

A cutan lymphocyta-asszociált antigén (CLA) prediktív szerepe psoriasis TNF- α gátló kezelése során

Doktori tézisek

Dr. Jókai Hajnalka

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Holló Péter, egyetemi docens, PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Szegedi Andrea, egyetemi tanár, MTA doktora

Dr. Miheller Pál, egyetemi adjunktus, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Rácz Károly, egyetemi tanár, MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szalai Zsuzsanna, osztályvezető főorvos, PhD

Dr. Jeney András, egyetemi tanár, MTA doktora

Budapest

2013

Bevezetés

Az elmúlt évtizedek folyamatosan gyarapodó tudományos ismereteinek tükrében az immunmediálta gyulladós kórképek (IMID, immune-mediated inflammatory diseases) csoportjába tartozó psoriasis számos vonatkozásban új értelmezést nyert. A szisztémás gyulladós jellegből adódóan a psoriasis mára bizonyítottan nem csupán a bőr érintettségével járó megbetegedés, hanem egy összetett, számos társbetegséggel szövődő kórkép, mely kedvezőtlenül hat a betegek mind testi, mind szellemi egészségére, csökkenti a várható élettartamot és a megélt élet minőségét egyaránt. A patológiás immunfolyamat egyes elemeinek szelektív befolyásolását célzó biológiai terápiák forradalmi áttörést hoztak a kezelésben. Az immunrendszer specifikus gátlásával a korábbi szisztémás kezelésekhez képest szignifikánsan javították a terápiás kockázat-haszon arányt. Az eredményesség vitathatatlan ténye mellett azonban szem előtt kell tartanunk néhány megfontolást a biológiai válaszmódosítók, s azon belül a TNF- α gátló szerek alkalmazhatóságával kapcsolatban. A kezelt páciensek 20-30%-ánál a megkezdett terápia felfüggesztése, terápiaváltás indokolt 2 éven belül, elsősorban a terápiás hatásvesztés, lényegesen kisebb hányadnál pedig a nem kívánt mellékhatások fellépése miatt. Mindemellett a kezelés költsége nem csekély terheket ró az egészségbiztosításra. A betegek biztonságos kezelése, a szükségtelen kockázatvállalás és a finanszírozási szempontok figyelembevétele alapján egyértelműen adódik

az igény olyan prediktív biomarkerek definiálására, melyek a kezelés hosszú távú eredményességét hitelesen előrevetíteni képesek.

Az elmúlt évek kutatási munkája során saját beteganyagon végzett vizsgálattal a cutan lymphocya-asszociált antigén (CLA) psoriasis TNF- α gátló terápiájában betöltött prediktív szerepéről gyűjtöttünk adatokat. Ehhez társulóan részletesen tanulmányoztuk ezen bőrspecifikus homing molekula szerepét fiziológiás körülmények között, valamint az egyes dermatológiai kórállapotokban, különös hangsúlyt fektetve a psoriasis immun-pathomechanizmusában igazolt jelentőségére. Az alábbiakban ismertetésre kerülnek a vizsgálat kivitelezéséhez alkalmazott módszerek, a kapott eredmények, valamint a tanulmány alapján levonható következtetéseink.

Célkitűzés

Az alkalmas biomarker hiányának megfelelően elsődleges célkitűzésünk volt, hogy megvizsgáljuk a hosszú távú klinikai válaszkészség előrevetítésének lehetőségeit. Az immun-pathomechanizmus mélyreható tanulmányozásával merült fel a CLA-nak mint a pathogén T-lymphocyták bőrspecifikus homing markerének és így a pathogenezis egyik kulcsmolekulájának potenciális prediktív szerepe, melyről mindezidáig

nem találtunk sem hazai, sem nemzetközi vizsgálati adatot. Munkánk során az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

1. Különbözik-e az egészséges, non-psoriasisos kontrollok és a psoriasisban szenvedő betegek kiindulási, TNF- α gátló kezelés előtti perifériás lymphocita CLA expressziójának mértéke?
2. Van-e szignifikáns különbség a kezelésre tartósan jól reagáló és a későbbiekben visszaeső betegek kiindulási perifériás lymphocita CLA expressziója között?
3. Megfigyelhető-e szignifikáns eltérés a két betegcsoport CLA expressziójának alakulása között az iniciációs kezelési fázisban (a terápia első 6 hetében)?
4. Korrelál-e a klinikai választ tükröző PASI változás az iniciációs periódus CLA expressziójának alakulásával?
5. Mindezek alapján lehet-e a terápia iniciációs periódusában nyomon követett perifériás lymphocita CLA expresszió egy alkalmas prediktív biomarker súlyos psoriasisos betegek TNF- α gátló kezelésének várható eredményességére vonatkozóan?

Módszerek

Beteganyag

A vizsgálatban 38 krónikus, nagy plakkos psoriasisban szenvedő felnőtt beteg vett részt. A beválasztás egyetlen alapvető kritériuma volt a TNF- α gátló kezelés iniciációs feltételeinek történő megfelelés. Nemre, korra, a betegség fennállásának időtartamára, komorbiditások jelenlétére vagy hiányára, illetve a megelőző terápiás metódusokra vonatkozóan semmiféle megkötést nem fogalmaztunk meg. Nem szerinti megoszlást tekintve a betegpopulációt 29 férfi és 9 nő alkotta a véletlenszerű besorolás nyomán, átlag életkoruk 43,7 (20-68) év volt. Kontroll csoportunk létrehozása pedig további 5 egészséges, non-psoriasisos felnőtt egyén részvételével a kiindulási CLA expressziós értékek összehasonlításának célját szolgálta. A regionális etikai bizottság a vizsgálat kivitelezését engedélyezte (No. 78/2011). A munka során minden téren a Helsinki deklaráció etikai alapelveinek megfelelően jártunk el. A pácienseket kellő alaposággal felvilágosítottuk a vizsgálat céljairól és a protokoll egymást követő lépéseiről. A tájékoztatást követően hivatalos beteg beleegyező nyilatkozatot írtak alá. A szakmai irányelveket követve elvégeztük az indikált kivizsgálásokat a TNF- α inhibitor terápia iniciálását megelőzően. Egyetlen esetben sem találtunk kontraindikációra utaló leletet, így az S3 európai konszenzus irányelvei szerint megindítottuk a biológiai válaszmódosító kezeléseket. 14 páciensnél infliximab, 10-nél adalimumab

és a fennmaradó 14-nél pedig etanercept került bevezetésre monoterápiás formában. A gyógyszerek dozírozása az alkalmazási előiratuknak megfelelően történt.

A klinikai válaszkészség monitorozása

A betegek klinikai státuszának nyomon követésére és rögzítésére a kalkulált PASI index mérőszámokat (Psoriasis Area and Severity Index) használtuk. A PASI indexet dokumentáltuk a terápia elkezdése előtt, majd a kezelés 12. és 24. hetének végén, a kezdeti és a hosszú távú válaszkészségre utalva. Az állapotfelmérést és ez alapján a PASI meghatározást valamennyi vizit alkalmával ugyanaz a kezelőorvos végezte. A terápia eredményességének megítélése a betegek állapotának individuális értékelésével történt, figyelembe véve a kiindulási képet, az ahhoz képest bekövetkező változást a 24 hetes terápiás periódus alatt és a mindezt számszerűen reprezentáló PASI értékek alakulását.

Az áramlási citometriai mérések, a CLA expresszió meghatározása

A CLA expressziós értékek detektálásához perifériás vérmintákat gyűjtöttünk a vizsgálati csoportoktól: a kontrolloktól egyszer, a betegektől pedig a kezelés indítását megelőzően, majd a terápia 2. és 6. hetének befejeztével. Az áramlási citometriai méréseket a friss perifériás

vérmintákból nyert sejtszuspenziókon végeztük el. A vörösvértestek eliminálásához FACS Lysing Solution-t (PharMingen International, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) használtunk. A sejtek fenotípus vizsgálatához hármas jelölést alkalmaztunk, az antitesteket fluoreszcein isothiocianáttal (FITC), phycoerythrinrel (RPE), illetve phycoerythrin-cyanin 5-tel (RPE-CY5) prekonjugált formában szereztük be. A CLA+ lymphocyták, illetve a CD4+ és CD8+ T-sejt populációk azonosítása a következő antitestek segítségével történt: anti-humán CLA (HECA 452, FITC; PharMingen International, BD Biosciences, San Jose, CA, USA); anti-humán CD4 (RPE-CY5; Dako, Glostrup, Dánia) és anti-humán CD8 (RPE; Dako, Glostrup, Dánia). Emellett az alkalmazott specifikus izotípus kontrollok az alábbi jelölt antitestek voltak: patkány IgM κ -FITC (PharMingen International, BD Biosciences, San Jose, CA, USA); egér IgG1 RPE (Dako, Glostrup, Dánia); egér IgG1 RPE-Cy5 (Dako, Glostrup, Dánia). Az antitesteket minden esetben pretitráltuk. A keringő lymphocyták CLA expresszióját asztali (bench-top) flow citométer rendszerrel (FACSCalibur, PharMingen International, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) mértük, s az eredményeket CellQuest Pro programmal (PharMingen International, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) értékeltük ki. A mérési küszöböt a mintáknál 100 ezer eseményre állítottuk be. Az egyes sejtpopulációk identifikálása típusos FSC-SSC dot plot grafikon segítségével történt. A citométeren áthaladó sejtre eső lézerfény előrefelé történő szóródása (FSC, forward scatter) a sejt méretéről, míg az oldalirányú szóródás (SSC, side scatter) a sejtméret mellett elsősorban a

granuláltságról, a morfológiai sajátosságokról informált. A fluorokróm festékek használata a lézerefény által gerjesztett fluoreszcens fény detektálásához, s ezáltal a vizsgálni kívánt paraméterek analizálásához volt szükséges. A CLA expresszió meghatározásához a lymphocytasejtpopulációra kapuztunk, majd a CLA⁺ lymphocyták számát hasonlítottuk a totál fehérvérsejt számhoz (CLA tot%) és a teljes lymphocytamennyiséghez (CLA lymph%), valamint a CLA⁺CD8⁺ és a CLA⁺CD4⁺ T-sejt alcsoportokat szintén a totál fehérvérsejt számhoz (CLA CD8⁺ Tlymph%, CLA CD4⁺ Tlymph%). A valós expressziós értékek nyeréséhez a leolvasott értékekből kivontuk a kontroll mérési adatokat.

A CLA prediktív szerepének függetlenségét vizsgálándó, összehasonlítottunk a hosszantartó kezelésre eltérően reagáló két betegcsoportban néhány klinikai tényezőt, mely ismerten hatással lehet a TNF- α inhibitorok terápiás sikerére, így a kiindulási betegsúlyosságot (kezdeti PASI), a betegség fennállásának időtartamát, ízületi érintettség meglétét, valamint TNF- α gátlók esetleges korábbi alkalmazásának a gyakoriságát.

Statisztikai analízis

A PASI és a CLA értékeket Student-féle kétmintás T-próbával és Wilcoxon-próbával (Wilcoxon matched pairs signed rank test), a Statistica 7.0 software-t (StatSoft, Inc., 1984-2004, Tulsa, USA) alkalmazva

analizáltuk. A statisztikai szignifikancia határának az 5%-nál alacsonyabb p valószínűségi értéket ($p < 0,05$) tekintettük.

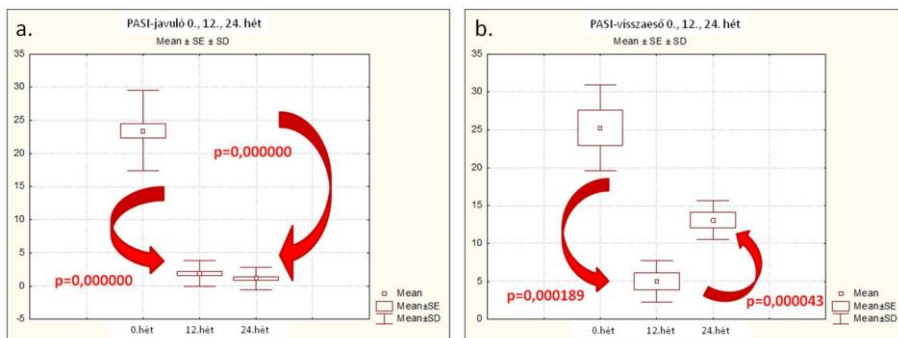
A hosszú távú terápiás válaszkészséget reprezentáló 12 és 24 hetes PASI érték különbségeket és a kapott CLA eredmények változásait (CLA 0. hét vs. 2. hét; CLA 0. hét vs. 6. hét; CLA 2. hét vs. 6. hét) Pearson-féle korreláció analízissel hasonlítottuk össze. A szignifikancia határa itt is $p < 0,05$ volt.

Eredmények

A klinikai válaszkészség alakulása

Mind a 38, vizsgálatba bevont betegnél a terápia megkezdése előtt a súlyos plakkos psoriasis klinikai képét láttuk, az ennek megfelelő magas PASI pontértékekkel. A teljes betegpopulációra vonatkozóan a kiindulási PASI átlagértéke 24,34 volt. A kezelés első 12 hetében, kivétel nélkül minden páciens esetében a bőrtünetek látványos javulását tapasztaltuk, s így a PASI értékek is szignifikánsan csökkentek. A jó hatásfokú primer terápiás válasz jelölőjeként valamennyien elérték a PASI75 klinikai választ, átlag 90%-os PASI javulást jegyeztünk fel. A hosszú távú válaszkészséget illetően a 24. hét végén 32 beteg a psoriasisos léziók tartós regresszióját prezentálta, a PASI75 fenntartásával és $1,14 \text{ SD} \pm 1,66$ PASI átlagértékkel. Őket soroltuk

a „tartósan tünetmentes”, ún. „responder” csoportba. Közülük a 12. hét végéig PASI90-et elért betegek (20/32) ezt az eredményt fenntartották a 24. hét végéig, amikor is összesen 30/32 „responder” páciensnél találtunk PASI90 javulást. Épp ellenkezőleg, a fennmaradó 6 betegnél a 12. és 24. vizsgálati hét között a bőrtünetek markáns fellángolását tapasztaltuk, a kezdeti nagy plakkok növekvő számának ismételt megjelenésével, a PASI75 elvesztésével és 13,10 SD \pm 2,56 átlag PASI-val. Ezek a „visszaeső”, ún. „relapsing” betegek a study 24. hetének végén az iniciális PASI átlagosan <60%-os „javulását” mutatták (<PASI60). (1. ábra)



1. ábra A PASI értékek (a klinikai válasz készség) alakulása a a.)javuló és a b.)visszaeső betegcsoportban. (Student-féle kétmintás T-próba p értékeivel)

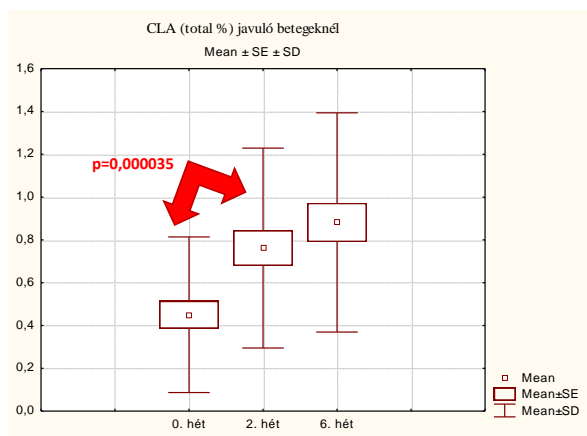
Az áramlási citometriával detektált CLA expresszió alakulása

Az iniciációs kezelési periódus első 6 hetében az áramlási citometriával mért CLA expresszió növekvő tendenciát mutatott a „responder”

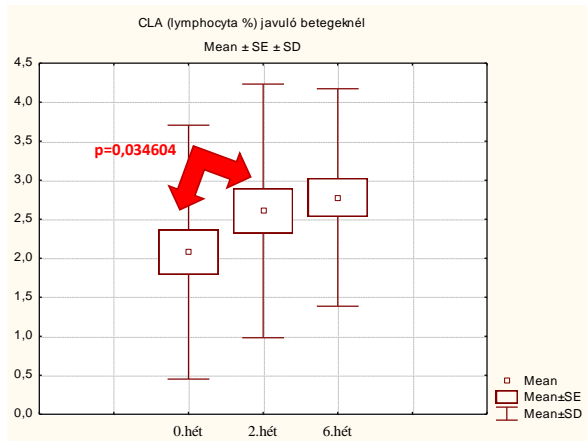
betegcsoportban. Valamennyi számított expressziós érték (CLA tot%, CLA lymph%, CLA CD8+ Tlymph%, CLA CD4+ Tlymph%) szignifikánsan (sorrendben $p=0,000035$; $p=0,034604$; $p=0,035310$; $p=0,000037$) emelkedett az első 2 hét alatt. A 2. és a 6. hét között további emelkedést észleltünk, mely szignifikáns mértéket már csak a CLA CD8+ Tlymph% esetében ért el ($p=0,022634$). (2-5. ábra) A „relapsing” betegek körében a CLA 2. hét végéig tartó, átmeneti, mérsékelt növekedését szignifikáns csökkenés követte a 2. és a 6. hét között (CLA tot%, $p=0,034552$; CLA lymph%, $p=0,012539$). (6-7. ábra) A kezelés előtti CLA expresszió vonatkozásában jóval alacsonyabb értékeket találtunk a „responderek”-nél a „relapsing” betegek adataihoz hasonlítva, jóllehet a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. A psoriasisos betegek (külön a „responder”, külön a „relapsing” és egyben a teljes csoport) iniciális CLA expressziója és a kontroll populáció egyszer mért expressziója között (a CLA CD4+ Tlymph% kivételével) szignifikáns eltérés nem mutatkozott. A CLA CD4+ Tlymph% hányados szignifikánsan alacsonyabb volt a psoriasisos betegeknél („responder” csoportot és valamennyi pácienszt együttesen figyelembe véve), mint az egészséges, felnőtt kontroll személyeknél ($p=0,020716$ és $p=0,035284$).

A terápiás kimenetelt esetlegesen befolyásoló klinikai faktorok vizsgálatával az alábbi megfigyeléseket tettük: A kórállapot kezdeti súlyosságát illetően szignifikáns különbség nem volt a két betegcsoport között, a „responderek” átlagos PASI-ja $23,42 \text{ SD} \pm 6,06$, a „relapsing” pácienseké pedig $25,25 \text{ SD} \pm 5,69$ volt. A betegség átlagos időtartama a

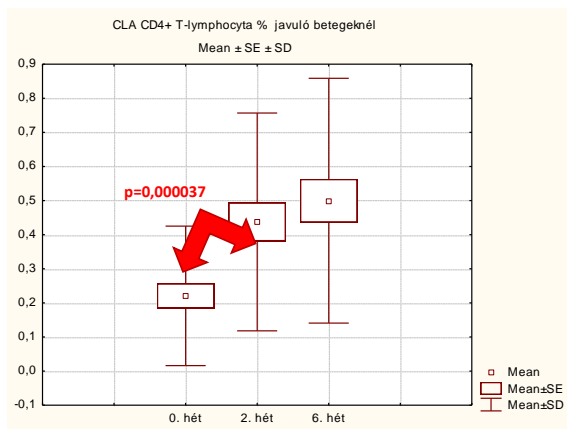
study indításakor szintén hasonlóan alakult, a „responderok” esetében $17,23 \text{ SD} \pm 7,68$ éve, míg a „relapsing” csoportban $23,50 \text{ SD} \pm 18,15$ éve diagnosztizálták a kórképet. Arthritis psoriatica fennállása a 32 „responder” beteg közül 18 betegnél, míg a 6 „relapsing” páciensnél 5 esetben volt igazolható. 3/32 „responder”, valamint 1/6 „relapsing” beteg nem volt biológiai terápia naiv, náluk egy megelőző TNF- α gátló kezelés kapcsán észlelt terápiás hatásvesztés miatt vált szükségessé a biologikum váltása.



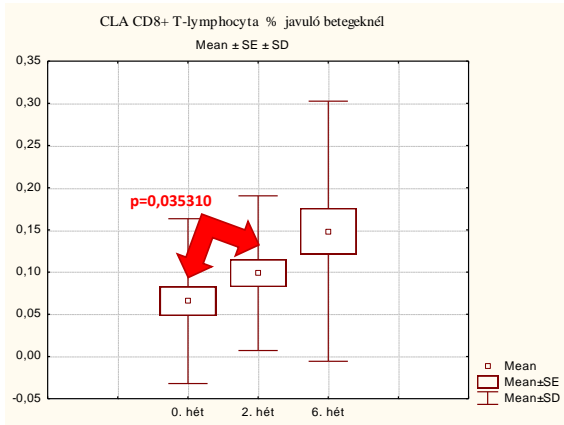
2. ábra A CLA expresszió (CLA tot%) alakulása a javuló betegcsoportban az iniciációs kezelési periódus első 6 hetében (0., 2., 6. hét). (Student-féle kétmintás T-próba)



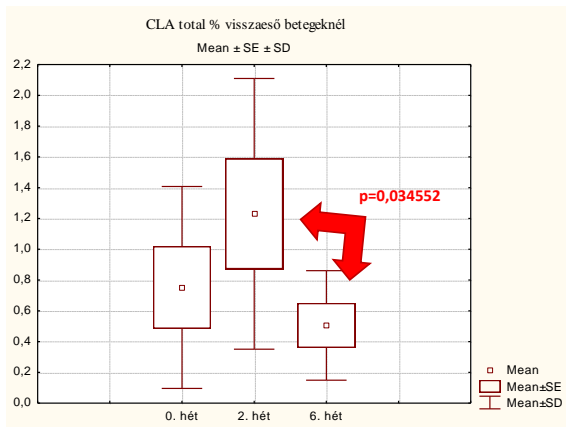
3. ábra A CLA expresszió (CLA lymph%) alakulása a javuló betegcsoportban az iniciációs kezelési periódus első 6 hetében (0., 2., 6. hét). (Student-féle kétmintás T-próba)



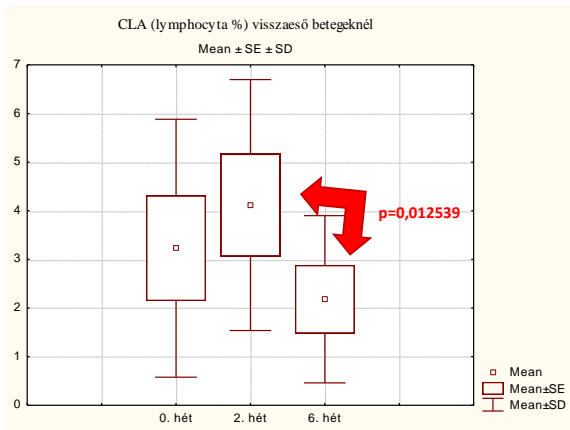
4. ábra A CLA expresszió (CLA CD4+ Tlymph%) alakulása a javuló betegcsoportban az iniciációs kezelési periódus első 6 hetében (0., 2., 6. hét). (Student-féle kétmintás T-próba)



5. ábra A CLA expresszió (CLA CD8+ Tlymph%) alakulása a javuló betegcsoportban az iniciációs kezelési periódus első 6 hetében (0., 2., 6. hét). (Student-féle kétmintás T-próba)



6. ábra A CLA expresszió (CLA tot%) alakulása a visszaeső betegcsoportban az iniciációs kezelési periódus első 6 hetében (0., 2., 6. hét). (Student-féle kétmintás T-próba)



7. ábra A CLA expresszió (CLA lymph%) alakulása a visszaeső betegcsoportban az iniciációs kezelési periódus első 6 hetében (0., 2., 6. hét). (Student-féle kétmintás T-próba)

A Pearson-féle korreláció analízis eredménye

Korreláció analízissel szignifikáns negatív, mérsékelten erős korrelációt (Pearson-féle korrelációs koefficiens r : 0,30-0,49; $p < 0,05$) tudunk igazolni a tartós klinikai válaszkészség megítélésében fontos PASI változás (PASI 12. hét vs. 24. hét) és a betegcsoportokban szignifikáns eltéréseket mutató CLA változások (CLA 0. hét vs. 6. hét, CLA 2. hét vs. 6. hét) között. Ez az eredmény pedig alátámasztotta a kapott expressziós adatok alapján levont következtetésünket, miszerint a terápia tartós eredményességét reprezentáló PASI értékek és a CLA expresszió alakulása egymástól függő változók.

Következtetések

A célkitűzésekben megfogalmazott kérdéseinkre az elvégzett vizsgálatok alapján az alábbi válaszokat fogalmaztuk meg:

1. Az egészséges kontrollok CLA értékei és a psoriasisos betegek kezelés előtti CLA expressziója között szignifikáns eltérés nem mutatkozott. (Kivéve a CLA+CD4+ T-sejtek analízisét, ahol szignifikánsan magasabb volt a CLA expresszió a kontroll csoportban, mind a javuló betegek, mind a teljes betegcsoport értékeihez viszonyítva.)
2. A kezelésre tartósan jól reagáló („responder”) és a későbbiekben kifejezett exacerbatiót mutató („relapsing”) betegek kiindulási perifériás CLA expressziója között szignifikáns különbséget nem találtunk. Jóllehet, a „relapsing” csoport értékei lényegesen, de nem szignifikánsan magasabbak voltak a „responder” betegek értékeivel összehasonlítva, melynek potenciális magyarázatául egy háttérben lévő, provokáló góc fennállásának lehetőségét jelöltük meg.
3. Szignifikáns különbséget észleltünk a két betegcsoport CLA expressziójának alakulása között a terápia iniciációs fázisában. A „respondek” CLA expressziója szignifikánsan emelkedett az első 2 hét során, majd további, (a CLA CD8+ Tlymph% kivételével) nem szignifikáns mértékű emelkedést mutatott a 2. és a 6. hét

között. A „relapsing” páciensek értékei az első 2 hétben tapasztalt, enyhe fokú növekedést követően szignifikánsan csökkentek (CLA tot%, CLA lymph%) a 2. héttől a 6. hétig.

4. Pearson-féle korreláció analízis segítségével szignifikánsan negatív, mérsékelten erős korrelációt igazoltunk a hosszú távú terápiás választ tükröző PASI változás (PASI 12. hét vs. 24. hét) és a kezelés iniciációs periódusában mért CLA expressziós változások (CLA 0. hét vs. 6. hét és CLA 2. hét vs. 6. hét) között. Eszerint a PASI és a CLA ellentétes irányú alakulása egymástól függő változók.
5. Vizsgálatunk eredményeit összesítve arra az alapvető következtetésre juthatunk, hogy a CLA a T-sejtek bőrspecifikus homing molekulájaként a súlyos psoriasisban szenvedő betegek TNF- α gátló kezelésének könnyen és relatíve olcsón vizsgálható, hiteles prediktív markere lehet.

A vizsgálatba bevont páciensek klinikai háttér analízise, vagyis a kezelés kimenetelét szintén módosítani képes faktorok (pl. a betegség számadatokkal jellemzett súlyossága, a fennállás időtartama a terápia megkezdése előtt) tanulmányozása további megerősítéssel szolgál a CLA független prediktív fontosságát illetően. Az általános érvénnyel elfogadott prediktív faktor hiányának ismeretében úgy véljük, hogy vizsgálati adataink elsődleges jelentősége egy új, adekvát módszer megalapozásában rejlik, mely a psoriasis legkorszerűbb kezelésmódjának hosszú távú

eredményességét hivatott hitelesen előre jelezni. Megfigyeléseink birtokában a tartós tünetmentesség vagy az esetleges relapszus predikciójához a perifériás CLA expresszió mérését javasoljuk az anti-TNF- α terápia indítása előtt, majd az iniciációs periódus 2. és 6. hetében. A kivitelezett vizsgálati munka esetleges limitációi között kell megemlítenünk a páciensek, és ezen belül is a „relapsing” betegek csekély számát, mely utóbbi a terápiás hatékonyság ismert megoszlási arányának megfelelően alakult; továbbá, hogy a CLA expressziós méréseket egyelőre csak perifériás vérmintákon vizsgáltuk, bőrmintákon nem végeztünk párhuzamos analízist. A jelenlegi reményt keltő eredmények megerősítésére és gyarapítására mindenképp hasznosnak tartanánk és tervezzük a későbbiekben újabb betegek bevonásával a kapott adatok fokozatos bővítését. A pathogenezis és a terápiás válaszreakció molekuláris szinten megvalósuló összefüggésének további felismerései pedig kétséget kizáróan segíthetnek a tárgyalt expressziós változások hátterében lévő mechanizmusoknak, s az általunk vázolt elméleti megfontolásoknak a tisztázásában.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. Jókai H, Marschalkó M, Csomor J, Szakonyi J, Kontár O, Barna G, Kárpáti S, Holló P. (2012) Tissue-Specific homing of immune cells in malignant skin tumors. *Pathol Oncol Res*, 18: 749-759. **IF:1,366**
2. Jókai H, Szakonyi J, Kontár O, Barna G, Kárpáti S, Holló P. (2013) Cutaneous lymphocyte-associated antigen as a novel predictive marker of TNF-alpha inhibitor biological therapy in psoriasis. *Exp Dermatol*, 22: 221-223. **IF:3,543**
3. Ferran M, Romeu ER, Rincón C, Sacrista M, Giménez Arnau AM, Celada A, Pujol RM, Holló P, Jókai H, Santamaria-Babí LF. (2013) Circulating CLA+T lymphocytes as peripheral cell biomarkers in T-cell-mediated skin diseases. *Exp Dermatol*, 22: 439-442. **IF:3,543**

A disszertációtól független közlemények

1. Holló P, Jókai H. (2011) Előzetesen TNF-alpha gátló terápiában részesülő beteg ustekinumab kezelése. *Bőrgyógy Venereol Sz*, 87: 219-221.