

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



*LUPUSOVÁ NEFRITIDA-
NOVÉ DIAGNOSTICKÉ A TERAPEUTICKÉ POSTUPY*

*LUPUS NEPHRITIS-
NOVEL DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC APPROACHES*

MUDr. Satu Pešičková

2014

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Klinika Nefrologie VFN a 1.LFUK, Praha

Školitel: prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc., MBA

Konzultant: prof. MUDr. Romana Ryšavá, CSc.

Obsah

Abstrakt	4
1. Úvod	6
1.1 Postižení ledvin u SLE	6
1.1.1 Vybrané protilátky u lupusové nefritidy	6
1.1.1.1 Protilátky proti C1q (anti-C1q)	6
1.1.1.2 mCRP a protilátky proti mCRP (anti-mCRP)	7
1.1.2. Standardní terapie proliferativních forem lupusové nefritidy	8
2. Hypotézy a cíle práce	8
2.1. Hypotézy	8
2.2 Cíle	9
3. Anti-mCRP protilátky u pacientů s lupusovou nefritidou-1.část práce	9
3.1. Pacienti a Metody	9
3.2. Výsledky	10
3.3. Diskuse	12
3.4. Závěry	15
4. Účinnost dlouhodobé léčby cyklosporinem A a pulsním cyklofosfamidem u nemocných s proliferativními formami lupusové nefritidy. Vliv terapie na hladiny protilátek antiC1q a antinukleosomů- 2.část práce	15
4.1. Pacienti a metody	15
4.2. Výsledky	17
4.3. Diskuze	19
4.4. Závěr	21
5. Použitá literatura	22
6. Seznam publikací	26

Abstrakt

Klíčová slova: anti-mCRP protilátky, cyklofosfamid, cyklosporin A, lupusová nefritida, systémový lupus erythematoses

Systémový lupus erythematoses (SLE) je systémové autoimunitní onemocnění, v jehož patogenezi je klíčová produkce autoprotilátek proti vlastním jaderným a cytoplazmatickým antigenům a tvorba imunokomplexů. Protilátky proti monomeru C-reaktivního proteinu (anti-mCRP) mohou hrát roli v patogenezi lupusové nefritidy (LN). Cílem této práce bylo najít souvislost mezi hladinami anti-mCRP a aktivitou LN a odpovědí na léčbu.

Metody: Anti-mCRP protilátky byly stanoveny u 57 pacientů s biopticky prokázanou LN (M/Ž 10/47, medián věku 32), 29 pacientů bylo vyšetřeno v době diagnózy a dále sledováno po medián 5,9 let. Anti-mCRP byly stanovovány in house ELISA metodou, aktivita onemocnění byla hodnocena skórem SLEDAI.

Výsledky: Hladiny anti-mCRP byly vyšší u pacientů s aktivitou LN (26,78 vs 7,5 AU; $p=0,009$), korelovaly s celkovou aktivitou onemocnění SLE ($r_s = 0,406$, $p=0,002$). Zjištěna byla souvislost těchto protilátek s horší odpovědí po dvou letech terapie, OR (95% CI)=13,7 (1,22-770,87); $p=0,014$.

Závěr: Přítomnost sérových anti-mCRP by mohla být užitečným markrem aktivity onemocnění a prediktorem dlouhodobé odpovědi na standardní léčbu.

V druhé části práce byla porovnávána standardní léčba proliferativní LN cyklofosfamidem (CFA) s terapií cyklosporinem A (CyA).

Metody: Randomizováno bylo 40 pacientů (M/Ž 11/29, průměrný věk 29 let) s proliferativní LN k léčebnému režimu na bázi CFA či CyA. Primárním cílem bylo dosažení renální remise na konci indukční a udržovací fáze.

Výsledky: V klinické studii srovnávající efekt terapie CFA a CyA nebyl statisticky významný rozdíl mezi skupinami v dosažení remise, či odpovědi na léčbu na konci indukční i udržovací fáze, ani v době přežití bez relapsu. Léčba CyA vedla k přechodnému vzestupu krevního tlaku a reverzibilnímu poklesu glomerulární filtrace.

Závěr: CyA měl podobnou účinnost jako cyklofosfamid v sekvenční indukční a udržovací léčbě.

Abstract

Key words: anti-mCRP antibodies, cyclophosphamide, cyclosporine A, lupus nephritis, systemic lupus erythematosus

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease. Circulating autoantibodies against the body's own nuclear and cytoplasmic structures and creation of immune complexes play a key role in the pathogenesis of SLE. Antibodies against monomeric C-reactive protein (anti-mCRP) might play role in pathogenesis of lupus nephritis (LN). The aim of this study was to find relation between anti-mCRP and activity of LN and response to therapy.

Methods: The study was performed on 57 patients (M/F 0.21, median age 32 years) with LN. In a subanalysis, we focused on 29 patients with newly diagnosed active LN and we followed them up for a median of 5.9 years. Levels of anti-CRP were measured by in house ELISA. Disease activity was measured by SLEDAI.

Results: Levels of anti-mCRP were significantly higher in patients with active lupus nephritis (26.78 versus 7.5 AU, $p=0.009$) and levels of anti-mCRP positively correlated with the activity of SLE as assessed by the SLEDAI score (Spearman's $r=0.406$, $p=0.002$). We found negative prediction of anti-mCRP for worse outcome after two years of standard therapy, OR (95% CI)=13.7 (1.22-770.87); $p=0.014$.

Conclusion: Serum levels of anti-mCRP seem to be a useful laboratory marker of LN/SLE activity and a predictor of worse outcome after standard treatment.

In the second part, we compared treatment with cyclophosphamide (CYC) to Cyclosporine A (CyA) in proliferative LN.

Methods:

Forty patients (M/F 0,38, mean age 29 years) with clinically active proliferative LN were randomly assigned to one of two sequential induction and maintenance treatment regimens based either on CYC or CyA. The primary outcomes were complete renal remission or response at the end of induction phase maintenance phase.

Results: In this clinical study comparing two sequential therapies there was no difference between the groups in reaching remission or response to therapy. CyA was associated with a reversible increase in blood pressure and decrease in glomerular filtration rate.

Conclusion: CyA was as effective as CYC in the induction and maintenance treatment in patients with proliferative lupus nephritis.

1. Úvod

Systémový lupus erythematosus (SLE) je systémové autoimunitní onemocnění, které může postihnout prakticky jakýkoliv orgán či systém [1-3].

SLE je nejčastěji diagnostikován mezi 20.- 40. rokem života. Ženy jsou postiženy asi 10x častěji [4]. Prevalence onemocnění je od 15 do 51 případů na 100 tisíc obyvatel [5, 6]. Vyšší incidence onemocnění byla pozorována u afrokaribského etnika, dále pak u asiátů a nejméně často bývají postiženi kavkazané [7].

Základním patogenetickým mechanismem působícím u SLE je produkce autoprotilátek proti vlastním jaderným a cytoplazmatickým antigenům a tvorba imunokomplexů [8, 9]. Nicméně primární příčina této dysregulace není dosud známá, v poslední době několik studií poukazuje na spojitost s defektním odstraňováním apoptotických buněk [10, 11].

Onemocnění SLE je pozorováno častěji u pacientů s vrozenými imunodeficiencemi, zejména onemocnění spojených s nedostatkem určitých komponent komplementu (např. deficience C1q esterázy a C2 deficience), které následně způsobují hromadění imunokomplexů v důsledku neschopnosti organismu je odstranit [12-14].

Recentně byla publikována nová (modifikovaná) kritéria pro stanovení diagnózy SLE, připravena skupinou SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics). Toto onemocnění může být diagnostikováno u osob splňujících minimálně 4 kritéria (z toho alespoň jedno imunologické a jedno klinické) či biopticky potvrzenou lupusovou nefritidu (LN) a jedno imunologické kritérium [15].

1.1 Postižení ledvin u SLE

Renální postižení je pozorováno u 25-65% pacientů se SLE [16]. Přítomnost LN je jedním z nejzávažnějších orgánových postižení u SLE a je spojeno se zvýšenou morbiditou a mortalitou [17]. Klinický obraz onemocnění může být velmi rozmanitý, má tendence ke střídání období remise a relapsů, přičemž se průběh u jednotlivých pacientů velmi často liší [18]. Minimální či dokonce negativní močové nálezy nevyklučují přítomnost LN. Aktivní LN se může manifestovat proteinurií, aktivním močovým sedimentem i akutním renálním selháním [19]. Včasná diagnostika a léčba lupusové nefritidy je důležitá, neboť časná odpověď na léčbu je spojena s lepší prognózou [20].

1.1.1 Vybrané protilátky u lupusové nefritidy

Autoprotilátky hrají jednu z ústředních rolí v patogenezi SLE a LN. Některé jsou asociované s aktivitou onemocnění [21]. Po mnoho let pátralo po tom, proč se tvoří protilátky proti vlastním nukleárním a cytoplazmatickým strukturám, které jsou ukryty v buňce. Podle jedné z teorií dochází na povrchu buněk procházejících apoptózou k akumulaci autoantigenů, proti kterým jsou často namířeny protilátky u pacientů se SLE [22]. U pacientů se SLE je odstraňování tohoto apoptotického materiálu zbržděno [23], protražovaná expozice těchto autoantigenů může vést k ztrátě periferní tolerance.

1.1.1.1 Protilátky proti C1q (anti-C1q)

C1q je molekula skládající se z kolagenní části končící globulárními hlavami. Imunokomplexy se váží na globulární části a anti-C1q protilátky na kolagenní část molekuly. Vazba na C1q se projeví jen, pokud je navázána na solidní struktury tkání, zřejmě po změně

konformace a odhalení neoepitopů, které po vazbě následuje. Tyto protilátky byly nalezeny v bioptických nálezech z ledvin pacientů s lupusovou nefritidou, kde byl 50x vyšší poměr anti-C1q/IgG v glomerulárním extraktu než v séru [24].

V experimentální studii Trouwa a kol. [25] byla normálním (BALB-c) myším podána murinní monoklonální protilátka proti C1q, což následně vedlo k depleci C1q v cirkulaci a ukládání C1q a anti-C1q v glomerulární bazální membráně, ale bez průkazu většího glomerulárního poškození. Poté u těchto myší k zmíněné protilátce přidali ještě subnefritogenní dávku komplement fixační anti-murinní GBM protilátky, která se zřejmě navázala v ledvině, a na ní se navázala C1q a anti-C1q, následně došlo k velkému přílivu granulocytů a rozvoji velké proteinurie [25]. K tomuto poškození nedošlo u myší s C1q, C3 a C4 deficiencí, lze tedy předpokládat, že se anti-C1q protilátky uplatňují pouze v kontextu imunokomplexových glomerulonefritid, jako je např. LN.

Jednou z možností patogenického působení anti-C1q by mohlo být vyvázání C1q složky komplementu z cirkulace, načež by došlo k hromadění apoptotických buněk, exprimujících autoantigeny na svém povrchu s následným rozvojem autoimunity [26].

Anti-C1q koreluje s aktivitou LN, zejména u proliferativních forem [27-30], kde byly nalezeny v glomerulární bazální membráně [24]. Vyšší prevalence těchto protilátek je u pacientů s aktivní nefritidou [31]. Vzestup anti-C1q predikuje renální relaps [32, 33], po terapii dochází k jejich poklesu [28]. Ve studii Trendelenburga a kol. [28] vyšla vysoká prediktivní hodnota negativního výsledku, z čehož vyplývá, že negativní test na anti-C1q téměř vylučuje aktivní proliferativní LN.

Ke stanovení anti-C1q se používá nyní již běžně dostupná ELISA metoda, kde se využívá C1q jako antigen. Konformační změny molekuly je dosaženo vazbou globulárních hlav C1q na destičky. Aby nedošlo k vázání imunokomplexů, jež mají pouze nízkou afinitu k C1q, je využito pufru [34].

1.1.1.2 mCRP a protilátky proti mCRP (anti-mCRP)

Za specifických podmínek (alterace pH, urémie, hypokalcémie) C-reaktivní protein (CRP) ireverzibilně disociuje na monomery (mCRP) a tím odhalí nové epitopy [35].

Předpokládá se, že mCRP hraje roli v indukcii sekrece IL-8 neutrofilů a tím potlačuje apoptózu [36]. Dále pak zvyšuje hladinu receptoru pro C3 (CD11b/CD 18) [37]. V kyselém prostředí se váže na IgG část imunokomplexů a tím může zřejmě hrát roli v jejich odstraňování [38]. Protilátky proti mCRP (anti-mCRP) se váží na nízko-afinitní receptory-FcγRIIIb (CD16) [39]. Podobně jako CRP může mCRP hrát roli v aktivaci komplementu klasickou cestou [40].

mCRP navázané na povrchu nekrotických buněk přitahuje složky komplementu, aktivuje jak klasickou cestu via C1q a C4-bp (binding protein), zároveň i blokuje alternativní cestu pomocí regulátorů faktoru H a FLH1 (faktor H-like protein) [41, 42]. mCRP se váže na kolagenní část C1q [42], a zdá se, že významně podporuje fagocytózu buněk v pozdní fázi apoptózy [42].

Recentně bylo publikováno, že IgG protilátky proti mCRP (anti-mCRP) mohou participovat v patogenezi SLE a LN [43, 44]. Anti-mCRP protilátky rozpoznají podjednotky CRP, ale ne nativní pentamerovou formu [45]. Tyto protilátky se pravděpodobně váží na mCRP navázané na povrchu tkání [46], např. cévách, játrech, kosterních svalech a ledvině [47-49]. Tyto nálezy podporuje i to, že anti-mCRP nekoreluje s hladinami cirkulujícího CRP [46, 50].

Anti-mCRP mohou inhibovat vazbu mCRP na C1q či H faktor a tím snižovat clearance apoptotických buněk u pacientů s LN [42].

Bellová a kolegové [35] popsali vysokou prevalenci těchto protilátek u pacientů se SLE. Další autoři je našli u nemocných s antifosfolipidovým syndromem, a to jak idiopatickým, tak asociovaným se SLE [51], popsány byly i u pacientů s aktivitou lupusové nefritidy [43, 51]. Jiná studie s opakovanými renálními biopsiemi prokázala korelaci mezi anti-mCRP a indexem aktivity [50], navíc pacienti s pozitivitou anti-mCRP hůře odpověděli na léčbu [43]. V renálních biopsiích pacientů s LN byla popsána v subendoteliálním prostoru a glomerulární bazální membráně kolokalizace IgG protilátek s mCRP, C1q a dsDNA [52]. Jiná skupina autorů tyto nálezy potvrdila a zároveň nebylo CRP při imunofluorescenčním vyšetření zachyceno u pacientů s jinými proliferativními nefritidami ani u zdravých kontrol [53]. Nakahara a kol. [54] však CRP depozita našla, jak u pacientů se LN, tak i u pacientů s IgA nefropatií.

Tyto protilátky nejsou zatím stanovovány rutinně, pouze in-house ELISA metodou, metodika se mírně liší dle jednotlivých laboratoří, kde byl výzkum prováděn [35, 51, 55].

1.1.2. Standardní terapie proliferativních forem lupusové nefritidy

Proliferativní formy LN (třída III a IV) jsou závažným postižením ledvin při onemocnění SLE, které bez adekvátní léčby mohou vést k renálnímu selhání a jsou spojeny se zvýšenou morbiditou a mortalitou. Při stanovení této diagnózy se zahajuje tzv. indukční léčba, která má za úkol navodit remisi onemocnění, na níž navazuje udržovací léčba s cílem remisi udržet. Výběr terapie se liší i podle toho, zda se jedná o první léčbu při primomaniestaci LN či o léčbu opakovaných relapsů. Jednotlivé studie je často obtížné mezi sebou srovnávat, i proto, že se liší definice relapsů, remisí, cílů a délek studií.

Zlatým standardem léčby proliferativních forem lupusové nefritidy stále zůstávají nescifická imunopresiva a cytotoxické preparáty v čele s cyklofosfamidem (CFA), a nověji mykofenolát mofetilem (MMF) a event. cyklosporinem A (CyA).

2. Hypotézy a cíle práce

2.1. Hypotézy

1. Hladiny anti m-CRP protilátek korelují s aktivitou onemocnění SLE a jsou zvýšené u pacientů s aktivní LN.
2. Hladiny anti-mCRP protilátek nekorelují se sérovými hladinami proteinů akutní fáze a s hladinami protilátek typickými pro LN.
3. Pozitivita anti-mCRP protilátek predikuje horší odpověď na terapii.

V druhé části práce jsme srovnávali účinnost dlouhodobé léčby cyklosporinem A s pulsním cyklofosfamidem u nemocných s proliferativními formami LN v rámci randomizované studie.

4. Indukční terapie cyklosporinem A je stejně účinná jako terapie cyklofosfamidem v navození remise LN a je méně toxická.
5. Po 9-ti a 18-ti měsíční terapii dochází k úpravě hladiny komplementu C3 a poklesu hladin protilátek (anti-dsDNA, anti-C1q a antinukleosomů).

2.2 Cíle

1. Provést korelaci anti-mCRP protilátek s aktivitou onemocnění, definovanou indexem aktivity onemocnění SLE (SLEDAI) a porovnání hladin anti-mCRP protilátek u pacientů s aktivní a neaktivní LN.
2. Provést korelaci hladin anti-mCRP protilátek s mCRP, sérovým amyloidem A (SAA), hladinami anti-dsDNA a anti-C1q.
3. Ve dvouletém sledování porovnat odpověď (parciální a kompletní remise vs. relaps či non-response) u pacientů se vstupní pozitivitou a negativitou anti-mCRP.
4. Porovnání odpovědi (navození remise onemocnění) u skupiny léčené cyklosporinem A a cyklofosfamidem po 9 a 18 měsících a 7 letech terapie. Porovnat nežádoucí účinky terapie ve skupině léčené cyklosporinem A a cyklofosfamidem.
5. Porovnání přítomnosti C3, anti dsDNA, hladin anti-C1q a antinukleosomů u pacientů před terapií a po terapii ve skupině léčené cyklofosfamidem a cyklosporinem A.

3. Anti-mCRP protilátky u pacientů s lupusovou nefritidou-1.část práce

3.1. Pacienti a Metody

Do studie bylo zařazeno 57 pacientů (M/Ž 10/47) s mediánem věku 32 let (18-65), splňujících kritéria pro SLE dle American College of Rheumatology (ACR) [56]. Všichni pacienti měli LN prokázanou renální biopsií v letech 1996-2010 na Klinice Nefrologie VFN a 1. LFUK. Výsledky renální biopsie byly dodatečně patologem překlasifikovány dle recentního hodnocení mezinárodní nefrologické společnosti a renální patologické společnosti (ISN/RPS) [57].

V letech 2005-2010 bylo od těchto pacientů odebráno celkem 119 vzorků séra (vzorky byly odebírány v různých fázích onemocnění, počet vzorků na pacienta byl v rozmezí 1-7). Jako kontrolní materiál sloužily vzorky séra, odebrané 122 zdravým dobrovolníkům, věkově korespondujícím se souborem pacientů.

Do druhé části projektu, zaměřené na význam anti-mCRP v predikci odpovědi na terapii, byli zahrnuti pacienti (n=29) s nově diagnostikovanou aktivní LN, od kterých byl k dispozici vzorek séra z doby renální biopsie. Sledování byli po dobu 3,6 až 8,1 let (medián 5,9) na Klinice Nefrologie VFN a 1. LFUK a v Revmatologickém Ústavu v Praze. Po roce od renální biopsie jsme měli výsledky od 26 pacientů, dva pacienti byli ztraceni ze sledování a jeden pacient zemřel.

Výsledky na konci sledování, k březnu 2014 (t.j. medián 5,9 let) máme k dispozici u 25 pacientů. V průběhu dlouhodobého sledování byla monitorována incidence renálních relapsů.

Do doby analýzy byla séra pacientů skladována v -80° C.

Definice

Aktivita celkového onemocnění byla hodnocena indexem aktivity SLEDAI [58]. Za aktivní renální onemocnění jsme považovali to, kde byla splněna alespoň 2 kritéria z následujících: aktivní močový sediment a/nebo proteinurie $\geq 0,5$ g/den a/nebo zhoršení glomerulární filtrace o $\geq 25\%$ (oproti vstupním hodnotám) a/nebo C3 hypokomplementemie.

Po jednom a dvou letech terapie byla hodnocena odpověď podle Evropského konsenzu [59].

Relaps byl hodnocen jako zvýšení aktivity vyžadující intenzivnější terapii, avšak až po dosažení minimálně parciální remise.

Za dobrý výstup jsme považovali dosažení alespoň parciální remise, naopak non-response či renální reaktivace-relaps byly považovány za negativní výstup.

V prodlouženém sledování byl hodnocen počet renálních relapsů, jako negativní výstup byl hodnocen alespoň jeden relaps.

Stanovení anti-mCRP protilátek

Hladiny anti-mCRP byly stanoveny pomocí *in house* ELISA dle Sjowall a kol [55] s drobnými modifikacemi. Sto nanogramů lidského nativního CRP (Sigma, USA) bylo rozpuštěno ve 100 μ l uhličitanového pufru (50 mM, pH 9,6), nanášeno na mikrotitrační destičky (Maxisorp, Nunc, Dánsko) a inkubováno přes noc při pokojové teplotě. Po promytí fosfátovým puftrem (PBS) s přidavkem 0,05% Tweenu 20 bylo do destičky napipetováno 100 μ l séra (ředěného 1: 20 PBS Tweenem) a inkubováno při pokojové teplotě po dobu 60 minut. Po opětovném promytí PBS-Tweenem, bylo přidáno 100 μ l králíčích IgG protilátek proti lidským γ -řetězcům, konjugovaných s alkalickou fosfatázou (DAKO, Dánsko) - (ředěno 1:500 v PBS-Tween). Po hodině inkubace a promytí PBS Tweenem bylo přidáno 100 μ l *p*-nitrofenyl fosfátu (Sigma, USA) rozpuštěného v reakčním pufru (uhličitanový pufr, 50 mM, pH 9,6; 1 mM MgCl₂) do finální koncentrace 10 mg/ml. Po hodině inkubace (pokojová teplota, temno) byla reakce ukončena přidáním 25 μ l 3 M NaOH. Absorbance byly odečteny při 405 nm. Všechny vzorky byly analyzovány v kvadruplikátech. Kalibrační křivka byla zkonstruována sériovým ředěním nejpozitivnějšího vzorku vzorkem negativním. Výsledky jsou uvedeny v jednotkách (AU), které jsou vyjádřeny % nejvyššího vzorku. Detekční limit byl 15.

Stanovení dalších parametrů

Na stanovení byly použity komerčně dostupné ELISA kity pro SAA (Invitrogen, USA) a antiC1q (Buhlmann Laboratories, Švýcarsko). Vše výše uvedené, včetně anti-mCRP, bylo měřeno v ÚLBLD VFN a 1.LFUK.

High sensitivity CRP (Siemens, USA) bylo měřeno nefelometricky na přístroji BN II (Siemens, USA) v ÚHK T.

V době odběru vzorku, během rutinního skrínungu byly stanoveny další imunologické parametry - složky komplementu- C3 a C4 (nefelometricky, Siemens, USA), anti-dsDNA (IF a/nebo ELISA, Orgentec, Německo), anti-dsDNA bylo hodnoceno semikvantitativně z důvodu sjednocení více metod), antinukleosomy (ELISA, BL Diagnostika, Německo). Stejně tak i základní biochemické parametry, včetně stanovení clearance endogenního kreatininu a kvantitativní proteinurie, vše měřeno v ÚLBLD VFN.

Statistické zpracování

Vzhledem k negaussovskému rozložení byla data analyzována pomocí neparametrických testů. Výsledky jsou uváděny jako medián a 5. – 95. percentil. Mann-Whitney rank sum test, Kruskal-Wallisova ANOVA a Spearmanův korelační koeficient byly počítány pomocí programu STATISTICA (verze 10). χ^2 , Fisher exact test a logistická regrese byla počítána pomocí programu EpiInfo (verze 3.5.3). Vzorkům s koncentrací protilátek anti-mCRP nižší než byl limit detekce (15 AU), byla pro účely výpočtů přiřazena hodnota 7,5 AU.

3.2. Výsledky

Vzhledem k tomu, že anti-mCRP nepatří k běžně vyšetřovaným analytům, není k dispozici ani referenční materiál ani informace o tom, jaké hladiny lze považovat za normální. Pro účely naší studie jsme tudíž stanovili vlastní referenční hodnoty na základě souboru 122

zdravých dobrovolníků. Celkem 68 (56 %) z nich mělo hladiny anti-mCRP pod detekčním limitem metody (<15 AU), maximální hodnota byla 72,4 AU. Za horní hranici normy považujeme hodnotu rovnou 95. percentilu tohoto kontrolního souboru, tj 45,45 AU.

Porovnávali jsme hladiny anti-mCRP pacientů a zdravých kontrol, v souladu s očekáváním byly významně vyšší hladiny protilátek u pacientů než u kontrol (21,1 AU (7,5-98,6) vs 7,5 AU (7,5-45,5); $p=0,012$). Ve studii byli pacienti nacházející v různém stadiu onemocnění, někteří měli aktivitu renálního onemocnění, jiní byli v remisi. Hladiny anti-mCRP byly významně vyšší u pacientů s aktivitou LN (26,78 AU (7,5-89,38) vs 7,5 AU (7,5-30,57); $p=0,009$).

Pozitivní anti-mCRP měla třetina pacientů s aktivitou LN, ve skupině pacientů s neaktivní LN se nikdo s pozitivními anti-mCRP nenašel. Tento rozdíl je na samé hranici statistické významnosti ($p=0,051$).

U tohoto souboru jsme zjistili významnou korelaci mezi hladinami anti-mCRP a celkovou aktivitou SLE, charakterizovanou indexem SLEDAI ($r_s=0,406$, $p=0,002$).

Vzhledem k tomu, že se jedná o vyšetření protilátek proti mCRP, nás zajímalo, jaký je vztah k vybraným proteinům akutní fáze. Anti-mCRP nekorelovaly s SAA ani s hsCRP.

Zkoumali jsme souvislost mezi anti-mCRP a dalšími imunologickými parametry typickými pro aktivitu LN. Anti-mCRP nekorelovaly s hladinami anti-C1q ($r_s=0,127$; $p<0,353$).

Statisticky významná byla korelace mezi poklesem složky komplementu C3 a vzestupem anti-mCRP ($r_s=-0,509$, $p<0,0001$), stejně tak i poklesem C4 a vzestupem anti-mCRP ($r_s=-0,528$, $p<0,0001$).

Dále jsme srovnávali hladiny anti-mCRP u pacientů anti-dsDNA pozitivních a negativních. Pacienti s pozitivitou anti-dsDNA měli hladiny anti-mCRP signifikantně vyšší 31,6 AU (7,5-91,6) vs 7,5 AU (7,5-57,8); $p=0,007$.

Jedním z našich předpokladů bylo, že by pacienti s proliferativními třídami LN měli mít vyšší hladiny anti-mCRP. Výsledně rozdíl mezi jednotlivými skupinami nebyl statisticky významný ($p=0,85$).

Porovnali jsme i proliferativní formy LN (tj. třída III, IV, kombinované formy III+V a IV+V) s neproliferativními (třída II), kterou tvořili pouze 2 pacienti, a ani zde jsme neprokázali rozdíl ($p=0,945$).

Predikce odpovědi na léčbu

V duhé části práce jsme na skupině pacientů ($n=29$), sledovaných po dostatečně dlouhou dobu ověřovali předpoklad, zda by vstupní koncentrace anti-mCRP (a případně jiných parametrů) mohly sloužit jako prediktor odpovědi na léčbu.

Hlavním cílem bylo otestovat, zda některý z vyšetřovaných parametrů může sloužit jako prediktor odpovědi v různých časových intervalech. Největší důraz jsme kladli na anti-mCRP, nicméně testovali jsme i možnou roli dalších možných faktorů, které by mohly odpověď na léčbu ovlivňovat.

Po roce terapie (na konci indukční fáze) 5 pacientů se vstupní anti-mCRP pozitivitou alespoň parciálně odpovědělo na léčbu, 6 pacientů zůstalo bez odpovědi. Ze skupiny anti-mCRP negativních mělo příznivou odpověď 9 pacientů a 5 pacientů na terapii neodpovědělo.

Po roce terapie nebyla anti-mCRP pozitivita vyšším rizikem pro horší odpověď na léčbu, OR (95% CI)=1,8 (0,29-11,44); $p=0,268$.

Po dvou letech terapie 5 pacientů, se vstupní anti-mCRP pozitivitou, odpovědělo na terapii (či odpověď udrželo), 6 pacientů mělo nepříznivou odpověď (buď na terapii neodpověděli vůbec, či po dosažení odpovědi zrelabovali). Narozdíl od skupiny anti-mCRP negativních, kde na konci druhého roku většina pacientů (13/14) dosáhla přinejmenším parciální odpovědi a pouze jeden pacient na léčbu neodpověděl, žádný neměl po dosažení odpovědi relaps.

Z univariátních analýz vyšly dva nadějně prediktory a to vstupní anti-CRP pozitivita OR (95% CI)=13,7 (1,22-770,87); $p=0,014$ a špatná odpověď na léčbu po roce sledování OR (95% CI)= 10,8 (0,98-596,62); $p=0,027$.

Identifikované prediktory jsme podrobili detailnější analýze-vzhledem k tomu, že spolu vzájemně nekorelují ($r_s=0,144$, $p=0,482$), lze je považovat za nezávislé rizikové faktory. Jejich vzájemnou kombinací bychom mohli odpověď v druhém roce terapie předpovědět spolehlivěji, než při použití prediktorů zvlášť. Velikost souboru pacientů je však poměrně malá, a tak neumožňuje korektní provedení vícenásobné regrese. Z univariátních analýz (viz výše) vyplývá, že riziko nesené oběma faktory je zhruba stejné (OR 10,8 vs 13,7), a tak si můžeme dovolit oba faktory pro účely výpočtů sloučit do jednoho prediktoru. Tento sloučený rizikový faktor (SRF) může nabývat hodnot 0 (pacient nemá ani vstupní anti-mCRP pozitivitu, ani nepříznivou odpověď v prvním roce), 1 (pacient má jen jeden z rizikových faktorů) a 2 (pacient nese oba rizikové faktory). Takto upravená data jsme analyzovali logistickou regresí: výstupem byla odpověď ve druhém roce, jakožto prediktor sloužil SRF. Z analýzy vyplývá, že přítomnost jediného z výše uvedených rizikových faktorů výrazně zvyšuje riziko nepříznivé odpovědi, OR (95%CI)=26,3 (2,2-308.7), $p=0,0094$. V případě, že pacient ponese oba rizikové faktory, bude (ve srovnání s pacientem bez rizikového faktoru) čelit více než padesátinásobnému riziku negativní odpovědi v druhém roce.

Pacienti byli sledováni do března 2014, celková doba sledování byla 5,9 let (3,6-8,1 let). Sledovali jsme kolik pacientů mělo v mezidobí rekativaci renálního onemocnění (relaps).

Čtyři z deseti vstupně anti-mCRP pozitivních pacientů mělo alespoň jeden relaps, jedna pacientka neodpověděla na terapii a následně progredovala do ESRD.

Ve skupině vstupně anti-mCRP negativních měli 2 pacienti z 9 relaps, jeden z nich dále progredoval do ESRD.

Opět jsme zkoušeli různé parametry, které by mohly předvídat horší vývoj onemocnění. Nenašli jsme žádný rizikový faktor mezi zkoušenými parametry, i když anti-mCRP se pohybuje v blízkosti hranic statistické významnosti.

Zajímalo nás, zda mají anti-mCRP vliv na dobu dosažení remise, předpokládali bychom prodlouženou dobu aktivity onemocnění. Mezi skupinami (anti-mCRP pozitivními vs negativními) nebyl rozdíl, co se týče doby dosažení alespoň parciální odpovědi: (medián (25%-75%) 10,5 (2,95-21,35) vs 14 (5-36) měsíců, $p=0,12$).

3.3. Diskuze

Výskyt anti-mCRP protilátek byl popsán již několika skupinami autorů, nejčastěji u pacientů s diagnostikovaným SLE [35, 50, 60].

Prevalence anti-mCRP se u pacientů se SLE se v různých studiích liší, popsána byla v rozmezí od 23 % do 78 % [35, 44, 50, 51, 55]. Záleží na spektru pacientů, obecně bývá prevalence vyšší u pacientů s aktivnějším a zejména renálním postižením. U celého souboru našich pacientů s LN (s aktivním onemocněním i remisí) byla prevalence 26,3 % (tj při dolní hranici výše uvedeného rozpětí). U pacientů s aktivní nefritidou však byla prevalence výrazně

vyšší - 44,8 %, což je zcela v souladu s publikovanými výsledky Sjowalla a kol. [43]. Značně široké rozmezí publikovaných prevalencí anti-mCRP může být rovněž způsobeno tím, že toto vyšetření není zatím rutinně používáno a k dispozici není žádný referenční materiál. Referenční meze, které si stanovují jednotlivá pracoviště sama, se tedy mohou výrazně lišit. My jsme za horní hranici referenčního rozmezí považovali 95. percentil v kontrolním souboru 122 zdravých dobrovolníků. Obdobný postup zvolila i další pracoviště [43, 51].

Renální aktivitu SLE lze v současné době stanovit několika způsoby. Jako nejpřesnější se jeví mikroskopické vyšetření vzorku ledviny s posouzením aktivity a chronicity, kde je dobře patrný vývoj změn po terapii. Toto invazivní vyšetření však s sebou nese značná rizika pro pacienta. Rutinně vyšetřované sérové ukazatele mohou být při posuzování aktivity LN přínosné, sledovány jsou zejména protilátky anti-dsDNA, složky komplementu C3 a C4 a nověji i anti-C1q protilátky. Ani tyto ukazatele nelze považovat za zcela postačující, a tak se nemalé úsilí věnuje hledání dalších markerů, které by pomohly monitorovat aktivitu onemocnění a předvídat jeho další průběh. Jedním z nových nadějných ukazatelů by mohly být právě anti-mCRP protilátky. Jedním z cílů naší studie proto bylo posoudit vztah anti-mCRP protilátek a aktivity LN (případně vztah anti-mCRP a ostatních markerů aktivity LN).

Již několik desetiletí se k diagnostice a sledování aktivity SLE využívají anti-dsDNA protilátky, které běžně nacházíme v séru i v glomerulech pacientů s LN [61], a jejichž sérové hladiny korelují s aktivitou onemocnění [62, 63]. V naší studii nás zajímal vztah těchto osvědčených markerů onemocnění a anti-mCRP. V souladu s pozorováním ostatních autorů [50] jsme našli zvýšené hladiny anti-mCRP u pacientů s pozitivitou anti-dsDNA.

Dalším častým nálezem u pacientů s aktivitou SLE a LN je hypokomplementemie [64]. V souladu s publikovanými pracemi jsme i v našem souboru prokázali mírnou (avšak statisticky velmi významnou) inverzní korelaci anti-mCRP s hladinami C3 i C4 složky komplementu ($r_s = -0,501$ a $r_s = -0,528$, $p < 0,0001$) [50]. Určitou, na komplementu nezávislou, roli anti-mCRP protilátek v patogenezi LN může naznačovat fakt, že nebyla prokázána korelace mezi anti-mCRP protilátkami a anti-C1q. I toto pozorování je ve shodě s jinými autory [43].

Dále se nám podařilo potvrdit dřívější pozorování jiných autorů [43], že hladiny anti-mCRP jsou významně (více než třikrát) zvýšené u pacientů s aktivitou LN. U žádného pacienta bez renální aktivity nemoci nebyly tyto protilátky zachyceny. Na základě předchozích výsledků se zdá, že anti-mCRP by mohly sloužit jako užitečný marker aktivity.

Pro možné využití anti-mCRP jakožto markeru aktivity onemocnění (alespoň u té části nemocných u které byly zjištěny) svědčí i pozorování Sjowalla a kol. [43], kteří pozorovali pokles těchto protilátek u pacientů při přechodu do remise onemocnění.

Domnívali jsme se, že by pacienti s proliferativními typy LN mohli mít vyšší hladiny anti-mCRP. Tyto třídy LN jsou spojeny s větším poškozením glomerulů a horší prognózou pokud nejsou adekvátně léčeny [20, 65]. Při porovnání jednotlivých typů LN jsme nenašli statisticky významné rozdíly. Z toho však nelze tvořit definitivní závěry, neboť ve skupině pacientů s neproliferativní LN bylo velmi málo jedinců. To bylo velmi pravděpodobně způsobeno tím, že pacienti s neproliferativními formami, z důvodu minimálních laboratorních nálezů, nebývají tak často biopsováni, a tedy i odhaleni.

Hladiny CRP v plazmě jsou u pacientů se SLE i přes aktivitu onemocnění nízké [46]. Důvod těchto snížených hladin je stále neobjasněný, zdá se však, že protilátky anti-mCRP na toto nemají vliv [44, 60]. V souladu s očekáváním jsme v naší studii nenalezli žádný vztah mezi CRP a hladinami anti-mCRP. Otázka sníženého CRP tak zůstává stále otevřena. Jedním

z nově diskutovaných mechanismů je potlačení tvorby CRP (řízené IL-6) v hepatocytech, za kterým stojí IFN α [66]. Jiným důvodem může být zrychlená konverze CRP na mCRP [67].

Kromě renální aktivity nás zajímalo, zda by anti-mCRP mohly souviset s celkovou aktivitou onemocnění. V naší studii jsme potvrdili, že anti-mCRP korelovaly s aktivitou celkového onemocnění SLE [43, 44, 50].

Kromě markerů aktivity onemocnění se dlouhodobě hledají možné prediktory odpovědi na standardní terapii. Předvídáním reakce daného pacienta na léčbu lze terapeutický přístup modifikovat a zvýšit tak šanci na úspěšnou léčbu s minimalizací vedlejších účinků neúčinné terapie. Protilátky anti-mCRP by tento prediktivní potenciál mít mohly, alespoň to naznačují výsledky Sjowalla a kol., kteří popsali více než dvojnásobné riziko nepříznivé terapeutické odpovědi (potvrzené i opakovanou renální biopsií) u pacientů se vstupní anti-mCRP pozitivitou [43, 68]. Navíc pozorovali u jednotlivých pacientů pokles hladin anti-mCRP v závislosti na snížení aktivity onemocnění. Jejich soubor čítal 38 pacientů s aktivní LN, sledovaných po dobu průměrně 8 měsíců. Tyto výsledky jsou velmi slibné, doba pozorování je však poměrně krátká. Hlavním cílem naší studie tudíž bylo ověřit, zda vstupní pozitivita anti-mCRP může predikovat odpověď na standardní léčbu a zda jsme predikce schopni i v delším časovém horizontu. U našich pacientů s nově diagnostikovanou LN jsme proto v závislosti na vstupních hladinách anti-mCRP hodnotili terapeutický výstup po roce a dvou letech sledování a poté četnost relapsů v dalším sledování (median 5,9 let). Kromě anti-mCRP jsme testovali i další možné laboratorní či klinické prediktory odpovědi.

Kupodivu nebyl po roce sledování rozdíl v odpovědi na terapii mezi vstupně anti-mCRP pozitivními a negativními pacienty patrný (OR=1,76; p=0,368). To není zcela v souladu s výsledky Sjowalla a kol., které byly získány na patientském souboru s velmi podobnou klinickou charakteristikou [43]. Tato neshoda může být dána menší velikostí našeho souboru (25 vs 38), mírně delší dobou sledování (1 rok vs 8 měsíců), jinou „cut-off“ hodnotou pro posuzování anti-mCRP pozitivity či použitím jiných kritérií pro hodnocení odpovědi na terapii [59]. Narozdíl od zmíněné práce švédských autorů jsme neprováděli kontrolní rebiopsii, jejíž provedení považujeme, z důvodu již dříve zmiňovaných rizik pro pacienta, za neoprávněné.

V další fázi našeho sledování, po dvou letech terapie (t.j. až v průběhu udržovací léčby), jsme identifikovali dva významné nezávislé prediktory. Pacienti, kteří v prvním roce na terapii neodpověděli, mají ve druhém roce zhruba desetkrát vyšší riziko nepříznivého terapeutického efektu. Podobné riziko neúspěchu terapie s sebou nese i vstupní pozitivita anti-mCRP protilátek. Je-li pacient nositelem obou rizikových faktorů, musíme u něj počítat s padesátinásobným rizikem selhání terapie v druhém roce. Takto silná predikce nás vede ke spekulaci, že u pacientů s vstupní anti-mCRP pozitivitou, kteří zároveň adekvátně neodpoví na terapii v průběhu indukční terapie do jednoho roku, by mělo být zváženo zintenzivnění stávající terapie či nasazení alternativní, např. biologické terapie.

Oproti silné predikci ve druhém roce, v prodlouženém sledování po dobu přibližně 6 let se anti-mCRP protilátky nezdály být statisticky významným prediktorem pro větší množství relapsů (OR=5; p=0,092). Jedním z možných důvodů mohla být i intenzivnější léčba pacientů se špatnou odpovědí na indukční léčbu a tím i suprese protilátek, které se prokazatelně snižují po úspěšné terapii s navozením odpovědi [43], příliš dlouhá doba mezi stanovením hladiny anti-mCRP a vyhodnocením odpovědi, nehomogenita patientského souboru (doba sledování se pohybuje v rozmezí 3,6-8,1 roku), případně i nedostatečná velikost patientského souboru. Můžeme předpokládat, že vyšetření hladin anti-mCRP protilátek v pozdější době (např. po dvou letech od zahájení terapie) by mohlo tuto predikci výrazně zlepšit. Jedná se však o spekulaci, pro kterou nemáme dostatečné důkazy.

Dle našich znalostí nikdo neprováděl studii s dlouhodobým sledováním vlivu těchto protilátek na vývoj onemocnění, proto jsou naše data v tomto smyslu unikátní. Velmi překvapivé je identifikace nebývalé silných prediktorů ve druhém roce terapie.

Limitací naší studie byl menší soubor pacientů, nicméně vzhledem k vzácnosti tohoto onemocnění je velmi nesnadné soubor výrazně rozšířit. Dále pak absence rebiopsie, avšak pro rizika spojená s výkonem je téměř vyloučené toto vyšetření provádět bez dostatečného klinického důvodu. Výhodnější by bylo i analyzovat vzorky séra i v průběhu sledování, ta jsme však měli k dispozici jen u malé části pacientů. Vzhledem k velmi nadějným výsledkům této pilotní studie by v budoucnu bylo vhodné provést rozsáhlejší (multicentrickou) prospektivní studii, která by s definitivní platností potvrdila/vyvrátila užitečnost anti-mCRP protilátek v predikci odpovědi na terapii. Na jejím základě by bylo možno modifikovat doporučené postupy pro terapii SLE.

3.4. Závěry

V naší práci jsme našli anti-mCRP protilátky u pacientů s aktivitou LN (26,78 AU (7,5-89,38) vs 7,5 AU (7,5-30,57); $p=0,009$), zároveň korelovaly s aktivitou celkového onemocnění SLE, charakterizovaného SLEDAI ($r_s=0,406$, $p=0,002$).

Anti-mCRP byly zvýšeny u pacientů s anti-dsDNA pozitivitou, inverzně korelovaly se složkami komplementu. Anti-mCRP nekorelovaly s proteiny akutní fáze.

Zásadním nálezem bylo zjištění, že pozitivita těchto protilátek vstupně předznamenává horší odpověď na léčbu po dvou letech standardní terapie, OR (95% CI)=13,7 (1,22-770,87); $p=0,014$. Dalším rizikovým faktorem byla horší odpověď na terapii v prvním roce. Při vyšetření logistickou regresí přítomnost jediného z výše uvedených rizikových faktorů výrazně zvyšuje riziko nepříznivé odpovědi, OR (95%CI)=26,3 (2,2-308,7), $p=0,0094$. V případě, že pacient ponese oba rizikové faktory, bude (ve srovnání s pacientem bez rizikového faktoru) čelit více než padesátinásobnému riziku negativní odpovědi v druhém roce.

4. Účinnost dlouhodobé léčby cyklosporinem A a pulsním cyklofosfamidem u nemocných s proliferativními formami lupusové nefritidy. Vliv terapie na hladiny protilátek anti-C1q a antinukleosomů- 2.část práce

4.1. Pacienti a metody

CYCLOFA LUNE je multicentrická otevřená randomizovaná kontrolovaná studie srovnávající účinnost a snášenlivost léčby cyklosporinem A a pulsním cyklofosfamidem u pacientů s proliferativními formami LN (třída III a IV).

Od ledna 2002 do prosince 2006, bylo v sedmi klinických centrech v České Republice a na Slovensku, zařazeno 40 pacientů se SLE, splňující kritéria ACR [56] a nově diagnostikovanou proliferativní LN (biopticky prokázanou) dle světové zdravotnické organizace (WHO) [69] či ISN/RPS [57]. Zároveň pacienti v době zařazení splňovali laboratorní aktivitu onemocnění, jež byla definována jako alespoň 2 kritéria z následujících: proteinurie $>0,5\text{g/den}$, mikroskopická hematurie nebo C3 hypokomplementemie. Věková hranice pro zařazení byla 18-50 let.

Před zařazením do studie pacienti podepsali informovaný souhlas. Studie byla schválena lokálními etickými komisemi.

Zařazení nemohli být pacienti s předchozím užíváním CFA či CyA. Dalším z vylučovacích kritérií byla perzistentní elevace sérového kreatininu $>140 \mu\text{mol/l}$, nekontrolovaná hypertenze, těhotenství či kojení, cytopenie nemající vztah k základnímu onemocnění, dále koincidující závažná infekce, maligní onemocnění, závažné jaterní onemocnění a vředová choroba gastroduodena.

Randomizace do příslušných větví studie probíhala pomocí speciálního počítačového programu, prováděném centrálně v nepřetržitém 24 hodinovém provozu. Randomizace byla provedena do 48 hodin od provedení renální biopsie.

Doba studijní léčby trvala 18 měsíců, z toho 9 měsíců indukční terapie a 9 měsíců udržovací terapie.

větev 1 – CFA: pacienti obdrželi 8 pulzů i.v. (v dávce 10 mg/kg) v období 9 měsíců v prodlužujících se intervalech (2x po 3 týdnech, 4x po 4 týdnech, 2x po 6 týdnech), následovalo 4-5 p.o. pulzů (10mg/kg) v 6-8 týdenních intervalech.

větev 2- CyA: byl podáván kontinuálně p.o., v dávce 4-5 mg/kg/den po dobu 9 měsíců. Následně byla dávka snížena na 3,75-1,25 mg/kg/den po dobu dalších 9 měsíců.

Obě větve měly v kombinaci postupně se snižující udržovací dávku p.o. metylprednisolonu podávanou po dobu 18 měsíců. Vstupní dávka byla 0,8 mg/kg/den, během 8 týdnů se snížila na 0,2 mg/den, od 3 měsíce byla dávka 12 mg/den, od 5 měsíce 8mg/den, od 16 měsíce 4 mg/den.

Definice

Primárním cílem bylo navození remise onemocnění na konci indukční a udržovací fáze terapie.

Sekundárním cílem byla incidence nežádoucích účinků a další období bez exacerbací ledvinného onemocnění.

Kompletní remise- hladina sérového kreatininu v normálním rozmezí, se stabilními či zlepšenými hodnotami oproti vstupním a inaktivní močový sediment a normální hodnoty proteinurie ($<0,3\text{g}/24\text{h}$).

Odpověď na terapii- hladina sérového kreatininu v normálním rozmezí, se stabilními či zlepšenými hodnotami oproti vstupním a minimálně 50% redukce proteinurie, t.j. pod 3g/den, pokud byla vstupně nefrotická, nebo $<0,5\text{g}/\text{den}$, pokud nebyla vstupně nefrotická a negativní močový sediment *nebo* minimálně 25% zvýšení C3 hladiny komplementu.

Selhání léčby- definováno jako zhoršení renální funkce (zvýšení sérového kreatininu o 50 $\mu\text{mol/l}$) *nebo* perzistující nefrotická proteinurie ($>3,5\text{g}/\text{den}$) *nebo* nový či perzistující nefritický syndrom, splňující nejméně 3 z následujících kritérií: 33% vzestup sérového kreatininu, aktivní močový sediment, proteinurie $>0,5\text{g}/\text{den}$ *nebo* C3 hypokomplementemie.

Relaps- byl hodnocen na konci udržovací fáze (t.j. 18 měsíců terapie), definován stejně jako selhání léčby s tím, že podmínkou bylo dosažení odpovědi na terapii na konci indukční fáze. V dlouhodobém sledování byl relaps definován jako nová renální aktivita onemocnění vyžadující agresivnější imunosupresivní terapii.

V dlouhodobém sledování (po ukončení studijního protokolu) bylo renální zhoršení hodnoceno dvojstupňově. Jako vzestup sérového kreatininu o 50% či více nebo více než 100% oproti nejnižší hodnotě naměřené během studijního protokolu. Pokud bylo zdvojení sérového kreatininu zachyceno na konci obou studijních fází a současně při obou kontrolách po studii byla tato změna hodnocena jako trvalá.

ESRD bylo definováno jako zhoršení renální funkce vyžadující náhradu funkce ledvin (dialýzu či transplantaci).

Provedená vyšetření

Vyšetřované imunologické testy zahrnovaly zjištění přítomnosti cirkulujících autoprotilátek a to antinukleárních (ANA)-IF, anti-dsDNA (ELISA, Orgentec, Německo) a hodnoty C3 a C4 komponent komplementu (nefelometricky, Siemens, USA) na našem pracovišti – nebo jinými standardními laboratorními metodami jednotlivých pracovišť.

V imunologické laboratoři FN Olomouc byly stanoveny anti-C1q ELISA metodou (Buhlmann Laboratories, Švýcarsko) a antinukleosomy (Organtec Diagnostica GmbH, Německo). Tato vyšetření byla provedena dodatečně ze vzorků mražených sér.

Aktivita choroby klasifikována vyšetřujícím lékařem podle systému SLEDAI [58].

Po ukončení studijního protokolu byla provedena dvě vyhodnocení stavu pacientů, pomocí dotazníků zaslanych do jednotlivých klinických center, a to v dubnu 2009 a dubnu 2012. Analyzována byla data od pacientů, kteří byli sledováni více než 5 let od randomizace.

Zajímaly nás parametry renálních funkcí (hladiny sérového kreatininu, proteinurie, vyšetření močového sedimentu)

Součástí dotazníku bylo vyhodnocení vyšetření dlouhodobého poškození orgánů v závislosti na základním onemocnění pomocí Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index (SLICC/ARI DI).

Dále jsem vyhodnocovali nežádoucí účinky terapie: ESRD, úmrtí, maligní onemocnění, závažná kardiovaskulární onemocnění, komorbidity, zajímalo nás množství následných těhotenství či sterilita. Rovněž byla zaznamenána další imunosupresivní terapie kterou pacienti obdrželi.

Statistické zpracování

K porovnání mezi skupinami byl použit nepárový t-test v jednotlivých skupinách bylo provedeno srovnání za pomoci párového t-testu. Kategorické proměnné byly srovnány χ^2 a Fisher exact testem. Křivky přežití byly konstruovány pomocí Kaplan-Meierovy metody a statisticky testovány log-rank testem. Pacienti vyřazení během protokolu studie byli zařazeni do analýzy přežívání a účinnosti léčby.

Porovnání protilátek u jednotlivých skupin pomocí Mann-Whitney rank sum testu.

V prodlouženém sledování byla normálně rozložená data porovnána párovým t-testem, na ostatní byl použit Wilcoxon rank sum test.

4.2. Výsledky

Ze 40 pacientů M/Ž 11/29, průměrný věk 29 let (18-49), splňujících vstupní a vylučovací kritéria, bylo 21 pacientů randomizováno do větve léčené CFA a 19 do větve léčené CyA.

Nebyl rozdíl ve vstupních renálních a imunologických parametrech mezi skupinami, stejně tak byla srovnatelná i celková aktivita onemocnění hodnocena SLEDAI.

Během studie bylo ze studie vyřazeno 5 pacientů, z toho v průběhu prvních 9 měsíců terapie 2 pacienti. Jeden pacient byl z větve léčené CFA pro rychle se zhoršující renální insuficienci, progredující do ESRD. Druhý pacient byl z větve CyA, laboratorně došlo ke zhoršení proteinurie, močového sedimentu, bylo podezření na non-compliance s léčbou. Během udržovací fáze byli vyřazení další 3 pacienti, všichni z větve CFA. Dva pacienti pro nefritický

relaps s nutnou úpravou medikace, jeden pacient pro akutní projevy neurolopusu s nutnou intenzifikací terapie.

V první části dlouhodobého sledování (duben 2009) jsme obdrželi dotazník s informacemi o 38 pacientech, v další fázi (duben 2012) jsme získali detaily o průběhu onemocnění o 36 pacientech. Ze 4 ztracených pacientů jsme od 2 měli informace pokrývající dobu 5 let od randomizace, tedy jsme s nimi počítali i v dlouhodobém sledování.

Dávka CyA musela být redukována u 3 pacientů z důvodu přechodného zhoršení renálních funkcí. U dvou pacientů bylo nutno podat vyšší dávky metylprednisolonu i.v. pro extrarenální aktivitu. Dávka metylprednisolonu byla u ostatních pacientů v rozmezí povoleném protokolem.

Odpověď na terapii

Na konci indukční fáze na terapii odpovědělo 11 pacientů z CFA a 8 pacientů z CyA větve. Kompletní renální remise dosáhlo 5 pacientů v každé větvi. Na terapii neodpovědělo 7 pacientů z CFA a 3 pacienti z CyA větve, mezi skupinami nebyly statisticky významné rozdíly. Tři pacienti z CFA větve a 7 pacientů z CyA nesplnili kriteria pro dobrý ani špatný výstup.

Na konci udržovací fáze terapie odpovědělo na terapii 8 pacientů z CFA větve a 11 z CyA větve, kriteria pro remisi splňovali 3 pacienti z CFA a 7 pacientů z CyA větve. Léčba selhala u 7 pacientů z CFA a 3 pacientů z CyA větve. Sedm pacientů z CFA a 5 pacientů z CyA nesplnili kriteria pro odpověď ani selhání léčby.

Na konci indukční fáze bylo ve skupině léčené CFA významné zlepšení sérového kreatininu ($p=0,02$). Na konci udržovací terapie tento rozdíl již významný nebyl. Naopak ve větvi léčené CyA mělo více pacientů absenci proteinurie na konci studijního protokolu ($p=0,02$).

Dynamika laboratorních změn v průběhu terapie

V průběhu prvních šesti týdnů proteinurie poklesla a hladina sérového albuminu vzestoupila v obou studijních větvích. Po 3 měsících se clearance kreatininu se zlepšila pouze ve větvi léčené CFA ($p=0,006$). Ve stejné době hladina sérového kreatininu vzestoupila ve skupině léčené CyA ($p=$, po této době již byla zvýšena pouze nesignifikantně. Na konci indukční fáze byla průměrná hladina sérového kreatininu signifikantně snížena ($p=0,03$) a glomerulární filtrace zvýšena ve větvi léčené CFA ($p=0,04$). Ve skupině léčené CyA byla snížena v tomto časovém horizontu snížena signifikantně proteinurie ($p=0,01$).

Na konci indukční terapie, při porovnání obou skupin, nebyl rozdíl v hladinách složky komplementu C3. Stejně tak se nelišily obě skupiny v počtu pacientů s hladinami C3 v normálním referenčním rozmezí na konci obou fází sledování.

Nebyl rozdíl mezi skupinami co se týče počtu pacientů s anti-dsDNA negativitou na konci 9 a 18 měsíce sledování.

Mezi oběma větvemi studie (CFA vs. CyA) nebyl statisticky významný rozdíl, co se týče vývoje hladin protilátek anti-C1q, vstupně 169,1 vs 201,9 IU/ml, po 9 měsících terapie 142,8 vs 136,8 IU/ml, po 18. měsících léčby 167 vs 169 IU/ml.

Dále byly měřeny hodnoty antinukleosomů, vstupně 80,6 vs 131,1 IU/ml, po 9 měsících terapie 82,0 vs 100,7 IU/ml a po 18 měsících 88,6 vs 120,8 IU/ml, ani zde nebyl mezi skupinami významný rozdíl.

Byla nalezena korelace mezi hladinami anti-C1q a antinukleosomy ($r_s = 0,68$; $p < 0,001$).

Nežádoucí účinky terapie

Jednou z našich hypotéz bylo, že terapie CyA bude méně toxická než CFA.

U 3 pacientů léčených CyA byla pozorována přechodná elevace sérového kreatininu, která se upravila po snížení dávky léku. Dále bylo pozorováno přechodné zvýšení systolického krevního tlaku ve skupině léčené CyA oproti CFA. Tento vzestup byl statisticky významný v době od 6 týdnů do 4,5 měsíců od začátku léčby, po půl roce léčby hodnoty krevního tlaku poklesly na vstupní hodnoty a nebyl rozdíl mezi oběma sledovanými skupinami. Krevní tlak byl korigován antihypertenzní medikací u všech pacientů. V průběhu studie bylo množství antihypertenziv vyšší ve skupině léčené CyA (1,5 vs 0,7 antihypertenziv/osobu, $p=0,7$), jinak rozdíl nebyl ani před léčbou ani po léčbě. U jednoho pacienta z větve CyA byly pozorovány generalizované křeče (3 dny po zahájení léčby). U jiného pacienta z této skupiny byla pozorována tranzienční ischemická příhoda (3 měsíce od zahájení terapie). Oba pacienti zůstali bez následků. Tyto příhody nebyly považovány za spojené s terapií. Incidence infekčních komplikací a leukopenie byly srovnatelné v obou skupinách. Ve skupině léčené CFA byl popsán jeden případ perzistentní amenorhey. Žádný pacient neměl hemoragickou cystitidu.

Prodloužené sledování

Průměrná doba sledování byla 7,7 let (rozmezí 5-10,3), sledované parametry se signifikantně nelišily mezi jednotlivými skupinami. Ze sledovaných parametrů: 50% zvýšení koncentrace sérového kreatininu, zdvojení a setrvalé zdvojení sérového kreatininu či progresse do renálního selhání nebyl rozdíl mezi oběma terapeutickými skupinami.

V každé skupině byl jeden pacient s ESRD, oba podstoupili úspěšnou transplantaci ledviny – úoba tito pacienti nedokončili protokol studie).

Většina pacientů se ještě v době prodlouženého sledování léčila alespoň kortikoidy, někteří i kombinovanou imunosupresivní léčbou (AZA, CyA, MMF, CFA, RTX). Po dokončení studijního protokolu či po vyloučení studie v průběhu protokolu obdrželi pacienti median 1 imunosupresivní látku. Na konci sledování bylo 47% pacientů z CFA větve vs 68% z CyA větve léčeno antihypertenzní terapií. Ve většině případů (53% všech pacientů) se jednalo o inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEI) či blokátory receptoru pro angiotenzin II (ARB). Nebyl rozdíl mezi skupinami v chronickém poškození orgánů hodnoceno SLICC DI.

U dvou pacientů z CyA skupiny byla zjištěna malignita. Jednalo se o maligní melanom, bez generalizace (5 let od randomizace), v druhém případě šlo o duktální karcinom mammy (8 let od randomizace). V CFA skupině byl popsán jeden případ předčasné menopauzy a jednou šlo o tranzitorní ischemickou ataku. Nebyl rozdíl mezi skupinami v renálních a non-renálních bezpečnostních výstupech.

4.3. Diskuze

CYCLOFA LUNE byla první randomizovanou studií využívající CyA jako terapii první volby v indukci remise u pacientů s proliferativními formami LN (třída III a IV). Dříve se léčba CyA objevila v randomizovaných studiích v jiných indikacích, např. u membranozní LN [70] nebo jako udržovací terapie difuzní LN [71]. Některé skupiny, včetně našeho pracoviště, publikovaly již dříve data o pacientech s LN a touto terapií v rámci nerandomizovaných studií [72-75].

V naší studii byl CyA minimálně stejně tak účinný jako CFA co se týče navození a udržení odpovědi, resp. remise.

Ve skupině léčené CyA jsme na konci indukční fáze pozorovali přechodné zhoršení renálních parametrů (vzestup sérového kreatininu, pokles GFR). Tento nález byl celkem nepřekvapivý vzhledem ke známému vasokonstriktivnímu účinku CyA na renální arterie, a tím způsobeným vzestupem krevního tlaku a poklesu renálních funkcí [76]. Avšak po snížení dávek CyA v udržovací fázi terapie již tato deteriorace renálních funkcí nebyla pozorována. Navíc pouze jeden pacient z větve CyA a 2 pacienti z CFA skupiny měli zhoršení sérového kreatininu o více než 50 $\mu\text{mol/l}$.

Na konci indukční fáze byla průměrná proteinurie signifikantně nižší v CyA skupině a téměř 2x více pacientů z CyA větve dosáhlo na konci indukce normálních hodnot proteinurie v porovnání s CFA skupinou ($p=0,06$), na konci udržovací fáze pak většina pacientů z CyA větve měla absenci proteinurie ($p=0,02$). I když je nutné podotknout, že ve skupině léčené CFA byly vstupní hodnoty proteinurie nesignifikantně vyšší.

Nebyl rozdíl mezi skupinami ve vývoji hladin sledovaných protilátek, anti-C1q a antinukleosomů, které na konci indukční fáze v obou skupinách poklesly, na konci sledování opět vzestoupily. Zdá se, že zvolený typ imunosupresivní terapie na vývoj protilátek neměl vliv. V této studii jsme nepotvrdili nálezy jiných autorů, kteří pozorovali snížení hladin anti-C1q při snížení aktivity onemocnění [28].

CyA byl podobně efektivní jako CFA co se týče zlepšení nálezů močového sedimentu, sérového albuminu a ovlivnění serologických markerů. Tato velmi slibná data se potvrdila i v dlouhodobém sledování, nicméně tam vzhledem k nedostatečné regulaci terapie (retrospektivní sledování) nelze vyloučit určité zkreslení výstupů. Zajímavé by bylo ještě delší sledování k posouzení dlouhodobé suprese renální aktivity onemocnění.

Navzdory našim očekáváním se nezdálo, že by terapie CyA byla spojena s menším množstvím nežádoucích účinků. Nicméně náš soubor pacientů byl pravděpodobně příliš malý k dosažení takových závěrů. Jak jsme předpokládali, ve skupině léčené CyA bylo pozorováno ve větším množství zvýšení krevního tlaku s nutností užívání intenzivnější antihypertenzní terapie. Toto bylo pozorováno zejména v prvních měsících terapie, kdy byly dávky CyA nejvyšší. Dále pak byl popsán po jeden případ transientní ischemické ataky a jeden případ generalizovaných křečí, které sice nebyly připisovány terapii CyA, ale teoreticky mohou být způsobeny endotelovým poškozením vyvolaným CyA či elevací krevního tlaku. Více pacientů vstupně léčených CyA bylo až do poslední kontroly léčeno antihypertenzní terapií.

Relativně nízká frekvence nežádoucích účinků způsobenou toxicitou CFA mohla být způsobena nižší dávkou CFA v porovnání s dávkami užívanými dle protokolů NIH (National Institute of Health) [77] a rovněž byli vyloučeni pacienti s předchozím užíváním CFA, což snižuje jeho kumulativní dávku. CyA se zdá být bezpečnější variantou zejména z hlediska gonadotoxicity CFA a výskytu SLE a LN především v populaci mladých žen v reprodukčním věku [78]. Nicméně v našem dlouhodobém sledování měla předčasnou amenorheu pouze jedna pacientka z této skupiny a dokonce více pacientek po dokončení protokolu otěhotnělo ve větvi CFA. Zajímavé je, že obě popisované malignity se vyskytly ve větvi léčené CyA.

Během studie žádný pacient nezemřel. Avšak na konci sledování nemáme informace o 4 pacientech. Incidence leukopenie a infekčních komplikací se nelišila mezi oběmi skupinami.

V dlouhodobém sledování jsme posuzovali i kumulativní chronické poškození, které bylo poměrně malé a mezi skupinami se nelišilo.

K posouzení odpovědi na terapii jsme 40 pacientů vyhodnocovali v dlouhodobém sledování počet relapsů a dlouhodobý renální výstup. Mezi skupinami nebyl rozdíl, co se týče frekvence relapsů, v analýze přežití - doby bez relapsu, nebyl rozdíl ani renálními parametry. Dále jsme

sledovali následující terapii, po ukončení protokolu, ani zde nebyly odlišnosti v terapii, ani v dávkách kortikoidů. Relapsy byly většinou léčeny zvýšením dávek kortikoidů anebo i.v. pulsy CFA, řidčeji MMF či CyA. I když se mezi skupinami terapie nelišily, je možné, že výběr terapie měl na výsledek vliv.

Přesto, že žádný z rozdílů mezi skupinami nebyl signifikantní, se zdá, že naše data podporují výstupy studie Euro-Lupus [79], která považuje terapii nižšími dávkami CFA za relativně bezpečnou.

Dalo by se říci, že jednou z limitací naší studie bylo omezené spektrum pacientů. Zařazení byli převážně bílé rasy, mající maximálně mírnou renální insuficienci. Tato restrikce byla provedena z důvodu potenciální renální toxicity CyA. Laboratorní vyšetření byla prováděna v jednotlivých zúčastněných centrech, proto byla data mezi sebou hůře srovnatelná, pro rozdíl v metodice, byla některá vyšetření hodnocena semikvitativně (např. anti-dsDNA, vyšetření močového sedimentu). Hodnocení dlouhodobého výstupu bylo prováděno retrospektivně a proto mohlo být ovlivněno terapií, která nebyla po ukončení studijního protokolu jasně definována. Studijní protokol byl vytvořen v roce 2000, proto definice výstupů naší studie, inspirované kritérii dle Boumpase [80], neodpovídají současným doporučením renomovaných revmatologických a nefrologických společností. Naše kritéria byla poměrně přísná, co se týče definování remise, kde byla vyžadována naprostá normalizace močového nálezu, mírnější bylo hodnocení odpovědi na terapii splňující alespoň částečné zlepšení některých parametrů (proteinurie, močového sedimentu, složky C3 komplementu).

Jistou nevýhodou bylo i alternativní podávání p.o. CFA pulzů v udržovací fázi terapie, což zřejmě není tak účinné jako i.v. forma.

Dále dlouhodobé hodnocení bylo provedeno retrospektivně, v dvou časových průřezích, lepší variantou by bylo jistě dlouhodobé prospektivní sledování.

4.4. Závěr:

V této randomizované studii se 40 zařazenými pacienty s proliferativními formami LN, kavkazské rasy, byl v dosažení primárních i sekundárních cílů CyA podobně efektivní jako CFA. Je zřejmé, že terapie CyA by neměla být používána u pacientů s arteriální hypertenzí a pokročilou renální insuficiencí. Zdá se, že terapie CyA může být srovnatelnou alternativou pro terapii proliferativních forem LN, zejména pak tam, kde jiná léčba je nevhodná, či selhala. V dlouhodobém sledování byl poměrně malý záchyť závažných nežádoucích účinků terapie a nebyl rozdíl v jejich výskytu mezi skupinami. Nebyl rozdíl mezi skupinami ve vývoji hladin komplementu, ani vybraných autoprotílátek, t.j. anti-C1q a antinukleosomů, je zde naznačen trend k poklesu protílátek po terapii, ale přesto u většiny pacientů zůstávají jejich hladiny elevované. Zdá se, že výběr imunopresivní terapie na jejich dynamiku neměl vliv.

5. Použitá literatura

1. Moss KE, Ioannou Y, Sultan SM, Haq I, Isenberg DA: **Outcome of a cohort of 300 patients with systemic lupus erythematosus attending a dedicated clinic for over two decades.** *Ann Rheum Dis* 2002, **61**(5):409-413.
2. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Domenech I, Aydintug AO, Jedryka-Goral A, de Ramon E *et al*: **Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus.** *Medicine (Baltimore)* 1993, **72**(2):113-124.
3. Doria A, Zen M, Canova M, Bettio S, Bassi N, Nalotto L, Rampudda M, Ghirardello A, Iaccarino L: **SLE diagnosis and treatment: when early is early.** *Autoimmun Rev*, **10**(1):55-60.
4. Cutolo M, Capellino S, Sulli A, Serioli B, Secchi ME, Villaggio B, Straub RH: **Estrogens and autoimmune diseases.** *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1089**:538-547.
5. Hochberg MC, Petri M: **Clinical features of systemic lupus erythematosus.** *Curr Opin Rheumatol* 1993, **5**(5):575-586.
6. Citera G, Wilson WA: **Ethnic and geographic perspectives in SLE.** *Lupus* 1993, **2**(6):351-353.
7. Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA: **The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth.** *Arthritis Rheum* 1995, **38**(4):551-558.
8. Tan EM: **Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology.** *Adv Immunol* 1989, **44**:93-151.
9. Clatworthy MR, Smith KG: **B cells in glomerulonephritis: focus on lupus nephritis.** *Semin Immunopathol* 2007, **29**(4):337-353.
10. Bigler C, Schaller M, Perahud I, Osthoff M, Trendelenburg M: **Autoantibodies against complement C1q specifically target C1q bound on early apoptotic cells.** *J Immunol* 2009, **183**(5):3512-3521.
11. Mevorach D: **Clearance of dying cells and systemic lupus erythematosus: the role of C1q and the complement system.** *Apoptosis*, **15**(9):1114-1123.
12. Clemenceau S, Castellano F, Montes de Oca M, Kaplan C, Danon F, Levy M: **C4 null alleles in childhood onset systemic lupus erythematosus. Is there any relationship with renal disease?** *Pediatr Nephrol* 1990, **4**(3):207-212.
13. Agnello V: **Complement deficiency states.** *Medicine (Baltimore)* 1978, **57**(1):1-23.
14. Roberts JL, Schwartz MM, Lewis EJ: **Hereditary C2 deficiency and systemic lupus erythematosus associated with severe glomerulonephritis.** *Clin Exp Immunol* 1978, **31**(2):328-338.
15. Petri M, Orbai AM, Alarcon GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, Bruce IN, Isenberg D, Wallace DJ, Nived O *et al*: **Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum*, **64**(8):2677-2686.
16. Cameron JS: **Clinical manifestation of lupus nephritis.** Oxford: *Oxford University Press*; 2001.
17. Doria A, Iaccarino L, Ghirardello A, Zampieri S, Arienti S, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Piccoli A, Todesco S: **Long-term prognosis and causes of death in systemic lupus erythematosus.** *Am J Med* 2006, **119**(8):700-706.
18. Cameron JS: **Lupus nephritis.** *J Am Soc Nephrol* 1999, **10**(2):413-424.
19. Hill GS, Delahousse M, Nochy D, Mandet C, Bariety J: **Proteinuria and tubulointerstitial lesions in lupus nephritis.** *Kidney Int* 2001, **60**(5):1893-1903.
20. Bertsias GK, Salmon JE, Boumpas DT: **Therapeutic opportunities in systemic lupus erythematosus: state of the art and prospects for the new decade.** *Ann Rheum Dis*, **69**(9):1603-1611.
21. Kurien BT, Scofield RH: **Autoantibody determination in the diagnosis of systemic lupus erythematosus.** *Scand J Immunol* 2006, **64**(3):227-235.
22. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A: **Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes.** *J Exp Med* 1994, **179**(4):1317-1330.
23. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR: **Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**(7):1241-1250.
24. Mannik M, Wener MH: **Deposition of antibodies to the collagen-like region of C1q in renal glomeruli of patients with proliferative lupus glomerulonephritis.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**(8):1504-1511.
25. Trouw LA, Groeneveld TW, Seelen MA, Duijs JM, Bajema IM, Prins FA, Kishore U, Salant DJ, Verbeek JS, van Kooten C *et al*: **Anti-C1q autoantibodies deposit in glomeruli but are only**

- pathogenic in combination with glomerular C1q-containing immune complexes. *J Clin Invest* 2004, **114**(5):679-688.**
26. Bijl M, Limburg PC, Kallenberg CG: **New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE): the role of apoptosis.** *Neth J Med* 2001, **59**(2):66-75.
 27. Trendelenburg M, Courvoisier S, Spath PJ, Moll S, Mihatsch M, Itin P, Schifferli JA: **Hypocomplementemic urticarial vasculitis or systemic lupus erythematosus?** *Am J Kidney Dis* 1999, **34**(4):745-751.
 28. Trendelenburg M, Lopez-Trascasa M, Potlukova E, Moll S, Regenass S, Fremeaux-Bacchi V, Martinez-Ara J, Jancova E, Picazo ML, Honsova E *et al*: **High prevalence of anti-C1q antibodies in biopsy-proven active lupus nephritis.** *Nephrol Dial Transplant* 2006, **21**(11):3115-3121.
 29. Moroni G, Radice A, Giammarresi G, Quaglini S, Gallelli B, Leoni A, Li Vecchi M, Messa P, Sinico RA: **Are laboratory tests useful for monitoring the activity of lupus nephritis? A 6-year prospective study in a cohort of 228 patients with lupus nephritis.** *Ann Rheum Dis* 2009, **68**(2):234-237.
 30. Pickering MC, Botto M: **Are anti-C1q antibodies different from other SLE autoantibodies?** *Nat Rev Rheumatol*, **6**(8):490-493.
 31. Marto N, Bertolaccini ML, Calabuig E, Hughes GR, Khamashta MA: **Anti-C1q antibodies in nephritis: correlation between titres and renal disease activity and positive predictive value in systemic lupus erythematosus.** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**(3):444-448.
 32. Moroni G, Trendelenburg M, Del Papa N, Quaglini S, Raschi E, Panzeri P, Testoni C, Tincani A, Banfi G, Balestrieri G *et al*: **Anti-C1q antibodies may help in diagnosing a renal flare in lupus nephritis.** *Am J Kidney Dis* 2001, **37**(3):490-498.
 33. Siegert CE, Daha MR, Tseng CM, Coremans IE, van Es LA, Breedveld FC: **Predictive value of IgG autoantibodies against C1q for nephritis in systemic lupus erythematosus.** *Ann Rheum Dis* 1993, **52**(12):851-856.
 34. Siegert CE, Kazatchkine MD, Sjoholm A, Wurznner R, Loos M, Daha MR: **Autoantibodies against C1q: view on clinical relevance and pathogenic role.** *Clin Exp Immunol* 1999, **116**(1):4-8.
 35. Bell SA, Faust H, Schmid A, Meurer M: **Autoantibodies to C-reactive protein (CRP) and other acute-phase proteins in systemic autoimmune diseases.** *Clin Exp Immunol* 1998, **113**(3):327-332.
 36. Berden JH: **Lupus nephritis.** *Kidney Int* 1997, **52**(2):538-558.
 37. Zouki C, Haas B, Chan JS, Potempa LA, Filep JG: **Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with promotion of neutrophil-endothelial cell adhesion.** *J Immunol* 2001, **167**(9):5355-5361.
 38. Motie M, Brockmeier S, Potempa LA: **Binding of model soluble immune complexes to modified C-reactive protein.** *J Immunol* 1996, **156**(11):4435-4441.
 39. Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW: **The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II.** *J Exp Med* 1999, **190**(4):585-590.
 40. Sjowall C, Wettero J, Bengtsson T, Askendal A, Almroth G, Skogh T, Tengvall P: **Solid-phase classical complement activation by C-reactive protein (CRP) is inhibited by fluid-phase CRP-C1q interaction.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **352**(1):251-258.
 41. Mihlan M, Blom AM, Kupreishvili K, Lauer N, Stelzner K, Bergstrom F, Niessen HW, Zipfel PF: **Monomeric C-reactive protein modulates classic complement activation on necrotic cells.** *FASEB J*, **25**(12):4198-4210.
 42. Yang XW, Tan Y, Yu F, Zhao MH: **Interference of antimodified C-reactive protein autoantibodies from lupus nephritis in the biofunctions of modified C-reactive protein.** *Hum Immunol*, **73**(2):156-163.
 43. Sjowall C, Zickert A, Skogh T, Wettero J, Gunnarsson I: **Serum levels of autoantibodies against C-reactive protein correlate with renal disease activity and response to therapy in lupus nephritis.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**(6):R188.
 44. Tan Y, Yu F, Yang H, Chen M, Fang Q, Zhao MH: **Autoantibodies against monomeric C-reactive protein in sera from patients with lupus nephritis are associated with disease activity and renal tubulointerstitial lesions.** *Hum Immunol* 2008, **69**(12):840-844.
 45. Kresl JJ, Potempa LA, Anderson BE: **Conversion of native oligomeric to a modified monomeric form of human C-reactive protein.** *Int J Biochem Cell Biol* 1998, **30**(12):1415-1426.
 46. Sjowall C, Wettero J: **Pathogenic implications for autoantibodies against C-reactive protein and other acute phase proteins.** *Clin Chim Acta* 2007, **378**(1-2):13-23.
 47. Rees RF, Gewurz H, Siegel JN, Coon J, Potempa LA: **Expression of a C-reactive protein neoantigen (neo-CRP) in inflamed rabbit liver and muscle.** *Clin Immunol Immunopathol* 1988, **48**(1):95-107.

48. Jabs WJ, Logering BA, Gerke P, Kreft B, Wolber EM, Klinger MH, Fricke L, Steinhoff J: **The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo.** *Eur J Immunol* 2003, **33**(1):152-161.
49. Diehl EE, Haines GK, 3rd, Radosevich JA, Potempa LA: **Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue.** *Am J Med Sci* 2000, **319**(2):79-83.
50. Sjowall C, Bengtsson AA, Sturfelt G, Skogh T: **Serum levels of autoantibodies against monomeric C-reactive protein are correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Res Ther* 2004, **6**(2):R87-94.
51. Figueredo MA, Rodriguez A, Ruiz-Yague M, Romero M, Fernandez-Cruz A, Gomez-de la Concha E, Patino R: **Autoantibodies against C-reactive protein: clinical associations in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome.** *J Rheumatol* 2006, **33**(10):1980-1986.
52. Sjowall C, Olin AI, Skogh T, Wettero J, Morgelin M, Nived O, Sturfelt G, Bengtsson AA: **C-reactive protein, immunoglobulin G and complement co-localize in renal immune deposits of proliferative lupus nephritis.** *Autoimmunity*, **46**(3):205-214.
53. Zuniga R, Markowitz GS, Arkachaisri T, Imperatore EA, D'Agati VD, Salmon JE: **Identification of IgG subclasses and C-reactive protein in lupus nephritis: the relationship between the composition of immune deposits and FCgamma receptor type IIA alleles.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**(2):460-470.
54. Nakahara C, Kanemoto K, Saito N, Oyake Y, Kamoda T, Nagata M, Matsui A: **C-reactive protein frequently localizes in the kidney in glomerular diseases.** *Clin Nephrol* 2001, **55**(5):365-370.
55. Sjowall C, Eriksson P, Almer S, Skogh T: **Autoantibodies to C-reactive protein is a common finding in SLE, but not in primary Sjogren's syndrome, rheumatoid arthritis or inflammatory bowel disease.** *J Autoimmun* 2002, **19**(3):155-160.
56. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ: **The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 1982, **25**(11):1271-1277.
57. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE, Bruijn JA, Cook T, Ferrario F *et al*: **The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited.** *J Am Soc Nephrol* 2004, **15**(2):241-250.
58. Hawker G, Gabriel S, Bombardier C, Goldsmith C, Caron D, Gladman D: **A reliability study of SLEDAI: a disease activity index for systemic lupus erythematosus.** *J Rheumatol* 1993, **20**(4):657-660.
59. Gordon C, Jayne D, Pusey C, Adu D, Amoura Z, Aringer M, Ballerin J, Cervera R, Calvo-Alen J, Chizzolini C *et al*: **European consensus statement on the terminology used in the management of lupus glomerulonephritis.** *Lupus* 2009, **18**(3):257-263.
60. Rosenau BJ, Schur PH: **Antibodies to C reactive protein.** *Ann Rheum Dis* 2006, **65**(5):674-676.
61. Vlahakos DV, Foster MH, Adams S, Katz M, Ucci AA, Barrett KJ, Datta SK, Madaio MP: **Anti-DNA antibodies form immune deposits at distinct glomerular and vascular sites.** *Kidney Int* 1992, **41**(6):1690-1700.
62. Bootsma H, Spronk PE, Ter Borg EJ, Hummel EJ, de Boer G, Limburg PC, Kallenberg CG: **The predictive value of fluctuations in IgM and IgG class anti-dsDNA antibodies for relapses in systemic lupus erythematosus. A prospective long-term observation.** *Ann Rheum Dis* 1997, **56**(11):661-666.
63. Mortensen ES, Rekvig OP: **Nephritogenic potential of anti-DNA antibodies against necrotic nucleosomes.** *J Am Soc Nephrol* 2009, **20**(4):696-704.
64. Trendelenburg M: **Antibodies against C1q in patients with systemic lupus erythematosus.** *Springer Semin Immunopathol* 2005, **27**(3):276-285.
65. Tesar V, Hruskova Z: **Treatment of proliferative lupus nephritis: a slowly changing landscape.** *Nat Rev Nephrol*, **7**(2):96-109.
66. Enocsson H, Sjowall C, Skogh T, Eloranta ML, Ronnblom L, Wettero J: **Interferon-alpha mediates suppression of C-reactive protein: explanation for muted C-reactive protein response in lupus flares?** *Arthritis Rheum* 2009, **60**(12):3755-3760.
67. Ji SR, Wu Y, Zhu L, Potempa LA, Sheng FL, Lu W, Zhao J: **Cell membranes and liposomes dissociate C-reactive protein (CRP) to form a new, biologically active structural intermediate: mCRP(m).** *FASEB J* 2007, **21**(1):284-294.
68. Hay EM, Bacon PA, Gordon C, Isenberg DA, Maddison P, Snaith ML, Symmons DP, Viner N, Zoma A: **The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus.** *Q J Med* 1993, **86**(7):447-458.
69. Churg JS, L.H.: **Renal Disease: Classification and Atlas of Glomerular Disease.** 1982.

70. Austin HA, 3rd, Illei GG, Braun MJ, Balow JE: **Randomized, controlled trial of prednisone, cyclophosphamide, and cyclosporine in lupus membranous nephropathy.** *J Am Soc Nephrol* 2009, **20**(4):901-911.
71. Moroni G, Doria A, Mosca M, Alberighi OD, Ferraccioli G, Todesco S, Manno C, Altieri P, Ferrara R, Greco S *et al*: **A randomized pilot trial comparing cyclosporine and azathioprine for maintenance therapy in diffuse lupus nephritis over four years.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2006, **1**(5):925-932.
72. Dostal C, Tesar V, Rychlik I, Zabka J, Vencovsky J, Bartunkova J, Stejskalova A, Tegzova D: **Effect of 1 year cyclosporine A treatment on the activity and renal involvement of systemic lupus erythematosus: a pilot study.** *Lupus* 1998, **7**(1):29-36.
73. Rihova Z, Vankova Z, Maixnerova D, Dostal C, Jancova E, Honsova E, Merta M, Rysava R, Tesar V: **Treatment of lupus nephritis with cyclosporine - an outcome analysis.** *Kidney Blood Press Res* 2007, **30**(2):124-128.
74. Manger K, Kalden JR, Manger B: **Cyclosporin A in the treatment of systemic lupus erythematosus: results of an open clinical study.** *Br J Rheumatol* 1996, **35**(7):669-675.
75. Tam LS, Li EK, Leung CB, Wong KC, Lai FM, Wang A, Szeto CC, Lui SF: **Long-term treatment of lupus nephritis with cyclosporin A.** *QJM* 1998, **91**(8):573-580.
76. Hansen JM, Fogh-Andersen N, Christensen NJ, Strandgaard S: **Cyclosporine-induced hypertension and decline in renal function in healthy volunteers.** *J Hypertens* 1997, **15**(3):319-326.
77. Houssiau FA, Vasconcelos C, D'Cruz D, Sebastiani GD, Garrido Ed Ede R, Danieli MG, Abramovicz D, Blockmans D, Mathieu A, Direskeneli H *et al*: **Immunosuppressive therapy in lupus nephritis: the Euro-Lupus Nephritis Trial, a randomized trial of low-dose versus high-dose intravenous cyclophosphamide.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**(8):2121-2131.
78. Katsifis GE, Tzioufas AG: **Ovarian failure in systemic lupus erythematosus patients treated with pulsed intravenous cyclophosphamide.** *Lupus* 2004, **13**(9):673-678.
79. Houssiau FA, Vasconcelos C, D'Cruz D, Sebastiani GD, de Ramon Garrido E, Danieli MG, Abramovicz D, Blockmans D, Cauli A, Direskeneli H *et al*: **The 10-year follow-up data of the Euro-Lupus Nephritis Trial comparing low-dose and high-dose intravenous cyclophosphamide.** *Ann Rheum Dis*, **69**(1):61-64.
80. Boumpas DT, Balow JE: **Outcome criteria for lupus nephritis trials: a critical overview.** *Lupus* 1998, **7**(9):622-629.

6. Seznam publikací

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

Zavada J*, Pesickova S*, Rysava R, Olejarova M, Horak P, Hrcir Z, Havrda M, Vitova J, Lukac J, Rovensky J, Tegzova D, Bohmova J, Zadrazil J, Hana J, Dostal C, Tesar V. Cyclosporine A or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis:the CYCLOFA-LUNE study. *Lupus* 2010;19(11):1281-9 **IF: 2,783**

Zavada J, Pesickova SS, Rysava R, Horak P, Hrcir Z, Lukac J, Rovensky J, Vitova J, Havrda M, Rychlik I, Bohmova J, Vlasakova V, Slatinska J, Zadrazil J, Olearova M, Tegzova D, Tesar V. Extended follow-up of the CYCLOFA-LUNE trial comparing two sequential induction and maintenance treatment regimens for proliferative lupus nephritis based on cyclophosphamide or on cyclosporine A. *Lupus* 2014; 23(1):69-74 **IF: 2,783**

Pesickova SS, Rysava R, Lenicek M, Vitek I, Potlukova E, Hruskova Z, Jancova E, Honsova E, Zavada J, Trendelenburg M, Tesar V. Prognostic value of anti-mCRP antibodies in lupus nephritis. Odesláno do časopisu.

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

Vitek L, Muchova L, Jancova E, Pesickova S, Tegzova D, Peterova V, Pavelka K, Tesar V. Association of systemic lupus erythematosus with low serum bilirubin levels. *Scand J Rheumatol* 2010;39(6):480-4 **IF: 2,216**

Potlukova E, Jiskra J, Freiberger T, Limanova Z, Zivorova D, Malickova K, Springer D, Grodecka L, Antosova M, Telicka Z, Pesickova SS, Trendelenburg M. The production of mannan-binding lectin is dependent upon thyroid hormones regardless of the genotype: a cohort study of 95 patients with autoimmune thyroid disorders. *Clin Immunol.* 2010;136(1):123-9 **IF: 3,382**

Fojtikova M, Novota P, Cejkova P, Pesickova S, Tegzova D, Cerna M. HLA class II, MICA and PRL gene polymorphisms:the common contribution to the systemic lupus erythematosus development in Czech population. *Rheumatol Int* 2011;31(9):1195-201 **IF: 2,214**

Koenig KF, Groeschl I, Pesickova SS, Tesar V, Eisenberger U, Trendelenburg M. Serum cytokine profile in patients with active lupus nephritis. *Cytokine*, 2012;60(2):410-6 **IF: 2,518**

*považováni za první spoluautory