

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
katedra biologických a lékařských věd



## **Chemokiny lidských epitelových buněk**

bakalářská práce

Hradec Králové 2012

Eisenhamerová Hana

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

20.4.2012

-----  
Eisenhamerová Hana

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu práce PharmDr. P.Jílkovi,CSc.  
a Prof. MUDr.I.Střížovi,CSc. za odborné vedení bakalářské práce.

## **Abstrakt**

Organismus je chráněn několika způsoby. Mezi nescifickou obrannou funkci patří fagocytóza. Důležitá část při fagocytóze se nazývá chemotaxe. Ta je ovlivňována chemokiny. Známe 52 různých chemokinů a 20 jejich receptorů. Chemokiny se dělí do čtyř skupin. Liší se strukturně a funkčně. Hrají roli při aktivaci leukocytů u zánětů, při zrání buněk a homeostaze. Chemokiny jsou nalézány u různých onemocnění.

## **Summary**

Organism is protected by many ways. Phagocytosis belongs among a nonspecific defensive function. Important part of phagocytosis is called chemotaxis. It is influenced by chemokines. We know 52 different chemokines and 20 their receptors. Chemokines are divided into four groups. They differ structurally and functionally. Chemokines play a role in activation of leukocytes in inflammation, in maturation of cells and homeostasis. Chemokines are found in various diseases.

# Obsah

1. ÚVOD A ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE .....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	2
2.1. SLIZNICE .....	2
2.1.1. Struktura slizničního a kožního imunitního systému.....	3
2.1.1.1. Kožní imunitní systém.....	3
2.1.1.2. Slizniční imunitní systém.....	3
2.1.1. Chemoatraktanty .....	4
2.2. BUNĚČNÁ SIGNALIZACE .....	5
2.2.1. Adhezivní molekuly.....	5
2.2.1.1. Selektiny .....	6
2.2.1.2. Integriny.....	6
2.2.1.3. Adheziny imunoglobulinové rodiny .....	6
2.2.1.4. Kadheriny.....	6
2.2.2. Buněčné typy receptorů: .....	7
2.2.3. Receptory spřažené s G proteiny .....	7
2.2.4. Tyrosinkinázové receptory .....	8
2.2.5. Cytokinové receptory.....	8
2.2.6. Receptory spojené s jinou enzymatickou aktivitou .....	9
2.3. CYTOKINY A JEJICH SIGNÁLNÍ DRÁHY .....	10
2.4. NESPECIFICKÉ IMUNITNÍ ROZPOZNÁNÍ: .....	10
2.4.1. Nespecifické imunitní rozpoznávání na epiteliální bariéře.....	11
2.4.2. Vliv nespecifického imunitního rozpoznávání na specifickou imunitu .....	13
2.4.3. Předkládání antigenu.....	13
2.4.4. Regulace imunitní odpovědi TH.....	13
2.4.5. Regulace TH1 odpovědi .....	14
2.4.6. Regulace imunitní odpovědi TH2.....	14
2.5. CHEMOKINY.....	15
2.5.1. Stavba a funkce chemokinů: .....	16
2.5.2. Genové polymorfismy chemokinů.....	16
2.5.3. Rozdělení chemokinů .....	17

2.5.3.1. CXC chemokiny .....	17
2.5.3.2. C chemokiny .....	19
2.5.3.3. CC chemokiny .....	20
2.5.3.4. CX <sub>3</sub> C chemokiny .....	23
2.6. EPITELY A CHEMOKINY: .....	24
2.6.1. Atopická dermatitida.....	24
2.6.2. Astma a CHOPN.....	25
2.6.3. Angiogeneze .....	28
2.6.3.1. Angiogenní faktory .....	28
2.6.3.2. Antiangiogenní faktory .....	29
2.6.4. Ateroskleróza .....	29
2.6.5. Nádorové buňky.....	29
2.6.5. HIV a AIDS.....	30
2.6.6. Jiná onemocnění .....	31
2.7. STANOVENÍ CHEMOKINŮ.....	33
3. ZÁVĚR.....	35
4. LITERATURA .....	36
5. PŘÍLOHA OBRÁZKŮ.....	39
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	41

## 1. Úvod a zadání bakalářské práce

Lidský organismus odolává faktorům z vnějšího i vnitřního prostředí a je chráněn několika způsoby. Má k dispozici buněčnou a protilátkovou obranu, které zajišťuje imunitní systém. Imunitní děje dělíme na specifické a nespecifické. Mezi specifické obranné funkce řadíme reakci antigenu s protilátkou a mezi nespecifické děje fagocytózu. Při fagocytóze je první krok chemotaxe, kterou podporují chemoatraktanty. Chemoatraktanty neboli chemokiny jsou důležité pro zahájení obranných funkcí jako je zánět. Zánět je obranný mechanismus epitelů. Organismus se skládá z několika druhů epitelů. V této práci bych se chtěla zaměřit na chemokiny epitelových buněk jako na celek a postupně se věnovat důležitým bodům, které se této práci týkají.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Sliznice

Sliznice poskytuje ochranu před škodlivými vlivy vnějšího prostředí. Skládá se z povrchového epitelu, slizničního vaziva a ze svalové vrstvy sliznice, která nemusí být vždy přítomna. Pro každou orgánovou soustavu je typický specializovaný epitel (web wikipedie.cz)

Mikroprostředí sliznic umožňuje diferenciaci lymfocytů. Slizniční a kožní lymfocyty ovlivňují svými produkty funkci epiteliálních buněk. Epiteliální buňky zase mohou expresí MHC gp II (Major histocompatibility komplex glykoprotein II) fungovat jako buňky prezentující antigen a produkcí cytokinů ovlivňovat imunokompetentní buňky. Slizniční imunitní systém tvoří hlavně mukózní lymfatický systém MALT (mucosal-associated lymphoid tissue), jako je lamina propria a Payerovy plaky ve střevě označovány jako GALT (gut-associated lymphoid tissue) a BALT (bronchial-associated lymphoid tissue), který tvoří Waldeyerův okruh nebo lymfoidní tkáň spojenou s průduškami (Ferenčík, Rovenský 2005).

Epiteliální buňky tvoří bílkovinu zvanou sekreční komponenta (zbytek transportního Fc - receptoru). Tato bílkovina se pod povrchem sliznice váže s IgA (imunoglobulin A) a prochází transcytózou na povrch sliznice a uvolňuje se. IgA má schopnost vázat se na mikroby a brání jim v adhezi na slizniční povrch. Významný faktor protiinfekční rezistence představuje sekreční IgA. Plazmatické buňky ho produkují jako dimery, které jsou spojené J řetězcem. Sekreční komponenta může být připojena i k IgM (Jílek 2002, Hořejší, Bartůňková 2005), její funkcí je ochrana imunoglobulinové molekuly před účinkem proteáz (Stříž 2012).



## **2.1.1. Struktura slizničního a kožního imunitního systému**

### **2.1.1.1. Kožní imunitní systém**

Kůže je složena z pokožky (epidermis) a ze škáry (dermis) (Paulsen 2004). Epidermis je tvořena keratinocyty s rozptýlenými intraepiteliálními T lymfocyty, dendritickými buňkami (Langerhansovy buňky) a melanocyty. Keratinocyty secernují IL - 1 (interleukin 1), IL - 6, IL - 10, TGF -  $\beta$ , TNF a mohou exprimovat MHC gpII (Masopust, Průša 2003).

Dermis je složena fibroblastů, ze žlázek, vaskulárního řečiště a malého množství T lymfocytů (paměťové T buňky) a mastocytů.

### **2.1.1.2. Slizniční imunitní systém**

Těsně pod slizniční vrstvou se nachází lymfoidní folikuly složené z B a T lymfocytů, neutrofilů, makrofágů, eozinofilů a žírných buněk. Výrazné nakupení lymfoidní folikulů je například v patrových a nosních mandlích, apendixu, lymfatických uzlinách a Peyerových placích.

Lymfatické uzliny jsou rozděleny na kůru a dřen. Kůra obsahuje četné lymfatické folikuly, které jsou složeny z reakčního centra a periferie. Na periférii se vyskytují B lymfocyty. V reakčním centru se nachází aktivované lymfocyty, mikrofégy a dendritické buňky. Toto složení má tzv. sekundární folikul. Primární folikul nemá reakční centrum a obsahuje hlavně malé lymfocyty (paměťové). Mezi dřen a kůrou jsou uloženy četné T lymfocyty. Dřeň obsahuje hlavně B lymfocyty, plazmatické buňky a dendritické buňky (Jelínek, Dostál web old.if3.cuni.cz).

Tonzily jsou vlastně folikuly s reakčními centry. Obsahují tedy převážně B lymfocyty a granulocyty. Interfolikulárně se nachází T lymfocyty (Jelínek, Dostál web old.if3.cuni.cz).

Folikuly v Peyerových placích mají stejné složení jako uzliny. Epitélie, které jsou okolo těchto folikulů, nazýváme M - buňky. M - buňky zajišťují transport antigenu a jsou v blízkém vztahu k lymfocytům a APC (buňka prezentující antigen) (Hořejší, Bartůňková 2005).

Při porušení nebo infekci tkáně dochází k uvolňování tkáňových i bakteriálních působků. Na povrchu endotelu jsou adhezivní molekuly schopné

dočasně k sobě poutat buňky s ligandy. Zachycují se zejména fagocyty, které jsou směřovány chemotaktickým podmětem do místa poškození. K jejich cílovým objektům jsou přitahovány po koncentračním spádu neboli ve směru chemotaktického gradientu. Vše tedy začíná u chemotaxe, kterou spouští chemoatraktanty (Jílek 2002).

### **2.1.1. Chemoatraktanty**

Molekuly, které mají možnost přilákat nebo odpudit fagocyty, se nazývají chemoatraktanty. Působí tedy pozitivně nebo negativně. Podle místa vzniku se dělí na endo - a exogenní chemoatraktanty (Jílek 2002).

EXOGENNÍ jsou součástí stěn bakterií a produkty rozpadlých stěn buněk, např. endotoxiny  $G^+$ ,  $G^-$  bakterií, chemotaktické peptidy z bakteriálních proteinů (Jílek 2002).

ENDOGENNÍ jsou látky vznikající při aktivaci komplementového (C5a), kininového, plasminového systému např. při degradaci kyseliny arachidonové (leukotrien B<sub>4</sub>), při aktivaci žírných buněk a při vylití obsahu lysozomálních enzymů, při aktivaci samotných fagocytů, monocytů a destiček, které produkují příslušné cytokiny; T lymfocytů, z histiocytů (Jílek 2002).

Chemotaktické látky vznikají přímo z buněk nebo nepřímo působením buněčných enzymů na mimobuněčné substráty (př. lysozomální protézy, trypsin, plasmin) (Jílek 2002).

Pro všechny tyto látky mají fagocyty na svém povrchu příslušné receptory. Stimulace těchto receptorů vede nejen k chemotaxi, ale i zároveň k aktivaci fagocytózy a následných dějů. Fagocyty se v tkáni aktivně pohybují k místu zánětu tak, že secernují hydrolytické enzymy, které částečně štěpí molekuly mezibuněčné hmoty a posunují se pomocí adhezivních molekul interagujících s molekulami mezibuněčné hmoty (b<sub>1</sub> integriny, které rozeznávají fibronectin, vitronektin, kolagen aj.). Pohyb umožňuje mikrobuněčný systém kontraktálních vláken obsahující zejména aktin a tubulin (mikrofilamenta, mikrotubuly) (Hořejší, Bartůňková 2005).

## **2.2. Buněčná signalizace**

Je to souhrn všech prostředků, které používají buňky ke vzájemné komunikaci. Jedna buňka vytvoří signál a druhá buňka tento signál prostřednictvím receptoru přijme. Signálními molekulami mohou být například hormony, cytokiny, neurotransmitery a také růstové faktory. Receptor naváže určitý ligand z okolí a obvykle na druhé straně spustí tzv. signalizační kaskádu. Jedná se o řadu proenzymů, z nichž každý je aktivován tím předcházejícím. Umožňuje to amplifikaci signálu v celém prostoru buňky (Masopust, Průša 2003).

Základ intercelulární vazby jsou buněčné adhezivní molekuly (CAM). Jsou to bílkoviny, které jsou součástí membrán. K realizaci vazby potřebují ionty vápenaté a hořečnaté (Dylevský 2007).

Komunikaci mezi buňkami známe mezibuněčnou a nitrobuněčnou. Mezibuněčné komunikace známe tři typy - autokrinní, parakrinní, endokrinní. Nitrobuněčná komunikace je přenášení signálu pomocí kaskády proteinů a malých molekul v rámci buňky (Handrková, web cellula.wz.cz). Na konci této kaskády následují:

- konformační změny
- ovlivnění aktivity enzymů
- změna koncentrace určitých signálních molekul
- změna jejich lokalizace v buňce

### **2.2.1. Adhezivní molekuly**

Adheze buněk je podmíněna účastí adhezivních proteinů. Jde o různorodou skupinu proteinů, které tvoří i specifické receptory na povrchu buněk (web wikiskripta.eu).

Adhezivní molekuly mají sekvenci arginin – glycin – aspartát. Ta je nezbytná pro adhezi buněk k extracelulární matrix. Podle struktury je dělíme na selektiny, integriny, kadheriny a adheziny imunoglobulinové rodiny (Masopust, Průša 2003).

#### **2.2.1.1. Selektiny**

Selektiny se váží na sacharidy. P - selektin se vyskytuje na destičkách, E - selektin na endoteliích a L – selektin na leukocytech. Všechny slouží k adhezi leukocytů (Masopust, Průša 2003). Mají důležitou úlohu při poranění a zánětu (Nečas 2007).

#### **2.2.1.2. Integriny**

Integriny jsou hlavními mediátory adheze mezi buňkami a extracelulární matrix. Skládají se z jednoho řetězce  $\alpha$  a jednoho řetězce  $\beta$ . Tvoří tak heterodimer a mají mnoho variant řetězců (Nečas 2007).

#### **2.2.1.3. Adheziny imunoglobulinové rodiny**

Adheziny imunoglobulinové rodiny obsahují alespoň jednu Ig doménu. Je jich více než 70 a mohou se vázat mezi sebou (Masopust, Průša 2003).

Slouží k usměrňování distribuce leukocytů jejich zachycením v cirkulaci endoteliemi (Nečas 2007).

PECAM – 1 (Platelet – Endothelial Cell Adhesion Molecule) se nachází na endotelu a zastavuje pohyb leukocytů (Masopust, Průša 2003). Také se vyskytuje na krevních destičkách a některých leukocytech (Nečas 2007).

ICAM – 1 (InterCellular Adhesion Molecule) je protein vázající se s integrity a vyskytuje se na endotelových buňkách a imunitních buňkách (leukocyty a monocyty) (Masopust, Průša 2003).

VCAM – 1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) zprostředkovává adhezi lymfocytů, monocytů, eozinofilů a bazofilů k cévnímu endotelu (Masopust, Průša 2003).

MadCAM naviguje lymfocyty k návratu do tkání (Masopust, Průša 2003).

NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) je přítomna na neuronech (Nečas 2007).

#### **2.2.1.4. Kadheriny**

Kadheriny jsou důležité pro diferenciaci buněk. Jsou tvořeny

Ca – dependentními adhezními molekulami, které zprostředkovávají adhezi buňka – buňka. Má – li buňka migrovat, musí ztratit všechny kadheriny (Masopust, Průša 2003).

### 2.2.2. Buněčné typy receptorů:

Receptor je bílkovina umístěna na cytoplazmatické membráně nebo v cytoplazmě či buněčném jádře, která se váže na specifický ligand. Spouští buněčnou odpověď vazbou na ligand. Existují různé typy receptorů, podle jejich funkcí a ligandů.

- GPCR = Receptory spřažené s G proteiny
- RTK = Tyrosinkinásové receptory
- Cytokinové receptory
- Receptory spojené s jinou enzymatickou aktivitou

(Handrková, web cellula.wz.cz)

### 2.2.3. Receptory spřažené s G proteiny

Jsou nejširší skupinou povrchových receptorů. Známe šest rodin, které se označují A až F. Rodiny A, B, C jsou hlavní a běžné v lidském organismu. Rodiny D a E nemají větší význam a rodina F je ve výzkumu (Littmar 2011).

Receptory spřažené s G proteiny mají sekundární strukturu 7 - transmembránových  $\alpha$  - helixů. Navázání ligandu vyvolá rozsáhlé konformační změny (C - koncové) domény receptoru, které umožní navázání G proteinu (Handrková, web cellula.wz.cz).

G proteiny se skládají ze tří podjednotek, označovaných  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Podjednotka  $\alpha$  váže nukleotid guanin a tím reguluje aktivitu G proteinu.

V klidovém stavu je vázána  $\alpha$  podjednotka s GDP (guanindifosfát) v komplexu s  $\beta$  a  $\gamma$  podjednotkou. Konformační změny cytoplasmatické domény receptoru vyvolají snížení afinity G proteinu ke GDP a dojde k jeho uvolnění a výměně za GTP (guanintrifosfát). Aktivovaná  $\alpha$  podjednotka s navázaným GTP se oddělí od  $\beta$   $\gamma$  komplexu (Masopust, Průša 2003).

Aktivní  $\alpha$  podjednotka aktivuje druhého posla (cAMP, cGMP). Přenosu signálu se dále účastní jak  $\alpha$  tak  $\beta$   $\gamma$  podjednotka. Po hydrolýze navázaného GTP na GDP dojde k ukončení aktivity. Neaktivní  $\alpha$  podjednotka opět asociuje s  $\beta$   $\gamma$  (Masopust, Průša 2003).

Savčí genom kóduje alespoň 23 různých  $\alpha$ , 5  $\beta$  a 11  $\gamma$  podjednotek. Díky této multiplicitě je známa řada různých G proteinů asociujících s různými receptory, vedou tak k odděleným buněčným odpovědím (Handrková, web cellula.wz.cz).

#### **2.2.4. Tyrosinkinázové receptory**

Tyrosinkinasy (PTK) jsou enzymy, které katalyzují fosforylaci tyrosinových zbytků. Dělí se na dvě třídy. První je celulární (non - receptorová) a druhá je receptorová třída (Masopust, Průša 2003).

PTK jsou typy buněčných receptorů, které jsou přímo spojené s enzymy uvnitř buňky. ATP se váže do štěrbině mezi laloky a ta část substrátu, která obsahuje tyrosin, interaguje s C - koncovou doménou kinázy. Vazbu substrátu posilují i další, méně specifické interakce. Většina PTK se vyskytuje v málo aktivním stavu díky řadě autoregulačních mechanismů, které udržují enzym v uzavřené konformaci. Po navázání ligandu fosforylují své substrátové bílkoviny na tyrosinových zbytcích. Vazbou ligandu na vnější straně membrány dojde ke konformačním změnám receptoru, které indukují dimerizaci receptorů a následně aktivaci kinasové domény. Kinasová část receptoru má velikost asi 300 zbytků, skládá se ze dvou domén. Ta se dále katalyzuje fosforylací klíčových aminokyselinových zbytků substrátu a následně vede k fosforylaci jeho cílových proteinů. Tyto proteiny přenáší signál dál (Handrková, web cellula.wz.cz).

#### **2.2.5. Cytokinové receptory**

Tato skupina receptorů zahrnuje receptory pro většinu cytokinů (př. IL – 2 a erythropoetin) a pro některé peptidové hormony (růstový hormon). Receptorová část se skládá z N - koncové extracelulární domény, která váže ligand, a dále jednoho  $\alpha$  - helixu procházejícího membránou a cytosolické C - koncové domény. Doména C postrádá vlastní katalytickou aktivitu, ale váže tyrosinkinasy. Tyto kinasy se aktivují až poté, co se naváže ligand na extracelulární doménu receptoru a vyvolá změnu v uspořádání receptoru. Prvním krokem je dimerisace receptoru. Tyrosinkinasy obou molekul receptorů se k sobě přiblíží a pak dojde k jejich vzájemné fosforylaci a aktivaci. Poté

fosforylují receptor samotný a vytvoří tak vazebná místa pro SH2 domény (Scr homology 2 domain) dalších signálních molekul. Struktura aminokyselin každé domény určuje specifitu vazby. Scr je zkratka pro gen a stejnojmenný protein tyrozinkinázový receptor (Handrková, web cellula.wz.cz).

Kinasy, které jsou spojeny s cytokinovými receptory, patří do JAK (Janus Kinase) skupiny. Po navázání na aktivní receptory tyto kinasy fosforylují skupinu transkripčních faktorů STAT (Stat Transducers and Activators of Transcription), které se vážou přes SH2 doménu (Handrková, web cellula.wz.cz).

Další skupina kinas patří mezi SFK (což je skupina Src a asi 8 podobných proteinů) a slouží např. k signalizaci od antigenních receptorů T a B lymfocytů a od integrinů (mezibuněčné kontakty, extracelulární matrix) (Handrková, web cellula.wz.cz).

Máme čtyři skupiny cytokinových receptorů:

- Nadrodina IL receptorů
- Třída I (pro hematopoetiny)
- Třída II (pro interferony)
- Nadrodina TNF receptorů (Masopust, Průša 2003)

#### **2.2.6. Receptory spojené s jinou enzymatickou aktivitou**

Většina receptorů s enzymatickou aktivitou stimuluje fosforylaci cílových proteinů na tyrozinech. Vyskytují se ale i jiné typy: tyrosinfosfatasy (PTP), treoninkinasy a guanylylcyklasy. PTP katalyzují hydrolýzu fosfotyrosinových zbytků a fungují jako „protiváha“ k tyrosinkinásám. V mnoha případech fungují jako negativní regulátory signálních cest. Ukončují přenos informace zprostředkovaný proteiny obsahujícími fosfotyrosin. Existují i výjimky, kde dochází prostřednictvím defosforylace k pozitivní regulaci, např. u receptoru CD 45 na povrchu T a B lymfocytů (Handrková, web cellula.wz.cz).

### 2.3. Cytokiny a jejich signální dráhy

Cytokin je označení pro skupinu signálních proteinů, které se účastní imunitní odpovědi. Jsou buňkami imunitního systému produkovány (web wikipedia.cz), ale tvoří je i buňky mimo klasický rámec imunitního systému (endotel, fibroblasty, epitel) (Stříž 2012).

Známe jejich signalizační kaskády s modelovými receptory pro vytokán M-CSF (CSF-1), Fc - receptory, TCR a BCR. Velmi důležitý prvek pro spuštění signalizace je tzv. signalizační membránová mikrodoména. Jsou to malé ostrůvky v membráně, které se liší lipidovým složením od ostatních membrán. Jejich součástí jsou transmembránové adaptorové proteiny (LAT a PAG).

V mikrodoménách je soustředěna většina molekul důležitých pro zahájení imunoreceptorové signalizace. Imunoreceptory jsou asociovány s kinázami pro rozeznání ligandu, agregaci a fúzi se signalizačními mikrodoménou (Handrková, web cellula.wz.cz).

Podle aminokyseliny, která přijímá signál, je dělíme:

- Serin/threonin kinasy
- Tyrozin kinasy
- Histidin kinasy
- Aspartát nebo glutamát minusy

### 2.4. Nespecifické imunitní rozpoznání:

Nespecifické imunitní mechanismy tvoří hlavně fagocyty, dendritické buňky a mastocyty (neboli žírné buňky), bazofilní granulocyty.

Mezi fagocyty patří eozifilní a neutrofilní granulocyty, monocyty a makrofágy. Fagocyty se uchycují na endoteliích díky adhezivním molekulám. Uplatňují se zde lektiny a při zánětlivém signálu také leukocytární integriny. Váží se na povrchový glykoprotein endoteliálních buněk ICAM - 1.

Monocyty a eozinofily adherují na cévní stěnu prostřednictvím  $\beta 1$  - integrinů a jejich partnerem je na endotelech molekula VCAM - 1. Interakce jsou zprostředkované mezi povrchovými lektiny. Mezi těmito povrchovými lektiny jsou nejznámější mannózový receptor, galaktózový receptor a receptory



skupiny TLR( toll - like receptor). Aktivací těchto receptorů spouští expresi zánětlivých cytokinů a některých adhezivních a kostimulačních receptorů na povrchu APC. Známé jsou cytoplazmatické receptory Nod, které aktivují podobné dráhy jako receptory TLR.

Dendritické buňky jsou schopné fagocytózy cizorodých částic v krvi a v tkáni. Existují dva základní typy těchto buněk, kdy se dělí podle svého původu na myeloidní a lymfoidní.

Tzv. myeloidní dendritické buňky jsou nejdůležitější pro buňky předkládající antigen. Mají nezralou a zralou formu. Nezralé formy nacházíme hlavně na rozhraní organismu a okolního prostředí. Nejvíce je jich v kůži, ve sliznici dýchacího a trávicího traktu. Cestují mezi lymfou a krví. Aktivací nezralých buněk vznikají zralé dendritické buňky. Ty se přesunují do lymfatických uzlin a sekundárních lymfatických orgánů. Ztrácejí tak schopnost fagocytovat a mění se na účinné APC. Dendritické buňky dosáhnou zralosti za 48 hodin a proces je nevratný.

Plasmacytoidní dendritické buňky jsou ovlivňovány IL - 4 a GM - CSF. Exprimují většinu TLR a hlavně stimulují ve zralém stádiu specifické T lymfocyty.

Mastocyty jsou podobné bazofilům. Známe je ve formě pojivové a slizniční. Mají hlavně obranou funkci proti parazitárním infekcím. Zabezpečují fyziologické funkce sliznic. Jejich charakteristickým receptorem je Fc - receptor pro IgE (FcεRI). Navázáním IgE na tento receptor dochází k jejich degranulaci. Další receptor je Fc - receptor pro IgG nebo pro komplementový fragment C5a, přes který lze také degranulovat mastocyty.

#### **2.4.1. Nespecifické imunitní rozpoznávání na epiteliální bariéře**

Jedním ze složitých úkolů imunitního systému je zajišťovat rovnováhu mezi povrchem bariéry před patogeny na jedné straně a vytvářením prospěšného vztahu s komenzálními bakteriemi na straně druhé. Předpokládá se, že oba procesy na začátku vyžadují mechanismus detekce mikroba nespecifickým imunitním systémem. Mechanismy nespecifické detekce zahrnují rozpoznání specifických molekulových znaků mikroorganismů (MAMP) různými rodinami molekul pro rozpoznání vzorů (PRM) kódovaných v zárodečných buňkách. Tyto buňky disponují potenciálem pro regulaci exprese mediátorů,

kteřé řídí první reakce hostitele a imunitní odpověď na specifický antigen. Nespecifické imunitní rozpoznávání se zaměřuje na rozpoznávání patogenů prostřednictvím molekul PRM specializovanými buňkami APC jako jsou dendritické buňky. Rozpoznávání MAMP - PRM a prezentace antigenů bylo navrženo k vytvoření centrální platformy pro integraci antigenové specifity a signálů odvozených od mikroorganismů pro spuštění imunitní odpovědi T a B lymfocytů. Primární buněčnou bariéru tvoří epitelální buňky vystýlající respirační, gastrointestinální a urogenitální sliznice. Epitelální buňky mají umístění na zahájení vnějšího a vnitřního prostředí. Jsou tedy primárními kandidáty pro zorganizování imunitní odpovědi. Epitelální buňky disponují mechanismy pro detekci mikroba a obsahují pevně regulovanou a specificky lokalizovanou sadu molekul PRM a její signální komponenty i přímé antimikrobiální efektorové molekuly. Vybavení nespecifického imunitního rozpoznávání u specifických druhů buněk jim umožňuje reagovat na mikroorganismy, a tím inicializovat první kroky interakce patogenu s hostitelem. Rozpoznávání mikroba bariérou epitelálních buněk je nedílnou součástí prvotní reakce hostitele. Epitelální bariéra ovlivňuje vývoj imunity na specifický antigen. Typ imunitní odpovědi vyvolané hostitelem výrazně závisí na povaze odpovědi definované mikroprostředím místní tkáně (Fritz, Bourhis 2007).

Střevní bakteriální flóra je hlavním stimulem pro rozvoj slizničního imunitního systému. Mechanismy detekce mikroba nespecifickým imunitním systémem přispívají k vytváření slizničních lymfatických tkání i k udržování bariérové integrity, což zahrnuje modulaci růstu buněk a obnovy tkáně, nespecifickou zánětlivou odpověď, expresi antimikrobiálních peptidů a indukci specifické imunitní odpovědi (Fritz, Bourhis 2007).

Nedostatek základní signalizace Toll - like receptorů (TLR) řízené komenzální flórou má za následek narušení integrity epitelální bariéry, což postupně vede ke zvýšené intestinální epitelální náchylnosti organismu.

### **2.4.2. Vliv nespecifického imunitního rozpoznávání na specifickou imunitu**

Mikrobiální stimulace epiteliálních buněk reguluje reakci B lymfocytů ve sliznici, čímž přispívá ke spuštění imunitní odpovědi na specifický antigen. Nespecifické imunitní rozpoznání buňkami bariéry navíc určuje funkční vlastnosti makrofágů a dendritických buněk v tkáních, přičemž řídí imunitu na specifický antigen (Fritz, Bourhis 2007).

### **2.4.3. Předkládání antigenu**

Mechanismy mezi epiteliálními a dendritickými buňkami jsou aktivně zahrnuty do absorpce antigenů na sliznicích. Bylo popsáno několik různých způsobů absorpce antigenů na těchto bariérách:

- Peyeroovy pláty pokryté intestinální epiteliální vrstvou obsahují M buňky, které transportují antigeny skrze buňku přímo z buněčné dutiny do spodního podslizničního vaziva
- některé slizniční epitely na apikální a bazolaterální straně disponují neonatálním Fc receptorem (FcRn), který zprostředkovává oboustranný transepitální transport imunních komplexů IgG nebo antigenu s IgG
- dendritické buňky mohou zpracovat antigeny z apoptických buněk IEC při klidovém stavu a po infekci (Holgate 2007).

### **2.4.4. Regulace imunitní odpovědi TH**

Lymfocyty dělíme na T a B. T lymfocyty se dále dělí na subpopulace Th (pomocné, CD4+) a Tc (cytotoxické, CD 8+). V případě Th buněk dochází ještě k funkční diferenciaci na Th1, Th2 a Th17 (Stříž 2012). Tyto subpopulace mají jiné biologické působení a produkují i jiné cytokiny. TH1 podporují činnost monocytů, makrofágů, CTL a NK. TH2 podporují protilátkovou odpověď. Existuje mezi nimi antagonismus - navzájem se tlumí (Jílek 2002). Relativně nedávno popsané Th17 buňky souvisí s neutrofilním zánětem u chronických chorob (Stříž, 2012).

#### **2.4.5. Regulace TH1 odpovědí**

Nespecifické imunitní rozpoznávání bariérovými buňkami je důležité pro vykonávání antigen specifických TH1 imunitních odpovědí. Mediátory uvolněné buňkami bariéry při nespecifických imunitních reakcí podmiňují dendritické buňky ve prospěch iniciace TH2 odpovědí. TLR4 exprese v úseku je dostačující pro indukci lokálního a systémového zánětu. Expese molekul PRM v bariérových buňkách není dostačující pro indukci exprese kostimulačních molekul a plnou aktivaci dendritických buněk. Zánětlivé mediátory nejsou dostačující pro plnou aktivaci dendritických buněk a přípravu TH1 imunity. Kombinací nespecifického imunitního rozpoznávání epiteliálních a dendritických buněk určuje, zda hostitel zvýší TH1 a případně TH17 imunitu na daný mikroorganismus. Patogen, který překročí povrch bariéry nebo komenzál, kterému je umožněn přístup do podslizničního vaziva v případě epiteliálního poškození se setkají s epiteliálními buňkami, následuje aktivace některých molekul PRM, včetně Toll - like receptorů a Nod - like receptorů. Dochází k sekreci prozánětlivých cytokinů a chemokinů, které mají přisun monocyty, které diferencují dendritických buněk v místě infekce. Tyto nové dendritické buňky, které ještě nebyly diferencované, a tkáňové dendritické buňky snímají dva signály: molekulové znaky mikroorganismů (MAMP) a indukované signály z buněk. Pozitivní i negativní spolupráce mezi Toll - like receptory a Nod - like receptory nebo dalšími molekulami PRM i působení mediátorů odvozených od APC buněk a stromálních buněk tak reguluje rovnováhu pro indukci TH1 a TH17 imunity (Holgate 2007).

#### **2.4.6. Regulace imunitní odpovědi TH2**

Faktory z epiteliálních buněk ovlivňují slizniční dendritické buňky. Buňky podskupiny CD11b+ vylučují cytokiny jako IL - 10 a TGF -  $\beta$  v odpovědi na mikrobiální stimuly a stimuly T lymfocytů, čímž zahajují diferenciaci imunitních odpovědí TH2 a TH3 buněk. Slezině dendritické buňky za stejných podmínek vylučují TH1 polarizační faktory např. IL - 12. Podobně aktivovány jsou střevní makrofágy. Jsou funkčně odlišné od makrofágů v krvi nebo

lymfatických tkáních. Tkáňově specifické vlastnosti slizničních dendritických buněk a makrofágů vznikají působením faktorů odvozených z bariérových buněk. Stromální faktory, zejména TGF -  $\beta$ , dodávají krevním monocytům podobný „nezánětlivý“ stav, přičemž indukují down regulaci nespecifických receptorů a uvolnění cytokinů. Působením dendritických buněk vzniklých z monocytů a epiteliálních buněk eliminuje schopnost těchto buněk produkovat IL - 12 a přípravu T lymfocytů pro TH1 aktivaci v reakci na mikrobiální stimuly. Naproti tomu epiteliální buňky dodávají dendritickým buňkám odvozených z monocytů schopnost produkovat velké množství IL - 10 a polarizovat TH2 odpovědi, což lze alespoň z části přisuzovat uvolnění thymického stromálního lymfopoetinu (TSLP), cytokinu derivovaného z epiteliálních buněk (Holgate 2007).

## **2.5. Chemokiny**

Chemokiny patří do skupiny cytokinů a jejich molekulová hmotnost je zpravidla pod 10 kDa. Jejich základní funkcí je regulace pohybu různých buněk a mají často i prozánětlivé účinky. Mají také vliv na angiogenezi a proliferaci hemopoetických prekurzorů a produkci extracelulární matrix. Chemokiny jsou produkovány všemi jadernými buňkami a některé chemokiny potřebují stimulaci (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

Vazbou chemokinu na receptor leukocytu dochází ke změně morfologie buňky. Dochází k polymeraci aktinu a vytvoření výběžků na povrchu čímž je umožněn pohyb leukocytu. Též je indukována aktivace integrinů a následně leukocyt adhezuje k endotelu cévní stěny (Nouza 1998, web zdrava-rodina.cz).

Mají dvě základní vlastnosti - četnost a variabilita. Genová mapa obsahuje non-alelické isoformy, velký počet polymorfismů a klasických alelických variací. Systém chemokinů je základem pro koordinaci, regulaci a přesného výkonu typu imunitní odpovědi (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

Bylo zatím identifikováno 52 chemokinů a 20 receptorů.

### **2.5.1. Stavba a funkce chemokinů:**

Chemokiny jsou často tvořeny z pro-peptidů. Skládají se z N-terminální oblasti, která je spojená cysteinovými vazbami, jádro je ze tří  $\beta$ -listů a C-terminálního  $\alpha$ -helixu. Mají G-protein, kterým mohou přenášet signál (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

Chemokiny rozdělujeme podle funkce na prozánětlivé a homeostatické. Homeostatické chemokiny jsou produkovány bez stimulace buněk. Některé také ovlivňují tvorbu nové cévy, nebo poskytují specifické signály pro buněčné zranění. Prozánětlivé chemokiny produkovány přitahují lymfocyty, monocyty, neutrofile do místa, které je poškozeno (Masopust, web stefajir.cz).

Leukocyty mají většinou několik receptorů pro více chemokinů. Mají pleiotropní účinky a vzájemně se překrývají funkcí. Tento systém je velmi účinný. Pokud je jeden chemokin nebo receptor defektní, je nahrazen alternativní skupinou, která udrží jeho biologickou funkci. Jeden chemokin tedy může působit na různé buňky a jedna buňka reaguje s více chemokiny. Tvorba chemokinů má prostorovou a časovou kontrolu. Díky klamným receptorům DARC, D6 a CCX-CKR je zajišťována regulace hladiny chemokinů. Klamné receptory jsou definované jako proteiny vázající ligandy na povrchu buněk. Mají vysokou afinitu a specifitu k chemokinům, ale nejsou schopny indukovat signalizaci. Chemokiny se vážou na glykosaminoglykany (GAG), které jsou volně ale i na povrchu buňky a v extracelulární matrix. To usnadňuje tvorbu gradientu chemokinů a zvyšuje se jejich koncentraci v místě produkce. Selektivním navázáním určitých chemokinů k různým typům GAG spojených s receptory, může poskytnout další stupeň specifity a kontroly migrace buněk (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

### **2.5.2. Genové polymorfismy chemokinů**

Chemokinové geny jsou pravděpodobně z nejvíce polymorfních sad genů v imunitním systému. Chemokinové polymorfismy mimořádně ovlivňují imunitní reakci. Většina objevených jednonukleotidových polymorfismů v chemokinových genech nebo jejich receptorech není lokalizována v kódovaných sekvencích, v promotoru, intronech nebo nepřekládaných oblastech 3' a může postihnout všechny aspekty vyjádření genu a úrovně mRNA. Většina polymorfismů

spojených s onemocněním v chemokinové rodině postihuje jejich prozánětlivé členy, což potvrzuje, že se jedná o geny pod silnějším vývojovým tlakem (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

### **2.5.3. Rozdělení chemokinů**

Členy rodiny chemokinů lze rozdělit do čtyř skupin v závislosti na vzdálenosti jejich prvních dvou N - terminálních cysteinových zbytků od sebe.

1. CXC chemokiny
2. C chemokiny
3. CC chemokiny
4. CX<sub>3</sub>C chemokiny

Za označením CC, CXC, CX<sub>3</sub>C a C následují písmen L pro ligandy či R pro receptor a na konci je uvedeno číslo, které odpovídá pořadí jeho objevení. Např. chemokin v literatuře často označován jako stromal derived factor 1 je dle klasifikace CXCL12 a jeho receptor je CXCR4.

Klasifikace chemokinových receptorů kopíruje dělení chemokinových ligandů.

#### **2.5.3.1. CXC chemokiny**

U těchto chemokinů jsou dva N - terminální cysteiny od sebe odděleny jednou aminokyselinou, reprezentovanou v tomto názvu "X". Jsou rozděleny do dvou kategorií. První skupina je ELR – pozitivní, která má specifickou sekvenci aminokyselin (kyselina glutamová – leucin - arginin) před prvním cysteinem z CXC vzorce. Druhá skupina ELR – negativní tuto sekvenci nemají (NON - ELR) (Colobran, Pujol-Borrell 2007).

Lidské CXC chemokiny zahrnují 15 ligandů a 6 receptorů. Většina chemokinů CXC jsou evoluční mladé. CXCL12 (SDF - 1) a CXCL14 (BRAF) jsou dva homeostatické chemokiny. Geny všech CXC prozánětlivých chemokinů jsou umístěny ve 4. chromozomu a jsou organizované do dvou podskupin. Máme podskupinu centromerickou a telomerickou (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

Centromerická podskupina obsahuje geny kódující CXCL1 až CXCL8 (systematické názvy GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , PF4, ENA - 78, GCP - 2, NAP - 2

a IL - 8). Všichni členové této skupiny mimo CXCL4 jsou ELR – pozitivní. Podílí se na neutrofilní chemotaxi přes vazbu na CXCR1 a CXCR2, a také se u nich prokázaly proangiogenní účinky. Přes jejich podobnosti má každý chemokin odlišné účinky. Mají odlišné schopnosti vázat a aktivovat CXCR1 a CXCR2. Četností ELR sekvencí v CXC chemokinech a jejich receptorech mohou zasahovat do regulace, která umožňuje kontrolu zánětu (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

Zcela odlišný od chemokinů této skupiny je CXCL4. Je to antiangiogenní ELR – negativní chemokin. CXCL4, který se hlavně nalézá v krevních destičkách, inhibuje proliferaci endoteliálních buněk, migraci a angiogenezi buněk. CXCL4 je závislý na vysoké afinitě pro heparan sírany. CXCR3 – B (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

Byly popsány některé zajímavé polymorfismy postihující jak prozánětlivé, tak homeostatické CXC ligandy. CXCL8 je prozánětlivý chemokin a je potenciální chemoatraktant pro neutrofile, basofily a T lymfocyty. Zvýšené koncentrace CXCL8 byly zjištěny v biologických tekutinách u různých akutních zánětlivých onemocnění. Je jedním z charakteristických znaků akutního zánětu s neutrofilovou infiltrací v zánětlivém místě (Colobran, Pujol - Borrell II. 2007).

Telomerická podskupina prozánětlivých chemokinů CXC ve 4. chromozomu zahrnují ELR - negativní chemokiny. Jsou to CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP - 10) a CXCL11 (I - TAC). Tyto tři chemokiny se váží k CXCR3 (CXCR3 – A CXCR3 - B) a přitahují aktivované Th1 lymfocyty a NK buňky. Na rozdíl od ELR – pozitivních chemokinů jsou tyto tři chemokiny silnými angiostatickými faktory. CXC chemokiny jsou jedinečnou skupinou cytokinů, které mají schopnost se chovat opačným způsobem při regulaci angiogeneze prostřednictvím ELR. Tyto různé činnosti mohou mít vliv na patogenezi různých zánětlivých onemocnění. CXCL9, CXCL10 a CXCL11 jsou přirozenými ligandy pro CCR3. Chemokiny, které přitahují Th1 buňky přes CXCR3 mohou současně blokovat migraci Th2 buněk ve vazbě na CCR3 ligandy, čímž se zvýší polarizace T lymfocytů. CXCR3 receptorová varianta CXCR3 - B (kromě klasické podoby, CXCR3 - A) by mohla vysvětlit rozdílné funkce CXCL9, CXCL10 a CXCL11 na odlišných buněčných typech (Colobran, Pujol - Borrell 2007).



CXCL12 je jediným chemokinem CXC, který vytváří izoformy alternativním sestřihem. Dvě hlavní formy CXCL12 (SDF - 1a a SDF - 1b) mají podobné aminokyselinové sekvence. Obě izoformy se vyskytují ve tkáni, avšak SDF - 1a mRNA byla narozdíl od SDF - 1b zjištěna v mozku dospělého člověka. Obě izoformy podléhají různým proteolytickým procesům, což by mohlo vysvětlovat funkční rozdíly. Byly zjištěny další čtyři izoformy SDF - 1 (CXCL12) z alternativního sestřihu (SDF - 1g, SDF - 1d, SDF - 1e a SDF - 1f) (Colobran, Pujol - Borrell II. 2007).

SDF - 1 je specifický pro prekurzory B lymfocytů a pro B lymfocyty a slouží k jejich udržení v mikroprostředí kostní dřeně. Je vhodný pro jejich růst a diferenciaci (Nouza 1998, web zdrava-rodina.cz ).

CXCL13 je homeostatický chemokin, který se nachází v lymfoidních folikulech. Jedná se o unikátní ligand CXCR5, který významným způsobem aktivuje B lymfocyty a navádí je ke správnému umístění v sekundárních lymfoidních orgánech a při diferencování B a T lymfocytů v lymfatických oblastech folikulů (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

### **2.5.3.2. C chemokiny**

Druhá skupina je známá jako chemokiny C (nebo  $\gamma$  chemokiny). Na rozdíl od všech ostatních chemokinů mají jen dva cysteiny, jeden N - terminální cystein a jeden cystein v řetězci. Tyto chemokiny přitahují prekurzorů T lymfocytů do brzlíku. Lidské C chemokiny, které se nachází v chromozomu 1, mají jen dva vysoce kódované homologní geny XCL1 (lymphotactin -  $\alpha$ ) a XCL2 (lymphotactin -  $\beta$ ). Tyto dva chemokiny se liší pouze dvěma aminokyselinami vázanými na XCR1. Hlavní strukturální rys XCL1 / 2 je chybění dvou ze čtyř cysteinových zbytků, které jsou charakteristické pro chemokiny a tudíž mají pouze jednu disulfidickou vazbu. XCL1 / 2 jsou účinnými chemoatraktanty T lymfocytů a NK buněk, ale ne monocytů nebo neutrofilů. Jsou hlavními produkty aktivovaných CD8 + T lymfocytů (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

### 2.5.3.3. CC chemokiny

Chemokiny CC (nebo  $\beta$  - chemokiny) mají v řetězci dva sousední cysteiny v blízkosti jejich N konce. 27 různých členů této podskupiny obsahuje čtyři cysteiny (C4 - CC chemokiny), ale malý počet chemokinů CC má i šest cysteinů (C6 - CC chemokiny) a mají tzv. CC chemokinové ligandy (CCL) -1 až -28. K C6 - CC chemokinům patří CCL1, CCL15, CCL21, CCL23 a CCL28 (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

CC chemokiny indukují migraci monocytů a dalších typů buněk, jako jsou NK buňky a dendritické buňky. Chemokin CCL2 (MCP - 1) nutí monocyty opustit krevní řečiště a inicializují je k přeměně na tkáňové makrofágy. CCL5 (RANTES) přitahuje eozinofily, T lymfocyty a bazofily pomocí CCR5.

Až 14 členů CC chemokinové podrodiny obsahuje polymorfismy asociované s onemocněními a nejvíce ovlivňuje prozánětlivé chemokiny. CCL2 (MCP - 1) přitahuje specificky monocyty a paměťové T lymfocyty a exprese v tkáni je nalezena v celé řadě onemocnění charakterizovaných infiltrací mononukleárních buněk. Jde o arteriosklerózu a roztroušenou sklerózu (Colobran, Pujol - Borrell II. 2007).

CCL27 může být sestřížen na dvě varianty. Jedna z těchto variant kóduje klasický chemokin s asociovaným signálním peptidem (CCL27), zatímco druhá varianta (PESKY) udržuje sekvenci chemokinu. Vylučovaný CCL27 se může dostat až k jádru po internalizaci zprostředkované receptorem CCR10, a tak přímo modulovat transkripci a ovlivnit některé buněčné procesy. Studie exprese CCL27 odhalily odlišnou expresi v tkáních. Zatímco CCL27 se ve vysoké míře vyskytuje v placentě, PESKY se vyskytuje hlavně ve varlatech a v mozku a slabě ve vyvíjejícím se embryu (Colobran, Pujol - Borrell II. 2007).

V rámci skupiny pro - zánětlivých chemokinů v CC chromozomu 17, byly jasně rozlišené dvě podskupiny:

### **1.)Podskupina-MCP**

Do této skupiny patří CCL2, CCL7, CCL11, CCL8,CCL13 a CCL1.CCL2, CCL8, CCL7 a CCL13 (původně nazvaný MCP - 1, -2, -3, -4) úzce souvisí s chemoatraktanty pro monocyty, aktivují T lymfocyty a NK buňky, navíc CCL8,CCL7 a CCL13 také přitahují eozinofily. Váží se hlavně k CCR2 a CCR3, a mohou být patogenní u onemocnění charakterizovaných mononukleární nebo eozinofilní infiltrací (ateroskleróza a astma).

CCL7 je vysoce účinný CCR5 antagonist. CCL11 (eotaxin - 1) je silný eozinofilní chemoatraktant a ostatní dva členové rodiny eotaxinů, CCL24 (Eotaxin - 2) a CCL26 (eotaxin - 3), jsou umístěny společně v chromozomu 7. Tyto tři chemokiny posilují a aktivují CCR3 buněk, jako jsou eozinofily, žírné buňky a Th2 lymfocyty, které hrají významnou úlohu v alergických onemocněních (Colobran, Pujol - Borrell II. 2007).

CCL26 je první lidský chemokin, který se vyznačuje širokou aktivitou jako přirozený antagonist pro ligandy CCR1, CCR2 a CCR5 (CCL11 může také blokovat CCR2). CCL26 může být spíše modulátorem (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

CCL1 má strukturální rysy, které jej odlišují od ostatních chemokinů, včetně dalšího páru cysteinu, které tvoří třetinu intramolekulární disulfidické vazby. CCL1 je jediný vysoce afinitní ligand pro CCR8 a má podobné funkční vlastnosti s ostatními členy této podskupiny, která je rovněž chemoatraktantem pro monocyty a Th2 lymfocyty (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

### **2.)Podskupiny – HCC a MDC**

Druhá podskupina jsou zánětlivé CC chemokiny. V této podskupině najdeme CCR1/CCR5 ligandy, které můžeme rozdělit ještě do HCC a MDC skupiny.

#### Skupina HCC:

Tato skupina obsahuje CCL14, CCL15,CCL16 (systematické názvy HCC1, HCC2, HCC4),CCL23 (MPIF) a CCL5 (RANTES). CCL14, CCL15,CCL16 a CCL23.

CCL5 se váže s vysokou afinitou k CCR1/CCR3/CCR5. HCC geny jsou poměrně velké od 3,1 Kb (CCL14) až do 8,8 Kb (CCL5). Na rozdíl od většiny ostatních lidských CC chemokinových genů, které obsahují tři exony, CCL15 a CCL23 mají čtyři exony. Ve skutečnosti, jejich vysoká nukleotidová homologie naznačuje, že byly získány zdvojením. Všechny tyto chemokiny sdílejí vazbu na CCR1, i když většina z nich se může vázat na další CCR. Tato skupina je mnohem funkčně heterogenní než skupina MDC nebo podskupina MCP (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

#### Skupina MDC:

Skupina MDC obsahuje CCL18 (PARC), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL3L (LD78b), CCL4 (MIP - 1 $\beta$ ) a CCL4L. CCL3 a CCL4 byly vytvořeny zdvojením společného rodového genu. Dvojice CCL3L - CCL4L ukazuje také další variabilitu: mají polymorfismus počtu kopií (CNP). Tyto geny jsou přítomny v proměnném čísle v genomu. Existují dvě hlavní alelické varianty CCL4L: CCL4L1, původně popsáné varianty a CCL4L2. CCL3/CCL3L a CCL4/CCL4L jsou funkčně velmi příbuzné. Obě se váží na CCR5, ale CCL3 se také váže s vysokou afinitou k CCR1 (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

CCL18 obsahuje dva pseudo - exony. Tuto vlastnost má společnou s CCL3 genem. CCL18 gen může být vytvořen fúzí dvou CCL3. CCL18 zřejmě funguje jako zánětlivý nebo homeostatický chemokin v závislosti na okolnostech. Je přítomen ve vysokých koncentracích v lidské plazmě (pravděpodobně přispívá k fyziologickému přísunu lymfocytů a dendritických buněk). Podílí se i na obnově primární imunitní odpovědi. CCL18 receptor není dosud identifikován. Tento chemokin CCR3 má antagonistické působení (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

Zbytek chemokinů CC je umístěn v jiných chromozomech, buď jako jediný člen, nebo tvoří podskupinu. CCL27 (CTACK), CCL19 (ELC) a CCL21 (SLC) jsou seskupeny do podskupiny v chromozomu 9. CCL19 a CCL21 mají podíl pouze 32% totožných aminokyselin, ale tvoří geneticky a funkčně velmi podobné podskupiny homeostatických CC chemokinů. Jsou to dva ligandy

z CCR7, které mají silnou chemotaxi pro naivní T lymfocyty a B lymfocyty. Mají hlavní roli při přísunu naivních lymfocytů a distribuci v rámci lymfatické tkáně. CCL27 zprostředkovává migraci lymfocytů do kůže prostřednictvím vazby na CCR10 (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

Dva úzce související chemokiny CCL22 (MDC) a CCL17 (TARC) jsou umístěny v chromozomu 16. CCL17 a CCL22, dva známé ligandy CCR4, jsou dvojicí CC chemokinů v brzlíku. Ty selektivně přitahují Th2 typ paměťových T lymfocytů do zánětlivého místa a regulují Th2 – souvisejí s imunitní odpovědí. Byly identifikovány díky stejným aminokyselinám se členy rodiny chemokinů CC. Mohou existovat ve dvou formách: jako transmembránový chemokin (mucin hybridní protein) a jako rozpustný chemotaktický polypeptid generovaný proteolytickým štěpením rodiny ADAM proteáz. CCL20 (LARC, chromozom 2) interaguje s CCR6 a sdílí s anti - mikrobiálními peptidy  $\beta$  - defensinů. Stejně jako CCL18 je CCL20 svojí stavbou považován za konstitutivní a inducibilní chemokin. Exprese CCL20 byla původně prokázána v játrech, sliznici a lymfatické tkáni pomocí indukčních monocytů. CCL25 se jako jediný chemokin váže na CCR9. Jeho exprese je v brzlíku a v tenkém střevě. CCL25 je chemoatraktant dendritických buněk a T lymfocytů. Aktivuje makrofágy a pravděpodobně hraje významnou roli u T lymfocytů v prostorech thymu a při rozvoji T lymfocytů. CCL28 (MEC, na chromozomu 5) je nejvíce homologní k CCL27, zobrazuje asi 40% identity a sdílí vazbu na CCR10 ačkoli CCL28 se také váže na CCR3. Má místo ve slizniční tkáni. CCL28 hraje důležitou roli ve fyziologii nebo aktivaci specializovaných buněk na sliznici (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

#### **2.5.3.4. CX<sub>3</sub>C chemokiny**

Členové této skupiny mají tři aminokyseliny mezi dvěma cysteiny a jsou nazývány CX<sub>3</sub>C chemokiny (nebo  $\delta$  - chemokiny). Doposud jediný objevený CX<sub>3</sub>C chemokin se nazývá fractalkine (nebo CX<sub>3</sub>CL1). Po uvolnění je upevněn na povrch buňky. Slouží jako chemoatraktant a jako adhezivní molekula.

Gen pro CX<sub>3</sub>CL1 se nachází mezi CCL17 a CCL22 geny. CX<sub>3</sub>CL1 má tři dimenzionální struktury chemokinové domény odlišné od chemokinů CC (Colobran, Pujol - Borrell, 2007).

## **2.6. Epitely a chemokiny:**

### **2.6.1. Atopická dermatitida**

Atopická dermatitida je neinfekční zánětlivé onemocnění kůže a má chronický charakter. Cytokiny řídí alergickou zánětlivou odpověď skrze přísun a aktivaci T lymfocytů, eozinofilů, bazofilů, monocytů a makrofágů. Atopická dermatitida zahrnuje alergenem řízenou Th2 lymfocytovou polarizaci s produkcí interleukinů IL - 3, IL - 4, IL - 5, IL - 9, IL - 13 a GM - CSF. IL - 4, IL - 9 a IL - 13 v přítomnosti MHC II vyhrazeného alergenem pro T lymfocyt, CD40 a OX40 navodí stimulaci zvýšení produkce IgE. Dochází ke zvýšené aktivaci mastocytů a basofilů přes navázání IgE na vysoce afinitní receptor FcεR1. U zánětu typu Th2 je charakteristická účast epitelu a poškození spojené s jeho tkáňovou přeměnou. Epitel je důležitý faktor pro produkci velké řady cytokinů, chemokinů a růstových faktorů. Snížená epiteliální bariérová funkčnost a změněná vrozená imunita je stěžejní pro vznik těchto chorob (Polášková, web [www.peceodite.cz](http://www.peceodite.cz)).

Mezi mnoha látkami produkovány kožním epitelem je thymický stromální lymfopoetin (TSLP). TSLP je 140 aminokyselinový cytokin, který byl prvně izolován z thymické stromální buňky myši. Podporuje vývoj B lymfocytů při absenci IL - 7. TSLP produkuje řadu biologických faktorů vztahujících se k alergickým onemocněním objevujících se na povrchu epitelů. Je potřebný pro zrání pre - B buněk a též aktivuje dendritické buňky regulací stimulačních molekul (CD40, OX40, CD80), které v přítomnosti odpovídajících ligandů navozují produkci cytotoxických CD8+ T buněk s interferonem IFN $\gamma$ , IL - 5, IL - 13 a řídí diferenciaci CD4+ T buněk na Th2 fenotyp. U atopické dermatitidy je TSLP zřetelně expresován v epitelu dýchacích cest. Tato exprese je vyhodnocována hladinou mRNA nebo imunohistochemií (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

U těchto chorob je důležitou buňkou mastocyt. Má schopnost uvolňovat velké množství přeformovaných mediátorů, enzymů, chemokinů, cytokinů a růstových faktorů. Také může exprimovat svůj receptor IL7R $\alpha$  - TLSPR. Je to nový mechanismus pro selektivní signalizaci. Mastocyty dýchacích cest a kůže jsou

zdrojem Th2 cytokinů u alergického onemocnění. V přítomnosti IL - 1, TSLP zvyšuje produkci selektivních Th2 cytokinů: IL - 5, IL - 10, IL - 13, IL - 16, GM - CSF. Odpověď vůči TSLP a IL - 1 je později zvýšena díky TNF $\alpha$ . Je to nový non T buňky dependentní mechanismus pro iniciaci a udržování Th2 cytokinů v epiteliálním povrchu. Prozápětivé cytokiny TNF $\alpha$ , IL - 1 $\alpha$ , IL - 4 a IL - 13 mohou také vyvolat produkci TSLP pomocí lidských keratinocytů v kožních implantátech.

Paměťové T lymfocyty exprimují CCR4 a CCR10. Ligandem pro CCR4 je CCL17 a ligandem pro CCR10 je CCL27. Ty jsou produkovány keranocyty, dendritickými buňkami a dermálními fibroblasty.

CCL11 (eotaxin - 1), CCL24 (eotaxin - 2) a CCL26 (eotaxin - 3) jsou ligandy CCR3 a účinné chemoatraktanty eozinofilů hrající zásadní roli u zánětlivých onemocnění. Byla zjištěna asociace jednonukleotidových polymorfismů v těchto třech chemokinech u atopické dermatitidy (Colobran, Pujol - Borrell 2007).

### **2.6.2. Astma a CHOPN**

Definice dle GINA (Global Initiative for Asthma):

Astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, kde hrají roli mnohé buňky (mastocyty, eozinofily, T lymfocyty) a buněčné částice. Chronický zánět je spojen s průduškovou hyperreaktivitou a vede k opakujícím se epizodám pískotů, dušnosti, tíže na hrudi a kašle, zvláště v noci nebo časně ráno. Tyto epizody jsou obvykle spojeny s variabilní obstrukcí, která je často reverzibilní buď spontánně, nebo vlivem léčby (web patf.lf1.cuni.cz).

Astma máme alergické nebo nealergické. Alergické astma je zprostředkované imunologickými mechanismy. IgE zprostředkované astma – IgE protilátky spouští jak okamžitou tak pozdní reakci. T lymfocyty spouští pozdní a opožděné reakce. Nealergické astma nemá imunologický původ.

U astmatu dochází k přestavbě dýchacích cest = remodeling.

Na remodelingu se podílejí:

- buňky epiteliální (deskvamace epitelu, ztráta integrity, TGF -  $\beta$ , IGF - 1, KGF -  $\beta$ , alterace diferenciací a proliferace epiteliálních buněk, apoptóza)
- endoteliální buňky
- Th2 lymfocyty (CD25+, produkce IL - 4, IL - 5, IL - 6, IL - 10, IL - 13)

- antigen prezentující buňky
- mastocyty
- eozinofily (prodloužené přežívání v epitelu a submukoze, tvoří lipidy PAF, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>, peptidy, cytokiny, TGF -  $\alpha$ , TGF -  $\beta$ , IL - 1, IL - 3, GM - CSF, ECP alveolární makrofágy (produkce TNF -  $\alpha$ , IL - 6)
- myocyty (proliferace myocytů - po stimulaci IL - 11, produkovaný mezenchymálními buňkami po stimulaci alergenem, PGDF, EGF, efekt gelatinázy A (MMP - 2) a B (MMP - 9), produkce IL - 6, IL - 8, eotaxinu, PGE<sub>2</sub>, RANTES, MCP - 1, 2, 3, exprese ICAM - 1, VCAM - 1, produkce NO, GM - CSF, IL - 5)
- fibroblasty (aktivace fibroblastů, vznik myofibroblastů, uvolnění GM - CSF a TGF -  $\beta$ , zvýšení prozánětlivé aktivity eozinofilů (web patf.lf1.cuni.cz).

Astma má jiné buněčné zastoupení než je tomu u CHOPN. Jsou to zejména eozinofily, makrofágy, CD4<sup>+</sup> Th2 lymfocyty a žírné buňky. U astmatu je při vystavení běžným virům nachlazení značně snižená tvorba interferonů typu 1 a 2 epitelem. To je hlavním důvodem zhoršení stavu (web patf.lf1.cuni.cz).

Cytokiny uplatňující se při patogenezi astmatu a jejich působení:

IL - 4 způsobuje přesmyk izotypů imunoglobulinů B lymfocytů k tvorbě IgE a IgG<sub>4</sub>, také zvyšuje expresi VCAM - 1 a sekreci hlenu. Interleukin inhibuje aktivaci Th1 a tvorbu IFN $\gamma$ . IL - 13 aktivuje žírné buňky a zvyšuje bronchiální hyperreaktivitu a kontraktilitu hladkých svalů, narušuje diferenciaci cílů a indukuje eotaxin. Také indukuje tvorbu IgE a IgG<sub>4</sub> a VCAM - 1 potlačuje tvorbu prozánětlivých cytokinů. IL - 5 je produkován žírnými buňkami a Th2 lymfocyty, epiteliálními buňkami a eozinofily. Ovlivňuje proliferaci a diferenciaci B lymfocytů a indukuje expresi IL - 2R. IL - 12 produkují makrofágy, dendritické buňky a monocyty. Potlačuje tvorbu Th2 cytokinů a snižuje tak tvorbu IgE a IgG<sub>1</sub>. Též snižuje eozinofilii v periferní krvi a ve sputu. IL - 10 má široké působení imunosupresivní a protizánětlivé. IFN $\gamma$  působí stimulačně na Th1 buňky a inhibičně na Th2. U atopiků jsou snižené hladiny. TGF -  $\beta$  ovlivňuje remodeling, indukuje Fas receptory na epiteliálních buňkách, aktivuje apoptózu, fagocytózu makrofágy, exsudaci plasmy a fibrózu (web patf.lf1.cuni.cz).



U astmatu bylo zjištěno spojení s jednonukleotidovým polymorfismem CCL2. CCL11 (eotaxin - 1), CCL24 (eotaxin - 2) a CCL26 (eotaxin - 3) jsou ligandy CCR3 a účinné chemoatraktanty eozinofilů hrající zásadní roli u astmatu. U čtyř jednonukleotidových polymorfismů genu CCL11 bylo několika nezávislými studii zjištěno spojení s astmatem. Tři z nich jsou lokalizovány v oblasti promotoru (-576C/T, -426C/T a -384 A/G) a čtvrtý (+67G/A) v signálním peptidu (exon 1) způsobujícím aminokyselinovou změnu (T23A). Obě alely -384G a +67A jsou spojovány s nižší produkcí CCL11. Tři polymorfismy genu CCL24 spojované s astmatem jsou intronické jednonukleotidové polymorfismy: +179TC a +275C/T v intronu 1 a +1265A/G v intronu 2. CCL26 má dva jednonukleotidové polymorfismy, které na astma působí odlišně: +2497T/G (v oblasti 3'UTR) je spojen s náchylností, zatímco +77C/T (v intronu 2) hraje zásadní roli při přitahování eozinofilů a udržování IgE na vysoké úrovni. U všech jednonukleotidových polymorfismů popsaných v souvislosti s CXCL8 má značný vliv na syntézu proteinu za přítomnosti -251A/T na začátku transkripce (Colobran, Pujol - Borrell II. 2007).

CHOPN je nemoc charakterizovaná omezením průtoku vzduchu v průduškách (bronchiální obstrukcí), která není úplně reverzibilní. Bronchiální obstrukce progreduje a je spojena s abnormální zánětlivou odpovědí plic na škodlivé částice a plyny. Definice dle GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) ( web patf.lf1.cuni.cz).

Mediátory podílející se na patogenezi CHOPN:

Leukotrien B<sub>4</sub> je silný chemoatraktant neutrofilů a je produkován makrofágy.

CXCL8 je secernován makrofágy, neutrofily a epitelíálními buňkami bronchů po stimulaci TNF -  $\alpha$ . Je to selektivní chemoatraktant pro neutrofily a aktivuje NF- $\kappa$ B, který aktivuje gen pro CXCL8 (web patf.lf1.cuni.cz).

Chemotaktický protein pro makrofágy 1 (CCL2) zajišťuje přísun makrofágů do plic. Další mediátory jsou zánětlivý protein makrofágů 1 (MIP - 1) a zánětlivý protein makrofágů  $\alpha$  (MIP-1  $\alpha$ ). Endotelin - 1 má za následek vazokonstrikci a chronickou hypoxémii. Komplement – složka C5a akumuluje neutrofily. Buněčné zastoupení u CHOPN tvoří neutrofily, značné zvýšené množství makrofágů a zvýšení CD8<sup>+</sup> T buněk (Klener, web remedia.cz).

### 2.6.3. Angiogeneze

Je to proces novotvorby cév. Nachází uplatnění jak u fyziologických tak i u patologických stavů. Je to vícestupňový proces. Angiogenní kaskádu lze rozdělit do tří etap.

- Iniciální fáze: disoluce basální membrány
- Proliferaci: endotélie jsou stimulovány angiogenními faktory
- Vlastní morfogeneze: aktivace pericytů, vytvoření nové basální membrány a lumina cévy

#### 2.6.3.1. Angiogenní faktory

Bývají souhrnně nazývány jako tumor angiogenesis factors - TAF. Dělí se na přímé – VEGF, FGF, HGF a nepřímé angiogenní faktory - TGF $\alpha$ , EGF, PDGF aj. Výraznou chemotaxi k endotelovým buňkám mají angiopoetiny a uplatňují se při pozdější fázi novotvorby cév. Řadíme sem angiopoetin - 1, angiogenin a angiotropin. Usnadňují vazbu k buněčné membráně a způsobí aktivaci pericytů. Angiogenin stimuluje endotelové buňky k produkci prostacyklinu a omezuje produkci adhezních molekul ICAM - 1 a VCAM - 1. TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor) je uvolňován z aktivovaných monocytů a makrofágů v procesu angiogeneze a též podněcuje výdej některých cytokinů (IL - 1) a adhezních molekul (ICAM - 1). Další faktor s chemotaktickými účinky je PD - ECGF (platelet derived endothelial cell growth factor) má vysokou afinitu k endoteliím a usnadňuje jejich migraci. TGF $\alpha$  a EGF stimuluje výdej VEGF a TGF a tím se uplatní více cytokinů. IL - 1 zvýší expresi endotelových receptorů a stimuluje mitogenezi. IL - 6 má vliv na migraci endotelií, CXCL8 svými chemotaktickými účinky přispívá ke snadnější migraci endotelií, INF $\gamma$  zvyšuje sekreci TNF $\alpha$ , CXCL8, IL - 1 a GM - CSF stimuluje makrofágy k sekreci angiogenních faktorů (Klener, web remedia.cz).

### **2.6.3.2. Antiangiogenní faktory**

Udržují rovnováhu a angiogenními faktory a umožňují tak angiogenezi. PF4 (platet factor 4) je uvolňován z  $\alpha$  granulí krevních destiček a omezuje vazbu FGT na receptory a inhibuje proliferaci endotelií indukovanou VEGF. Spolu s CXCL8 patří do rodiny CXC chemokinů. Další oslabující schopnost u migrace má též IL – 12 a IL - 18 (Klener, web remedia.cz).

### **2.6.4. Ateroskleróza**

Chemokiny jsou odpovědné za chemotaxi a nahromadění makrofágů v tzv. tukových proužcích. Aktivace monocytů a T buněk vede ke zvýšené tvorbě jejich receptorů a také k produkci molekul vázajících selektiny, integriny a k tvorbě receptorů vázajících chemoatraktanty (např. CCL2). Tato interakce aktivuje dále monocyty. Ty proliferují a ohraničí proces v místě zánětu. Je identifikována skupina transmembránových proteinů – disintegriny. Jejich extracelulární segment umožňuje aktivaci TNF $\alpha$ . Nebyly nalezeny v normálních arteriích, ale disintegrin 15 byl nalezen v lézích. Metaloproteinázová aktivita by mohla odštěpovat z povrchu leukocytů adhezivní molekuly jako L – selektiny (Masopust, web stefajir.cz).

### **2.6.5. Nádorové buňky**

Nádorové buňky u renálního karcinomu společně se stromálními buňkami vytváří cytokinové a chemokinové prostředí (CXCL5, GRO, CXCL8). To má vliv na růst nádoru a protinádorovou imunitní odpověď. Tumor – associated macrophages (TAMs) jsou schopné přímo zabíjet nádorové buňky a produkují TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , CXCL8, proteinázy a metabolity kyseliny arachidonové. TAMs se diferencují z monocytů, které vstupují do nádorové tkáně působením chemokinů. TAMs exprimují VEGF - C, VEGF - D, VEGFR - 3 (receptor) a podílejí se na lymfangiogenezi a šíření metastáz lymfatickými cévami (Kopecký, Lukešová, web linkos.cz).

CCL 3, CCL 21, CCL 27 a CX3CL 1 mají inhibiční efekt na růst nádorů. Jsou uvolňovány v místě nádoru a přitahují cytotoxické T lymfocyty, NK buňky a dendritické buňky. CCL 2 reguluje vstup monocytů (makrofágů) do nádoru a potencuje jejich cytotoxický protinádorový efekt. CX3CL 1 zesiluje protinádorovou aktivitu NK buněk (Kopecký, Kopecký 2010).

CCL2 má jednonukleotidový polymorfismus, který je spjat s rakovinou prsu. Také polymorfismus CXCL12 + 801G/A má spojení s mnoha různými typy rakoviny jako rakovinou prsu a plic, akutní myeloidní leukémií, lymfomem a chronickým myeloproliferativním onemocněním (Colobran, Pujol - Borrell II. 2007).

### **2.6.5. HIV a AIDS**

Chemokiny slouží i jako koreceptory pro vstup virů do buněk (Sayyed, Ruy 2011). Koreceptor pro HIV do T lymfocytu je CXCR4 a jeho ligand CXCL12. CXCL12 umožňuje blokovat vstup viru do T lymfocytu (Berlin, Amara 1996). Pro vstup do makrofágu slouží CCR5 (Ono 2003). Někteří lidé tak mohou od narození být rezistentní z důvodu defektní chemokinových receptorů – delece 32 bp v genu kódujícím koreceptor CCR5 (Vácha 2008, web orko.cz). Mutované alely (-801A) mají ochranu před postupem HIV infekce k propuknutí AIDS a tím k delší době života.

CCL2 má jednonukleotidový polymorfismus je také asociován s infekcí HIV. Polymorfismus -251A/T CXCL8 ovlivňuje onemocnění jako Kaposiho sarkom související s onemocněním AIDS (Colobran, Pujol - Borrell II. 2007).

CCL3 makrofágový zánětlivý protein (MIP - 1a), CCL4 (MIP - 1b), CCL4L lymfocyty aktivující gen (LAG - 1) a CCL5 (RANTES) mají různorodé polymorfismy, které značně ovlivňují náchylnost k infekci HIV - 1. Bylo zjištěno spojení haplotypů definovaných v oblasti obsahujících geny CCL18, CCL3 a CCL4 (chromozom 17 q11 – q21) s náchylností k infekci HIV a její progresí.

Haplotypy CCL5 ovlivňují klinickou progresi infekce HIV. Dva zajímavé jednonukleotidové polymorfismy v genu CCL4L byly spojeny s různými aspekty infekce HIV - 1:

(a) + 590A/G je lokalizován v akceptorovém místě sestřihu intronu 2. Tato alela pozměňuje náchylnost k infekci HIV - 1.

(b) +59C/T je lokalizován v exonu 2, způsobuje aminokyselinovou změnu (R22H). Varianta H byla asociována s kratší celkovou dobou života osob infikovaných HIV - 1.

Tři CCL5 individuální jednonukleotidové polymorfismy byly rovněž asociovány s infekcí HIV – 1 (Colobran, Pujol - Borrell II. 2007).

### 2.6.6. Jiná onemocnění

Chemokiny jsou též spojené s obezitou. Adipocyty viscerální tukové tkáně se chovají jako buňky imunitního systému. Produkují TNF $\alpha$ , IL - 6, IL - 1, rezistin, leptin, PAI - 1, CCL2, MIF. Zvýšené jsou i chemokiny rodiny CC a CXC (Masopust, web stefajir.cz). U nemocných s obezitou se vyskytuje zvýšené množství CCR2+ makrofágů v adipocytech. To spouští imunitní proces, jako při inzulinové rezistenci (Ito, Suganami 2008).

CCL2 má jednonukleotidový polymorfismus lokalizovaný v 5' distální regulační oblasti ( - 2518G/A). Alela -2518G je spojena se zvýšenou produkcí CCL2. Tento polymorfismus je spojován s celou řadou onemocnění jako je systémový lupus erythematosus, juvenilní revmatoidní artritida, systematická skleróza a akutní uveitida asociovaná s HLA - B27. Dále sem patří stavy ovlivňující ledviny jako transplantace ledviny, dlouhodobá hemodialýza a IgA nefropatie. Také sem patří srdeční choroby jako infarkt myokardu, koronární arteriální onemocnění, kardiomyopatie při Chagasově chorobě a onemocnění CNS jako Alzheimerova choroba, závažná deprese, onemocnění endokrinního systému jako diabetes 1. a 2. typu. Týká se to též infekčních onemocnění způsobená HCV, HBV a Mycobacterium tuberculosis (Colobran, Pujol - Borrell II. 2007).

Dva polymorfismy promotoru CCL5, -403G/A a -28C/G, byly rovněž spojeny s celou řadou dalších onemocnění jako alergická onemocnění, zánětlivá onemocnění a infekční onemocnění (HCV) (Colobran, Pujol - Borrell II. 2007).

Polymorfismus - 403G/A má souvislost s metabolickými riziky jako jsou vysoký cholesterol v krvi, koronární arterioskleróza a kardiovaskulární mortalita u diabetu 2. typu. CCL11 (eotaxin - 1), CCL24 (eotaxin - 2) a CCL26 (eotaxin - 3) jsou ligandy CCR3 a účinné chemoatraktanty eozinofilů hrající roli u gastrointestinálních onemocnění. U všech jednonukleotidových polymorfismů popsanych v souvislosti s CXCL8 má značný vliv na syntézu proteinu za přítomnosti - 251A/T na začátku transkripce. Nachází se u infekce způsobené respiračním syncytiálním virem a u spinocelulárního karcinomu dutiny ústní. Nachází se také u gastrointestinálních onemocnění způsobené Clostridium difficile nebo Escherichia coli, u žaludečního vředu způsobeného

bakterií *Helicobacter pylori*, u atrofického zánětu žaludku, u prudkého akutního zánětu slinivky břišní a u nádorů gastrointestinálního traktu. Také se vyskytuje u onemocnění centrálního nervového systému jako Parkinsonova choroba, roztroušená skleróza a multisystémová atrofie (Colobran, Pujol - Borrell II. 2007).

Akutní pyelonefritida je ovlivňována polymorfismem - 251A/T CXCL8.

- 845C/T SNP (Single nukleotide polymorphism) v oblasti promotoru CXCL8 byl spojen s prudkým zánětem ledvin v důsledku systémového lupus erythematosus. Další odlišný jednonukleotidový polymorfismus v 3'UTR (+2767A/T) byl spojen s akutní pyelonefritidou a nefritidou v kožní vaskulitidě (Colobran, Pujol - Borrell II. 2007).

Poškození a následná aktivace endotelu v patogenezi chronické transplantální nefropatie má důležitou úlohu. Exprimují se na povrchu endotelu adhezivní molekuly a chemokiny – CXCL 8, CCL2 (MCP – 1), MIP - 1 $\alpha$ , CCL4 (MIP - 1 $\beta$ ), CCL5. Usnadňují tak migraci leukocytů směrem ke štěpu. Leukocyty produkují další látky a ty usnadňují lymfocytární adhezi (Tesař, Schüch 2006).

U diabetické nefropatie byla prokázána vyšší hladina CCL2. CCL5 a CXCL 8 mohou být zapojeny do rozvoje diabetu 2. typu a to nezávisle na metabolickém syndromu (internet). U diabetické nefropatie hrají roli zřejmě makrofágy. Jejich blokáda může působit na progresi nefropatie. Makrofágy a monocyty se svým povrchovým receptorem CCR2 vážou na CC chemokiny. U pacientů s tímto onemocněním byly nalezeny v moči CCL2 (Sayyed, Ruy 2011).

Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida jsou zánětlivé chronické střevní choroby. Charakteristická je zvýšená infiltrace lamina propria neutrofily, makrofágy, dendritickými buňkami, NK buňkami, T a B lymfocyty. To vede k lokálnímu zvýšení TNF $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IFN $\gamma$  a cytokiny dráhy IL 23 - Th 17. Crohnova choroba je spojena s Th1 odpovědí a ulcerózní kolitida s Th2 odpovědí a eozinofily. Vyskytují se zde chemokiny CXCL8, CXCL5, CCL2, CCL11, CXCL10 a CX3CL1 (web medicaltribune, 2010).

Chemokiny nejsou spjaty pouze s virovým onemocněním HIV, ale i s dalšími jako je např. cytomegalovirus. Ten kóduje receptor US 28 a váže MIP - 1 $\alpha$ ,

MIP - 1 $\beta$ , CCL2 a CCL5 (Gao 1994). U CMV slouží jako hostitelské buňky makrofágy, endotélie, lymfocyty, granulocyty, fibroblasty a epitelální buňky (Roubalová web szu.pdf).

Chemokiny jsou důležité i u autoimunitních chorob. Zde můžeme zařadit roztroušenou sklerózu. U této choroby jsou zvýšené koncentrace CCL5 a MIP - 1 $\alpha$ . Makrofágy jsou zde významnými efektorovými buňkami. Prostřednictvím CCL2, MIP - 1 $\alpha$ , MIP - 1 $\beta$ , CXCL10 a CCL5 ovlivňují migrační aktivitu lymfocytů a zajišťují jejich hromadění v místě patologického procesu v CNS (Krejzek, Otakar 2002, web solen.cz).

Předčasný porod je spojen také se zánětlivými cytokiny. Infekce dělohy je pokládána za hlavní příčinu předčasného porodu. Záněty genitálních cest hrají významnou roli v patogenezi předčasného porodu. Zánětlivé mediátory IL - 1, TNF  $\alpha$  a chemokiny CXCL8, MIP -  $\alpha$  a imunomodulátory cytokinů (IL 6), imunosupresivní cytokiny (IL - 10, IL - 4) jsou produkovány amniálními a deciduálními membránami a jsou nalézány ve fetální cirkulaci a amniální tekutině. Spouští kaskádu vedoucí k produkci prostaglandinů a cyklooxygenázy, které vedou k děložním kontrakcím (Ville 2001).

U Alzheimerovy choroby hrají chemokiny též svoji roli. Makrofágy u neurodegeneraivních chorob mohou redukovat patologické plaky v mozku. Specializované makrofágy pocházejí z kostní dřeně a díky chemokinům se dostávají do mozkové tkáně (Málek 2011, web gate2biotech.cz).

## **2.7. Stanovení chemokinů**

### ELISA

Používá se nekompetitivní neboli sendvičová technika. Nejdříve se naváže chemokin na monoklonální protilátku. Ta je adsorbována v jamce. Nadbytek protilátky je po inkubaci odstraněn promytím. Množství navázaného antigenu se stanoví pomocí enzymem značené protilátky. Nadbytek se znovu odstraní promytím. Přidáním vhodného substrátu je stanovena aktivita enzymu. Množství produktu je přímoúměrné množství chemokinu.

### Cytometric Bead Array systém

Na průtokovém cytometru jsou detekovány jednotlivé populace částic navázané se specifickými protilátkami a detekčními protilátkami. Intenzitu fluorescence těchto částic je úměrné koncentraci chemokinů ve vzorku. Koncentrace je odečítána z kalibrační křivky (Sedláčková, Průcha web clip.lf2.cuni.cz).

K tomuto vyšetření se využívá séra, plazmy a supernatantu buněčných kultur.

### ELISPOT – Enzyme-linked ImmunSpot Assay

Principem je vazba chemokinů produkovaných buňkou na protilátku, která je vázána na destičce. Mononukleární buňky jsou nejdříve inkubovány s požadovaným antigenem. Buňky jsou přeneseny na mikrotitrační destičku, kde je možno detekovat frekvenci buněk produkující chemokiny v odpovědi na antigenní stimul. Buňky jsou lyzovány, odmyty a přidáváme biotinem značenou druhou protilátkou proti testovanému chemokinu. Po navázání protilátky je proprána, stabilizována a usušena. Vazba je detekována pomocí streptavidinu konjugovaného křenovou peroxidázou. Po přidání peroxidu vodíku a substrátu se zvýrazní v jamce místo, kde je produkovaný chemokin.

K vyhodnocení můžeme použít buď inverzní mikroskop nebo ELISPOT reader (Bartůňková, Paulik 2011). Slouží ke sledování průběhu onemocnění, vlivu léku na produkci cytokinů nebo transplantaci (Průcha, web imunologie.lf2.cuni.cz).

mRNA – analýza exprese mRNA pomocí PCR. Umožňuje zjistit jak klidový stav, tak aktivaci chemokinů (Průcha, web imunologie.lf2.cuni.cz). mRNA chemokinů prochází alternativním sestřihem a vznikající varianty se liší v molekulové aktivitě nebo v distribuci v tkáni (Colobran, Pujol-Borrell 2007).



### 3. Závěr

Lidský organismus je tvořen mnoha epitely člověk se bez nich neobejde. V každém epitelu ale může vzniknout zánět. Příčin může být několik, ale vždy potřebuje k přísunu imunitních buněk chemoatraktanty, aby mohl zánět vzniknout. Chemokinů bylo objeveno zhruba 52 a známe i jejich některé receptory. Co zatím neznáme, jsou přesné signální mechanismy. Nejsou dané hranice, která by rozeznávala, zda zánětlivý stav je už patologický. Je zde jedno zda má zánět původ virový, bakteriální či dokonce autoimunitní. Některé metody stanovení již známe a používáme. Nejsou to však rutinní metody, které mají referenční rozmezí, podle kterých se můžeme přesně řídit. Nesmíme však zapomenout, že chemokiny neplní jen funkci při zánětu, jak se původně zamýšlelo. Chemokiny se také účastní remodelací tkání, vývoje a diferenciace imunitních buněk, hematopoézy, transplantací, angiogeneze a organogeneze. Poslední objev u léčby Alzheimerovy choroby dokazuje, že léčba pomocí chemokinů je teprve na začátku jejich využití.

## 4. Literatura

- R. Colobran, R. Pujol-Borrell, Ma P. Armengol and M. Juan: 2007 British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology, 148: 208–217
- R. Colobran, R. Pujol-Borrell II, M. P. Armengol and M. Juan: 2007 British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology, 150: 1–12
- Jörg H. Fritz, Lionel Le Bourhis, Joao Gamales Magalhaes and Dana J. Philpott: 2007 TRENDS in Immunology Vol.29No.1: 41-49
- Stephen T. Holgate: TRENDS in Immunology Vol.28No.6: 248-251
- Václav Hořejší, Jiřina Bartůňková: Základy imunologie. 3. vyd. Praha: Triton 2005, str. 40-43, 107-116, 132, 134, 158-165, ISBN 80-7254-686-4
- Petr Jílek: Základy imunologie. 1.vyd. Praha: Anyway 2002, str. 11-16, 48, 50, 56-59, ISBN 80-238-8594-4
- Jiřina Bartůňková, Milan Paulik a kolektiv: Vyšetřovací metody v imunologii. 2.vyd. Grada 2011, str. 77, 78, 85, ISBN 978-80-247-3533-7
- Sedláčková, Průcha: [www.clip.lf2.cuni.cz/files/archiv/CBA.pdf](http://www.clip.lf2.cuni.cz/files/archiv/CBA.pdf)
- Helena Handrková: <http://cellula.wz.cz/>
- Jaroslav Masopust: [www.stefajir.cz/files/Atero.pdf](http://www.stefajir.cz/files/Atero.pdf)
- Prof. MUDr. Pavel Klener DrSc., Remedia online:  
<http://www.remédia.cz/Clanky/Editorial/Angiogeneze-a-nadorova-onemocneni/6-M-fa.magarticle.aspx>  
<http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/154/3581.pdf>
- Miroslav Ferenčík, J. Rovenský a spol.: Imunitní systém: informace pro každého Grada 2005 ISBN 80-247-1196-6
- Ivan Dylevský: Obecná kineziologie, Grada 2007 str. 23-26, ISBN 978-80-247-1649-7
- Otomar Littmar a kolektiv: Lékařská fyziologie, Grada 2011 str. 43-54 ISBN 978-80-247-3068-4
- Prof. MUDr. Jaroslav Masopust DrSc., Doc. MUDr. Richard Průša CSc.: Patobiochemie buňky, České tiskárny s.r.o. Praha 2003 str. 180 – 210 ISBN 80–239–1011-0
- Marek Vácha 2008: [www.orko.cz/lekarska%20etika%202011/AIDSetika05.ppt](http://www.orko.cz/lekarska%20etika%202011/AIDSetika05.ppt)

Vladimír Tesař, Otto Schüch:Klinická neurologie, Grada Publishing 2006, str. 486, 487 ISBN 80-247-0503-6

Emanuel Nečas:Obecná patologická fyziologie, Nakladatelství Karolinum 2007, str. 104 – 107 ISBN 978-80-246-1291-1

D.F.Paulsen:Histologie a buněčná biologie, Nakladatelství H H 2004, str. 272 – 277 ISBN 80-7319-024-9

Ito A., Suganami T., Yamauchi et al. Role of CC chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue, J Biol Chem 2008, 283:35715 – 35723

Sayed SG, Ruy M., Kulkarni OP, et al.:An orally active chemokine receptor CCR2 antagonist prevents glomerulosclerosis and renal failure in type 2 diabetes, Kidney Int 2011, 80:68 – 78

Gao JL, Murphy PM:Human cytomegalovirus open reading frame US 28 encodes a functional beta chemokine receptor, J Biol Chem 1994, 269:28539 – 28542

Oberlin E, Amara A, Bachelier F et al., The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for CXCR4 /fusin and prevents infection by T-tropic HIV-1: Nature 1996, 382:833-835

Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D et al., Chemokines: Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. J Allergy Clin Immunol 2003, 111:1185-1198

Roubalova: [www.szu/uploads/documents/CeM/Her\\_viry/CMV.pdf](http://www.szu/uploads/documents/CeM/Her_viry/CMV.pdf)

Krejzsek, Otakar, Kopecký, Taláb: Hradec Králové 2002, Neurologie v praxi 5, str. 236 – 242 [www.solen.cz](http://www.solen.cz)

Ville Y., Premature delivery and inflammation, J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 2001, 30 Suppl 1:12.16

MUDr. Nouza Karel DrSc., Medicína 6, Imunologie dnes 1998, Chemokiny a jejich funkce web: [http://www.zdrava-rodina.cz/med/med698/m698\\_42.html](http://www.zdrava-rodina.cz/med/med698/m698_42.html)

Jakub Málek: <http://www.gate2biotech.cz/lecba-alzheimerovy-choroby-s-pouzitim-specializovanych-bunek-imunitniho-systemu/>

Medical Tribune, Zánětlivá střevní onemocnění: [www.tribune.cz/clanek/17591](http://www.tribune.cz/clanek/17591)

Prof. MUDr. R. Jelínek DrSc., MUDr. M. Dostál DrSc., RNDr. Z. Likovský a spol.: Histologie a embryologie, str. 153 – 156, 186 – 193 <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>

M. Průcha: Imunitní systém jako informační soustava

[http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory\\_vyuka/cytokiny.ppt#256,1](http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/cytokiny.ppt#256,1), Imunitní systém jako informační soustava

[www.wikiskripta.cz](http://www.wikiskripta.cz)

[www.wikipedie.cz](http://www.wikipedie.cz)

Kopecný, Lukešová, Vroblová: Sledování hladin

[http://www.linkos.cz/files/abstrakta/BOD2007\\_44.pdf](http://www.linkos.cz/files/abstrakta/BOD2007_44.pdf)

Patogeneze bronchiální obstrukce, Astma CHOPN:

<http://patf.lf1.cuni.cz/stumat/broch.pdf>

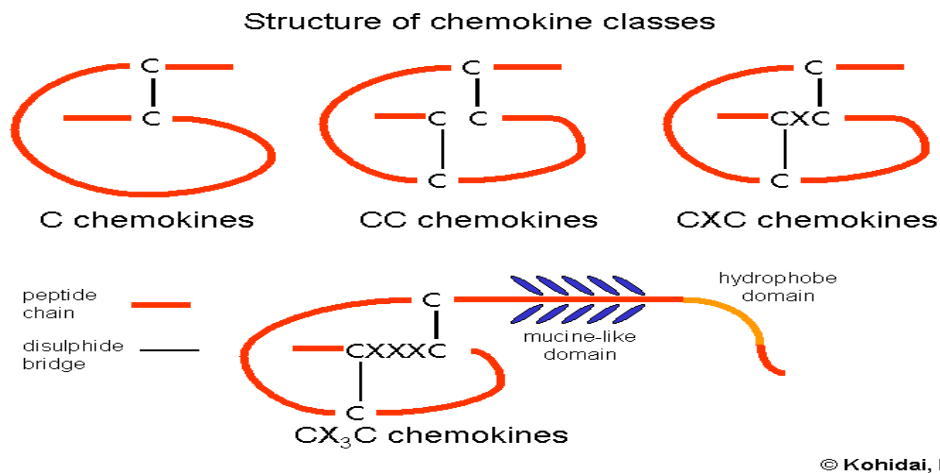
Kopecný J, Kopecný O.: NK buňky, chemokiny a chemokinové receptory 2010,

[www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/154/3577.pdf](http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/154/3577.pdf)

MUDr. Stanislava Poláčková [www.peceodite.cz/files/6\\_dil.pdf](http://www.peceodite.cz/files/6_dil.pdf)

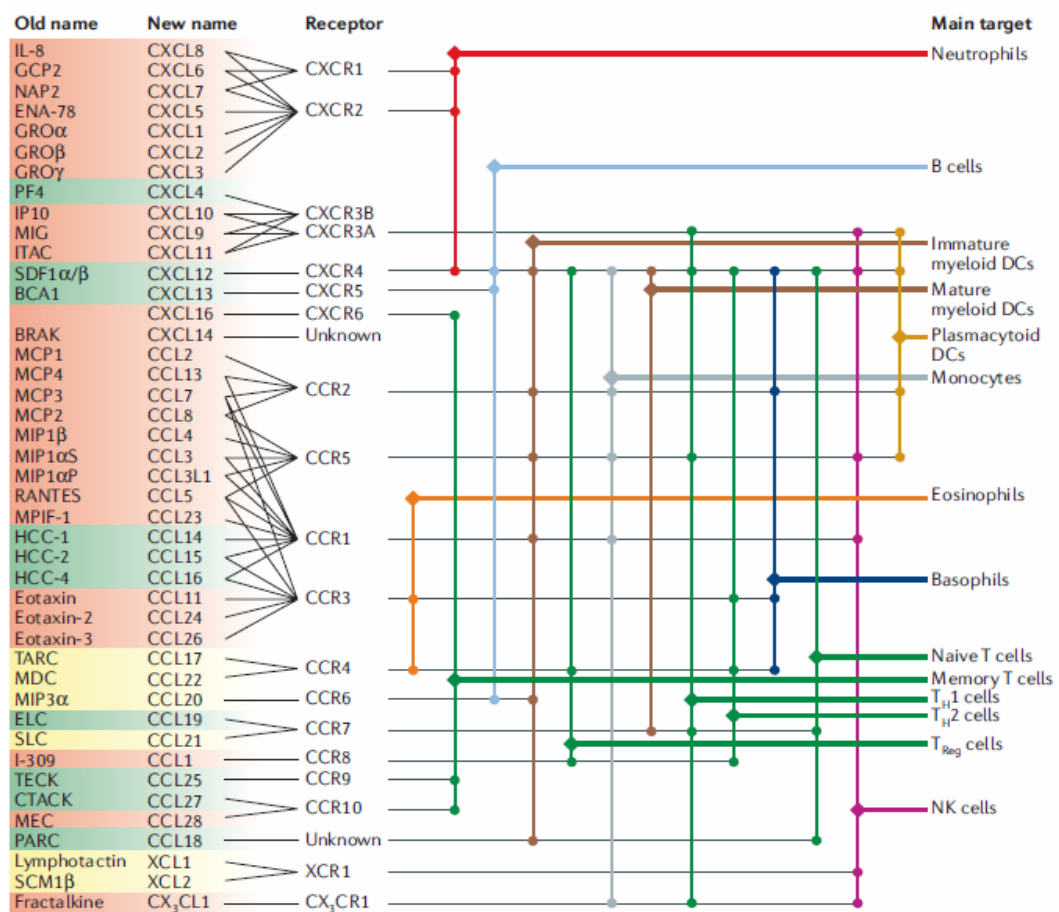
Prof. MUDr. I. Stříž: ústní sdělení, 2012

## 5. Příloha obrázků

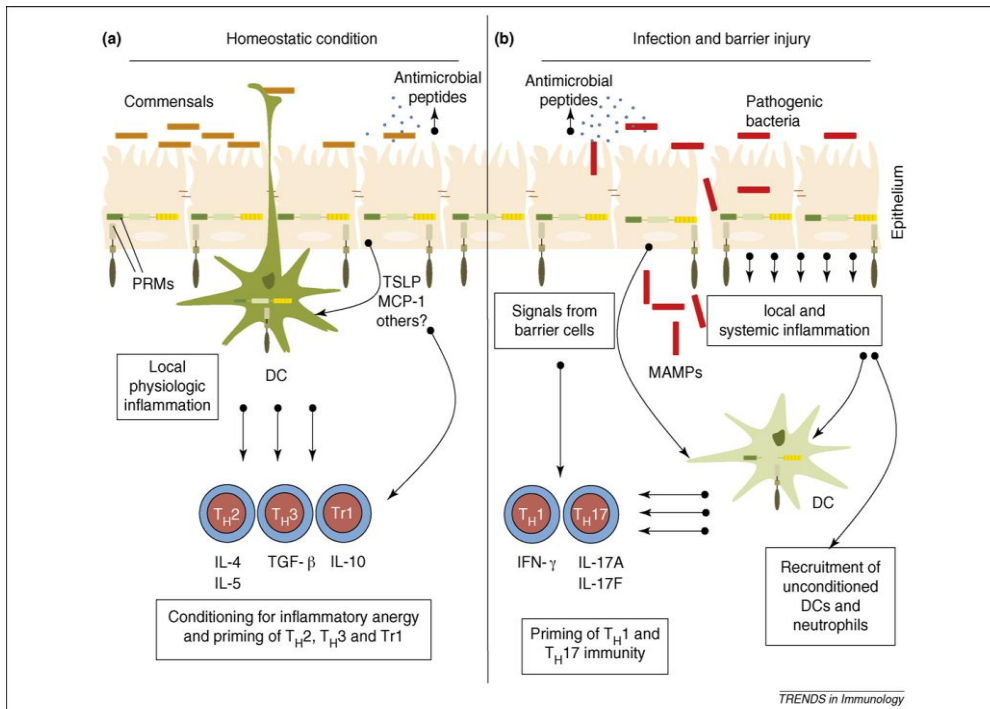


### Struktura chemokinů (web wikipedia.cz)

#### Box 1 | Chemokines and chemokine receptors

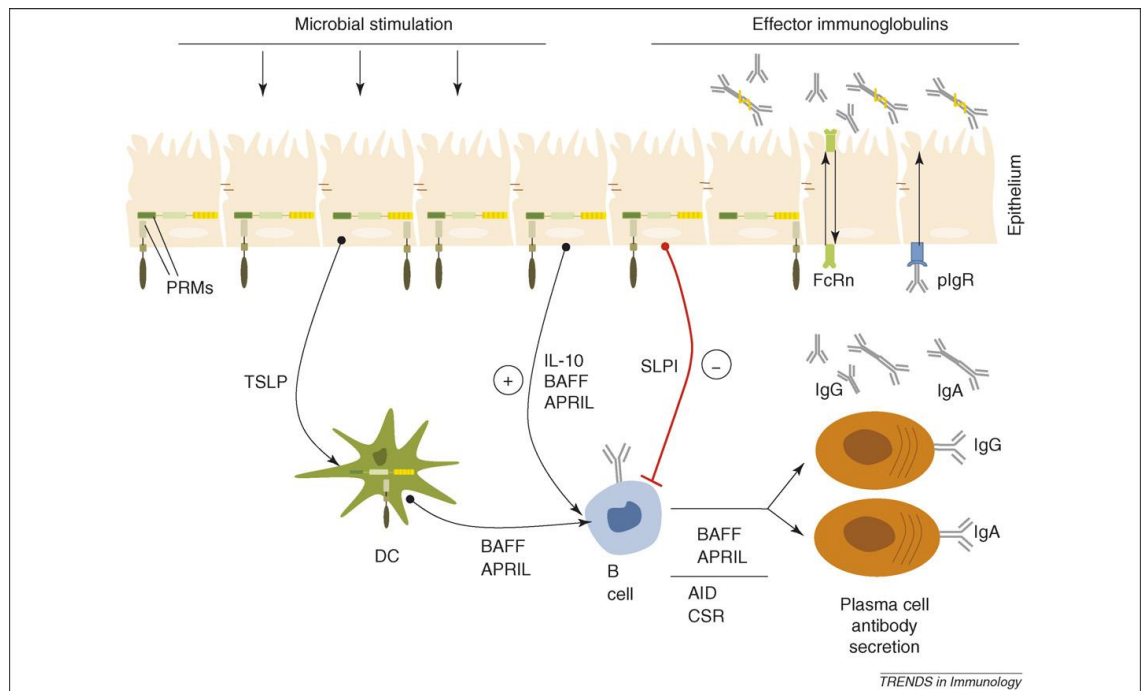


### Chemokiny a chemokinové receptory



### Následky vlastního imunitního rozpoznání buňkami bariéry (Philpott, 2007)

- (A) Homeostáza
- (B) Infekce a porušení bariéry



### Regulace odpovědi lokálních efektorových B buněk epiteliálními buňkami (Philpott: 2007).

## 6. Seznam použitých zkratk

GPCR	G protein coupled receptors
RTK	receptorový protein tyrosin kynasy
JAK	Janus Kinase
STAT	Stat transducers and activators of transcription
PTP	protein tyrosin fosfatasy
PAF	faktor aktivující destičky
GAG	glykosaminoglykany
MHC II gp	Major histocompatibility komplex glykoprotein II
MALT	mucosal – associated lymphoid tissue
GALT	gut associated lymphoid tissue
BALT	bronchial associated tissue
Ig G, A, M,E	imunoglobulin G, A, M, E
IL	interleukin
TGF – $\alpha\beta$	transforming growth factor
TNF	tumor nekrosis factor
APC	buňka prezentující antigen
GDP	guanindifosfát
GTP	guainintrifosfát
ATP	adenosintrifosfát
TCR	T buněčný receptor
BCR	B buněčný receptor
TLR	toll like receptor
GM – CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
TSLP	thymický stromální fymfopoetin
mRNA	mediátorová ribosonukleotidová kyselina
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
GOLD	global initiative for chronic obstructive lung disease
TAF	tumor angiogenesis factors
PD – ECGF	platelet derived endothelial cell growth factor