

**1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy**

**Disertační práce**

**Expresce cytokinů, zvláště chemokinů,  
po aplikaci  
acyklických nukleosidfosfonátů**

**MUDr. Petr Potměšil**

**Praha 2007**

Tato práce vznikla na základě výzkumu prováděného v letech 2002-2006 na oddělení imunofarmakologie Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR pod vedením školitele postgraduálního studia biomedicíny oboru farmakologie RNDr. Zdeňka Zídka, DrSc. Práce byla podpořena výzkumným záměrem Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR (AV0Z50390512) a Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd ČR (Z40550506). Dále byla podpořena grantem Centra pro nová antivirotika a antineoplastika (1M138896301) a granty Grantové agentury České republiky (305/03/1470, 305/00/0048).

## **Poděkování**

Autor děkuje především svému školiteli RNDr. Zdeňkovi Zídkovi, DrSc. a všem, kteří se podíleli na výzkumu, jehož výsledky byly podkladem této disertační práce:

Prof. RNDr. Antonín Holý, DrSc.,

RNDr. Eva Kmoníčková, CSc.,

Mgr. Jana Křížková,

Vlasta Krejčová.

Dále autor děkuje svým rodičům a bratrovi Janovi.

## OBSAH

<b>Použité zkratky</b> .....	<b>4</b>
<b>I. Úvod</b> .....	<b>6</b>
1. Význam virových chorob .....	6
2. Infekce virem HIV-1: současné a některé budoucí možnosti léčby .....	7
3. Acyklické nukleosidfosfonáty .....	9
<b>II. Cíle disertační práce</b> .....	<b>11</b>
<b>III. Teoretická část</b> .....	<b>12</b>
<b>1. Acyklické nukleosidfosfonáty</b> .....	<b>12</b>
1.1. Chemická struktura .....	12
1.2. Protivirové spektrum účinku .....	15
<b>2. Infekce virem HIV-1 a syndrom získané imunodeficience</b> .....	<b>16</b>
2.1. Replikace viru HIV-1 a cytokiny .....	17
<b>3. Cytokiny</b> .....	<b>20</b>
3.1. Obecné vlastnosti cytokinů .....	20
3.2. TNF- $\alpha$ .....	21
3.3. IL-10 .....	22
<b>4. Chemokiny</b> .....	<b>23</b>
4.1. Názvy chemokinů .....	23
4.2. Obecné vlastnosti chemokinů .....	24
4.3. RANTES/CCL5 .....	26
4.4. MIP-1 $\alpha$ /CCL3 .....	27
4.5. Monocytární chemotaktické proteiny .....	28
4.6. SDF-1/CXCL12 .....	30
<b>IV. Experimentální část</b> .....	<b>31</b>
<b>1. Materiál a metody</b> .....	<b>31</b>
1.1. Acyklické nukleosidfosfonáty .....	31
1.2. Antagonisté adenosinových receptorů .....	33
1.3. Lipopolysacharid .....	33
1.4. Pokusná zvířata .....	34
1.5. Izolace a kultivace myších makrofágů .....	34

1.6. Izolace a kultivace myších lymfocytů a tymocytů .....	34
1.7. Lidská buněčná linie THP-1 .....	35
1.8. Izolace a kultivace lidských monocytů .....	35
1.9. Kultivační médium .....	35
1.10. Stanovení životnosti buněk .....	35
1.11. Produkce NO .....	36
1.12. ELISA .....	36
1.13. Izolace RNA .....	36
1.14. Reverzní transkripce RNA na cDNA .....	36
1.15. Polymerázová řetězová reakce .....	37
1.16. Statistická analýza dat .....	38
<b>2. Výsledky .....</b>	<b>39</b>
<b>2.1. Produkce NO .....</b>	<b>39</b>
<b>2.2. Expresе cytokinů po aplikaci acyklických nukleosidfosfonátů .....</b>	<b>39</b>
2.2.1. Expresе TNF- $\alpha$ .....	39
2.2.2. Expresе IL-10 .....	43
2.2.3. Expresе IFN- $\alpha$ a IFN- $\beta$ .....	45
<b>2.3. Expresе chemokinů po aplikaci acyklických nukleosidfosfonátů .....</b>	<b>46</b>
2.3.1. Expresе RANTES/CCL5 .....	46
2.3.2. Expresе MIP-1 $\alpha$ /CCL3 .....	51
2.3.3. Expresе monocytárních chemotaktických proteinů .....	54
2.3.3.1. Expresе MCP-1/CCL2 .....	54
2.3.3.2. Expresе MCP-2/CCL8 .....	57
2.3.3.3. Expresе MCP-3/CCL7 .....	58
2.3.3.4. Expresе MCP-5/CCL12 .....	59
2.3.4. Expresе SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 .....	59
<b>2.4. Závislost expresе TNF-<math>\alpha</math> a MCP-1/CCL2 na transkripčním faktoru NF-<math>\kappa</math>B ...</b>	<b>60</b>
2.4.1. Inhibice produkce TNF- $\alpha$ pyrrolidinditiokarbamátem .....	60
2.4.2. Inhibice produkce MCP-1/CCL2 pyrrolidinditiokarbamátem .....	61
<b>2.5. Vliv antagonistů adenosinových receptorů na expresi cytokinů/chemokinů ....</b>	<b>62</b>
<b>2.6. Expresе chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4 po aplikaci ANP .....</b>	<b>66</b>
2.6.1. Expresе CCR5 na úrovni mRNA .....	66
2.6.2. Expresе CXCR4 na úrovni mRNA .....	68

<b>V. Diskuze</b> .....	<b>70</b>
1. Exprese cytokinů a chemokinů po aplikaci ANP .....	70
2. Exprese chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4 po aplikaci ANP .....	78
3. Vliv antagonistů adenosinových receptorů na expresi cytokinů a chemokinů .....	80
4. Vztah mezi chemickou strukturou a účinky ANP na expresi cytokinů/chemokinů .....	82
<b>VI. Závěry disertační práce</b> .....	<b>83</b>
<b>VII. Shrnutí</b> .....	<b>84</b>
<b>VIII. Seznam publikací autora</b> .....	<b>85</b>
1. Seznam publikací, které jsou podkladem disertační práce .....	85
2. Seznam ostatních impaktovaných publikací .....	85
<b>IX. Seznam literatury</b> .....	<b>86</b>
<b>X. Přílohy 1-4: publikace týkající se disertace</b> .....	<b>100</b>

## Použité zkratky

<b>AIDS</b>	Acquired immunodeficiency syndrome
<b>AMP</b>	Adenosine monophosphate
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance
<b>ANP</b>	Acyclic nucleoside phosphonate
<b>cART</b>	combined Antiretroviral therapy
<b>CD4+</b>	Cluster of differentiation 4+
<b>CCR5</b>	Receptor pro CC-chemokiny č. 5
<b>CPA</b>	<i>N</i> <sup>6</sup> -cyclopentyladenosine
<b>CREB</b>	Cyclic AMP response element-binding protein
<b>CXCR4</b>	Receptor pro CXC chemokiny č. 4
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immunoabsorbent assay
<b>FIV</b>	Feline immunodeficiency virus
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
<b>gp120</b>	glycoprotein 120
<b>HAART</b>	Highly active antiretroviral therapy
<b>HIV-1</b>	Human immunodeficiency virus-1
<b>HLA</b>	Human leucocyte antigen
<b>HTLV-1</b>	Human T-cell leucaemia virus-1
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleukin
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MCP-1/CCL2</b>	Monocyte chemoattractant protein-1
<b>MCP-2/CCL8</b>	Monocyte chemoattractant protein-2
<b>MCP-3/CCL7</b>	Monocyte chemoattractant protein-3
<b>MCP-4/CCL13</b>	Monocyte chemoattractant protein-4
<b>MCP-5/CCL12</b>	Monocyte chemoattractant protein-5
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex
<b>MIP-1<math>\alpha</math>/CCL3</b>	Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$
<b>MSV</b>	Moloney sarcoma virus

<b>NECA</b>	5'- <i>N</i> -ethylcarboxamidoadenosine
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor- $\kappa$ B
<b>NK</b>	Natural killer
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartate
<b>PDTC</b>	Pyrrolidindithiocarbamate
<b>RANTES/CCL5</b>	Regulated on activation of normal T-cell expressed and secreted
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
<b>SDF-1/CXCL12</b>	Stromal cell derived factor-1
<b>SIV</b>	Simian immunodeficiency virus
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor- $\beta$
<b>Th</b>	T helper
<b>THP-1</b>	Lidská buněčná linie akutní monocytární leukemie
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor- $\alpha$

### ***Použité zkratky acyklických nukleosidfosfonátů***

<b>HPMPA</b>	9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]adenin
<b>HPMPDAP</b>	9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin
<b>HPMPC</b>	1-(3-hydroxy-2-fosfonometoxypropyl)cytozin
<b>PMEA</b>	9-[2-(fosfonometoxy)etyl]adenin
<b>(<i>R</i>)-PMPA</b>	9-( <i>R</i> )-[2-(fosfonometoxy)propyl]adenin
<b>(<i>R</i>)-PMPDAP</b>	9-( <i>R</i> )-[2-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin
<b>PMEDAP</b>	9-[2-(fosfonometoxy)etyl]2,6-diaminopurin
<b>PMEG</b>	9-(2-fosfonometoxyetyl)guanin



# I. Úvod

## 1. Význam virových chorob

Infekční onemocnění různého původu provázejí člověka od nepaměti a jsou celosvětově významnou příčinou nemoci a úmrtnosti. Z bakteriálních onemocnění je důležitým zdravotnickým problémem tuberkulóza [1]. Z parazitárních chorob je především v tropických oblastech časté a závažné onemocnění malárií nebo bilharziózou [2-4].

Co se týče virových chorob, bylo v léčbě řady infekcí dosaženo pokroku, stále však existují virové nákazy, jejichž terapie není uspokojivě vyřešena, případně by bylo zapotřebí mít k dispozici širší výběr virostatik. Kromě infekce virem HIV-1 jsou to infekce papillomavirové, adenovirové (u imunokompromitovaných osob), herpetické, infekce virem hepatitidy C, chřipkové infekce a jiné infekce (např. koronavirové). Některé viry způsobují navíc vznik nádorových onemocnění. Značné úsilí se v nynější době soustřeďuje na výzkum léčiv proti viru HIV-1, ze 40 schválených antivirotik se jich polovina používá při léčbě HIV-1 infekce [2, 5].

Současná pandemie choroby AIDS vyvolaná virem HIV-1 probíhá již od osmdesátých let 20. století a počet nakažených pacientů stále roste [6]. Syndrom získané imunodeficiency AIDS je nejzávažnějším druhem získané poruchy imunity navozené virovou infekcí [7]. Doposud proti infekci virem HIV-1 neexistuje naprosto účinná léčba nebo možnost očkování a mnoho pacientů vkládá své naděje do nových antiretrovirotik ve stadiu výzkumu [2].

Někteří vědci se navíc domnívají, že vývoj účinné preventivní vakcíny proti viru HIV-1 nebude možný [6], jedním z problémů je fakt, že kromě primátů neexistuje dobrý zvířecí model onemocnění [8]. V nynější době je tedy zapotřebí usilovat o zlepšení současných léčebných postupů a věnovat zvýšenou pozornost důsledné prevenci.

## 2. Infekce virem HIV-1: současné a některé budoucí možnosti léčby

K terapii HIV-1 infekce se používají antiretrovirová léčiva, která jsou zaměřena na dva hlavní produkty virového genomu, a to na reverzní transkriptázu a aspartátovou proteázu (inhibitory reverzní transkriptázy a inhibitory proteázy). V nedávné době se začal též používat inhibitor HIV-1 fúze, léčivo enfuvirtid [9].

Inhibitory reverzní transkriptázy se dělí na nukleosidové inhibitory, nenukleosidové inhibitory a nukleotidové inhibitory reverzní transkriptázy. Společnou vlastností nukleosidových inhibitorů je přítomnost abnormálního cukru v molekule. K těmto léčivům patří: azidothymidin neboli zidovudin, stavudin, didanosin, lamivudin, zalcitabin, abacavir, emtricitabin a amdoxovir. Do této skupiny pravděpodobně přibude elvucitabin, který je podobně jako amdoxovir účinný také proti viru hepatitidy B. Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy jsou nevirapin, delavirdin a efavirenz. Novější etravirin je klinicky zkoušen s příznivými výsledky. Nukleotidové inhibitory reverzní transkriptázy jsou acyklické nukleosidfosfonáty adefovir a tenofovir, k léčbě AIDS se používá pouze tenofovir [5, 6, 9, 10].

Inhibitory HIV-proteázy jsou léčiva saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir a atazanavir. Z nových proteázových inhibitorů jsou nadějnými kandidáty anti-HIV-1 terapie tipranavir, darunavir a brekanavir [6, 10, 11].

Nejúčinnější postup při farmakoterapii HIV-1 infekce je kombinace výše uvedených léčiv označovaná jako HAART (highly active antiretroviral therapy), novější označení je cART (combined antiretroviral therapy) [12, 13]. Většinou se podává kombinace dvou nebo tří preparátů a v mnoha případech lze zastavit rozvoj imunodeficiency a s pomocí účinných léčiv proti oportunním infekcím pak dlouhodobě zmírnit průběh choroby [14]. Některé preparáty je již možné podávat pouze jednou denně, což může zlepšit compliance pacientů a následně výsledky léčby [13]. Příkladem HAART je kombinace zidovudinu a lamivudinu (Combivir<sup>®</sup>) nebo kombinace zidovudinu, lamivudinu a abakaviru (Trizivir<sup>®</sup>) [13]. Příkladem HAART, jejíž součástí je acyklický nukleosidfosfonát tenofovir je lék Truvada<sup>®</sup> s obsahem emtricitabinu a tenofoviru nebo lék Atripla<sup>®</sup>, který obsahuje navíc ještě efavirenz [15].

Významnou součástí antiretrovirové terapie budou v budoucnu inhibitory vstupu viru HIV-1 do buňky, což jsou antagonisté chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4 [6]. Prototypem sloučenin cílených proti receptoru CXCR4 jsou bicyklamy (AMD 3100, AMD

070). Antagonisté receptoru CCR5 jsou např. sloučeniny s označením TAK-220 a SCH-C [10].

Dalším cílem farmakoterapie HIV-1 infekce je enzym integráza, která je nezbytná pro integraci virové DNA do DNA hostitele. Inhibitory integrázy jsou již také ve stadiu klinických zkoušek. Vyvíjejí se rovněž léčiva cílená proti HIV-1 proteinu Tat (trans-activating protein), která blokuji replikaci HIV-1 na úrovni transkripce [5, 10].

Na poslední konferenci o AIDS v roce 2006 byly diskutovány možnosti imunomodulační terapie nebo genové terapie [6].

Přes pozitivní účinek antiretrovirové léčby nedochází při její aplikaci k úplné eliminaci viru HIV-1. Makrofágy zůstávají rezervoáry viru a jsou asi hlavním zdrojem pro další šíření infekce. Po určité době léčby vznikají únikové mutanty viru HIV-1. Dále mají antiretrovirotika částečně imunosupresivní efekt. Léčba HAART je provázena např. snížením cytotoxických virově specifických lymfocytů T. Mechanismů imunosupresivního účinku HAART je více a přispívají ke snížení účinnosti farmakologické léčby. Antiretrovirovou terapii limitují rovněž nežádoucí účinky jako neuropatie, poruchy krvetvorby, poruchy metabolismu tuků a glycidů, pankreatitida, možnost vzniku poruchy renálních funkcí aj. [7, 11, 15, 16].

Při vývoji nových antiretrovirotik bude nutné hledat léčiva s nižší toxicitou, nízkými vedlejšími účinky a s širokým spektrem účinku proti rezistentním mutantům viru HIV-1. Větší důraz se bude muset rovněž klást na způsoby, jak posílit imunitní systém pacienta [2, 14, 17-19]. Jednou z možností, jak se přiblížit tomuto cíli, může být vývoj léčiv, která by ovlivňovala žádoucím směrem expresi těch cytokinů/chemokinů, které přímo ovlivňují replikaci viru HIV-1 (případně i jiných virů) nebo zvyšují obranyschopnost organismu [20-23].

Supresivní efekt na replikaci viru HIV-1 mají cytokiny IL-10, IL-13, IL-16, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  [24, 25]. Chemokiny zabraňují šíření HIV-1 infekce vazbou na chemokinové receptory CCR5 a CXCR4, které mají funkci hlavních koreceptorů pro vstup viru HIV-1 do buňky [26, 27]. Tuto schopnost mají především  $\beta$ -chemokiny RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-2, MCP-3 a  $\alpha$ -chemokin SDF-1 $\alpha$  [24, 28-30]. Skupině chemokinů je při výzkumu patogeneze HIV-1 infekce věnována oprávněná pozornost, neboť bylo zjištěno, že rezistence k HIV-1 infekci je asociována s geneticky podmíněnou vysokou produkcí výše uvedených molekul [31, 32]. Obdobně jedinci s geneticky podmíněnou nízkou expresí HIV-1 koreceptorů jsou méně vnímaví vůči nákaze virem HIV-1 [31, 33, 34].

Induktivní efekt na šíření infekce virem HIV-1 mají naproti tomu cytokiny IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18, GM-CSF a TNF- $\alpha$  [24, 28-30]. Bifunkční účinky mohou mít cytokiny IL-4, TGF- $\beta$  a chemokin MCP-1 [24, 28, 35].

Některé z výše uvedených cytokinů/chemokinů mají schopnost působit antineoplasticky. Jedná se o interferony a chemokin MCP-3 [36-38]. Stimulace genové exprese těchto molekul virostatickými léčivy by mohla mít u pacientů trpících AIDS význam, neboť v pokročilejší fázi HIV-1 infekce se objevují různá nádorová onemocnění [7, 39].

### 3. Acyklické nukleosidfosfonáty (ANP)

K léčivům, která mají kromě přímého virostatického účinku i vlastnosti imunobiologické, patří acyklické nukleosidfosfonáty vyvinuté prof. RNDr. Antonínem Holým, DrSc., Dr. h.c. a spolupracovníky [15, 19, 40-43]. Jsou to nadějná antivirotika, z nichž některá se již běžně používají při léčbě lidských virových onemocnění. Konkrétně tenofovir se jako preparát Viread<sup>®</sup> používá k terapii AIDS. Sloučenina adefovir se ve formě biologicky dostupnějšího proléčiva jako preparát Hepsera<sup>®</sup> podává u žloutenky typu B. Vistide<sup>®</sup> s obsahem cidofoviru je určen k léčbě cytomegalovirové retinitidy [15, 43, 44]. Řada ANP má také účinky antiparazitární. Působí proti plazmodiím, trypanozomám a *Schistosoma mansoni* [3, 43, 45, 46].

Některé ANP mají schopnost zvyšovat expresi cytokinů/chemokinů [41, 47, 48]. Např. tenofovir zvyšuje produkci  $\beta$ -chemokinů RANTES a MIP-1 $\alpha$ , které mají schopnost blokovat replikaci viru HIV-1, neboť jsou přirozenými ligandy receptoru CCR5 používaného virem HIV-1 ke vstupu do buňky [42, 49]. RANTES má dále schopnost potlačit infekci respiračně syncytiálním virem [50]. Tenofovir zvyšuje také produkci cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-10 [18, 42]. TNF- $\alpha$  sice podle většiny literárních údajů replikaci viru HIV-1 urychluje [29, 35, 51], ale na druhé straně může snížit expresi koreceptoru CCR5 pro vstup viru HIV-1 do buňky indukcí produkce  $\beta$ -chemokinů [52]. TNF- $\alpha$  působí inhibičně na replikaci celé řady virů [53]. IL-10 nejenže může potlačit šíření HIV-1 infekce [54], ale ovlivňuje také příznivě stav pacientů se žloutenkou typu C [55]. Tenofovir rovněž zvyšuje produkci virostatické molekuly oxidu dusnatého (NO) [18, 42].

Z dalších imunomodulačních účinků ANP lze jmenovat zvýšení cytotoxických účinků NK buněk a indukci produkce IFN- $\alpha/\beta$  u myšího modelu in vivo po aplikaci adefoviru a fosfonometyldiaminopurinu [19, 40].

V preklinickém výzkumu může být prospěšné zabývat se otázkou vlivu jednotlivých typů virostatik na expresi cytokinů/chemokinů a dalších molekul, neboť mezi jednotlivými třídami antivirotik mohou existovat rozdíly.

Zatímco tenofovir (nukleotidový inhibitor reverzní transkriptázy) zvyšuje produkci  $\beta$ -chemokinů [42], terapie nukleosidovými a nenukleosidovými inhibitory vedla v jedné klinické studii ke snížení exprese  $\beta$ -chemokinů RANTES a MIP-1, které zabraňují vstupu viru HIV-1 do buňky [56]. V jiné studii se u HIV-1 infikovaných pacientů hladina RANTES při léčbě nenukleosidovými inhibitory neměnila, koncentrace MIP-1 se však zvýšila. Ve skupině pacientů léčených proteázovými inhibitory se hladina RANTES také nezměnila, došlo ale ke snížení koncentrace chemokinů MIP-1 [57].

Odlišnosti ve vlivu na genovou expresi chemokinů existují i mezi jednotlivými ANP. Např. adefovir na rozdíl od tenofoviru snížil hladinu RANTES v plazmě zvířat, u kterých byla vyvolána adjuvantní artritida, a působil protizánětlivě [58].

**Na oddělení imunofarmakologie Ústavu experimentální medicíny AV ČR se podílíme na výzkumu a vývoji acyklických nukleosidfosfonátů ve spolupráci s Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR. Při screeningu farmakologických vlastností ANP věnujeme pozornost efektu ANP na produkci NO. Následně zkoumáme účinky ANP na expresi cytokinů a chemokinů [18, 39, 41, 42, 47, 48].**

Zabýváme se rovněž expresí adenosinových a chemokinových receptorů, signálními transdukčními mechanismy, vlastnostmi cytostatickými a antiparazitárními, interferencí s enzymy metabolismu léčiv, protizánětlivým působením a jinými efekty ANP [3, 58-62].

Cílem tohoto výzkumu je rozšířit dosavadní poznatky o biologických účincích ANP a nalézt látky s vlastnostmi, které by měly příznivý vliv na obranyschopnost organismu proti infekčním patogenům.

Jedním z důvodů proč nadále sledovat rozličné farmakologické vlastnosti ANP mohou být příznivé výsledky nedávné klinické studie GS 934 srovnávající léčebný režim tenofovir + emtricitabin + efavirenz versus zidovudin + lamivudin + efavirenz. U pacientů užívajících kombinaci léčiv obsahujících tenofovir bylo pozorováno větší snížení hladin HIV-1 RNA a méně nežádoucích účinků vedoucích k odstoupení ze studie [63]. Dále stojí za pozornost fakt, že se u pacientů dlouhodobě léčených tenofovirem prozatím nevyskytoval problém vzniku rezistentních kmenů viru HIV-1 [15].

## II. Cíle disertační práce

Obecným cílem disertační práce „Expresí cytokinů, zvláště chemokinů, po aplikaci acyklických nukleosidfosfonátů“ bylo přispět k prohloubení poznatků o vlivu ANP na genovou expresi cytokinů a chemokinů, které hrají významnou roli při obraně organismu proti virovým infekcím, zvláště proti infekci virem HIV-1. Důležitým cílem bylo zčásti objasnit, jakým způsobem ANP genovou expresi cytokinů/chemokinů ovlivňuje. Na základě výsledků experimentů v průběhu studia genové exprese cytokinů/chemokinů jsme se dále rozhodli zkoumat účinky ANP na transkripci mRNA pro dva hlavní chemokinové koreceptory pro vstup viru HIV-1 do buňky: receptory CCR5 a CXCR4.

Jednotlivé cíle disertační práce byly následující:

1. Rozšířit poznatky o vlivu ANP na expresi cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a získat poznatky o vlivu ANP na expresi IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$ .
2. Rozšířit poznatky o vlivu ANP na expresi chemokinů RANTES, MIP-1 $\alpha$  a získat poznatky o vlivu ANP na expresi monocytárních chemotaktických proteinů a chemokinů SDF-1 $\alpha$ .
3. Otestovat účinky ANP na expresi chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4 na úrovni mRNA.
4. Zjistit, zda je zvýšení exprese cytokinů/chemokinů po aplikaci ANP závislé na transkripčním faktoru NF- $\kappa$ B.

5. Zjistit, zda může být zvýšení exprese cytokinů/chemokinů po aplikaci ANP podmíněno ovlivněním adenosinových receptorů.

### III. Teoretická část

Úkolem teoretické části je podat informace o ANP a o patogenezi infekce virem HIV-1 s přihlédnutím k roli cytokinů a chemokinů. Dále jsou uvedeny obecné poznatky o některých cytokinech a chemokinech.

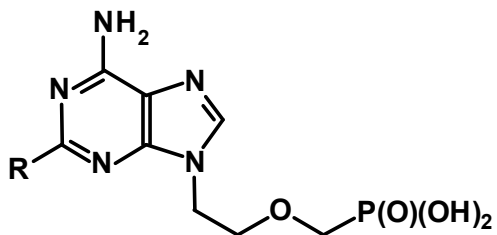
## 1. Acyklické nukleosidfosfonáty

### 1.1. Chemická struktura

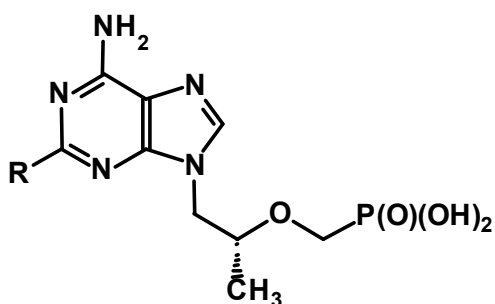
#### *Nehydroxylované ANP*

ANP jsou N-(2-fosfonometoxyalkyl)puriny (příp. pyrimidiny), vyvinuté prof. RNDr. Antonínem Holým, DrSc. [43, 64, 65]. Jsou odvozeny od heterocyklických bazí adeninu (A) nebo 2,6-diaminopurinu (DAP). Charakteristikou jejich molekul je náhrada nukleosidového cukerného zbytku acyklickým hydroxylovaným řetězcem a vazbou esteru kyseliny fosforečné s izopolárním fosfonometylerem. V poloze  $N^9$  se jednotlivé ANP liší přítomností fosfonometoxyetyl (PME) nebo fosfonometoxypropyl (PMP) skupiny. Výchozí ANP jsou sloučeniny:  $\text{PMEA} = 9\text{-}[2\text{-}(\text{fosfonometoxy})\text{etyl}]\text{adenin}$ ;  $\text{PMEDAP} = 9\text{-}[2\text{-}(\text{fosfonometoxy})\text{etyl}]\text{2,6-diaminopurin}$ ;  $(R)\text{-PMPA} = 9\text{-}(R)\text{-}[2\text{-}(\text{fosfonometoxy})\text{propyl}]\text{adenin}$ ;  $(S)\text{-PMPA} = 9\text{-}(S)\text{-}[2\text{-}(\text{fosfonometoxy})\text{propyl}]\text{adenin}$ ;  $(R)\text{-PMPDAP} = 9\text{-}(R)\text{-}[2\text{-}(\text{fosfonometoxy})\text{propyl}]\text{2,6-diaminopurin}$ ;  $(S)\text{-PMPDAP} = 9\text{-}(S)\text{-}[2\text{-}(\text{fosfonometoxy})\text{propyl}]\text{2,6-diaminopurin}$  [43]. Viz obrázek 1 na následující stránce:

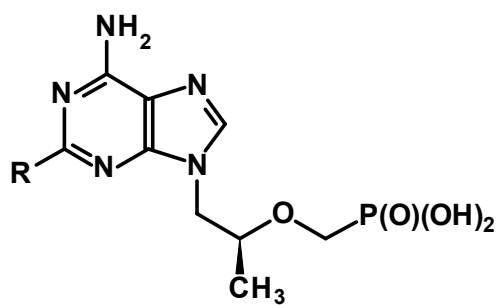




R = H; PMEА (*adefovir*)  
 R = NH<sub>2</sub>; PMEDAP



R = H; (*R*)-PMPA (*tenofovir*)  
 R = NH<sub>2</sub>; (*R*)-PMPDAP



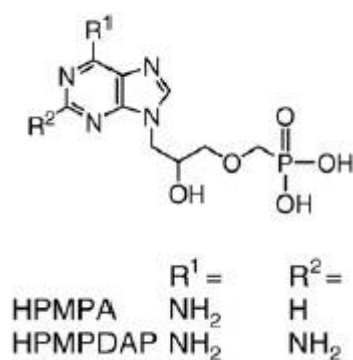
R = H; (*S*)-PMPDAP  
 R = NH<sub>2</sub>; (*S*)-PMPDAP

Obr. 1. Chemická struktura některých základních typů acyklických nukleosidfosfonátů [41].

Výchozí ANP mohou být dále modifikovány náhradou aminoskupiny v poloze N<sup>6</sup> heterocyklické báze adeninu nebo 2,6-diaminopurinu. Aminoskupina je substituována různými monoalkylovými, dialkylovými, cykloalkylovými, alkenylovými nebo rozvětvenými alkylovými skupinami [41, 43].

### *Hydroxylované ANP*

ANP mohou dále obsahovat hydroxylovou skupinu v poloze  $N^9$  heterocyklické báze adeninu nebo 2,6-diaminopurinu, vznikají tak základní sloučeniny 9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]adenin tj. zkráceně HPMPA a 9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin neboli HPMPDAP. Tyto výchozí ANP mohou být také modifikovány substitucí aminoskupiny v poloze  $N^6$  heterocyklické báze adeninu nebo 2,6-diaminopurinu [43, 64]. Vzorce sloučenin HPMPA a HPMPDAP jsou znázorněny na obrázku 2:



**Obr. 2.** Chemická struktura acyklických nukleosidfosfonátů HPMPA a HPMPDAP [47].  
*HPMPA = 9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]adenin; HPMPDAP = 9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin.*

## 1.2. Protivirové spektrum účinku

ANP inhibují replikaci celé řady virů. Jak bylo uvedeno, hlavním mechanismem protivirového účinku těchto látek je inhibice virem indukovaných DNA polymeráz [66] nebo reverzních transkriptáz [67]. Spektrum jejich účinku zahrnuje herpes simplex virus 1 a 2 [68], cytomegalovirus [69], varicella zoster virus [70], Epstein-Barr virus [71], herpetický virus 6 [72], papilloma virus [70], virus hepatitidy B [73]. Co se týče retrovirů, blokují ANP replikaci virů HIV, SIV, MSV, FIV, FLV [13]. Účinek proti jednotlivým typům virů je závislý na chemické struktuře ANP, viz tabulka 1:

Tab. 1. Protivirové spektrum účinku ANP [13, 43, 74].

Hlavní mechanismus účinku ANP:								
<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibice virem indukovaných DNA polymeráz</li> <li>Inhibice reverzních transkriptáz</li> </ul>	PMEA	(R)-PMPA	HPMPC	(S)-PMPA	PMEDAP	(R)-PMPDAP	(S)-PMPDAP	PMEG
Virus								
Herpes simplex virus 1 a 2 (HSV-1, HSV-2)								
Herpetický virus 6 (HHV-6)								
Cytomegalovirus (CMV)			Cidofovir®					
Varicella zoster virus (VZV)								
Epstein-Barr virus (EBV)								
Papilloma virus (HPV)								
Virus hepatitidy B (HBV)	Hepsera®							
Visna virus (VV)								
Moloney sarcoma virus (MSV)								
Friend leukemia virus (FLV)								
Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)		Viread®						
Simian immunodeficiency virus (SIV)								
Feline immunodeficiency virus (FIV)								

## 2. Infekce virem HIV-1 a syndrom získané imunodeficiencie

Infekce virem HIV-1 způsobuje nejzávažnější získanou poruchu buněčné imunity: syndrom získané imunodeficiencie (AIDS). Vybrané informace o tomto onemocnění jsou nejprve shrnuty v tabulce 2:

Tab. 2. *Imunodeficiencie navozená virem HIV (upraveno dle [7, 16, 24, 75-77]).*

<b>Příčiny</b>	Infekce virem HIV-1 nebo HIV-2
<b>Patogeneze imunodeficiencie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infekce buněk prezentujících antigen a infekce lymfocytů CD4+</li> <li>• Eliminace lymfocytů CD4+ v důsledku cytopatického efektu viru HIV-1 a cytotoxických imunitních mechanismů</li> <li>• Tymická dysfunkce: neschopnost regenerace počtu a funkce lymfocytů CD4+</li> <li>• Destrukce makrofágů a jiných antigen prezentujících buněk</li> <li>• Porucha tvorby protilátek, vznik autoprotilátek</li> <li>• Porucha cytotoxické aktivity lymfocytů T a makrofágů</li> <li>• Omezení funkce Th1 lymfocytů (snížení produkce IFN-<math>\gamma</math>, IL-2)</li> <li>• Deregulace tvorby cytokinů (zahrnujících chemokiny)</li> <li>• Genetická vnímavost hostitele k HIV-1 infekci</li> </ul>
<b>Závažnost imunodeficiencie</b>	Mírná, středně těžká až velmi těžká
<b>Průběh infekce</b>	<p>I. Akutní fáze (nespecifické příznaky připomínají těžší virové onemocnění nebo nejsou přítomny)</p> <p>II. Asymptomatická fáze</p> <p>III. Symptomatická fáze: propuknutí infekčních onemocnění, vznik nádorových chorob, projevy autoimunity</p> <p>IV. vlastní AIDS</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Infekce způsobené oportunními mikroorganismy: kandidóza, pneumocystóza, mykobakteriózy, toxoplazmóza, kryptokokóza, virové infekce (CMV, HSV-1, HSV-2, VZV, HBV, HTLV-II), infekce běžnými patogeny</li> <li>• Malignity (Kaposiho sarkom, nehodgkinské lymfomy, lymfom mozku)</li> <li>• Postižení CNS</li> </ul>
<b>Diagnóza</b>	Průkaz protilátek proti HIV (ELISA) Western blot; PCR
<b>Možnosti léčby</b>	<p>1. Kauzální (antiretrovirová terapie): inhibitory reverzní transkriptázy, inhibitory HIV-1 proteázy, inhibitor HIV-1 fúze, inhibitory vstupu HIV-1 do buňky, inhibitory integrázy, imunomodulace</p> <p>2. Symptomatická</p>
<b>Prevence</b>	<p>1. Zamezení vzniku infekce</p> <p>2. Perspektivně vakcinace?</p>

Jednou z příčin vzniku imunodeficiencie v průběhu infekce HIV-1 je deregulace exprese cytokinů zahrnujících chemokiny [29]. Vyskytuje se jak zvýšení, tak snížení

produkce a/nebo aktivity cytokinů [78]. Změny v produkci cytokinů ovlivňují funkce imunitního systému a cytokiny samotné mohou potlačovat nebo stimulovat replikaci HIV-1 na různých úrovních jeho životního cyklu, jak je uvedeno níže.

## 2.1. Replikace viru HIV-1 a cytokiny

Pochody při replikaci viru HIV-1 zahrnují vstup viru do buňky (adsorpci a penetraci), odpláštění viru („uncoating“), reverzní transkripci RNA na DNA, integraci virové DNA do genomu hostitele, syntézu virové RNA a proteinů, štěpení proteinů HIV-1 proteázou, sestavení virionu („assembling“) a uvolnění viru z buňky [75, 79]. Literární údaje o účincích cytokinů na replikaci viru HIV-1 bývají někdy rozporné. Záleží na tom, zda se jednalo o studie prováděné za podmínek *in vitro* nebo *in vivo* a na zvoleném experimentálním přístupu [78].

### *Vstup viru HIV-1 do buňky*

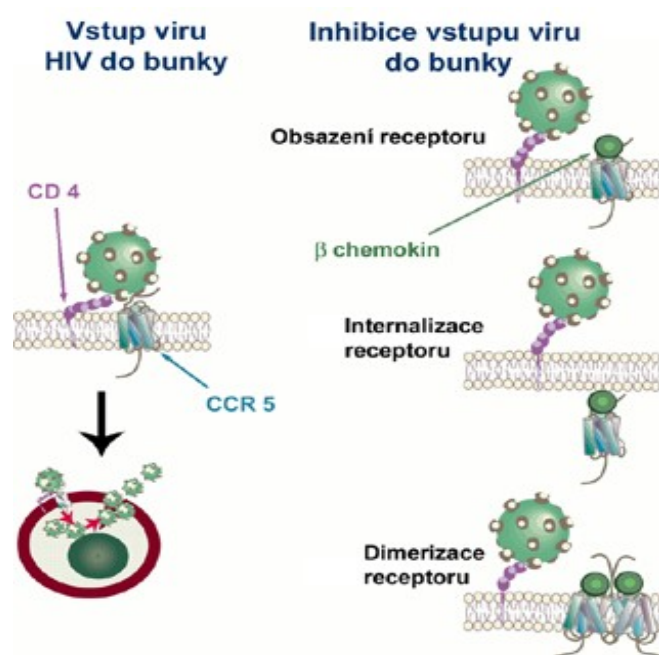
Virus lidské imunodeficiency 1 infikuje T lymfocyty CD4+, monocyty, makrofágy a dendritické buňky [80]. Váže se glykoproteinovým obalem gp120 na receptor CD4 a jako koreceptory používá receptory pro chemokiny CCR5 a CXCR4 [33, 76]. HIV-1 může pro vstup do buňky využívat další chemokinové receptory jako např. CCR2 a CCR3 [26, 81]. Přírodní ligandy pro chemokinové receptory interferují se vstupem viru HIV-1 do permissivních buněk. Viz tabulka 3:

Tab. 3. *Chemokinové receptory jako HIV-1 koreceptory [26, 49, 81-86].*

<b>Receptor</b>	<b>Ligand</b>
CCR2	MCP-1, MCP-2, MCP-3
CCR3	RANTES, MCP-2, MCP-3
<b>CCR5</b>	<b><u>RANTES, MIP-1, MCP-1, MCP-2, MCP-3</u></b>
CXCR4	SDF-1

Ligandy receptoru CCR5 potlačující šíření HIV-1 infekce jsou především  $\beta$ -chemokiny RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  a MCP-2 [49, 84].

Představy o inhibičním vlivu  $\beta$ -chemokinů na šíření HIV-1 infekce jsou znázorněny na obrázku 3 na následující straně (upraveno dle [87]):



*Obr. 3. Hypotézy o mechanismu účinku, jakým  $\beta$ -chemokiny zabraňují vstupu viru HIV-1 do vnímavých buněk a tím dalšímu šíření infekce [87].  $\beta$ -chemokiny svojí přítomností znemožňují fúzi molekuly CD4 a receptoru CCR5 a tím průniku viru do nitra buňky.*

Jediným ligandem receptoru CXCR4 je  $\alpha$ -chemokin SDF-1, který také potlačuje infekci virem HIV-1 [83]. Penetraci viru HIV-1 do buňky omezují dále cytokiny IL-16 a IFN- $\gamma$  a to mechanismem snížení exprese molekuly CD4 [88, 89]. Po vazbě viru HIV-1 na receptor CD4 a chemokinový koreceptor dochází k fúzi virionu s membránou hostitelské buňky, která je zprostředkována obalovým glykoproteinem viru HIV-1 gp41 [75].

### ***Transkripce a translace viru HIV-1***

Po vstupu viru HIV-1 do buňky dochází k odstranění virových obalů („uncoating“) a genetická informace viru uložená ve virové RNA se přepisuje pomocí reverzní transkriptázy do dvojšroubovicové DNA, která se prostřednictvím HIV-1 integrázy integruje do genomu hostitele ve formě proviru [75]. Proces reverzní transkripce inhibuje IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$ , naproti tomu GM-CSF jej aktivuje [35, 90]. Po aktivaci buňky imunitními podněty dojde k přepisu virové DNA do jednovláknové RNA. Proces transkripce viru HIV-1 je negativně ovlivňován IL-1ra, IL-16, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  a v závislosti na použitém experimentálním modelu mohou transkripci HIV-1 inhibovat IL-4 a TGF- $\beta$  [30, 90]. Induktivní efekt na transkripci viru HIV-1 mají cytokiny TNF- $\alpha/\beta$ , IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-7, IFN- $\gamma$ , IL-18 [24, 29]. IL-10 má zřejmě bimodální funkci: aktivuje transkripci HIV-1, avšak inhibičním vlivem na sekreci

prozáněťových cytokinů blokuje replikaci viru HIV-1 [24, 90]. Bifunkční vliv na replikaci viru HIV-1 mají dále cytokiny IL-2 a IL-15, které působí mechanismem aktivace genové exprese prozáněťových cytokinů [24]. Genetická informace jednořetězcové RNA viru HIV-1 je na ribosomech hostitelské buňky překládána do polyproteinů, které jsou po glykosylaci v Golgiho aparátu štěpeny proteasami na virové proteiny a glykoproteiny [75]. Translaci HIV-1 RNA aktivuje IL-6, naproti tomu IL-13 působí inhibičně [90].

### ***Sestavení virionu HIV-1 a uvolnění z buňky***

Z virových proteinů a glykoproteinů se sestavují nové viriony HIV-1, do kterých se zasouvají dvě kopie virové jednořetězcové RNA („virus assembly“). Vzniklé viriony jsou pak pomocí aktinových vláken posunovány směrem k cytoplazmatické membráně, kterou procházejí a získávají tak lipidické obaly (pučení: „budding“). Tvorba virionů má za následek lýzu hostitelské buňky [75, 77]. Nově vzniklé viry infikují další buňky. Virus HIV-1 se replikuje zejména v aktivovaných T-lymfocytech. Značný význam má i funkční inaktivace a/nebo destrukce makrofágů, které jsou také infikovány virem HIV-1 a jsou hlavním zdrojem pro další šíření infekce [7, 76, 91]. Produkci nových virových partikulí může ovlivnit IFN- $\gamma$ , díky jehož působení se nově vzniklé virové částice inkorporují do intracytoplazmatických vakuol a neopouštějí buňku. IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$  potlačují proces sestavení virionu HIV-1 a rovněž blokuje uvolňování nových virů z buňky po jejich obalení plazmatickou membránou [35, 90].

## 3. Cytokiny

### 3.1. Obecné vlastnosti cytokinů

Cytokiny jsou malé bílkovinné molekuly, které jsou secernovány imunitními buňkami, a mají velmi krátký biologický poločas účinku. Produkovány jsou především Th lymfocyty a monocyty/makrofágy. Působí autokrinně nebo na jiné imunitní buňky parakrinně nebo endokrinně po transportu cévním řečištěm. Společné vlastnosti cytokinů jsou pleiotropie, redundance, synergie a antagonismus. Pleiotropie znamená, že jeden cytokin má rozličné biologické účinky na různé cílové buňky. Redundance znamená, že stejný účinek je zprostředkován více než jedním cytokinem. Účinky cytokinů jsou často navzájem synergické. Účinky cytokinů jsou také samoregulovány, a to jejich vzájemně protichůdným působením – antagonismus [76, 92, 93]. Cytokiny se dělí na interleukiny, chemokiny (chemotaktické cytokiny), interferony, transformující růstové faktory, faktory stimulující kolonie, faktory nádorové nekrózy a jiné růstové faktory [76, 92, 93]. Z funkčního hlediska se cytokiny dělí do na:

1. Prozáněťové cytokiny včetně chemokinů. Patří sem např. cytokiny IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha/\beta$  a další. Prozáněťové chemokiny jsou IL-8, IP-10, MIG, MIP-1 $\alpha/\beta$ , MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, RANTES aj.
2. Protizáněťové cytokiny IL-1Ra, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ .
3. Cytokiny s aktivitou růstových faktorů hematopoetických buněk: IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, GM-CSF, M-CSF, erytropoetin.
4. Cytokiny uplatňující se v humorální imunitě (Th2 cytokiny): IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ .
5. Cytokiny uplatňující se v buněčně zprostředkované imunitě (Th1 cytokiny): IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha/\beta$ , GM-CSF.
6. Cytokiny s protivirovým účinkem: interferony [76, 92].

Další možná klasifikace cytokinů je dělení cytokinů na imunostimulační (např. IL-2) a imunosupresivní (např. TGF- $\beta$ ) [94, 95]. Rozlišují se také pronádorové/protinádorové cytokiny a dále proangiogenní/antiangiogenní cytokiny [74]. Z hlediska patogeneze infekcí má význam členění cytokinů na Th1/Th2 cytokiny. Th1 cytokiny (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ )



aktivují makrofágy a následně dochází k fagocytóze mikroorganismů (např. mykobakterií). Th1 cytokiny stimulují u CD8<sup>+</sup> T lymfocytů sekreci IL-2, což vede k diferenciaci na cytotoxické T lymfocyty. Cytotoxické T lymfocyty poté způsobují zánik buněk napadených virovými infekcemi [96]. Při progresi onemocnění AIDS dochází k oslabení Th1 imunitní odpovědi, která je pro kontrolu infekce virem HIV-1 důležitější. Th1 lymfocyty ztrácejí funkční kapacitu pro produkci cytokinů, jako např. IL-2 a IFN- $\gamma$ . Převaha Th2 imunitní odpovědi, která může být způsobena genetickými faktory, usnadňuje rozvoj HIV-1 infekce [16, 96].

### 3.2. Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  (kachektin) byl původně popsán jako cytokin způsobující nekrózu u nádorových buněk. Účastní se transdukce apoptotických signálů. Je pokládán za prototyp prozánětového cytokinu [97]. TNF- $\alpha$  iniciuje kaskádu produkce dalších cytokinů zahrnující např. IL-1 [98], IL-6 [78], IL-10 [99], IFN- $\gamma$ , GM-CSF, M-CSF, TGF- $\beta$  a dalších působků [100]. Dochází k tomu aktivací buněčných transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B, AP-1, které indukují expresi cytokinů a dalších molekul [97]. TNF- $\alpha$  indukuje také expresi chemokinů RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  [52], MCP-1, MCP-3 a eotaxinu [101].

Množství buněk, které exprimují TNF- $\alpha$  je enormní a zahrnuje např. makrofágy, CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, monocyty, žírné buňky, dendritické buňky, osteoblasty, epitelové buňky střeva, pankreatické buňky, neurony, buňky dřeně nadledvin, keratinocyty a jiné buňky [97].

TNF- $\alpha$  se uplatňuje v patogenezi kachexie u rozličných chorob charakterizovaných celkově špatným stavem, revmatoidní artritidy, Crohnovy nemoci, septického šoku, sarkoidózy aj. chorob [97, 100].

V klinické medicíně se využívají např. léčiva Etanercept® a Humira® (léčba revmatoidní artritidy), Remicade® (léčba Crohnovy nemoci a revmatoidní artritidy), která antagonizují účinky TNF- $\alpha$ . K nežádoucím účinkům těchto léčiv patří však zvýšený výskyt infekcí, včetně sepse a tuberkulózy a dále hematologických malignit [102].

Produkcí TNF- $\alpha$  inhibuje také řada jiných léčiv (i když ne cíleně), jako např. methotrexát, sulfasalazin, soli zlata, chlorochin, hydroxychlorochin a kortikosteroidy [103]. Úloha TNF- $\alpha$  v patogenezi virových a jiných infekcí je probírána v diskuzní části disertační práce.



### 3.3. Interleukin-10 (IL-10)

IL-10 patří mezi protizáněťové cytokiny. IL-10 se vyznačuje schopností inhibovat syntézu ostatních cytokinů Th lymfocyty, NK buňkami a makrofágy, a proto byl původně nazýván inhibiční faktor syntézy cytokinů. Jedná se např. o prozáněťové cytokiny IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  a GM-CSF [104].

IL-10 inhibuje také produkci chemokinů jako např. MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  a dále IL-8 [105]. Vliv na produkci některých jiných chemokinů např. MCP-1 se uvádí jako inhibiční [106] nebo naopak stimulační [105].

IL-10 snižuje schopnost monocytů/makrofágů prezentovat antigen. Molekulárním mechanismem je snížení exprese molekul MHC II. třídy. Inhibuje proliferaci CD4+ lymfocytů. Stimuluje naopak proliferaci B lymfocytů a jejich diferenciaci na plazmatické buňky. Ochraňuje B lymfocyty před apoptózou [78, 107].

Protizáněťový účinek IL-10 u monocytů/makrofágů a dendritických buněk spočívá ve snížení produkce mediátorů zánětu jako cytokinů, chemokinů, prostaglandinů, oxidu dusnatého aj. molekul [108]. U granulocytů je silný protizáněťový účinek IL-10 zprostředkován kromě inhibice syntézy cytokinů/chemokinů také snížením produkce superoxidových aniontů a syntézy cyklooxygenázy-2 [109, 110].

Buňky, které produkují IL-10 zahrnují např. Th2 a B lymfocyty, makrofágy, NK buňky, žírné buňky, monocyty, eosinofily, dendritické buňky, jaterní buňky, keratinocyty a melanomové buňky [104, 110].

IL-10 hraje roli v patogenezi septikémie a septického šoku, revmatoidní artritidy, zánětlivých onemocnění střev (např. Crohnova nemoc), akutní pankreatitidy, cukrovky, autoimunitních onemocnění, infekčních onemocnění aj. chorob [55, 107, 110, 111].

Expese IL-10 je zvýšena např. u následujících virových infekcí: infekce virem Epstein-Barrové, hepatitidy B a HIV-1 [112]. Role IL-10 v patogenezi HIV-1 infekce a jiných virových infekcí je probírána v diskuzní části disertační práce. Tamtéž se diskutuje úloha IL-10 za fyziologických nebo imunopatologických stavů.

## 4. Chemokiny

### 4.1. Názvy chemokinů

Chemokiny lze označovat různými způsoby. Původní názvy chemokinů lépe vystihují podstatu jejich biologických účinků v organismu. Např. MIP-1 $\alpha$  je „macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ “. Novější nomenklatura klade naproti tomu důraz na chemickou strukturu chemokinů [113]. Vznikají tak dvě hlavní skupiny: CXC-chemokiny ( $\alpha$ -chemokiny) a CC-chemokiny ( $\beta$ -chemokiny). U CXC-chemokinů je mezi prvními dvěma molekulami cysteinu přítomen zbytek jiné aminokyseliny. U CC-chemokinů jsou první dvě molekuly cysteinu spojeny přímo. V tabulce 4 a 5 je uveden přehled vybraných chemokinů, které mají vztah k patogenezi HIV-1 infekce nebo jiných virových onemocnění. V textu disertační práce autor upřednostnil původní, zažité názvy chemokinů. V nadpisech je však pro úplnost uveden i nový, systematický název.

Tab. 4.  $\alpha$ -chemokiny (CXC-chemokiny)

Zkratka	Nezkrácený, původní název	Nový, systematický název
<b>IL-8</b>	Interleukin-8	CXCL8
<b>MIG</b>	Monokine induced by IFN- $\gamma$	CXCL9
<b>IP-10</b>	IFN- $\gamma$ -inducible protein-10	CXCL10
<b>SDF-1</b>	Stroma cell derived factor-1	CXCL12

Tab. 5.  $\beta$ -chemokiny (CC-chemokiny)

Zkratka	Nezkrácený, původní název	Nový, systematický název
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemotactic protein-1	CCL2
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$	CCL3
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$	CCL4
<b>RANTES</b>	Regulated on activation of normal T cell expressed and secreted	CCL5
<b>MCP-3</b>	Monocyte chemotactic protein-3	CCL7
<b>MCP-2</b>	Monocyte chemotactic protein-2	CCL8
<b>Eotaxin</b>	Eotaxin	CCL11
<b>MCP-4</b>	Monocyte chemotactic protein-4	CCL13
<b>MDC</b>	Macrophage-derived chemokine	CCL22

## 4.2. Obecné vlastnosti chemokinů

Od doby objevu prvního chemotaktického cytokinu IL-8 v roce 1987 bylo identifikováno téměř 50 chemokinů a 20 jejich receptorů. Intenzivní základní i aplikovaný výzkum těchto molekul značně rozšířil naše znalosti o fyziologii a patofyziologii imunitního systému i jiných systémů u člověka i zvířat a přispěl k možnosti vývoje nových léčiv, která modulují aktivitu cytokinů zahrnujících chemokiny [114, 115].

Chemokiny se uplatňují jako signální molekuly během fyziologických a patofyziologických. Mohou ovlivňovat pohyb, diferenciaci, funkční aktivitu, růst, ale i smrt buněk. Hrají základní roli při vzniku a vývoji imunitního systému a regulaci jeho obranných funkcí. V některých případech vykazují chemotaktické cytokiny vlastnosti hormonů [116, 117].

Účastní se řady biologických procesů zahrnujících např. regulaci embryonálního vývoje, hematopoezi a hemostázu, stimulaci nebo inhibici angiogeneze, hojení ran, komunikaci mezi neuroendokrinním a imunitním systémem. Chemokiny jsou klíčovými molekulami, které usnadňují migraci specifických populací leukocytů do ložisek zánětu a následnou aktivaci těchto buněk spojenou s degranulací a uvolněním zánětlivých i jiných mediátorů [114, 118].

Z hlediska infekční imunologie jsou chemokiny důležité pro funkce dendritických buněk, diferenciaci B a T buněk, regulaci Th1 a Th2 odpovědi, interakce mezi leukocyty a endotelem, zajištění slizniční a podkožní imunity a imunitní odpovědi na virovou infekci včetně infekce virem HIV-1 [117, 119].

V klinické praxi se chemokiny a jejich receptory významně podílejí na patogenezi následujících chorob: akutní i chronická zánětlivá onemocnění bez ohledu na jejich etiologii (např. artritida) [118, 120], ateroskleróza a ischemická choroba srdeční [101, 121], alergická rinitida a bronchiální astma [122, 123], roztroušená skleróza mozkomíšni a psoriáza [124, 125], mikrobiální, parazitární a virové infekce [126-128], nádorová onemocnění [114, 129].

V transplantační medicíně se chemokiny za spoluúčasti adhezivních molekul podílejí na akutní i chronické rejekci renálního alloštěpu, případně na vzniku cyklosporinové nefropatie [94, 95, 130].

Možnosti antichemokinové farmakoterapie zahrnují podávání monoklonálních protilátek, antagonistů receptorů a zásah do přenosu signálu inhibitory kináz nebo transkripčních faktorů [131, 132]. Chemokiny se na rozdíl od ostatních cytokinů váží na transmembránové helikální receptory spřažené s G proteiny, tedy na receptory, které jsou již více než 25 let místem zásahu mnoha úspěšných léčiv. V současné době probíhají např. klinické studie s antagonisty chemokinových receptorů CCR3 (receptor pro MCP-2, MCP-3, RANTES) nebo CXCR2 (receptor pro IL-8), jejichž podávání by mělo mít za následek potlačení přísunu imunitních buněk do ložiska imunopatologické reakce [132]. V další části textu jsou obecně probírány důležité chemokiny z hlediska ovlivnění šíření HIV-1 infekce (RANTES, MIP-1, SDF-1, monocytární chemotaktické proteiny).

### 4.3. RANTES/CCL5 (Regulated on activation of normal T cell expressed and secreted)

RANTES je prozáněťový chemokin produkovaný CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, makrofágy, epiteliálními buňkami, fibroblasty a destičkami. Váže se na receptory CCR1, CCR3, CCR4 a CCR5 [121]. Receptory CCR3 a CCR5 mají funkci koreceptorů pro vstup viru HIV-1 do buňky [26].

Sekreci RANTES lze indukovat např. cytokiny TNF- $\alpha$  a IL-1 [97, 98]. Naproti tomu cytokiny IFN- $\gamma$ , IL-6 a chemokin TGF- $\beta$  nemají schopnost zvýšit syntézu RANTES [133]. RANTES je schopen indukovat expresi cytokinů IL-6, TNF- $\alpha$  a chemokinů MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  [134].

RANTES je stimulem pro migraci lymfocytů, monocytů, eosinofilů, basofilů, ale nikoliv neutrofilů [121, 125]. V závislosti na koncentraci zvyšuje účinky cytotoxických T lymfocytů a aktivuje T lymfocyty, monocyty a neutrofile. Aktivace T lymfocytů RANTES je následována proliferací T buněk a uvolňováním prozáněťových cytokinů IL-2, IFN- $\gamma$  a chemokinů MIP-1 $\beta$  [116, 135, 136]. Dále RANTES aktivuje rovněž eosinofily a způsobuje zvýšení produkce eosinofilního kationického proteinu. Aktivace basofilů působením RANTES má za následek uvolnění histaminu. RANTES má přímé mikrobicidní účinky a byl proto zařazen mezi kinocidiny (mikrobicidní chemokiny) [133].

RANTES se podílí na patogenezi artritických onemocnění [120], chronické obstrukční plicní nemoci [122], astmatu a alergie [118], kožních onemocnění [125], růstu a metastazování melanomu [137], mesangioproliferativní glomerulonefritidy a rejekci renálního aloštěpu [133].

Úloha RANTES v patogenezi HIV-1 infekce a jiných virových chorob je probírána v diskuzní části disertační práce.

#### 4.4. MIP-1 $\alpha$ /CCL3 (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ )

MIP-1 $\alpha$  a MIP-1 $\beta$  jsou vysoce příbuzné proteiny, které se řadí mezi  $\beta$ -chemokiny. Geny pro myši a lidský MIP-1 $\alpha$  mají podobnou strukturu, geny pro myši a lidský MIP-1 $\beta$  jsou odlišné. MIP-1 $\alpha$  se váže na receptory CCR1 a CCR5, MIP-1 $\beta$  pouze na receptor CCR5 [138]. Jak MIP-1 $\alpha$ , tak MIP-1 $\beta$  inhibují vazbou na receptor CCR5 vstup viru HIV-1 do buňky a potlačují tak další šíření infekce [49].

MIP-1 $\alpha$  je v nízkém množství produkován konstitutivně celou řadou buněk, většinou je však jeho sekrece indukována některým ze zánětlivých stimulů. Sekreci MIP-1 $\alpha$  stimulují např. lipopolysacharid, IL-1 $\beta$  a IFN- $\gamma$  [139]. Exprese MIP-1 $\alpha$  je přítomná u monocytů, makrofágů, B i T lymfocytů, NK buněk, dendritických buněk, neutrofilů, eosinofilů, osteoblastů, astrocytů, epiteliálních buněk, fibroblastů aj. buněk [138]. Inhibici produkce MIP-1 $\alpha$  způsobují protizáněťové cytokiny IL-4, IL-10 a kortikoidy [138, 140]. MIP-1 $\alpha$  indukuje syntézu prozáněťových cytokinů jako IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$  u fibroblastů a makrofágů [139].

Podobně jako ostatní prozáněťové chemokiny se MIP-1 $\alpha$  váže na proteoglykany na povrchu endoteliálních buněk nebo v extracelulární matrix, což usnadňuje funkční interakce MIP-1 $\alpha$  s receptory leukocytů a zvyšuje tak jeho biologickou aktivitu. Následně tak může dojít k migraci makrofágů, lymfocytů a NK buněk do místa průniku infekčních patogenů a spuštění obranné zánětlivé odpovědi [138, 141].

MIP-1 $\alpha$  se podílí na patogenezi osteoartritidy a revmatoidní artritidy, roztroušené

sklerózy mozkomíšní, astmatu, gastritidy indukované *Helicobacter pylori*, rejekce štěpu, glomerulonefritidy aj. chorob [114, 132, 138].

Úloha MIP-1 $\alpha$  v patogenezi HIV-1 infekce a jiných virových chorob je probírána v diskuzní části disertační práce.



## 4.5. Monocytární chemotaktické proteiny

Monocytární chemotaktické proteiny (MCP) patří do samostatné skupiny prozáněťových  $\beta$ -chemokinů. Patří sem působky MCP-1/CCL2, MCP-2/CCL8, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13 (přítomen pouze u lidí) a MCP-5/CCL12 (přítomen pouze u myši). Nejvíce studovaným je MCP-1, který byl také prvním objeveným  $\beta$ -chemokinem. K této rodině chemotaktických cytokinů se ještě řadí geneticky příbuzná molekula eotaxinu/CCL11 [101]. Jak vyplývá z názvu je hlavní funkcí MCP zprostředkovat chemotaxi monocytů. MCP jsou však také nezbytné pro migraci aktivovaných CD4+ a CD8+ T lymfocytů do místa vzniku infekce [119].

MCP jsou produkovány tkáňovými buňkami, leukocyty (monocyty/makrofágy) a nádorovými buňkami [101]. Jejich exprese je indukována lipopolysacharidem a četnými cytokiny jako např. IL-1, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ . Inhibici sekrece způsobují kortikoidy a cytokiny IL-10, IL-13 [101, 142].

MCP se váží na četné chemokinové receptory: CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 a CCR10 [101, 142]. Některé z nich mají funkci koreceptorů pro vstup HIV-1 do buňky, a proto MCP mohou účinně blokovat replikaci viru HIV-1 (především MCP-2 a MCP-3) [21, 26, 32, 84, 86]. Viz tabulka 6:

*Tab. 6. Chemokinové receptory pro monocytární chemotaktické proteiny jako HIV-1 koreceptory [26, 82, 101, 142].*

<b>Receptor</b>	<b>Ligand</b>
<b>CCR5</b> (hlavní koreceptor pro vstup HIV-1 do buňky)	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4
<b>CCR3</b>	MCP-2, MCP-3, MCP-4

CCR2	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4
------	----------------------------

V některých experimentech se však zjistilo, že MCP-1 také urychluje replikaci viru HIV-1 [28]. Na druhé straně tento chemokin ochraňuje neurony před buněčnou smrtí indukovanou NMDA a nebo tímto proteinem viru HIV-1 [143].

Kromě infekce virem HIV-1 může mít MCP-1 protivirové účinky u nákazy cytomegalovirem [144, 145]. Při napadení organismu mykobakteriemi a listeriemi hraje MCP-1 zřejmě nepříznivou roli [101, 146]. Naproti tomu u parazitární infekce *Schistosoma mansoni* má MCP-1 protektivní úlohu [101].

MCP-2 potlačuje šíření HIV-1 infekce vazbou na receptor CCR5 [84]. O roli MCP-2 v patogenezi infekce virem hepatitidy C existuje málo údajů, zdá se však, že genotyp hostitele nemá vliv na nosičství viru a míru zánětlivé odpovědi [147].

Co se týče nádorových chorob, může MCP-1 uspořádat růst např. Kaposiho sarkomu. V řadě studií působil však MCP-1 antineoplasticky [148]. MCP-3 může mít protinádorové účinky a uvažuje se o jeho využití v genové terapii [36, 37, 149, 150].

MCP a eotaxin hrají významnou roli při vzniku nebo progresi aterosklerózy (MCP-1), roztroušené sklerózy mozkomíšní (MCP-1,-2,-3), revmatoidní artritidy a osteoartritidy (MCP-1), astmatu a alergické rinitidy (MCP-1,-3,eotaxin), ulcerativní kolitidy a Crohnovy nemoci (MCP-1, eotaxin), IgA nefropatie a akutní rejeckce renálního štěpu (MCP-1) [101].

#### 4.6. SDF-1/CXCL12 (stromal cell derived factor-1)

SDF-1 je  $\alpha$ -chemokin, který je nezbytný pro hematopoezu, růst a vývoj organismu [151, 152]. Vyskytuje se ve dvou izoformách, a to jako SDF-1 $\alpha$  a SDF-1 $\beta$ . Myší a lidské geny pro SDF-1 $\alpha$  jsou téměř identické [153]. SDF-1 se váže na receptor CXCR4 a je jediným ligandem tohoto receptoru. CXCR4 je druhý hlavní koreceptor pro vstup viru HIV-1 do buňky, proto má SDF-1 schopnost inhibovat replikaci tohoto viru [83].

SDF-1 je exprimován u neuronů, fibroblastů, CD 34+ kmenových buněk, tyrocytů, kmenových buněk, tymocytů, endoteliálních buněk. Výjimkou jsou krevní buňky [153-156]. SDF-1 je konstitutivně exprimován ve většině tkání [157]. U myší je exprese SDF-1 přítomná např. ve slezině [158].

Snížení exprese SDF-1 bylo pozorováno u fibroblastů díky působení cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-1 [159]. Zvýšení exprese SDF-1 bylo posáno při aplikaci cyklofosfamidu v hematopietických tkáních [160]. SDF-1 aktivuje řadu signálních drah, např. způsobuje fosforylaci kináz MAPK p42/44 a aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. Následně SDF-1 zvyšuje expresi molekul jako TNF- $\alpha$ , IL-1, RANTES, VEGF a dalších [152, 161].

SDF-1 je chemokin, který působí chemoatraktivně na NK buňky, T buňky, monocyty, plazmatické a dendritické buňky, nikoliv však na neutrofile [152, 153]. Klíčovou úlohu má SDF-1 při proliferaci B buněk. Byla vyslovena hypotéza, že SDF-1 patří spíše mezi chemokiny, které se podílejí na specifické imunitní odpovědi organismu, než že se jedná o pouhý mediátor zánětu [157].

SDF-1 je chemokin nezbytný pro normální embryonální vývoj (především nervového a srdečního systému). Zvířecí mutanti SDF-1 (-/-) umírají perinatálně na srdeční anomálie [153]. Možnosti ovlivnění genové exprese SDF-1 a receptoru CXCR4 se kromě infekce virem HIV-1 a syndromu AIDS intenzivně studují u nádorových chorob [162].

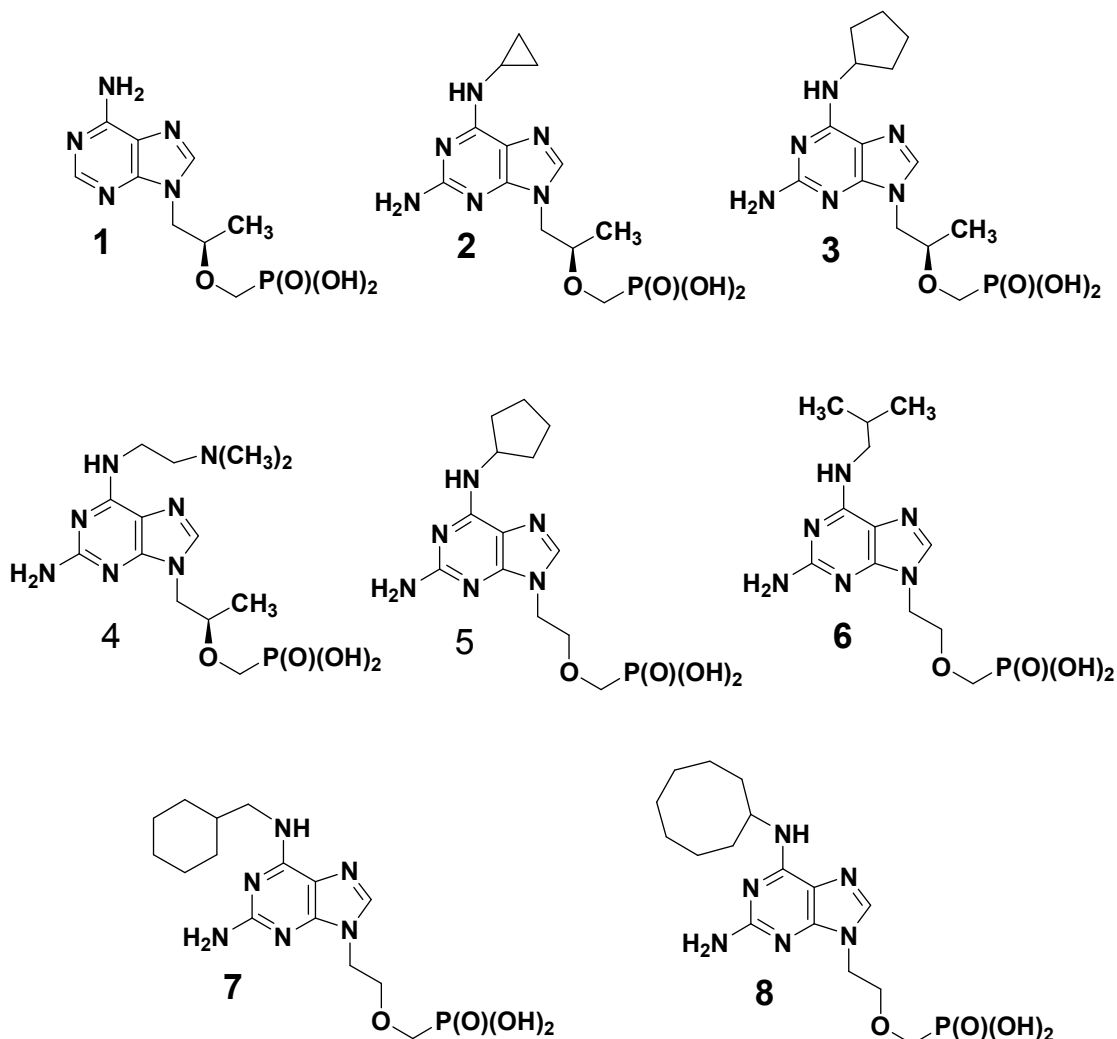
## IV. Experimentální část

### 1. Materiál a metody

#### 1.1. Acyklické nukleosidfosfonáty

**Všechny testované ANP byly syntetizovány v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR prof. RNDr. Antonínem Holým a spol. [64, 65]. Výčet všech testovaných ANP je uveden v příloze č. 2 (publikace č. 2) a v příloze č. 4 (publikace č.4) [41, 47].**

**Chemická struktura a úplné názvy nejčastěji testovaných ANP je uvedena na následující straně na obrázku 4 (schéma poskytl prof. RNDr. Antonín Holý):**



Obr. 4. Chemická struktura nejčastěji testovaných acyklických nukleosidfosfonátů. ANP 1 = 9-(R)-[2-(fosfonometoxy)propyl]adenin [(R)-PMPA; tenofovir], ANP 2 = N<sup>6</sup>-cyklopropyl-(R)-9-[2-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin [N<sup>6</sup>-cyklopropyl-(R)-PMPDAP], ANP 3 = N<sup>6</sup>-cyklopentyl-(R)-9-[2-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin [N<sup>6</sup>-cyklopentyl-(R)-PMPDAP], ANP 4 = N<sup>6</sup>-dimethylaminoethyl-(R)-9-[2-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin [N<sup>6</sup>-dimethylaminoethyl-(R)-PMPDAP], ANP 5 = N<sup>6</sup>-cyklopentyl-9-[2-(fosfonometoxy)etyl]2,6-diaminopurin [N<sup>6</sup>-cyklopentyl-PMEDAP], ANP 6 = N<sup>6</sup>-izobutyl-9-[2-(fosfonometoxy)etyl]2,6-diaminopurin [N<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP], ANP 7 = N<sup>6</sup>-cyklohexylmetyl-9-[2-(fosfonometoxy)etyl]2,6-diaminopurin [N<sup>6</sup>-cyklohexylmetyl-PMEDAP], ANP 8 = N<sup>6</sup>-cyklooktyl-9-[2-(fosfonometoxy)etyl]2,6-diaminopurin [N<sup>6</sup>-cyklooktyl-PMEDAP].

Zásobní roztoky ANP byly připraveny rozpuštěním v nekompletním mediu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich). Před použitím byly filtrovány přes sterilní 0.22 µm filtry (Costar). Roztoky byly uchovávány při teplotě -20 °C po dobu nepřesahující 4 týdny. Možná kontaminace lipopolysacharidem byla vyloučena použitím testu „Limulus Amoebocyte Lysate Assay“ (Kinetic-QCL; Biowhittaker). Požadované koncentrace pro imunobiologické testování se připravily zředěním v kompletním RPMI-1640 mediu.

## 1.2. Antagonisté adenosinových receptorů

Pro studium mechanismů genové exprese cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a chemokinů RANTES, MIP-1 $\alpha$  po aplikaci ANP se používal nescifický antagonist adenosinových receptorů A<sub>1/2A/2B/3</sub>, což je sloučenina s označením CGS-15943 (9-chloro-2-(2-furantyl)-[1,2,4]triazolol[1,5-*c*]quinazolin-5-amin).

Dále se používali specifictí antagonisté jednotlivých receptorů pro adenosin: antagonist adenosinových receptorů A<sub>1</sub> DCCPX (8-cyklopentyl-1,3-dipropylxantin), antagonist adenosinových receptorů A<sub>2A</sub> CSC (8-(3-chlorostyryl)kofein), antagonist adenosinových receptorů A<sub>2B</sub> Alloxazin (benzo[g]pteridin-2,4(1H,3H)-dion), antagonist adenosinových receptorů A<sub>3</sub> MRS-1191 (3-etyl-5-benzyl-2-metyl-4-fenyletynyl-6-fenyl-1,4-( $\pm$ )dihydropyridin-3,5-dikarboxylát).

Všichni antagonisté adenosinových receptorů byli zakoupeni u firmy Sigma-Aldrich. Zásobní roztoky byly připraveny v roztoku dimetylsulfoxidu (DMSO; Sigma-Aldrich). Do buněčných kultur makrofágů byli antagonisté (50 µM) přidáni 20 minut před aplikací ANP (50 µM).

## 1.3. Lipopolysacharid

Efekt ANP na genovou expresi cytokinů, chemokinů a chemokinových receptorů se většinou porovnával s lipopolysacharidem (LPS) (*Escherichia coli* O55:B5, BioWhittaker), který sloužil jako referenční kontrola. Aplikoval se v dávkách 0.1 µg/ml až 1 µg/ml.



## 1.4. Pokusná zvířata

K pokusům se používaly myši samice inbredního kmene C57BL/6 staré 8-10 týdnů (Charles River Deutschland, Sulzfeld) . Byly chovány ve skupinách po osmi v laminárním boxu na ustájení zvířat (ESI Flufrance, Wissous). Světelný režim byl od 6:00 do 18:00, teplota byla udržována konstantně 22°C. Protokoly pokusů na zvířatech byly schváleny etickou komisí Ústavu experimentální medicíny AV ČR.

## 1.5. Izolace a kultivace myších makrofágů

Po cervikální dislokaci se u myši provedl výplach peritoneální dutiny 8 ml sterilního fyziologického roztoku. Buňky byly po promytí a kolekci kultivovány v množství  $2 \times 10^5$  na jamku ve finálním objemu 100  $\mu$ l na 96-jamkové destičce (Costar, Cambridge, UK) pro následné stanovení cytokinů a chemokinů metodou ELISA. V případě studia genové exprese na úrovni mRNA se makrofágy kultivovaly v množství  $4 \times 10^6$  na vzorek v 12-jamkové destičce ve finálním objemu 2 ml (Costar, Cambridge, UK). Makrofágy se kultivovaly v přítomnosti nebo nepřítomnosti sledovaných ANP a v přítomnosti LPS v různých časech a koncentracích (viz část výsledky).

## 1.6. Izolace a kultivace myších lymfocytů a tymocytů

Po cervikální dislokaci se u myši vyňala slezina a lymfocyty se získaly protlačením sleziny přes sterilní nylonovou síťku. Erytrocyty byly odstraněny promytím v lyzačním pufu (Sigma, Praha), který obsahoval 0.8% ammonium chloridu v roztoku 0.01 M Tris-HCl (pH 7.5). Buňky se poté 2x promývaly ve sterilním fyziologickém roztoku. Lymfocyty se kultivovaly v 96-jamkové destičce (Costar, Cambridge, UK) v množství  $5 \times 10^5$  na jamku ve finálním objemu 100  $\mu$ l pro následné stanovení chemokinů RANTES metodou ELISA v přítomnosti nebo nepřítomnosti sledovaných ANP (viz část výsledky). Pro studium genové exprese chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4 se lymfocyty kultivovaly v množství  $5 \times 10^6$  na vzorek v 12-jamkové destičce ve finálním objemu 1.5 ml



(Costar, Cambridge, UK). Myší tymocyty se získaly vyjmutím tymu a následným protlačením přes nylonovou síťku. Další postup byl shodný jako u myších lymfocytů (viz výše).

## 1.7. Lidská buněčná linie THP-1

Buňky této nádorové linie (GCMCC, Braunschweig, Německo) byly poskytnuty laskavostí Mgr. Lenky Palové, PhD. z Mikrobiologického ústavu AV ČR. Podmínky kultivace jsou popsány v publikaci Jelínková et al. [163]. U buněk THP-1 je přítomna translokace t(9;11)(p21;q23), která znamená přítomnost fúzního gen MLL-AF9. THP-1 buňky mají na svém povrchu molekuly CD14, CD68 a dále je přítomen Fc receptor a C3b receptor. Původním zdrojem buněk byly buňky periferní krve 1 ročního chlapce trpícího relapsem akutní myeloidní leukémie (1978) [164]. Detailní charakteristika vlastností buněk THP-1 je popsána např. v práci autora Auwerx, J. [165]. Pro izolaci RNA se buňky kultivovaly v množství  $5 \times 10^6$  na jamku ve finálním objemu 1.5 ml.

## 1.8. Izolace a kultivace lidských monocytů

Zdrojem buněk byly „buffy coats“ zdravých dárců, klientů Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze. Separace monocytů se provedla pomocí gradientové centrifugace metodou Ficoll-Paque Plus dle pokynů výrobce (GE Healthcare). Buňky se kultivovaly v kompletním RPMI-1640 mediu ( $1 \times 10^6$ /ml, 250  $\mu$ l na jamku).

## 1.9. Kultivační médium

Kompletní kultivační médium RPMI-1640 obsahovalo 10% fetální bovinní sérum, 2 mM L-glutamin, gentamicin 50  $\mu$ g/ml,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-merkaptoetanol (vše Sigma, Praha). Pro studium genové exprese cytokinů, chemokinů a chemokinových receptorů na úrovni mRNA se používalo 1-2% sérum.

## 1.10. Stanovení životnosti buněk

Životnost myších makrofágů byla určována pomocí kolorimetrického testu založeném na štěpení soli tetrazolia WST-1 mitochondriálními dehydrogenázami v živých buňkách podle pokynů výrobce (Roche Diagnostics, Německo).

## 1.11. Produkce NO

Produkce NO se stanovovala u myších makrofágů kultivovaných společně se samotnými ANP nebo za přítomnosti ANP v kombinaci s IFN- $\gamma$  nebo s LPS po době 24 h dle metody popsané v práci Marletta a spol. [166] (detailně viz příloha č. 2 a příloha č. 4, tj. publikace č. 2 [47] a publikace č. 4 [41]).

## 1.12. ELISA

Pro stanovení cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  a chemokinů RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, MCP-5, SDF-1 $\alpha$  byla použita metoda ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay). Kity „Quantikine“ ELISA byly zakoupeny od firmy RD Systems (Minneapolis, USA) a postupovalo se podle pokynů výrobce. Pro měření hladin proteinů byly buňky vždy kultivovány duplicitně (případně ve trojici nebo čtveřici).

## 1.13. Izolace RNA

RNA se izolovala pomocí kitu firmy Qiagen (Hilden, Německo) s názvem „RNeasy mini kit“ podle pokynů výrobce. Součástí této procedury bylo štěpení genomické DNA dnázou I (ve kvalitě „RNase free“) v průběhu extrakce. Čistota a množství RNA se stanovily měřením optické denzity při vlnové délce 260/280 nm.

## 1.14. Reverzní transkripce RNA na cDNA

Pro reverzní transkripci RNA na cDNA se používalo 25 U rekombinantní transkriptázy Moloneyho viru myši leukemie (Top-Bio, Praha). Množství RNA vstupující do reakce bylo 0.5 µg. Jako primery byly použity náhodné nonamery o finální koncentraci 2.5 µM (Sigma-Aldrich, Praha). Do reakční směsi byl vždy přidáván RNase inhibitor (Stratagene, USA).

## 1.15. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro studium genové exprese cytokinů, chemokinů a chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4 byla použita metoda semikvantitativní RT-PCR. V případech, kdy to bylo možné, se společně s experimentálně získanou cDNA amplifikovala syntetická DNA, která byla součástí dodávky komerčně dostupných primerů – tzv. pozitivní kontrola účinnosti amplifikace. Reakční mix PCR o celkovém objemu 50 µl obsahoval: sense a antisense primery (0.15 µM), deoxynukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 0.2 mM, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> a 2.5 U Taq DNA polymerázy. Veškeré chemikálie na PCR byly zakoupeny u firmy Top-Bio (Praha, ČR). Na provedení semikvantitativní RT-PCR se používal termocykler „Mastercycler gradient“ firmy Eppendorf (Hamburg, Německo). Po iniciální denaturaci cDNA (2 min, 94 °C) následovalo 24-30 amplifikačních cyklů dle typu genu (viz tabulka 7). Amplifikace probíhala v lineárním rozmezí. Během jednoho cyklu trvala denaturace 45 s (94 °C), hybridizace primerů 45 s (hybridizační teploty viz tabulka 7) a extenze primerů 45 s (72 °C). Po skončení posledního cyklu byla reakční směs inkubována při 72 °C po dobu 7 minut. PCR produkty byly poté identifikovány elektroforézou v 1.5% agarózovém gelu barveném etidium bromidem a fotografovány v UV světle. Jako kontrola velikosti získaných PCR ampliconů (produktů polymerázové řetězové reakce získané pomocí

specifických primerů) byly při elektroforéze používány komerčně dostupné „DNA laddery“ (Fermentas): „Generuler™ 100 bp DNA ladder“ nebo „Generuler™ 50 bp DNA ladder“. V českém jazyce jsou někdy nazývány jako tzv. žebříčky. Označení „DNA markery“ se rovněž používá. Velikosti fragmentů DNA byly u žebříčku „Generuler™ 100 bp DNA ladder“: 1031 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp, 80 bp. Při elektroforéze žebříčku „Generuler™ 50 bp DNA ladder“ jsou patrné následující fragmenty DNA: 1031 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 150 bp, 100 bp, 50 bp. V případě analýzy exprese chemokinu RANTES na úrovni mRNA u buněk THP-1 byl použit žebříček firmy Top-Bio „DNA marker 155-970“ (155 bp, 194 bp, 239 bp, 305 bp, 447 bp, 544 bp, 595 bp, 750 bp, 970 bp).

Komerčně dostupné primery byly zakoupeny od firmy RD Systems nebo Clontech (primery pro gen GAPDH), syntetizované primery byly vyrobeny firmou Metabion. Primery byly vybrány tak, aby neamplifikovaly genomickou DNA nebo aby případný amplikon z genomické DNA měl jinou velikost než amplikon ze cDNA. Přehled použitých primerů je uveden na následující straně v tabulce 7 (zde jsou rovněž uvedeny velikosti produktů PCR):

**Tab. 7.** Primery na semikvantitativní RT-PCR cytokinů, chemokinů a chemokinových receptorů.

Gen	Sekvence primerů (sense/antisense)	Hybridizační teplota	Velikost produktu PCR	Počet cyklů
TNF- $\alpha$ (myší)	Komerčně dostupné – výrobce RD Systems sekvenci nesděljuje.	55 °C	585 bp	30
IL-10 (myší)	Komerčně dostupné (RD Systems)	55 °C	235 bp	30
RANTES (myší) [167]	5'-TCTTCTCTGGGTGGCACACAC-3' 5'-CCTCACCATCATCCTCACTGCA-3'	59 °C	215 bp	30
RANTES (lidský)	Komerčně dostupné (RD Systems)	55 °C	198 bp	28
MCP-1 (myší)	Komerčně dostupné (RD Systems)	55 °C	246 bp	29
MCP-2 (myší) [168]	5'-GCAGGGTATGTCTCTCTGTG-3' 5'-GCTTGTAACATCTCTCTGCC-3'	56 °C	173 bp	30
MCP-3 (myší) [37]	5'-CTTTGGAGTTGGGGTTTTCA-3' 5'-TCTGTGCCTGCTGCTCATAG-3'	58 °C	268 bp	29
MCP-5 (myší) [126]	5'-GTTCTGACTCCTCTAGCTTTC-3' 5'-ACGTAAGAGTTTTTGGAACTC-3'	57 °C	397 bp	30
CCR5 (myší)	Komerčně dostupné (RD Systems)	55 °C	433 bp	27
CXCR4 (myší)	Komerčně dostupné (RD Systems)	55 °C	415 bp	27
GAPDH (kontrolní)	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	59 °C	452 bp	24

## 1.16. Statistická analýza dat

**Pro statistické vyhodnocení dat se použila metoda ANOVA (analysis of variance) a následně Dunettův nebo Tukeyův test. Ke grafickému zpracování dat se používal program GraphPrism (GraphPad Software, USA). Hodnoty měření jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M.**

## 2. Výsledky

### 2.1. Produkce NO

Výsledky produkce NO po aplikaci ANP jsou uvedeny v příloze 2 (publikace č. 2) a příloze 4 (publikace č. 4) [41, 47]. Na základě tohoto screeningu byly účinné ANP zařazeny do experimentů týkajících se exprese cytokinů/chemokinů.

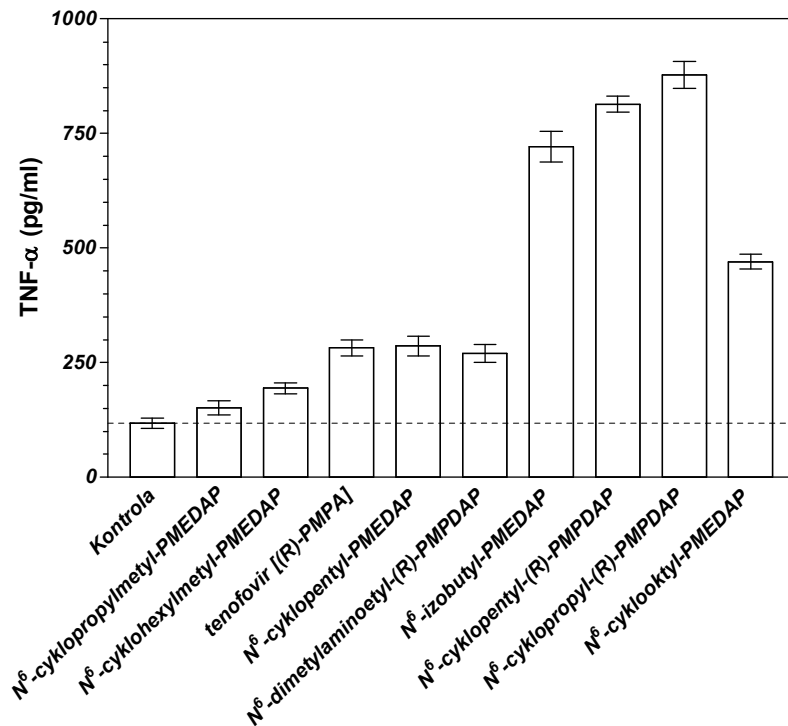
### 2.2. Exprese cytokinů po aplikaci ANP

#### 2.2.1. Exprese TNF- $\alpha$

##### *Exprese TNF- $\alpha$ po aplikaci nehydroxylovaných ANP*

Nehydroxylované deriváty ANP (25  $\mu$ M) mají schopnost zvýšit produkci TNF- $\alpha$  u myších makrofágů. Doba kultivace byla 5 h. Z derivátů ANP, které lze syntetizovat jako optické stereoizomery, jsou účinné pouze *R*-enantiomery [41].

Nejúčinněji stimulují produkci TNF- $\alpha$  sloučeniny *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP, *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP, *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP a *N*<sup>6</sup>-cyklooktyl-PMEDAP. Tenofovir [(*R*)-PMPA] je rovněž účinný [41]. Viz obrázek 5 na následující straně:



**Obr. 5.** *Produkce TNF- $\alpha$  po aplikaci nehydroxylovaných ANP (25  $\mu$ M) u myších makrofágů [41]. Buňky ( $2 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly 5 h. Koncentrace TNF- $\alpha$  (pg/ml) byla stanovena metodou ELISA. V grafech jsou uváděny průměry a S.E.M., v dalším textu jsou v grafech rovněž uváděny průměry a S.E.M.*

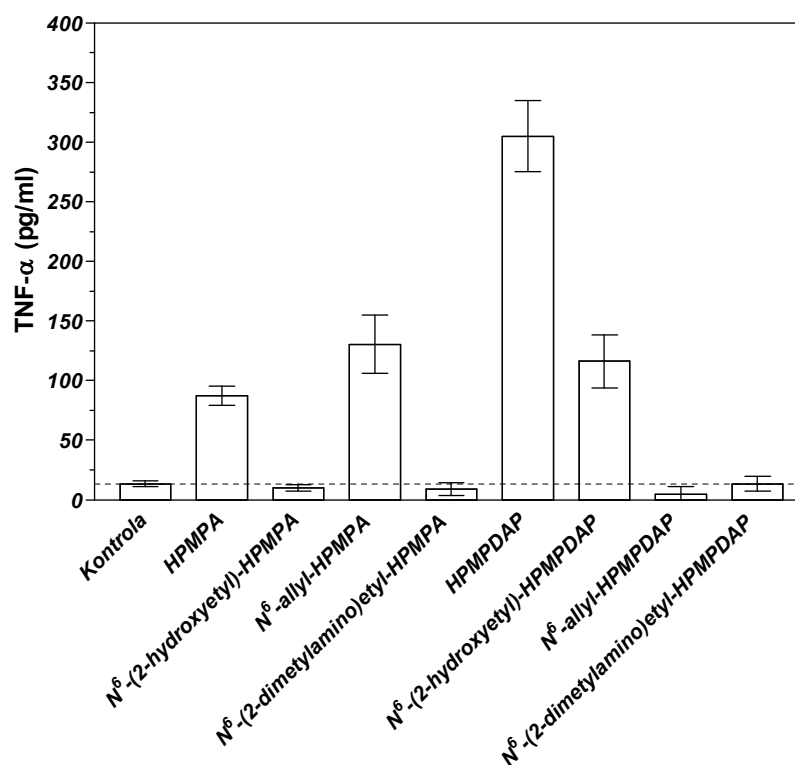


## Expresa TNF- $\alpha$ po aplikaci hydroxylovaných ANP

### Expresa TNF- $\alpha$ u myších makrofágů

Z hydroxylovaných ANP (100  $\mu$ M, 5-h kultivace) stimuluje nejúčinněji produkci TNF- $\alpha$  sloučenina HPMPDAP (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin), zatímco sloučenina HPMPA (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]adenin) je méně aktivní [47].

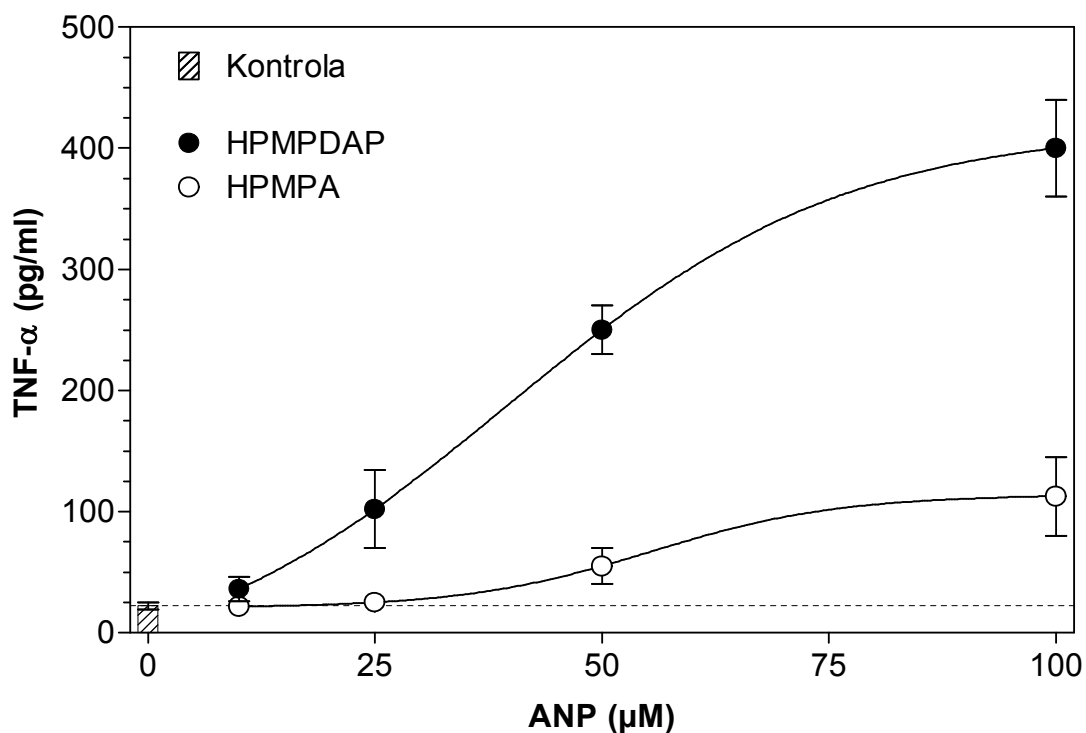
Substituce aminoskupiny v poloze 6 dusíkaté báze mateřské sloučeniny HPMPA allylovým zbytkem vede ke zvýšení produkce TNF- $\alpha$ . Náhrada aminoskupiny v poloze 6 dusíkaté báze mateřské sloučeniny HPMPDAP vede k snížení účinku na sekreci TNF- $\alpha$  [47]. Viz obrázek 6:



**Obr. 6.** Produkce TNF- $\alpha$  po aplikaci hydroxylovaných ANP (100  $\mu$ M) u myších makrofágů [47]. HPMPA = 9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]adenin, HPMPDAP = 9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin. Buňky ( $2 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly 5 h. Koncentrace TNF- $\alpha$  (pg/ml) byla stanovena metodou ELISA.

## *Expresa TNF- $\alpha$ u lidských monocytů*

Obě nesubstituované sloučeniny HPMPA a HPMPDAP zvyšují produkci TNF- $\alpha$  rovněž u lidských monocytů a to v závislosti na koncentraci [47]. Viz obrázek 7:



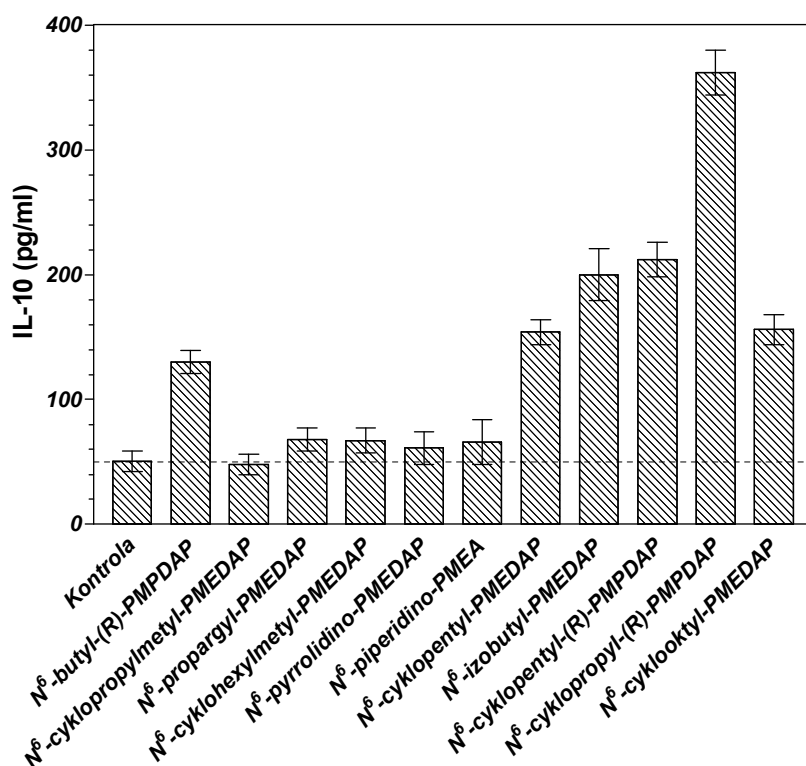
*Obr. 7. Dávková závislost produkce TNF- $\alpha$  u lidských monocytů po aplikaci hydroxylovaných ANP [47]. Buňky ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) se kultivovaly 5 h s různými koncentracemi acyklických nukleosidfosfonátů HPMPA (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]adenin) a HPMPDAP (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin). Koncentrace TNF- $\alpha$  (pg/ml) byla stanovena metodou ELISA.*

## 2.2.2. Exprese IL-10

### ***Exprese IL-10 po aplikaci nehydroxylovaných ANP***

Nehydroxylované deriváty ANP (25  $\mu\text{M}$ ) mají schopnost zvýšit produkci IL-10 u myších makrofágů. Doba kultivace byla 5 h. Z derivátů ANP, které lze syntetizovat jako optické stereoizomery, jsou účinné pouze (*R*)-enantiomery [41].

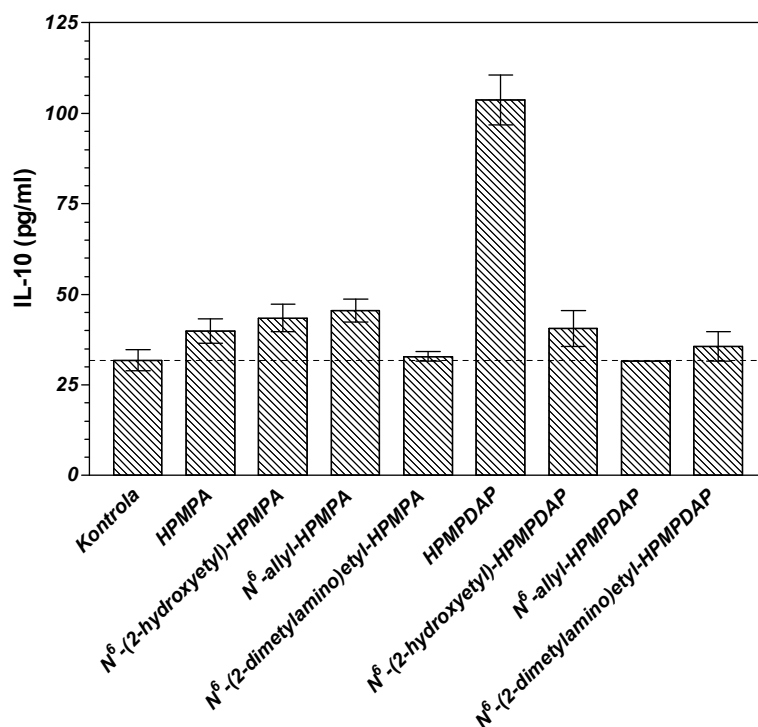
Nejúčinněji stimulují produkci IL-10 sloučeniny *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP, *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP a *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP. Účinné jsou rovněž sloučeniny *N*<sup>6</sup>-cyklooktyl-PMEDAP, *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-PMEDAP a *N*<sup>6</sup>-butyl-(*R*)-PMPDAP [41]. Viz obrázek 8:



**Obr. 8.** Produkce IL-10 po aplikaci nehydroxylovaných derivátů ANP (25  $\mu\text{M}$ ) u myších makrofágů [41]. Buňky ( $2 \times 10^6/\text{ml}$ ) se kultivovaly 5 h. Koncentrace IL-10 (pg/ml) byla stanovena metodou ELISA.

### Expresa IL-10 po aplikaci hydroxylovaných ANP

Z hydroxylovaných derivátů ANP (100  $\mu$ M, 5-h kultivace) se schopností zvýšit produkci IL-10 u myších makrofágů vyznačuje pouze mateřská sloučenina HPMPDAP (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin) [47]. Viz obrázek 9:



**Obr. 9.** Produkce IL-10 po aplikaci hydroxylovaných derivátů ANP (100  $\mu$ M) u myších makrofágů [47]. HPMPA = (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]adenin, HPMPDAP = (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin). Buňky ( $2 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly 5 h. Koncentrace IL-10 (pg/ml) byla stanovena metodou ELISA.

### 2.2.3. Exprese IFN- $\alpha$ a IFN- $\beta$

Produkce IFN- $\alpha$  nebo IFN- $\beta$  nebyla po aplikaci nehydroxylovaných ANP (100  $\mu$ M) u myších makrofágů zvýšena. Hydroxylované deriváty ANP testovány nebyly.

Metodou ELISA byly testovány následující sloučeniny: ANP **1** = tenofovir [(*R*)-PMPA], ANP **2** = *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP, ANP **3** = *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP, ANP **4** = *N*<sup>6</sup>-dimethylaminoethyl-(*R*)-PMPDAP, ANP **5** = *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-PMEDAP, ANP **6** = *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP, ANP **7** = *N*<sup>6</sup>-cyklohexylmetyl-PMEDAP a ANP **8** = *N*<sup>6</sup>-cyklooktyl-PMEDAP (chemická struktura a úplné názvy sloučenin viz obrázek 4 na straně 32). Testovány byly časové intervaly 5 h, 12 h, 24 h a 48 h.

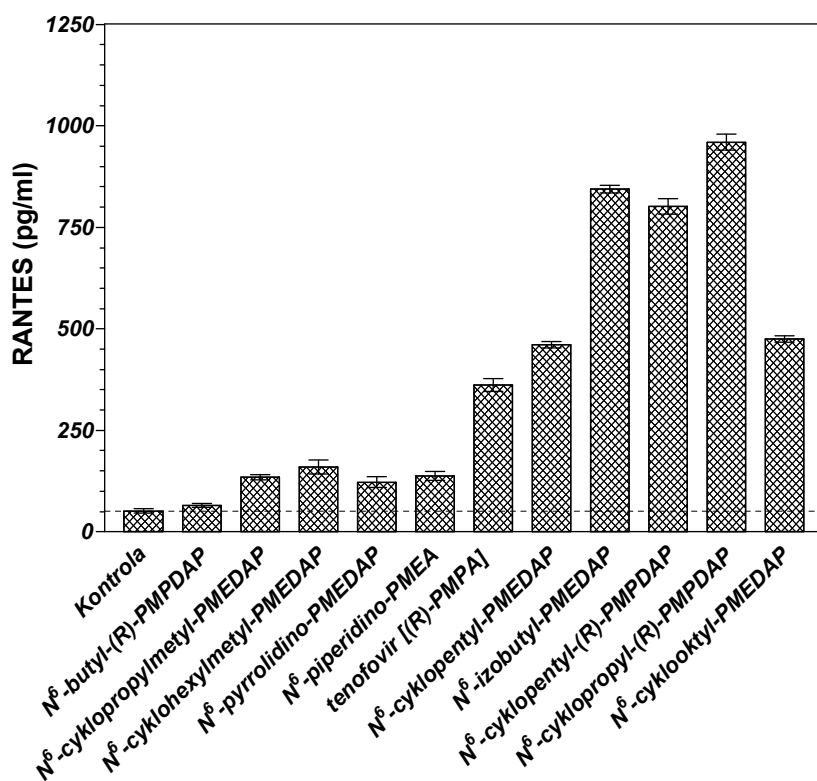
## 2.3. Expresa chemokinů po aplikaci ANP

### 2.3.1. Expresa RANTES/CCL5

#### *Expresa RANTES/CCL5 po aplikaci nehydroxylovaných ANP*

Nehydroxylované deriváty ANP (25  $\mu\text{M}$ ) mají schopnost zvýšit expresi RANTES u myších makrofágů [41], lymfocytů a lidských buněk THP-1. Z derivátů ANP, které lze syntetizovat jako optické stereoizomery, jsou účinné pouze (*R*)-enantiomery [41].

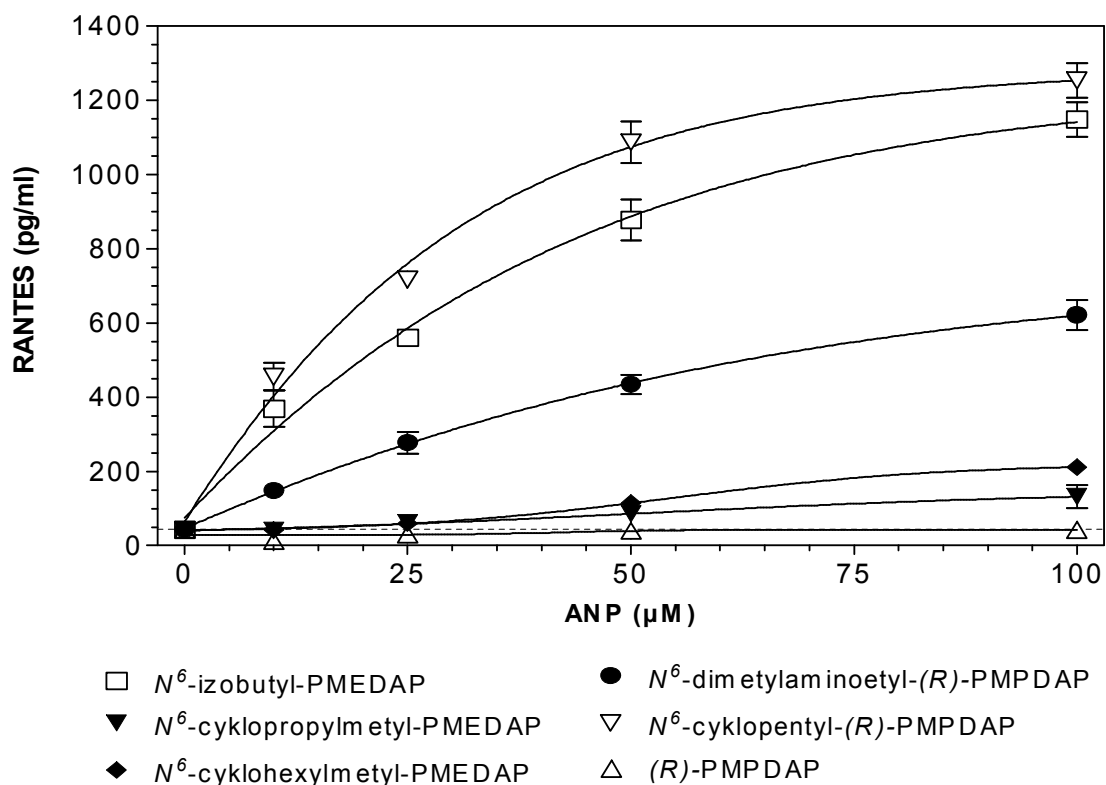
U myších makrofágů vysoce zvyšují produkci RANTES sloučeniny *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP, *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP a *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP. Velmi účinné jsou také sloučeniny *N*<sup>6</sup>-cyklooktyl-PMEDAP, *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-PMEDAP a tenofovir [(*R*)-(PMPA)] [41]. Viz obrázek 10:



**Obr. 10.** *Produkce RANTES po aplikaci nehydroxylovaných derivátů ANP (25  $\mu$ M) u myších makrofágů [41]. Buňky ( $2 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly 5 h. Koncentrace RANTES (pg/ml) byla stanovena metodou ELISA.*

## *Dávková závislost produkce RANTES/CCL5 po aplikaci nehydroxylovaných ANP*

Produkce chemokinu RANTES po aplikaci ANP je závislá na použité dávce. Nejnižší účinná dávka u aktivních sloučenin je zhruba 10  $\mu\text{M}$  [41]. Viz obrázek 11:

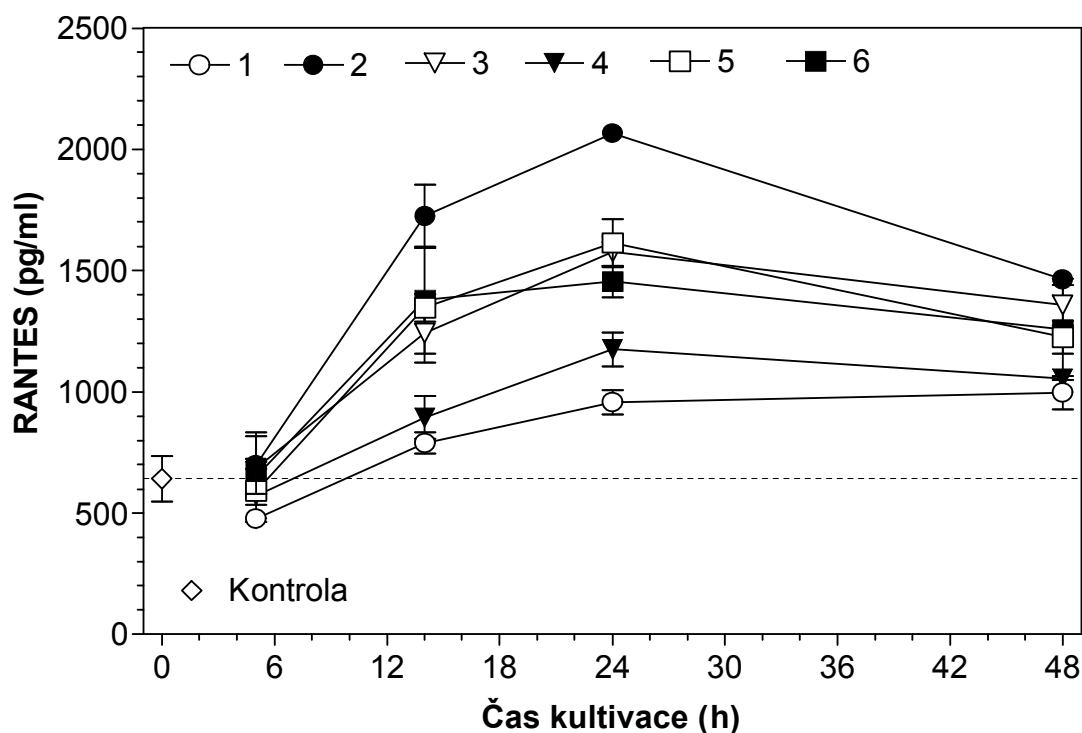


Obr. 11. *Dávková závislost produkce RANTES po aplikaci nehydroxylovaných ANP [41].* Koncentrace RANTES (pg/ml) v supernatantech myších makrofágů ( $2 \times 10^6/\text{ml}$ ) se stanovily metodou ELISA za 5 h kultivace buněk v přítomnosti různých koncentrací ANP.



## Časová závislost produkce RANTES/CCL5 po aplikaci nehydroxylovaných ANP

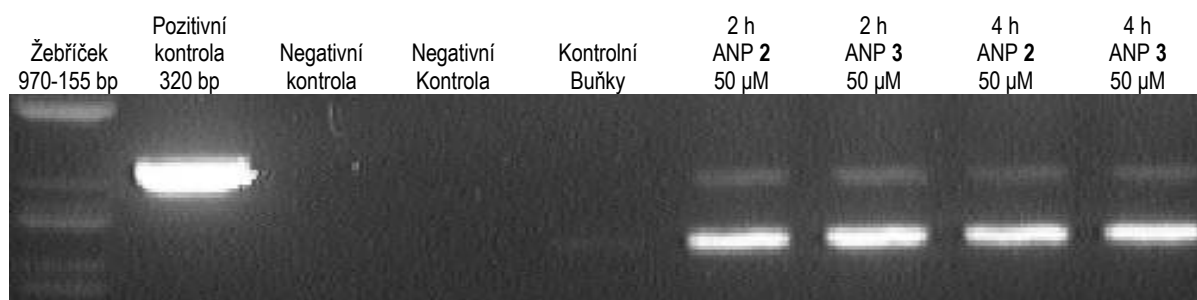
Produkce RANTES se studovala také u myších lymfocytů v průběhu 5 až 48 hodin. Po aplikaci ANP (50  $\mu$ M) je produkce RANTES zřetelně patrná v časovém intervalu 12 h, maxima dosahuje po 24 h a za 48 h klesá na úroveň produkce po 12 h. V intervalu 5 h po aplikaci ANP se koncentrace RANTES neliší od neovlivněných buněk. Viz obrázek 12:



**Obr. 12.** Časová závislost produkce RANTES po aplikaci nehydroxylovaných ANP (50  $\mu$ M) u myších lymfocytů. Buňky ( $5 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly v různých časových intervalech společně s vybranými ANP: 1 = tenofovir [(R)-PMPA], 2 = N<sup>6</sup>-cyklopropyl-(R)-PMPDAP, 3 = N<sup>6</sup>-cyklopentyl-(R)-PMPDAP, 4 = N<sup>6</sup>-dimethylaminoethyl-(R)-PMPDAP, 5 = N<sup>6</sup>-cyklopentyl-PMEDAP, 6 = N<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP (úplné chemické názvy a struktura těchto sloučenin viz obrázek 4 na straně 32). Koncentrace RANTES (pg/ml) byla stanovena metodou ELISA.

### ***Expres mRNA pro RANTES/CCL5 po aplikaci nehydroxylovaných ANP***

Transkripce mRNA pro RANTES je u lidské buněčné linie THP-1 indukována již za 2 h působení sloučenin *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP a *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP a je patrná i za 4 h po aplikaci těchto látek. Viz obrázek 13:



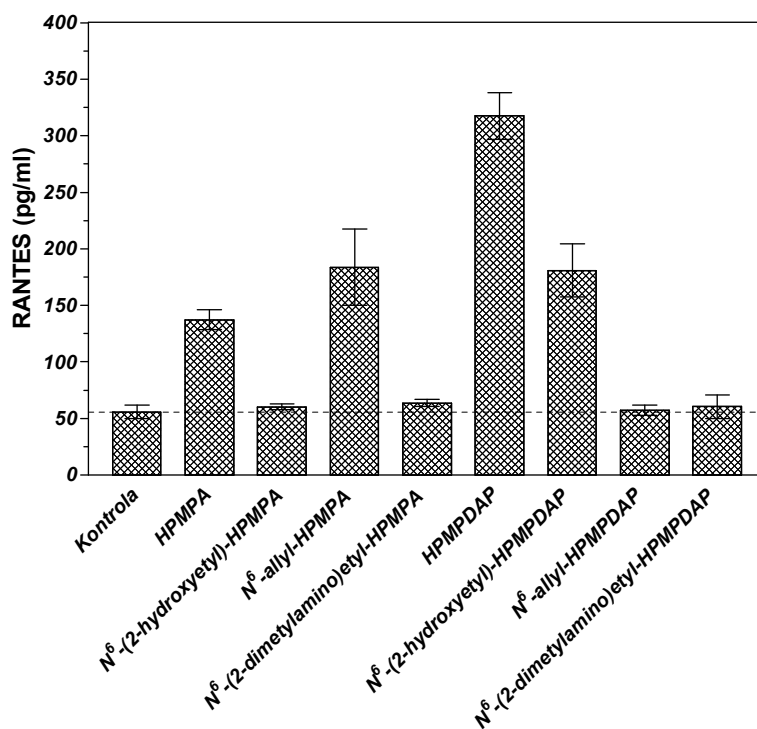
***Obr. 13. Expres mRNA pro RANTES po aplikaci acyklických nukleosidfosfonátů *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP (ANP 2) a *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP (ANP 3) u lidských buněk THP-1 (úplné chemické názvy a struktura sloučenin viz obrázek 4 na straně 32). Konstitutivní expres mRNA pro RANTES není u lidských buněk THP-1 ( $2 \times 10^6$ /ml) patrná. Při kultivaci s ANP (50 μM) dochází k aktivaci transkripce mRNA pro RANTES již za 2 h. Po 4 h působení ANP je expres mRNA pro RANTES stejná jako po 2 h. Velikost PCR produktu je 198 bp. Velikost PCR produktu získaného amplifikací syntetické DNA dodané výrobcem primerů pro chemokin RANTES (RD systems) je 320 bp.***

### Expresa RANTES/CCL5 po aplikaci hydroxylovaných ANP

Hydroxylované ANP (100  $\mu$ M) mají schopnost zvýšit produkci RANTES u myších makrofágů. Doba kultivace byla 5 h [47].

Obě mateřské sloučeniny HPMPA (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]adenin) a HPMPDAP (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin) stimuluji produkci RANTES, méně aktivní je sloučenina HPMPA [47].

Substituce aminoskupiny v poloze 6 dusíkaté báze sloučeniny HPMPA allylovým zbytkem vede ke zvýšení exprese RANTES. Náhrada aminoskupiny v poloze 6 dusíkaté báze sloučeniny HPMPDAP vede ke snížení efektu na sekreci RANTES [47]. Viz obrázek 14:



**Obr. 14.** Produkce RANTES po aplikaci hydroxylovaných derivátů ANP (100  $\mu$ M) u myších makrofágů [47]. HPMPA = (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]adenin), HPMPDAP = (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin). Buňky ( $2 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly 5 h. Koncentrace RANTES (pg/ml) byla stanovena metodou ELISA.

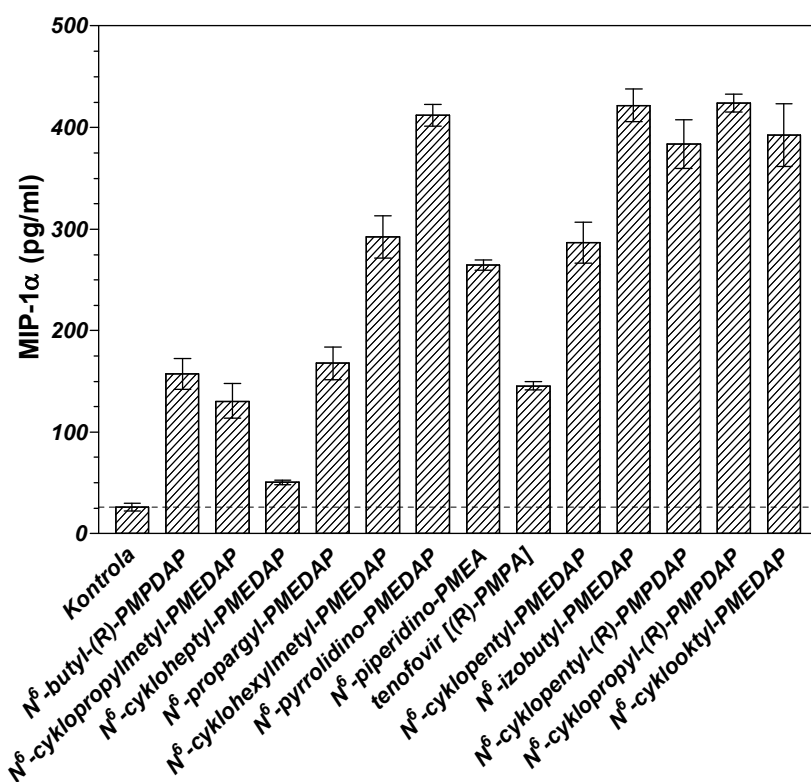


### 2.3.2. Exprese MIP-1 $\alpha$ /CCL3

#### *Exprese MIP-1 $\alpha$ /CCL3 po aplikaci nehydroxylovaných ANP*

Nehydroxylované deriváty ANP (25  $\mu$ M) mají schopnost mohutně aktivovat produkci MIP-1 $\alpha$  u myších makrofágů. Doba kultivace byla 5 h. Z derivátů ANP, které lze syntetizovat jako optické stereoizomery, jsou účinné pouze (*R*)-enantiomery [41].

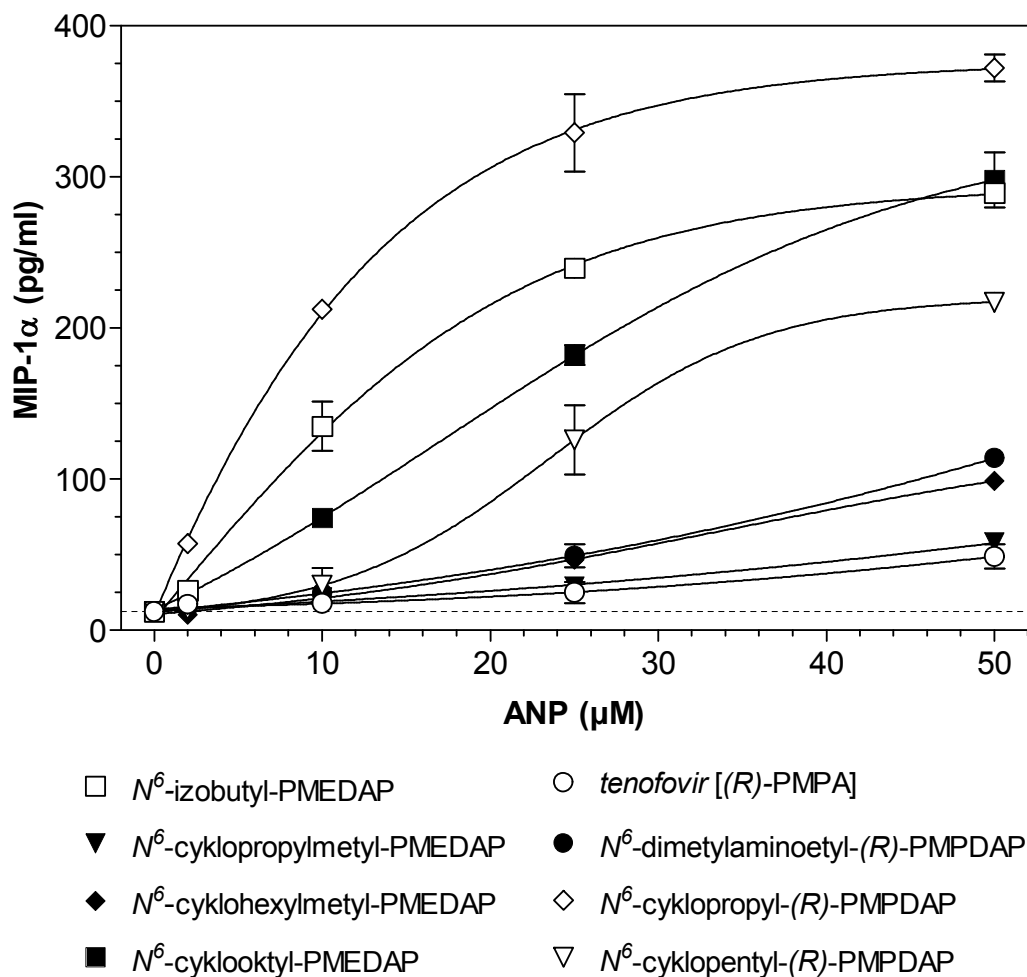
Nejsilněji působící sloučeniny jsou *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP, *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP, *N*<sup>6</sup>-pyrrolidino-PMEDAP, *N*<sup>6</sup>-cyklooktyl-PMEDAP a *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP. Rovněž sloučeniny *N*<sup>6</sup>-cyklohexylmethyl-PMEDAP, *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-PMEDAP a *N*<sup>6</sup>-piperidino-PMEA jsou velmi účinné [41]. Viz obrázek 15:



**Obr. 15.** Produkce MIP-1 $\alpha$  po aplikaci nehydroxylovaných derivátů ANP (25  $\mu$ M) u myších makrofágů [41]. Buňky ( $2 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly 5 h. Koncentrace MIP-1 $\alpha$  (pg/ml) byla stanovena metodou ELISA.

### Dávková závislost produkce MIP-1 $\alpha$ /CCL3

Produkce chemokinu MIP-1 $\alpha$  po aplikaci ANP je závislá na použité dávce. Nejnižší účinná dávka u aktivních sloučenin je zhruba 10  $\mu$ M [41]. Viz obrázek 16:



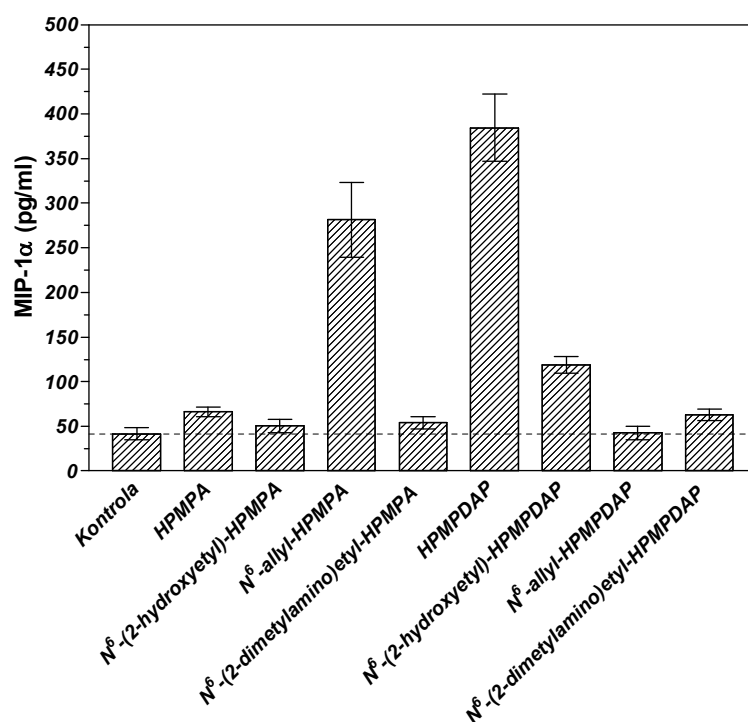
Obr. 16. Dávková závislost produkce MIP-1 $\alpha$  po aplikaci nehydroxylovaných ANP [41]. Koncentrace MIP-1 $\alpha$  (pg/ml) v supernatantech myších makrofágů ( $2 \times 10^6$ /ml) se stanovily metodou ELISA za 5 h kultivace buněk v přítomnosti různých koncentrací ANP.

### Expresa MIP-1 $\alpha$ /CCL3 po aplikaci hydroxylovaných ANP

Hydroxylované deriváty ANP (100  $\mu$ M) mají schopnost zvýšit produkci MIP-1 $\alpha$  u myších makrofágů. Doba kultivace byla 5 h [47].

Produkce MIP-1 $\alpha$  je u myších makrofágů aktivována především při aplikaci mateřské sloučeniny HPMPDAP (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin). Substituce aminoskupiny v poloze 6 dusíkaté báze této látky vede ke snížení efektu na sekreci MIP-1 $\alpha$  [47].

Sloučenina HPMPA (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]adenin) nezvyšuje produkci MIP-1 $\alpha$ , avšak náhrada aminoskupiny allylaminovou skupinou v poloze 6 dusíkaté báze této látky vede k mohutnému nárůstu sekrece MIP-1 $\alpha$  [47]. Viz obrázek 17:



**Obr. 17.** Produkce MIP-1 $\alpha$  po aplikaci hydroxylovaných derivátů ANP (100  $\mu$ M) u myších makrofágů [47]. HPMPA = (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]adenin), HPMPDAP = (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin). Buňky ( $2 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly 5 h. Koncentrace MIP-1 $\alpha$  (pg/ml) se stanovila metodou ELISA.

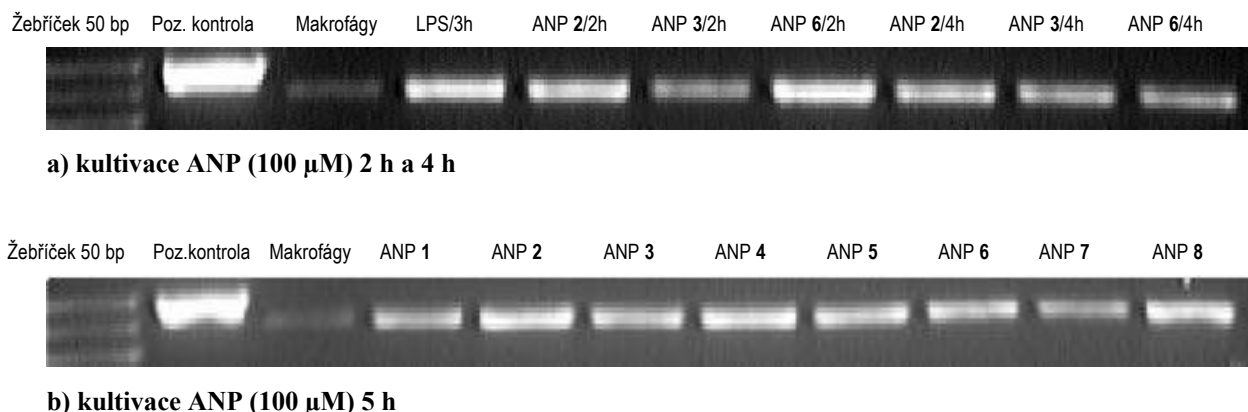
### 2.3.3. Expresa monocytárních chemotaktických proteinů

(*R*)-enantiomery nehydroxylovaných ANP (100  $\mu$ M) zvýšily u myších makrofágů expresi chemokinů MCP-1 a MCP-3, nikoliv však MCP-2 a MCP-5 [39]. Hydroxylované deriváty ANP nebyly testovány.

#### 2.3.3.1. Expresa MCP-1/CCL2

##### *Expresa mRNA pro MCP-1/CCL2*

Aktivace transkripce mRNA pro MCP-1 po aplikaci ANP (100  $\mu$ M) byla u makrofágů zřetelně patrná již za 2 h působení ANP a dále byla zvýšená i za 4 a 5 h po aplikaci ANP. LPS (1  $\mu$ g/ml) aktivuje transkripci mRNA pro MCP-1 za 3 h po aplikaci [39]. Viz obrázek 18:



**Obr. 18.** *Expresa mRNA pro MCP-1 po aplikaci nehydroxylovaných ANP (100  $\mu$ M) u myších makrofágů [39]. Velikost PCR produktu je 246 bp. Velikost PCR produktu získaného amplifikací syntetické DNA dodané výrobcem primerů je 300 bp (poz. kontrola).*

a) *Rychlá stimulace transkripce mRNA pro MCP-1. Buňky ( $2 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly po dobu 2 a 4 h za přítomnosti vybraných ANP: ANP 2 = *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP, ANP 3 = *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP, ANP 6 = *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP (úplné chemické názvy a struktura sloučenin viz obrázek 4 na straně 32). LPS (1  $\mu$ g/ml) se aplikoval na 3 h. b) Zvýšení transkripce mRNA pro MCP-1 za 5 h po aplikaci ANP. (ANP 1 – ANP 8: ANP 1 = tenofovir [(*R*)-PMPA], ANP 2 = *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP, ANP 3 = *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-*

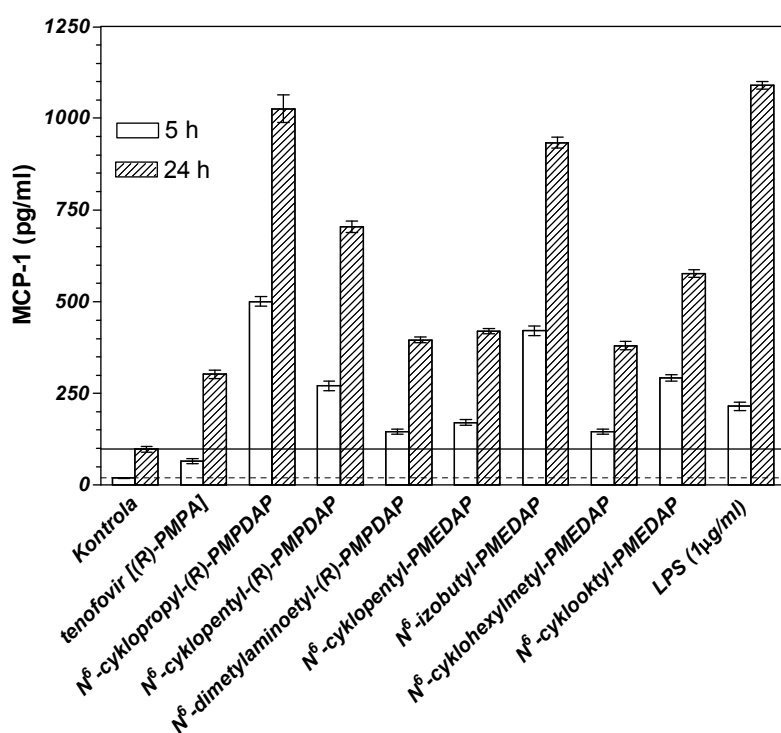


*(R)-PMPDAP, ANP 4 = N<sup>6</sup>-dimethylaminoethyl-(R)-PMPDAP, ANP 5 = N<sup>6</sup>-cyklopentyl-PMEDAP, ANP 6 = N<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP, ANP 7 = N<sup>6</sup>-cyklohexylmetyl-PMEDAP, ANP 8 = N<sup>6</sup>-cyklooktyl-PMEDAP; úplné chemické názvy a struktura sloučenin viz obrázek 4 na straně 32).*

### Produkce proteinu MCP-1/CCL2

Veškeré testované ANP (100  $\mu$ M) mohutně zvýšily sekreci MCP-1 po 5 a 24 h kultivace myších makrofágů [39].

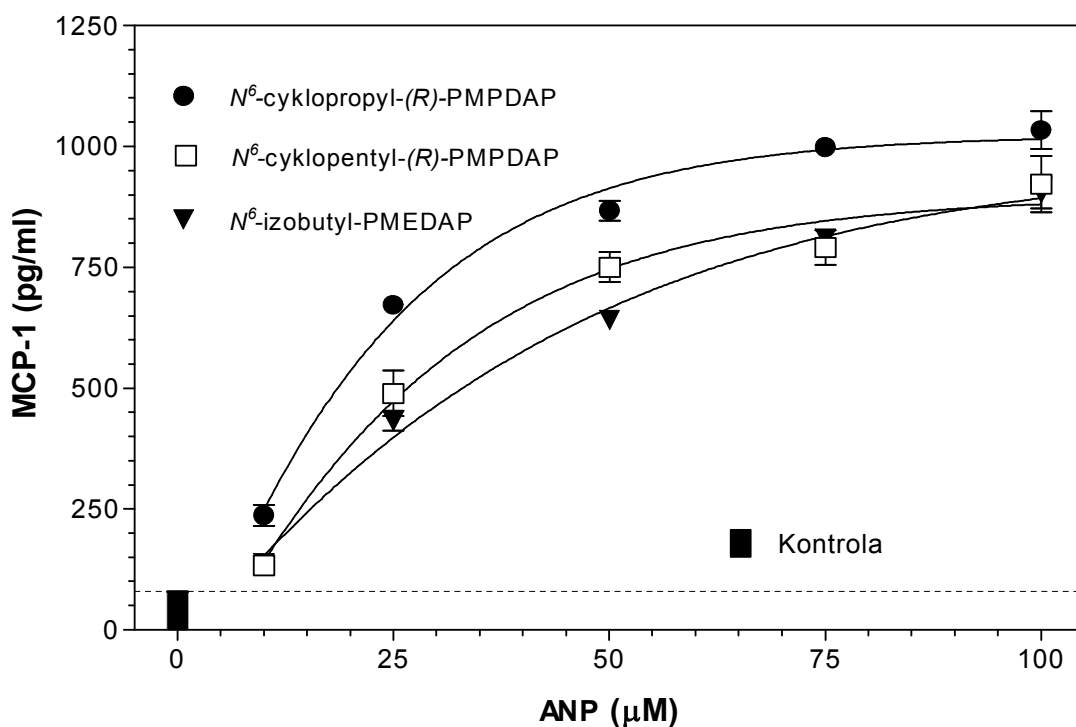
Nejsilněji působící sloučeniny jsou *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP, *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP a *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP. Nejméně aktivní látka je tenofovir [(*R*)-PMPA]. Účinek LPS (1  $\mu$ g/ml) je srovnatelný s látkou *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP, která stimuluje produkci MCP-1 nejvíce [39]. Viz obrázek 19:



**Obr. 19.** Produkce MCP-1 po aplikaci nehydroxylovaných ANP (100  $\mu$ M) u myších makrofágů [39]. Buňky ( $2 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly po dobu 5 a 24 h společně s ANP (úplné chemické názvy a struktura sloučenin viz obrázek 4 na straně 32). LPS se aplikoval v koncentraci 1  $\mu$ g/ml. Koncentrace MCP-1 (pg/ml) se stanovila metodou ELISA.

*Dávková závislost produkce MCP-1/CCL2*

ANP aktivují produkci MCP-1 v závislosti na dávce. Nejnižší účinná koncentrace je v případě nejsilněji působící sloučeniny *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP 10  $\mu$ M. Ostatní ANP stimuluji sekreci MCP-1 až při vyšší 25  $\mu$ M koncentraci [39]. Viz obrázek 20:



**Obr. 20.** Dávková závislost produkce MCP-1 po aplikaci nehydroxylovaných ANP [39]. Koncentrace MCP-1 (pg/ml) v supernatantech myších makrofágů ( $2 \times 10^6$ /ml) se stanovily metodou ELISA po 24 h kultivace buněk s vybranými deriváty ANP (*N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP, *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP a *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP; úplné chemické názvy a struktura sloučenin viz obrázek 4 na straně 32). Použité koncentrace ANP byly 10, 25, 50, 75 a 100  $\mu$ M.

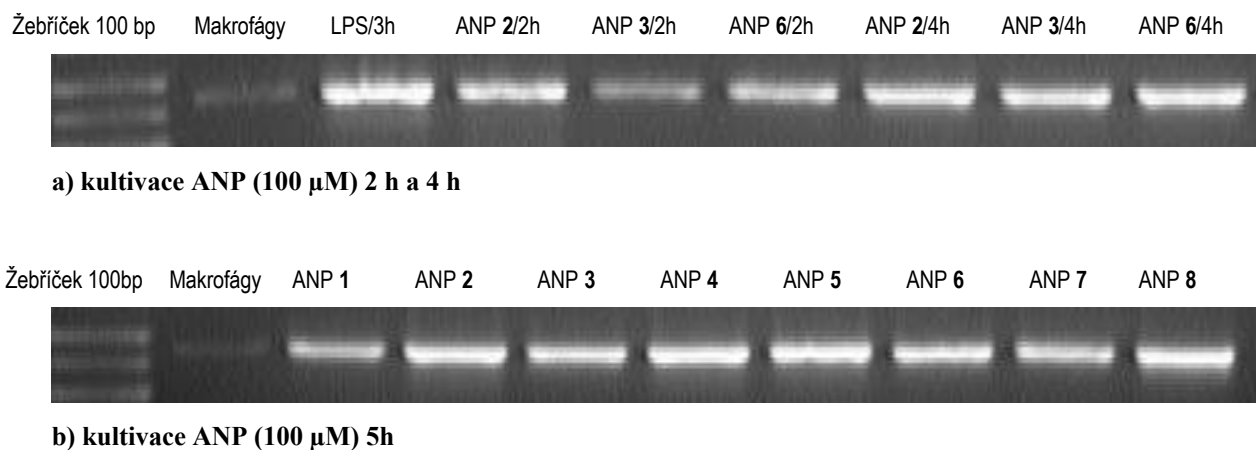
### 2.3.3.2. Exprese MCP-2/CCL8

ANP (100  $\mu$ M) nezvýšily transkripci mRNA pro MCP-2 u myších makrofágů [39]. Testováno bylo 8 nehydroxylovaných ANP: ANP 1 = tenofovir [(*R*)-PMPA], ANP 2 = *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP, ANP 3 = *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP, ANP 4 = *N*<sup>6</sup>-dimethylaminoethyl-(*R*)-PMPDAP, ANP 5 = *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-PMEDAP, ANP 6 = *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP, ANP 7 = *N*<sup>6</sup>-cyklohexylmetyl-PMEDAP, ANP 8 = *N*<sup>6</sup>-cyklooktyl-PMEDAP (úplné chemické názvy a struktura sloučenin viz obrázek 4 na straně 32) [39].

ANP byly testovány v časových intervalech 2 h, 4 h a 5 h metodou RT-PCR. Konstitutivní exprese mRNA pro MCP-2 nebyla u makrofágů detekována [39].

### 2.3.3.3. Exprese MCP-3/CCL7

Nehydroxylované ANP (100  $\mu$ M) výrazně aktivují transkripci mRNA pro MCP-3 u myších makrofágů, a to již po 2 h kultivace. Efekt LPS (1  $\mu$ g/ml) je patrný v intervalu 3 h [39]. Viz obrázek 21:



**Obr. 21.** Exprese mRNA pro MCP-3 po aplikaci nehydroxylovaných ANP (100  $\mu$ M) u myších makrofágů [39]. Velikost PCR produktu je 268 bp.

a) Rychlá stimulace transkripce MCP-3 mRNA. Buňky ( $2 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly po dobu 2 a 4 h za přítomnosti vybraných ANP: ANP 2 =  $N^6$ -cyklopropyl-(R)-PMPDAP, ANP 3 =  $N^6$ -cyklopentyl-(R)-PMPDAP, ANP 6 =  $N^6$ -izobutyl-PMEDAP (úplné chemické názvy a struktura sloučenin viz obrázek 4 na straně 32). LPS (1  $\mu$ g/ml) se aplikoval na dobu 3 h.

b) Zvýšení exprese MCP-3 mRNA za 5 h po aplikaci ANP (ANP 1 – ANP 8: ANP 1 = tenofovir [(R)-PMPA], ANP 2 =  $N^6$ -cyklopropyl-(R)-PMPDAP, ANP 3 =  $N^6$ -cyklopentyl-(R)-PMPDAP, ANP 4 =  $N^6$ -dimethylaminoethyl-(R)-PMPDAP, ANP 5 =  $N^6$ -cyklopentyl-PMEDAP, ANP 6 =  $N^6$ -izobutyl-PMEDAP, ANP 7 =  $N^6$ -cyklohexylmetyl-PMEDAP, ANP 8 =  $N^6$ -cyklooktyl-PMEDAP; úplné chemické názvy a struktura sloučenin viz obrázek 4 na straně 32).

#### 2.3.3.4. Exprese MCP-5/CCL12

Nehydroxylované ANP (100  $\mu$ M) nezvýšily expresi MCP-5 u myších makrofágů [39]. Testováno bylo 8 následujících ANP: ANP 1 = tenofovir [(*R*)-PMPA], ANP 2 = *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP, ANP 3 = *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP, ANP 4 = *N*<sup>6</sup>-dimethylaminoethyl-(*R*)-PMPDAP, ANP 5 = *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-PMEDAP, ANP 6 = *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP, ANP 7 = *N*<sup>6</sup>-cyklohexylmethyl-PMEDAP, ANP 8 = *N*<sup>6</sup>-cyklooktyl-PMEDAP (úplné chemické názvy a struktura sloučenin viz obrázek 4 na straně 32) [39].

ANP byly testovány v časových intervalech 2 h, 4 h a 5 h metodou RT-PCR. Konstitutivní exprese mRNA pro MCP-5 nebyla u makrofágů detekována [39].

Při použití metody ELISA se rovněž neprokázala přítomnost MCP-5 v supernatantech myších makrofágů za 5 nebo 24 hodin kultivace s ANP. LPS 1  $\mu$ g/ml neaktivoval expresi MCP-5.

#### 2.3.4. Exprese SDF-1 $\alpha$ /CXCL12

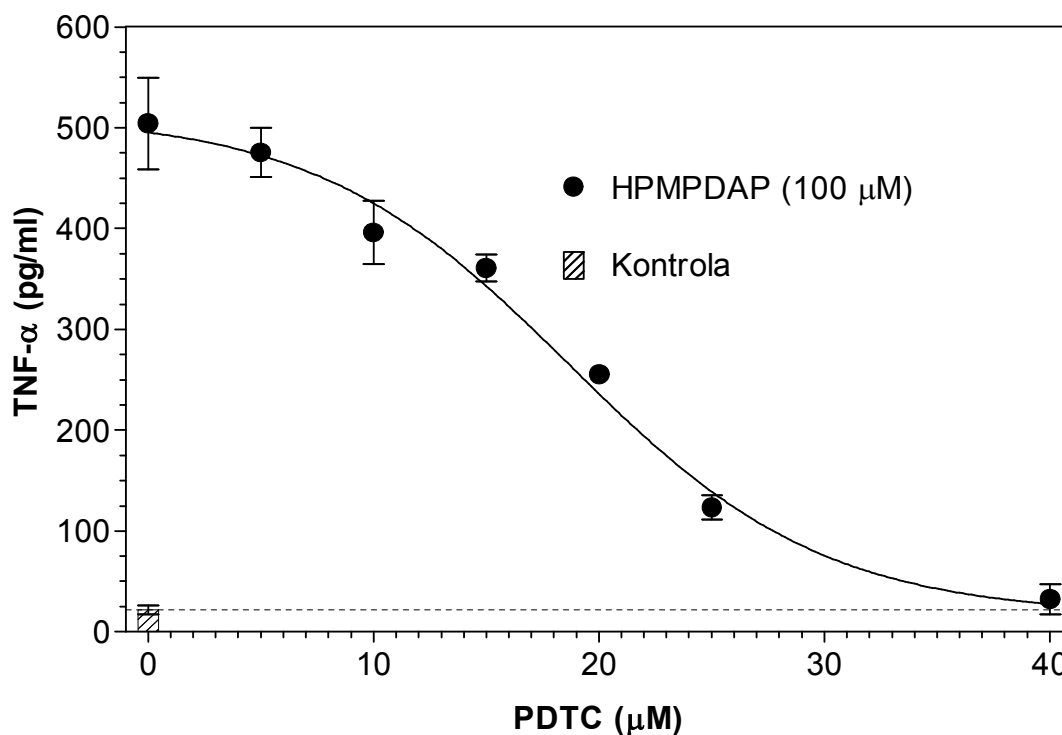
Nehydroxylované ANP (100  $\mu$ M) nezvýšily sekreci chemokinu SDF-1 $\alpha$  u myších lymfocytů ani tymocytů. Hydroxylované deriváty ANP nebyly testovány.

Metodou ELISA bylo testováno 8 následujících ANP: ANP 1 = tenofovir [(*R*)-PMPA], ANP 2 = *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP, ANP 3 = *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP, ANP 4 = *N*<sup>6</sup>-dimethylaminoethyl-(*R*)-PMPDAP, ANP 5 = *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-PMEDAP, ANP 6 = *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP, ANP 7 = *N*<sup>6</sup>-cyklohexylmethyl-PMEDAP, ANP 8 = *N*<sup>6</sup>-cyklooktyl-PMEDAP (úplné chemické názvy a struktura sloučenin viz obrázek 4 na straně 32). Časové intervaly byly 5 h a 24 h.

## 2.4. Závislost exprese TNF- $\alpha$ a MCP-1/CCL2 na transkripčním faktoru NF- $\kappa$ B

### 2.4.1. Inhibice produkce TNF- $\alpha$ pyrrolidinditiokarbamátem

Zvýšení produkce TNF- $\alpha$  u myších makrofágů po aplikaci sloučeniny HPMPDAP (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin) bylo sníženo přidáním různých koncentrací pyrrolidinditiokarbamátu (PDTC), což je inhibitor aktivace transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. Při aplikaci 40  $\mu$ M koncentrace PDTC dochází k poklesu sekrece TNF- $\alpha$  na úroveň neovlivňovaných makrofágů [47]. Viz obrázek 22:

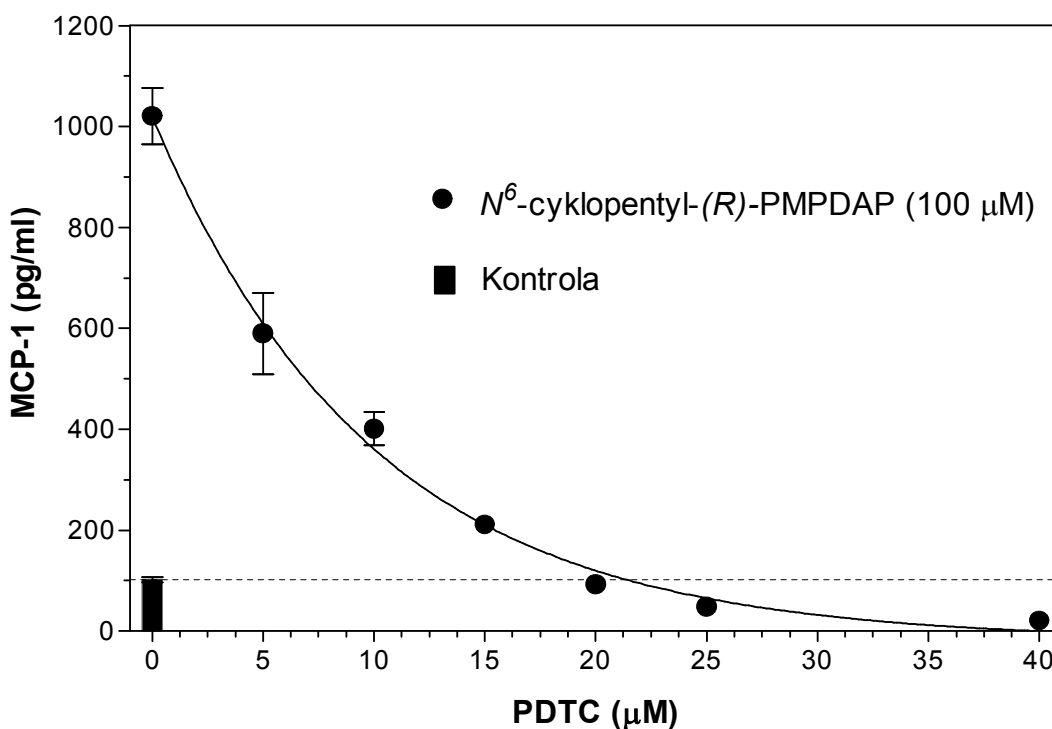


Obr. 22. Inhibiční efekt inhibitoru aktivace NF- $\kappa$ B, pyrrolidinditiokarbamátu (PDTC), na produkci TNF- $\alpha$  u myších makrofágů [47]. Zvýšení produkce TNF- $\alpha$  v buněčné kultuře makrofágů ( $2 \times 10^6$ /ml) po aplikaci acyklického nukleosidfosfonátu HPMPDAP (9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin) ve 100  $\mu$ M koncentraci je snižováno přidáním různých koncentrací PDTC. PDTC se přidal do buněčné kultury 10 min. před aplikací

sloučeniny HPMPDAP. Doba kultivace činila 5 h. Koncentrace TNF- $\alpha$  (pg/ml) byla stanovena metodou ELISA.

#### 2.4.2. Inhibice produkce MCP-1/CCL2 pyrrolidinditiokarbamátem

Zvýšení produkce MCP-1 po aplikaci acyklického nukleosidfosfonátu  $N^6$ -cyklopentyl-(R)-PMPDAP (100  $\mu$ M) u myších makrofágů bylo sníženo přidáním různých koncentrací pyrrolidinditiokarbamátu (PDTC). Při aplikaci 20  $\mu$ M koncentrace PDTC dochází k poklesu produkce MCP-1 na úroveň neovlivňovaných makrofágů [39]. Viz obrázek 23:



**Obr. 23.** Inhibiční efekt inhibitoru aktivace NF- $\kappa$ B, pyrrolidinditiokarbamátu (PDTC), na produkci MCP-1 u myších makrofágů [39]. Zvýšení produkce MCP-1 v buněčné kultuře makrofágů ( $2 \times 10^6$ /ml) po aplikaci sloučeniny  $N^6$ -cyklopentyl-(R)-PMPDAP (100  $\mu$ M) je snižováno přidáním různých koncentrací PDTC. PDTC se přidal 10 min. před aplikací sloučeniny  $N^6$ -cyklopentyl-(R)-PMPDAP (úplný chemický název a struktura sloučeniny viz obrázek 4 na straně 32). Doba kultivace činila 24 h. Koncentrace MCP-1 (pg/ml) byla stanovena metodou ELISA.





## 2.5. Vliv antagonistů adenosinových receptorů na expresi cytokinů a chemokinů

Účinky antagonistů adenosinových receptorů na expresi cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a chemokinů RANTES, MIP-1 $\alpha$  po aplikaci různých ANP jsou shrnuty v tabulce 8:

*Tab. 8. Inhibiční nebo neutrální účinek antagonistů adenosinových receptorů (50  $\mu$ M) na sekreci cytokinů/chemokinů indukovanou ANP (50  $\mu$ M) u myších makrofágů [60].*

Cytokiny	Antagonisté adenosinových receptorů				
	A <sub>1-3</sub> CGS-15943	A <sub>1</sub> DCCPX	A <sub>2a</sub> CSC	A <sub>2b</sub> Alloxazin	A <sub>3</sub> MRS-1191
TNF- $\alpha$	↓	↓	0	↓	0
IL-10	↓	↓	0	0	↓
RANTES	↓	↓	0	↓	↓
MIP-1 $\alpha$	0	0	0	0	0

V experimentech byly pozorovány pouze inhibiční nebo neutrální účinky jednotlivých antagonistů adenosinových receptorů na produkci cytokinů/chemokinů indukovanou různými ANP [60]. Testované ANP aktivovaly sekreci cytokinů/chemokinů v různé míře. Signifikantní rozdíly v inhibici produkce cytokinů/chemokinů po aplikaci antagonistů adenosinových receptorů v závislosti na chemické struktuře použitých ANP nebyly pozorovány. Konkrétní hodnoty výsledků experimentů jsou uvedeny v příloze č. 3 (publikace č. 3) [60].

Finální koncentrace dimetylsulfoxidu v kulturách makrofágů, který se používal jako rozpouštědlo antagonistů adenosinových receptorů, neměla negativní vliv na viabilitu buněk. Acyklický nukleosidfosfonát *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP kultivovaný samotný nebo společně s antagonisty adenosinových receptorů viabilitu makrofágů rovněž neovlivňoval [60].

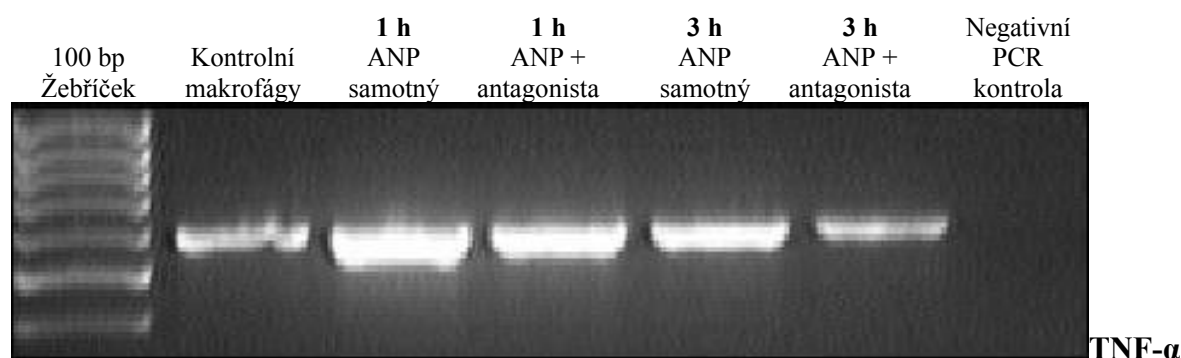
Inhibiční účinek nesespecifického antagonisty adenosinových receptorů CGS-15946 na expresi TNF- $\alpha$ , IL-10 a RANTES byl zkoumán také na úrovni mRNA. Sloučenina *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP indukovala transkripci mRNA již za 1 h působení. Přidání

**antagonisty adenosinových receptorů CGS-15943 do buněčných kultur makrofágů vedlo ke snížení exprese mRNA pro TNF- $\alpha$ , IL-10 a RANTES [60]. Viz další text.**

## *Inhibice exprese mRNA pro TNF- $\alpha$ nespecifickým antagonistou adenosinových receptorů CGS-15943*

Acyklický nukleosidfosfonát *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP (50  $\mu$ M) rychle a výrazně indukuje transkripci mRNA pro TNF- $\alpha$  a to již za 1 h po aplikaci této protivirové látky. Pokud je do buněčné kultury makrofágů přidán nespecifický antagonist adenosinových receptorů CGS-15943 (50  $\mu$ M), dochází ke zřetelné inhibici transkripce mRNA pro TNF- $\alpha$  [60].

V časovém intervalu 3 h je indukce transkripce mRNA pro TNF- $\alpha$  po aplikaci látky *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP již menší. Přidání antagonisty adenosinových receptorů CGS-15943 do buněčné kultury makrofágů vede opět k inhibici transkripce mRNA pro TNF- $\alpha$  [60]. Viz obrázek 24:

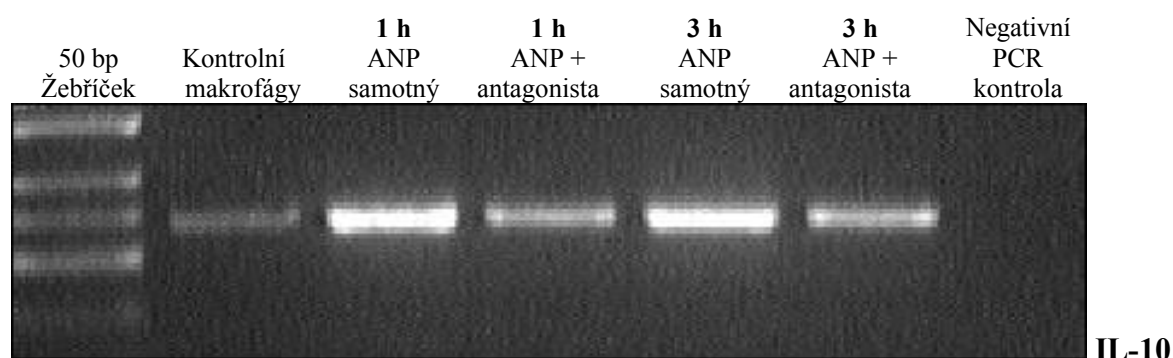


*Obr. 24. Inhibice transkripce mRNA pro TNF- $\alpha$  nespecifickým antagonistou adenosinových receptorů CGS-15943 u myších makrofágů [60]. Velikost PCR produktu je 585 bp. Zvýšení transkripce mRNA pro TNF- $\alpha$  po aplikaci acyklického nukleosidfosfonátu *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP (50  $\mu$ M, úplný chemický název a struktura sloučeniny viz obrázek 4 na straně 32) je sníženo přidáním antagonisty adenosinových receptorů CGS-15943 (50  $\mu$ M). Buňky ( $2 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly 1 h a 3 h.*

*Inhibice exprese mRNA pro IL-10 nespecifickým antagonistou adenosinových receptorů CGS-15943*

Acyklický nukleosidfosfonát *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP (50 μM) zvyšuje transkripci mRNA pro IL-10 a to již za 1 h po aplikaci této protivirové látky. Pokud je do buněčné kultury makrofágů přidán nespecifický antagonist adenosinových receptorů CGS-15943 (50 μM), dochází k inhibici transkripce mRNA pro IL-10 [60].

V časovém intervalu 3 h je indukce transkripce mRNA pro IL-10 po aplikaci látky *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP stejná jako za 1 h. Přidání antagonisty adenosinových receptorů CGS-15943 do buněčné kultury makrofágů vede opět k inhibici transkripce mRNA pro IL-10 [60]. Viz obrázek 25:

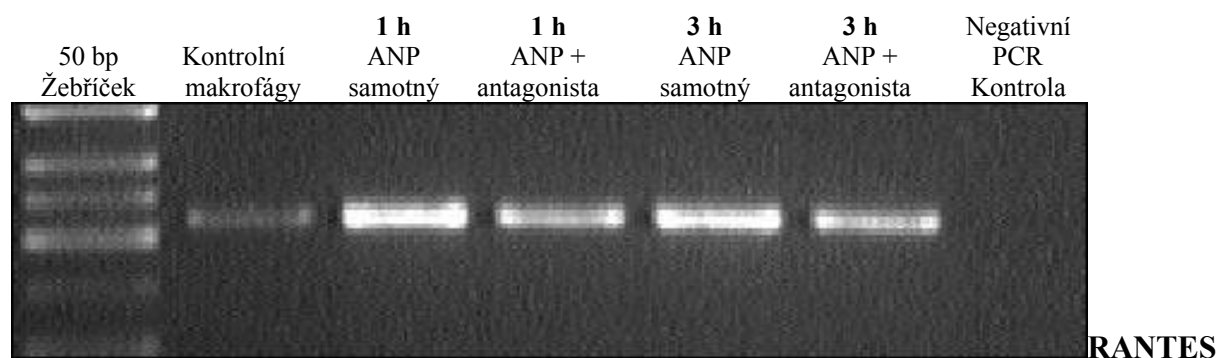


**Obr. 25.** *Inhibice transkripce mRNA pro IL-10 nespecifickým antagonistou adenosinových receptorů CGS-15943 u myších makrofágů [60]. Velikost PCR produktu je 235 bp. Zvýšení transkripce mRNA pro IL-10 po aplikaci acyklického nukleosidfosfonátu *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP (50 μM, úplný chemický název a struktura sloučeniny viz obrázek 4 na straně 32) je sníženo přidáním antagonisty adenosinových receptorů CGS-15943 (50 μM). Buňky ( $2 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly 1 h a 3 h.*

## *Inhibice exprese mRNA pro RANTES/CCL5 nespecifickým antagonistou adenosinových receptorů CGS-15943*

Acyklický nukleosidfosfonát *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP (50 μM) zvyšuje transkripci mRNA pro RANTES a to již za 1 h po aplikaci této protivirové látky. Pokud je k buňkám přidán nespecifický antagonist adenosinových receptorů CGS-15943, dochází k inhibici transkripce mRNA pro RANTES [60].

V časovém intervalu 3 h je indukce transkripce mRNA pro RANTES po aplikaci látky *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP stejná jako za 1 h po aplikaci. Přidání antagonisty adenosinových receptorů CGS-15943 do buněčné kultury makrofágů vede opět k inhibici transkripce mRNA pro RANTES [60]. Viz obrázek 26:



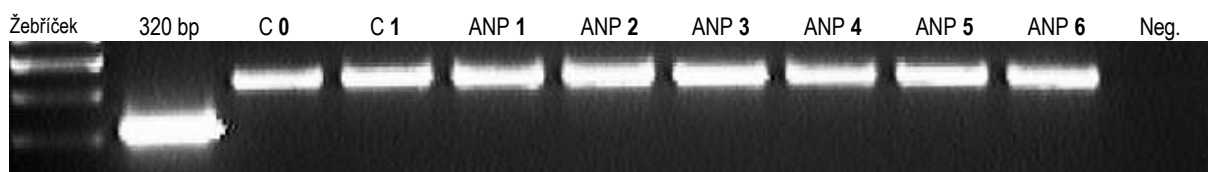
**Obr. 26.** *Inhibice transkripce mRNA pro RANTES nespecifickým antagonistou adenosinových receptorů CGS-15943 u myších makrofágů [60]. Velikost PCR produktu je 215 bp. Zvýšení transkripce mRNA pro RANTES u makrofágů po aplikaci acyklického nukleosidfosfonátu *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP (50 μM, úplný chemický název a struktura sloučeniny viz obrázek 4 na straně 32) je sníženo přidáním antagonisty adenosinových receptorů CGS-15943 (50 μM). Buňky ( $2 \times 10^6/ml$ ) se kultivovaly 1 h a 3 h.*

## 2.6. Exprese chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4 po aplikaci ANP

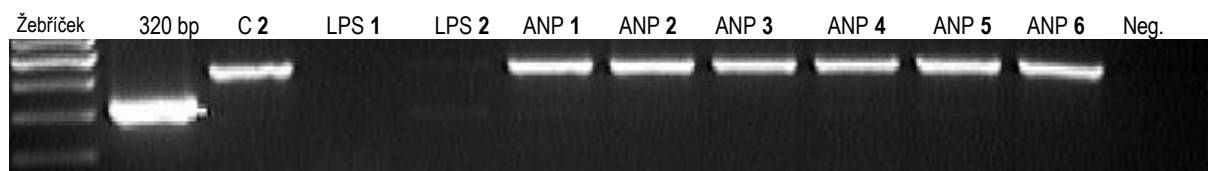
### 2.6.1. Exprese CCR5 na úrovni mRNA

Expresa chemokinového receptoru CCR5 je u myších lymfocytů na úrovni mRNA zřetelně vyjádřena, i když ne tak silně jako exprese receptoru CXCR4. Žádný z 6 testovaných ANP (50  $\mu$ M) neovlivnil transkripci mRNA pro CCR5 v časových intervalech 1 h, 2 h a 24 h. Testovány byly následující sloučeniny: ANP 1 = tenofovir [(R)-PMPA], ANP 2 = *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(R)-PMPDAP, ANP 3 = *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(R)-PMPDAP, ANP 4 = *N*<sup>6</sup>-dimethylaminoetyl-(R)-PMPDAP, ANP 5 = *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-PMEDAP, ANP 6 = *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP. LPS (1  $\mu$ g/ml) inhiboval produkci CCR5 mRNA v intervalech 1 h a 2 h. Fotografie RT-PCR experimentů jsou zobrazeny na následující straně na obrázku 27.

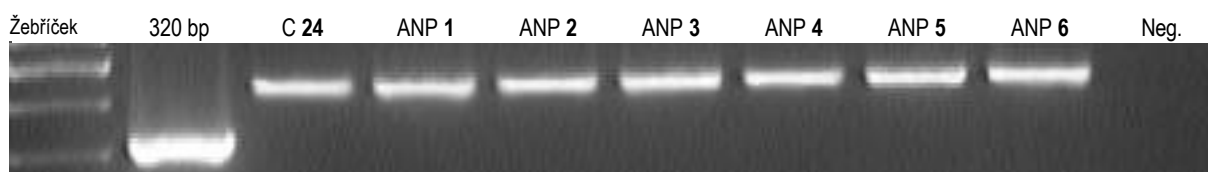
U myších makrofágů nebyla metodou RT-PCR detekována exprese mRNA pro CCR5. Sloučeniny ANP 1 = tenofovir [(R)-PMPA], ANP 2 = *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(R)-PMPDAP a ANP 6 = *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP (50  $\mu$ M) neindukovaly transkripci CCR5 mRNA v intervalech 1 h, 2 h a 24 h. LPS (1  $\mu$ g/ml) rovněž neindukoval transkripci CCR5 mRNA.



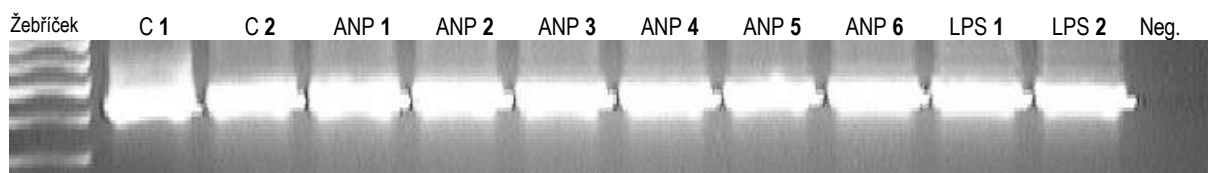
**a) kultivace ANP (50  $\mu$ M) 1 h**



**b) kultivace ANP (50 $\mu$ M) 2 h**



**c) kultivace ANP (50  $\mu$ M) 24 h**



**d) GAPDH**

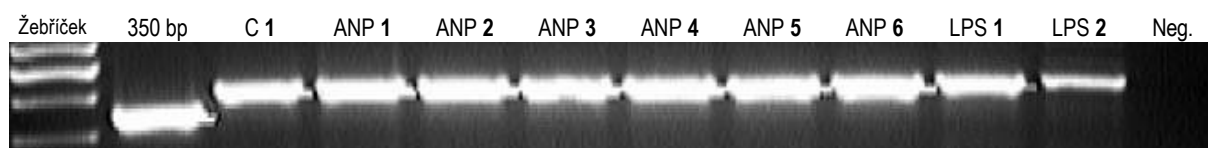
*Obr. 27. Expresa mRNA pro CCR5 u myších splenocytů. Velikost PCR produktu je 433 bp. Velikost PCR produktu získaného amplifikací syntetické DNA dodané výrobcem primerů je 320 bp. Jako žebříček byl použit „GeneRuler 100 bp DNA ladder“ (viz část Materiál a metody). Splenocyty byly kultivovány po dobu 1 h, 2 h a 24 h s různými ANP (ANP 1 - ANP 6: ANP 1 = tenofovir [(R)-PMPA], ANP 2 = N<sup>6</sup>-cyklopropyl-(R)-PMPDAP, ANP 3 = N<sup>6</sup>-cyklopentyl-(R)-PMPDAP, ANP 4 = N<sup>6</sup>-dimethylaminoethyl-(R)-PMPDAP, ANP 5 = N<sup>6</sup>-cyklopentyl-PMEDAP, ANP 6 = N<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP; chemická struktura a úplné názvy sloučenin viz obrázek 4 na straně 32). Finální koncentrace ANP byla 50  $\mu$ M. Lipopolysacharid (1  $\mu$ g/ml) byl přidáván k buňkám na 1 h (LPS 1) a 2 h (LPS 2). Poté následovala extrakce RNA a její analýza pomocí RT-PCR. C 0 = neovlivněné buňky (nekultivovány). C 1, C 2, C 24 = neovlivněné buňky, kultivovány po dobu 1 h, 2 h a 24 h. 320 bp = pozitivní PCR kontrola. Negativní PCR kontrola je označena jako Neg. ANP neovlivňují genovou transkripci mRNA pro CCR5 po kultivační době 1 h (a), 2 h (b) a 24-h (c). LPS inhibuje transkripci CCR5 mRNA v čase 1 h a 2 h. Příklad exprese mRNA pro konstitutivní gen GAPDH (450 bp) je ukázán na fotografii d).*



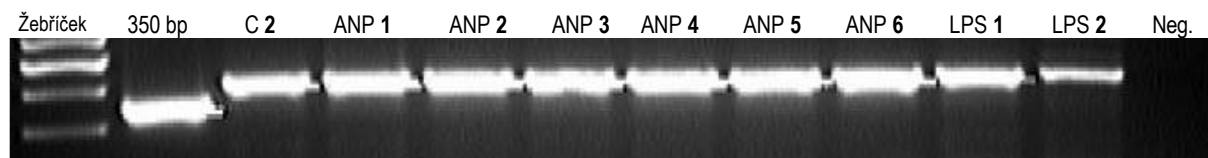
## 2.6.2. Exprese CXCR4 na úrovni mRNA

Exprese chemokinového receptoru CXCR4 je u myších lymfocytů na úrovni mRNA velmi silně vyjádřena. Žádný z 6 testovaných ANP (50  $\mu$ M) neovlivnil transkripci mRNA pro CXCR4 v časových intervalech 1 h, 2 h a 24 h. Testovány byly následující sloučeniny: ANP 1 = tenofovir [(*R*)-PMPA], ANP 2 = *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP, ANP 3 = *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP, ANP 4 = *N*<sup>6</sup>-dimetylaminoetyl-(*R*)-PMPDAP, ANP 5 = *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-PMEDAP, ANP 6 = *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP. LPS (1  $\mu$ g/ml) inhiboval mírně transkripci CXCR4 mRNA za 1 h působení a ještě silněji po době 2 h. Fotografie RT-PCR experimentů jsou zobrazeny na následující straně na obrázku 28.

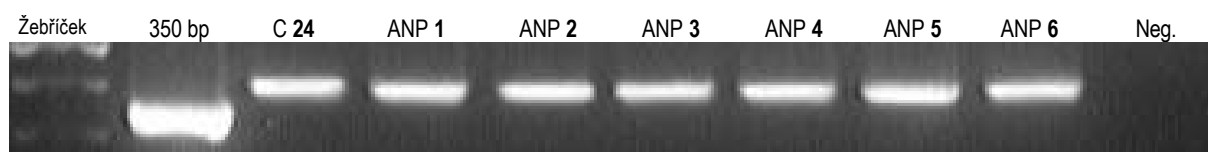
U myších makrofágů byla metodou RT-PCR detekována zcela minimální exprese mRNA pro CXCR4. Sloučeniny ANP 1 = tenofovir [(*R*)-PMPA], ANP 2 = *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP a ANP 6 = *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP (50  $\mu$ M) neindukovaly transkripci CXCR4 mRNA v intervalech 1 h, 2 h a 24 h. Rovněž LPS (1  $\mu$ g/ml) neindukoval transkripci CXCR4 mRNA.



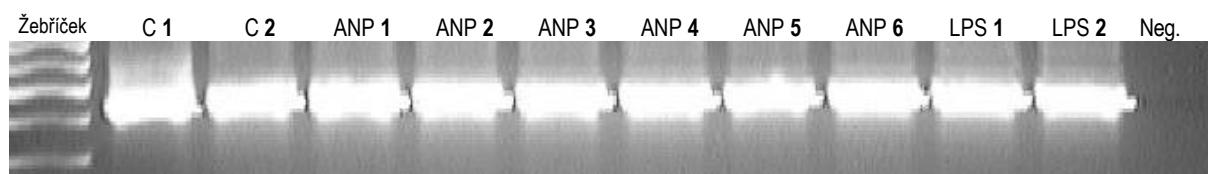
**a) kultivace ANP (50  $\mu$ M) 1 h**



**b) kultivace ANP (50  $\mu$ M) 2 h**



**c) kultivace ANP (50  $\mu$ M) 24 h**



**d) GAPDH**

*Obr. 28. Exprese mRNA pro CXCR4 u myších splenocytů. Velikost PCR produktu je 415 bp. Velikost PCR produktu získaného amplifikací syntetické DNA dodané výrobcem primerů je 350 bp. Jako žebříček byl použit „GeneRuler 100 bp DNA ladder“ (viz část Materiál a metody). Splenocyty byly kultivovány po dobu 1 h, 2 h a 24 h s různými ANP (ANP 1 – ANP 6: ANP 1 = tenofovir [(R)-PMPA], ANP 2 = N<sup>6</sup>-cyklopropyl-(R)-PMPDAP, ANP 3 = N<sup>6</sup>-cyklopentyl-(R)-PMPDAP, ANP 4 = N<sup>6</sup>-dimethylaminoethyl-(R)-PMPDAP, ANP 5 = N<sup>6</sup>-cyklopentyl-PMEDAP, ANP 6 = N<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP; chemická struktura a úplné názvy sloučenin viz obrázek 4 na straně 32). Finální koncentrace ANP byla 50  $\mu$ M. Lipopolysacharid (1  $\mu$ g/ml) byl k buňkám přidáván na dobu 1 h (LPS 1) a 2 h (LPS 2). Poté následovala extrakce RNA a její analýza pomocí RT-PCR. C 1, C 2, C 24 = neovlivněné buňky, kultivované 1 h, 2 h a 24 h. 350 bp = pozitivní PCR kontrola. Negativní PCR kontrola je označena jako Neg. ANP neovlivňují transkripci CXCR4 mRNA po kultivační době 1 h (a), 2 h (b) a 24 h (c). LPS inhibuje transkripci CXCR4 mRNA za 1 h a také za 2 h. Příklad exprese mRNA pro konstitutivní gen GAPDH (450 bp) je ukázán na fotografii d).*

## V. Diskuze

### 1. Exprese cytokinů a chemokinů po aplikaci ANP

V průběhu našeho výzkumu jsme sledovali imunobiologické účinky nově syntetizovaných acyklických nukleosidfosfonátů s virostatickými vlastnostmi za účelem nalezení perspektivních sloučenin z hlediska dalšího možného vývoje antivirotik.

Rozvoj virových infekcí je závislý na interakci mezi virulenčními faktory a mechanismy vrozené i získané imunity. Obranné funkce organismu jsou zprostředkovány cytokiny, které řídí expresi dalších antiinfekčních molekul např. oxidu dusnatého [74, 92]. NO inhibuje replikaci řady virů včetně viru HIV-1 a hepatitidy B [169, 170]. Produkci NO mohou ovlivnit četné cytokiny. Za klíčový cytokin pro zvýšení exprese NO je považován TNF- $\alpha$ , který synergizuje s IFN- $\gamma$  [171, 172]. Naproti tomu u IL-10 se uvádí inhibiční vliv na produkci NO [173].

Problematika regulace exprese NO byla v minulosti studována rovněž na našem pracovišti [18, 48, 58, 174]. Konkrétně IL-10 v kombinaci s IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  zvýšil produkci NO u myších makrofágů [174]. V dalších experimentech se zjistilo, že antiretrovirotikum tenofovir indukuje sekreci cytokinů TNF- $\alpha$  i IL-10, samotný ale produkci NO nezvyšuje. V kombinaci s IFN- $\gamma$  tenofovir produkci NO však zvyšuje a tento efekt je neutralizován přidáním protilátek proti cytokinům TNF- $\alpha$  a IL-10 do buněčných kultur makrofágů [18].

V experimentech provedených s různými nehydroxylovanými  $N^6$ -deriváty adeninu a 2,6-diaminopurinu nebo hydroxylovanými deriváty adeninu a 2,6-diaminopurinu se produkce NO po aplikaci samotných ANP nezvýšila. Ve shodě s dřívějšími nálezy [48] některé sloučeniny zvýšily produkci NO při společné kultivaci s IFN- $\gamma$  [41, 47]. Tyto ANP byly vybrány pro následnou studii týkající se vlivu ANP na expresi cytokinů/chemokinů. Nehydroxylované deriváty ANP, které zvýšily produkci NO, rovněž aktivovaly sekreci cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a chemokinů RANTES, MIP-1 $\alpha$  (různou měrou v závislosti na chemické struktuře). Sekreci IL-10 zvyšovaly ANP nejméně. Nejúčinnější cykloalkylové deriváty ANP zvýšily produkci všech cytokinů/chemokinů [41]. Co se týče hydroxylovaných derivátů ANP, také tyto sloučeniny aktivovaly expresi cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a chemokinů RANTES, MIP-1 $\alpha$  a to rovněž v závislosti na chemické struktuře [47]. Nejúčinnější byla nesubstituovaná sloučenina HPMPDAP, která stimulovala sekreci všech studovaných

cytokinů/chemokinů. Naproti tomu ostatní hydroxylované deriváty ANP neměly schopnost zvýšit expresi všech studovaných cytokinů/chemokinů [47]. Potenciál ANP aktivovat expresi cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a chemokinů RANTES, MIP-1 $\alpha$  by mohl znamenat dodatečný protiinfekční mechanismus účinku těchto léčiv, jak je uvedeno níže.

TNF- $\alpha$  má protivirové účinky u mnoha virových infekcí a patří ke klíčovým molekulám, které se podílejí na obraně organismu proti virovým aj. infekčním patogenům [53, 175]. Exprese TNF- $\alpha$  je zvýšena např. u infekcí virem herpes simplex, Epstein-Barrové, influenzy, hepatitidy B, HTLV-1 a HIV-1 [112].

TNF- $\alpha$  přímo potlačuje replikaci cytomegaloviru [176], herpes simplex viru 1 a 2 [175], varicella zoster viru [177], adenoviru [178], viru encefalomyokarditidy a vezikulární stomatitidy [179].

TNF- $\alpha$  má dále i antibakteriální vlastnosti, např. proti infekci *Listeria monocytogenes* [180]. Působí též protiparazitárně, např. proti infekci *Toxoplasma gondii* [181] nebo *Trypanosoma cruzi* [182].

**Podle některých údajů je TNF- $\alpha$  účinný také proti viru HIV-1 [183]. Supresivní efekt TNF- $\alpha$  proti viru HIV-1 může záviset na snížení exprese receptoru CCR5 pro vstup viru HIV-1 do buňky, kterou TNF- $\alpha$  způsobuje stimulací produkce  $\beta$ -chemokinů [52, 184]. Podle jiných autorů však TNF- $\alpha$  zvyšuje replikaci a produkci viru HIV-1 [25, 51, 78, 185].**

Role TNF- $\alpha$  v patogenezi HIV-1 infekce byla intenzivně studována. TNF- $\alpha$  je někdy používán jako referenční cytokin ve studiích zabývajících se rolí cytokinů při regulaci produkce viru HIV-1 a jeho šíření [29]. Zvýšené hladiny TNF- $\alpha$  byly nalezeny v plazmě, séru, cerebrospinálním moku a bronchoalveolární laváži osob infikovaných virem HIV-1. Zvýšená produkce TNF- $\alpha$  byla také zjištěna u B lymfocytů získaných z krve a lymfatické tkáně HIV-1 pozitivních pacientů [186]. Některé studie uvádějí pozitivní korelaci mezi hladinou TNF- $\alpha$  a

progresí infekce virem HIV-1 [187]. Bylo také zjištěno, že léčba osob infikovaných virem HIV-1 azidothymidinem má za následek snížení hladin TNF- $\alpha$  v séru [188]. V experimentálním modelu rekombinantní forma rozpustného TNF- $\alpha$  receptoru potlačovala HIV-1 transkripci a expresi u chronicky infikovaných buněk stimulovaných TNF- $\alpha$  [189].

Lze shrnout, že i když větší část literárních údajů hovoří o nepříznivé úloze TNF- $\alpha$  v patogenezi HIV-1 infekce, nelze pominout skutečnost, že TNF- $\alpha$  aktivuje produkci anti-HIV-1  $\beta$ -chemokinů a působí proti široké škále infekčních patogenů, jak bylo zmíněno. Vzhledem k tomu, že v pokročilejší fázi infekci virem HIV-1 jsou u pacientů častá další infekční onemocnění zahrnující virové infekce [77], mohlo by být z určitého pohledu považováno za přínos, že se ANP vyznačují schopností zvýšit produkci TNF- $\alpha$ . Je známo, že viry mohou inhibovat aktivitu TNF- $\alpha$  a interferonů, aby unikly mechanismům imunitního dozoru hostitele [190]. Stimulační efekt TNF- $\alpha$  na replikaci viru HIV-1 by mohl být vyvážen působením IL-10, jehož expresi ANP mohou rovněž aktivovat. IL-10 inhibuje replikaci viru HIV-1 [54], a tak by případně mohl zvrátit indukční vliv TNF- $\alpha$  na šíření HIV-1 infekce.

IL-10 je pokládán za jeden z klíčových cytokinů z hlediska patogeneze infekce virem HIV-1 i vzniku syndromu získaného selhání imunity AIDS [24, 78]. Sekrece IL-10 monocyty a makrofágy je podobně jako u prozáněťových cytokinů IL-1 a TNF- $\alpha$  indukována infekcí virem HIV-1. Zvýšení produkce IL-10 v souvislosti s HIV-1 infekcí bylo pozorováno jak za podmínek *in vitro* tak *in vivo* [191]. Podle některých autorů jsou zvýšené hladiny IL-10 *in vivo*, zjišťované jako sérové hladiny IL-10, nebo pomocí *in situ* hybridizace ve tkáni lymfatických uzlin infikovaných pacientů, spíše asociovány se vznikem non-Hodgkinovských lymfomů během progresse onemocnění AIDS, než s HIV-1 infekcí jako takovou [78].

Jiný přístup k objasnění role IL-10 v patogenezi HIV-1 infekce a onemocnění AIDS byl demonstrován nedávno, kdy byl u více než 3000 pacientů analyzován polymorfismus promotoru genu pro IL-10 v pozici 5'-592, který ovlivňuje produkci IL-10. U pacientů infikovaných virem HIV-1 s genotypem pro nízkou produkci IL-10 došlo během 5 let k mnohem rychlejšímu rozvoji onemocnění AIDS. Naopak pacienti s genotypem pro vysokou produkci IL-10 byli před vznikem syndromu získané imunodeficiency AIDS chráněni [192].

IL-10 je pravděpodobně bifunkčním cytokinem, neboť je protektivní z hlediska progresse HIV-1 infekce do syndromu získaného selhání imunity AIDS, avšak zřejmě zvyšuje pravděpodobnost vzniku non-Hodgkinovských B lymfomů asociovaných s AIDS [78].

Co se týče jiných virových infekcí, je v klinické praxi dokumentován příznivý vliv IL-10 na průběh onemocnění hepatitidou C, který mimo jiné závisí na genotypu pacientů pro

vysokou nebo nízkou produkci tohoto cytokinu. U většiny pacientů léčených IL-10 (63-86%) se normalizují sérové hladiny ALT a dochází k histologickému zlepšení jaterní fibrózy. Navíc je IL-10 účinný i u těch pacientů, u nichž selhává léčba interferony [55]. U HIV-1 pozitivních pacientů je infekce virem hepatitidy C častá [12], a proto lze pokládat schopnost zvýšení produkce IL-10 po aplikaci ANP za přínos. Na druhé straně bylo zjištěno, že IL-10 může nepříznivě ovlivnit protivirové obranné funkce, a to mechanismem snížení sekrece IL-12, který má protivirové účinky [104].

Další faktor, který může být důležitý při hodnocení účinků ANP zvyšujících produkci IL-10, je vliv tohoto cytokinu na imunitní systém. Ačkoliv je IL-10 všeobecně pokládán za imunosupresivní cytokin, může mít imunostimulační vlastnosti [111]. Např. IL-10 posiluje činnost NK buněk, následně dochází k destrukci patogenu a zvýšené nabídce antigenů infekčního agens [109]. Obecně může být IL-10 užitečný při terapii akutních nebo chronických, systémových nebo lokalizovaných zánětlivých stavů. Např. u pacientů postižených psoriázou vedla léčba IL-10 ke zlepšení stavu a byla dobře tolerována. Na druhé straně u autoimunitních onemocnění (systémový lupus erytematodes) se hledají možnosti, jak účinky IL-10 neutralizovat [107].

Dalšími protivirovými cytokiny jsou IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$  [38]. V minulosti bylo zjištěno, že adefovir a sloučenina PMEDAP indukují po intraperitoneální aplikaci u myši produkci IFN- $\alpha/\beta$  [19, 40]. V našich experimentech tenofovir a  $N^6$ -substituované deriváty sloučenin PMPDAP a PMEDAP nevyšly sekreci IFN- $\alpha/\beta$  u myších makrofágů za podmínek in vitro. Potenciál ANP zvyšovat expresi IFN- $\alpha/\beta$  by mohl mít tedy souvislost s jejich chemickou strukturou. IFN- $\alpha$  účinně blokuje replikaci viru HIV-1 na několika úrovních jeho životního cyklu, a to při reverzní transkripci a při uvolňování nových virových částic z infikovaných buněk [193]. IFN- $\alpha$  byl již klinicky zkoušen jako přídatná terapie u HIV-1 pozitivních pacientů s příznivými výsledky [194]. Známé jsou účinky interferonů proti virům hepatitidy B a C [12]. Mechanismy posílení imunitních funkcí organismu při podávání interferonů zahrnují především zvýšenou produkci protilátek a zvýšení aktivity cytotoxických lymfocytů T [195].

K patrně nejdůležitějším chemokinům z hlediska patogeneze HIV-1 infekce patří  $\beta$ -chemokiny RANTES, MIP-1 $\alpha$  a MIP-1 $\beta$ . V roce 1995 bylo zjištěno, že chemokiny RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  produkované CD8<sup>+</sup> T lymfocyty jsou schopné potlačit replikaci viru HIV-1 *in vitro* [49]. Toto zjištění bylo důležité pro indentifikaci receptoru CCR5 pro tyto chemokiny jako hlavního koreceptoru pro vstup viru HIV-1 do buňky [196]. Další studie inhibiční účinek uvedených chemokinů na replikaci viru HIV-1 potvrdily [85].

Mechanismus potlačení replikace viru HIV-1 chemkinem RANTES může být zprostředkován pouhou prevencí vstupu molekuly proteinu obalu viru gp120 na receptor CCR5, nebo se může jednat o efekt dimerizace a internalizace receptoru CCR5 po navázání přirozeného ligandu RANTES [116]. U lidských makrofágů bylo demonstrováno, že RANTES konzistentně a významně inhibuje fúzi obalových proteinů viru HIV-1 s membránou napadených buněk [197]. Zdá se, že supresivní účinky RANTES na replikaci viru HIV-1 jsou závislé především na přítomnosti glykosaminoglykanových molekul na povrchu cílové buňky, které jsou vazebnými doménami pro RANTES [198]. V některých studiích  $\beta$ -chemokiny replikaci viru HIV-1 naopak zvyšovaly [199, 200]. Studie *in vivo* však podpořily hypotézu, že  $\beta$ -chemokiny potlačují replikaci viru HIV-1. U lidí a opic s neobvykle vysokou hladinou RANTES, kteří byli exponováni infekci virem HIV-1, příp. virem SIV (simian immunodeficiency virus) u makaků, byla pozorována rezistence k infekci [27, 201]. V jiné experimentální práci bylo zjištěno, že aplikace tenofoviru u novorozených makaků infikovaných virem SIV působila profylakticky nebo oddálila rozvoj AIDS [202]. Jak bylo v minulosti zjištěno v naší laboratoři, tenofovir expresi RANTES zvyšuje [42]. Chemokin RANTES se kromě receptoru CCR5 váže také na receptor CCR3, což je alternativní koreceptor pro vstup viru HIV-1 do buňky [26, 121]. Výsledky studií o inhibičním vlivu RANTES na infekci virem HIV-1 vedly k úsilí vyvinout léčiva pro léčbu a prevenci HIV-1 infekce. Byly připraveny modifikované molekuly Met-RANTES a aminoxypentan-RANTES, které účinně potlačují HIV-1 infekci [203].

ANP mají schopnost zvýšit produkci RANTES [41, 47], což by mohlo umocňovat jejich protivirové účinky. Chemokin RANTES hraje důležitou roli v mnoha aspektech imunitní odpovědi organismu na virové infekce. Je nezbytný pro normální výkonné funkce T buněk a pro migraci monocytů a lymfocytů do míst zánětlivé reakce v místě infekce [204]. Cytomegalovirus způsobující zánět sítnice u pacientů s AIDS, podněcuje

produkcí virových analogů, ligandů chemokinových receptorů CCR5 a CCR3, aby zabránil účinku RANTES a mohl se tak úspěšně replikovat [128].

Některé ANP zvyšovaly v experimentech expresi chemokinů MIP-1 $\alpha$  [41, 47]. Jak již bylo zmíněno, chemokin MIP-1 $\alpha$  obdobně jako RANTES účinně potlačuje infekci virem HIV-1 [49]. Kromě inhibice replikace viru HIV-1 je MIP-1 $\alpha$  nezbytný pro účinnou obranu organismu proti jiným virovým infekcím, jak prokázaly studie na MIP-1 $\alpha$  deficientních myších. MIP-1 $\alpha$  má protektivní úlohu při infekci virem influenzy [205], paramyxovirem „myší pneumonie“ [206] a cytomegalovirem [207]. Mechanismem protivirových účinků chemokinů MIP-1 $\alpha$  je např. chemotaxe NK buněk do místa průniku infekce a zvýšení produkce protivirového IFN- $\gamma$  [208]. Dále se na myším modelu infekce kvasinkou *Cryptococcus neoformans* zjistilo, že sekrece MIP-1 $\alpha$  je klíčová pro rozvoj obranné reakce imunitního systému. U zvířat deficientních v genu pro MIP-1 $\alpha$  byla po plicní infekci *Cryptococcus neoformans* signifikantně snížena doba přežití oproti kontrolní skupině [209]. Zvýšení produkce MIP-1 $\alpha$  po aplikaci ANP by mohlo znamenat dodatečný protiinfekční účinek těchto léčiv, který by byl mimo jiné zprostředkován aktivací imunitních funkcí organismu.

Poslední studovanou skupinou  $\beta$ -chemokinů v průběhu výzkumu byly monocytární chemotaktické proteiny (MCP). Testované ANP zvýšily genovou expresi MCP-1 a MCP-3 [39]. Tento efekt by mohl mít důsledky pro farmakoterapii infekčních a nádorových onemocnění. MCP mají z chemokinů nejsilnější účinek na migraci aktivovaných CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů do místa vzniku infekce a podílejí se tak na iniciaci imunitní odpovědi [119]. MCP se váží na četné chemokinové receptory, z nichž většina plní současně funkci koreceptorů pro vstup viru HIV-1 do buněk [82, 101]. MCP dále ovlivňují proces nádorového růstu (viz níže) [129]. Zvýšení exprese MCP po podání ANP by případně mohlo ovlivnit nejen replikaci viru HIV-1 ale také růst a šíření nádorů, které vznikají v pokročilejší fázi HIV-1 infekce.

Chemokin MCP-1 se váže především na receptor CCR2, také ale na receptor CCR5, což jsou koreceptory pro vstup viru HIV-1 do buňky [26, 81, 82, 101]. Může tedy vazbou na uvedené receptory inhibovat replikaci viru HIV-1 [81]. Urychlení replikace viru HIV-1 díky působení MCP-1 bylo však také pozorováno [28]. V klinické praxi byla zkoumána souvislost mezi genotypy pro vysokou produkci chemokinů MCP-1, MCP-3 a eotaxinu a zjistilo se, že nosiči alel pro vyšší tvorbu uvedených proteinů jsou méně



vnímaví vůči nákaze virem HIV-1. Byla vyslovena hypotéza, že se jedná o důsledek aktivace imunitního systému, a nikoliv o přímý inhibiční vliv těchto chemokinů na vstup viru HIV-1 do permissivních buněk [32]. Z hlediska patogeneze dalších infekčních onemocnění může být důležitý inhibiční vliv MCP-1 na rozvoj infekce cytomegalovirem [145, 210]. Na druhé straně se v nedávné době zjistilo, že osoby s genotypem pro vysokou produkci MCP-1 jsou vnímavější k nákaze plicní formou tuberkulózy [146]. Jak nákaza cytomegalovirem, tak mykobakteriální infekce jsou běžnými oportunními infekcemi u pacientů trpících nemocí AIDS [77].

Další komplikací u osob infikovaných virem HIV-1 je vznik různých malignit [7]. Zvýšení exprese MCP-1 po aplikaci ANP by mohlo růst těchto nádorů nespecificky ovlivnit. Zdá se, že úloha MCP-1 při progresi různých typů nádorů závisí na typu tumoru. Např. genotyp pro vysokou produkci tohoto chemokinu chrání pacientky před plným rozvojem rakoviny prsu [211]. Na druhé straně však za podmínek *in vitro* MCP-1 pravděpodobně přispívá k růstu Kaposiho sarkomu a to urychlením migrace vaskulárních buněk [148]. V současné době není MCP-1 považován za perspektivního kandidáta pro genovou terapii u nádorových onemocnění [150]. Zvýšení exprese MCP-1 po aplikaci ANP by z hlediska mechanismu účinku těchto léčiv mohlo být spíše kontroverzní vlastností [39].

Lidský chemokin MCP-2 aktivuje receptor CCR5 a blokuje replikaci viru HIV-1 [84]. Patofyziologický význam myšího genu pro MCP-2 nebyl zatím rozsáhle zkoumán. Zvýšená produkce MCP-2 provází např. mykobakteriální a schistosomální infekci [212] a dále stav po transplantaci nebo zánětlivém poškození orgánů [213]. Z testovaných ANP žádná látka genovou expresí MCP-2 neaktivovala. Tento chemokin má být v makrofázích exprimován [214].

Aktivace transkripce genu pro MCP-3 by mohla znamenat dodatečný protivirový a protinádorový mechanismus účinku ANP [39]. MCP-3 je přirozeným antagonistou receptoru CCR5, takže má schopnost blokovat vstup viru HIV-1 do buněk [28, 82]. Váže se rovněž na další HIV-1 koreceptory, receptory CCR2 a CCR3 [215]. V experimentech *in vitro* inhibuje MCP-3 dokonce replikaci lyfotropních kmenů HIV-1 a to zřejmě modulací funkce CD4 receptoru, tento efekt je však odvislý od koncentrace MCP-3. Vysoké dávky MCP-3 nejsou dostatečně účinné [86]. MCP-3 je nadějným kandidátem protinádorové terapie na rozdíl od kontroverzního MCP-1 [150]. Antineoplastický efekt

MCP-3 je zprostředkován aktivací Th1 imunitní odpovědi [149]. Prokázán byl např. u buněčných linií cervikálního a kolorektálního karcinomu [36, 37].

Myší chemokin MCP-5 je z hlediska chemické struktury a funkce možno podle některých autorů považovat za homolog lidského MCP-1. Přestože má být v makrofázích exprimován [216], testované ANP jeho produkci nestimulovaly [39].

Ze skupiny  $\alpha$ -chemokinů je hlediska patogeneze HIV-1 infekce velmi důležitý chemokin SDF-1 $\alpha$ . Testované ANP nezvýšily jeho produkci. U ANP, které jsou vyvíjeny jako anti-HIV-1 léčiva, není tato skutečnost povzbuzující. SDF-1 $\alpha$  se totiž váže na druhý klíčový koreceptor pro vstup viru HIV-1 do buňky, chemokinový receptor CXCR4, a má tak schopnost blokovat replikaci viru HIV-1 [83]. Ideální by bylo nalézt v preklinických testech sloučeninu, která by aktivovala genovou expresi jak  $\beta$ -chemokinů (obsazujících receptor CCR5), tak chemokinů SDF-1 $\alpha$ , který se váže na receptor CXCR4.

Z hlediska ovlivnění růstu nádorů, které se vyskytují u pacientů v pokročilejší fázi onemocnění AIDS, by mohl být neutrální účinek ANP na expresi SDF-1 $\alpha$  výhodnou vlastností. V nedávné době bylo sice zjištěno, že lokální sekrece SDF-1 $\alpha$  v nádorových tkáních má určitý význam pro indukci protinádorové odpovědi závislé na T lymfocytech [217], ale jiná pozorování svědčí pro to, že sekrece SDF-1 $\alpha$  přispívá u nádorových onemocnění k šíření metastáz [137].

Zvýšení exprese cytokinů a chemokinů pozorované v experimentech s ANP bude pravděpodobně souviset s aktivací mnoha signálních drah zahrnujících různé transkripční faktory. Jedním z nich je transkripční faktor NF- $\kappa$ B, který hraje zřejmě klíčovou roli v imunobiologických účincích ANP. Tento fylogeneticky starý mediátor imunitní a zánětlivé odpovědi ovlivňuje přímým způsobem řadu genů zahrnujících cytokiny (TNF- $\alpha$ ) a chemokiny (RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, MCP-3) [218, 219]. Expresi všech těchto molekul je možné zvýšit přidáním rozličných ANP k buněčným kulturám makrofágů a/nebo lymfocytů, případně monocytů. Zvýšení produkce cytokinu TNF- $\alpha$  a chemokinů MCP-1 po aplikaci ANP bylo sníženo přidáním inhibitoru aktivace NF- $\kappa$ B pyrrolidin dithiokarbamátu (PDTC) do buněčných kultur myších makrofágů. V závislosti na koncentraci PDTC dochází ke zřetelnému poklesu sekrece TNF- $\alpha$  a MCP-1 na úroveň kontrolních buněk [39, 47]. Také u krysích makrofágů PDTC potlačuje produkci TNF- $\alpha$  indukovanou acyklickým nukleosidfosfonátem, jak ukázala

**Melkusová a spol. [220]. Na aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B po aplikaci ANP lze usuzovat i nepřímo: antagonistu adenosinového receptoru  $A_{2B}$  Alloxazin v experimentech inhiboval zvýšení exprese cytokinu TNF- $\alpha$  a chemokinů RANTES po aplikaci ANP [60]. Po vazbě ligandů na  $A_{2B}$  receptor je aktivována signální dráha zahrnující NF- $\kappa$ B, což vede ke zvýšení genové exprese cytokinů a chemokinů [221].**

**Z dalších mechanismů, které by mohly předurčovat imunomodulační vlastnosti ANP spočívající ve zvýšení exprese cytokinů a chemokinů, připadá v úvahu aktivace různých proteinových kináz či tzv. toll-like receptorů.**

**Dosavadní nálezy o vlivu ANP na expresi cytokinů/chemokinů u myších buněk a pilotní studie u lidských buněk se v současné době ověřují v experimentech u lidských polymorfonukleárních leukocytů příp. krysích buněk [220, 222]. Výsledky korespondují se dříve publikovanými údaji o efektech ANP.**

## 2. Exprese chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4

### po aplikaci ANP

Aby se virus HIV-1 mohl účinně replikovat, musí nejdříve proniknout do hostitelské buňky. Primárním receptorem je povrchová molekula CD4 a sekundárním je jeden z chemokinových receptorů CCR5 nebo CXCR4, tzv. koreceptor. Některé kmeny viru HIV-1 mohou využívat však i další chemokinové receptory jako CCR2, CCR3, CCR8 a jiné, i když v menší míře, než hlavní koreceptory [26]. Pouze receptory CCR5 a CXCR4 jsou v současné době hlavním předmětem zájmu farmaceutického výzkumu v oblasti vývoje nových léčiv proti viru HIV-1 [33]. Strategie léčby, která není namířená přímo proti viru HIV-1 samotnému, ale nepřímo ovlivňuje jeho životní cyklus, by mohla být velmi úspěšná, neboť nepovede ke vzniku rezistentních mutant [223]. Někteří antagonisté receptoru CCR5 a/nebo CXCR4 jsou ve stadiu klinického zkoušení [224]. Zcela nový mechanismus účinku antiretrovirotik by představovala inhibice transkripce mRNA pro koreceptory pro vstup viru HIV-1 do buňky. V úvahu připadá především receptor CCR5, neboť jeho exprese není zcela nezbytná pro normální funkce organismu, na rozdíl od receptoru CXCR4 [225]. Jedinci s nízkou expresí CCR5 způsobenou mutací jsou málo vnímaví k infekci virem HIV-1 a zdá se, že tento receptor hraje klíčovou úlohu při přenosu HIV-1 infekce a progresi syndromu AIDS [226].

Vliv antiretrovirotik na genovou expresi chemokinových receptorů majících funkci HIV-1 koreceptorů doposud podrobně a rozsáhle zkoumán nebyl, proto se nabízí výzkum transkripce mRNA pro receptory CCR5 a CXCR4 po aplikaci ANP. Navíc ANP stimuluje mimo jiné tvorbu cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-10 [41], o nichž je známo, že expresi chemokinových receptorů ovlivňují (viz níže). Existoval tedy předpoklad, že by mohlo dojít ke zvýšení nebo snížení exprese mRNA pro receptor CCR5 a/nebo CXCR4.

Expresi chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4 lze ovlivnit řadou cytokinů [227, 228]. Účinek IL-10 byl zkoumán četnými autory s rozdílnými výsledky podle typu studovaných buněk. Snížení exprese receptoru CCR5 po aplikaci IL-10 bylo pozorováno u CD4<sup>+</sup> lymfocytů [228]. V jiné práci u T lymfocytů IL-10 expresi receptoru CCR5 neovlivňoval [229]. U makrofágů [230] a u monocytů [231] se exprese CCR5 po přidání IL-10 do buněčné kultury zvyšovala. U dendritických buněk a makrofágů docházelo po aplikaci IL-10 ke zvýšení transkripce mRNA pro receptor CXCR4, avšak u CD4<sup>+</sup> lymfocytů tomu bylo naopak [232].

Rovněž TNF- $\alpha$  ovlivňoval expresi chemokinových receptorů pozitivně nebo negativně podle toho, jaké buňky byly v experimentech použity. U lidských lymfocytů z periferní krve TNF- $\alpha$  snižoval expresi CCR5 [52]. Naproti tomu u lidských astrocytů TNF- $\alpha$  zvýšil transkripci mRNA pro receptory CCR5 i CXCR4 [227].

Také LPS má schopnost ovlivňovat expresi chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4. LPS snižoval expresi obou hlavních HIV-1 koreceptorů na úrovni mRNA i na úrovni proteinu v různých studiích [233-237]. Na druhé straně byly publikovány údaje o neutrálním nebo stimulačním efektu LPS na expresi chemokinových receptorů [238, 239]. V našich pokusech LPS potlačil transkripci mRNA pro receptory CCR5 a CXCR4.

LPS může omezovat HIV-1 infekci u makrofágů i T lymfocytů, což různí autoři vysvětlují indukčním účinkem LPS na sekreci  $\beta$ -chemokinů a negativním vlivem na expresi chemokinových receptorů [233, 235-237, 240]. Např. Worgall a spol. pozoroval po přidání LPS do buněčných kultur lidských makrofágů inhibici replikace viru HIV-1. Současně byla aktivována produkce  $\beta$ -chemokinů RANTES, MIP-1 $\alpha$  a snížena transkripce mRNA pro receptory CCR5 a CXCR4 [233]. Jiní autoři však dokumentovali vyšší penetraci viru HIV-1 do buněk po jejich expozici bakteriálním produktům [241].

Přestože testované ANP stimulují produkci cytokinů IL-10 a TNF- $\alpha$ , neovlivnily u myších lymfocytů a/nebo makrofágů transkripci mRNA pro receptory CCR5 a CXCR4. Lze si to vysvětlit tak, že případný efekt IL-10 na expresi CCR5 nebo CXCR4 mohl být protichůdně ovlivněn TNF- $\alpha$ , což mohlo platit i naopak. I když výsledky těchto experimentů naznačují, že vliv ANP na expresi receptorů CCR5 a CXCR4 na úrovni mRNA je neutrální, je nutné vzít v úvahu malý počet testovaných léčiv. Jednalo se o pilotní studii, která zasluhuje další rozšíření s použitím metod umožňujících velmi přesnou kvantifikaci exprese mRNA.

### 3. Vliv antagonistů adenosinových receptorů na expresi cytokinů a chemokinů

Výsledky experimentů ukázaly, že zvýšenou expresi cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a chemokinů RANTES po aplikaci ANP lze snížit přidáním antagonistů adenosinových receptorů do buněčných kultur makrofágů. Zvýšení produkce chemokinů MIP-1 $\alpha$  po aplikaci ANP však antagonisté adenosinových receptorů neovlivňují [60].

Konkrétně nesespecifický antagonist A<sub>1-3</sub> receptorů a specifický antagonist A<sub>1</sub> receptorů snížil expresi TNF- $\alpha$ , IL-10 a RANTES, která byla indukována působením ANP. Antagonista A<sub>2B</sub> receptorů snížil sekreci TNF- $\alpha$  a RANTES. Antagonista A<sub>3</sub> receptorů snížil produkci IL-10 a RANTES. Inhibice zvýšení produkce TNF- $\alpha$ , IL-10 a RANTES po aplikaci ANP byla patrná na úrovni proteinu a také na úrovni mRNA. Cytotoxicita antagonistů adenosinových receptorů byla přitom vyloučena. Antagonista A<sub>2A</sub> neměl vliv na zvýšení exprese cytokinů a chemokinů po aplikaci ANP. ANP tedy zvyšují produkci jednotlivých cytokinů a chemokinů v závislosti na typu adenosinového receptoru [60].

Lze předpokládat, že ANP aktivují receptory pro adenosin a následně dochází ke zvýšení exprese cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a chemokinů RANTES [60]. Obecně dochází po aktivaci adenosinových receptorů k ovlivnění genové exprese cytokinů/chemokinů prostřednictvím aktivace transkripčních faktorů jako např. CREB (cyclic AMP response element-binding protein) nebo NF- $\kappa$ B v případě receptoru A<sub>2B</sub> [221].

Rozdíl v mechanismu účinku mezi ANP a různými experimentálně používanými agonisty adenosinových receptorů spočívá v tom, že agonisté adenosinových receptorů ovlivňují genovou expresi cytokinů/chemokinů v kombinaci s LPS nebo jinými bakteriálními produkty, IL-1 $\beta$  apod [60]. Konkrétně agonisté adenosinových receptorů snižují expresi TNF- $\alpha$  zvýšenou působením LPS nebo IL-1 $\beta$  [242, 243]. Nesespecifický agonista adenosinových receptorů NECA (5'-*N*-etylcarboxamidoadenosin) navýšil produkci IL-10 u monocytů stimulovaných LPS [244]. V jiné práci zvýšil sekreci IL-10 samotný adenosin [245]. Produkci chemokinů MIP-1 $\alpha$  lze snížit agonisty receptorů pro adenosin u makrofágů [246], na druhé straně agonista adenosinového A<sub>1</sub> receptoru CPA (*N*<sup>6</sup>-cyklopentyladenosin) sekreci MIP-1 $\alpha$  neovlivňuje [247].

Vzhledem k tomu, že žádný antagonist adenosinových receptorů nesnížil produkci chemokinů MIP-1 $\alpha$  indukovanou působením ANP, je pravděpodobné, že ANP aktivují další receptory a následně signální dráhy, které podmiňují zvýšení exprese cytokinů/chemokinů [60].

ANP, které jsou analogy adeninu a 2,6-diaminopurinu by mohly aktivovat např. purinergní P<sub>2</sub> receptory [60]. Dále připadají v úvahu tzv. toll-like receptory. Aktivace toll-like receptorů vede prostřednictvím transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B ke zvýšení exprese cytokinů IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  a MIP-1 $\alpha$  [248, 249], tedy molekul, jejichž expresi lze zvýšit přidáním tenofoviru do buněčných kultur makrofágů [42].

Lze shrnout, že imunostimulační potenciál ANP je částečně výsledkem aktivace receptorů pro adenosin a že tyto sloučeniny je možné považovat za nespecifické ligandy těchto receptorů. Zvýšení genové exprese cytokinů a chemokinů po aplikaci ANP má přitom vztah k jednotlivým typům adenosinových receptorů a následně k různým transdukčním mechanismům [60].

Výzkum úlohy adenosinových receptorů při patogenezi různých onemocnění přinesl již první konkrétní výsledky. Antagonisté adenosinových receptorů jsou např. zařazeni do klinických zkoušek nových léčiv proti Parkinsonově chorobě. Neuroprotektivní účinek by přitom mohl být jejich obecnou vlastností. Agonisté A<sub>3</sub> receptorů jsou zkoušeni jako nová léčiva proti nádorovým onemocněním [221].

V současné době se na našem pracovišti věnujeme účinkům ANP na expresi adenosinových receptorů na úrovni mRNA u lidských i myších buněk, neboť je známo že expresi adenosinových receptorů lze ovlivnit četnými cytokiny [250-253].

## 4. Vztah mezi chemickou strukturou a účinky ANP na expresi cytokinů/chemokinů

Efekty testovaných ANP na expresi cytokinů/chemokinů mají vztah k jejich chemické struktuře. Nelze však formulovat jednoznačné závěry, na základě kterých by bylo možné navrhnout chemickou strukturu budoucích ANP vyznačujících se imunomodulačními účinky [41].

U sloučenin, které je možné syntetizovat ve formě optických stereoizomerů, byly v experimentech účinné pouze (*R*)-enantiomery [41].

Efekt ANP na expresi cytokinů/chemokinů závisí také na tom, zda je na pozici  $N^9$  heterocyklické báze adeninu nebo 2,6-diaminopurinu přítomna hydroxylovaná skupina. Hydroxylované deriváty ANP mají nižší potenciál indukovat expresi cytokinů včetně chemokinů než nehydroxylované deriváty ANP. Při 100  $\mu\text{M}$  koncentraci je efekt hydroxylovaných ANP mnohem nižší než efekt nehydroxylovaných ANP o koncentraci 25  $\mu\text{M}$  [47].

Z nehydroxylovaných derivátů ANP vysoce zvyšují expresi cytokinů/chemokinů cykloalkylové a cykloalkylmetylové sloučeniny:  $N^6$ -cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP,  $N^6$ -cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP,  $N^6$ -cyklooktyl-PMEDAP,  $N^6$ -cyklopentyl-PMEDAP a  $N^6$ -cyklohexylmetyl-PMEDAP. Rovněž deriváty ANP  $N^6$ -izobutyl-PMEDAP a  $N^6$ -dimethylaminoetyl-(*R*)-PMPDAP mohutně aktivují expresi cytokinů/chemokinů. Tyto sloučeniny jsou mnohem účinnější než tenofovir [(*R*)-PMPA], který je používán v klinické praxi [41]. Zvýšení produkce cytokinů a chemokinů po aplikaci účinných ANP je závislé na dávce. K aktivaci genové exprese postačuje u nejsilněji působících sloučenin 10  $\mu\text{M}$  koncentrace [39, 41].

Protivirové účinky ANP by mohly mít souvislost se schopností aktivovat genovou expresi cytokinů/chemokinů. Konkrétně alkylové a cykloalkylové  $N^6$ -deriváty 2,6-diaminopurinu jsou vysoce účinné proti herpesvirům, např. proti cytomegaloviru nebo varicella-zoster viru [43]. Protivirový efekt těchto sloučenin proti cytomegaloviru zjištěný v minulosti [43] by mohl souviset s jejich schopností zvyšovat expresi chemokinů MCP-1 [39], neboť bylo zjištěno, že tento chemokin hraje při obraně organismu proti cytomegalovirové infekci nezbytnou roli [144, 145, 210].



**Problematika vztahů mezi strukturou ANP a jejich biologickými účinky je podrobněji diskutována v přílohách č. 2 a č. 4 (publikace č. 2 a č. 4) [41, 47].**

## VI. Závěry disertační práce

**Na základě výsledků experimentů provedených v období IX/2002 až IX/2006 lze formulovat následující závěry o vlivu ANP na genovou expresi cytokinů, chemokinů a chemokinových receptorů:**

1. Nehydroxylované a hydroxylované deriváty ANP mají schopnost zvýšit expresi cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-10. Tenofovir a nehydroxylované deriváty ANP nezvýšily expresi IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$ .
2. Nehydroxylované a hydroxylované deriváty ANP mají schopnost zvýšit expresi chemokinů RANTES a MIP-1 $\alpha$ . Tenofovir a nehydroxylované deriváty ANP zvýšily expresi chemokinů MCP-1 a MCP-3, nikoliv však MCP-2, MCP-5 a SDF-1 $\alpha$ .
3. Tenofovir a nehydroxylované deriváty ANP neovlivnily expresi chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4 na úrovni mRNA.
4. Zvýšení exprese cytokinu TNF- $\alpha$  a chemokinů MCP-1 po aplikaci ANP je závislé na transkripčním faktoru NF- $\kappa$ B.
5. Zvýšení exprese cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a chemokinů RANTES po aplikaci ANP lze inhibovat antagonisty adenosinových receptorů. ANP by mohly být nespecifickými ligandy adenosinových receptorů.

## VII. Shrnutí

Acyklické nukleosidfosfonáty jsou samostatnou skupinou antivirotik, která účinně potlačují replikaci DNA virů a retrovirů. V klinické praxi se používají tenofovir (Viread<sup>®</sup>) k léčbě infekce virem HIV-1, adefovir (Hepsera<sup>®</sup>) k terapii hepatitidy B a cidofovir (Vistide<sup>®</sup>) k léčbě cytomegalovirové retinitidy u pacientů s AIDS [43]. V minulosti bylo zjištěno, že některé ANP jako např. tenofovir mají rovněž imunomodulační vlastnosti, které by mohly znamenat dodatečný protivirový účinek. Tenofovir zvyšuje expresi NO, cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a chemokinů RANTES, MIP-1 $\alpha$  [18, 42, 48].

V dalších experimentech jsme věnovali pozornost imunobiologickým účinkům nových derivátů ANP za podmínek *in vitro* u myších makrofágů a splenocytů, případně u lidských leukocytů. Nejdříve jsme věnovali pozornost sloučeninám odvozeným od adeninu nebo 2,6-diaminopurinu, které se liší přítomností fosfonometoxyetylové nebo fosfonometoxypropylové skupiny v poloze  $N^9$  a typem substituce aminoskupiny v poloze  $N^6$  heterocyklické báze. Zjistili jsme, že řada těchto sloučenin má schopnost zvýšit produkci NO, cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a chemokinů RANTES, MIP-1 $\alpha$  [41].

Nově jsme ukázali, že ANP indukují expresi chemokinů MCP-1 a MCP-3, nikoliv však MCP-2 a MCP-5 [39]. K molekulám jejichž exprese nebyla působením vybraných ANP ovlivněna patřily IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , SDF-1 $\alpha$  a chemokinové receptory CCR5 a CXCR4. Zvýšení produkce cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a chemokinů RANTES po aplikaci ANP bylo možné inhibovat antagonisty adenosinových receptorů [60]. Je možné se domnívat, že ANP jsou nescifickými ligandy adenosinových receptorů [60]. Zkoumali jsme také vliv hydroxylovaných ANP odvozených od adeninu a 2,6-diaminopurinu a jejich  $N^6$ -derivátů na sekreci cytokinů/chemokinů. Také tyto sloučeniny mají schopnost zvyšovat produkci NO, cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a chemokinů RANTES, MIP-1 $\alpha$  (v menší míře než nehydroxylované ANP) [47]. Zvýšení exprese NO a cytokinů/chemokinů po aplikaci ANP bylo způsobeno aktivací transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B [39, 47]. Efekt ANP na produkci NO a cytokinů/chemokinů je závislý na dávce [39, 41, 47]. Nejúčinnější nehydroxylované  $N^6$ -deriváty ANP zvyšují sekreci cytokinů/chemokinů několikanásobně více než tenofovir [41].

**Nově testované ANP by mohly být nadějnými sloučeninami z hlediska dalšího vývoje virostatik. Experimentální nálezy dokumentují, že ANP mohou být považovány za antivirotika nové generace, která mají kromě přímých protivirotických účinků rovněž efekty imunomodulační.**

## **VIII. Seznam publikací autora**

### **1. Seznam publikací, které jsou podkladem disertační práce**

1. Potměšil P, Holý A, Kmoníčková E, Křížková J, Zídek Z. Acyclic nucleoside phosphonate antivirals activate gene expression of monocyte chemotactic protein 1 and 3. *J Biomed Sci* 2007;14:59-66. *IF=1.995*.
2. Potměšil P, Krečmerová M, Kmoníčková E, Zídek Z, Holý A. Nucleotide analogues with immunobiological properties: 9-[2-hydroxy-3-(phosphonomethoxy)propyl]-adenine (HPMPA), -2,6-diaminopurine (HPMPDAP), and their *N*6-substituted derivatives. *Eur J Pharmacol* 2006;540:191-199. *IF=2.477*.
3. Kmoníčková E, Potměšil P, Holý A, Zídek Z. Purine P1 receptor-dependent immunostimulatory effects of antiviral acyclic analogues of adenine and 2,6-diaminopurine. *Eur J Pharmacol* 2006;530:179-187. *IF=2.477*.
4. Zídek Z, Potměšil P, Kmoníčková E, Holý A. Immunobiological activity of N-[2-(phosphonomethoxy)alkyl] derivatives of *N*<sup>6</sup>-substituted adenines, and 2,6-diaminopurines. *Eur J Pharmacol* 2003;475:149-159. *IF=2.477*.

### **2. Seznam ostatních impaktovaných publikací**

1. Maixnerová D, Merta M, Reiterová J, Stekrová J, Ryšavá R, Obeidová H, Viklický O, Potměšil P, Tesař V. The influence of three endothelin-1 polymorphisms on the progression of IgA nephropathy. *Folia Biol* 2007;53:27-32. *IF=0.719*.
2. Zimová M, Mysliveček J, Potměšil P. Retinoic acid attenuates the mild hyperoxic lung injury in newborn mice. *Physiol Res* 2007 (přijato do tisku). *IF=1.806*.
3. Hodis J, Kutinová-Canová N, Potměšil P, Kameníková L, Kmoníčková E, Zídek Z, Farghali H. The role of adrenergic agonists on glycogenolysis in rat hepatocyte culture and possible of NO. *Physiol Res* 2006 (přijato do tisku). *IF=1.806*.
4. Zídek Z, Anzenbacher P, Anzenbacherová E, Buchar E, Kmoníčková E, Potměšil P, Holý A. In vivo effects of antiviral acyclic nucleoside phosphonate 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]adenine (adefovir) on cytochrome P450 system of rat liver microsomes. *J Biomed Sci* 2006;13:295-301. *IF=1.995*.
5. Zídek Z, Potměšil P, Holý A. Cytostatic activity of antiviral acyclic nucleoside phosphonates in rodent lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;192:246-253. *IF=3.148*.

### **3. Neimpaktované zahraniční publikace**

1. †Lácha J, Hubáček JA, Potměšil P, Viklický O, Málek I, Vítko Š. TGF-beta 1 gene polymorphism in heart transplant recipients – effect on renal function. Ann Transplant 2001;6:39-43.

## IX. Seznam literatury

- [1] Roháčová H. Infekční lékařství - obor s minulostí i perspektivou. *Lékařské listy* 2006;8:3.
- [2] Holý A. Virostatika 2000 - a co dál. *Časopis lékařů českých* 2001;140:583-91.
- [3] Botros S, William S, Hammam O, Zidek Z, Holy A. Activity of 9-(S)-[3-Hydroxy-2-(Phosphonomethoxy)Propyl]Adenine against Schistosomiasis mansoni in Mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3853-8.
- [4] Jirásek V. Schistozomózy (bilharziózy). In: Klener P, editor. *Vnitřní lékařství*. Praha: Galén, 2001. p. 507.
- [5] De Clercq E. Recent highlights in the development of new antiviral drugs. *Current Opinion in Microbiology* 2005;8:552-60.
- [6] Staňková M. XVI International AIDS Conference, Toronto, Kanada, 13.-18.8.2006. *Remedia* 2006;16:538-40.
- [7] Klener P. *Vnitřní lékařství II*. 1998:166.
- [8] Hořejší J, Bartůňková J. Imunodeficiency. *Základy imunologie*, 2005. p. 220-35.
- [9] Lullmann H, Mohr K, Ziegler A, Bieger D. Léciva používaná při AIDS. *Barevný atlas farmakologie: Grada*, 2007. p. 292-3.
- [10] De Clercq E. New approaches toward anti-HIV chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry* 2005;48:1297-313.
- [11] Lullmann H, Mohr K, Ziegler A, Bieger D. Léciva používaná při AIDS. *Barevný atlas farmakologie: Grada*, 2000. p. 288-9.
- [12] Aster V. Virové hepatitidy u HIV infikovaných osob. *Lékařské listy* 2006;8:17-20.
- [13] Holý A. Inhibitory jednotlivých stupňů multiplikace virů. *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*, 2004. p. 94-147.
- [14] De Clercq E. HIV-chemotherapy and -prophylaxis: new drugs, leads and approaches. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004;36:1800-22.
- [15] De Clercq E. Acyclic nucleoside phosphonates: Past, present and future. Bridging chemistry to HIV, HBV, HCV, HPV, adeno-, herpes- and poxvirus infections: the phosphonate bridge. *Biochemical Pharmacology* 2006.
- [16] Bartůňková M. Imunodeficiency. *Grada Avicenum* 2002:180-4.
- [17] De Clercq E. HIV-chemotherapy and prophylaxis: new drugs, leads and approaches. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1800-22.
- [18] Zidek Z, Holý A, Franková D. Antiretroviral agent (R)-9-(2-phosphonomethoxypropyl)adenine stimulates cytokine and nitric oxide production. *Eur J Pharmacol* 1997;331:245-52.
- [19] Calio R, Villani N, Balestra E, Sesa F, Holy A, Balzarini J, et al. Enhancement of natural killer activity and interferon induction by different acyclic nucleoside phosphonates. *Antiviral Res* 1994;23:77-89.
- [20] Majka M, Rozmyslowicz T, Lee B, Murphy SL, Pietrzowski Z, Gaulton GN, et al. Bone marrow CD34+ cells and megakaryoblasts secrete {beta}-chemokines that block infection of hematopoietic cells by M-tropic R5 HIV. *J Clin Invest* 1999;104:1739-49.
- [21] Majka M, Rozmyslowicz T, Ratajczak J, Dobrowsky A, Pietrzowski Z, Gaulton GN, et al. The limited infectability by R5 HIV of CD34(+) cells from thymus, cord, and peripheral blood and bone marrow is explained by their ability to produce beta-chemokines. *Exp Hematol* 2000;28:1334-42.

- [22] Rozmyslowicz T, Kijowski J, Conover DO, Majka M, Baj-Krzyworzeka M, Reca R, et al. New T-lymphocytic cell lines for studying cell infectability by human immunodeficiency virus. *Eur J Haematol* 2001;67:142-51.
- [23] Villar C, Dongari-Bagtzoglou A. Therapeutic modulation of cytokines in chronic infectious diseases. *Curr Pharm Des* 2006;12:2329-48.
- [24] Alfano M, Poli G. Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Molecular Immunology* 2005;42:161-82.
- [25] Copeland K. Modulation of HIV-1 transcription by cytokines and chemokines. *Mini Rev Med Chem* 2005;5:1093-101.
- [26] Berger E, Murphy P, Farber J. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Annu Rev Immunol* 1999;17:657-700.
- [27] Zagury D, Lachgar A, Chams V, Fall L, Bernard J, Zagury J, et al. C-C chemokines, pivotal in protection against HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3857-61.
- [28] Vicenzi E, Alfano M, Ghezzi S, Gatti A, Veglia F, Lazzarin A, et al. Divergent regulation of HIV-1 replication in PBMC of infected individuals by CC chemokines: suppression by RANTES, MIP-1a and MCP-3, and enhancement by MCP-1. *J Leukoc Biol* 2000;68:405-12.
- [29] Alfano M, Poli G. The cytokine network in HIV infection. *Curr Mol Med* 2002;2:677-89.
- [30] Alfano M, Poli G. Cytokine and chemokine based control of HIV infection and replication. *Curr Pharm Des* 2001;7:993-1013.
- [31] Arenzana-Seisdedos F, Parmentier M. Genetics of resistance to HIV infection: role of co-receptors and co-receptor ligands. *Seminars in Immunology* 2006;18:387-403.
- [32] Modi W, Goedert J, Strathdee S, Buchbinder S, Detels R, Donfield S, et al. MCP-1-MCP-3-Eotaxin gene cluster influences HIV-1 transmission. *AIDS* 2003;17:2357-65.
- [33] Moore J, Kitchen S, Pugach P. The CCR5 and CXCR4 coreceptors-central to understanding the transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004;20:111-26.
- [34] Paxton W, Kang S, Koup R. The HIV type 1 coreceptor CCR5 and its role in viral transmission and disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14:89-92.
- [35] Poli G, Fauci A. Role of cytokines in the pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. In: Aggarwal B, Puri R, editors. *Human cytokines: their role in disease and therapy*, 1999. p. 421-49.
- [36] Wetzel K, Menten P, Opdenakker G, Van Damme J, Grone H, Giese N, et al. Transduction of human MCP-3 by a parvoviral vector induces leukocyte infiltration and reduces growth of human cervical carcinoma cell xenografts. *J Gene Med* 2001;3:326-37.
- [37] Hu J, Li G, Wang W, Zhu J, Li Y, Zhou G, et al. Transfection of colorectal cancer cells with chemokine MCP-3 (monocyte chemotactic protein-3) gene retards tumor growth and inhibits tumor metastasis. *World J Gastroenterol* 2002;8:1067-72.
- [38] Maeyer E, De Maeyer-Guignard J. Interferons. In: Thomson A, editor. *The cytokine handbook*, 1998. p. 491-516.
- [39] Potměšil P, Holý A, Kmoníčková E, Křížková J, Zídek Z. Acyclic nucleoside phosphonate antivirals activate gene expression of monocyte chemotactic protein 1 and 3. *J Biomed Sci* 2007;14:59-66.
- [40] Del Gobbo V, Foli A, Balzarini J, De Clercq E, Balestra E, Villani N, et al. Immunomodulatory activity of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA), a potent anti-HIV nucleotide analogue, on in vivo murine models. *Antiviral Research* 1991;16:65-75.

- [41] Zidek Z, Potměšil P, Kmoníčková E, Holý A. Immunobiological activity of *N*-[2(phosphonomethoxy)alkyl] derivatives of *N*<sup>6</sup>-substituted adenines, and 2,6-diaminopurines. *Eur J Pharmacol* 2003;475:149-59.
- [42] Zidek Z, Franková D, Holý A. Activation by 9-(*R*)-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine of chemokine (RANTES, macrophage inflammatory protein-1 alpha) and cytokine (tumor necrosis factor alpha, interleukin-10 [IL-10], IL-1 b) production. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3381-6.
- [43] Holý A. Phosphonomethoxyalkyl analogs of nucleotides. *Curr Pharm Des* 2003;9:2567-92.
- [44] De Clercq E. Potential of acyclic nucleoside phosphonates in the treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2003;1:21-43.
- [45] Smeijsters L, Franssen F, Naesens L, De Vries E, Holý A, Balzarini J, et al. Inhibition of the in vitro growth of *Plasmodium falciparum* by acyclic nucleoside phosphonates. *Int J Antimicrob Agents* 1999;12:53-61.
- [46] Kaminsky R, Zweygarth E, De Clercq E. Antitrypanosomal activity of phosphonomethoxyalkylpurines. *J Parasitol* 1994;80:1026-30.
- [47] Potmesil P, Krecmerova M, Kmonickova E, Holy A, Zidek Z. Nucleotide analogues with immunobiological properties: 9-[2-Hydroxy-3-(phosphonomethoxy)propyl]-adenine (HPMPA), -2,6-diaminopurine (HPMPDAP), and their *N*(6)-substituted derivatives. *Eur J Pharmacol* 2006;540:191-9.
- [48] Zidek Z, Holý A, Franková D. Immunomodulatory properties of antiviral acyclic nucleotide analogues: cytokine stimulatory and nitric oxide costimulatory effects. *Int J Immunopharmacol* 1997;19:587-97.
- [49] Cocchi F, De Vico A, Garzino-Demo A. Identification of RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta as the major HIV suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995;270:1811-15.
- [50] Elliott M, Tebbey P, Pryharski K, Scheuer C. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with the CC chemokine RANTES. *J Med Virol* 2004;73:300-8.
- [51] Poli G. Tumor necrosis factor alpha functions in an autocrine manner in the induction of HIV expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:782-5.
- [52] Hornung F, Scala G, Leonardo M. TNF-alpha induced secretion of C-C chemokines modulates C-C chemokine receptor 5 expression on peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 2000;164:6180-7.
- [53] Benedict C. Viruses and TNF related cytokines, an evolving battle. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:349-57.
- [54] Akridge R, Oyafuso L, Reed S. IL-10 is induced during HIV infection and is capable of decreasing viral replication in human macrophages. *J Immunol* 1994;153:5782-9.
- [55] Nelson D, Lauwers G, Lau J. IL-10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology* 2000;118:655-60.
- [56] Wasmuth J-C, Nischalke H-D, Jutte A, Fatkenheuer G, Salzberger B, Sauerbruch T, et al. Chemokine mRNA levels in mononucleated cells of HIV-infected patients before and after initiation of PI- versus NNRTI-containing HAART. *Antiviral Research* 2004;61:207-12.
- [57] Burton CT, Hardy GAD, Sullivan AK, Nelson MR, Gazzard B, Gotch FM, et al. Impact of NNRTI compared to PI-based highly active antiretroviral therapy on CCR5 receptor expression, beta-chemokines and IL-16 secretion in HIV-1 infection. *Clinical & Experimental Immunology* 2002;130:286-92.
- [58] Zidek Z, Franková D, Holý A. Chemokines, nitric oxide and antiarthritic effects of 9-(2-phosphonomethoxyethyl)adenine (Adefovir). *Eur J Pharmacol* 1999;376:91-100.



- [59] Zídek Z, Potměšil P, Holý A. Cytostatic activity of antiviral acyclic nucleoside phosphonates in rodent lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;192:246-53.
- [60] Kmonickova E, Potmesil P, Holy A, Zidek Z. Purine P1 receptor-dependent immunostimulatory effects of antiviral acyclic analogues of adenine and 2,6-diaminopurine. *Eur J Pharmacol* 2006;530:179-87.
- [61] Zidek Z, Anzenbacher P, Anzenbacherova E, Buchar E, Kmonickova E, Potmesil P, et al. In vivo effects of antiviral acyclic nucleoside phosphonate 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]adenine (adefovir) on cytochrome P450 system of rat liver microsomes. *J Biomed Sci* 2006;13:295-301.
- [62] Otová B, Zídek Z, Holý A, Votruba I, Sladká M, Marinov I, et al. Antitumor activity of novel purine acyclic nucleotide analogs PMEA and PMEDAP. *In Vivo* 1997;11:163-7.
- [63] Gallant J, DeJesus E, Arribas J, Pozniak A, Gazzard B, Campo R. Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV. *N Engl J Med* 2006;354:251-60.
- [64] Krečmerová M, Masojídková M, Holý A. Synthesis of N9- and N7-[2-hydroxy-3-phosphonomethoxypropyl] derivatives of N6-substituted adenines, 2,6-diaminopurines and related compounds. *Collect Czechoslovak Chem Commun* 2004;69:1889-913.
- [65] Holý A, Votruba I, Tloušťová E, Masojídková M. Synthesis and cytostatic activity of N-[2-(phosphonomethoxy)alkyl] derivatives of N<sup>6</sup>-substituted adenines, 2,6-diaminopurines and related compounds. *Collect Czechoslovak Chem Commun* 2001;66:1545-92.
- [66] Kramata P, Votruba I, Otová B, Holý A. Different inhibitory potencies of acyclic phosphonomethoxyalkyl nucleotide analogs toward DNA polymerases  $\alpha$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$ . *Mol Pharmacol* 1996;49:1005-11.
- [67] Crowe S. New reverse transcriptase inhibitors. *Adv Exp Med Biol* 1999;458:183-97.
- [68] Yang H, Datema R. Prolonged and potent therapeutic and prophylactic effects of (S)-1-[(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxy)propyl]cytosine against herpes simplex virus type 2 infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1596-600.
- [69] Lalezari J. Cidofovir: results of a phase I/II study of novel antiviral nucleotide analogue. *J Infect Dis* 1995;171:788-96.
- [70] De Clercq E. Therapeutic potential of Cidofovir (Vistide) for the treatment of DNA virus (i.e. herpes-, papova-, pox and adenovirus) infections. *Verh K Acad Geneesk Belg* 1996;58:19-47.
- [71] Lin J. Inhibitory effects of acyclic nucleoside analogues, including (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl)-cytosine, on Epstein-Barr virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2440-3.
- [72] Reymen D, Naesens L, Balzarini J, Holý A, Dvořáková H, De Clercq E. Antiviral activity of selected acyclic nucleoside analogues against human herpesvirus 6. *Antiviral Res* 1995;28:343-57.
- [73] Perillo R. Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine resistant hepatitis B. *Hepatology* 2000;32:129-34.
- [74] Zídek Z. Osobní sdělení. 2007.
- [75] Krejsek J, Kopecký O. *Klinická imunologie*. 2004:751-72.
- [76] Hořejší J, Bartůňková J. *Cytokiny. Základy imunologie*, 2005. p. 95-103.
- [77] Holý A. Úvod. *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*, 2004. p. 9-53.
- [78] Breen E. Pro- and anti-inflammatory cytokines in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacol Ther* 2002;95:295-304.

- [79] Hynie S. Speciální farmakologie VII. Protinádorová a protiinfekční chemoterapeutika. 1999:210-6.
- [80] Cunningham A, Kedzierska K. Chemokines in HIV infections. In: Mahalingham S, editor. Chemokines in viral infections, 2004. p. 83-91.
- [81] Frade J, Llorente M, Mellado M, Alcamí J, Gutierrez-Ramos J, Zaballos A, et al. The amino-terminal domain of the CCR2 chemokine receptor acts as coreceptor for HIV-1 infection. *J Clin Invest* 1997;100:497-502.
- [82] Blanpain C, Migeotte I, Lee B, Vakili J, Doranz B, Govaerts C, et al. CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as natural antagonist. *Blood* 1999;94:1899-905.
- [83] Bleul C, Farzan M, Choe H. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996;382:829-33.
- [84] Gong W, Howard O, Turpin J, Grimm M, Ueda H, Gray P, et al. Monocyte chemoattractant protein-2 activates CCR5 and blocks CD4/CCR5-mediated HIV-1 entry replication. *J Biol Chem* 1998;273:4289-92.
- [85] Capobianchi M, Abbate I, Antonelli G, Turriziani O, Dolei A, Dianzani F. Inhibition of HIV type 1 BaL replication by MIP-1 alpha, MIP-1 beta, and RANTES in macrophages. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14:233-40.
- [86] Schols D, Proost P, Damme J, De Clercq E. RANTES and MCP-3 inhibit the replication of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains (SF-2, MN, and HE). *J Virol* 1997;74:7300-4.
- [87] Horuk R. Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. *Immunol Today* 1999;20:89-93.
- [88] Hermann E, Darcissac T, Idziorek A, Capron A, Bahr G. Recombinant interleukin-16 selectively modulates surface receptor expression and cytokine release in macrophages and dendritic cells. *Immunobiology* 1999;97:241-8.
- [89] Dhawan S, Heredia A, Wahl L, Epstein J, Meltzer M, Hewlett I. Interferon-gamma induced downregulation of CD4 inhibits the entry of human immunodeficiency virus type-1 in primary monocytes. *Pathobiology* 1995;63:93-9.
- [90] Vicenzi E, Biswas P, Mengozzi M, Poli G. Role of proinflammatory cytokines and beta-chemokines in controlling HIV replication. *J Leukoc Biol* 1997;62:34-40.
- [91] Aquaro S, Svicher V, Schols D, Pollicita M, Antinori A, Balzarini J, et al. Mechanisms underlying activity of antiretroviral drugs in HIV-1-infected macrophages: new therapeutic strategies. *J Leukoc Biol* 2006;80:1103-10.
- [92] Bartůňková J. Stručná fyziologie a patologie imunitního systému. In: Bartůňková J, Paulík M, editors. *Vyšetřovací metody v imunologii*, 2005. p. 19-41.
- [93] Vilček J. The cytokines: An Overview. In: Thomson A, editor. *The cytokine handbook*, 1998. p. 1-20.
- [94] Láchař J. Osobní sdělení. 2001.
- [95] Láchař J, Hubacek JA, Potmesil P, Viklicky O, Malek I, Vitko S. TGF-beta I gene polymorphism in heart transplant recipients--effect on renal function. *Ann Transplant* 2001;6:39-43.
- [96] Rang H, Dale M, Ritter J, Flover R. Local hormones, inflammation and immune reactions. *Pharmacology*, 2007. p. 202-22.
- [97] Zhang M, Tracey K. Tumor necrosis factor. In: Thomson A, editor. *The cytokine handbook*, 1998. p. 517-92.
- [98] Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 1997;8:253-65.
- [99] Wanidworanun C, Strober W. Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *J Immunol* 1993;151:6853-61.
- [100] Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:185-91.

- [101] Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999;10:61-86.
- [102] Pavelka K, Pavelková A. Biologická léčba ankylozující spondylitidy. *Remedia* 2006;16:389-97.
- [103] Danning C, Boumpas D. Commonly used disease-modifying antirheumatic drugs in the treatment of inflammatory arthritis: an update on mechanism of action. *Clin Exp Rheumatol* 1998;16:595-603.
- [104] Mosmann T. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 1994;56:1-26.
- [105] Seitz M. Interleukin 10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. *Eur J Immunol* 1995;25:1129-40.
- [106] Yano S. T helper cytokines differentially regulate MCP-1 production by human peripheral blood mononuclear monocytes and alveolar macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;35:1596-600.
- [107] Asadullah K, Sterry W, Volk H. Interleukin-10 therapy-review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003;55:241-69.
- [108] Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 2005;77:3-15.
- [109] Mocellin S, Panelli M, Wang E. The dual role of interleukin-10. *Trends Immunol* 2003;24:36-43.
- [110] Malefyt R, Moore K. Interleukin-10. In: Thomson A, editor. *The cytokine handbook*, 1998. p. 333-64.
- [111] Mocellin S, Marincola F, Rossi C. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:61-76.
- [112] Mogensen T, Paludan S. Molecular pathways in virus induced cytokine production. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65:131-50.
- [113] Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, et al. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22:1067-8.
- [114] Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 2001;250:91-104.
- [115] Houshmand P, Zlotnik A. Therapeutic applications in the chemokine superfamily. *Curr Opin Chem Biol* 2003;7:457-60.
- [116] Ward S, Westwick J. Chemokines- understanding their role in T lymphocyte biology. *Biochem J* 1998;333:457-70.
- [117] Mackay C. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2001;2:95-101.
- [118] Conti P, Barbacane R, M R. Chemokines in inflammatory states. *Allergy Asthma Proc* 1999;20:205-8.
- [119] Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Monocyte chemoattractant proteins MCP-1, MCP-2 and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *FASEB* 1994;8:1055-60.
- [120] Volin M. RANTES expression and contribution to monocyte chemotaxis in arthritis. *Clin Immunol* 1998;89:44-53.
- [121] Appay V, Rowland-Jones S. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol* 2001;22:83-7.
- [122] Chung J. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001;34:50-9.
- [123] Bellanti J. Cytokines and allergic diseases. *Allergy Asthma Proc* 1998;19:337-41.

- [124] Mahad D, Ransohoff R. The role of MCP-1 and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Semin Immunol* 2003;15:23-32.
- [125] Schroder J. Cytokine networks in the skin. *J Invest Dermatol* 1995;105:20-4.
- [126] Park M, Hoffmann K, Cheever A, Amichay D, Wynn T, Farber J. Patterns of chemokine expression in models of *Schistosoma mansoni* inflammation and infection reveal relationships between type 1 and type 2 responses and chemokines in vivo. *Infect Immun* 2001;69:6755-68.
- [127] Mahalingam S, Karupiah G. Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases. *Immunol Cell Biol* 1999;77:469-75.
- [128] Bodaghi B, Jones T, Zipeto D, Vita C, Sun L, Laurent L, et al. Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J Exp Med* 1998;188:855-66.
- [129] Zlotnik A. Chemokines in neoplastic progression. *Semin Cancer Biol* 2004;14:181-5.
- [130] Le Moine A, Goldman M, Ambramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation* 2002;73:1373-81.
- [131] Schwarz M, Wells T. New therapeutics that modulate chemokine networks. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:347-58.
- [132] Johnson Z, Schwarz M, Power C, Wells T, Proudfoot AAEI. Multi-faceted strategies to combat disease by interference with the chemokine system. *Trends Immunol* 2005;26:268-74.
- [133] Ibelgaufts H. RANTES. 19.3.2007. [www.copewithcytokines.de](http://www.copewithcytokines.de).
- [134] Fischer F, Luo M, Luo Y, Santambrogio L, Dorf M. RANTES induced chemokine cascade in dendritic cells. *J Immunol* 2001;167:1637-43.
- [135] Taub D. Chemokines and T lymphocyte activation: beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *J Immunol* 1996;156:2095-103.
- [136] Appay V, Brown A, Cribbes S. Aggregation of RANTES is responsible for its inflammatory properties. *J Biol Chem* 1999;274:27505-12.
- [137] Payne A, Cornelius L. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J Invest Dermatol* 2002;118:915-22.
- [138] Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein 1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:455-81.
- [139] Ibelgaufts H. MIP-1. 23. 3. 2007. [www.copewithcytokines.de](http://www.copewithcytokines.de).
- [140] Wolpe S, Cerami A. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB* 1989;3:2565-73.
- [141] Pirog K, Stabinsky Y, Goldman R. MIP-1alpha and MIP-1beta. In: Stabinsky Y, Goldman M, editors. *The cytokine index*, 2006. p. 143.
- [142] Bacon K, Greaves D, Dairaghi D, Schall T. The expanding universe of C, CX3C and CC chemokines. In: Thomson A, editor. *The cytokine handbook*, 1998. p. 753-75.
- [143] Eugenin E, D'Aversa T, Lopez L, Calderon T, Berman J. MCP-1 (CCL2) protects human neurons and astrocytes from NMDA or HIV-tat-induced apoptosis. *J Neurochem* 2003;85:1299-311.
- [144] Hirsch AJ, Shenk T. Human Cytomegalovirus Inhibits Transcription of the CC Chemokine MCP-1 Gene. *J Virol* 1999;73:404-10.
- [145] Froberg MK, Dannen D, Adams A, Parker-Thornburg J, Kolattukudy P. Murine Cytomegalovirus Infection Markedly Reduces Serum MCP-1 Levels in MCP-1 Transgenic Mice. *Ann Clin Lab Sci* 2006;36:179-84.
- [146] Flores-Villanueva P, Ruiz-Morales J, Song C, Flores L, Jo E, Montano M, et al. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is

- associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J Exp Med* 2005;202:1649-58.
- [147] Hellier S, Frodsham A, Hennig B, Knapp S, Ramaley P, Wright M, et al. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology* 2003;38:1468-76.
- [148] Sciacca F, Sturzl M, Bussolino F, Sironi M, Brandstetter H, Zietz C, et al. Expression of adhesion molecules, platelet-activating factor, and chemokines by Kaposi's sarcoma cells. *J Immunol* 1994;153:4816-25.
- [149] Fioretti F, Fradelizi D, Stoppacciaro A, Ramponi S, Ruco L, Minty A, et al. Reduced tumorigenicity and augmented leukocyte infiltration after monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3) gene transfer: perivascular accumulation of dendritic cells in peritumoral tissue and neutrophil recruitment within the tumor. *J Immunol* 1998;161:342-6.
- [150] Chada S, Ramesh R, Mhashilkar A. Cytokine- and chemokine-based gene therapy for cancer. *Curr Opin Mol Ther* 2003;5:463-74.
- [151] Nagasawa T. A chemokine, SDF-1 and its receptor CXCR4 as a mediators of hematopoiesis. *Int J Hematol* 2000;72:408-11.
- [152] Kucia M, Jankowski K, Reza R. CXCR4/SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol* 2003;35:233-45.
- [153] Ibelgaufts H. SDF-1. 20. 12. 2006. [www.copewithcytokines.de](http://www.copewithcytokines.de).
- [154] Aiuti A, Turchetto L, Cota M, Cipponi A, Brambilla A, Arcelloni C, et al. Human CD34+ Cells Express CXCR4 and Its Ligand Stromal Cell-Derived Factor-1. Implications for Infection by T-Cell Tropic Human Immunodeficiency Virus. *Blood* 1999;94:62-73.
- [155] Aust G, Steinert M, Kiessling S, Kamprad M, Simchen C. Reduced Expression of Stromal-Derived Factor 1 in Autonomous Thyroid Adenomas and Its Regulation in Thyroid-Derived Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3368-76.
- [156] Stumm RK, Rummel J, Junker V, Culmsee C, Pfeiffer M, Kriegelstein J, et al. A Dual Role for the SDF-1/CXCR4 Chemokine Receptor System in Adult Brain: Isoform-Selective Regulation of SDF-1 Expression Modulates CXCR4-Dependent Neuronal Plasticity and Cerebral Leukocyte Recruitment after Focal Ischemia. *J Neurosci* 2002;22:5865-78.
- [157] Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996;184:1101-9.
- [158] Freeman T, Dixon A, Cambell E, Tait T, Richardson P, Rice K, et al. Expression mapping of mouse genes. MGI Direct Data Submission 1998.
- [159] Fedyk ER, Jones D, Critchley HOD, Phipps RP, Blieden TM, Springer TA. Expression of Stromal-Derived Factor-1 Is Decreased by IL-1 and TNF and in Dermal Wound Healing. *J Immunol* 2001;166:5749-54.
- [160] Psenak O, Sefc L, Sykora V, Chang K, Necas E. Cytokine gene expression in regenerating haematopoietic tissues of mice after cyclophosphamide treatment. *Acta Haematol* 2003;109:68-75.
- [161] Han Y, He T, Huang D, Pardo CA, Ransohoff RM. TNF- $\alpha$  mediates SDF-1  $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation and cytotoxic effects in primary astrocytes. *J Clin Invest* 2001;108:425-35.
- [162] Juarez J, Bendall L, Bradstock K. Chemokines and their receptors as therapeutic targets: the role of the SDF-1/CXCR4 axis. *Curr Pharm Des* 2001;10:1245-59.

- [163] Jelínková L, Tučková L, Cínová J, Flegelová Z, Tlaskalová-Hogenová H. Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF-alpha through a mechanism involving NF-kappaB. *FEBS Letters* 2004;571:81-5.
- [164] Kyselá K. Osobní sdělení. 2007.
- [165] Auwerx J. The human leukemia cell line THP-1: multifaceted model for the study of monocyte macrophage differentiation. *Experientia* 1991;47:22-31.
- [166] Marletta M, Yoon P, Iyengar R, Leaf C, Wishnok J. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988;27:8706-11.
- [167] Cho N, Seong S, Huh M, Han T, Koh Y. Expression of chemokine genes in murine macrophages infected with *Orientia tsutsugamushi*. *Infect Immun* 2000;68:594-602.
- [168] Chen Z, Yu S, Bakhiet M, Winblad B, Zhu J. The chemokine receptor CCR5 is not necessary inflammatory mediator in kainic acid induced hippocampal injury: evidence for a compensatory effect by increased CCR2 and CCR3. *J Neurochem* 2003;86:61-8.
- [169] Guidotti LG, McClary H, Loudis JM, Chisari FV. Nitric Oxide Inhibits Hepatitis B Virus Replication in the Livers of Transgenic Mice. *J Exp Med* 2000;191:1247-52.
- [170] Persichini T, Colasanti M, Fraziano M, Colizzi V, Ascenzi P, Lauro G. Nitric oxide inhibits HIV-1 replication in human astrocytoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:200-2.
- [171] Ding A, Nathan C, Stuehr D. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988;141:2407-12.
- [172] Bogdan C, Rollinghoff M, Vodovotz Y, Xie Q, Nathan C. Regulation of inducible nitric oxide synthase in macrophages by cytokines and microbial products. In: Masihi K, editor. *Immunotherapy of Infections*, 1994. p. 37-54.
- [173] Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin-10. *J Exp Med* 1991;174:1549-55.
- [174] Zídek Z, Franková D. Interleukin-10 in combination with interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha enhances in vitro production of nitric oxide by murine resident peritoneal macrophages. *Eur Cytokine Network* 1999;10:25-32.
- [175] Feduchi E, Alonso M, Carrasco L. Human interferon gamma and TNF-alpha exert a synergistic blockade on the replication of herpes simplex virus. *J Virol* 1989;63:1354-59.
- [176] Orange J, Biron C. Characterization of early IL-12, IFN alpha/beta and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 1996;156:4746-56.
- [177] Ito M, Nakano T, Kamiya T. Effects of tumor necrosis factor alpha on replication of varicella zoster virus. *Antiviral Res* 1991;15:183-92.
- [178] Mayer A, Gelderblom H, Kumel G. Interferon gamma induced assembly block in the replication of adenovirus2: augmentation by tumour necrosis factor alpha. *Virology* 1992;187:372-6.
- [179] Ito M, O'Malley J. Antiviral effects of recombinant human tumor necrosis factor. *Lymphokine Res* 1987;6:309-18.
- [180] Leenen P, Canono B, Drevets D. TNF-alpha and IFN-gamma stimulate a macrophage cell line to kill *Listeria monocytogenes* in a nitric oxide independent manner. *J Immunol* 1994;153:5141-47.
- [181] Yap G, Scharton-Kersten T, Charest H. Decreased resistance of TNF receptor p55 and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo. *J Immunol* 1998;160:1340-5.

- [182] Castanoz-Velez E, Maerlan S, Osorio. Trypanosoma cruzi infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. *Infect Immun* 1998;66:2960-8.
- [183] Cotter R, Zheng J, Che M. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infection, beta chemokine production and CCR5 expression in CD40L stimulated macrophages: immune control of viral entry. *J Virol* 2001;75:4308-20.
- [184] Lane BR, Markovitz DM, Woodford NL, Rochford R, Strieter RM, Coffey MJ. TNF- $\alpha$  Inhibits HIV-1 Replication in Peripheral Blood Monocytes and Alveolar Macrophages by Inducing the Production of RANTES and Decreasing C-C Chemokine Receptor 5 (CCR5) Expression. *J Immunol* 1999;163:3653-61.
- [185] Kedzierska K, Crowe S, Turville S, Cunningham A. The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev Med Virol* 2003;13:39-56.
- [186] Lahdevirta J. Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 1988;85:289-91.
- [187] Hess G. Tumor necrosis factor and interferon as prognostic markers in HIV infection. *Infection* 1991;19:93-7.
- [188] De Simone C. Clinical and immunological effects of combination therapy with intravenous immunoglobulins and AZT in HIV infected patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1991;13:447.
- [189] Howard O. Soluble tumor necrosis factor receptor: inhibition of human immunodeficiency virus activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:2335-9.
- [190] Rang H, Dale M, Ritter J, Flover R. Antiviral drugs. *Pharmacology*, 2007. p. 679-90.
- [191] Fauci A. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 1993;262:1011-18.
- [192] Shin H, Winkler C, Stephens J, Bream J, Young H, Goedert J, et al. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL-10. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:14467-72.
- [193] Poli G, Biswas P, Fauci A. Interferons in the pathogenesis and treatment of human immunodeficiency virus infection. *Antiviral Res* 1994;24:221-33.
- [194] Haas D, Lavelle J, Nadler J. A randomized trial of interferon alpha therapy for HIV type I infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16:183-90.
- [195] Belardelli F, Gresser I. The neglected role of type I interferon in the T cell response: implications for its clinical use. *Immunol Today* 1996;17:369-72.
- [196] Deng H, Liu R, Ellmeier W. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996;381:661-6.
- [197] Stantchev T, Broder C. Consistent and significant inhibition of human immunodeficiency virus type 1 envelope-mediated membrane fusion by beta chemokines (RANTES) in primary human macrophages. *J Infect Dis* 2000;182:68-78.
- [198] Burns J, Gallo R, DeVico A, Lewis G. A new monoclonal antibody, mAb 4A12, identifies a role for the glycosaminoglycan (GAG) binding domain of RANTES in the antiviral effect against HIV-1 and intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Exp Med* 1998;188:1917-27.
- [199] Kinter A, Catanzaro A, Monaco J, Ruiz M, Justement J, Moir S, et al. CC-chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4(+) T cells: role of signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11880-5.
- [200] Kelly M, Naif H, Adams S, Cunningham A, Lloyd A. Dichotomous effects of beta-chemokines on HIV replication in monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 1998;160:3091-5.

- [201] Wang Y, Tao L, Mitchell E, Bogers W, Doyle C, Bravery C, et al. Generation of CD8 suppressor factor and beta chemokines, induced by xenogeneic immunization, in the prevention of simian immunodeficiency virus infection in macaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5223-8.
- [202] Van Rompay KKA, Miller MD, Marthas ML, Margot NA, Dailey PJ, Canfield DR, et al. Prophylactic and Therapeutic Benefits of Short-Term 9-[2-(R)-(Phosphonomethoxy)Propyl]Adenine (PMPA) Administration to Newborn Macaques following Oral Inoculation with Simian Immunodeficiency Virus with Reduced Susceptibility to PMPA. *J Virol* 2000;74:1767-74.
- [203] Simmons G, Clapham P, Picard L, Offord R, Rosenkilde M, Schwartz T, et al. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* 1997;276:276-9.
- [204] Makino Y, Cook D, Smithies O, Hwang O, Neilson E, Turka L, et al. Impaired T cell function in RANTES-deficient mice. *Clin Immunol* 2002;102:302-9.
- [205] Cook D, Beck M, Coffman T, Kirby S, Sheridan J, Pragnell I, et al. Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science* 1995;269:1583-5.
- [206] Domachowske J, Bonville C, Gao J, Murphy P, Easton A, Rosenberg H. The chemokine macrophage-inflammatory protein-1 alpha and its receptor CCR1 control pulmonary inflammation and antiviral host defense in paramyxovirus infection. *J Immunol* 2000;163:2677-82.
- [207] Salazar-Mather T, Orange J, Biron C. Early murine cytomegalovirus infection (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 alpha) - dependent pathways. *J Exp Med* 1998;187:1-14.
- [208] Salazar-Mather T, Hamilton T, Biron C. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *J Clin Invest* 2000;105:985-93.
- [209] Olszewski M, Huffnagle G, Mc Donald R. The role of macrophage inflammatory protein-1 alpha/CCL3 in regulation of T cell-mediated immunity to *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* 2000;165:6429-36.
- [210] Hokeness K, Kuziel W, Biron C, Salazar-Mather T. Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN-alpha/beta-induced inflammatory response and antiviral defense in liver. *J Immunol* 2005;174:1549-56.
- [211] Dehqanzada Z, Storrer C, Hueman M, Foley R, Harris K, Jama YK, TC, et al. Correlations between serum monocyte chemotactic protein-1 levels, clinical prognostic factors, and HER-2/neu vaccine-related immunity in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12:478-86.
- [212] Qiu B, Frait K, Reich F, Komuniecki E, Chensue S. Chemokine expression dynamics in mycobacterial (type-1) and schistosomal (type-2) antigen-elicited pulmonary granuloma formation. *Am J Pathol* 2001;158:1503-15.
- [213] Schroppel B, Zhang N, Chen P, Zang W, Chen D, Hudkins K, et al. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in murine islet allografts: the role of CCR2 and CCR5 signaling pathways. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1853-61.
- [214] Wilthsire T. Personal communication. 2006.
- [215] Menten P, Wuyts A, Damme J. Monocyte chemotactic protein-3. *Eur Cytokine Network* 2001;12:554-60.
- [216] Sarafi M, Garcia-Zepeda E, MacLean J, Charo I, Luster A. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is structural and functional homologue of human MCP-1. *J Exp Med* 1997;185:99-109.



- [217] Dunussi-Joannopoulos K, Zuberek K, Runyon K, Hawley R, Wong A, Erickson J, et al. Efficacious immunomodulatory activity of the chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1): local secretion of SDF-1 at the tumor site serves as T-cell chemoattractant and mediates T-cell-dependent antitumor responses. *Blood* 2002;100:1551-8.
- [218] Li X, Massa PE, Hanidu A, Peet GW, Aro P, Savitt A, et al. IKKalpha, IKKbeta and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B mediated inflammatory response program. *J Biol Chem* 2002;M205165200.
- [219] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853-66.
- [220] Melkusová P, Křížková J, Holý A, Zidek Z, Kmoníčková E. High responsiveness of rat macrophages to activation of antiviral defence mechanisms by acyclic nucleoside phosphonates. *Farmakologické dni. Bratislava, 2006.*
- [221] Jacobson KA, Gao Z-G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:247-64.
- [222] Zidek Z et al. Unpublished results. 2006-2007.
- [223] Nansen A, Christensen J, Andreasen S, Bartholdy C, Christensen J, Thomsen A. The role of CC chemokine receptor 5 in antiviral immunity. *Blood* 2002;99:1237-45.
- [224] Princen K, Hatse S, Vermeire K, Aquaro S, De Clercq E, Gerlach L, et al. Inhibition of Human immunodeficiency virus replication by a dual CCR5/CXCR4 antagonist. *J Virol* 2004;78:12996-30006.
- [225] Mueller A, Strange P. The chemokine receptor, CCR5. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:35-8.
- [226] Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley G, Smith M, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science* 1996;273:1856-62.
- [227] Croitoru-Lamoury J, Guillemain G, Boussin F, Mognetti B, Gigout L, Cheret A, et al. Expression of chemokines and their receptors in human and simian astrocytes: evidence for central role of TNF alpha and IFN gamma in CXCR4 and CCR5 modulation. *Glia* 2003;41:354-70.
- [228] Patterson B, Czerniewski M, Andersson J, Sullivan Y, Su F, Jiyamapa D, et al. Regulation of CCR5 and CXCR4 expression by type 1 and type 2 cytokines: CCR5 expression is downregulated by IL-10 in CD4-positive lymphocytes. *Clin Immunol* 1999;91:254-62.
- [229] Wang J, Guan E, Roderiguez G, Norcross M. Inhibition of CCR5 expression by IL-12 through induction of beta chemokines in human T lymphocytes. *J Immunol* 1999;163:5763-9.
- [230] Torres G, Garcia V, Sanchez E. Expression of the HIV-1 co-receptors CCR5 and CXCR4 on placental macrophages and the effect of IL-10 on their expression. *Placenta* 2001;22S:29-33.
- [231] Sozzani S. Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes. *J Exp Med* 1998;187:439-44.
- [232] Ancuta P, Bakri Y, Chomont N, Hocini H, Gabuzda D, Haeffner-Cavaillon N. Opposite effects of IL-10 on the ability of dendritic cells and macrophages to replicate primary CXCR4-dependent HIV-1 strains. *J Immunol* 2001;166:4244-53.
- [233] Worgall S, Connor R, Kaner RJ, Fenamore E, Sheridan K, Singh R, et al. Expression and Use of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Coreceptors by Human Alveolar Macrophages. *J Virol* 1999;73:5865-74.

- [234] Chen Z, Gordon J, Zhang X, Xiang J. Analysis of the gene expression profiles of immature versus mature bone marrow-derived dendritic cells using DNA arrays. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:66-72.
- [235] Juffermans NP, Weijer S, Verbon A, Speelman P, Van der Poll T. Expression of human immunodeficiency virus coreceptors CXCR4 and CCR5 on monocytes is downregulated during human endotoxemia. *J Infect Dis* 2002;185:986-9.
- [236] Franchin G, Zybarth G, Dai WW, Dubrovsky L, Reiling N, Schmidtayerova H, et al. Lipopolysaccharide Inhibits HIV-1 Infection of Monocyte-Derived Macrophages Through Direct and Sustained Down-Regulation of CXCR4 Chemokine Receptor 5. *J Immunol* 2000;164:2592-601.
- [237] Verani A, Sironi F, Siccardi AG, Lusso P, Vercelli D. Inhibition of CXCR4-Tropic HIV-1 Infection by Lipopolysaccharide: Evidence of Different Mechanisms in Macrophages and T Lymphocytes. *J Immunol* 2002;168:6388-95.
- [238] Juffermans NP, Paxton WA, Dekkers PEP, Verbon A, de Jonge E, Speelman P, et al. Up-regulation of HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 on CD4+ T cells during human endotoxemia and after stimulation with (myco)bacterial antigens: the role of cytokines. *Blood* 2000;96:2649-54.
- [239] Ohtani Y, Minami M, Kawaguchi N, Nishiyori A, Yamamoto Y, Takami S, et al. Expression of stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 chemokine receptor mRNAs in cultured rat glial and neuronal cells. *Neurosci Lett* 1998;249:163-6.
- [240] Kornbluth RS, Oh PS, Munis JR, Cleveland PH, Richman DD. Interferons and bacterial lipopolysaccharide protect macrophages from productive infection by human immunodeficiency virus in vitro. *J Exp Med* 1989;169:1137-51.
- [241] Moriuchi M, Moriuchi H, Turner W, Fauci A. Exposure to bacterial products renders macrophages highly susceptible to T-tropic HIV-1. *J Clin Invest* 1998;102:1540-50.
- [242] Le Vraux V, Chen Y, Masson I, De Sousa M, Giroud J, Florentin I, et al. Inhibition of human monocyte TNF production by adenosine receptor agonists. *Life Sci* 1993;52:1917-24.
- [243] Hasko G, Szabó C, Németh Z, Kvetan V, Pastores S, Vizi ES. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- $\alpha$  and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol* 1996;157:4634-40.
- [244] Link A, Kino T, Worth J, McGuire J, Crane M, Chrousos G, et al. Ligand activation of the adenosine A<sub>2A</sub> receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J Immunol* 2000;164:436-42.
- [245] Le Moine O, Stordeur P, Schandané L, Marchant A, de Groote D, Goldman M, et al. Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. *J Immunol* 1996;157:4408-14.
- [246] Shanley TP, Hasko G, Egnaczyk G, Salzman AL, Szabó C. Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$  production by adenosine receptor agonists in immunostimulated macrophages. *FASEB* 1998;12:766.
- [247] Szabo C, Scott GS, Virag L, Egnaczyk G, Salzman AL, Shanley TP, et al. Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$  production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. *J Biol Chem* 1998;273:379-87.
- [248] Kaisho, Akira. Toll-like receptor function and signaling. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006;117:979-87.
- [249] Olah ME, Caldwell CC. Adenosine Receptors and Mammalian Toll-Like Receptors: Synergism in Macrophages. *Mol Interv* 2003;3:370-4.
- [250] Trincavelli ML, Marroni M, Tuscano D, Ceruti S, Mazzola A, Mitro N, et al. Regulation of A<sub>2B</sub> adenosine receptor functioning by tumour necrosis factor  $\alpha$  in human astroglial cells. *Journal of Neurochemistry* 2004;91:1180-90.

- [251] Trincavelli ML, Costa B, Tuscano D, Lucacchini A, Martini C. Up-regulation of A2A adenosine receptors by proinflammatory cytokines in rat PC12 cells. *Biochemical Pharmacology* 2002;64:625-31.
- [252] Khoa ND, Montesinos MC, Williams AJ, Kelly M, Cronstein BN. Th1 Cytokines Regulate Adenosine Receptors and Their Downstream Signaling Elements in Human Microvascular Endothelial Cells. *J Immunol* 2003;171:3991-8.
- [253] Morello S, Ito K, Yamamura S, Lee K-Y, Jazrawi E, DeSouza P, et al. IL-1beta and TNF-alpha Regulation of the Adenosine Receptor (A2A) Expression: Differential Requirement for NF-kappaB Binding to the Proximal Promoter. *J Immunol* 2006;177:7173-83.

## **X. Přílohy 1-4: publikace týkající se disertace**

### **Příloha 1:**

Potměšil P, Holý A, Kmoníčková E, Křížková J, Zidek Z. Acyclic nucleoside phosphonate antivirals activate gene expression of monocyte chemotactic protein 1 and 3. *J Biomed Sci* 2007;14:59-66.

### **Příloha 2:**

Potměšil P, Krečmerová M, Kmoníčková E, Zidek Z, Holý A. Nucleotide analogues with immunobiological properties: 9-[2-hydroxy-3-(phosphonomethoxy)propyl]-adenine (HPMPA), -2,6-diaminopurine (HPMPDAP), and their  $N^6$ -substituted derivatives. *Eur J Pharmacol* 2006;540:191-199.

### **Příloha 3:**

Kmoníčková E, Potměšil P, Holý A, Zidek Z. Purine P1 receptor-dependent immunostimulatory effects of antiviral acyclic analogues of adenine and 2,6-diaminopurine. *Eur J Pharmacol* 2006;530:179-187.

### **Příloha 4:**

Zidek Z, Potměšil P, Kmoníčková E, Holý A. Immunobiological activity of N-[2-(phosphonomethoxy)alkyl] derivatives of  $N^6$ -substituted adenines, and 2,6-diaminopurines. *Eur J Pharmacol* 2003;475:149-159.