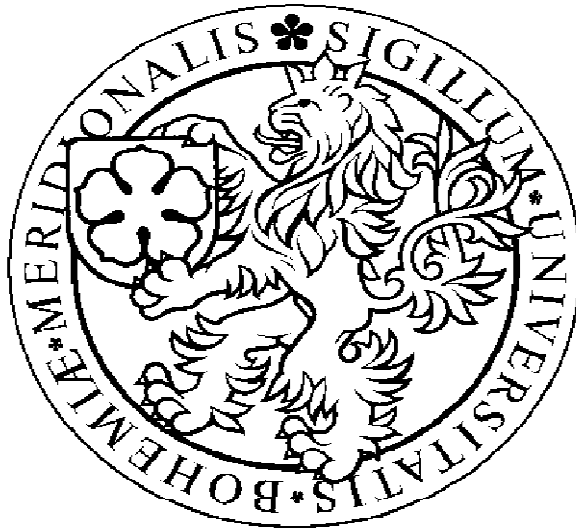


Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích



VLIV ETIOCHOLANOLONU NA PRODUKCI CYTOKINŮ
IZOLOVANÝMI LIDSKÝMI LYMFOCYTY

Bakalářská diplomová práce

Martina Jeníková

2008

Vedoucí práce: prof. RNDr. Ladislav Janský, DrSc.

Mgr. Jan Okrouhlík

Bakalářská diplomová práce

Jeníková M., 2008: Vliv etiocholanolonu na produkci cytokinů izolovanými lidskými lymfocyty. [Effect of etiocholanolone on cytokine production in human mononuclear cells. Bc. Thesis, in Czech.]- 36 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

In vitro production of cytokines (INF- γ , TNF- α , IL-1 β) by human peripheral blood mononuclear cells was studied after incubation with different concentrations of etiocholanolone.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne 25.3.2008

.....

Jeníková Martina

OBSAH

| | |
|---|----|
| 1 ÚVOD | 5 |
| 2 PŘEHLED PROBLEMATIKY | 6 |
| 2.1 Cytokiny..... | 6 |
| 2.1.1 Interleukin 1..... | 7 |
| 2.1.2 Tumor necrosis factor α | 8 |
| 2.1.3 Interferon γ | 8 |
| 2.1.4 Cytokiny jako endogenní pyrogeny..... | 9 |
| 2.2. Horečka a cytokiny..... | 10 |
| 2.2.1 Klasický model pro patogenezi horečky..... | 11 |
| 2.3. Steroidní látky..... | 12 |
| 2.3.1 Steroidy..... | 12 |
| 2.3.2 Steroidní hormony..... | 13 |
| 2.3.3 Androgeny..... | 13 |
| 2.3.4 Etiocholanolon..... | 14 |
| 2.3.5 Působení steroidních hormonů..... | 14 |
| 2.3.5.1 Genomické působení..... | 14 |
| 2.3.5.2 Negenomické působení..... | 15 |
| 2.3.6 Steroidní pyrogeny..... | 15 |
| 2.4. Cíl práce..... | 17 |
| 3 MATERIÁL A METODY | 18 |
| 3.1 Odběr krve..... | 18 |
| 3.2 Izolace mononukleárních buněk periferní krve..... | 18 |
| 3.3 Počítání PBMC..... | 19 |
| 3.4 Kultivace buněk..... | 19 |
| 3.5 Detekce cytokinové produkce..... | 20 |
| 3.6 Zpracování naměřených hodnot..... | 21 |
| 4 EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY | 22 |
| 5 DISKUZE | 26 |
| 6 ZÁVĚR | 28 |
| 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 29 |
| 8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY | 30 |

Ráda bych poděkovala svým školitelům prof. Ladislavu Janskému, DrSc. a Mgr. Janu Okrouhlíkovi za odborné vedení této práce. Také děkuji dobrovolníkům, kteří darovali krev. Děkuji všem, kteří mi pomáhali slovem i skutkem.

1 ÚVOD

Cytokiny jsou bílkovinné molekuly, které zprostředkovávají přenos dorozumívacích signálů mezi imunitním systémem a ostatními orgány v těle a regulaci imunitních reakcí. Dříve byly studovány hlavně jako endogenní mediátory horečky. Termíny „granulocytové nebo endogenní“ pyrogeny popisovaly látky s vlastnostmi vyvolávajícími horečku. Dnes víme, že pyrogenita je základní biologickou vlastností několika cytokinů (Dinarello, 1999).

Horečka je jeden z nejvíce se vyskytujících klinických příznaků v lidské patologii, zvláště během infekce. Když mikroorganismy napadnou hostitele a vstoupí do krevního řečiště, stimulované leukocyty a ostatní buněčné typy určují syntézu a uvolnění skupiny molekul, které mohou vyvolat horečku. Horečnatá odpověď je zprostředkována endogenními mediátory, běžně nazývanými endogenní pyrogeny. Studie ukázaly, že leukocyty stimulované bakteriálními produkty syntetizují proteinové mediátory cytokiny, z nichž některé mají pyrogenní vlastnosti. V klasickém modelu patogeneze je vyvolání horečky zprostředkováno uvolněním pyrogenních cytokinů jako je tumor necrosis factor (TNF), interleukin 1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) a interferony do krevního řečiště jako odpověď na exogenní pyrogeny. Tyto mediátory přes centrální nervový systém (CNS) indukují syntézu prostaglandinů, které koordinují odpovědi vedoucí k horečce (Netea et al., 2000).

2 PŘEHLED PROBLEMATIKY

2.1 CYTOKINY

Cytokiny jsou rozpustné glykoproteiny neimunoglobulinové povahy, které se uvolňují zejména z buněk imunitního systému a působí neenzymově ve velmi nízkých koncentracích (pikomoly/litr až nanomoly/litr) prostřednictvím specifických receptorů. Cytokiny tvoří třetí významnou skupinu rozpustných mezibuněčných signálních molekul vedle neurotransmiterů a endokrinních hormonů. Fyziologická důležitost cytokinů není o nic menší než ostatních tříd (Nathan et Sporn, 1991). Jejich základní úlohou je regulovat směr, rozsah a délku trvání imunitních reakcí. Dále modelují nebo remodelují tkáň během ontogenického vývoje jedince podle jeho genetického programu.

Jednotlivé cytokiny mohou mít pleiotropní účinky, tzn. že působí na několik různých druhů buněk, vzájemně se překrývající a zesilující nebo naopak protichůdné a vzájemně se potlačující účinky. Například dva cytokiny mohou mít synergické účinky a jejich účinek je potom větší než součet účinků jednotlivých cytokinů, nebo na sebe mohou působit antagonisticky, kdy účinek jednoho cytokinu inhibuje účinek druhého. Cytokiny působí autokrinně na buňku, která je sekretovala, parakrinně na sousední buňky nebo endokrinně navázáním na vzdálené buňky. Výsledek působení určitého cytokinu závisí na jeho koncentraci, typu buňky na niž působí, ale také na přítomnosti jiných cytokinů. Jednotlivé cytokiny takto vytvářejí cytokinovou síť, v níž aktivitu každého z nich ovlivňuje i menší nebo větší soubor cytokinů (Ferenčík et al., 2004). Cytokiny mohou také působit v kaskádě (jeden cytokin indukuje tvorbu druhého). Vazba cytokinu na buněčný receptor přenáší signál do buňky a vede k aktivaci a expresi genů.

Určitá nespecifita v působení cytokinů je nahrazena přísnou regulací exprese jejich receptorů na buňkách. Tyto receptory jsou často na buňce exprimovány až po její interakci s antigenem. Tak je nespecifická lymfocytová aktivace omezena na lymfocyty, které se setkaly s antigenem. Další mechanismus udržující specifitu je požadavek na vzájemný kontakt buněk, aby mohly vytvořit účinné koncentrace cytokinu (Hořejší et Bartůňková, 1998).

Cytokiny se dělí do několika skupin podle své funkce a typu buněk, které je uvolňují, nebo podle buněk na než působí. Interleukiny zajišťují komunikaci mezi leukocyty, lymfokiny jsou produkovány především leukocyty, tumor nekrotizující faktory dostaly název podle jejich prvně známé aktivity (mají přímý cytotoxický účinek na

nádorové buňky) stejně jako interferony (interference s virem) a faktory stimulující kolonie (Ferenčík et al., 2000).

2.1.1 Interleukin 1 (IL-1)

Jako interleukin 1 jsou označovány dva polypeptidy (IL-1 α a IL-1 β). IL-1 α a IL-1 β jsou z 26% homologní, mají stejnou velikost molekuly (15-17 kDa), ale liší se izoelektrickým bodem. Rozeznávají stejné povrchové buněčné receptory. Oba jsou kódovány nezávislými geny, které leží na chromozomu 2 (Dinarello, 1988). Patří do rodiny cytokinů známých jako interleukin-1 superfamily. Do této rodiny dále patří IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) (Dinarello, 1994; Eisenberg, 1991).

IL-1 je produkován řadou buněk jako jsou monocyty, makrofágy, NK buňky, fibroblasty, Langerhansovy buňky, dendritické buňky, B lymfocyty, neutrofilové, endotelové a epitelální buňky, buňky nervové tkáně (astrocyty a mikrogliaální buňky) a buňkami hladkého svalstva (Dinarello, 1991; Di Giovine et Duff, 1990).

Produkce těmito buňkami je možná pouze po jejich antigenní stimulaci, infekci, zánětu nebo zranění. Jako stimul může také sloužit například fagocytóza bakterií nebo endotoxiny (Dinarello, 1988).

Byl nazván endogenním pyrogenem pro svou schopnost vyvolávat hořčku (Atkins, 1960). *In vivo* způsobuje hypotenzi, úbytek hmotnosti a odpověď akutní fáze. Působí na nervový systém, vyvolává ospalost a nechutenství. Stimuluje imunitní systém buď přímou aktivací lymfocytů (T a B lymfocytů a NK buněk) nebo nepřímo indukcí syntézy molekul, které postupně aktivují lymfocyty. Dále stimuluje produkci cytokinů jako IL-2, IL-3, IL-6, interferonů a také sám sebe. Indukce IL-1 a IL-2 je způsobena imunitní odpovědí na antigen, zatímco stimulace interferonů je výsledkem antiproliferativních a protizánětlivých účinků (Dinarello, 1988). Indukuje produkci proteinů akutní fáze v hepatocytech (Ferenčík et al., 2000). Má pleiotropní účinky, které se projevují na fibroblastech, endoteliálních buňkách, keratinocytech, osteoklastech, chondrocytech, dendritických buňkách a neurálních buňkách (Nicola, 1994).

2.1.2 Tumor necrosis factor α (TNF- α)

Tumor necrosis factor je protein o molekulové hmotnosti 17 kDa, který leží na chromozomu 7 (Spriggs et al., 1992). TNF existuje ve dvou biologicky aktivních formách, jako TNF- α (kachetin) a TNF- β (lymfotoxin), které interagují se stejnými receptory (Smith et al., 1990).

TNF- α je produkován přirozenými cytotoxickými buňkami, hlavně makrofágy (Carswell et al., 1975; Männel et al., 1980), ale také dalšími typy buněk jako jsou například NK buňky (Degliantony et al., 1985; Paya et al., 1987) nebo T cytotoxické a T helper lymfocyty (Kobayashi et al., 1987), bazofily (Richards et al., 1988) a eosinofily (Cost et al., 1993).

Má několik léčebných úloh zahrnující imunostimulaci, rezistenci k infekčním agens a rezistenci k nádorům (Vilček et Lee, 1991). Na druhé straně parazitické, bakteriální a virové infekce mohou být více patogenní nebo fatální díky cirkulaci TNF. Má cytotoxické účinky na nádorové buňky (Carswell et al., 1975), které mohou být zvyšovány přítomností interferonů (Fiers, 1991). Hraje důležitou roli ve vývoji zánětlivé odpovědi (Permuter et al., 1986; Mortensen et al., 1988). Ve vysoké koncentraci může být pro hostitele toxický (Idriss et Naidsmith, 2000). Uplatňuje se při kachexii a šoku (Beutler et al., 1985), buněčné proliferaci (Sugarman et al., 1985), může indukovat nekrotickou a apoptotickou buněčnou smrt (Beyaert et Fiers, 1994). Je to endogenní pyrogen stejně jako IL-1 (Dinarello et al., 1986).

2.1.3 Interferon γ (INF- γ)

Interferon- γ (INF- γ) je homodimerický glykoprotein o molekulové hmotnosti 20-25 kDa. Gen pro lidský INF- γ leží na chromozomu 12 (Naylor et al., 1983). Původně byl popsán jako látka vznikající v buňkách po virové infekci, která interferuje s virem a brání jeho rozmnožování (Isaacs et Linderman, 1957).

Interferony se dělí do dvou tříd podle receptorové specifity a sekvenční homologie. Do třídy I se řadí INF- α , INF- β , INF- ω a INF- τ . INF- γ je jediný zástupce třídy II (Gray et Goeddel, 1982). Není strukturně příbuzný s interferony typu I, váže se na rozdílné receptory a je kódován samostatným chromozonovým lokusem.

Hlavní buněční producenti INF- γ jsou aktivované NK-buňky (Perussia, 1991), aktivované pomocné Th1 buňky (Mosmann et Coffman, 1989) a aktivované CD8⁺ cytotoxické buňky (Sad et al., 1995).

Je to typický lymfokin s významnými imunoregulačními, antivirovými a proti nádorovými vlastnostmi (Schroder et al., 2004). Působí jako makrofágy aktivující faktor (MAF) v oběhu (Schultz et Kleinschmidt, 1983). Jako MAF aktivuje množství funkcí makrofágů zahrnující nádorově buněčnou cytotoxicitu (Pace et al., 1983), antimikrobiální aktivitu (Nathan et al., 1983) a indukuje mechanismy schopné zabít intracelulární patogeny (Torrico et al., 1991). Také zvyšuje expresi MHC na makrofázích, T a B lymfocytech a na některých nádorových buněčných liniích (Ciampolillo et al., 1993). Navozuje proliferaci a zrání B-lymfocytů (Sidman et al., 1984). Vykazuje pyrogenní účinky u lidí a experimentálních zvířat (Leon, 2004).

2.1.4 Cytokiny jako endogenní pyrogeny

Cytokiny jsou pleiotropní molekuly zprostředkující několik patologických procesů. Jsou to mezibuněčné signální proteiny, které jsou produkovány hlavně imunokompetentními buňkami. Jejich hlavní funkce je regulace a koordinace imunitních odpovědí. Dříve než byly objeveny jako růstové faktory nebo stimulanty kostní dřeně byly studovány jako endogenní mediátory horečky. Pyrogenita je základní vlastností několika cytokinů. Typické endogenní pyrogeny jsou IL-1 (IL-1 α i IL-1 β), TNF- α , IL-6 a INF- γ (Conti et al., 2004; Dinarello, 1999; Mackowiak, 1998).

Zvyšující se hladina IL-1 β v plazmě a mozkomíšní tekutině, která následuje po periferní aplikaci LPS (Virta et al., 2002), terpentýnu (Moldawer et al., 1987) a zymogenu (Lyte, 1986) vede k horečce. Injekční aplikace IL-1 β přivodí horečku u hlodavců (Avitsur et al., 1997), králíků (Murakami et al., 1990) a lidí (Nemunaitis et al., 1994).

Role TNF v indukci horečky není zcela jasná, vykazuje jak pyrogenní tak antipyretické účinky. Jeho injekční aplikace způsobuje horečku u myší (Sundgren-Anderson et al., 1998), králíků (Hashimoto et al., 1994), morčat (Goldblach et al., 1997) a lidí (Michie et al., 1988).

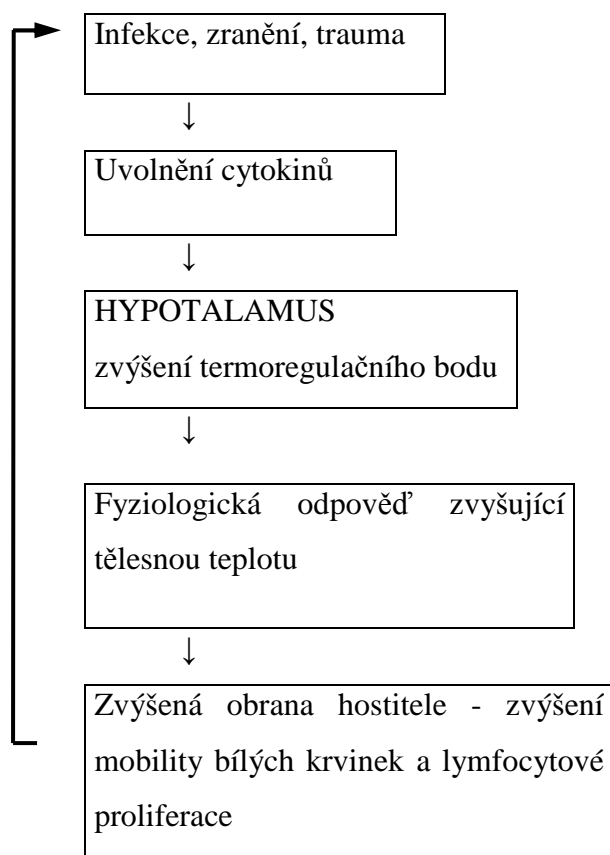
Bylo prokázáno, že intravenózní aplikace INF- γ indukuje horečku u experimentálních zvířat a lidí (Leon, 2004).

2.2 HOREČKA A CYTOKINY

Horečka byla definována jako stav zvýšené tělesné teploty, která je často, ale ne nezbytně, součástí obranné odpovědi mnohobuněčných organismů (hostitelů) na živé nebo neživé látky, které jsou hostitelem rozpoznány jako patogenní nebo cizí. Mohou to být například bakterie, viry nebo mikrobiální houby. Horečnatá odpověď je komplex fyziologických reakcí, zahrnující zvýšení tělesné teploty zprostředkované cytokiny a aktivaci fyziologických, endokrinologických a imunologických systémů (Mackowiak, 1998).

Horečka je jeden z nejlepších příkladů interakce mezi centrálním nervovým systémem a imunitním systémem. Kontakt s patogenem, zranění tkáně nebo trauma způsobí uvolnění cytokinů z různých buněk. Tyto cytokiny pak uplatní svůj účinek na četné součásti specifické a nespecifické imunity (Kluger et al., 1995). Horečka je regulována centrálními termoregulačními mechanismy lokalizovanými v hypotalamu (Conti et al., 2004).

Zahájení horečky



Obrázek 1 Horečka je zahájena infekcí, zraněním nebo traumatem. To způsobí uvolnění cytokinů, které působí na zvýšení termoregulačního bodu v hypotalamu a zvýší tak tělesnou teplotu a obranné mechanismy hostitele. Zvýšení obrany vyvolá zpětnou vazbu, která redukuje stimul, který zahájil pyrogenézi (např. snižuje infekci nebo zvyšuje opravu tkání).

2.2.1 Klasický model pro patogenezi horečky

Prvotní krok v kaskádě vedoucí k horečce je stimulace leukocytů různými exogenními stimuly nazývanými exogenní pyrogeny. Tyto stimuly jsou prezentovány hlavně bakteriálními produkty, toxiny nebo mikroby samotnými. Různé bakteriální produkty uvolňované během infekce také potencionálně indukují produkci cytokinů horečku. Je to například lipopolysacharid (LPS), který je součástí gram negativních bakterií (Cannon et al., 1989), peptidoglykany a jejich muramyl peptidové deriváty (Johannsen et al., 1991; 1990), bakteriální toxiny jako enterotoxin *Staphylococcus aureus* (Luheshi et Rothwell, 1996) nebo virové komponenty jako dvouvláknenná RNA (Freeman

et al., 1977). Stimulace buněk imunitního systému, zvláště monocytů/makrofágů a neutrofilů, různými exogenními pyrogeny vede k syntéze zánětlivých mediátorů, které působí jako endogenní pyrogeny pro stimulaci horečky (Dinarello, 1999). Endogenní pyrogeny uvolněné do krevního oběhu jsou transportovány do cév mozku aktivním transportem přes krevní mozkovou bariéru (Banks et al., 1989) nebo pasivním transportem skrz kapiláry v cirkumventrikulárních orgánech (Katsura et al., 1990) a dosáhnou tak centrální nervové soustavy. V této úrovni endogenní pyrogeny uvolňují prostaglandiny, zvláště prostaglandin třídy E₂ (PGE₂), který zprostředkovává zvýšení teploty (Saper et Breder, 1994).

2.3 STEROIDNÍ LÁTKY

Chemicky patří steroidní látky do skupiny isoprenů. Je to velmi rozsáhlá a pestrá skupina přírodních látek povahy tzv. sekundárních metabolitů. Zástupci této skupiny jsou přítomni téměř v každé živé buňce. Jsou vyráběny z „aktivního“ isoprenu, isopentenyl difosfátu. Je známo přes 5000 přírodních isoprenoidů, které se dělí podle počtu pětiuhlíkatých stavebních jednotek na mono- až polyterpeny (Vodrážka, 1996).

2.3.1 Steroidy

Nejdůležitější a nejrozšířenější skupinu isoprenoidů tvoří steroidy. Jsou odvozeny od nenasyceného tetracyklického uhlovodíku steranu. Patří mezi ně látky jak živočišného, tak rostlinného původu a dovedou je vytvářet i primitivní organismy jako jsou kvasinky, plísně nebo bakterie. Jsou mezi nimi regulátory životních procesů, nezbytné součásti buněčných membrán, emulgátory v procesu trávení a obranné látky některých živočichů. Lze mezi nimi nalézt i látky vysoce toxické, ale i nenahraditelná léčiva (Vodrážka, 1996).

2.3.2 Steroidní hormony

Steroidní hormony jsou široce rozšířené signály pro mezibuněčnou komunikaci. Upravují různé buněčné funkce a jsou nezbytné pro vývoj a homeostázu. Jsou to látky lypofilního charakteru, které snadno prostupují membránou a vstupují do cytosolu. Jejich účinek uvnitř buňky je zprostředkován interakcí se specifickým receptorem, který má vysokou afinitu k odpovídajícímu hormonu a schopnost rozlišit mezi blízce souvisejícími ligandy. Receptory pro hormony jsou ligand-aktivované transkripční modulátory, které se ve většině případů vážou na neúplné palindromické sekvence na DNA, tzv. elementy hormonové odezvy (HRE) (Beato et al., 1996).

Steroidní hormony se rozdělují do dvou skupin podle místa vzniku na adrenokortikoidní hormony, které jsou vylučovány kůrou nadledvin po stimulaci peptidovým hormonem ACTH (adrenokortikotropní hormon) a na gonadální hormony (pohlavní hormony).

Adrenokortikoidní hormony se dále dělí na dvě funkčně odlišné skupiny: glukokortikoidy (např. kortisol a kortikosteron) a mineralokortikoidy (např. aldosteron). Glukokortikoidy regulují metabolismus sacharidů, brzdí proteosyntézu a podporují degradaci bílkovin. Mineralokortikoidy kontrolují metabolismus minerálních látek (zadržování iontů Na^+ , Cl^- a HCO_3^- v ledvinách a vylučování K^+).

Pohlavní hormony se dělí na samičí a samčí. V samičím organismu se tvoří dvě odlišné skupiny hormonů, a to estrogeny a gestageny. Samčí organismus produkuje androgeny.

Prekurzorem pro vznik všech steroidních hormonů je cholesterol. Steroidní hormony vznikají podle schématu : cholesterol \rightarrow pregnenolon \rightarrow gestageny z nichž pak vznikají glukokortikoidy, mineralokortikoidy, androgeny a estrogeny (Vodrážka, 1996).

2.3.3 Androgeny

Samčí pohlavní hormony jsou rozhodující pro růst a udržování prostatických buněk. Jsou produkovány skrze endokrinní cestu zahrnující hypotalamus, hypofýzu, varlata a žlázy nadledvinek. Nejhojnějším androgenem je testosteron. Je uvolňován do krevního oběhu a posléze proniká do různých buněk, kde z něj konverzací vzniká více aktivní androgen, 5α -dihydrotestosteron (Santos et al., 2004). Androgeny, jako je

testosteron, jsou také zapotřebí ke zrání spermatu a také stimulují anabolické procesy, jako je výroba bílkovin (Vodrážka, 1996).

2.3.4 Etiocholanolon

Etiocholanolon (5β -androstan- 3α -ol-17-on) je steroidní metabolit mužského pohlavního hormonu testosteronu (dále je metabolitem δ -4-androsten-3,17-dionu nebo dehydroepiandrosteronu) stejně jako androsteron. Oba se běžně vyskytují v moči jako 11-doxy-17-ketosteroidy obvykle vázané na glukuronovou kyselinu. Etiocholanolonu je močí vylučováno poněkud více než androsteronu. Etiocholanolon a androsteron jsou stereoisomery. Androsteron má konfiguraci 5-alfa (A:B hydroxy trans) a etiocholanolon 5-beta (A:B hydroxy cis). Ačkoliv je etiocholanolon odvozen od androgenů nemá žádnou hormonální aktivitu (Wolf et al., 1967). Intramuskulární injekční podání etiocholanolonu vyvolává u člověka horečku, je tedy exogenním pyrogenem (Kappas et al., 1957). Aby měl etiocholanolon pyrogenní účinky nesmí být vázaný. Pyrogenní účinky se vyskytují pouze u lidských příjemců. Horečka vyvolaná etiocholanolonem může být potlačena acetyl salicylovou kyselinou nebo úplně zrušena kortisolem (ovšem pouze pokud jsou látky podány současně) (Wolf et al., 1967). Snadněji vyvolává horečku u mužů než u žen (Dillard et Bodel, 1970). Účinná koncentrace etiocholanolonu je 30 μ g/ml (Bodel et Dillard, 1968).

2.3.5 Působení steroidních hormonů

2.3.5.1 Genomické působení

Podle klasické teorie genomického působení se steroidní hormony vážou ke specifickým intrabuněčným receptorům, které fungují jako ligand-dependentní transkripční faktory a uplatňují pozitivní nebo negativní účinek na expresi cílových genů (tzn. že aktivují nebo potlačují expresi cílových genů). Tato cesta je charakteristická pro specifický zpožděný účinek hormonů a pro citlivost k inhibitorům transkripce a translace. Intrabuněčné steroidní receptory se skládají z ligand-vázací domény, DNA-vázací domény a několika transaktivačních funkcí šířících se podél molekuly (Falkenstein et al.,

2000). DNA-vázající doména se skládá z dvou iontů zinku a dovoluje receptorům se vázat na palindromické sekvence DNA, nazývané elementy hormonové odezvy (HRE).

K regulaci genové exprese dochází díky tomu, že receptory rozpoznají neúplné palindromické sekvence na DNA, tzv. HRE (Beato et al., 1996). Transkripce je iniciována spojením se základním transkripčním komplexem, různými koaktivátory, represory a transkripčními regulátory. Ligand-dependentní modulace transkripce ligand-receptorovým komplexem byla nazvána „genomická“ a je citlivá k inhibitorům transkripce a translace. Exprese genů indukovaných steroidy je modulována hladinou proteinů několik hodin po stimulaci steroidem (Falkenstein et al., 2000).

2.3.5.2 Negenomické působení

Na rozdíl od působení genomického, negenomické účinky steroidů jsou charakterizovány hlavně jejich necitlivostí k inhibitorům transkripce a syntéze proteinů. Mají rychlý nástup účinku (několik sekund až minut). Tento rychlý účinek je pravděpodobně zprostředkován přes receptory s rozdílnými farmakologickými vlastnostmi od intrabuněčných receptorů (Falkenstein et al., 2000).

2.3.6 Steriodní pyrogeny

Bylo zjištěno, že jisté steroidy C₁₉ a C₂₁ s 3 α -hydroxy-5 β konfigurací vyvolávají horečku (mají pyrogenní účinky) (Kappas et al., 1959). Pyrogenní aktivita různých steroidů souvisí s jejich strukturálními znaky a je závislá na 5 β konfiguraci (Kappas, 1960;1957). Svojí pyrogenní aktivitu ztrácí, když je 3-hydroxylová skupina esterifikována nebo navázána. Snížení pyrogenity nastává při konvertaci z 3- α -hydroxyl na 3- β -hydroxyl nebo keton, nebo přidáním hydroxylu na 17- α či 11- β pozici. Protože se přirozené pyrogenní steroidy běžně objevují v plasmě nebo moči hlavně v esterifikované formě, je jejich potencionální pyrogenní účinek normálně blokován (Bondy et al., 1965).

Mají několik neobvyklých vlastností. Ačkoliv ochotně způsobí horečku po intramuskulární aplikaci, tohoto výsledku je mnohem těžší dosáhnout, jsou-li podány intravenózně (Glickman et al., 1964). Steroidy nezpůsobují horečku jsou-li aplikovány rychle intravenózně, pokud je prodloužena doba podání pyrogenu, horečka se často objeví, ale tento výsledek není tak předvídatelný jako u intramuskulárního podání. Pyrogenní reakce způsobená steroidy je rozdílná od reakcí způsobených ostatními

pyrogeny. Na rozdíl od bakteriálních pyrogenů jejichž účinek se objeví zhruba půl hodiny po aplikaci, steroidní pyrogeny mají obvykle latentní periodu 4-6 hodin (Kappas et al., 1959). Navíc bakteriální pyrogeny jsou účinné u více druhů živočichů, zatímco jediný známý druh náchylný k pyrogenním účinkům steroidů je člověk (Kappas et al., 1960). Pyrogenní účinek steroidů může být blokován systémovým nebo lokálním řízením protizánětlivých kortikosteroidů (Kappas et al., 1957; 1963).

Jedním z těchto steroidních pyrogenů je metabolit mužského pohlavního hormonu testosteronu, etiocholanolon. Bylo zjištěno, že etiocholanolon po intramuskulární aplikaci vyvolává horečku (Kappas et al., 1957).

2.4 CÍL PRÁCE

Steroidní látky jsou různorodá skupina do které patří steroidní hormony. Bylo prokázáno, že některé steroidní hormony mají pyretické účinky (tj. vyvolávají horečku) a naopak některé mají antipyretické účinky (tj. potlačují horečku). Cílem této práce bylo sledovat na mononukleárních buňkách lidské periferní krve účinek etiocholanolonu na produkci cytokinů a zjistit zda se účinek této látky realizuje v rozvoji horečky nepřímo přes zvýšenou produkci cytokinů v izolovaných lidských lymfocytech.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Odběr krve

Bylo odebíráno 12 ml venózní krve z předloktí od zdravých, poučených, dobrovolných dárců (žen ve věku 20-25 let). Odběr provedla kvalifikovaná zdravotní sestra. Krev byla odebírána do vakuovaných heparizovaných zkumavek po 9 ml (Vacuette, Greiner Laborortechnik, Austria).

3.2 Izolace mononukleárních buněk periferní krve (PBMC)

PBMC byly izolovány metodou hustotní gradientové centrifugace na roztoku Ficoll-Paque (Boyum, 1968).

Ve dvou sterilních zkumavkách o objemu 15 ml (Gama Group a.s., České Budějovice) bylo 6 ml nesrážlivé krve naředěno s 6 ml Hanksova roztoku (lékárna VFN, Praha) a jemně promícháno.

Do dalších 4 sterilních zkumavek byly napipetovány 3 ml roztoku Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Na roztok Ficoll-Paque bylo opatrně navrstveno 6 ml naředěné krve tak, aby nedošlo ke vzájemnému promíchání roztoků. Navrstvená krev byla dále centrifugována 40 minut při pokojové teplotě a 1200 otáčkách za minutu na centrifuze Universal 16 (Hettich Zentrifugen, Denmark, rotor 1624). Po centrifugaci se uprostřed zkumavky utvořil mléčně bílý prstenec mononukleárních buněk, lymfocytů a monocytů (na dně zkumavky usazené erytrocyty, svrchní vrstva plazma). Plazma byla bez zvíření odsáta a prstenec mononukleárních buněk byl napipetován sterilní špičkou do sterilní zkumavky, kde byl doplněn 10 ml Hanksova roztoku, zcentrifugován 10 minut při 1200 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byly PBMC usazené na dně zkumavky a supernatant byl odstraněn. PBMC byly tímto způsobem dvakrát promyty. Promytím došlo k odstranění trombocytů, sérových proteinů a granulocytů. Supernatant byl slit, mononukleární buňky byly přeneseny do čisté zkumavky a rozsuspendovány.

Použité roztoky byly skladovány v lednici a před použitím vytemperovány na pokojovou teplotu 18-25°C. Izolace PBMC byla prováděna asepticky ve flow boxu (Jouan MSC 12).

3.3 Počítání PBMC

Mononukleární buňky byly zvýrazněny trypanovou modří v poměru 1:10 (k 10 µl vzorku bylo přidáno 90 µl 0,5% roztoku trypanové modři) a počítány v Bürkerově komůrce podle vzorce:

$$\text{Počet buněk v 25 polích} \times 10_{(\text{ředění})} \times 10^4_{(\text{objem})} = \text{počet PBMC v 1 ml.}$$

3.4 Kultivace buněk

Vyizolované a promyté PBMC byly inkubovány na mikrotitrační destičce v médiu RPMI-1640 obohaceného o penicilin, streptomycin, L-glutamin (Bio Whittaker, A Cambrex Company, Maryland) a o 10% tepelně inaktivovaného fetálního telecího séra (BOFES). Buňky byly rozpipetovány do jednotlivých jamek tak, aby byl jejich počet v každé jamce 10^6 . Každá jamka byla doplněna kultivačním médiem na objem 200 µl. Do jamek byly přidány různé koncentrace etiocholanolonu. Byly použity tyto konečné koncentrace: 120 µg/ml; 30 µg/ml; 7,5 µg/ml; 1,9 µg/ml a 0,47 µg/ml (účinná koncentrace etiocholanolonu je 30 µg/ml- Bodel a Dillard, 1968). Nejprve byl namíchán zásobní roztok etiocholanolonu. Práškový etiocholanolon byl rozpuštěn ve 2 dílech 60% methanolu a poté byl přidán 1 díl vody. Jako kontrola byly použity buňky v kultivačním médiu s methanolem bez přídavku etiocholanolonu o koncentraci, která odpovídala koncentraci 30 µg/ml s etiocholanolonem. Inkubace vzorků probíhala v inkubačním termostatu (MCO-17 AIC, Scholler Instruments, Praha) při konstantní teplotě 37°C a 3,5% CO₂ v atmosféře. Vzorky z inkubačních buněk byly odebírány v čase 18 hodin a ihned byly provedena detekce cytokinové produkce (poločas rozpadu steroidních hormonů se pohybuje v hodinách až desítkách hodin a jejich účinek se dostaví po delší době, proto byla zvolena doba inkubace 18 hodin).

3.5 Detekce cytokinové produkce

V této práci byly stanovovány cytokiny IL-1 β , TNF- α a INF- γ . Pro stanovení těchto cytokinů byly použity imunoenzymatické kity (Bender MedSystems, Austria). Množství cytokinů ve vzorku bylo stanoveno kvantitativně pomocí metody ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) podle návodu poskytnutého výrobcem. Jednotlivé kity byly skladovány v lednici při 4°C a před použitím vytemperovány na pokojovou teplotu.

Jamky s navázanou primární monoklonální protilátkou byly nejprve dvakrát promyty 300 μ l promývacího pufru. Do jamek bylo napipetováno 50 μ l standardů a 50 μ l vzorků, k nim bylo přidáno 50 μ l pufru a 50 μ l biotin-konjugátu (sekundární protilátka proti danému cytokinu s navázaným biotinem). Takto připravené vzorky byly inkubovány 2 hodiny při pokojové teplotě 18-25°C na třepačce (100 otáček za minutu).

Po inkubaci byly jamky třikrát (v případě TNF α čtyřikrát) promyty 300 μ l promývacího pufru, čímž byl odstraněn nenavázaný materiál. Poté bylo do jamek napipetováno 100 μ l streptavidinu-HRP. Streptavidin má vysokou afinitu k biotinu a zároveň je na něj navázán enzym křenová peroxidáza (HRP). Vzorky byly opět inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě 18-25°C na třepačce (100 otáček za minutu).

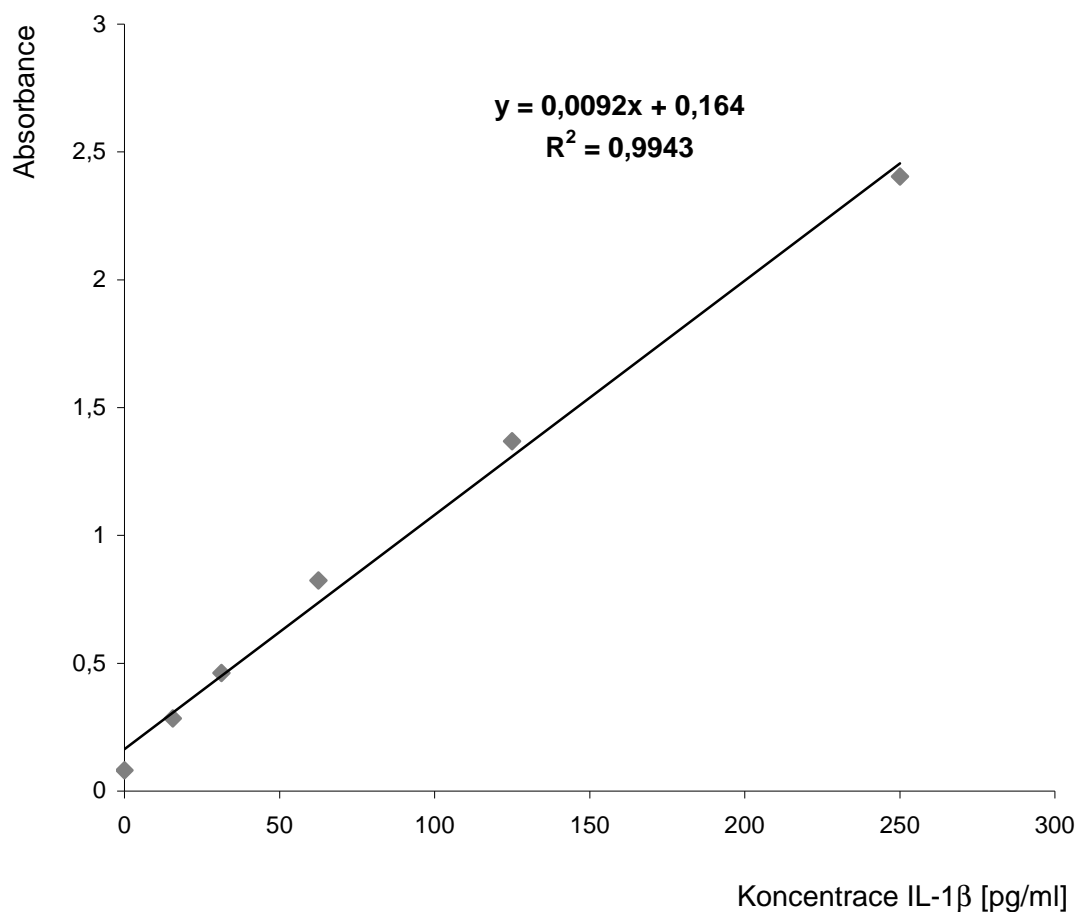
Nenavázaný streptavidin byl odstraněn třikrát (u TNF- α čtyřikrát) opakovaným promytím 300 μ l promývacího roztoku. Navázaný enzym byl měřen chromogenní reakcí pomocí chromogenního roztoku (3,3',5,5'-tetramethyl benzidin + peroxid vodíku), kterého bylo do každé jamky napipetováno 100 μ l. Vzorky byly inkubovány 10-20 minut na třepačce za vyloučení přímého světla. Chromogenní enzymatická reakce byla ukončena přidáním 100 μ l stopovacího roztoku (kyselina fosforečná). Absorbance v jednotlivých jamkách byla změřena na spektrofotometru (Tecan, typ Sunrise, č. F0393, Austria) při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce 620 nm. Získaná data byla zpracována pomocí počítačového softwaru KIM (Immunochemical Methods for Windows, Daniel Kittrich, 2000).

3.6 Zpracování naměřených hodnot

Vzorky byly stanovovány jednotlivě. Koncentrace cytokinů ve vzorcích byla stanovena ze standardní kalibrační křivky, která byla získána ze série ředění rekombinantních lidských cytokinů. Výsledné hodnoty v grafech ukazují průměrné hodnoty z jednotlivých stanovení koncentrací cytokinů v časovém intervalu 18 hodin, přepočtené na produkci jednotlivých cytokinů v $\text{pg}/10^6$ PBMC. Statistické hodnocení experimentů bylo prováděno v programu Statistica 5.5. analýzou variance (ANOVA test) a Wilcoxon Matched Pair testem. IL-1 a TNF- α byly vyhodnocovány analýzou variance. INF- γ byl hodnocen neparametrickým testem (Wilcoxon Matched Pair test) kvůli nenormálnímu rozložení dat a velké variabilitě jedinců. Jednotlivá data byla vždy porovnávána s kontrolou.

4 EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY

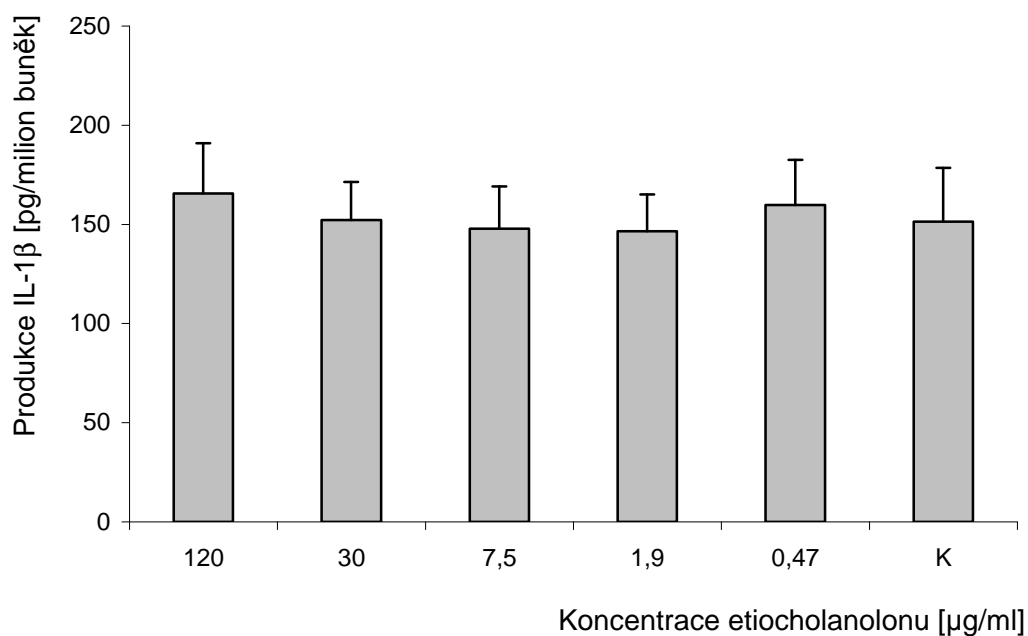
Experimentální výsledky byly získány měřením produkce cytokinů IL-1 β , TNF- α a INF- γ . Vyizolované lidské PBMC byly inkubovány *in vitro* v kultivačním médiu RPMI-1640 s 10% přidavkem inaktivovaného BOFES a antibiotik a různými koncentracemi etiocholanolonu při *in vivo* podmínkách. Koncentrace cytokinů v jednotlivých vzorcích byly stanovovány metodou ELISA po kalibraci metody vzorky o známé koncentraci sledovaného cytokinu. Ukázkovou kalibrační přímkou stanovení IL-1 β ukazuje Obr. 2.



Obrázek 2 Kalibrační křivka IL-1 beta

Produkce IL-1 β

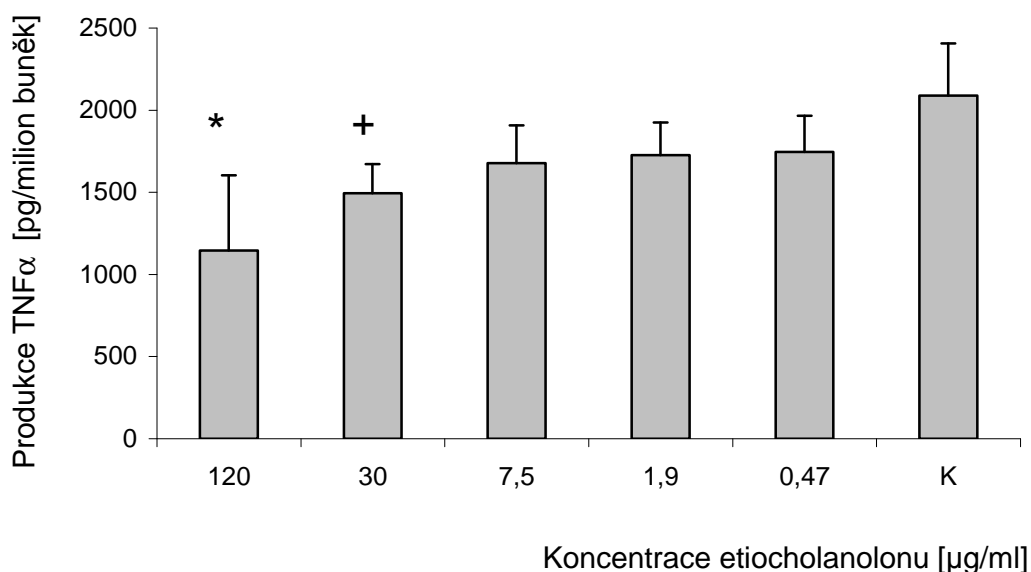
Měření produkce IL-1 β bylo provedeno z krve dvou dárců. U každého dárce byly provedeny 2 měření pro každou koncentraci. Průměry všech 4 měření byly vyneseny do grafu (Obr. 3). Kontrolní hodnota nestimulovaných PBMC dosahovala 151 pg/10⁶ buněk. Produkce stimulovaných PBMC měla hodnoty koncentrací v rozmezí od 146,5 do 166,5 pg/10⁶ buněk. Předpoklady ANOVY byly splněny. Rozdíly mezi jednotlivými hodnotami vztahujícími se k jednotlivým koncentracím etiocholanolonu nejsou statisticky signifikantní.



Obrázek 3 Produkce IL-1 β lidskými PBMC stimulovanými různými koncentracemi etiocholanolonu. K = kontrola. n = 4.

Produkce TNF- α

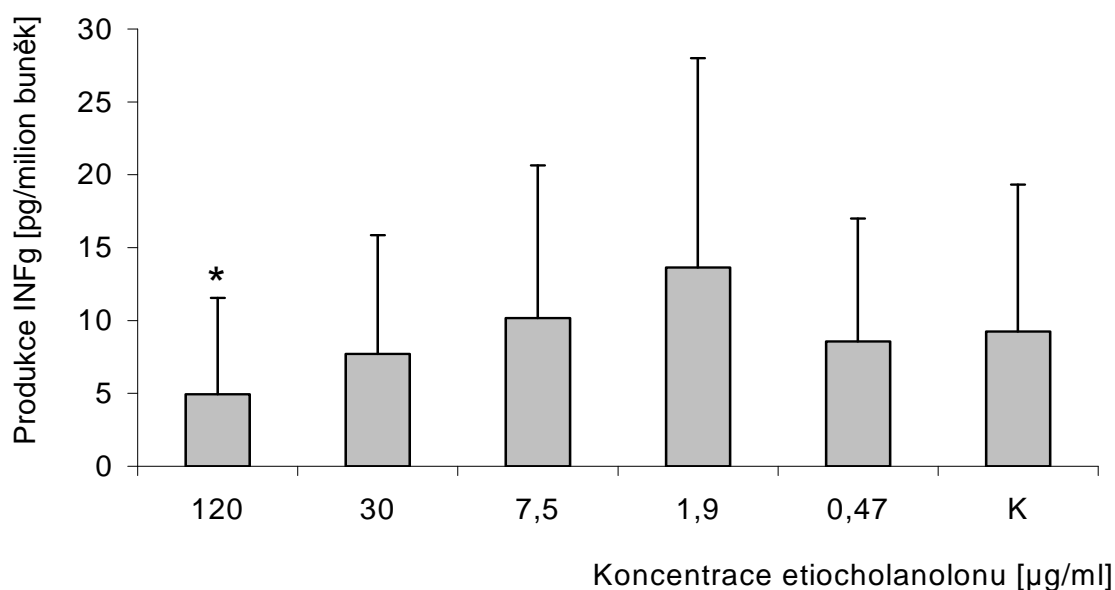
I zde bylo provedeno měření z krve dvou dárců. U každého dárce byly provedeny 2 měření pro každou koncentraci. Průměry všech 4 měření byly vyneseny do grafu (Obr. 4). Kontrolní hodnota nestimulovaných PBMC byla 2089 pg/10⁶ buněk. Hodnoty koncentrací TNF- α stimulovanými PBMC se pohybovaly od 1146 do 1745 pg/10⁶ buněk. Statistické porovnání souboru dat (ANOVA) vyšlo průkazně (df = 5; p = 0,0057). Předpoklady ANOVY byly splněny. Zpětným dohledáním průkazných dat POST HOC testem (jednostranným Tukey HSD test), kde byla porovnáována jednotlivá data s kontrolou, vyšly signifikantní výsledky pouze u koncentrace etiocholanolonu 120 μ g/ml na 1% hladině významnosti a u koncentrace 30 μ g/ml na 5% hladině významnosti. Ostatní porovnané koncentrace neměly statisticky významné rozdíly. V tomto případě s rostoucí koncentrací etiocholanolonu klesá produkce TNF- α .



Obrázek 4 Produkce TNF- α lidskými PBMC stimulovanými různými koncentracemi etiocholanolonu. K = kontrola. * p < 0,002; + p < 0,05. n = 4.

Produkce INF- γ

Měření bylo provedeno z krve pěti dárců. U každého dárce byly provedeny 2 měření, kromě dárce 5, u kterého byly provedeny 4 měření. Ve sloupcích je vynesena průměr všech měření (Obr. 5). Kontrolní hodnota byla 9 pg/10⁶ buněk. Hodnoty koncentrací INF- γ stimulovanými PBMC se pohybovaly v rozmezí 5-13,5 pg/10⁶ buněk. Data byla statisticky vyhodnocena Wilcoxon Matched Pair testem kvůli jejich nenormálnímu rozložení a také kvůli velké variabilitě jedinců. Jednotlivá data byla porovnávána s kontrolou. Zde vyšla statisticky významná pouze koncentrace etiocholanolonu 120 μ g/ml proti kontrole. Stejně jako u TNF- α etiocholanolon snižuje produkci INF- γ . Ostatní rozdíly mezi jednotlivými hodnotami vztahujícími se k jednotlivým koncentracím etiocholanolonu nejsou statisticky signifikantní.



Obrázek 5 Produkce INF- γ lidskými PBMC stimulovanými různými koncentracemi etiocholanolonu. K = kontrola. * p = 0,017. n = 5.

5 DISKUZE

Tato práce byla zaměřena na prokázání pyrogenního účinku etiocholanolonu prostřednictvím zvýšené produkce cytokinů IL-1 β , TNF- α a INF- γ na modelu lidských PBMC. Cytokiny se v krvi zdravých jedinců vyskytují v minimálním množství (IL-1: 0-5 pg/ml, TNF- α : 0-20 pg/ml, INF- γ : 0-2 pg/ml) (Ullum et al., 1994; Suzuki et al., 2000). Zvýšená produkce cytokinů nastává při patologických situacích. Tyto patologické situace mohou vyvolat různé stimuly např. napadení organismu mikroby, různé bakteriální produkty nebo toxiny (Netea et al., 2000). Existuje mnoho studií zabývajících se touto problematikou. My jsme se zabývali etiocholanolonem, jako na stimulem, jež vyvolává horečku. Naším cílem bylo zjistit, zda etiocholanolon způsobuje horečku přes zvýšenou produkci námi měřených cytokinů (IL-1 β , TNF- α a INF- γ).

Etiocholanolon je přirozeně se vyskytující steroid, který je konečným produktem metabolismu androgenů. Nemá žádnou hormonální aktivitu. Bylo zjištěno, že etiocholanolon a některé další podobné steroidy mohou mít pyrogenní účinky. (Bodel et Dillard, 1968). Etiocholanolon vyvolává horečku pouze u lidských příjemců (Wolf et al., 1967). Také byl zjištěn účinek několika steroidů (5 β -redukované C₁₉) v produkci tepla, tzv. termogenezi. Termogenní účinek těchto steroidů byl prokázán díky uvolnění interleukinu-1 a ostatních zánětlivých cytokinů (Janský et al., 2006).

První zmínka o pyrogenních účincích etiocholanolonu byla v roce 1956, kdy bylo zjištěno, že injekční aplikace etiocholanolonu vyvolává horečku u člověka (Kappas et al., 1956). Tento objev byl potvrzen několika následnými studiemi (Kappas et al., 1957; 1958; 1959; 1960). Intramuskulární injekční aplikace etiocholanolonu vyvolává u člověka horečnatou odpověď (Wolf et al., 1967). V dalších pracích byly vyizolovány lidské lymfocyty a inkubovány s etiocholanolonem. Poté byly injekčně vpraveny do experimentálních zvířat většinou králíků, jimž byl měřen procentuální nárůst horečky. V těchto studiích byla účinná koncentrace etiocholanolonu stanovena na 30 μ g/ml, když byla koncentrace etiocholanolonu 10 μ g/ml byla zjištěna velmi malá nebo žádná horečnatá odpověď (Bodel et Dillard, 1968; 1970). Z těchto studií jsme vycházeli při určování koncentrací vhodných pro naše pokusy.

Autoři zabývající se touto otázkou však nezjišťovali, zda se pyrogenní účinek etiocholanolonu uplatňuje přes cytokinovou produkci. Proto se dají výsledky jen těžko porovnávat.

Na produkci IL-1 β nemá etiocholanolon žádný prokazatelný vliv (nezvyšuje ani nesnižuje jeho produkci). Výsledky ukazují, že etiocholanolon potlačuje produkci TNF- α a INF- γ u koncentrace etiocholanolonu 120 $\mu\text{g/ml}$ v porovnání s kontrolou. U TNF- α potlačuje etiocholanolon jeho produkci i v koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$ proti kontrole. Tyto výsledky mohly být způsobeny imunosupresivními vlastnostmi glukokortikoidů na imunokompetentní buňky (lymfocyty), které vylučují cytokiny (Vodrážka, 1996). Tento faktor může mít za následek sníženou produkci těchto cytokinů (TNF- α , INF- γ) díky potlačení imunitní aktivity lymfocytů, které je sekretují. Navíc jsou oba tyto cytokiny (TNF- α , INF- γ) součástí zánětlivé odpovědi, což může mít na výsledku také jistý podíl.

U INF- γ byly výsledky čtyř stanovení jednoho dárce značně odlišné od výsledků ostatních dárců (produkce INF- γ byla podstatně vyšší než u ostatních dárců), proto byl INF- γ hodnocen neparametrickým testem (Wilcoxon Matched Pair test). Tato odlišnost mohla být způsobena zdravotním stavem dárce (nástup nebo dozvuk virového onemocnění, např. chřipky).

Výsledek měření INF- γ mohl být ovlivněn nevhodným zvolením dárců. Je také možné, že methanol, v němž byl etiocholanolon rozpuštěn mohl mít vliv na konečné výsledky. Tuto teorii by bylo možné potvrdit či vyvrátit pokud bychom prováděli i měření kontrol bez methanolu.

Naše výsledky nepotvrzují pyrogenní účinek etiocholanolonu přes zvýšenou produkci námi měřených cytokinů. Je možné, že působí přes jiný pyrogenní cytokin, který jsme neměřili, a to např. IL-6.

6 ZÁVĚR

Na modelu mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) byl studován vliv etiocholanolonu na produkci cytokinů IL-1 β , TNF- α a INF- γ . Nebylo prokázáno, že by tato látka měla účinek na zvýšenou produkci sledovaných cytokinů. Naopak se podařilo prokázat, že etiocholanolon v koncentraci 120 $\mu\text{g/ml}$ snižuje produkci TNF- α a INF- γ . Můžeme proto říci, že pyrogenní účinek etiocholanolonu se nerealizuje prostřednictvím zvýšené produkce cytokinů IL-1 β , TNF- α a INF- γ .

7 SEZNAM ZKRATEK

| | |
|------------------------|------------------------------------|
| ACTH..... | adrenokortikotropní hormon |
| BOFES..... | fetální telecí sérum |
| CNS..... | centrální nervový systém |
| DNA..... | deoxyribonukleová kyselina |
| ELISA..... | Enzyme linked immunosorbent assay |
| HRE..... | elementy hormonové odezvy |
| HRP..... | křenová peroxidáza |
| IL..... | interleukin |
| INF..... | interferon |
| LPS..... | lipopolysacharid |
| NK..... | natural killer |
| PBMC..... | mononukleární buňky periferní krve |
| PGE ₂ | prostaglandin třídy E ₂ |
| RNA..... | ribonukleová kyselina |
| TNF..... | tumor necrosis faktor |

8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Atkins E. (1960):** The pathogenesis of fever. *Physiol. Rev.* 40: 580-646
- Avitsur R., Pollak Y., Yirmiya R.(1997):** Administration of interleukin-1 into the hypothalamic paraventricular nucleus induces febrile behavioral effects. *Neuroimmunomodulation* 4: 258-265
- Banks W.A., Kastin A.J., Durham D.A. (1989):** Bidirectional transport of interleukin-1 α across the blood-brain barrier. *Brain Res. Bull.* 23: 433-437
- Beato M., Chávez S., Truss M. (1996):** Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61: 240-251
- Beutler B., Mahoney J., Le Trank N., Pekala P., Cerami A. (1985):** Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-susceptible hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *Jour. Exp. Med.* 161: 984-995
- Beutler B., Milsark I.W., Cerami A. (1985):** Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protect mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229: 869-871
- Beyaert R. et Fiers W. (1994):** Molecular mechanism of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. *FEBS Lett.* 340: 9-16
- Bodel P., Dillard M. (1968):** Studies on steroid fever I. Production of leukocyte pyrogen *in vitro* by etiocholanolone. *J. Clin. Invest.* 47: 107-117
- Bondy P.K., Cohn G.L., Gregory P.B. (1965):** Etiocholone fever. *Medicine* 44: 249-262
- Boyum A. (1968):** Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab Invest. Suppl.* 21: 77-89
- Cannon J.G., Wingfield P. et al. (1989):** IL-1: cloning, expression, biologic properties and transcription during endotoxemia. *Jour. Immunol.* 142: 2299-2306
- Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. (1975):** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Nat. Aca. Sci USA* 72: 3666-3670
- Ciampolillo A., Guastamacchia E., Caragiulo L., Lollino G., De Robertis O., Lattanzi V., Giorgino R. (1993):** In vitro secretion of interleukin-1 beta and interferon-gamma by peripheral blood lymphonuclear cells in diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 21: 87-93

- Conti B., Tabarean I., Andrei C., Bartfai T. (2004):** Cytokines and fever. *Front. Biosc.* 9: 1433-1449
- Costa J.J., Matossian K., Resnic M.B., Beil W.J., Wong D.T.W., Gordon J.R., Dvorak A.M., Weller P.F., Galli S.J. (1993):** Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor- α and macrophages inflammatory protein-1 α . *Jour. Clin. Invest.* 91: 2673- 2684
- Degliantoni G., Murphy M., Kobayashi M., Francis M.K., Perussia B., Trinchier G. (1985):** Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activating and NK cytotoxic factor. Relationship with tumor necrosis factor and synergism with immune interferon. *Jour. Exp. Med.* 162: 1512-1530
- Di Giovine F.S., Duff G.W. (1990):** Interleukin-1: The 1st interleukin. *Immunol. Tod.* 11: 13-20
- Dillard D.M. et Bodel P. (1970):** Studies on steroid fever II. Pyrogenic and anti-pyrogenic activity *in vitro* of some endogenous steroids of man. *J. Clin. Invest.* 49: 2418-2426
- Dinarello C.A. (1988):** Biology of interleukin-1. *FASEB J.* 2: 108-115
- Dinarello C.A. (1991):** Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77: 1627-1652
- Dinarello C.A. (1994):** The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.* 22: 1314-1325
- Dinarello C.A. (1999):** Cytokines as endogenous pyrogens. *Jour. Infect. Dis.* 179: Suppl. 294- 304
- Dinarello C.A., Cannon J.G., Wolf S.M., Bernheim H.A., Beutler B., Cerami A., Figari I.S., Palladino M.A.Jr., O'Connor J.V. (1986):** Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces productions of interleukin 1. *Jour.Exp.Med.* 163: 1433-1450
- Eisenberg S.P., Brewer M.T., Verderber E., Heimdal P., Brandhuber B.J., Thompson R.C. (1991):** Interleukin 1 receptor antagonist is a member of the interleukin 1 gene family: evolution of a cytokine control mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5232-5236
- Falkenstein E., Tillmann H-CH., Feuring M., Wehling M. (2000):** Multiple actions of steroid hormones- A focus on rapid, nongenomic effect. *Pharmacol. Rev.* 52: 513-555
- Ferenčík M., Rovenský J., Mat'ha V. (2000):** Dictionary of immunology. Faber, Slovak A.P.
- Ferenčík M., Rovenský J., Shoenfeld Y., Mat'ha V. (2004):** Imunitní systém, Grada

- Fiers W. (1991):** Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and *in vivo* level. FEBS Lett. 285: 199-212
- Freeman A.I., Al-Bussam N., O'Malley J.A., Stutzman L., Bjornnson S., Carter W.A. (1997):** Pharmacologic effects of polyinosinic-polycytidylic acid in man. J. Med. Virol. 1: 79-93
- Glickman P.B., Palmer R.H., Kappas A. (1964):** Steroid fever and inflammation. Arch. Inter. Med. 114: 46
- Goldbach J.M., Roth M., Storr B., Zeisberger (1997):** Influence of pentoxifylline on fevers induced by bacterial lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- α in guinea pigs. Eur. J. Pharmacol. 319: 273-278
- Gray P.W. et Goeddel D.V. (1982):** Structure of the human immune interferon gene. Nature 298: 859-863
- Hashimoto M., Sakakibara Y., Iriki M., Goto F., Shimada Y. (1994):** Does interleukin-1 mediate tumor necrosis factor alpha-induced fever in rabbits? Pflugers Arch. 427: 365-372
- Hořejší V. et Bartůňková J. (1998):** Základy imunologie, Triton
- Idriss H.T. et Naismith J.H. (2000):** TNF α and TNF receptor superfamily: Structure-function relationships. Microsc. Res. Tech. 50: 184-195
- Isaccs A. et Lindermann J. (1957):** Virus interference I. The interferon. Proc. R. Soc. Lond. B. Bio. Sci. 147: 258-267
- Janský L., Hampl R., Stárka L. (2006):** Steroids and thermogenesis. Physiol. Res. 55: 123-131
- Johannsen L., Toth L.A., Rosenthal R.S. et al. (1990):** Somnogenic, pyrogenic and hematologic effect of bacterial peptidoglycan. Am. J. Psychol. 258: R182-186
- Johannsen L., Wecke J., Obal F.Jr., Krueger J.M. (1991):** Macrophages produce somnogenic and pyrogenic muramyl peptides during the digestion of staphylococci. Am. J. Physiol. 260: R126-133
- Kappas A. et Palmer R.H. (1963):** Selected aspects of steroid pharmacology. Pharmacol. Rev. 15: 123
- Kappas A. Hellman L., Fukushima F.K., Gallagher T.F. (1956):** The pyrogenic effect of etiocholanolone (3- α -hydroxyetiocholanolone-17-one). J. Clin. Endocrinol. 16: 948
- Kappas A. Hellman L., Fukushima F.K., Gallagher T.F. (1957):** The pyrogenic effect of etiocholanolone. J. Clin. Endocrinol. 17: 451

- Kappas A., Hellman L., Fukushima F.K., Gallagher T.F. (1958):** The thermogenic effect and metabolic fate of etiocholanolone in man. *J. Clin. Endocrinol.* 18: 1043
- Kappas A., Glickman P.B., Palmer R.H. (1960):** Steroid fever studies: Physiological differences between bacterial pyrogens and endogenous steroid pyrogens of man. *Trans. Assoc. Amer. Physicians* 73: 176
- Kappas A., Soybel W., Fukushima D.K., Gallager T.F. (1959):** Studies on pyrogenic steroids in man. *Trans. Assoc. Amer. Physicians* 72: 54
- Kappas A., Soybel W., Glickman P., Fukushima D.K. (1960):** Fever-producing steroids of endogenous origin in man. *Arch. Internal. Med.* 105: 701
- Katsuura G., Arimura A., Koves K., Gottshall P.E. (1990):** Involvement of organum vasculosum of lamina terminalis and preoptic area in interleukin-1 β -induced ACTH release. *Am. J. Physiol.* 258: E163-171
- Kluger M.J., Kozak W., Leon L.R., D. Soszynski, Conn C.A. (1995):** Cytokines and fever. *Neuroimmunomodulation* 2: 216-223
- Kluger M.J., Kozak W., Leon L.R., Soszynski D., Conn C.A. (1995):** Cytokines and fever. *Neuroimmunomodulation* 2: 216-223
- Kobayashi M., Fitz L., Ryan M., Hewick R.M., Clark S.C., Chan S., Loudon R., Sherman F., Perussia B., Trinchieri G. (1989):** Identification and purification of natural killer cells stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effect on human lymphocytes. *Jour. Exp. Med.* 170: 827-845
- Leon L. (2004):** Hypothermia in systemic inflammation: Role of cytokines. *Front. Biosc.* 9: 1877-1888
- Lugeshi G. et Rothwell N. (1996):** Cytokines and fever. *Int. Arch Allergy Immunol.* 109: 301-307
- Lyte M. (1986):** Regulation of interleukin-1 production in murine macrophages and human monocytes by a normal physiological constituent. *Life Sci.* 38: 1163-1170
- Mackowiack P.A. (1998):** Concepts of fever. *Arch. Intern. Med.* 158: 1870-1881
- Männel D.N., Moore R.N., Mergenhagen S.E. (1980):** Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor.necrotizing factor). *Inf. Immu.* 30: 523-530
- Michie H.R., Spriggs D.R., Manogue K.R., Sherman M.L., Revghaug A., O'Dwier S., Arthur K., Dinarello C.A., Cerami A., Wolff S.M., Kufe D.W., Wilmore D.W. (1988):** Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery St. Louis* 104: 280-286

- Moldawer L.L., Gelin J., Schersten T., Lundholm K.G. (1987):** Circulating interleukin 1 and tumor necrosis factor during inflammation. *Am. J. Physiol.* 253: R922-928
- Mortensen R.F., Shapiro J., Lin B.-F., Douches S., Neta R. (1988):** Interaction of recombinant IL-1 and recombinant tumor necrosis factor in the induction of mouse acute phase proteins. *Jour. Immun.* 140: 2260-2266
- Mosmann T.R. et Coffman R.L. (1989):** TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 145-73
- Murakami M., Sakata Y., watanabe T. (1990):** Central action sites of interleukin-1 beta for inducing fever in rabbits. *J. Physiol* 428: 299-312
- Nathan C. et Sporn M. (1991):** Cytokines in context. *J. Cell Biol.* 113: 981-986
- Nathan C.F., Murray H.W., Wiebe M.E., Rubin B.I. (1983):** Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and anti-microbial activity. *J. Exp. Med.* 158: 670-689
- Naylor S.L., Sakaguchi A.Y., Shows T.B., Law M.L., Goeddel D.V., Gray P.W. (1983):** Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J. Ex. Med.* 157: 1020-1027
- Nemunaitis J., Appelbaum F.R., Lilleby K., Buhles W.C., Rosenfeld C., Ziegler Z.R., Shadduck C.A., Singer J.W., Meyer W., Buckner C.D. (1994):** Phase I study of recombinant interleukin-1 beta in patients undergoing autologous bone marrow transplant for acute myelogenous leukemia. *Blood* 83: 3473-3479
- Netea G.M., Kullberg B.J., Van der Meer J.W.M. (2000):** Circulating cytokines as mediators of fever. *Clin. Infect. Diss.* 31: S178-184
- Nicola N.A. (1994):** Guidebook to cytokines and their receptors. A Sambrook and Tooze Publication, Oxford U.P.
- Pace J.L., Russell S.W., Torres B.A. Johnson H.M., Gray P.W. (1983):** Recombinant mouse γ interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cells killing. *J. Immunol.* 130: 2011-2013
- Perlmutter D.H., Dinarello C.A., Punsal P.I., Colten H.R. (1986):** Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression. *Jour. Clin. Invest.* 78: 1349-1354
- Perrusia B. (1991):** Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 49-55

- Richards A.L., Okuno T., Takagaki Y., Djeu J.Y. (1988):** Natural cytotoxic cell-specific cytotoxic factor produced by IL-3-dependent basophilic/mast cells. Relationship to TNF. *Jour. Immun.* 141: 3061-3066
- Sad S., Marcotte R., Mosmann T.R. (1995):** Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells into cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or T2 cytokines. *Immunity* 2: 271-79
- Santos A.F., Huang H., Tindall D.J. (2004):** *Steroids* 69: 79-85
- Saper C.B. et Breder C.D. (1994):** The neurologic basis of fever. *N. Engl. J. Med.* 330: 1880-1886
- Schroder K., Hretzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. (2004):** Interferon- γ an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75: 163-189
- Schultz R.M. et Kleinschmidt W. (1983):** Functional identity between murine interferon and macrophage activating factor. *Nature* 305: 239-240
- Sidman C.L., Marshall J.D., Shultz L.D., Gray P.W., Johnson H.M. (1984):** Gamma-interferon is one of several direct B cell-maturing lymphokines. *Nature* 309: 801-804
- Smith C.A., Davis T., Anderson D., Solam L., Beckman M.P., Jerzy R., Dower S.K., Cosman D. et Goodwin R.G. (1990):** A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248: 1019-1023
- Spriggs D.R., Deutsch S., Kufe D.W. (1992):** Genomic structure, induction and production of TNF-alpha. *Immun. Ser.* 56: 3-34
- Sugarman B.J., Aggarwal B.B., Hass P.E., Figari I.S., Palladino M.A.Jr., Shepard H.M. (1985):** Recombinant human tumor necrosis factor- α : effect on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Science* 230: 943-945
- Sundgren-Andersson A.K., Ostlund P., Bartfai T. (1998):** IL-6 is essential in TNF-alpha-induced fever. *Am. Jour. Physiol* 275: R2028-R2034
- Suzuki K., Yamada M., Kurakake S., Okamura N., Yamaya K., Liu Q., Kudoh S., Kowatari K., Nakaji S., Sugawara K. (2000):** Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-promoting potentials rise after endurance exercise in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 8: 281-287
- Torricco F., Heremans H., Rivera M.T., Van Marc E., Billiau A., Carlier Y. (1991):** Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* 146: 3626-3632

- Ullum H., Haarhr P.M., Diamant M., Palmo J., Halkjer- Kristensen J., Pedersen B.K. (1994):** Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 or TNF- α pre-mRNA in BMNC. *J. Appl. Physiol.* 77 (1): 93-97
- Vilček J. et Lee T.H. (1991):** Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanism of its multiple action. *J. Biol.Chem.* 266: 7313-7316
- Virta M., Hurme M., Helminen M. (2002):** Increased plasma levels of pro- and antiinflammatory cytokines in patients with febrile seizures. *Epilepsia* 43: 920-923
- Vodrážka Z. (1996):** *Biochemie, Academica*
- Wolf S.M., Kimball H.R., Perry S., Root R., Kappas A (1967):** The biological properties of etiocholanolon. *Ann. Inter. Med.* 67: 1268-1295