Citokini i njihov značaj u farmaceutskoj industriji

Pikec, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:554161

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Petra Pikec

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Citokini i njihov značaj u farmaceutskoj industriji

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2020.

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 5. srpnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 30. rujna 2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK
§ 1. UVOD 1
§ 2. CITOKINI 2
2.1. Podjela i nomenklatura citokina 3
2.2. Svojstva citokina 5
§ 3. CITOKINSKI RECEPTORI 7
3.1. Podjela citokinskih receptora 7
3.1.1. Kemokini i kemokinski receptori 7
3.1.2. Receptori tipa I i tipa II 10
3.1.3. Faktori nekroze tumora (TNF) i pripadajući receptori 12
3.1.4. Receptori smrti 13
3.2. Signalizacija 13
§ 4. CITOKINSKI INHIBITORI 16
4.1. Inhibitori sinteze citokina 16
4.2. Inhibitori citokina u aktivnoj formi 17
4.3. Inhibitori citokinskih receptora 18
4.4. Inhibitori citokin-ovisne signalizacije 18
§ 5. CITOKINI U FARMACEUTSKOJ INDUSTRIJI 20
5.1. Citokini i maligne bolesti 22
5.2. Citokini i HIV 24
§ 6. LITERATURNI IZVORI 26

§ Sažetak

Citokini su glikoproteini koji reguliraju funkciju imunološkog sustava, odnosno omogućuju receptorima i medijatorskim stanicama međusobnu komunikaciju. Oni upravljaju urođenim imunitetitom na način da induciraju lokalnu upalu i izazivaju sistematski odgovor. Citokini nakon sinteze mogu postati solubilni medijatori, ostati vezani na membrani ili se vratiti u jezgru i djelovati kao transkripcijski regulatori. Kako bi se aktivirali za obavljanje svoje biološke funkcije, citokini se vežu na odgovarajuće receptore. Podjela receptora na temelju njihove strukture i aktivnosti je sljedeća: receptori tipa I, receptori tipa II, kemokinski receptori, TGF-β receptori, TNF receptori te superobitelj imunoglobina. Inhibitori citokina su heterogenei spojevi koji mogu imati četiri različita utjecaja na citokine. Takve komponente mogu direktno inhibirati sintezu citokina, inhibirati citokin-ovisnu signalizaciju, inhibirati citokinske receptore ili inhibirati citokine u aktivnoj formi. Identificirano je na stotine ovih proteina pri čemu se neki od njih koriste u liječenju karcinoma te autoimunih i virusnih bolesti. Veliki broj citokina, njihovih receptora i inhibitora otvara mogućnosti za razvoj i otkriće novih biofarmaceutika. Citokini su, trenutno, u fokusu velikog broja istraživanja kao potencijalni lijekovi za bolesti poput tumora, HIV-a, Parkinsonove bolesti, Alzheimerove bolesti, reumatoidnog artritisa, renalnih bolesti i mnogih drugih kliničkih slika povezanih s upalom i imunološkim odgovorom.

§ 1. UVOD

Citokini su sekrecijski proteini male molekulske mase koje izlučuju stanice imunološkog sustava, a primarna uloga im je posredništvo i regulacija između ostalih elemenata imunološkog sistema. Osim toga, sudjeluju u obrani sustava domaćina od mikroorganizama izazivanjem zaštitne lokalne upale koja može imati sistematski utjecaj na akutnoj razini.[1] Citokini, općenito, uz hormone i neurotransmitere imaju važnu ulogu u regulaciji kao unutarstanični glasnici nakon što se vežu na ciljani receptor stanice.

Autokrini citokini djeluju na stanice koje ih luče, parakrini citokini utječu na stanice koje se nalaze u njihovoj blizini, a endokrini citokini djeluju na udaljene stanice. Citokini uključuju interferone, interleukine, kemokine, limfokine, faktore rasta, a proizvode ih različite stanice poput makrofaga ili T-limfocita.[2] Njihova aktivnost ovisi o koncentraciji u okolišu te jačini ekspresije površinskih receptora na ciljanoj stanici, a *in vivo* citokini vrlo rijetko djeluju samostalno, a postoji nekoliko citokina čija se biološka funkcija preklapa. Citokini se mogu definirati i kao peptidni ili glikoproteinski medijatori čija je uloga prenošenje unutarstaničnih signala. Mogu djelovati lokalno, kao autokrini ili parakrini prijenosnici signala, ali mogu djelovati i na razini cijelog organizma. Trenutno je identificirano i poznato oko 200 citokina.

Općenito, upala u tijelu je kontrolirana s velikim brojem izvanstaničnih regulatora i medijatora, uključujući citokine, faktore rasta, eikosanoide te peptide. Otkriće ovih medijatora u posljednjih nekoliko godina uvelike je pridonjelo opisu kompleksnih upalnih procesa te ispitivanju mnogih bolesti poput srčanih bolesti, Alzheimerove bolesti, dijabetesa tipa I i tipa II te pretilosti kao poremećaju.[3] Osim toga, citokini i njihovi receptori postali su vrlo važno područje u medicini za dijagnostička istraživanja te terapeutskim istraživanjem lijekova u humanim bolestima. Pri tome se istražuju područja povezana s upalom, imunologijom, aterosklerozom i tumorima.[4]

§ 2. CITOKINI

Citokini su sekrecijski glikoproteini imunološkog sustava. Najčešće ih proizvode makrofagi i limfociti. Poznato je više od 200 citokina, a obuhvaćaju interleukine, kemokine, faktore nekroze tumora (TNF), interferone, faktore rasta tumora (TGF) i faktore stimulacije kolonija.

Citokini postaju aktivni tek nakon što se vežu na specifični receptor koji se nalazi ili na membrani određene stanice ili u samoj stanici pri čemu nastaje niz unutarstaničnih signala koji rezultiraju imunološkim odgovorom ili aktivacijom različitih gena. Ekspresiju citokina mogu potaknuti mnogobrojni stanični faktori poput samog kontakta stanica-stanica, neki kompleksi antitijela, mikrobi i njihovi nusprodukti, reaktivne kisikove i dušikove vrste, UV svjetlo, komponente izvanstaničnog matriksa, DNA sisavaca ili mikroba.[2] Citokini nakon aktivacije reguliraju poliferaciju i diferencijaciju stanica te kontroliraju imunološki sustav. Osim toga, mogu inducirati i stvaranje drugih citokina uzrokujući kaskade signala, ekspresiju receptora za druge citokine te reagirati sinergistički ili antagonistički s ostalim citokinima. Svaki od citokina ima različitu biološku ulogu, odnosno prenose različite signale te imaju visoke afinitite za specifične receptore na koje se vežu, ali u nekim slučajevima dolazi do preklapanja njihovih funkcija i svojstava. Poneki receptor može vezati različite citokine, a oni aktivirati različite stanice što dovodi do stvaranja funkcionalne mreže citokina u organizmu. Mogu djelovati na lokalnoj razini (kao autokrini ili parakrini glasnik) i na endokrinoj razini, kao hormoni.[4,5]

Citokini, kao dio obrambenog mehanizma, mogu uzrokovati bolesti ili braniti organizam od oboljenja što omogućuje široki spektar istraživanja citokina kao terapeutika upalnih bolesti pri čemu se dijele na proinflamatorne i antiinflamatorne citokine. Proinflamatorni citokini promoviraju inflamaciju u borbi protiv patogena, dok antiinflamatorni citokini reguliraju proinflamatorni citokinski odgovor.

2.1. Podjela i nomenklatura citokina

Citokini su prvobitno bili imenovani prema stanicama koje ih proizvode. Monociti su citokini koje proizvode mononuklearni fagociti (monociti i makrofagi), a limfokine proizvode limfociti. No, prema kasnijim istraživanjima uočeno je da citokine mogu proizvoditi različiti tipovi stanica pa je usvojena podjela citokina prema funkciji i stanici koje ih proizvode na interleukine, kemokine i limfokine. Kemokini su dobili ime prema sposobnosti izazivanja kemotaksije, odnosno sposobnosti pobude i usmjeravanja gibanja stanica prema kemijskim tvarima u tkivu. Interleukini su imenovani na temelju toga što djeluju na leukocite i proizvode ih leukociti. IL-1 označavao je produkte monocita, a IL-2 produkte limfocita.[5] No, pokazalo se da interleukini ne djeluju samo na leukocite, a termin interleukina ostao je u upotrebi te označava grupu bioloških medijatora odgovornih za međusobno komuniciranje leukocita te je do sada poznato 38 interleukina.

Prema biološkoj funkciji, osim interleukina, limfokina i kemokina, u citokine se ubrajaju još i interferoni (IFN), faktori nekroze tumora (TNF), faktori rasta (TGF) i faktori stimulacije kolonija (CSF) koji se imenuju prema opisnim, navedenim skraćenicama.

Prema biološkim svojstvima i funkciji, citokini se mogu podijeliti u još tri grupe (tablica 1.) kao citokini stečenog imuniteta, proinflamatorni citokini i antiinflamatorni citokini.[3]

Tablica 1. Podjela citokina prema regulaciji imunološkog odgovora.[3]

	OBITELJ CITOKINA	ČLANOVI
STEČENI IMUNITET	Receptori liganada γ-lanca	IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21
	Receptori liganada β-lanca (CD131)	IL-3, IL-5, GM-CSF
	Dijeleni IL-2β lanac (CD122)	IL-2, IL-15
	Dijeljeni receptori	IL-13 (IL-13R–IL-4R compleks)
PROINFLAMATORNO DJELOVANJE	IL-1	IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-18, IL-33, IL-36α, IL-36β, IL-36γ, IL-36Ra, IL-37 and IL-1Hy2
	IL-6	IL-6, IL-11, IL-31, CNTF, CT-1, LIF, OPN, OSM
	TNFα	TNFα, TNFβ, BAFF, APRIL
	IL-17	IL-17A-F, IL-25 (IL-17E)
	Tip I IFN	IFNα, IFNβ, IFNω, IFNκ, Limitin
	Tip II IFN	IFNγ
	Tip III IFN	IFNλ1 (IL-29), IFNλ2 (IL-28A), IFNλ3 (IL-28B)
ANTIINFLAMATORNO DJELOVANJE	IL-12	IL-12, IL-23, IL-27, IL-35
	IL-10	IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, IL-29

2.2. Svojstva citokina

Citokini se mogu definirati kao glikoproteinski medijatori male molekulske mase koja varira između 6 i 7 kDa. Nativna struktura citokina vrlo je važna za vezanje na odgovarajući receptor, a neka od tih svojstava pojedinih citokina prikazana su u tablici 2.[9]

Tablica 2. Proteinske karakteristike citokina.[9]

Citokin	Broj aminokiselina	Molekulska masa (kDa)	Broj disulfidnih mostova	Izoelektrična točka
IFN-α	165-166	17.5-22.0	2	6
IFN-α2	165	19-21	2	6
IFN-β	166	23	1	9
IFN-γ	143(×2)	30-50	0	10
IL-2	133	15-18	1	7
IL-11	178	19	0	11
G-CSF	174	20	2	6

Interferoni se pojavljuju u tri oblika kao interferoni tipa I, tipa II i tipa III. Imaju antivirusnu ulogu u organizmu jer inhibiraju replikaciju virusa unutar stanice te potiču apoptozu. Osim toga, inhibiraju proliferaciju hematopoetskih (krvotvornih) stanica i reguliraju stanične funkcije poput fagocitoze. Oznaka grčkog slova uz kraticu IFN se odnosi na vrstu stanica koje ih proizvode. Leukociti proizvode IFN-α, IFN-β potječu iz fibroblasta, a limfociti proizvode IFN-γ. Sinteza IFN-α i IFN-β može biti posljedica virusne infekcije stanice čime se sprječava zaraza stanice nekim drugim virusom, a drugi način sinteze interferona (IFN-β i IFN-γ) je iz limfocita stimulacijom odgovarajućim antigenima.[5]

IFN-α je interferon tipa I i bio je prvi rekombinantni citokin čija upotreba je dopuštena u terapijske svrhe. Ima antivirusno, antiproliferativno i imunoregulacijsko djelovanje, a postoji 12 gena koji mogu kodirati za IFN-α.[10] Terapija ovim citokinima, u kombinaciji s ostalim lijekovima, se najčešće koristi za liječenje hepatitisa B i C.

IFN-β je također interferon tipa I i ima ulogu borbe protiv virusa te antiproliferativno i imunoregulacijsko djelovanje. Primjenjuje se u terapijske svrhe za ublažavanje simptoma multiple skleroze. IFN-β usporava razvoj bolesti ukoliko se terapija započne vrlo rano te se kontinuirano koristi. Smatra se da smanjuje upalu neurona i pospješuje sintezu faktora rasta živčanih stanica.[5,9]

IFN-γ je jedini humani interferon tipa III. Proizvode ga aktivirani T-limfociti, monociti i makrofagi. Ima vrlo važnu ulogu u aktivaciji i regulaciji fagocitne funkcije mononuklearnih stanica te regulira stvaranje ostalih citokina kao što su IL-12 i TNF-α. U terapijske svrhe se koristi za liječenje kronične granulomatozne bolesti i osteoporoze.[2]

Interleukin-2 (IL-2) je citokin koji ima vrlo važnu ulogu u regulaciji cijelog imunološkog sustava, a sintetiziraju ga T-limfociti, u najvećim količinama aktivirane CD4+ i CD8+ stanice. Stimulira profileraciju i diferencijaciju T-stanica te proizvodnju antitijela limfocita B. Rekombinantni IL-2 se koristi u terapiji virusa HIV-a jer značajno podiže vrijednosti T4 limfocita te u terapiji malignih bolesti.[2,10]

Interleukin-11 (IL-11) je još poznat kao AGIF (eng. *adipogenesis inhibitory factor*, *AGIS*). IL-11 regulira proizvodnju trombocita, adipogenezu, osteoklastogenezu i neurogenezu. Rekombinantni IL-11 se na tržištu nalazi u obliku proteina oprelvekina koji sprječava pojavu trombocitopenije i smanjuje potrebu za transfuzijom trombocita kod pacijenata oboljelih od raka i nakon kemoterapije.[9]

G-CSF (eng. *granulocyte colony-stimulating factor*) je vrlo važan citokin koji potiče koštanu srž na proizvodnju granulocita i njihovo otpuštanje u krvotok te stimulira proliferaciju i diferencijaciju neutrofila. Najčešće se koristi kako bi se smanjila vjerojatnost oboljenja od leukopenije i neutrofilije kao posljedice kemoterapije. Takav redukcijski utjecaj omogućuje primjenu kemoterapije većeg inteziteta.[9]

§ 3. CITOKINSKI RECEPTORI

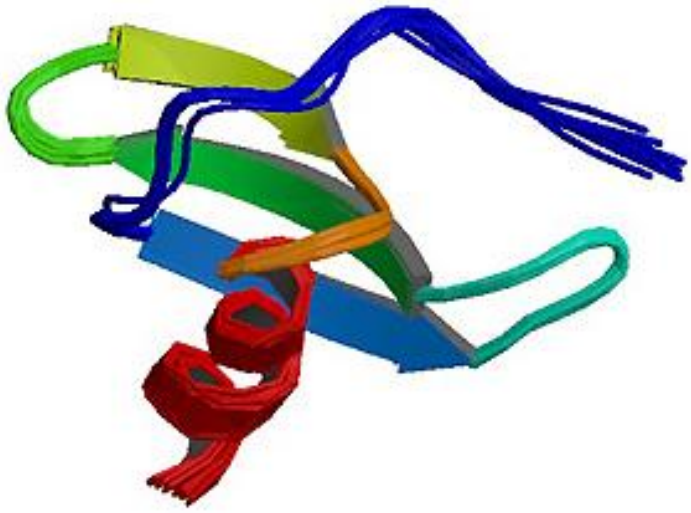
Receptori su stanični proteini čija uloga je vezanje liganda pri čemu organizam daje odgovarajući odgovor. Ligand je molekula koja se veže na receptor, a u ulozi takvog liganda može biti peptid, hormon, neurotransmiter, virus, bakterija ili toksin. Kada se citokin veže na odgovarajući receptor, dolazi do aktivacije ili inhibicije biološkog puta za koji određeni citokin signalizira. Većina citokina djeluje vezanjem na specifični receptor što potiče kaskadu unutarstaničnih signala koja utječe na ekspresiju gena potaknutih transkripcijskim faktorima. Citokinski receptori mogu biti i topljivi i vezani na membranu, pri čemu su topljivi citokinski receptori važni za regulaciju citokinske funkcije i aktivnosti.

3.1. Podjela citokinskih receptora

Receptori i njihovi odgovarajući citokini mogu se podijeliti na nekoliko obitelji na temelju njihove 3D strukture i aktivnosti: receptori tipa I, receptori tipa II, kemokinski receptori, TGF-β receptori, TNF receptori, superobitelj imunoglobina.[1]

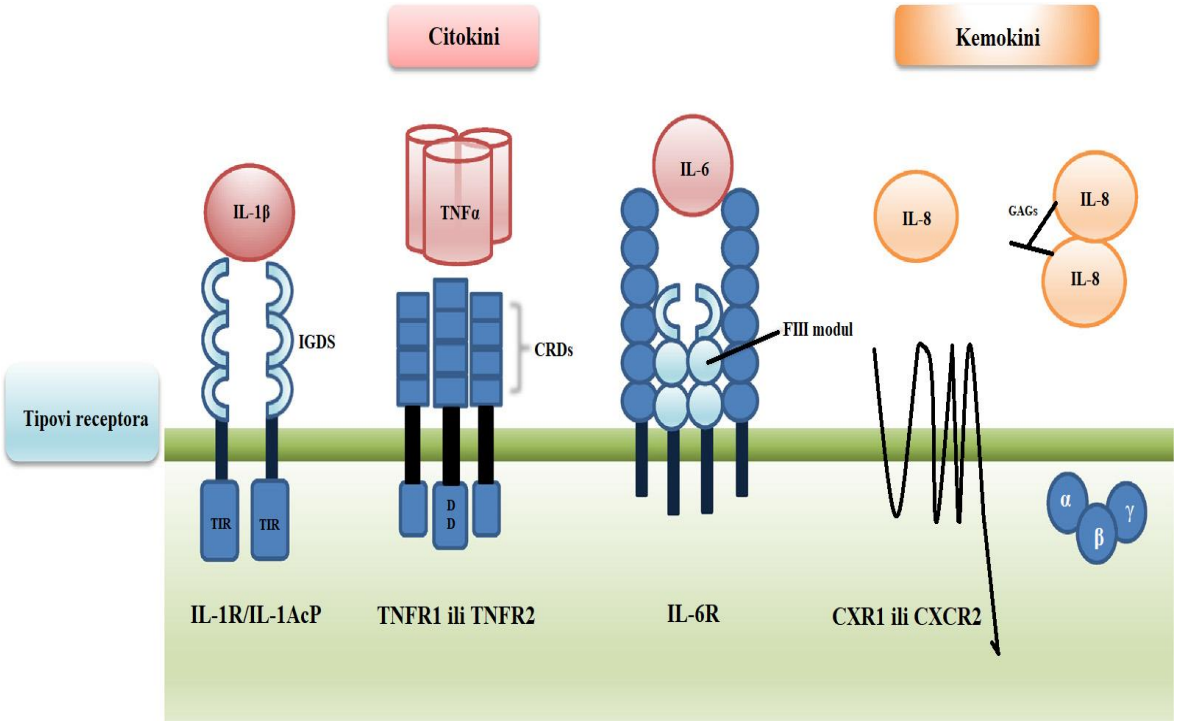
3.1.1. Kemokini i kemokinski receptori

Kemokini su grupa malih proteina, veličine 8 – 10 kDa te je do sada poznato 44 kemokina i 23 kemokinska receptora. Pripadaju grupi heptahelikalnih transmembranskih G-proteina. Za kemokine je karakteristično da imaju tri ili četiri očuvana cisteinska ostatka te se mogu podijeliti na četiri različite obitelji ovisno o položaju cisteinskog ostatka. Obitelj CXC (slika 1) ima prva dva cisteina odvojena nekom aminokiselinom, CC obitelj ima cisteinske ostatke koji su jedan pored drugog, C obitelj sadrži samo jedan cistein. Posljednja grupa kemokina, CX3C, sadrži dva slobodna N-kraja cisteina koji su odijeljeni s tri aminokiseline. U ljudskom organizmu postoji samo jedan takav kemokin, CX3L1.[2]



Slika 1. Motiv zavojnice sa sedam transmembranskih područja. Primjer vezanja receptora CXCR3 na pripadajući kemokin IP-10 / CXCL10.
(Preuzeto: https://www.sinobiological.com/resource/cytokines/cytokine-receptor)

Postoji 10 β-kemokina (CCR) i 7 α-kemokina (CXCL). Kemokinski receptori pretvaraju kemokinske signale pomoću G-proteina i sadrže sedam transembranskih domena u okviru membrane leukocita.[2] Za kemokinske receptore svojstvena je heterogenost ekspresije gena u stanici, odnosno mogućnost stvaranja više kompleksa kao npr. CXCR4 i CCR5 mogu stvarati hetorodimere nakon stimulacije pripadajućim ligandima. G-protein s karboksilnim krajem receptora inducira konformacijsku promjenu te dolazi do signalizacije posredovane G-proteinima (slika 2).[3] Unutarstanični C-kraj receptora sadrži ostatke aminokiseline serina i treonina važne za receptorsku regulaciju koje vežu G-proteine i time aktiviraju unutarstanični signalni put, a aminokiselina na N-kraju proteina određuje specifičnost vezanja liganda. Svi kemokinski receptori imaju sličnu strukturu. Sadrže oko 350 aminokiselina, imaju sedam transmembranskih domena s tri izvanstanične i tri unutarstanične hidrofilne petlje. Prve dvije unutarstanične petlje imaju dva cisteinska ostatka pri čemu mogu stvarati disulfidni most između tih petlji.[2]



Slika 2. Primjer citokina, kemokina i njihovih receptora.[3]

Kemokinski receptori imaju važnu ulogu u bolestima poput raka dojke, pluća, prostate i melanoma. Potencijalno mogu uzrokovati širenje tumora jer sudjeluju u nekoliko ključnih koraka metastaziranja koji uključuju vezanje stanica tumora na endotel, angiogenezu i poliferaciju. Kemokini i njihovi receptori aktiviraju signalne puteve koji uključuju prijenos signala preko fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata. Kemokinski receptori sudjeluju i u infekciji tipa HIV-1. Pomoću CCR5 ili CXCR4, stanice HIV-1 vežu CD4+ pri čemu ulaze u stanicu domaćina.[2] Otpuštanje kemokina iz stanica također može uzrokovati destruktivnu invaziju stanice. To se događa u dijabetesu tipa I i tipa II gdje glukotoksičnost aktivira upalne NLRP3 β-stanice gušterače koja tada proizvodi i otpušta IL-1β citokine koji se vežu na IL-1βR što u konačnici vodi do prodiranja endogenih stanica u stanice gušterače. Zajedničko djelovanje endogenih stanica i otpuštanja kemokina rezultira staničnom smrću proizvedenih inzulinskih β-stanica.[3]

Tek je za nekoliko spojeva poznato da djeluju kao izravni inhibitori sinteze kemokina. Jedan od njih je bindarit. Bindarit selektivno inhibira sintezu kemokina MCP-1/CCL2, MCP-2/CCL8 i MCP-3/CCL7 iz monocita. U kombinaciji s inhibicijom TNF-α, bindarit ima protuupalno djelovanje u eksperimentima liječenja artritisa, upale gušterače, lupusa i ulceroznog kolitisa.

Osim toga, za male doze makrolidnih antibiotika (klaritromicia, azitromicina, eritromicina) se pretpostavlja da imaju supresivno djelovanje na kemokin IL-8/CXCL8 i MIP-1α, stoga se ti makrolidni antibiotici istražuju u svrhu liječenja astme, kolitisa i artritisa.[10,11]

3.1.2. Receptori tipa I i tipa II

Citokinski receptori tipa I i tipa II često se nazivaju i helikalni receptori jer uglavnom vežu helikalne citokine. Pojam helikalnih citokina uključuje 39 različitih proteina kojima je zajednička struktura – spiralna jezgra.

Receptori tipa I mogu vezati 27 humanih citokina, a šest od njih se trenutno smatra terapeutskim proteinskim lijekovima – eritropoetin, G-CSF, GM-CSF, HGH, IL-2 i IL-11, a citokini CNTF, IL-6 i LIF su u fazama kliničkog istraživanja. Od citokina tipa II proteini IFN-α, IFN-β i IFN-γ su poznati kao terapeutici, a IFN-ω, IL-10 i IL-24 su još u tijeku istraživanja.[12]

Tip I citokinskih receptora ima određene karakteristične strukturne motive u izvanstaničnoj domeni te nema proteinsku tirozin-kinaznu aktivnost. Izvanstanična domena receptora sadrži oko 200 aminokiselina od čega ima četiri cisteinska ostatka u području N-kraja proteina koji su odgovorni za očuvanje strukture i funkcije ovih receptora zbog stvaranja disulfidnih veza. Osim toga, u blizini transmembranske domene sadrži sekvencu Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS motiv) koja omogućuje specifičnost receptora na temelju interakcija između citokina i receptora. Ova grupa citokinskih receptora uključuje receptore za IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, GM-CSF, G-CSF, Epo, LIF, CNTF, TPO, prolaktin i faktore hormona rasta. Sadrže tri podtipa na temelju sposobnosti stvaranja kompleksa s nekom od tri receptorskih signalnih komponenti – gp130 te zajednički beta i gama lanci.[2]

Tip II citokinskih receptora su polimerni proteini koji su građeni od heterogenih podjedinica. Ovaj tip receptora uglavnom veže interferone, tj. IFN-α, IFN-β, IFN-ω, IL-10, IL-22 (slika 3). Izvanstanična domena receptora citokina tipa II strukturno je slična svojim odgovarajućim ligandima. Tako slični i očuvani motivi funkcioniraju kao vezna mjesta za Jak i STAT proteine.[12]

Slika 3. NMR prikaz vezanja interferona u izvanstaničnoj domeni na humani interferonski receptor. Prikazana sekvenca je vezana na Janus kinazu iz obitelji tirozin kinaza. (Preuzeto: https://www.sinobiological.com/resource/cytokines/cytokine-receptor)

Interferonski receptori tipa I sastoje se od dvije komponente, od IFNAR1 i IFNAR2. Od ostalih citokinskih receptora razlikuju se po broju liganada koje mogu vezati, od čega je 13 liganada iz obitelji interferona tipa I. Receptori IFN tipa I strukturno se razlikuju od receptora za interferone tipa II (IFNGR1 i IFNGR2) i interferone tipa III (IFNLR i IL10Rβ), ali svi geni za interferonske receptore nalaze se u ljudskom kromosomu 21q22.[2]

IFN-α, interferon tipa I, sadrži 166 aminokiselina i dva disulfidna mosta. Kao i kod ostalih interferona tipa I, put signalizacije IFN-α ide kanonski aktivacijom Janus kinaze i STAT puta čime dolazi do transkripcije gena za IFN-α.[8]

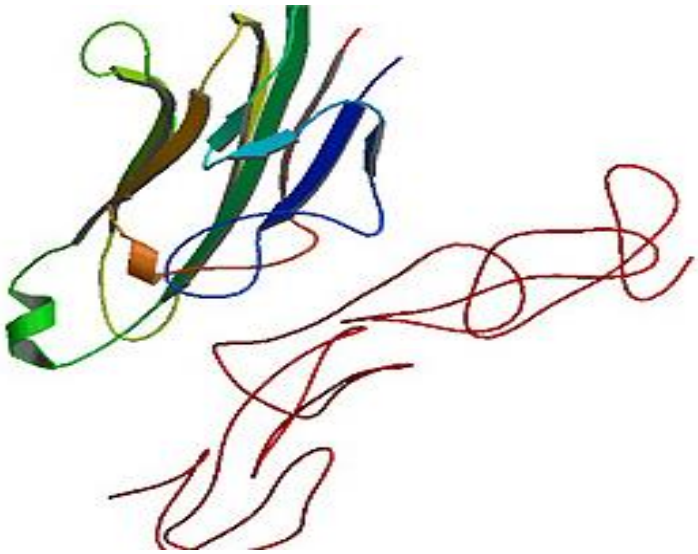
U ljudskom organizmu postoji samo jedan interferon tipa II, IFN-γ. On ima jedinstven receptor koji se strukturno razlikuje od ostalih interferona jer je biološki aktivna forma IFN-γ u obliku dimera koji sadrži dva identična polipeptidna lanca od 143 aminokiseline smotanog u 6 α-uzvojnica, a ukupna dimerna struktura je stabilizirana ispreplitanjem zavojnica što je neobično za globularne proteine.[8] Za stvaranje odgovora na ovaj interferon, potrebna je aktivacija kaskadnog puta signalizacije Jak-STAT.[2]

Tip III interferona opisan je tek 2003.godine kada je opisan IFN-λ. Postoje 3 gena koji kodiraju IFN-λ (IFN-λ1, IFN-λ2 i IFN -λ3), a ti proteini se još nazivaju i IL-29, IL-28A i IL-28B. Od IFN tipa I razlikuju se samo po tipu receptora na koje se vežu, a put signalizacije i ekspresija su im vrlo slične te imaju jednaku antivirusnu aktivnost.[8]

3.1.3. Faktori nekroze tumora (TNF) i pripadajući receptori

Različiti TNF citokini (eng. *tumor necrosis factor, TNF*) vežu se na različite TNF receptore (slika 6). TNF-α stimulira poliferaciju stanica, regulira citolitičku ili citostatičku aktivnost tumorskih stanica i ima upalnu, antivirusnu i imunoregulativnu ulogu. Sintetizirano je pet lijekova za terapiju reumatoidnog artritisa, psorijaze ili spondilitisa koji se temelje na anti-TNF-α derivatima, a najviše rezultata pokazuju kod bolesti zglobova.[1] TNF-α je član TNF superobitelji transmembranskih proteina tipa II koji imaju 30 citokinskih receptora i 19 pripadajućih liganada s različitim funkcijama. Primarno ih proizvode aktivni makrofagi, a mogu ih proizvoditi i T-stanice, monociti, mastociti, fibroblasti i neuroni. Sintetizira se kao transmembranski prekursor, mTNF-α, s molekulskom masom oko 25 kDa, koji se transportira putem grubog endoplazmatskog retikuluma, Golgijeva aparata i reciklirajućeg endosoma do stanične površine gdje dolazi do njegove ekspresije.[2,3,8]

Receptori za TNF (slika 4) uglavnom su u obliku trimera transmemranskih proteina tipa I i sadrže jednu do šest domena s cisteinom (CRD, eng. *cystein-rich domains*) u ekstracelularnom prostoru. Receptori su uključeni u razne biološke funkcije stanica poput selektivnog izumiranja stanice i signaliziranja za odgovarajuću imunološku reakciju. Od ukupno 27 receptora za TNF, dva su glavna receptora na membrani stanice, TNFR1 i TNFR2, a razlikuju se u intracelularnoj domeni, transdukciji signala i prema svojoj funkciji.[2]



Slika 4. Struktura kompleksa humanog TNFR i TNF-β uz cisteinski bogatu izvanstaničnu domenu TNFR.

(Preuzeto: https://www.sinobiological.com/resource/cytokines/cytokine-receptor)

3.1.4. Receptori smrti

Apoptoza je specifično reguliran mehanizam stanične smrti čime se organizam rješava oštećenih ili zaraženih stanica. Receptori smrti su površinski receptori koji prenose apoptotske signale inicirane određenim ligandima. Put signala smrti stanice je zapravo odgovor na izvanstanične signale posredovan vezanjem citokina, najčešće TNF-α, na receptore smrti na površini stanice te je do sad poznato osam članova obitelji receptora smrti koji su zapravo podtipovi receptora TNF, a to su: TNFR1 (ili DR1, CD120a, p55 i p60), CD95 (ili DR2, APO-1 and Fas), DR3 (ili APO-3, LARD, TRAMP i WSL1), TRAILR1 (ili DR4 and APO-2), TRAILR2 (ili DR5, KILLER i TRICK2), DR6, ectodysplasin A receptor (EDAR) i receptor faktora rasta živca (NGFR, eng. *nerve growth factor receptor*). Signalni kompleks koji izaziva smrt, DISC (eng. *death inducing signalling complex*) nastaje nakon vezanja TNF-a jer dolazi do polimerizacije receptora smrti i aktivacije kaspaze-8 koja je zadužena za transdukciju signala apoptoze. Kompleks DISC nastaje na CD95 receptoru, TRAILR1 ili TRAILR2, a posljedica takvog signalnog puta je fragmentacija DNA. DISC je jedna od dvije vrste signalnih kompleksa receptora smrti koje se mogu razlikovati. Druga vrsta signalnih kompleksa je TNFR1, DR3, DR6 i EDAR koji mogu pretvarati i apoptotske signale i signale preživljavanja.[15]

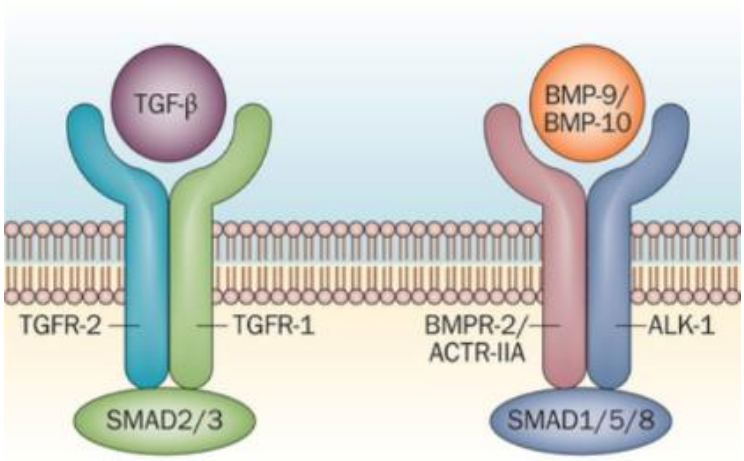
3.2. Signalizacija

Citokini djeluju tako što se vežu za svoj receptor, a kao takvi se mogu i podijeliti u nekoliko vrsta na temelju strukture jer mogu sadržavati nekoliko podjedinica. Kao primjer je receptor niskog afiniteta za IL-2 citokin koji sadrži samo α podjedinicu (IL-2Rα), IL-2R srednjeg afiniteta sadrži βc i γc podjedinice, a IL-2R visokog afiniteta sadrži sve tri podjedinice, α, βc i γc pri čemu je α podjedinica ona koja veže ligand. Takve podjedinice mogu biti zajedničke mnogim receptorima. Podjedinicu γc tako sadrže receptori za IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 i IL-21 pa se faktori rasta T-stanica poklapaju u aktivnosti. Podjedinicu β sadrže receptori IL-3, IL-5 i GM-CSF.[8]

Jedan od važnijih mehanizama signalizacije citokina je preko Jak-STAT signalnog puta (eng. *Janus kinase-signal transducter and activator of transcription*). Koriste ga citokini koji se vežu na citokinske receptore čija kinazna aktivnost je smanjena (IFNa/b, IFN-g, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-17, IL-20, IL-21, IL-22, G-CSF), GM-CSF). Jak1, Jak2, Jak3, Jak4 pripadaju citoplazmatskim tirozin-kinazama, a sudjeluju u aktivaciji transkripcijskih faktora iz STAT obitelji (STAT1, STAT2, STAT3,

STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6) preko fosforilacije tirozina. Fosfotirozinske ostatke prepoznaju SH2 domene na signalnim molekulama. STAT proteini sadrže karboksilni kraj koji se nastavlja na SH2 domenu, N-kraj na koji se nastavlja strukturni motiv dvostruke zavojnice (eng. *coiled-coil*) te područje za vezanje DNA.[1] Kinazna aktivnost JAK proteina se aktivira interakcijom s intracelularnom domenom citokinskog receptora koja je bogata aminokiselinom prolinom. STAT faktori tvore dimere koji ulaze u jezgru te se vežu u okviru promotorske regije ciljanih gena pri čemu se aktivira njihova transkripcija. (Silvennoinen *et.al.,* 1997; Imada and Leonard, 2000.)[5]

Tek nekoliko receptora citokina ima kinaznu aktivnost u vlastitoj citoplazmatskoj domeni pri čemu se direktno mogu fosforilirati unutarstanični supstrati. To je svojstveno za receptore TGF obitelji i faktora rasta. Oni signaliziraju pomoću heterotetramerskih kompleksa receptora tipa I i tipa II koji uključuju serin-treonin-kinaznu aktivnost u unutarstaničnoj domeni, odnosno funkcioniraju po MAP-kinaznom signalnom putu. Serin-treonin specifične kinaze odgovaraju na ekstracelularne podražaje i reguliraju stanične aktivnosti poput diobe stanica, ekspresije gena, diferencijacije i poliferacije.[2,14] Smad signalni put transdukcije (slika 5) aktiviraju receptori tipa I koji se aktiviraju fosforilacijom receptorima tipa II. Heteromerni Smad kompleks se translocira u jezgru i veže direktno ili indirektno na DNA stanice te na taj način regulira ekspresiju gena.[5] Pokazano je da ima ključnu ulogu u samoobnavljanju stanica, diferencijaciji, gastrulaciji i homeostazi tkiva embrijskih stanica.



Slika 5. TGF-β i BMP-9/BMP-10 signalizacija putem serin-treonin-kinaze na površini stanice do Smad proteina za ekspresiju gena u jezgri. (Preuzeto sa: https://www.sinobiological.com/research/receptors/tgf-beta-superfamily-receptors)

NF-κB (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB*) je proteinski kompleks koji kontrolira transkripciju DNA i proizvodnju citokina te je važan u regulaciji imunološkog odgovora na infekcije. NF-κB sastoji se od pet monomera NF-κB, a to su RelA/p65, RelB, cRel, NF-κB1 p50 i NF-κB2 p52, a oni mogu dimerizirati do 15 transkripcijskih faktora koji reagiraju s κB jedinicama gena.[11] NF-κB je uključen u stanični odgovor na stres, citokine, reaktivne kisikove vrste (ROS), UV zračenje i teške metale.

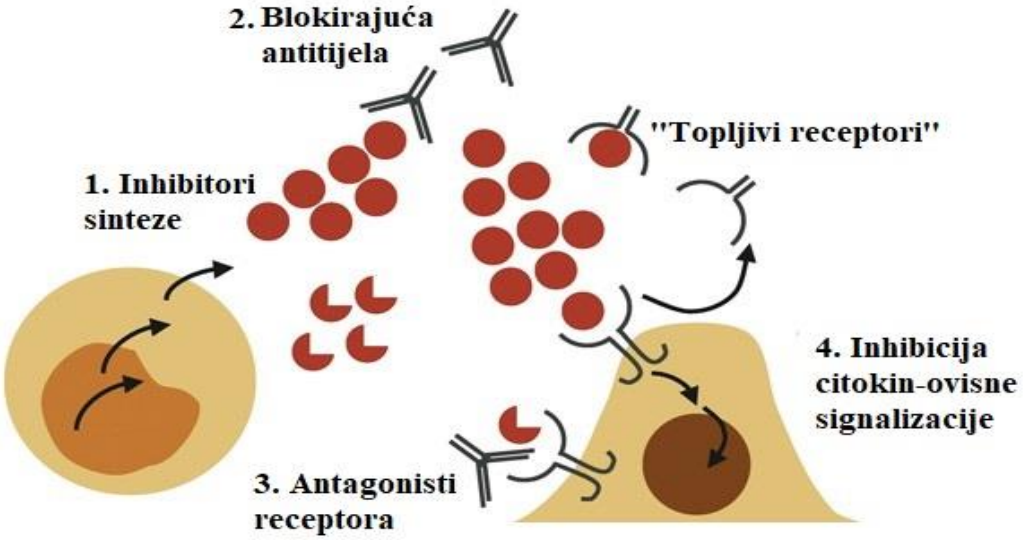
§ 4. CITOKINSKI INHIBITORI

Ustanovljeno je da citokini imaju vitalnu ulogu u upali, hematopoezi i imunološkim reakcijama organizma, stoga su citokinski inhibitori kao terapeutici vrlo značajni u istraživanjima. Inhibitori citokina su heterogena grupa lijekova koji smanjuju sintezu citokina i njihovu koncentraciju u aktivnom obliku, blokiraju interakcije citokina s odgovarajućim receptorima te ometaju puteve signalizacije.[1]

4.1. Inhibitori sinteze citokina

Lijekovi koji smanjuju prozvodnju limfocita i broj proizvedenih citokina, poput azatriopina ili metotreksata, su poznati kao citostatici te imaju imunosupresivno i protuupalno djelovanje. Muromonab je imunosupresivni lijek koji sadrži monoklonska antitijela koja se vežu na CD3 membranski receptor na površini T-limfocita (slika 6) te na taj način inducira redukciju cirkulacije limfocita i njihovu apoptozu. Zbog takvog djelovanja, muromonab ima mogućnost obrane novotransplantiranih organa u tijelu od T-limfocita čime se sprječava odbacivanje organa.

Sinteza citokina može biti inhibirana i bez utjecaja na funkcionalnost stanice. Na takav način djeluju glukokortikodi poput prednizona. Glukokortikoidna terapija prvotno je imala protuupalni i imunosupresivni cilj, a tek je naknadno utemeljeno da inhibira sintezu citokina poput IL-1, TNF ili IL-2. Glukokortikoid se veže na glukokortikoidni receptor u citoplazmi stanice koji je u kompleksu s HSP 90 (eng. *heat shock protein, HSP*) pri čemu receptor odlazi u jezgru gdje dimerizira te se veže na specifične sekvence GRE (eng. *glucocorticoid response element, GRE*) u okviru DNA pri čemu dolazi do ekspresije ciljanih gena.[16]



Slika 6. Shematski prikaz inhibicije sinteze citokina.[14]

Osim glukokortikoida, neki imunosupresivni lijekovi poput ciklosporina i takrolimusa utječu i na faktore rasta T-limfocita, IL-2 te time blokiraju imunološki odgovor stanice. Oba lijeka se vežu na odgovarajući receptor te inhibiraju kalcineurin, poznat još kao proteinska fosfataza-3 ili kalcij-ovisna serin-treoninska fosfataza čija je uloga aktivacija nuklearnih faktora aktivnih T-stanica (NFAT) da se mogu vezati na promotor gena IL-2. NFAT se specifično pojavljuje u T-limfocitima što omogućuje visoku selektivnost ciklosporina i takrolimusa.[16]

4.2. Inhibitori citokina u aktivnoj formi

Specifičan način inhibicije aktivnih citokina je u generiranju monoklonskih antitijela koja ih sprječavaju u vezanju na njihov receptor. Za sada je samo jedan lijek na tržištu koji na ovaj način djeluje – infliksimab. Infliksimab je monoklonsko antitijelo usmjereno na inhibiciju faktora nekroze tumora, TNF-α.

Da bi citokini imali fiziološku aktivnost, moraju se vezati na svoj odgovarajući receptor. Postoje dva tipa TNF receptora: transmembranski receptori i topljivi TNF receptori čija zadaća je da naprave kompleks s TNF citokinima i utišaju imunološki odgovor. Kao derivat topljivih TNF receptora sintetizan je etanercept. Etanercept je genetski modificiran protein koji sadrži

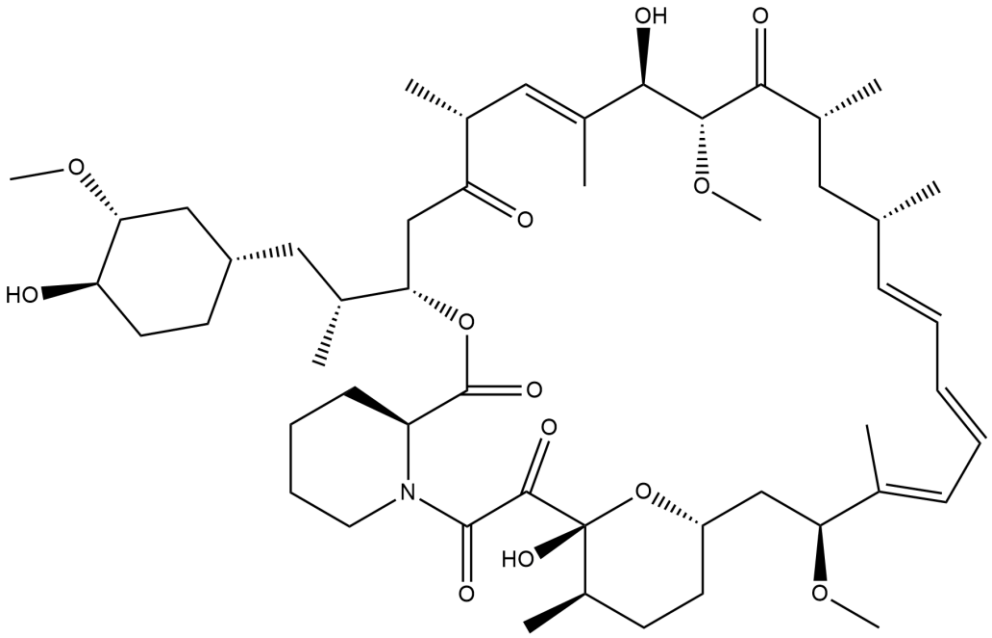
rekombinantu DNA i povezuje TNF receptor s Fc regijom IgG antitijela, a najčešće se koristi za liječenje reumatoidnog artritisa kao TNF inhibitor.[15,17]

4.3. Inhibitori citokinskih receptora

Monoklonska antitijela mogu djelovati i na receptore tako da sprječavaju djelovanje pojedinog citokina. Basiliximab i daklizumab su humana monoklonska antitijela koja djeluju kao inhibitori receptora IL-2 citokina čime blokiraju reakcije imunološkog sustava. Osim toga, anakinra je rekombinantna i izmijenjena inačica proteina antagonista za IL-1, a najčešće se koristi u liječenju reumatoidnog artritisa.[16] Anakinra je pokazala i rezultate u nekim istraživanjima bolesti s pacijentima zaraženim SARS-CoV-2 virusom. Studija je pokazala da je pacijentima koji su primali anakinru, pojava citokinske oluje bila smanjena za 72%. Citokinska oluja je skup simptoma upalnih promjena jer dolazi do prekomjerne proizvodnje citokina koji pak aktiviraju druge stanice imunološkog sustava. Veliki broj pacijenata umrlih od COVID-19 pokazali su simptome sindroma citokinskog šoka, a eksperimentima s lijekovima koji su derivati anakinre pokazano je da ona umanjuje nastanak citokinskog šoka. No, trenutačno su sve kliničke studije u tijeku te se još uvijek korona virus ne tretira ovim derivatima kao način liječenja.[17]

4.4. Inhibitori citokin-ovisne signalizacije

Biološki odgovor nakon vezanja citokina na njegov odgovarajući receptor najčešće ovisi o kaskadama signala. Sirolimus ili rapamycin (slika 7) je imunosupresivni terapeutik koji selektivno inhibira proteinsku kinazu mTOR (eng. *target of rapamycin, mTOR*) kao vrlo važnu komponentu signalizacije receptora za IL-2 koja ima ulogu u staničnoj kontroli. Inhibicija mTOR kinaza sprječava poliferaciju aktivnih T-limfocita. Proteinske kinaze se u velikom broju istraživanja proučavaju kao protuupalni terapeutici inhibicije citokina.[16]



Slika 7. Strukturna formula sirolimusa.

§ 5. CITOKINI U FARMACEUTSKOJ INDUSTRIJI

Posljednjih nekoliko godina veliki je broj uspješnih kliničkih istraživanja citokina kao specifičnih i djelotvornih bioloških molekula u liječenju različitih bolesti. Neki od trenutno istraživanih terapeutika pokazuju obećavajuće rezultate, a neki su već pronašli primjenu u liječenju određenih bolesti. Citokini se, kao terapeutski targeti, mogu podijeliti na proiinflamatorne citokine i antiinflamatorne citokine, ovisno djeluju li ciljani citokini upalno ili protuupalno. Proinflamatorni i antiinflamatorni citokini su kontrolirani putem mehanizma obrane u koji spadaju antagonisti receptora, antitijela protiv citokina, topljivi citokinski receptori i inhibitori citokina. Pomoću tako kontroliranih mehanizama može se pratiti tijek autoimunih i upalnih bolesti (tablica 3) u kliničkim studijama.[5]

Citokinski lijekovi na tržištu sadrže različite podtipove IFN-α, IFN-β, IFN-γ, G-CSF, IL-11, GM-CSF, IL-2, i IL-11, a sami citokini kao izolirani proteini su kemijski i fizikalno vrlo nestabilni pa citokinski lijekovi često sadrže pomoćne tvari da se očuva stabilnost i funkcionalnost. Kao posljedica helikalne strukture, citokini imaju veliko svojstvo hidrofobnosti te su agregacija i površinska adsorpcija problem kod sinteze lijekova, no to se rješava odabirom odgovarajuće pomoćne tvari koja čuva biološku aktivnost ciljanog proteina. Raspad proteina u sintetiziranim derivatima mogu uzrovati nečistoće iz ambalaže ili pomoćnih tvari te oksidacija.

Najčešće pomoćne tvari koje se koriste za stabilnost citokinskih proizvoda su saharoza, manitol, sorbitol, albumin i neke aminokiseline. Kao puferske otopine se koriste fosfati i acetati zbog najstabilnije forme proteina u rasponima pH vrijednosti ovih pufera. Osim toga, u svakom citokinskom proizvodu koriste se i tenzidi, poput polisorbata ili SDS, te albumin.[8]

Tablica 3. Citokini i imena generičkih lijekova koji sudjeluju u liječenju pojedinih bolesti.[8]

CITOKIN	FARMACEUTSKI PROIZVOD	CILJANA BOLEST
IFN-α	rekombinantni IFN-α2a: roferon, peginterferon α2a rekombinantni IFN-α2b: IntronA, peginterferon α2 wellferon (IFN-αn1), alferon (IFN αn3)	hepatitis C, hepatitis B
IFN-β	rekombinantni IFN-β1a: avonex, rebif rekombinantni IFN-β1b: betaseron, berlex	multipla skleroza
TNF-α	humani anti-TNF-α mAb: adalimumab, golimumab humani/mišji IgG1anti-TNF-α mAb: infliximab mišji F(ab')2 anti-TNF-α fragment: afelimomab alnalog TNF-αR: etanercept	reumatoidni artritis, psorijaza, Crohnova bolest, sepsa, ankilozni spondilitis, kronična obstruktivna bolest pluća
G-CSF	rekombinantni G-CSF: filgrastim, lenograstim, pegfilgastrim	febrilna neutropenija, transplatacija koštane srži
GM-CSF	rekombinantni GM-CSF: sargramostim, molgrastim	neutropenija nakon kemoterapije
IL-1	rekombinantni IL-1ra: anakinra humani IL-1R1-Fc IgG1 protein: IL-1 Trap	reumatoidni artritis, Crohnova bolest, juvenilni artritis, Stillova bolest
IL-2	rekombinanti IL-2: aldesleukin, telecleukin, proleukin humani/mišji anti-IL-2Rα mAb: basiliximab humanizirani anti-IL-2Rα mAb: daclizumab	metastatski karcinom bubrežnih stanica
IL-4	topljivi rekombinantni humani IL-4R: altrakincept	astma
IL-6	humanizirani anti-IL-6R mAb: atliumab, tocilizumab	reumatoidni artritis
IL-10	rekombinantni humani IL-10: ilodecakin	Crohnova bolest, reumatoidni artritis, psorijaza, ulcerozni kolitis, multipla skleroza
IL-11	rekombinantni humani IL-11: oprelvekin	trombocitopenija, ulcerozni colitis, psorijaza, reumatoidni artritis, Crohnova bolest

5.1. Citokini i maligne bolesti

Citokini koji se nalaze u okolini tumorske stanice imaju važnu ulogu u patogenezi raka. I u ovom slučaju, citokini se sintetiziraju kao odgovor na određenu infekciju ili upalu te mogu djelovati u cilju sprječavanja širenja stanica raka te kontrolirati stanični stres i minimizirati oštećenja stanica.[1] Citokini kao takvi predstavljaju glavni cilj medicinskih istraživanja za inovativne i dijagnostičke rezultate protiv tumorskih stanica te su neke epidemiološke studije pokazale da kronične upale mogu biti predispozicija raku, a te upalne komponente mogu biti prisutne i u mikrookolišu tumora koji epidemiološki nije povezan s upalom.[18]

Citokini i kemokini pospješuju širenje angiogeneze, metastaza i ostalih oštećenja imunološkog sustava. Upala je fiziološki odgovor imunološkog sustava na svako oštećenje tkiva te je posljedica toksina i trauma. Većina karcinoma nastaje na mjestima infekcije, kronične upale ili iritacije te su dva molekularna i stanična puta koja povezuju rak i upalu, intrizični put i vanjski put, a reguliraju ih faktori transkripcije (NFκB), TNF citokini i kemokini. U intrizičnom putu je aktivacija različitih onkoloških gena povezana sa stvaranjem upalne mikrookoline, a u vanjskom putu različiti elementi upale generiraju razvoj raka.

Upala inicira sintezu i aktivaciju proinflamatornih citokina i kemokina te upalnih enzima poput ciklooksigenaze koja sudjeluje u sintezi prostanglandina, derivata arahidonske kiseline odgovornih za osjet boli. Mikrobne infekcije (npr. upalna bolest crijeva kao prethodnik raka debelog crijeva), autoimune bolesti i bolesti nepoznatog podrijetla poput upale prostate su vrste upala koje povećavaju vjerojatnost nastanka tumora.[18]

Razvoj tumora posredovanih TNF citokinom može imati nekoliko različitih puteva: niske koncentracije ovog citokina mogu direktno utjecati na razvoj tumorskih stanica, stvaranje interakcija TNF-a s kemokinskim sustavom i indukcijom CXCR4 te stimulacijom prijelaza TNF-a iz epitela u mezenhim. Ovi putevi su stvorili potrebnu podlogu za razvoj antagonista TNF-a u terapiji raka.

IL-6 je ključni proinflamatorni citokin koji ima ulogu faktora rasta stanica, inhibitor je stanične smrti te signalizira aktivaciju transkripcijskog faktora NFκB odgovornog za inicijaciju širenja tumorskih stanica.

Mikrookruženje tumora uglavnom sadrži visoke koncentracije imunosupresivnih citokina IL-22 i TGF-β, a u uznapredovalim stadijima tumora su niske koncentracije IL-10.

Već prije spomenuti proinflamatorni citokini i njihova infiltracija u leukocite i tumorske stanice su glavni target u razvoju antitumorskih lijekova. Klinička istraživanja se uglavnom

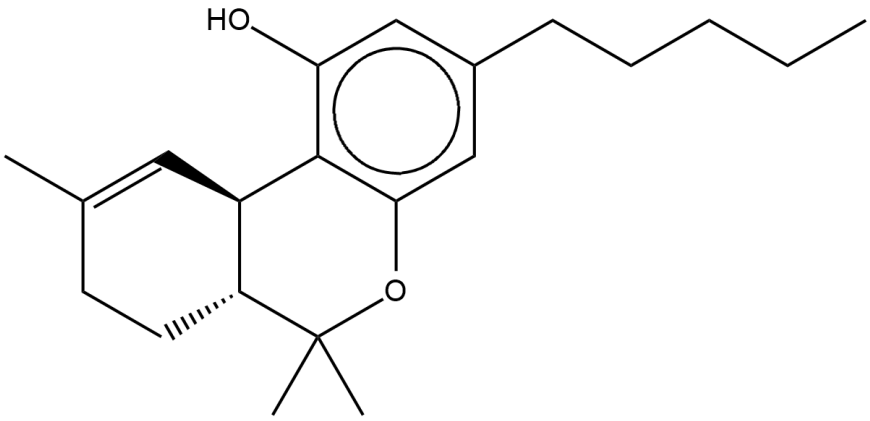
provode na TNF-α inhibitorima na primjeru upalnih bolesti, no prilikom uzimanja takvih TNF antagonista veća je podložnost bolesnika da obole od tuberkuloze čiji je uzročnik *Mycobacterium tuberculosis*. U kliničkim studijima reumatoidnog artritisa, antagonisti TNF-α su inhibirali upalne citokine, MMP (matriks metaloproteinaze) te sprječavali transport leukocita do mjesta upale. Kod pacijenata sa uznapredovalim stadijem raka pokazali su djelomičnu biološku aktivnost kod karcinoma renalnog sustava (bubrezi, mokraćni mjehur). Djelovanje ovih antagonista bilo samih, bilo u kombinaciji s drugim terapeuticima u ranijim stadijima tumora je još u tijeku istraživanja.[19]

TAM (eng. *tumour associated macrophages*) su stanice urođenog imunološkog sustava te mogu činiti i do 50% mase tumora. Pretpostavljalo se da TAM stanice imaju antitumorsko djelovanje, no u konačnici je pokazano da ove stanice ipak potiču razvoj tumorskih stanica. TAM su proizvođači topljivih upalnih medijatora u mikrookolišu tumora, potiču rast epitelnih i endotelijalnih stanica, citokina i kemokina koji sudjeluju u borbi protiv tumora stoga je uslijedilo i ciljanje TAM stanica kao vrsta terapije, a trenutno se provodi na tri načina. Prvi je inhibicija preživljavanja ili umnožavanja TAM stanica u okolini tumora, drugi način uključuje inhibiciju njihovih pozitivnih učinaka na angionezu, a treći je inverzija njihove imunološke supresivnosti i poticanje citoksičnosti.[16,19]

Farmakološki lijekovi koji oštećuju makrofage *in vivo* sadrže npr. klodronat liposome ili amino-bis-fosfonate. Klodronatni derivati, testiranjem na miševima, koji su sadržavali F9 tetrakarcinom ili humani A673 rabdomiosarkom (rak mekog tkiva koji najčešće pogađa djecu do 14 godina) rezultirali su redukcijom tumorske angiogeneze. Trabectedin je prirodni derivat izoliran iz morskog organizma *Ecteinascidia turbinata* za kojeg se smatra da ima citotoksično djelovanje na makrofage i T-stanice te inhibira proizvodnju CCL2 pri čemu ometa nakupljanje monocita u tumorskom području. Trabectedin pogađa i ostale citokine i kemokine poput IL-6, CCL7, CCL3, CCL14, CCL2 što se ispoljava kao antitumorsko djelovanje.[5]

Od prirodnih agensa, proantocijanidin iz vinove loze (lat. *Vitis vinifera*) i polifenoli iz porodice zelenog čaja (lat. *Camelia sinensis*) induciraju IL-12 i supresori su za IL-10. Njihov utjecaj je predložen za opisivanje mehanizma kemoprotekcije od imunosupresije inducirane UV-zračenjem te suzbijanja raka kože. U skupu razmatranja prirodnih antitumorskih lijekova, važno je spomenuti i široko poznat kofein i kanabis. THC (tetrahidrokanabinol) (slika 8) je glavni sastojak marihuane te ima opću imunosupresivnu aktivnost. On inhibira proizvodnju TGF-β, TNF-α, GM-CSF, kemokine IL-8/CXCL8, MIP-1α/CCL3, Th1 citokine IFN-γ, IL-12,

IL-2 te Th2 imunološke odgovore. Najviše je upotrijebljavan kanabidiol, jedan od 113 identificiran kanabidoina u biljkama kanabisa, te se primjenjuje u svrhu suzbijanju rasta tumora. Međutim, ni ti rezultati ispitivanja nisu u potpunosti doveli do legalizacije THC-a u terapijske svrhe jer postoje i neke kontradiktorne nuspojave poput pretpostavke da THC može poticati rast tumora inhibicijom antitumorskog imuniteta preko CB_2 receptora u citokin-ovisnom putu signalizacije.[8]



Slika 8. Struktura tetrahidrokanabinola.

5.2. Citokini i HIV

HIV ili humani virus imunodeficijencije je retrovirus koji izaziva AIDS, stečeni sindrom imunodeficijencije. AIDS je bolest imunološkog sustava pri čemu oboljela osoba nema sposobnost zaštite tijela od štetnog djelovanja ostalih bolesti. Pri tome je smanjen broj leukocita, broj limfocita u limfnim čvorovima i slezeni, broj aktivnih T-stanica te je reducirana količina proizvedenih antitijela. Najčešće ciljne stanice u kojima dolazi do replikacije HIV-a su memorijski CCR5+ i CD4+ limfociti, makrofagi i dendritičke stanice. Do fuzije virusa i ciljne stanice dolazi preko staničnog receptora CD4 i jednog od dva kemokinska koreceptora CCR5 ili CXCR4.[22]

HIV infekcija je u svim fazama bolesti blisko povezana s kroničnom imunološkom aktivacijom i nepravilnom proizvodnjom citokina. Tijekom bolesti događa se promjena u okviru stanica Th1 (smanjena proizvodnja IL-2 i IFN-γ) i Th2 (povećana razina IL-4 i IL-10 u serumu) te povećana proizvodnja proinflamatornih citokina (IL-1, IL-6, IL-8 i TNF-α) u svrhu aktivacije transkripcijskog faktora NF-κB. Ovakvo stanje organizma privremeno se može popraviti primjenom HAART (eng. *highly active antiretroviral therapy, HAART*) terapije uz

istovremeni povrat broja CD4+ limfocita i supresijom širenja virusa. Primjena citokinske terapije u nekim okolnostima je rezultirala obnavljanjem imunološkog sustava.

Studije su pokazale da je replikacija HIV-1 virusa ovisna o mreži citokina od čega su IFN-α, IFN-β, IL-10, IL-13 i IL-16 supresivni citokini, a TNF-α, TNF-β, M-CSF, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-15 i IL-18 su induktivni citokini u širenju ovog virusa. Infekcija HIV-om i replikacija virusa mogu biti modulirane ako je u kulturi prisutan LPS (eng. *lipopolysaccharide, LPS*) ili endotoksin.[21,22] LPS je velika molekula koja sadrži lipide i polisaharide koji u strukturi sadrže *O*-antigen. *O*-antigen je pričvršćen za srž oligosaharida te obuhvaća najudaljeniju domenu LPS molekule.[22] Prisutnost LPS-a u teraputicima za HIV pokazalo je smanjenu proizvodnju HIV-1 iz MDM-a (eng. *monocyte-derived macrophages, MDM*).

Prirodni inhibitor citokina IL-18, alfa-1-antitripsin, (AAT) reducira proizvodnju TNF-α, potiče proizvodnju IL-10 i čuva inzulinske β-stanice gušterače. U spektru svih humanih plazma proteina, AAT je trenutačno jedini istraživani protein koji inhibira HIV-1.[4]

Široki spektar bolesti u kojima sudjeluju citokini omogućuje veliki broj kliničkih studija i istraživanja bioloških efekata citokina u cilju pronalaska lijekova za nekolicinu bolesti.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. S. R. Holdsworth, P. Y. Gan, Cytokines, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **10** (2015) 2243-2254.
2. https://www.sinobiological.com/resource/cytokines (Datum pristupa: 18.lipnja 2020.)
3. M. D. Turner, et al., Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease, *Biochim. Biophys. Acta* (2014)
4. C. A. Dinarello, *Eur. J. Immunol.* **37** (2007) 34-45.
5. S. Čulić, *Citokini i autoimunosne bolesti*, Klinička bolnica Split, Klinika za dječje bolesti, Klinički odjel za hematologiju, onkologiju, imunologiju i medicinsku genetiku, 2005.
6. **https://www.news-medical.net/health/Cytokine-Nomenclature.aspx** (Datum pristupa: 14. rujna 2020)
7. **https://en.wikipedia.org/wiki/Cytokine_receptor** (Datum pristupa: 14. rujna 2020.)
8. Z. Zídek, P. Anzenbacher, E, Kmoníčková, *Br. J. Pharmacol.* **157** (2009) 342-361.
9. https://en.wikipedia.org/wiki/Cytokine_release_syndrome (Datum pristupa: 25. srpnja 2020.)
10. T. Lipiäinen, M. Peltoniemi, S. Sarkhel, T. Yrjönen, H. Vuorela, *Journal of pharmaceutical sciences* **104** (2014) 307-326
11. M. G. Dorrington, I. D. C. Fraser, *Front. Immunol.*, **10** (2019) 705.
12. D. Foster, J. Parrish-Novak, B. Fox, W. Xu, *Nat. Rev. Drug Discovery* **3** (2004) 160-170.
13. M. Čaić, *Inhibitori Janus kinaza u liječenju upalnih reumatoidnih bolesti*, Diplomski rad, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019, str. 26
14. https://sh.wikipedia.org/wiki/Mitogenom-aktivirane_proteinske_kinaze (Datum pristupa: 25. kolovoza 2020.)
15. I. Žrvnar, *Djelovanje izvanstaničnog Hsp70 i ekstrakta dima cigareta na aktivaciju protein-kinaza aktiviranih mitogenom te na ekspresiju receptora 2 sličnog Tollu i unutarstaničnog Hsp70,* Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019, str. 5

16. K. Resch, *Cytokine Inhibitors*, Encyclopedic Reference of Immunotoxicology, 2005, Springer, Berlin, Heidelberg
17. https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S2665-9913%2820%2930273-3 (datum pristupa: 30.kolovoza 2020.)
18. A. Mantovani, C. Garlanda, P. Allavena, *Annals of medicine* **42** (2010) 161-170.
19. G. Germano, P. Allavena, A. Mantovani, *Cytokine* **43** (2008) 374-379.
20. J. Karahemić, Z. Dizdarević i suradnici, *Klinička imunologija*, Svjetlost, Sarajevo, 2007, str. 89-115.
21. **https://hr.wikipedia.org/wiki/Sindrom_ste%C4%8Dene_imunodeficijencije** (Datum pristupa: 1.rujna 2020.)
22. L. Gorenec, *Citokini u infekciji virusom ljudske imunodeficijencije tipa 1*, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015, str. 4, 24