

NOVÉ MEDICÍNSKÉ PARADIGMA: MEDICÍNA NÍZKÝCH DÁVEK



Alessandro Perra,
vědecký ředitel, Guna S.p.a.



Diego Cardani,
vědecký pracovník, Guna S.p.a.

Tento článek je část rozsáhlejšího textu. Dokončení budeme publikovat v příštím čísle

Medicína nízkých dávek je založena na stanovisku, které představuje na poli medicíny inovaci: obnovení fyziologické situace v nemocném organismu prostřednictvím podávání molekul identických s biologickými signálními molekulami, které jsou ve zdravém organismu syntetizovány a adekvátně řídí všechny funkce organismu.

Díky výzkumu v oblasti molekulární biologie je známa řada těchto molekul, označovaných jako signální (či messengerové) molekuly. Jsou převážně proteinového charakteru a předávají různým buňkám adekvátní signály pro jejich fyziologickou funkci. Do této skupiny základních molekul potřebných pro regulaci buněčných a tkáňových funkcí patří neuropeptidy, hormony, cytokiny a růstové faktory.

Stručná historie medicíny nízkých dávek

Medicína nízkých dávek (The Low Dose Medicine, LDM) vznikla spojením poznatků oborů molekulární biologie a psycho-neuro-endokrino-imunologie (PNEI) a byla dále rozvíjena na základě výsledků výzkumu na poli nanofarmakologie. K hlavním principům medicíny nízkých dávek patří:

1. léčení celého organismu, nikoli jen nemoci;
2. ovlivňování příčin, ne pouze příznaků;
3. koncepce člověka jako psychofyzického celku.

Signální molekuly a síť PNEI

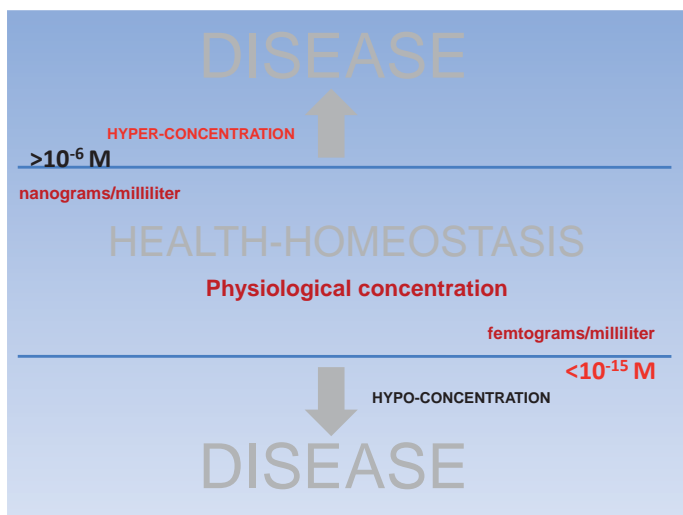
Od 70. let 20. století začala být výzkumným pracovníkům na poli fyziologie a molekulární biologie zřejmá zásadní role signálních molekul ve všech fyziologických i patologických procesech. Tento výzkum ukázal rozhodující úlohu těchto molekul v řízení stavu zdraví i nemoci. V současnosti je evidentní, že pro každou nemoc je charakteristická změněná exprese (ve významu přebytku či nedostatku) těchto mole-

kul; z těchto důvodů je ve výzkumu věnována rostoucí pozornost signálním molekulám a možnosti jejich použití k terapeutickým účelům. Přibližně v téže době byl v podobě základních principů psycho-neuro-endokrino-imunologie (PNEI) překonán klasický separatistický model fyziopatologie člověka.¹⁻⁴

Koncept PNEI představuje inovativní a zásadní posun medicínského paradigmatu: od přísně biomedicínského a specializovaného pohledu na nemoc a zdraví k hluboce interdisciplinárnímu přístupu. Hlavní sjednocující složkou koncepce PNEI je vzájemné ovlivňování psychoneuroendokrinního a imunitního systému. Tento vzájemný vliv je zprostředkovan sítí signálních molekul, které zajišťují přenos adekvátních biologických informací pro správnou regulaci odpovědi buněk na vnitřní a vnější podněty. Porucha vzájemné komunikace mezi uvedenými systémy, způsobená nerovnováhou v hladinách signálních molekul, má základní význam pro vznik např. zánětlivých, alergických a autoimunitních onemocnění;⁵⁻⁷ obnova a udržení fyziologických hladin signálních molekul je cílem nové léčebné strategie zaměřené na znovunastolení homeostázy.

Za normálních podmínek hladiny těchto molekul v extracelulární matrix (ECM)^{8,9} fyziologicky oscilují v určitých specifických mezích (řádově od nanogramů/ml do femtogramů/ml); každý patologický stav lze považovat za následek změněných koncentrací specifických signálních molekul¹⁰⁻¹³ (obr. 1). Použití biologických molekul kontrolujících a řídících buněčné funkce za účelem obnovení fyziologického stavu je základem medicíny nízkých dávek (LDM). K pochopení principu LDM je třeba osvětlit některé aspekty koncepce ovlivňování sítě PNEI:

- Komunikace mezi složkami PNEI je vzájemná, totéž se týká i změn této komunikace.¹⁴⁻¹⁶
- Mezibuněčná komunikace je regulována difúzí signálních molekul do extracelulární matrix (ECM); patologické změny v ECM se promítají do narušení komunikace mezi buňkami, orgány a systémy.^{17,18}
- Klíčovým modulačním faktorem přenosu signálu je interakce mezi ligandy a receptory: klíčovými parametry jsou koncentrace substrátu, vazebná afinita a aspekt saturace.^{19,20}

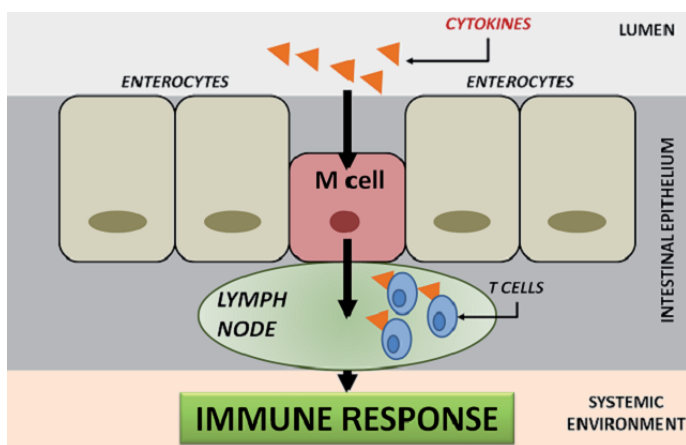


Obr. 1 – Rozsah fyziologických koncentrací signálních molekul v extracelulární matrixi.

Možnost ovlivňovat určité změny v imunitním systému pomocí cytokinů nebo endokrinní poruchy pomocí hormonů představují jednu z nejzajímavějších oblastí biomedicínského výzkumu, ale klinická aplikace těchto koncepcí naráží na závažné, na dávce závislé nežádoucí účinky, které se u těchto látek projevují, pokud jsou aplikovány v obvyklých farmakologických (nikoli nízkých, fyziologických) dávkách.

Fyziologické, nízké dávky signálních molekul, které představují základní prostředek LDM, se v rámci medicíny nízkých dávek podávají perorálně a jejich účinek je systémový. Jak potvrzuje odborná literatura, perorální aplikace cytokinů je účinná v modulaci imunitní odpovědi.²¹⁻²³

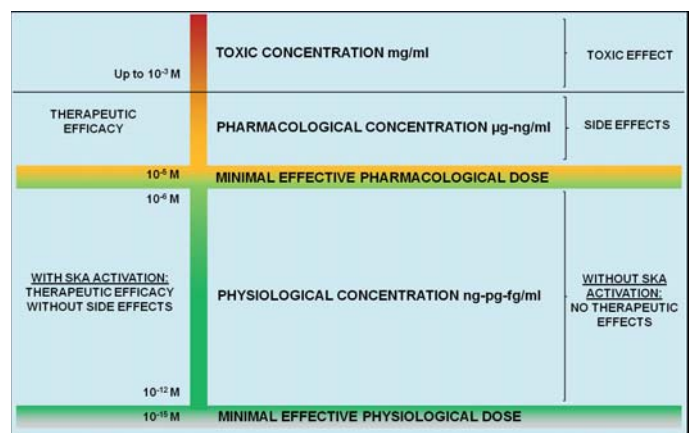
Jedním z možných mechanismů účinku perorálně podávaných peptidů je role M-buněk epitelu tenkého střeva. Signální molekuly jsou M-buňkami detekovány přímo ve střevním lumen a prezentovány imunitním T-buňkám v Peyerových plátech lymfatických uzlin²⁴ za vzniku specifické imunitní odpovědi (obr. 2).



Obr. 2 – Role M-buněk v procesu absorpce signálních molekul ze střevního lumina.

Určitou nevýhodou perorálního podávání signálních molekul (a obecně peptidů), zvláště při nízkém dávkování, může být nižší biologická dostupnost (obvykle pod 1 až 2 %). K překonání tohoto problému bylo třeba vyvinout účinný systém (drug delivery system), který zaručí dostatečnou účinnost léčiva i při nízkých dávkách. Účinnost signálních molekul po jejich perorálním podání

v nízkých dávkách v řádu nanogramů až femtogramů (obr.3) byl umožněn technologií sekvenční kinetické aktivace (SKA), inovativním systémem (vyvinutým a standardizovaným společností GUNA S.p.a, Milan, Italy) založeným na principech kvantové fyziky. Díky tomuto systému je zajištěna schopnost specifické substance aktivně působit ve vodném prostředí²⁵ i v hladinách nižších, než jsou hladiny považované v současnosti za minimální účinné koncentrace, a to s léčebným efektem srovnatelným s účinkem vysokých koncentrací.



Obr. 3 – Vztah mezi koncentrací a účinkem signálních molekul.

K mechanismům působení nízkých dávek cytokinů, hormonů, neuropeptidů a růstových faktorů potencovaných technologií SKA patří zvýšení citlivosti (resp. aktivace) buněčných a plazmatických receptorů v jejich pracovním rozsahu mezi 10^{-6} (mikrogramy) pro hormony⁸ a 10^{-15} (femtogramy) pro ostatní signální molekuly⁹ (obr. 3). Senzitivace (zvýšení citlivosti) receptorů na nízké dávky spouští specifický intracelulární řetězec reakcí a zvyšuje biologickou funkci systému PNEI. Souhrnně lze říci, že nízké dávky molekul potencovaných technologií SKA mají schopnost aktivovat autoregulační mechanismus systému PNEI.

Ke klinickým terapeutickým přístupům LDM vycházejícím z uvedených premis patří:

1. Obnovení rovnováhy PNEI stimulací patologicky změněné buněčné metabolické dráhy za použití nízkých dávek cytokinů, hormonů, neuropeptidů či růstových faktorů aktivovaných technologií SKA a identických s těmi molekulami, které jsou za fyziologických podmínek odpovědné za buněčnou signalizaci;
2. Použití antagonisticky působících molekul (aktivovaných technologií SKA) s využitím mechanismu negativní zpětné vazby k obnovení jejich koncentrací tam, kde jsou patologicky zvýšené.

Výzkum v oblasti nízkých dávek

Teoretické podklady medicíny nízkých dávek byly ověřeny základním a klinickým výzkumem. V roce 2009 byl publikován v časopise Pulmonary Pharmacology & Therapeutics první článek o účincích nízkodávkovaných a technologií SKA aktivovaných cytokinů na animálním modelu alergického astmatu.²⁶ Po tomto základním článku následovaly další publikace²⁷⁻³³ (tab. 1).

Rok	Autoři	Časopis	Typ výzkumu	Název	Testované molekuly
2009	Gariboldi S. et al.	Pulmonary Pharmacology & Therapeutics	Základní výzkum <i>in vivo</i>	Low dose oral administration of cytokines for treatment of allergic asthma.	IL-12, IFN- γ
2012	D'Amico L. et al.	Journal of Cancer Therapy	Základní výzkum <i>ex vivo</i>	Low Dose of IL-12 stimulates T Cell response in cultures of PBMCs derived from Non Small Cell Lung Cancer Patients.	IL-12
2013	Cardani D. et al.	Gastroenterology Research	Základní výzkum <i>in vivo</i>	Oral administration of Interleukin-10 and Anti-IL-1 Antibody ameliorates experimental intestinal inflammation.	IL-10, α -IL-1
2014	Radice E. et al.	International Immunopharmacology	Základní výzkum <i>ex vivo</i>	Low-doses of sequential-kinetic-activated interferon-gamma enhance the <i>ex vivo</i> cytotoxicity of peripheral blood natural killer cells from patients with early-stage colorectal cancer. A preliminary study.	IFN- γ
2014	Roberti ML. et al.	Journal of Biological Regulatory & Homeostatic Agents	Klinická studie	Immunomodulating treatment with low dose Interleukin-4, Interleukin-10 and Interleukin-11 in Psoriasis Vulgaris.	IL-4, IL-10, IL-11
2015	Luchetti P.	Minerva Medica Oftalmologica	Klinická studie	Increasing of visual function in patients with retinal atrophy treated with drugs of Low Dose Medicine. Monocentric retrospective observational study.	NT3, NT4, NGF
2015	Galli E. et al.	V tisku	Klinická studie	Clinical and immunological evaluation of long-term treatment with Low Dose Medicine in pediatric population affected by chronic Atopic Dermatitis. Experimental randomized double-blind at two stages clinical trial.	IL-12, IFN- γ
2015	Fiorito F. et al.	V tisku	Klinická studie (veterinární)	Clinical improvement in feline herpesvirus-1 infected cats by oral low doses of interleukin-12 and interferon-gamma.	IL-12, IFN- γ
2015	Barygina V. et al.	Journal of Dermatological Science	Základní výzkum <i>in vitro</i>	Treatment with low-dose cytokines reduces oxidative-mediated injury in perilesional keratinocytes from vitiligo skin.	IL-4, IL-10, b-FGF, β -endorfin
2015	Lotti T. et al.	Journal of Biological Regulatory & Homeostatic Agents	Spontánní observační retrospektivní klinická studie	Vitiligo: successful combination treatment based on oral low dose cytokines and different topical treatments	IL-4, IL-10, b-FGF, Anti-IL-1

Tabulka 1 – Články z oblasti medicíny nízkých dávek od roku 2009 (publikované a zaslané k tisku).

Základní výzkum – studie cytokinů se stimulačním účinkem na imunitní buňky

Ve studiích *in vitro* dvou autorských kolektivů (D'Amico et al. a Radice et al.) byly použity (v souladu se stimulačním přístupem LDM) nízké dávky cytokinů aktivovaných technologií SKA za účelem stimulace fyziologické odpovědi různých typů imunitních buněk z periferní krve onkologických pacientů (nejdůležitější údaje o těchto dvou studiích jsou obsaženy v tab. 2).

D'Amico a spolupracovníci²⁷ provedli studii *ex vivo* na mononukleárech z periferní krve (PBMCs) pacientů s malobuněčným karcinomem plic (NSCLC). Cílem studie bylo stanovení imunostimulační/imunomodulační aktivity nízkodávkovaného IL-12 aktivovaného SKA na subpopulaci T-lymfocytů. Výsledky ukázaly, že nízkodávkovaný SKA IL-12 (0,01 pg/ml) byl schopen stimulovat CD4+ a CD8+ T-lymfocyty (zvýšil expresi IFN- γ souvisejícího s CD4+ T-buňkami a zvýšil i cytotoxickou aktivitu CD8+ T-lymfocytů). Bylo také zjištěno, že nízkodávkovaný IL-12 aktivovaný SKA způsobuje down-regulaci T-reg buněk. Tato studie také prokázala zvýšenou lytickou aktivitu vůči H1373 buňkám, kterou zajišťují CD8+ lymfocyty.

Radice a spolupracovníci²⁹ provedli *ex vivo* studii na NK (Natural Killer) buňkách získaných z periferní krve (PB) pacientů s kolorektálním

karcinomem (CRC) v raném stádiu a z krve zdravých dárců. Cílem této studie bylo stanovení imunostimulačního /imunomodulačního účinku nízkých dávek IFN- γ na PB-NK buňky. Pozornost autorů byla zaměřena zvláště na lytickou schopnost PB-NK buněk poté, co byly vystaveny působení IFN- γ v běžných dávkách (1 ng/ml) a nízkých dávkách aktivovaných SKA (0,25 fg/ml).

Aktivita PB-NK je u pacientů s tímto onemocněním obvykle snižena v závislosti na stádiu tumoru. Výsledky ukázaly, že oba typy dávkování IFN- γ zvýšily cytotoxicitu PB-NK jak u zdravých dobrovolníků, tak u pacientů; ukázalo se tak, že postup LDM není méně účinný než běžné dávkování uvedeného cytokinu.

Na základě obou studií lze konstatovat, že v uvedených modelech je použitý nízkodávkovaný, SKA aktivovaný cytokinů účinné, účinnost při nízkém dávkování není nižší než při dávkování konvenčním (průkaz noninferiority). Navíc ve studii D'Amica podávání vysokých dávek IL-12 (10 ng/ml) vedlo k down-regulaci CD4+ Th1 lymfocytů, což lze považovat za potenciálně nežádoucí účinek, který nebyl pozorován při nízkém dávkování. V obou studiích byla prokázána účinnost a bezpečnost LDM, nežádoucí účinky (připisované testovaným cytokinům ve vysokých dávkách) se při nízkém dávkování neobjevily.^{34, 35}

Studie	Typ	Cytokiny	Positivní kontrola	Placebová kontrola	Výsledky
D'Amico L. et al. Low Dose of IL-12 stimulates T Cell response in cultures of PBMCs derived from Non Small Cell Lung Cancer patients.	Základní výzkum <i>ex vivo</i>	rIL-12 (1 / 0.01 pg/ml)	rIL-12 (10 ng/ml)	(vehikulum)	<ul style="list-style-type: none"> Stimulace CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů. Zvýšené množství CD4⁺ T lymfocytů produkujících IFN-γ. Zvýšená lytická aktivita buněk CD8⁺ T lymfocytů Suprese T_{reg} lymfocytů
Radice E. et al. Low-doses of sequential-kinetic-activated interferon-gamma enhance the <i>ex vivo</i> cytotoxicity of peripheral blood natural killer cells from patients with early-stage colorectal cancer.	Základní výzkum <i>ex vivo</i>	SKA nízká dávka IFN- γ (0.25 fg/ml)	(rIFN- γ 1 ng/ml)	---	<ul style="list-style-type: none"> Snížení cytotoxicity PB-NK buněk souvisí se stádiem progresu tumoru Nízké dávky SKA IFN-γ aktivují PB-NK buňky v raném stádiu kolorektálního karcinomu. Nízké a vysoké dávky IFN-γ: stejný vliv na PB-NK buňky.

Tabulka 2 – Souhrn základních údajů o studiích základního výzkumu na téma vlivu nízkodávkovaných cytokinů (aktivovaných SKA) se stimulačními účinky na imunitní buňky.

Základní výzkum a klinická studie vlivu nízkodávkovaných cytokinů na obnovu rovnováhy Th1/Th2 odpovědi

Záněť představuje důležitou etiologickou komponentu onemocnění charakterizovaných poruchou imunitní rovnováhy; zvláště tam, kde existuje nerovnováha mezi cytokiny exprimovanými Th1 and Th2 lymfocyty. Převaha Th1 imunitní odpovědi je spojena s autoimunitními zánětlivými chorobami, jako je např. psoriasis vulgaris a vitiligo, nebo chronickými onemocněními, jako např. Crohnova choroba. Naproti tomu převaha Th2 odpovědi je spojena s alergickými stavy charakterizovanými výraznou zánětlivou složkou (např. alergické bronchiální astma). V závislosti na převládajícím typu imunitní odpovědi Th1/Th2 se liší také příslušný cytokinový profil.

Na toto téma bylo provedeno 6 studií (3 studie základního výzkumu a 3 klinické studie), v nichž byl zkoumán potenciální léčebný přístup založený na principech LDM, zaměřený na obnovu rovnováhy imunitní odpovědi.

Gariboldi et al.²⁶ studovali na animálním modelu imunologické mechanismy alergického bronchiálního astmatu za účelem otestování účinnosti podávání nízkodávkovaných SKA cytokinů (IL-12 a IFN- γ 0,1 fg/ml), pokud jde o obnovu rovnováhy Th1/Th2 odpovědi. V této studii byly hodnoceny *in vivo* v bronchiální alveolární tekutině (BALF) zvířat různé parametry, jejichž hodnota byla před léčbou patologicky změněna. Šlo o následující parametry: kvantitativní a kvalitativní složení panelu imunitních buněk, dále hladiny charakteristických cytokinů (IL-4, IL-5, IL-13, IL-17) a titer protilátek IgE (IgE-OVA).

Výsledky ukázaly, že nízkodávkované cytokiny potencované SKA obnovují rovnováhu Th1/Th2. Ve studii byla také prokázána zásadní role sekvenční kinetické aktivace (SKA): pokud nebyly cytokiny před podáním ošetřeny touto procedurou, nebylo dosaženo požadovaného efektu. Tato studie přinesla ještě další poznatky: (a) synergický účinek kombinace cytokinů IL-12 a IFN- γ ve srovnání s podáváním jednotlivých cytokinů; (b) schopnost nízkých dávek IL-12 a IFN- γ (0,1 fg/ml) indukovat *in vitro* sekreci identických cytokinů ve splenocytech a CD11+ DC buňkách (pouze IL-12), s naměřenou koncentrací v řádu nanogramů. Tyto výsledky ukazují, že nízké dávky SKA cytokinů indukují imunomodulační odpověď prostřednictvím stimulace imunitních buněk.

Cardani a spoluautoři²⁸ se ve své studii *in vivo* na animálním modelu zabývali imunitními mechanismy zánětlivých střevních onemocnění

(IBD, např. Crohnovy choroby) a možnostmi jejich ovlivnění pomocí LDM. Analýza vybraných cytokinů produkovaných buňkami Th1/Th17 (TNF- α , IFN- γ , IL-12, KC, and IL-17) ukázala zvýšenou produkci prozánětlivých cytokinů. Studie prokázala, že použitím nízkých dávek (0,01 pg/ml) IL-10 a protilátky anti-IL-1 (SKA) lze výrazně snížit expresi všech zánětlivých markerů a zvýšit endogenní produkci IL-10 (protizánětlivého interleukinu produkovaného buňkami Th2) a obnovit tak rovnováhu Th1/Th2. Uvedené nízké dávky cytokinů a anticytokinu vedly též ke zlepšení dalších fyziologických a histologických parametrů.

Roberti a spoluautoři³⁰ testovali podávání nízkých dávek SKA cytokinů (IL-4; IL-10; IL-11, v koncentraci 10 fg/ml) za účelem léčby psoriázy (tj. kožní autoimunitní choroby s významnou zánětlivou komponentou). Tato léčba byla hodnocena jak pokud jde o zlepšení psoriatických lézí za použití škály PASI (Psoriasis Area Severity Index), tak pokud jde o kvalitu života s použitím škály DLQI (Dermatology Life Quality Index). Studie ukázala, že testované SKA cytokiny v nízkých dávkách jsou účinné a bezpečné; jejich podávání významně zlepšilo jak hodnoty PASI, tak DLQI.

Barygina se spolupracovníky³² provedla studii *in vitro* s cílem zhodnotit účinky nízkých dávek IL-4, IL-10, b-FGF a β -endorfinu (SKA), pokud jde o snížení oxidativního stresu keratinocytů v bezprostředním okolí lézí kůže postižené vitiligem. Studie prokázala podstatné snížení intracelulárního oxidativního stresu buněk ošetřených nízkými dávkami SKA IL-4, IL-10 a b-FGF; u skupin buněk ošetřených nízkými dávkami SKA IL-4 a b-FGF byl navíc snížen i extracelulární oxidativní stres. Testy buněčné viability ukázaly, že ošetření buněk nízkými dávkami SKA IL-10, b-FGF a β -endorfinu zvýšilo rychlost proliferace keratinocytů v okolí lézí v porovnání s keratinocyty, které takto ošetřeny nebyly.

Galli E. a spolupracovníci [článek v tisku] se zabývali účinností léčby s použitím nízkých dávek SKA cytokinů (IL-12 a IFN- γ , 10 fg/ml) a nízké dávky přípravku s drenážními účinky na pojivovou tkáň (Galium-Heel® – Biologische Heilmittel Heel GmbH, Baden Baden, Německo) u dětských pacientů postižených atopickou dermatitidou. Stupeň postižení (lehký stupeň/střední stupeň) byl určen na základě indexu SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis). Všechny zařazené děti byly při zařazení do studie v akutní fázi onemocnění. Jako primární sledovaný parametr hodnocení bylo zvoleno snížení hodnoty indexu SCORAD, jako sekundární parametr délka období bez příznaků (disease-free interval). Předběžné výsledky studie ukázaly, že ve skupině léčené nízkými dávkami cytokinů poklesla hodnota indexu SCORAD mezi dny T0 a T8 o 54 %, v průběhu dalšího sledování pokles pokračoval (na 64 %).

Studie	Typ	Cytokiny Anticytokiny Růstové faktory Neuropeptidy	Pozitivní kontrola	Placebová kontrola	Výsledky
Gariboldi S. et al. Low dose oral administration of cytokines for treatment of allergic asthma.	Základní výzkum <i>in vivo</i>	IL-12 IFN- γ [(100 ng; 1 ng; 10 pg; 100 fg; 1 fg; 0.01 fg; 0.0001 fg) /dávka]	IL-12 / IFN- γ (500 ng/dávka)	Kontrolní skupina	<ul style="list-style-type: none"> Nízké dávky SKA molekul jsou účinné a bezpečné v obnovení rovnováhy Th1 / Th2. Neaktivované cytokiny jsou neúčinné. Kombinace cytokinů má synergické účinky.
Cardani D. et al. Oral Administration of Interleukin-10 and Anti-IL-1 antibody ameliorates experimental intestinal inflammation.	Základní výzkum <i>in vivo</i>	IL-10; anti IL-1 50 fg/Kg	--	Kontrolní skupina	<ul style="list-style-type: none"> Kombinace nízkých dávek SKA IL-10 a anti IL-1 je účinná v potlačení zánětu spojeného s chron. zánětem střev (IBD).
Barygina V. et al Treatment with low-dose cytokines reduces oxidative-mediated injury in perilesional keratinocytes from vitiligo skin.	Základní výzkum <i>in vitro</i>	IL-4 IL-10 b-FGF β -Endorfin (10 fg/ml)	--	Neléčená skupina	<ul style="list-style-type: none"> IL-4, IL-10 a b-FGF mají významný antioxidantní účinek. β-endorfin a b-FGF mají významný pozitivní účinek na buněčnou proliferaci.
Roberti ML. et al. Immunomodulating treatment with low dose Interleukin-4, Interleukin-10 and Interleukin-11 in Psoriasis vulgaris.	Multicentr. dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná, randomiz. klinická studie	IL-4; IL-10; IL-11 10 fg/ml; 20 gtt (každého cytokinu) 2x denně po dobu 3 měsíců	--	(vehikulum)	<ul style="list-style-type: none"> Kombinace IL-10, IL-11 a IL-4 SKA v nízkých dávkách je účinná v léčbě psoriázy. SKA nízkodávkované interleukiny mají dlouhodobý účinek.
Fiorito F. et al Clinical improvement in feline herpesvirus 1 infected cats by oral low doses of interleukin-12 and interferon-gamma.	Klinická studie (veterinární)	IL-12, IFN- γ (10 fg/ml; 10 gtt (každého cytokinu) denně po dobu 6 měsíců	pradofloxacin	--	<ul style="list-style-type: none"> Protivirový účinek u 13 ze 16 zvířat. Zlepšení klinických příznaků u všech parametrů.
Luchetti P. Increasing of visual function in patients with retinal atrophy treated with drugs of Low Dose Medicine. Monocentric retrospective observational study.	Observační retrospektivní klinická studie	NT3, NT4, FGF 0.01 pg/ml; 15 gtt 2x denně každého růst.faktoru po dobu 6 měsíců	--	--	<ul style="list-style-type: none"> Výsledky statistického hodnocení svědčí pro to, že použitá léčba má potenciál (v rámci omezení daném rozsahem skupiny) navodit brzkou obnovu funkce. Získaná data vedou k předpokladu, že pro udržení dosažených terapeutických výsledků by bylo třeba prodlouženě pokračovat v léčbě.
Galli E. et al Clinical and immunological evaluation of long-term treatment with Low Dose Medicine in pediatric population affected by chronic atopie dermatitis. Experimental randomized double-blind at two stages clinical trial.	Dvojitě zaslepená dvoustupňová, randomiz. klinická studie	IL-12, IFN- γ [(10 fg/ml) 15 gtt 2x denně po dobu 8 měsíců; děti mladší než 5 let 8 gtt 2x denně po dobu 8 měsíců	--	(vehikulum)	<ul style="list-style-type: none"> U skupiny léčené nízkými dávkami cytokinů SKA kleslo skóre SCORAD mezi T0 a T8 o 54 %, pokles během dalšího sledování pokračoval o dalších 10 %. Studie také prokázala progresivní zlepšení kvality života pacientů léčených nízkými dávkami cytokinů SKA.
Lotti T. et al. Vitiligo: successful combination treatment based on oral low dose cytokines and different topical treatments	Spontánní observační retrospektivní klinická studie	IL-4, IL-10, b-FGF, Anti-IL-1 (10 fg/ml)	--	--	<ul style="list-style-type: none"> Léčba nízkodávkovanými SKA cytokiny je účinná v monoterapii i v kombinaci s cílenou fototerapií.

Tabulka 3 – Souhrn základních údajů o studiích základního výzkumu a klinických studiích na téma nízkých dávek SKA aktivovaných cytokinů působících obnovu rovnováhy poměru Th1/Th2 a klinického hodnocení vlivu nízkých dávek SKA aktivovaných růstových faktorů na stimulaci tkáňového trofismu.

Fiorito F. a spoluautoři [článek v tisku] provedli studii na animálním modelu, do které bylo zařazeno 31 nevakcinovaných koček pozitivních na FHV-1 (průkaz pomocí polymerázové řetězové reakce – PCR); 16 zvířat bylo léčeno 6 měsíců perorálním podáváním nízkých dávek SKA IL-12 a IFN- γ (10 fg/ml), zbytek tvořil kontrolní skupinu, v níž byla podávána antibiotická léčba. Cílem bylo zhodnocení účinnosti nízkodávkovaných SKA cytokinů v léčbě FHV-1 infekce. Výsledky ukázaly, že ve skupině léčené nízkodávkovanými SKA cytokiny bylo po ukončení léčby 13 ze 16 zvířat PCR negativních, se zlepšením specifické i celkové symptomatologie, zatímco v kontrolní skupině zůstala všechna zvířata PCR pozitivní, symptomatologie se zlepšila jen nevýznamně. Výsledky studie ukázaly, že nízké dávky uvedených cytokinů byly v léčbě infekce FHV-1 u koček účinné.

Klinické studie vlivu nízkých dávek růstových faktorů potencionovaných SKA na stimulaci tkáňového tropismu

Luchetti a Lotti se svými spolupracovníky provedli dvě na sobě nezávislé klinické studie zaměřené na perorální podávání nízkých dávek SKA aktivovaných růstových faktorů za účelem podpory specifických biologických účinků těchto molekul. Po klinické stránce byly tyto studie zaměřeny na léčbu hypotrofie, atrofie a hypofunkčních stavů.

Luchetti³¹ zkoumal účinnost perorálního podávání nízkých dávek SKA růstových faktorů NT3, NT4 and NGF (10 fg/ml) v kombinaci s injekčně podávanými nízkými dávkami léčiv stimujících vaskularizaci s cílem zlepšit funkci zraku u pacientů s retinální atrofií. Do studie bylo zařazeno 29 pacientů ve věku 18 až 70 let s centrální nebo periferní retinální atrofií. Pro stanovení diagnózy a hodnocení výsledků byla využita mikroperimetrie (Nidek MP1) a standardní ISCEV elektroretinogramy (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision). Výsledky ukázaly, že léčba byla účinná, hodnocené parametry byly po léčbě oproti výchozím hodnotám statisticky významně zlepšeny.

Lotti se spolupracovníky³³ v retrospektivní studii hodnotili skupiny pacientů postižených vitiligem, jimž byly podávány různé typy lokál-

ní a celkové léčby: kombinace nízkých dávek SKA IL-4, IL-10, anti-IL-1; monoterapie nízkodávkovaným SKA b-FGF a kombinace cytokinů s jinými typy terapie, např. s úzkopásmovým UVB zářením. Výsledky ukázaly, že kombinace nízkodávkované SKA terapie s topickým UVB zářením přineslo 92/93 % pozitivních výsledků, což autoři interpretují jako potvrzení možnosti používat v léčbě vitiliga integrované tyto dvě léčebné metody.

Výsledky uvedených studií, pokud jde o obnovu rovnováhy Th1/Th2 a stimulaci tkáňového tropismu podáváním nízkých dávek SKA cytokinů jsou shrnuty v tab. 3.

Citované výzkumné práce dokumentují experimentální a klinické důkazy účinnosti LDM u chorob, v jejichž etiologii hraje roli imunitní systém. Všechny studie ukázaly schopnost nízkodávkovaných SKA signálních molekul k selektivní modulaci imunitní odpovědi. Základním přínosem uvedených studií je průkaz účinnosti SKA signálních molekul při jejich nízkém dávkování (tedy v koncentracích nižších než ty, které jsou obecně považovány za farmakologicky účinné).

Léčebné používání cytokinů a dalších signálních molekul ve farmakologických dávkách je nutno často přerušit, protože tyto vysoké dávky bývají příčinou (vedle účinků farmakologických) na dávce závislých nežádoucích účinků. Za klasicky uznávanou minimální účinnou dávku se obecně považuje množství od minimální farmakologické koncentrace (10^{-5}) po nejvyšší fyziologickou (10^{-6}) (obr. 3). Medicína nízkých dávek používá rozmezí fyziologických koncentrací signálních molekul pod uvedenými hranicemi klasických minimálních účinných dávek. Pro vysvětlení účinnosti nízkých dávek SKA signálních molekul jsou podstatné vlastnosti vazby ligand-receptor. Afnita receptoru k jeho specifickému ligandu je klíčovým parametrem aktivace post-receptorové signalizace;^{36, 37} saturace receptoru ligandem obecně indukuje "zmrazení" receptoru a/nebo jeho down-regulaci. Signální molekuly v nízkém dávkování způsobují přímou stimulaci receptorů imunitních buněk, což vede k posunu jejich reakce do fyziologického/homeostatického rozmezí. Prostřednictvím LDM se realizuje jeden z hlavních bodů koncepce PNEI: obnova fyziologického stavu v oblasti signálních molekul.

Literatura

- Ader R, N, Felten DL (1987) Brain, behavior, and immunity. *Brain Behav Immun* (1): 1-6.
- Ader R, Felten D, N (1990) Interactions between the brain and the immune system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 3: 561-602.
- Ader R, N (1993) Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. *Annu Rev Psychol* : 53-85.
- Ader R, N, Felten D (1995) Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet* (8942): 99-103.
- Haroony E, Raision CL, Miller AH (2012) Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology* (1): 137-62.
- Ngoc PL, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedón JC (2005) Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* (2): 161-6.
- Lourenço EV, La Cava A (2009) Cytokines in systemic lupus erythematosus. *Curr Mol Med* 9(3): 242-54.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, et al. (2012) Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and dose responses. *Endocr Rev* (3): 378-455.
- Biancotto A, Wank A, Perl S, Cook W, Olines MJ, et al. (2013) levels and temporal stability of 27 multiplexed serum cytokine concentrations in healthy subjects. *PLoS One* (12): e76091.
- Reeves R, Leonard WJ, Nissen MS (2000) Binding of HMG-I(Y) imparts architectural specificity to a positioned nucleosome on the promoter of the human interleukin-2 alpha gene. *Mol Cell Biol* (13): 4666-79.
- Ishihara K, Hirano T (2002) Molecular of the specificity of action. *Biochim Biophys Acta* (3): 281-96.
- Commins SP, Borish L, Steinke JW (2010) Immunologic messenger molecules: interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* (2 suppl 2): S53-72.
- Bacchus W, Aubel D, Fussenegger M (2013) Biomedically relevant circuit-design strategies in mammalian synthetic. *Mol Syst Biol* : 691.
- Weigert DA, Blalock JE (1995) Associations between the neuroendocrine and immune systems. *Leukocyte Biology* 58(2): 137-150.
- Haddad JJ (2008) On the mechanisms and pathways involving neuroimmune interactions. *Biochem Biophys Res Commun* (4): 531-5.
- De la Fuente M (2014) Editorial: between the nervous and the immune systems in health and sickness. *Curr Pharm Des* (29): 4605-7.
- Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, et al. (2009) Cellular and molecular basis of arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* (1 Suppl): S20-31.
- Bollyky PL, Bogdani M, JB, Hull RL, Wight TN (2012) The role of and the extracellular matrix in islet inflammation and immune regulation. *Curr Diab Rep* (5): 471-80.
- Borroni EM, Mantovani A, Locati M, Bonecchi R (2010) Chemokine receptors intracellular trafficking. *Pharmacol Ther* (1): 1-8.
- Farrell MS, Roth BL (2013) Pharmacosynthetic: Reimagining the approach. *Brain Res* : 6-20.
- Burnett AF, Biju PG, Lui H, Hauer-Jensen M (2013) Oral interleukin 11 as a countermeasure to lethal total-body irradiation in a murine model. *Radiat Res* (6): -602.
- Hanson ML, Hixon JA, Li W, Felber BK, Anver MR, et al. (2014) delivery of IL-27 recombinant bacteria attenuates immune colitis in mice. *Gastroenterology* (1): -221.
- Forster K, Goethel A, Chan CW, Zanello G, Streutker C, et al. (2012) An oral CD3-specific antibody suppresses T-cell-induced colitis and alters cytokine responses to T-cell activation in mice. *Gastroenterology* (5): 1298-307.
- Yun Y, Cho YW, Park K (2013) Nanoparticles for : with ligands for protein. *Adv Drug Deliv Rev* (6): 822-32.
- O. I. Epstein () Release-Activity: A Long Way from Phenomenon to New Drugs. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* November 2012, Volume 154, Issue 1, pp 54-58
- Gariboldi S, Palazzo M, Zanobio L, Dusio GF, Mauro V, et al (2009) Low dose oral administration of cytokines for treatment of allergic asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 22(6): 497-510.
- D'Amico L, Ruffini E, Ferracini R, Roato I (2012) Low Dose of IL-12 stimulates T Cell response in cultures of PBMCs derived from Non Small Cell Lung Cancer Patients. *Journal of Cancer Therapy* 3: 337-342.
- Cardani D, Dusio GF, Luchini P, Sciarabba M, Solimene U, et al (2013) Oral Administration of Interleukin-10 and Anti-IL-1 Antibody Ameliorates Experimental Intestinal Inflammation. *Gastroenterology Research* 6(4): 124-133.
- Radicce E, Miranda V, Bellone G (2014) Low-doses of sequential-kinetic-activated interferon-gamma enhance the ex vivo cytotoxicity of peripheral blood natural killer cells from patients with early-stage colorectal cancer. A preliminary study Intern. *Immunopharmacol* 19(1): 66-73.
- Roberti ML, Ricottini L, Capponi A, Sclauzero E, Vicenti P, et al. (2014) Immunomodulating treatment with low dose Interleukin-4, Interleukin-10 and Interleukin-11 in psoriasis vulgaris. *J Biol Regul Homeost Agents* 28(1): 133-9.
- Luchetti P. Increasing of visual function in patients with retinal atrophy treated with drug of low Dose Medicine. *Monocentric retrospective observational study. Minerva Oftalmologica* 2014;56(3-4):53-61.
- Banygina V, Becatti M, Lotti T, et al. Treatment with low-dose cytokines reduces oxidative-mediated injury in perilesional keratinocytes from vitiligo skin. *Dermatol Sci*. 2015 pii: S0923-1811(15)00168-1.
- Lotti T, Hercogova J, Wollina U, et al. Vitiligo: successful combination treatment based on oral low dose cytokines and different topical treatments. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2015;29(1 Suppl):53-8.
- Barnes PJ (2002) Cytokine modulators as novel therapies for asthma. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* : -98.
- Ichinose M, Barnes PJ (2004) Cytokine-directed therapy in asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* (1): -9.
- Davies DR, Wlodawer A (1995) Cytokines and their receptor complexes. *FASEB J* (1): 50-6.
- Sakamoto S, Caaveiro JM, Sano E, Tanaka Y, Kudou M, et al. (2009) Contributions of interfacial residues of human Interleukin 15 to the specificity and affinity for its private alpha-. *J Mol Biol* (5): 880-94.