z wyjątkiem TNF- α . Eksperyment ten potwierdził skuteczność dostawowych iniekcji PRP w zwierzęcym modelu zapalenia stawów, zmniejszając zarówno ekspresję markerów zapalenia, jak i stopień nasilenia zapalnych zmian stawowych. Było to pierwsze badanie oceniające histologiczne i molekularne efekty zastosowania PRP w autoimmunologicznym zapaleniu stawów [2].

Niewątpliwą zaletą terapii PRP są dobre efekty u zwierząt, skuteczność i bezpieczeństwo w badaniach u ludzi z chorobą zwyrodnieniową stawów oraz potencjał, nie tylko w zakresie hamowania zapalenia, ale i regeneracji chrząstki stawowej. Dodatkowo zwraca uwagę, że PRP można pozyskać stosunkowo łatwo, a technika ta nie jest droga. Pojawia się nadzieja, że w niedalekiej przyszłości PRP może zająć istotne miejsce w leczeniu dolegliwości stawowych w przebiegu RZS, obok iniekcji dostawowych, glikokortykosteroidów lub kwasu hialuronowego. Niezbędne są dalsze badania kliniczne w celu oceny skuteczności, trwałości efektu i bezpieczeństwa stosowania PRP u chorych z RZS.

W badaniach nad eksperymentalnymi technikami leczenia RZS korzysta się często ze zwierzęcych modeli choroby

– stosuje się odpowiednik RZS u myszy, jakim jest zapalenie stawów indukowane kolagenem (*collagen induced arthritis*, CIA) lub bada mysz szczep SKG. Lepszą metodą wydaje się prowadzenie badań z wyindukowanym zapaleniem stawów u dużych ssaków, jak u wspomnianych wyżej świń z AIA, ze względu na ich większe podobieństwo do ludzi; technika ta jest jednak zdecydowanie trudniejsza i bardziej kosztowna. Natomiast CIA stanowi model RZS u myszy immunizowanych kolagenem typu II [8]. Z kolei myszy SKG wykazują mutację genu ZAP-70. Brak ekspresji genu zaburza apoptozę limfocytów T podczas fazy negatywnej selekcji w grasicy, co powoduje przeżycie autoreaktywnych klonów i czyni myszy SKG szczególnie wrażliwymi na indukcję zapalenia stawów. Modele zwierzęce autoimmunologicznego zapalenia stawów wykazują znaczne podobieństwo do ludzkiego RZS pod względem mechanizmów rozwoju stanu zapalnego, ekspresji cytokin, obecności typowych rodzajów komórek związanych z zapaleniem czy też powstawania zmian stawowych, są więc wiarygodnym narzędziem w badaniach przedklinicznych nowych sposobów leczenia RZS.

Immunoterapia

Ostatnie lata charakteryzuje intensywny rozwój immunoterapii RZS. Pojawia się wiele nowych leków, korzysta się też z technik zastosowanych wcześniej z powodzeniem w leczeniu innych chorób. Z uwagi na autoimmunologiczny charakter RZS oczywiste jest, że praktycznie większość podejść terapeutycznych, poza typowo objawowymi (mamy na myśli zwłaszcza stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych, NLPZ), wybitnie ingeruje w mechanizmy odpowiedzi immunologicznej. Celem leczenia jest przede wszystkim inhibicja TNF, IL-1 i IL-6, hamowanie stymulacji i proliferacji limfocytów T oraz indukcja apoptozy limfocytów B. Istnieje wiele potencjalnych punktów uchwytu nowych terapii immunologicznych. Wymienia się wśród nich m.in. IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, IL-33, transkrypcyjny czynnik jądrowy κ B (*Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells*, NF- κ B) oraz ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B (*Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*, ligand RANKL) [9]. Z uwagi na mnogość stosowanych technik eksperymentalnych i ograniczoną objętość pracy opisano poniżej tylko wybrane metody, uwzględniając mechanizmy ich działania, skuteczność i perspektywę dalszego rozwoju.

IL-18 odgrywa ważną rolę w polaryzacji odpowiedzi immunologicznej oraz w patogenezie chorób autoimmunologicznych, w tym RZS, co czyni ją celem potencjalnych terapii [10]. W badaniu przeprowadzonym na myszach z CIA sprawdzano wpływ hamowania IL-18 na aktywność choroby i stopień późniejszego uszkodzenia chrząstki stawowej. Użyto w tym celu króliczych przeciwciał przeciw mysiej IL-18 lub ludzkiego białka wiążącego IL-18. W obu przypadkach stwierdzono zahamowanie postępu choroby oraz mniejsze uszkodzenia chrząstek stawowych niż w grupie kontrolnej. U chorych, u których zastosowano przeciwciała królicze, stwierdzono ponadto znaczną redukcję stanu zapalnego [11]. Podobny efekt uzyskano przy zastosowaniu lipopleksów z małymi interferującymi cząsteczkami RNA (*small interfering RNA*, siRNA), skierowanych przeciwko prozapalnym cytokinom: IL-1, IL-6 i IL-18. Cząsteczki siRNA są dwuniciowymi konstrukcjami RNA o długości 20–25 nukleotydów, przy czym jedna z nici, tzw. antysensowa, jest komplementarna do transkryptu (mRNA) genu danej cytokiny. Komórki

wykorzystują cząsteczki siRNA do hamowania ekspresji danego genu na poziomie translacji, a sposób działania opiera się w uproszczeniu na uruchomieniu czułych i bardzo wydajnych zespołów enzymatycznych (tzw. kompleks RISC), które wydajnie degradują docelowe mRNA. Użycie siRNA swoistego dla transkryptów genów wymienionych cytokin ma za zadanie zmniejszać ich ekspresję, redukować stan zapalny i jego następstwa. Do badania użyto opisanego wyżej modelu mysiego CIA. Uzyskano redukcję stanu zapalnego, jak i poprawę morfologii chrząstki stawowej po zastosowaniu każdego z siRNA, jednak najskuteczniej działała kombinacja wszystkich trzech cząsteczek siRNA [12]. Warto zauważyć, że pozytywne wpływy leczenia w przypadku IL-18 występują bez względu na to, czy stosowano terapię genową, czy immunologiczną. Dotychczasowe wyniki uzasadniają celowość dalszych badań nad hamowaniem aktywności IL-18 w RZS, co może istotnie zmniejszać dolegliwości, a zwłaszcza zapobiec uszkodzeniu chrząstki stawowej.

Pojawiają się także nowe metody leczenia oparte na hamowaniu drogi przewodzenia sygnału związanej z TNF. W odróżnieniu od dotychczas stosowanych leków, będących przeciwciałami przeciw TNF- α , nowe leki oparte są na selektywnym hamowaniu receptora typu I dla TNF. Wynika to z faktu, iż obecność receptora TNF typu I na powierzchni komórek (np. chrząstki stawowej), odpowiedzialna jest – w pewnym uproszczeniu – za indukowaną przez TNF- α śmierć komórek docelowych i wystąpienie reakcji zapalnej, natomiast aktywacja receptora TNF typu II (powszechnego na powierzchni krwinek białych) odpowiada za modulację procesu zapalnego i zwiększa aktywność limfocytów regulatorowych T. Potwierdzono to w badaniu z 2014 roku, w którym część myszy z CIA poddano terapii swoistym przeciwciałem przeciw mysjemu receptorowi TNF typu I, natomiast pozostałe leczono nieselektywnymi przeciwciałami blokującymi mysie receptory TNF. Potwierdzono hipotezę, że zastosowanie selektywnej inhibicji receptora TNF typu I, przy równoczesnym braku hamowania receptora TNF typu II, prowadziło do wzrostu aktywności limfocytów regulatorowych T. Natomiast hamowanie progresji zapalenia stawów było porównywalne w obu grupach [13]. Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań porównujących efekty kliniczne selektywnego i nieselektywnego hamowania receptorów dla TNF.

Interleukina 17, produkowana przez limfocyty T, jest jedną z najważniejszych cytokin w powstaniu miejscowego odczynu zapalnego w RZS. Fakt ten czyni ją oczywistym celem immunoterapii: zahamowanie zapalenia powinno skutkować zmniejszeniem dolegliwości u chorych i ograniczyć zmiany stawowe. Badania nad tym sposobem leczenia są zaawansowane i dotyczą poszczególnych podtypów IL-17. Jednym z nich jest IL-17A, a opracowane przeciwko niej przeciwciało – ixekizumab – dowiodło swojej skuteczności zarówno u chorych, u których wcześniej nie stosowano leczenia biologicznego, jak i w grupie pacjentów, którzy nie odpowiedzieli wystarczająco na leczenie inhibitorami TNF. Po podskórnym podaniu ixekizumabu obserwowano zmniejszenie aktywności choroby [14]. Stwierdzono jednak częstsze infekcje, co niestety jest typowym powikłaniem ogólnoustrojowych terapii immunologicznych z uwagi na ich mechanizm działania. Pomimo to zakłada się, że leczenie przeciwciałami anti-IL-17 jest obiecującą metodą, szczególnie u chorych, którzy nie odpowiadają na leczenie przeciwciałami anti-TNF.

Nieco inny mechanizm występuje w immunoterapii z użyciem egzosomów. Są to wyspecjalizowane pęcherzyki biorące udział w wydzielaniu przez komórki ich niektórych metabolitów. Obecne są we wszystkich płynach ustrojowych. Pełnią zróżnicowane i złożone funkcje – od komunikacji międzykomórkowej, przez procesy krzepnięcia krwi, po regulację odpowiedzi immunologicznej [15]. W RZS szczególną uwagę zwraca się na immunosupresyjne działanie egzosomów produkowanych przez komórki dendrytyczne. Komórki te mogą indukować tolerancję na autoantygeny. W licznych badaniach stwierdzono, że redukcja stanu zapalnego w zwierzęcych modelach RZS jest większa w przypadku stosowania egzosomów zawierających odpowiednie białka, jak IL-4, IL-10, FasL czy APO2L/TRAIL, aniżeli gdy poda się same białka [4, 16, 17]. Na tej podstawie można wysnuć wniosek, że zastosowanie egzosomów w immunoterapii przyniesie lepsze efekty niż analogiczne strategie terapeutyczne, ale bez użycia egzosomów. Niestety brak badań u ludzi z zastosowaniem określonych białek zawartych w pęcherzykach egzosomalnych nie pozwala ocenić skuteczności ani bezpieczeństwa tej terapii.

Terapia genowa

Wprowadzenie obcej informacji genetycznej w celu zahamowania procesu zapalnego, zmniejszenia dolegliwości lub ułatwienia regeneracji chrząstki stawowej jest kolejną metodą dającą nadzieję na postęp w terapii RZS. Leczenie takie polegałoby na wprowadzeniu do komórek organizmu chorego informacji genetycznej za pomocą wektora (terapia genowa *in vivo*) lub pobranie komórek pacjenta, wprowadzenie do nich odpowiedniej informacji genetycznej i podanie ich ponownie choremu (*ex vivo*). Celem takiego postępowania jest hamowanie lub inicjowanie produkcji określonego białka przez komórki, na które skierowane byłoby leczenie. Terapia genowa może umożliwić nie tylko redukcję stanu zapalnego, ale i poprawę funkcji uszkodzonych stawów, zwłaszcza gdy zawiódł standardowe sposoby leczenia. Jednak pomimo obiecujących wyników badań na zwierzętach, zarówno pod kątem skuteczności jak i bezpieczeństwa, terapia genowa autoimmunologicznych zapaleń stawów jest na dość wczesnym etapie rozwoju. Prace opisujące badania kliniczne są nieliczne.

W patogenezie RZS, jak i innych chorób autoimmunologicznych, istotną rolę odgrywają cząsteczki mikroRNA (miRNA). Są to cząsteczki jednoniciowego RNA o długości ok. 21–23 nukleotydów, które stanowią inny, obok wymienionego wyżej siRNA, mechanizm regulacji ekspresji genów na poziomie translacji. W RZS szczególne znaczenie ma miRNA-223, którego zwiększona ekspresja występuje zarówno u chorych na RZS, jak i u myszy z CIA. Wpływając na osteoklastogenezę, powoduje niszczenie macierzy kostnej i w konsekwencji nasila dolegliwości bólowe i sztywność stawów. W pracy opublikowanej w sierpniu 2012 roku w „Arthritis & Rheumatism” wykazano, że hamowanie aktywności miRNA-223 przy pomocy wektorów wirusowych (pWPXL/miR-223T) u myszy z CIA prowadzi do złagodzenia objawów klinicznych; genoterapia związana z inhibicją miRNA-223 może być w przyszłości metodą leczenia RZS [18].

Kolejnym obiecującym celem terapii genowej jest czynnik wzrostu hepatocytów (*hepatocyte growth factor*, HGF). Białko to odgrywa ważną rolę w procesach angiogenezy i immunomodulacji, a wzrost jego stężenia w osoczu jest powiązany ze stopniem uszkodzenia stawów u ludzi z RZS [19]. Antagonistą HGF jest NK4. W wyindukowanym modelu zwierzęcym RZS (myszy SKG) po podaniu wektora wirusowego kodującego

cDNA dla NK4 (AdCMV.NK4) uzyskano redukcję zapalenia stawów, zmniejszenie produkcji IFN- γ , IL-4 oraz IL-17 przez limfocyty T CD4+, a także spadek stężenia RANKL w stawach [20].

Inna interesująca metoda opiera się na użyciu zmodyfikowanego fragmentu cząsteczki kolagenu typu II, który hamuje odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko prawidłowym cząsteczkom kolagenu typu II. Supresja tej odpowiedzi następuje przypuszczalnie za pośrednictwem limfocytów regulatorowych T różnicujących się z komórek T, obecnych w obrębie stawu objętego stanem zapalnym. Pomysłowy jest sposób dostarczenia zmodyfikowanego białka do stawu. W tym celu zastosowano terapię genową *in vivo*. Wektor adenowirusowy kodujący zmodyfikowany fragment kolagenu (adenoX-rCB11-A9) wstrzyknięto dostawowo myszom z CIA. Uzyskano znamiennej redukcję stanu zapalnego. W grupie kontrolnej, która otrzymała dostawowo wirus adenoX-lacZ, niezawierający badanego genu, nie uzyskano poprawy [21].

Zastosowanie terapii genowej u ludzi

Jak wspomniano, prace z zastosowaniem terapii genowej u ludzi są nieliczne. Jednym z pierwszych badań tego typu było podanie w iniekcjach dostawowych wektora wirusowego – wirusa towarzyszącego adenowirusom (*adenov-associated virus*, AAV), zawierającego sekwencję genu fuzyjnego TNFR:Fc (rAAV2-TNFR:Fc). Produktem tego transgenu jest połączenie receptora TNF- α z fragmentem Fc immunoglobuliny, którego działanie polega na hamowaniu stanu zapalnego stawów w mechanizmie podobnym do inhibitorów TNF. W I fazie badania iniekcje dostawowe wykonano u 14 chorych z RZS i jednego z zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa (ZZSK), nie stwierdzając poważnych efektów ubocznych; jedynie u jednego pacjenta (z RZS) stwierdzono niewielkiego stopnia świąd okolicy lezonego stawu [22]. W 2010 roku opublikowano wyniki I/II fazy badania klinicznego. U 12% spośród 191 leczonych chorych wystąpił obrzęk i zaczerwienienie lezonego stawu. Wystąpił jeden przypadek septycznego zapalenia stawu, zaś inny chory zmarł w trakcie badania, co jednak zostało uznane za niezwiązane przyczynowo z użyciem badanego leku. W 12 tygodni od pierwszej iniekcji, w wizualnej analogowej skali szerokiej oceny dolegliwości ze strony badanego stawu (skali VAS *TJ global score*), wykazano częstszą poprawę w grupie leczonej wektorem rAAV2-TNFR:Fc (30%) w porównaniu z chorymi otrzymującymi placebo (19%) [23].

W innym badaniu oceniano reakcję chorych na terapię genową *ex vivo*, polegającą na wprowadzeniu genu kodującego antagonistę receptora interleukiny 1 (IL-1Ra) do fibroblastów błony maziowej; posłużono się wektorem wirusowym MFG-IRAP. Transfekowane komórki podano do stawów śródreżnopalczkowych, a po czterech tygodniach wykonano synowektomię. W uzyskanym materiale stwierdzono zwiększoną ekspresję IL-1Ra oraz zmniejszoną ekspresję metaloproteinazy-3 i IL-1 β , a więc ważnych markerów zapalenia. Ponadto uzyskano znaczną redukcję dolegliwości ze strony leczonych stawów. Niestety badanie wykonano zaledwie u dwóch osób [24].

Terapia genowa daje szerokie możliwości wpływu na poszczególne etapy rozwoju reakcji zapalnej, gdyż jej celem może być ekspresja praktycznie każdego genu. Techniki te są jednak bardzo wyszukane i drogie. Pomimo to można przypuszczać, że w miarę rozwoju wiedzy na temat

patomechanizmów RZS, będą powstawały coraz bardziej celowane i skuteczne metody terapii genowej, co może w przyszłości uczynić chorobę całkowicie wyleczalną. Nadziejemy też szybki rozwój terapii genowej w leczeniu innych schorzeń. Należy jednak pamiętać, że zdarzenia genetyczne i molekularne w transfekowanych komórkach są trudne do przewidzenia i kontrolowania, zaś w przeszłości (zwłaszcza w latach 90. ubiegłego wieku) niektóre eksperymenty medyczne z zakresu terapii genowej prowadziły do poważnych zdarzeń niepożądanych, również takich, które związane były z wystąpieniem pojedynczych przypadków śmiertelnych [25]. Jest to jeden z powodów, dla których przeprowadzono dotąd niewiele badań u ludzi; zastosowanie genoterapii u chorych z RZS odsuwa się zatem w czasie. Konieczne jest przeprowadzenie badań klinicznych, dobrze zaplanowanych i dotyczących szerokich grup chorych, oceniających bezpieczeństwo i skuteczność najbardziej obiecujących metod.

Mezenchymalne komórki macierzyste

Stawy mają ograniczoną zdolność do samoregeneracji. Usunięcie czynnika powodującego uszkodzenie, czyli w przypadku RZS zahamowanie procesu zapalnego, jest konieczne do naprawy zmian, jednak potencjał regeneracyjny stawów okazuje się niewystarczający w przypadku zaawansowanych uszkodzeń. Wśród nowatorskich prób regeneracji pozapalnych zmian stawowych ważne miejsce zajmują komórki macierzyste. Nie jest to jednorodna forma terapii, proponowane są bowiem różne odmiany komórek macierzystych. I tak niektóre eksperymentalne metody leczenia wykorzystują odróżnionowane chondrocyty. Prowadzone są także badania nad mezenchymalnymi komórkami macierzystymi (*mesenchymal stem cells*, MSC) pozyskiwanymi z łatwo dostępnych tkanek tak, by proces ich pobrania nie wywołał zaburzeń funkcji organizmu. Przykładem mogą być tu komórki macierzyste szpiku i tkanki tłuszczowej. Ich użyteczność wiąże się nie tylko z potencjałem regeneracyjnym w chrząstce stawowej, ale także z właściwościami immunomodulującymi. Fakt ten potwierdzono w eksperymentalnym zapaleniu stawów u myszy. Do jednego ze stawów podawano komórki macierzyste wyizolowane ze szpiku. Parzysty staw tego samego zwierzęcia stanowił kontrolny punkt odniesienia. W leczonym stawie uzyskano zmniejszenie stanu zapalnego, obrzęku i uszkodzeń chrząstki [3]. Prowadzono też badania dotyczące bezpośrednio chorych z RZS. Ocenie poddano wpływ komórek macierzystych wyizolowanych z krwi obwodowej i płynu stawowego na limfocyty T, swoiście reaktywne w stosunku do kolagenu typu II. Stwierdzono, że komórki macierzyste i komórki różnicujące się w kierunku chondrocytów hamują odpowiedź limfocytów T skierowaną przeciw cząsteczkom kolagenu II [26]. Ich użycie w RZS powinno więc hamować odczyn zapalny, a być może także umożliwić zajście procesów regeneracyjnych i uchronić odbudowaną chrząstkę stawową chorych przed ponownym zniszczeniem.

W innym badaniu posłużono się komórkami macierzystymi pobranymi z tkanki tłuszczowej chorych, które podawano w iniekcjach dostawowych do zmienionych chorobowo stawów kolanowych. Uzyskano poprawę w zakresie dolegliwości miejscowych; w artroskopii stwierdzono redukcję uszkodzeń chrząstki stawowej, nie stwierdzono zaś związanych z leczeniem zdarzeń niepożądanych [27]. Co prawda badanie zostało przeprowadzone nie u chorych z RZS, lecz w chorobie zwyrodnieniowej stawów, jednak potwierdziło ono potencjał regeneracyjny i bezpieczeństwo stosowania autologicznego

przeszczepu z komórek macierzystych. W połączeniu z immunosupresyjnymi właściwościami tej terapii daje to szansę na bardzo dobre efekty w leczeniu RZS.

Opisano także obiecujące właściwości wspomnianych preparatów PRP, które za pośrednictwem zawartych w nich czynników wzrostu mają pozytywnie wpływać właśnie na proliferację komórek macierzystych oraz ich różnicowanie w kierunku chondrocytów [28]. Połączenie tych dwóch metod (PRP i komórek macierzystych) daje więc lepsze perspektywy niż użycie każdej z tych metod z osobna. W szczególności takie podejście terapeutyczne może nie tylko zahamować miejscowy proces zapalny, ale wręcz umożliwić regenerację uszkodzonych wcześniej stawów.

PODSUMOWANIE

W ostatnich latach obserwuje się szybki postęp w leczeniu RZS, w szczególności dzięki stosowanym obecnie metodom leczenia biologicznego. Jednak, jak wspomniano, w dalszym ciągu istotna grupa chorych nie wykazuje zadowolającej reakcji na długotrwale stosowane nowoczesne leczenie konwencjonalne.

Istnieje nadzieja, że opisane wyżej metody, często celnie wymierzone w swoiste molekularne patomechanizmy RZS, staną się w niedalekiej przyszłości rozwiązaniem tego problemu. Powszechne zastosowanie nowych, precyzyjnych metod oddziaływania na układ immunologiczny, takich jak geno- oraz immunoterapia, wydają się być kwestią niedalekiej przyszłości. Z uwagi na bardzo różne punkty uchwytu nowych strategii leczniczych oraz wnioski płynące z badań na modelach zwierzęcych można zakładać, że techniki te przyniosą pełną ulgę właśnie tym chorym, u których nie osiągnęto dotąd terapeutycznego sukcesu. Warto też zauważyć, że techniki eksperymentalne stosuje się w dużej mierze miejscowo. Umożliwia to precyzyjne leczenie zajętych stawów z równoczesnym uniknięciem ewentualnych efektów ubocznych, czy też ograniczeniem wystąpienia powikłań, np. spowodowanych leczeniem hamującym systemowo układ odpornościowy. Z drugiej strony warto zauważyć, że w przebiegu RZS, zaliczanego przecież do chorób układowych, często zajęte są, obok narządu ruchu, inne układy. Jak dotąd brak jednak precyzyjnych danych o ubocznym (potencjalnie korzystnym) wpływie technik eksperymentalnych na zmiany chorobowe w takich narządach jak płuca lub nerki.

W leczeniu zmian stawowych w przebiegu RZS szczególnie nadzieje budzi zastosowanie PRP. Co prawda mechanizm działania wciąż wymaga dokładniejszych badań, jednak bardzo dobre efekty i bezpieczeństwo w leczeniu innych chorób stawów, możliwość uzyskania znacznej poprawy ich funkcji, a także korzystny wpływ PRP na regenerację uszkodzeń stawowych daje szansę na istotną poprawę efektywności dotychczasowego leczenia. Ważna wydaje się też możliwość stosunkowo łatwego pozyskania leku. Istnieje więc szansa, że będzie możliwe znacznie wcześniejsze wprowadzenie iniekcji dostawowych PRP do powszechnego leczenia RZS niż w przypadku eksperymentalnych metod terapii genowej lub biologicznej.

W przypadku bardzo zaawansowanych uszkodzeń, dotąd niemożliwych do korekty bez obciążającej interwencji chirurgicznej, najbardziej obiecującą terapią wydaje się zastosowanie komórek macierzystych. Udowodniono skuteczność tej metody w leczeniu wielu chorób. Chociaż aktualnie następuje

jej błyskawiczny rozwój, to jednak barierą ograniczającą jej powszechne użycie są dość skomplikowane technicznie i kosztowne metody pozyskiwania komórek macierzystych. Konieczny jest dalszy rozwój małoinwazyjnych metod ich pobierania, a być może także zwiększenie skuteczności ich działania poprzez dodatkową stymulację, np. za pomocą PRP. Może to pozwolić na uzyskanie zadowalającego efektu już po użyciu relatywnie małej liczby komórek.

PIŚMIENNICTWO

- Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73(3): 492–509.
- Lippross S, Moeller B, Haas H, Tohidnezhad M, Steubesand N, Wruck CJ, et al. Intraarticular injection of platelet-rich plasma reduces inflammation in a pig model of rheumatoid arthritis of the knee joint. *Arthritis Rheum*. 2011; 63: 3344–3353.
- Kehoe O, Cartwright A, Askari A, El Haj AJ, Middleton J. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells leads to reduced inflammation and cartilage damage in murine antigen-induced arthritis. *J Transl Med*. 2014; 12: 157, <http://www.translational-medicine.com/content/12/1/157> (dostęp: 22.12.2015).
- Yang C, Robbins PD. Immunosuppressive Exosomes: A New Approach for Treating Arthritis. *J Rheumatol*. 2012; 573528: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3324137/> (dostęp: 22.12.2015).
- Raeissadat SA, Rayegani SM, Babaee M, Ghorbani E. The Effect of Platelet-Rich Plasma on Pain, Function, and Quality of Life of Patients with Knee Osteoarthritis. *Pain Res Treat*. 2013; 165967: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3872432/> (dostęp: 22.12.2015).
- El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, et al. Platelet-Rich Plasma: Growth Factors and Pro- and Anti-Inflammatory Properties. *J Periodontol*. 2007; 78(4): 661–669.
- Xie X, Zhang C, Tuan RS. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Res Ther*. 2014; 16(1) 204: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3978832/> (dostęp: 22.12.2015).
- Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc*. 2007; 2: 1269–1275.
- Magyari L, Varszegi D, Kovessi E, Sarlos P, Farago B, Javorhazy A, et al. Interleukins and interleukin receptors in rheumatoid arthritis: Research, diagnostics and clinical implications. *World J Orthop*. 2014; 5(4): 516–536.
- Boraschi D, Dinarello CA. IL-18 in autoimmunity: review. *Eur Cytokine Netw*. 2006; 17: 224–252.
- Plater-Zyberk C, Joosten LAB, Helsen MMA, Sattonnet-Roche P, Siegfried C, Alouani S, et al. Therapeutic effect of neutralizing endogenous IL-18 activity in the collagen-induced model of arthritis. *J Clin Invest*. 2001; 108(12): 1825–1832.
- Khouri M, Escriou V, Courties G, Galy A, Yao R, Largeau C, et al. Efficient suppression of murine arthritis by combined anticytokine small interfering RNA lipoplexes. *Arthritis Rheum*. 2008; 58: 2356–2367.
- McCann FE, Perocheau DP, Ruspi G, Blazek K, Davies ML, Feldmann M, et al. Selective Tumor Necrosis Factor Receptor I Blockade Is Anti-inflammatory and Reveals Immunoregulatory Role of Tumor Necrosis Factor Receptor II in Collagen-Induced Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014; 66: 2728–2738.
- Genovese MC, Greenwald M, Cho CS, Berman A, Jin L, Cameron GS, et al. A Phase II Randomized Study of Subcutaneous Ixekizumab, an Anti-Interleukin-17 Monoclonal Antibody, in Rheumatoid Arthritis Patients Who Were Naive to Biologic Agents or Had an Inadequate Response to Tumor Necrosis Factor Inhibitors. *Arthritis Rheumatol*. 2014; 66: 1693–1704.
- van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*. 2012; 64: 676–705.
- Kim SH, Lechman ER, Bianco N, Menon R, Keravala A, Nash J, et al. Exosomes derived from IL-10-treated dendritic cells can suppress inflammation and collagen-induced arthritis. *J Immunol*. 2005; 174(10): 6440–8.
- Martinez-Lostao L, García-Alvarez F, Basáñez G, Alegre-Aguarón E, Desportes P, Larrad L, et al. Liposome-bound APO2L/TRAIL is an

- effective treatment in a rabbit model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(8): 2272–82.
18. Li YT, Chen SY, Wang CR, Liu MF, Lin CC, Jou IM, et al. Brief Report: Amelioration of collagen-induced arthritis in mice by lentivirus-mediated silencing of microRNA-223. *Arthritis Rheum.* 2012; 64: 3240–3245.
19. Grandaunet B, Syversen SW, Hoff M, Sundan A, Haugeberg G, van Der Heijde D, et al. Association between high plasma levels of hepatocyte growth factor and progression of radiographic damage in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011; 63: 662–669.
20. Tsunemi S, Iwasaki T, Kitano S, Matsumoto K, Takagi-Kimura M, Kubo S, et al. Molecular targeting of hepatocyte growth factor by an antagonist, NK4, in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2013; 15(4): R75, <http://arthritis-research.com/content/15/4/R75> (dostęp: 22.12.2015).
21. Tang B, Cullins DL, Zhou J, Zawaski JA, Park H, Brand DD, et al. (2010). Modulation of collagen-induced arthritis by adenovirus-mediated intra-articular expression of modified collagen type II. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12(4): R136, <http://arthritis-research.com/content/12/4/R136> (dostęp: 22.12.2015).
22. Mease PJ, Hobbs K, Chalmers A, El-Gabalawy H, Bookman A, Keystone E, et al. Local delivery of a recombinant adenoassociated vector containing a tumour necrosis factor alpha antagonist gene in inflammatory arthritis: a phase I dose-escalation safety and tolerability study. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68: 1247–54.
23. Mease PJ, Wei N, Fudman EJ, Kivitz AJ, Schechtman J, Trapp RG, et al. Safety, tolerability, and clinical outcomes after intraarticular injection of a recombinant adeno-associated vector containing a tumor necrosis factor antagonist gene: results of a phase 1/2. *Study J Rheumatol.* 2010; 37(4): 692–703.
24. Wehling P, Reinecke J, Baltzer AW, Granrath M, Schulitz KP, Schultz C, et al. Clinical responses to gene therapy in joints of two subjects with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther.* 2009; 20(2): 97–101.
25. Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 477–488.
26. Zheng ZH, Li XY, Ding J, Jia JF, Zhu P. Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2008; 47(1): 22–30.
27. Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, et al. Intra-Articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Proof-of-Concept Clinical Trial. *Stem Cells.* 2014; 32: 1254–1266.
28. Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, Kraus M, Tse V, et al. Buffered Platelet-Rich Plasma Enhances Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Chondrogenic Differentiation. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009; 15(3): 431–435.

Experimental therapies of articular lesions in patients with rheumatoid arthritis

Abstract

Introduction and purpose. Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most common autoimmune diseases affecting connective tissue. It is characterized by inflammation of the joints leading to progressive damage and loss of joint function, and subsequently to physical disability of the patient. The aim of the article is to provide an overview of the experimental RA therapies of articular lesions that are currently in early and advanced stages of clinical development.

Brief description. RA management is presently based on symptomatic treatment, taking biological and synthetic disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), physiotherapy and surgical correction of articular complications. There are many drugs currently under investigation, such as immune and gene therapy, platelet rich plasma intraarticular injections, application of mesenchymal stem cells, as well as a combination of techniques listed above.

Summary. Over the last few years, the rapid progress in RA treatment has been made by introduction of biological treatment. However, no satisfactory clinical response is observed in a significant group of patients, despite the long-term conventional treatment. Hopefully, the techniques described briefly in this review targeting molecular pathomechanisms, are believed to be useful in finding solutions in the treatment of RA articular lesions.

Key words

investigational therapies, immune therapy, platelet-rich plasma, rheumatoid arthritis, gene therapy