Trans zlom 3 30.10.2006 9:44 Stránka 167
proLékaře.cz | 10.11.2026

Hladiny cytokinů a kostimulačních molekul (interleukinů IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF-α, TGFβ1, sCD23, sCD40L a receptoru pro IL-6) v plazmě zdravých dárců krve

Kohútová V.[1], Čoupek P.[2], Neničková M.[3], Tesařová E.[3]
[1]Interní hematoonkologická klinika Fakultní nemocnice, Brno
[2]Česká geologická služba Brno
[3]Transfuzní oddělení a krevní banka Fakultní nemocnice, Brno

Souhrn
Regulace pomocí cytokinové signální sítě významnou měrou ovlivňuje homeostázu, fyziologické funkce buněk a uplatňuje se při rozvoji řady patologických stavů, včetně nádorových onemocnění. Pomocí imunoanalytické metody ELISA autoři stanovili hladiny vybraných cytokinů a kostimulačních molekul v plazmě 30 dárců krve. Věk dárců se pohyboval od 19 do 52 let (medián 30,5; ženy 29, muži 32). Většina hladin interleukinů byla pod detekčním limitem metody. Vyhodnocení analýz bylo proto rozděleno na 2 části zvlášť pro interleukiny 2, 4, 5, 6, 8, 10, 13 a zvlášť pro ostatní sledované cytokiny a kostimulační molekuly (faktor nekrotizující tumory-α, transformující růstový faktor β1, solubilní CD23, CD40 ligand a receptor pro interleukin-6). Vztahy mezi jednotlivými parametry byly ověřovány Fisherovým exaktním testem v kontingenčních tabulkách. Pro jednotlivé interleukiny byly určeny pravděpodobnosti výskytu měřitelných hodnot ve zdravé populaci, včetně intervalu spolehlivosti pro tuto pravděpodobnost. Zjištěné hodnoty jsou výchozí referenční hodnoty pro shodné sledování hladin cytokinů u pacientů s diagnostikovanými hematologickými malignitami. Cytokinová či anticytokinová terapie s využitím monoklonálních protilátek je rovněž již součástí léčby řady nenádorových i nádorových onemocnění.
Klíčová slova: cytokiny, interleukiny, plazmatická hladina, dárce krve, ELISA

Summary
Kohútová V., Čoupek P., Neničková M., Tesařová E.: Plasma concentrations of cytokines and co-stimulatory molecules (interleukins IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF-α, TGFβ1, sCD23, sCD40L and IL-6 receptor) in healthy blood donors

Homeostasis and cell functions are remarkably influenced by cytokine signal network. Cytokine regulation is involved in many diseases, including cancer. ELISA method was used for the detection of soluble cytokines and co-stimulatory molecules in plasma of 30 blood donors in age range from 19 to 52 years (median 30,5; women 29, men 32). Most of the interleukin concentrations were below the detection limit of the assay. Because of problem of "zero" values (below detection limits), separate data evaluation of interleukin and other cytokine and co-stimulatory molecules (tumor necrosis factor-α, transforming growth factor β1, soluble CD23, CD40 ligand and IL-6 receptor) was made. Dependency between the parameters was tested using the Fisher's exact tests for contingency table. The probability of the occurrence at detactable level for each particular interleukin was calculated, including the confidence interval for the probability. These results provide fundamental reference values of cytokine concentrations in plasma for identical observations on the patients with hematological malignancies. The cytokine or anti-cytokine therapy has already become a part of therapeutic protocols in treatment of malignant and non-malignant diseases.
Key words: cytokines, interleukins, plasma concentration, blood donor, ELISA

Trans. Hemat. dnes, 12, 2006, No. 3, p. 167–173.

Úvod

Cytokiny, poprvé definované r. 1974 Cohenem a kol., jsou biologicky aktivní makromolekuly proteinové povahy. Jejich biologické funkce se rozvíjejí po vazbě na specifické receptory, přičemž jsou součástí dalších signálních drah. Cytokiny působí pleiotropně, jsou redundantní a působí již ve velmi nízkých koncentracích (ng/ml až pg/ml). Regulují také míru exprese kostimulačních a akcesorních molekul na povrchu buněk. Za pomoci cytokinové signální sítě je přenos informací v organismu regulován pozitivně i negativně (fyziologické regulace, indukční, efektorové a reparační mechanismy zánětu, ukončení imunitní reakce apod.). Současné definice pod pojem cytokiny zahrnují i další regulační proteiny, a to monokiny, interleukiny, interferony a růstové faktory, které mohou být potenciálně produkovány každou buňkou, přičemž budou zaručeny jejich pleiotropní účinky (1). Řada z níže diskutovaných cytokinů, růstových faktorů a molekul nemá zažitý český ekvivalent. České překlady názvů se často v literatuře značně liší (2, 3). Autoři tedy v textu uvádějí vždy anglickou zkratku molekuly a tam, kde je k dispozici český ekvivalent názvu (3), jej

Trans zlom 3 30.10.2006 9:44 Stránka 168
proLékaře.cz | 10.11.2026

používají. U molekul, které nemají zažitý český překlad, se autoři drží anglického originálu.

Cytokinové receptory jsou na povrchu buněk exprimovány inducibilně a po aktivaci se jejich exprese mnohonásobně zvyšuje. Není jednoduché cytokiny rozčlenit do ucelených skupin, protože některé molekuly je možné zařadit do více kategorií. Jedno ze současných členění je založeno na rozdělení cytokinů podle funkce, a to na cytokiny regulující krvetvorbu (SCF – „stem cell factor“, Flt-3-ligand, interleukin-3, CSF – faktory stimulující kolonie, erytropoetin, trombopoetin), interferony (IFNα, IFNβ, IFNγ), cytokiny regulující funkce B a T lymfocytárního systému (cytokiny subpopulace Th1: IL-2, IL-3, INF γ a TNF, cytokiny subpopulace Th2: IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13, cytokiny subpopulace Th3: IL-10 a transformující růstový faktor β – TGFβ), pluripotentní prozánětlivé cytokiny (IL-1 a IL-6), tumor nekrotizující faktory (TNF), chemokiny (IL-8/CXCL8, MIP-1α, β – makrofágový prozánětlivý protein-1α, β, MCP-1 – peptid chemoatrakční pro monocyty-1 a jiné) a růstové faktory (TGFβ, PDGFβ – růstový faktor odvozený od destiček, FGF – fibroblastový růstový faktor, VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor, KGF – růstový faktor pro keratinocyty apod.) (1, 3).

V hematoonkologii je aplikace některých cytokinů již standardní součástí terapie. Jsou využívány rekombinantní hematopoetické růstové faktory na mobilizaci kompartmentu $CD34^+$ buněk (označovaných pro klinické účely jako buňky kmenové) při transplantačních režimech (4), IFN α v terapii lymfomů, chronické myeloidní leukemie (5) i dalších myeloproliferací. V onkologii solidních nádorů má své místo TNF a IL-2 v léčbě karcinomu ledviny, v revmatologii anti-cytokinová terapie infliximabem (anti-TNF-α) (6, 7) a jiné.

Hladina cytokinů v tělních tekutinách či v supernatantech tkáňových kultur se stanovuje imunochemicky pomocí monoklonálních nebo polyklonálních protilátek (v modifikacích ELISA, FIA, luminiscenční imunoanalýzy, pomocí průtokové cytometrie), imunohistochemicky nebo na úrovni mRNA či pomocí bioanalýz. Při hledání práce, která by hodnotila normy fyziologických limitů koncentrací jednotlivých cytokinů a růstových faktorů, narážíme na nekomplexnost informací – v pracích popisujících posuny v cytokinovém profilu při neonkologických a onkologických diagnózách jsou analyzovány i vzorky kontrolní skupiny, ale ve většině případů není kontrolní skupina dostatečně zastoupena, upřednostňuje se sledování koncentrace cytokinů in vitro, nebo je práce zaměřena selektivně na určitý cytokin. Tato práce si dala za cíl získat reálný obraz fyziologických hodnot u cíleně vybrané a definované skupiny zdravé populace, dárců krve.

Materiál a metody

Dárci krve

Do analýzy bylo zahrnuto 30 zdravých dárců krve, z toho 15 žen a 15 mužů, kteří byli vybráni k odběru plné krve na Transfuzním oddělení a krevní bance Fakultní nemocnice Brno. Průměrný věk dárců byl 34 let (medián 30,5, muži: 32, ženy: 29 let). V zastoupení krevních skupin převažovala skupina 0 (n = 13), následovaly skupiny A (n = 5), A1 (n = 4), B (n = 4), A1B (n = 3) a AB (n = 1). Zastoupení krevních skupin v systému RhD odpovídalo prevalenci jednotlivých skupin v populaci. Před odběrem vzorku nesrážlivé krve byl podepsán informovaný souhlas.

Zpracování vzorků

Vzorky byly do laboratoře transportovány ve zkumavkách s EDTA v temperovaném boxu a byly zpracovány do 2 hodin od odběru. Po centrifugaci (10 minut, 250 g) byla plazma odsána, zamražena (-80 °C) a později použita k jednotlivým analýzám.

ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“)

Ke stanovení hladin jednotlivých solubilních cytokinových a kostimulačních molekul byly použity soupravy Instant ELISA (firmy Bender MedSystems GmbH, Rakousko). Mikrotitrační destička s adsorbovaným konjugátem myší monoklonální protilátky proti stanovovaným antigenům a nespecifické křenové peroxidázy obsahovala dublet sestupné řady sedmi standardů potřebných na sestrojení kalibrační křivky a blank. pH promývacího roztoku PBS s 1% Tween 20 bylo upraveno na 7,4. Jako substrát pro redoxní reakce sloužil roztok tetra-methyl benzidinu. Aktivita použitého enzymu byla zastavena 1 M kyselinou fosforečnou a absorbance změřena při vlnové délce 450 nm. Na vyhodnocení analýzy sloužil laboratorní software Kim32 (Schoeller Pharma, Praha).

Zpracování dat

Pro posouzení získaných údajů a jejich rozložení byla data vyhodnocena ve statistickém prostředí R-language a grafické výstupy zpracovány pomocí software Statistica for Windows v. 6.1.

Výsledky

Soubor výsledků byl rozdělen na dvě části, a to na hodnoty interleukinů v plazmě dárců a na hodnoty koncentrací TNF-α, TGFβ1, sIL-6R, sCD23 a sCD40L. Pro hodnoty koncentrace interleukinů platí, že většina změřených hodnot byla pod hranicí měřitelnosti použité laboratorní metody. Hodnota nula byla přiřazena koncentraci, která spadala pod detekční limit konkrétní analýzy.

Problém „nulových“ hodnot interleukinů (IL-2 až IL-13) znamená, že soubor není možné hodnotit klasickými statistickými testy, proto byl zvolen odlišný přístup. Ze 30 pozorování lze stanovit pravděpodobnost výskytu měřitelné hodnoty pro daný interleukin u zdravého jedince, a to včetně intervalu spolehlivosti. Měřitelných hodnot bylo v našem souboru velmi málo. Uvedená hodnota p v tabulce 1a určuje odhad pravděpodobnosti, s jakou se vyskytne měřitelná (tj. nenulová) hladina daného interleukinu u zdravých dárců krve, jakož i inter-

Trans zlom 3 30.10.2006 9:44 Stránka 169
proLékaře.cz | 10.11.2026

Tab. 1a. Odhad p výskytu sledovaného parametru v populaci a odhad procentuálního zastoupení dárců krve bez sledovaného parametru s intervalem spolehlivosti pro p na hladině $1 - \alpha = 0{,}95$.

Veličina	p	Konfidenční interval pro p (95%)	% populace bez znaku	Konfidenční interval pro % populace bez znaku (95%)	Detekční limit
IL-2	0,067	(0,056; 0,147)	93,3 %	(85,3 %; 94,4 %)	2,3 pg/ml
IL-4	0,100	(0,073; 0,204)	90 %	(79,6 %; 92,7 %)	0,66 pg/ml
IL-5	0,167	(0,11; 0,306)	83,3 %	(69,4 %; 89 %)	1,45 pg/ml
IL-6	0,067	(0,056; 0,147)	93,3 %	(85,3 %; 94,4 %)	0,92 pg/ml
IL-8	0,167	(0,11; 0,306)	83,3 %	(69,4 %; 89 %)	7,26 pg/ml
IL-10	0,033	(0,038; 0,084)	96,7 %	(91,6 %; 96,2 %)	0,66 pg/ml
IL-13	0,100	(0,073; 0,20)	90 %	(79,6 %; 92,7 %)	0,99 pg/ml

(IL = interleukin)

Tab. 1b. Zjištěné popisné statistiky pro další sledované veličiny.

Veličina	průměr	medián	max.	S.D.	% populace bez znaku	detekční limit
TNF-α [pg/ml]	20,73	0	73,50	*	52 %	1,65 pg/ml
TGFβ1 [ng/ml]	14,98	10,80	51,60	12,39	3,5 %	0,06 ng/ml
sCD23 [ng/ml]	28,90	27,60	74,00	15,22	7 %	3,30 ng/ml
sCD40L [ng/ml]	0,4286	0	3,5000	*	71 %	0,062 ng/ml
sIL-6R [ng/ml]	75,89	68,75	225,00	35,83	0 %	0,01 ng/ml

(TNF-α = tumor nekrotizující faktor α, TGFβ1 = transformující růstový faktor β1, sCD23 = solubilní antigen CD23, sCD40L = solubilní CD40 ligand, sIL-6R = solubilní receptor pro IL-6)

valy spolehlivosti pro tuto pravděpodobnost, konstruované na základě zjištěných dat dle (36).

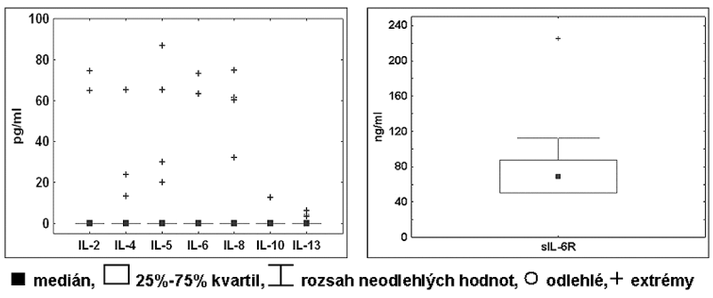
Možnosti případné závislosti mezi jednotlivými hodnotami cytokinů a pohlavím, krevní skupině a Rh faktorem byly testovány pomocí Fisherova exaktního testu v kontingenčních tabulkách. Takové závislosti se na základě změřených dat a jejich malému rozsahu neprokázaly.

V následujícím textu uvádíme popis hodnot, které se od většiny naměřených dat významně odlišovaly (odlehlé hodnoty a extrémy). Přehledný souhrn pravděpodobnosti p výskytu nenulové hodnoty sledovaného parametru včetně intervalů spolehlivosti a detekčních limitů je uveden v tabulce 1a. Například pro IL-2 byla vypočítána p = 0,067 s intervalem (0,056; 0,147), a tedy odhadem pro 93,3 % populace [interval (85,3; 94,4)] je tento znak právě nulový. Intervaly spolehlivosti byly konstruovány na hladině 5 procent významnosti.

U parametrů TNF-α, TGFβ1, sIL-6R, sCD23 a sCD40L je vzhledem k povaze detekovaných hodnot možné běžné popisné zobrazení a grafické znázornění dat včetně zobrazení odlehlých a extrémních hodnot. Obr. 1 ukazuje mediány hladin interleukinů a sIL-6R, jejich odlehlé hodnoty, resp. kvartily. Obr. 2 ukazuje mediány, kvartily a rozsah hodnot pro TNF-α, TGFβ1, sCD23 a sCD40L, údaje jsou zachyceny v Tab. 1b.

Interleukiny (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13)

Pouze u několika dárců byla naměřena nenulová hladina interleukinů v plazmě. Mediány se rovnaly nule. U IL-2 dva pozitivní dárci (muži) měli současně s detekovanou hladinu IL-5, sIL-6R, sCD23, CD40L, TGFβ1, resp. TNF-α. Většina hodnot byla pod detekčním limitem analýzy (DL) 2,3 pg/ml. Hladina IL-4 nad DL (0,66 pg/ml) byla u 2 mužů a 1 ženy. U mužů byly současně detekovány sIL-6R, sCD23, TGFβ1, u ženy i IL-13. Interleukin-5 nad DL 1,45 pg/ml byl naměřen u 2 mužů a 2 žen. Muži měli v plazmě současně nenulovou hladinu sCD40L, TGFβ1, sIL-6R, sCD23, jedna žena IL-10 a sIL-6R. Dva muži měli hladinu IL-6 nad DL 0,92 pg/ml, současně s pozitivní hodnotou sIL-6R, sCD23, TGFβ1, resp. IL-5, IL-8 a sCD40L. DL pro IL-8 byl 7,26 pg/ml. Nad tímto limitem se nacházeli 2 muži a 3 ženy. U všech byl detekován i sIL-6R, sCD23 a TGFβ1. Pro interleukin 10 byl DL na hranici 0,66 pg/ml a pozitivní 1 dárkyně (současně pozitivita IL-5 a sIL-6R). Hladina IL-13 nad DL 0,99 pg/ml byla zjištěna u 2 mužů a 1 ženy – všichni současně měli detekované i sIL-6R, sCD23 a TGFβ1.



Obr. 1. Grafy znázorňující rozsah naměřených koncentrací ve vztahu k hodnotě mediánu u interleukinů 2, 4, 5, 6, 8, 10, 13 a solubilního receptoru pro IL-6 (sIL-6R). Nebyla zjištěna korelace mezi naměřenými extrémními hodnotami. Hodnota plazmového sIL-6R se výrazně odlišila od většiny dat jen u jednoho dárce.

Trans zlom 3 30.10.2006 9:44 Stránka 170
proLékaře.cz | 10.11.2026

Tumor nekrotizující faktor-α (TNF-α)

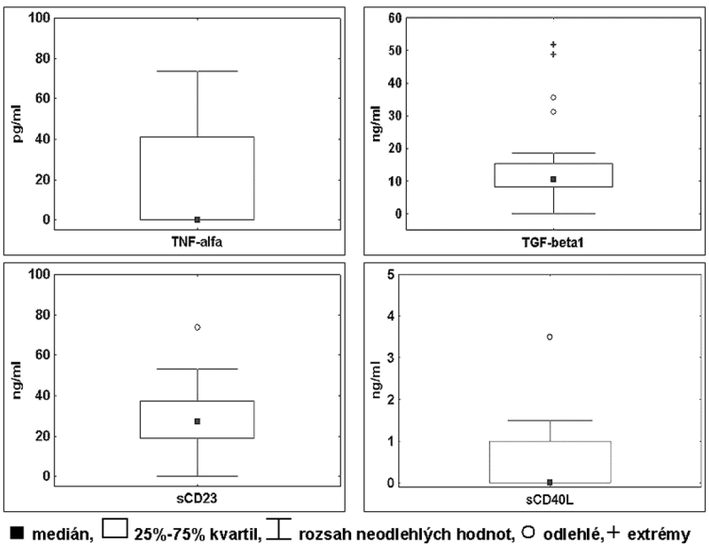
Medián hladin TNF-α byl stejný jako u interleukinů (0), DL 1,65 pg/ml. U tumor nekrotizujícího faktoru alfa byl rozdíl v mediánu u mužů a žen (0 vs. 26,2 pg/ml).

Transformující růstový faktor β1 (TGFβ1)

Průměr hodnot koncentrací TGFβ1 byl 14,98, směrodatná odchylka (S.D.) 12,39, medián 10,8 ng/ml. Medián mužů a žen se mírně lišil. DL analýzy byl 0,06 ng/ml.

Solubilní kostimulační molekuly CD23 a CD40L (sCD23, sCD40L)

Pro sCD23 (DL 3,3 ng/ml) byl průměr hodnot 28,9, S.D. 15,22, medián 27,6 ng/ml a pro sCD40L s DL 0,062 ng/ml byl medián hodnot rovný nule. Detekované hodnoty u několika mužů a žen byly přítomny současně s pozitivitou na sIL-6R, sCD23, TGFβ1, v několika případech současně s IL-2, IL-5, IL-6, IL-8 nebo TNF-α.



Obr. 2. Grafy znázorňující naměřené plazmové koncentrace solubilního CD23 antigenu, CD40 ligandu, tumor nekrotizujícího faktoru α a transformujícího růstového faktoru β1. Odlehlé a extrémní hodnoty byly u jednotlivých parametrů detekovány u různých jednotlivců – výjimku tvoří extrémní hodnota sCD40L a současně TGFβ1 u jednoho dárce.

Solubilní receptor pro interleukin-6 (sIL-6R)

U sIL-6R (DL 0,01 ng/ml) byly hodnoty průměru 75,89, S.D. 35,83, medián 68,75 ng/ml. Rozsah hodnot je graficky znázorněný na obrázku 1.

Diskuse

Efekt cytokinů je převážně lokální. Jejich koncentrace v tělních tekutinách kolísá v určitém rozmezí pod vlivem exogenních i endogenních faktorů. Většina interleukinů, na rozdíl od jejich receptorů, není v tělních tekutinách zdravého jedince detekována. Koncentrace cytokinů v tělních tekutinách je závislá nejen na probíhajících patologických procesech, ale souvisí i s fyzickou a psychickou zátěží, věkem (případně pohlavím). Vzhledem k rozsahu a charakteru dat testování pomocí neparametrických testů nevedl k nalezení nějaké přímé (lineární) závislosti mezi testovanými veličinami.

Interleukin-2, produkován subpopulací Th1 lymfocytů, je příkladem cytokinu, který má i klinické uplatnění v onkologii (8–10). Měřitelná koncentrace IL-2 nebyla u většiny sledovaných vzorků zjištěna. Výjimku tvořily měřitelné hodnoty u dvou mužů (41 a 42 let). Zástupce antagonického T-lymfocytární subpopulace Th2, interleukin-4, byl již před 16 lety považován za nástroj kontroly produkce mediátorů zánětu (TNF-α, IL-1, prostaglandin E_2). Ovlivňuje také charakter reakce štěpu proti hostiteli (GvHD) (11). U dárců krve mělo detekovanou plazmatickou hladinu pouze 10 % z testovaného souboru. S funkcemi Th2 lymfocytů souvisí i interleukin-5, který je současně diferenciačním faktorem pro B-lymfocyty a stimulačním i diferenciačním faktorem pro eozinofily. Monoklonální protilátka mepolizumab je účinná proti nadprodukci IL-5 při léčbě hypereozinofilních syndromů a při atopických reakcích (12). Společně s IFN γ, TNF-α a IL-13 se jeví i jako významný prediktor rozvoje akutní GvHD po alogenní nepříbuzenské transplantaci kmenových buněk (13), naproti tomu u zdravých jedinců by neměl být detekován. Na základě našich výsledků můžeme předpokládat, že v zdravé populaci detekujeme určitou koncentraci v plazmě pouze u necelých 17 % osob. Interleukin-6 je pleiotropním cytokinem a dalším zástupcem Th2 subpopulace. Významně moduluje expresi ostatních cytokinů, ovlivňuje procesy nádorového růstu,

Tab. 2. Jiné charakteristiky testovaného souboru dárců krve, * = asymetrický tvar rozdělení.

Pohlaví	Hemoglobin (g/l) (av. ± S.D.)	Počet leukocytů ($x10^9$/l) (av. ± S.D.)	Tlak krve (mm Hg) (av. ± S.D.)	ALT (μkat/l) (av. ± S.D.)	Výška/hmotnost (m, kg) (av. ± S.D.)
muži	150,07 ± 9,13	5,47 ± 0,80	139 ± 14,70/ 81,07 ± 11,20	0,52 ± 0,41	1,76 ± 0,06/ 81,93 ± 11,65
ženy	132,0 ± 5,67	5,88 ± 1,34	122 ± 13,38/ 76,77 ± 7,62	0,28 ± 0,09	1,67 ± 0,06/ 67,0 ± 11,52

(av. ± S.D. = průměr ± směrodatná odchylka, ALT = alaninaminotransferáza)

Trans zlom 3 30.10.2006 9:44 Stránka 171
proLékaře.cz | 10.11.2026

sehrává klíčovou roli při vyplavování prozánětlivých mediátorů. Thomas a kol. stanovili koncentraci IL-6 v séru deseti zdravých kontrol 6 pg/ml, přičemž nebyla zjištěna korelace mezi detekovanou hladinou a věkem nebo pohlavím (14). Yamamura a kol. dokázali zvýšenou produkci interleukinu-6 u pacientů s T-lymfatickou leukemií nebo T-lymfomem (15). Velmi nízké koncentrace jsme citlivější metodou (detekce od 0,92 pg/ml) naměřili u 47 % zdravých kontrol. Wierzbowska a kol. uvádí při ještě vyšší citlivosti metody rozmezí hodnot v séru 24 zdravých kontrol 0,5–16,6 pg/ml (medián 5,35 pg/ml) (16). Porovnáním hodnot sérových koncentrací kontrol se skupinou pacientů s mnohočetným myelomem autoři dospěli k hypotéze, že hladiny sérového IL-6 a sIL-6R mohou být markery aktivity tohoto onemocnění (17). Gause a kol. při použití analýzy s poměrně vysokým limitem detekce (10 pg/ml) změřili sérové koncentrace IL-6 pouze u 10 % testovaných zdravých dárců (18), v jiných pracích nebyl v séru zdravých kontrol vůbec detekován (19). V naší skupině byla celkově při citlivosti metody 0,92 pg/ml měřitelná koncentrace IL-6 u 6,7 % dárců krve.

Chemotaktický faktor pro neutrofily, chemokin interleukin-8 (CXC ligand 8) je produkován B-lymfocyty, fibroblasty i některými buněčnými liniemi nádorů (20). Watanabe a kol. publikovali výsledky vztahu mobilizace krvetvorných buněk a endogenní produkcí IL-8, MIP-1α, TNF-α a IFN γ u 20 dárců periferních kmenových buněk. Jedině IL-8 koreloval také s nárůstem množství $CD34^+$ buněk a CFU-GM („colony forming unit for granulocyte–macrophage") (21). U jiné kontrolní skupiny byla změřena koncentrace IL-8 v séru v rozmezí 0–60 pg/ml (průměr ± S.D.: 3 ± 14 pg/ml) (21). Produkci tohoto chemokinu u fyzicky zdravých jedinců jsme zjistili v plazmě jen necelých 17 % osob.

Zvláštní postavení mezi interleukiny má interleukin-10, který kromě jiných významných funkcí inhibuje proliferaci Th1 subpopulace, sekreci příslušných cytokinů, jako i expresi cytokinů aktivovaných makrofágů na transkripční úrovni. IL-10 může být současně růstovým faktorem pro maligní buňky (23). V sérech zdravých kontrol byl interleukin-10 při citlivosti metody 0,5 pg/ml nedetekovatelný, naopak tomu bylo u všech nemocných s chronickou B-lymfocytární leukemií (B-CLL) (24). U třech zdravých kontrol stejně jako u našeho souboru nebyl detekován; výjimkou je detekovaný plazmatický IL-10 u 20leté ženy. Aktivované T-lymfocyty jsou schopny produkovat interleukin-13, který je v části své struktury podobný IL-4. Svým multifunkčním působením zasahuje do indukce exprese CD23 na B-lymfocytech, proliferace B-buněk a stimuluje sekreci IgE a IgG_4. Terapeuticky by se mohl uplatnit v léčbě B-CLL či Hodgkinovy nemoci, kde působí jako modulátor apoptózy, nádorového růstu a imunitního dohledu (24). Další možné využití je u alogenních transplantací, kde byla hladina IL-13 u dárců štěpu nejvýznamnějším prediktorem rozvoje akutní GvHD u příjemce transplantátu (13). Za fyziologických podmínek se tento interleukin vyskytuje v měřitelné koncentraci s přibližně 10% pravděpodobností.

Jeden z tumor nekrotizujících faktorů, TNF-α (kachektin), byl poprvé sledován O'Malleym a kol. v r. 1962. Necelých 30 let poté byl popsán jeho význam u B-CLL a „hairy-cell" leukemie (HCL). Potvrdilo se, že mononukleární buňky z periferní krve zdravých jedinců produkují desetkrát větší množství TNF-α než buňky pacientů s CLL (26). Koike a kol. prokázali u pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) a aplastickou anémií vzestup hladiny cytokinů IL-6, IL-1β a TNF-α, spojený zejména s hypocelularitou kostní dřeně (27). Fuhrmann-Benzakein a kol. při sledování koncentrací angiogenních cytokinů u pacientů se solidními tumory naměřili u zdravých kontrol hodnoty do 13 pg/ml (28). Naše kontroly měly medián hodnot TNF-α rovný nule s detekovaným maximem přibližně pětkrát vyšším než v citované publikaci. Jedním z cytokinů, jehož rozpětí měřitelných koncentrací v plazmě bylo možné hodnotit jinak než skupinu interleukinů, byl transformující růstový faktor β1. TGFβ1 se mimo jiné uplatňuje jako pozitivní regulátor angiogeneze. Pro posuzování změny cytokinové hladiny sloužily jako referenční hodnoty plazmatických koncentrací angiogenních cytokinů (bazického FGF, HGF – „hepatocyte growth factor", VEGF, TGFβ a TNF-α) 40 zdravých dobrovolníků. Medián hodnot pro TGFβ se rovnal 16 ng/ml (z rozsahu hodnot 3–40 ng/ml) (28). Medián koncentrací TGFβ1 naší skupiny dárců byl nižší (10,8 ng/ml).

Kostimulační molekula sCD23 (solubilní CD23 antigen), růstový faktor B-lymfocytů a nízkoafinitní Fc receptor pro IgE, se uplatňuje u nehematologických onemocnění (diabetes mellitus, neplodnost, astma), a zároveň jako predikční faktor u HCL a B-CLL (29, 30). U dárců krve je jeho koncentraci v tělních tekutinách možné detekovat od ng/ml. Solubilní CD40 ligand (sCD40L) je kostimulační molekula uplatňující se v regulaci růstu a přežívání B-lymfocytů závislém na T-buňkách (31). U pacientů s B-lymfomy, jako i u jiných malignit odvozených od B-lymfocytů, byla prokázána jeho zvýšená hladina. Detekované sérové koncentrace měly i zdravé kontroly. sCD40L indukuje zvýšenou produkci IL-6 a GM-CSF $CD40^+$ blasty AML (32). U dárců krve nebyla prokázána souvislost mezi hladinou IL-6 a sCD40L.

Solubilní interleukin-6 receptor (sIL-6R) potencuje efekt IL-6 a uplatňuje se v regulaci protinádorové aktivity a proliferaci hematopoetických kmenových buněk (33). U pacientů, kteří se po transplantaci kostní dřeně podrobili imunoterapii IL-2/IFNα (Roferon-A) nebo jim byly aplikovány dárcovské lymfocyty, byla koncentrace sIL-6R po dobu imunoterapie zvýšená, po ní následoval pokles na normální hodnoty 20 ± 3 ng/ml (34). Podle dostupných dat může v séru zdravých jedinců koncentrace sIL-6R dosahovat hodnot od 65 až nad 200 ng/ml. Medián našich hodnot u dárců krve byl podobný průměru (68,75 vs. 75,89 ng/ml).

Imunopotenciační a imunoregulační účinky cytokinů jsou předmětem současného výzkumu. Hledají se sou-

Trans zlom 3 30.10.2006 9:44 Stránka 172
proLékaře.cz | 10.11.2026

vislosti mezi hladinami cytokinů a průběhem onkologických a neonkologických onemocnění, jako i jejich terapeutické uplatnění (např. vliv TNF-α, IL-15 nebo IL-18 na přihojení štěpu po alogeních transplantacích kostní dřeně nebo PBSC, hladina IFN γ u pacientů s chronickou myeloidní leukemií při léčbě imatinib mesylátem, ale i závislost koncentrace některých cytokinů na úspěšnost metod asistované reprodukce). Současné terapeutické možnosti kombinují více přístupů – bioterapii, celulární terapii, monoklonální protilátky, vakcíny, atd. Potenciální využití mají imunotoxiny vázané na monoklonální protilátky směrované proti cytokinům a jejich receptorům v léčbě lymfomů, myelomu, leukemií, některých solidních nádorů a komplikací po transplantacích (35). Získaná primární data mohou rovněž vstupovat do společných analýz srovnáním kontrolní a patologické skupiny.

Poděkování

Tato práce byla podpořena grantem Interní grantové agentury ministerstva zdravotnictví České republiky NR8003-3/2004.

Literatura

1. **Thomson AW, Lotze MT (editors).** The cytokine handbook. 4. vyd. London, Academic Press 2003; 1396.
2. **Klener P, et al.** Cytokiny ve vnitřním lékařství. 1. vyd. Praha, Grada Publishing s.r.o. 1997; 264.
3. **Krejsek J, Kopecký O.** Klinická imunologie. 1. vyd. Hradec Králové, Nucleus HK 2004; 968.
4. **Klabusay M, Suková V, Kořístek Z, Mayer J, Vorlíček J.** Analýza fenotypu a kinetiky subpopulací CD34+ buněk a lymfocytů dárců periferních hematopoetických kmenových buněk pro alogenní transplantace. Čas Lék Čes 2003; 142(7): 410–416.
5. **Klamová H, Vítek A, Michalová K, et al.** Interferon alfa – lék volby pro nemocné s chronickou myeloidní leukemií. Čas Lék Čes 1998; 137: 552–556.
6. **Bewtra M, Lichtenstein GR.** Infliximab use in Crohn's disease. Expert Opin Biol Ther 2005; 5(4): 589–599.
7. **Fojtík Z, Beránek M, Klabusay M, Kořístek Z, Buliková A.** Výskyt antifosfolipidových protilátek u nemocných se systémovým lupus erythematodes. Čes Revmatol 2003; 11(4): 174–180.
8. **Hájek R, Kořístek Z, Vinklárková J, Janovská E, Klabusay M, et al.** Aktivace autologního transplantátu hematopoetických kmenových buněk interleukinem-2. Čas Lék Čes 2001; 140(14): 430–435.
9. **Hájek R, Kořístek Z, Vinklárková J, Janovská E, Klabusay M, et al.** Interleukin-2 activation of haematopoietic stem cells. Acta Medica Austriaca 2002; 29(2): 61–67.
10. **Meloni G, Vignetti M, Pogliani E, Invernizzi R, Allione B, et al.** Interleukin-2 for the treatment of advanced acute myelogenous leukemia patients with limited disease: updated experience with 20 cases. Leuk Lymphoma 1996; 21(5–6): 429–435.
11. **Krenger W, Ferrara JLM.** Dysregulation of cytokines during graft-versus-host-disease. J Hematother 1996; 5: 3–14.
12. **Garret JK, Jameson SC, Thomson B, Collins MH, Wagoner LE, et al.** Anti-interleukin-5 (mepolizumab) therapy for hypereosinophilic syndromes. J Allergy Clin Immunol 2004; 113(1): 115–119.
13. **Jordan WJ, Brookes PA, Szydlo RM, Goldman JM, Lechler RI, Ritter MA.** IL-13 production by donor T cells is prognostic of acute graft versus host disease following unrelated donor stem cell transplantation. Blood 2004; 103(2): 717–724.
14. **Thomas X, Hirschauer C, Troncy J, Assouline D, Joly M, et al.** Serum interleukin-6 levels in adult acute myelogenous leukemia: relationship with disease characteristics and outcome. Leuk Lymphoma 1997; 24: 291–300.
15. **Yamamura M, Yamada Y, Momita S, Kamihira S, Tomonaga M.** Circulating interleukin-6 levels are elevated in adult T-cell leukaemia/lymphoma patients and correlate with adverse clinical features and survival. Br J Haematol 1998; 100: 129–134.
16. **Wierzbowska A, Urbańska-Rys H, Robak T.** Circulating IL-6-type cytokines and sIL-6R in patients with multiple myeloma. Br J Haematol 1999; 105: 412–419.
17. **Klabusay M, Doubek M, Adam Z, Hájek R, Křivanová A.** Detekce myelomových buněk v periferní krvi vícerozměrnou průtokovou cytometrií: monitorování zbytkové nemoci. Čas Lék Čes 2000; 139(14): 432–436.
18. **Gause A, Spickermann D, Klein S, Diehl V, Pfreundschuh M.** Elevation of circulating IL-6 in patients with acute non-lymphocytic leukemia. Eur J Haematol 1994; 53: 178–180.
19. **Herold M, Schmalzl F, Zwierzina H.** Increased serum interleukin 6 levels in patients with myelodysplastic syndromes. Leuk Res 1992; 16(6/7): 585–588.
20. **Srivastava MD, Srivastava R, Srivastava BIS.** Constitutive production of interlekuin-8 (IL-8) by normal and malignant human B-cells and other cell types. Leuk Res 1993; 12(17): 1063–1069.
21. **Watanabe T, Kawano Y, Kanamaru S, Onishi T, Kaneko S, et al.** Endogenous interleukin-8 (IL-8) surge in granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilization. Blood 1999; 93(4): 1157–1163.
22. **Vinante F, Rigo A, Tecchio C, Patuzzo C, Ricetti MM, et al.** Preferential release of high amounts of interleukin-8 by myeloid blasts showing monocytic differentiation. Haematologica 1996; 81: 195–200.
23. **Lu ZY, Zhang XG, Rodriguez C, Wijdenes J, Gu Z, et al.** Interleukin-10 is a proliferation factor but not a differentiation factor for human myeloma cells. Blood 1995; 85(9): 2521–2527.
24. **Kamper EF, Papaphilis AD, Angelopoulou MK, Kopeikina LT, Siakantaris MP, et al.** Serum levels of tetranectin, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 in B-chronic lymphocytic leukemia. Clin Biochem 1999; 32(8): 639–645.
25. **Wynn TA.** IL-13 effector functions. Annu Rev Immunol 2003; 21: 425–456.
26. **Foa R, Massaia M, Cardona S, Tos AG, Bianchi A, et al.** Production of tumor necrosis factor-alpha by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: a possible regulatory role of TNF in the progression of the disease. Blood 1990; 76(2): 393–400.
27. **Koike M, Ishiyama T, Tomoyasu S, Tsuruoka N.** Spontaneous cytokine overproduction by peripheral blood mononuclear cells from patients with myelodysplastic syndromes and aplastic anemia. Leuk Res 1995; 19(9): 639–644.
28. **Fuhrmann-Benzakein E, Ma MN, Rubbia-Brandt L, Mentha G, Ruefenacht D, et al.** Elevated levels of angiogenic cytokines in the plasma of cancer patients. Int J Cancer 2000; 85: 40–45.
29. **Sarmiento MA, Palacios MF, Scolnik MP, Ramirez FR, Stanganelli C, et al.** Evolution of chronic lymphocytic leukemia: predictive value of immunophenotype, soluble CD23 and morphology. Medicina (B Aires) 2002; 62(4): 305–312.
30. **Schwarzmeier JD, Shehata M, Hilgarth M, Marschitz I, Louda N, et al.** The role of soluble CD23 in distinguishing stable and progressive forms of B-chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma 2002; 43(3): 549–554.
31. **Clodi K, Asgary Z, Zhao S, Kliche K, Cabanillas F, et al.** Coexpression of CD40 and CD40 ligand in B-cell lymphoma cells. Br J Haematol 1998; 103(1): 270–275.
32. **Aldinucci D, Poletto D, Nanni P, Degan M, Rupolo M, Pinto A, Gattei V.** CD40L induces proliferation, self-renewal, rescue from apoptosis, and production of cytokines by CD40-expressing AML blasts. Exp Hematol 2002; 30(11): 1283–1292.

Trans zlom 3 30.10.2006 9:44 Stránka 173
proLékaře.cz | 10.11.2026

33. **Klabusay M, Dvořák P, Mayer J.** Kmenové buňky: nový příslib v medicíně. Vnitřní lékařství 2005; 51(2): 206–215.
34. **Toren A, Novick D, Ackerstein A, Or R, Slavin S, et al.** Soluble IL-6 receptors (sIL-6R) in hematological patients recieving immunotherapy with IL-2/IFN-α or donor lymphocytes following bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1996; 18: 721–724.
35. **Thrush GR, Lark LR, Clinchy BC, Vitetta ES.** Immunotoxins: an update. Annu Rev Immunol 1996; 14: 49–71.
36. **Likeš J, Machek J.** Matematická statistika. SNTL 1983; kap. 8, 77–78.

Mgr. Viera Kohútová
Laboratoř flow cytometrie a celulární terapie
Interní hematoonkologická klinika
Fakultní nemocnice Brno
Černopolní 9
625 00 Brno
e-mail: sunea@centrum.cz

Došlo do redakce: 23. 2. 2006
Přijato: 29. 5. 2006

Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
Charles Parker, Mitsuhiro Omine, et al. for the International PNH Interest Group
Blood, 1 December 2005, Volume 106, Number 12, p. 3699–3709

Mezinárodní zájmová skupina pro paroxyzmální noční hemoglobinurii (PNH) definuje toto onemocnění jako důsledek maligního klonálního růstu jednoho nebo několika druhů hematopoetických kmenových buněk, které získaly somatickou mutaci genu pro fosfatidylinositolglykan třídy A (PIGA). Progenitory postižených kmenových buněk mají defekt v expresi proteinů vázaných na glykosylfosfatidylinositol (GPI-APs). Deficience komplementárních regulačních proteinů vázaných na GPI (CD55 a CD59) je zodpovědná za intravaskulární hemolýzu, která je primární klinickou manifestací choroby. PNH často vzniká ve spojení s chorobami dřeňového selhání, zvláště s aplastickou anémií. Trombofilie je hlavní příčinou morbidity a mortality u PNH. Zatím se užívá pracovní klasifikace do 3 subkategorií: A – klasická PNH, B – PNH v rámci jiného specifikovaného onemocnění kostní dřeně, C – subklinická PNH (PNH-sc). Pokračující výzkum však vyžaduje modifikaci těchto 3 subkategorií. Minimální základní kritéria požadovaná pro diagnózu a kategorizaci zahrnují: A – průkaz populace buněk periferní krve (erytrocytů, granulocytů nebo raději obou), které mají deficienci v GPI-APs. Metodou průkazu částečného nebo úplného deficitu je průtoková cytometrie s užitím primárních protilátek proti GPI-APs nebo metoda FLAER (fluoresceinem značeným aerolysinem). Aerolysin je bakteriální protein, který se selektivně váže na GPI-APs. Možnosti obou metodických přístupů jsou blíže osvětleny. B – kompletní krevní obraz, počet retikulocytů, sérová koncentrace LDH, frakce bilirubinu a haptoglobin. C – aspirát kostní dřeně, biopsie a cytogenetika. Doporučeny jsou další podpůrné studie (podrobná anamnéza, průtoková cytometrie zaměřená na podíl erytrocytů a granulocytů deficientních v GPI-AP, vyšetření séra na železo, celkovou vazebnou kapacitu, koncentraci ferritinu, dále vyšetření séra na kreatinin a ureu, koncentraci erytropoetinu, hemosiderin v moči a HLA typizace). Práce demonstruje obrazově analýzu erytrocytů a granulocytů pomocí průtokové cytometrie pomocí specifických identifikačních postupů. Léčení anémie při PNH je komplexní, vyžaduje správné posouzení, jak mnoho je anémie důsledkem hemolýzy a nakolik je způsobena porušenou erytropoézou. Jednotlivé možnosti terapie a příslušné indikace jsou podrobně komentovány. Samostatná kapitola je věnována transplantaci kmenových buněk. Jsou uvedena data největší transplantované skupiny (220 pacientů) z registru Francouzské hematologické společnosti. Práce klade některé dosud otevřené otázky. Týkají se možnosti spontánních remisí, optimálního času pro transplantaci, užití kmenových buněk od nepříbuzného dárce, přípravného režimu a dalších možností, např. humanizované monoklonální protilátky proti komplementu C5 (eculizumab). Podrobně je probrána tromboembolická nemoc jak z hlediska profylaxe tromboembolických příhod tak jejich léčby, včetně disproporcionálně přicházejících míst trombózy. Ženy s PNH mohou mít závažnou morbiditu a zvýšenou mortalitu během těhotenství. PNH komplikující těhotenství přináší rizika jak pro matku, tak vyvíjející se plod. Samostatný odstavec je věnován pediatrické PNH, problematice dysfagie, mužské impotenci a abdominální kolikovité bolesti, zvláštnostem geografických a etnických rozdílů. Mezinárodní PNH skupina podporuje celosvětový registr pacientů s PNH a vytyčuje budoucí směry klinických a laboratorních studií.

Prof. MUDr. Otto Hrodek, DrSc.
FN Motol Praha