

## Cytokiny a biologická léčba

**Fenomenální vítěz Tour de France americký závodník Lance Armstrong se 14. ledna 2013 veřejně přiznal k dopingu erythropoetinem poté, co všechna jeho vítězství byla anulována. Co je to za látku, která udělala z člověka, jež prodělal rakovinu, sedminásobného vítěze nejtěžšího cyklistického závodu na světě? Erythropoetin je cytokin. Pokusme se objasnit, co to jsou cytokiny a proč mají takový účinek na naše tělo. Buňky lidského těla spolu neustále komunikují. Je to nutné pro sladění jejich aktivit a pro správnou funkci vyšších struktur – tkání, orgánů i celého organismu. Signály vycházející z buněk řídí jejich růst, zrání, funkci i smrt, oznamují poškození, řídí imunitní reakci i obnovu tkání (viz také Živa 2013, 2: 50–53). Všechny tyto signály jsou nesené malými proteiny, které se nazývají cytokiny.**

Vnitřní prostředí organismu se udržuje v dynamické rovnováze (homeostáze), kterou zajišťují hormony. Ty působí systémově a propojují nervový a imunitní systém. Komunikaci jednotlivých buněk a synchronizaci jejich aktivit však zprostředkují cytokiny, které se vyskytují v daleko menších koncentracích než hormony, a proto byly objeveny mnohem později. Zatímco hormony působí v séru v nanomolárních hladinách ( $10^{-9}$  mol/l), cytokiny se vyskytují v tisíckrát menších pikomolárních množstvích ( $10^{-12}$  mol/l). Krátkodobě se může koncentrace cytokinů zvýšit i stonásobně, ale opět se sníží. Měřit mizivé koncentrace některých cytokinů je velmi obtížné. Původně se stanovovaly biologickým účinkem na buňky v tkáňové kultuře. V současné době se jejich koncentrace v séru a jiných tělních tekutinách měří citlivou metodou ELISA (protilátkami značenými enzymem peroxidázou), případně se stanovuje genový přepis cytokinů do

mediátorové RNA metodou reverzní transkriptase a polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase nebo se jejich tkáňové rozmístění sleduje imunohistochemicky – barevnými reakcemi v mikroskopii tkáňových řezů.

Hormony jsou produkovány určitými buňkami s vnitřní sekrecí nebo v určitých endokrinních orgánech. Naproti tomu cytokiny vznikají prakticky ve všech jaderných buňkách. Např. buňky kůže si mezi sebou vyměňují četné cytokinové signály a tvoří živý povrch našeho těla. Účinek cytokinů není tak jednoznačný jako u hormonů. Podobně tomu, co platí v kvantové fyzice pro chování částic, je i pro cytokiny typická vysoká neurčitost. Je to jejich pleiotropie, což znamená, že týž cytokin účinkuje odlišně v různém čase, místě a buněčném typu (např. cytokin TGF beta – transformující růstový faktor beta – je nejdříve signálem pro zánět, později působí protizánětlivě a regeneračně). Dále je to jejich redundan-

ce – každý cytokin může být ve své určité funkci nahrazen mnoha jinými cytokiny. Přes tuto nejednoznačnost, všudy přítomnost a krátkodobost účinku je cytokinová odpověď většinou robustní. Můžeme říci, že bez cytokinů by mnohobuněčná živočišná nedokázala ovládat svá těla jako jedinou strukturu – byl by to orchestr bez dirigenta. Zatím známe dobře cytokiny jen desítky savců – asi tisícovku molekul.

Cytokiny se vážou velmi specificky a pevně na membránové receptory, které spouštějí signalizaci v cytoplazmě a tu přenášejí do buněčného jádra, kde dochází k přepisu příslušných genů. Konečným výsledkem je produkce určitých látek, přesun, množení nebo případně jiné projevy buněk, při nichž cytokiny působí jako mediátory přirozené imunity a zánětu, krvetvorby, fagocytózy či aktivace, proliferace, diferenciací a smrti T a B lymfocytů specifické imunity.

### Z historie

K objevu prvního cytokinu došlo v Anglii r. 1957, kdy Alick Isaacs a Jean Lindemann zjistili, že buňky tkáňové kultury po infekci virem vylučují do média látku, která brání (interferuje) nové virové infekci. Látka byla nazvána interferon. Dnes je známo, že interferonů je celá řada a označují se řeckými písmeny. Teprve r. 1972 byl popsán druhý cytokin, který byl později nazván interleukin 1. V současné době známe již 38 interleukinů označovaných IL-1 až IL-38.

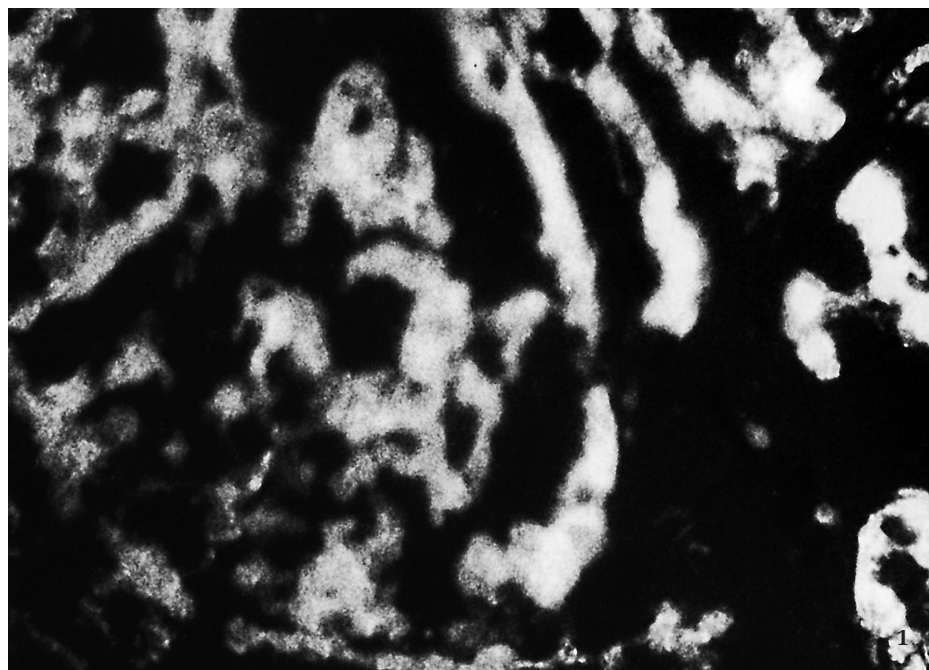
Kromě interferonů a interleukinů patří mezi cytokiny růstové faktory (Growth Factor – GF), faktory nekrotizující nádory (Tumor Necrosis Factor – TNF), diferenciací faktory (Colony Stimulating Factor – CSF, erythropoetin čili EPO, trombo-poetin), nebo faktory buněčné migrace chemokiny. U člověka bylo popsáno více než 100 cytokinů. Jednou z velkých rolí cytokinů je řízení imunity a boj s infekčními činiteli – patogenními bakteriemi, virem, houbami, prvoky, ploštěnci a hlísty.

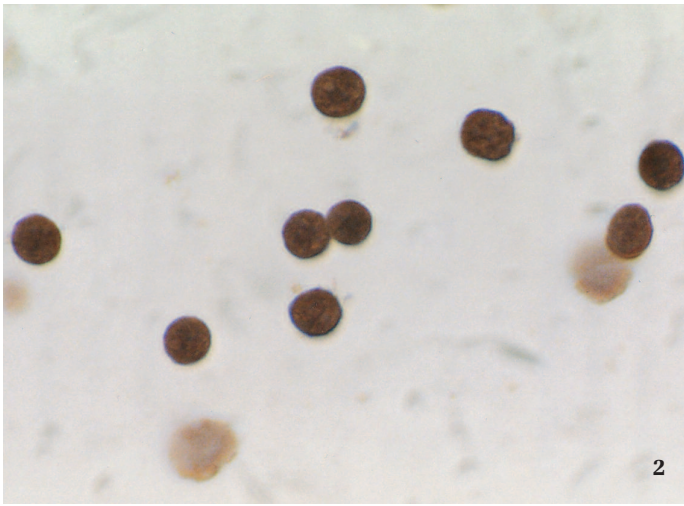
### Dezinformace v imunitním systému

Vzhledem k účinnosti cytokinů využívají patogenní mikroorganismy cytokinové interakce k podvracením mechanismů a manipulují s imunitní odpovědí svého hostitele. Je to informační válka, v níž virem uplatňují geny, jež kódují cytokinům podobné látky a které se nazývají virokiny.

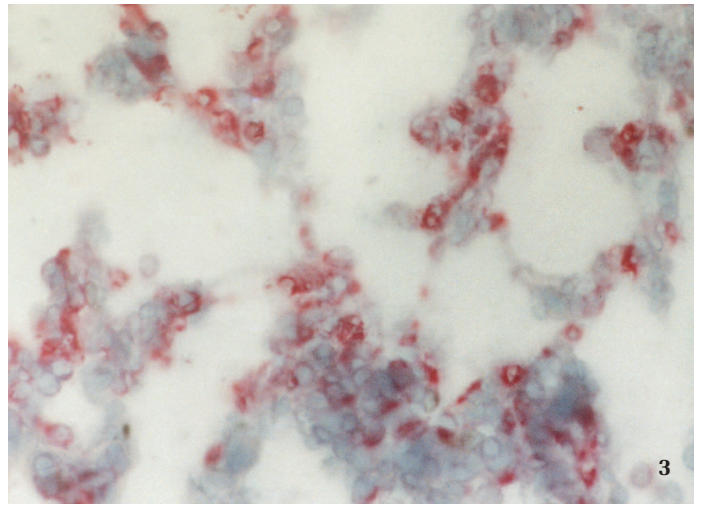
Řada lidských herpesvirů (např. virus infekční mononukleózy) nese geny pro homology interleukinů 10 a 6, cytokinů regulujících imunitu. Velké virem neštovic (poxviry) mají geny pro homology chemokínů, což jsou cytokiny, které mohou na napadené místo přivolat imunitní buňky. Antivirovou odpověď pak snižují homology interleukinu 1 a receptorů pro interferony. Je samozřejmé, že napadené buňky produkcí těchto nefunkčních virových cytokinů zcela rozvrátí imunitu. Však také herpesviry, virem oparu, mononukleózy a dalších onemocnění využívají nejdůmyslnější strategie k podminování lidské imunity.

**1** Interleukin 8 – cytokin, který hraje významnou úlohu proti bakteriálním infekcím. Na obr. je prokázán fluorescencí v epitelu tenkého střeva při salmonelové sepsi. Zvětšení 300×





2



3

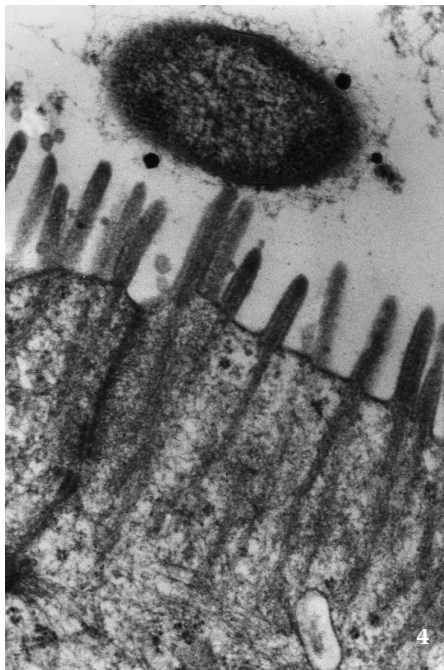
**2** Průkaz tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF alfa) v lymfocytech uzliny střevního okruží (přichycuje střevo k břišní stěně) při salmonelové sepsi (tmavé zbarvení). Zvětšení 1 000×

**3** Plicní intersticiium (vmezeřená tkáň tvořená řídkým vazivem) při sepsi – cytoplazma buněk zánětu je v řezu zbarvena červeně imunohistochemickou reakcí prokazující zánětové cytokiny. Zvětšení 200×

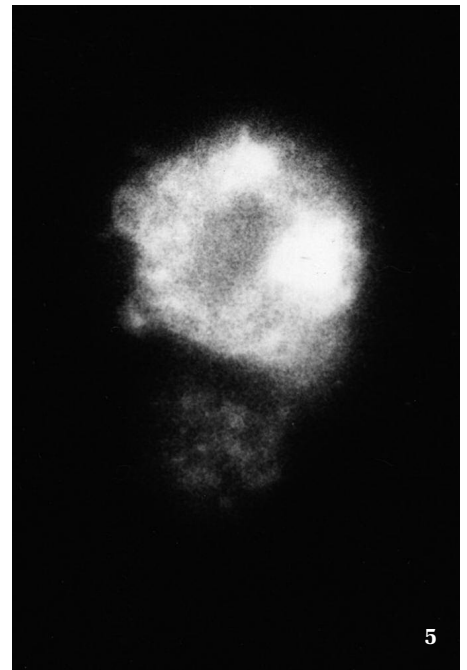
**4** Bakterie na řasinkách střevní buňky. Normální střevní mikroflóra tlumí produkci zánětových cytokinů, které indukují patogenní mikroby. Snímek z elektronového mikroskopu, zvětšení 20 000×

**5** Makrofág z povrchu nitroděložního tělíska Dana. Cytokin TNF alfa je prokázán v cytoplasmě buňky fluorescencí. TNF alfa vyvolává chronický zánět, který snižuje pravděpodobnost otěhotnění. Zvětšení 3 000×

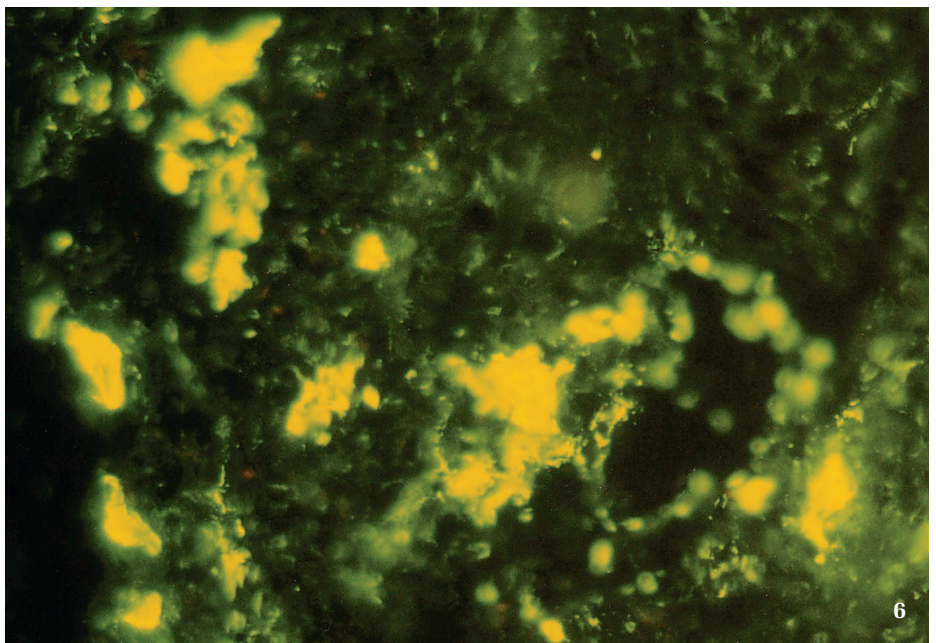
**6** Alarminy při salmonelové sepsi jsou prokázány žlutým zbarvením řezu tkání v imunofluorescenci. Na toto smrtelné onemocnění umírají v Africe ročně miliony lidí. Zvětšení 200×. Snímky I. Trebichavského



4



5



6

Odhaduje se, že 8 lidských herpesvirů je příčinou celkem 30 miliard současných infekcí, to znamená, že každý člověk na naší planetě byl několikrát v životě, ale nejspíš už brzy po narození infikován několika různými herpesviry. Na památku po nich mu zůstal trvalý zápis jejich genů v genomu některých neuronů nebo bílých krvinek. Stačí sebemenší stres a viry se probudí z latentního stavu a z informace se stanou infekční partikule, které vyvolají např. opar na rtu. Nicméně časný styk v životě s těmito viry je významný pro trénink našeho imunitního systému, a lidé, kteří se setkají s prvními herpesviry až v dospělosti, mají s imunitou velké problémy.

Kromě tvorby homologních cytokinů dokážou viry potlačovat tvorbu některých cytokinů v hostitelské buňce. V naší laboratoři jsme ukázali, že prasečí PRRS virus (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus; v americkém zemědělství působí ztráty půl miliardy dolarů ročně) zcela potlačí tvorbu antivirového interferonu alfa v buňkách, které by jinak pomocí tohoto interferonu PRRS viry zlikvidovaly. Naopak některé cytokiny podporují množení virů, např. TNF alfa tvorbu HIV.

### Cytokiny jako léky

Cytokiny jako diferenciální faktory ovlivňují vyžívání krvetvorných buněk do určitých buněčných linií. Zráním červených krvinek ovlivňuje erythropoetin (EPO). Tento cytokin je dobře znám z dopingových

afér ze sportů, jež vyžadují dlouhodobou zátěž, jako např. biatlon, triatlon, cyklistika či dlouhé tratě běžců a chodců. Nejznámějším příkladem zneužití erythropoetinu je nyní případ cyklisty Lance Armstronga. Další velkou aférou byl doping zlatého

medailisty na 50 km chůze Alexe Schwazera, který vytvořil v Pekingu nový olympijský rekord. Také tento výkon byl ovlivněn erythropoetinem. Podstatou jeho účinku je, že větší množství červených krvinek dodává svalům více kyslíku.

Z diferenciacních faktorů našel uplatnění v medicíně zejména GM-CSF (faktor stimulující zrání granulocytů a makrofágů), který se pod generickým názvem sargramostim a obchodním názvem Leukin používá ke zvýšení počtu bílých krvinek po chemoterapii při léčbě akutní myeloidní leukémie a po transplantaci kostní dřeně. Další cytokin interferon alfa slouží při léčbě některých virových onemocnění, kupř. hepatitidy C a některých nádorových onemocnění.

Léčba cytokiny je velmi nákladná a pro své vedlejší účinky představuje velká rizika. Mnohem nadějnější je antic cytokinová terapie některých zánětlivých onemocnění, u nichž se cytokinová regulace vymkla z normálu a kde lze snížením škodlivé vysoké koncentrace cytokinů zmírnit ohrožení pacienta. Samozřejmě je tato biologická léčba pouze podpůrná, dočasná a zacílena na překonání nejtěžší krize onemocnění.

O tom, že cytokiny řízením zánětu zasahují vlastně do průběhu každé infekční nemoci, nádorového onemocnění nebo alergie pojednávají následující řádky.

### Jak vzniká horečka?

Ve 40. letech minulého stol. si vědci všimli, že sekret buněk vypláchnutých z břišní dutiny králíků a injikovaný do krevního oběhu vede ke zvýšení tělesné teploty. Bylo to proto, že sekret obsahoval cytokiny, které vyvolávají horečku.

Horečka je výsledkem účinku několika zánětových cytokinů. Patří k nim interleukiny 1 a 6, faktor nekrotizující nádory (TNF alfa), ciliární neutrotrofický faktor (CNTF) a interferon alfa. Tyto cytokiny jsou produkovány bílými krvinkami, cévní výstelkou, některými pojivovými buňkami a podpůrnými buňkami nervové soustavy nejen při infekci, ale i při poškození, nádorovém onemocnění nebo vpravení určitých jedů do těla. Cytokiny pronikají do mozku v místech, kde jim nebrání krevní bariéra, vyvolávají tam tvorbu další signální látky zánětu – prostaglandinu  $E_2$  a ten pomocí neurohormonů ovlivní termoregulační centrum mozku v hypotalamu a přestaví je na vyšší tělesnou teplotu. Té je dosaženo svalovým třesem a aktivitou drobných buněčných výrobců energie – mitochondrií. Jakmile příčina reakce přestane působit, cytokiny vymizí a centrální termostat se nastaví opět pod 37 °C. Po dobu zvýšené sérové koncentrace interleukinu 1 cítíme nepříjemné průvodní jevy jako malátnost, nechutenství, ospalost apod. Mnoho známých chřipkových příznaků – to, že „nejsme ve své kůži“, je právě výsledkem aktivity zánětových cytokinů, zejména interleukinu 1 a interferonu gama.

### Cytokinová bouře zabíjí

Víme už, že existují cytokiny vyvolávající horečku a zánět. Aktivují bílé krvinky k tomu, aby zabíjely infekční mikroorganismy, zejména bakterie a viry. Nadměrná

produkce cytokinů však ohrožuje zdraví. Generuje vznik nebezpečných toxických látek, které sice usmrtí vše živé, ale současně i vlastní buňky. Při sepsi, což je rozsev patogenních bakterií v krevním oběhu, dochází k cytokinové bouři, tedy k takové koncentraci zánětových faktorů, při níž poklesne krevní tlak a selžou funkce životně důležitých orgánů – ledvin, plic, srdce nebo jater. Už selhání dvou orgánů vede přes veškerou léčbu ke smrti. Na sepsi umírá ve světě ročně několik milionů lidí.

Cytokinová bouře v plicích zapříčinila smrt desítek milionů lidí na španělskou chřipku v letech 1918–19 a ukončila první světovou válku pro nedostatek zdravotních vojáků v německé armádě. Politickým následkem této pandemie bylo vítězství Dohody, změna mapy celé Evropy a vznik nových států včetně Československa.

Zánětové cytokiny se využívají také v ženské antikoncepci, neboť nitroděložní tělíška vyvolávají lokální zánět a tvorbu pro plod toxického cytokinu TNF alfa a prostaglandinů produkovaných makrofágy v děložní dutině.

### Cytokiny jsou viníci alergií

Porucha cytokinové regulace imunitních odpovědí (interleukiny IL-4, IL-5, IL-9 a IL-13) je příčinou bronchiálního astmatu, těžkého alergického onemocnění dýchacích cest, které v současnosti postihuje kolem 300 milionů lidí, především ve vyspělých zemích (v Americe, Evropě a Austrálii). Cytokiny se zapojují v patogenezi a v průběhu dalších alergií jako lupénky nebo ekzémů. Jestliže se u alergických onemocnění uplatňují vyšší koncentrace některých cytokinů, je logické, že jejich blokování by mohlo snížit projevy onemocnění. Takové blokování provedou antic cytokinové protilátky. Protilátky proti TH2 cytokinům – interleukinům, které byly uvedeny u astmatu, jsou zatím v preklinických a klinických zkouškách. U těžkých forem lupénky se již používá ustekinumab (mab na konci označuje protilátku), protilátka proti zánětovým cytokinům IL-12/IL-23. Tato biologická léčba vyžaduje vysoké náklady (kolem 400 tisíc korun ročně). Je to dáno tím, že vývoj antic cytokinových protilátek patří k finančně velmi náročným.

### Naděje a zklamání z biologické léčby

Biologická léčba protilátkami a cytokiny se nasazuje tam, kde dosavadní klasická léčba nebyla dostatečně úspěšná. Cílem této terapie jsou především nespecifické střevní záněty, revmatické choroby, lupénka a některá nádorová onemocnění. V budoucnosti se tato léčba pravděpodobně rozšíří na těžká alergická onemocnění.

Protilátka proti cytokinu RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand) zvaná denosumab snižuje rozpad kostní tkáně. Používá se pro léčbu těžké osteoporózy žen po závěru plodného období (v menopauze) s náklady kolem 10 tisíc korun ročně. Je také volbou pro terapii nádorů s metastázami do kostí, zde se ale roční náklady na léčbu mohou vyšplhat až na tři čtvrtě milionu korun.

Pro léčbu revmatické artritidy a Crohnovy choroby (těžkého zánětlivého onemocnění tlustého střeva) se využívá řada protilátek proti TNF alfa jako infliximab,

adalimumab nebo jeho inhibitoru (etanercept) a další léky, jako jsou blokátory IL-1 nebo protilátky proti receptoru IL-6. Fragment protilátky proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru VEGF (ranibizumab – lék Lucentis), cytokinu, jenž stimuluje růst cév, slouží k léčbě řady nádorových onemocnění (např. karcinomu tlustého střeva) a v očním lékařství při degeneraci makuly (žluté skvrny). Prodeje tohoto léku dosahují již 8 miliard dolarů za rok a řadí se tak za prodeje blokátorů TNF (24 miliard dolarů v r. 2011).

Biologická léčba stojí jen v USA ročně desítky miliard dolarů. Protože náklady na tuto léčbu neustále stoupají, blíží se doba, kdy nebudou zdravotnické systémy nikde na světě schopny ji uhradit.

U biologické léčby platí více než kde jinde, že každý pacient na ni reaguje individuálně, takže úspěšnost nelze předem zaručit. Mnohdy tato nákladná terapie probíhá dlouho bez příznivého efektu a z finančních důvodů musí být zastavena. Samozřejmě ji provází řada nepříznivých vedlejších účinků, protože potlačení určité regulační složky v cytokinové síti vede k jejímu nahrazení jiným faktorem, který dosáhne opět nepříznivých koncentrací. Jedním z následků léčby protilátkami proti zánětovým cytokinům je nárůst virových i bakteriálních infekcí, např. četnosti virové hepatitidy. Cytokinové vztahy jsou velmi komplexní a zasahují do nich i nedávno objevené faktory, o nichž zatím mnoho nevíme.

### Alarminy

Cytokiny zánětu reagují na buněčné poškození, které může být vyvoláno infekcí, nádorovým onemocněním, transplantační reakcí nebo jinou příčinou. Poškození a usmrcení buněk ale signalizují ještě dříve faktory zvané alarminy. Pokud by se podařilo přetnout signalizační dráhy poškození na samém začátku již na úrovni alarminů, nedošlo by ke škodlivému nárůstu zánětových cytokinů např. u sepse. Takovým alarminem je třeba transkripční faktor HMGB-1 (High-Mobility Group Box), který je znakem sepse. Tento nukleární faktor se uvolňuje z jader poškozených buněk, kde provádí organizování DNA, ale jako volný faktor v mezibuněčném prostředí představuje signál poškození buněk a cytokin zesilující zánět.

V nejbližších letech čeká biomedicínské vědy úkol naučit se celou řec buněk a nejen její závěrečné fráze. Také se musíme dozvědět více o přirozeném zastavování zánětových signálů. Teprve pak budeme schopni přetnout bludný kruh, kde zánět usmrcuje další a další buňky, jejichž alarminy zesilují průběh, až zhoubný chronický proces nelze zastavit.

Poznáme-li celou cytokinovou síť regulací, budeme schopni také účinně kontrolovat zneužívání těchto látek k dopingů.

*Studie byla podpořena institucionálním záměrem AVOZ50200510.*