

**1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy**

**Ústav experimentální medicíny Akademie věd ČR, v.v.i.**

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

**Autoreferát doktorské disertační práce  
v oboru farmakologie a toxikologie**

## **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.

Disertační práce „Expresse cytokinů, zvláště chemokinů, po aplikaci acyklických nukleosidfosfonátů“ byla vypracována na Oddělení farmakologie v laboratoři imunofarmakologie Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR v Praze. Zpracováno v letech 2002-2006. 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).

**Disertant:** MUDr. Petr Potměšil

Adresa: ÚEM AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4  
Tel.: 2 4106 2731, 608 531 174  
Fax: 2 4106 2609  
E-mail: ppotmesil@hotmail.com

**Obor:** farmakologie a toxikologie

Školitel: RNDr. Zdeněk Zídek, DrSc.

**Oponenti:** .....

.....

Autoreferát rozeslán dne .....

Obhajoba doktorské disertační práce se koná dne ..... v ..... hod.

před komisí doktorského studia oboru farmakologie a toxikologie.

**Předseda oborové rady:** prof. MUDr. Sixtus Hynie, DrSc.



## OBSAH

Použité zkratky .....	6
<b>I. Úvod .....</b>	<b>7</b>
<b>II. Cíle disertační práce .....</b>	<b>9</b>
<b>III. Teoretická část .....</b>	<b>10</b>
1. Acyklické nukleosidfosfonáty .....	10
2. Replikace viru HIV-1 a cytokiny .....	11
<b>IV. Experimentální část .....</b>	<b>12</b>
<b>1. Materiál a metody .....</b>	<b>12</b>
<b>2. Výsledky .....</b>	<b>14</b>
2.1. Produkce NO .....	14
2.2. Exprese cytokinů a chemokinů po aplikaci acyklických nukleosidfosfonátů .....	15
2.3. Závislost exprese TNF- $\alpha$ a MCP-1 na transkripčním faktoru NF- $\kappa$ B .....	18
2.4. Vliv antagonistů adenosinových receptorů na expresi cytokinů a chemokinů .....	18
2.5. Exprese chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4 po aplikaci ANP .....	18
<b>V. Diskuze .....</b>	<b>19</b>
1. Exprese cytokinů a chemokinů po aplikaci ANP .....	19
2. Exprese chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4 po aplikaci ANP .....	21
3. Vliv antagonistů adenosinových receptorů na expresi cytokinů a chemokinů .....	22
4. Vztah mezi chemickou strukturou a účinky ANP na expresi cytokinů/chemokinů .....	22
<b>VI. Závěry disertační práce .....</b>	<b>23</b>
<b>VII. Shrnutí .....</b>	<b>24</b>
<b>VIII. Summary .....</b>	<b>25</b>
<b>IX. Seznam publikací autora .....</b>	<b>26</b>
<b>X. Seznam literatury .....</b>	<b>27</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>CD4+</b>	Cluster of differentiation 4+
<b>CCR5</b>	Receptor pro CC-chemokiny č. 5
<b>CXCR4</b>	Receptor pro CXC-chemokin SDF-1 č. 4
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immunoabsorbent assay
<b>FIV</b>	Feline immunodeficiency virus
<b>gp120</b>	glycoprotein 120
<b>HAART</b>	Highly active antiretroviral therapy
<b>HLA</b>	Human leucocyte antigen
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleukin
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MCP</b>	Monocyte chemoattractant protein
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$
<b>MSV</b>	Moloney sarcoma virus
<b>NECA</b>	5'-N-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</b>	Regulated on activation of normal T-cell expressed and secreted
<b>SDF-1</b>	Stromal cell derived factor-1
<b>Th</b>	T helper
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor- $\alpha$

## I. Úvod

Přestože bylo ve farmakoterapii mnoha virových infekcí dosaženo pokroku, stále existují virové nákazy, jejichž léčba není uspokojivě vyřešena, případně by bylo zapotřebí mít k dispozici širší výběr virostatik. Kromě infekce virem HIV-1 jsou to infekce papillomavirové, adenovirové, herpetické, infekce virem hepatitidy C, chřipkové infekce a jiné. Značné úsilí se soustřeďuje na výzkum léčiv proti viru HIV-1, ze 40 schválených antivirotik se jich polovina používá při léčbě HIV-1 infekce [1, 2].

Proti infekci virem HIV-1 neexistuje naprosto účinná léčba nebo možnost očkování, a proto mnoho pacientů vkládá své naděje do nových antiretrovirotik [2]. 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) [3].

Nejúčinnější postup při terapii HIV-1 infekce je kombinace výše uvedených léčiv označovaná jako HAART. Řada v současnosti používaných antiretrovirotik má částečně imunosupresivní efekt. Při vývoji nových antiretrovirotik bude žádoucí hledat léčiva, která by měla schopnost posílit imunitní systém pacienta a byla by účinná i proti rezistentním kmenům HIV-1 [2, 4-7]. Jako perspektivní se jeví vývoj léčiv, jež by ovlivňovala žádoucím směrem expresi cytokinů/chemokinů, které mají supresivní účinek na replikaci HIV-1 a mohou zvýšit obranyschopnost organismu [8-11].

Konkrétně supresivní efekt na replikaci HIV-1 mají např. cytokiny IL-10, IL-13, IL-16 a interferony [12, 13]. Chemokiny zabraňují šíření HIV-1 infekce vazbou na chemokinové receptory CCR5 a CXCR4, které mají funkci koreceptorů pro vstup HIV-1 do buňky [14, 15]. Tuto schopnost mají především RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-2 a SDF-1 $\alpha$  [12, 16-18]. Naproti tomu cytokiny jako IL-1, IL-8 a TNF- $\alpha$  urychlují replikaci HIV-1 [12, 16-18]. Bifunkční účinek má např. MCP-1 [12, 16, 19].

K léčivům, která mají kromě virostatického účinku i vlastnosti imunobiologické spočívající ve schopnosti ovlivnit expresi cytokinů, patří acyklické nukleosidfosfonáty vyvinuté prof. RNDr. Antonínem Holým a kol. Tato léčiva se již osvědčila [7, 20-26]. Tenofovir se jako preparát Viread<sup>®</sup> používá k terapii AIDS. Sloučenina adefovir se ve formě proléčiva jako preparát Hepsera<sup>®</sup> podává u žloutenky typu B [23, 24, 26]. Tenofovir zvyšuje produkci chemokinů RANTES a MIP-1 $\alpha$ , které mají schopnost blokovat replikaci viru HIV-1

[22, 27]. Zvyšuje také produkci TNF- $\alpha$  a IL-10 [6, 22]. Adefovir může zvýšit expresi interferonů [20].

V preklinickém výzkumu je prospěšné zabývat se vlivem virostatik na expresi cytokinů/chemokinů, neboť mezi jednotlivými třídami antivirotik existují rozdíly. Např. zatímco ANP mají schopnost zvýšit produkci anti-HIV-1 cytokinů/chemokinů [21, 22, 28-30], terapie jinými inhibitory reverzní transkriptázy vedla v jedné klinické studii ke snížení exprese chemokinů [31].

Na oddělení farmakologie Ústavu experimentální medicíny AV ČR věnujeme při screeningu vlastností ANP pozornost jejich efektu na expresi cytokinů/chemokinů a dalších molekul, které mají význam při obraně organismu proti infekčním patogenům [6, 21, 22, 28-30]. Cílem je nalézt perspektivní sloučeniny z hlediska dalšího vývoje virostatik.



## **II. Cíle disertační práce**

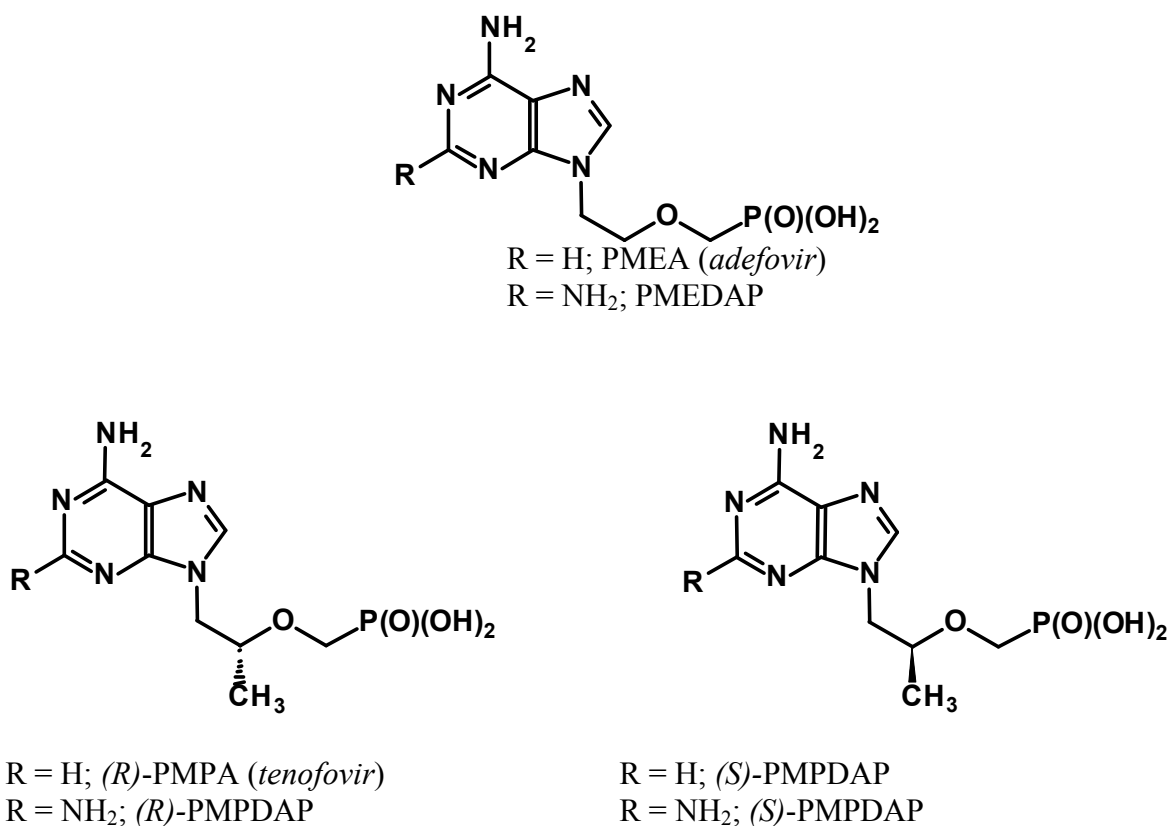
Obecným cílem disertační práce „Expresí cytokinů, zvláště chemokinů, po aplikaci acyklických nukleosidfosfonátů“ bylo přispět k prohloubení poznatků o vlivu ANP na expresi cytokinů/chemokinů, které hrají významnou roli při obraně organismu proti virovým infekcím, zvláště proti viru HIV-1. Důležitým cílem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

#### 1. Acyklické nukleosidfosfonáty

ANP jsou odvozeny od adeninu nebo 2,6-diaminopurinu, příp. pyrimidinových bází. Charakteristikou jejich molekul je náhrada nukleosidového cukerného zbytku acyklickým hydroxylovaným řetězcem a vazbou esteru kyseliny fosforečné s izopolárním fosfonometylerem [23]. V poloze  $N^9$  se jednotlivé ANP liší přítomností fosfonometoxyetyl (PME) nebo fosfonometoxypropyl (PMP) skupiny. Výchozí ANP jsou: PME = 9-[2-(fosfonometoxy)etyl]adenin; PMEDAP = 9-[2-(fosfonometoxy)etyl]2,6-diaminopurin; (*R*)-PMPA = 9-(*R*)-[2-(fosfonometoxy)propyl]adenin; (*R*)-PMPDAP = 9-(*R*)-[2-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin [23]. Viz obr. 1:



Obr. 1. Chemická struktura některých základních typů acyklických nukleosidfosfonátů [21].

Výchozí ANP mohou být modifikovány náhradou  $NH_2$  skupiny v poloze  $N^6$  dusíkaté báze. Mohou také obsahovat OH skupinu v poloze  $N^9$ , vznikají tak sloučeniny 9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]adenin (HPMPA) a 9-[2-hydroxy-3-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin (HPMPDAP), které lze rovněž modifikovat náhradou  $NH_2$  skupiny v poloze  $N^6$  [23, 32].

### ***Protivirové spektrum účinku ANP***

Spektrum účinku ANP zahrnuje herpes simplex virus 1 a 2 [33], cytomegalovirus [34], varicella zoster virus [25], Epstein-Barr virus [35], herpetický virus 6 [36], papilloma virus [25], virus hepatitidy B [37] a jiné viry. Co se týče retrovirů, blokují ANP replikaci virů HIV, SIV, MSV, FIV, FLV [38].

## **2. Replikace viru HIV-1 a cytokiny**

Cytokiny mohou potlačovat nebo stimulovat replikaci HIV-1 na různých úrovních jeho životního cyklu:

### ***Vstup viru HIV-1 do buňky***

HIV-1 infikuje T lymfocyty a makrofágy [39]. Váže se svým obalem gp120 na buněčný receptor CD4 a jako koreceptory využívá především chemokinové receptory CCR5 a CXCR4, i když někdy může používat i jiné chemokinové receptory [40, 41]. Ligandy pro chemokinové receptory tedy interferují se vstupem HIV-1 do buněk. Viz tab. 1:

*Tab. 1. Chemokinové receptory CCR5 a CXCR4 jako hlavní HIV-1 koreceptory [14, 27, 42-47].*

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

Z cytokinů může inhibovat vstup viru HIV-1 do buňky IL-16 a IFN- $\gamma$  [48, 49].

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

Po vstupu HIV-1 do buňky se genetická informace viru uložená v RNA přepisuje reverzní transkriptázou do DNA. DNA se posléze HIV-1 integrázou integruje do genomu hostitele [50]. Proces reverzní transkripce inhibuje IFN- $\alpha/\beta$  [19, 51]. Po aktivaci buňky imunitními podněty dojde k přepisu virové DNA do RNA. Transkripce HIV-1 je potlačována IFN- $\alpha/\beta$  [18, 51]. Induktivní efekt na transkripci HIV-1 mají např. TNF- $\alpha$  a IL-6 [12, 17]. IL-10 má bimodální funkci [12, 51]. Translaci HIV-1 RNA aktivuje IL-6, IL-13 působí inhibičně [51].

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

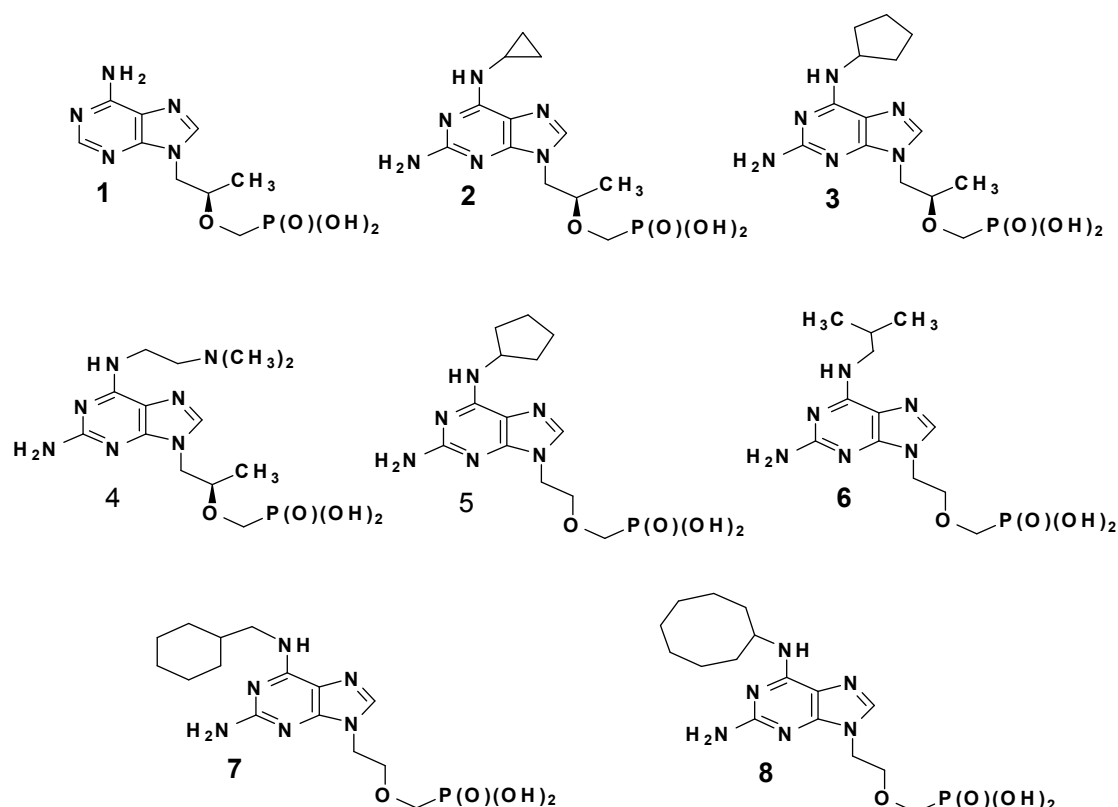
Produkcí nových virových partikulí viru HIV-1 mohou omezit hlavně interferony [19, 51].

## IV. Experimentální část

### 1. Materiál a metody

#### *Acyklické nukleosidfosfonáty*

ANP byly syntetizovány prof. RNDr. Antonínem. Holým a kol. Možná kontaminace LPS byla vyloučena použitím testu „Limulus Amoebocyte Lysate Assay“. Struktura nejčastěji testovaných ANP viz obr. 2:



**Obr. 2. Chemická struktura nejčastěji testovaných acyklických nukleosidfosfonátů (ANP).**

ANP 1 = 9-(R)-[2-(fosfonometoxy)propyl]adenin [(R)-PMPA; tenofovir], ANP 2 =  $N^6$ -cyklopropyl-(R)-9-[2-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin [ $N^6$ -cyklopropyl-(R)-PMPDAP], ANP 3 =  $N^6$ -cyklopentyl-(R)-9-[2-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin [ $N^6$ -cyklopentyl-(R)-PMPDAP], ANP 4 =  $N^6$ -dimethylaminoethyl-(R)-9-[2-(fosfonometoxy)propyl]2,6-diaminopurin [ $N^6$ -dimethylaminoethyl-(R)-PMPDAP], ANP 5 =  $N^6$ -cyklopentyl-9-[2-(fosfonometoxy)etyl]2,6-diaminopurin [ $N^6$ -cyklopentyl-PMEDAP], ANP 6 =  $N^6$ -izobutyl-9-[2-(fosfonometoxy)etyl]2,6-diaminopurin [ $N^6$ -izobutyl-PMEDAP], ANP 7 =  $N^6$ -cyklohexylmetyl-9-[2-(fosfonometoxy)etyl]2,6-diaminopurin [ $N^6$ -cyklohexylmetyl-PMEDAP], ANP 8 =  $N^6$ -cyklooktyl-9-[2-(fosfonometoxy)etyl]2,6-diaminopurin [ $N^6$ -cyklooktyl-PMEDAP]. Schéma poskytl prof. RNDr. A. Holý.

### ***Antagonisté adenosinových receptorů***

Pro studium mechanismů exprese cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a chemokinů RANTES, MIP-1 $\alpha$  po aplikaci ANP se používal nescifický antagonist adenosinových receptorů, což je sloučenina CGS-15943. Dále se používali specifické antagonisty adenosinových receptorů: antagonist A<sub>1</sub> receptorů DCCPX, antagonist A<sub>2A</sub> receptorů CSC, antagonist adenosinových receptorů A<sub>2B</sub> Alloxazin a antagonist A<sub>3</sub> receptorů MRS-1191.

### ***Lipopolysacharid***

Efekt ANP na expresi cytokinů/chemokinů a chemokinových receptorů se většinou porovnával s LPS, který sloužil jako referenční kontrola.

### ***Pokusná zvířata***

K pokusům se používaly myši samice inbredního kmene C57BL/6. Protokoly pokusů na zvířatech byly schváleny etickou komisí Ústavu experimentální medicíny AV ČR.

### ***Izolace a kultivace myších makrofágů***

Po cervikální dislokaci se u myši provedl výplach peritoneální dutiny fyziologickým roztokem. Buňky se kultivovaly v množství  $2 \times 10^5$  na jamku ve finálním objemu 100  $\mu$ l pro stanovení cytokinů/chemokinů (ELISA). V případě studia exprese na úrovni mRNA se makrofágy kultivovaly v množství  $4 \times 10^6$  na vzorek ve finálním objemu 2ml.

### ***Izolace a kultivace myších lymfocytů a tymocytů***

Po cervikální dislokaci se vyňala slezina a lymfocyty se získaly protlačením sleziny přes nylonovou síťku. Erytrocyty byly odstraněny promytím v lyzačním pufu. Pro studium exprese receptorů CCR5 a CXCR4 se lymfocyty kultivovaly v množství  $5 \times 10^6$  na vzorek ve finálním objemu 1.5 ml. Myší tymocyty se získaly protlačením tymu přes nylonovou síťku.

### ***Izolace a kultivace lidských monocytů***

Zdrojem buněk byly „buffy coats“ zdravých dárců z Ústavu hematologie a krevní transfúze. Separace monocytů se provedla gradientovou centrifugací (metoda „Ficoll-Paque Plus“). Kultivace buněk byla za koncentrace  $1 \times 10^6$ /ml ve finálním objemu 250  $\mu$ l.

### ***Kultivační médium***

Médium RPMI-1640 obsahovalo 10% fetální bovinní sérum, 2 mM L-glutamin, gentamicin 50 µg/ml a  $5 \times 10^{-5}$  M 2-merkaptoetanol.

### ***Stanovení životnosti buněk***

Životnost buněk byla určována pomocí kolorimetrického testu založeného na štěpení soli tetrazolia WST-1 mitochondriálními dehydrogenázami v živých buňkách.

### ***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 24 h dle metody popsané v práci Marletta a spol. [52].

### ***ELISA***

Pro stanovení TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, MCP-5, SDF-1 $\alpha$  byla použita metoda ELISA (kity firmy RD systems) .

### ***Izolace RNA***

RNA se izolovala pomocí kitů firmy Qiagen: „RNeasy mini kit“ a „RNase free DNase set“.

### ***Reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce***

Pro studium exprese cytokinů/chemokinů a chemokinových receptorů byla použita semikvantitativní RT-PCR. Amplifikace probíhala v lineárním rozmezí.

### ***Statistická analýza dat***

Pro statistické vyhodnocení se použila metoda ANOVA a následně Dunettův nebo Tukeyův test. Hodnoty měření jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M.

## **2. Výsledky**

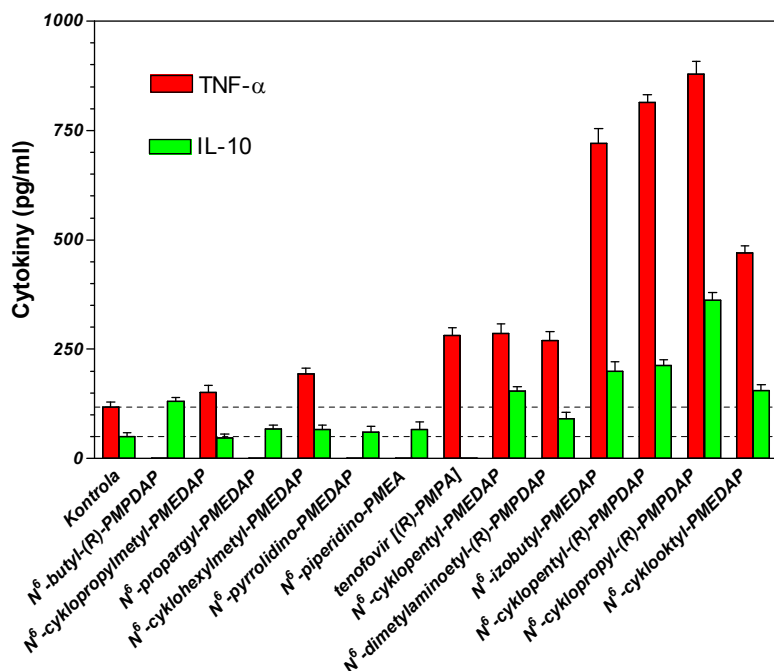
### **2.1. Produkce NO**

ANP zvyšující produkci NO v prvotním screeningu vlastností ANP byly zařazeny do experimentů týkajících se exprese cytokinů/chemokinů (viz níže) [21, 29].

## 2.2. Expresse cytokinů a chemokinů po aplikaci ANP

### *Expresse TNF- $\alpha$ a IL-10 po aplikaci nehydroxylovaných ANP*

Nehydroxylované deriváty ANP mají schopnost vysoce zvýšit sekreci TNF- $\alpha$  a IL-10 [21]. Nejvíce stimulují produkci ANP: *N*<sup>6</sup>-cyklopropyl-(*R*)-PMPDAP, *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP a *N*<sup>6</sup>-izobutyl-PMEDAP [21]. Viz obr. 3:



Obr. 3. *Produkce TNF- $\alpha$  a IL-10 po aplikaci nehydroxylovaných ANP (25  $\mu$ M) u myších makrofágů [21]. Buňky ( $2 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly 5 h. Koncentrace cytokinů (pg/ml) byla stanovena metodou ELISA.*

### *Expresse TNF- $\alpha$ a IL-10 po aplikaci hydroxylovaných ANP*

Rovněž hydroxylované deriváty ANP mají schopnost zvýšit sekreci TNF- $\alpha$  a IL-10 u myších makrofágů. Produkci TNF- $\alpha$  stimuluje nejúčinněji sloučenina HPMPDAP, sloučenina HPMPA je méně aktivní (sekrece TNF- $\alpha$  je po aplikaci těchto ANP zvýšena i u lidských monocytů) [29]. Substituce aminoskupiny v poloze *N*<sup>6</sup> heterocyklické báze může účinek výchozích sloučenin na expresi TNF- $\alpha$  zvýšit i snížit [29].

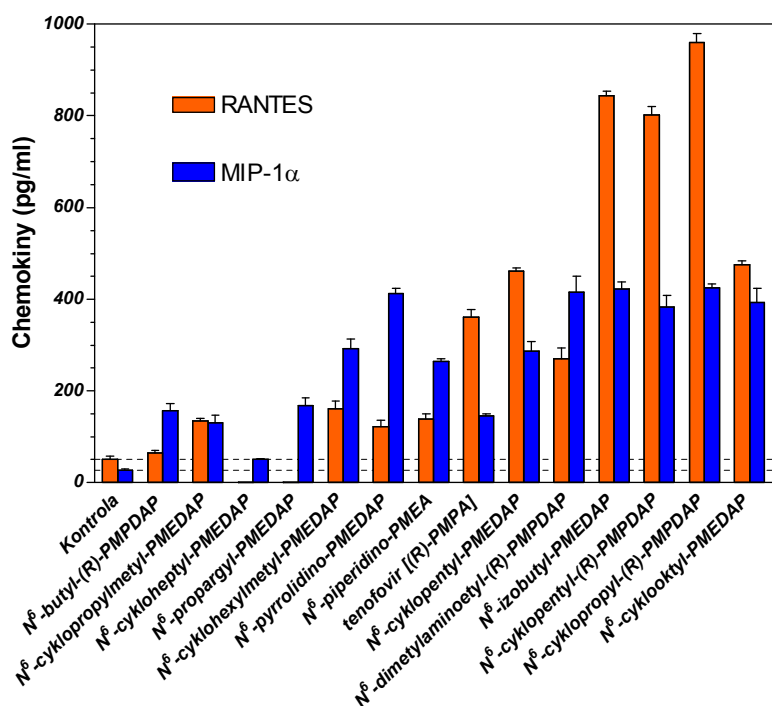
Schopností zvýšit produkci IL-10 se vyznačuje pouze sloučenina HPMPDAP. Náhrada aminoskupiny v poloze *N*<sup>6</sup> heterocyklické báze sloučenin HPMPDAP nebo HPMPA nemá za následek stimulační efekt ANP na produkci IL-10 [29].

### ***Expres IFN- $\alpha$ a IFN- $\beta$***

Produkce IFN- $\alpha$  nebo IFN- $\beta$  nebyla po aplikaci nehydroxylovaných ANP u myších makrofágů zvýšena (testované ANP viz obr. 2 na str. 12). Hydroxylované ANP testovány nebyly.

### ***Expres RANTES a MIP-1 $\alpha$ po aplikaci nehydroxylovaných ANP***

Nehydroxylované deriváty ANP mají schopnost zvýšit expresi RANTES a MIP-1 $\alpha$  [21]. Vysoce zvyšují produkci především sloučeniny  $N^{\delta}$ -cyklopropyl-(R)-PMPDAP,  $N^{\delta}$ -izobutyl-PMEDAP a  $N^{\delta}$ -cyklopentyl-(R)-PMPDAP [21]. Viz obr. 4:



Obr. 4. ***Produkce RANTES a MIP-1 $\alpha$  po aplikaci nehydroxylovaných derivátů ANP (25  $\mu$ M) u myších makrofágů [21]. Buňky ( $2 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly 5 h. Koncentrace RANTES a MIP-1 $\alpha$  (pg/ml) byla stanovena metodou ELISA.***

Studie dávkové závislosti dále ukázaly, že zvýšení produkce RANTES/MIP-1 $\alpha$  po aplikaci ANP je závislé na použité dávce [21].

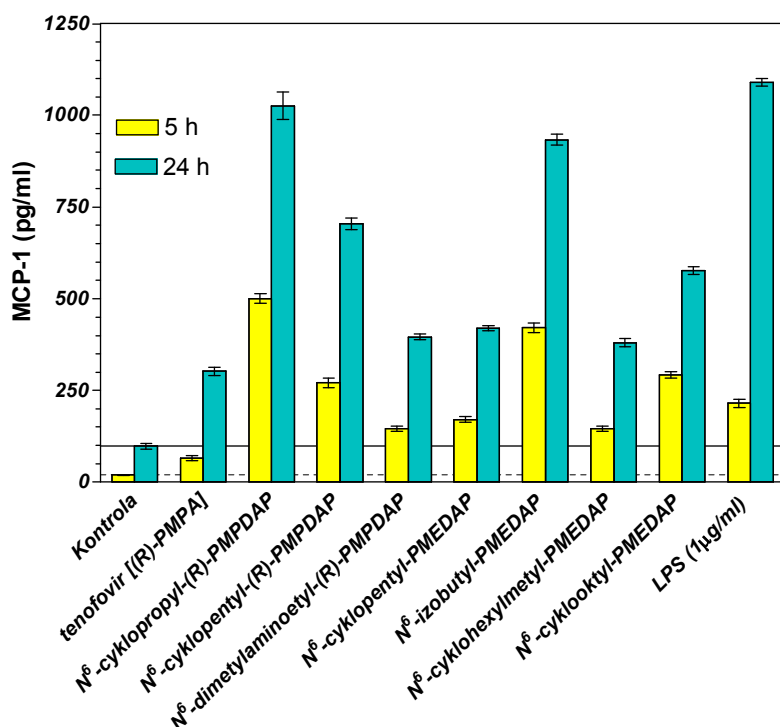
### ***Expres monocytárních chemotaktických proteinů***

Nehydroxylované ANP zvýšily u myších makrofágů expresi chemokinů MCP-1 a MCP-3, nikoliv však MCP-2 a MCP-5 [28]. Hydroxylované ANP nebyly testovány.



### Expresa MCP-1

Nejsilněji zvyšují sekreci MCP-1 sloučeniny  $N^6$ -cyklopropyl-(R)-PMPDAP,  $N^6$ -izobutyl-PMEDAP a  $N^6$ -cyklopentyl-(R)-PMPDAP [28]. Viz obrázek 5:



Obr. 5. Produkce MCP-1 po aplikaci nehydroxylovaných ANP (100  $\mu$ M) u myších makrofágů [28]. Buňky ( $2 \times 10^6$ /ml) se kultivovaly 5 h a 24 h. Koncentrace MCP-1 se stanovila metodou ELISA.

Indukce exprese MCP-1 po aplikaci ANP je zřetelná i na úrovni mRNA. Studie dávkové závislosti ukázala efekt ANP již při koncentraci 10  $\mu$ M (resp. 25  $\mu$ M) [28].

### Expresa MCP-3

ANP (uvedené výše na obr. 5) mohutně indukovaly transkripci mRNA pro MCP-3 u makrofágů v různých časových intervalech [28].

### Expresa SDF-1 $\alpha$

Nehydroxylované ANP nezvýšily sekreci SDF-1 $\alpha$  u myších lymfocytů ani tymocytů (testované ANP viz obr. 2 na str. 12). Hydroxylované ANP nebyly testovány.

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

### *Inhibice produkce TNF- $\alpha$ pyrrolidinditiokarbamátem*

Zvýšení produkce TNF- $\alpha$  po aplikaci sloučeniny HPMPDAP bylo sníženo přidáním různých koncentrací pyrrolidinditiokarbamátu, což je inhibitor aktivace NF- $\kappa$ B [29].

### *Inhibice produkce MCP-1 pyrrolidinditiokarbamátem*

Zvýšení produkce MCP-1 po aplikaci sloučeniny *N*<sup>6</sup>-cyklopentyl-(*R*)-PMPDAP bylo rovněž sníženo přidáním různých koncentrací pyrrolidinditiokarbamátu [28].

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

Účinky antagonistů adenosinových receptorů na expresi TNF- $\alpha$ , IL-10, RANTES a MIP-1 $\alpha$  po aplikaci různých ANP jsou shrnuty v tab. 2:

Tab. 2. *Inhibiční nebo neutrální účinek antagonistů adenosinových receptorů (50  $\mu$ M) na sekreci cytokinů/chemokinů indukovanou ANP (50  $\mu$ M) u myších makrofágů [53].*

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 [53]. Inhibiční účinek nescifického antagonisty adenosinových receptorů CGS-15946 na zvýšení exprese TNF- $\alpha$ , IL-10 a RANTES byl potvrzen také na úrovni mRNA [53].

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

### *Exprese receptoru CCR5 na úrovni mRNA*

Exprese CCR5 je u myších lymfocytů na úrovni mRNA přítomná. Žádný z 6 testovaných ANP neovlivnil expresi mRNA pro CCR5 v časových intervalech 1 h, 2 h a 24 h (testované ANP viz obr. 2 na str. 12). LPS inhiboval expresi CCR5 mRNA. U myších makrofágů nebyla exprese mRNA pro CCR5 detekována a ANP neindukovaly transkripci mRNA pro CCR5.

### ***Exprese receptoru CXCR4 na úrovni mRNA***

Expresi CXCR4 je u myších lymfocytů na úrovni mRNA silně vyjádřena. Žádný z 6 testovaných ANP neovlivnil expresi mRNA pro CXCR4 v časových intervalech 1 h, 2 h a 24 h (testované ANP viz obr. 2 na str. 12). LPS inhiboval expresi CXCR4 mRNA.

## **V. Diskuze**

### **1. Expresi cytokinů a chemokinů po aplikaci ANP**

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

Obranné funkce organismu jsou zprostředkovány cytokiny/chemokiny, které řídí expresi dalších antiinfekčních molekul např. oxidu dusnatého [54, 55]. V experimentech provedených v minulosti se zjistilo, že antiretrovirotikum tenofovir indukuje sekreci TNF- $\alpha$ , IL-10, RANTES a MIP-1 $\alpha$  [22]. Dále tenofovir zvyšoval v kombinaci s IFN- $\gamma$  produkci NO, samotný tenofovir však expresi NO nezvýšil [6, 22].

V dalších experimentech provedených s nově syntetizovanými ANP různých chemických struktur zvýšily některé sloučeniny ve shodě s dřívějšími nálezy [30] produkci NO při společné kultivaci s IFN- $\gamma$  [21, 29]. Tyto ANP byly vybrány pro následnou studii týkající se vlivu ANP na expresi cytokinů/chemokinů. Sloučeniny, které aktivovaly produkci NO, měly schopnost zvýšit sekreci cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-10 a chemokinů RANTES a MIP-1 $\alpha$  (v závislosti na chemické struktuře) [21, 29]. To by mohlo znamenat dodatečný antiinfekční mechanismus účinku těchto léčiv, jak je uvedeno níže.

TNF- $\alpha$  má protivirové účinky u mnoha virových infekcí [56, 57]. TNF- $\alpha$  potlačuje např. replikaci cytomegaloviru [58], herpes simplex viru 1 a 2 [57], varicella zoster viru [59] a adenoviru [60].

Podle některých údajů je TNF- $\alpha$  účinný také proti HIV-1 [61]. Supresivní efekt TNF- $\alpha$  proti HIV-1 může záviset na indukci sekrece  $\beta$ -chemokinů [62, 63]. Podle jiných autorů však TNF- $\alpha$  replikaci viru HIV-1 urychluje [13, 64-66].

I když větší část literárních údajů hovoří o nepříznivé úloze TNF- $\alpha$  v patogenezi HIV-1 infekce, nelze pominout, že TNF- $\alpha$  působí proti široké škále jiných virů. Vzhledem k tomu, že v pokročilejší fázi HIV-1 infekce jsou u pacientů častá další infekční onemocnění

zahrnující virové infekce [67], mohlo by být z určitého pohledu přínosem, že se ANP vyznačují schopností zvýšit produkci TNF- $\alpha$ .

Některé ANP zvýšily také sekreci IL-10 [21, 29]. IL-10 je pokládán za klíčový cytokin z hlediska patogeneze infekce virem HIV-1 [12, 65]. IL-10 je protektivním cytokinem z hlediska progresu HIV-1 infekce do syndromu AIDS, avšak na druhé straně zvyšuje pravděpodobnost vzniku lymfomů asociovaných s AIDS [65]. Co se týče jiných virových infekcí, je dobře dokumentován příznivý vliv podávání IL-10 na průběh onemocnění hepatitidou C [68].

Dalšími protivirovými cytokiny jsou IFN- $\alpha/\beta$  [69]. V našich experimentech tenofovir a nehydroxylované ANP nezvýšily sekreci IFN- $\alpha/\beta$ .

K velmi důležitým  $\beta$ -chemokinům z hlediska patogeneze HIV-1 infekce patří RANTES a MIP-1 $\alpha$ . Potlačují replikaci viru HIV-1, a to vazbou na receptor CCR5 [27]. Toto zjištění bylo důležité pro identifikaci receptoru CCR5 jako hlavního koreceptoru pro vstup viru HIV-1 do buňky [70]. V některých studiích  $\beta$ -chemokiny replikaci viru HIV-1 sice zvyšovaly [71, 72], avšak většina studií (včetně experimentů *in vivo*) ukázala, že  $\beta$ -chemokiny potlačují replikaci HIV-1 [27, 73]. ANP mají schopnost zvýšit produkci RANTES [21, 29], což by mohlo umocňovat jejich účinky proti viru HIV-1.

Některé ANP zvyšovaly v experimentech rovněž expresi MIP-1 $\alpha$  [21, 29]. Chemokin MIP-1 $\alpha$  potlačuje replikaci virem HIV-1 stejně účinně jako RANTES [27]. Kromě inhibice replikace HIV-1 je MIP-1 $\alpha$  nezbytný pro obranu organismu proti cytomegalovirové infekci [74]. Zvýšení produkce MIP-1 $\alpha$  po aplikaci ANP by mohlo znamenat dodatečný protivirový účinek těchto léčiv [21].

Poslední studovanou skupinou  $\beta$ -chemokinů byly monocytární chemotaktické proteiny. Testované ANP zvýšily genovou expresi MCP-1 a MCP-3 [28]. MCP se váží na četné chemokinové receptory, z nichž většina plní současně funkci koreceptorů pro vstup viru HIV-1 do buněk [43, 75]. MCP-1 může inhibovat replikaci viru HIV-1 [42], avšak urychlení replikace HIV-1 díky působení MCP-1 bylo také pozorováno [16]. MCP-1 má inhibiční vliv na rozvoj infekce cytomegalovirem a ta může být život ohrožující komplikací pacientů trpících AIDS [76, 77].

Aktivace exprese MCP-3 po aplikaci ANP by mohla znamenat příznivou vlastnost těchto antivirových [28]. MCP-3 je antagonistou receptoru CCR5, takže blokuje vstup HIV-1 do buněk [16, 43]. Dále je MCP-3 dle některých autorů považován za nadějný kandidát pro nádorové terapie [78].

Ze skupiny  $\alpha$ -chemokinů je z hlediska patogeneze HIV-1 infekce důležitý SDF-1 $\alpha$ . SDF-1 $\alpha$  se váže na druhý hlavní HIV-1 koreceptor - chemokinový receptor CXCR4, a má tak schopnost potlačit šíření HIV-1 infekce [44]. Testované ANP nezvýšily jeho produkci, počet léčiv nebyl však velký.

Zvýšení exprese cytokinů/chemokinů pozorované v experimentech s ANP bude souviset s aktivací mnoha transkripčních faktorů. Jedním z nich je NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B indukuje expresi celé řady genů zahrnujících TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 a MCP-3 [79, 80]. ANP měly v experimentech schopnost zvýšit expresi všech těchto molekul [21, 28, 29]. Dále jsme pozorovali, že zvýšení produkce TNF- $\alpha$  a MCP-1 po aplikaci ANP bylo sníženo přidáním inhibitoru aktivace NF- $\kappa$ B neboli pyrrolidinditiokarbamátu do buněčných kultur [28, 29].

## **2. Expese chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4 po aplikaci ANP**

Receptory CCR5 a CXCR4 jsou v současnosti atraktivním předmětem zájmu farmaceutického průmyslu v oblasti vývoje nových léčiv proti HIV-1 [41]. Antagonisté CCR5 a/nebo CXCR4 jsou již ve stadiu klinického zkoušení [81]. Nový mechanismus účinku antiretrovirotik by pak představovala inhibice transkripce mRNA pro tyto dva hlavní HIV-1 koreceptory. Výzkum transkripce mRNA pro receptory CCR5 a CXCR4 po aplikaci ANP se jevil nadějný, neboť ANP stimulují tvorbu cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-10 [21], o nichž je známo, že expresi chemokinových receptorů ovlivňují.

Účinek IL-10 na expresi CCR5 a/nebo CXCR4 byl zkoumán s různými výsledky dle typu buněk. Bylo pozorováno jak snížení exprese tak zvýšení exprese u makrofágů nebo lymfocytů [82]. Obdobně TNF- $\alpha$  ovlivňuje expresi receptorů CCR5/CXCR4 pozitivně nebo negativně dle typu buněk [82, 83]. Přestože testované ANP stimulují produkci IL-10 a TNF- $\alpha$ , neovlivnily u lymfocytů a makrofágů expresi mRNA pro CCR5 a CXCR4. Výsledky naznačují, že vliv ANP na expresi CCR5 a CXCR4 na úrovni mRNA je neutrální.

LPS v experimentech potlačil expresi mRNA pro CCR5/CXCR4, což je ve shodě s dřívějšími nálezy jiných autorů, i když existují studie s opačnými výsledky [84-88].

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

Výsledky experimentů ukázaly, že zvýšenou expresi TNF- $\alpha$ , IL-10 a RANTES po aplikaci ANP lze snížit přidáním různých antagonistů adenosinových receptorů. Zvýšení produkce MIP-1 $\alpha$  po aplikaci ANP však antagonisté adenosinových receptorů neovlivňují. Inhibice zvýšení produkce TNF- $\alpha$ , IL-10 a RANTES po aplikaci ANP byla patrná na úrovni proteinu i mRNA [53].

Lze se domnívat, že ANP aktivují receptory pro adenosin a následně dochází ke zvýšení exprese TNF- $\alpha$ , IL-10 a RANTES. ANP by mohly být nescifickými ligandy adenosinových receptorů [53]. Vzhledem k tomu, že žádný antagonist adenosinových receptorů nesnížil produkci MIP-1 $\alpha$  indukovanou ANP, budou ANP aktivovat další receptory a následně signální dráhy, které podmiňují zvýšení exprese cytokinů/chemokinů [53].

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

Efekty testovaných ANP na produkci cytokinů/chemokinů mají souvislost s chemickou strukturou ANP [21, 29].

Účinek ANP na expresi cytokinů/chemokinů závisí především na tom, zda je na pozici  $N^9$  heterocyklické báze adeninu nebo 2,6-diaminopurinu přítomna hydroxylovaná skupina (vliv má však i typ substituce aminoskupiny v poloze  $N^6$  purinových bazí). Hydroxylované deriváty ANP mají mnohem nižší potenciál indukovat expresi cytokinů/chemokinů než nehydroxylované deriváty ANP [21, 29].

## **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 (ANP) jsou novou 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 [23, 24].

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 $\alpha$  [6, 22, 30].

V dalších experimentech jsme věnovali pozornost imunobiologickým účinkům nově syntetizovaných 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, TNF- $\alpha$ , IL-10, RANTES, MIP-1 $\alpha$  [21]. Zkoumali jsme také imunobiologické vlastnosti hydroxylovaných derivátů ANP. Také tyto sloučeniny mají schopnost zvyšovat produkci NO, TNF- $\alpha$ , IL-10, RANTES a MIP-1 $\alpha$  [29].

Nově jsme ukázali, že různé ANP indukovaly expresi chemokinů MCP-1 a MCP-3, nikoliv však MCP-2 a MCP-5 [28]. 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 inhibováno antagonisty adenosinových receptorů [53]. Je možné se domnívat, že ANP jsou nespecifickými ligandy adenosinových receptorů [53]. Zvýšení exprese NO a cytokinů/chemokinů po aplikaci ANP bylo způsobeno aktivací transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B [28, 29]. Efekt ANP na produkci NO a cytokinů/chemokinů je závislý na dávce. Nejúčinnější deriváty ANP zvyšují sekreci cytokinů/chemokinů několikanásobně více než tenofovir [21]. Proto by nově testované ANP mohly být nadějnými sloučeninami z hlediska dalšího vývoje virostatik.

Experimentální nálezy dokumentují, že ANP by mohly být považovány za antivirotika nové generace, která mají kromě přímých protivirových účinků rovněž efekty imunomodulační.



## VIII. Summary

Acyclic nucleoside phosphonates (ANPs) are novel class of virostatics, that inhibit replication of both DNA viruses and retroviruses. ANP approved for the treatment of viral diseases are: tenofovir (Viread<sup>®</sup>) for the therapy of AIDS, adefovir (Hepsera<sup>®</sup>) for the treatment of hepatitis B and cidofovir (Vistide<sup>®</sup>), that is used in HIV-1 positive patients suffering from retinitis caused by cytomegalovirus [23, 24].

Some ANPs, such as tenofovir, are endowed by immunomodulatory properties that can non specifically influence replication of viruses. Tenofovir has been shown previously to increase gene expression of nitric oxide, cytokines TNF- $\alpha$ , IL-10 and chemokines RANTES, MIP-1 $\alpha$  [6, 22, 30].

In present experiments we investigated possible immunobiological properties of newly synthesized derivatives of ANPs *in vitro* using mouse macrophages and lymphocytes (or human leukocytes, respectively). *N*<sup>6</sup>-substituted derivatives of adenine or 2,6-diaminopurine, that possess phosphonomethoxyethyl or phosphonomethoxypropyl moiety at the position *N*<sup>9</sup> of the heterocyclic base were included in the study. Some of these compounds were found to activate production of nitric oxide, cytokines TNF- $\alpha$ , IL-10 and chemokines RANTES, MIP-1 $\alpha$  [21]. Various hydroxylated derivatives of ANPs were also screened for their immunobiological potential. These compounds were also able to increase production of nitric oxide, TNF- $\alpha$ , IL-10, RANTES and MIP-1 $\alpha$  [29].

Newly we have revealed that various ANPs induced gene expression of chemokines MCP-1 and MCP-3, but not expression of MCP-2 and MCP-5 [28]. We have also analyzed possible impact of ANPs on gene expression of IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , SDF-1 $\alpha$  and chemokine receptors CCR5 and CXCR4. ANPs did not influence production of these molecules. Activation of cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-10) and chemokine (RANTES) secretion by ANPs was inhibited by various antagonists of adenosine receptors. It may be suggested that ANPs could be non specific ligands of adenosine receptors [53].

Induction of production of NO and cytokines/chemokines by ANPs is dose dependent and this effect was mediated by transcriptional factor NF- $\kappa$ B [21, 28, 29]. The most effective newly synthesized ANPs are more potent than tenofovir itself, thus these ANPs could be candidates for further therapeutic exploitation.

Experimental results indicate that ANPs might be considered as antivirals of new generation, that possess both antiviral and immunomodulatory effects.

## IX. Seznam publikací autora

### 1. Seznam publikací, které jsou podkladem disertace

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* 2006;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 N6-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 N6-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* 2006 (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 publikace

1. † Lácha J, Hubáček JA, Potměšil P, Viklický O, Málek I, Vítko Š. TGF-beta1 polymorphism in heart transplant recipients – effect on renal function. *Ann Transplant* 2001;6:39-43.

## X. Seznam literatury

- [1] De Clercq E. Recent highlights in the development of new antiviral drugs. *Current Opinion in Microbiology* 2005;8:552-60.
- [2] Holý A. *Virostatika 2000 - a co dál. Časopis lékařů českých* 2001;140:583-91.
- [3] Lullmann H, Mohr K, Ziegler A, Bieger D. Léčiva používaná při AIDS. *Barevný atlas farmakologie: Grada, 2007. p. 292-3.*
- [4] De Clercq E. HIV-chemotherapy and prophylaxis: new drugs, leads and approaches. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1800-22.
- [5] De Clercq E. HIV-chemotherapy and -prophylaxis: new drugs, leads and approaches. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004;36:1800-22.
- [6] Zídek 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.
- [7] 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.
- [8] Majka M, Rozmyslowicz T, Lee B, Murphy SL, Pietrzkowski 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.
- [9] Majka M, Rozmyslowicz T, Ratajczak J, Dobrowsky A, Pietrzkowski 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.
- [10] Rozmyslowicz T, Kijowski J, Conover DO, Majka M, Baj-Krzyworzeka M, Reza R, et al. New T-lymphocytic cell lines for studying cell infectability by human immunodeficiency virus. *Eur J Haematol* 2001;67:142-51.
- [11] Villar C, Dongari-Bagtzoglou A. Therapeutic modulation of cytokines in chronic infectious diseases. *Curr Pharm Des* 2006;12:2329-48.
- [12] Alfano M, Poli G. Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Molecular Immunology* 2005;42:161-82.
- [13] Copeland K. Modulation of HIV-1 transcription by cytokines and chemokines. *Mini Rev Med Chem* 2005;5:1093-101.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Alfano M, Poli G. The cytokine network in HIV infection. *Curr Mol Med* 2002;2:677-89.
- [18] Alfano M, Poli G. Cytokine and chemokine based control of HIV infection and replication. *Curr Pharm Des* 2001;7:993-1013.
- [19] 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.*

- [20] 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.
- [21] 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;475:149-59.
- [22] Zídek 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.
- [23] Holý A. Phosphonomethoxyalkyl analogs of nucleotides. *Curr Pharm Des* 2003;9:2567-92.
- [24] 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.
- [25] 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 Geneeskd Belg* 1996;58:19-47.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] Zídek 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.
- [31] 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.
- [32] Krečmerová M, Masojídková M, Holý A. Synthesis of *N*9- and *N*7-[2-hydroxy-3-phosphonomethoxypropyl] derivatives of *N*6-substituted adenines, 2,6-diaminopurines and related compounds. *Collect Czechoslovak Chem Commun* 2004;69:1889-913.
- [33] 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.
- [34] Lalezari J. Cidofovir: results of a phase I/II study of novel antiviral nucleotide analogue. *J Infect Dis* 1995;171:788-96.
- [35] 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.

- [36] 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.
- [37] Perillo R. Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine resistant hepatitis B. *Hepatology* 2000;32:129-34.
- [38] Holý A. Inhibitory jednotlivých stupňů multiplikace virů. *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*, 2004. p. 94-147.
- [39] Cunningham A, Kedzierska K. Chemokines in HIV infections. In: Mahalingham S, editor. *Chemokines in viral infections*, 2004. p. 83-91.
- [40] Hořejší J, Bartůňková J. Cytokiny. *Základy imunologie*, 2005. p. 95-103.
- [41] 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.
- [42] Frade J, Llorente M, Mellado M, Alcami 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.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] Gong W, Howard O, Turpin J, Grimm M, Ueda H, Gray P, et al. Monocyte chemotactic protein-2 activates CCR5 and blocks CD4/CCR5-mediated HIV-1 entry replication. *J Biol Chem* 1998;273:4289-92.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] Krejsek J, Kopecký O. *Klinická imunologie*. 2004:751-72.
- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] Bartůňková J. Stručná fyziologie a patologie imunitního systému. In: Bartůňková J, Paulík M, editors. *Vyšetřovací metody v imunologii*, 2005. p. 19-41.
- [55] Zídek Z. *Osobní sdělení*. 2007.
- [56] Benedict C. Viruses and TNF related cytokines, an evolving battle. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:349-57.

- [57] 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.
- [58] 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.
- [59] Ito M, Nakano T, Kamiya T. Effects of tumor necrosis factor alpha on replication of varicella zoster virus. *Antiviral Res* 1991;15:183-92.
- [60] 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.
- [61] 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.
- [62] Hornung F, Scala G, Leonardo M. TNF- a induced secretion of C-C chemokines modulates C-C chemokine receptor 5 expression on peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 2000;164:6180-7.
- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] Breen E. Pro- and anti-inflammatory cytokines in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacol Ther* 2002;95:295-304.
- [66] 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.
- [67] Holý A. Úvod. Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik, 2004. p. 9-53.
- [68] 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.
- [69] Maeyer E, De Maeyer-Guignard J. Interferons. In: Thomson A, editor. *The cytokine handbook*, 1998. p. 491-516.
- [70] Deng H, Liu R, Ellmeier W. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996;381:661-6.
- [71] 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.
- [72] 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.
- [73] 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.

- [74] 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.
- [75] Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999;10:61-86.
- [76] 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.
- [77] 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.
- [78] Chada S, Ramesh R, Mhashilkar A. Cytokine- and chemokine-based gene therapy for cancer. *Curr Opin Mol Ther* 2003;5:463-74.
- [79] 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.
- [80] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853-66.
- [81] 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.
- [82] 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.
- [83] Croitoru-Lamoury J, Guillemin 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.
- [84] 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.
- [85] 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.
- [86] 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.
- [87] 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 CC Chemokine Receptor 5. *J Immunol* 2000;164:2592-601.
- [88] 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.