

Zánět, mediátory zánětu

Autoři

Doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D., prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

(bousova@faf.cuni.cz)

Katedra biochemických věd

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zánět je **základním obranným mechanismem** organismu. Cílem je zničení nebo alespoň ohraničení škodliviny a rekonstrukce nebo náhrada poškozené tkáně. Zásadní úlohu v **zánětlivé reakci** hraje imunitní systém, neméně důležitá je však i role neuroendokrinní regulace. V obranné zánětlivé reakci jsou neoddělitelně spojeny pozitivní obranné složky a složky poškozující. Díky mnoha úrovním regulace převáží za normálních okolností pozitivní prvky obranného zánětu nad mírou poškození vlastních struktur, která ho provází. Důležitým faktem je, že k realizaci jednotlivých kroků aktivace imunitního systému je vždy zapotřebí souběhu několika aktivačních signálů. Díky tomu nemůže dojít k rozvoji imunitní odpovědi v přítomnosti jednoho, byť silného aktivačního podnětu.

Fáze zánětlivé odpovědi

Zánětovou reakci můžeme rozdělit na tři navazující fáze, ač je to dělení umělé a jednotlivé fáze se mezi sebou prolínají. **Iniciační fáze** nastává bezprostředně po podnětu a probíhá v řádu hodin až dnů. Dochází k aktivaci rozpustných mediátorů zánětu, hemokoagulačního a fibrinolytického systému a k migraci buněk zánětu do místa poškození. Charakteristickým rysem této fáze je rychlá amplifikace imunitní odpovědi. Buněčné složky přirozené imunity jsou aktivovány (signální dráhy s NF- κ B) a syntetizují prozánětlivé cytokiny, chemokiny a proteiny regulující buněčný cyklus. Chemokiny vyvolají migraci těchto buněk do místa zánětu, která je podmíněna změnami adhezních vlastností buněk imunitního systému, endotelových buněk a dalších buněčných elementů. **Vrcholná fáze** je charakterizována aktivitou specifické imunity, dochází k dokončení obrany organismu a k rozvoji imunologické paměti, která je pro přežití člověka nezbytná. Specifická imunita se rozvíjí v sekundárních lymfatických orgánech, kde dendritické buňky předkládají zpracované antigeny T lymfocytům. Dochází ke klonální expanzi – proliferaci klonů T a B lymfocytů specifických pro dané



antigeny. V **pozdní fázi** dochází k reparaci poškození a k obnově tkáňové integrity. Na procesech hojení, které jsou regulovány cytokiny a adhezními interakcemi, se podílejí jak složky imunitního systému, tak endotelové buňky a fibroblasty. Je obnovena mezibuněčná hmota a cévní zásobenění. Optimálně se poškození tkáně hojí *ad intergum*, avšak tato situace je výjimečná a obvykle dochází v jisté míře k fibrotizaci a omezení funkční kapacity tkáně (hojení *per defectum*).

Lokální znaky zánětu

Lokální makroskopické znaky zánětu jsou známy již z dob antického Řecka a Říma. V 1. století našeho letopočtu Aulus Cornelius Celsus popsal čtyři charakteristické znaky zánětu – **calor** (zvýšení teploty), **rubor** (zarudnutí), **tumor** (otok) a **dolor** (bolest), které o 200 let později doplnil Claudius Galenus (Galén) o **functio laesa** (porušená funkce). Tyto znaky odpovídají postupu zánětlivé reakce, kde se objevuje vasodilatace, edém a poškození tkáně.

Postup akutní zánětlivé odpovědi

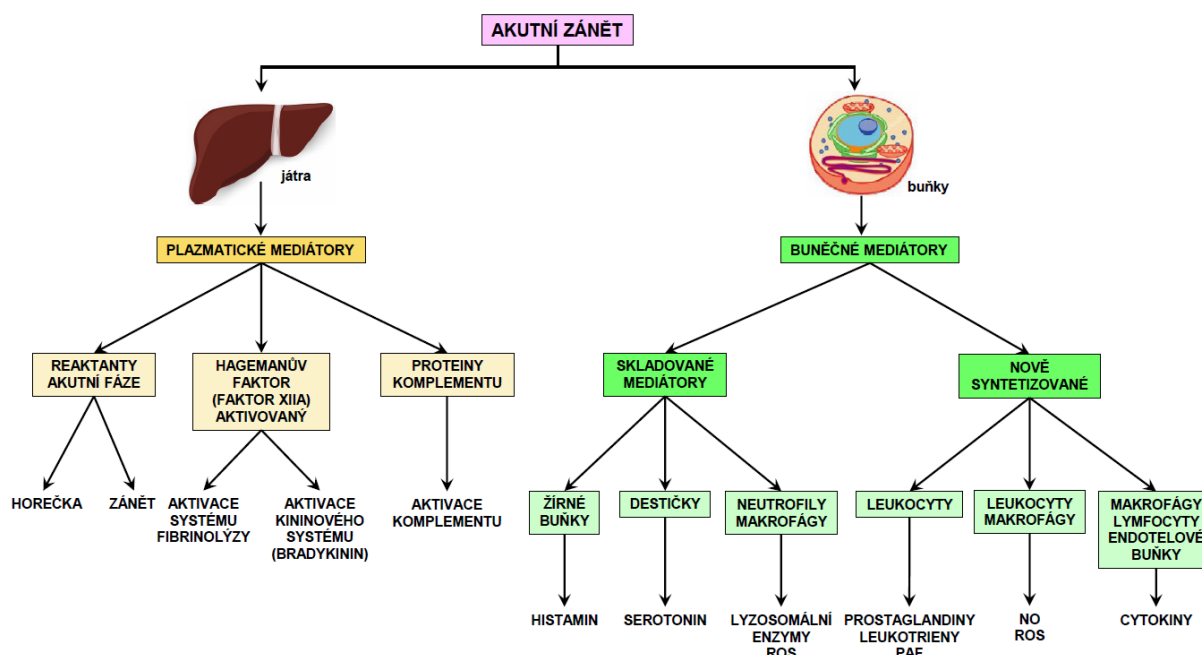
Akutní zánětlivá odpověď začíná po přímém poškození nebo po stimulaci buněčných či strukturních složek tkáně a účastní se jí parenchymové buňky, mikrovaskulatura, tkáňové makrofágy a žírné buňky, mesenchymální buňky (např. fibroblasty) a mezibuněčná hmota. Po iniciaci akutní zánětlivé odpovědi vznikají v místě poškození specifické mediátory zánětu, které přímým působením na cévní stěnu **zvyšují vaskulární permeabilitu** (kontrakce a retrakce endotelových buněk, alterace transcytózy). Díky tomu se v postižené tkáni hromadí tekutina (edém) a buněčné komponenty, které unikají z cévního řečiště. Poškození bariérových funkcí cévní stěny je typickým znakem akutního zánětu. Uvolněné mediátory zánětu **aktivují destičky a zánětové buňky** v cévním systému. Je aktivována kininová, komplementová a koagulační kaskáda, což vede k dalšímu zvýšení cévní permeability a edému. Chemotaktické faktory pak přitahují neutrofile z cévního systému do poškozené tkáně. Rekrutované leukocyty zahájí v tkáni **eliminaci patogenu**, která je následována odstraněním poškozených složek a **opravou poškozené tkáně**. Tyto buňky produkují další mediátory zánětu, které mohou posílit nebo potlačit zánětlivou odpověď.

Mediátory zánětu

Mediátory zánětu zprostředkují odpověď organismu na cizorodý stimul. Jedná se rozpustné sloučeniny schopné difúze, které aktivují některou ze složek zánětu prostřednictvím



interakce s příslušným receptorem. Působí lokálně i na vzdálenějších místech organismu. Endogenní mediátory vznikají působením imunitního a hemokoagulačního systému, zatímco exogenní mediátory jsou sloučeniny vytvořené původci infekce, fyzikálními faktory či mechanickými vlivy. Působí jako faktory vasopermeability (kininy, eikosanoidy, histamin, serotonin, anafylatoxiny komplementu) nebo leukotaktické faktory (peptidy komplementu, bakteriální produkty, štěpné produkty fibrinu, cytokiny). Endogenní mediátory zánětu můžeme podle původu rozdělit na plazmatické, které jsou syntetizované v játrech, a buněčné pocházející z neutrofilů, monocytů/makrofágů, žírných buněk, destiček či endotelových buněk (Obr. 1).



Obr. 1: Plazmatické a buněčné mediátory zánětu (upraveno z Porth 2011).

Mediátory časně fáze mají význam hlavně v akutní zánětlivé reakci a patří mezi ně histamin, serotonin a další vazoaktivní látky syntetizované žírnými buňkami a destičkami, chemoatraktanty (např. C5a) a cytokiny (interleukin-1, interleukin-6, tumor-nekrotizující faktora). Mediátory pozdní fáze regulují vaskulární změny, které se odehrávají později (cca 6-12 hodin po iniciaci zánětu). Patří mezi ně zejména lipidové mediátory tvořené z kyseliny arachidonové.

Histamin a serotonin

Nejvýznamnějšími vazoaktivními mediátory zánětu jsou biogenní aminy histamin a serotonin (větší význam u hlodavců). Jsou skladovány v granulech žírných buněk, bazofilů a

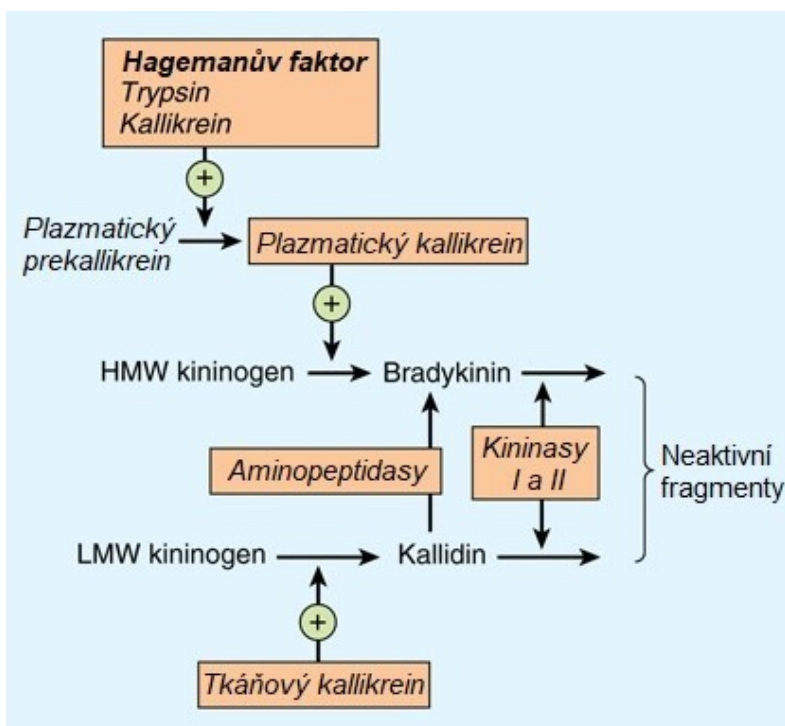


destiček. **Histamin** vzniká dekarboxylací aminokyseliny histidinu, která je katalyzovaná histidindekarboxylasou. V granulech žírných buněk vytváří komplexy s glykosaminoglykanem heparinem (součást proteoglykanu serglycinu). Po degranulaci žírných buněk je exocytózou uvolněn do okolí, kde vyvolává dilataci arteriol, zvýšení vaskulární permeability, kontrakci hladkých svalů (např. bronchů) a působí jako chemoatraktant pro eozinofily. Tyto účinky jsou zprostředkovány interakcí histaminu s H1 receptory. Histamin je degradován oxidační deaminací, kterou katalyzuje enzym histaminasa (diaminoxidasa) na imidazolacetát. **Serotonin** vzniká z aminokyseliny tryptofanu, který je nejprve tryptofanhydroxylasou hydroxylován v poloze 5 na 5-hydroxytryptofan. Ten je následně dekarboxylován na serotonin pomocí dekarboxylasy aromatických aminokyselin. Rovněž serotonin zvyšuje vaskulární permeabilitu, vyvolává dilataci kapilár a kontrakci hladkých svalů (mimo cévy). Jeho vazokonstrikční účinek snižuje únik krve z těla při krvácivých poraněních. Většina serotoninu je uložena v GITu a CNS, ale velké množství je uloženo rovněž v granulech destiček. Hlavní degradační drahou serotoninu je oxidační deaminace monoaminoxidasou A na 5-hydroxyindolacetaldehyd a následná oxidace aldehyddehydrogenasou na 5-hydroxyindolacetát.

Kallikrein-kininový systém

Kininy (bradykinin, kallidin) jsou významnými mediátory zánětu peptidové povahy. Vznikají z molekul prekurzorů (kininogenů) působením proteolytických enzymů (např. kallikreinu). **Kininogeny** jsou syntetizovány játry a uvolněny do krve, kde působí jako kofaktory hemokoagulační kaskády, inhibitory cysteinových proteas a jako součást reakce akutní fáze. **Kallikrein** je v plazmě přítomen v neaktivní formě, která se označuje jako prekallikrein, a tvoří komplex s vysokomolekulárním kininogenem (HMW kininogen). Při poškození tkáně, kdy dochází k odkrytí kolagenních vláken, se tento komplex spolu s Hagemanovým faktorem (faktor XII krevního srážení) váže na negativně nabitý kolagen. Hagemanův faktor je aktivován a štěpí prekallikrein na kallikrein, čímž ho aktivuje. Kallikrein rozkládá vysokomolekulární kininogen za vzniku nonapeptidu bradykininu. **Bradykinin** je silným vasoaktivním mediátorem, který zvyšuje vaskulární permeabilitu, vyvolává vasodilataci, bolest a stimuluje metabolismus kyseliny arachidonové. Aktivita a vznik bradykininu jsou pečlivě kontrolovány. Aktivace kininové dráhy může být potlačena působením inhibitorů aktivovaného Hagemanova faktoru (C1 inhibitor) nebo kallikreinu (C1 inhibitor, α 2-makroglobulin). Navíc je v plazmě přítomná řada enzymů, které bradykinin rozkládají a snižují tak jeho aktivitu. Mezi ně patří například angiotenzin-konvertující enzym a karboxypeptidasa N, které se označují jako **kininasy** (Obr. 2).



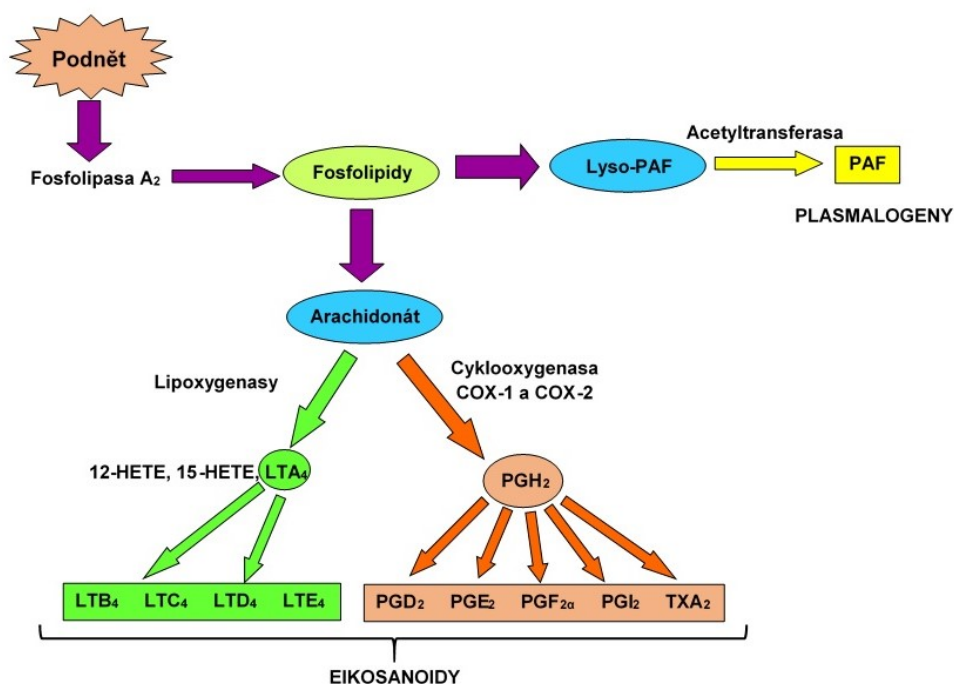


Obr. 2. Kallikrein-kininový systém (upraveno z Katzung a kol. 2012). HMW kininogen = vysokomolekulární kininogen, LMW kininogen = nízkomolekulární kininogen

Lipidové mediátory

Lipidové mediátory můžeme rozdělit do dvou skupin – na **eikosanoidy** a **plasmalogeny** (Obr. 3). Během zánětu jsou aktivovány buněčné fosfolipasy (zejm. fosfolipasa A₂), které membránové fosfolipidy štěpí a uvolňují arachidonát. Zbývající lysofosfolipid (lyso-PAF) je acetyltransferasou přeměněn na faktor aktivující destičky (PAF), který patří do skupiny plasmalogenů. Arachidonát má krátký biologický poločas a může být metabolizována dvěma hlavními cestami – cyklooxygenasovou a lipoxygenasovou – za vzniku různých eikosanoidů. Působením cyklooxygenasy vznikají tzv. prostanoidy, mezi něž patří prostaglandiny, tromboxany a prostacyklin. Druhou cestou vznikají leukotrieny (katalyzováno 5-lipoxygenasou), hepoxiliny a 12-HETE (katalyzováno 12-lipoxygenasou), lipoxiny a 15-HETE (katalyzováno 15-lipoxygenasou). Lipidové mediátory nejsou v buňce skladovány, ale jsou syntetizovány a uvolněny v odpověď na odpovídající stimul. Jejich účinky v organismu se liší nejen podle druhu eikosanoidu, ale i podle toho, na které receptory může v daném místě působit.



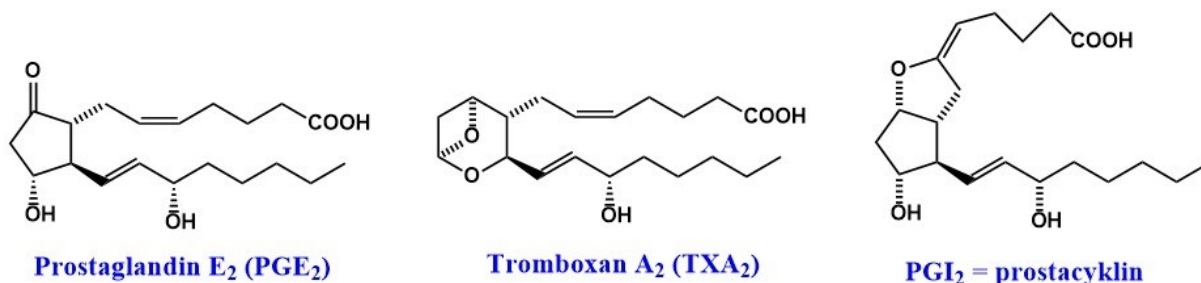


Obr. 3. Syntéza lipidových mediátorů.

Syntéza prostanoidů je zahájena **cyklooxygenasou** (prostaglandin-endoperoxid-synthasa; COX), která přeměňuje arachidonát na prostaglandin H₂ (PGH₂), který je společným meziproduktem syntézy všech typů prostanoidů. COX katalyzuje první dvě reakce syntézy prostanoidů – cyklooxygenasovou reakci, při které vzniká bicyklický endoperoxid s hydroperoxylovou skupinou PGG₂, a peroxidasovou reakci, při které je hydroperoxylová skupina PGG₂ redukována na hydroxylovou skupinu PGH₂. Jsou známy dvě isoformy enzymu COX-1 (exprimována konstitutivně) a COX-2 (exprese indukována cytokiny nebo růstovými faktory). Nestabilní PGH₂ je působením dalších enzymů přeměňován na **tromboxany, prostaglandiny a prostacyklin**. O tom, který prostanoid vznikne, rozhoduje enzymová výbava dané buňky. Daný typ buňky většinou produkuje 1 konkrétní druh prostanoidu: destičky produkují téměř výhradně tromboxany, cévní endoteliální buňky především prostacyklin a buňky myokardu hlavně PGE₂ a PGF_{2α}. **Prostaglandiny** vznikají působením např. prostaglandin-D₂-synthasy nebo prostaglandin-E₂-synthasy. Jedná se o tkáňové hormony, které jsou aktivní již v nanomolárních koncentracích. PGE₂ vyvolává vasodilataci, zvyšuje vaskulární permeabilitu, je pyrogenem a zvyšuje citlivost na bolestivé podněty. Syntéza **tromboxanů** (Tx) je v destičkách, monocitech a makrofázích katalyzována tromboxansynthasou. TxA₂ vyvolává agregaci destiček, vasokonstrikci a bronchokonstrikci.



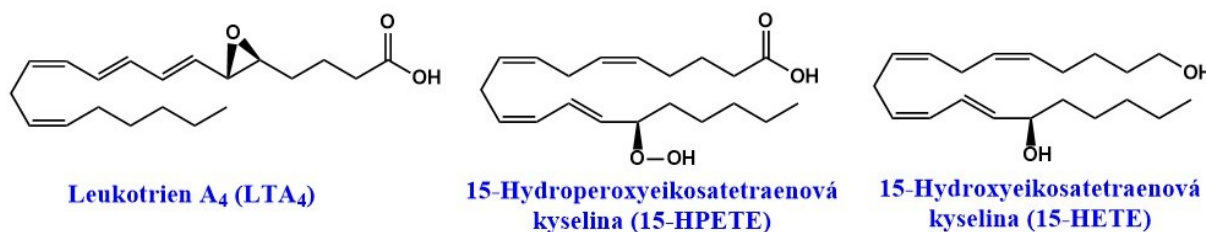
Jeho účinky jsou antagonizovány působením **prostacyklinu** (PGI₂), který je silným vasodilatátorem a brání agregaci destiček. PGI₂ je syntetizován v endotelových buňkách působením prostacyklinsynthasy. Základní struktury prostanoidů jsou uvedeny v Obr. 4.



Obr. 4. Struktury základních prostanoidů.

Tři různé lipoxygenasy zavádějí kyslík do polohy 5, 12 či 15 arachidonátu, ale jen 5-lipoxygenasa syntetizuje **leukotrieny** (LT). Jedná se o dioxygenasy obsahující nehemové železo. Prvními vznikajícími produkty jsou hydroperoxyeikosatetraenové kyseliny (HPETE), které jsou rychle redukovány glutathionperoxidasou na hydroxyeikosatetraenové kyseliny (HETE) nebo podstoupí isomerizační reakce za vzniku leukotrienů či lipoxinů. 5-lipoxygenasa, je přítomná zejména v leukocytech a vyžaduje přítomnost aktivačního proteinu FLAP a Ca²⁺. Tento enzym katalyzuje přeměnu 5-HPETE na nestabilní LTA₄, který je rychle přeměněn na peptidoleukotrieny (LTC₄, LTD₄ a LTE₄) připojením molekuly GSH nebo hydrolyzován na LTB₄. Leukotrieny jsou prozánětlivé mediátory, které působí v nízkých koncentracích (nM), vyvolávají rychlou odpověď organismu, ale jejich působení je krátkodobé. Mají vasokonstrikční a silný bronchokonstrikční účinek (zejm. peptidoLT), zvyšují permeabilitu cév, působí chemotakticky a aktivačně na leukocyty, podporují diapedézu a fagocytózu. **Lipoxiny**, na jejichž syntéze se podílí 15-lipoxygenasa, mají protizánětlivé účinky, podílejí se na odeznění zánětu a brání jeho přechodu do chronické fáze. Lipoxiny inhibují chemotaxi a diapedézu, brání produkci ROS a cytokinů, působí jako antagonisté receptorů pro LT, vyvolávají bronchodilataci. **Hepoxiliny**, které vznikají působením 12-lipoxygenasy, brání oxidačnímu poškození buněk zvýšením exprese GPx a stimulují sekreci insulinu v β-buňkách pankreatu. **5-HETE** se účastní imunitní obrany proti bakteriálním infekcím (participují na chemotaxi a degranulaci neutrofilů), zatímco **12-HETE** a **15-HETE** jsou syntetizované v ledvinách a podílejí se na regulaci angiotensin-aldosteronového systému. Základní strukturální vzorce jsou uvedeny v Obr. 5.





Obr. 5. Strukturální vzorce leukotrienu, HETE a HPETE

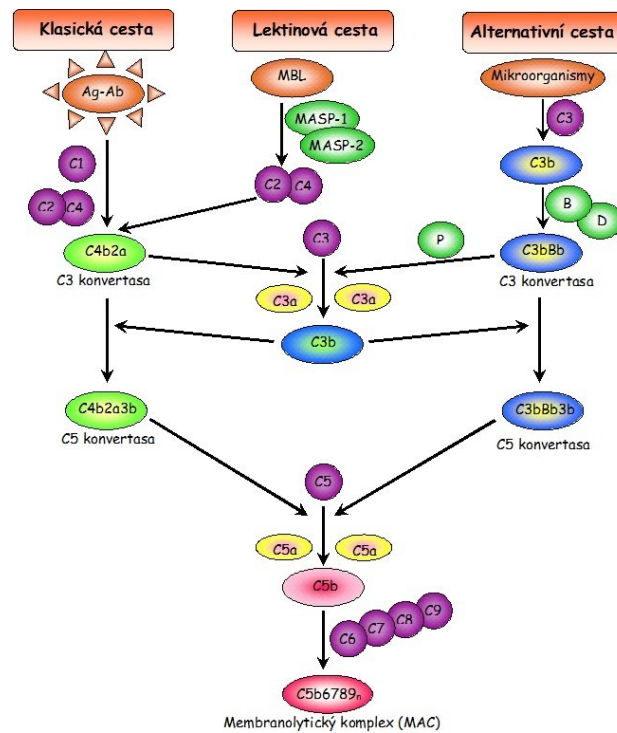
Destičky produkují skupinu acetylovaných 1-*O*-alkyl-*sn*-glycerol-3-fosfocholinů označovaných jako **faktor aktivující destičky** (PAF). PAF vzniká acetylací lyso-PAF v poloze *sn*-2, kterou katalyzuje lyso-PAF-acetyltransferasa. Tento mediátor vyvolává agregaci destiček a to již v pikomolárních koncentracích, je silným chemoatraktantem pro fagocyty, stimuluje uvolnění lyzozomálních enzymů a tvorbu ROS v neutrofilech a makrofázích. Navíc zvyšuje adhezivitu endotelu pro leukocyty. Aktivita a koncentrace PAF jsou regulovány prostřednictvím PAF-acetylhydrolas, které odštěpují acetylovou skupinu PAF. Plazmatická isoforma PAF-acetylhydrolasy je nekovalentně připojena k lipoproteinovým částicím HDL a LDL, další dvě isoformy působí intracelulárně v buňkách ledvin, jater, mozku a červených krvinek.

Komplement

Komplement je komplexní systém složený z více než 30 glykoproteinů přítomných v krvi ve formě složek, faktorů a dalších regulátorů a/nebo na povrchu různých buněk ve formě receptorů. Složky komplementu jsou v krvi přítomné v neaktivní formě, které se kaskádovitě aktivují proteolytickým štěpením. Rozeznáváme tři dráhy aktivace komplementu – klasickou, alternativní a lektinovou, které se od sebe liší způsobem aktivace klíčové složky C3. Klasická dráha je aktivována imunokomplexy antigen-protilátka, lektinová dráha je zahájena vazbou sérového lektinu MBL na sacharidové struktury na povrchu mikrobu a alternativní dráha je aktivována dalšími strukturami na povrchu mikrobu. Aktivace všech tří drah vede k tvorbě **membranolytického komplexu** (*membrane attack complex*, MAC), který vyvolává osmotickou lýzu buněk (Obr. 6). Aktivace jednotlivých složek vede ke vzniku dvou fragmentů – fragment b (např. C3b) je obvykle větší a dále se účastní komplementové kaskády, zatímco menší fragment a (např. C3a), označovaný jako anafylatoxin, má jinou biologickou aktivitu. **Anafylatoxiny** (C3a, C4a a C5a) způsobují silnou kontrakci hladkosvalových vláken a zvyšují vaskulární permeabilitu. Nejúčinnějším anafylatoxinem je C5a, který je extrémně silný stimulant chemotaxe, adherence, respiračního vzplanutí a degranulace neutrofilů. Po vazbě na



C5a receptor vyvolává mobilizaci arachidonátu a jeho přeměnu na prostaglandiny a leukotrieny v neutrofilech, zatímco v monocytech indukuje uvolnění interleukinu-1 (IL-1). Fragments C3b a C4b a rovněž lektin MBL účinkují jako **opsoniny**, které se váží na povrch mikrobu, označují je a usnadňují jejich fagocytózu. Opsoniny tedy podporují a zesilují fagocytózu.



Obr. 6. Aktivace jednotlivých drah komplementu

Cytokiny

Cytokiny jsou vysoce aktivní signální sloučeniny proteinové povahy s krátkým biologickým poločasem, které vykazují autokrinní a parakrinní účinky. Po vazbě na specifický receptor regulují buněčné funkce organismu. Jsou syntetizovány, skladovány a transportovány různými typy buněk nejen imunitního systému (lymfokiny, interleukiny, monokiny, tumor-nekrotizující faktory, interferony), ale i dalších buněk studovaných v hematologii (kolonie-stimulující faktory), onkologii (transformující růstové faktory) a buněčné biologii (peptidové růstové faktory, stresové proteiny). Cytokiny kontrolují směr, rozsah a trvání imunitní odpovědi a kontrolují remodelaci tkání. Mezi charakteristické rysy většiny cytokinů patří, že působí na několik různých typů buněk (jsou **pleiotropní**), účinek cytokinu je pro něj typický (**specifita**), jeden cytokin indukuje tvorbu druhého (působí v **kaskádě**) a jednotlivé cytokiny mohou být nahrazeny jinými (určitá míra **redundance** cytokinového systému). Účinky různých cytokinů



se vzájemně doplňují (**synergismus**), nebo jeden cytokin blokuje účinky jiného (**antagonismus**). S ohledem na zánět rozlišujeme dvě hlavní skupiny cytokinů – prozánětlivé a protizánětlivé. **Prozánětlivé cytokiny** (IL-1, IL-6, IL-8 a tumor-nekrotizující faktor- α (TNF- α)) jsou syntetizované hlavně aktivovanými makrofágy a stimulují zánětlivé reakce. Navozují změny v místě zánětlivého poškození - stimulují antigen prezentující a endotelové buňky k expresi adhezních molekul. Výsledkem je aktivace, diferenciací a proliferace zánětlivých buněk. IL-8 jako chemoatraktant pro neutrofilů. Ústřední úlohu v zánětlivé odpovědi mají IL-1 a TNF, které působí také systémově a navozují reakci akutní fáze včetně ovlivnění syntézy proteinů v játrech (proteiny akutní fáze) a vzniku horečky (spolu s IL-6). **Protizánětlivé cytokiny** (IL-4, IL-10 a IL-13) jsou produkovány T-lymfocyty, tlumí zánětlivou odpověď a inhibují produkci prozánětlivých cytokinů.

Exogenní mediátory zánětu

Rozpoznání patogenních mikroorganismů imunitním systémem je umožněno díky přítomnosti specifických molekul/molekulárních vzorů („**pathogen associated molecular patterns**“, PAMP), které jsou fylogeneticky značně zakonzervované. Jejich nositeli jsou pouze mikroorganismy a pro přežití daného mikroorganismu jsou esenciální. Patří mezi ně např. složky bakteriální stěny (lipopolysacharid Gram⁻ bakterií = endotoxin, peptidoglykany, flagelin, lipoteichoová kyselina), bakteriální DNA (mnoho C a G, bez methylace) a virová dsRNA, *N*-formylmethionylpeptidy (FMLP, pouze bakterie využívají formylovaný methionin k syntéze proteinů), fungální β -glukany a chitin. Molekuly PAMP jsou rozeznávány PRR receptory („**pattern recognition receptors**“) a aktivují mechanismy vrozené imunity. PRR receptory jsou přítomné na membránách všech buněk těla, zejména pak buněk přirozené imunity (Toll-like receptory, C-lektinové receptory, scavengerové receptory, imunoglobulinové receptory), ale i v nitrobuněčných strukturách (NOD-like receptory, receptory NLRP, RIG-like receptory) a v tělních tekutinách (pentraxiny, kolektiny, ficoliny).

Fagocytóza a fagocytující buňky

Fagocytóza, tj. schopnost některých buněk imunitního systému identifikovat, pohltit a rozložit částice větší než 0,5 μ m, patří mezi základní mechanismy vrozené imunity. Slouží k obraně proti původcům infekčních onemocnění, k obraně proti vnitřním faktorům narušujícím homeostázu, k likvidaci apoptotických tělísek a k remodelaci tkání. Schopnost fagocytózy mají neutrofilní granulocyty (PMN, profesionální fagocyty), monocyty a



makrofágy, dendritické buňky (prezentace zpracovaných antigenních peptidů buňkám adaptivní imunity) a eosinofilní granulocyty. Jedná se o několikastupňový proces, který je důsledně regulován, aby nedošlo k poškození vlastních struktur.

Agregace a migrace fagocytů

PMN jsou aktivovány endogenními nebo exogenními signály a migrují ve směru **gradientu chemotaktických působků** do místa zánětu. Cévní řečiště opouštějí v kapilárách s nejmenším průsvitem a vstupují do tkání. Interakce ligandů na povrchu PMN (sialyl Lewis^X) se selektivně exprimovanými na povrchu endotelových buněk (E-selektin a P-selektin) **zpomaluje** pohyb fagocytů („*tethering*“) v krevním řečišti a ty se začínají **koulet** („*rolling*“) po endotelové výstelce. K **pevnému zachycení** PMN na endotelu slouží adhezní molekuly z integrinové rodiny na povrchu PMN, které se váží na adhezní molekuly z imunoglobulinové rodiny na povrchu endotelu (ICAM-1). Pevná vazba PMN na endotel umožní jeho řízený vstup (**diapedézu** mezi endotelovými buňkami) do tkání. Spojení mezi endotelovými buňkami zprostředkované molekulami PECAM-1 a kadheriny je při průchodu PMN přerušeno a poté znovu obnoveno. Navíc interakce adhezních molekul aktivuje intracelulární signální dráhy, jejichž výsledkem je další aktivace PMN i endotelových buněk. Při průchodu tkání uvolňují migrující buňky proteolytické enzymy (např. matrix metalloproteinasy, elastasu), které rozrušují bazální membránu a mezibuněčnou hmotu. Migrující PMN mění svůj tvar a pohybují se ve směru gradientu chemotaktických molekul (zejm. C5a, FMLP, LTB₄, chemokiny).

Oponizace a pohlcení

V okamžiku, kdy PMN dosáhne místa zánětu, začne zachycovat a pohlcovat (ingescence) částice ze svého okolí. K usnadnění a zesílení fagocytózy slouží **opsonizace** (navázání, označení) pohlcované částice vhodnou biologicky aktivní látkou. Mezi opsoniny patří aktivované složky komplementu C3b a C4b, protilátky, solubilní PRR receptory (pentraxiny, kolektiny a fikoliny). Vlastní pohlcení (**ingescence**) částice zprostředkovává interakce opsoninů s jejich receptory na povrchu PMN (např. receptory pro Fc fragmenty imunoglobulinů, receptory pro složky komplementu a lektinové receptory). Interakce s těmito receptory vyvolá aktivaci metabolismu buňky a přestavbu cytoskeletu, která je nutná k obklopení a pohlcení částice. Ta je uzavřena ve fagosomu, který po fúzi s lyzosemem vytváří **fagolizosom** a tak je zahájen proces nitrobuněčného zabíjení. Po dokonalém rozložení a využití obsahu fagolizosomu může být jeho obsah z buňky odstraněn exocytózou.



Mechanismy nitrobuněčného zabíjení

Mechanismy nitrobuněčného zabíjení rozdělujeme na mechanismy závislé na kyslíku a mechanismy nezávislé na kyslíku.

Mechanismy nezávislé na kyslíku využívají baktericidní proteiny, které jsou uskladněné v cytoplasmatických granulech PMN. Granula PMN (primární, sekundární, terciární) se liší morfologicky a biochemicky – každé obsahuje unikátní spektrum enzymů. Granula obsahují především *proteolytické enzymy* ze skupin serinových, cysteinových, aspartátových proteas i metaloproteas, jejichž cílem je narušit proteinový obal mikroorganismů a degradovat proteiny obsažené ve fagolyzosomu. Pracují v kyselém i neutrálním pH. Mezi nejvýznamnější zástupce patří serinové proteasy kathepsin G, neutrofilová elastasa a proteinasa-3, blízký aktivitou jim je rovněž antimikrobiální protein azurocidin. *Fosfolipasy* narušují fosfolipidové membrány mikroorganismů. *Antimikrobiální proteiny a peptidy* (katelicidy, defensiny), které jsou významnou složkou nitrobuněčného zabíjení, destabilizují a narušují membrány mikroorganismů a vyvolávají jejich lýzu. Kationický protein *lysozym* štěpí β -1,4-glykosidickou vazbu mezi *N*-acetylmuramovou kyselinou a *N*-acetylglukosaminem v bakteriálních peptidoglykanech Gram⁺ bakterií a patogenních hub. *Laktoferin* snižuje ve fagolyzosomu hladinu volného železa a tak brání růstu bakterií.

Mechanismy závislé na kyslíku jsou fylogeneticky mladší formou nitrobuněčného zabíjení. Jsou charakterizovány zvýšenou spotřebou kyslíku v aktivované fagocytující buňce (respirační vzplanutí). Výsledkem je tvorba RONS, které likvidují částice uzavřené ve fagolyzosomech, ale jsou rovněž uvolňovány do endosomů a cytoplasmu a secernovány mimo buňku. Tvorba ROS je závislá na fagocytární *NADPH-oxidase* (NOX2), která zajišťuje redukci O₂ na superoxidový radikál. Ten je *superoxiddismutasou* dismutován na peroxid vodíku, který má slabé cidní účinky a je schopný procházet membránami. Peroxid vodíku v kyselém prostředí fagolyzosomu v přítomnosti superoxidu a iontů Fe²⁺ nebo Cu⁺ podstupuje *Fentonovu reakci*, při které vznikají hydroxylové radikály. V přítomnosti *myeloperoxidasy* (azurofilní granula) a chloridových iontů je peroxid vodíku přeměněn na kyselinu chlornou s výraznou mikrobicidní aktivitou. Kyselina chlorná poškozuje různé biomolekuly (nukleové kyseliny, lipidy, volné proteiny), při reakci s aminoskupinami poskytuje chloraminy, ale může být i zdrojem hydroxylových radikálů po reakci se superoxidem. Při reakci kyseliny chlorné s peroxidem vodíku vzniká vysoce reaktivní forma kyslíku – tzv. singletový kyslík, který efektivně poškozuje biologické struktury a má velmi krátký biologický poločas. V makrofázích i PMN je účinkem cytokinů, mikrobů a jejich produktů stimulována exprese *indukovatelné NO-syntasy*, která (v závislosti na dostupnosti kofaktorů, substrátu a NADPH) ve svém okolí zvyšuje



koncentraci NO o několik řádů. Ten pak nestačí být odstraněn difúzí do krve a reaguje ve fagosomu se superoxidem za vzniku baktericidního prostředku ONOO⁻.

Systémové účinky zánětu

Účinná zánětlivá odpověď vede k 1) ohraničení oblasti poškození, 2) odstranění patogenních agens a poškozené tkáně a 3) obnovení funkce tkáně. Za určitých podmínek však může vést lokální poškození k významným systémovým účinkům, které mohou být sami o sobě vysilující. Pokud se v zánětlivém ložisku vytvoří dostatek cytokinů (zejm. IL-1 a TNF- α), přestoupí do krve a projeví se jejich celkové účinky. Tyto cytokiny způsobují rozvoj celkových příznaků zánětu (horečka, spavost, nechutenství, leukocytóza, zvýšení sedimentace a syntéza reaktantů akutní fáze) a při dalším zvýšení spouštějí stresovou reakci organismu (produkce stresových hormonů). Komplexní metabolické, endokrinní a neurologické změny, které v organismu při zánětu probíhají, se označují jako reakce akutní fáze.

Reaktanty akutní fáze

Jedná se o proteiny, jejichž hladina se během akutní fáze zánětu mění. V odpověď na zvýšení plazmatické koncentrace IL-1, IL-6 a TNF- α dojde v játrech ke změně exprese těchto proteinů. Expese **pozitivních reaktantů akutní fáze (RAF)** se po stimulaci cytokiny zvyšuje a jejich plazmatická koncentrace tedy při zánětu stoupá. Jejich biologické aktivity jsou značně různorodé: přímé zneškodnění noxy, minimalizace rozsahu lokálního poškození tkáně, účast na reparaci a regeneraci tkáně. Mezi RAF, které se přímo podílejí na likvidaci noxy, odstraňování poškozených buněk nebo modulaci imunitních reakcí patří C-reaktivní protein (CRP), sérový amyloid A (SAA), složky komplementu C3 a C4, orosomukoid, prokalcitonin. Během akutní fáze se z fagocytů a rozpadajících se buněk uvolňují proteolytické enzymy a ROS, které mají zničit noxu a „rozpustit“ poškozenou tkáň. Účinek těchto látek je třeba omezit, aby se minimalizovalo poškození zdravé tkáně. Proto mezi RAF najdeme inhibitory proteas (α_1 -antitrypsin, α_1 -antichymotrypsin, α_2 -makroglobulin), proteiny snižující tvorbu a dostupnost ROS (haptoglobin, hemopexin, ferritin, ceruloplasmin) a proteiny, které transportují odpadní látky (haptoglobin, hemopexin, SAA). Na regeneraci a reparaci poškozené tkáně se podílejí koagulační faktory (fibrinogen) a prokalcitonin. Plazmatické koncentrace jednotlivých RAF se mění různě rychle a podle rychlosti vzniku od začátku onemocnění je rozdělujeme na časné RAF (hladiny stoupají za 6-10 hod), RAF se střední dobou odpovědi (koncentrace stoupá za 12-36 hod) a pozdní RAF (hladina roste za 48-72 hod).



Plazmatické hladiny **negativních RAF** při zánětu klesají. Pokles jejich exprese je pravděpodobně způsoben tím, že je syntetická kapacita jater využita přednostně k tvorbě pozitivních RAF. Mezi negativní RAF patří albumin, prealbumin (též transthyretin) a transferin. Pokles koncentrace těchto proteinů vede k dočasnému zvýšení hladin volných hormonů (např. thyroxin), které tyto proteiny transportují.

Horečka

Zvýšení tělesné teploty je přirozeným a (do určité míry) žádoucím procesem, protože vyšší teplota zvyšuje schopnost organismu bojovat s patogeny. Množení a aktivita leukocytů se se stoupající teplotou zvyšuje a množení bakterií se naopak snižuje. Horečka je vyvolána působením **endogenních pyrogenů** (IL-1, IL-6 a TNF- α) na termosenzitivní neurony v hypothalamu. Tyto cytokiny indukují syntézu PGE₂ (hlavní mediátor horečky), který přenastaví termoregulační centrum (set-point) v hypothalamu na vyšší teplotu. Rozdíl mezi nastavenou a reálnou teplotou spouští termoregulační mechanismy – jsou blokovány mechanismy výdeje tepla (periferní vazokonstrikcí) a je stimulována produkce tepla (třesová termogeneze ve svalech, hormonálně vyvolané zvýšení metabolického obrátu). Jakmile se obě teploty vyrovnají, ukončuje se aktivita sympatiku, takže třes ustává a mizí pocity chladu. Při poklesu koncentrace cytokinů dojde ke snížení teploty set pointu a organismus se přebytečného tepla zbavuje pocením a vazodilatací.

Leukocytóza

Leukocytóza je charakterizována zvýšením počtu cirkulujících leukocytů v krvi. V periferní krvi je možné nalézt i nezralé formy PMN („tyčky“). Makrofágy uvolňují mediátory zánětu (IL-1, TNF- α , C3a), které urychlují uvolnění PMN z kostní dřeně. Následně tvoří makrofágy a T-lymfocyty kolonie-stimulující faktory, které indukují proliferaci hematopoetických buněk v kostní dřeni.

Hormonální změny

Mnoho systémových účinků chronického zánětu je zprostředkováno cestou hypothalamus-hypofýza-nadledviny. Cytokiny aktivují chronickou stresovou reakci, která je prováděna zvýšeným tonem sympatického nervového systému a aktivací osy hypothalamus-hypofýza-nadledviny s následným zvýšením hladin adrenalinu, noradrenalinu a kortisolu, které zvyšují energetický výdej.



Kachexie (sešlost)

Následkem vážných onemocnění, zejm. zhoubných nádorů a těžkých infekcí, vzniká kachexie, což je stav charakterizovaný silnou celkovou sešlostí, chátráním a hubnutím, který je spojený s výraznou slabostí. Kachexie je provázána nechutenstvím (anorexie), zvýšenými hladinami stresových hormonů, negativní energetickou bilancí díky převaze katabolických dějů (proteolýza ve svalech, lipolýza, glykogenolýza a glukoneogeneze), „syndromem nemocného chování“ (deprese, únava, kognitivní poruchy, bolest). Jako mediátor kachektické odpovědi působí zejména TNF- α (též IL-1, IL-6 a interferon), který tlumí centra hladu v hypothalamu a ovlivňuje tvorbu některých enzymů spojených s trávením (např. lipoproteinová lipasa).

Bolest

Jedním z nejtypičtějších příznaků onemocnění (zánětu, úrazu, nádoru aj.), jehož biologickým smyslem je upozornit na vznikající chorobu, je bolest. Senzory pro bolest (nocisenzory) jsou uloženy ve volných nervových zakončeních a podráždí je pouze bolestivé podněty. Bolestivý podnět je pak veden aferentní drahou do mozkové kůry, kde je zpracován. Nocisenzory mohou být aktivovány třemi mechanismy – 1) přímým drážděním nocisenzorů (K^+ , silné vazodilatátory bradykinin a histamin), 2) drážděním nocisenzorů zvýšeným tlakem v tkáních, který vzniká při zánětu (při zánětu se uvolňuje substance P, která vyvolává vazodilataci a edém tkáně), 3) zvýšením citlivosti nocisenzorů v důsledku aktivace fosfolipidů membrán působením fosfolipasy (vzniká arachidonát, který je COX a PGE₂-synthasou přeměněn na PGE₂, který snižuje práh bolesti a tak senzitivizuje nocisenzor).

Použitá literatura

- Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ (2012) Basic & Clinical Pharmacology. 12th edition. McGraw-Hill Medical, USA, pp. 1248.
- Krejsek J, Andrýs C, Krčmová I (2016) Imunologie člověka. 1. vydání. Garamon, Hradec Králové, 496 s.
- Masopust J (2003) Patobiochemie buňky. 1. vydání. 2. LFUK, Praha, 344 s.
- Murphy HS (2007) Inflammation. In: Rubin R, Strayer DS (eds.) Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine. 5th edition. LWW, Baltimore, p. 37-70.
- Porth CM (2011) Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States. 3rd edition. LWW, China, pp. 1256.



- Rokyta R. a kol. (2015) Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi. 1. vydání. Grada, Praha, 712 s.
- Strayer DS, Rubin R (2011) Cell adaptation, cell injury, and cell death. *In*: Rubin R, Strayer DS (eds.) Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine. 6th edition. LWW, Baltimore, p. 1-46.
- Štvrtinová V a kol. (1995) Inflammation and fever. Academic Electronic Press, <http://www.patfyz.sk/ANGL/inflam1.pdf>

