

Vznik a ukončení zánětu

Zánět představuje významnou složku imunity, která zajišťuje integritu organismu. Je to soubor odpovědí na nejrůznější noxy (škodliviny) a jeho jednotlivé odpovědi mohou být samy pro organismus nebezpečné, pokud nejsou včas omezeny. Protože významně zasahuje do homeostázy, rozvrat v jeho regulaci může ohrozit život. Proto je nutné zánět včas ukončit.

Zánět vzniká jako komplexní odpověď organismu na poškození tkání. Vyvolávají ho infekce, trauma, ischemie (místní omezení či zastavení přívodu okysličené krve) nebo nejrůznější dráždivé látky. Známými původci neinfekčních zánětů jsou krystaly křemene (silikóza) a soli kyseliny močové – urátů (dna), vlákna azbestu (azbestóza), oxid železitý, fosforečnan vápenatý, cholesterol (ateroskleróza) a amyloid beta (některá neurologická onemocnění), ale způsobují je nekrotické buňky obecně.

Buněčné poškození aktivuje buňky přirozené imunity k sekreci mediátorů zánětu, které vyvolají zvýšenou propustnost cévní stěny, migraci bílých krvinek z krevního oběhu do postižené tkáně a přestup obranných látek krevní plazmy do místa zánětu (protilátek, komplexu proteinů přirozené imunity zvaného komplement a antimikrobiálních peptidů). Tímto procesem vzniká v kůži zčervenání a bolestivý a horký otok (již ve starověku známá Celsova tetráda – *rubor, dolor, calor et tumor*). U vnitřních orgánů probíhá zánět skrytě, ale projeví se horečkou a změnou ve složení krevních bílkovin a fungování orgánů (pátý znak zánětu – *functio laesa*).

Pokud imunitní systém nedokáže zánět ukončit, přechází do chronicity. Běžným chronickým zánětem je zubní kaz, dále parodontitida, kterou trpí téměř miliarda lidí, astma postihující čtvrt miliardy lidí, artritida u desetiny lidstva nebo tuberkulóza, na niž umírá ročně přes jeden a půl milionu

nemocných. S chronickým zánětem jsou spojeny cukrovka i nádorová onemocnění. Chronický zánět po přestupu střevních bakterií nebo jejich složek (endotoxin, DNA, vnější membránové váčky – 60nm váčky gramnegativních bakterií apod.) do vnitřního prostředí organismu představuje podle hypotézy „děravého“ střeva (leaky gut) nejčastější příčinu depresí (odkaz na psychosomatickou medicínu). Naopak stres zesiluje procesy chronických zánětů těsným propojením obou homeostatických systémů organismu – imunitního a neurohumorálního. Ukončení zánětu by všem chronicky nemocným pomohlo, a proto je velice důležité pochopit procesy, které k němu vedou.

Lokální kontrolovaný zánět je využíván v medicíně. V děložce umístěná nitroděložní tělíska brání zánětovými mediátory otěhotnění. Jako další příklad uvedme adjuvancia obsažená ve vakcínách. Bez jejich stimulačního účinku by imunita očkovanych byla slabá a krátkodobá (blíže viz Živa 2016, 3: LIII–LV).

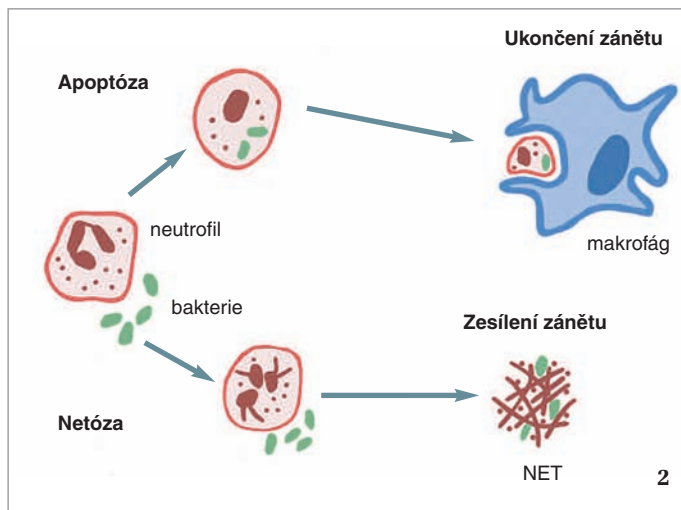
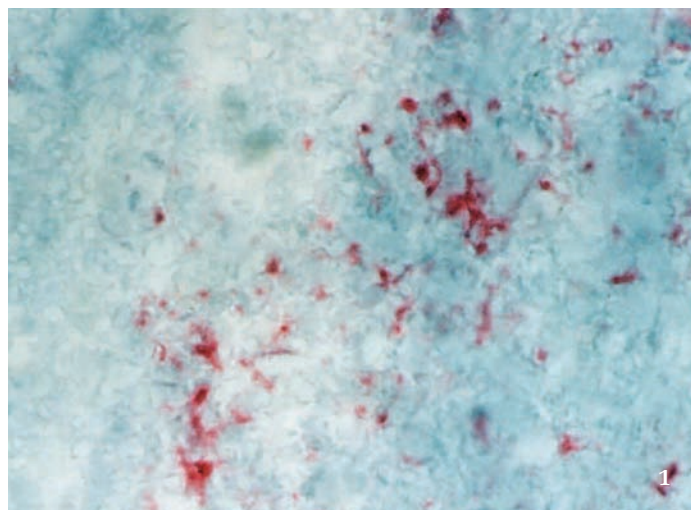
Řídicími buňkami zánětu jsou makrofágy, které se usadily v tkáních. Tyto velké bílé krvinky tvoří mimo jiné podstatu tetování, protože zůstávají na místě vpichu s pohlavním neškodným barvivem po celý život. Makrofágy reagují jak na mikroby, tak na nekrotické buňky. Rozpoznávají mikrobiální molekuly celou škálou membránových a cytoplazmatických receptorů. Signálem nekrózy jsou pro makrofágy alarminy – molekulární znaky poškozených buněk

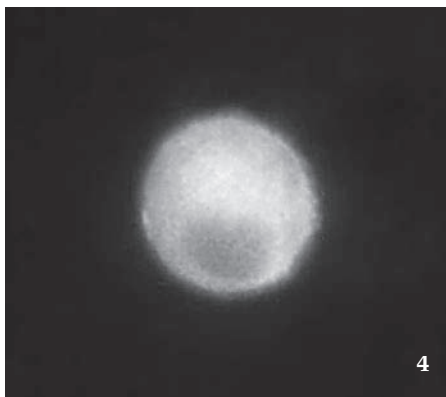
(viz obr. 1). Jejich existenci předpověděla americká badatelka Polly Matzingerová už v r. 1994 v hypotéze nebezpečí, podle níž imunitní systém nerozeznává jen mezi svým a cizím, ale také mezi normálním a poškozeným. K alarminům řadíme látky, které se uvolňují z jader poškozených buněk (DNA, histony a transkripční faktor HMGB-1 neboli High Mobility Group Box 1 protein) či z jejich plazmy (RNA, kyselina adenosintrifosforečná – ATP, proteiny teplotního šoku nebo některé antimikrobiální peptidy). Tyto molekuly se normálně nacházejí uložené uvnitř buněk, takže jejich přítomnost v extracelulárním prostoru signalizuje buněčný rozpad. Alarmin HMGB-1 je také sekretován po stimulaci buněk glukokortikoidy, např. při stresové reakci fight-or-flight (volně přeloženo boj, nebo utíkej), která zánět podporuje.

Aktivace makrofágů alarminy nebo mikroorganismy vede k produkci chemokínů – faktorů řídicích migraci bílých krvinek z krevního oběhu do místa zánětu. Jsou to nejdříve neutrofil, jež představují krátkodobou smrtící zbraň, a později monocyt, které v tkáních vyvrážají v další makrofágy – řídicí buňky zánětu. Oba typy bílých krvinek společně pohlcují škodlivé a infekční partikule a produkují antimikrobiální látky. Jde např. o kalprotektin (jeho zvýšený obsah ve stolici je známkou střevního zánětu), který vychytá v prostředí zánětu zinek, a laktoferin vychytávající železo, takže přítomné mikroorganismy trpí nedostatkem těchto dvou životně důležitých iontů.

Jak se zánět rozvíjí, dojde k produkci velmi reaktivních kyslíkových a dusíkových metabolitů, jež likvidují patogeny. Peroxynitrit (ONOO⁻, vzniká reakcí radikálu superoxidu s radikálem oxidu dusnatého) zabije vše živé – poškozuje DNA, bílkoviny a lipidy – v krátké době milisekund do vzdálenosti asi 10 μm včetně buňky, která ho vyprodukovala (obr. 3). Je to skutečně *ultima ratio* – krajní prostředek. O smrtícím účinku peroxynitritu svědčí poškození plicní tkáně a následné udušení bojovým plynem yperitem.

Mediátory zánětu zvané prozánětové cytokiny (viz tab. 1) vyvolají horečku, působí množení bílých krvinek a sekreci hormonů nadledvin a proteinů akutní fáze významných pro přirozenou imunitu (viz obr. 2; např. CRP, C-reaktivní protein, známý z ordinací praktických lékařů jako znak bakteriální infekce). Při poškození cévní





1 Lymfatická uzlina při zánětu. Červené zbarvení ukazuje protein teplotního šoku – alarmin HSP 65. Zvětšení 200×

2 Buněčná smrt neutrofilů v zánětu. Apoptóza – neutrofilové fagocytují bakterie a jsou odstraněny makrofágy – ukončení zánětu. Netóza – neutrofilové vyvrhují sítě NET (vlákna DNA s histony a antimikrobiálními peptidy), které zachytí volné bakterie – zesílení zánětu. Podle I. Trebichavského, orig. M. Chumchalová

3 Fluorescentní průkaz peroxynitritu v makrofágu infikovaném lymfatické uzliny. Zvětšení 500×

4 Fluorescentní průkaz záněťového cytokinu TNF alfa v cytoplasmě lidského makrofágu v zánětu. Zvětšení 1 000×. Snímky I. Trebichavského

stěny se aktivují krevní destičky, vyplaví histamin z tkáňových žírných buněk a dochází ke srážení krve (koagulaci). Síť fibrinu a obsahu jader neutrofilů uvězní pochyblivé patogeny.

Zastavení zánětu

Protože během zánětu dojde k imigraci velkého množství aktivovaných krvinek, jež mohou vážně poškodit cílovou tkáň, je důležité tento proces včas ukončit. Pro ukončení neboli rezoluci zánětu hrají významnou roli následující mechanismy:

- Zastavení aktivity chemokinů, které přitahují stále další bílé krvinky do místa zánětu. Toho se docílí jednak enzymatickým štěpením chemokinů, jednak pomocí falešných receptorů, které chemokiny vychytávají, ale nezprostředkují jejich migrační signál. Regulace počtu těchto falešných receptorů je nutná, aby zánět nebyl ukončen v případě vysokého počtu mikrobiálních buněk dříve, než budou zabity.

V přírodě existuje mnoho antagonistů chemokinů (faktorů, které brzdí jejich úči-

nek). Ve slinách klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) byl nalezen protein evasin, který chemokiny váže, brání tak vzniku zánětu a umožňuje přežití mikrobiálních parazitů přenášejících roztočem. O evasinu se proto uvažuje jako o léku proti zánětu.

Zajímavý je nález tripeptidu feG (fenylalanin-glutamát-glycin) ve slinách savců včetně lidí – tento imunitně selektivní protizáněťový prostředek inhibuje aktivaci a migraci neutrofilů do místa zánětu a snižuje jeho bolestivost. Protizáněťový (a antibakteriální) účinek slin vysvětluje, proč si zvířata lížou rány a proč dříve tento postup používali i lidé (dosud si reflexivně řada z nás dá zraněný prst do úst a říkáme, že jsme se z nemoci „vylízáli“).

- Pro zastavení zánětu je nutno snížit produkci prozáněťových cytokinů. V biologické léčbě těžkých chronických zánětů, autoimunitních a nádorových onemocnění se používají protilátky proti těmto cytokinům (viz Živa 2013, 3: 98–100). V organismu dochází k útlumu jejich produkce složitými regulacemi a produkcí jejich antagonistů a vazebných proteinů.

Úspěšné hojení zanícených ran řepíkem lékařským (*Agrimonia eupatoria*) bylo vysvětleno potlačením produkce prozáněťových cytokinů jeho účinnou látkou agrimonolidem.

- Snížení množství neutrofilů v místě zánětu. Protizáněťový účinek a významné klinické využití mají kortikosteroidy, které snižují počet neutrofilů v tkáních. Jsou antagonistické prozáněťovému mediátoru prostaglandinu E, jehož syntézu potlačují inhibitory enzymu cyklooxygenázy – nesteroidní léky proti zánětu aspirin, paracetamol nebo ibuprofen. Podobné účinky jako ibuprofen vykazují oleocanthal obsažený v panenském olivovém oleji.

- Odstraňování neutrofilů řízenou programovanou smrtí – apoptózou. Neutrofilové jsou

krátkodobě žijící krvinky, v krvi přítomné v klidovém stavu. Jsou extrémně citlivé na signály poškození a mikrobiální produkty a reagují na ně fylogeneticky starou zbraní imunity (nalezenou již u améb) – vytvářením NET (Neutrophil Extracellular Traps – neutrofilové extracelulární pasti). NET jsou sítě „vystřelené“ z těchto buněk a tvořené vlákny DNA, histony a antimikrobiálními složkami granúl. Jsou pro mikroby smrtící, ale indukují další rozvoj zánětu. Neutrofilové přitom umírají smrtí zvanou netóza (obr. 2), která může být pro organismus nebezpečná tvorbou krevních sraženin (trombů). Pokud se má zánět ukončit, je nutné, aby neutrofilové začaly umírat řízenou smrtí (apoptóza), jež nevyvolává výrony jaderného obsahu ani další zánět. Makrofágy pohlcují apoptické neutrofilové bez další aktivace a odcházejí do lymfatických cest, což urychluje ukončení zánětu. Apoptózu vyvolávají produkty samotných neutrofilů annexin a laktoferin. Je tedy zřejmé, že ukončení tvoří integrální součást zánětu a že mnohé záněťové složky v pozdější fázi také působí protizáněťově, stejně jako reaktivní kyslíkové a dusíkové metabolity.

- Pohlcování neutrofilů. Apoptické neutrofilové nasměrují makrofágy k svému pohlcení pomocí signálů find me (najdi mne) a eat me (požři mne), resp. produkcí molekul takto označovaných. Je, při němž makrofágy odstraňují apoptické buňky, se nazývá efferocytóza (z latinského efferre – pohřbívat). Makrofágy, původně se účastníci rozvoje zánětu, se změnil na reparační makrofágy, které produkují protizáněťové cytokiny, spolupracují s protizáněťovými regulačními T lymfocyty a s nezralými bílými krvinkami odstraňují zbývající mrtvé neutrofilové.

Protizáněťový (antiflogistický) účinek vykazují řada přírodních látek. Rutin z routy vonné (*Ruta graveolens*) inhibuje sekreci alarminu HMGB-1. Kyseliny boswelové kacidolovnicku pilovitého (*Boswellia serrata*) inhibují lipoxygenázu, čímž zastaví syntézu leukotrienů, které zesilují zánět. Antiflogistický účinek mají heřmánek pravý (*Matricaria recutita*), česnek (*Allium sativum*), zázvor (zázvorovník) lékařský (*Zingiber officinale*), yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*), kurkuma (*Curcuma* spp.), rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*), konopí (*Cannabis sativa*), neem (nimba – *Azadirachta indica*), lékořice (*Glycyrrhiza glabra*), prha arnika (*Arnica montana*), dále i bromelain ananasu a papája používané ve Wobenzymu, třesně a borůvky. Není cílem vyjmenovat zde všechny látky tlumící zánět, ale poukázat na význam fytotherapie, diety a jejího vlivu na imunitu. Snížení mikrobiální signalizace pomocí antibiotik a dalších antimikrobiálních látek má obrovský význam pro tlumení infekčního zánětu.

Při ukončení zánětu se uplatňují některé lipidové metabolity, jež zabráňují imigraci dalších neutrofilů do cílového místa (viz tab. 1). Rezoluce zánětu je ukončena regenerací tkání a návratem k jejich funkci. Tohoto složitého procesu se účastní další buněčné působky jako vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), protizáněťové cytokiny a tkáňové inhibitory enzymů metaloproteáz. Remodelaci tkáně řídí makrofágy a novou mezibuněčnou hmotu produkují fibroblasty za účasti růstových faktorů. Zánět může být ukončen reparací,

Tab. 1 Buňky a faktory regulující vznik a ukončení zánětu

Prozáněťové buňky	makrofágy, neutrofilové, monocyty, žírné buňky, krevní destičky
Prozáněťové cytokiny	interleukiny 1 beta, 6, 8, 12, 18, TNF alfa (faktor nekrotizující nádory)
Prozáněťové lipidové metabolity	prostaglandiny, tromboxany, leukotrieny
Prozáněťové mediátory	alarminy, kininy, komplement, histamin
Protizáněťové buňky	makrofágy, regulační T lymfocyty
Protizáněťové cytokiny	interleukiny 4, 10, TGF beta (transformační růstový faktor beta)
Protizáněťové lipidové metabolity	prostaglandiny, lipoxiny, protektiny, resolvin, maresiny
Protizáněťové mediátory	kortikosteroidy, inhibitory cyklooxygenázy, lipoxygenázy a cytokinů

nefunkční fibrózou, kolagenní jizvou nebo granulomem (ohraničením škodliviny obrovskými makrofágy a lymfocyty).

Optimální ukončení zánětu by znamenalo návrat k normálu – *restitutio ad integrum*. Toho ovšem, vzhledem ke složitosti celého procesu a případnému chybění či mutaci určitých obranných složek u některých jedinců, není často možné dosáhnout. Patogeny se neustále vyvíjejí a mění své strategie, a to mnohem rychleji, než se jim stačí přizpůsobovat složitý imunitní systém pomalu se reprodukcí hostitele. Mikroorganismy využívají mimikry z molekul hostitele, potlačují imunitní odpověď, stimuluji tvorbu protizáněťových cytokinů, inhibují tvorbu prozáněťových faktorů nebo šíří v systému obrany hostitele dezinformaci. Rychlou horizontální výměnou genů (např. pro rezistenci k antibiotikům) doplňují patogenní bakterie svůj genom využívajíce jeho plasticity a své rychlé reprodukce. Imunitní systém může naproti tomu svými stereotypními odpověďmi způ-

sobit velké škody vlastnímu organismu. Osudné chyby v regulaci vedou u akutního zánětu k chronicitě, v horším případě k cytokinové bouři (cytokine storm).

Cytokinová bouře

Jde o patologický rozvrat v regulaci mechanismů zánětu. Následkem nekontrolované pozitivní zpětné vazby nastane nadměrné zvýšení systémové koncentrace interleukinů 1, 6, 10, faktoru TNF alfa a desítek dalších mediátorů zánětu, což vede k poklesu krevního tlaku, poruchám srážlivosti a multiorgánovému selhání.

Syndrom cytokinové bouře bývá spojován s pandemií „španělské“ chřipky v r. 1918 (důkazy byly nalezeny v lidských tkáních uchovaných v permafrostu), s epidemií ptačí chřipky H5N1, krvácivými horečkami způsobenými filoviry či hantaviry nebo respiračním syndromem SARS a MERS. Může se vyskytnout u gramnegativní bakteriální sepsy, ale také u některých neinfekčních akutních zánětů.

Cytokinová bouře se objevila nešťastnou náhodou i u 6 dobrovolníků při prvním testování nového léku proti leukemii na lidech 13. března 2006 v londýnské nemocnici Northwick Hospital. Příčinou byla aplikace TGN1412, protilátky proti aktivací molekul CD28 na membráně T lymfocytů. Sérová koncentrace TNF alfa stoupla už za čtyři hodiny až 1 560krát, přestože muži dostali dávku léku 500krát menší než pokusná zvířata, jež neměla negativní reakci. Již za 90 minut po podání anti-CD28 nastal prudký pokles krevního tlaku a po 12 hodinách se objevilo poškození plic, selhávání ledvin a diseminovaná intravaskulární koagulace – tvorba sraženin v cévách důležitých orgánů. Jen zázrakem všichni přežili na jednotkách intenzivní péče. Malý německý výrobce TGN1412 společnost TeGenero poté zkrachovala. Tento dramatický příběh je mementem, že v pochopení zánětu jsme dosud na počátku obtížné a dlouhé cesty.

Helena Kupcová Skalníková, Hana Kovářová

Extracelulární váčky II. Exozomy a jejich význam u patofyziologických stavů člověka

Extracelulární váčky jsou útvary menší než jeden mikrometr obalené lipidovou membránou, uvolňované z buněk do vnějšího prostoru. Zprostředkovávají přenos látek mezi buňkami a účastní se tím mezibuněčné komunikace. Řadí se k nim zejména apoptotická tělíska, mikrovezikuly a exozomy, které se navzájem liší velikostí a způsobem vzniku. Blíže je o jednotlivých typech váček a jejich funkcích u bakterií, prvků, rostlin a živočichů pojednáno v předchozím dílu (Živa 2016, 6: 274–277). Druhý díl zaměříme na exozomy, které jsou nejlépe prozkoumané a u nichž se očekává praktické využití v diagnostice a léčbě patofyziologických stavů člověka. Názvosloví váček používané různými autory se poněkud liší. V našem článku používáme pojem exozom, pokud je jasné, že jde o tento typ váčky, v ostatních případech zůstaneme u obecného označení extracelulární váček.

Exozomy jsou velmi malé váčky o průměru 30–100 nm pozorovatelné pouze v elektronovém mikroskopu (obr. 1). Vznikají vylitím vnitřních váček multivezikulárních tělísek (MVB) ven z buňky (o vzniku exozomů blíže v předchozím dílu). Do exozomů je během jejich tvorby zabudována část proteinů a nukleových kyselin původní buňky. Mohou se tak stát zdrojem molekul (tzv. biomarkerů), jejichž přítomnost či množství jsou ovlivněny určitým patologickým procesem. Předpokládá se, že exozomy přítomné v tělních tekutinách člověka (např. v krvi nebo moči) bude možné využít v diagnostice chorobných stavů. Z těchto důvodů jsou možnosti izolace exozomů z různých tělesných tekutin

a složení těchto váček předmětem intenzivního výzkumu.

Izolace exozomů

Tento typ váček se nejčastěji získává z tělních tekutin (z krevní plazmy, moči, mozkomíšního moku, slin) nebo z živých médií po kultivaci buněk *in vitro* v buněčných a tkáňových kulturách. Z tekutin je lze izolovat pomocí tří základních technik – ultracentrifugací, protilátkami na magnetických kuličkách a gelovou filtrační chromatografií (anglicky size-exclusion chromatography). Uvedeným technikám může ještě předcházet filtrace vzorku přes filtr s velikostí pórů 0,45 nebo 0,22 μm k odstranění větších částic. Při izolaci exozomů musíme

brát v úvahu, že biologické tekutiny a kulturační média obsahují i další typy váček (menší mikrovezikuly a apoptotická tělíska) a různé částice (viry, agregáty proteinů, lipoproteiny), které mají podobnou velikost a mohou představovat obtížné odstranitelné kontaminace vzorků exozomů. Proto je nezbytné zvolit vhodnou techniku nebo kombinaci technik a důkladně ověřit nejen množství, ale také kvalitu a čistotu izolovaných exozomů. To platí zvláště pro následné studium jejich složení molekulárně-biologickými a proteomickými metodami nebo pro funkční studie jejich vlivu na cílové buňky.

K izolaci exozomů se nejčastěji používá diferenciální nebo gradientová ultracentrifugace. Diferenciální centrifugace v několika krocích s narůstajícím přetížením (g) odstraní buňky a další nežádoucí složky (obr. 3). V závěrečném kroku s přetížením 100 tisíc až 200 tisíc g se exozomy usadí na dně zkumavky. Pro získání čistých izolátů je vhodná ultracentrifugace v gradientu – k jeho tvorbě slouží roztoky sacharózy nebo iodixanolu o různé koncentraci, a tím i hustotě, které se navrství do ultracentrifugačních zkumavek. Vzorek obsahující exozomy nanášíme buď na povrch gradientu, nebo na dno zkumavky. Po mnohahodinové ultracentrifugaci se váčky a jiné částice v gradientu rozdělí podle své vzájemné hustoty. Exozomy se izolují z frakcí o hustotě 1,13–1,19 g/ml.

Jiná technika využívá magnetické mikrokuličky potažené protilátkou rozpoznávající určité povrchové proteiny exozomů. Touto metodou jsou vycytány váčky a částice bez ohledu na svou velikost. Mikrokuličky se smíchají se vzorkem tělní tekutiny nebo kulturačního média obsahujícího exozomy. Poté se pomocí magnetu vycytají kuličky s navázanými exozomy. K jejich izolaci se používají protilátky proti molekulám přítomným na většině exozomů – jako CD63 (bílkovina ukotvená v membráně exozomů i buněk; podle mezinárodní dohody se povrchové bílkoviny buněk označují jako CD – Cluster of Differentiation, a pořadovým číslem), nebo