

i spráše pokrýl les, pod nímž se vyvinuly lesní půdy typu luvizemí (sprašové hnědozemě).

Nicméně spráše dodnes ovlivňují půdní poměry, především tím, že poskytují vegetaci a drobné fauně vápnitý substrát také v krajinách, kde skalní podklad tvoří nevápnité, začasť i silně kyselé horniny. Příkladem jsou sprašové pokrývy na plošinách kvádrových pískovců v severní polovině Čech, kde sprašový pokrýv

umožňuje jak orbu, tak úspěšné ovocnářství (Mužský v Českém ráji, jih Polomeňských hor), stejně jako na štěrkopískových labských terasách mezi Mělníkem a Českým středohořím. Tam, kde čerstvá spráš vychází k povrchu, třeba na hranách plošin, ve stržích a úvozech, se dodnes setkáváme s bohatou stepní květenou, jako donedávna v přírodní památce Sprašová rokle u Zeměch na Kralupsku i v dalších dnes již většinou zaniklých stržích v dol-

ním Povltaví, na Slánsku nebo na jižní Moravě pod Pálavou a na Znojemsku.

Biota sprašové stepi představuje ve střední a východní Evropě jeden ze základních pilířů postglaciálního vývoje a její bližší poznání je předpokladem k hlubšímu pochopení dnešní živé přírody, jak se pokusíme osvětlit v druhém dílu článku.

Petr Šíma, Ilja Trebichavský

## Rozpoznávání – základ imunity III.

*Nepředvídatelnost je trvalou vlastností všeho živého.*  
Konrad Lorenz, Odumírání lidskosti

**Už víme, že proces rozpoznávání „cizího“, co nepatří do skladby vnitřního prostředí organismu, je důležitý pro přežití organismu jako svébytné, nezaměnitelné individuality. Předání zprávy o přítomnosti „cizího“ imunokompetentním buňkám je následováno evolučně prastarou odpovědí, podle závažnosti ohrožení buď místní, nebo systémovou. Říkáme jí obecně zánět. Zánětová reakce je nesmírně komplexní obranná reakce, které se účastní soubory hierarchicky uspořádaných a vzájemně zpětnovazebně propojených mechanismů, jež dnes přesně neznáme.**

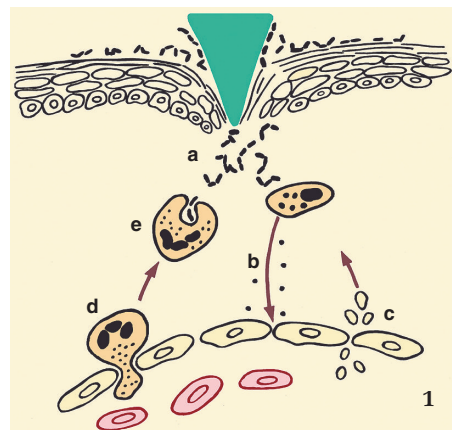
### Zánět

Zánět si určitě prožil každý člověk. Jeho jednotlivé fáze byly popsány už před dvěma tisíci let tak věrohodně, že na jejich původní formulaci není třeba dodnes nic měnit. Jsou čtyři znaky zánětu: zčervenání, otok, teplo a bolest – v latinském originálu Notae vero inflammationis sunt quattuor: rubor et tumor cum calore et dolore. Tak zánět charakterizoval kolem r. 30 našeho letopočtu římský encyklopedista Aulus Cornelius Celsus ve svém spisu De medicina. Téměř o 130 let později připojil Galén z Pergamu k této definici ještě pátý znak – porucha funkce (functio laesa).

Zánětem organismus reaguje na cizorodé látky a patogenní mikroorganismy a jejich metabolity (toxiny), které pronikly

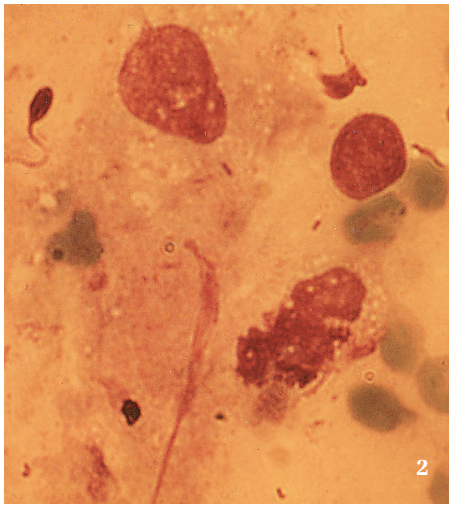
do jeho vnitřního prostředí, ale také na některé fyzikální a chemické faktory přicházející z vnějšího světa. Stejně odpovídá i na pozměněné složky vlastních buněk a tkání. Řada nemocí různé etiologie, od infekčních chorob, alergií, revmatismu, až po nádory, jsou provázeny zánětem. Podle toho, jak dlouho trvá, rozlišuje se zánět na akutní (dny) a chronický (měsíce).

Zánětu se už od jeho počáteční fáze účastní obě složky přirozené imunity: humorální, kterou představují tzv. mediátory zánětu, a buněčná. Mediátory zánětu jsou produkty bílých krvinek i jiných buněčných elementů (obr. 1). Jsou to faktory srážení krve (koagulace) i opačného procesu (fibrinolýzy), látky zvyšující propustnost cév (kininy), složky komplementu



**1** Schéma zánětu. Do místa poranění kůže vnikají bakterie (a), žírné buňky uvolní histamin zvyšující propustnost cévní stěny (b), z kapilár vycestovávají krevní destičky, které zahajují srážení krve a uvolňují TGF- $\beta$  (transformační růstový faktor beta). TGF- $\beta$  aktivuje makrofágy, ale později zánět brzdí a napomáhá obnově poškozených tkání (c). Do místa zánětu vcestovávají granulocyty – neutrofilny (d), které pohlcují bakterie (e). Všechny přítomné buňky rozpoznávají struktury bakterií pomocí receptorů TLR, produkují zánětové cytokiny a ty zesílí uvedené mechanismy. Blíže v textu. Orig. I. Trebichavský, kreslila M. Chumchalová

a různé cytokiny a v posledních fázích také specifické protilátky namířené proti cizorodým i pozměněným antigenům vlastních buněk. Převažující buněčnou složkou v zánětlivém ložisku jsou fagocytující buňky (makrofágy, monocytů a neutrofilní granulocyty), významnou roli hrají i žírné buňky (Živa 2009, 3: 102–103). Později vstupují do místa zánětu lymfocyty. Při akutním zánětu stoupá v kostní dřeni produkce monocytů až o 60 %. Ty pak vstupují do krevního oběhu, takže již po



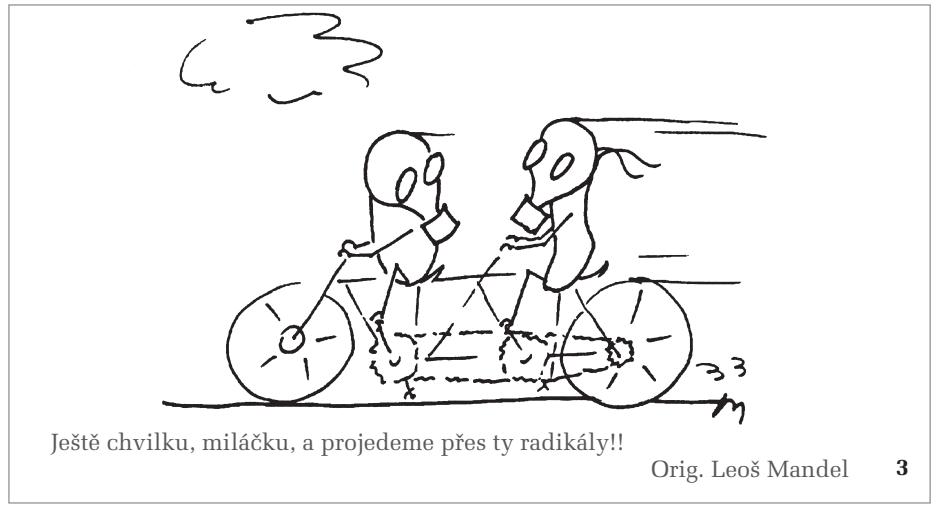
2 Skupina zánětových makrofágů, které přilnuly k nitroděložnímu tělísku. Jejich zánětové faktory jako TNF, peroxy-nitrit nebo prostaglandiny zabraňují početí. Zvětšeno 1 000x. Blíže v textu

48 hodinách se jejich počty zvyšují tři až čtyřikrát. Fagocyty pohlcují bakterie, nebo je zabíjejí antibakteriálními látkami (Živa 2001, 1–6). Dalšími buňkami, které se zapojují do zánětu, jsou dendritické buňky, které snímají otisky bakteriálních vzorů a ve spádové lymfatické uzlině je předkládají T lymfocytům. Informace je dále předávána lymfocytům B, které vytvářejí odpovídající specifické protilátky. Přirozená imunita je následována specifickou, adaptivní imunitou.

Jak zánět probíhá, je názorně vidět na kůži. Nejprve dojde k zarudnutí (rubor). Mikroskopické vyšetření ukáže, že je způsobeno roztažením cév a vyšším prokrvením ložiska zánětu. Uvolňují se pyrogenní látky vyvolávající zvýšení teploty, která urychluje metabolické pochody (calor). Postupně se zde hromadí buněčné elementy, městná se tkáňový mok a vzniká otok (tumor). Další metabolické produkty mikrobů i vlastních buněk účastnících se zánětu pak působí na nervová zakončení a vyvolávají bolest (dolor). Vytváří se hnis, což jsou z velké části odumřelé bílé krvinky spolu s usmrcenými mikroorganismy.

I když je zánět v boji proti infekci velmi účinný, poškozuje také okolní tkáň (functio laesa) i celkově organismus samotný. Pokud není příčina zánětu odstraněna, anebo není aplikována včasná a účinná léčba, přechází krátkodobý akutní zánět v zánět chronický, který může způsobit nevratné poškození tkání i orgánů. Příkladem může být náhrada kůže vazivovou jizvou. Účinky zánětu dokumentují nitroděložní tělíska, která zabraňují početí (obr. 2).

Při zánětu vznikají toxické sloučeniny kyslíku a dusíku a jejich radikály. Některé z nich existují jen krátkodobě, ale jsou natolik reaktivní, že okamžitě zabíjejí mikroby. Jsou však velmi nebezpečné. Např. peroxy-nitrit ONOO<sup>-</sup> během zlomku vteřiny zabije vše živé do okruhu jednoho buněčného průměru kolem buňky, která jej vyprodukovala, včetně jí samé. Některé patogenní bakterie, jako původce břišního tyfu a salmonelózy *Salmonella enterica*, mohou být i proti těmto účinným chemickým zbraňím rezistentní. Nebo lze zmínit



Ještě chvílku, miláčku, a projedeme přes ty radikály!!

Orig. Leoš Mandel 3

další antibakteriální zbraň leukocytů, enzym myeloperoxidázu, jež rozkládá toxický peroxid vodíku (a způsobuje žlutozelené zabarvení hnisu), přičemž vzniká další toxická látka, kyselina chlorná. Obě sloučeniny se používají jako dezinfekční činidla. Přitom si ani neuvědomujeme, že jde o složky přirozené imunity, které slouží k bezprostřednímu zabíjení patogenních mikrobů. Kyselina chlorná vzniká i při chlorování pitné vody ve vodárenských úpravárnách a v plaveckých bazénech. Účinkuje sice už v ředění několika objemových miliontin, ale přesto jsou některé mikroorganismy (např. prvoci) vůči chlorování velmi odolné. V r. 1993 vypukla v městě Milwaukee ve Wisconsinu (USA) epidemie kryptosporidiózy vyvolaná fekálními prvoky rodu *Cryptosporidium*, která byla způsobena nedokonalou úpravou pitné vody. Během dvou týdnů dostalo přes 400 tisíc lidí průjmy provázené horečkami a křečemi. Podobné kontaminace vodovodní sítě postihly v letech 2007–08 také Anglii a Irsko a statisíce lidí si muselo po jistou dobu vodu převařovat, což zabránilo masovému rozšíření epidemie. V této souvislosti je třeba zmínit, že pitná voda znečištěná patogenními viry, bakteriemi a z prvoků hlavně amébami, nebo i jinými parazity způsobí úmrtí několika milionů lidí ročně. Jen od počátku r. 2010 do doby psaní tohoto článku na světě zemřelo na choroby vyvolané kontaminovanou vodou podle statistik Světové zdravotnické organizace už jeden a čtvrt milionu lidí.

### Inflamazomy

Na počátku zánětové odpovědi je rozpoznání škodliviny pomocí senzorů přirozené imunity. Významným vyvolavatelem zánětu (nikoli příčinou) jsou nitrobuněčné senzory zvané inflamazomy. Jsou to v podstatě komplexy cytoplazmatických proteinů, které teprve na počátku našeho tisíciletí popsal a takto definoval F. Martinon z Biochemického ústavu univerzity v Lausanne ve Švýcarsku. Inflamazomy rozpoznávají hlavní struktury mikrobů, jako jsou lipopolysacharidy vnější membrány gramnegativních bakterií, toxiny bakterií (např. antraxu), ale i některé jiné škodlivé látky, které pronikly do buněčné cytoplazmy. Jak bylo zmíněno již v druhé části této série článků, k rozpoznání slouží několik receptorů NLR nebo receptor AIM2 pro DNA (Živa 2010, 2: 50–52).

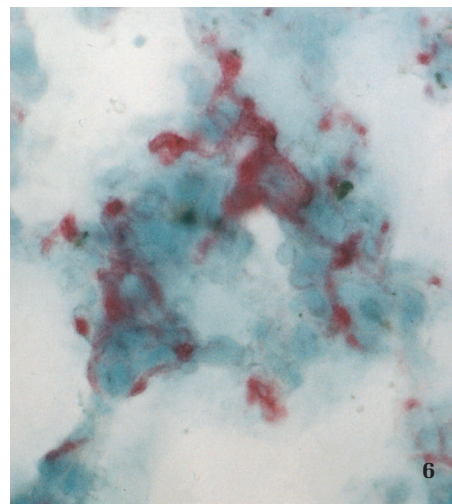
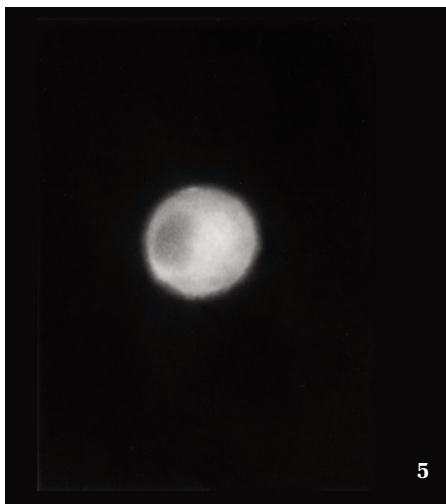
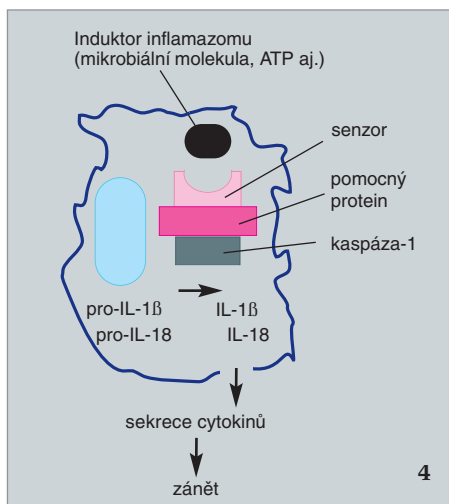
Prozatím byly popsány čtyři typy inflamazomů. Podílejí se na vzniku mnoha zánětlivých onemocnění, např. dny, při níž jsou škodlivinou soli kyseliny močové. U Alzheimerovy choroby jsou inflamazomy aktivovány amyloidem, u azbestózy a silikózy azbestovými vlákny a křemičitými krystaly, při malárii molekulou hemu v hemoglobinu. Aktivace inflamazomu se využívá při očkování, kdy se do vakcín kvůli zvýšení účinnosti přidává hydroxid hlinitý.

Signál rozpoznání je v inflamazomu přenesen na proteiny, které aktivují cytoplazmatický enzym kaspázu-1 (obr. 4). Ta představuje ústřední výkonnou složku inflamazomu, protože bezprostředně indukuje zánětovou odpověď. Má však ještě další důležitou funkci: účastní se při opravách buněčné membrány proděravělé účinkem některých bakteriálních toxinů. Kaspáza-1 může také vyvolat smrt buňky infikované nitrobuněčnými parazity (pyroptózu) a tím zabránit šíření infekce.

### Cytokiny

Aktivovaná kaspáza-1 autolyticky štěpí dva proteiny, které se v cytoplazmě nacházejí v inaktivovaném stavu. Vzniknou dva aktivované proteiny, které představují další spouštěče zánětu. Jsou to endogenní pyrogen (zvyšuje teplotu) interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) a interleukin-18 (IL-18), který podporuje tvorbu aktivátoru makrofágů, interferonu gamma (IF- $\gamma$ ).

Co jsou cytokiny? Původně byly popsány jako regulační buněčné funkce v rámci imunitního systému. Produkují je různé typy buněk a slouží jako mezibuněčné signální molekuly, které zajišťují komunikaci buněk mezi sebou. Navazují se na odpovídající receptorové struktury na buňkách, jejichž funkce modulují. Jde o relativně malé polypeptidy, které se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích ( $10^{-12}$ ), tedy o tři a více řádů nižších než hormony. To představuje pouhé miliardtiny mg na gram tkáně po krátkou dobu (některé mají vrchol koncentrace jen několik minut). Dokonce i nejcitlivější imunoenzymatickými metodami (ELISA) se nacházejí na hranici měřitelnosti. Přesto jejich nízké koncentrace dostačují, aby došlo k vazbě na odpovídající membránové receptory a k indukci příslušné odpovědi. Zatímco hormony zasahují různé orgány, cytokiny mají za cíl jednotlivé buňky. Jinak řečeno, zatímco



hormony působí v celém organismu, cytokiny působí hlavně místně a cíleně. Bez přesného rozpoznání informace přenášené cytokiny by specializované buňky nemohly zareagovat na přítomnost mikroorganismů, rozpoznat jejich cizí vzory a toxické produkty, nemohly by tuto zprávu odpovídajícím způsobem vyhodnotit, takže by k obranné reakci nedošlo.

Cytokiny jsou faktory s pleiotropními účinky (vykazují různé funkce u různých buněk v různém místě a čase) a jsou také redundantní (různé cytokiny zajišťují tužé funkce). V tomto ohledu se cytokiny blíží pojetí biologického principu neurčitosti (podobně jako ve fyzice Heisenbergův princip neurčitosti, který postuluje, že čím přesněji určíme polohu částice, tím méně přesně bude stanovení její rychlosti a naopak). To má důležitý význam pro zachování jejich funkčnosti i v případě, že by došlo k mutaci jejich genů. Přesto, nebo právě proto jsou důležité pro zajištění mezibuněčné komunikace. Jako příklad zmíněného biologického principu neurčitosti lze uvést cytokin TNF- $\alpha$  z rodiny faktorů nekrotizujících nádory (TNF, Tumor Necrosis Factor). Ve velmi malých kvantech reguluje vyzrávání lymfatických struktur v embryu, ale ve vyšších koncentracích se uplatňuje při rozpoznávání cizorodých (mikrobiálních) vzorů. Poškození buněk patogenním agens pak má za následek ještě vyšší tvorbu TNF- $\alpha$ , což vede k horečce a zánětu, přičemž jsou infikované buňky zabíjeny, ale také třeba samotné embryo. Na tomto principu fungují antikoncepční nitroděložní tělíška (obr. 5). Ještě vyšší koncentrace TNF- $\alpha$  v krevním oběhu však mají za následek funkční rozvrat orgánů vedoucí k septickému šoku a následně ke smrti organismu. Proto je právě tento cytokin produkovan jen velmi krátce a jeho působení je striktně omezeno protizáněťovými cytokiny a dalšími brzdícími mechanismy zánětu.

Vraťme se však k prozáněťovým cytokinům IL-1 $\beta$  a IL-18. Po aktivaci inflamazomu mikroby, které pronikly do cytoplazmy, jsou oba interleukiny okamžitě z buňky sekretovány do mezibuněčného prostředí, kde bezprostředně vyvolávají záněťové změny vedoucí k mobilizaci lokální imunitní odpovědi. Se stejnou rychlostí se uvolňují i další prozáněťové cytokiny obsažené v buňkách cévní výstelky, granulocytech a v krevních destičkách.

To je pro vyvolání zánětu velmi důležité, protože ostatní faktory regulující nástup a průběh zánětu nejsou uvnitř buněk připraveny předem v hotové, účinné formě. Jejich syntéza trvá relativně dlouho, protože má několik fází: musí dojít k přepisu genů a jejich překladu do mRNA, pak k syntéze v ribozomech, posttranslační úpravě a posléze k tvorbě komplexního sekrečního aparátu, který teprve umožní jejich uvolnění z buněk.

Podprahové podněty k zánětu, které vycházejí např. od symbiotických bakterií žijících v obrovských množstvích v trávicím ústrojí, tlumí řada regulačních mechanismů, protože jinak by dlouhodobě přetrvávající zánět organismus vyčerpával. Pokud však při tomto riskantním soužití s mikroorganismy dojde k infekci vlastních buněk makroorganismu, nebo dokonce k jejich smrti, je tento stav rozpoznáván jako nebezpečí.

#### Rozpoznávání nebezpečí

Hypotéza o rozpoznávání nebezpečí (Danger Hypothesis) vnesla do imunologie zcela nový pohled. Vyslovila ji v r. 1994 P. C. E. Matzingerová z Národního ústavu pro zdraví v Bethesda (USA). Podle ní organismus toleruje svoje symbiotické mikroby, i když nesou v podstatě stejné mikrobiální vzory jako mikroby patogenní, ale svou imunitní odpovědí reaguje hlavně na poškození svých vlastních buněk, na nové struktury, které přitom vznikají. A právě tyto vzory jsou rozpoznávány jako ohrožující. Hypotézu o rozpoznávání nebezpečí dosud někteří vědci odmítají.

Motivy poškození (DAMP – Damage Associated Molecular Patterns) jsou např. výše zmíněné soli kyseliny močové, které vyvolávají vznik záněťového onemocnění kloubů známého jako dna. Dále lze jmenovat volnou kyselinu adenosintrifosforečnou nebo stresové proteiny tepelného šoku (HSP – Heat Shock Proteins, obr. 6), některé antimikrobiální peptidy, proteiny mezibuněčné hmoty nebo transkripční faktory, jako je HMGB-1 (High Mobility Group Box 1). HMGB-1 je produkovan všudepřítomnými makrofágy nebo se uvolňuje do mezibuněčného prostoru při nekroze buněk, a je tedy v organismu poměrně hojně zastoupený. Působí jako pleiotropní prozáněťový cytokin, může poškodovat plicní buňky, regulovat šíření a invazivitu nádorových buněk, ale také vyvolat migraci

4 Rozpoznání mikrobu uvnitř buněk pomocí inflamazomu – cytoplazmatického proteinového komplexu. Mikroby, které proniknou do buněk, jsou rozpoznávány inflamazonovým senzorem NLR (NOD Like Receptor). Poté se aktivuje enzym kaspáza-1, jež rozštěpí neaktivní cytokinové prekurzory za vzniku funkčních cytokinů IL-1 $\beta$  a IL-18, které spouštějí záněťovou reakci.

Orig. I. Trebichavský

5 Makrofág z nitroděložního tělíška Dana. Světlá fluorescence označuje lokalizaci cytotoxického cytokinu TNF- $\alpha$ . Buněčné jádro a okolí buňky jsou tmavé. Zvětšeno 1 000 $\times$

6 Plicní buňky infikované bakterií *Escherichia coli* obsahují stresový protein tepelného šoku HSP, který představuje signál nebezpečí (červené zbarvení). Ostatní buňky jsou modré, prostory plicních sklípků bílé. Zvětšeno 300 $\times$ . Blíže v textu. Snímky I. Trebichavského

a dělení kmenových cévních buněk, což má velký význam pro novotvorbu cév, a tím pro obnovu tkání.

#### Závěr

Poznali jsme, že zánět je komplexní, hierarchizované propojená řada událostí vyvolaných rozpoznáním motivů nebezpečí, které aktivují cytoplazmatické prozáněťové komplexy, inflamazomy. Rozpoznávání se však neděje na principu „ano“ a „ne“, ani „vše“, nebo „nic“, ale je kvantifikováno. Nevíme ještě, jak je nastavena rovnováha, kdy záněťové procesy vedou k návratu do původního stavu (tedy k uzdravení), ale víme, že se za určitých okolností zánět může zvrátit v poškozující proces, který končí smrtí. Organismus toleruje stovky gramů bakterií různých druhů, které žijí symbioticky ve střevě, nebo na kůži a sliznicích. Proč ale nedojde k zánětu? Proč imunitní systém toleruje vlastní buňky a proč v některých případech začne proti nim reagovat? Rozhodnutí o tom, jak nakonec vše dopadne, závisí ještě na dalších mechanismech rozpoznávání určujících, které funkční schopnosti imunitního systému budou pro reakci na vzniklý podnět využity. O tom pojednáme příště.

Studie byla podpořena institucionálním záměrem AV0Z 5020051.