

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



**Patogeneze klíšťové encefalitidy a její ovlivnění
genetickým pozadím hostitele**

Diplomová práce

Bc. Martin Palus

Vedoucí práce: RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.

České Budějovice
2011

Palus M., 2011: Patogeneze klíšťové encefalitidy a její ovlivnění genetickým pozadím hostitele [The role of genetic background of the host on the pathogenesis of tick-borne encephalitis. Mgr. Thesis, in Czech]- 64 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Tato práce byla financována granty:

Grantová Agentura České republiky: P502/11/2116 a P302/10/P438

Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky: MSM 6007665801, LC 06009

Annotation:

We examined the influence of the host genetic background on the pathogenesis of tick-borne encephalitis. We determined virus titers in organs and serum in different time intervals post-infection for different ways of inoculation. We also stated mean survival times and antibody production in different strains of mice infected with tick-borne encephalitis virus. Moreover, differences in expression of immunologically important genes in brains of infected mice were compared.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích,

.....

Bc. Martin Palus

Poděkování:

Rád bych na tomto místě poděkoval svému školiteli RNDr. Danielu Růžkovi, Ph.D. za trpělivost, cenné rady a ochotu pomoci s vědeckou prací. Poděkování také patří Prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi, CSc. za poskytnutí zázemí a za možnost pracovat v Laboratoři molekulární biologie vektorů a patogenů PaÚ BC AV ČR, v.v.i. Velké poděkování patří členům Laboratoře molekulární biologie vektorů a patogenů za jejich velkou ochotu pomoci a za přátelské prostředí. Současně bych rád poděkoval členům Laboratoře interakcí vektor-hostitel PaÚ BC AV ČR, v.v.i. za vstřícné prostředí a za umožnění přístupu do jejich prostor.

Velice děkuji také svým rodičům a známým za podporu nejen v mém studiu.

OBSAH

1.	Úvod	1
1.1	Virus klíšťové encefalitidy	1
1.1.1	Molekulárně-biologická charakteristika VKE	1
1.1.2	Ekologie VKE	4
1.1.3	Klinické projevy KE u člověka	5
1.1.4	Patogeneze infekce VKE	7
1.1.5	Ostatní faktory ovlivňující průběh infekce	10
1.2	Modelový organismus pro studium vlivu genetického pozadí na závažnost infekce	11
2.	Cíle práce	13
3.	Materiál a Metody	14
3.1.1	Pokusná zvířata	14
3.1.2	Buněčné linie	14
3.1.3	Inokulum	14
3.1.4	Plaková titrace	15
3.1.5	Záznam tělesné teploty, hmotnosti a střední doby přežití po SC VKE	15
3.1.6	Stanovení střední doby přežití po IC VKE	16
3.1.7	Změny genové exprese v mozkové tkáni po IC a SC VKE	16
3.1.8	Izolace RNA	17
3.1.9	Reverzní transkripce (RT-PCR)	17
3.1.10	Real-time PCR	17
3.1.11	Neutralizační test (NT)	19
3.1.12	Statistické vyhodnocení výsledků	20
4.	Výsledky	21
4.1.1	Sledování změn tělesné teploty, hmotnosti a střední doby přežití vybraných kmenů myši řady CcS/Dem po SC VKE	21
4.1.2	Titru viru v krvi vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem po SC VKE	25
4.1.3	Přežívání vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem po IC VKE	25
4.1.4	Titru viru v mozkové tkáni vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem po IC a SC VKE	27
4.1.5	Změny exprese na úrovni mRNA imunologicky významných genů po SC a IC VKE u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem v mozkové tkáni	29
4.1.6	Titru neutralizujících protilátek po SC VKE u kmenů CcS-11, BALB/c a STS..	47
5.	Diskuze	48
6.	Závěr	54
7.	Seznam zkratk	55
8.	Použitá literatura	57
9.	Přílohy	63
9.1	Příloha A	63
9.2	Příloha B	64

1. Úvod

1.1 Virus klíšťové encefalitidy

Klíšťová encefalitida (KE), onemocnění způsobené virem klíšťové encefalitidy (VKE), představuje jednu z nejdůležitějších a nejzávažnějších infekčních chorob postihujících centrální nervový systém člověka v rozsáhlých oblastech Evropy a Asie (Heinz *et al.*, 2000). Celosvětově se eviduje přibližně 10-12 tisíc případů KE za rok (Süss, 2003). Na Českou republiku připadá z toho každoročně 500-1000 diagnostikovaných případů KE (EpiDat-databáze Státního zdravotního ústavu v Praze; použita data za posledních deset let). Navzdory závažnosti a významu KE není patogeneza tohoto onemocnění důkladně prozkoumána. Proti KE dosud neexistuje žádný specifický lék a neúčinnějším způsobem ochrany před infekcí VKE je preventivní očkování.

VKE patří do rodu Flavivirus, čeledi *Flaviviridae* (Thiel *et al.*, 2005). Rod Flavivirus je tvořen více než 50 druhy virů. Zástupce rodu Flavivirus dále dělíme podle přenašeče do tří skupin. Jsou jimi viry bez známého přenašeče, viry přenášeny komáry a konečně viry přenášené klíšťaty (Gritsun *et al.*, 2003). Mnohé z virů náležejících do těchto skupin reprezentují významné lidské patogeny. Kromě VKE uveďme například virus dengue, virus japonské encefalitidy, virus západního Nilu, či virus žluté zimnice. Skupina klíšťaty přenášených flavivirů se dále člení na dvě podskupiny dle hostitelské preference, tj. na flaviviry infikující především savce a flaviviry, jejichž hostiteli jsou zejména mořští ptáci. VKE přísluší do savčí podskupiny flavivirů. V rámci VKE dále rozlišujeme tři subtypy – evropský, sibiřský a dálnovýchodní (Gaunt *et al.*, 2001; Grard *et al.*, 2007).

Do tzv. „serologické skupiny klíšťové encefalitidy“ řadíme kromě VKE dále např. virus vrtivky (Louping ill virus), virus Langat a virus Powassan. Další dva příbuzné viry ze stejné skupiny, virus Omské hemoragické horečky a virus horečky Kyasanurského lesa, způsobující infekce projevující se jako hemoragické horečky, spíše než encefalitidy (Pattnaik 2006; Růžek *et al.*, 2010). Všichni tito zástupci dnes patří mezi nejvýznamnější znovu se objevující („reemergentní“) původce onemocnění přenášené krevsajcími členovci.

1.1.1 Molekulárně-biologická charakteristika VKE

Genetickou informaci VKE nese jednovláknová RNA pozitivní polarity o délce 11 kb. Virový genom obsahuje jeden otevřený čtecí rámec (ORF), který kóduje polyprotein tvořený

3414 aminokyselinami (**Obr. 1.1**). Tento polyprotein je štěpen buněčnými a virovými proteázami na tři strukturní proteiny (C, M a E) a sedm nestructurních proteinů (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5) (Lindquist *et Vapalahti* 2008) **Tab. 1.1**.

	5'UTR 11 000 b 3'UTR										
	STRUKTURNÍ				NESTRUKTURNÍ						
<u>Protein</u>	C	(prM)	M	E	NS1	NS2A	NS2B	NS3	NS4A	NS4B	NS5
<u>Velikost [kDa]</u>	11	26 z toho	M 8	50	46	22	14	70	16	27	103

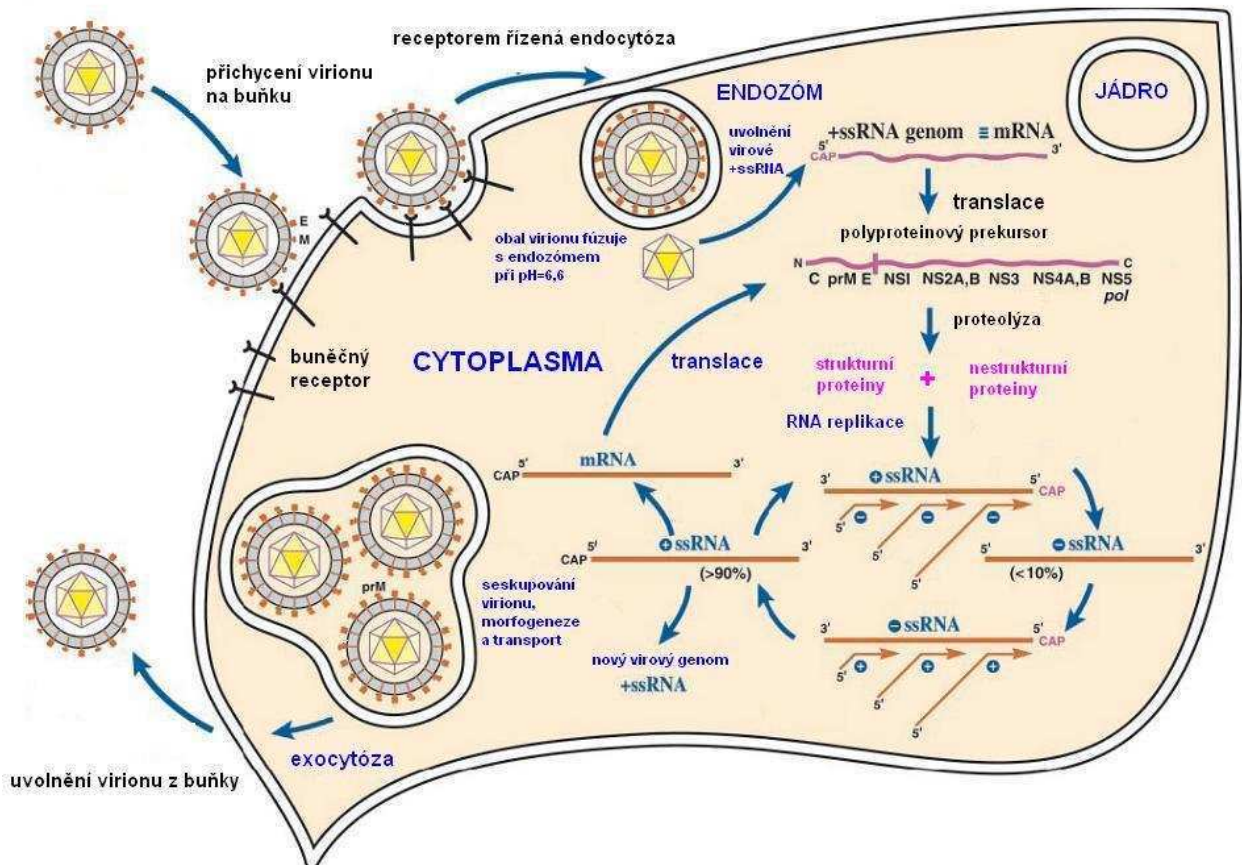
Obr. 1.1 Schéma genomu VKE

Tab. 1.1 Strukturní a nestructurní proteiny VKE a jejich funkce (dle Lindebach *et Rice*, 2003)

<u>Protein</u>	<u>Funkce proteinu</u>
C	hlavní protein kapsidy
M (prM)	powrchový protein; ochrana E proteinu před proteázami; chaperon-like aktivita
E	virový hemaglutinin, slouží k přichycení na buňce a fúzi membrán, hlavní antigen
NS1	glykoprotein, vyvolává silnou protilátkovou odpověď; hexamer nezbytný pro RNA replikaci
NS2A	koordinace mezi zabalením RNA a RNA replikací
NS2B	kofaktor NS3 serinové proteázy
NS3	multi-funkční protein, serin proteasový komplex s NS2B; RNA helikáza, RNA replikace; triptofosfatázová aktivita
NS4A	neznámá funkce
NS4B	neznámá funkce
NS5	methyl transferázová aktivita; RdRp (RNA dependentní RNA polymerása)

ORF je ohraničený 5' netranslatovanou oblastí (UTR, z angl. „untranslated regions“; asi 130 nukleotidů) a 3' UTR (350-750 nukleotidů) (**Obr. 1.1**). RNA v těchto oblastech tvoří sekundární struktury, které pravděpodobně mají důležitou úlohu při replikaci genomu, translaci a balení virové nukleové kyseliny do kapsidy viru (Gritsun *et al.*, 1997).

Nukleokapsida viru se vyznačuje ikosaedrální symetrií a je tvořena virovým genomem, který je spojen s bazickým kapsidovým proteinem C. Celý nukleokapsid představuje elektrodenzní jádro. Nukleokapsida je obalena lipidovou dvojvrstvou, v níž jsou obsaženy dva glykoproteiny – protein E („envelope“) a protein M („membrane“). Průměr celého virionu je kolem 50 nm. Protein M se tvoří štěpením z nezralého prekursoru prM při průchodu virionu ven z hostitelské buňky. Protein E je hlavním povrchovým proteinem virové částice, který interaguje s buněčnými receptory a zprostředkovává fúzi viru s buněčnou membránou. V savčích buňkách také indukuje tvorbu virus-neutralizačních protilátek, které hrají důležitou roli v protivirové imunitní odpovědi (Heinz, 1986). Celý proces replikace VKE v hostitelské buňce je znázorněn na **Obr. 1.2** (dle Samuel, 2002).



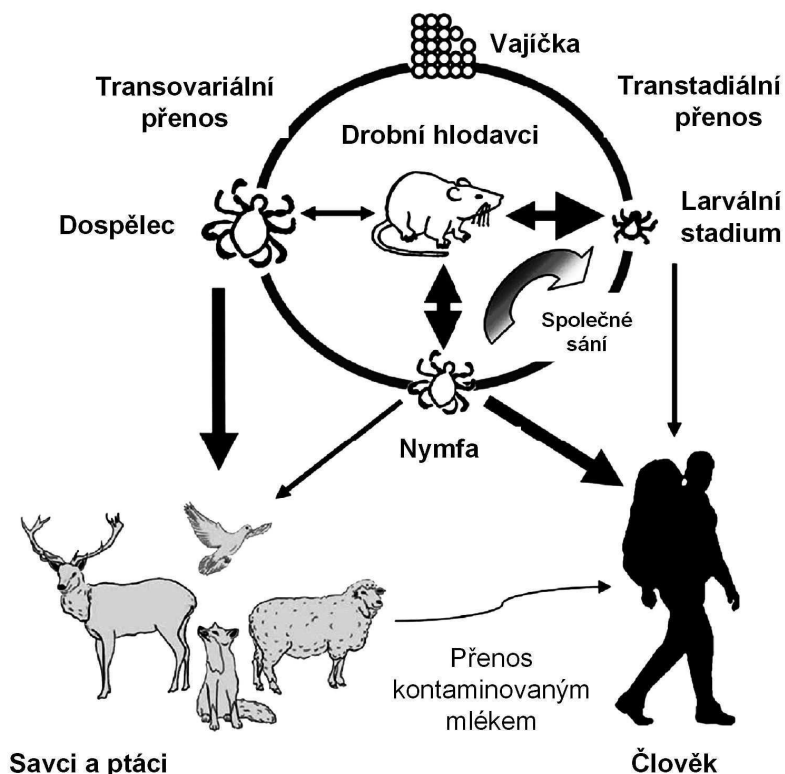
Obr. 1.2 Schématické zobrazení replikačního cyklu VKE v hostitelské buňce (dle Samuel, 2002)

1.1.2 Ekologie VKE

V přirozeném prostředí je výskyt jakéhokoliv vektory přenášeného viru úzce spjat s ekologií a biologií přenašeče, s jejich oblastmi rozšíření a obdobím jejich aktivity. VKE je přenášen klíšťaty z rodu *Ixodes*. Nejčastěji se jedná o tyto dva druhy: *Ixodes persulcatus* jako vektor zástupců subtypu sibiřského a dálnovýchodního (Blaškovič *et al.*, 1967) a *Ixodes ricinus* jako hlavní vektor zástupců evropského subtypu VKE (Rampas *et Gallia*, 1949). VKE se velice dobře adaptoval na klíšťata, a to jak na jejich fyziologické vlastnosti, tak i na jejich chování (Nuttall *et al.*, 1994). Faktory výskytu klíšťat jsou závislé převážně na klimatických podmínkách (teplotě, vlhkosti, vegetaci). Tyto podmínky poskytují bezbariérové rozšíření klíšťat, které tvoří přinejmenším 20 000 – 30 000 přírodních ohnisek infekce VKE napříč severní polokoulí od Evropy po Japonsko (Korenberg *et Kovalevskii*, 1999).

Klíště infikované VKE zůstává nakaženo po celý život. Udržování VKE v klíšťatech je usnadněno transstadiálním a transovariálním přenosem (**Obr. 1.3**). Klíšťata obecně mohou být infikována virem KE tzv. viremickým nebo neviremickým způsobem. K přenosu dochází

při společném sání na malých hlodavcích (Labuda *et al.*, 1996). Tito hlodavci mají ze všech hostitelů největší vliv na udržení VKE v přírodě (Achazi *et al.*, 2011). Role člověka jako hostitele VKE je zcela náhodná.



Obr. 1.3 Cirkulace VKE v přírodě (dle Růžek *et al.*, 2010)

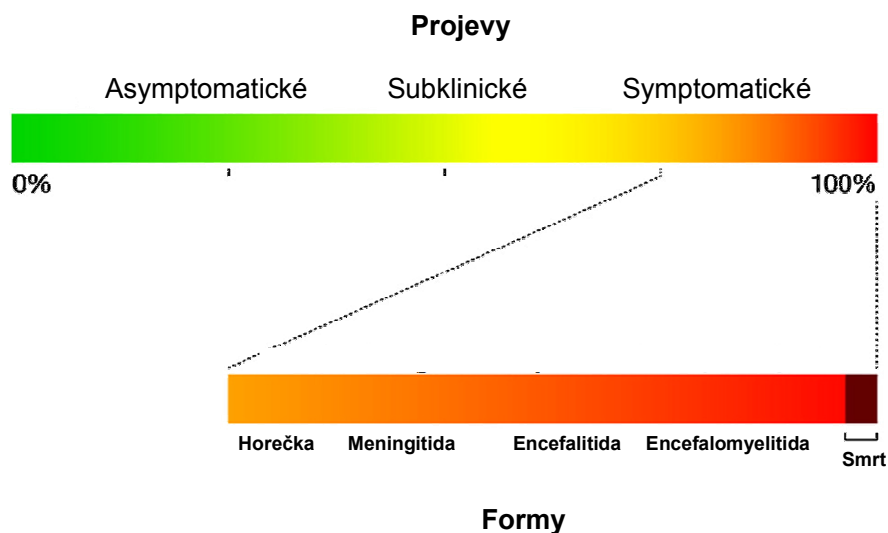
1.1.3 Klinické projevy KE u člověka

K přenosu VKE na člověka může dojít při sání infikovaného klíštěte na člověku nebo požitím nepasterizovaného mléka nebo mléčných produktů pocházejících od infikovaných koz, ovcí či krav (Grešíkova 1958), **Obr. 1.3**.

U asi 70-80 % případů probíhá KE jako dvoufázové onemocnění (Holzmann, 2003). Po relativně krátké inkubační době (7-14 dní) nastává první, tzv. viremická, fáze infekce (Kaiser, 1999; Holzmann, 2003). Projev příznaků trvá u první fáze kolem 1-8 dnů, mezi první a druhou fází se nachází 7 denní bezpříznakový interval. Příznaky během první fáze se podobají chřipkovému onemocnění (horečka, únava, nevolnost, malátnost, bolest hlavy a bolest celého těla). Druhá fáze KE nastává poté asi u 20-30% případů infikovaných osob, a je charakterizována projevy meningitidy až těžké encefalitidy (Mickiene *et al.*, 2002).

Klinické formy KE dělíme zejména na tři základní formy horečnatá, meningitická a encefalitická/meningoencefalitická jak zobrazuje **Obr. 1.4** (Gritsun *et al.*, 2003).

V případě horečnaté formy onemocnění dochází zpravidla ke kompletnímu uzdravení pacienta. U této formy se neobjevují neurologické příznaky a ani nedochází k žádnému poškození CNS. Horečnatou formu zaznamenáváme u asi u jedné třetiny ze všech KE infekcí. U pacientů bývá pozorována horečka až 39°C, která může trvat od několika hodin až 5 dní. Druhou a nejčastější formou infekce KE je meningitida. Tato forma má podobné počáteční projevy jako u horečnaté formy, nicméně s horšími příznaky. Pacienti obvykle trpí silnými bolestmi hlavy a nevolností. Časté je i zvracení a zvýšená citlivost na světlo. Tato forma obvykle trvá 7-14 dní a zotavení je pozvolné. Encefalitida/encefalomyelitida je forma, která se vyskytuje s nejnižší četností, nicméně je asociována se závažným poškozením CNS. Pacienti bývají zesláblí, ospalí, mohou se objevit i halucinace či může pacient upadnout i do bezvědomí. Objevují se svalové křeče, zpomalení srdeční činnosti, krvácení do žaludku, či nastává ochrnutí. U některých pacientů se dokonce rozvine epilepsie. 30% těchto případů končí smrtí. U ostatních pacientů, zvláště u starší populace, může docházet k trvalému ochrnutí. Rekonvalescence je pozvolná provázena známkami nervového vyčerpání, malátnosti a častými změnami nálad (Gritsun *et al.*, 2003).



Obrázek 1.4 Projevy a formy KE

Letalita se u dospělých lidí v Evropě pohybuje kolem 1-2 %. S vyšším věkem pacienta narůstá závažnost průběhu KE a s tím vzrůstá i letalita (Mickiene *et al.*, 2002; Lindquist *et Vapalahti*, 2008).

Průběh KE u hostitele je ovlivněn řadou faktorů jak na úrovni viru, tak i hostitele. Výsledek onemocnění je ale dán především mírou poškození mozkové tkáně. Hlavní mechanismy vedoucí k poškození neuronů jsou u KE známé tři: poškození neuronů způsobené přímo virem, patologické působení hostitelského imunitního systému, a konečně vzájemná kombinace obou předchozích faktorů (Chambers *et al.*, 2003; King *et al.*, 2007; Hayasaka *et al.*, 2009; Růžek *et al.*, 2009);

O tom, zda VKE pronikne z periférie do mozkové tkáně a zda dojde k porušení hematoencefalické bariéry, která je vstupní branou do CNS, rozhoduje řada faktorů ovlivňující průběh infekce VKE, které budou diskutovány dále (King *et al.*, 2007; Růžek *et al.*, 2011).

1.1.4 Patogeneze infekce VKE

Po přisátí infikovaného klišťete dochází k přenosu VKE a jeho replikaci v podkožní tkáni (Labuda *et al.*, 1996). Hlavní úlohu zde hrají dendritické a Langerhansovy buňky. Virus se pak dále šíří do spádových lymfatických uzlin, kde dochází k jeho dalšímu pomnožení. Následně nastává primární virémie, během které virus proniká do různých tkání a orgánů v těle. Po pomnožení viru v periferních orgánech, zejména retikuloendoteliálního systému (Málková *et al.*, 1959), nastává sekundární virémie, během které virus proniká do CNS.

Mechanismy, jakými VKE překonává hematoencefalickou bariéru, nebyly doposud zcela objasněny (Samuel *et al.*, 2006). Dříve popsané porušení hematoencefalické bariéry je spíše následkem infekce v CNS, ale není nutné pro vstup viru do CNS (Růžek *et al.*, 2011). Patologie v CNS je do značné míry výsledkem zánětlivé imunitní odpovědi vyvolané infekcí VKE a s tím spojenou imunopatologickou odpovědí v mozkové tkáni. Rozvoj a průběh imunitní odpovědi hostitele neurčují pouze buňky imunitního systému, ale celý komplex reakcí, který je řízen především na úrovni exprese různých cytokínů a chemokínů (Shirato *et al.*, 2004; Venter *et al.*, 2005).

1.1.4.1 Úloha cytokínů/chemokínů při infekci KE v CNS

CNS představuje imunitně privilegovaný orgán, který disponuje širokým spektrem imunitních mechanismů, jenž mohou být v případě virové infekce mobilizovány. Stanovení transkriptomického profilu z myši mozkové tkáně po infekci japonskou encefalitidou odhalilo celou řadu aktivací antivirových odpovědí na počátku infekce (Gupta *et al.*, 2011).

Tato odpověď zahrnovala aktivaci vrozených imunitních reakcí, tvorbu interferonu a expresi interferon-stimulujících genů, komplement a aktivaci NK buněk, makrofágů v CNS.

Zdrojem chemokínů/cytokínů v rámci CNS jsou virem napadené buňky, mikroglie a astrocyty (Carpentier *et al.*, 2005). Mikroglie představují tkáňově specifické makrofágy v CNS, které se funkčně podobají monocytům (King *et al.*, 2007). Astrocyty jsou na druhou stranu rozpoznávány jako trofická podpůrná buňka CNS (Carpentier *et al.*, 2005). Mikroglialní a astrocytární aktivace během falavivirové infekce se projevuje podobným histologickým obrazem jak u myši tak u lidské tkáně. Například při japonské encefalitidě dochází u mikroglíí a astrocytů ke zvýšení exprese řady chemokínů, které by mohly mít za určitých okolností imunopatologický efekt. Mezi tyto chemokíny patří například MCP-1 (CCL2) a RANTES (CCL5). Tyto prozánětlivé chemokíny nemají sice samy o sobě imunopatologický efekt, ale mohou zprostředkovat neurotoxicitu u poškozené tkáně například tím, že jsou schopny nadměrně rekrutovat cirkulující buňky imunitního systému, či nadměrně stimulovat makrofágy a mikroglie (King *et al.*, 2007).

Jak z dřívějších pokusů vyplývá, mediátory imunologické odpovědi sehrávají kritickou roli při řadě reakcí v imunitní obraně a je třeba jim věnovat dostatečnou pozornost (Klein *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2011).

1.1.4.2 Vliv zánětlivé odpovědi při KE na integritu hematoencefalické bariéry

Důležitost výše zmiňovaných imunologických reakcí může být dobře prezentována a na příkladu jejich vlivu na porušení hematoencefalické bariéry. Integrita hematoencefalické bariéry je nezbytná pro správný transport živin do CNS, ochranu před patogeny, toxiny a ostatními látkami, které mohou být škodlivé pro buňky CNS. Narušení integrity bariéry pak umožňuje vstup prozánětlivých buněk imunitního systému do CNS, jež jsou nezbytné při odstraňování viru z nervové tkáně (Wang *et al.*, 2003). Při neúměrné regulaci však imunitní odpověď může vést k rozvoji řady imunopatologických reakcí poškozujících nervovou tkáň (Gralinski *et al.*, 2009; Růžek *et al.*, 2009). Podmínky, za kterých dochází k rozrušení bariéry a rekrutování prozánětlivých buněk do CNS, jsou regulovány cytokíny/chemokíny exprimovanými v napadené tkáni (Winter *et al.*, 2004; Růžek *et al.*, 2011).

Studie, které byly zaměřeny na autoimunitní odpověď v CNS a virem indukovanou zánětlivou odpověď, svědčí o vztahu mezi zánětem CNS a narušením integrity hematoencefalické bariéry (Olsen *et al.*, 2007; Gralinski *et al.*, 2009; Růžek *et al.*, 2009).

Příkladem mediátorů ovlivňujících prostupnost hematoencefalické bariéry mohou být cytokíny TNF α a IL-6 (de Vries *et al.*, 1996; Abbott, 2000). U transgenních myší produkujících IL-6 ve zvýšené míře byly zaznamenány neuropatologické abnormality a dokonce s tím spojené porušení hematoencefalické bariéry. Avšak v případě odlišného transgenního myšího modelu nevedlo řízené zvýšení hladin IL-6 samo o sobě k narušení ani prolomení hematoencefalické bariéry (Atrasheuskaya *et al.*, 2003).

Zjednodušeně by se dalo říci, že prakticky každá infekce, která se rozvíjí v CNS, ovlivňuje funkce hematoencefalické bariéry (Gralinski *et al.*, 2009; Růžek *et al.*, 2009; Růžek *et al.*, 2011). To může být dáno právě s infekcí spojenou expresí cytokínů/chemokínů. veškeré reakce odehrávající se v CNS následkem infekce však mohou být ovlivněny řadou faktorů (stáří jedince, pohlaví, genetická výbava atd.) a tato záležitost bude diskutována dále.

1.1.4.3 Vliv imunologické reakce na rozvoj imunopatologie v CNS

Cytokíny/chemokíny, jak již bylo výše zmíněno, mohou také figurovat jako chemoatraktanty a aktivátory buněk imunitního systému. Stále častěji se, nicméně ukazuje, že některé aktivace vedou spíše k imunopatologii. Takovým příkladem může být zvýšená produkci cytokínu IP-10 (CXCL10) a CXCL11, která je spjata s aktivací a migrací T lymfocytů. Zvýšená hladina těchto cytokínů byla též pozorována v mozkomíšním moku u pacientů s KE (Lepej *et al.*, 2007). Další cytokín, který byl nalezen v mozkomíšním moku pacientů s rozvinutou KE, byl IL-12, jenž je považován za hlavní regulátor aktivity a proliferace Th1 lymfocytů (Lepej *et al.*, 2007). Jako jedny z mnoha dalších cytokínů/chemokínů, jejichž zvýšená exprese indukuje vyšší aktivitu CD8⁺ lymfocytů v CNS a prozánětlivou reakci u pacientů postižených KE, jsou β_2 mikroglobulin a neopterin (Lindquist *et Vapalahti*, 2008). Zvýšená hladina těchto mediátorů pak může mít významný vliv na patologii v CNS zprostředkovanou cytotoxickými lymfocyty. Cytotoxické T lymfocyty by měly být cílené na infikované neurony. Nicméně cytotoxické T lymfocyty a zánětlivé infiltráty nebyly vždy pozorovány pouze u infikovaných neuronů a dokonce zde nebyla nalezena ani topografická korelace mezi zánětlivými změnami a distribucí virového antigenu (Růžek *et al.*, 2009). Posmrtné nálezy u zemřelých v mozkové tkáni po KE a experimenty provedené na myších svědčí o spojitosti a důležitosti role cytotoxických T lymfocytů (CD8⁺) v imunopatologii při infekci KE (Růžek *et al.*, 2009).

Expresí některých cytokínů/chemokínů nemusí mít pouze regulační charakter jak je uvedené výše, ale může například přímo zodpovídat za buněčnou smrt, což bylo pozorováno

například u IP-10 (CXCL10). IP-10 tedy funguje nejen jako aktivátor T lymfocytů, ale též jako neurotoxin, který indukuje u neuronů apoptózu (Sui *et al.*, 2006).

Také zvýšená produkce dalších cytokínů (MCP-1; RANTES; MIP-1 α ; IL-1 α) sledovaná v séru a mozkomíšním moku pacientů trpících KE je spojována s rozvíjející se imunopatologií v CNS (Grygorczuk *et al.*, 2006; Grygorczuk *et al.*, 2006; Michalowska-Wender *et al.*, 2006).

Kromě výše uvedeného sehraává i humorální imunita významnou úlohu při KE, která je založena zejména na neutralizační aktivitě produkovaných protilátek. Významnou roli sehraávají nejen IgM a IgG, které se účastní neutralizace viru (Konishi *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2001; Chambers *et al.*, 2003). Klíčová úloha protilátek při eliminaci infekce byla dokumentována řadou experimentálních studií. Například bylo pozorováno, že myši postrádající B lymfocyty protilátky, jsou více vnímavé k flavivirové infekci (Diamond *et al.*, 2003).

1.1.5 Ostatní faktory ovlivňující průběh infekce

Jak známo, existuje mnoho faktorů, které se mohou projevit na vnímavosti hostitele vůči virové infekci. Mezi tyto faktory bezesporu patří věk, pohlaví, výživový status, vliv prostředí a v neposlední řadě také genetická výbava daného jedince. Stejně tak se projevují i faktory virulence daného patogena, množství a lokalizace inokula.

Zvýšená letalita a trvalé následky, které často výraznou měrou postihují pacientův život po prodělání KE, koreluje se stoupajícím věkem (>60 let) (Gritsun *et al.*, 2003). Experimenty provedené na myších nakažených virem Sindbis odhalily, že rozdílná exprese genů v neurálních buňkách mladých a starších myši zodpovídá za rezistenci/vnímavost vázanou na stáří jedince. Geny účastníci se tohoto procesu zahrnovaly regulátory apoptózy, na interferon reagující geny a jiné druhy regulace (Labrada *et al.*, 2002).

Po inokulaci viru encefalitidy St. Louis byla pozorována shodná vnímavost samic i samců ve stáří dvou měsíců, ovšem ve stáří tří a čtyř měsíců došlo k snížení vnímavosti k infekci pouze u samic (Andersen *et al.*, 1974). Zdá se, že genetické faktory, hormonální efekt daného pohlaví a proces stárnutí ovlivňuje vnímavost vůči flavivirovým infekcím.

Další z faktorů geneticky předurčujících vnímavostí k flavivirové infekci souvisí s genem *OAS* (oligonadenylát syntetáza), jehož produkt se účastní aktivace RNázy L (Samuel, 2002). Za zmínku stojí příklad homozygotně dominantních myši v genu *Flv'* (*Oas1b*), které jsou citlivé k infekci flaviviry, ale infekce nedojde k rozvoji klinicky

manifestního onemocnění. *Flv'* je zodpovědný za rezistenci vůči flavivirům na intracelulární úrovni, avšak bez plně fungujícího imunitního systému je přítomnost této rezistentní alely zcela zanedbatelná (Brinton *et Perelygin*, 2003).

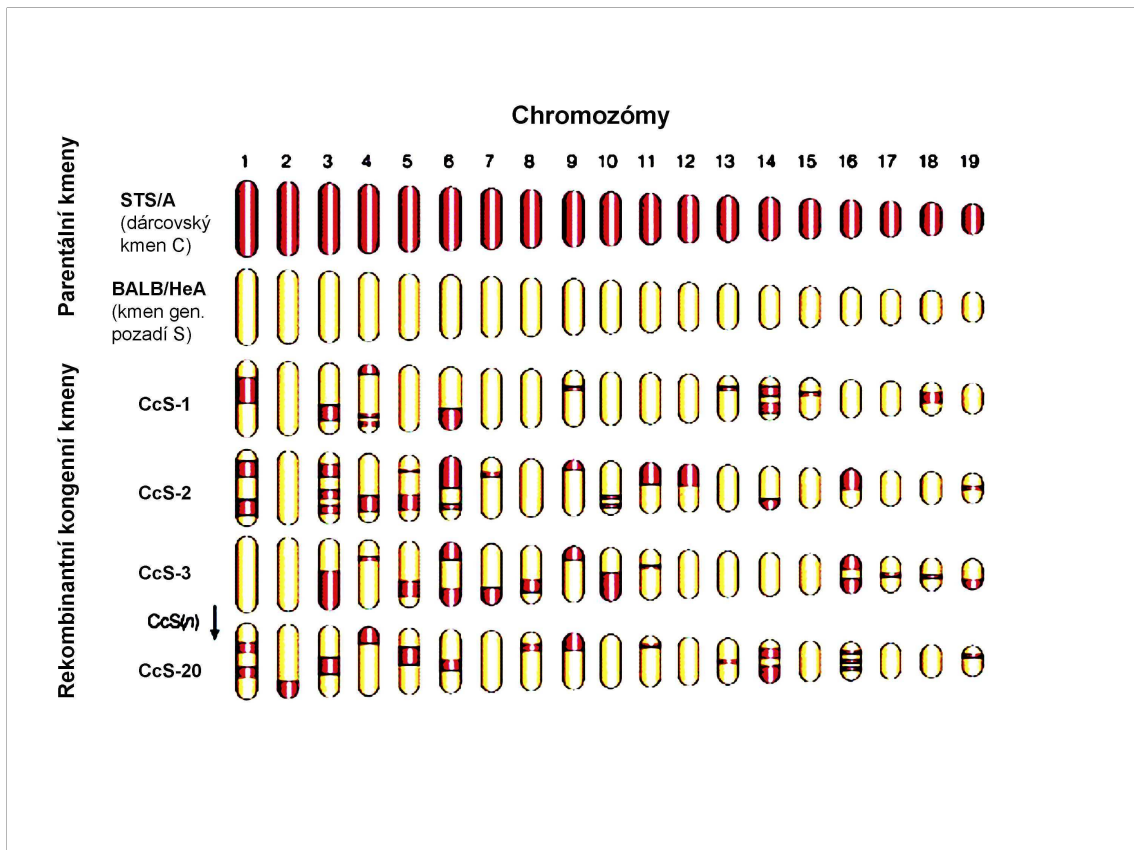
Vliv hostitelských genetických faktorů při infekci VKE stále není uspokojivě znám. Existují pouze sporadické studie založené na genotypizování pacientů s KE (Kindberg *et al.*, 2008; Barkhash *et al.*, 2011). Přítomnost konkrétního typu promotoru genu pro CD209 byla spojována se zhoršeným průběhem KE. Vážnější formy KE byly zaznamenány také u jedinců nesoucích specifický typ chemokínového receptoru pro CCR5. Nicméně pokusy zahrnující lidské subjekty představují určité omezení, proto jsme se v naší studii zaměřili na hledání vhodného modelu, který by v závislosti na genetickém pozadí vykazoval odlišný klinický průběh infekce. Pro studium komplexních reakcí u různých onemocnění a vlivu jejich genetického pozadí se objevuje stále více dostupných inbredních linií a více pokročilých systémů jako jsou rekombinantní inbrední kmeny, kongenní kmeny myši, rekombinantní kongenní kmeny a myši jiné linie vzniklé cíleným křížením (shrnutí Lipoldová *et Démant*, 2006)

1.2 Modelový organismus pro studium vlivu genetického pozadí na závažnost infekce

Pro účely naší studie byly zvoleny rekombinantní kongenní kmeny myši z řady CcS/Dem (Lipoldová *et Démant*, 2006). Příklad chromozomálních map zobrazuje **Obr. 1.5**.

Některé experimenty jsou jen obtížně zařaditelné do jednoduchého modelu a vhodnější je tedy posuzovat probíhající infekci z pohledu celé sítě vzájemně propojených interakcí (Lipoldová *et Démant*, 2006). Výhodou těchto kmenů je to, že nesledujeme pouze vliv jednoho majoritního genu, ale kombinace genů. Současně je možné selektivním křížením přesněji zmapovat polohu genu zodpovědného za daný projev. Takto je snížena komplexnost a tedy usnadněné mapování jednotlivých lokusů.

Kmeny z řady CcS/Dem byly úspěšně použity v pokusech, kdy byla sledována infekce prvoky *Leishmania* či *Trypanosoma* (Badalová *et al.*, 2002; Vladimirov *et al.*, 2003; Šíma *et al.*, 2011).



Obrázek 1.5 Genetická mapa rekombinantních kongenních myší řady CcS/Dem (dle Lipoldová *et* Démant, 2006)

Cílem naší práce bylo tedy nalézt myší model, u kterého by bylo možné sledovat odlišné klinické projevy ve vztahu k hostitelské genetické výbavě a zjistit, zda se jednotlivé kmeny liší v expresi imunologicky významných genů po infekci KE a porovnat klinické projevy s genovou expresí.

2. Cíle práce

1. Infikovat soubor myší různých kmenů z řady CcS/Dem virem klíšťové encefalidity; zaznamenat míru letality a střední dobu přežití u jednotlivých kmenů po intracerebrální a subkutánní inokulaci. Zaznamenat změny tělesné teploty a hmotnosti u infikovaných jedinců a stanovit titr viru ve vybraných orgánech v různých časových intervalech po infekci.
2. Stanovit změny exprese imunologicky významných genů v mozkové tkáni u vybraných kmenů myší ze souboru CcS/Dem po intracerebrální a subkutánní inokulaci virem klíšťové encefalidity.
3. Charakterizovat produkci neutralizačních protilátek u vybraných kmenů myší z řady CcS/Dem po infekci virem klíšťové encefalidity.

3. Materiál a Metody

3.1.1 Pokusná zvířata

V našich experimentech byly použity rekombinantní kongenní kmeny myší (RCS-„Recombinant Congenic Strains“) včetně jejich parentálních kmenů ze série BALB/c-c-STS/Dem (CcS/Dem) řady (Démant 1986). Původně vzniklých 20 CcS/Dem kmenů nese různou, náhodnou kombinaci 12,5 % genů z kmene STS/A a 87,5 % genů z BALB/cHeA kmene (Démant, 1986). V pokusech byly zahrnuty kmeny myší STS, BALB/c, CcS-3, CcS-4, CcS-7, CcS-9, CcS-11, CcS-12, CcS-15, CcS-16, CcS-18 a CcS-20. RCS kmeny myší byly laskavě poskytnuty doc. Marií Lipoldovou, CSc., vedoucí Oddělení molekulární a buněčné imunologie, Ústavu molekulární genetiky AVČR v Praze, na základě dohody o spolupráci. Jedinci byly infikováni virem KE ve stáří 12-15 týdnů. V pokusech byly použity jedinci samičího pohlaví.

Pokusné myši byly ustájeny v experimentálních „specific-pathogen free“ prostorách v plastových nádobách s podestýlkou z dřevěných hoblin. Myši měly k dispozici vodu a sterilní granulovanou potravu *ad libitum*. V experimentální místnosti byla udržována konstantní teplota 22 °C a 65% vlhkost vzduchu.

3.1.2 Buněčné linie

Pro plakovou titraci byla použita buněčná linie PS (“porcine kidney stable”; prasečí ledvina) (Inoue *et al.*, 1962). Tyto buňky byly kultivovány v médiu L15 (Leibowitz) (*Sigma*) s přídavkem 3 % prekolostrálního telecího séra (PTS), 1 % antibiotik a antimykotik (*Sigma*; penicilin, streptomycin, amphotericin B) a 1 % glutaminu při 37 °C. Pasáž byla prováděna suchou trypsinizací.

3.1.3 Inokulum

Myši byly injikovány virem klíšťové encefalitidy, kmen Neudoerfl (evropský prototypový kmen). Tento virus byl izolován z klíštěte *Ixodes ricinus* v Rakousku roku 1971. Biologické vlastnosti kmene Neudoerfl jsou důkladně popsány; je známa i jeho genomová sekvence (GenBank přístupové číslo U17495) a byla odhalena trojrozměrná struktura jeho obalového proteinu E (Rey *et al.*, 1995). V našich experimentech byla použita 4. mozková

pasáž viru (pasážována v mozcích sajících myšek - 4. MS), případně 5. pasáž viru (4. MS + jedna pasáž v klišťecích buňkách *Ixodes ricinus*). Zásobní virové suspenze byly uchovávány při teplotě -70 °C. Inokulace myši byla prováděna subkutánně (SC) na dorzální straně v oblasti krční páteře 10⁴ PFU (4. MS) v objemu 200 µl, nebo intracerebrálně (IC) v oblasti lebečního švu v objemu 80 PFU (5. pasáž viru přes klišťecí buňky) v objemu 20 µl. Virus byl vždy ředěn v kultivačním mediu pro PS buňky. Kontrolní myši byly inokulovány shodným způsobem, objemem a roztokem, neobsahujícím VKE.

3.1.4 Plaková titrace

Stanovení titru viru bylo prováděno metodou plakové titrace (De Madrid *et* Porterfield, 1969). Titr viru je určen množstvím replikace schopných virových částic vyjádřený v plakotvorných jednotkách (PFU, z angl. „plaque forming units“) v 1 ml testovaného vzorku. Pro plakovou titraci byly použity 24-jamkové panely. Testované vzorky byly naředěny desítkovou řadou v kultivačním mediu. Poté bylo do každé jamky přidáno 300 µl buněčné suspenze (PS buňky) v množství 1,1-1,4 x 10⁵ buněk (koncentrace 4-5 x 10⁵ buněk/ml) a obsah panelu byl řádně promíchán. Buňky byly inkubovány při 37 °C v atmosféře 0,5% CO₂. Po 4 hodinách inkubace byly buňky převrstveny 400 µl přelivu (roztok 3% karboxymethylcelulózy a 2x koncentrovaného kultivačního média v poměru 1:1). Inkubace probíhala po dobu 5 dní za teploty 37 °C v prostředí 0,5 % CO₂. Poté byly panely nejprve promyty ve fyziologickém roztoku a živé buňky byly obarveny roztokem naftalenové černě (1 g naftalenové černě, 60 ml ledové kyseliny octové, 13,6 g octanu sodného, doplněno do 1 l destilované vody). Po obarvení byl panel promyt proudem vody a usušen.

3.1.5 Záznam tělesné teploty, hmotnosti a střední doby přežití po SC VKE

Rozdíly ve střední době přežití a změny tělesné teploty a hmotnosti byly studovány u vybraných RCS kmenů myši, které jsou uvedeny v **Tab. 3.1**, včetně rozdělení do skupin.

Tab. 3.1 Počet myši zahrnutých v experimentu

	BALB/c	STS	CcS-3	CcS-7	CcS-9	CcS-11	CcS-15	CcS-16
infikované	10	10	10	10	10	10	6	7
kontrolní	5	2	4	3	2	2	1	2

V tomto experimentu byly myši inokulovány dávkou 10^3 PFU (5. pasáž viru). Monitorování myši bylo prováděno denně ve stejnou hodinu po celou dobu trvání pokusu (31 dní). Tělesná teplota a hmotnost byla měřena obden, a to pomocí rektálního teploměru BIO-TK9882 (*Bioseb*) a běžných laboratorních předvážek (AND HF300G). V případě vážení byly myši uspány inhalačním anestetikem.

3.1.6 Stanovení střední doby přežití po IC VKE

Pro stanovení střední doby přežití bylo použito celkem 95 myši (STS – 7 myši, BALB/c – 8 myši, CcS-3 – 7 myši, CcS-4 – 6 myši, CcS-7– 10 myši, CcS-9– 8 myši, CcS-11–9 myši, CcS-12– 8 myši, CcS-15– 6 myši, CcS-18– 6 myši a CcS-20– 6 myši). V pokuse byly kontrolní myši zahrnuti min. 2 jedinci od každého kmene. Kontrolní myši byly inokulovány shodným způsobem, objemem a roztokem, neobsahujícím VKE. Kontrola myši byla prováděna denně ve stejnou hodinu po celou dobu trvání pokusu (20 dní).

3.1.7 Změny genové exprese v mozkové tkáni po IC a SC VKE

Změny genové exprese byly studovány u třech kmenů STS, BALB/c, CcS-11.

V případě souboru myši inokulovaných SC byla pokusným jedincům měřena hmotnost a jednotlivé myši byly rozděleny do skupin dle projevů infekce (symptomatické/nesymptomatické), jak bylo popsáno dříve (Hayasaka *et al.*, 2010).

I v tomto případě byly zahrnuty neinfikované myši jako negativní kontroly. Pro další zpracování byli použiti 3 jedinci ze symptomatické skupiny a 3 kontrolní myši z daného kmene (CcS-11, BALB/c, STS).

Odběr vzorků u laboratorních myši po intracerebrální inokulaci byl prováděn v předem stanovené intervaly 2., 4., 6. a 7. DPI. V případě myši inokulovaných subkutánně byli jedinci zpracováni 13. DPI. V případě každého intervalu byli náhodně vybráni 3 jedinci z každé skupiny.

Každý mozek byl samostatně zvážen a zamražen (-70°C) pro další zpracování. Mozky byly homogenizovány kuličkovým homogenizátorem *TissueLyser II (Qiagen)* (30 kmitů/sec po dobu 3 minut) za vytvoření 20% (m/V) suspenze v PBS. Suspenze byla klarifikována centrifugací 14 000 g po 10 min v předchlazené centrifuze při 4°C . Odebraný supernatant byl zamražen (-70°C) pro pozdější zpracování plakovou titrací. Pelet mozkové tkáně byl uchován (-70°C) pro izolaci mRNA a následné stanovení míry exprese vybraných genů.

Veškeré vzorky byly během přípravy a následných pokusů uchovávány na ledu.

3.1.8 Izolace RNA

Pelet mozkové tkáně byl resuspendován ve 200 μ l PBS. 50 μ l této suspenze bylo použito pro izolaci RNA pomocí *RNeasy Mini Kit (Qiagen)*, dle protokolu výrobce. Purifikovaná RNA byla v posledním kroku izolace eluována z kolonky 60 μ l vymývacího pufru a poté skladována při -70°C .

3.1.9 Reverzní transkripce (RT-PCR)

Přepis izolované RNA do cDNA byl proveden kitem pro reverzní transkripci *High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems)*, dle instrukcí výrobce. Tento kit byl výrobcem doporučen pro následnou analýzu real-time PCR, kde získaná cDNA sloužila jako templátová DNA. Získané cDNA byly uchovávány při -70°C .

3.1.10 Real-time PCR

cDNA byla následně podrobena real-time PCR za účelem určení změn exprese vybraných genů v mozkové tkáni po infekci VKE. Pro real-time PCR byly použity *TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems)*, obdobně jak bylo popsáno dříve (Růžek *et al.*, 2011) (**Tab. 3.4**). Zastoupení jednotlivých složek v reakci, včetně celkového objemu vzorku, je uvedeno v **Tab. 3.3**. **Tab. 3.2** uvádí kombinace sond a primerů, které byly použity v našich experimentech pod daným identifikačním číslem od Applied Biosystems.

Tab. 3.2 Seznam použitých sond/primerů (*Applied Biosystems*)

Gen	Identifikační číslo
TNF α	Mm00443258_m1
INF γ	Mm 01168134_m1
MCP-1	Mm 00441242_m1
MIP-1 α	Mm00441258_m1
MIP-1 β	Mm00443111_m1
RANTES	Mm01302428_m1
CD4	Mm00442754_m1
CD8 β 1	Mm00438116_m1
CD11 β	Mm00434455_m1
CD19	Mm00515420_m1
IL-1 α	Mm00439620_m1
IL-1 β	Mm01336189_m1
IL-6	Mm00446190_m1
IL-2	Mm00434256_m1
IL-5	Mm00439646_m1
IL-10	Mm00439614_m1
IP-10	Mm00445235_m1
ACTB	4352933E

Tab. 3.3 Zastoupení jednotlivých komponent v PCR reakci

komponenty PCR vzorku	Celkový objem vzorku 20 μ l
primer/sonda	1 μ l
2X TaqMan® Gene Expression Master Mix	10 μ l
cDNA templát	1 μ l
RNase-free water	8 μ l

Tab. 3.4 Podmínky amplifikace

Krok	UNG* Inkubace	AmpliTaq Gold Aktivace	PCR	
			Cykly (40 cyklů)	
			Denaturace	Přisedání primerů/ elongace
Teplota	50°C	95°C	95°C	60°C
Čas	2 min	10 min	15 sec	1 min

*UNG (uracil N-glykosyláza)

Reakce probíhala na přístroji *Rotor Gene-3000 (Corbett Research)* a byla monitorována a vyhodnocena pomocí programu *Rotor-Gene 6.0.19 (Corbett Research)*. Pro další výpočty byla užita tzv. CT hodnota, tj. číslo cyklu, kdy nastává exponenciální fáze amplifikace (z angl. „theshold cycle“), kalkulována automaticky pomocí uvedeného programu.

Míra změny exprese sledovaného genu byla provedena srovnávací CT metodou a vyjádřena jako násobná změna exprese vzniklá porovnána s expresí genu, jehož exprese se udržuje na konstantní hladině, dále jen HKG (z angl. „housekeeping gene“). V naší studii byl coby HKG použit myší beta aktin. Pro výpočet násobné změny exprese byla CT hodnota HKG odečtena od CT hodnoty cílového genu (ΔCT). Změna exprese normalizovaného genu jako výsledek experimentálního zásahu, v našem případě infekce VKE, je pak vyjádřena jako $2^{-\Delta\Delta CT}$, kde $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{vzorku (infekce)}} - \Delta CT_{\text{kontroly (bez infekce)}}$ (Babu *et* Nutman, 2003).

3.1.11 Neutralizační test (NT)

NT byl proveden z předchozích odběrů krve ze souboru myší po subkutánní inokulaci po odběrech v různé časové intervaly pro kmen CcS-11, BALB/c a STS.

Vzorky sér byly ředěny 1:4 v kultivačním mediu a inkubovány po dobu 30 min při 56°C pro inaktivaci komplementu a rozrušení termolabilních nespecifických virových inhibitorů. Poté byla séra rozředěna v 96-jamkovém panelu dvojkovou ředící řadou, v kultivačním mediu pro PS buňky. Následně byla do každé jamky přidána virová suspenze v objemu 50 μ l (10^4 PFU/jamka). Následovala inkubace 90 minut při teplotě 37 °C, 0,5 % CO₂, která sloužila k vytvoření komplexu protilátka virus. Po uplynutí tohoto časového intervalu byla přidána suspenze PS buněk o koncentraci 5×10^4 na jamku v objemu 100 μ l. Po dobu následujících šesti dní byl panel inkubován při 37 °C, 0,5 % CO₂. Po uplynutí této

inkubace byl po obarvení (viz „Plaková titrace“) odečten titr protilátek jako limitní ředění, při kterém byl jasně patrný cytopatický efekt (80-100 % lyzovaných buněk). Pozitivní a negativní kontroly byly provedeny v triplikaci. Pozitivní kontrola představovala PS buňky bez přidaného viru a séra a negativní kontrola s přidaným virem, bez séra.

3.1.12 Statistické vyhodnocení výsledků

Statistická analýza byla provedena pomocí počítačového programu *GraphPad Prism 5.00* (*GraphPad Software, Inc.*). Střední doba přežití u jednotlivých kmenů myší infikovaných VKE byla vyhodnocena pomocí Survival Analysis (Log-rank Mantel-Cox Test). Rozdíly v titru neutralizujících protilátek, množství viru v orgánech a rozdíly v expresi daného genu v mozkové tkáni byly vyhodnocovány pomocí jednocestné analýzy variance (Newman-Keuls Multiple Comparison Test). U hodnot, které nevykazovaly homogenní rozdělení, byla data logaritmována. Výsledky, jejichž hladina významnosti p byla menší než 5 % ($p < 0,05$), jsou považovány za statisticky signifikantní a jsou v grafech označeny hvězdičkou.

4. Výsledky

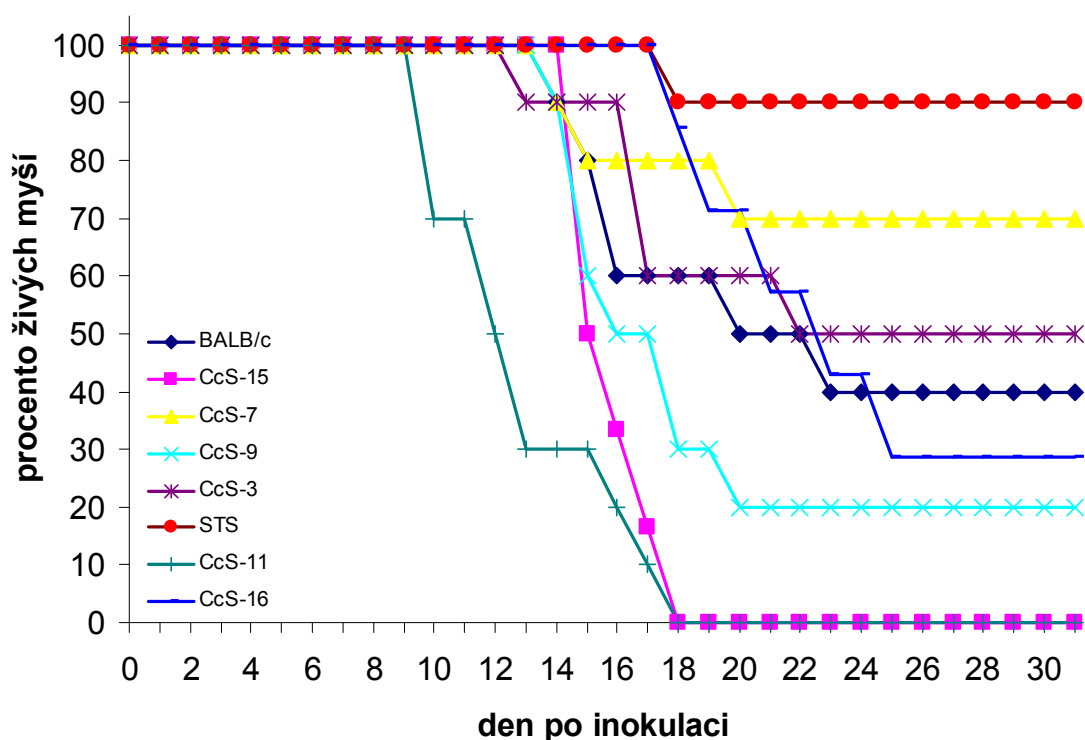
4.1.1 Sledování změn tělesné teploty, hmotnosti a střední doby přežití vybraných kmenů myši řady CcS/Dem po SC VKE

Mezi jednotlivými kmeny myši byly nalezeny významné rozdíly ($p < 0,05$) ve středních dobách přežití. Nejdelší střední dobu přežití měl v tomto případě parentální kmen STS ($29,7 \pm 4,1$ dnů) a nejkratší dobou přežití projevoval kmen CcS-11 ($13,1 \pm 3,0$ dnů) (**Tab. 4.1**). Mezi další kmeny, které se projevovaly kratší dobou přežití než parentální kmen BALB/c, patří kmeny CcS-15 a CcS-9 (**Obr. 4.1**)

Po SC VKE u všech myši docházelo k obdobnému poklesu hmotnosti v intervalu od 10. do 22. DPI. Nicméně rekonvalescence se u jednotlivých kmenů lišila. Nejrychlejší návrat k fyziologickým hodnotám v porovnání s negativními kontrolami byl pozorován u kmene STS (od 18. do 24. DPI). U ostatních přeživších kmenů (BALB/c, CcS-16, CcS-3, CcS-7, CcS-9) byla snížená hmotnost pozorována delší dobu v porovnání s negativní kontrolou a počáteční hmotností (**Obr. 4.2**).

V případě změn tělesných teplot (**Obr. 4.3**) nedošlo u kmene STS k výraznějším změnám. Určitý pokles tělesné teploty byl ale patrný u ostatních kmenů (BALB/c, CcS-16, CcS-3, CcS-7, CcS-9, CcS-11 a CcS-15) (**Obr. 4.3**).

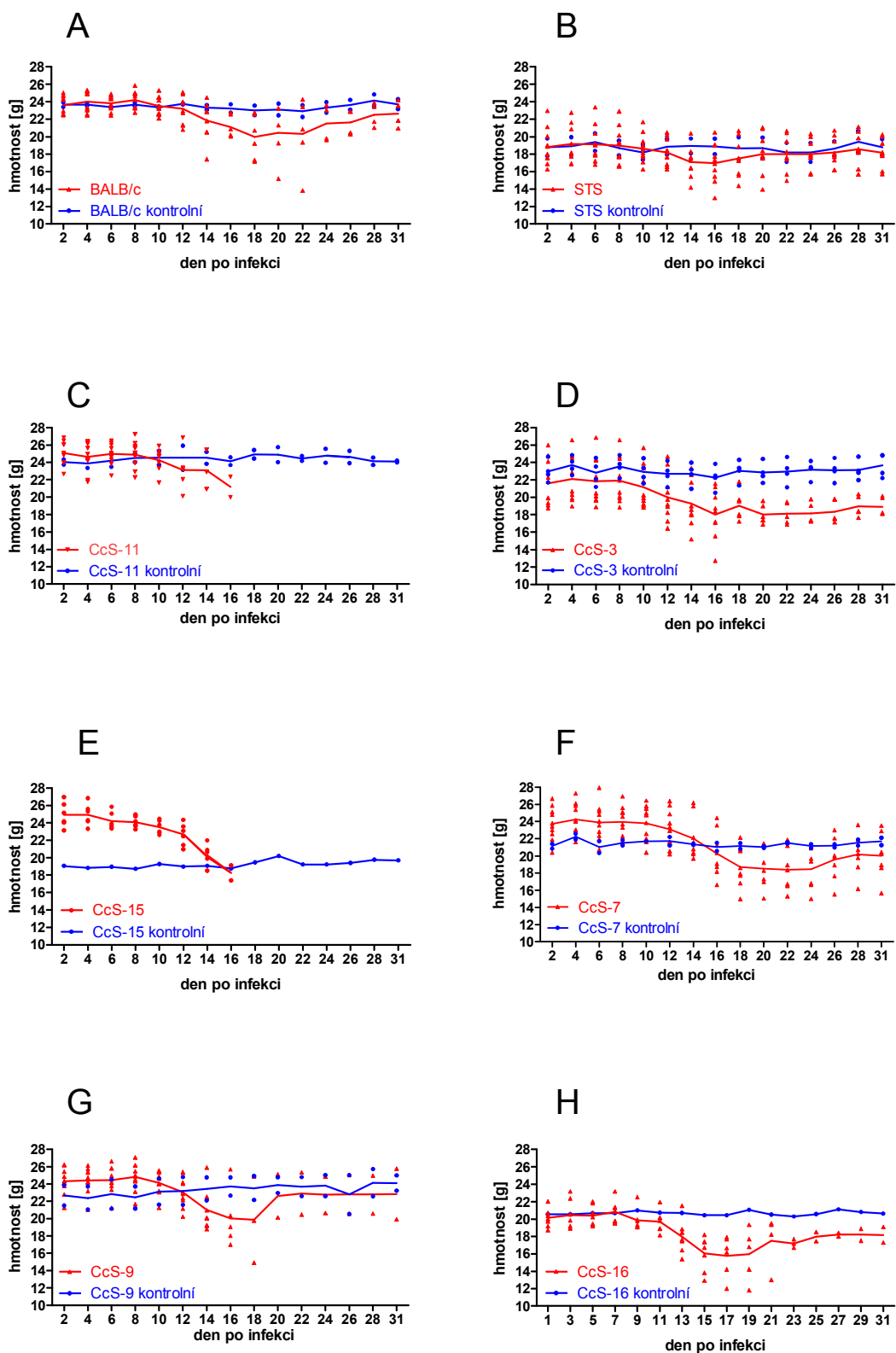
Sledování změn tělesné hmotnosti a teploty mělo za cíl orientačně vyhodnotit průběh infekce.



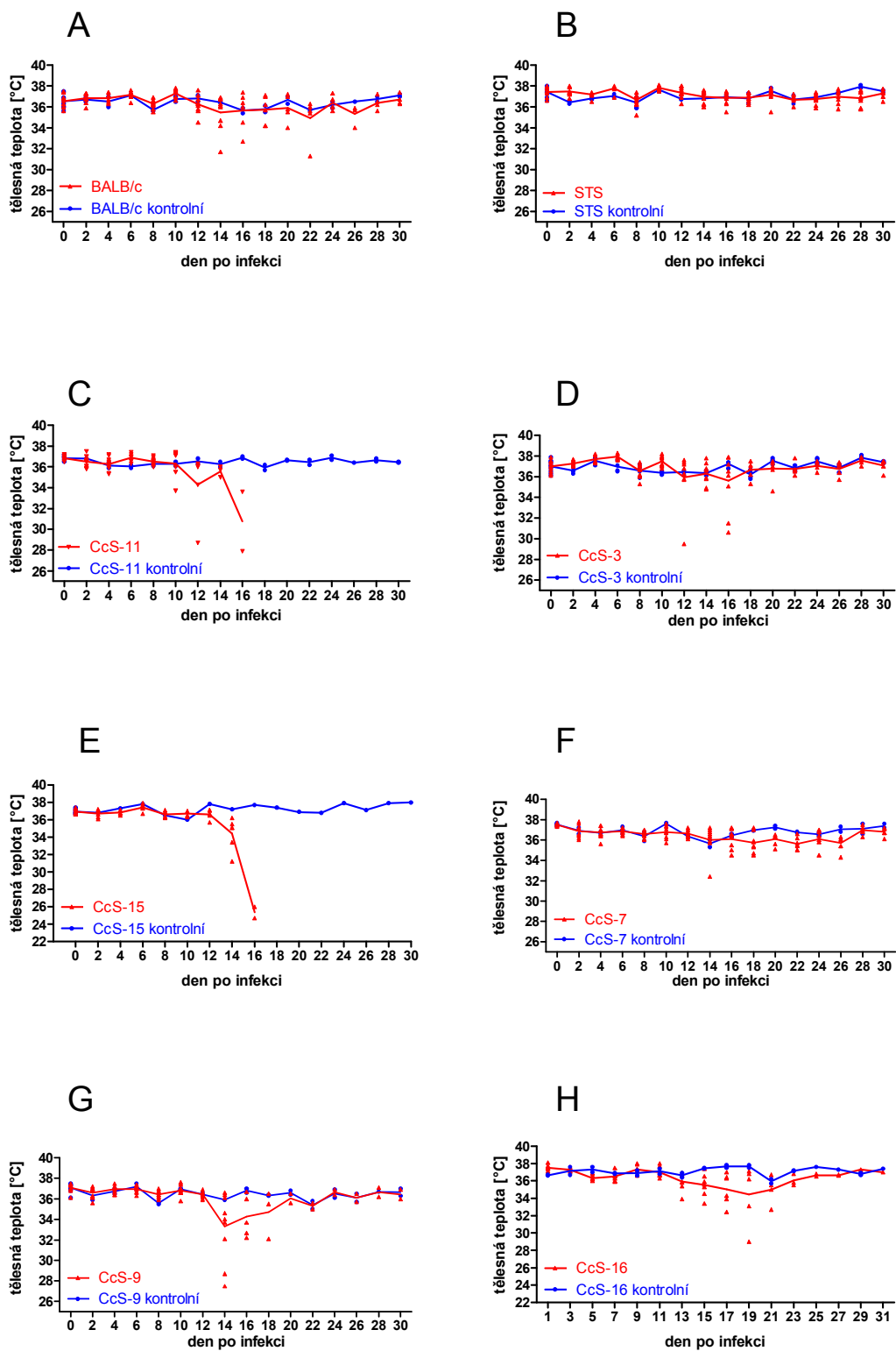
Obr. 4.1 Záznam letality vybraných kmenů myší z řady CcS/Dem po SC VKE při měření tělesných teplot a hmotností (přežití mezi jednotlivými kmeny bylo významně rozdílné, $p < 0,005$)

Tab. 4.1 Střední doby přežití u vybraných kmenů myší z řady CcS/Dem po SC VKE

Kmen myší	BALB/c	STS	CcS-3	CcS-7	CcS-9	CcS-11	CcS-15	CcS-16
Střední doba přežívání [dny]	22,8	29,7	24,1	26,6	19,3	13,1	16,0	24,0
Směrodatná odchylka [dny]	±7,5	±4,1	±7,6	±7,2	±6,4	±3,0	±1,3	±5,3
Počet myší, které přežily / celkový počet myší	4/10	9/10	5/10	7/10	2/10	0/10	0/6	2/7



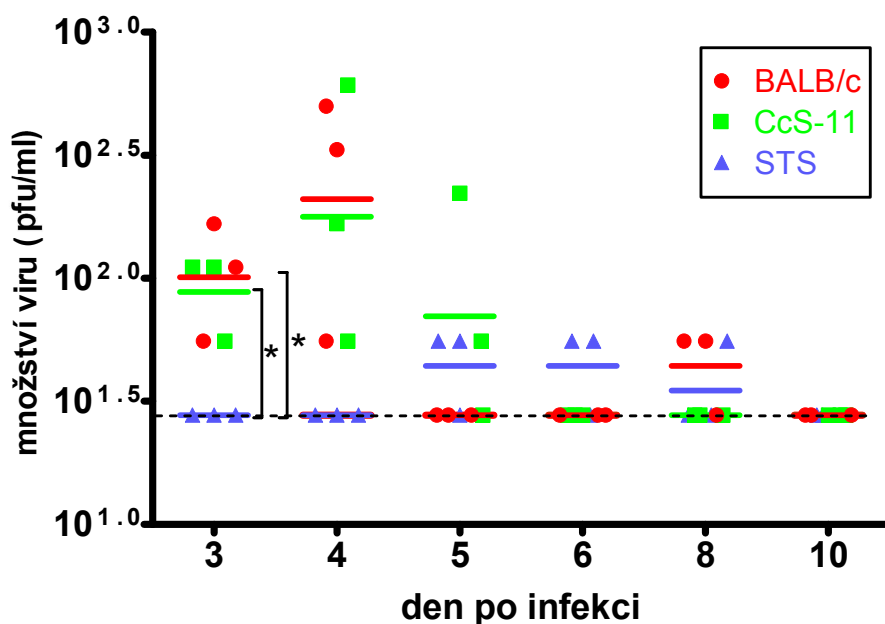
Obr. 4.2 Vliv infekce po SC VKE na změnu tělesné hmotnosti u jednotlivých vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem



Obr. 4.3 Vliv infekce po SC VKE na změnu tělesné teploty u jednotlivých vybraných kmenů myší z řady CcS/Dem

4.1.2 Titr viru v krvi vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem po SC VKE

Po SC VKE jsme zaznamenali virémii u kmenů CcS-11 a BALB/c vrcholící 4. DPI. U kmene STS byla pozorována velmi nízká virémie 5.-8. DPI. V případě 3. DPI se titr viru v séru u BALB/c a CcS-11 výrazně lišil od kmene STS ($p < 0,05$) (**Obr. 4.4**).



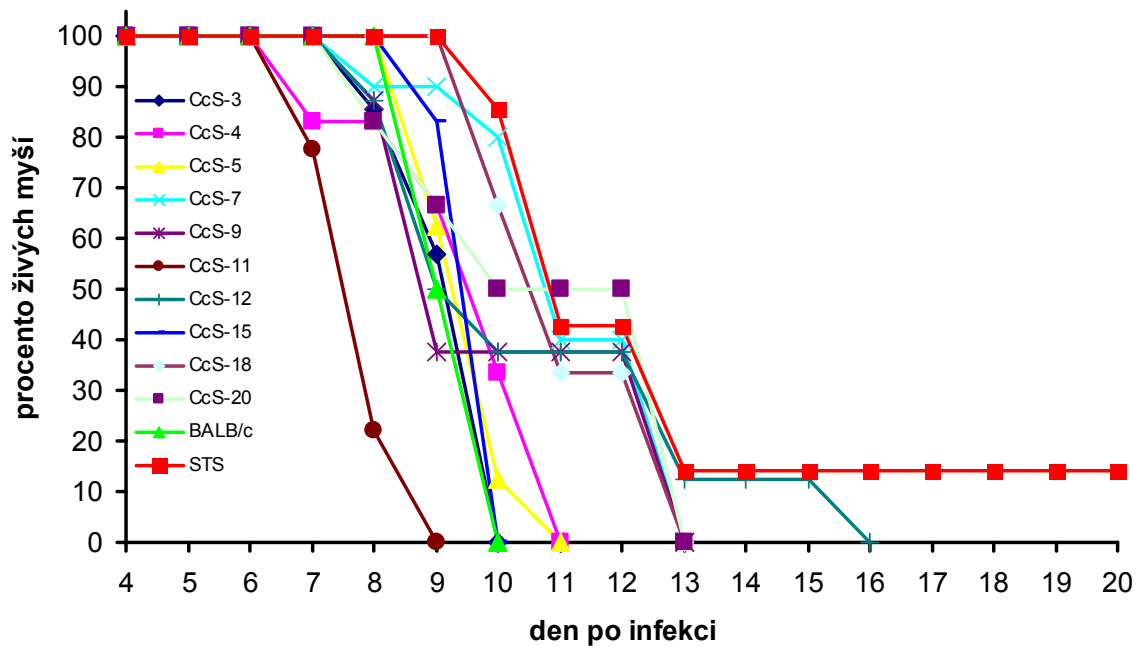
Obr. 4.4 Graf závislosti množství viru v krvi na dni po SC VKE

Úsečka mezi jednotlivými body ($n=3$ /kmen) znázorňuje průměrnou hodnotu titru viru u daného kmene v daný časový interval. Detekční mez je v grafu znázorněna přerušovanou čarou. * = $p < 0,05$

4.1.3 Přežívání vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem po IC VKE

Průběh a následky infekce VKE, jak již bylo v úvodu řečeno, úzce souvisí s průběhem infekce v tkáni centrální nervové soustavy a její neuropatogenezi (Růžek *et al.*, 2009). Z toho důvodu bylo provedeno srovnání letality a střední doby přežití u jednotlivých vybraných kmenů z řady CcS/Dem po IC VKE. Myši byly inokulovány v oblasti lebečního švu virem VKE (80 PFU, Neudoerfl) (**Obr. 4.5**).

Nejdelší střední dobu přežití po IC VKE projevily kmen STS ($12,4 \pm 2,7$ dnů) a nejkratší střední dobou přežití se vykazoval kmen CcS-11 ($8,0 \pm 0,7$ dnů) (**Tab. 4.2**).



Obr. 4.5 Graf závislosti přežívání vybraných kmenů myší z řady CcS/Dem na dnech po IC VKE (přežití mezi jednotlivými kmeny bylo významně rozdílné, $p < 0,0001$)

Tab. 4.2 Střední doby přežití u vybraných kmenů myší z řady CcS/Dem po IC VKE

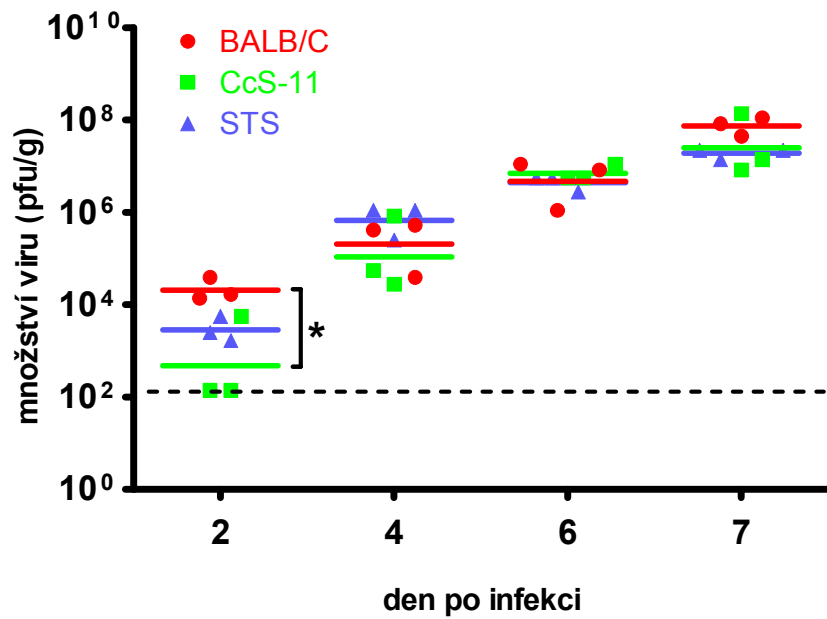
Kmen myší	CcS-3	CcS-4	CcS-5	CcS-7	CcS-9	CcS-11	CcS-12	CcS-15	CcS-18	CcS-20	BALB/c	STS
Střední doba přežívání [dny]	9,4	9,7	9,8	11,4	10,4	8,0	10,9	9,8	11,3	11,0	9,5	12,4
Směrodatná odchylka [dny]	±0,8	±1,5	±0,7	±1,6	±2,2	±0,7	±2,8	±0,4	±1,4	±2,3	±0,5	±2,7
Počet myší, které přežily / celkový počet myší	0/7	0/6	0/8	0/10	0/8	0/9	0/8	0/6	0/6	0/6	0/8	1/7

4.1.4 Titr viru v mozkové tkáni vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem po IC a SC VKE

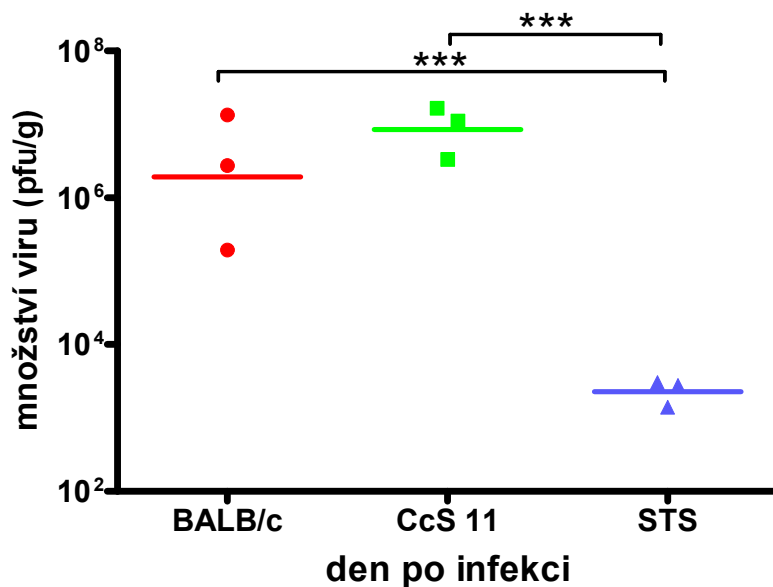
Na základě předchozích výsledků byly k veškerým dalším experimentům vybrány pouze tyto tři kmeny: CcS-11, BALB/c a STS.

Po IC VKE byly mozky v dané časové intervaly vyjmuty a spracovány plakovou titrací. Po celou dobu pokusu docházelo k nárůstu titru viru. Mezi jednotlivými kmeny nebyly pozorovány významné rozdíly v titru v mozkové tkáni s výjimkou dne 2. DPI, kdy byl zaznamenán rozdíl mezi kmeny CcS-11 a BALB/c ($p < 0,05$) (**Obr. 4.6 A**).

Po SC VKE ve 13. DPI jsme zaznamenali výrazné rozdíly v titru viru mezi kmeny po SC VKE (STS vs. BALB/c a CcS-11; $p < 0,005$). Pro tento pokus byly použity pouze myši projevující příznaky KE. (**Obr. 4.6 B**).



A



B

Obr. 4.6 Graf závislosti množství viru v mozkové tkáni na dni po infekci u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem po IC a SC VKE
 Graf A zobrazuje titr v mozkové tkáni po IC VKE, graf B zobrazuje titr viru po SC VKE ve 13. DPI. Úsečka mezi jednotlivými body (n=3/kmen) znázorňuje průměrnou hodnotu titru viru u daného kmene v daný časový interval. Detekční mez je v grafu A znázorněna přerušovanou čarou. * = p<0,05; ** = p<0,005; *** = p<0,005

4.1.5 Změny exprese na úrovni mRNA imunologicky významných genů po SC a IC VKE u vybraných kmenů myší z řady CcS/Dem v mozkové tkáni

Sledování změn exprese genů bylo provedeno u kmenů STS a BALB/c, které byly srovnány mezi sebou a kmenem CcS-11.

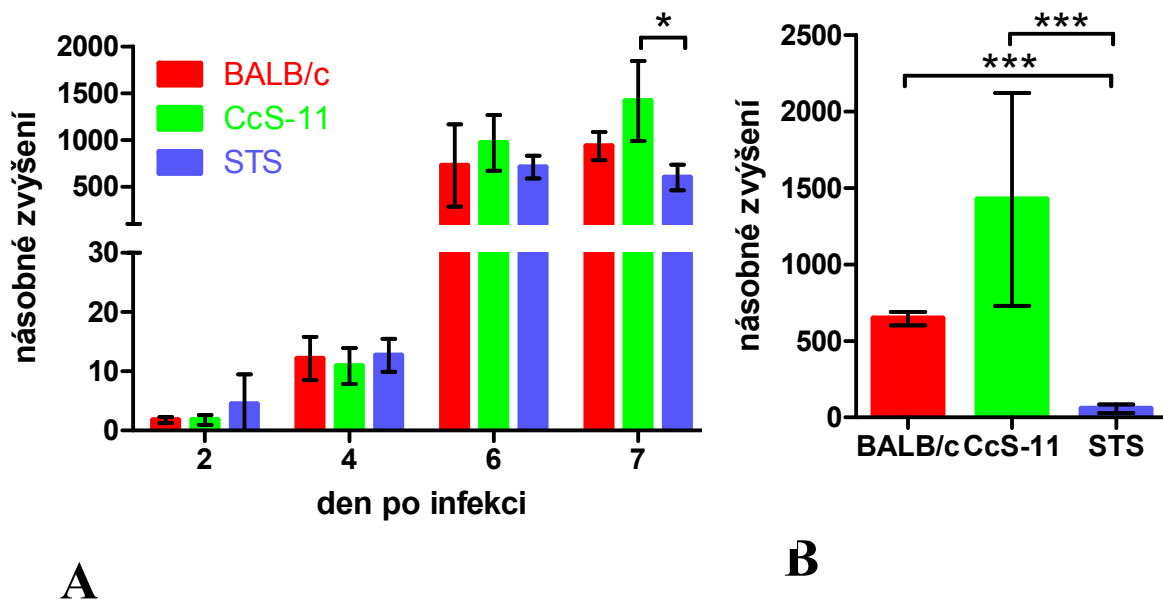
Zaměřili jsme se na změny exprese na úrovni mRNA u těchto genů: INF γ , MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, CD4, CD8 β 1, CD11 β , CD19, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-2, IL5, IL-10, IP-10.

U kontrolních jedinců byl srovnán rozdíl hodnot mezi CT HKG a CT kontrolních jedinců za účelem určení bazální míry exprese studovaných genů. (**Příloha A**)

Příklad průběhu RT-PCR je zobrazen v grafu (**Příloha B**).

INF γ

Změna exprese INF γ na úrovni mRNA byla nejvýraznější u CcS-11 a to jak po IC tak po SC. Po IC VKE došlo ke zvýšené expresi genu na úrovni mRNA. Prokazatelně rozdílné ($p < 0,05$) hodnoty v expresi tohoto genu byly zaznamenány 7. DPI (CcS-11 vs. STS; $p < 0,05$) (Obr. 4.7 A). Ve 13. DPI po SC VKE byl sledován významný rozdíl STS vs. CcS-11, a BALB/c ($p < 0,0005$) (Obr. 4.7 B).

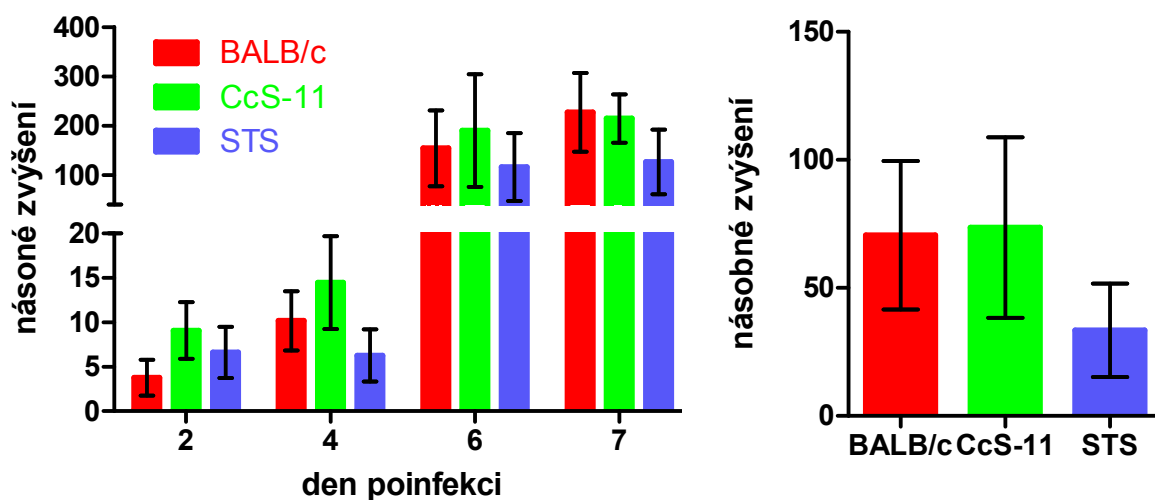


Obr. 4.7 Násobné zvýšení exprese genu pro INF γ na úrovni mRNA u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem v mozkové tkáni

Graf A (INF γ IC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po IC VKE v jednotlivé časové intervaly (2., 4., 6. a 7. DPI) zatímco B (INF γ SC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po SC ve 13. DPI. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,0005$

TNF α

V případě změny exprese genu pro TNF α na úrovni mRNA nebyla mezi vybranými kmeny z CcS/Dem řady nalezena žádná statisticky významná odlišnost a to ani v případě SC VKE ani IC VKE. Změny v expresi TNF α po SC ve 13. DPI nedosahovaly tak vysokých hodnot jako v případě intracerebrálního podání (**Obr. 4.8**).



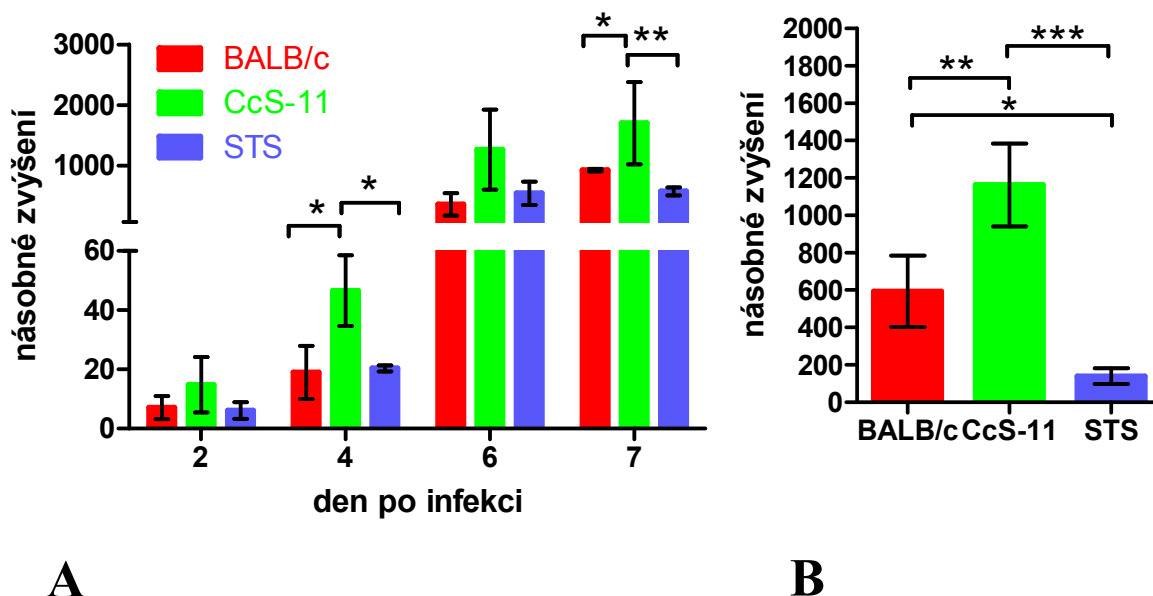
A

B

Obr. 4.8 Násobné zvýšení exprese genu pro TNF α na úrovni mRNA u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem v mozkové tkáni
Graf A (TNF α IC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po IC VKE v jednotlivé časové intervaly (2., 4., 6. a 7. DPI) zatímco B (TNF α SC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po SC VKE ve 13. DPI.

MCP-1

Změna exprese genu pro MCP-1 na úrovni mRNA se projevila významnými rozdíly 4. DPI (CcS-11 vs. BALB/c a STS, $p < 0,05$) a 7. DPI (CcS-11 vs. BALB/c, $p < 0,05$; CcS-11 vs. STS, $p < 0,05$) po IC VKE (**Obr. 4.9 A**). V případě SC VKE byly pozorovány rozdíly v expresi mezi všemi zahrnutými kmeny (CcS-11 vs. BALB/c, $p < 0,005$; CcS-11 vs. STS, $p < 0,0005$; BALB/c vs. STS, $p < 0,05$)(**Obr. 4.9 B**).



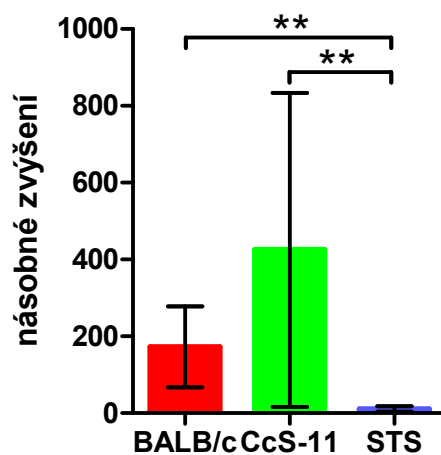
Obr. 4.9 Násobné zvýšení exprese genu pro MCP-1 na úrovni mRNA u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem v mozkové tkáni

Graf A (MCP-1 IC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po IC VKE v jednotlivé časové intervaly (2., 4., 6. a 7. DPI) zatímco B (MCP-1 SC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po SC VKE ve 13. DPI. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$

MIP-1 α

Statisticky významná rozdílnost byla zjištěna ve 13. DPI po SC VKE (STS vs. BALB/c a CcS-11; $p < 0,005$) (Obr. 4.10).

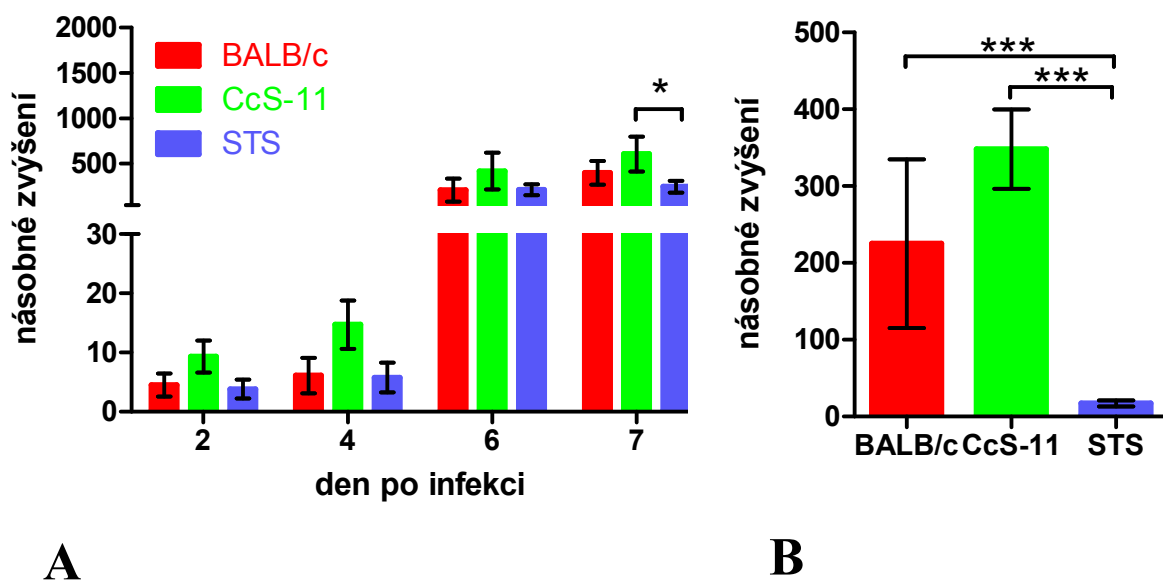
Hodnoty CT u některých vzorků po IC VKE byly jen obtížně zaznamatelné a shledány zavádějící, proto byl graf z výsledků vyřazen.



Obr. 4.10 Násobné zvýšení exprese genu pro MCP-1 na úrovni mRNA u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem v mozkové tkáni po SC VKE ve 13. DPI. **= $p < 0,005$

MIP-1 β

Rozdíly v expresi genu na úrovni mRNA pro gen MIP-1 β u vybraných kmenů myší se projevil 7. DPI (CcS-11 vs. STS, $p < 0,05$) (Obr. 4.11 A) po IC VKE a 13. DPI (CcS-11 vs. BALB/c a STS, $p < 0,0005$) (Obr. 4.11 B).



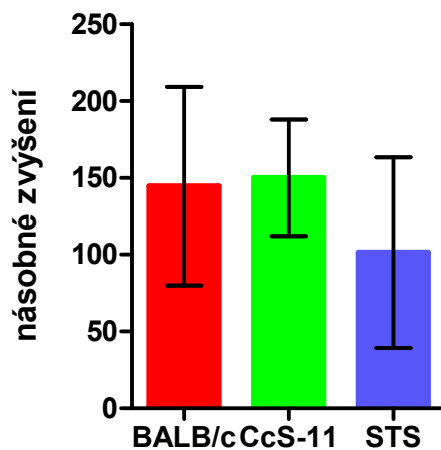
Obr. 4.11 Násobné zvýšení exprese genu pro MIP-1 β na úrovni mRNA u vybraných kmenů myší z řady CcS/Dem v mozkové tkáni

Graf A (MIP-1 β IC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po IC VKE v jednotlivé časové intervaly (2., 4., 6. a 7. DPI) zatímco B (MIP-1 β SC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po SC VKE ve 13. DPI. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,0005$

IL-10

13. DPI po SC nebyly potvrzeny žádné významné rozdíly v expresi genu pro IL-10 na úrovni mRNA mezi žádnými z vybraných kmenů (**Obr. 4.12**).

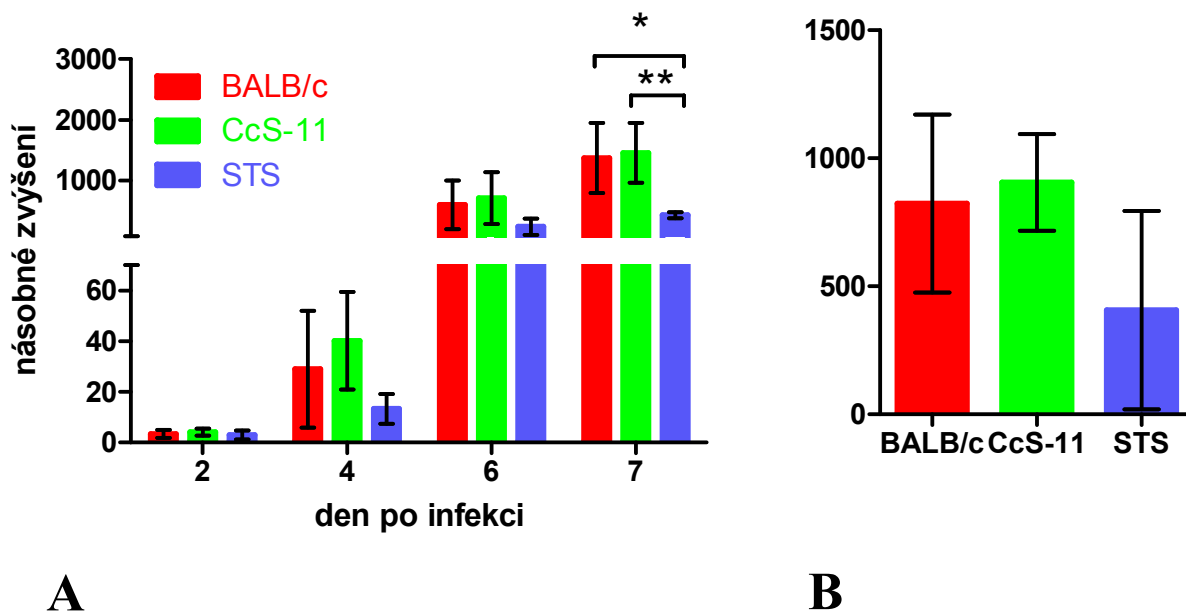
Hodnoty CT u některých vzorků po IC VKE byly jen obtížně zaznamatelné, proto byly tyto výsledky vyřazeny.



Obr. 4.12 Násobné zvýšení exprese genu pro IL-10 na úrovni mRNA u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem v mozkové tkáni po SC VKE ve 13. DPI

RANTES

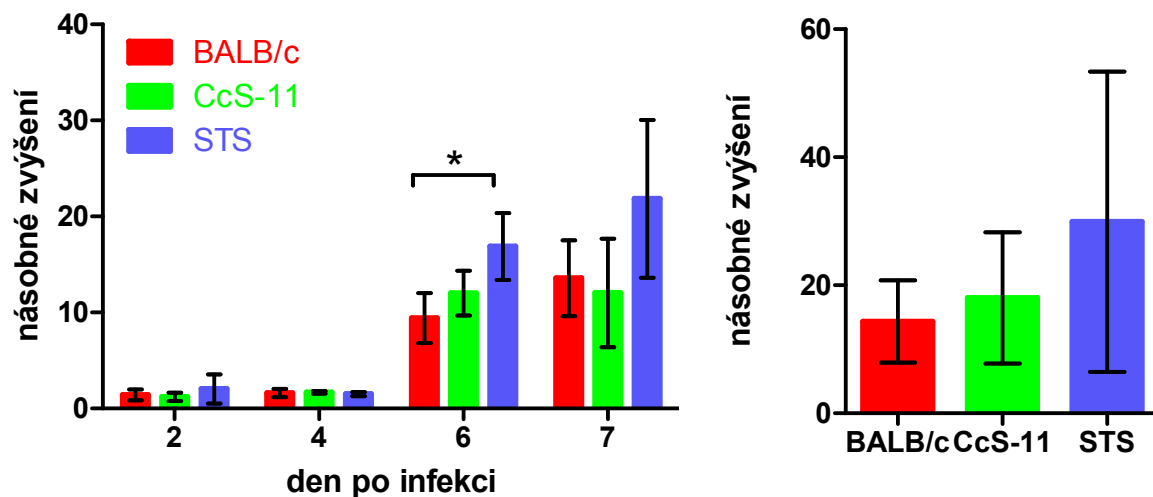
Exprese genu RANTES na úrovni mRNA u vybraných kmenů myši byla v případě IC VKE významně odlišná v 7. DPI (BALB/c vs. STS, $p < 0,05$; CcS-11 vs. STS; $p < 0,005$) (Obr. 4.13 A). V případě SC VKE nebyly prokázány statisticky významné rozdíly mezi skupinami ve 13. DPI (Obr. 4.13 B).



Obr. 4.13 Násobné zvýšení exprese genu pro RANTES na úrovni mRNA u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem v mozkové tkáni
Graf A (RANTES IC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po IC VKE v jednotlivé časové intervaly (2., 4., 6. a 7. DPI) zatímco B (RANTES SC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po SC VKE ve 13. DPI. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$

CD4

Mezi jednotlivými kmeny se rozdíl exprese genu pro CD4 na úrovni mRNA projevil jako významný v 6. DPI (BALB/c vs. STS, $p < 0,05$) po IC VKE (**Obr. 4.15 A**). 13. DPI po SC VKE nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly v expresi (**Obr. 4.15 B**).



A

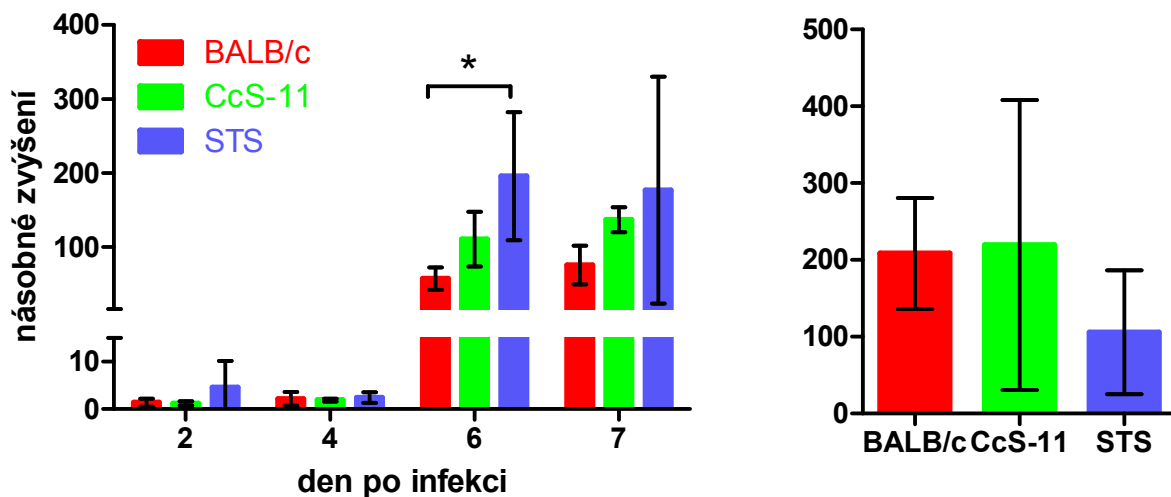
B

Obr. 4.15 Násobné zvýšení exprese genu pro CD4 na úrovni mRNA u vybraných kmenů myší z řady CcS/Dem v mozkové tkáni

Graf A (CD4 IC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po IC VKE v jednotlivé časové intervaly (2., 4., 6. a 7. DPI) zatímco B (CD4 SC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po SC VKE ve 13. DPI. * = $p < 0,05$

CD8 β 1

Rozdíl exprese genu pro CD8 β 1 na úrovni mRNA byl významný 6. DPI (BALB/c vs. STS, $p < 0,05$) po IC VKE (**Obr. 4.16 A**). 13. DPI po SC VKE nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly v expresi (**Obr. 4.16 B**).



A

B

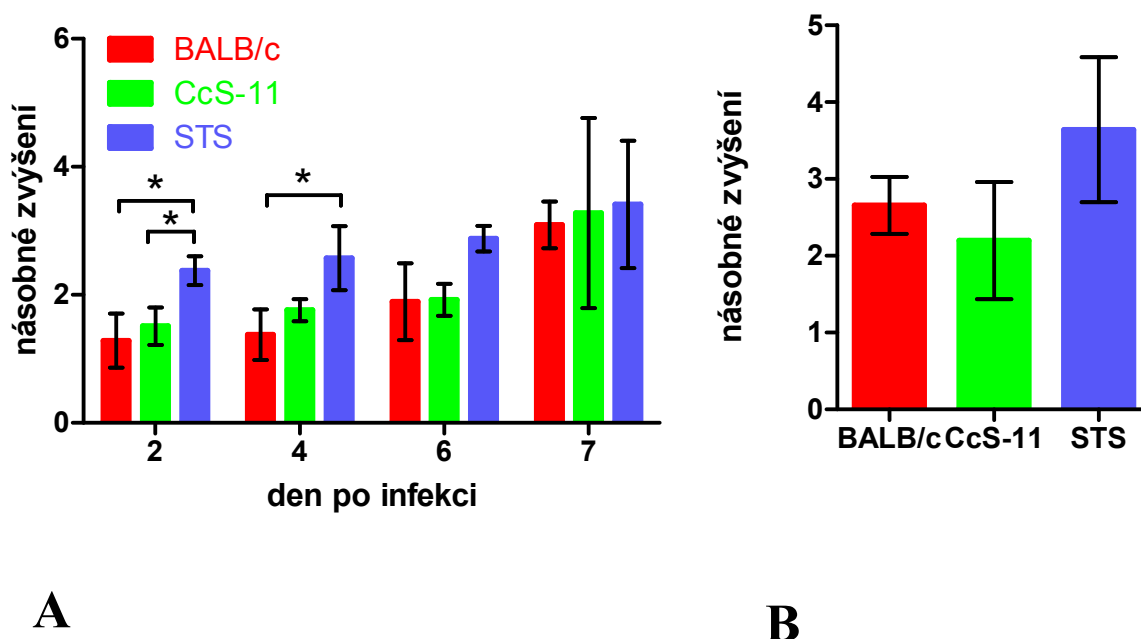
Obr. 4.16 Násobné zvýšení exprese genu pro CD8 β 1 na úrovni mRNA u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem v mozkové tkáni

Graf A (CD8 β 1 IC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po IC VKE v jednotlivé časové intervaly (2., 4., 6. a 7. DPI) zatímco B (CD8 β 1 SC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po SC VKE ve 13. DPI. * = $p < 0,05$

CD11 β

Násobné zvýšení exprese genu pro CD11 β na mRNA úrovni dosahovalo pouze nízkých hodnot. Nicméně i přesto se mezi jednotlivými kmeny projevilo významně odlišnými výsledky již 2. DPI (STS vs. BALB/c a CcS-11, $p < 0,05$) a 4. DPI (BALB/c vs. STS, $p < 0,05$) po IC VKE (**Obr. 4.17 A**). Narozdíl od 13. DPI po SC VKE, kdy nebyly potvrzeny žádné statisticky významné rozdíly v expresi genu pro CD11 β (**Obr. 4.17 B**).

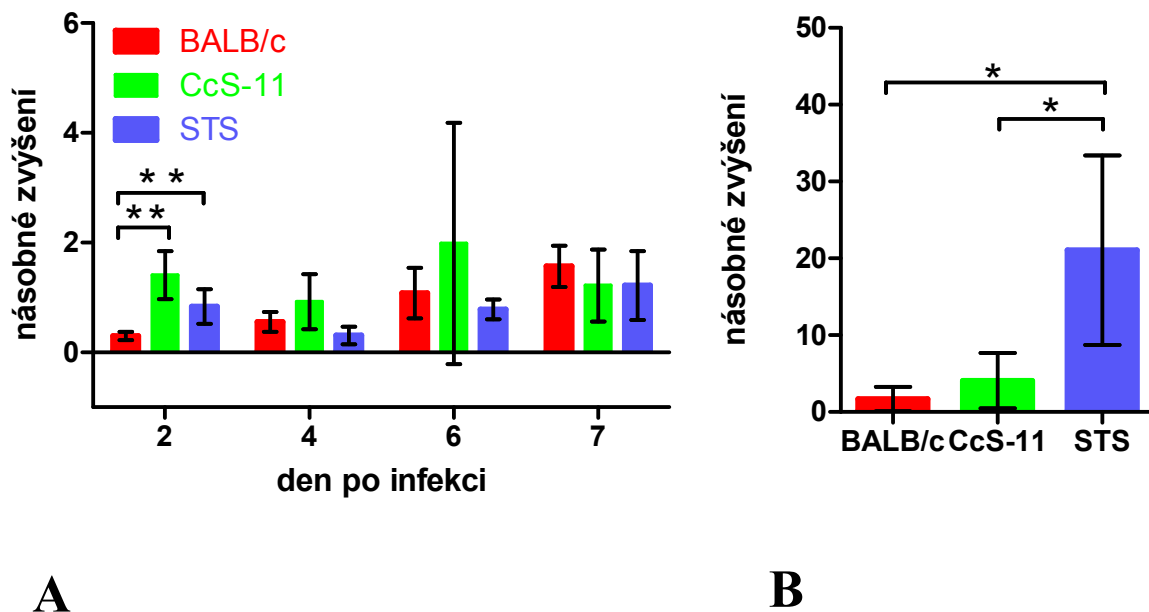
Basální exprese genu pro CD11 β na mRNA úrovni pro BALB/c ($5,56 \pm 0,44$) se výrazně odlišovala od zbývajících dvou kmenů STS ($12,89 \pm 0,39$) a CcS-11 ($13,21 \pm 0,25$) a to jak v případě IC tak u SC VKE (**Příloha A**).



Obr. 4.17 Násobné zvýšení exprese genu pro CD11 β na úrovni mRNA u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem v mozkové tkáni
Graf A (CD11 β IC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po IC VKE v jednotlivé časové intervaly (2., 4., 6. a 7. DPI) zatímco B (CD11 β SC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po SC VKE ve 13. DPI. * = $p < 0,05$

CD19

Exprese genu pro CD19 na mRNA úrovni se mezi kmeny prokazatelně lišila již 2. DPI (BALB/c vs. STS a CcS-11, $p < 0,005$) po IC VKE, ovšem v dalších intervalech se významně nelišila (**Obr. 4.18 A**). V případě 13. DPI po SC VKE byly zaznamenány významné rozdíly v expresi daného genu (STS vs. BALB/c a CcS-11, $p < 0,05$) (**Obr. 4.18 B**).



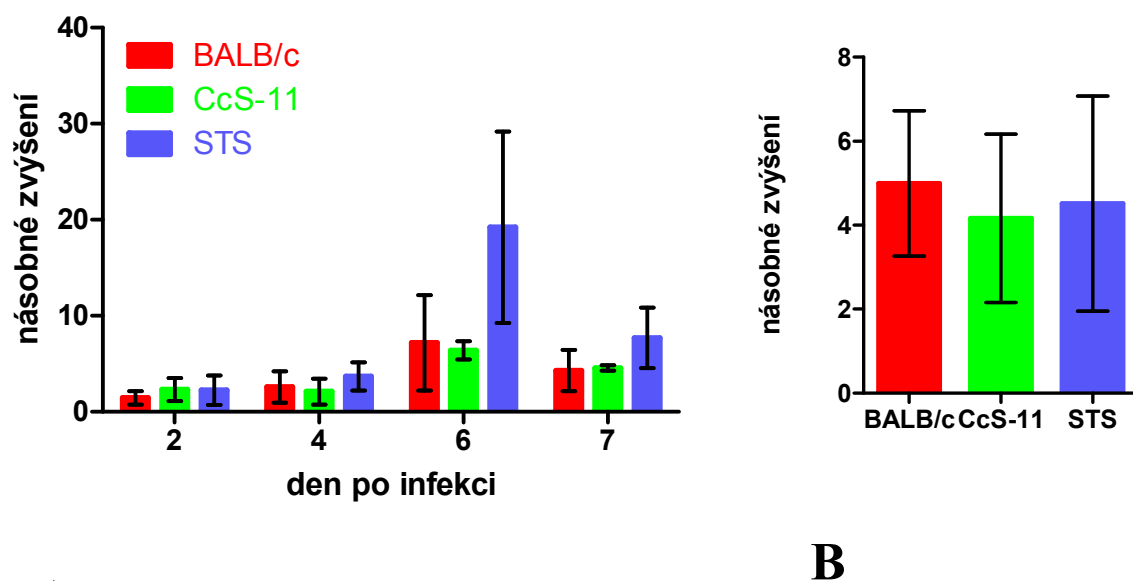
Obr. 4.18 Násobné zvýšení exprese genu pro CD19 na úrovni mRNA u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem v mozkové tkáni

Graf A (CD19 IC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po IC VKE v jednotlivé časové intervaly (2., 4., 6. a 7. DPI) zatímco B (CD19 SC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po SC VKE ve 13. DPI. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$

IL-1 α

Zvýšených hodnot exprese genu pro IL-1 α na úrovni mRNA dosahoval kmen STS 6. DPI. Nicméně ani v případě IC VKE ani SC VKE nebylo dosaženo statisticky významných výsledků (Obr. 4.19).

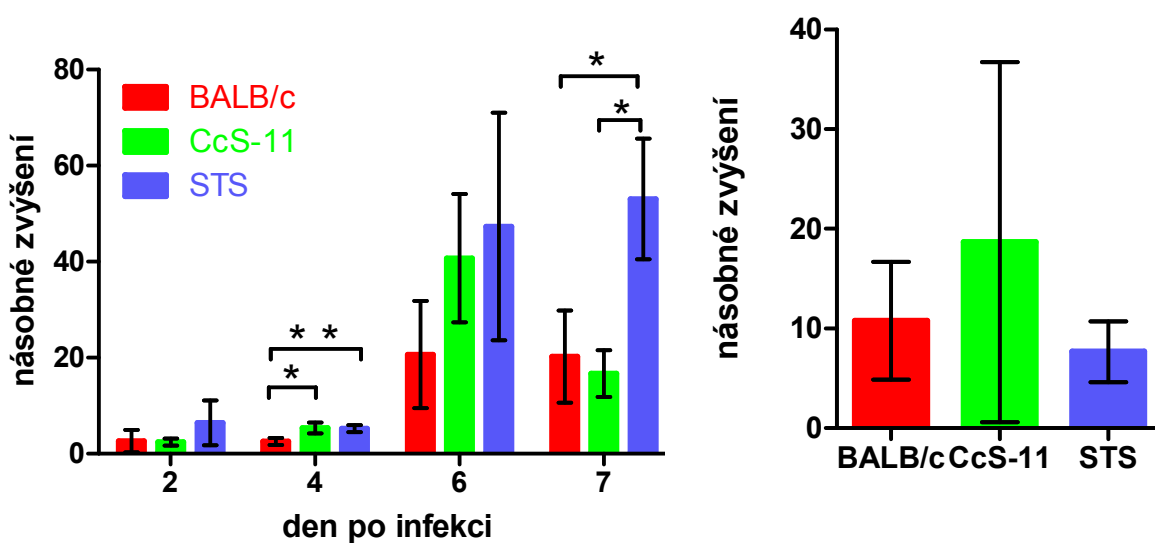
Basální exprese genu pro IL-1 α na mRNA úrovni pro STS (12,56 \pm 0,85) se výrazně odlišovala od zbývajících dvou kmenů BALB/c (10,46 \pm 1,04) a CcS-11 (10,68 \pm 0,71) a to jak v případě IC tak u SC VKE (Příloha A).



Obr. 4.19 Násobné zvýšení exprese genu pro IL-1 α na úrovni mRNA u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem v mozkové tkáni
Graf A (IL-1 α IC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po IC VKE v jednotlivé časové intervaly (2., 4., 6. a 7. DPI) zatímco B (IL-1 α SC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po SC VKE ve 13. DPI.

IL-1 β

V nárůstu exprese genu pro IL-1 β na mRNA úrovni byl shledán významný rozdíl mezi jednotlivými kmeny v 6. DPI (BALB/c vs. CcS-11, $p < 0,05$; BALB/c vs. STS, $p < 0,005$) a 7. DPI (STS vs. CcS-11 a BALB/c, $p < 0,05$) po IC VKE (**Obr. 4.20 A**). 13. DPI po SC VKE nebyly potvrzeny statisticky významné rozdíly v expresi genu pro IL-1 β (**Obr. 4.20 B**). Nicméně, byla u tohoto genu patrná změna v poměru exprese při srovnání výsledků z IC VKE a SC VKE a to zejména v případě STS kmene.



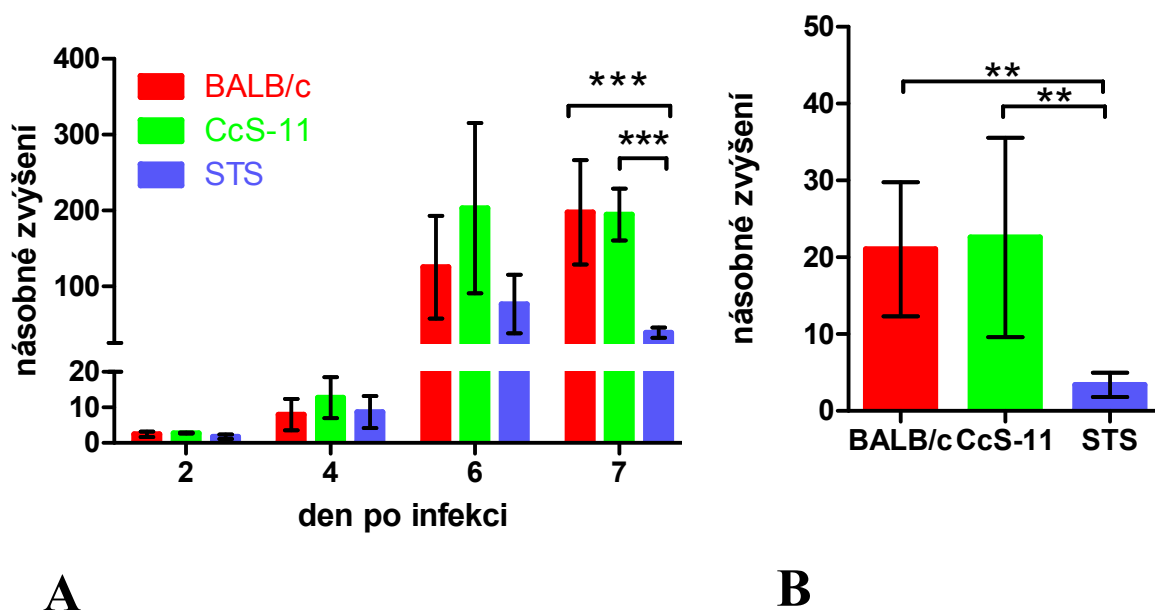
A

B

Obr. 4.20 Násobné zvýšení exprese genu pro IL-1 β na úrovni mRNA u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem v mozkové tkáni
Graf A (IL-1 β IC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po IC VKE v jednotlivé časové intervaly (2., 4., 6. a 7. DPI) zatímco B (IL-1 β SC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po SC VKE ve 13. DPI. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$

IL-6

K výraznému navýšení exprese genu pro IL-6 na úrovni mRNA došlo 6. DPI a 7. DPI, kdy byly také patrné statisticky výrazné rozdíly v expresi (STS vs. BALB/c a CcS-11, $p < 0,0005$) po IC VKE (**Obr. 4.21 A**). Dále byl nárůst exprese významně odlišný i v případě 13. DPI po SC VKE (STS vs. CcS-11 a BALB/c, $p < 0,005$) (**Obr. 4.21 B**).

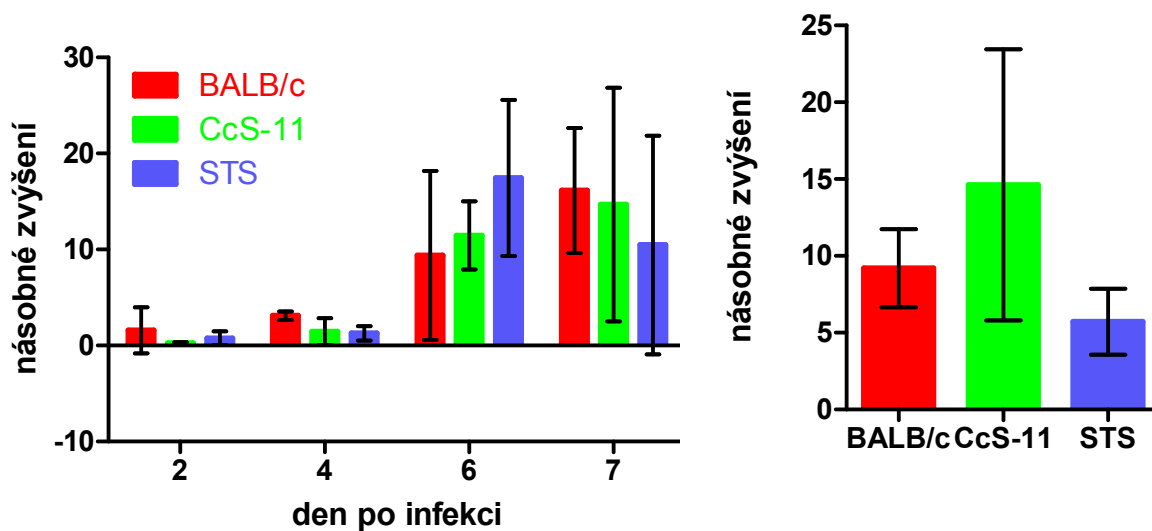


Obr. 4.21 Násobné zvýšení exprese genu pro IL-6 na úrovni mRNA u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem v mozkové tkáni

Graf A (IL-6 IC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po IC VKE v jednotlivé časové intervaly (2., 4., 6. a 7. DPI) zatímco B (IL-6 SC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po SC VKE ve 13. DPI. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$

IL-2

K nárůstu exprese IL-2 na mRNA úrovni došlo 6. DPI, po tomto dni projevil kmen STS sestupnou tendenci v expresi genu pro IL-2, avšak ani v případě IC VKE ani u SC VKE nebyl mezi jednotlivými kmeny potvrzen statisticky významný rozdíl (**Obr. 4.22**).



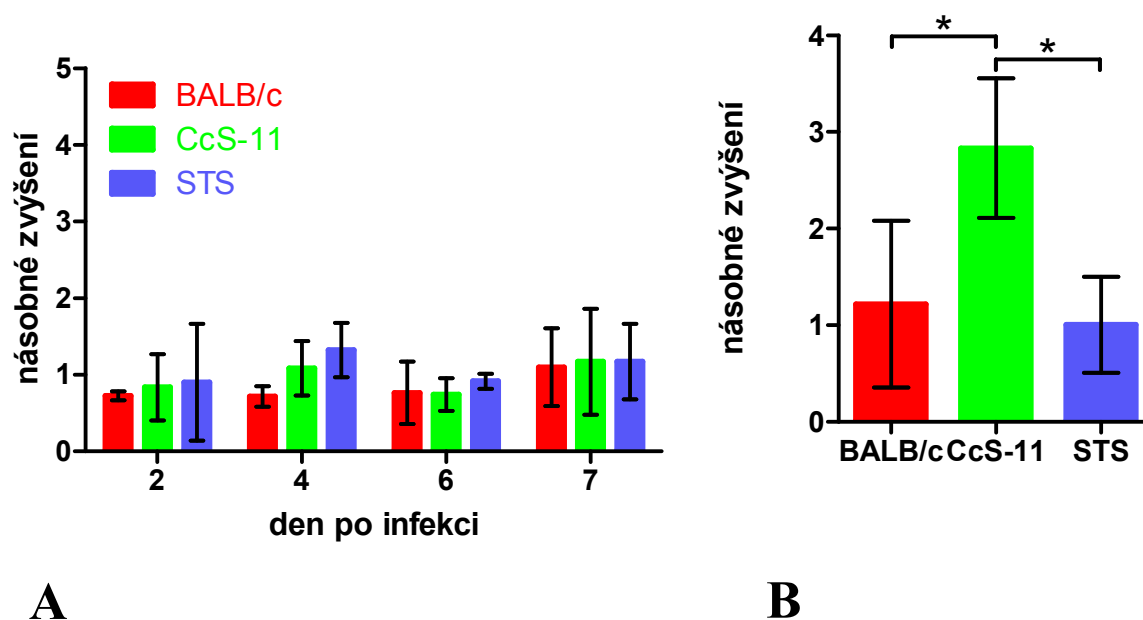
A

B

Obr. 4.22 Násobné zvýšení exprese genu pro IL-2 na úrovni mRNA u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem v mozkové tkáni
Graf A (IL-2 IC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po IC VKE v jednotlivé časové intervaly (2., 4., 6. a 7. DPI) zatímco B (IL-2 SC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po SC VKE ve 13. DPI.

IL-5

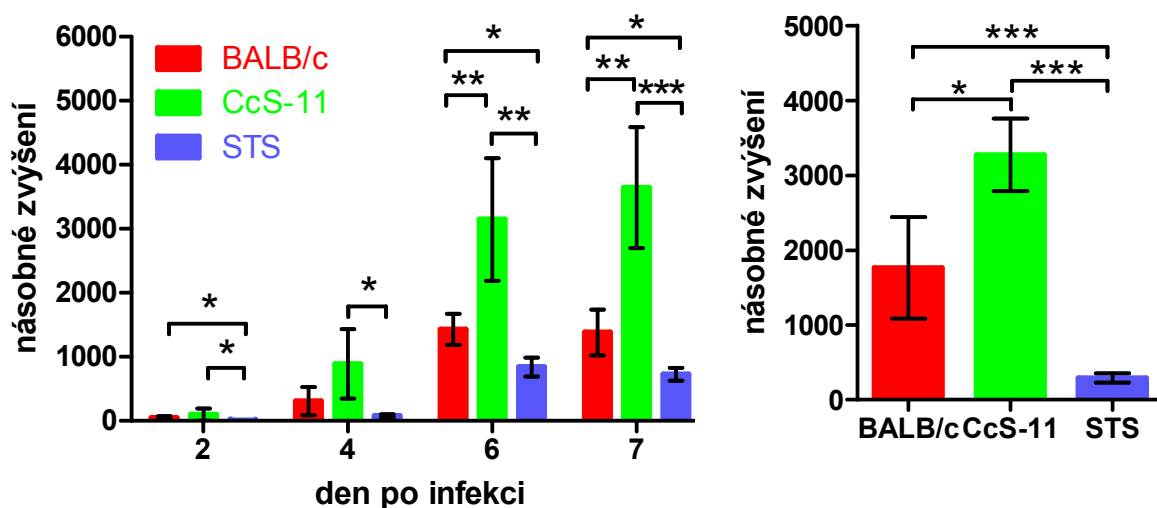
Exprese genu pro IL-5 na mRNA úrovni se výrazně nelišila mezi jednotlivými kmeny po IC VKE, avšak u SC VKE byly pozorovatelné statisticky významné odlišnosti mezi kmeny v expresi IL-5 (CcS-11 vs. STS a BALB/c, $p < 0,05$) (**Obr. 4.23**).



Obr. 4.23 Násobné zvýšení exprese genu pro IL-5 na úrovni mRNA u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem v mozkové tkáni
Graf A (IL-5 IC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po IC VKE v jednotlivé časové intervaly (2., 4., 6. a 7. DPI) zatímco B (IL-5 SC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po SC VKE ve 13. DPI. * = $p < 0,05$

IP-10

Rozdíly v expresi IP-10 na mRNA úrovni mezi jednotlivými kmeny byly v případě IC VKE patrné již 2. DPI (STS vs. BALB/c a CcS-11, $p < 0,05$) a 4. DPI (CcS-11 vs. STS, $p < 0,05$). V následujících časových intervalech došlo ke zvýšení rozdílů v expresi mezi myšimi kmeny a to v 6. DPI (CcS-11 vs. STS a BALB/c, $p < 0,005$; BALB/c vs. STS, $p < 0,05$) a 7. DPI (CcS-11 vs. STS, $p < 0,0005$; CcS-11 vs. BALB/c, $p < 0,005$; BALB/c vs. STS, $p < 0,05$) (**Obr. 4.24 A**). Nárůst exprese genu pro IP-10 po SC VKE ve 13. DPI se projevil významnými rozdíly mezi jednotlivými kmeny (CcS-11 vs. STS, $p < 0,0005$; BALB/c vs. STS, $p < 0,0005$; CcS-11 vs. BALB/c, $p < 0,05$) (**Obr. 4.24 B**).



A

B

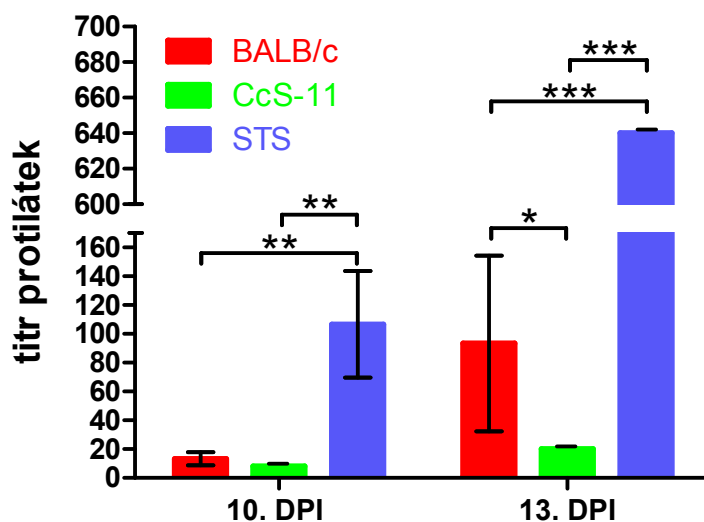
Obr. 4.24 Násobné zvýšení exprese genu pro IP-10 na úrovni mRNA u vybraných kmenů myší z řady CcS/Dem v mozkové tkáni

Graf A (IP-10 IC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po IC VKE v jednotlivé časové intervaly (2., 4., 6. a 7. DPI) zatímco B (IP-10 SC) zobrazuje genovou expresi na úrovni mRNA po SC VKE ve 13. DPI. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$

4.1.6 Titr neutralizujících protilátek po SC VKE u kmenů CcS-11, BALB/c a STS

Titr neutralizačních protilátek u jednotlivých kmenů (BALB/c, CcS-11, STS) byl stanoven pro 10. DPI (nezávisle na tom, zda myš projevovала příznaky KE) a časový interval (13. DPI), v němž byly zahrnuty pouze myši s projevy KE (**Obr. 4.25**).

Rozdíly v titru neutralizujících protilátek v 10. DPI byly významně rozdílné (STS vs. BALB/c a CcS-11, $p < 0,005$). Odlišnosti v titru neutralizačních protilátek byly mezi jednotlivými kmeny zesíleny ve 13. DPI (STS vs. BALB/c a CcS-11, $p < 0,0005$; BALB/c vs. CcS-11, $p < 0,05$) (**Obr. 4.25**).



Obr. 4.25 Titr neutralizačních protilátek po SC VKE u vybraných kmenů myši z řady CcS/Dem

10. DPI je stanoven z myši, které nebyly rozděleny podle příznaků, zatímco ve 13. DPI jsou zahrnuty pouze myši, které vykazovaly příznaky KE.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$

5. Diskuze

Klinický rozvoj a výsledek virové infekce je přímo závislý na jemné rovnováze mezi imunitní odpovědí hostitele a replikační schopností viru. Úspěšná replikace viru v buňkách a jeho uniknutí hostitelské imunitní odpovědi je nezbytné pro rozvinutí nemoci u vnímavého hostitele. VKE představuje jednu z nejčastějších příčin virové encefalitidy v Evropě a Asii (Heinz *et al.*, 2000). KE může mít až smrtelný průběh nebo vést k vážným trvalým neurologickým dysfunkcím. Ačkoliv VKE se vyskytuje napříč severní polokoulí od Evropy po Japonsko (Korenberg *et Kovalevskii*, 1999) a představuje vážné riziko pro člověka, je stále tento virus a jím způsobované onemocnění velmi málo prozkoumáno. Jedny z klíčových nezodpovězených otázek se týkají zejména komplexní buněčné odpovědi a jejich interakce u infikovaných jedinců.

Patologické změny v CNS objevující se během flavivirové infekce spočívají především poškození neuronů, které hynou procesem apoptózy a nekrózy (Růžek *et al.*, 2009), a to je považováno za hlavní příčinu neurologické dysfunkce. Proto je porozumění dějům odehrávajících se během infekce v CNS nezbytné pro vývoj budoucích terapeutik bránících rozvinutí encefalitidy.

Existuje mnoho hostitelských faktorů, které mohou mít vliv na vnímavosti hostitele vůči virové infekci a mezi tyto faktory bezesporu patří věk, pohlaví, výživový status, vliv prostředí, a v neposlední řadě také genetická výbava daného jedince. Vliv hostitelských genetických faktorů při infekci VKE stále není uspokojivě znám. Proto naším cílem bylo jednak vyvinout model, který by umožňoval studovat vliv genetické výbavy hostitele na průběh infekce, a zjistit, nakolik je pak v takovém případě odlišná aktivace různých imunologicky významných genů. V naší studii jsme se tedy zaměřili na studium patogeneze KE s využitím rekombinantních kongenních kmenů myši. Protože křížením parentálních kmenů BALB/c a STS lze získat potomky vlastní unikátní kombinace genetického materiálu, byla vybrána pro naše experimenty rekombinantní kongenní řada CcS/Dem (Démant *et Hart*, 1986). Tyto myši byly původně určeny pro studium nádorů tlustého střeva (Groot *et al.*, 1992), ovšem jejich genetické predispozice se ukázaly být užitečným modelem i pro studium infekcí. Rozdílnou reakci kmenů myši z řady CcS/Dem na infekci ukázaly již první experimenty porovnávající míru letality a střední dobu přežití myši po SC i IC. Podobné rozdíly ve vnímavosti a rezistenci u parentálních kmenů CcS/Dem řady byly pozorovány i při infekci prvoky *Leishmania* (Lipoldová *et al.*, 2000). Pro některé naše

pokusy bylo s přihlédnutím na rozdíly ve střední době přežití přistoupeno k výběru pouze tří kmenů, parentálních (STS, BALB/c) a kmene (CcS-11), který se projevil zvýšenou vnímavostí k infekci KE. Přežívání kmene STS se jeví jako nejdelší, současně v kombinaci s nejnižší letalitou, jak v případě SC VKE tak u IC VKE, přežívání u kmene BALB/c je doba přežívání kratší pro oba způsoby inokulace.

Neurologické příznaky se začaly objevovat současně s výrazným poklesem tělesné hmotnosti a tělesné teploty. Zatímco pokles tělesné hmotnosti byl patrný u všech kmenů v intervalu od 10. do 22. DPI, pokles tělesné teploty byl výrazný u většiny zúčastněných kmenů (BALB/c, CcS-16, CcS-3, CcS-7, CcS-9, CcS-11 a CcS-15) kromě kmene STS. Tyto výsledky se objevily po průběhu virémie a počátku zvýšené letality u všech myších kmenů. V případě lidí postižených KE se vyskytují příznaky ve dvou fázích akutní horečnaté onemocnění a neurologické příznaky. Myši nevykazovaly žádné zvýšení tělesné teploty, ačkoliv virémie byla pozorována u infikovaných myší před infekcí CNS (data z předchozích studií, nepublikováno). Nicméně u myší se mohl vyskytnout dvoufázový průběh, ale bylo obtížné zaznamenat prvotní příznaky. Na druhou stranu je možné, že k dvoufázovým projevům příznaků KE nedošlo s ohledem na rychlý průběh infekce u myšičího modelu (2 týdny), zatímco u lidí trvá 1-4 týdny. Obdobně zvýšení tělesné teploty u myší infikovaných VKE nebylo pozorováno ani s využitím jiných experimentálních modelů (Tigabu *et al.*, 2009; Růžek *et al.*, 2011).

Titru viru při virémii nedosahoval vysokých hodnot jako v podobných studiích (Růžek *et al.*, 2011) u jiných kmenů myší. Tento rozdíl byl patrný zejména u kmene STS projevujícího částečnou rezistenci. Současně výskyt virémie u toho kmene byl v porovnání s jinými studiemi (Růžek *et al.*, 2009; Růžek *et al.*, 2011) posunut až na 5-6. DPI. Pro nás je ovšem nejdůležitější rozdíl vzniklý mezi zahrnutými kmeny, kdy se vnímavé kmeny (CcS-11, BALB/c) prokazovaly zvýšenou a časnější virémií než tomu bylo v případě rezistentního kmene STS. Tato skutečnost by mohla poukazovat na vliv různých faktorů odehrávající se v periferní tkáni a omezující dostatečné pomnožení VKE a s tím spojenou sníženou neuroinvasivitou viru u kmene STS, která by mohla vést k pozorovaným rozdílům ve vnímavosti ke KE.

Protože celkový průběh a následky infekce KE úzce souvisejí s průběhem infekce v tkáni CNS a její neuropatogenezi (Růžek *et al.*, 2009), bylo provedeno srovnání titru viru v CNS po IC VKE. Po celou dobu tohoto pokusu docházelo k nárůstu titru viru. Mezi jednotlivými kmeny nebyly pozorovány významné rozdíly v titru v mozkové tkáni s výjimkou intervalu 2. DPI. S přihlédnutím ke střední době přežití po IC VKE, která si

zachovala podobný charakter jako po SC, lze usuzovat na vliv dalších faktorů sehrávajících roli přímo v CNS.

Korelace mezi přítomností virus-neutralizačních protilátek a účinné ochraně proti rozvoji virovému onemocnění je u flavivirových infekcí dobře známa. Přítomnost protilátek po pasivním očkování hraje klíčovou roli v ochraně proti infekci (Cardosa *et al.*, 1986; Diamond *et al.*, 2003; Suthar *et al.*, 2010). Titr neutralizačních protilátek byl v našich pokusech stanoven u vybraných kmenů, které se mezi sebou výrazně odlišovaly ve středních době přežití (BALB/c, CcS-11, STS). Hladina neutralizačních protilátek byla výrazně vyšší u nejméně citlivého kmene (STS), oproti kmenům s nižší střední dobou přežití (CcS-11, BALB/c). Kmen STS několikanásobně převyšoval titr neutralizačních protilátek dvou zbývajících kmenů. Z našich výsledků je tedy patrná korelace mezi středními dobami přežití a množstvím neutralizačních protilátek. Vyšší titr protilátek a jejich časnější tvorba může přispět významnou měrou ke zpoždění či zabránění rozvoje neurologické fáze KE.

Skutečnost, že titr viru v pozdějších intervalech po IC nevykazoval žádné rozdíly, zatímco se střední doba přežití u jednotlivých kmenů lišila, poukazuje na důležitou roli hostitelské imunitní odpovědi v určení následků infekce, jak již bylo ostatně dříve pozorováno (Gupta *et Rao*, 2011). Geny, které byly během infekce exprimovány v odlišné míře od negativních kontrol poskytují vhled do komplexu regulačního systému imunitní odpovědi na infekci KE. V našich experimentech jsme porovnávali dynamiku exprese daných genů na úrovni mRNA v mozkové tkáni pro vybrané rekombinantní kmeny myši řady CcS/Dem (CcS-11, BALB/c, STS) po IC VKE a zvýšení exprese po SC VKE 13. DPI.

V rámci dřívějších studií bylo pozorováno, že transkriptomický profil ve tkáni myšního mozku po infekci virem japonské encefalitidy zahrnuje aktivaci celé řady protivirových odpovědí (Gupta *et Rao*, 2011). Aktivované geny se týkaly vrozené imunitní odpovědi, interferonu a interferonem stimulovaných mediátorů, komplementu, aktivace NK buněk, makrofágů a tvorby leukocytárních infiltrací v CNS. Změny genové exprese pozorované v naší studii byly v mnoha ohledech obdobné jako tomu bylo v případě japonské encefalitidy (Gupta *et Rao*, 2011) či horečky západního Nilu (Klein *et al.*, 2005). Tato data nasvědčují na obvyklou aktivaci některých drah při průniku infekce do CNS. Tyto dráhy často zahrnují produkty genů jako je $\text{INF}\gamma$, IP-10 atd., které hrají důležitou roli v prvních fázích infekce, ovšem v pozdějších stádiích mohou mít spíše patologický efekt (Johnston *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2005; Gupta *et Rao*, 2011). V našem případě došlo k výraznému nárůstu exprese až 6. DPI po IC ve většině stanovených imunologicky významných genů ($\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\gamma$, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, CD4, CD8 β 1, IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-10,

IP-10), s výjimkou genů CD11 β , CD19, IL-1 α , a IL5, jejichž exprese na úrovni mRNA neprojevovala žádnou změnu v daném časovém pásmu. Výrazně zvýšená exprese některých z námi zkoumaných cytokínů a chemokínů byla pozorována v mozcích myši infikovaných KE i v jiných studiích (Hayasaka *et al.*, 2009; Tigabu *et al.*, 2010; Růžek *et al.*, 2011).

Během flavivirové encefalitidy mají při vstupu viru do CNS také výrazný vliv makrofágové a T-lymfocytární infiltráty (Chambers *et al.*, 2003). Extravazace těchto prozánětlivých buněk vyžaduje aktivaci různých mediátorů zahrnující zejména selektiny a jejich ligandy, chemokíny a chemokínové receptory a prozánětlivé cytokíny (Gupta *et al.*, 2011).

Chemokíny jsou považovány za kritické regulátory migrace leukocytů do CNS. Astrocyty a mikroglie jsou primárním zdrojem chemokínů při infekci řady různých neurotrovních virů. Současně se ukázalo, že i některé neurony jsou při infekci schopné produkovat chemokíny (Gupta *et al.*, 2010).

U některých infekcí způsobených vysoce neuroinvasivními flaviviry byla pozorována zvýšená exprese cytokínů TNF α a chemokínů aktivujících T lymfocyty, jako je IP-10, I-TAC a Mig-1, poukazující na jejich roli při vzniku leukocytárních infiltrátů v CNS (Venter *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2011). Zajímavý byl náš výsledek získaný porovnáním genové exprese INF γ mezi IC VKE a SC VKE. V tomto případě byly patrné výrazné rozdíly v hladině exprese genu po SC, kdy se infekce VKE u parentálního kmene STS projevila minimálním zvýšením exprese tohoto genu v porovnání se zbylými dvěma vnímavými kmeny. Tento jev však již nebyl pozorován v případě IC VKE. Vysvětlením může být odlišnost v titru viru v mozkové tkáni, která sice nebyla pozorována v případě IC VKE, ale byla zaznamenána 13. DPI po SC. Podobné výsledky, kdy byly zaznamenány snížené hladiny exprese u INF γ u myši, které se projevovaly zvýšenou rezistencí vůči infekci a sníženým rozvojem zánětlivé odpovědi v CNS, byly pozorovány v případě encefalitidy Murray Valley (Silvia *et al.*, 2004). Tento rozdíl v expresi INF γ mohl mít vliv na aktivaci leukocytů a jejich migraci do CNS (Guo *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2011). Obdobně v případě genu pro MCP-1 byly pozorovatelné výrazné rozdíly v hladinách tohoto genu mezi kmeny. Nejvyšší nárůst exprese byl zaznamenán u nejnímavějšího kmene (CcS-11) a nejnižší u kmene STS a to v případě IC i SC VKE. MCP-1 byl shledán významným chemokínem schopný zapříčinit narušení integrity hematoencefalcké bariéry (Stamatovic *et al.*, 2005; Růžek *et al.*, 2011). Vysoké hladiny MCP-1 v mozkomíšním moku byly také zaznamenány u pacientů s rozvinutou KE (Michalowska-Wender *et al.*, 2006).

Současně byla pozorována zvýšené exprese většiny prozánětlivých mediátů a to jak v případě IC tak u SC VKE. MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES a IP-10 patří do skupiny chemokínů, které rekrutují NK a T lymfocyty (Glass *et al.*, 2003). Tyto chemokíny mohou podněcovat infiltraci prozánětlivých buněk zvyšováním exprese řady integrínů, selektínů a zvýšením propustnosti hematoencefalické bariéry (Das *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2011; Růžek *et al.*, 2011). V našem případě výsledky pro tyto mediátory mezi sebou korelují. Ve všech případech a způsobech inokulace byly zachovány shodné rozdíly, STS kmen projevoval nejnižší hodnoty exprese těchto chemokínů a vysoce vnímavý kmen CcS-11 naopak nejvyšší násobné zvýšení exprese.

Zatímco skupina chemokínů (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES) patří mezi CC chemokíny a jejich exprese se liší v závislosti na typu virové infekce a typu buněk (Haeberle *et al.*, 2001), gen pro IP-10 patří do skupiny CXC. Tato skupina chemokínů je exprimována řadou buněk infikovaných virem (Winter *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2005; Lepej *et al.*, 2007). Exprese genu pro IP-10 dosahovala nejvýraznějších rozdílů mezi zahrnutými kmeny. Podle těchto získaných dat by se dalo uvažovat o nekontrolované expresi tohoto chemokínu jako faktoru zodpovědného za vzniklou imunopatologii a kratší střední dobu přežití u kmene CcS-11. Na druhou stranu již dříve bylo zjištěno, že inhibice IP-10 vedla při infekci virem západního Nilu ke zvýšení letality, zpomalení likvidace viru z infikované tkáně a snížení infiltrace T lymfocytů v CNS (Liu *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 2005). Zajímavý je také fakt, že geny pro antigeny T lymfocytů (CD4, CD8 β 1) nevykazovaly zvýšené hodnoty exprese u vnímavých kmenů nad rezistentním kmenem STS, jak bychom mohli ze zvýšené exprese genů stimulujících rekrutování T lymfocytů usuzovat.

V případě exprese antigenu CD19 (B lymfocyty) po SC VKE byly zaznamenány vyšší hodnoty u rezistentního kmene STS oproti zbylým kmenům. Tento údaj společně s titrem protilátek v séru svědčí o důležité úloze protilátkové odpovědi při průběhu KE.

Již v předchozích studiích byla zaznamenána nadprodukce IL-6 ve spojitosti s indukcí zánětlivé odpovědi, poškozením neuronů (Jeohn *et al.*, 1998) a zvýšením permeability hematoencefalické bariéry (de Vries *et al.*, 1996; Abbott, 2000). V našem případě tyto údaje korelují s pozorováním zvýšené exprese IL-6 u vnímavých kmenů, jež poukazují na vliv IL-6 v souvislosti se zvýšenou citlivostí vůči infekci KE.

Jak již bylo odhaleno v dřívějších studiích chemokíny, které jsou zodpovědné za infiltraci monocytů a makrofágů jako je RANTES a MIP-1 β , se projevují zvýšenou expresí během akutní fáze infekce (Gupta *et al.*, 2011). Ovšem v našem případě nebyl pozorován

výrazný nárůst v dynamice exprese pro gen CD11 β , který by poukazoval na zvýšený výskyt makrofágů v CNS, přestože byla pozorována zvýšená exprese genů pro RANTES a MIP-1 β .

V neposlední řadě může mít určitou roli také buněčná adheze řízená řadou různých genů, která je kritická pro interakci lymfocytů a antigen-prezentujících buněk s endoteliem a pro rekrutování prozánětlivých buněk. Kombinace INF γ , TNF α nebo IL-1 vede k výraznému navýšení exprese těchto adhezivních molekul (Ren *et al.*, 2010). Zvýšení exprese INF γ , TNF α a IL-1 β bylo pozorováno i v našich experimentech, ovšem stanovení změn exprese adhezivních molekul nebylo v našich experimentech prováděno. Vliv těchto molekul v regulaci prozánětlivé odpovědi se zdá být velmi významný na základě dat z jiných studií (Gupta *et Rao*, 2011). Podobně klíčová může být také exprese integrinů, jež některé flaviviry zřejmě využívají jako vstupní receptory do endoteliálních buněk (Chu *et Ng*, 2004).

Závěrem lze konstatovat, že naše výsledky poukazují na aktivaci exprese několika imunologicky významných genů, které z větší části zahrnují první fázi protivirové obrany organismu (Paul *et al.*, 2007; Pichlmair *et Reis*, 2007). Tyto mediátory mohou zprostředkovat výrazné poškození tkáně, pokud jejich exprese není správně načasována a řízena. Tímto efektem pak může být například zvýšení leukocytární infiltrace, která zhoršuje zánětlivou reakci v CNS. Ve výsledku tato neúměrná imunologická odpověď může zapříčinit až fatální průběh infekce (Samuel *et Diamond*, 2006; Hayasaka *et al.*, 2009; Růžek *et al.*, 2009; Hayasaka *et al.*, 2010; Gupta *et Rao*, 2011; Růžek *et al.*, 2011). Zvýšená exprese prozánětlivých cytokinů byla pozorována obecně u vnímavých kmenů, zatímco rezistentní kmen STS vykazoval nižší míru exprese. Současně ke vzniklým rozdílům mezi kmeny přispěla i míra aktivace protilátkové odpovědi, která se také projevila u rezistentního STS kmene. Ani role chemokínů jako kritických mediátorů neuropatologie během infekce KE, které přitahují zánětlivé buňky nebo přímo zodpovídají za neurotoxicitu a buněčnou smrt, nemůže být během vzniku zánětu v CNS ignorována. Vztah mezi rozvojem zánětlivé odpovědi a vážnosti onemocnění je současně pozorován i u ostatních virových onemocnění (Sugamata *et al.*, 1992; Rowell *et Griffin*, 2002; Samuel *et Diamond*, 2006; Gupta *et Rao*, 2011; Růžek *et al.*, 2011).

V naší budoucí práci plánujeme připravení histologických preparátů z mozkové tkáně pro potvrzení a vizuální doložení zmiňovaných pozorování. Dále bychom se rádi zaměřili na studium primárních buněčných kultur (makrofágy, dendritické buňky, neurony atd.) připravených z vybraných kmenů rekombinantních kongenních myší řady CcS/Dem. V současné době také probíhá genotypizační pokus s F2 generací (BALB/c x CcS-11), který by měl pomoci v lokalizaci genů zodpovědných za zvýšenou citlivost vůči KE.

6. Závěr

1. Infikovali jsme soubor myší různých kmenů z řady CcS/Dem virem KE, zaznamenali jsme míru letality, střední dobu přežití, změnu tělesné teploty a hmotnosti pro jednotlivé kmeny po SC i IC. Parentální kmen STS projevoval nejnižší letalitu a slabé klinické příznaky při KE, zatímco jako nejvnímavější se jevil kmen CcS-11, který se projevil výraznými klinickými příznaky a vysokou letalitou po SC i IC VKE. Zachování odlišností ve středních dobách přežití v obou způsobech inokulace, nasvědčuje existenci různých klíčových faktorů vyskytujících se jak na periférii tak v CNS. Současně byl stanoven titr viru pro vybrané kmeny (STS, BALB/c, CcS-11) v krevním séru po SC VKE a v mozkové tkáni po IC VKE. Výsledky získané z těchto pokusů nasvědčují zjištění, že použitý soubor myší je vhodný pro sledování odlišných klinických projevů ve vztahu k hostitelské genetické výbavě.
2. V našich experimentech jsme porovnávali změny exprese imunologicky významných genů na úrovni mRNA v mozkové tkáni u vybraných kmenů (STS, BALB/c, CcS-11) po IC i SC VKE. Kmen CcS-11 vykazoval vysoké hladiny exprese prozánětlivých chemokínů pro oba způsoby inokulace, naopak kmen projevující rezistenci (STS) vykazoval nízké hladiny těchto chemokínů, kmen BALB/c se mírou exprese těchto regulátorů přibližoval vnímavému kmeni CcS-11 a to jak po SC VKE tak i po IC VKE, nejvýraznější rozdíly byly pozorovány u genu IP-10/CXCL10. Hodnoty exprese u daného kmene pro tyto chemokíny korelovaly s klinickými příznaky a středními dobami přežití.
3. Titr virus-neutralizačních protilátek byl u infikovaných myší stanoven pro dva intervaly (10. DPI, 13. DPI) z nichž jeden zahrnoval pouze jedince projevující příznaky KE. V tomto experimentu byly zahrnuty opět tři kmeny z řady CcS/Dem (STS, BALB/c, CcS-11). U kmene projevujícího rezistenci (STS) byla zaznamenána nejvyšší hladina titru virus-neutralizačních protilátek, zatímco vnímavý kmen CcS-11 dosahoval velice nízkého titru. Poměry titru viru mezi jednotlivými kmeny myší byly totožné pro oba intervaly. Na základě porovnání těchto výsledků s letalitou a klinickými projevy lze usuzovat na klíčovou roli humorální odpovědi při KE.

7. Seznam zkratek

ACTB	myší β actin
CCR5	z angl. „C-C chemokine receptor type 5”
CD11 β	z angl. „cluster of differentiation 11 beta chain”
CD19	z angl. „cluster of differentiation 19”
CD4	z angl. „cluster of differentiation 4”
CD8 β 1	z angl. „cluster of differentiation 8 beta chain 1”
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CNS	centrální nervová soustava
CT	z angl. „treshold cycle“
CXCL11	z angl. „C-X-C motif chemokine 10”
DPI	den po infekci/inokulaci
<i>Flv</i>	z angl. „flavivirus resistance factor”
HKG	z angl. „housekeeping gene“
IC	intracerebrální inokulace
Ig	imunoglobulin
IL-10	interleukin-10
IL-12	interleukin-2
IL-1 α	interleukin-1 α
IL-1 β	interleukin-1 β
IL-2	interleukin-2
IL-4	interleukin-4
IL-5	interleukin-5
IL-6	interleukin-6
INF γ	interferon γ
IP-10 (CXCL10)	z angl. „interferon gamma-induced protein 10”
I-TAC	z angl. „interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant”
MCP-1 (CCL2)	z angl. „monocyte chemotactic protein-1”
Mig-1	z angl. „monokine induced by gamma-Interferon”
MIP-1 α	z angl. „macrophage inflammatory protein-1 α ”
MIP-1 β	z angl. „macrophage inflammatory protein-1 β ”
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	mozková suspenze

NK	z angl. „natural killer“
NT	neutralizační test
OAS	oligoadenylát syntetáza
ORF	otevřený čtecí rámec
PBS	z angl. „phosphate buffered saline“
PFU	z angl. „plaque forming units“
PS	z angl. „porcine kidney stable“
PTS	prekolostrální telecí sérum
RANTES (CCL5)	z angl. „Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted“
RCS	z angl. „Recombinant Congenic Strains“
RdRp	RNA-dependentí RNA polymeráza
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	z angl. „real-time polymerase reaction“
SC	subkutanní inokulace
TNF α	z angl. „tumor necrosis factor- α “
UNG	uracil N-glykosyláza
UTR	netranslatovaná oblast
VKE/KE	virus klíšťové encefalitidy/ klíšťová encefalitida

8. Použitá literatura

- Abbott N. J. (2000). "Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability." Cell Mol Neurobiol **20**(2): 131-47.
- Achazi K., D. Růžek, O. Donoso-Mantke, M. Schlegel, H. S. Ali, M. Wenk, J. Schmidt-Chanasit, L. Ohlmeyer, F. Ruhe, T. Vor, C. Kiffner, R. Kallies, R. G. Ulrich M. Niedrig (2011). "Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus." Vector Borne Zoonotic Dis **11**(6): 641-7.
- Andersen A. A., R. P. Hanson (1974). "Influence of sex and age on natural resistance to St. Louis encephalitis virus infection in mice." Infect Immun **9**(6): 1123-5.
- Atrasheuskaya A. V., T. M. Fredeking G. M. Ignatyev (2003). "Changes in immune parameters and their correction in human cases of tick-borne encephalitis." Clin Exp Immunol **131**(1): 148-54.
- Babu S. T., B. Nutman (2003). "Proinflammatory cytokines dominate the early immune response to filarial parasites." J Immunol **171**(12): 6723.
- Badalová J., M. Svobodová, H. Havelková, V. Vladimirov, J. Vojtišková, J. Engová, T. Pilcik, P. Volf, P. Démant M. Lipoldová (2002). "Separation and mapping of multiple genes that control IgE level in Leishmania major infected mice." Genes Immun **3**(4): 187-95.
- Barkhash A. V., A. A. Perelygin, V. N. Babenko, M. A. Brinton M. I. Voevoda (2011). "Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the CD209 gene is associated with human predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis." Antiviral Res epub.
- Blaškovič D., G. Pučeková, L. Kubinyi, S. Stupalová, V. Oravcová (1967). "An epidemiological study of tick-borne encephalitis in the Tribec region: 1953-63." Bull World Health Organ **36 Suppl**: 89-94.
- Brinton M. A., A. A. Perelygin (2003). "Genetic resistance to flaviviruses." Adv Virus Res **60**: 43-85.
- Cardosa M. J., S. Gordon, S. Hirsch, T. A. Springer, J. S. Porterfield (1986). "Interaction of West Nile virus with primary murine macrophages: role of cell activation and receptors for antibody and complement." J Virol **57**(3): 952-9.
- Carpentier P. A., W. S. Begolka, J. K. Olson, A. Elhofy, W. J. Karpus, S. D. Miller (2005). "Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli." Glia **49**(3): 360-74.
- Das S., D. Ghosh, A. Basu (2009). "Japanese encephalitis virus induce immuno-competency in neural stem/progenitor cells." PLoS One **4**(12): e8134.
- De Madrid A. T., J. S. Porterfield (1969). "A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses." Bull World Health Organ **40**(1): 113.
- De Vries H. E., M. C. Blom-Roosemalen, M. van Oosten, A. G. de Boer, T. J. van Berkel, D. D. Breimer, J. Kuiper (1996). "The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro." J Neuroimmunol **64**(1): 37-43.
- Démant P. (1986). "Histocompatibility and the genetics of tumour resistance." J Immunogenet **13**(2-3): 61-7.
- Démant P. A., A. Hart (1986). "Recombinant congenic strains--a new tool for analyzing genetic traits determined by more than one gene." Immunogenetics **24**(6): 416-22.
- Diamond M. S., B. Shrestha, A. Marri, D. Mahan, M. Engle (2003). "B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus." J Virol **77**(4): 2578-86.

- Gaunt M. W., A. A. Sall, X. de Lamballerie, A. K. Falconar, T. I. Dzhivanian, E. A. Gould (2001). "Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography." *J Gen Virol* **82**(Pt 8): 1867-76.
- Glass W. G., T. E. Lane (2003). "Functional expression of chemokine receptor CCR5 on CD4(+) T cells during virus-induced central nervous system disease." *J Virol* **77**(1): 191-8.
- Gralinski L. E., S. L. Ashley, S. D. Dixon, K. R. Spindler (2009). "Mouse adenovirus type 1-induced breakdown of the blood-brain barrier." *J Virol* **83**(18): 9398-410.
- Grard G., G. Moureau, R. N. Charrel, J. J. Lemasson, J. P. Gonzalez, P. Gallian, T. S. Gritsun, E. C. Holmes, E. A. Gould, X. de Lamballerie (2007). "Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy." *Virology* **361**(1): 80-92.
- Grešíková M. (1958). "Excretion of the tickborne encephalitis virus in the milk of subcutaneously infected cows." *Acta Virol* **2**(3): 188-92.
- Gritsun T. S., V. A. Lashkevich, E. A. Gould (2003). "Tick-borne encephalitis." *Antiviral Res* **57**(1-2): 129-46.
- Gritsun T. S., P. A. Nuttall, E. A. Gould (2003). "Tick-borne flaviviruses." *Adv Virus Res* **61**: 317-71.
- Gritsun T. S., K. Venugopal, P. M. Zanotto, M. V. Mikhailov, A. A. Sall, E. C. Holmes, I. Polkinghorne, T. V. Frolova, V. V. Pogodina, V. A. Lashkevich, E. A. Gould (1997). "Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5' and 3'-UTRs." *Virus Res* **49**(1): 27-39.
- Groot P. C., C. J. A. Moen, W. Dietrich, J. P. Stoye, E. S. Lander, P. Démant (1992). "The recombinant congenic strains for analysis of multigenic traits: genetics composition." In: Lyon, M. F., Searle, A. G., eds. *Genetics Variants and Strains of the Laboratory Mouse*. 3rd ed., Oxford University Press, Oxford. 2826-2835
- Grygorczuk S., J. Zajkowska, R. Swierzbinska, S. Pancewicz, M. Kondrusik, T. Hermanowska-Szpakowicz (2006). "[Concentration of the beta-chemokine CCL5 (RANTES) in cerebrospinal fluid in patients with tick-borne encephalitis]." *Neurol Neurochir Pol* **40**(2): 106-11.
- Grygorczuk S., J. Zajkowska, R. Swierzbinska, S. Pancewicz, M. Kondrusik, T. Hermanowska-Szpakowicz (2006). "Elevated concentration of the chemokine CCL3 (MIP-1alpha) in cerebrospinal fluid and serum of patients with tick borne encephalitis." *Adv Med Sci* **51**: 340-4.
- Guo J. T., J. Hayashi, C. Seeger (2005). "West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha interferon." *J Virol* **79**(3): 1343-50.
- Gupta N., P. V. Rao (2011). "Transcriptomic profile of host response in Japanese encephalitis virus infection." *Virol J* **8**: 92.
- Gupta N., S. R. Santhosh, J. P. Babu, M. M. Parida, P. V. Rao (2010). "Chemokine profiling of Japanese encephalitis virus-infected mouse neuroblastoma cells by microarray and real-time RT-PCR: implication in neuropathogenesis." *Virus Res* **147**(1): 107-12.
- Haeberle H. A., W. A. Kuziel, H. J. Dieterich, A. Casola, Z. Gatalica, R. P. Garofalo (2001). "Inducible expression of inflammatory chemokines in respiratory syncytial virus-infected mice: role of MIP-1alpha in lung pathology." *J Virol* **75**(2): 878-90.
- Hayasaka D., N. Nagata, Y. Fujii, H. Hasegawa, T. Sata, R. Suzuki, E. A. Gould, I. Takashima, S. Koike (2009). "Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses." *Virology* **390**(1): 139-50.

- Hayasaka D., N. Nagata, H. Hasegawa, T. Sata, I. Takashima, S. Koike (2010). "Early mortality following intracerebral infection with the Oshima strain of tick-borne encephalitis virus in a mouse model." *J Vet Med Sci* **72**(4): 391-6.
- Heinz F. X. (1986). "Epitope mapping of flavivirus glycoproteins." *Adv Virus Res* **31**: 103-68.
- Heinz, F. X., Collet, M. S., Purcell, R. H., Gould, E. A., Howard, C. R., Houghton, M., Moormann, R. J. M., Rice, C. M., Thiel, H. J. (2000). Family Flaviviridae. In: van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E., Estes, M. K., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeogch, D., Pringle, C. R., Wickner, R. B. eds. *Virus Taxonomy*. In: *Proceedings of the 7th International Committee for the Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, Ca. p. 859-878.
- Holzmann H. (2003). "Diagnosis of tick-borne encephalitis." *Vaccine* **21 Suppl 1**: S36-40.
- Chambers T. J., M. S. Diamond (2003). "Pathogenesis of flavivirus encephalitis." *Adv Virus Res* **60**: 273-342.
- Chu J. J., M. L. Ng (2004). "Interaction of West Nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells." *J Biol Chem* **279**(52): 54533-41.
- Jeohn G. H., L. Y. Kong, B. Wilson, P. Hudson, J. S. Hong (1998). "Synergistic neurotoxic effects of combined treatments with cytokines in murine primary mixed neuron/glia cultures." *J Neuroimmunol* **85**(1): 1-10.
- Johnston C., W. Jiang, T. Chu, B. Levine (2001). "Identification of genes involved in the host response to neurovirulent alphavirus infection." *J Virol* **75**(21): 10431-45.
- Kaiser R. (1999). "The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: a prospective study of 656 patients." *Brain* **122 (Pt 11)**: 2067-78.
- Kindberg E., A. Mickiene, C. Ax, B. Akerlind, S. Vene, L. Lindquist, A. Lundkvist L. Svensson (2008). "A deletion in the chemokine receptor 5 (CCR5) gene is associated with tickborne encephalitis." *J Infect Dis* **197**(2): 266-9.
- King N. J., D. R. Getts, M. T. Getts, S. Rana, B. Shrestha, A. M. Kesson (2007). "Immunopathology of flavivirus infections." *Immunol Cell Biol* **85**(1): 33-42.
- Klein R. S., E. Lin, B. Zhang, A. D. Luster, J. Tollett, M. A. Samuel, M. Engle, M. S. Diamond (2005). "Neuronal CXCL10 directs CD8+ T-cell recruitment and control of West Nile virus encephalitis." *J Virol* **79**(17): 11457-66.
- Konishi E., M. Yamaoka, W. Khin Sane, I. Kurane, K. Takada, P. W. Mason (1999). "The anamnestic neutralizing antibody response is critical for protection of mice from challenge following vaccination with a plasmid encoding the Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes." *J Virol* **73**(7): 5527-34.
- Korenberg E. I., Y. V. Kovalevskii (1999). "Main features of tick-borne encephalitis eco-epidemiology in Russia." *Zentralbl Bakteriol* **289**(5-7): 525-39.
- Labrada L., X. H. Liang, W. Zheng, C. Johnston, B. Levine (2002). "Age-dependent resistance to lethal alphavirus encephalitis in mice: analysis of gene expression in the central nervous system and identification of a novel interferon-inducible protective gene, mouse ISG12." *J Virol* **76**(22): 11688-703.
- Labuda M., J. M. Austyn, E. Zuffova, O. Kozuch, N. Fuchsberger, J. Lysy, P. A. Nuttall (1996). "Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission." *Virology* **219**(2): 357-66.
- Lepej S. Z., L. Misic-Majerus, T. Jeren, O. D. Rode, A. Remenar, V. Sporec, A. Vince (2007). "Chemokines CXCL10 and CXCL11 in the cerebrospinal fluid of patients with tick-borne encephalitis." *Acta Neurol Scand* **115**(2): 109-14.
- Lindquist L., O. Vapalahti (2008). "Tick-borne encephalitis." *Lancet* **371**(9627): 1861-71.
- Lindenbach, B. D., Ch. M. Rice (2003). "Molecular biology of flaviviruses."

- Adv Virus Res 59:23-61.
- Lipoldová, M., Svobodová, M., Krulová, M., Havelková, H., Badalová, J., Nohýnková, E., Holář, V., Hart, A. A. M., Volf, P., Démant, P. (2000). Susceptibility to *Leishmania major* infection in mice: multiple loci and heterogeneity of immunopathological phenotypes. Genes Immun 1:200-206.
- Lipoldová M., P. Démant (2006). "Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis." Nat Rev Genet 7(4): 294-305.
- Liu M. T., B. P. Chen, P. Oertel, M. J. Buchmeier, T. A. Hamilton, D. A. Armstrong, T. E. Lane (2001). "The CXC chemokines IP-10 and Mig are essential in host defense following infection with a neurotropic coronavirus." Adv Exp Med Biol 494: 323-7.
- Málková D., V. Fraňková (1959). "The lymphatic system in the development of experimental tick-borne encephalitis in mice." Acta Virol 3: 210-4.
- Mickiene A., A. Laiskonis, G. Gunther, S. Vene, A. Lundkvist, L. Lindquist (2002). "Tickborne encephalitis in an area of high endemicity in lithuania: disease severity and long-term prognosis." Clin Infect Dis 35(6): 650-8.
- Michalowska-Wender G., J. Losy, M. Kondrusik, J. Zajkowska, S. Pancewicz, S. Grygorczuk, M. Wender (2006). "[Evaluation of soluble platelet cell adhesion molecule sPECAM-1 and chemokine MCP-1 (CCL2) concentration in CSF of patients with tick-borne encephalitis]." Pol Merkur Lekarski 20(115): 46-8.
- Nuttall P. A., L. D. Jones, M. Labuda W. R. Kaufman (1994). "Adaptations of arboviruses to ticks." J Med Entomol 31(1): 1-9.
- Olsen A. L., J. D. Morrey, D. F. Smee, R. W. Sidwell (2007). "Correlation between breakdown of the blood-brain barrier and disease outcome of viral encephalitis in mice." Antiviral Res 75(2): 104-12.
- Pan Z. J., C. J. Anderson, H. A. Stafford (2001). "A murine monoclonal anti-idiotypic to anti-ribosomal P antibodies: production, characterization, and use in systemic lupus erythematosus." Clin Immunol 100(3): 289-97.
- Pattnaik P. (2006). "Kyasanur forest disease: an epidemiological view in India." Rev Med Virol 16(3): 151-65.
- Paul S., C. Ricour, C. Sommereyns, F. Sorgeloos, T. Michiels (2007). "Type I interferon response in the central nervous system." Biochimie 89(6-7): 770-8.
- Pichlmair A., C. Reis e Sousa (2007). "Innate recognition of viruses." Immunity 27(3): 370-83.
- Rampas J., F. Gallia, (1949). "Isolation of tick-borne encephalitis virus from ticks *Ixodes ricinus*." Časopis lékařů českých, 88 (1949), pp. 1179–1180.
- Ren G., X. Zhao, L. Zhang, J. Zhang, A. L'Huillier, W. Ling, A. I. Roberts, A. D. Le, S. Shi, C. Shao, Y. Shi (2010). "Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression." J Immunol 184(5): 2321-8.
- Rowell J. F., D. E. Griffin (2002). "Contribution of T cells to mortality in neurovirulent Sindbis virus encephalomyelitis." J Neuroimmunol 127(1-2): 106-14.
- Růžek D., J. Salát, M. Palus, T. S. Gritsun, E. A. Gould, I. Dykova, A. Skalova, J. Jelinek, J. Kopecký, L. Grubhoffer (2009). "CD8+ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis." Virology 384(1): 1-6.
- Růžek D., J. Salát, S. K. Singh, J. Kopecký (2011). "Breakdown of the blood-brain barrier during tick-borne encephalitis in mice is not dependent on CD8+ T-cells." PLoS One 6(5): e20472.
- Růžek D., M. Vancová, M. Tesařová, A. Ahantarig, J. Kopecký, L. Grubhoffer (2009). "Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection." J Gen Virol 90(Pt 7): 1649-58.

- Růžek D., V. V. Yakimenko, L. S. Karan, S. E. Tkachev (2010). "Omsk haemorrhagic fever." Lancet **376**(9758): 2104-13.
- Samuel C. E. (2002). "Host genetic variability and West Nile virus susceptibility." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11555-7.
- Samuel M. A., M. S. Diamond (2006). "Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion." J Virol **80**(19): 9349-60.
- Shirato K., T. Kimura, T. Mizutani, H. Kariwa I., Takashima (2004). "Different chemokine expression in lethal and non-lethal murine West Nile virus infection." J Med Virol **74**(3): 507-13.
- Silvia O. J., L. Pantelic, J. S. Mackenzie, G. R. Shellam, J. Papadimitriou, N. Urosevic (2004). "Virus spread, tissue inflammation and antiviral response in brains of flavivirus susceptible and resistant mice acutely infected with Murray Valley encephalitis virus." Arch Virol **149**(3): 447-64.
- Šíma M., H. Havelková, L. Quan, M. Svobodová, T. Jarošíková, J. Vojtišková, A. P. Stassen, P. Démant, M. Lipoldová (2011). "Genetic control of resistance to *Trypanosoma brucei brucei* infection in mice." PLoS Negl Trop Dis **5**(6): e1173.
- Stamatovic S. M., P. Shaku, R. F. Keep, B. B. Moore, S. L. Kunkel, N. Van Rooijen, A. V. Andjelkovic (2005). "Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability." J Cereb Blood Flow Metab **25**(5): 593-606.
- Sugamata M., M. Miyazawa, S. Mori, G. J. Spangrude, L. C. Ewalt, D. L. Lodmell (1992). "Paralysis of street rabies virus-infected mice is dependent on T lymphocytes." J Virol **66**(2): 1252-60.
- Sui Y., L. Stehno-Bittel, S. Li, R. Loganathan, N. K. Dhillon, D. Pinson, A. Nath, D. Kolson, O. Narayan, S. Buch (2006). "CXCL10-induced cell death in neurons: role of calcium dysregulation." Eur J Neurosci **23**(4): 957-64.
- Süss J. (2003). "Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines." Vaccine **21 Suppl 1**: S19-35.
- Suthar M. S., D. Y. Ma, S. Thomas, J. M. Lund, N. Zhang, S. Daffis, A. Y. Rudensky, M. J. Bevan, E. A. Clark, M. K. Kaja, M. S. Diamond, M. Gale, Jr. (2010). "IPS-1 is essential for the control of West Nile virus infection and immunity." PLoS Pathog **6**(2): e1000757.
- Tigabu B., T. Juelich, J. Bertrand, M. R. Holbrook (2009). "Clinical evaluation of highly pathogenic tick-borne flavivirus infection in the mouse model." J Med Virol **81**(7): 1261-9.
- Tigabu B., T. Juelich, M. R. Holbrook (2010). "Comparative analysis of immune responses to Russian spring-summer encephalitis and Omsk hemorrhagic fever viruses in mouse models." Virology **408**(1): 57-63.
- Thiel H. J., M. S. Collett, E. A. Gould, F.X. Heinz, M. Houghton, G. Meyers, et al. Family Flaviviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. Virus taxonomy: classification and nomenclature, eighth report of the international committee on the taxonomy of viruses. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford: Elsevier Academic Press; 2005. p. 981e98.
- Venter M., T. G. Myers, M. A. Wilson, T. J. Kindt, J. T. Paweska, F. J. Burt, P. A. Leman, R. Swanepoel (2005). "Gene expression in mice infected with West Nile virus strains of different neurovirulence." Virology **342**(1): 119-40.
- Vladimirov V., J. Badalová, M. Svobodová, H. Havelková, A. A. Hart, H. Blažková, P. Démant, M. Lipoldová (2003). "Different genetic control of cutaneous and visceral disease after *Leishmania major* infection in mice." Infect Immun **71**(4): 2041-6.

- Wang Y., M. Lobigs, E. Lee, A. Mullbacher (2003). "CD8+ T cells mediate recovery and immunopathology in West Nile virus encephalitis." J Virol **77**(24): 13323-34.
- Winter P. M., N. M. Dung, H. T. Loan, R. Kneen, B. Wills, T. Thu le, D. House, N. J. White, J. J. Farrar, C. A. Hart, T. Solomon (2004). "Proinflammatory cytokines and chemokines in humans with Japanese encephalitis." J Infect Dis **190**(9): 1618-26.

<http://www.szu.cz/publikace/data/infekce-v-cr>

9. Přílohy

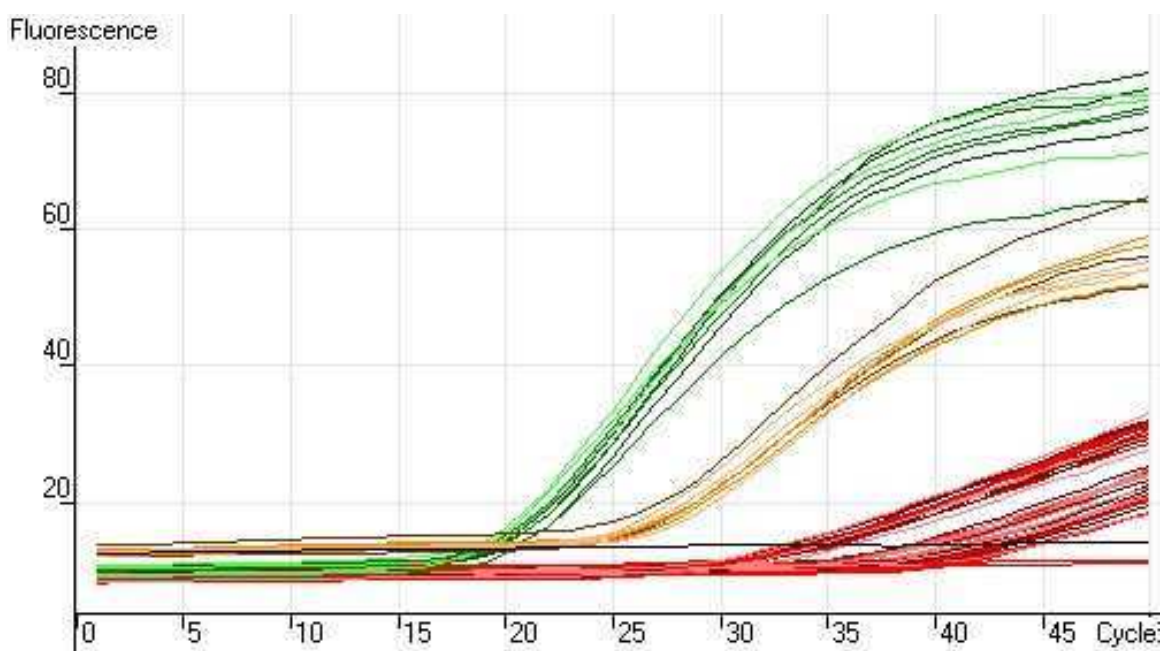
9.1 Příloha A

Tab. 9.1 Průměrný rozdíl hodnot CT u daného genu a HKG u neinfikovaných myších kmenů

	BALB/c	CcS-11	STS
Δ CT INF γ IC	18,42 \pm 0,84	18,87 \pm 1,12	18,35 \pm 2,82
Δ CT INF γ SC	18,72 \pm 1,02	18,85 \pm 0,62	17,35 \pm 1,05
Δ CT TNF α IC	13,82 \pm 1,35	14,51 \pm 0,50	13,45 \pm 0,65
Δ CT TNF α SC	14,08 \pm 0,40	13,85 \pm 0,36	14,18 \pm 0,28
Δ CT MCP-1 IC	11,69 \pm 2,12	13,08 \pm 0,44	11,66 \pm 0,40
Δ CT MCP-1 SC	13,75 \pm 0,26	14,68 \pm 0,50	13,45 \pm 0,61
Δ CT MIP-1 α SC	13,58 \pm 0,81	14,02 \pm 0,55	11,52 \pm 0,58
Δ CT MIP-1 β IC	12,42 \pm 1,27	13,84 \pm 1,35	12,49 \pm 0,13
Δ CT MIP-1 β SC	14,32 \pm 0,42	15,08 \pm 0,45	12,92 \pm 0,33
Δ CT IL-10 SC	18,78 \pm 0,91	19,72 \pm 0,15	19,08 \pm 0,18
Δ CT RANTES IC	12,19 \pm 0,50	12,81 \pm 0,81	11,32 \pm 0,48
Δ CT RANTES SC	13,22 \pm 0,21	13,65 \pm 0,62	12,65 \pm 1,05
Δ CT CD4 IC	14,39 \pm 0,56	14,88 \pm 0,64	14,42 \pm 0,67
Δ CT CD4 SC	14,55 \pm 0,53	15,18 \pm 0,42	14,35 \pm 0,54
Δ CT CD8 β 1 IC	14,86 \pm 0,55	15,61 \pm 0,79	15,06 \pm 0,20
Δ CT CD8 β 1 SC	15,55 \pm 0,44	16,08 \pm 0,31	14,87 \pm 0,61
Δ CT CD11 β IC	5,56 \pm 0,44	13,21 \pm 0,25	12,89 \pm 0,39
Δ CT CD11 β SC	6,05 \pm 0,61	15,52 \pm 0,21	14,45 \pm 0,33
Δ CT CD19 IC	15,62 \pm 0,88	16,51 \pm 1,07	15,56 \pm 0,95
Δ CT CD19 SC	15,88 \pm 0,95	16,95 \pm 1,20	16,38 \pm 0,11
Δ CT IL-1 α IC	10,46 \pm 1,04	10,68 \pm 0,71	12,56 \pm 0,85
Δ CT IL-1 α SC	11,48 \pm 0,21	10,85 \pm 0,17	12,92 \pm 0,70
Δ CT IL-1 β IC	12,12 \pm 0,47	13,01 \pm 0,43	14,49 \pm 0,49
Δ CT IL-1 β SC	13,42 \pm 0,06	13,92 \pm 0,25	14,38 \pm 0,10
Δ CT IL-6 IC	15,32 \pm 0,48	16,28 \pm 0,31	15,12 \pm 0,64
Δ CT IL-6 SC	15,85 \pm 0,26	16,12 \pm 0,15	14,98 \pm 0,52
Δ CT IL-2 IC	19,76 \pm 0,62	20,04 \pm 1,64	20,44 \pm 0,43
Δ CT IL-2 SC	19,45 \pm 0,42	19,75 \pm 0,28	19,30 \pm 0,42
Δ CT IL5 IC	14,27 \pm 0,75	14,47 \pm 0,29	13,63 \pm 0,25
Δ CT IL5 SC	13,78 \pm 0,99	15,22 \pm 0,72	13,58 \pm 0,32
Δ CT IP-10 IC	10,80 \pm 0,90	12,40 \pm 0,44	10,20 \pm 0,82
Δ CT IP-10 SC	11,98 \pm 0,29	12,92 \pm 0,12	11,58 \pm 0,33

9.2 Příloha B

Příklad průběhu RT-PCR je vyjádřen v grafu (**Obr. 9.1**) po podání viru IC. Z grafu je patrné rozdílné množství cDNA pro jednotlivé geny. HKG (zelená) dosahuje nejnižších hodnot CT, což poukazuje na vysokou koncentraci cDNA pro tento gen. Opačná situace je ovšem u IL-10, kde i přes navýšení celkového počtu cyklů (**Obr. 9.1**) byla hodnota CT některých vzorků jen obtížně zaznamatelná a shlédána zavádějící. Proto byly výsledky z RT-PCR pro IL-10 z práce vyřazeny, obdobně tomu bylo u MIP-1 α v případě vzorků po IC.



Obr. 9.1 Graf zobrazující průběh QRT-PCR
(červená = IL-10; zelená=HKG; černá=negativní kontrola; béžová=TNF α)