

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE**

PRAHA 2010

**Bakalářská práce**

**Úloha interleukinu-17 v transplantaci ledvin**

Markéta Menšíková

Školitel: Doc. MUDr. Ilja Stříž, CSc.

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Doc. MUDr. Iljovi Střížovi, CSc. za odbornou pomoc při psaní této bakalářské práce, dále pak Daniele Menšíkové a Magdaléně Macurové za opravu překlepů a formulačních nedostatků.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: Interleukin-17 v ledvinném transplantátu vypracovala sama s použitím uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Praha 2010

Markéta Menšíková

# 1. Obsah

1. Obsah.....	2
2. Abstrakt.....	3
3. Abstract.....	4
4. Seznam použitých zkratk.....	5
5. Úvod.....	6
6. Charakteristika interleukinu-17 a buněk, které jej produkují.....	7
Th17.....	7
Interleukin-17.....	9
7. Th17 versus Treg v ledvinném transplantátu.....	11
8. Vliv IL-17 na ledvinné epiteliální buňky (REC).....	13
Vliv samotného interleukinu-17.....	13
Synergické působení interleukinu-17 a CD40L.....	15
Signální dráhy v působení interleukinu-17.....	16
9. Zvířecí modely.....	17
10. Vliv interleukinu-17 v ledvinné transplantaci u lidí.....	18
11. BK virus a IL-17 v ledvinném transplantátu.....	20
12. Závěr.....	21
13. Použitá literatura.....	23

## 2. Abstrakt

V přítomnosti TGF- $\beta$  a IL-6 se naivní CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty (Thp) vyvinou v Th17 linii, která je charakterizována expresí Ror- $\gamma$ t a produkcí interleukinu-17 (IL-17). Ten je sekretován jako glykoproteinový homodimer. Navázání IL-17 na receptor (IL-17R), který je přítomen na všech typech buněk, stimuluje produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů. Poměr Th17:Treg je ve štěpu vykazujícím známky rejekce vyšší než u štěpu bez rejekce. Přítomnost IL-17 v kultuře epiteliálních buněk proximálních tubulů (PTEC) stimuluje jejich produkci IL-6, IL-8, MCP-1 a C3 komponenty komplementu. Současné působení IL-17 a CD40L synergicky zvyšuje produkci IL-6, IL-8 a RANTES. Signalizace od navázání k receptoru na povrchu PTEC až ke zvýšení exprese se uskutečňuje přes src kinázu a MAP kinázu a nejspíše končí u transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. V krysích transplantačních modelech se IL-17 objevuje u allotransplantátů druhý den po operaci, jeho množství vzrůstá do pátého dne, pak klesá a před smrtí zvířete vymizí. Není však přítomen v izotransplantátech ani v negativních kontrolách. Objevuje se dříve než IFN- $\gamma$ , který býval považován za spouštěče rejekce. U pacientů s transplantovanou ledvinou bylo rovněž při rejekci pozorováno zvýšené množství IL-17 v infiltrátu monocytů ve štěpu i v močovém sedimentu. Přestože existuje i studie, která neprokázala zvýšenou hladinu IL-17 ve štěpech vykazujících rejekci, většina výsledků podporuje hypotézu, že interleukin-17 je jedním z důležitých spouštěčů imunitní odpovědi příjemce, která má za následek rejekci transplantované ledviny. Zejména jeho přítomnost v moči pacientů po transplantaci by mohla varovat s ohledem na možnou přítomnost rejekčních mechanismů.

**Klíčová slova: ledvinový, transplantace, štěp, interleukin-17, rejekce**

### 3. Abstract

Naive CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes (Thp) can develop into Th17 line in the presence of TGF- $\beta$  and IL-6. Th17 cells are characterized by expression of Ror- $\gamma$ t and by production of interleukin-17 (IL-17). It is secreted as a glycoprotein homodimer. Binding to IL-17 receptor (IL-17R), which is present in all cell types, stimulates the production of proinflammatory cytokines and chemokines. The ratio of Th17: Treg in the graft showing signs of rejection is higher than in the graft without rejection. The presence of IL-17 in a culture of proximal tubular epithelial cells (PTEC) stimulates the production of IL-6, IL-8, MCP-1 and C3 complement component. Simultaneous action of IL-17 and CD40L synergistically increases the production of IL-6, IL-8 and RANTES. Signaling from the receptor on the surface of PTEC associated with its increased expression is effected via the src kinase and MAP kinase, and probably leads to the transcription factor NF- $\kappa$ B. In rat models of transplantation, the IL-17 appears in allografts on the second day after surgery, the level rises until the fifth day, then decreases and disappears before the death of the animal. IL-17 is not detectable in isografts and negative controls. It appears before the IFN- $\gamma$ , which had been considered a trigger of rejection. In patients with transplanted kidneys, an increased amount of IL-17 in monocytes in the graft infiltrate and urinary sediment was also observed during the rejection. Although there is a study not indicating elevated levels of IL-17 in rejected graft, most of the data support the hypothesis that interleukin-17 is one of the important triggers of the recipient's immune response leading to rejection of transplanted kidneys. Particularly, its presence in urine of transplant patients might be suspicious with respect to rejection mechanisms.

**Key words: Kidney, renal, allograft, transplantation, interleukin-17, Th17**

## 4. Seznam použitých zkratk

APC – buňky prezentující antigen

BKV – Polyomavirus BK

BKVAN – BKV-asociovaná nefropatie

CTLA – Antigen cytotoxických T lymfocytů (např. CTLA-8)

FoxP3 – forkhead box P3

HDAC – histon/protein deacetyláza

IFN- $\gamma$  – interferon- $\gamma$

IL – interleukin (IL-1, IL-4, IL-17...)

IL-17R – receptor pro interleukin-17

JNK – C-Jun N-terminální kináza

MAP kináza – mitogeny aktivovaná protein kináza

MCP-1 – chemoatraktantní protein monocytů

PDTC - Pyrolidin dithiokarbamát

PTEC – epiteliální buňky proximálních tubulů

RANTES – chemokin (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted)

REC – ledvinné epiteliální buňky

RT-PCR – spojení reverzní transkripce a polymerázové řetězové reakce

STAT – signální transduktor a aktivátor transkripce (např. STAT-4)

TGF- $\beta$  – transformující růstový faktor- $\beta$

Th – pomocné T-lymfocyty (Th1, Th2, Th17)

Thp – prekurzor pomocných T-lymfocytů

Treg – regulační T-lymfocyty

## 5. Úvod

Pro pacienty s terminálním stádiem onemocnění ledvin bývá transplantace poslední a často jedinou možností léčby. Úspěšná transplantace ledviny může výrazně zlepšit kvalitu jejich života.

Dlouhodobé přijetí ledvinného transplantátu bez imunosupresivní léčby, která s sebou nese nežádoucí účinky včetně snížení obranyschopnosti příjemce vůči infekcím, by jistě bylo největším snem jak pacientů samotných, tak i jejich lékařů.

Přežití štěpu v těle příjemce však závisí na celé řadě rizikových faktorů. K tomu, aby bylo vůbec možné tyto rizikové faktory snížit, je samozřejmě potřeba nejdříve dobře znát patogenetické mechanismy transplantačních reakcí. Budeme-li jednou schopni přesně a bez jediné pochybnosti definovat, co všechno má vliv na přijetí transplantovaného orgánu příjemcem, jaký to má vliv a čím to lze ovlivnit, budeme možná schopni všechny tyto rizikové faktory lépe eliminovat a přiblížit se tomuto snu.

Přestože je dnes již celá řada rizikových faktorů známa a prostudována, realita se stále pohybuje poměrně daleko od zmíněné představy. A proto je potřeba neustálého sledování vlivu různých faktorů na přežití transplantovaného orgánu, včetně získávání poznatků o rozdílném zastoupení cytokinů ve stabilním štěpu a ve štěpu vykazujícím známky rejekce, a také o úloze těchto cytokinů v imunitní odpovědi organismu.

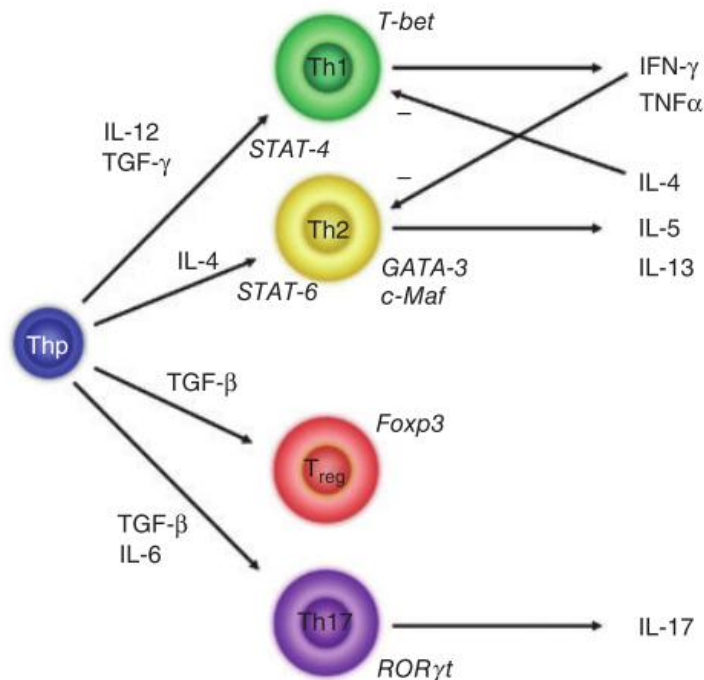
Poměrně nedávno objevený cytokin interleukin-17 se poslední dobou ukazuje jako jeden z možných aktérů v rejekci transplantátu. V této bakalářské práci bych chtěla shrnout veškeré dosavadní poznatky o jeho úloze v ledvinné transplantaci.

## 6. Charakteristika interleukinu-17 a buněk, které jej produkují

### Th17

CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty hrají důležitou roli v iniciaci imunitní odpovědi díky tomu, že mají v průběhu imunitní reakce řadu efektorových funkcí a že poskytují pomoc dalším buňkám imunitního systému.

Naivní CD4<sup>+</sup> pomocné buňky (Thp) se mohou diferencovat v nejméně čtyři typy efektorových buněk: Th1, Th2, Th17 a Treg. Přítomnost interleukinu-12 (IL-12) způsobí vývoj ve směru k Th1, přítomnost IL-4 směrem k Th2, současná přítomnost TGF-β a IL-6 způsobí diferenciaci Th17 a je-li Thp pouze v přítomnosti TGF-β bez IL-6, vyvine se v regulační Treg buňky. Každá z těchto linií je charakterizována specifickou cytokinovou produkcí a expresí specifických transkripčních faktorů: Th1 exprimuje T-bet, Th2 GATA-3, Treg exprimuje FoxP3 a Th17 Ror-γt (Afzali et al., 2007).

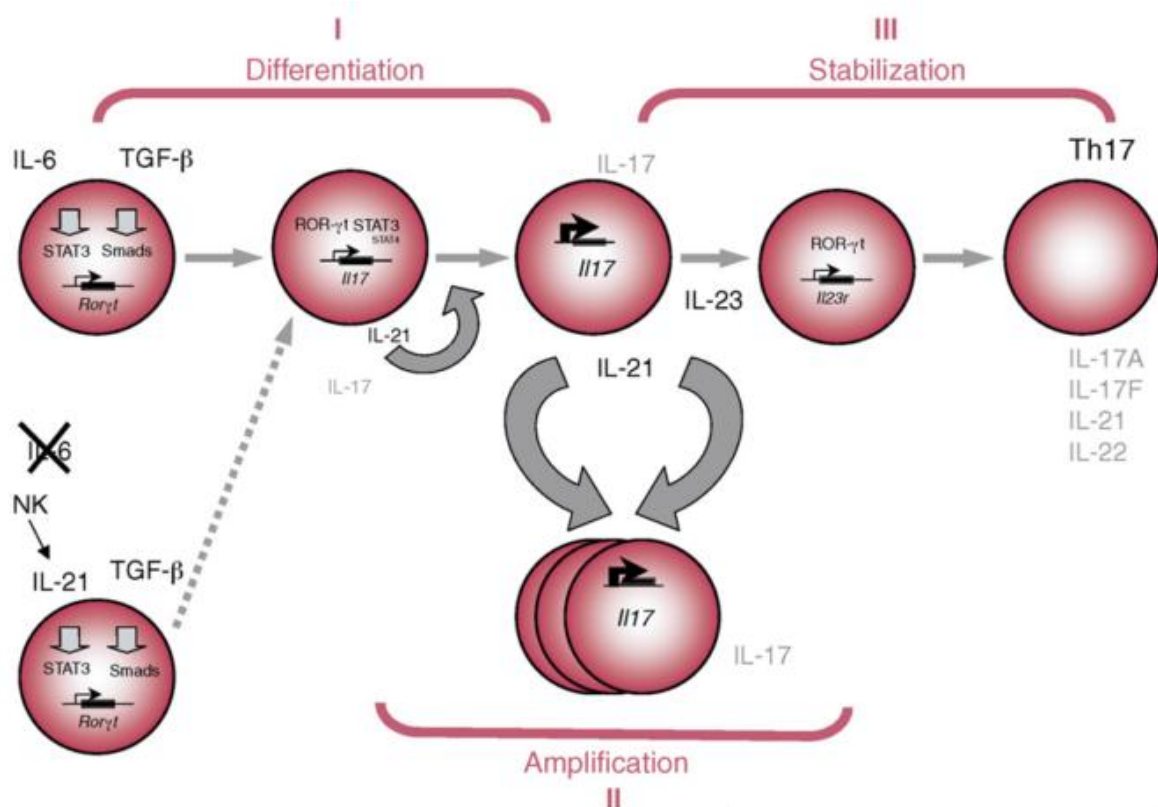


**Obr. 1 Vývoj T-pomocných buněk ke specifickým liniím u myši.** Na základě cytokinového prostředí se může prekurzor T pomocných buněk (Thp) vyvinout ve vzájemně vylučné fenotypy Th1, Th2, Th17 a Treg. Přítomnost IL-12 způsobí vychýlení k Th1 za pomoci signalizace přes STAT-4. Th1 buňky jsou charakterizovány expresí T-bet a produkcí IFN-γ a TNF-α. Vychýlení k Th-2 je způsobeno IL-4 přes STAT-6 signalizaci. Th2 buňky jsou charakterizovány expresí GATA-3. Jak vývoj Treg, tak i Th17 vyžaduje přítomnost TGF-β, ale je-li přítomný i IL-6 dojde k vychýlení směrem k Th17 fenotypu. Th17 fenotyp je charakterizován expresí RoR-γt a produkcí IL-17, Treg fenotyp expresí FoxP3 (Převzato z Afzali et al., 2007).



Je také známo, že interferon- $\gamma$  (Th1 cytokin) inhibuje diferenciaci Th2 a Interleukin-4 (Th2 cytokin) inhibuje diferenciaci Th1. IFN- $\gamma$  stejně jako IL-4 inhibují Th17 diferenciaci (San Segundo, 2008).

Diferenciace Th17 je tedy iniciována aktivací Thp v přítomnosti IL-6 a TGF- $\beta$ , což vede k expresi ROR- $\gamma$ t a produkci IL-17 (IL-17A). Th17 buňky produkují také IL-17F, IL-21 a IL-22. Přítomnost interleukinu-23 při aktivaci T buněk vede k expanzi buněk produkujících IL-17 a stabilizaci Th17 fenotypu (Bettelli et al., 2007).



**Obr. 2 Model vývoje Th17 linie.** Diferenciace Th17 buněk je iniciována aktivací naivních T-lymfocytů v přítomnosti IL-6 a TGF- $\beta$ , což vede k expresi ROR- $\gamma$ t a produkci IL-17. IL-6 produkovaný vrozenou složkou imunitního systému je v této fázi vývoje klíčový, ale není-li přítomen a jsou-li eliminovány Treg buňky, IL-21 produkovaný NK a NKT buňkami může také ve spolupráci s TGF- $\beta$  iniciovat alternativní dráhu diferenciace Th17. Po diferenciaci je IL-21 masivně produkován vyvíjejícími se Th17 buňkami a autokrinně ovlivňuje Th17 k amplifikaci jejich populace. Poté interleukin-23 stabilizuje diferenciované Th17 buňky a umožní další expanzi Th17 linie udržením produkce jejich charakteristických cytokinů (Převzato z Bettelli et al., 2007).

## Interleukin-17

Interleukin-17 (IL-17A) byl objeven v roce 1993 jako CTLA-8 a je členem IL-17-cytokinové rodiny obsahující v současné době šest popsaných členů (IL-17A-F), které jsou strukturálně homologní. IL-17 je produkován převážně Th17 lymfocyty, ale jeho produkce byla popsána i u dalších buněčných typů např.  $\gamma\delta$ T-lymfocytů a CD8<sup>+</sup>T-lymfocytů (Afzali et al., 2007).

Lidský Interleukin-17A je protein složený ze 150 aminokyselinových zbytků, jehož molekulová hmotnost je 15kDa. Je glykosylován a sekretován jako homodimer spojený disulfidickými můstky. Konečný glykoproteinový homodimer má molekulovou hmotnost 30-35kDa (Moseley et al., 2003).

Interleukin-17A bývá produkován Th17 buňkami současně s IL-17F, se kterým může tvořit také heterodimery. IL-17A a IL-17F tedy mohou působit samostatně i synergicky (Bettelli et al., 2007).

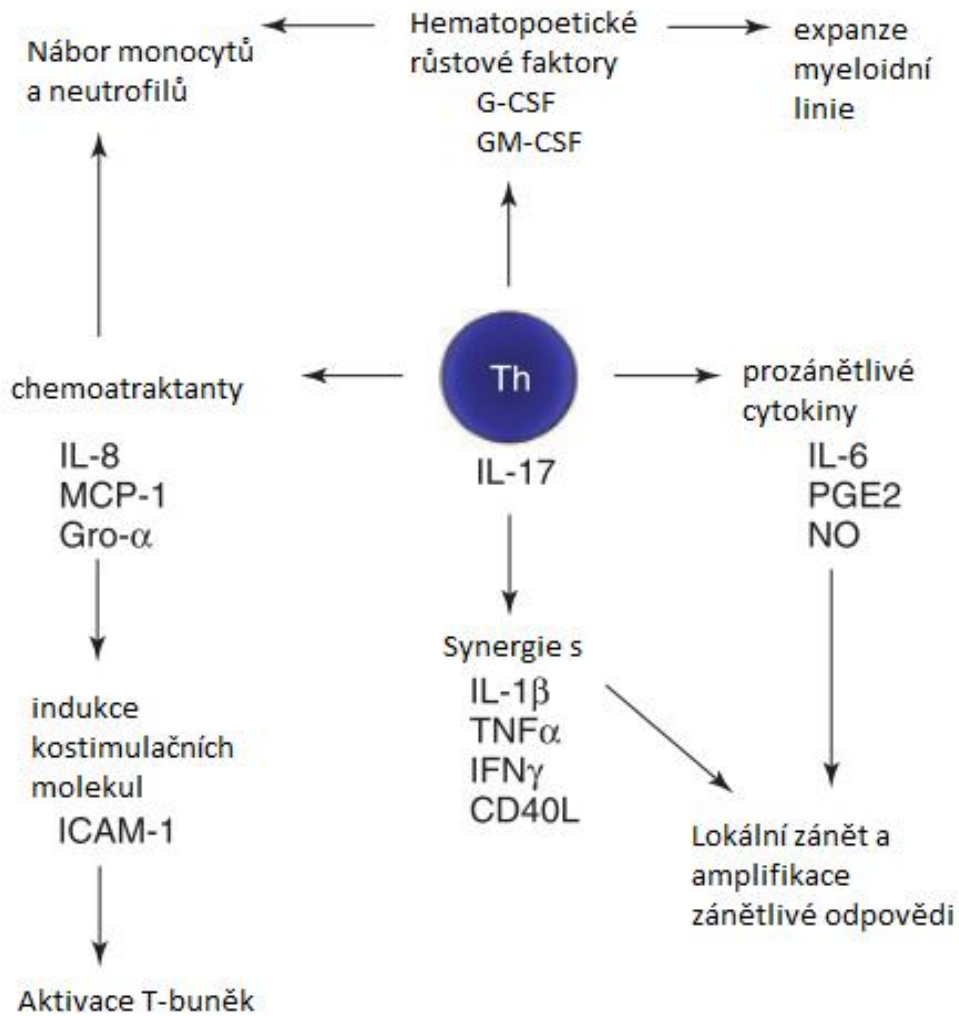
Receptor pro IL-17A (IL-17R) je 130kDa velký protein, procházející jedenkrát membránou. Zatímco IL-17A je exprimován pouze T-lymfocyty, jeho receptor je přítomen na všech buněčných typech a tkáních, které byly doposud zkoumány (Moseley et al., 2003).

Aktivace receptoru pro interleukin-17 má za následek indukci řady prozánětlivých mediátorů stromatickými buňkami a stimuluje produkci cytokinů, které lákají neutrofile do místa zánětu a které stimulují vývoj granulocytů v kostní dřeni (Witowski et al., 2004).

IL-17 je významným mediátorem zánětu v obraně proti specifickým patogenům (Witowski et al., 2004). Jeho zvýšená produkce byla zaznamenána v řadě chronických a autoimunitních onemocnění jako jsou revmatoidní artritida, roztroušená skleróza, systémový lupus erythematoses, chronické záněty nebo lupénka (Afzali et al., 2007).

V poslední době se objevuje stále více důkazů, že by interleukin-17 mohl hrát významnou roli i při rejekci transplantovaných orgánů.

Prozánětlivý vliv interleukinu-17 je znázorněn na následujícím obrázku.



**Obr. 3** Prozánětlivé efekty interleukinu-17 (Převzato z Afzali et al., 2007 a upraveno)

## 7. Th17 versus Treg v ledvinném transplantátu

Ačkoli je známo, že naivní CD4<sup>+</sup> pomocné buňky (Thp) se podle cytokinového prostředí mohou diferencovat jak v Th1 a Th2, tak i v prozánětlivé buňky charakteristické produkcí IL-17 a v regulační Treg (v závislosti na (ne)přítomnosti IL-6), existují i studie ukazující, že tato diferenciace nemusí být zcela konečná a nezvratná. Koenen et al. izolovali Treg buňky z periferní krve a zkoumali jejich chování při působení různých cytokinů. Zjistili, že regulační Treg buňky se mohou přeměnit v buňky produkující interleukin-17, které rovněž exprimují ROR- $\gamma$ t, IL-21, IL-22 a IFN- $\gamma$ .

Na rozdíl od diferenciace Th17 buněk z Thp, není tento proces nijak ovlivněn přítomností interleukinu-6. Jako klíčové cytokiny v přeměně Treg na IL-17-produkující buňky se ukázaly být IL-2 a IL-15. Nejvýznamnější byla tato diferenciace za přítomnosti antigen prezentujících buněk (APC). Zvýšena byla i přítomností IL-1 $\beta$ , IL-23 a IL-21.

Tento děj rovněž závisí na aktivitě histon/protein deacetylázy (HDAC) – enzymu, který reguluje remodelaci chromatinu, genovou expresi a funkci řady transkripčních faktorů. Inhibice HDAC úplně zabránil přeměně Treg na IL-17-produkující buňky. Příčinou může být fakt, že k optimálnímu fungování Treg je zapotřebí acetylace forkhead domény FoxP3 a tento enzym ji deacetyluje (Koenen et al., 2008).

Nebylo zatím nikterak prokázáno, že by tento proces hrál v rejekci transplantátu nějakou roli. Dosavadní výsledky však ukazují, že poměr Th17:Treg je ve štěpu vykazujícím známky rejekce vyšší než u štěpu bez rejekce a že v průběhu rejekce dochází k poklesu Treg (Wang et al., 2008).

Jediný doposud provedený pokus na možnost přeměny Treg na IL-17-produkující buňky v ledvinném transplantátu poskytl negativní výsledek. Byla v něm prověřena možnost výskytu buněk vykazujících současnou expresi IL-17 a FoxP3. Takovéto buňky však nebyly v ledvinném štěpu nalezeny. Buňky exprimující FoxP3 a buňky produkující IL-17 se zde ukázaly být jasně oddělenými populacemi (Zuber et al., 2009).

V téže studii se ukázalo, že poměr Th17/FoxP3<sup>+</sup> buněk kolísá v závislosti na typu infiltrátu. Difúzní infiltrát vykazuje signifikantně nižší podíl než infiltrát nodulární (Zuber et al., 2009).

Výskytem Treg v ledvinném transplantátu a jeho vztahem k interleukinu-17 se zabýval i Wang s kolektivem. Ukázali, že počet FoxP3-exprimujících buněk klesá během vývoje rejekce štěpu. Up-regulace IL-17, stejně jako IL-6, IL-23 a TGF- $\beta$ , koreluje s poklesem FoxP3<sup>+</sup>Treg. Neutralizace interleukinu-6 protilátkami má za následek zvýšení množství Treg (Wang et al., 2008).

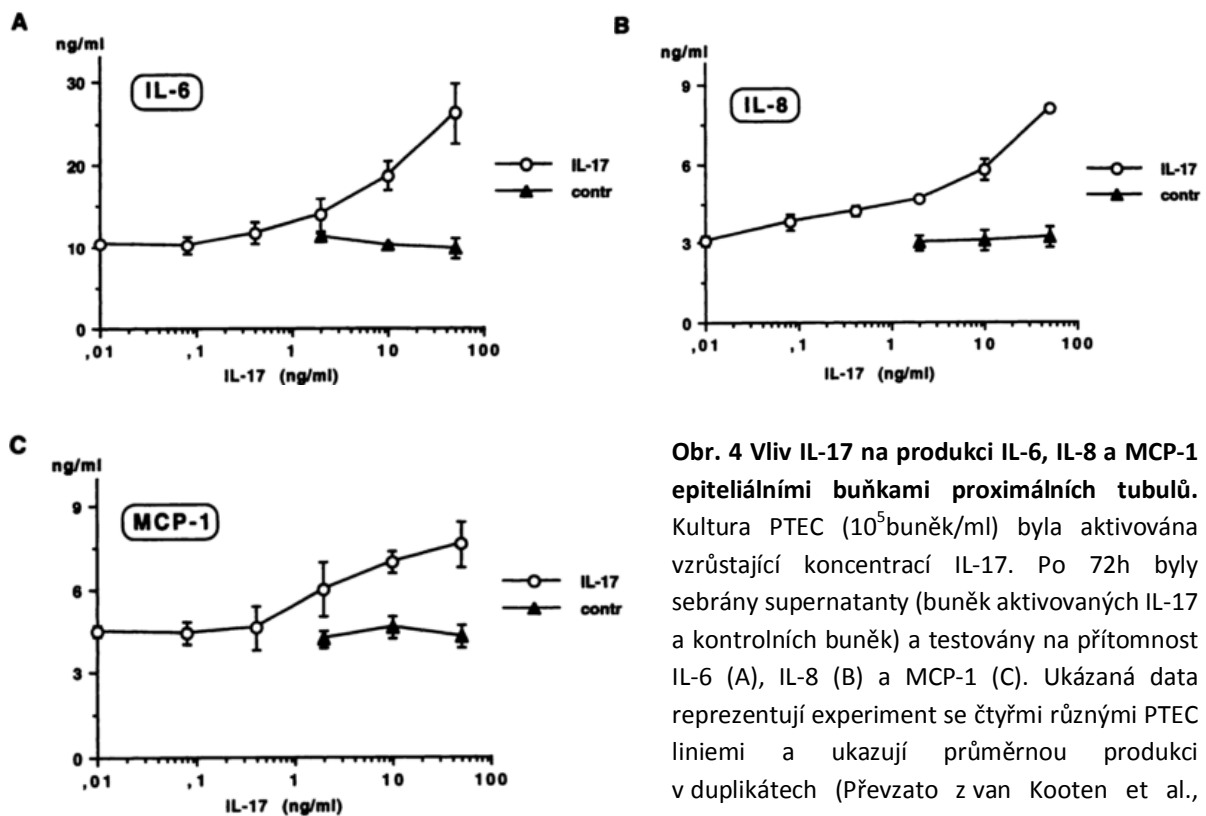
Bylo také pozorováno, že pacienti, čekající na druhou transplantaci kvůli dysfunkci předchozího štěpu, mají vyšší hladinu interleukinu-17 v séru než pacienti s terminálním stádiem onemocnění ledvin, kteří čekají na transplantaci poprvé. Zároveň měli signifikantně nižší celkové množství Treg v krvi. Vyšší hladina IL-17 mohla být důsledkem zvýšené aktivity Th17 v průběhu rejekce a mohla mít za následek snížené množství Treg. Nedostatek regulačních Treg pak může být důvodem častější rejekce u pacientů s druhým transplantátem (San Segundo et al., 2008).

## 8. Vliv IL-17 na ledvinné epitelální buňky (REC)

Lokální produkce cytokinů hraje klíčovou roli v regulaci patofyziologických procesů vedoucích k rejekci transplantovaných orgánů. Kromě infiltrujících lymfocytů mohou být významné i buňky transplantované ledviny, např. epitelální buňky proximálních tubulů (PTEC) mohou mít, díky své schopnosti produkovat řadu cytokinů, chemokinů a komponent komplementu, za následek vývoj zánětu.

### Vliv samotného interleukinu-17

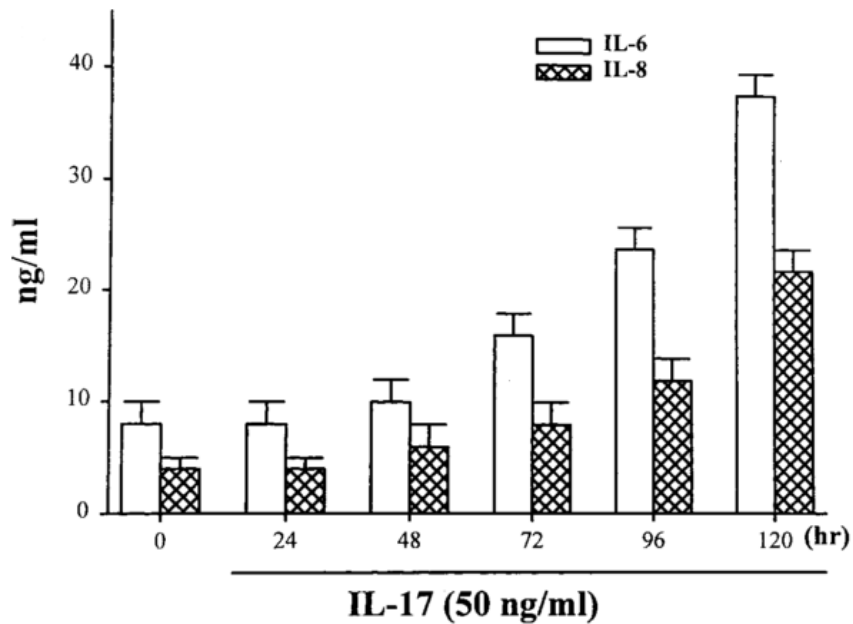
In vitro studie na PTEC získaných z tkáně kůry lidské ledviny, z anatomických důvodů nevhodné pro transplantaci, ukázaly, že působení interleukinu-17 na kulturu PTEC stimuluje produkci interleukinu-6 (IL-6), interleukinu-8 (IL-8) a chemoatraktantního proteinu monocytů (MCP-1), nemá však žádný přímý vliv na produkci RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted). Produkce IL-6, IL-8 (van Kooten et al., 1998; Loong et al., 2002; Hsieh et al., 2002) a MPC-1 (van Kooten et al.; 1998, Hsieh et al., 2002) vzrůstá s dávkou IL-17, kterému jsou PTEC vystaveny.



Obr. 4 Vliv IL-17 na produkci IL-6, IL-8 a MCP-1 epitelálními buňkami proximálních tubulů. Kultura PTEC ( $10^5$  buněk/ml) byla aktivována vzrůstající koncentrací IL-17. Po 72h byly sebrány supernatanty (buněk aktivovaných IL-17 a kontrolních buněk) a testovány na přítomnost IL-6 (A), IL-8 (B) a MCP-1 (C). Ukázaná data reprezentují experiment se čtyřmi různými PTEC liniemi a ukazují průměrnou produkci v duplikátech (Převzato z van Kooten et al., 1998).

Se zvyšujícími se koncentracemi IL-17 vzrůstá nejen množství IL-6 a IL-8 proteinu v médiu, ale také množství samotné mRNA v PTEC (Loong et al., 2002).

Produkce IL-6 a IL-8 závisí také na době expozice. Do 24h od počátku působení IL-17 není zaznamenatelný vzrůst produkce těchto cytokinů, ale při expozici delší než 24h se objevuje významné zvýšení produkce, vzrůstající s dobou expozice (Loong et al., 2002).



**Obr. 5** Produkce IL-6 a IL-8 lidskými ledvinnými epitelálními buňkami stimulovanými interleukinem-17 (50ng/ml) v závislosti na době expozice (Převzato z Loong et al., 2002 a upraveno).

Přidání neutralizačních anti-IL-17 protilátek zcela inhibuje vliv IL-17 na cytokinovou produkci epitelálních buněk proximálních tubulů (van Kooten et al., 1998).

Interleukin-17 rovněž výrazně zvyšuje produkci C3 komponenty komplementu epitelálními buňkami proximálních tubulů. Vliv IL-17 na produkci dalších složek komplementu nebyl prokázán (van Kooten et al., 1998).

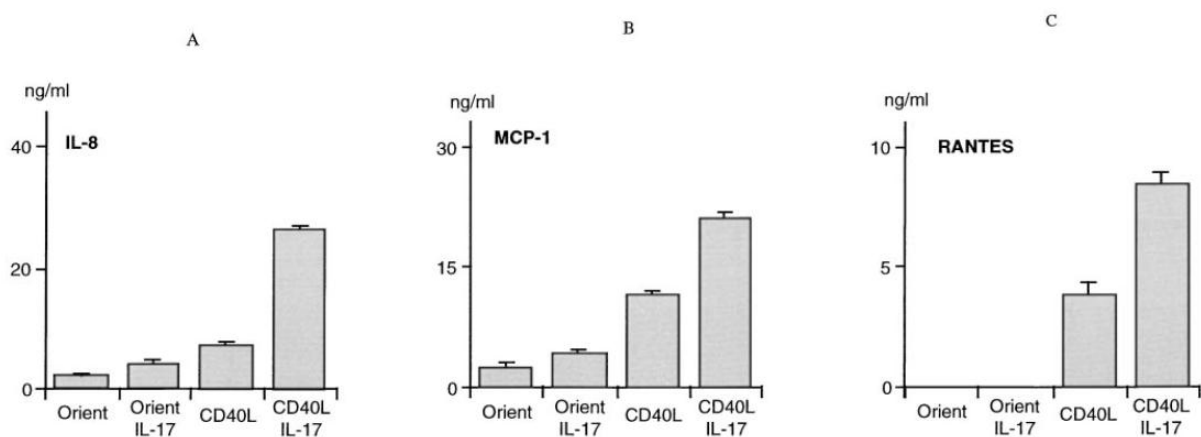
## Synergické působení interleukinu-17 a CD40L

CD40L, stejně jako IL-17, je produkován aktivovanými T-lymfocyty a je schopen stimulovat epiteliální buňky tubulů k produkci cytokinů. Oba dva jsou rovněž exprimovány v průběhu rejekce ledvinného transplantátu, což nasvědčuje jejich možné kooperaci.

Interleukin-17 i CD40L stimulují epiteliální buňky tubulů k produkci IL-8, IL-6 a MCP-1. Stimulace epiteliálních buněk k produkci RANTES je možná pouze pomocí CD40L. Samotný IL-17 nemá na produkci RANTES žádný vliv.

Jsou-li IL-17 a CD40L přidány ke kultuře buněk současně, dojde ke zvýšení produkce RANTES oproti působení samotného CD40L, což svědčí o jejich synergickém působení. Rovněž u interleukinu-8 se projeví přidání obou najednou synergickým zvýšením produkce, taktéž u IL-6. Na MCP-1 se jeví vliv obou současně spíše aditivně.

Synergický vliv je rovněž závislý na použitém množství CD40L a IL-17 a lze jej plně inhibovat přidáním anti-IL-17 protilátek (Woltman et al., 2000).



**Obr. 6 Interleukin-17 a CD40L synergicky zvyšují chemokinovou produkci epiteliálních buněk tubulů.**

Buňky byly kultivovány s médiem, IL-17 (50ng/ml), CD40L, nebo jejich kombinací. Po čtyřech dnech byly odebrány supernatanty a testovány na IL-8 (A), MCP-1 (B) a RANTES (C) použitím ELISA. Uvedena je průměrná produkce duplikátů (Převzato z Woltman et al., 2000).



## Signální dráhy v působení interleukinu-17

Při stimulaci lidských ledvinných epitelálních buněk interleukinem-17 vzroste fosforylace tyrozinů u několika proteinů. Ta se objevuje po první minutě a je nejvyšší po pěti minutách od přidání IL-17, pak zase klesá. Fosforyluje se i src kináza. Její fosforylace je závislá na množství IL-17. Vyšší dávka IL-17 má za následek masivnější fosforylaci. Přidání inhibitoru src kinázy k buněčné kultuře před stimulací interleukinem-17 blokuje následnou produkci IL-6, IL-8 a MCP-1. IL-17 také aktivuje všechny tři druhy MAP kináz - JNK, P38 a ERK. Na základě těchto zjištění navrhl Hsieh s kolektivem tři možné signalizační dráhy, které mohou indukovat produkci IL-6, IL-8 a MCP-1 po stimulaci ledvinných epitelálních buněk interleukinem-17.

Interleukin-17 se naváže na receptor na povrchu epitelálních buněk tubulů, což způsobí fosforylaci src kinázy, která může způsobit fosforylaci SHC-GRB2-SOS komplexu, čímž jej aktivuje. Ten pak aktivuje Ras protein, který může předat signál dalším signálním molekulám a následně aktivovat ERK MAP kinázu.

Druhou variantou je, že aktivovaná src kináza aktivuje JNK dráhu přes Rho kinázy. Do třetice může IL-17 aktivovat i P38 MAP kinázu buďto přímo, nebo přes další neidentifikované molekuly (Hsieh et al., 2002).

Existuje zde ještě možnost, že signální dráhy ovlivňující produkci IL-6, IL-8 a MCP-1 epitelálními buňkami tubulů končí u transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. Nebylo sice zaznamenáno signifikantní ovlivnění množství NF- $\kappa$ B v epitelálních buňkách tubulů po stimulaci samotným IL-17, pouze po aktivaci CD40L, ale při přidání PDTC (Pyrolidin dithiokarbamát), inhibitoru NF- $\kappa$ B, byla při pozdější stimulaci IL-17 inhibována produkce IL-6, IL-8 i MCP-1 (Woltman et al., 2000).

## 9. Zvířecí modely

Při studiu akutní rejekce na krysím modelu se ukázalo, že v průběhu prvního a druhého dne po operaci je možné ve štěpu histologicky nalézt roztroušené infiltrující lymfocyty. Třetí a čtvrtý den se začíná vyvíjet rejekce. Po pátém dni nastane masivní kumatobuněčná infiltrace a od sedmého do devátého dne se objevuje nekróza tkáně.

Za pomoci RT-PCR a in-situ hybridizace se zjistilo, že první a druhý den po operaci vykazují infiltrované buňky ve štěpu slabou expresi IL-17 mRNA, která vzrůstá po třetím dni, vrcholí den pátý a pak klesá. Z výše uvedeného vyplývá, že exprese IL-17 je úzce spojena se stupněm akutní rejekce a objevuje se již v jejím počátku (Loong et al., 2000, Hsieh et al., 2001).

Na krysím modelu byla rovněž zkoumána produkce Th1/Th2 cytokinů a bylo zjištěno detekovatelné množství mRNA exprese IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15 a IL-18 v allotransplantátech, ale všechny chyběly v izotransplantátech a negativních kontrolách. Nebyla zaznamenána žádná exprese IL-4 a IL-5 (Hsieh et al., 2001).

Produkce IL-6, IL-8 a IFN- $\gamma$  se objevuje třetí postoperační den a vzrůstá do šestého dne, pak klesá. Dříve se považoval IFN- $\gamma$  za spouštěč akutní rejekce. Objevuje se však později než IL-17 (Hsieh et al., 2001).

Interleukin-17 je tudíž jediný cytokin indukovaný časně (druhý postoperační den) v infiltrátu mononukleárních buněk ledvinného štěpu. Při vývoji rejekce jeho exprese stoupá a vrcholí pátý postoperační den. Pak opět klesá a vymizí před smrtí krysy (osmý nebo devátý postoperační den). Již druhý den po operaci lze histologicky detekovat hraniční změny rejekce. IL-6 i IL-8 se objevují později než IL-17 – třetí postoperační den, kdy rejekce začíná být výraznější – což odpovídá předchozímu zjištění na epiteliálních buňkách tubulů, že IL-17 indukuje jejich produkci IL-6 a IL-8 (Loong et al., 2002).

## 10. Vliv interleukinu-17 v ledvinné transplantaci u lidí

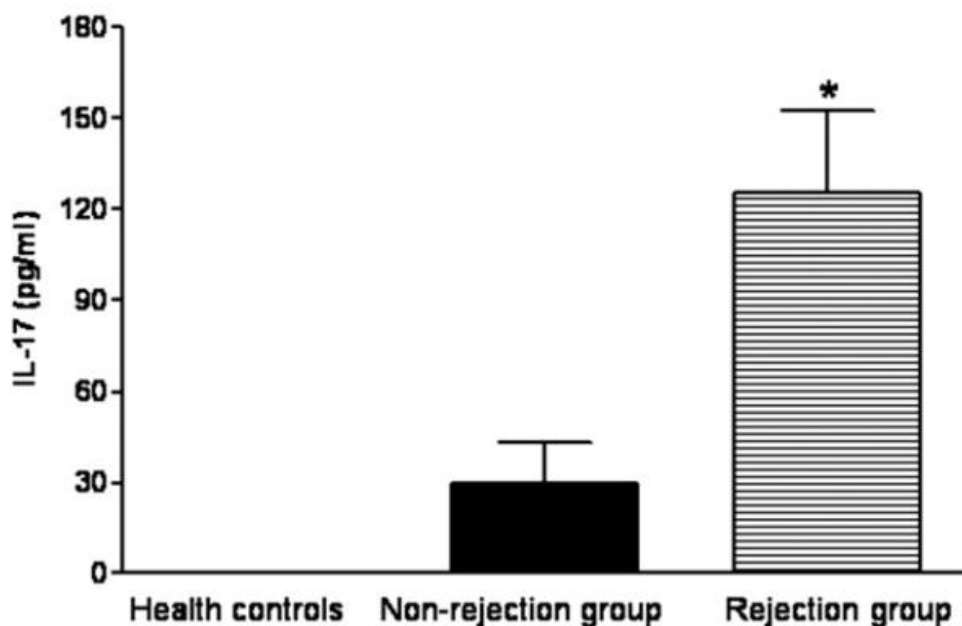
Při studiu IL-17 mRNA a proteinu v ledvinné tkáni vykazující známky rejekce, která byla srovnávána s kůrou zdravé ledviny, z anatomických důvodů nevhodné pro transplantaci, se ukázalo, že interleukin-17 i jeho mRNA jsou přítomny při rejekci, ale nejsou detekovatelné u zdravé ledviny. Produkci interleukinu-17 lze identifikovat při různých stádiích vývoje rejekce. Prokázalo se rovněž, že tento interleukin-17 je produktem pouze T-lymfocytů infiltrovaných do štěpu, nikoli ledvinných epiteliálních buněk (van Kooten et al., 1998).

Provedením biopsie tkáně z transplantované ledviny u stabilních pacientů, u nichž byla detekována zvýšená hladina kreatininu v séru, byly zjištěny hraniční změny subklinické rejekce s méně než 25% infiltrovaných lymfocytů okolo tubulů. Exprese interleukinu-17 byla detekována v tkáni těchto pacientů, nebyla však nalezena při ledvinné biopsii u pacientů s transplantátem bez známek rejekce ani u ledvin pacientů, jimž byla provedena nefrektomie kvůli karcinomu.

Ukázalo se také, že pacienti vykazující hraniční změny subklinické rejekce mají vždy detekovatelné množství IL-17 mRNA v mononukleárních buňkách jejich močového sedimentu. Ve vzorcích od pacientů s normální funkcí štěpu bez známek rejekce nebo od pacientů s normální infekcí močových cest byla IL-17 mRNA v mononukleárních buňkách z močového sedimentu zcela nedetekovatelná pomocí in-situ hybridizace.

Výše uvedené nabízí možnost, že by interleukin-17 mohl být používán jako užitečný parametr, jehož detekce v močovém sedimentu by byla varováním před rejekcí (Hsieh et al. 2001, Loong et al. 2002).

O významu interleukinu-17 v ledvinné transplantaci u lidí svědčí i další studie, která studovala výskyt IL-17 u 18 pacientů s transplantovanou ledvinou. Interleukin-17 byl detekován v 17 případech, z čehož u devíti pacientů štěp vykazoval známky rejekce a u osmi nikoli, ale proběhly v něm jiné patologické změny (např. fibróza, imunoglobulin A nefropatie atd.). Množství interleukinu-17 v séru pacientů s rejekcí však bylo signifikantně vyšší než u těch bez rejekce (Crispim et al., 2009).



**Obr. 7 Hladina interleukinu-17 u pacientů s transplantovanou ledvinou.** Byla odebrána periferní krev od zdravé skupiny lidí, skupiny pacientů po transplantaci, u nichž nebyly zaznamenány známky rejekce a skupiny pacientů s rejekcí. Byla sledována hladina IL-17 v séru. Množství IL-17 bylo zjištěno pomocí ELISA. Výsledky jsou uváděny v pikogramech na mililitr (Převzato z Crispim et al., 2009).

Nebyl prokázán žádný signifikantní rozdíl v produkci IL-17 mezi pacienty v souvislosti s věkem, pohlavím, časem od transplantace k biopsii, původem štěpu, HLA neshodou, typem dárce, době chladné ischemie nebo v souvislosti s imunosupresivní léčbou (Crispim et al., 2009).

Ne všechny dosavadní studie však ukazují vliv interleukinu-17 v rejekci ledvinného transplantátu. De Oliveira a kolektiv prokázali vyšší množství interleukinu-7, interleukinu-16 a interleukinu-18 u pacientů s rejekcí než u pacientů bez známek rejekce. V jejich pokusu však nebyl prokázán žádný signifikantní rozdíl v produkci interleukinu-17 v ledvinné tkáni získané biopsií od pacientů s rejekcí oproti těm bez ní (de Oliveira et al., 2002).

## **11. BK virus a IL-17 v ledvinném transplantátu**

Polyomavirus BK (BKV) způsobuje v raném dětství infekci, po níž zůstává v latentní formě v urogenitálním traktu. Jeho reaktivace infekcí uroteliálních buněk se objevuje u deseti až šedesáti procent příjemců ledvinného transplantátu, u kterých může způsobit BKV-asociovanou nefropatii (BKVAN). Ta se vyskytuje u přibližně pěti až osmi procent pacientů. Až u padesáti procent pacientů s BKVAN dojde v průběhu dvou až tří let ke ztrátě štěpu.

Při studiu vztahu BKV k cytokinům v moči šedesáti pěti příjemců ledvinného transplantátu se zjistilo, že BK-positivní pacienti vykazují silnou zánětlivou cytokinovou odpověď, při níž se zvyšuje hladina sIL-1RA, IL-3, IL-6 a sIL-6R v moči.

Hladina IL-17 se však nezvýšila. Naopak byla vyšší u zdravých kontrol než u pacientů s transplantací. U části pacientů s transplantovanou ledvinou byla zcela nedetekovatelná, nezávisle na tom, byli-li BK-positivní nebo BK-negativní (Sadeghi et al., 2009).

## 12. Závěr

Interleukin-17 je prozánětlivý cytokin produkovaný převážně Th-17 buňkami, který po navázání na svůj všudypřítomný receptor stimuluje jiné buňky k produkci cytokinů. Zvyšuje produkci interleukinu-6, interleukinu-8, MCP-1 a C3 komponenty komplementu ledvinnými epiteliálními buňkami. Velikost jejich produkce je závislá na dávce i době působení IL-17 (Hsieh et al., 2002).

Ve spolupráci s CD40L se množství IL-6, IL-8, MCP-1 vyprodukovaného PTEC zvyšuje synergicky, ve srovnání s produkcí po stimulaci zvláště CD40L a IL-17. V přítomnosti IL-17 a CD40L se synergicky zvyšuje i množství produkovaného RANTES, na který IL-17 bez spolupráce s CD40L nemá žádný vliv (Woltman et al., 2000). Signalizace od navázání receptoru na povrchu PTEC až ke zvýšení exprese se uskutečňuje přes src kinázu a MAP kinázu (Hsieh et al., 2002) a nejspíše končí u transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B (Woltman et al., 2000).

Poměr Th17:Treg je u štěpu vykazujícího známky rejekce vyšší než u štěpu bez rejekce a během vývoje rejekce vzrůstá (Wang et al., 2008).

Jakým způsobem dochází ke změně zastoupení těchto populací T-buněk, není zcela známo. Mohlo by to být způsobeno tím, že IL-6 produkovaný PTEC po stimulaci interleukinem-17 při rejekci nasměruje vývoj Thp směrem k Th-17. Nově se však také objevilo, že diferenciované Treg jsou schopny se přeměnit v IL-17-produkující buňky. Tento jev sice v ledvinném transplantátu ještě nebyl nikdy prokázán, ale jeho možností se dosud zabývala – a to jen okrajově – pouze jedna studie, která udává negativní výsledek. Přesto si myslím, že k tomu, aby jej bylo možné zcela vyloučit, by bylo potřeba podrobnější přezkoumání.

Interleukin-17 se v modelech ledvinné transplantace u kryš objevuje druhý postoperační den pouze u allotransplantátů, chybí v negativních kontrolách i izotransplantátech. Ve štěpu vyvíjejícím akutní rejekci vzrůstá jeho množství do pátého dne, pak klesá a před smrtí zvířete vymizí. Objevuje se v transplantovaném orgánu dříve než IFN- $\gamma$ , který býval považován za spouštěč rejekce (Hsieh et al., 2001).

Interleukin-17 se tudíž ukázal být jediným cytokinem objeveným časně v ledvinné tkáni vykazující hraniční známky rejekce a je proto možné, že právě on hraje v rejekci roli hlavního spouštěče změn spojených s rejekcí.

U pacientů s ledvinným transplantátem bylo v několika studiích při rejekci pozorováno zvýšené množství interleukinu-17 jak v infiltrátu monocytů ve štěpu, tak i v močovém sedimentu. To dává vznik myšlence, že by IL-17 objevený v močovém sedimentu časně po transplantaci mohl varovat před vznikající rejekcí a mohla by být zahájena léčba ještě před tím, než probíhající rejekce poškodí štěp (Hsieh et al. 2001, Loong et al. 2002).

Existují ale i výsledky, v nichž nebyl prokázán signifikantní rozdíl u pacientů s rejekcí a bez ní (de Oliveira et al., 2002). Toto zjištění vrací nad roli interleukinu-17 jistý otazník zvláště proto, že počet příjemců ledvinného transplantátu zahrnutých v této studii byl výrazně vyšší než v studiích ukazujících opak (73 pacientů s transplantovanou ledvinou ve studii de Oliviera s kolektivem je vyšší než 40 ve studii van Kootena, 25 u Loonga a 18 u Crispima).

Reaktivace BK viru a vývoj BKV asociované nefropatie zřejmě nemá na produkci IL-17 žádný vliv (Sadeghi et al., 2009).

Interleukin-17, produkováný infiltrujícími T-buňkami, je tudíž s vysokou pravděpodobností jedním ze spouštěčů rejekce v ledvinném transplantátu. Působí na ledvinné epiteliální buňky, které po stimulaci produkují cytokiny a chemokiny, jež podporují vývoj zánětu a způsobují rejekci.

### 13. Použitá literatura

AFZALI, B.; LOMBARDI, G.; LECHLER, R. I.; LORD, G. M. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clinical and experimental immunology*. 2007, 148, 1, s. 32-46. ISSN 0009-9104.

BETTELLI, E.; KORN, T.; KUCHROO, V.K. Th 17: the third member of the effector T cell trilogy. *Current Opinion in Immunology*. 2007, 19, s. 652-657. ISSN 0952-7915

CRISPIM, J. C. O.; GRESPAN, R.; MARTELLI-PALOMINO, G.; RASSI, D. M.; COSTA, R. S.; SABER, L. T.; CUNHA, F. Q.; DONADI, E. A. Interleukin-17 and Kidney Allograft Outcome. *Transplantation proceedings*. 2009, 41, 5, s. 1562-1564. ISSN 0041-1345.

DE OLIVEIRA, J. G. G.; XAVIER, P. D. P.; SAMPAINO, S. M.; TAVARES, I. S.; MENDES, A. A. The synthesis by fine-needle aspiration biopsy cultures of IL-7, IL-16 and IL-18 is significantly associated with acute rejection in kidney transplants. *Nephron*. 2002, 92, 3, s. 622-628. ISSN 0028-2766.

HSIEH, H.-G.; LOONG, C.-C.; LIN, C.-Y. Interleukin-17 induces src/MAPK cascades activation in human renal epithelial cells. *Cytokine*. 2002, 19, 4, s. 159-174. ISSN 1043-4666.

HSIEH, H.-G.; LOONG, C.-C.; LUI, W.-Y.; CHEN, A.; LIN, C.-Y. IL-17 expression as a possible predictive parameter for subclinical renal allograft rejection. *Transplant international*. 2001, 14, 5, s. 287-298. ISSN 0934-0874.

KOENEN, H. J. P. M.; SMEETS, R. L.; VINK, P. M.; VAN RIJSSEN, E.; BOOTS, A. M. H.; JOOSTEN, I. Human CD25(high)Foxp3(pos) regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood*. 2008, 112, 6, s. 2340-2352. ISSN 0006-4971.

LOONG, C.-C.; HSIEH, H.-G.; LUI, W.-Y.; CHEN, A.; LIN, C.-Y. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. *The Journal of pathology*. 2002, 197, 3, s. 322-332. ISSN 0022-3417.

LOONG, C.-C.; LIN, C.-Y.; LUI, W.-Y.. Expression of interleukin-17 as a predictive parameter in acute renal allograft rejection. *Transplantation proceedings*. 2000, 32, 7, s. 1773. ISSN 0041-1345.

MOSELEY, T.A.; HAUDENSCHILD, D.R.; ROSE, L; REDDI, A.H. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 2003, 14, 2, s. 155-174. ISSN 1359-6101.

SADEGHI, M.; DANIEL, V.; SCHNITZLER, P.; LAHDOU, I.; NAUJOKAT, C.; ZEIER, M; OPELZ, G. Urinary Proinflammatory Cytokine Response in Renal Transplant Recipients With Polyomavirus BK Viruria. *Transplantation*. 2009, 88, 9, s. 1109-1116. ISSN 0041-1337.



SAN SEGUNDO, D.; LÓPEZ-HOYOS, M.; FERNÁNDEZ-FRESNEDO, G.; BENITO, M. J.; RUIZ, J. C.; BENITO, A.; RODRIGO, E.; ARIAS, M. T(H)17 Versus Treg Cells in Renal Transplant Candidates : Effect of a Previous Transplant. *Transplantation proceedings*. 2008, 40, 9, s. 2885-2888. ISSN 0041-1345.

VAN KOOTEN, C.; BOONSTRA, J. G.; PAAPE, M. E.; FOSSIEZ, F., BANCHEREAU, J.; LEBECQUE, S.; BRUIJN, J. A.; DE FIJTER, J. W; VAN ES, L. A.; DAHA, M. R. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1998, 9, 8, s. 1526-1534. ISSN 1046-6673.

WANG, S.; JIANG, J.; GUAN, Q.; LAN, Z.; WANG, H.; NGUAN, C. Y. C.; JEVNIKAR, A. M.; DU, C. Reduction of Foxp3-expressing regulatory T cell infiltrates during the progression of renal allograft rejection in a mouse model. *Transplant immunology*. 2008, 19, 2, s. 93-102. ISSN 0966-3274.

WITOWSKI, J.; KSIAZEK, K.; JÖRRES, A. Interleukin-17 : a mediator of inflammatory responses. *Cellular and molecular life sciences*. 2004, 61, 5, s. 567-579. ISSN 1420-682X.

WOLTMAN, A. M.; DE HAIJ, S.; BOONSTRA, J. G.; GOBIN, S. J. P.; DAHA, M. R.; VAN KOOTEN, C. Interleukin-17 and CD40-ligand synergistically enhance cytokine and chemokine production by renal epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2000, 11, 11, s. 2044-2055. ISSN 1046-6673.

ZUBER, J.; BORODIN-SARTORIUS, A.; LAPIDUS, N.; PATEY, N.; TOSOLINI, M.; CANDON, S.; RABANT, M.; SNANOUDJ, R.; PANTERNE, C.; THERVET, E.; LEGENDRE, C.; CHATENOU, L. FOXP3-enriched infiltrates associated with better outcome in renal allografts with inflamed fibrosis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 2009, 24, 12, s. 3847-3854. ISSN 0931-0509.