

Możliwości wykorzystania immunoterapii w leczeniu grzybic

Immunotherapy in the treatment of mycoses

BARBARA MODRZEWSKA, PIOTR KURNATOWSKI

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Zarażenia grzybami z rodzajów: *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Mucor* i *Rhizopus*, powszechnie występującymi w środowisku oraz mogącymi zagrażać życiu pacjentów z obniżoną odpornością, stanowią stały problem terapeutyczny dla lekarzy różnych specjalności. W dobie narastającej oporności powyższych patogenów na stosowane leki, pojawiła się koncepcja wykorzystania immunoterapii jako metody eliminującej grzyby z organizmu człowieka. Różni autorzy potwierdzają skuteczność takiego sposobu leczenia, zwłaszcza jako kuracji łączonej z podawanymi preparatami przeciwgrzybiczymi. W pracy zestawiono dane na ten temat.

Słowa kluczowe: immunoterapia, CSF, IFN γ , IL, grzyby chorobotwórcze

Infections caused by fungal species such as *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Mucor* and *Rhizopus* commonly occurring in the environment and possibly fatal for immunosuppressed patients continue to be a therapeutic issue for physicians of various specialties. Increasing resistance of these pathogens to therapeutic agents has resulted in developing the concept of immunotherapy as a method for eliminating fungal pathogens from the human organism. Various authors confirm the efficacy of this type of treatment, especially in combination with simultaneous administration of antimycotic drugs. Data are presented that support the feasibility of using immune system stimulating agents in treatment of mycoses.

Key words: immunotherapy, CSF, IFN γ , IL, pathogenic fungi

© Otorinolaryngologia 2010, 9(3): 103-111

www.mediton.pl/orl

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej UM w Łodzi
ul. pl. Hallera 1, 90-647 Łódź
tel. 042 639 33 70, faks 042 639 33 71; e-mail: barbara.mo-
drzevska@umed.lodz.pl

Wstęp

Większość gatunków grzybów potencjalnie chorobotwórczych występuje kosmopolitycznie. W naszej strefie klimatycznej najczęściej inwazje wywołane są przez grzyby z rodzajów: *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Mucor* i *Rhizopus*.

Grzyby z rodzaju *Candida* mogą zajmować wszystkie tkanki i narządy człowieka, powodując infekcje powierzchniowe, narządowe i uogólnione. Poszczególne gatunki bezobjawowo występują na skórze, w jamie ustnej, przewodzie pokarmowym i pochwie, natomiast w inwazjach objawowych wykrywano je ponadto w układzie oddechowym, narządach płciowych i moczowych, tkance podskórnej, paznokciach, spojówkach, kanalikach łzowych, gałce ocznej, przewodzie słuchowym zewnętrznym,

ośrodkowym układzie nerwowym, wsierdziu, mięśniu serca, osierdziu, kościach i stawach. Poprzez przerwy w barierach anatomicznych grzyby, będące florą endogeniczną, dostają się do krwiobiegu [1].

Zarażenie grzybami należącymi do rodzaju *Aspergillus* następuje drogą oddechową, pokarmową lub krwionośną, ale także – po operacjach, czy urazach – przez rany powłok ciała. Grzyby te mogą zasiedlać gałki oczne, układ oddechowy, trawienny oraz powodować aspergilozę uogólnioną z zajęciem ośrodkowego układu nerwowego i wytworzeniem wielu ognisk inwazji, np. we wsierdziu, mięśniu serca, czy szpiku [1].

Cryptococcus sp. wykrywano jest w inwazjach bezobjawowych na skórze, w jamie ustnej i w pochwie. Jest odpowiedzialny za inwazje objawowe

skóry, tkanki podskórnej, płuc, gałki ocznej, przewodu pokarmowego, stawów, narządów mięszo-
wych zawierających komórki układu siateczkowo-
śródbłonkowego, innych narządów wewnętrznych,
także ośrodkowego układu nerwowego (najczęstszą
postacią kryptokokozy jest zapalenie opon mózgo-
wo-rdzeniowych) oraz krwi [1].

Mucor sp. i *Rhizopus sp.* są grzybami powodują-
cymi inwazje płuc, zatok przynosowych, przewodu
pokarmowego, gałki ocznej, oczodołu, skóry, tkanki
podskórnej, pochwy, układu moczowego, przewo-
du słuchowego zewnętrznego, krwi, serca, szpiku,
otrzewnej i ośrodkowego układu nerwowego. Różne
formy zarażenia (skórna, nosowo-mózgowa, płucna,
żołądkowo-jelitowa, rozsiana) mogą być wynikiem
angioinwazji, zakrzepów, zawałów lub martwicy
zajętych tkanek [1-3].

Patofizjologia zakażeń

Wniknięcie grzybów do ustroju człowieka
wywołuje pobudzenie receptorów toll-podobnych
(TLR), granulocytów obojętnochłonnych, makro-
fagów, komórek dendrytycznych (DC), tucznych,
kwasochłonnych i limfocytów [4].

TLR2, TLR4 i TLR6, łączą się z wzorcami mo-
lekularnymi związanymi z patogenami (PAMP),
m.in. grzybów; wspólnie indukują obronę organi-
zmu przed grzybami, wzmagając syntezę i uwal-
nianie prozapalnych cytokin, takich jak TNF α ,
IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, a także
defensyn oraz oddziałując na transkrypcyjny
czynnik jądrowy NF- κ B w komórkach układu
odpornościowego [5].

W ziarnistościach wewnątrzkomórkowych
neutrofilów znajdują się m.in. kwaśne hydrolazy
lizosomowe, serprocydyny, defensyny, mieloperok-
sydaza i laktoferyna, które po pobudzeniu neutrofila
(głównie przez IL-8 i TNF α) uwalniane są w procesie
degranulacji wewnątrzkomórkowej oraz zewnątrz-
komórkowej. Pozakomórkowo neutrofile indukują
także wybuch tlenowy, polegający na tworzeniu
reaktywnych form tlenu, głównie rodników, które
niszczą komórki grzyba [4].

Aktywowane przez TLR makrofagi efektywniej
prezentują antygen limfocytom T i indukują oraz
regulują swoistą odpowiedź immunologiczną po-
przez wydzielanie cytokin: IL-1 α (pobudza prolifera-
cję limfocytów T pomocniczych), IL-8 (aktywuje
neutrofile), TNF α , IFN γ , czy prostaglandyn PGE2
(pobudzają supresorowe limfocyty T) [4].

DC wytwarzają duże ilości cytokin prozapalnych
(GM-CSF, IFN γ , TNF α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-18),

a także chemokin (MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 i MCAF)
[4].

Komórki tuczne (mastocyty) uwalniają czynniki
prozapalne, takie jak TNF α , GM-CSF, prostaglan-
dyny, leukotrieny, histaminę, które nasilając stan
zapalny, eliminują czynnik patogenny [4].

Eozynofile ograniczają migrację grzybów. Liczba
krwinek kwasochłonnych i ich zwiększona aktyw-
ność cytotoksyczna jest wynikiem produkcji przez
komórki tuczne, limfocyty i makrofagi cytokin (IL-3,
IL-5, G-CSF, GM-CSF, TNF α) [4].

G-CSF, GM-CSF i IFN γ wzmagają aktywność
monocytów i neutrofilów przeciwko strzępkom;
IL-15 – niszczenie strzępek, a IL-8 – przyciąganie
neutrofilów do miejsc zapalenia i uwalnianie białek
przeciw mikroorganizmów. Przeciwnie, produkcja
IL-4 przez limfocyty T CD4+ osłabia przeciwgrzy-
biczą aktywność neutrofilów. IL-10 osłabia wybuch
tlenowy i przeciwgrzybiczą aktywność komórek
jednojądrzastych wobec strzępek, ale wzmacnia ich
działalność fagocytarną [4]. GM-CSF przede wszy-
stkim pobudza produkcję granulocytów, makrofagów,
komórek dendrytycznych, komórek Langerhans'a,
eozynofili i megakariocytów, a ponadto wzmacnia
przeciwbakteryjne oraz przeciwgrzybicze działanie
dojrzałych neutrofilów i monocytów. Syntetycznie
rekombinowany GM-CSF wywołuje proliferację
prekursorów czerwonych krwinek, działając syner-
gicznie z erytropoetyną [6].

W pośredniczeniu odpowiedzi limfocytów Th-
1 ważną rolę odgrywają IFN γ i IL-12 [7]. IL-12 jest
wytwarzana głównie przez makrofagi i komórki
dendrytyczne, a rzadziej przez keratynocyty, granu-
locyty i komórki tuczne. Stymuluje ona limfocyty T
i komórki NK – ich proliferację, aktywację, cytotox-
syczność i wytwarzanie IFN γ oraz TNF α – cytokin o
właściwościach antyproliferacyjnych. IFN γ wzmacnia
cytotoksyczność limfocytów T_c, komórek K i NK,
nasila funkcjonowanie neutrofilów oraz aktywność
makrofagów, a także pobudza produkcję TNF α .
Ponadto wzmacnia ekspresję cząsteczek MHC, ale jed-
nocześnie zmniejsza ich wrażliwość na aktywność
komórek NK. Hamuje również aktywację limfocy-
tów Th-2 CD4+ i produkcję IL-4, IL-10 oraz innych
cytokin przeciwzapalnych [4,8].

Rekombinowany interferon- γ (rIFN γ) jest naj-
lepiej poznaną cytokiną nasilającą aktywność prze-
ciwgrzybiczą komórek efektorowych, która – obok
IL-12, IL-15 i IL-18 oraz chemokin – rokuje nadzieję
dla terapii stosowanej w infekcjach grzybiczych.
rIFN γ wykazuje działanie antyproliferacyjne i im-
munomodulujące, bierze udział we wczesnej reakcji

obronnej organizmu, zwłaszcza w zakażeniach wirusowych, bakteryjnych, grzybiczych i pierwotniakowych [9].

W odporności nabytej odpowiedź humoralna polega m.in. na pobudzaniu produkcji swoistych immunoglobulin przeciwko antygenom ściany komórkowej lub antygenom cytoplazmatycznym grzyba. Wytwarzane przeciwciała klasy A, E i G uczestniczą w mechanizmie cytotoxycznosci komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC), zapobiegają adherencji komórek grzyba, opłaszczają komórki docelowe (np. makrofagi), warunkują swoistość reakcji i uwalniają mediatory z komórek tucznych. W odpowiedzi komórkowej istotne jest zróżnicowanie limfocytów T CD4+ na komórki Th1 i Th2. Limfocyty Th rozpoznają swoiste antygeny grzybów przygotowane przez komórki prezentujące antygen; rozwój odpowiedzi Th1 (aktywacja odpowiedzi komórkowej – makrofagów, komórek NK, PMNL) zależy od działania wielu cytokin, np. IFN γ , TNF α , IL-2, IL-3, IL-12, zaś rozwój odpowiedzi Th2 (silna aktywacja limfocytów B i odpowiedź humoralna) związana jest z np. IL-4, IL-5, IL-10, IL-25. Zakażenia grzybami są spowodowane przewagą liczebności limfocytów Th2 nad Th1 [4].

Immunoterapia

Obserwowany w ostatnich latach wzrost częstości grzybic uogólnionych oraz narastanie oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki przeciwgrzybicze wymusza poszukiwanie nie tylko nowych leków, ale także możliwości wykorzystania do leczenia innych metod; jedną z obiecujących jest immunoterapia.

Immunoterapia kandydozy

W immunoterapii kandydozy wykorzystuje się m.in. czynniki stymulujące wzrost populacji (*colony-stimulating factors* – CSF) – granulocytów (G-CSF), granulocytów i makrofagów (GM-CSF) oraz makrofagów (M-CSF), które *in vitro* zwiększają grzybobójczą funkcję fagocytozy. GM-CSF dodatkowo stymuluje szereg innych czynników immunomodulujących organizm gospodarza [10,11]. Przypuszcza się, że w połączeniu z lekami przeciwgrzybiczymi (np. flukonazol, czy worykonazol) G-CSF i GM-CSF wykazują wzmożoną aktywność przeciwgrzybiczą [12,13], aczkolwiek dane kliniczne nie są jeszcze wystarczające do oceny skuteczności takiej terapii, która jest bezpieczna.

Kuhara i wsp. przeprowadzili doświadczenia na myszach zarażonych *Candida albicans*, w stanie immunosupresji wywołanej przez cyklofosfamid. Miały one na celu analizę aktywności M-CSF oraz

ich działania na makrofagi i neutrofile. Autorzy wykazali, że podawanie M-CSF wzmacnia odporność myszy na grzyby, przedłużając im życie. Efekt ten był silniejszy po połączeniu immunoterapii z lekami przeciwgrzybiczymi, takimi jak amfoterycyna B (AMB) i flukonazol (FLCZ), przy czym większa skuteczność cechowała kombinację AMB z M-CSF, niż FLCZ z M-CSF. Przypuszcza się, że dodatkowe zastosowanie M-CSF do terapii AMB może ograniczyć szkodliwy wpływ tego antybiotyku na organizm poprzez zmniejszenie jego dawki. Badania makrofagów *ex vivo* potwierdziły, że połączenie AMB i M-CSF hamuje znacznie wzrost strzępek *Candida albicans*, a makrofagi aktywniej fagocytują i niszczą komórki grzyba niż w przypadku zastosowania monoterapii AMB lub M-CSF. Granulocyty obojętnochłonne (PMNL) silniej od makrofagów hamowały wzrost strzępek grzyba, co potwierdziło lepsze działanie neutrofilii jako bezpośrednich komórek efektorowych przeciwko *Candida albicans* [14].

Podobną skuteczność M-CSF w zwalczaniu zakażeń grzybami z tego rodzaju wykazali Cenci i wsp. [15], którzy zauważyli istotny pozytywny wpływ M-CSF na przeżycie myszy z kandydozą. Również Vitt i wsp. [16] w badaniach na szczurach zaobserwowali zwiększanie liczby monocytów i makrofagów we krwi obwodowej pod wpływem M-CSF. Natomiast Karbassi i wsp. [17] wykazali, że wzrost przeciwgrzybiczej aktywności makrofagów pod wpływem M-CSF wyraża się wzmożoną zdolnością do fagocytozy.

Analizę wpływu różnych cytokin na aktywność monocytów skierowaną przeciwko *Candida albicans* przeprowadzili Baltch i wsp. [18]. Zaobserwowali oni, że dużą aktywnością przeciwgrzybiczą charakteryzuje się GM-CSF oraz połączenia: TNF α z IL-10, IL-1 β z IL-10, IL-4 z IL-10, TNF α z IL-4 i IL-10. Natomiast TNF α i IL-1 β oraz kombinacja GM-CSF z IFN γ nie pobudzały funkcjonowania monocytów, zaś IFN γ nasilał wewnątrzkomórkowe niszczenie grzyba tylko w obecności flukonazolu. IL-4 i IL-10 ograniczały przeciwgrzybicze działanie makrofagów, co opisane zostało także przez innych autorów [19-22], ale w połączeniu z flukonazolem powodowały wzrost aktywności tych komórek [18]. GM-CSF dodatkowo wzmacniał efektywność leczenia flukonazolem, co potwierdzają Gujral i wsp. [23] oraz Natarajan i wsp. [24]. Wiele badań prowadzonych na myszach z kandydozą wykazało skuteczność TNF α jako czynnika przedłużającego życie zwierząt [25-27].

W innych doświadczeniach Vonk i wsp. [28] oraz Kullberg i wsp. [29] zaobserwowali skuteczność

profilaktyki z użyciem rekombinowanego G-CSF myszy (rmG-CSF). U zwierząt doświadczalnych liczba neutrofilów w momencie zarażenia była zwiększona, z czym wiązało się wzmożone niszczenie blastospor *Candida albicans*. Leczenie rmG-CSF (podawanym najwcześniej 3 dni po zarażeniu) nie wpływało znacząco na liczbę kolonii grzyba, prawdopodobnie dlatego, że w tym czasie większą od neutrofilów aktywność przeciwgrzybiczą wykazują makrofagi i limfocyty, a G-CSF hamuje produkcję TNF α przez te komórki [30] oraz zmniejsza uwalnianie monokin [31,32], prowadząc do osłabienia procesów odpornościowych żywiciela. Dodanie rmG-CSF w trakcie terapii AMB lub FLCZ nieznacznie redukowało populację grzyba, w porównaniu z zastosowaniem samego leku. Przypuszcza się, że czynnik ten, zwiększając liczbę granulocytów obojętnochłonnych krążących w miejscu zarażenia, powoduje wzrost stężenia leków akumulujących się w neutrofilach [28,33].

Silniejsze od flukonazolu działanie przeciwko grzybom z rodzaju *Candida* wykazuje worykonazol (VCZ); granulocyty obojętnochłonne i monocyty działają synergistycznie z tym lekiem, podobnie jak z FLCZ, zwiększając efektywność grzybobójczą komórek fagocytarnych (10-krotnie lepsze wyniki z VCZ). Za jeszcze bardziej wzmożoną aktywność neutrofilów i monocytów oraz ich współdziałanie z omawianymi lekami przeciwgrzybiczymi odpowiadają G-CSF i GM-CSF [34-36].

Immunoterapia aspergilozy

W dużym stopniu od prawidłowego funkcjonowania neutrofilów i makrofagów zależy obrona gospodarza przed zarażeniem grzybami z rodzaju *Aspergillus*. Dlatego do ich zwalczania mogą przyczynić się czynniki wzrostowe stymulujące kolonie granulocytarne (G-CSF) oraz granulocytarno-makrofagowe (GM-CSF), które pobudzają proliferację i różnicowanie prekursorowych komórek szeregu granulocytarnego i makrofagowego, a GM-CSF także totipotencjalnych komórek hematopoetycznych. Ponadto przedłużają one przeżycie neutrofilów poza organizmem, przyspieszają rozwój układu monocyt-makrofag, nasilają cytotoksyczność eozynofilów zależną od przeciwciał i wzmagają fagocytozę [9-11]. Znalazły zastosowanie praktyczne preparaty G-CSF (Neupogen, Granocyte) i GM-CSF (Leucomax) [37].

W badaniach doświadczalnych wykazano, że prekursorzy szpikowe granulocytów i monocytów istotnie przyczyniają się do ochrony organizmu przed *A. fumigatus* [38].

rINF γ

rINF γ , podobnie jak GM-CSF, wzmagają *in vitro* aktywność makrofagów i neutrofilów przeciwko różnym grzybom, w tym *Aspergillus sp.* [9]. W przewlekłej chorobie ziarniniakowej IFN γ jest istotnym czynnikiem profilaktycznym i jego stosowanie powoduje *ex vivo* nasilone niszczenie strzępek *Aspergillus*, przypuszczalnie na szlakach niezależnych od oksydazy NADPH [39]. IFN γ i GM-CSF wzmagają aktywność PMNL przeciwko *Aspergillus fumigatus* [9,40,41].

W odpowiedzi na zapalne cytokiny pentraksyna 3 (PTX3) wydzielana jest *in vitro* i *in vivo* przez różnego typu komórki, w szczególności przez mononuklearne fagocyty, komórki endotelialne i DC [42,43]. Wiąże ona liczne czynniki biotyczne, np. konidia *A. fumigatus* i aktywuje różne efektorowe drogi systemu immunologicznego w celu zwalczania patogenu. W badaniach doświadczalnych u myszy z niskim poziomem PTX3 wykazano, że PTX3 jest receptorem rozpoznającym wzorce (PRR) i odgrywa niezbędną rolę w odporności na wybrane patogeny. Podatność myszy ze zredukowanym PTX3 na *A. fumigatus* związana jest z wadliwą organizacją nabytej odpowiedzi immunologicznej typu I, która zostaje przywrócona dzięki egzogenicznemu podaniu zrekombinowanej PTX3 [44].

W badaniach doświadczalnych wykazano, że naturalnie występujące białko grasicy – tymozyna- α 1, pobudza limfocyty Th1 do reakcji przeciwko *Aspergillus*, chroni mysich biorców szpiku przed inwazją i przyspiesza regenerację komórek szpiku u myszy z neutropenią, a ponadto wywołuje, przy udziale różnych receptorów TLR, dojrzewanie i produkcję IL-12 w komórkach dendrytycznych pobudzanych przez *Aspergillus* [45].

W przypadkach ostrego kryptokokowego zapalenia opon mózgowych u chorych na AIDS skutecznym jest IFN γ . Pappas i wsp. [46] przeprowadzili badania na 75 osobach, z których 27 w połączeniu z konwencjonalną terapią przeciwgrzybiczą otrzymywało (podskórnie trzy razy w tygodniu przez 10 tygodni) 100 μ g IFN γ , 25 osób – 200 μ g IFN γ , a pozostali – placebo. U pacjentów przyjmujących IFN γ zaobserwowano szybszy przebieg eliminacji *C. neoformans* z płynu mózgowo-rdzeniowego; nie spostrzeżono natomiast istotnych różnic w wynikach terapii pomiędzy dawkami podawanej cytokiny. Netea i wsp. również zaobserwowali pozytywną reakcję w terapii tą cytokiną pacjentów z idiopatyczną limfopenią CD4+ i kryptokokowym zapaleniem opon mózgowych [47]. U zarażonych

C. neoformans zwierząt po leczeniu samym IFN γ , lub w połączeniu z amfoterycyną B, wzrastała odporność przeciwkryptokokowa, zmniejszała się inwazja tkanek i malała śmiertelność osobników; reakcja była silniejsza przy łącznym stosowaniu tych czynników. Skojarzone podawanie IFN γ z flukonazolem także przyniosło pozytywne wyniki, jednakże w mniejszym stopniu niż z amfoterycyną B [48]. W innych badaniach uzyskano większą przeżywalność myszy z kryptokokozą po zastosowaniu IL-12 w połączeniu z anty-CD40 [49]. Zaobserwowano przy tym zmniejszenie intensywności inwazji grzybiczej w obrębie nerek i mózgu oraz wzrost stężenia IFN γ i TNF α w surowicy. Na podstawie doświadczenia przeprowadzonego na myszach pozbawionych IFN γ , leczonych w ten sam sposób, dowiedziono, że jest on czynnikiem koniecznym do zapewnienia myszom ochrony przeciwgrzybiczej. Wskazuje to na wartość transferu limfocytów Th jako immunomodulatora skierowanego na żywiciela [50]. Nie tylko limfocyty T CD4+, ale także inne – np. CD8+, mogą wytwarzać IFN γ , czego dowodem jest fakt, że u myszy nie posiadających limfocytów CD4+ ilość IFN γ powstała wskutek leczenia IL-2, połączoną z anty-CD40, była tylko nieznacznie mniejsza niż w przypadku myszy, u których komórki te były obecne [49]. Limfocyty T CD8+, zazwyczaj są uzależnione od pomocy limfocytów T CD4+, jednak u myszy pozbawionych tej subpopulacji, mogą wytworzyć IFN γ w ilości wystarczającej do zwalczania płucnej postaci kryptokokozy [51].

Immunoterapia kryptokokozy

W przypadku zarażenia *C. neoformans* korzystne efekty przynosi wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych (mAb); zmniejsza się intensywność inwazji i tym samym wydłuża życie zwierząt doświadczalnych [52,53]. Immunoglobuliny te mogą być także stosowane u pacjentów z obniżoną odpornością, ponieważ ich działanie nie jest zależne od stanu układu immunologicznego. Potęgują one opsonizację patogenów i w konsekwencji niszczenie oraz usuwają antygeny z surowicy zwierząt [54-57]. U myszy zarażonych *C. neoformans*, którym podano przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw polisacharydom otoczkowym grzyba, zaobserwowano mniejszą inwazję tkanek, sprawniejsze tworzenie ziarniniaków, wzmożone niszczenie komórek grzyba przez różne czynniki przeciwgrzybicze, co w następstwie wydłużało przeżywalność zwierząt [58-61]. Leczenie trzech pacjentów z ostrym kryptokokowym zapaleniem opon mózgowych amfoterycyną B, połączoną z króliczym przeciwciałem

skierowanym przeciwko *C. neoformans* wykazało u dwóch – spadek miana antygenów kryptokokowych w surowicy do zera; przeciwciała były dobrze tolerowane przez wszystkie osoby [62]. Przykładowym przeciwciałem monoklonalnym przeciw polisacharydom otoczki *C. neoformans* jest 18B7, którego bezpieczeństwo stosowania i właściwości farmakokinetyczne u HIV-pozytywnych pacjentów z kryptokokowym zapaleniem opon mózgowych opisał Larsen i wsp. [63].

Immunoterapia mukormykozy

W leczeniu różnych postaci mukormykozy udowodniono wysoką skuteczność lipidowej odmiany amfoterycyny B, której mniejsza toksyczność – w porównaniu z konwencjonalną amfoterycyną B – pozwalała na podawanie pacjentom wyższych dawek tego leku [64]. Jednocześnie Rodríguez i wsp. [65] przeprowadzili badania doświadczalne na myszach, mające potwierdzić wyższą efektywność działania CM-CSF i IFN γ w terapii łączonej z liposomalną amfoterycyną B (LAMB). LAMB i IFN γ podawane były dożylnie, natomiast GM-CSF podskórnice. Zbadano połączenie LAMB z obiema cytokinami oraz z każdą z osobna. Monoterapia IFN γ lub GM-CSF nie wydłużyła czasu życia zarażonych myszy, natomiast kuracja łącząca IFN γ lub GM-CSF z LAMB znacznie zwiększyła szanse przeżycia zwierząt. Połączenie LAMB z GM-CSF okazało się zdecydowanie bardziej skuteczne od leczenia samym LAMB. Nie zaobserwowano natomiast lepszych efektów leczenia po zastosowaniu LAMB z IFN γ . Kilka innych badań potwierdza skuteczność GM-CSF w połączeniu z amfoterycyną B lub jej lipidową odmianą w klinicznych przypadkach mukormykozy [66,67]. Także G-CSF, według kilku autorów, pełni znaczącą rolę w terapii mukormykozy u pacjentów z neutropenią, przy równoczesnym podawaniu amfoterycyny B [68,69]. Natomiast w przypadku pacjentów bez neutropenii skuteczne okazało się leczenie z zastosowaniem GM-CSF. Garcia-Diaz i wsp. [6] wyleczyli trzech pacjentów z postacią nosowomózgową mukormykozy wywołaną przez *Rhizopus sp.*: pierwsza pacjentka – po leczeniu chirurgicznym i intensywnym, aczkolwiek nieskutecznym, leczeniu amfoterycyną B – przyjmowała GM-CSF, co doprowadziło do poprawy jej stanu i ustąpienia objawów; druga – po leczeniu chirurgicznym zatok sitowej i szczękowej otrzymywała lipidowy kompleks amfoterycyny B (ABL) oraz GM-CSF, po którym stan pacjentki uległ poprawie, a w następnych badaniach nie stwierdzono obecności strzępek grzyba; u trzeciej osoby – po leczeniu lipidowym kompleksem amfoterycyny B (ABL) z podawanym podskórnice

GM-CSF, uzyskano także całkowitą eliminację grzyba z tkanek i powrót do zdrowia. U wszystkich tych chorych uzyskano wyleczenie i nie stwierdzono nawrotu choroby, co sugeruje, że GM-CSF można z powodzeniem wykorzystywać w terapii tej postaci grzybiczy. Spellberg i wsp. [70] oraz Simitsopoulou i wsp. [71] wykazali, że u pacjentów z neutropenią zarażonych grzybami z rodziny *Mucoraceae* dobre wyniki leczenia uzyskuje się po podaniu lipidowego kompleksu amfoterycyny B (ABLC) i transfuzji granulocytów, które także *in vitro* działają synergistycznie. Dalsze podawanie GM-CSF lub IFN γ pacjentom bez objawów neutropenii wzmacnia odpowiedź immunologiczną i ostatecznie efekt przeciwgrzybiczy [70].

Badania makrofagów człowieka i szczurów przeprowadzone przez Jorens'a i wsp. [77] ujawniły, że komórki te mają zdolność hamowania kiełkowania zarodników *Rhizopus sp.* Obecność lipopolisacharydów (LPS) i rIFN γ – łącznie lub osobno – podczas inkubacji makrofagów szczura z komórkami *Rhizopus sp.*, przyczyniła się do hamowania rozmnażania grzyba, ale tylko w obecności dodanej do podłoża

L-argininy (prekursor tlenu azotu II); w przypadku makrofagów człowieka nie było to konieczne. Kombinacja LPS i IFN γ u ludzi skutecznie zmniejszała germinację spor, a obie substancje stosowane oddzielnie nie wpływały na ten proces. Po kiełkowaniu zarodników makrofagi – pobudzone powyższymi czynnikami (LPS, IFN γ i ich połączeniem) – nie były w stanie uszkodzić strzępek i tym samym zahamować wzrostu grzybów.

Z immunoterapią jako skuteczną metodą zwalczania zarażeń grzybami, niekiedy zagrażającymi życiu, wiązane są duże nadzieje. Czynniki wykorzystywane w tej terapii, takie jak IFN γ , mAb, GM-CSF i G-CSF stosowane u ludzi, zwiększają aktywność przeciwgrzybiczą fagocytów, a także nasilają terapeutyczne działanie leków przeciwgrzybiczych. Należy podkreślić, że inwazje nawracające po immunoterapii zdarzają się dużo rzadziej niż w przypadku leczenia metodami tradycyjnymi [6,78].

Finansowane z działalności statutowej UM 503-1013-1

Piśmiennictwo

- Kurnatowska A, Kurnatowski P. Wybrane postacie grzybic wieloogniskowych i uogólnionych. (w) Mikologia medyczna. Kurnatowska A, Kurnatowski P (red.). Promedi, Łódź 2006: 295-34-7.
- Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 236-301.
- Gonzalez CE, Rinaldi MG, Sugar AM. Zygomycosis. Infect Dis Clin North Am 2002; 16: 895-914.
- Kurnatowski P, Kurnatowska AJ. Odpowiedź immunologiczna na zarażenie grzybami. Wiad Parazytol 2010; 56(1): 23-7.
- Netea MG, van der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. J Infect Dis 2002; 185: 1483-9.
- Garcia-Diaz JB, Palau L, Pankey GA. Resolution of rhinocerebral zygomycosis associated with adjuvant administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Clin Infect Dis 2001; 32: e166-70.
- Dorman SE, Holland SM. Interferon- γ and interleukin-12 pathway defects and human disease. Cytokine Growth Factor Rev 2000; 11: 321-33.
- Pappas PG. Immunotherapy for invasive fungal infections: from bench to bedside. Drug Resist Update 2004; 7(1): 3-10.
- Segal BH, Kwon-Chung J, Walsh TJ, Klein BS, Battiwalla M, Almyroudou NG i wsp. Immunotherapy for fungal infections. Clin Infect Dis 2006; 42: 507-15.
- Roilides E, Holmes A, Blake C, Pizzo PA, Walsh TJ. Effects of granulocyte colony-stimulating factor and interferon-gamma on antifungal activity of human polymorphonuclear neutrophils against pseudohyphae of different medically important *Candida species*. J Leukoc Biol 1995; 57: 651-6.
- Nemunaitis J. Use of macrophage colony-stimulating factor in the treatment of fungal infections. Clin Infect Dis 1998; 26: 1279-81.
- Vora S, Purimetla N, Brummer E, Stevens DA. Activity of voriconazole, a new triazole, combined with neutrophils or monocytes against *Candida albicans*: effect of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 907-10.
- Sionov E, Segal E. Polyene and cytokine treatment of experimental aspergillosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 39: 221-7.
- Kuhara T, Uchida K, Yamaguchi H. Therapeutic efficacy of human macrophage colony-stimulating factor, used alone and in combination with antifungal agents, in mice with systemic *Candida albicans* infection. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(1): 19-23.
- Cenci E, Bartocci A, Puccetti P, Mocci S, Stanley ER, Bistoni F. Macrophage colony-stimulating factor in murine candidiasis: serum and tissue levels during infection and protective effect of exogenous administration. Infect Immun 1991; 59: 868-72.
- Vitt CR, Fidler JM, Ando D, Zimmerman RJ, Aukerman SL. Antifungal activity of recombinant human macrophage colony-stimulating factor in models of acute and chronic candidiasis in the rat. J Infect Dis 1994; 169: 369-74.

17. Karbassi A, Becker JM, Foster JS, Moore RN. Enhanced killing of *Candida albicans* by murine macrophages treated with macrophage colony-stimulating factor: evidence for augmented expression of mannose receptors. *J Immunol* 1987; 139: 417-21.
18. Baltch AL, Smith RP, Franke MA, Ritz WJ, Michelsen PB, Bopp LH. Effects of cytokines and fluconazole on the activity of human monocytes against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(1): 96-104.
19. Levitz SM, Tabuni A, Nong S, Golenbock DT. Effects of interleukin-10 on human peripheral blood mononuclear cell responses to *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1996; 64: 945-51.
20. Roilides E, Kadiltsoglou I, Dimitriadou A, Hatzistilianou M, Manitsa A, Karpouzias J i wsp. Interleukin-4 suppresses antifungal activity of human mononuclear phagocytes against *Candida albicans* in association with decreased uptake of blastoconidia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997; 19: 169-80.
21. Roilides E, Anastasio-Katsiardani A, Dimitriadou-Georgiadou A, Kadiltsoglou I, Tsaparidou S, Pantelliadis C i wsp. Suppressing effects of interleukin-10 on human mononuclear phagocyte function against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1998; 178: 1734-42.
22. Tonnetti L, Spaccapelo R, Cenci E, Mencacci A, Puccetti P, Coffman RL i wsp. Interleukin-4 and -10 exacerbate candidiasis in mice. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1559-65.
23. Gujral S, Brummer E, Stevens DA. Role of extended culture time on synergy of fluconazole and human monocyte-derived macrophages in clearing *Candida albicans*. *J Infect Dis* 1996; 174: 888-90.
24. Natarajan U, Randhawa N, Brummer E, Stevens DA. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on candidacidal activity of neutrophils, monocytes or monocyte-derived macrophage and synergy with fluconazole. *J Med Microbiol* 1998; 47: 359-63.
25. Aybay C, Imir T. Tumor necrosis factor (TNF) induction from monocyte/macrophages by *Candida species*. *Immunobiology* 1996; 196: 363-74.
26. Blasi E, Pitzurra L, Puliti M, Mazzolla R, Barluzzi R, Saleppico S i wsp. Different events involved in the induction of macrophage tumor necrosis factor by *Candida albicans* and lipopolysaccharide. *Cell Immunol* 1994; 157: 501-9.
27. Louie A, Baltch AL, Smith RP, Franke M, Ritz W, Singh J i wsp. Tumor necrosis factor has a protective effect in a murine model of systemic candidiasis. *Infect Immun* 1994; 62: 2761-72.
28. Vonk AG, Netea MG, van Krieken JH, Verweij PE, van der Meer JW, Kullberg BJ. Treatment of intra-abdominal abscesses caused by *Candida albicans* with antifungal agents and recombinant murine granulocyte colony-stimulating factor. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(12): 3688-93.
29. Kullberg BJ, Netea MG, Curfs JH, Keuter M, Meis JF, van der Meer JW. Recombinant murine granulocyte colony-stimulating factor protects against acute disseminated *Candida albicans* infection in nonneutropenic mice. *J Infect Dis* 1998; 177: 175-81.
30. Terashima T, Soejima K, Waki Y, Nakamura H, Fujishima S, Suzuki Y i wsp. Neutrophils activated by granulocyte colony-stimulating factor suppress tumor necrosis factor- α release from monocytes stimulated by endotoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13: 69-73.
31. Boneberg EM, Hareng L, Gantner F, Wendel A, Hartung T. Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon gamma. *Blood* 2000; 95: 270-6.
32. Hartung T, Doecke WD, Bundschuh D, Foote MA, Gantner F, Hermann C i wsp. Effect of filgrastim treatment on inflammatory cytokines and lymphocyte functions. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66: 415-24.
33. Pascual A, Garcia I, Conejo C, Perea EJ. Uptake and intracellular activity of fluconazole in human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 187-90.
34. Brummer E, Stevens DA. Synergy of human neutrophils with fluconazole in killing *Candida species*. *Mycopathologia* 1996; 134: 115-20.
35. Garcha UK, Brummer E, Stevens DA. Synergy of fluconazole with human monocytes or monocyte-derived macrophages for killing *Candida species*. *J Infect Dis* 1995; 172: 1620-23.
36. Vora S, Purimetla N, Brummer E, Stevens DA. Activity of voriconazole, a new triazole, combined with neutrophils or monocytes against *Candida albicans*: effect of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42 (4): 907-10.
37. Kowalski M. *Immunologia kliniczna*. Mediton, Łódź, 2000.
38. BitMansour A, Burns SM, Traver D, Akashi K, Contag CH, Weissman IL i wsp. Myeloid progenitors protect against invasive aspergillosis and *Pseudomonas aeruginosa* infection following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2002; 100: 4660-7.
39. Rex JH, Bennett JE, Gallin JI, Malech HL, DeCarlo ES, Melnick DA. In vivo interferon-gamma therapy augments the in vitro ability of chronic granulomatous disease neutrophils to damage *Aspergillus hyphae*. *J Infect Dis* 1991; 163: 849-52.
40. Vora S, Chauhan S, Brummer E, Stevens DA. Activity of voriconazole combined with neutrophils or monocytes against *Aspergillus fumigatus*: effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2299-303.
41. Gaviria JM, van Burik JA, Dale DC, Root RK, Liles WC. Comparison of interferon- γ , granulocyte colony-stimulating factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for priming leukocyte-mediated hyphal damage of opportunistic fungal pathogens. *J Infect Dis* 1999; 179: 1038-41.
42. Polentarutti N, Picardi G, Basile A, Cenzuales S, Rivolta A, Matteucci C i wsp. Interferon-gamma inhibits expression of the long pentraxin PTX3 in human monocytes. *Eur J Immunol* 1998; 28: 496-501.

43. Doni A, Peri G, Chieppa M, Allavena P, Pasqualini F, Vago L i wsp. Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2886-93.
44. Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Palustri A, De Acetis M, Nota R i wsp. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* 2002; 420: 182-6.
45. Romani L, Bistoni F, Gaziano R, Bozza S, Montagnoli C, Perruccio K i wsp. Thymosin alpha 1 activates dendritic cells for antifungal Th1 resistance through toll-like receptor signaling. *Blood* 2004; 103: 4232-9.
46. Pappas PG, Bustamante B, Ticona E, Hamill RJ, Johnson PC, Reboli A i wsp. Recombinant interferon γ 1b as adjunctive therapy for AIDS-related acute cryptococcal meningitis. *J Infect Dis* 2004; 189: 2185-91.
47. Netea MG, Brouwer AE, Hoogendoorn EH, Van der Meer JW, Koolen M, Verweij PE i wsp. Two patients with cryptococcal meningitis and idiopathic CD4 lymphopenia: defective cytokine production and reversal by recombinant interferon- γ therapy. *Clin Infect Dis* 2004; 39: e83-7.
48. Lutz JE, Clemons KV, Stevens DA. Enhancement of antifungal chemotherapy by interferon-gamma in experimental systemic cryptococcosis. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 437-42.
49. Zhou Q, Gault RA, Koziel TR, Murphy WJ. Immunoglobulin with CD40 stimulation and interleukin-2 protects mice from disseminated cryptococcosis. *Infect Immun* 2006; 74: 2161-8.
50. Hamad M. Antifungal immunotherapy and immunomodulation: a double-hitter approach to deal with invasive fungal infections. *Scand J Immunol* 2008; 67: 533-43.
51. Lindell DM, Moore TA, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. Generation of antifungal effector CD8+ T cells in the absence of CD4+ T cells during *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* 2005; 174: 7920-8.
52. Mukherjee J, Pirofski IA, Scharf MD, Casadevall A. Antibody mediated protection in mice with lethal intracerebral *Cryptococcus neoformans* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 90: 3636-40.
53. Mukherjee J, Nassbaum G, Scharf MD, Casadevall A. Protective and nonprotective monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* originating from one B cell. *J Exp Med* 1995; 181: 405-9.
54. Lee SC, Kress Y, Zhao ML, Dickson DW, Casadevall A. Human microglia mediate anti-*Cryptococcus neoformans* activity in the presence of specific antibody. *J Neuroimmunol* 1995; 16: 152-61.
55. Mukherjee S, Lee S, Mukherjee J, Scharff MD, Casadevall A. Monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide modify the course of intravenous infection in mice. *Infect Immun* 1994; 62: 1079-88.
56. Mukherjee S, Lee SC, Casadevall A. Antibodies of *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan enhance antifungal activity of murine macrophages. *Infect Immun* 1995; 63: 573-9.
57. Mukherjee S, Feldmesser M, Casadevall A. J774 murine macrophage-like cell interactions with *Cryptococcus neoformans* in the presence and absence of opsonins. *J Infect Dis* 1996; 173: 1222-31.
58. Dromer F, Charreire J, Contrepois A, Carbon C, Yeni P. Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti-*Cryptococcus neoformans* monoclonal antibody. *Infect Immun* 1987; 55: 749-52.
59. Mukherjee J, Scharff MD, Casadevall A. Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1992; 60: 4534-41.
60. Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A. Effect of antibody of capsular polysaccharide on eosinophilic pneumonia in murine infection with *Cryptococcus neoformans*. *J Infect Dis* 1998; 177: 1639-46.
61. Fleuridor R, Zhong Z, Pirofski L. A human IgM monoclonal antibody prolongs survival of mice with lethal cryptococcosis. *J Infect Dis* 1998; 178: 1213-16.
62. Gordon MO, Casadevall A. Serum therapy for cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 1477-9.
63. Larsen RA, Pappas PG, Perfect J, Aberg JA, Casadevall A, Cloud GA i wsp. Phase I evaluation of the safety and pharmacokinetics of murine-derived anticryptococcal antibody 18B7 in subjects with treated cryptococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 952-8.
64. Kurnatowski P, Kurnatowski M. Terapia empiryczna w zakażeniach grzybami. *Zakażenia* 2007; 7: 62-72.
65. Rodríguez MM, Calvo E, Mariné M, Pastor FJ, Fernandez-Ballart J, Guarro J. Efficacy of liposomal Amphotericin B combined with gamma interferon or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of systemic zygomycosis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(8): 3569-71.
66. Gonzalez CE, Couriel DR, Walsh TJ. Disseminated zygomycosis in a neutropenic patient: succesful treatment with amphotericin B lipid complex and granulocyte colony-stimulating factor. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 192-6.
67. Mastroianni A. Paranasal sinus mucormycosis in an immunocompetent host: efficacy and safety of combination therapy with liposomal amphotericin B and adjuvant rHuGM-CSF. *Infez Med* 2004; 12: 278-83.
68. Fukushima T, Sumazaki R, Shibasaki M, Saitoh H, Fujigaki Y, Kaneko M i wsp. Successful treatment of invasive thoracopulmonary mucormycosis in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 1995; 76: 895-9.
69. Sahin B, Paydas S, Cosar E, Bicakci K, Hazar B. Role of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of mucormycosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 866-9.
70. Spellberg B, Walsh TJ, Kontoyiannis DP, Edwards J Jr., Ibrahim AS. Recent advances in the management of mucormycosis: from bench to bedside. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1743-51.
71. Simitopoulou M, Roilides E, Maloukou A, Gil-Lamaignere C, Walsh TJ. Interaction of amphotericin B lipid formulations and triazoles with human polymorphonuclear leucocytes for antifungal activity against zygomycetes. *Mycoses* 2008; 51: 147-54.

72. Gil-Lamaignere C, Simitopoulou M, Roilides E, Maloukou A, Winn RM, Walsh TJ. Interferon- γ and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment the activity of polymorphonuclear leukocytes against medically important zygomycetes. *J Infect Dis* 2005; 191: 1180-7.
73. Dale DC, Liles WC, Llewellyn C, Price TH. Effects of granulocytemacrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on neutrophil kinetics and function in normal human volunteers. *Am J Hematol* 1998; 57: 7-15.
74. Fossati G, Mazzucchelli I, Gritti D, Ricevuti G, Edwards SW, Moulding DA i wsp. In vitro effects of GM-CSF on mature peripheral blood neutrophils. *Int J Mol Med* 1998; 1: 943-51.
75. Cohen DM, Bhalla SC, Anaissie EJ, Hester JP, Savary CA, Rex JH. Effects of in vitro and in vivo cytokine treatment, leucapheresis and irradiation on the function of human neutrophils: implications for white blood cell transfusion therapy. *Clin Lab Haematol* 1997; 19: 39-47.
76. Al-Shami A, Mahanna W, Naccache PH. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Selective activation of Jak2, Stat3, and Stat5b. *J Biol Chem* 1998; 273: 1058-63.
77. Jorens PG, Boelaert JR, Halloy V, Zamora R, Schneider Y-J, Herman AG. Human and rat macrophages mediate fungistatic activity against *Rhizopus species* differently: *in vitro* and *ex vivo* studies. *Infect Immun* 1995; 63(11): 4489-94.
78. Marple BF. Allergic fungal rhinosinusitis: current theories and management strategies. *Laryngoscope* 2001; 111(6): 1006-19.