

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd**

**Vliv komenzální střevní mikroflóry na lokální
přirozenou imunitu hostitele**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Ilja Trebichavský, CSc.

Hradec Králové, 2008

Ema Milatová

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci „Vliv komenzální střevní mikroflóry na lokální přirozenou imunitu hostitele vypracovala samostatně“. Veškerá literatura a zdroje, které jsem při zpracování použila, jsou uvedené v seznamu literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové, dne 1.9. 2008

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu práce PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. za odborné vedení a RNDr. Iljovi Trebichavskému, CSc. za cenné rady a pomoc při zpracování práce. Dále děkuji své rodině a přátelům za podporu ve studiu.

Práce byla vypracována v rámci grantu Grantové agentury České republiky č. 523/07/0572 „Modulace přirozené složky imunitní odpovědi probiotickými bakteriemi“ a institucionálního záměru Mikrobiologického ústavu AV ČR AVOZ 5020510.

OBSAH

SOUHRN	5
SUMMARY	6
1. Úvod.....	7
2. Literární přehled	8
2.1. Komenzální mikroflóra.....	8
2.2. Přirozená imunita střeva	8
2.3. Antimikrobiální peptidy.....	9
2.3.1. AMP ve střevě	10
2.3.2. Účinek AMP na vnější membránu gramnegativních bakterií	10
2.3.3. Účinek AMP na cytoplazmatickou membránu bakterií	10
2.3.4. Úloha AMP v organismu.....	11
2.4. Toll-like receptory	11
2.5. Nitrobuněčné receptory NOD-like receptory	13
2.6. Zánětové cytokiny.....	14
2.7. Vliv komenzální střevní mikroflóry na přirozenou imunitu.....	15
2.8. Buněčné kultury	17
3. Cíl práce.....	18
4. Materiál a metody	19
4.1. Buněčná kultura epitelálních buněk.....	19
4.2. Bakteriální kultury	19
4.3. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce.....	20
4.3.1. Izolace celkové RNA z buněčné kultury	20
4.3.2. Stanovení koncentrace a čistoty celkové RNA	21

4.3.3.	Syntéza komplementární DNA.....	21
4.3.4.	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	21
4.4.	ELISA	22
4.5.	Další přístroje, pomůcky a software	24
5.	Výsledky	25
5.1.	Izolace RNA a syntéza cDNA	25
5.2.	Kvantifikace genového přepisu	26
5.3.	Koncentrace cytokinů v supernatantu buněčné kultury	27
6.	Diskuze	28
7.	Závěr	31
8.	Použité zkratky a klíčová slova	32
9.	Použitá literatura	33

SOUHRN

Mikroorganismy jsou nedílnou složkou našeho organismu. Vzájemné interakce s mikroby zahrnují celou škálu vztahů počínaje prospěšnými a konče negativním působením patogenních mikroorganismů. Tyto interakce se odehrávají především na obrovském povrchu trávicího traktu (200-300 m²), kde přítomnost mikroorganismů vede k vyvrávání imunitního systému (hlavně slizničního). Mezi buňky prvního kontaktu s mikroorganismy patří enterocyty, kterým nebyla dlouho přiznávána jejich role v obranných reakcích. Při imunitní odpovědi jsou zapojeny různé buněčné populace a jedním z jejich způsobů vzájemné komunikace je produkce signalizačních molekul – cytokinů.

V práci jsme se zaměřili na vypracování přehledu vybraných mechanismů nespecifické imunity a jako model interakce makroorganismu s mikroorganismy jsme zvolili buněčnou linii IPEC J2 původem z ječuna sajícího selete a tepelně usmrcené symbiotické (bifidobakterie) a patogenní bakterie (*E.coli*). Jako molekuly charakterizující vzájemnou komunikaci jsme zvolili zánětové cytokiny interleukin 1 β (IL-1 β), IL-8, IL-10 a faktor nekrotizující nádory α (TNF- α). Jako metody detekce jsme použili kvantifikaci mRNA reverzní transkripcí a polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase a metodu ELISA stanovující přítomnost proteinu v supernatantu tkáňové kultury.

Ze stanovovaných cytokinů produkovala buněčná linie IPEC J2 pouze IL-8, přičemž bakteriemi nestimulovaná buněčná linie neprodukovala žádný cytokin. Jednou z možností je potřeba dalších kostimulačních signálů pro produkci ostatních cytokinů nebo neschopnost IPEC J2 tyto cytokiny produkovat. Zatímco genový přepis IL-8 a TNF- α bylo možné detekovat již po 30 minutách stimulace IPEC J2 buněk, tedy v prvním použitém časovém intervalu, sekretované cytokiny jsme stanovili až po 6 hodinách kultivace. Překvapivě je zjištění, že mezi buňkami infikovanými bifidobakteriemi a buňkami infikovanými patogenními mikroorganismy nebyly zřetelné rozdíly (soubor byl pro statistické hodnocení malý). To je možné vysvětlit přítomností bakteriálních struktur stimulujících produkci IL-8 všemi bakteriemi, i když IL-8 je většinou produkován po rozlišení flagelinu Toll-like receptorem 5 (TLR-5) nebo omezeností systémů *in vitro* pro studium složitých regulačních vztahů cytokinové sítě.

SUMMARY

Microorganisms represent an integral part of our organism. Interactions with them consist of different relationships from mutualistic ones to the very negative actions of pathogens. These interactions proceed chiefly on a large area of intestines (200-300 m²), where the presence of microorganisms leads to the maturation of the immune system (especially the mucosal immune system). The enterocytes belong to the cells of the first contact with microorganisms. These cells were recognized as the cells of defence only recently. It is clear now that various cell populations participate on the immune response against antigens and they communicate with other cells by signal molecules – the cytokines.

In this work, selected mechanisms of the natural immunity were overviewed. The IPEC J2 cell line originating from the jejunum of suckling piglet has been chosen as a model for studies of host-bacterium interplay. Heat-killed symbiotic bacteria (bifidobacteria) and pathogens (*E.coli*) were used as model microorganisms. The following pro-inflammatory cytokines were studied as molecules of communication: interleukin 1 β (IL-1 β) IL-8, IL-10 and TNF- α (tumor necrosis factor). The mRNA was measured by reverse transcription and polymerase chain reaction in real time and protein products were measured by ELISA of supernatants from the cell cultures.

The IPEC J2 cell line produced only interleukin 8 and only when stimulated with bacteria. Non-stimulated cell line did not produce any above-mentioned cytokine. This finding can be explicated either by need of other co-stimulation signals for the production of other cytokines or by the inability of the IPEC J2 cell line to produce them. The secreted cytokine was found firstly in the 6th hour of cultivation whereas the gene transcription of IL-8 and TNF- α were detected as early as in 30 minutes of IPEC J2 stimulation, i.e. in the first time interval used. Surprisingly, there was no obvious difference between cells infected with bifidobacteria and cells infected with pathogens (statistical evaluation, however, could not be done due to few data). This finding can be explicated either by the presence of relevant microbial patterns in all bacteria (IL-8 is mostly produced when bacterial flagellin is recognized by toll-like receptor TLR-5) or by the limitations of *in vitro* models for such a study of complex regulations in the cytokine net.

1. ÚVOD

Počet mikrobiálních buněk osídlujících lidské tělo převyšuje desetinásobně počet vlastních buněk těla. Ke kontaktu s mikroflórou dochází především na sliznici střeva, která má celkovou plochu 200-300 m². Komenzální střevní mikroflóra proto sehrává klíčovou roli v ovlivňování vývoje slizničního imunitního systému a obranyschopnosti organismu proti patogenům.

Bakalářská práce je především rešeršní práce zahrnující složky nespecifické imunity s doplněním o výsledky stimulace střevní epitelální buněčné linie k produkci zánětvých cytokinů (IL-1 β , IL-8, IL-10 a TNF- α), kdy budou použity usmrcené kmeny bifidobakterií a *E.coli*. Práce je zpracována v těchto hlavních kapitolách: Úvod (literární rešerše se stanovenými cíli), Materiál a metody, Výsledky, Diskuse, Závěr a Seznam použité literatury.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Komenzální mikroflóra

Mikroflóra gastrointestinálního traktu člověka obsahuje asi 600 bakteriálních druhů a přes tisíc různých kmenů (Henderson et al., 1996; Tlaskalova-Hogenova et al., 2005). Většinu této mikroflóry můžeme označit jako symbiotické mutualistické společenství, které má významnou úlohu pro výživu a zdraví. Pomáhá při fermentaci některých složek potravy, na něž není hostitel vybaven enzymaticky (některé polysacharidy, hemicelulózy a částečně celulóza), dodává některé potřebné nutriční složky (vitamin K) a zejména brání usídlení patogenů soutěžících o důležité nutriční složky (železo a další vitální faktory) – (van der Waaij, 1982). Významně také formuje a udržuje normální slizniční imunitu (Kelly et al., 2005; Kelly a Conway, 2005). Z důvodu absence mikrobiální složky mají experimentální bezmikrobní zvířata menší energetický zisk z potravy a nezralý GALT (gut-associated lymphoid tissue) – lymfatický systém spojený se střevem. Bezmikrobní selata například vůbec nemají ve střevních klících zralé T lymfocyty a v lamina propria jim dlouho chybí i buňky tvořící IgG a IgA (Mandel et al., 1995; Trebichavsky et al., 1997). V takových bezmikrobních organismech lze střevo kolonizovat téměř jakoukoliv nově přichozí bakterií, včetně nepatogenních a probiotických. Naproti tomu v konvenčních organismech dojde k postupnému osidlování střeva – u člověka již při porodu mikroby porodních cest a análními (Mandar a Mikelsaar, 1996). *Escherichia coli* z gramnegativních bakterií a *Lactobacillus* sp. a *Bifidobacterium* sp. z grampozitivních bakterií patří k prvním obyvatelům lidského střeva po narození a jsou to právě tyto bakterie, které představují nejvýznamnější probiotické mikroorganismy využívané komerčně při dysmikrobii a dalších onemocněních trávicího traktu (Nissle A., 1930; Broussard a Surawicz, 2004; de Vrese a Schrezenmeir, 2008).

2.2. Přirozená imunita střeva

Přirozená imunita trávicího traktu je zajišťována mechanicky (peristaltika, mukus), buňkami (leukocyty, jež vycestují do dutiny střevní – fagocyty a lymfocyty), včasným

rozpoznáním patogenů (receptory na membráně a v buněčné cytoplasmě) a rozpustnými faktory (antimikrobiální peptidy, cytokiny). Mechanismy přirozené imunity nastupují bezprostředně po antigenní stimulaci (minuty). Adaptivní (specifická) imunita nastupuje podstatně později (dny) a využívá klonální reakce specifických lymfocytů a protilátek (ve střevním lumen zejména IgA a IgM) (Macpherson et al., 2001).

V následujícím přehledu budeme věnovat pozornost pouze receptorům a faktorům přirozené imunity, protože buňkami přirozené imunity se zabývala většina prací v minulých desetiletích. Mezi faktory přirozené imunity bude hlavní důraz položen na vybrané zánětové cytokiny, jimž je věnována experimentální část práce.

2.3. Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (AMP) představují základní složku vrozené imunity (Sima et al., 2003). V současné době se jejich počet blíží tisíci, ale je pravděpodobné, že konečný počet by mohl korelovat s množstvím živých druhů – tedy v řádu milionů mikrobicidních látek. AMP byly nalezeny u obratlovců, bezobratlých, prvoků i u rostlin. Zabezpečují okamžitou ochranu organismů před mikrobiálními parazity.

Mezi AMP patří (Ganz, 2004):

- enzymy trávicí mikrobiální struktury (lysozym - muramidáza, elastáza a další serinové proteázy označované souhrnně jako serprocidiny, fosfolipáza A₂, PGLYRP - N-acetylmuramoyl-L-alanin amidáza, která štěpí bakteriální peptidoglykan)
- peptidy vychytávající vitální substance (laktoferin – Fe, kalprotektin – Zn)
- substance pronikající bakteriální membránou případně s lytickým účinkem zvané též kationické peptidy. Mají hydrofobní oblast reagující s lipidy a pozitivně nabitou hydrofilní oblast, která se váže na bakteriální membrány nesoucí negativní náboj. Jsou schopny zabíjet bakterie, houby a případně i obalené viry nebo nádorové buňky.

Lze odhadnout, že všechny leukocyty lidského těla obsahují trvale několik gramů AMP. Např. kalprotektin představuje polovinu hmotnosti cytoplazmatických proteinů neutrofilních leukocytů. Nárůst koncentrace kalprotektinu ve střevním obsahu a ve feces je při těžkých infekcích až stonásobný (Striz a Trebichavsky, 2004). Antimikrobiální peptidy jsou tvořeny ve velkém množství na sliznicích – tedy na rozhraní vnitřního a vnějšího prostředí organismu – např. střevním epitelem a zde zejména Panethovými buňkami (Salzman et al., 2007).

2.3.1. AMP ve střevě

Střevní epitel produkuje celou řadu defensinů a dále katelicidin, BPI (bactericidal/permeability - inducing protein), resistinu podobnou molekulu beta a antimikrobiální lektiny jako Reg III, intelektin nebo hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatic associated protein (Dann a Eckmann, 2007).

2.3.2. Účinek AMP na vnější membránu gramnegativních bakterií

U gramnegativních bakterií, které mají kromě cytoplazmatické membrány ještě vnější membránu oddělenou periplasmatickým prostorem a tvořenou LPS (lipopolysacharidem), se vážou AMP na negativně nabitý LPS v místě vázajícím dvoumocné kationty (Mg), což vede k vytvoření štěrbin v membráně nebo neutralizují část membrány. V obou případech pak přestupují přes vnější membránu (Rosenfeld et al., 2008).

2.3.3. Účinek AMP na cytoplazmatickou membránu bakterií

AMP se vážou na vnitřní membránu a procesem flip-flop ji přestupují anebo vytvářejí micelové struktury v negativně nabitých membránových lipidech a v obou případech prostupují membránou do cytoplasmy bakterie. Dochází k lýze bakteriální buňky, k tvorbě pórů a narušení integrity bakteriální membrány, k plošnému narušení bakteriální membrány a k přímému zabití buňky vazbou na polyanionty v cytoplasmě bakterie (např. nukleové kyseliny) (Matsuzaki et al., 1996).

2.3.4. Úloha AMP v organismu

AMP se aktivně účastní mnoha dalších funkcí v organismu:

1. **sekvestrace volného LPS** v organismu, což má velký význam pro snížení rizika endotoxinového šoku při septickém stavu (Rosenfeld and Shai, 2006)
2. **indukce chemokinů** (tj. cytokinů přivolávajících určité buněčné typy profesionálních imunocytů do místa zánětu) (Bowdish et al., 2006)
3. **procesu reparace** poškozených tkání jako např. hojení ran (Steinstraesser et al., 2008)
4. **angiogeneze** (Nishikawa et al., 2008)
5. **aktivace buněk prezentujících a rozpoznávajících antigeny (dendritické buňky, makrofágy, lymfocyty)** – některé substance přirozené imunity jako různé AMP (defensiny, katelicidiny) nebo HMGB1 (high-mobility group box protein 1) jsou označovány jako **alarminy**, protože přivolávají a aktivují profesionální imunitní buňky specificky rozpoznávající antigeny (Eliasson and Egesten, 2008)
6. **modulace T buněk** (Masuda et al., 1992)

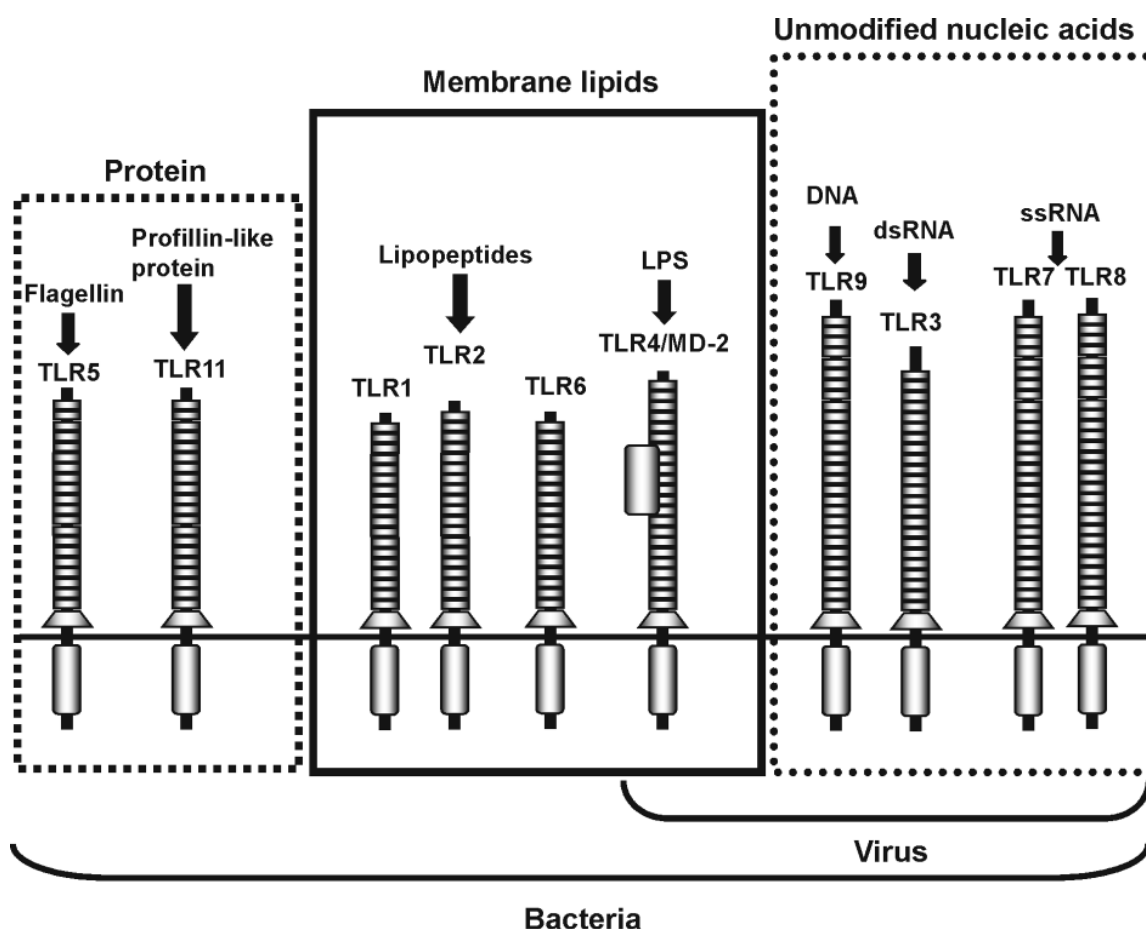
2.4. Toll-like receptory

Toll-like receptory (TLR) jsou receptory mikrobiálních struktur jako jsou bakteriální lipopolysacharid, lipoproteiny, flagelin nebo virové RNA a DNA (Sandor a Buc, 2005). Byly objeveny původně v genomu jako molekuly analogické receptorům Toll u octomilky, kde slouží dvěma různým funkcím: v ontogenetickém vývoji a při tvorbě zánětové odpovědi (Leulier a Lemaitre, 2008).

U obratlovců mají TLR významnou signální úlohu pro zánět, protože předávají informaci o mikrobiální molekule bakterie či viru adaptorovým molekulám (jako MyD 88), a přes enzymy proteinkinázy působí derepresi genů, které spouštějí a regulují zánětovou odpověď (např. cytokiny) (Chen et al., 2007).

Jednotlivé TLR jsou označeny arabskými číslicemi a rozpoznávají následující molekuly (Harris et al., 2006; Miyake, 2006):

TLR 1	lipoproteiny
TLR 2	lipoproteiny
TLR 3	dvouvláknou RNA
TLR 4	lipopolysacharidy
TLR 5	flagelin
TLR 6	lipoproteiny
TLR 7	jednovláknou RNA
TLR 8	jednovláknou RNA
TLR 9	nemetylovanou CpG (bakteriální) DNA
TLR 10	dosud neznámý ligand
TLR 11	profilin-like proteiny



Obr.č.1 Toll-like receptory (Miyake, 2006).

2.5. Nitrobuněčné receptory NOD-like receptory

Kromě TLR, které jsou většinou lokalizovány na membráně buněk imunitního systému či sliznic (některé TLR se vyskytují i v cytoplasmě, např. TLR 9), existuje uvnitř buněk soustava molekul určená k ochraně vnitřního prostředí buněk a k rozpoznávání mikroorganismů. Tyto molekuly tvořící součást proteinových komplexů zvaných inflamatomy slouží k aktivaci caspázy 1 a k zahájení zánětové odpovědi (Petrilli et al., 2007), jindy se vyskytují samostatně. NOD molekuly jsou samostatné, NALP a IPAF molekuly tvoří součást inflamatomu. Doménou těchto vnitřních receptorů je rozpoznávací doména LRR (nazvaná podle množství aminokyselinových zbytků leucinu), která se váže na bakteriální lipopolysacharid a další mikrobiální motivy (Martinon, 2007).

Indukce inflamasyonu vede k aktivaci caspázy 1, enzymu, který vytváří z prekursorů časné cytokiny interleukin-1 beta a interleukin-18. Díky tomu, že k jejich vytvoření stačí enzymatické rozštěpení prekursoru, dochází k počátku zánětové odpovědi vlastně okamžitě poté, co nějaký mikroorganismus pronikne do nitra hostitelské buňky.

2.6. Zánětové cytokiny

Cytokiny jsou malé proteiny (většinou glykoproteiny) zprostředkovávající přenos informace mezi buňkami živočišného organismu. Jejich většina je popsána u savců, zejména u člověka a laboratorních experimentálních zvířat.

Cytokiny, na rozdíl od hormonů, nejsou produktem specializovaných buněk a jejich účinek není tak jednoznačný. Řídí buněčné zrání, diferenciaci a smrt, regulují imunitní reakce a regenerační pochody a remodelování tkání a tím často doplňují funkce neurohumorálního systému. Část cytokinů je schopna účinné regulace zánětu. Těmto cytokinům se říká **zánětové cytokiny** a podle kladné či záporné regulace se dělí na prozánětové a protizánětové cytokiny (O'Shea a Murray, 2008).

Cytokiny jsou produkovány krátkodobě v pikogramových množstvích s překryvem funkcí a vážou se na velmi citlivé a specializované membránové receptory. Touto vazbou spouštějí v cytoplasmě signalizační kaskády (aktivují proteinkinázy a další signální molekuly), které vyústí v transkripci genů a indukci sekrece efektorových molekul. U prozánětových cytokinů dochází k amplifikacím zánětových znaků a nakonec k sekreci výkonných molekul jako proteinů akutní fáze, histaminu, degranulaci fagocytů, k tvorbě antimikrobiálních peptidů nebo k tvorbě reaktivních metabolitů v makrofázích (Conner a Grisham, 1996).

Výsledkem je prudká antimikrobiální reakce, která musí být současně brzděna protizánětovými cytokiny a dalšími regulátory (SOCS, IL-1RA a další), neboť některé faktory zánětu rychle poškozují vlastní buňky, tkáně a orgány. Pokud toto tlumení není dostatečné, vede systémový zánět k rozvratu životních funkcí (sepsis, meningokokový rozvrat nadledvinových funkcí, gangréna a další případy, kdy je organismus poškozován vlastní hyperimunní reakcí (Wang a Ma, 2008).

Prozáněťové cytokiny

IL-1 α (interleukin-1 alfa), IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, GM-CSF, LIF, OSM, CNTF, IL-11, IL-17, TNF- α (faktor nekrotizující nádory – alfa), IFN- γ (interferon gama)(Jacobi, 2002;Zanotti et al., 2002;Ibelgaufts, 2008).

Protizáněťové cytokiny

IL-4 (mění diferenciaci prozáněťových buněk TH1 na pomocné buňky tvorby protilátek TH2), IL-10, IL-13, IL-16, IL-1ra, G-CSF, TGF- β (transformační růstový faktor beta) (Jacobi, 2002;Zanotti et al., 2002) (Ibelgaufts, 2008).

2.7. Vliv komenzální střevní mikroflóry na přirozenou imunitu

Malé děti jsou velmi náchylné k infekčním chorobám gastrointestinálního a respiračního systému. Odhaduje se, že ve světě každoročně umírá pět milionů dětí na průjemová onemocnění a choroby dýchacích cest (Garenne et al., 1992). Jednou z hlavních příčin je kromě špatných hygienických podmínek a nedostatečné lékařské péče v rozvojových zemích také nezralost imunitního systému těchto sliznic. Například adaptivní specifická imunita ve sliznicích, zejména tvorba protilátek IgA, které prostupují střevním epitelem do střevní dutiny, dosahuje své plné výše teprve po pubertě (Macpherson et al., 2001).

Avšak nejen specifická imunita, ale také přirozená imunita je ovlivněna přítomností endogenní mikroflóry a pod jejím vlivem vyžívá (Bambou et al., 2006). Tak například s věkem po narození stoupá ve střevě exprese genů regulovaných gama interferonem (Rhee et al., 2005), hlavních genů pro imunitní odpovědi proti nitrobuněčným parazitům jako jsou *Salmonella* nebo *Mycobacterium*, původcům hlavních bakteriálních infekčních nemocí člověka (břišním tyfem onemocní ročně na 30 milionů lidí, tuberkulózní bacily kontaktuje asi třetina lidstva a na TBC umírá ročně 2 miliony lidí) (Crump et al., 2004).

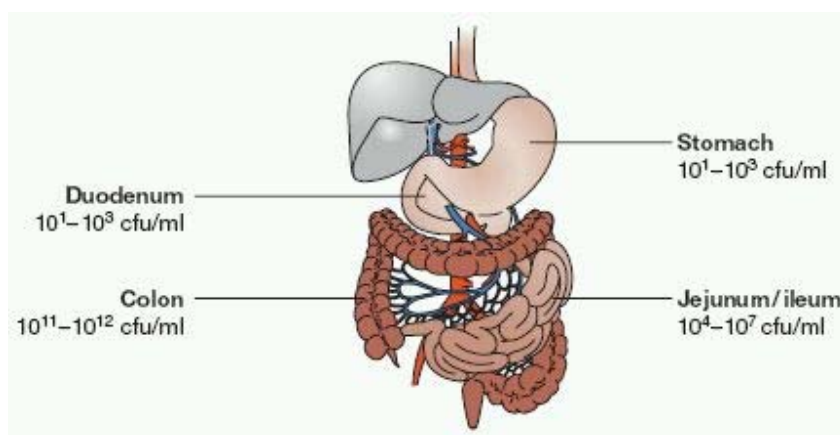
(Shirkey et al., 2006) ukázali na gnotobiotických selatech, že kmen komenzální *E.coli* způsobil vyžívání střevního epitelu v distálním tenkém střevu a zvýšil expresi cytokinů interleukinu-1 beta a interleukinu-6. Proti komenzálním bakteriím, které při translokaci do

organismu mohou být nebezpečné a které mohou ještě zhoršovat záněty střeva vyvolané genetickou příčinou jako např. nedostatečností lokální přirozené imunity, probiotické bakterie jsou jednak bezpečnější a jednak aktivně modulují lokální přirozenou střevní imunitu ve prospěch hostitele – např. indukci antimikrobiálních peptidů a protizánětvých cytokinů případně chemokinů jako interleukinu-8 - (Trebichavsky a Splichal, 2006).

Mechanismy, jimiž působí komensální mikroflóra na hostitele, mohou být mnohé (Kelly et al., 2005):

- snížení přenosu signálu z TLR a aktivace transkripčního faktoru NF-kappa B (např. komensál *Bacteroides thetaiotaomicron*)
- indukce protizánětvých cytokinů IL-10 a TGF- β či signalizační molekuly SMAD7
- indukce cytoplasmového NOD2, který má také protizánětlivou funkci

Mnohé komensální bakterie mají sekreční systémy III. a IV. typu, které jim umožňují těsný kontakt s enterocytem (normálně jsou bakterie odmyvány mukou, k přichycení je jim bráněno peristaltikou střeva, přítomností slizničních protilátek a vrstvičkou glykokalyxu, která pokrývá kartáčový lem střevních epitelů). Díky sekrečním systémům jsou schopny dokonce komunikace s eukaryotickou buňkou hostitele. Proto je komensální mikroflóra v současné době považována za další imunitní orgán (O'Hara a Shanahan, 2006).



Obr. č.2. Bakteriální osídlení trávicího traktu (O'Hara a Shanahan, 2006).

Bakterie mezi sebou dokáží komunikovat molekulami např. quorum sensing, které regulují jejich počet. Bakterie se chovají v mikroflóře jako v biofilmu - to znamená, že jsou daleko více odolné vůči stresu a daleko rychleji si mezi sebou předávají genetické informace. S imunitním systémem hostitele komunikují komensální bakterie tak, že vytvářejí mutualistické vzájemně prospěšné vztahy. Mapování jejich účinku na přirozenou imunitu ukazuje některé z těchto mechanismů, jež jsou prospěšné pro hostitele, jenž komensálům poskytuje bezpečnou niku a dostatek živin za to, že tyto bakterie jej dokáží velmi úspěšně chránit proti virulentním patogenům (Tlaskalova-Hogenova et al., 2005).

2.8. Buněčné kultury

Vzájemné vztahy mezi hostitelem a mikroflórou je možné studovat na zjednodušených modelech pomocí různých buněčných linií. Z lidských buněčných linií střevních epiteliálních buněk se pravděpodobně nejčastěji používají buněčné linie T84 a Caco-2 (Ruchaud-Sparagano et al., 2007; Yeruva et al., 2008). U prasete nabývá v posledních letech na popularitě buněčná linie IPEC J2, která je odvozená z epiteliálních buněk jejuna sajícího selete (Schierack et al., 2006). Je však třeba mít na zřeteli, že se jedná o velice zjednodušený systém *in vitro*, jehož chování nelze generalizovat na model *in vivo*, přičemž stejně tak není možno jednoduše zobecňovat na člověka reakce získané při práci s jednotlivými biologickými druhy.

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce je zvládnutí studované problematiky, které se dělí na:

- 1) Teoretický přehled vybraných nástrojů nespecifické imunity,
- 2) Příprava bakteriálních kultur (bifidobakterie a *E.coli*),
- 3) Práce s buněčnou kulturou (epiteliální buněčná linie IPEC J2 odvozená z buněk jejunu selete),
- 4) Izolace celkové RNA, její kvantifikace a odhad kvality,
- 5) Syntéza cDNA,
- 6) Kvantifikace mRNA metodou RT-PCR v reálném čase,
- 7) ELISA pro stanovení sekretovaného cytokinu,
- 8) Zhodnocení a vyvození závěrů.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Buněčná kultura epiteliálních buněk

Buněčná kultura buněk IPEC J2 (Schierack et al., 2006) byla kultivována v médiu DMEN/F12 (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA) s přidavkem 5 % fetálního telecího séra (PAA, Pasching, Rakousko). Buňky byly kultivovány v kultivačních láhvích (TPP, Trasadingen, Švýcarsko) při 30°C a 5 % CO₂ inkubátoru Sanyo MC 16AI (Sanyo, Gunma, Japonsko) a podle potřeby přesazovány po odebrání média, opláchnutí PBS (PAA) a po odstranění z povrchu kultivační láhve pomocí směsi trypsinu a EDTA (TPP). Vlastní pokus byl proveden ve 24 jamkových destičkách (TPP) u buněk pokrývajících 80% povrchu dna kultivační destičky. Tepelně usmrcené bakterie byly přidány k buněčné kultuře v počtu 10⁸ CFU na mL média. Po stanovené době kultivace (30 minut, 2 hodiny, 6 hodin a 24 hodin) byly odebrány supernatanty, centrifugovány při 500 g v centrifuze Hettich 32R Universal (Hettich, Tuttlingen, SRN) a uschovány při hlubokomrazicím boxu Sanyo MDF-U3086S (Sanyo Electric Co., Osaka, Japonsko) při -70°C. Vlastní buňky byly po opláchnutí PBS (PAA) lyzovány v RLT pufu (Qiagen, Hilden, SRN) s přidavkem β-mercaptoetanolu (Sigma-Aldrich) a uschovány při -40°C.

4.2. Bakteriální kultury

Bifidobaktérie jsme kultivovali v TPY bujónu (Scharlau, Barcelona, Španělsko) v anaerobních podmínkách. Suspenze bakterií byla centrifugována 15 min. při 4000 rpm a slit supernatant. Buňky jsme nesuspendovali v DPBS a znovu centrifugovali. Poté jsme počet bakterií stanovili fotometricky při 550 nm a předpokládaný počet CFU odečetli z kalibrační křivky. Kontrolu jsme provedli kultivací bakterií na TPY agaru (Scharlau) v anaerostatu.

E.coli O55 a O86 byly ze sbírky vyočkovány na šikmý agar a dále připravena suspenze v DPBS jako v případě bifidobakterií. Kontrolu počtu CFU jsme provedli kultivací na Endově půdě (Oxoid, Basingstoke, UK).

Bakterie jsme usmrtili 30 minutovou kultivací ve vodní lázni při 95°C. Kontrola usmrcení byla provedena 24 hodinovou kultivací na TPY agaru nebo Endově agaru.

4.3. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

4.3.1. Izolace celkové RNA z buněčné kultury

Izolaci jsme provedli kitem RNeasy® Plus (Qiagen)

Celková RNA byla izolována z buněčného lyzátu v RTL pufru (Qiagen) s přidavkem β -mercaptoetanolu (Sigma-Aldrich) následujícím způsobem:

1. Lyzát jsme centrifugovali v centrifuze Hettich 32R Universal (Hettich) **3 minuty** při maximální rychlosti (14 000 rpm).
2. Supernatant jsme přemístili do gDNA eliminátorové spin kolonky umístěné v 2 mL sběrné zkumavce a centrifugovali 30 s při 12 000 rpm.
3. Přidali 600 μ L 70% etanolu (Top-bio, Praha, ČR) k tomu, co prošlo kolonkou a promíchali pipetováním.
4. 700 μ l vzorku jsme přenesli do RNeasy spin kolonky umístěné v 2 mL sběrné zkumavky. Zavřeli jsme víčko a centrifugovali 15 s při 12 000 rpm. To, co prošlo kolonkou, jsme vylili.
5. Přidali jsme 700 μ l RW1 pufru do RNeasy spin kolonky, zavřeli víčko a centrifugovali 15 s při 12 000 rpm. To, co prošlo kolonkou, jsme vylili.
6. Přidali jsme 500 μ L roztoku RPE do RNeasy spin kolonky a centrifugovali 15 s při 12 000 rpm. To, co prošlo kolonkou, jsme vylili.
7. Přidali jsme 500 μ l RPE do RNeasy spin kolonky. Zavřeli víčko a centrifugovali 2 min při 12 000 rpm.
8. Přendali jsme RNeasy spin kolonku do nové 2 ml zkumavky a centrifugovali 1 min při 14 000 rpm.
9. Umístili jsme RNeasy spin kolonku do nové 1,5 mL zkumavky, přidali 40 μ L RNase-free vody na membránu spin kolonky a centrifugovali 1 min při 12 000 rpm.

4.3.2. Stanovení koncentrace a čistoty celkové RNA

Měření je prováděno na spektrofotometru Ultrospec 2100 *pro* (Pharmacia, Upsala, Švédsko) v křemenné kyvetě o šířce 10 mm. Vyizolovanou celkovou RNA jsme naředili v 300 mL neionizované vody v poměru 20:1 a výpočet koncentrace provedli podle vzorce:

$$\text{Koncentrace RNA} = A_{260} \times 0,040 \times 20 \quad [\mu\text{g}/\mu\text{L}]$$

Čistotu RNA jsme hodnotili jako poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm ($A_{260/280}$).

4.3.3. Syntéza komplementární DNA

Pro syntézu cDNA jsme použili kit „Enhanced Avian HS RT-PCR kit“ (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA). Jako primery jsme použili oligo d(T) primery, které jsou jednou z možností obsažených v kitu.

Syntézu cDNA jsme provedli ve dvou krocích:

1. krok – rozvolnění struktury templátové RNA v 10 μL směsi 1 obsahující 0,15 μg celkové RNA, 500 μM dNTP (platí pro každou ze čtyř bází) a 2,5 mM oligo d(T)₂₃ primery. Směs jsme inkubovali 10 min. při 72°C v termocykleru a poté rychle ochladili na ledu.
2. krok – 10 μL směsi 2 obsahující pufr pro AMV-RT, inhibitor ribonukleáz (1 U/ μL) „Enhanced Avian“ reverzní transkriptázu (1 U/ μL) jsme přidali ke směsi 1, promíchali, centrifugovali a poté inkubovali v termocykleru 45°C po dobu 50 min a 10 min. při 72°C.

4.3.4. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Pro stanovení genového přepisu jsme použili systém Universal Probe Library firmy Roche Diagnostic (Manheim, SRN) – viz. www.universalprobelibrary.com.

Jako kontrolní gen jsme použili β -Aktin.

β -Aktin

L primer: 5'-tcctggagaagagctacga-3

R primer: 5'-aagagcgcctctggacac-3

LNA sonda č.: 9

IL-8

L primer: 5'-ttctctttatcccaactgg-3

R primer: 5'-ccacatgtcctcaaggttagga-3

LNA sonda č.: 41

TNF- α

L-primer: 5'-tggtacgaacccatctacgtg-3

S primer: 5'-ggcactgagtcgatcctcct-3

LNA sonda: 11

Pro PCR v reálném čase byl použit master mix FastStart s výslednou koncentrací LNA sondy 250 nM a primerů (Invitrogen, Paisley, UK) 500 nM. Použitý teplotní režim byl 1 x 95°C po dobu 10 minut a 50 cyklů 95°C po 20 sekund a 59°C po 40 sekund. Jako termocykler jsme použili iQ5 cykler s iQ5 Optical systém software (Bio-Rad, Hercules, USA).

4.4. ELISA

Vazebné protilátky jsme vážali na 96 jamkové destičky Maxisorp (Nunc, Rotschild, Dánsko) v předem vyzkoušených ředěních po dobu 36 hodin při 4°C ve 100 μ L uhličitanového pufru pH 9,6 s přídavkem 0,01% Thimerosalu (Sigma-Aldrich). Biotinylované detekční protilátku v komplexu se streptavidinem konjugovaným s peroxidázou (Invitrogen) jsme použili v předem vyzkoušeném ředění. Jako substrát jsme

použili peroxidázu s TMB jako chromogenem ve 205 mM citrátovém pufru (vše Sigma-Aldrich) (Frey et al., 2000).

Cytokiny v supernatantu buněčné kultury jsme stanovili páry monoklonálních protilátek se standardem IL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, USA), IL-10 a TNF- α (Invitrogen) a IL-8 vlastním detekčním systémem (Splichal et al., 2003).

Tabulka č. 1. ELISA systémy pro stanovení cytokinů.

Cytokin	Ředění vazebné protilátky	Ředění detekční protilátky	Rozsah detekce [pg/ml]
IL-1β	1/500	1/500	64 – 4000
IL-8	1/200	1/2000	16 – 1000
IL-10	1/400	1/600	16 – 1000
TNF-α	1/600	1/300	16 – 1000

Ke stanovení všech cytokinů bylo použito obecné schéma:

- 1) Vazebná monoklonální protilátka v odpovídajícím ředění ve 100 μ l uhličitanového pufru. Inkubace 36 hodin při 4°C.
- 2) Promytí 4 x 400 μ l promývacího roztoku (1mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 0.05% Tween 20 (vše Sigma-Aldrich)).

- 3) Standard nebo vzorek ředěný v 10 mM Tris, 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween 20 (vše Sigma-Aldrich) s přidavkem 0,1 % odstředěného mléka (Difco/Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA).
- 4) Inkubace 2 hodiny při pokojové teplotě.
- 5) Promytí 4 x 400 µl promývacího roztoku.
- 6) Detekční biotinylovaná monoklonální protilátka v odpovídajícím ředění ve 100 µL ředícího roztoku.
- 7) Inkubace 1 hodinu při pokojové teplotě.
- 8) Promytí 4 x 400 µL promývacího roztoku.
- 9) Streptavidin konjugovaný s peroxidázou ředěný 1/5000 v 100 µL ředícího roztoku
- 10) Promytí 4 x 400 µL promývacího roztoku.
- 11) Přidání 100 µL substrátu.
- 12) Zastavení reakce 100 µL 2 M H₂SO₄.

Absorbance byly měřeny při 450 a 620 nm na fotometru RC Multiskan (Labsystems, Helsinky, Finsko) a hodnoty vyhodnoceny pomocí software Genesis verze 3,01.

4.5. Další přístroje, pomůcky a software

Pipety - jednobanální a 12-banální pipety řady Digital (ThermoLabsystems, Helsinky, Finsko). Pipetování malých objemů. Pipetus Aku (Hirschmann, Duren, SRN), pipetování větších objemů v kombinaci s plastickými pipetami (PTT, Trasadingen, Švýcarsko).

Text a literatura byly zpracovány softwarem Reference Manager, verze 10 (Thomson Scientific, Carlsbad, USA).

5. VÝSLEDKY

5.1. Izolace RNA a syntéza cDNA

Celkovou RNA jsme izolovali kitem RNeasy® Plus (Qiagen), přičemž žádoucí je poměr $A_{260/280} \geq 1,8$. Maximální objem RNA mohl být 8 μL , což u málo koncentrované RNA umožnilo vzít pouze 0,15 mg RNA. Při koncentrovanějších preparátech je zbytek do 8 μl dopočítán a doplněn vodou tak, aby k syntéze každé cDNA bylo vzato vždy 0,15 μg RNA.

Tabulka č. 2. Izolace RNA a syntéza cDNA

Buněčná linie IPEC J2			Izolace RNA				Syntéza cDNA	
			Absorbance		Poměr	Konc.	0,15 μg RNA	H ₂ O
Čas	Vzorek	Stimulace	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	[$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	[μL]	[μL]
30 minut	EM01	IPEC	0,021	0,010	2,10	0,025	6,0	2,0
	EM02	JKM	0,037	0,019	1,95	0,044	3,4	4,6
	EM03	PR4	0,017	0,008	2,13	0,020	7,4	0,6
	EM04	O86	0,046	0,025	1,84	0,055	2,7	5,3
	EM05	O55	0,017	0,010	1,70	0,020	7,4	0,6
2 hodiny	EM06	IPEC	0,018	0,009	2,00	0,022	6,9	1,1
	EM07	JKM	0,025	0,014	1,79	0,030	5,0	3,0
	EM08	PR4	0,022	0,011	2,00	0,026	5,7	2,3
	EM09	O86	0,020	0,011	1,82	0,024	6,3	1,8
	EM10	O55	0,035	0,019	1,84	0,042	3,6	4,4
6 hodin	EM11	IPEC	0,076	0,044	1,73	0,091	1,6	6,4
	EM12	JKM	0,042	0,024	1,75	0,050	3,0	5,0
	EM13	PR4	0,057	0,033	1,73	0,068	2,2	5,8
	EM14	O86	0,068	0,039	1,74	0,082	1,8	6,2
	EM15	O55	0,092	0,054	1,70	0,110	1,4	6,6
24 hodin	EM16	IPEC	0,031	0,016	1,94	0,037	4,0	4,0
	EM17	JKM	0,030	0,018	1,67	0,036	4,2	3,8
	EM18	PR4	0,039	0,020	1,95	0,047	3,2	4,8
	EM19	O86	0,025	0,014	1,79	0,030	5,0	3,0
	EM20	O55	0,022	0,012	1,83	0,026	5,7	2,3

Legenda: IPEC = buňky IPEC J2 bez stimulace, JKM – buňky IPEC J2 + bifidobakterie JKM, PR4 = IPEC J2 + bifidobakterie PR4, O86 = buňky IPEC + *E.coli* O86, O55 = buňky IPEC J2 + *E.coli* O55.

5.2. Kvantifikace genového přepisu

Tabulka č. 3. Kvantifikace genového přepisu

Buněčná linie IPEC J2			Cytokiny	
Čas	Vzorek	Stimulace	IL-8	TNF- α
30 minut	EM01	IPEC	4,264	0,132
	EM02	JKM	0,213	0,024
	EM03	PR4	4,243	0,432
	EM04	O86	8,958	2,916
	EM05	O55	2,698	1,030

Genová exprese v tomto malém souboru přinesla některé překvapivé výsledky, které jsou komentovány v diskuzi.

5.3. Koncentrace cytokinů v supernatantu buněčné kultury

Koncentrace cytokinů v supernatantu buněčné kultury byla stanovena metodou ELISA. Pozitivní hodnoty jsme našli pouze u IL-8 po stimulaci po dobu 6 a 24 hodin.

Tabulka č. 4. Stanovení cytokinů v supernatantu buněčné kultury.

Koncentrace cytokinů [pg/mL]						
Čas	Vzorek	Stimulace	IL- β	IL-8	IL-10	TNF- α
30 minut	EM01	IPEC	0	0	0	0
	EM02	JKM	0	0	0	0
	EM03	PR4	0	0	0	0
	EM04	O86	0	0	0	0
	EM05	O55	0	0	0	0
2 hodiny	EM06	IPEC	0	0	0	0
	EM07	JKM	0	0	0	0
	EM08	PR4	0	0	0	0
	EM09	O86	0	0	0	0
	EM10	O55	0	0	0	0
6 hodin	EM11	IPEC	0	0	0	0
	EM12	JKM	0	93	0	0
	EM13	PR4	0	117	0	0
	EM14	O86	0	205	0	0
	EM15	O55	0	227	0	0
24 hodin	EM16	IPEC	0	0	0	0
	EM17	JKM	0	313	0	0
	EM18	PR4	0	390	0	0
	EM19	O86	0	892	0	0
	EM20	O55	0	947	0	0

6. DISKUZE

Savčí mláďata zdravých matek se vyvíjejí ve sterilním prostředí dělohy. Mikroflórou začínají být poprvé asociována až v době průchodu porodními cestami. Je prokázáno odlišné složení mikroflóry u mláďat získaných přirozeným porodem nebo císařským řezem (Bezirtzoglou a Romond, 1990). V případě imunodeficitů nebo v experimentální práci jsou využívány různé metody gnotobiologie pro získání mláďat do sterilního prostředí, které umožňuje vytvořit podmínky mikrobiologicky definovaného prostředí. Zatímco v konvenčním prostředí je důležitý vývoj obranných reakcí či jeho pasivní ochrana mateřskými protilátkami, bezmikrobní podmínky umožňují přežívání imunologicky nezralým nebo imunodeficitním jedincům (Mandel a Travnicek, 1987). Vývoj složení mikroflóry po narození je také výrazně ovlivňován dietou. Kojené děti mají menší incidenci patogenních bakterií než děti krmené umělou mléčnou dietou (Hokama et al., 1996). Kojené děti jsou osidlovány především mikroflórou bifidobakterií a laktobacilů, zatímco u dětí s umělou výživou je tento podíl symbiotických bakterií nižší. Bifidogenní efekt mateřského mléka je nutno připsat jeho složení (malá koncentrace proteinů a fosfátů, přítomnost laktózy, laktoferinu, nukleotidů a oligosacharidů). Tento probiotický efekt mateřského mléka podporuje nepatogenní symbiotickou mikroflóru (Coppa et al., 2006).

Cílem bakalářské práce bylo seznámit se s poznatky o mechanismech nespecifické imunity, složení mikroflóry trávicího traktu, zvládnout přípravu bakteriálních kultur (bifidobakterie a *E.coli*), práci s buněčnou kulturou (epiteliální buněčná linie IPEC J2 odvozená z buněk jejunu selete), izolaci celkové RNA, její kvantifikaci a odhad kvality, syntézu cDNA, PCR v reálném čase, ELISA pro stanovení sekretovaného cytokinu, zhodnocení výsledků a vyvození závěrů.

Jako bakterie stimulující produkci vybraných zánětvých cytokinů jsme použili dva kmeny bifidobakterií izolované z lidské (*Bifidobacterium bifidum* KLM) nebo prasečí mikroflóry (PR4) a *E.coli* serotypů O86 a O55. *E.coli* O55 je enteropatogenní kmen (EPEC) letální pro gnotobiotická selata vyvolávající u nich cytokinovou bouři (cytokine storm), zatímco *E.coli* O86 nevyvolává téměř žádnou lokální nebo systémovou reakci charakterizovanou produkcí zánětvých cytokinů (Splichal et al., 2002; Splichal et al.,

2005;Kozub-Witkowski et al., 2008). Bifidobakterie jsou striktní anaerobi a v případě jejich kultivace v buněčné kultuře eukaryotických buněk rychle hynou, zatímco *E.coli* se velice rychle pomnoží a během několika málo hodin výrazně změní podmínky buněčné kultury, což je navenek charakterizováno změnou barvy média s přidavkem metylénové červeně jako indikátoru pH. Z tohoto důvodu jsme použili pro stimulaci epiteliální buněčné linie IPEC J2 původem z jejunu sajícího selete (Schierack et al., 2006) teplem inaktivované bakterie. Použití teplem inaktivovaných bifidobakterií pro stimulaci produkce IL-12 a TNF- α u buněčné linie J774.1 odvozené od myších makrofágů bylo popsáno (He et al., 2002). Další autoři popisují srovnání stimulace produkce IL-6 a IL-8 bifidobakteriemi inaktivovanými teplem nebo gama zářením u lidské střevní epiteliální buněčné linie Caco-2, přičemž bifidobakterie inaktivované teplem vykazovaly vyšší stimulaci produkce obou cytokinů.

V případě produkce cytokinů jsme předpokládali výrazně vyšší produkci cytokinů u stimulace inaktivovanými *E.coli* a to především z důvodu přítomnosti endotoxinu (lipopolysacharid - LPS) jako součásti bakteriální stěny gramnegativních bakterií (Freudenberg et al., 2008), který jako exogenní pyrogen výrazně ovlivňuje produkci cytokinů různými buněčnými liniemi nebo buňkami z primárních buněčných kultur.

Z uvedených zánětových cytokinů produkovala buněčná linie IPEC J2 pouze chemokin interleukin 8. Zatímco genový přepis IL-8 bylo možné detekovat již po 30 minutách stimulace IPEC J2 buněk, sekretovaný IL-8 jsme stanovili až po 6 hodinách kultivace. Je možné, že buněčná linie odvozená z prasečích jejunálních enterocytů není schopná produkovat zánětové cytokiny IL-1 β , IL-10 a TNF- α . Podobně jako v této práci byl interleukin 8 nalezen po stimulaci lidské střevní buněčné linie bifidobakteriemi, ale ostatní námi studované cytokiny autoři nesledovali (Wong a Ustunol, 2006;Zeuthen et al., 2008). Překvapivé bylo, že mezi buňkami infikovanými bifidobakteriemi a buňkami infikovanými patogenními mikroorganismy nebyly patrné rozdíly, ale soubor údajů byl pro statistické hodnocení malý. Tento nálezn lze vysvětlit přítomností bakteriálních struktur stimulujících produkci IL-8 všemi bakteriemi, i když IL-8 je většinou produkován po rozlišení flagelinu Toll-like receptorem 5 (TLR-5) nebo omezeností *in vitro* modelu pro studium složitých cytokinových vztahů a regulací.

Kvantifikace genového přepisu obou cytokinů přinesla některé kontroverzní a obtížně vysvětlitelné výsledky. Enterocyty jsou konstitutivním producentem IL-8, na což ukázal i přepis jeho genu u kontrol. Bifidobakterie kmene JKM vyvolaly snížení přepisu obou cytokinů. Vyšší přepis u *E.coli* O86 může být zapříčiněn vlivem flagelinu a byl provázen i zvýšením přepisu TNF. Vyšší přepis TNF byl zjištěn u obou kultur s *E.coli*, zatímco u bifidobakterií byl zaznamenán v obou případech pokles přepisu TNF. Jsme si vědomi, že data nelze uzavřít jednoznačnou interpretací výsledků, protože soubor byl malý, avšak i tyto údaje poskytly určitý pohled na problematiku komunikace střevní buňky s bakteriemi vyskytujícími se ve střevě. Základním cílem bylo ovšem vyzkoušet všechny uvedené metodické přístupy na daném *in vitro* modelu a tento cíl byl splněn.

7. ZÁVĚR

Sledovali jsme genový přepis a měřili koncentraci produktů cytokinové odpovědi (zánětvých cytokinů IL-1 β , IL-8, IL-10 a TNF- α) střevních epitelálních buněčných kultur jako odezvu na usmrcené bakterie se záměrem modelovat odpověď enterocytů na endogenní střevní mikroflóru. Jako komenzální bakterie byly použity bifidobakterie, jejichž význam při osidlování střeva, kojení a jako probiotik byl zdůrazněn v literárním přehledu a diskusi.

Výrazná neodpovídavost kultur buněčné linie IPEC J2 potvrdila inertnost zánětvých mechanismů vůči symbiotické mikroflóře. Protože však výrazné odpovědi nebyly pozorovány ani u pozitivních kontrol (patogenní *E.coli*), ukázal se tento *in vitro* systém jako nedostačující ke skutečnému napodobení podmínek přirozené buněčné odpovědi v organismu. Je pravděpodobné, že nedostatečná odpovídavost byla způsobena nepřítomností profesionálních imunitních buněk, které jsou *in vivo* přítomny jak ve sliznici tak ve střevním lumen a nepřítomností signálů poškození, které vznikají při kontaktu buněk hostitele s živými patogeny.

Za cíle práce jsme si kladli seznámit se s problematikou a zvládnout metodiky přípravy buněčných bakteriálních a eukaryontních kultur, kvantifikace mRNA metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase (izolace RNA, syntéza cDNA a PCR) a na úrovni sekretovaného proteinu metodou ELISA. Domníváme se proto, že jsme zadané cíle úspěšně splnili.

8. POUŽITÉ ZKRATKY A KLÍČOVÁ SLOVA

cDNA (complementary **DNA**) – komplementární DNA

CFU (Colony **F**orming **U**nits) – kolonie tvořící jednotky

DMEM/F12 – kultivační médium

DNA (**D**eoxyribo**N**ucleic **A**cid) – kyselina deoxyribonukleová

DPBS (**D**ulbecco's **P**hosphate **B**uffered **S**aline) – Dulbeccova modifikace fosforečnany pufrovaného fyziologického roztoku.

IFN – interferon

IL – interleukin

LNA (**L**ocked **N**ucleic **A**cid) – „zamknuté nukleové kyseliny“

LPS - lipopolysacharid

mRNA (**m**essenger **R**ibo**N**ucleic **A**cid) – mediátorová kyselina ribonukleová

PBS (**P**hosphate **B**uffer **S**aline) – fosforečnany pufrovaný fyziologický roztok

PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) – polymerázová řetězová reakce

RNA (**R**ibo**N**ucleic **A**cid) – kyselina ribonukleová

rRNA (**r**ibosomal **R**ibo **N**ucleic **A**cid) – ribosomová kyselina ribonukleová

RT-PCR (**R**everse **T**ranscription - **P**olymerase **C**hain **R**eaction) – reverzní transkripce následovaná polymerázovou řetězovou reakcí

TBS – (**T**ris **B**uffered **S**aline) – Trisem pufrovaný fyziologický roztok

Th (**T**-cell **h**elper) – pomocné T lymfocyty

TNF (**T**umor **N**ecrosis **F**actor) – faktor nekrotizující nádory

KLÍČOVÁ SLOVA: bifidobaktérie, polymerázová řetězová reakce, ELISA, cytokiny

9. POUŽITÁ LITERATURA

1. Bambou, J. C., A. Giraud, V. Gaboriau, F. Taddei, and N. Cerf-Bensussan, 2006, [The intestinal flora: the scales without the sword]: *J Soc.Biol.*, v. 200, no. 2, p. 113-120.
2. Bezirtzoglou, E., and C. Romond, 1990, Apparition of *Clostridium* sp. and *Bacteroides* in the intestine of the newborn delivered by cesarian section: *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.*, v. 13, no. 4, p. 217-221.
3. Bowdish, D. M., D. J. Davidson, and R. E. Hancock, 2006, Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins: *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, v. 306, p. 27-66.
4. Broussard, E. K., and C. M. Surawicz, 2004, Probiotics and prebiotics in clinical practice: *Nutr.Clin.Care*, v. 7, no. 3, p. 104-113.
5. Chen, K., J. Huang, W. Gong, P. Iribarren, N. M. Dunlop, and J. M. Wang, 2007, Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer: *Int.Immunopharmacol.*, v. 7, no. 10, p. 1271-1285.
6. Conner, E. M., and M. B. Grisham, 1996, Inflammation, free radicals, and antioxidants: *Nutrition*, v. 12, no. 4, p. 274-277.
7. Coppa, G. V., L. Zampini, T. Galeazzi, and O. Gabrielli, 2006, Prebiotics in human milk: a review: *Dig.Liver Dis.*, v. 38 Suppl 2, p. S291-S294.
8. Crump, J. A., S. P. Luby, and E. D. Mintz, 2004, The global burden of typhoid fever: *Bull.World Health Organ*, v. 82, no. 5, p. 346-353.
9. Dann, S. M., and L. Eckmann, 2007, Innate immune defenses in the intestinal tract: *Curr.Opin.Gastroenterol.*, v. 23, no. 2, p. 115-120.
10. de Vrese, M., and J. Schrezenmeir, 2008, Probiotics, prebiotics, and synbiotics: *Adv.Biochem.Eng Biotechnol.*, v. 111, p. 1-66.
11. Eliasson, M., and A. Egesten, 2008, Antibacterial chemokines--actors in both innate and adaptive immunity: *Contrib.Microbiol.*, v. 15, p. 101-117.
12. Freudenberg, M. A., S. Tchaptchet, S. Keck, G. Fejer, M. Huber, N. Schutze, B. Beutler, and C. Galanos, 2008, Lipopolysaccharide sensing an important factor in

- the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: benefits and hazards of LPS hypersensitivity: *Immunobiology*, v. 213, no. 3-4, p. 193-203.
13. Frey, A., B. Meckelein, D. Externest, and M. A. Schmidt, 2000, A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays: *J Immunol.Methods*, v. 233, no. 1-2, p. 47-56.
 14. Ganz, T., 2004, Antimicrobial polypeptides: *J.Leukoc.Biol.*, v. 75, no. 1, p. 34-38.
 15. Garenne, M., C. Ronsmans, and H. Campbell, 1992, The magnitude of mortality from acute respiratory infections in children under 5 years in developing countries: *World Health Stat.Q.*, v. 45, no. 2-3, p. 180-191.
 16. Harris, G., R. KuoLee, and W. Chen, 2006, Role of Toll-like receptors in health and diseases of gastrointestinal tract: *World J Gastroenterol.*, v. 12, no. 14, p. 2149-2160.
 17. He, F., H. Morita, A. C. Ouwehand, M. Hosoda, M. Hiramatsu, J. Kurisaki, E. Isolauri, Y. Benno, and S. Salminen, 2002, Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by Bifidobacterium strains: *Microbiol.Immunol.*, v. 46, no. 11, p. 781-785.
 18. Henderson, B., S. Poole, and M. Wilson, 1996, Microbial/host interactions in health and disease: who controls the cytokine network?: *Immunopharmacology*, v. 35, no. 1, p. 1-21.
 19. Hokama, T., I. Hamamoto, S. Takenaka, K. Hirayama, A. Yara, and A. Adjei, 1996, Throat microflora in breastfed and formula-fed infants: *J Trop.Pediatr.*, v. 42, no. 6, p. 324-326.
 20. Ibelgaufits, H., 2008, Cytokine & cells online pathfinder encyclopedia, www.copewithcytokines.de/cope.cgi.
 21. Jacobi, J., 2002, Pathophysiology of sepsis: *Am.J Health Syst.Pharm.*, v. 59 Suppl 1, p. S3-S8.
 22. Kelly, D., and S. Conway, 2005, Bacterial modulation of mucosal innate immunity: *Mol.Immunol.*, v. 42, no. 8, p. 895-901.
 23. Kelly, D., S. Conway, and R. Aminov, 2005, Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation: *Trends Immunol.*, v. 26, no. 6, p. 326-333.

24. Kozub-Witkowski, E., G. Krause, G. Frankel, D. Kramer, B. Appel, and L. Beutin, 2008, Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany: *J Appl.Microbiol.*, v. 104, no. 2, p. 403-410.
25. Leulier, F., and B. Lemaitre, 2008, Toll-like receptors--taking an evolutionary approach: *Nat.Rev.Genet.*, v. 9, no. 3, p. 165-178.
26. Macpherson, A. J., L. Hunziker, K. McCoy, and A. Lamarre, 2001, IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms: *Microbes.Infect.*, v. 3, no. 12, p. 1021-1035.
27. Mandar, R., and M. Mikelsaar, 1996, Transmission of mother's microflora to the newborn at birth: *Biol.Neonate*, v. 69, no. 1, p. 30-35.
28. Mandel, L., and J. Travnicek, 1987, The minipig as a model in gnotobiology: *Nahrung*, v. 31, no. 5-6, p. 613-618.
29. Mandel, L., I. Trebichavsky, I. Splichal, and J. Schulze, 1995, Stimulation of intestinal immune cells by *E. coli* in gnotobiotic piglets: *Adv.Exp.Med.Biol.*, v. 371A, p. 463-464.
30. Martinon, F., 2007, Orchestration of pathogen recognition by inflammasome diversity: Variations on a common theme: *Eur.J Immunol.*, v. 37, no. 11, p. 3003-3006.
31. Masuda, M. et al., 1992, A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr^{5,12},Lys⁷]-polyphemusin II): *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 189, no. 2, p. 845-850.
32. Matsuzaki, K., O. Murase, N. Fujii, and K. Miyajima, 1996, An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation: *Biochemistry*, v. 35, no. 35, p. 11361-11368.
33. Miyake, K., 2006, Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors: *J Endotoxin.Res.*, v. 12, no. 4, p. 195-204.
34. Nishikawa, T. et al., 2008, Development of a novel antimicrobial peptide, AG-30, with angiogenic properties: *J.Cell Mol.Med.*
35. Nissle A., 1930, Uber die Bedeutung bakteriologischer Stuhluntersuchungen bei nichtinfektiosen Darmkrankheiten. *Arch.Hyg.Bakt.*, v. 103, p. 124-131.

36. O'Hara, A. M., and F. Shanahan, 2006, The gut flora as a forgotten organ: *EMBO Rep.*, v. 7, no. 7, p. 688-693.
37. O'Shea, J. J., and P. J. Murray, 2008, Cytokine signaling modules in inflammatory responses: *Immunity.*, v. 28, no. 4, p. 477-487.
38. Petrilli, V., C. Dostert, D. A. Muruve, and J. Tschopp, 2007, The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity: *Curr.Opin.Immunol.*, v. 19, no. 6, p. 615-622.
39. Rhee, S. J., W. A. Walker, and B. J. Cherayil, 2005, Developmentally regulated intestinal expression of IFN-gamma and its target genes and the age-specific response to enteric Salmonella infection: *J Immunol.*, v. 175, no. 2, p. 1127-1136.
40. Rosenfeld, Y., H. G. Sahl, and Y. Shai, 2008, Parameters involved in antimicrobial and endotoxin detoxification activities of antimicrobial peptides: *Biochemistry*, v. 47, no. 24, p. 6468-6478.
41. Rosenfeld, Y., and Y. Shai, 2006, Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1758, no. 9, p. 1513-1522.
42. Ruchaud-Sparagano, M. H., M. Maresca, and B. Kenny, 2007, Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) inactivate innate immune responses prior to compromising epithelial barrier function: *Cell Microbiol.*, v. 9, no. 8, p. 1909-1921.
43. Salzman, N. H., M. A. Underwood, and C. L. Bevins, 2007, Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa: *Semin.Immunol.*, v. 19, no. 2, p. 70-83.
44. Sandor, F., and M. Buc, 2005, Toll-like receptors. III. Biological significance and impact for human medicine: *Folia Biol.(Praha)*, v. 51, no. 6, p. 198-203.
45. Schierack, P. et al., 2006, Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine: *Histochem.Cell Biol.*, v. 125, no. 3, p. 293-305.
46. Shirkey, T. W., R. H. Siggers, B. G. Goldade, J. K. Marshall, M. D. Drew, B. Laarveld, and A. G. Van Kessel, 2006, Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig: *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*, v. 231, no. 8, p. 1333-1345.

47. Sima, P., I. Trebichavsky, and K. Sigler, 2003, Mammalian antibiotic peptides: *Folia Microbiol.(Praha)*, v. 48, no. 2, p. 123-137.
48. Splichal, I., M. K. Fagerhol, I. Trebichavsky, A. Splichalova, and J. Schulze, 2005, The effect of intestinal colonization of germ-free pigs with *Escherichia coli* on calprotectin levels in plasma, intestinal and bronchoalveolar lavages: *Immunobiology*, v. 209, no. 9, p. 681-687.
49. Splichal, I., Y. Muneta, Y. Mori, and E. Takahashi, 2003, Development and application of a pig IL-8 ELISA detection system: *J Immunoassay Immunochem.*, v. 24, no. 2, p. 219-232.
50. Splichal, I., I. Trebichavsky, A. Splichalova, L. Ditetova, and M. Zahradnickova, 2002, *Escherichia coli* administered into pig amniotic cavity appear in fetal airways and attract macrophages into fetal lungs: *Physiol Res.*, v. 51, no. 5, p. 523-528.
51. Steinstraesser, L. et al., 2008, Host defense peptides in wound healing: *Mol.Med.*, v. 14, no. 7-8, p. 528-537.
52. Striz, I., and I. Trebichavsky, 2004, Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation: *Physiol Res.*, v. 53, no. 3, p. 245-253.
53. Tlaskalova-Hogenova, H. et al., 2005, Interaction of mucosal microbiota with the innate immune system: *Scand.J Immunol.*, v. 62 Suppl 1, p. 106-113.
54. Travnickek, J., and L. Mandel, 1987, Germ-free newborn baby: *Nahrung*, v. 31, no. 5-6, p. 631-633.
55. Trebichavsky, I., V. Dlabac, Z. Rehakova, M. Zahradnickova, and I. Splichal, 1997, Cellular changes and cytokine expression in the ilea of gnotobiotic piglets resulting from peroral *Salmonella typhimurium* challenge: *Infect.Immun.*, v. 65, no. 12, p. 5244-5249.
56. Trebichavsky, I., and I. Splichal, 2006, Probiotics manipulate host cytokine response and induce antimicrobial peptides: *Folia Microbiol.(Praha)*, v. 51, no. 5, p. 507-510.
57. van der Waaij, D., 1982, Colonization resistance of the digestive tract: clinical consequences and implications: *J Antimicrob.Chemother.*, v. 10, no. 4, p. 263-270.

58. Wang, H., and S. Ma, 2008, The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome: *Am.J Emerg.Med.*, v. 26, no. 6, p. 711-715.
59. Wong, C., and Z. Ustunol, 2006, Mode of inactivation of probiotic bacteria affects interleukin 6 and interleukin 8 production in human intestinal epithelial-like Caco-2 cells: *J Food Prot.*, v. 69, no. 9, p. 2285-2288.
60. Yeruva, S., G. Ramadori, and D. Raddatz, 2008, NF-kappaB-dependent synergistic regulation of CXCL10 gene expression by IL-1beta and IFN-gamma in human intestinal epithelial cell lines: *Int.J Colorectal Dis.*, v. 23, no. 3, p. 305-317.
61. Zanotti, S., A. Kumar, and A. Kumar, 2002, Cytokine modulation in sepsis and septic shock: *Expert.Opin.Investig.Drugs*, v. 11, no. 8, p. 1061-1075.
62. Zeuthen, L. H., L. N. Fink, and H. Frokiaer, 2008, Toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain-2 play divergent roles in the recognition of gut-derived lactobacilli and bifidobacteria in dendritic cells: *Immunology*.