

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



LUCIE VAŠKOVÁ

**Studium adherence bakterií na plicní epitel nemocných
Cystickou fibrózou**

**Study of bacterial adherence on lung epithelia of Cystic
fibrosis patients**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2014

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

Abstrakt

Cystická fibróza je autozomálně recesivní onemocnění, které patří k nejčastějším dědičným poruchám. Tato nemoc je způsobena mutací v genu CFTR kódujícím chloridový kanál, čímž dochází k poruše transportu iontů a výraznému zvýšení viskozity hlenu. Nejvíce postižen je respirační systém. Zvýšení obsahu solí a přítomnost hustého hlenu v plicích potlačují antibakteriální účinky imunitního systému. Bakteriální infekce jsou nejčastější příčinou smrti pacientů s CF, zejména infekce *Pseudomonas aeruginosa*. Nejčastěji je pro terapii infekce tímto patogenem používána léčba antibiotiky, která je komplikována častým vznikem rezistencí. Jsou proto hledány nové možnosti terapie. Nadějnou by mohla být pasivní imunizace pacientů pomocí žloutkových protilátek IgY.

Pro sledování vlivu těchto protilátek *in vivo* byl zvolen modelový systém buněk plicního epitelu zdravého pacienta (NuLi-1), pacienta trpícího CF (CuFi-1) a 3 kmenů bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Byly porovnávány protilátky proti lektinu *Pseudomonas aeruginosa* PA-III, který je významnou adhezivní strukturou této bakterie, pocházející od 2 různých imunizovaných zvířat. K vizualizaci a vyhodnocení adheze bakterií na plicní buňky v přítomnosti protilátek bylo používáno barvení fluorescenčními sloučeninami PKH a následné spektrofluorimetrické vyhodnocení. Také bylo porovnáváno vyhodnocení pomocí luminiscence bakterií, která umožňuje detekci bez barvení fluorescenčními barvivy.

V tomto uspořádání bylo zjištěno, že protilátky pocházející od různých zvířat vykazují obdobnou schopnost výrazně bránit adhezi PA na buňky plicní tkáně, u linie NuLi-1 byl pokles 65-75 %, v případě linie CuFi-1 až 86 % oproti buňkám bez přidané protilátky. Kontrolní protilátka naopak vazbu bakterií zvyšuje. Tento efekt byl pozorován u všech použitých kmenů. Při použití luminiscence bakterií se tento rozdíl mezi specifickou a kontrolní protilátkou neobjevil, což pravděpodobně souvisí s viabilitou bakterií.

Klíčová slova: *Pseudomonas aeruginosa*, žloutkové protilátky, virulenční faktory, buněčné linie

Abstract

Cystic fibrosis is an autosomal recessive disease that is one of the most common hereditary disorders. The disease is caused by the mutation in the gene encoding CFTR chloride channel which leads to the failure of ion transport and a significant increase in viscosity of mucus, affecting especially the respiratory system. The increase of salt and the presence of thick mucus in the lungs suppress the antibacterial effects of the immune system. Bacterial infections are the most common cause of death in patients with CF, especially the *Pseudomonas aeruginosa* infection. Antibiotics are used for treatment of the infection by this pathogen, but the treatment is frequently complicated by developing resistance. Due to this fact, new ways of treatment have been searched for. The method of passive immunization of patients with yolk IgY antibodies seems to be promising.

To examine the effect of these antibodies in *in vivo* model system, lung epithelial cells of a healthy subject (NuLi-1) and of a CF patient (CuFi-1) were exposed to 3 strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antibodies against the lectin of *Pseudomonas aeruginosa* PA-III, which is an important adhesion structure of this bacterium, prepared from two immunized animals were compared. To visualize and evaluate the adhesion of bacteria to lung cells in the presence of antibodies, the cells were stained with fluorescent dye and a subsequently quantified by means of spectrofluorimetry. Luminescent bacteria were also used to allow their detection without their staining.

Antibodies derived from two animals have a similar ability to significantly reduce the adhesion of PA to lung cell lines. For line NuLi-1, the decrease was 65-75 %, and in the case of line CuFi-1 the decrease was up to 86 % compared to cells without the antibody added. The control antibody (pre-immune), on the contrary, increases PA binding. This effect was observed with all PA strains. When using the luminescent bacteria, the difference between the specific and the control antibody was not significant. This observation may be related to the differences in viability of the bacteria when using these two approaches.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, yolk antibody, virulence factors, cell lines

Obsah

Seznam zkratk	1
1 ÚVOD	2
1.1 Cystická fibróza	2
1.1.1 Obecná charakteristika onemocnění	2
1.1.2 Příznaky onemocnění	3
1.1.3 Diagnostika	5
1.1.4 Léčba	5
1.1.5 Imunitní systém pacientů s CF	6
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.2.1 Obecná charakteristika	11
1.2.2 Adhezivní struktury PA	13
2 Cíl práce	14
3 MATERIÁL A METODY	15
3.1 Použité chemikálie a přístroje	15
3.1.1 Přístroje	15
3.1.2 Materiál	16
3.2 Práce s tkáňovými kulturami	17
3.2.1 Zamrazení buněčných linií	17
3.2.2 Rozmražení buněčných linií	17
3.2.3 Kultivace linií	19
3.2.4 Subkultivace linií	19
3.2.5 Určení množství živých buněk pomocí trypanové modři	20
3.2.6 Příprava kultivačních nádob potažených kolagenem	21
3.3 Práce s preparáty <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
3.4 Fluorescenční značení	22

3.4.1	Fluorescenční značení plicních buněk pomocí PKH67.....	22
3.4.2	Fluorescenční značení bakteriálních buněk pomocí PKH26.....	23
3.5	Adhezní test	24
4	Výsledky	26
4.1	Fluorescenční barvení bakteriálních buněk <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pomocí PKH26	26
4.2	Fluorescenční značení eukaryotických buněk NuLi-1 a CuFi-1 pomocí PKH67.....	28
4.3	Adhezní testy	31
5	Diskuze	40
6	Souhrn.....	43
7	Seznam použité literatury	44

Seznam zkratek

ABC	„ATP-binding cassette“
BSA	hovězí sérový albumin
CF	cystická fibróza
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FBS	fetální telecí sérum
h	hodina
Ig	imunoglobulin
IRT	imunoreaktivní trypsin
kb	kilobáze
kDa	kilodalton, jednotka molekulové hmotnosti
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IL, PA-IIL	lektiny <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	“phosphate buffered saline”
RPM	počet otáček za minutu
UV	ultrafialové záření

1 ÚVOD

1.1 Cystická fibróza

1.1.1 Obecná charakteristika onemocnění

Cystická fibróza (CF), dříve nazývána též muskovicidóza, je autozomálně recesivní onemocnění postihující zhruba 1 z 2500 - 4500 novorozenců [1]. Je to jedno z nejčastějších vrozených dědičných onemocnění, každý rok se v České Republice narodí 32 – 46 dětí s CF a zhruba každý 26. jedinec je nositelem genu pro CF. Tato nemoc je stále ještě nevléčitelná, ale je možno léčit jednotlivé symptomy [2].

Pokud jsou oba rodiče heterozygoty nesoucími mutaci genu pro CF, pak je zde 25% šance narození zdravého dítěte, 25% šance narození nemocného dítěte a 50% šance, že dítě bude heterozygotním nosičem mutace jako jeho rodiče. Podstatou tohoto onemocnění je mutace genu CFTR (cystic fibrosis transmembrane-conductance regulator), který kóduje stejnojmenný protein.

CFTR

CFTR protein patří do ABC rodiny transportérů (ATP vázající, z ang. ATP-binding cassette), což jsou většinou ATP-dependentní pumpy. Tyto pumpy mohou transportovat substráty do nebo ven z buňky.

Protein, který je kódován CFTR genem, se nachází na apikální membráně exokrinních epiteliálních buněk a má funkci chloridového kanálu [3]. CFTR protein má významné postavení v transportu elektrolytů a transepiteliální tekutiny. Ve střevním epitelu, pankreatu a dýchacích cestách řídí sekreci Cl^- a HCO_3^- iontů a v epitelu potních žláz zajišťuje zpětnou absorpci solí. Z tohoto je zřejmé, že poruchou CFTR kanálu je postižena celá řada tělních systémů [4].

Gen CFTR, který je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 7, obsahuje 27 kódujících exonů v rozpětí přes 250 kb. Funkční nebo strukturní porucha tohoto proteinu má za následek změnu transportu solí buněčnou membránou. To se nejčastěji projeví dvěma způsoby: Zaprvé dojde ke zvýšení absorpce sodíku, který s sebou do buněk vnáší vodu, a tím dochází k úbytku tekutiny v hlenu, tedy jeho zahuštění, a k poruše mukociliární

clearance. Zadruhé je defektní transport Cl^- iontů, jejich koncentrace v hleně roste a hlen přestane být hypotonický, díky čemuž nedochází k aktivaci antimikrobiálních peptidů (defenzinů). To vede poté k poškození plicních obranných mechanismů a rozvoji zánětu a infekce [5].

Bylo popsáno více než 1900 mutací tohoto genu, které jsou rozděleny do tříd podle svého účinku na syntézu a/nebo funkci proteinu CFTR:

1. třída – poškozený, nefunkční protein CFTR
2. třída – nesprávně složený protein CFTR
3. třída – CFTR protein je v buněčné membráně, ale je narušena jeho regulace
4. třída – je snížena vodivost kanálu
5. třída - CFTR proteiny mají správnou funkci, ale je významně snížený jejich počet

Více než 80 % pacientů má alespoň jednu mutaci ze třídy 2. F508del patří do této třídy je vůbec nejčastější mutací u pacientů s CF. Zastoupení jednotlivých mutací se velmi liší v rámci různých populací a národností. Mutace F508del způsobuje delecí fenylalaninu v pozici 508 [6]. Pacienti s mutacemi třídy 1 - 3 mají většinou závažný průběh onemocnění, které se projevuje například vysokou koncentrací solí v potu, pankreatickou insuficiencí a mužskou neplodností. Tyto třídy jsou také spojeny s menší variabilitou klinického průběhu na rozdíl od mutací třídy 4, 5 a další nezařazených mutací, které jsou atypické či monosymptomatické [1].

1.1.2 Příznaky onemocnění

Klinické příznaky onemocnění a jejich závažnost se velmi liší v rámci jednotlivých pacientů. Prakticky u všech nemocných cystickou fibrózou je postiženo dýchací ústrojí, což se projevuje hlavně opakovanými infekcemi. Postižení dýchacího ústrojí se může projevit kdykoli během života. Zhruba 80 – 85 % nemocných trpí poruchami trávení způsobenými nedostatečnou produkcí enzymů ze slinivky břišní. Tato pankreatická nedostatečnost nemusí být přítomna od narození, ale může se rozvinout až ve vyšším věku. U 10 % novorozenců je CF diagnostikována ihned po porodu na základě mekoniového ileu, tedy ucpaní střev hustým hlenem. Téměř všichni pacienti mají nadměrný obsah solí v potu a 98 % mužů je neplodných. Potíže trávicího a dýchacího ústrojí jsou úzce

provázány a navzájem se ovlivňují. Nemocný s respiračními problémy trpí nechutenstvím, potravu špatně zpracovává a ubývá na váze. Zároveň podvyživený pacient se mnohem hůře vyrovnává s infekcemi. Tedy dostatečná výživa i hygiena dýchacích cest jsou nezbytné pro správné prospívání [7]. Souhrn postižení jednotlivých tělních systémů je uveden v tab. 1.1.

Tab. 1.1 Přehled příznaků a onemocnění souvisejících s cystickou fibrózou [1, 8]

<i>Dýchací ústrojí</i>	
Obecné příznaky:	<ul style="list-style-type: none"> • kašel: dráždivý nebo s vykašláváním hlenu • zrychlené, ztížené dýchání, dušnost • zastřený hlas, ucpaný nos • soudkovitý hrudník, paličkovité prsty
Onemocnění:	<ul style="list-style-type: none"> • polypy v nosních dutinách • opakující se záněty vedlejších nosních dutin • opakované, ale i chronické bronchitidy (záněty průdušek), opakované pneumonie (záněty plic)
<i>Trávicí ústrojí</i>	
Obecné příznaky:	<ul style="list-style-type: none"> • špatné prospívání (nemusí být snížena chuť k jídlu) • tenké končetiny a velké břicho • objemné páchnoucí stolice, plynatost • otoky z hypoalbuminemie • při postižení jater žluté zbarvení kůže a bělma očí
Onemocnění střev:	<ul style="list-style-type: none"> • mekoniový ileus u novorozenců • prolaps rekta (výhřez konečníku) • distální intestinální obstrukční syndrom
Onemocnění slinivky břišní:	<ul style="list-style-type: none"> • poruchy zevní sekrece, záněty • cukrovka
Onemocnění jater a žlučníku:	<ul style="list-style-type: none"> • postižení jater až cirhóza • žlučnickové kameny
<i>Reprodukční ústrojí</i>	<ul style="list-style-type: none"> • muži: neplodní, ženy: snížená plodnost
<i>Potní žlázy</i>	<ul style="list-style-type: none"> • výrazně slaný pot, vysoký obsah solí • metabolický šok při vyšších ztrátách solí potem

1.1.3 Diagnostika

Diagnostika CF se provádí na základě klinického podezření, tedy výskytu charakteristických obtíží. Nedílnou součástí jsou laboratorní vyšetření. V současnosti jsou používány hlavně tři metody: 1) potní test, 2) molekulárně genetické vyšetření, 3) transepiteliální rozdíl potenciálů.

Pro časnou diagnostiku je používán novorozenecký screening, kde se vyšetřuje imunoreaktivní trypsin (IRT) ze suché kapky krve z patičky novorozence. Při jeho zvýšené hodnotě následuje genetické vyšetření. Toto vyšetření je prováděno novorozencům 48 – 72 hodin po narození. Společně s CF se testuje 12 dalších metabolických poruch [9]. Nejjednodušší metodou je však tzv. „kiss your baby test“, kde může matka z nepřírozeň slaného potu dítěte sama pojmout podezření na onemocnění.

Diagnostická kritéria jsou založena na hodnocení přítomnosti jednoho nebo více typických klinických příznaků, rodinné anamnéze s podezřením na CF, pozitivním novorozeneckém screeningu a laboratorním průkazu abnormální funkce CFTR proteinu, která je dokumentována přítomností 2 patogenních mutací v CFTR genu, vysokou koncentrací chloridů v potu nebo *in vivo* prokázanou poruchou transportu elektrolytů v nosním epitelu [1].

1.1.4 Léčba

Cystická fibróza je nemocí dosud nevléčitelnou a léčba je proto jen symptomatická. Je nutné k ní přistupovat jako k onemocnění celého organismu, proto léčba bývá složitá, dlouhodobá a často velmi agresivní. Agresivní léčbou je míněno, že je použito velkého množství léků často ve velmi vysokých dávkách.

Cílem léčby je udržet pacienta v dobré kondici, zajistit dobrou kvalitu života a život co nejvíce prodloužit. Největší důraz je kladen na zabránění infekcím plic a zachování výživy pacienta. Důležitá je také podpora rodiny a okolí.

Nejzávažnější problém v terapii CF jsou respirační potíže. Léčení infekce v dýchacích cestách probíhá pomocí antibiotik. U nemocných CF se léčba antibiotiky začíná dříve, podávají se vyšší dávky a léčba trvá déle než u zdravých jedinců. Antibiotika se podávají

kdykoli jsou ze sekretu dýchacích cest kultivovány patogenní bakterie nebo se objeví sebemenší příznaky plicní infekce. V případě infekce *Pseudomonas aeruginosa* je nutné ihned zahájit antibiotickou léčbu inhalačními antibiotiky trvající až 3 měsíce a současně podávat antibiotika v tabletách. Pokud tato léčba není účinná, je nutné zahájit intravenózní léčbu. K léčbě zánětu dýchacích cest, který může způsobit nevratné poškození, se používají kortikoidy. Ke zředění hlenu se používá inhalování hypertonické soli, které napomáhá transportovat vodu do dýchacích cest a tím zlepšit vykašlávání a mukociliární „clearance“.

Nezbytnou součástí péče o dýchací cesty je respirační fyzioterapie, soubor cviků a technik dýchání, která následuje inhalaci a má výrazný efekt na vykašlávání naředěného hlenu.

Pro terapii pankreatické zevní nedostatečnosti se užívají enzymatické preparáty nahrazující chybějící enzymy a vhodná dieta. Zlepšení výživy pacienta vede ke zlepšení celkové kondice, odolnosti vůči infekcím a funkce plic. Vzhledem ke sníženému využití živin a zvýšeným metabolickým požadavkům organismu musí být výživa lehce stravitelná a až o 20 – 50 % bohatší na proteiny a kalorie než u zdravých jedinců dané váhy. V těchto rozpustné vitamíny je také potřeba dodat uměle. S každým jídlem (s výjimkou čerstvého ovoce) je nutné užívat substituci pankreatických enzymů. Vzhledem ke sklonům k dehydrataci, pacienti s CF potřebují vyšší příjem solí, zejména v podmínkách zvýšeného pocení jako je letní počasí nebo horečka [2, 4, 7, 10].

1.1.5 Imunitní systém pacientů s CF

U pacientů s cystickou fibrózou nebyla zjištěna žádná primární porucha imunitního systému ani imunodeficiencie. Imunitní systém těchto pacientů reaguje na podněty normálně, ale celkové okolnosti mutace CFTR jako je hustý hlen a vysoká koncentrace solí znemožňují potlačení onemocnění a infekce [1].

Vrozená imunita

Jako první se na obraně proti patogenům podílí vrozená imunita fungující jako bariéra. Ta je následována získanou (specifickou) imunitou spojenou s aktivací T a B lymfocytů. Vrozená imunita nezajišťuje jen prvotní bariéru zabraňující kolonizaci a infekci, ale také určuje, na které podněty bude specifická imunita reagovat a jak.

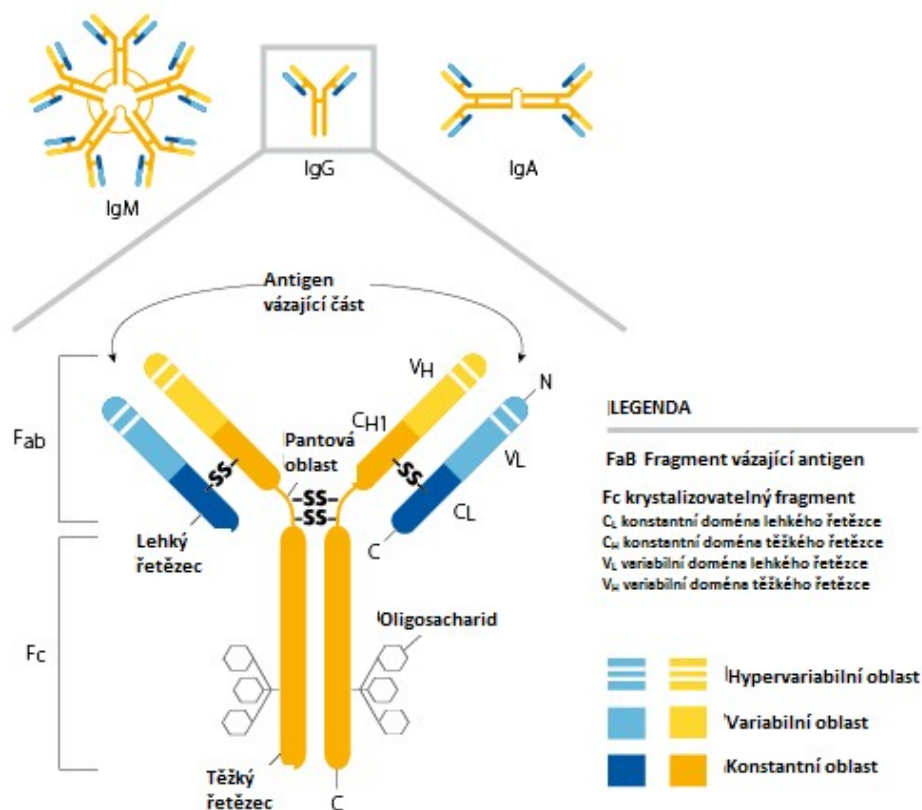
Složky vrozené imunity jsou alveolární makrofágy, neutrofilny a epiteliální buňky. Jejich úlohou je rozpoznat, zpracovat a zničit patogeny. Mutací v CFTR proteinu dochází ke změnám, které znemožňují složkám imunity plnit funkci a ty se poté v místě zánětu hromadí [11].

Specifická (získaná) imunita

Nejdůležitější složkou získané imunity jsou protilátky. Protilátky jsou proteiny produkované imunitním systémem ve chvíli, kdy dojde ke kontaktu s cizorodou látkou – antigenem. Každá protilátka má unikátní strukturu svých variabilních oblastí, která ji umožňuje vázat se specificky na antigen, ale zároveň všechny protilátky mají stejnou celkovou strukturu a jsou souhrnně nazývány jako imunoglobuliny nebo zkráceně Ig. Protilátky jsou produkovány plasmatickými buňkami jako odpověď na kontakt s cizorodou strukturou jako je například infekce nebo imunizace. Antigenem může být mikroorganismus (bakterie, houby, parazité a viry) nebo chemická látka. Následně se protilátky naváží na patogen a neutralizují ho nebo označí pro fagocytózu [12].

U savců rozeznáváme 5 základních tříd imunoglobulinů: IgM, IgD, IgE, IgA a IgG. Protilátky IgG jsou proteinové molekuly s molekulovou hmotností okolo 150 kDa a jsou složeny ze dvou typů polypeptidových řetězců. Je to tzv. těžký řetězec (H z ang. heavy) a lehký řetězec (L z ang. light). Struktura imunoglobulinu G je znázorněna na obr. 1.1 – upraveno z [13].

Molekuly protilátek připomínají tvar písmene Y. Každá molekula imunoglobulinu se skládá ze dvou těžkých řetězců nesoucích kovalentně navázanou oligosacharidovou skupinu a dvou neglykosylovaných lehkých řetězců. Těžké řetězce jsou navzájem k sobě a k lehkým řetězcům připojeny disulfidovými můstky. Disulfidové vazby spojující těžké řetězce jsou umístěny ve flexibilní části těžkého řetězce nazývané pantová oblast.



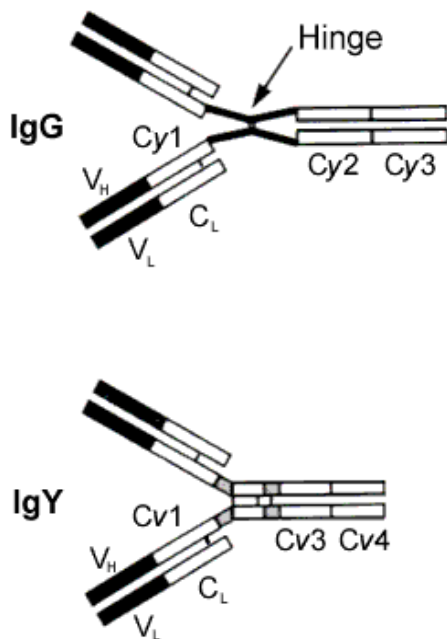
Obr. 1.1 Struktura protilátky (IgG)

N-koncový úsek řetězců, který je variabilní, je místem zodpovědným za vazbu na antigen

Každé rameno protilátky je tvořeno 4 doménami: 2 variabilními doménami (VH, VL) a 2 konstantními doménami (CH, CL). Efektorové funkce protilátky jako je například placentární transport nebo buněčná toxicita jsou určeny konstantní oblastí těžkého řetězce [13, 14].

Slepičí protilátky – možnost terapie

Slepice (ptačí) mají 3 druhy imunoglobulinů: IgA, IgM a IgY. Ptačí IgA a IgM jsou přítomny ve vaječném bílku a mají podobné vlastnosti jako jejich analogy u savců. IgY je hlavním imunoglobulinem séra a je dominantní protilátkou přítomnou ve vaječném žloutku. Imunoglobulin Y je svou funkcí velmi podobný savčímu imunoglobulinu G (obr. 1.2 [15]). Oba obsahují 2 lehké a 2 těžké řetězce spojené dohromady disulfidovými vazbami, ale liší se v pantové oblasti, u IgY je kratší a méně flexibilní.



Obr. 1.2 Porovnání struktury ptačího IgY a savčího IgG

Dalším rozdílem je velikost, IgY mají molekulovou hmotnost zhruba 170 kDa na rozdíl od IgG s molekulovou hmotností okolo 160 kDa. IgY má těžký řetězec s větším počtem konstantních domén a sacharidových řetězců.

Transport IgY ze séra k embryu je srovnatelný s transportem IgG přes placentu u savců, s cílem chránit nově vylíhnuté potomky než si vyvinou vlastní imunitu. Specifické IgY protilátky se získávají imunizací slepic daným antigenem. Vaječné protilátky mají vysokou aviditu a titer protilátek je stabilní.

Výhodou použití IgY oproti savcím protilátkám je mnoho. Zaprvé velká fylogenetická vzdálenost savců a ptáků poskytuje i vyšší imunitní odpověď a umožňuje získat IgY s afinitou k více epitopům savčích proteinů. Další výhodou je vysoká stabilita slepičích protilátek – IgY je velmi tepelně stabilní, až do teploty 60 – 65°C. Jedna slepice snese zhruba 20 vajec za měsíc a každé vejce obsahuje vysokou koncentraci IgY – zhruba 100 mg, z toho je požadovaných specifických protilátek cca 10 %, což je 5 – 10x více než je možno získat imunizací a následnou izolací protilátek z krve z králíka. Tato metoda získávání protilátek je méně invazivní a stresující pro používaná zvířata, kterých navíc stačí menší počet.

Díky uvedeným vlastnostem se slepičí protilátky zdají vhodnými prostředky pro orální imunoterapii. IgY neaktivují lidský komplement a nereagují se složkami imunitního systému způsobujícími zánět. Protilátky při orálním podání nepronikají ze střev do krve, a

tedy nemají žádné systémové účinky. Navíc není riziko, že by si bakterie vytvořily na IgY rezistenci [16].

Slepičí protilátky jako prostředek pasivní imunizace jsou v současné době používány k prevenci rotavirových průjmů u novorozených telat [17]. Dále se testuje jejich použití jako antisérum při hadím uštknutí. Antiséra používaná v současné době jsou nejčastěji koňská a často vyvolávají silné alergické reakce, což u protilátek ze slepic nehrozí, protože neaktivují komplementové složky imunitního systému [18].

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Plicní infekce způsobené patogenem *Pseudomonas aeruginosa* (PA) jsou jedním z hlavních důvodů nemocnosti a úmrtnosti pacientů s cystickou fibrózou. Infekce obvykle začíná již v dětství a je nakonec zodpovědná za respirační selhání a smrt u mnoha CF pacientů. Patogen vyvolá zánětlivou reakci, která poškozuje dýchací cesty a vede ke ztrátě funkce plic [19].

Pseudomonas aeruginosa je oportunní patogen, který infikuje pacienty s poškozenou nebo omezenou obranyschopností. Predispozice k napadení tímto patogenem jsou například porušená epiteliální bariéra (pacienti s popáleninami), nízký počet neutrofilů (pacienti s rakovinou podstupující chemoterapii), přítomnost cizího tělesa (centrální žilní katétr) a změněná mukociliární clearance (cystická fibróza). Často se infekce *P. aeruginosa* objeví až po hospitalizaci pacienta. Úspěšnost tohoto patogena spočívá v několika faktorech. *Pseudomonas aeruginosa* dokáže využívat velmi široké spektrum živin a tak může růst v nemocničních odpadech, dřezech a dokonce v desinfekčních roztocích.

P. aeruginosa je rezistentní na velké množství antibiotik a dokáže získat odolnost na mnoho dalších, proto je léčba tak obtížná. Schopnost PA tvořit biofilm chrání tento mikroorganismus před antibiotiky a imunitním systémem hostitele. Navíc dokáže produkovat množství toxických proteinů, které způsobují rozsáhlá poškození tkání a navíc napadají mechanismy obrany imunitního systému. Tyto proteiny vykazují široké spektrum funkcí od silných toxinů, které napadají a zabíjí hostitelské buňky, až po degradační enzymy, které trvale narušují buněčné membrány a pojivové tkáně [20, 21].

1.2.1 Obecná charakteristika

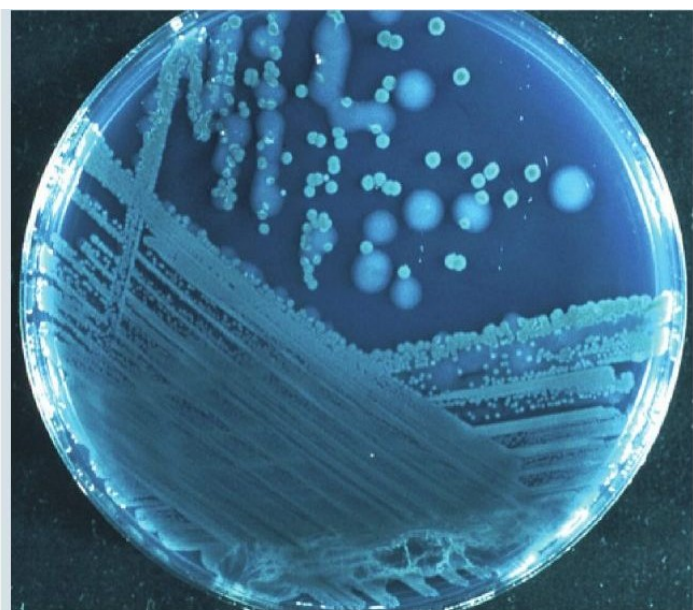
Pseudomonas aeruginosa je gram-negativní bakterie. Téměř všechny kmeny jsou pohyblivé pomocí jednoho polárního bičíku (viz. obr. 1.3). Metabolismus této bakterie je respirační, nikdy neprovádí fermentaci, ale roste i v nepřítomnosti kyslíku, pokud je jako akceptor elektronů přítomen dusičnan. V přírodě lze PA nalézt ve formě biofilmu přisedlého na povrchích nebo ve formě planktonu jako jednobuněčný organismus aktivně plovoucí pomocí bičíku. *Pseudomonas aeruginosa* je jednou z nejpohyblivějších a nejrychleji plavajících bakterií.

Tato bakterie má velmi nízké požadavky na výživu, proto dokáže žít téměř všude. Teplotní optimum je 37°C, ale dokáže růst v teplotách do 42°C. Je velmi tolerantní k fyzikálním podmínkám a odolná vysokým koncentracím solí, slabým antiseptikům a mnoha běžně používaným antibiotikům.



Obr. 1.3 *Pseudomonas aeruginosa* [21]

Pseudomonas aeruginosa může tvořit 3 typy kolonií. Bakterie izolované z půdy nebo vody typicky produkují malé, drsné kolonie. Klinické vzorky tvoří jeden ze dvou typů hladkých kolonií. Prvý typ je hladký a zvýšený. Druhý typ, nejčastěji izolovaný z dýchacích a močových cest, má hlenovitý charakter, který je způsoben produkcí alginátu. Vzhled kolonií získaných z klinického vzorku pacienta s cystickou fibrózou je znázorněn na obr. 1.4 [22].



Source: Future Microbiol © 2010 Future Medicine Ltd

Obr. 1.4 Kolonie *Pseudomonas aeruginosa* na agaru

Velké kolonie odpovídají mukoidní formě, malé kolonie nemukoidní formě bakterie.

Mukoidní forma PA je typická pro pacienty s CF. Kolonie bakterií se začnou obalovat vrstvou alginátu, který je chrání před imunitním systémem hostitele a účinky antibiotik.

Velkým problémem u infekcí PA je jejich rezistence na antibiotika, díky níž se stávají tak nebezpečným a velmi obávaným patogenem. Přirozená rezistence této bakterie na antibiotika je díky silné bariéře, kterou jí poskytuje její vnější membrána. Na infekce *Pseudomonas aeruginosa* je účinný jen omezený počet antibiotik (např. gentamicin, ciprofloxacin a tobramycin), které ovšem nemusí být účinné vůči všem kmenům. U pacientů s cystickou fibrózou často dojde ke kolonizaci kmenem, který je tak odolný, že ho již nelze zlikvidovat [23].

1.2.2 Adhezivní struktury PA

Vazba (adheze) na epitel hostitele je nutnou podmínkou pro kolonizaci a vznik infekce. Pokud by nedošlo k pevné vazbě na buňky, bakterie by byla odstraněna vydechovaným vzduchem (plíce) nebo třeba proudem moči (močové cesty). PA dokáže adherovat na mnoho povrchů jako například polystyren a PVC, které jsou běžnou součástí lékařského vybavení.

Strukturou, které PA využívají k adhezi na hostitelské buňky, jsou především pili a bičík. Obě jsou tvořeny vláknitými strukturami proteinů a jsou důležitým virulentním faktorem této bakterie [24].

Mezi nejvýznamnější virulenční faktor PA patří lektiny. Lektiny jsou proteiny, které specificky rozeznávají a váží sacharidové struktury. Jsou využívány širokým spektrem organismů: viry, bakteriemi, rostlinami a zvířaty. *Pseudomonas aeruginosa* syntetizuje dva druhy lektinů, PA-IL (LecA) a PA-IIL (LecB). PA-IL váže specificky D-galaktosu a PA-IIL L-fukosu. Oba tyto lektiny hrají významnou roli v infekcích u pacientů s CF [25].

Lektin PA-IIL má tetramerní proteinovou strukturu stabilizovanou ionty vápníku a obsahuje 4 místa vázající cukr. Tento lektin se také podílí na tvorbě bakteriálního biofilmu. U CF pacientů je zvýšená fukosylace koncových řetězců epiteliálních glykoproteinů a také vyšší procento sialyzovaných a sulfatovaných oligosacharidů v postraních řetězcích Lewisovského typu. Tyto struktury představují hlavní vazebná místa pro PA-IIL. Oba lektiny PA také inhibují pohyb řasinek plicního epitelu, a tím efektivní odstraňování hlenu z dýchacích cest [26].

Vazbu PA lektinů na epiteliální buňky je možné inhibovat přidáním daných monosacharidů nebo oligosacharidů [27].

V této práci byla zkoumána schopnost slepičích protilátek proti PA-IIL snižovat vazbu *Pseudomonas aeruginosa* na plicní epiteliální buňky.

2 Cíl práce

V této práci byla zkoumána možnost použití slepičích protilátek IgY jako profylaktického prostředku k předcházení infekcí *Pseudomonas aeruginosa* u cystické fibrózy. Hlavním cílem bylo na modelovém systému bakteriálních buněk PA (barvených PKH26) a epiteliálních buněk (barvených PKH67) prokázat vliv specifických protilátek proti bakteriálnímu lektinu PA-IIL na adhezenci bakterií na plicní buňky. Pro splnění tohoto hlavního cíle bylo třeba splnit následující dílčí úkoly:

- barvit buňky pomocí fluorescenčních barviv a prokázat, že míra fluorescence odpovídá počtu buněk v daném systému;
- zjistit, zda protilátky proti stejnému antigenu (lektin PA-IIL) pocházející od různých zvířat mají stejné účinky na adhezenci bakterií;
- srovnat vliv protilátek na schopnost adherence bakterií různých bakteriálních kmenů, konkrétně byly použity kontrolní (PAK), mukoidní (PA) a bioluminiscenční kmen *Pseudomonas aeruginosa*;
- porovnat schopnost adherence bioluminiscenčního kmene bakterií ovlivněného a neovlivněného procesem barvení;
- zjistit, zda přítomnost pouze obecného proteinu (BSA) může ovlivnit schopnost bakterií adherovat na plicní buňky.

3 MATERIÁL A METODY

3.1. Použité chemikálie a přístroje

3.1.1 Přístroje

analytické váhy 40 SM	PESA, Švýcarsko
autokláv Varioklav®	H+P Labortechnik GmbH, Německo
centrifuga Eppendorf 5415 R	Eppendorf, USA
centrifuga MicroStar 12	VWR. Labogene Aps, Dánsko
centrifuga Hettich Universal 320 R	Hettich Zentrifugen, Německo
CO ₂ inkubátor	ShellLab, ČR
inkubátor s funkcí třepání	New Brunswick Scientific, USA
laminární box BIO 126	Labox, ČR
laminární box MB 20	Labox, ČR
mikroskop Motic AE31	Motic, Německo
mikroskop Nikon ECLIPSE TE2002-U	Nikon, Japonsko
s programem NIS-Elements AR 2.30	
minicentrifuga Spectrafuge™	Labnet, USA
spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro	Tecan, Švýcarsko
s programem i-control	
spektrokolorimetr Spekol	Carl-Zeis, Německo
spektrofotometr Helios alpha	Thermo Scientific, Velká Británie
vodní lázeň	Memmert, Německo
zamrazovací box Nalgene™ Cryo 1°C	Nalgene®
Freezing Container	

3.1.2 Materiál

10, 50 ml plastové zkumavky	TPP, Švýcarsko
BSA fraction V	Merck, USA
Collagen type IV from human placenta	Sigma, USA
destičky CellBind® 24 jamek	Corning, USA
dimethylsulfoxid (DMSO)	Aplichem, Německo
D-Tube™ Dialyzer Mini-Maxi (6-8 kDa, 12-14 kDa) dialyzační tuby	Novagen®, USA
FBS	Lonza Biotec s.r.o., Švýcarsko
jednorázové plastové sterilní pipety 1-25 ml	Corning, USA
kryozkumavky	Corning, USA
kultivační lahve 12,5-25 cm ²	TPP, Švýcarsko
kyselina octová	Lachema, ČR
LHC-9 medium	Gibco™ Invitrogen, UK
MidiPlus pipetovací nástavec	Biohit, UK
parafilm	Bemis, USA
PBS tablety (pro přípravu pufru – 1 do 500ml destilované vody)	Gibco™ Invitrogen, UK
Peha-Soft nitrilové rukavice bez pudru	Hartmann, ČR
pipety	Biohit, UK
PKH 26 Red Fluorescent Cell Linker	Sigma, USA
Mini Kit for General Cell Membrane labeling	
PKH 67 Green Fluorescent Cell Linker	Sigma, USA
Mini Kit for general Cell Membrane Labeling	
sterilní mikrofiltry 0,22 µm	Merck Millipore, Německo
špičky	Biohit, UK
trypsin-EDTA 10x koncentrovaný roztok	PAA Laboratories, Rakousko

3.2 Práce s tkáňovými kulturami

Byly použity tři různé buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1. Linie NuLi-1 jsou imortalizované buňky plicní tkáně normálního pacienta a linie CuFi-1 jsou imortalizované buňky plicní tkáně pacienta s cystickou fibrózou. S liniemi NuLi-1 a CuFi-1 bylo pracováno podle produktového listu a webových zdrojů [28, 29].

3.2.1 Zamrazení buněčných linií

Buněčné linie se uchovávají zamražené v kapalném dusíku nebo hlubokomrazícím boxu. Zamrazení linií zajistí kromě konzervace také genetickou stabilitu.

Buňky byly „pasážovány“ obvyklým způsobem (viz. kap. 3.2.4). Peleta po centrifugaci byla centrifugačně (1000 RPM, 5 minut, centrifuga Hettich Universal 320R) promyta pomocí PBS (tablety pro přípravu pufru – 1 tableta do 500 ml destilované vody). Bylo připraveno zamrazovací médium ve složení: LHC-9 médium, 30% v/v FBS a 10% v/v DMSO.

Peleta po centrifugaci byla resuspendována v zamrazovacím médiu a tato buněčná suspenze alikvotována po 1 ml do připravených a popsaných kryozkumavek. Kryozkumavky byly důkladně uzavřeny a umístěny do zamrazovacího boxu Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container a umístěny přes noc do hlubokomrazícího boxu. Tento zamrazovací box má garantováno postupné ochlazování 1°C/ minuta.

3.2.2 Rozmrazení buněčných linií

Buněčné linie se uchovávají zamražené v hlubokomrazícím boxu nebo kapalném dusíku. Jako kryoprotektant je používán dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO je pro buňky částečně toxický, proto musí rozmrazení probíhat co nejrychleji.

Linie NuLi-1, CuFi-1

Bylo připraveno médium ve složení: LHC-9 s obsahem geneticinu 50 µg/ml (na 1 ml média 1 µl Geneticinu, zásobní roztok 50 mg/ml) a temperováno na 37°C. Buňky z hlubokomrazicího boxu/kapalného dusíku byly rychle rozmrazeny ve vodní lázni (37°C) a sterilně převedeny do nádoby. K buňkám bylo postupně přidáváno vytemperované médium po 1 minutě dle daného schématu (viz. tab. 3.1) tak, aby se buňky mohly postupně adaptovat na změnu pH a osmolarity.

Tab. 3.1 Schéma přidávání média

objem alikvotu buněk (ml)	přídavek média po minutách (ml)									
1	0,10	0,12	0,15	0,19	0,26	0,36	0,52	0,86	1,69	4,75
2	0,20	0,24	0,30	0,38	0,52	0,72	1,04	1,72	3,38	9,50

Toto schéma se používá pro citlivé linie buněk.

Buněčná suspenze byla centrifugována (1000 RPM, 5 minut, centrifuga Hettich Universal 320R). Peleta byla resuspendována v 1 ml média a převedena do kultivační lahve s růstovou plochou 25/75 cm² (podle množství rozmrazovaných buněk, po rozmražení nasazení ve vyšší hustotě) s povrchem potaženým kolagenem (kolagen IV, z lidské placenty, viz. kap.3.2.6) a odpovídajícím množstvím média (10/15 ml) LHC-9 s odpovídajícím množstvím Geneticinu. Z buněčné suspenze bylo odebráno 20 µl pro stanovení viability a počtu buněk.

3.2.3 Kultivace linií

Všechny buněčné linie byly kultivovány v inkubátoru ShellLab při 37°C a 5% CO₂ v místnosti pro tkáňové kultury, aby bylo co nejvíce sníženo riziko kontaminace. Spotřební materiál (pufry, špičky k automatickým pipetám) byly sterilizovány v autoklávu (121°C, 20 minut), ostatní materiál (pipety, kultivační lahvičky, zkumavky Falcon) byl používán sterilní jednorázový.

Linie NuLi-1, CuFi-1

NuLi-1 je immortalizovaná linie buněk plicního epitelu průdušek od zdravého pacienta [28]. CuFi-1 je immortalizovaná linie buněk plicního epitelu od pacienta trpícího cystickou fibrózou [29]. U obou linií se jedná o buňky průdušek.

Tyto linie jsou adherentní a pro svůj růst vyžadují specifický povrch potažený kolagenem typu IV. Pro kultivaci bylo využíváno médium LHC-9, které obsahuje růstové faktory, ale neobsahuje fetální bovinní sérum [30]. Jako indikátor změny pH je v tomto médiu fenolová červeň [31]. Do média byl přidáván Geneticin (G418) v množství: 1 µl Geneticinu na 1 ml média LHC-9. Geneticin slouží jako antibiotikum a selekční agens geneticky modifikovaných buněk [32].

Buňky byly kultivovány na povrchu potaženém kolagenem typu IV (viz. kap. 3.2.6). Pro adhezní testy byly tyto linie kultivovány na Corning CellBind destičkách, které nemají povrch s kolagenem. Tato kultivace však byla velmi krátká, proto neměla vliv na vlastnosti buněk.

3.2.4 Subkultivace linií

Subkultivace nazývaná též „pasáž“ je převedení buněk na nové kultivační médium a snížení jejich hustoty. U adherentních linií necháváme buňky narůst do monovrstvy, tzv. „monolayer“. U těchto linií je pro uvolnění buněk použit trypsin s EDTA. K zastavení účinků trypsinu se používá FBS. Při každé pasáži je na kultivační lahvičku nutné poznamenat o kolikátou pasáž se jedná a kdy byla provedena. Pasáž byla prováděna v různých časových intervalech, podle množství nasazených buněk, a tedy době než vytvořily monovrstvu. Nejčastěji se pasáž prováděla po 5-7 dnech, výměna média každé 2-3 dny.

Linie Cu-Fi-1, Nu-Li-1

Buňky se nechávaly narůst do souvislé monovrstvy. Poté z nich bylo slito kultivační médium a bylo přidáno 2-3 ml 0,25% v/v trypsinu s EDTA (0,53 mM). Buňky byly ponechány inkubovat 5-10 minut při 37°C. Následně bylo přidáno ekvivalentní množství (2-3 ml) 1% v/v FBS v PBS. Kultivační povrch byl ještě několikrát opláchnut, aby došlo k uvolnění všech buněk a buněčná suspenze byla centrifugována (1000 RPM, 5 minut, centrifuga Hettich Universal 320R). Peleta byla resuspendována v 1 ml média s příslušným množstvím Geneticinu. Byl odebrán alikvot k počítání buněk. Pro další kultivaci bylo použito 75 – 150 μ l buněčné suspenze a nasazeno do nových kultivačních lahví potažených kolagenem IV.

U těchto linií je doporučeno maximálně 15 pasáží po rozmražení pro zachování deklarovaných vlastností.

3.2.5 Určení množství živých buněk pomocí trypanové modři

Často bylo pro experiment nutné znát množství buněk v suspenzi. K určení počtu buněk byla využívána Bürkerova komůrka (hemocytometr) a mikroskop Motic. 20 μ l buněčné suspenze bylo smícháno s 20 μ l 0,4% w/v trypanové modři (1:1). Z této obarvené suspenze bylo odebráno 20 μ l a pipetováno na mřížku Bürkerovy komůrky. Ta byla umístěna pod mikroskop a byly počítány buňky. Byl vždy počítán 1 velký čtverec, tedy 4x4 malé, a to tak, že z okrajů byl vždy počítán jen pravý a horní, aby se některé buňky nezapočítaly vícekrát. Započítávány byly pouze živé buňky, tedy ty co nebyly obarvené namodro.

Počet buněk byl vypočítán ze vztahu:

$$n = \text{počet buněk ve velkém čtverci} \times \text{ředění} \times 10000$$

3.2.6 Příprava kultivačních nádob potažených kolagenem

Linie CuFi-A a NuLi-1 pro svůj růst vyžadují kultivační povrch potažený kolagenem IV z lidské placenty. Jako zásobní roztok pro práci byl používán roztok kolagenu IV v 0,25% v/v kyselině octové o koncentraci 1,8 mg/ml. Zásobní roztok byl uchováván ve skleněné lahvičce v chladu.

Pro potažení kultivačních lahviček byl tento zásobní roztok zředěn 30x, tedy na 60 µg/ml sterilní destilovanou vodou nebo PBS a přefiltrován přes 0,2 µm filtr (Corning). Roztok kolagenu IV o koncentraci 60 µg/ml byl nanášen do kultivačních lahví tak, aby pokryl celý kultivační povrch lahve: na 75 cm² 4-5 ml roztoku kolagenu, na 25 cm² 2 ml roztoku kolagenu. Lahve s roztokem kolagenu byly ponechány inkubovat v laminárním boxu za laboratorní teploty 12-18 hodin. Roztok kolagenu byl slit a povrch ponechán vyschnout a následně byl kultivační povrch omyt 2-3 x PBS. Promyté lahve byly ponechány vyschnout obrácené, aby nedošlo k vytvoření krystalů PBS na kultivačním povrchu. Vysušené lahve byly sterilizovány v boxu pod UV světlem (minimálně 2-3 hodiny, nejlépe přes noc). Poté bylo víčko zajištěno parafilmem a lahve umístěny v chladu. Před použitím byl kultivační povrch promyt ještě jednou PBS.

3.3 Práce s preparáty *Pseudomonas aeruginosa*

K dispozici byly 4 kmeny bakterie *Pseudomonas aeruginosa*:

- PAK – sbírkový kontrolní kmen *Pseudomonas aeruginosa*
- PA – sbírkový kmen mukoidní formy *Pseudomonas aeruginosa*
- PA Xen41 – bioluminiscenční *Pseudomonas aeruginosa*
- PA lux - bioluminiscenční *Pseudomonas aeruginosa* (luminiscence cca 10x vyšší než u PA Xen41)

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byly kultivovány v PS médiu při 37°C a konstantním třepání v inkubátoru.

PS médium: 1,6% (w/v) pepton, 1% (w/v) enzymatický kaseinový hydrolyzát, 57 mM K₂SO₄, 15 mM MgCl₂, 0,5 % (v/v) glycerol. Médium bylo sterilizováno v autoklávu.

3.4 Fluorescenční značení

Pro fluorescenční značení buněk byly použity fluorescenční sloučeniny PKH67 pro plicní buňky a PKH26 pro bakterie. Tyto sloučeniny se váží svými dlouhými alifatickými řetězci do lipidových částí buněčné membrány. Poločas přetrvání fluorescence je deklarovaný výrobcem 10-12 dní u PKH67 a několik týdnů u PKH26. Při práci bylo postupováno podle produktového listu k těmto sloučeninám, s drobnými úpravami dle [33].

3.4.1 Fluorescenční značení plicních buněk pomocí PKH67

Při barvení touto sloučeninou je nutné mít buňky v suspenzi, proto byla nejprve provedena pasáž (viz. 3.2.4). Buněčná suspenze po pasáži byla centrifugačně promyta PBS (1000 RPM, 5 minut, centrifuga Hettich Universal 320R). Supernatant byl opatrně odebrán a peleta resuspendována ve 250 - 500 μ l Diluentu C (dle množství barvených buněk). Byl připraven roztok barviva o koncentraci 8 μ M (2 μ l barviva do 248 μ l Diluentu C) a ihned přidán k buněčné suspenzi. Směs byla šetrně, ale důkladně promíchána a ponechána inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě v nádobě obalené alobalem.

Po inkubaci bylo barvení zastaveno přidavkem 1 ml FBS a směs byla promíchána. Poté byla suspenze centrifugována (1000 RPM, 10 minut, centrifuga Hettich Universal 320R) a získaná peleta resuspendována v 5 ml kompletního média (LHC-9 s Geneticinem). Buňky byly následně ještě dvakrát centrifugačně promyty kompletním médiem (1000 RPM, 5 minut, centrifuga Hettich Universal 320R). Získaná peleta byla resuspendována v kompletním médiu – základní suspenze pro další práci. Ze základní suspenze bylo odebráno 20 μ l na počítání buněk.

Fluorescence byla sledována na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro při vlnových délkách 470/505 nm, spodní čtení destičky, gain nastavován automaticky. Další hodnocení fluorescence bylo prováděno na mikroskopu Nikon Eclipse, filtr 31001 FITC C87701.

3.4.2 Fluorescenční značení bakteriálních buněk pomocí PKH26

K fluorescenci dochází v červené oblasti spektra, excitační maximum je při 551 nm a emisní maximum při 567 nm.

Bakterie narostlé přes noc v kompletním médiu byly centrifugovány (12000 RPM, 10 minut, Eppendorf Centrifuge 5415R). Poté byly ještě centrifugačně promyty od zbytků média (12000 RPM, 10 minut, Eppendorf Centrifuge 5415R). Roztok PBS byl důkladně odebrán a peleta resuspendována ve 250 μ l Diluentu C. Byl připraven roztok barviva o koncentraci 20 μ M (4 μ l barviva do 246 μ l Diluentu C) a ihned přidán k buněčné suspenzi. Suspenze s barvivem byla důkladně promíchána a ponechána inkubovat za laboratorní teploty a občasného promíchání 30 minut v mikrozkumavce obalené alobalem. Po inkubaci bylo barvení zastaveno přidáním 150 μ l 1% (w/v) BSA v PBS. Směs byla krátce inkubována a poté přidán další 1 ml roztoku BSA. Směs byla poté centrifugována (13000 RPM, 10 minut, Eppendorf Centrifuge 5415R). Peleta byla resuspendována v PBS a ještě 2x centrifugačně promyta PBS (12000 RPM, 10 minut, Eppendorf Centrifuge 5415R).

Fluorescence byla sledována na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro při vlnových délkách 522/569 nm, spodní čtení destičky, gain 160. Další hodnocení fluorescence bylo prováděno na mikroskopu Nikon Eclipse, filtr 31002 RdiI C87702.

3.5 Adhezní test

V této práci byl studován vliv protilátek proti lektinu *Pseudomonas aeruginosa* na schopnost adheze těchto patogenů na buňky plicního epitelu. Konkrétně byly používány protilátky proti lektinu PA-IIL. Metodika práce byla převzata z [31].

Jako modelový systém plicní tkáně byly použity linie CuFi-1 a NuLi-1 (viz. 3.2). Buňky byly pro adhezní test značeny pomocí fluorescenčních barviv: PKH67 (plicní epiteliální buňky) a PKH26 (bakteriální buňky). Následně byly vyhodnocovány poměry fluorescencí těchto dvou systémů v přítomnosti či nepřítomnosti protilátek.

Z výsledné suspenze plicních buněk po barvení byl odebrán alikvot k počítání buněk v Bürkerově komůrce. Následně byly buňky nanесeny na 24 jamkovou destičku Corning CellBind v množství $5,5 \cdot 10^5$ buněk/jamka. Buňky byly převrstveny 750 μ l kompletního média a ponechány inkubovat přes noc (37°C , 5% CO_2) pro vytvoření souvislé vrstvy.

Do kompletního média byly inokulovány bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a nechány přes noc růst. Zároveň byly připraveny preparáty protilátek. Protože jsou uchovávány v azidu sodném, který je pro buňky toxický, je třeba je dialýzou (alespoň 24 hodin) převést do PBS. Poté byla změřena koncentrace proteinů (protilátek) v roztoku při 280 nm a vypočtena podle vztahu:

$$\text{konc.} = A_{280} \cdot \text{ředění} \cdot 1,094$$

Protilátka kontrolní (K) pocházela ze zvířete, které nebylo imunizováno, protilátka specifická (S) z imunizovaného zvířete.

Napěstované bakterie byly následující den promyty od média a fluorescenčně značeny. Poté byla určena koncentrace buněk změřením optické denzity bakteriální suspenze při 600 nm (Spekol). Pro adhezní test bylo použito množství bakteriálních buněk cca 33x větší než bylo množství plicních buněk ($1,65 \cdot 10^7$ bakteriálních buněk na jamku, tzn. $5,5 \cdot 10^7$ buněk/ml).

Byly připraveny suspenze ve složení:

- 1) *Pseudomonas aeruginosa* $5,5 \cdot 10^7$ buněk/ml v PBS
- 2) *Pseudomonas aeruginosa* $5,5 \cdot 10^7$ buněk/ml v PBS s kontrolní protilátkou (4K/3K) o koncentraci 1 mg/ml v PBS
- 3) *Pseudomonas aeruginosa* $5,5 \cdot 10^7$ buněk/ml v PBS se specifickou protilátkou (4S/3S) proti lektinu PA-IIL o koncentraci 1 mg/ml v PBS
- 4) *Pseudomonas aeruginosa* $5,5 \cdot 10^6$ buněk/ml v PBS
- 5) *Pseudomonas aeruginosa* $5,5 \cdot 10^5$ buněk/ml v PBS

(Pozn.: Roztoky 4 a 5 sloužily pouze jako pomocná kalibrace při měření a nebyly používány při všech testech.)

Narostlé eukaryotické buňky byly omyty od zbytků média roztokem PBS. Bakteriální suspenze byly v množství 300 μ l/ jamka pipetovány na destičku s plicními buňkami. Poté byla celá destička změřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro v programu i-Control: spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain 160 (PKH26)/ nastavený automaticky (PKH67), vlnové délky Ex/Em: 470/505 nm (PKH67); 522/569 nm (PKH26). Po dvouhodinové inkubaci byla změřena fluorescence celé destičky znovu při totožném nastavení.

Poté byly jamky 3x promyty PBS, aby byly odstraněny nenavázané bakterie. První promytí bylo 500 μ l PBS, další dvě promytí 350 μ l PBS. Poté byly jamky převrstveny 100 μ l PBS, aby buňky nevyschly, a znovu změřeny na spektrofluorimetru.

Následně byla situace v jednotlivých jamkách dokumentována na mikroskopu Nikon Eclipse jako nativní a fluorescenční snímky s příslušnými filtry. Snímky byly uloženy. Pro úpravu snímků a vnášení barvy byl využíván program Zoner Photo Studio 16 PRO.

4 Výsledky

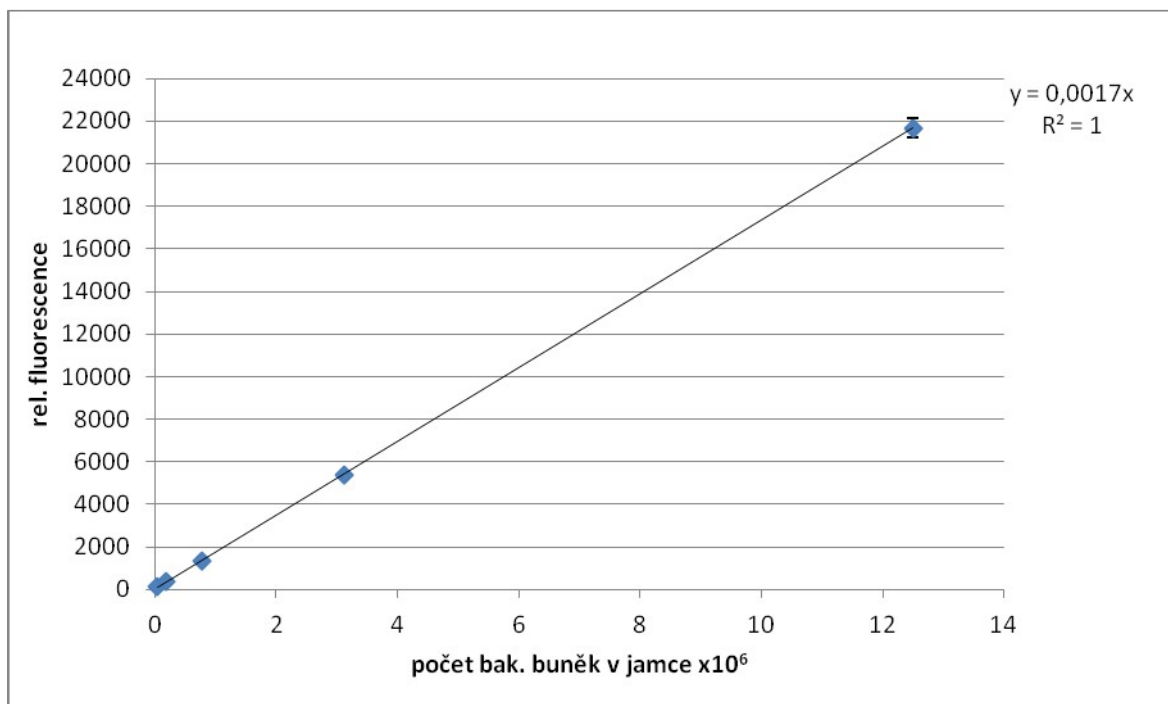
4.1 Fluorescenční barvení bakteriálních buněk

Pseudomonas aeruginosa pomocí PKH26

K barvení bakteriálních buněk bylo použito barvivo PKH26 poskytující fluorescenci v červené části spektra. K práci byly používány vlnové délky excitační 522 nm a emisní 569 nm, aby nedocházelo k překryvu fluorescence barviva PKH67 používaným ke značení eukaryotických buněk.

Byl použit kontrolní kmen *Pseudomonas aeruginosa* (PAK). Bakteriální buňky *Pseudomonas aeruginosa* narostlé v kompletním médiu přes noc byly promyty od média a barveny PKH26. Byla vytvořena finální suspenze promytých buněk v PBS, u které byla změřena optická denzita a bylo vypočteno množství bakterií. Z této suspenze byly ředící řadou připraveny roztoky o různé koncentraci a ty naneseny na CellBind 24 jamkovou destičku v objemu 300 μ l/jamka. Jako slepý vzorek bylo použito 300 μ l roztoku PBS.

Od naměřených hodnot pro dané počty bakterií byla odečtena hodnota fluorescence pro slepý vzorek, hodnoty pro daný počet bakterií zprůměrovány a určena směrodatná odchylka. Z těchto hodnot byl sestaven graf závislosti relativní fluorescence na množství bakteriálních buněk v jamce (obr. 4.1), na straně 27.

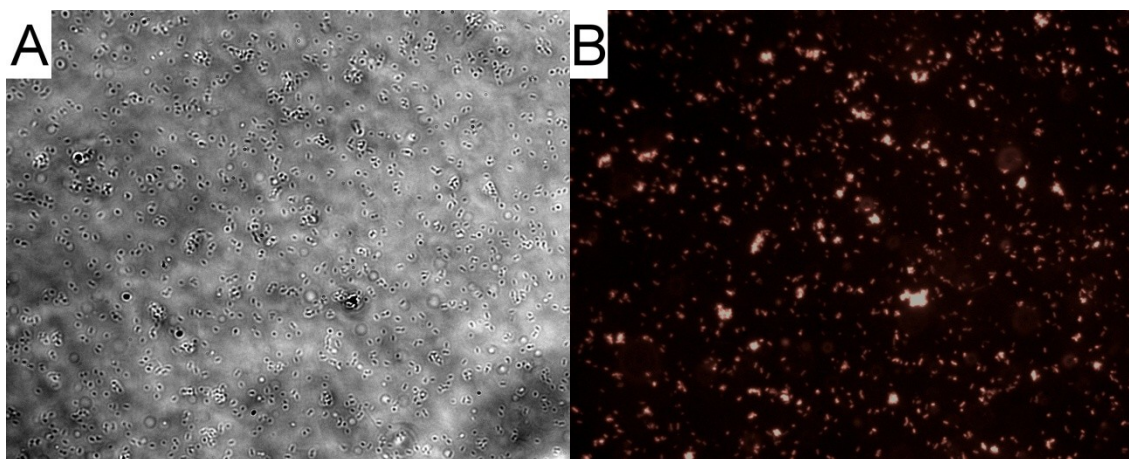


Obr. 4.1 Závislost relativní fluorescence *Pseudomonas aeruginosa* barvených PKH26 na počtu buněk v jamce

Hodnoty fluorescence jsou vyneseny po odečtu hodnoty fluorescence pozadí (4442). Měření probíhalo na spektrofluorimetru Tecan Infinite při nastavení: Ex/Em - 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain 160

Jako hraniční počet buněk, jejichž fluorescenci lze odlišit od blanku se jeví hodnota $1,95 \cdot 10^5$ buněk/jamka.

Destička se vzorky byla po změření relativní fluorescence hodnocena mikroskopicky na mikroskopu Nikon Eclipse: filtr 31002 RdiI C87702. Snímky z mikroskopu jsou na obrázku 4.2.



Obr. 4.2 Mikroskopické snímky *Pseudomonas aeruginosa* značené PKH26

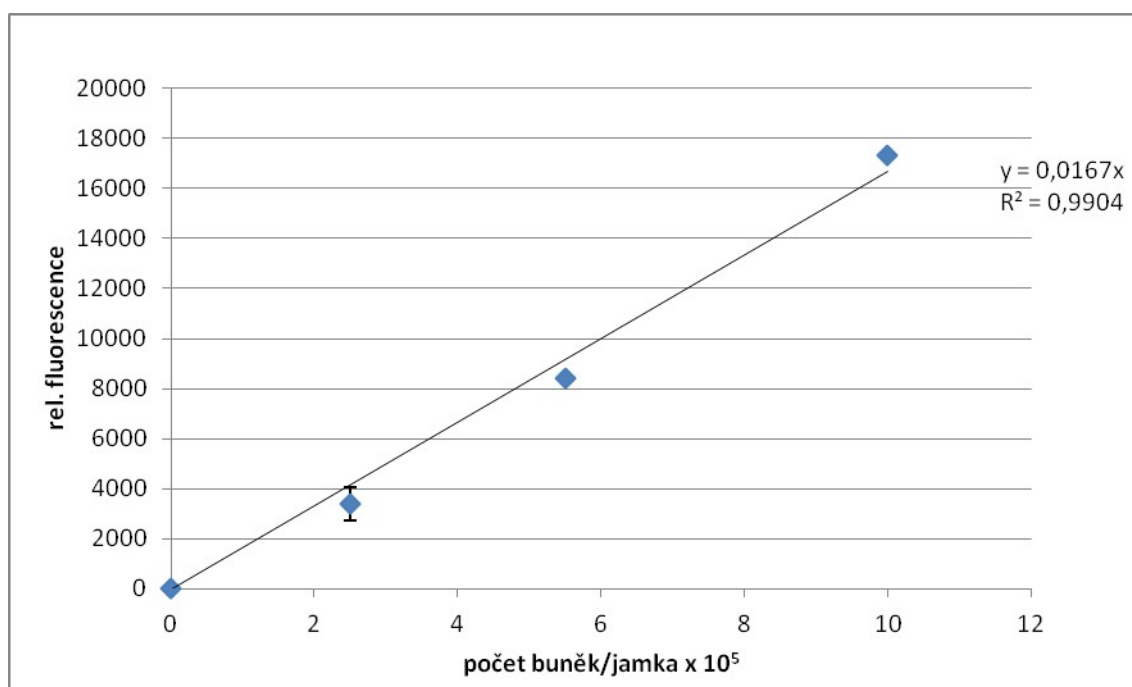
Nikon Eclipse, filtr 31002 RdiI, zvětšení 300x; snímek A – nativní snímek, B – fluorescence PKH26, snímek kolorován v programu Zoner Photo Studio 16

4.2 Fluorescenční značení eukaryotických buněk NuLi-1 a CuFi-1 pomocí PKH67

V této práci byly jako optimální používány vlnové délky excitační 470 nm a emisní 505 nm, aby nedocházelo k překryvu fluorescence s barvivem PKH26 používaným ke značení bakteriálních buněk.

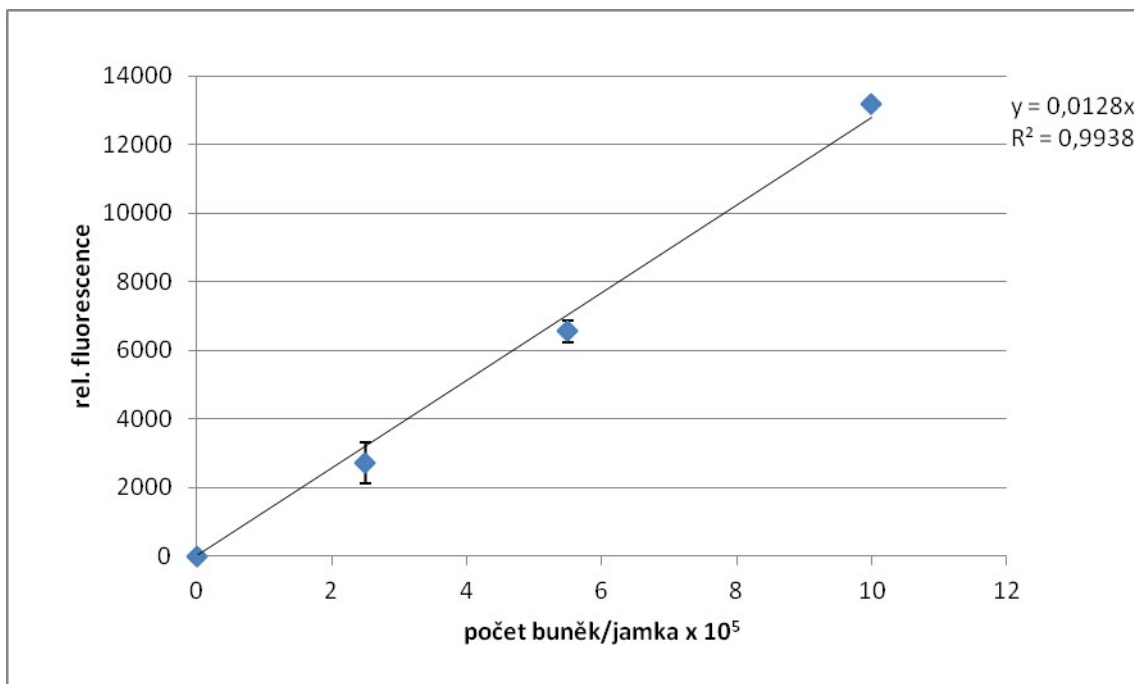
Buňky byly nabarveny. Z finální buněčné suspenze v kompletním médiu bylo odebráno 20 μl k počítání v Bürkerově komůrce. Z buněčné suspenze bylo odebráno příslušné množství suspenze odpovídající 10^6 - 10^5 buněk/jamka a nanášeno na CellBind 24 jamkovou destičku. Jako slepý vzorek byl použit roztok PBS.

Od naměřených hodnot pro dané počty buněk na jamce byla odečtena hodnota fluorescence slepého vzorku, hodnoty pro daný počet buněk zprůměrovány a určena směrodatná odchylka. Z těchto hodnot byl sestaven graf závislosti relativní fluorescence na množství bakteriálních buněk v jamce (obr. 4.3 pro NuLi-1 a 4.4 pro CuFi-1).



Obr. 4.3 Závislost relativní fluorescence NuLi-1 barvených PKH67 na počtu buněk v jamce

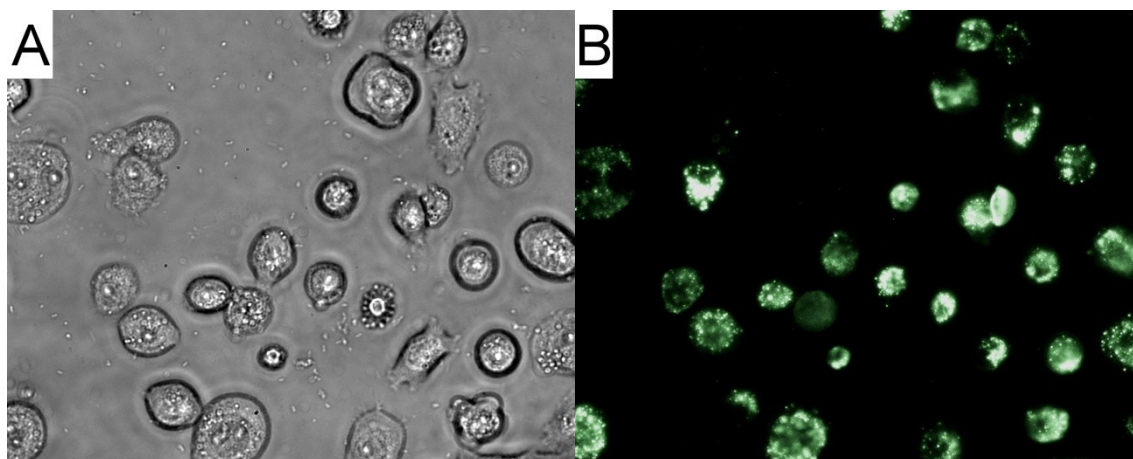
Hodnoty rel. fluorescence jsou vyneseny po odečtu fluorescence pozadí (20359). Měření probíhalo na spektrofluorimetru Tecan Infinite při nastavení: Ex/Em - 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky



Obr. 4.4 Závislost relativní fluorescence CuFi-1 barvených PKH67 na počtu buněk v jamce

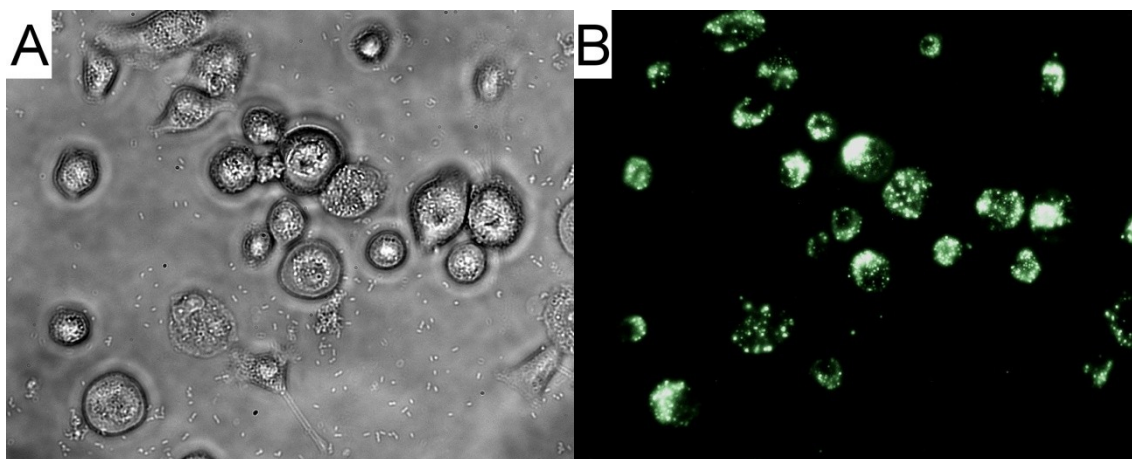
Hodnoty rel. fluorescence jsou vyneseny po odečtu fluorescence pozadí (20359). Měření probíhalo na spektrofotometru Tecan Infinite při nastavení: Ex/Em - 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky

Destička se vzorky byla po změření mikroskopicky hodnocena na mikroskopu Nikon Eclipse: filtr 31001 FITC C87701. Snímky z mikroskopu jsou na obrázku 4.5 pro NuLi a na obrázku 4.6 pro CuFi.



Obr. 4.5 Mikroskopické snímky NuLi-1 značené PKH67

Nikon Eclipse, filtr 31001 FITC, zvětšení 300x, A – nativní snímek, B - fluorescence PKH67, snímek kolorován v programu Zoner Photo Studio 16



Obr. 4.6 Mikroskopické snímky NuLi-1 značené PKH67

Nikon Eclipse, filtr 31001 FITC, zvětšení 300x, A – nativní snímek, B - fluorescence PKH67, snímek kolorován v programu Zoner Photo Studio 16

4.3 Adhezní testy

Úkolem celé práce bylo porovnat ovlivnění schopnosti adheze různých druhů bakterií, konkrétně kmenů PAK, PA a PA lux, na eukaryotické buňky v přítomnosti protilátek. Dále bylo zkoumáno, zda protilátky z různých imunizovaných zvířat mají stejný vliv na ovlivnění adheze bakterií.

Při adhezních testech byl sledován vliv kontrolní (K) a specifické (S) protilátky proti bakteriálnímu lektinu PA-IIL na bakterie kontrolního kmenu. K dispozici byly dvě řady protilátek, označené 3 a 4 podle čísla imunizované slepice.

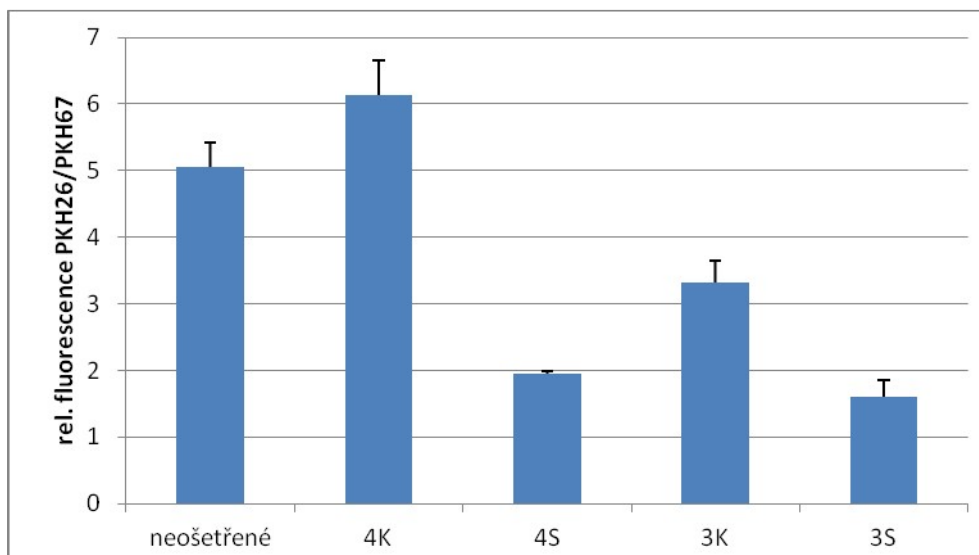
Pro vizualizaci interakce bakteriálních a eukaryotických buněk bylo využíváno značení fluorescenčními barvivy PKH a následné vyhodnocení vzájemných poměrů relativní fluorescence.

Buňky obou eukaryotických linií (CuFi-1 a NuLi-1) byly barveny fluorescenční barvou PKH67, nasazeny na destičku v množství $5,5 \cdot 10^5$ buněk/jamka a nechány inkubovat přes noc. Bakterie PAK byly barveny PKH26. Poté byly vytvořeny suspenze bakterií s jednotlivými agens použitými v daném testu.

Tyto vzorky byly nanášeny do jamek na eukaryotické buňky. Jako kontrolní vzorek byl použit roztok PBS ve stejném množství. Destičky byly následně inkubovány 2 h při laboratorní teplotě. Poté byly změřeny na spektrofluorimetru Tecan Infinite. Jamky byly následně promyty a destičky znovu změřeny.

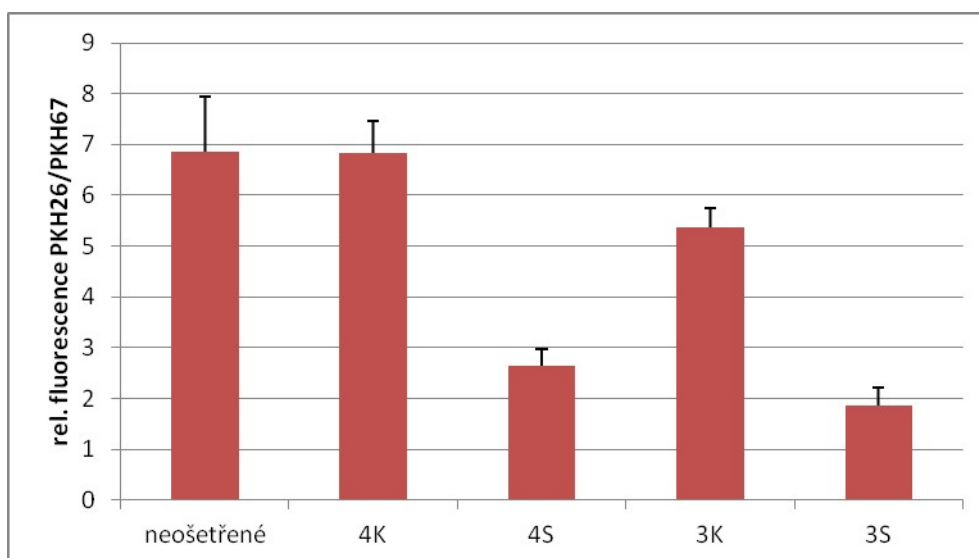
Od naměřených hodnot fluorescence byla odečtena fluorescence pozadí. Pro normalizaci výsledků bakteriální adherence byly relativní fluorescence naměřené pro bakteriální buňky (PKH26) děleny hodnotami relativní fluorescence určené pro eukaryotické buňky (PKH67) a byla vypočtena hodnota směrodatné odchylky.

Porovnání protilátek ze dvou různých slepic imunizovaných týmž antigenem bylo prováděno na kontrolním kmenu *Pseudomonas aeruginosa* (PAK). K dispozici byly protilátky od dvou zvířat, dále označované jako 3 a 4. Výsledný graf poměru rel. fluorescence bakteriálních a eukaryotických buněk je uveden na obrázku 4.7 pro linii NuLi-1 a na obrázku 4.8 pro linii CuFi-1 na straně 32.



Obr. 4.7 Relativní adherence bakterií PAK na buňky NuLi-1

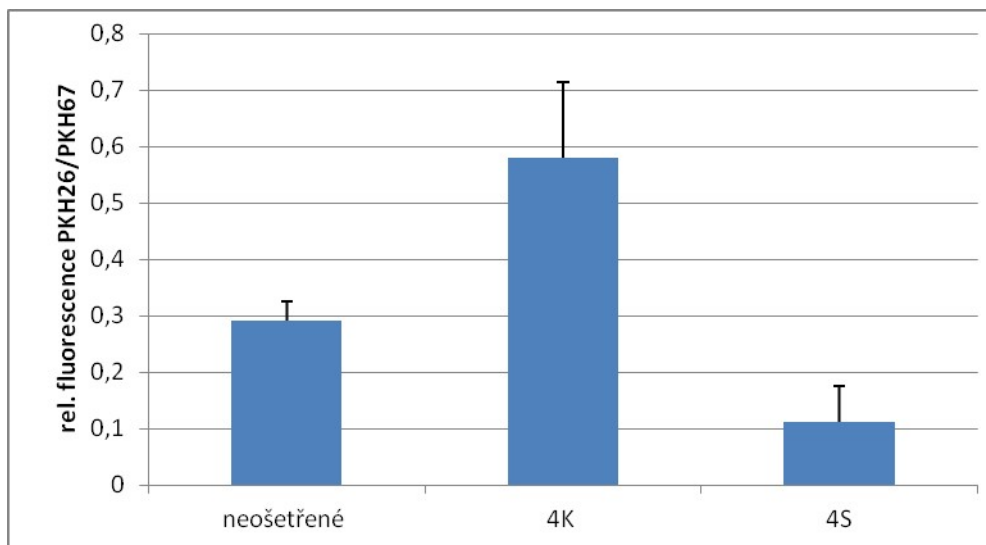
Byly použity bakterie PAK (kontrolní kmen). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em - 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain 160) a buněk NuLi-1 (Ex/Em - 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky) určené pro jednotlivé reakční směsi: kontrolní protilátka (4K, 3K), specifická protilátka (4S, 3S), neošetřené (buňky bez přidávaných ovlivňujících agens). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty rel. fluorescence použité pro poměr jsou po odečtu pozadí (buňky: 3183, bakterie: 3924).



Obr. 4.8 Relativní adherence bakterií PAK na buňky CuFi-1

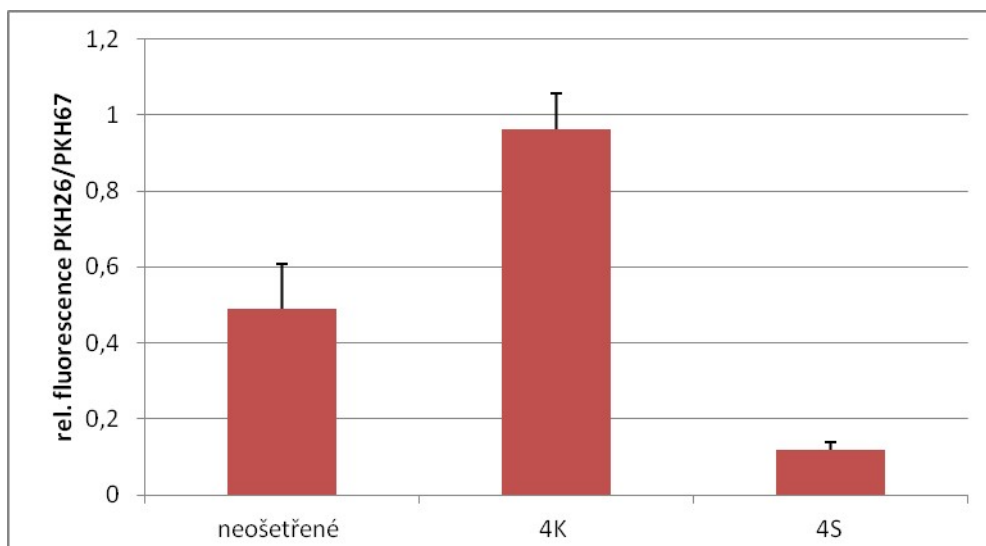
Byly použity bakterie PAK (kontrolní kmen). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em - 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain 160) a buněk CuFi-1 (Ex/Em - 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky) určené pro jednotlivé reakční směsi: kontrolní protilátka (4K, 3K), specifická protilátka (4S, 3S), neošetřené (buňky bez přidávaných ovlivňujících agens). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty rel. fluorescence použité pro poměr jsou po odečtu pozadí (buňky: 3 290, bakterie: 3973).

Pro adhezní test s kontrolním kmenem *Pseudomonas aeruginosa* (PAK) byly použity protilátky označené 4. Výsledný graf poměru rel. fluorescence bakteriálních a eukaryotických buněk je uveden na obrázku 4.9 pro linii NuLi-1 a na obrázku 4.10 pro linii CuFi-1.



Obr. 4.9 Relativní adherence bakterií PAK na buňky NuLi-1

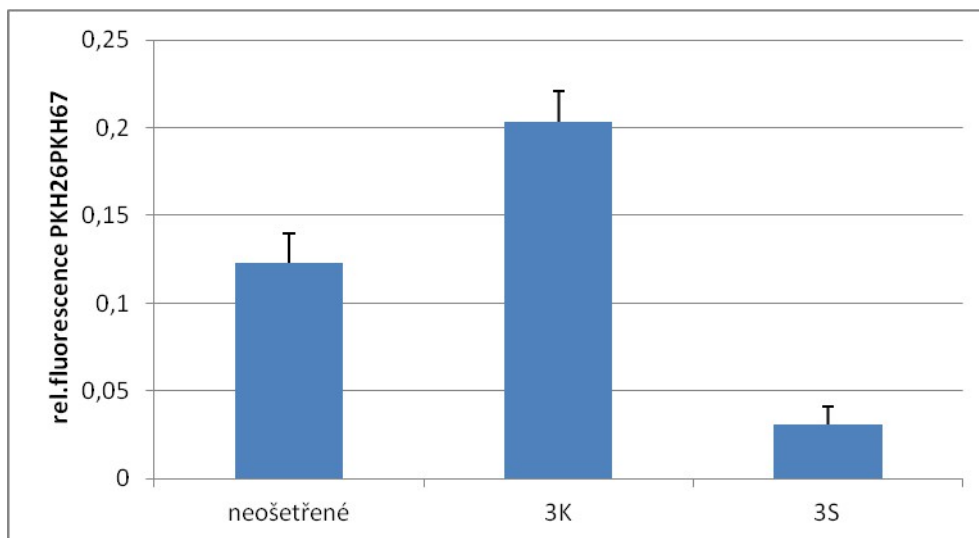
Byly použity bakterie PAK (kontrolní kmen). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain 160) a buněk NuLi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky) určené pro jednotlivé reakční směsi: kontrolní protilátka (4K), specifická protilátka (4S), neošetřené (buňky bez přidávaných ovlivňujících agens). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty rel. fluorescence použité pro poměr jsou po odečtu pozadí (buňky: 11886, bakterie: 4053).



Obr. 4.10 Relativní adherence bakterií PAK na buňky CuFi-1

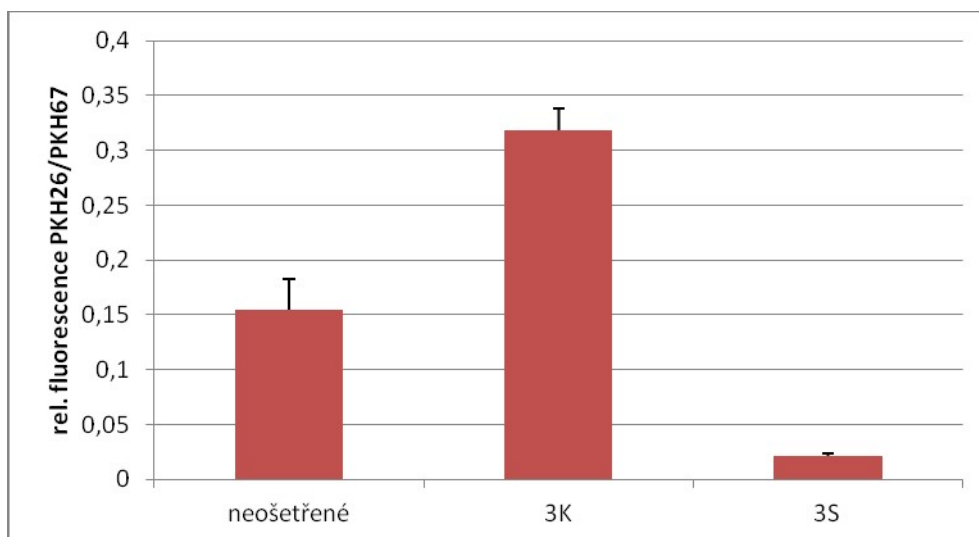
Byly použity bakterie PAK (kontrolní kmen). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain 160) a buněk CuFi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky) určené pro jednotlivé reakční směsi: kontrolní protilátka (4K), specifická protilátka (4S), neošetřené (buňky bez přidávaných ovlivňujících agens). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty rel. fluorescence použité pro poměr jsou po odečtu pozadí (buňky: 12184, bakterie: 4130).

K testování adheze bakteriálních buněk mukoidního kmenu *Pseudomonas aeruginosa* (PA) byly použity protilátky řady 3. Výsledný graf poměru rel. fluorescence bakteriálních a eukaryotických buněk je uveden na obrázku 4.11 pro linii NuLi-1 a na obrázku 4.12 pro linii CuFi-1.



Obr. 4.11 Relativní adherence bakterií PA na buňky NuLi-1

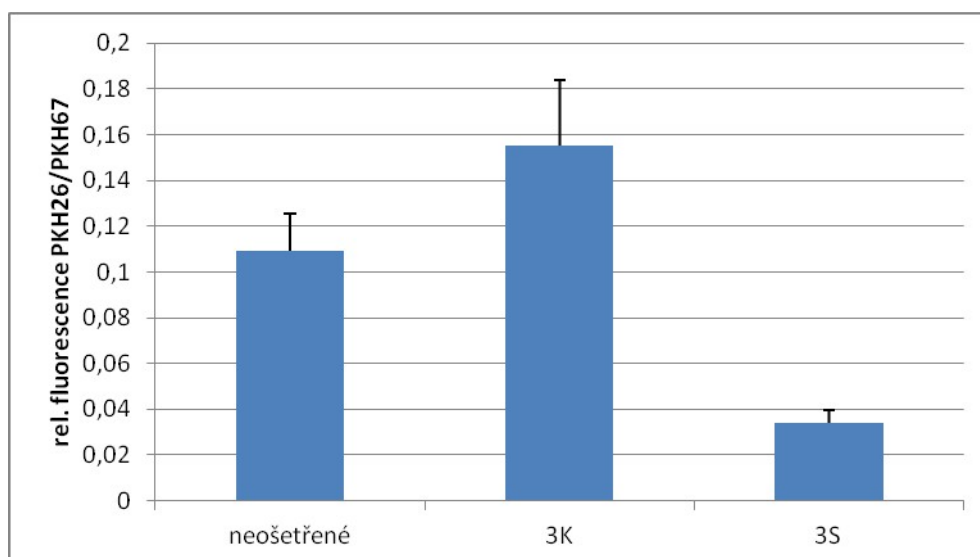
Byly použity bakterie PA (mukoidní kmen). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain 160) a buněk NuLi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky) určené pro jednotlivé reakční směsi: kontrolní protilátka (3K), specifická protilátka (3S), neošetřené (buňky bez přidání ovlivňujících agens). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty rel. fluorescence použité pro poměr jsou po odečtu pozadí (buňky: 18551, bakterie: 3876).



Obr. 4.12 Relativní adherence bakterií PA na buňky CuFi-1

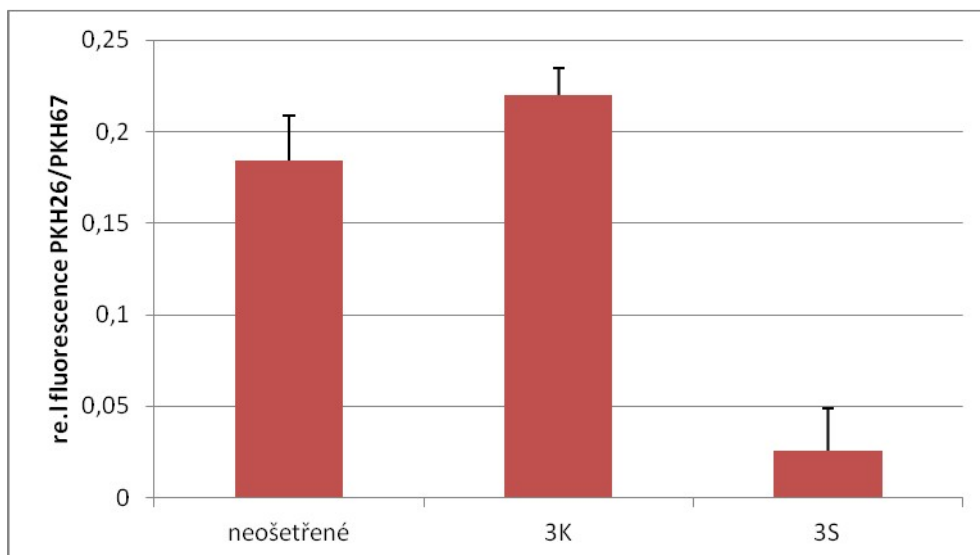
Byly použity bakterie PA (mukoidní kmen). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain 160) a buněk CuFi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky) určené pro jednotlivé reakční směsi: kontrolní protilátka (3K), specifická protilátka (3S), neošetřené (buňky bez přidání ovlivňujících agens). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty rel. fluorescence použité pro poměr jsou po odečtu pozadí (buňky: 16872, bakterie: 4047).

Testování protilátek na bioluminiscenčním kmenu *Pseudomonas aeruginosa* bylo prováděno na kmenu PA lux, u kterého byla zjištěna luminiscence zhruba 10x vyšší než u kmenu PA Xen41. Bakteriální buňky tohoto kmenu byly použity ve dvou formách – nebarvené a barvené PKH26. U barvených bakterií byla měřena fluorescence i luminiscence, u nebarvených jen luminiscence. Výsledný graf poměru rel. fluorescence barvených bakteriálních a eukaryotických buněk je uveden na obrázku 4.13 pro linii NuLi-1 a na obrázku 4.14 (str. 36) pro linii CuFi-1. Graf poměru rel. luminiscence bakterií barvených PKH26 a rel. fluorescence eukaryotických buněk je na obrázku 4.15 (str. 36) pro NuLi-1 a na obrázku 4.16 (str. 37) pro CuFi-1, graf poměru rel. luminiscence nebarvených bakterií a rel. fluorescence eukaryotických buněk je na obrázku 4.17 (str. 37) pro linii NuLi-1 a na obrázku 4.18 (str. 38) pro linii CuFi-1.



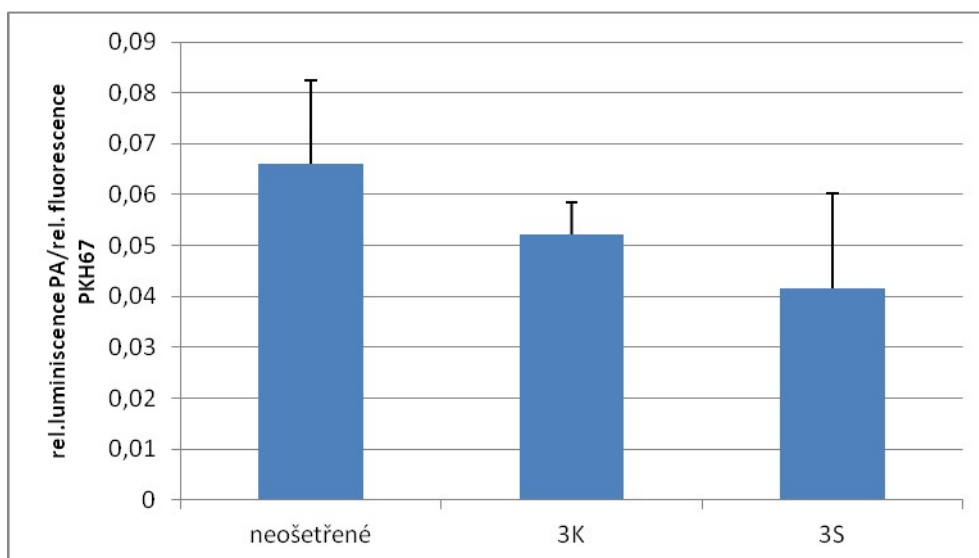
Obr. 4.13 Relativní adherence bakterií PA lux na buňky NuLi-1

Byly použity bakterie PA lux (bioluminiscenční kmen). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain 160) a buněk NuLi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky) určené pro jednotlivé reakční směsi: kontrolní protilátka (3K), specifická protilátka (3S), neošetřené (buňky bez přidání ovlivňujících agens). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty rel. fluorescence použité pro poměr jsou po odečtu pozadí (buňky: 26231, bakterie: 3937).



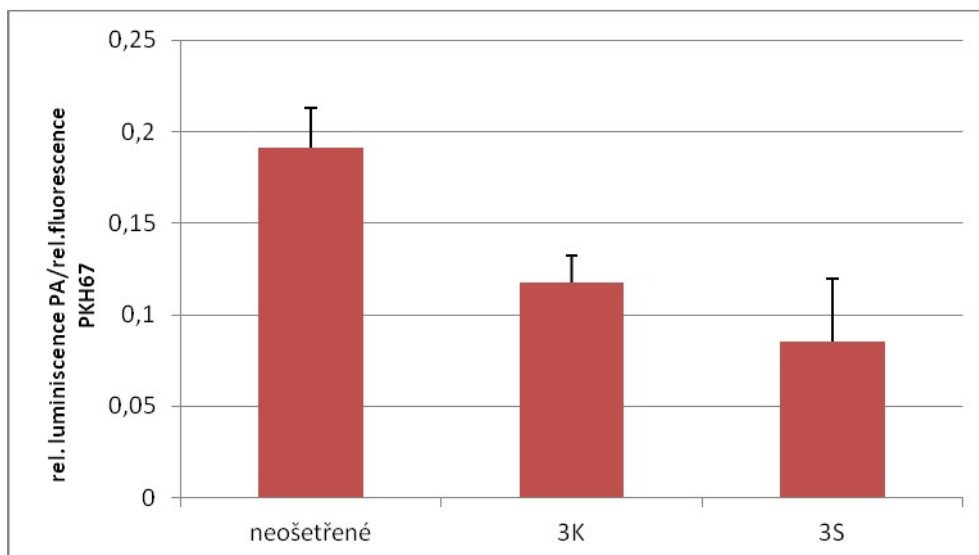
Obř. 4.14 Relativní adherence bakterií PA lux na buňky CuFi-1

Byly použity bakterie PA lux (bioluminiscenční kmen). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain 160) a buněk CuFi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky) určené pro jednotlivé reakční směsi: kontrolní protilátka (3K), specifická protilátka (3S), neošetřené (buňky bez přidávaných ovlivňujících agens). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty rel. fluorescence použité pro poměr jsou po odečtu pozadí (buňky: 25319, 4121).



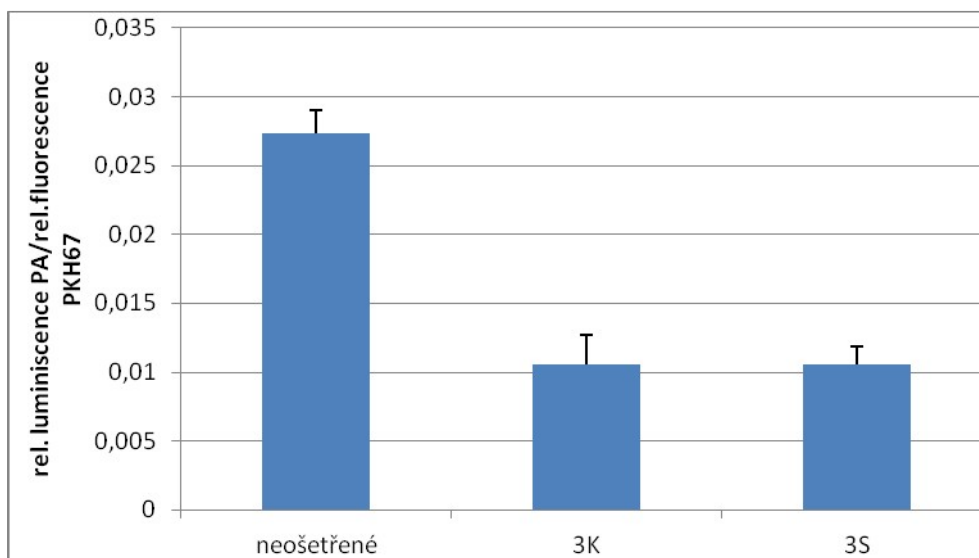
Obř. 4.15 Relativní adherence bakterií PA lux na buňky NuLi-1

Byly použity bakterie PA lux (bioluminiscenční kmen) barvené PKH26. Do grafu byly vyneseny poměry relativní luminescence bakterií (Luminescence PA: bez zeslabení, integrační čas 1000 ms) a rel fluorescence buněk NuLi-1 (PKH67:Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky) určené pro jednotlivé reakční směsi: kontrolní protilátka (3K), specifická protilátka (3S), neošetřené (buňky bez přidávaných ovlivňujících agens). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty rel. fluorescence a luminescence použité pro poměr jsou po odečtu pozadí (26231, bakterie: 0).



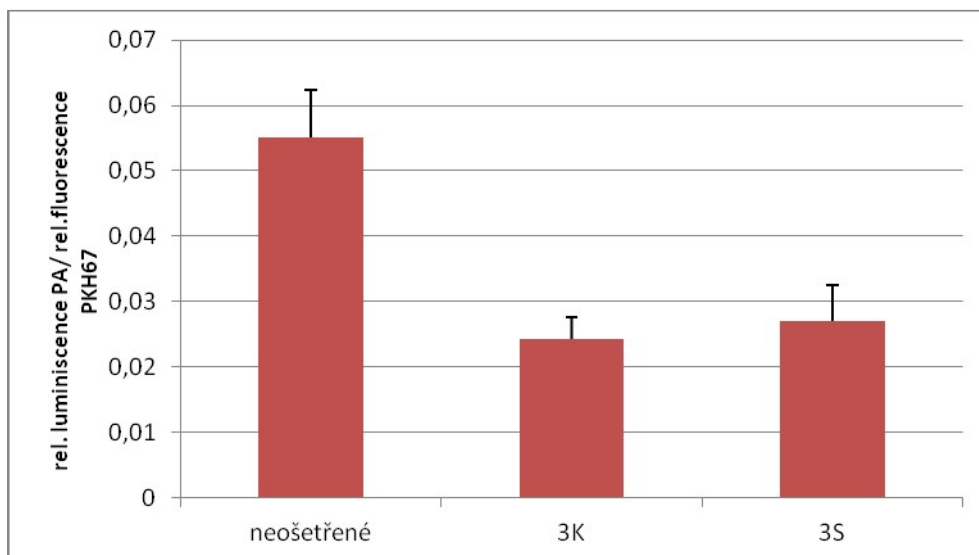
Obr. 4.16 Relativní adherence bakterií PA lux na buňky CuFi-1

Byly použity bakterie PA lux (bioluminiscenční kmen) barvené PKH26. Do grafu byly vyneseny poměry relativní luminescence bakterií (Luminiscence PA: bez zeslabení, integrační čas 1000 ms) a rel fluorescence buněk CuFi-1 (PKH67:Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky) určené pro jednotlivé reakční směsi: kontrolní protilátka (3K), specifická protilátka (3S), neošetřené (buňky bez přidání ovlivňujících agens). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty rel. fluorescence a luminescence použité pro poměr jsou po odečtu pozadí (buňky: 25319, bakterie: 6).



Obr. 4.17 Relativní adherence bakterií PA lux na buňky NuLi-1

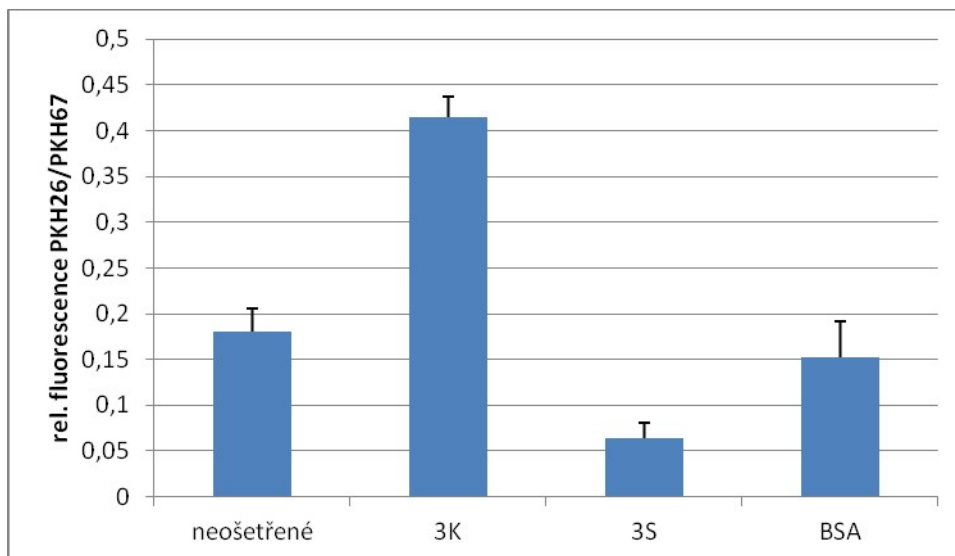
Byly použity nebarvené bakterie PA lux (bioluminiscenční kmen). Do grafu byly vyneseny poměry relativní luminescence bakterií (Luminiscence PA: bez zeslabení, integrační čas 1000 ms) a rel fluorescence buněk NuLi-1 (PKH67:Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky) určené pro jednotlivé reakční směsi: kontrolní protilátka (3K), specifická protilátka (3S), neošetřené (buňky bez přidání ovlivňujících agens). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty rel. fluorescence a luminescence použité pro poměr jsou po odečtu pozadí (buňky: 26231, bakterie: 0).



Obr. 4.18 Relativní adherence bakterií PA lux na buňky CuF-1

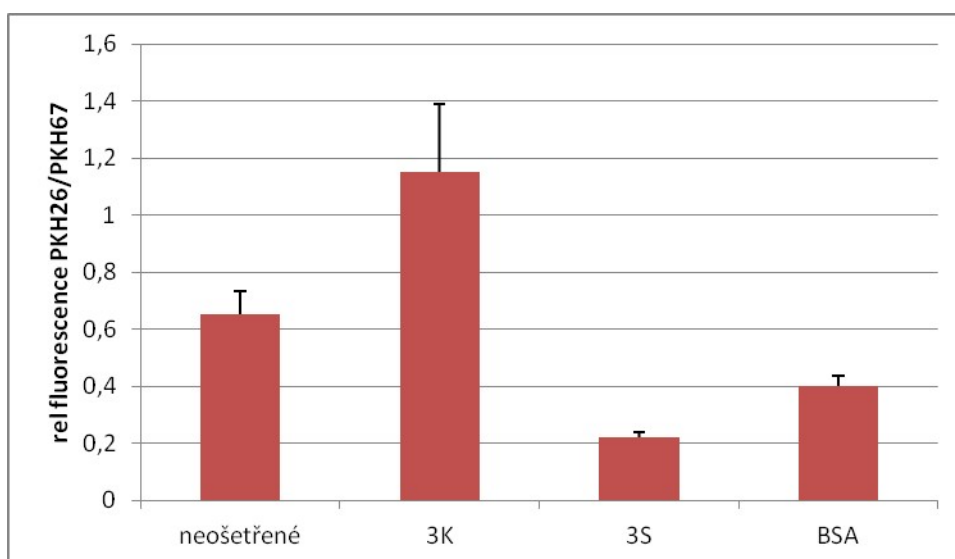
Byly použity nebarvené bakterie PA lux (bioluminiscenční kmen). Do grafu byly vyneseny poměry relativní luminescence bakterií (Luminescence PA: bez zeslabení, integrační čas 1000 ms) a rel fluorescence buněk CuFi-1 (PKH67:Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky) určené pro jednotlivé reakční směsi: kontrolní protilátka (3K), specifická protilátka (3S), neošetřené (buňky bez přidání ovlivňujících agens). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty rel. fluorescence a luminescence použité pro poměr jsou po odečtu pozadí (buňky: 25319, bakterie: 16).

K porovnání vlivu protilátek a obecného proteinu byly použity bakterie kontrolního kmenu (PAK) a protilátky řady 3. Jako obecný protein byl vybrán hovězí sérový albumin (BSA), který byl přidán v koncentraci 1 mg/ml k bakteriální suspenzi. Dále bylo postupováno dle standardního postupu. Výsledný graf poměru rel. fluorescence bakteriálních a eukaryotických buněk je uveden na obrázku 4.19 pro linii NuLi-1 a na obrázku 4.20 pro linii CuFi-1 (str. 39).



Obr. 4.19 Relativní adherence bakterií PAK na buňky NuLi-1

Byly použity bakterie PAK (kontrolní kmen). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain 160) a buněk NuLi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky) určené pro jednotlivé reakční směsi: kontrolní protilátka (3K), specifická protilátka (3S), hovězí sérový albumin (BSA), neošetřené (buňky bez přidaných ovlivňujících agens). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty rel. fluorescence použité pro poměr jsou po odečtu pozadí (buňky: 16026, bakterie: 5153).



Obr. 4.19 Relativní adherence bakterií PAK na buňky CuFi-1

Byly použity bakterie PAK (kontrolní kmen). Do grafu byly vyneseny poměry relativní fluorescence bakterií (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain 160) a buněk CuFi-1 (Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4, gain nastaven automaticky) určené pro jednotlivé reakční směsi: kontrolní protilátka (3K), specifická protilátka (3S), hovězí sérový albumin (BSA), neošetřené (buňky bez přidaných ovlivňujících agens). Graf reprezentuje situaci po odmytí neadherovaných bakterií. Hodnoty rel. fluorescence použité pro poměr jsou po odečtu pozadí (buňky: 37921, bakterie: 5444).

5 Diskuze

Cystická fibróza je genetické onemocnění, jehož příčinou je mutace v genu CFTR. Tento gen kóduje protein pro chloridový kanál. Mutace a následné poškození toho kanálu s sebou nese celou řadu zdravotních komplikací. U CF nejvíce postiženo dýchací ústrojí, které je náchylné k bakteriální infekci, zejména patogenem *Pseudomonas aeruginosa*. V této práci byla proto zkoumána možnost profylaktického použití slepičích protilátek proti adhezivním strukturám *Pseudomonas aeruginosa*, zda mají potenciál snižovat adhezi těchto patogenů na buňky plicního epitelu.

Žloutkové imunoglobuliny jsou v současnosti zkoumány pro účely pasivní imunizace proti různým typům mikroorganismů. Byly například použity proti kvasinkám *Candida* spp., kde efektivně bránily adhezi těchto patogenů na orální epiteliální buňky [34].

V předkládané práci byly jako modelový systém zvoleny buněčné linie CuFi-1 a NuLi-1, které pocházejí z plicního epitelu zdravého (NuLi-1) a CF (CuFi-1) pacienta. Tyto buňky byly vystaveny působení bakteriálních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* v přítomnosti protilátek právě proti lektinu PA-III.

Pro vyhodnocení množství adherovaných buněk byla použita kvantifikace pomocí fluorescence a luminiscence. Pro experimenty byly buňky barveny fluorescenčními barvivy PKH. Tato barviva byla používána, protože bakterie po nabarvení zůstávají plně pohyblivé a životaschopné a nedochází k žádným poruchám povrchových struktur, které by ovlivňovaly zkoumanou adhezi. Excitační a emisní vlnové délky byly oproti návodu výrobce mírně upraveny, aby nedocházelo k vzájemnému překryvu fluorescencí jednotlivých barviv.

Jednotlivé experimenty byly prováděny na 24 jamkových destičkách s tzv. CellBind povrchem, tedy povrchem, který je vhodný k navázání buněk. Bylo potřeba, aby eukaryotické buňky plicní tkáně byly pevně přichyceny na dno jamek, protože po inkubaci s bakteriemi byly jamky promývány, aby došlo k odstranění nenavázaných bakterií, nikoliv eukaryotických buněk. Důvodem k uspořádání v jamkách je fakt, že se jedná o adherentní linie a toto uspořádání nejlépe simulovalo reálnou situaci v plicích. Další výhodou je rychlost měření destiček na spektrofluorimetru. Změření celé destičky pro fluorescenci obou druhů barviv trvá < 5 minut, což výrazně neovlivní dobu inkubace.

Spektrofluorimetrické měření bylo vždy doplněno mikroskopickým pozorováním na mikroskopu Nikon Eclipse. Toto pozorování umožnilo hodnotit kvalitu nabarvení

jednotlivých buněk, chování bakterií v přítomnosti či nepřítomnosti protilátek a v neposlední řadě také jejich motilitu.

Pro tuto práci byly k dispozici dva vzorky od dvou různých slepic - kontrolní (před imunizací) a specifické protilátky (po imunizaci). Bylo třeba zjistit, zda tyto protilátky mají stejné vlastnosti, tedy schopnost zabraňovat vazbě PA na plicní buňky.

Prvním cílem bylo porovnat účinky těchto protilátek na adhezi *Pseudomonas aeruginosa*. Pro testování byl vybrán jako referenční kontrolní kmen, jehož chování je dobře dokumentováno.

Z výsledků je zřejmé, že v chování obou řad protilátek není výrazný rozdíl. Specifické protilátky obou řad se chovají velmi podobně, u obou došlo k výraznému poklesu množství bakterií. Z toho vyplývá, že specifické protilátky proti lektinu PA-IIL obecně mají schopnost snižovat adhezi bakteriálních buněk na buňky plicního epitelu.

Kromě srovnání protilátek byly srovnávány navzájem 3 kmeny bakterií, které byly k dispozici. Cílem bylo ověřit, zda trend snižování množství adherovaných bakterií v přítomnosti specifické protilátky platí i pro jiné kmeny PA. U všech 3 kmenů barvených PKH a vyhodnocených poměrů rel. fluorescence bakteriálních/plicních buněk byl pozorován stejný trend. V případě specifické protilátky došlo k výraznému poklesu množství bakterií navázaných na buňky, zhruba o 60 - 85 % v závislosti na použitém kmenu bakterií a dané linii plicních buněk. V případě linie CuFi-1 byl vždy zaznamenán vyšší pokles než u linie NuLi-1.

V případě kontrolní protilátky docházelo však ke zvýšení fluorescence oproti situaci bez ovlivnění. Pro tento efekt zatím neexistuje uspokojivé vysvětlení. Předpokládáme, že se může jednat o arteficiální výsledek související se způsobem měření fluorescence bakteriálních buněk na destičkách. Jak naznačují předběžné výsledky, kontrolní protilátky mohou způsobit aglutinaci bakterií přes své sacharidové struktury HC. Bakterie se tak dostanou všechny do stejné roviny a stávají se dostupnější pro měření než bakterie, které jsou volně v celém objemu.

U neošetřených buněk bylo převedením fluorescence na počet buněk zjištěno, že u všech použitých bakteriálních kmenů je množství bakteriálních buněk na jednu buňku eukaryotickou v případě linie CuFi-1 zhruba 2x vyšší než u linie NuLi-1. Tento výsledek odpovídá faktu, že na změněné povrchové struktury buněk plicní tkáně pacienta s CF, obsahující vyšší procento sialyzovaných a fukosylovaných řetězců, se bakterie vážou lépe.

Stejný trend jako u výsledků založených na měření fluorescence bakterií jsme očekávali i v případě měření jejich luminiscence. Zde se však v případě luminiscence bakterií, které prošly procesem barvení, rozdíl mezi specifickou a kontrolní protilátkou snižuje. V případě bakterií nebarvených je dokonce luminiscence vzorků se specifickou a kontrolní protilátkou srovnatelná. Důvod tohoto pozorování může souviset s tím, že luminiscence bakterií, na rozdíl od fluorescence barviva, závisí na viabilitě bakterií – neživé bakterie neposkytují bioluminiscenci. V případě barvení sloučeninou PKH26 je fluorescence patrná jak pro živé, tak pro mrtvé bakteriální buňky bez rozdílu. Přestože barvivo PKH26 samo o sobě bakteriální buňky nepoškozuje, proces barvení je může negativně ovlivnit. Proto by bylo vhodné pokusit se barvicí postup modifikovat tak, aby poškození, popřípadě usmrcení bakterií, bylo co nejnižší.

Abychom zjistili, zda zvyšování fluorescence v případě kontrolní protilátky je skutečně vlastností této protilátky nebo obecně jakéhokoliv proteinu, byl testován vliv BSA na adhezi bakterií. V tomto případě však po odmytí neadherovaných bakterií došlo k poklesu množství navázaných bakterií o zhruba 35 %. Vlastnost zvyšování fluorescence bakterií oproti situaci bez přidaných ovlivňujících látek je tedy specifická pro kontrolní protilátku a bylo by vhodné ji ještě více prozkoumat.

6 Souhrn

- Buňky se podařilo obarvit pomocí fluorescenčních barviv PKH a prokázat, že úroveň relativní fluorescence je přímo úměrná počtu buněk.
- Ze srovnání specifických a kontrolních protilátek proti lektinu *Pseudomonas aeruginosa* PA-III pocházejících ze dvou různých imunizovaných zvířat vyplývá, že chování obou sad je podobné a specifické protilátky mají tendenci snižovat adherenci bakterií na plicní buňky o 65 -75 %, v případě linie CuFi-1 až o 86 %.
- Porovnáním jednotlivých kmenů *Pseudomonas aeruginosa* byl u všech pozorován stejný trend – výrazné snížení množství navázaných bakterií v přítomnosti specifické protilátky. Zároveň docházelo k výraznému nárůstu fluorescence v případě kontrolní protilátky. Tento jev zatím nelze uspokojivě vysvětlit.
- Při použití vyhodnocení pomocí luminiscence bakterií se hodnoty mezi jednotlivými protilátkami téměř nelišily. Vzhledem k tomu, že luminiscence bakterií je závislá na jejich viabilitě, při barvení zřejmě dochází k poškození a případně usmrcení bakteriálních buněk.
- Protektivní účinek pozorovaný u specifických IgY nebyl prokázán v případě použití obecného proteinu (BSA).

7 Seznam použité literatury

- [1] Vávrová V. a kol., Cystická fibróza. Grada Publishing 2006
- [2] Vávrová V., Bartošová J. a kol., Cystická fibróza – příručka pro nemocné a jejich rodiče. Professional Publishing 2009
- [3] Vasiliou V., Vasiliou K., Nebert D. W., Hum. Genomics 2008; 3: 281-290
- [4] Vávrová V., Bartošová J., Fila L., Klin. Farmakol. Farm. 2007; 21: 22-26
- [5] Bush A., Cystic fibrosis in the 21st century. Karger 2006
- [6] De Boeck K. a kol., J. Cystic Fibrosis 2014
- [7] Radlovic N., Srp. Arch. Celok. Lek. 2012; 140: 244-249
- [8] <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cystic-fibrosis/basics/symptoms/con-20013731>, březen 2014
- [9] <http://www.novorozeneckyscreening.cz>, březen 2014
- [10] O'Sullivan B. P., Freedman S. D., J.- Lancet 2009; 373: 1891-1904
- [11] Bals, R., Weiner D. J., Wilson J. M., J. Clin. Invest. 1999; 103: 303-307
- [12] <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002223.htm>, březen 2014
- [13] <http://www.ebioscience.com/knowledge-center/antigen/immunoglobulin/structure.htm>, březen 2014
- [14] Travers P., Walport M., Schlomchik M., Janeway Ch., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. Garland Science 2001
- [15] <http://altweb.jhsph.edu/pubs/ecvam/ecvam21.html>, březen 2014
- [16] Carlander D., Stålberg J., Larsson A., Upsala J. Med. Sci. 1999; 104: 179-190
- [17] Vega C., Bok M., Chacana P., Saif L., Fernandez F., Parreno V., Vet. Immunol. Immunopathol. 2011; 142: 156-169
- [18] Araújo A. S., Lobato Z. I. P., Chávez-Olórtegui C., Velarde D. T., Toxicon 2010; 55: 739-744
- [19] Elkin, S., Geddes D., Expert Rev. Anti-Infect. Ther. 2003; 1: 609 – 618
- [20] Hauser A. R., Ozer E. A., Nat. Rev. Microbiol. 2011; 9: 123-128
- [21] http://www.pseudomonas.com/p_aerug.jsp, duben 2014
- [22] Høiby N., Ciofu O., Bjarnsholt T., Future Microbiol. 2010; 5: 1663-1674

- [23] <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas>, duben 2014
- [24] Farinha M. A., Conway B. D., Glasier M. G., Ellert N. W., Irvin R. T., Sherburne R., Paranchych W., *Infect. Immun.* 1994; 62: 4118-4123
- [25] Bartels K.-M., Funken H., Knapp A., Brocker M., Bott M., Wilhelm S., Jaeger K.-E., Rosenau F., *J. Bacteriol.* 2011; 193: 1107-1113
- [26] Funken H., Bartels K.-M., Wilhelm S., Brocker M., Bott M., Bains M., Hancock R. E. W., Rosenau F., Jaeger K.-E., *PLoS One* 2012; 7: doi:10.1371/journal.pone.0046857
- [27] Gustke H., Kleene R., Loers G., Nehmann N., Jaehne M., Bartels K.-M., Jaeger K.-E., Schachner M., Schumacher U., *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2012; 31: 207-215
- [28] http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4011.aspx?geo_country=cz#generalinformation, duben 2014
- [29] http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4013.aspx?geo_country=cz#generalinformation, duben 2014
- [30] Galiotta L., Lantero S., Gazzolo A., Sacco O. a kol., *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1998; 34: 478-481
- [31] <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/12680013?ICID=search-product>, duben 2014
- [32] <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cell-culture/transfection/selection/g418.html>, duben 2014
- [33] Nosková L., *Studium adheze Pseudomonas aeruginosa na buňky plicního epitelu*, Diplomová práce, PřF UK, 2013
- [34] Fujibayashi T., Nakamura M., Tominaga A., Satoh N., Kawarai T., Narisawa N., Shinozuka O., Watanabe H., Yamazaki T., Senpuku H., *Jpn. J. Infect. Dis.* 2009; 62: 337-342

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka