Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Ústav klinické imunologie a alergologie

INFEKCE MAKROFÁGOVÉ LINIE J774.2 BAKTERIÍ *FRANCISELLA TULARENSIS* - ZMĚNY MEMBRÁNOVÝCH A NITROBUNĚČNÝCH MOLEKUL

Disertační práce

MUDr. Jakub Novosad

Doktorský studijní program Lékařská imunologie

2010

Poděkování

Je mou povinností vyjádřit upřímné poděkování všem, kteří mi v průběhu celého postgraduálního studia při Lékařské fakultě UK v HK umožnili svou pomocí vypracování této disertační práce.

V prvé řadě bych rád poděkoval své školitelce MUDr. Ireně Krčmové, CSc., za vedení během studia, pomoci při navazování kontaktů na spolupracujících pracovištích i za její korektorskou pomoc při přípravě prací publikovaných v odborných časopisech během studia i tohoto závěrečného textu disertační práce.

Za vytvoření vhodných pracovních i studijních podmínek děkuji přednostovi Ústavu klinické imunologie a alergologie FN HK prof. RNDr. Janu Krejskovi, CSc.

Za oporu, vytvoření příjemné pracovní atmosféry a pomoc při mé experimentální práci děkuji celému kolektivu pracovníků Ústavu klinické imunologie a alergologie FN HK a zejména mým spolupracovníkům spolupodílejícím se na řešení grantového projektu zaměřeného na studium nitrobuněčného parazitismu při Proteomovém centru Ústavu molekulární patologie FVZ UO, jmenovitě paní Mgr. Monice Holické a mé ženě PharmDr. Martině Novosadové, Ph.D., které navíc patří vřelý dík za korekturu celého textu a mimořádné odborné i rodinné zázemí.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT České Republiky, č. LN00A033 v rámci realizace projektu s názvem „Proteomové centrum pro studium intracelulárního parazitizmu bakterií“ s další podporou výzkumného záměru MSM VZ 0021620812.

OBSAH:

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE.....9

1.1. Úvod do problematiky.....10

1.2. Výzkumné otázky a hypotézy.....12

2. TEORETICKÁ ČÁST.....13

2.1. Historické poznámky.....14

2.1.1. Buněčná složka přirozené imunity (od Mečnikova k Janewayovi).....14

2.1.2. Objevení původce tularemie.....15

2.2. Bioterorismus.....15

2.2.1. *Francisella tularensis* jako potenciální biologická zbraň.....18

2.2.2. Možnosti primární a sekundární prevence a terapie.....18

2.3. *Francisella tularensis*, obecné poznámky a taxonomie, tularemie.....19

2.4. Koncept vzájemné interakce mezi intracelulárním parazitem a imunitním systémem...20

2.4.1. Strategie bakterií k osídlení hostitelských buněk.....21

2.4.2. Obranné mechanismy hostitelské buňky.....22

2.4.2.1. Strukturální změny makrofágů v průběhu fagocytózy.....23

2.4.2.2. Aktivace makrofágů - klíčový moment překonání primární infekce.....25

2.4.2.2.1. Signalizace zprostředkovaná LPS – signální cesta NFκB a MAPK.....26

2.4.2.2.2. Inflamazóm - signalizace zprostředkovaná NLR.....28

2.4.2.2.3. Signalizace zprostředkovaná IFNγ – signální cesta JAK/STAT.....29

2.4.2.3. Oxid dusnatý ve fyziologii buňky a v obraně proti intracelulárním parazitům.....31

2.4.2.4. Smrt infikovaných buněk.....36

2.4.3. Role granulocytů a komplementového systému.....39

2.4.4. Specifická imunitní odpověď na infekci intracelulárními parazity.....39

2.4.4.1. T lymfocyty.....40

2.4.4.2. B lymfocyty.....43

2.4.5. Mechanismy překonání obranných funkcí hostitele obecně.....43

2.5. Průběh primární infekce *Francisella tularensis*.....45

2.6. Závěr k teoretické části.....49
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....50
3.1. Problematika detekce aktivace makrofágů a její praktické využití.....51
3.1.1. Praktické využití průtokové cytometrie.....52
3.1.2. Charakteristika zvolených povrchových znaků 54
3.1.2.1. Intracelulární adhezní molekula-I (CD54) 54
3.1.2.2. Receptory pro Fc fragment IgG (CD16/32).....54
3.1.2.3. Kostimulační molekula CD86.....55
3.1.3. Metodologické poznámky k detekci NO.....55
3.2. Použitý materiál..... 57
3.2.1. Reagencie, buňky a infekce.....57
3.2.2. Přístrojové vybavení.....58
3.3. Časový protokol pokusů, prováděná měření v jednotlivých intervalech.....58
3.4. Metodika kultivace buněk před zahájením pokusu.....59
3.5. Infekce buněk.....59
3.6. Stimulace buněk.....59
3.7. Sledování životnosti buněk a bakterií.....60
3.8. Průtokově cytometrická analýza.....60
3.9. Měření produkce NO v supernatantu.....60
3.10. Metodologie statistického zpracování výsledků, obecný lineární model.....61
4. VÝSLEDKY. 63
4.1. Příklady výstupů z cytometrické analýzy a fluorescenční mikroskopie.....64
4.1.1. Exprese CD54.....64
4.1.2. Exprese CD16/32.....65
4.1.3. Exprese CD86.....66
4.2. Závislost absolutních hodnot MFI a změny MFI CD54 na čase bez ohledu na další proměnné a s ohledem na přítomnost infekce a stimulace.....67
4.2.1. Závislost absolutních hodnot MFI CD54 na čase, základním časovém schématu a typu stimulace, přítomnosti infekce a dávce LPS a IFNγ 69
4.2.2. Relativní vzestup MFI CD54 (ΔMFI(6) CD54) po šesti hodinách v závislosti na zvoleném modelu.....74
4.3. Závislost absolutních hodnot MFI a změny MFI CD16/32 na čase bez ohledu na další proměnné a s ohledem na přítomnost infekce a stimulace 75

4.3.1. Závislost absolutních hodnot MFI CD16/32 na čase, základním časovém schématu a typu stimulace, přítomnosti infekce a dávce LPS a IFNγ.....77
4.3.2. Relativní vzestup MFI CD16/32 po 24 hodinách (ΔMFI(24) CD16/32) v závislosti na zvoleném modelu.....82
4.4. Závislost absolutních hodnot MFI a změny MFI CD86 na čase bez ohledu na další proměnné a s ohledem na přítomnost infekce a stimulace.....83
4.4.1. Závislost absolutních hodnot MFI CD86 na čase, základním časovém schématu a typu stimulace, přítomnosti infekce a dávce LPS a IFNγ.....85
4.4.2. Relativní vzestup MFI CD86 po 24 hodinách (ΔMFI(24) CD86) v závislosti na zvoleném modelu.....90
4.5. Závislost kombinace fenotypových změn (relativní vzestup ΔMFI) CD54, CD16/32 a CD86 na čase a zvoleném časovém schématu a stimulačním agens.....91
4.6. Závislost změny produkce NO na čase bez ohledu na další proměnné.....94
4.6.1. Relativní produkce NO (μM/l) v závislosti na zvoleném modelu stimulace resp. infekce a stimulačním agens.....94
4.6.2 Závislost relativní produkce NO (μM/l) po 24 hodinách s ohledem na zvolený model stimulace a infekce.....95
4.7. Závislost proliferace *F. tularensis* LVS (log_{10}CFU/ml) na čase bez ohledu na další proměnné.....96
4.7.1. závislost proliferace *F. tularensis.* LVS (log_{10}CFU/ml) na čase, zvoleném časovém schématu a stimulačním agens.....96
4.8. Korelace mezi produkcí NO (μM/l) v čase 24 hod. a proliferací *F.tularensis.* LVS (log_{10}CFU/ml) v čase 24.....97
4.9. Korelace mezi fenotypovými změnami a produkcí NO.....98
4.10. Statistická závislost přežívání *F.tularensis.* LVS na modelových podmínkách, fenotypových změnách a produkci NO.....99
4.11. Efekt infekce na MFI CD54 v šesté hodině, CD86 ve 24. hodině a index MFI CD54(6) x CD86(24).....101
4.12. Pravděpodobnost eliminace infekce při dosažení kritických hodnot sledovaných fenotypových parametrů.....104
5. ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE.....105
5.1. Modelování vzájemného vztahu mezi hostitelem a patogenem *in vitro*.....106
5.2. Změny exprese jednotlivých znaků v závislosti na čase a dalších faktorech.....106
5.2.1. Exprese CD54.....106

5.2.2. Exprese CD16/32... 108
5.2.3. Exprese CD86.....111
5.2.4. Kombinace všech znaků.....113
5.3. Produkce NO.....116
5.4. Přežívání *Francisella tularensis* LVS.....117
5.5. Korelace mezi produkcí NO a proliferací infekce ve 24. hodině.....118
5.6. Krelace mezi fenotypovými změnami a produkcí NO ve 12. a 24. hodině.....119
5.7. Statistická závislost přežívání infekce na modelových podmínkách, fenotypových změnách a produkci NO.....119
5.8. Efekt infekce na fenotypové změny.....122
5.9. Diskuze.....124
6. ZÁVĚR.....130
6.1. Odpovědi na otázky formulované v úvodu.....131
6.2. Závěr.....132
7. LITERATURA.....133
8. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA.....148

POUŽITÉ ZKRATKY:

Apaf-1	Adaptorový protein vnitřní cesty apoptózy
APC	Antigen prezentující buňky
ASC	Adaptorový protein inflamazómu
B7-2	Kostimulační molekula, CD86
CFU	Kolonie formující jednotky
ERK	Kináza regulována extracelulárními signály (součást MAPK)
FADD	Adaptorový protein vnější cesty apoptózy
FcγRIII/II	Receptor pro Fc fragment IgG, CD16 / CD32
FITC	Fluorescein isothiokyanát – fluorescenční barvivo
FOXP3	Transkripční faktor (Treg)
F.t.	*Francisella tularensis*
***F.t.* LVS**	*Francisella tularensis*, živý vakcinační kmen – LVS (live vaccine strain)
GLM	Obecný lineární model
GATA-3	Transkripční faktor (subset Th2 **)**
ICAM-1	Adhezní molekula, CD54
IL	Interleukin
IFNγ	Interferon gama
IFNGR	Receptor pro IFNγ
ISRE/GAS	Signální sekvence pro transkripční faktor STAT 1
ITAM	Nitrobuněčné aktivační domény receptorů buněk imunitního systému
JAK	Janusova kináza
JNK	c-Jun N terminální kináza (součást MAPK)
LPS	Lipopolysacharid
κB	Signální sekvence pro transkripční faktor NFκB
LAMP	Molekulární znak asociovaný s lysozómy
LD_{50}	Dávka způsobující smrt 50 % infikovaných jedinců
LRR	Sekvence bílkovin bohaté na leucin
MKK	Kináza aktivující MAPK
MAPK	Mitogenem aktivované protein-kinázy
MD2	Protein MD2 – součást receptoru pro LPS
MFI	Průměrná fluorescence analyzované skupiny buněk

ΔMFI	Změna průměrné fluorescence v čase za konkrétních podmínek
NALP	Protein z rodiny NLR, receptorová složka inflamazómu
NFκB	Nukleární faktor κB
NLR	NOD-like receptor
NO	Oxid dusnatý
NOS	NO syntetáza (forma inducibilní/endoteliální/neuronální/bakteriální)
OD	Optická denzita
p38	Terminální kináza (součást MAPK)
PAMP	Molekulární znaky asociované s patogeny
PBS	Fosfátový pufr
PE	Phycoerythrin – fluorescenční barvivo
PRR	Receptory pro molekulární znaky mikroorganismů
RORγt	Transkripční faktor (subset Th17)
SIRS	Syndrom **s**ystémové zánětlivé reakce imunitního systému
STAT	Signální transduktor a aktivátor transkripce
T-BET	Transkripční faktor (subset Th1)
TLR	Toll-like receptor
TNFα	Tumor nekrotizující faktor α
TRADD	Adaptorový protein vnější cesty apoptózy

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

1.1. Úvod do problematiky

Francisella tularensis je gram-negativní, nesporulující, fakultativně intracelulární patogen zodpovědný za endemicky se vyskytující onemocnění – tularemii. Ačkoliv toto onemocnění v současné době zdánlivě nepředstavuje větší společensko-medicínský problém, pravý opak je pravdou. Existují důkazy o tom, že díky svým ojedinělým biologickým vlastnostem (odolnost a mimořádně vysoká infekciozita – LD_{50} u virulentních kmenů pro člověka nepřesahuje 10 CFU (kolonie formujících jednotek)) byla *Francisella tularensis (F.t.)* v minulosti zneužita k vojenským cílům jako biologická zbraň a je proto od roku 2002 Centrem pro kontrolu nemocí (CDC) v USA zařazena mezi nejrizikovější potenciálně zneužitelné infekční agens v rámci vývoje biologických zbraní a bioterorismu (skupina A zahrnuje kromě *Francisella tularensis* i *Bacillus anthracis, Yersinia pestis, Clostridium botulinum*, viry pravých neštovic, Eboly a horečky Marburg)[19;50;151].

Není překvapující, že bylo vyvinuto enormní úsilí k objasnění imunopatogeneze onemocnění se zaměřením na faktory virulence s cílem vyvinout účinnou a bezpečnou vakcínu. Přestože již v padesátých letech byla využita u exponovaných jedinců v USA vakcína obsahující oslabený kmen *Francisella tularensis* LVS (live vaccine strain, *F.t.* LVS), nebyla doposud schválena pro široké klinické využití. Retrospektivní analýza totiž prokázala, že její účinnost proti virulentním kmenům není 100% a navíc existují nejasnosti ohledně metodiky její přípravy[135;153].

Současný výzkum se opírá jednak o analýzu atenuovaných a virulentních kmenů francisel se zaměřením na odhalení rozdílů v genetické výbavě a proteinové produkce a jednak o modelování primární infekce *in vitro* či pokusy *in vivo* na zvířecích modelech. Doposud tak byl zmapován bakteriální genom i proteom [10;87;102;139;183;186], byly definovány genové úseky kódující nejpravděpodobnější faktory virulence[9;146;169] i obecné zákonitosti v reakci imunitního systému na infekci a zároveň i některé možné mechanismy úniku *F.t.* z jeho dosahu[37;57;67;192]. Nicméně nadále nejsou bezezbytku jasné okolnosti samotného vstupu bakterie do buňky a zejména jejího úniku z nebezpečného prostředí fagolysozómu[9;35;112;156], stejně tak, jako mechanismy modulace imunitní odpovědi hostitele.

Z toho důvodu jsme na našem pracovišti ve spolupráci s Proteomovým centrem pro výzkum nitrobuněčného parazitismu (Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové) začali vyvíjet funkční *in vitro* model primární infekce myších buněk monocyto-makrofágové linie J774.2 kmenem *Francisella tularensis* LVS. Naše analýzy byly zaměřeny zejména na vzájemnou interakci mezi *F.t.* LVS a hostitelskou buňkou v průběhu

primární infekce. Dále na okolnosti související s přežíváním *F.t.* LVS v cytoplazmě makrofágů a na podmínky efektivní stimulace makrofágů vedoucí k eliminaci infekce. Díky průtokově cytometrické analýze infikovaných makrofágů jsme se pokusili definovat charakteristické fenotypové změny v průběhu infekce a stimulace.

V následujícím textu budou podrobněji rozebrány současné pohledy na interakci mezi intracelulárním parazitem a hostitelskou buňkou, resp. imunitním systémem jako celkem. Hlavní důraz je kladen na biologické vlastnosti makrofágů, které stojí v samém středu naší pozornosti. Infekce *Francisella tularensis* je do značné míry z hlediska intracelulárního parazitismu považována za prototypovou, nicméně má celou řadu specifik, jimiž se od ostatních infekcí intracelulárními parazity odlišuje. Tyto odlišnosti budou dalším těžištěm zájmu.

1.2. Výzkumné otázky a hypotézy

Rozsáhlý výzkum imunobiologických vlastností infekce *F.t.* vedl v posledních desetiletích k enormnímu nárůstu informací o jejím průběhu a důsledcích. V současné době je však jen velmi málo informací o fenotypových změnách ve smyslu exprese povrchových molekul infikovaných makrofágů v prvních hodinách infekce. Rovněž je nejasný způsob indukce anergie a apoptózy u infikovaných buněk, kterou lze považovat za specifickou formu úniku imunitním mechanismům. Byly stanoveny následující cíle a pracovní otázky:

1) je možné *in vitro* vytvořit podmínky pro intracelulární přežívání *Francisella tularensis* LVS?

2) existují fenotypové změny hostitelských buněk, které by byly specifické pro průběh infekce?

3) je možné stimulací makrofágů eliminovat infekci?

4) je možné sledováním fenotypu v čase charakterizovat funkční stav hostitelské buňky a potažmo tak předpovídat osud infekce?

5) dochází k interakci mezi infekcí a chováním hostitelské buňky v průběhu stimulace? Pokud ano, jaká je její povaha?

6) existuje specifický fenotypový korelát interakce *Francisella tularensis* LVS s hostitelskou buňkou?

7) jsou uvedená zjištění klinicky aplikovatelná v konkrétní či alespoň obecné podobě?

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Historické poznámky

Vzájemná interakce mezi hostitelem a invadujícím patogenem je stěžejní otázkou imunologie jako takové. Byla to právě problematika rezistence proti neléčitelným infekcím, která rozpohybovala dění v tomto oboru tak, že se postupně osamostatnil od mikrobiologie a patologie. Na počátku tohoto fascinujícího příběhu stál britský lékař Edward Jenner (1749-1822), který pečlivě popsal 23 případů nemocných kravskými neštovicemi kteří neonemocněli neštovicemi pravými. Položil tak základy budoucí vakcinace. Samotným otcem imunologie je někdy označován jeden z nejproduktivnějších vědců moderní doby Luis Pasteur (1822-1895). V návaznosti na Jennera vykultivoval celou řadu atenuovaných mikrobiálních kmenů, ze kterých připravil vakcinační preparáty, m.j. proti vzteklině. Jedním z Pasteurových spolupracovníků, který působil i na jeho ústavu v Paříži, byl ruský vědec Ilja Mečnikov, o němž bude zmínka dále.

2.1.1. Buněčná složka přirozené imunity (od Mečnikova k Janewayovi)

Historie makrofágů coby klíčové buňky přirozené imunity je neméně zajímavá, jako lidé, kteří ji utvářeli. Na počátku výzkumu buněčné imunity je třeba zmínit Ilju Mečnikova (1845-1916), jehož kariéra začala na univerzitě v ruské Oděse, kde působil jako profesor zoologie. Zabýval se zejména mořskou faunou a jeho následná práce v oceanologické laboratoři v Itálii, kde studoval fagocytující buňky mořské hvězdice se staly základním kamenem buněčné teorie imunity, kterou dále propracoval v Pasteurově institutu v Paříži. Za své objevy dostal roku 1908 Nobelovu cenu, spolu se svým vědeckým rivalem Paulem Ehrlichem - hlavním zástupcem „humoralistů“.

V průběhu 20. století se výzkum funkcí imunitního systému zaměřil převážně na problematiku specifických obranných mechanismů. V 50. letech byla popsána struktura specifických protilátek a v 60. letech základy buněčné složky specifické imunity (T a B lymfocyty). Přesto se našla řada vědců, která tvůrčím a nekonvenčním myšlením přispěla ke v té době zjednodušenému chápání schopnosti imunitního systému odlišovat „své od cizího“. Patřil mezi ně např. i Göran Möller z Institutu Karolinska ve Stockholmu, který se v 50. letech zabýval schopností některých mitogenů stimulovat B lymfocyty bez závislosti na funkci thymu. Přispěl tak m.j. k definici bakteriálního lipopolysacharidu (LPS). Samotný receptor pro LPS byl však na B-lymfocytech poprvé popsán až r. 1978. I přes tyto nesporné úspěchy však někteří odborníci popisovali studium účinků nespecifických mitogenů na B-

lymfocyty jako „provádění archeologie buldozerem“ a Europen Journal of Immunology se v té době rozhodl neotisknout žádné další články s touto tématikou.

Zlomovým okamžikem se stal až rok 1989, kdy americký vývojový imunolog Charles Janeway (1943-2003) svou přednáškou na sympoziu v Cold Spring Harbor (USA) položil základy moderní imunologii zaměřené na přirozenou imunitu. Již tehdy předpokládal existenci konkrétních, vývojově vysoce konzervovaných povrchových receptorů na buňkách přirozené i specifické imunity, které jsou schopny interagovat s fylogeneticky odlišnými motivy nacházejícími se v tělech bakterií a virů. V roce 1980 byly tyto receptory poprvé popsány u rodu *Drosophila* a pojmenovány Toll. V roce 1997 pak byly popsány i na lidských buňkách a označeny Medzhitovem a Janewayem jako Toll-like receptory (TLR). V dnešní době jich známe již jedenáct typů a jejich funkce jsou i nadále studovány v nejrůznějších souvislostech[41;174].

2.1.2. Objevení původce tularemie

Pohnutý osud bakterie *Francisella tularensis* se datuje od počátku 20. století, kdy McCoy roku 1911 jako první popsal onemocnění drobných hlodavců v okolí jezera Tulare v Kalifornii v USA a podle místa výskytu je pojmenoval tularemie. Toto onemocnění však bylo pravděpodobně literárně dokumentováno již dříve (poprvé patrně v r. 1653 v Norsku). Rok nato (1912) se podařilo izolovat původce onemocnění, gram-negativní nesporulující tyčku, která byla označena jako *Bacterium tularensis*. Tento mikroorganismus se dále popisoval také jako *Pasteurella* či *Brucella tularensis*[118;170]. První mikrobiologicky verifikované onemocnění tularemií prokázal v Ohiu v r. 1914 americký bakteriolog dr. Edward Francis. V roce 1959 pak byla publikována práce Olsufjeva a spolupracovníků, která dokladovala, že existují minimálně dva subtypy tularemického onemocnění a doporučil nové označení jako *Francisella tularensis*[118;134]. Mimořádné vlastnosti *F.t.*, jako je vysoká odolnost a zcela mimořádná infekciozita vedla bohužel i k jejímu zneužití v rámci výroby biologických zbraní (viz. dále).

2.2. Bioterorismus

První zmínky o zneužití infekčního agens jako zbraně v rámci válečného konfliktu či k teroristickému útoku pocházejí již ze středověku. V šestém století př.n.l. Asyřané otrávili protivníkům zdroje pitné vody plísní paličkovicí nachovou. K dalším zneužitím mikrobů pak

docházelo např. v roce 1346, kdy tatarská vojska při obléhání Kaffy házela mrtvá těla nemocných černým morem přes hradby města. Z relativně nedávné minulosti je pak potřeba vzpomenout pravděpodobné zneužití biologických zbraní ve II. světové válce ruskou armádou na východní frontě.

Znalost vysokých rizik uvedených zbraní vedla k vytvoření mezinárodní úmluvy o zákazu vývoje, výroby a hromadění zásob bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o jejich zničení, která byla 10. dubna 1972 podepsána v Moskvě, Londýně a Washingtonu. Jejím předchůdcem je Ženevský protokol z r. 1925[21].

Události z 11. září 2001 v New Yorku, které byly následovány rozšířením bílého prášku s anthraxem v americkém poštovním systému, dramaticky rozvířily diskuzi na téma bioterorismus. Výsledkem byla iniciativa zaštítěná americkým Centrem pro kontrolu nemocí (CDC), která definovala charakteristiky potenciálních biologických zbraní (viz. tabulka č.1) a roku 2002 kategorizovala kandidátní patogeny podle jejich rizikovosti do tří skupin. Ve skupině A s nejvyšší rizikovostí se pak vyskytuje m.j. i *Francisella tularensis*[151]. Přehledně viz. tabulka č.2.

Tabulka č.1: Klíčové vlastnosti patogenů využívaných pro vývoj biologických zbraní

1	Vysoká morbidita a mortalita
2	Možný přenos z člověka na člověka
3	Nízká dávka potřebná k infekci, šíření aerosolem
4	Není rychlá a jednoduchá diagnostika
5	Není vakcína
6	Vzbuzuje obavy ve společnosti
7	Dostupnost patogenu a možnost jeho produkce
8	Stabilita v prostředí
9	Záznamy o jeho dřívějším výzkumu
10	Potenciál být využit při výrobě zbraní

Upraveno dle Boria et al.[19]

Tabulka č.2: Kategorie rizikových patogenů dle CDC

A	Nejvyšší priorita • snadné šíření • vysoká morbidita a mortalita • způsobují paniku a narušují sociální systém • zdravotnický systém vyžaduje speciální opatření
	Anthrax (*Bacillus anthracis*) Botulismus (*Clostridium botulinum* toxin) Mor (*Yersinia pestis*) Pravé neštovice (variola major) Tularémie (*Francisella tularensis*) Virová hemoragická horečka (filoviry [Ebola, Marburg] a arenaviry [Lassa, Machupo])
B	Druhá nejvyšší priorita • středně obtížné šíření • středně závažná morbidita a mortalita • vyžadují speciální režimové změny k diagnostice a monitoringu
	Brucelóza (*Brucella* species) Epsilon toxin *Clostridium perfringens* Ohrožení bezpečnosti potravy (*Salmonella* species, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella*) Vozhřivka (*Burkholderia mallei*) Melioidóza (*Burkholderia pseudomallei*) Psitakóza (*Chlamydia psittaci*) Q horečka (*Coxiella burnetii*) Ricinový toxin z *Ricinus communis* Staphylokokový enterotoxin B Břišní tyfus (*Rickettsia prowazekii*) Virová encefalitida (alfaviry) Ohrožení bezpečnosti vodních zdrojů (*Vibrio cholerae, Cryptosporidium parvum*)
C	Třetí nejvyšší priorita, obsahuje patogeny, které by mohly být teoreticky geneticky upravené k masovému šíření
	Nipah virus a hantavirus

Upraveno dle: http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp

2.2.1. *Francisella tularensis* jako potenciální biologická zbraň

F.t .má naneštěstí většinu atributů, které z ní činí potenciální biologickou zbraň. Tato rizika jsou navíc podpořena skutečností, že již v tomto smyslu byla velmi pravděpodobně skutečně zneužita. *F.t.* byla jedním z testovaných patogenů japonskými speciálními jednotkami pro vývoj biologických zbraní, které operovaly v Manchurii v Číně v průběhu II. sv. války. Ve 40. letech vedl intenzivní výzkum *F.t.* v Sovětském svazu k vývoji kmene, který byl pravděpodobně použit při bitvách na východní frontě ve II. světové válce. Existují dokonce domněnky, že i přes mezinárodní úmluvy pokračoval vývoj biologických zbraní obsahujících *F.t.* v Sovětském svazu až do 90. let a vedl k vytvoření polyrezistentní linie *F.t.* Ve Spojených státech vedl obdobný výzkum ke konci 60. let k výrobě funkčních biologických zbraní s *F.t.* Dle oficiálních informací však byly poté všechny zásoby bakterií a biologických zbraní v USA zničeny[21;43;50;151;170].

2.2.2. Možnosti primární a sekundární prevence a terapie

Teoreticky nejefektivnějším způsobem primární prevence (která by znemožnila či alespoň zkomplikovala další potenciální zneužití *F.t.*) by byla účinná vakcinace. V tomto směru bylo proto vyvinuto veliké úsilí. Již před II. světovou válkou byl v Sovětském svazu kultivován oslabený vakcinační kmen, odvozený od *Francisella tularensis* subtyp *holarctica*. V letech 1946-1960 bylo postupně proočkováno 60 miliónů lidí. V roce 1956 byl kmen převezen do USA, kde z něj byl postupným pasážováním připraven vakcinační kmen LVS (live vaccine strain). I přes poměrně slibné výsledky ohledně imunizačního potenciálu však retrospektivní studie prokázaly, že ke snížení incidence došlo jen u jedné z forem tularémie (plicní), zatímco výskyt ostatních forem zůstal nezměněn. Zároveň přetrvávají nejasnosti ohledně její atenuace a biologického účinku a proto nebyla nikdy schválena pro klinické využití[89;118;135;188]. V současné době se intenzivně hledají faktory virulence *F.t.*, které by byly dostatečně imunogenní a použitelné pro subjednotkové vakcíny (např. LPS). výsledky však zatím nejsou přesvědčivé[188].

Vzhledem k neuspokojivé situaci stran vakcinace je třeba se v případě ohrožení spolehnout na profylaktické či terapeutické využití antibiotik. Pracovní skupina zabývající se terapií nemocných po kontaktu s biologickou zbraní doporučuje u dospělých použití Gentamicinu (5mg/kg i.m. nebo i.v. 1x denně) či Streptomycinu (1g i.m. 2x denně). Jako alternativní léčba je uváděn Doxycyklin (100mg 2x denně), Ciprofloxacin (400mg i.v. 2x

denně) či Chloramfenicol (15 mg/kg i.v. 4x denně)[50]. V případě přirozeného, endemického výskytu onemocnění je terapie v zásadě stejná.

2.3. *Francisella tularensis,* obecné poznámky a taxonomie, tularemie

Francisella tularensis je gram-negativní, aerobní bakterie, většinou tyčinkového tvaru (velikost 0.4-0.6 μm x 0.8-1 μm) s fakultativně intracelulárním růstem. Netvoří spóry a je velmi náročná na kultivaci (kultivační půdy vyžadují zvýšené množství železa a sloučeniny obsahující –SH skupiny, např. cystein či thioglykolát sodný). Na rozdíl od kultivační náročnosti je však poměrně odolná a vyniká i svou zcela mimořádnou infekčností.

Už v padesátých letech bylo Bellem a kol. popsáno, že LD_{50} virulentního kmene Schu S4 podaného subkutánně myším nepřesahuje 4 mikroorganismy[11]. U člověka může 10 mikroorganismů aplikovaných podkožně či 25 mikroorganismů inhalovaných způsobit život ohrožující onemocnění[158]. Jak již bylo zmíněno, *F.t.* se vyznačuje schopností přežívat a množit se v profesionálně fagocytujících buňkách lidského organismu (a ne jen v nich) a k tomu si evolučně vyvinula celou řadu protektivních mechanismů, které budou předmětem dalších kapitol.

Intenzivním studiem bakteriálního genomu byly postupně popsány čtyři subtypy, lišící se svým výskytem a patogenicitou. Jako první byly roku 1959 odděleny biovary rodu *Francisella* vyskytující se v Severní Americe – *Francisella tularensis, tularensis*, subtyp A a v Evropě a Asii žijící *Francisella tularensis, palaearctica*, subtyp B, později označována též *holarctica*[134]. Teprve asi po 30ti letech byl popsán další subtyp rodu *Francisella* žijící zejména v střední Asii, *Francisella tularensis, mediaasiatica*[154]. Nově byla ke třem popsaným subtypům rodu *Francisella* přidána i *Francisella tularensis, novicida*, která není pro člověka patogenní[118]. Již výše zmiňovaný oslabený kmen vyvinutý v 50. letech v laboratořích v USA – *Francisella tularensis* LVS (live vaccine strain) je odvozen od rodu *Francisella tularensis, holarctica*[135].

Tularemie je zoonotické onemocnění s přírodní ohniskovostí, vyskytující se na celé severní polokouli, nejčastěji na území USA, Kanady, Skandinávie, střední Evropy, centrální Asie a Japonska. Lokální epidemie byly většinou spojeny s obdobími zhoršených sociálně hygienických poměrů (např. povodně, válečné konflikty) a v souvislosti s lovem divoké zvěře. Přírodním zdrojem *F.t.* jsou především hlodavci, členovci a hmyz. Její výskyt však byl dokladován již u asi 150 živočišných druhů, včetně prvoků. Poměrně nedávno bylo pozorováno přežívání *F.t.* ve vodních amébách[71;108]. *F.t.* je dobře přenosná na člověka při

kontaktu s kontaminovanými zvířaty či pobodáním hmyzem, byly popsány i infekce způsobené požitím kontaminované vody.

Vstupní branou je spojivkový vak, poraněná kůže, plíce či zažívací trakt. Na místě vstupu pak závisí klinický průběh celého onemocnění, který se rozděluje na čtyři formy. Nejčastějším typem tularémie je ulceroglandulární forma (cca 80% případů), asi 10% ze všech onemocnění zaujímá forma střevní a 5% okuloglandulární. Nejméně častá plicní forma tularemie je však mimořádně nebezpečná a to jak svým klinickým průběhem, tak faktem, že právě tato forma je spojována s rizikem zneužití biologických zbraní.

Onemocnění je charakteristické svým náhlým začátkem s vysokými teplotami, zimnicemi s třesavkami, bolestmi hlavy, kloubů a svalů. Typickým znakem bývají zvětšené uzliny či místa infekce na kůži, které často (až v 60%) přecházejí do formy otevřeného vředu velikosti až 3 cm, hojícího se dlouhodobě, někdy až tři roky. Histologicky je možno prokázat granulomatózní zánět, zpravidla s centrálními nekrózami.

Onemocnění způsobené *F.t.* subtypem *tularensis* mají v případě neléčení až 60% mortalitu, v případě infekce subtypem *holarctica* toto číslo klesá asi na 10%[63;91;127;176-178].

Diagnostika tularémie se opírá (kromě epidemiologické anamnézy, klinického vyšetření pacienta a zobrazovacích metod) o serologický průkaz specifických protilátek ve třídě IgG, IgA a IgM (které se objevují zhruba do dvou týdnů po infekci a maxima dosahují cca za 1-2 měsíce)[58], toto vyšetření je však nespolehlivé a nezřídka falešně pozitivní při onemocnění brucelózou. Další možností je serologický průkaz antigenů francisel, aglutinačními metodami či pomocí ELISA kitu nasměrovaného proti LPS *F.t.* Pro přímý průkaz *F.t.* je možno použít buď velmi nesnadnou kultivaci či metodu PCR (primerem je gen tul4)[72;171]. Terapie a prevence tularémie již byla nastíněna v kapitole 2.2.2. a není primárním cílem této práce.

2.4. Koncept vzájemné interakce mezi intracelulárním parazitem a imunitním systémem

Koexistence prokaryotických a eukaryotických organismů (neboli bakterií a jejich hostitelů) je významně modifikována evolucí. V zásadě je možno tyto vztahy rozdělit na symbiotické, komenzální a patergní. Symbiotické vztahy jsou takové, ze kterých profituje minimálně jedna ze zúčastněných stran. Oproti tomu vztahy komenzální jsou definovány jako sdílení společného prostoru bez jasně vyjádřeného prospěchu či nevýhody jednoho z organismů. Patergní jsou potom vztahy, ze kterých profituje jedna ze stran na úkor druhé.

Život na Zemi dle různých teorií exisuje cca 3,6 miliardy let. Před asi 1,5 miliardou let došlo pravděpodobně k prvnímu výskytu symbiózy eubakterie a archaebakterie za vzniku organel (jádra, mitochondrií a plastidů). I po vzniku prvních eukaryotických buněk nadále docházelo ke vzájemným interakcím, které snad již od počátku měla symbiotický, komenzální či patologický charakter[118].

Velké množství bakteriálních taxonů parazituje na existenci eukaryotních buněk, a to od jednobuněčných organismů po člověka. Doposud bylo popsáno více než 200 prokaryotických patogenů schopných vyvolat onemocnění u člověka. Z hlediska životního stylu je lze rozdělit na extracelulární (jsou schopny se množit nezávisle na eukaryotických buňkách – např. *Clostridium*), fakultativně intracelulární (množí se vně i uvnitř eukaryotických buněk – např. *Legionella, Listeria* či *Francisella*) a obligátně intracelulární (ke své proliferaci striktně vyžadují nitrobuněčné prostředí – např. *Coxiella*). Je třeba zde poznamenat, že dle starších kritérii se za intracelulární parazity (fakultativní či obligátní) považovaly pouze bakterie schopné proliferace uvnitř profesionálních fagocytů (polymorfonukleáry a makrofágy), teprve později se ukázalo, že některé bakterie, které dle uvedené podmínky nelze mezi intracelulární parazity zařadit (např. *E. coli, Staphylococcus* a *Streptococcus*), jsou schopny vstupovat i do nefagocytujících buněk[118].

2.4.1. Strategie bakterií k osídlení hostitelských buněk

Každou vzájemnou interakci je možno popsat jak z pohledu hostitele tak invadujícího mikroorganismu a je výsledkem vlivu nepřeberného množství proměnných na obou stranách[80]. Další kapitola bude zaměřena na intracelulární parazity.

Z pohledu bakterie se jedná o hledání nového životního prostoru a zdrojů výživy. Intracelulární parazité jsou k tomu vybaveni celou řadou schopností označovaných jako faktory virulence. V dalších řádcích budou nejdůležitější z nich popsány.

Schematicky (z časového hlediska) musí nejprve dojít k bezprostřednímu kontaktu mezi bakterií a hostitelskou buňkou. K tomu slouží struktury na bakteriální povrchu – adheziny, které váží příslušné receptory na povrchu hostitelské buňky. Adheziny je možné si představit jako vláknité a velice ohebné povrchové struktury (pili či fimbrie) nebo jako složky bakteriálních buněčných membrán (non-pili adheziny). Pro tvorbu pilů na bakteriálním povrchu byla vytvořena řada mechanismů (obecné sekreční dráhy, extracelulární precipitace, alternativní chaperonové cesty či asistovaný přenos) a výsledkem je několik druhů pilů – P pili či pili typu I, pili typu IV, struktury označované curli a pili typu II[159;168].

Dalším krokem v životním cyklu intracelulárně parazitující bakterie je její vstup do hostitelské buňky a to jak do buňky nefagocytující, tak do profesionálního fagocytu. K tomu slouží další povrchové bakteriální struktury označované jako invaziny, které po kontaktu s hostitelskou buňkou iniciují membránové změny rezultující v pohlcení bakterie[143].

V hostitelské buňce se pak mikrob musí rychle zorientovat. Mechanismy k tomu uzpůsobené jsou v zásadě velmi podobné těm, které mají i eukaryotické buňky, jedná se o molekulární komplexy provádějící transdukci signálu z vnějšího prostředí dovnitř bakterie. Podle složení se rozlišují dvou- a čtyř-složkové systémy. Obecným principem transdukce signálů uvedenými systémy je jejich fosforylace a defosforylace a výsledkem regulace transkripce bakteriálních genů. Na stejném principu funguje i vzájemná komunikace mezi bakteriemi navzájem. Bylo prokázáno, že jsou schopny reagovat na počty mikrobů a koncentraci živin v životním prostoru, tzv. Quorum sensing[130;138].

Nezbytnou podmínkou pro osídlení hostitelské buňky je bezesporu ovlivnění jejího chování tak, aby nevytvářela pro parazitující bakterii nepřátelské prostředí. Toho je možné dosáhnout sekrecí specifických produktů prostřednictvím více či méně komplexních bakteriálních sekrečních systémů či transportních proteinů (např. ABC transportér – ATP binding cassette transportér). Sekretované molekuly pak modulují chování hostitelské buňky. Doposud bylo popsáno několik typů sekrečních systémů, mezi recentně popsanými je i sekreční systém typu VI, který byl objeven i u *Franciselly*[145;155].

Proběhnou-li všechny výše zmiňované kroky bez komplikací, může parazitující bakterie osídlit okupované území. V případě, že dojde k vyčerpání přírodních zdrojů a jejich další existence je tímto ohrožena, bakterie opouštějí hostitelské prostředí a to buď indukcí apoptózy (čímž zabrání nežádoucí zánětlivé aktivaci hostitelského imunitního systému) nebo jiné formy programované smrti (např. pyroptózy), dochází k autofagii či nekróze. Bakterie toho mohou docílit sekrecí bílkovin interagujících s příslušnými kaskádami (např. aktivace kaspáz vedoucí k aktivaci apoptózy)[104;190].

2.4.2. Obranné mechanismy hostitelské buňky

V následující části budou nastíněny některé ze stěžejních mechanismů obrany hostitelského organismu proti invadujícím intracelulárně parazitickým bakteriím. Tyto principy je možné zcela schematicky rozdělit buď z pohledu složek imunitního systému na vrozené (nespecifické) a získané (specifické). Z časového hlediska pak na mechanismy

prvního kontaktu s bakterií (primární infekce makrofágů) a na mechanismy indukované komplexní imunitní odpovědi.

Makrofágy jsou z hlediska obrany proti intracelulárním parazitům klíčovými buňkami. Jednak přicházejí do kontaktu s patogenem jako jedni z prvních a na jejich reakci do značné míry závisí osud celého organismu a jednak (z hlediska definice intracelulárních parazitů jako takových – viz. výše) představují v organismu rezervoár pro infekci. Reakce makrofágů na infekci je nesmírně komplexním dějem s projevy jak strukturálními (pozorovatelnými ultramikroskopicky), tak funkčními.

2.4.2.1. Strukturální změny makrofágů v průběhu fagocytózy

Strukturální změny fagocytů v průběhu kontaktu s patogenem byly jako první pozorovány již v 19. století Mečnikovem a jeho poznatky se staly základním kamenem teorie buněčné imunologie. Dnešní pohled na proces pohlcování cizorodého materiálu buňkami - fagocytózy je velmi komplexní a její rozdělení na změny strukturální a funkční je čistě akademické. Na jejím chápání se podstatnou měrou podílely i průlomové poznatky Janewaye, který přispěl k utvoření celistvé představy o rozpoznávání nebezpečných podnětů z vnějšího prostředí makrofágy. Blíže viz. kapitola 2.4.2.2.

Na počátku procesu fagocytózy (jak již bylo zmíněno výše) je vzájemný kontakt mezi makrofágem a invadujícím mikrobem. Podmínkou je přítomnost specifických adhezinových struktur na straně mikroba, stejně tak jako více či méně specifické receptory na povrchu makrofágů. K dnešnímu dni již bylo popsáno velké množství těchto povrchových receptorů a další stále přibývají. Obecně se označují jako receptory rozeznávající patogenní znaky mikrobů, tzv. PRR (patterns recognition receptors) a jejich ligandami jsou molekuly exprimované mikroorganismy, tzv. PAMP (s patogenem asociované molekulární znaky – pathogen associated molecular patterns). Tyto molekuly jsou charakteristické velkou, evolučně danou strukturální odlišností od molekul eukaryotických buněk. Zjednodušeně se tak dá říci, že makrofágy pomocí uvedených receptorů rozpoznávají nebezpečné od bezpečného, což přidává další rozměr ke konvenčnímu konceptu rozpoznávání imunitním systémem platnému do konce 20. století – rozpoznávání vlastní od cizího. Kromě uvedených povrchových struktur je potřeba dále vzpomenout receptory, které interagují s patogenem až po jeho opsonizaci molekulami imunitního systému, t.j. např. receptory pro Fc fragmenty imunoglobulinů či komplement.

Pro většinu těchto povrchových molekul je typický jejich transmembránový průběh s expresí specifických intracelulárních domén, které jsou esenciální složkou procesu signalizace povrchovými receptorovými strukturami. Po navázání ligandu na vazebné místo příslušného receptoru extracelulárně dochází totiž k jejich konformačním změnám spojeným s agregací jednotlivých receptorových proteinů a se vzájemnou fosforylací těchto intracelulárních domén či k aktivaci tyrosinových kináz asociovaných s receptory. V dalších krocích se spouští nesmírně složitá a vzájemně provázaná síť intracelulárních signálních drah, rezultující ve zmiňované strukturální a funkční změny makrofágů. O některých z nich bude pojednáno v kapitole 2.4.2.2.

Jednou z prvních strukturálních změn fagocytózy je postupné vytváření výběžků cytoplasmy makrofágu vedoucí k obklopení mikroba a jeho uzavření do nově utvořeného cytoplazmatického kompartmentu – fagozómu. Proces uzavření pohlcované struktury do fagozómu je do značné míry variabilní a mnohdy i specifický pro daný mikroorganismus. Nově vzniklý fagozóm podléhá řadě změn, které se označují jako maturace. V průběhu maturace se na jeho povrchu objevují některé molekulární znaky, pomocí nichž je celý průběh dobře mapovatelný. Z funkčního hlediska jsou maturující fagozómy obohacovány o řadu hydrolytických enzymů, baktericidních peptidů (např. baktericidní permeabilitu zvyšující protein BPI, lysozym či defenzíny), klesá jeho pH a dochází k tvorbě membránového NADPH-oxidačního komplexu zodpovědného za tvorbu kyslíkových radikálů v rámci oxidačního vzplanutí. Všechny uvedené změny mají jeden cíl – zničení pohlceného mikroba.

Paralelně se vznikem fagozómu je možno pozorovat i tvorbu drobných vesikul – endozómů (endocytická cesta tvorby nitrobuněčných membránových organel), které z části přejímají do svého obsahu hydrolytické enzymy syntetizované v endoplasmatickém retikulu. I endozómy podléhají maturačním procesům a od časných endozómů přes pozdní endozómy zrají až do definitivních lysozómů. Endozómy v průběhu své maturace opakovaně interagují s fagozómy, předávají jim svůj obsah a některé povrchové molekuly (viz. výše), aby ve finále vznikla společná fúzní organela – fagolysozóm. Fagolysozóm je již plně kompetentní k destrukci pohlcené bakterie[97].

Jak již bylo zmíněno, je proces maturace fagozómů a endozómů dobře pozorovatelný pomocí změn exprese některých povrchových molekul. Mezi ně řadíme např.: Rab proteiny, EEA 1 (early endosomal antigen) a u pozdních stádií se vyskytující LAMP 1 a 2. Fagolysozómy jsou definovány povrchovým výskytem katepsinu D. Přehledně je proces maturace fagozómu popsán např. v práci Vieiry[185].

2.4.2.2. Aktivace makrofágů - klíčový moment překonání primární infekce

Již od 50. let 20. století znepokojovala vědce skutečnost, že některé bakteriální produkty jsou schopny indukovat velmi komplexní děje uvnitř buněk. Chemická povaha jedné z těchto molekul byla poprvé popsána v r. 1954 a byla označena dle své struktury jako lipopolysacharid (LPS). Bylo prokázáno, že je nedílnou součástí membrány gram-negativních bakterií. Od konce 90. let 20. století známe i strukturu jeho receptoru na povrchu buněk imunitního systému.

Jak bylo zmíněno dříve, vlastnost makrofágů identifikovat molekulární znaky patogenů a svou dynamickou odpovědí tak modulovat odpověď celého imunitního systému je v reaktivitě imunitního systému jako celku klíčová.

Makrofágy jsou k tomuto účelu vybaveny povrchovými a intracelulárními receptory (PRR – viz. výše), mezi něž se řadí zejména Toll-like receptory, receptory pro manózu, scavenger receptory či intracytoplazmaticky se vyskytující NOD-like receptory (nucleotide binding oligomerization domain - like protein)[92;136].

Toll-like receptory (TLR 1-11), v dnešní době již početná skupina molekul s charakteristickým strukturálním rysem, kterým jsou sekvence bohaté na leucin (LRR – leucin rich repeats), pomoci nichž váží mikrobiální struktury. Povrchově vázané TLR molekuly jsou schopny m.j. rozpoznávat produkty gram-pozitivních bakterií (např. peptidoglykan) – TLR 2 a TLR 1, gram-negativních bakterií (např. lipopolysacharid - LPS) – TLR 4 či flagelin – TLR 5. TLR molekuly se však vyskytují i intracelulárně v endosomálních váčcích, kde rozpoznávají např. dsRNA – TLR 3 nebo nemetylovanou CpG DNA – TLR 9. Po navázání příslušných ligand na receptory, dochází k spuštění fosforylačních dějů, konkrétně zejm. signální dráhy NFκB (nukleární faktor κB) a MAPK (mitogenem aktivované protein kinázy). Přehledně je o TLR molekulách pojednáno např. v práci Beutlera[15]. Blíže viz. kapitola 2.4.2.2.1.

V ne příliš dávné minulosti byly popsány i tzv. NOD-like receptory (NLR). Jedná se o poměrně početnou rodinu proteinů charakteristickou (podobně jako TLR) motivy bohatými na leucin (LRR). Podle struktury se dále dělí na skupinu NLRP (NLR s pyrinovou doménou, např. proteiny NALP 1-14, viz. dále) a NLRC (NRL s doménou vázající kaspázy, např. proteiny NOD 1 a 2). Na rozdíl od TLR však nejsou vázány na membrány, ale vyskytují se volně v cytoplazmě. Jejich funkce nebyly zdaleka ještě bezezbytku popsány, ale předpokládá se, že představují mechanismus obrany před patogeny, které uniknou z vymezeného prostředí fagozómů. NLR interagují např. s LPS, proteoglykany či muramyldipeptidem. Výsledkem

jejich aktivace je iniciace signální dráhy NFκB či sestavení multimolekulárního komplexu, tzv. inflamazómu, regulujícího jak zánětovou reakci, tak buněčnou smrt - pyroptózu[30;66;149]. Blíže viz. kapitola 2.4.2.2.2.

Konečně není možné opomenout ani fakt, že pouze koordinovaná spolupráce mezi jednotlivými složkami imunitního systému vede k efektivní obraně vůči infekci. Z tohoto hlediska se jako esenciální jeví příspěvek pomocných T lymfocytů Th1 prostřednictvím interferonu γ (IFNγ). Uvedená cesta aktivace se jeví jako klíčová v průběhu eliminace infekce intracelulárními parazity.

2.4.2.2.1. Signalizace zprostředkovaná LPS – signální cesta NFκB a MAPK

Typickou situací, při které dochází ke spuštění signální dráhy NFκB a MAPK je vazba ligandu (např. bakteriálního lipopolysacharidu - LPS) na molekulu TLR (v případě LPS je to TLR 4). Je třeba poznamenat, že problematika signálních drah je nesmírně komplikovaná a komplexní. V průběhu jejich aktivace dochází totiž k mnoha vzájemným překryvům mezi jednotlivými signálními kaskádami. Proto bude tato problematika rozebrána jen stručně s přihlédnutím na možné „Achillovy paty“, které sehrávají důležitou úlohu v rámci interakce mezi intracelulárním parazitem a makrofágem.

Již bylo uvedeno, že podstata všech signálních drah (až na apoptotickou kaskádu) je v zásadě stejná. Dochází k dominovému efektu, při kterém jsou kaskádovitě aktivovány další a další proteiny s fosforylační aktivitou – kinázy (viz. dále). Na konci celého procesu dochází k vytvoření specifického regulačního proteinu – transkripčního faktoru, který se váže na signální sekvence DNA v buněčném jádře a iniciuje transkripci jím regulovaných genů.

LPS je prototypovou molekulou ze skupiny PAMP a skládá se ze tří složek – lipidu A, korové oblasti a polysacharidového řetězce – O. Jako klíčová z hlediska patogenicity se jeví lipidová složka – lipid A. Jeho vazba na příslušný receptor však není úplně jednoduchá. LPS je v séru vázán proteinem LBP (lipopolysacharid-vázající protein) a tento komplex je ligandem membránové molekuly CD14. CD14 však nemá intracytoplazmaticku doménu schopnou transdukovat signál dovnitř buňky, je proto nezbytné, aby došlo k další interakci, tentokrát již s homodimerickým receptorem TLR 4, který je stabilizován molekulou MD2. Rozsáhlé práce prokázaly, že absence každé ze jmenovaných součástí tohoto receptorového komplexu vážně ovlivní sílu výsledné signalizace. Analogii je možné pozorovat v případě asociace receptoru pro antigen u T-lymfocytů a molekuly CD3. Je potřeba rovněž upozornit na skutečnost, že LPS zdaleka neinteraguje pouze s receptorovým komplexem TLR 4, ale

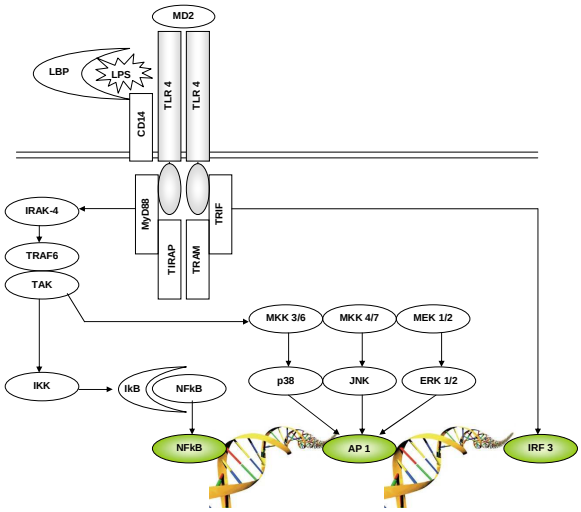
velmi pravděpodobně i s intracelulárními molekulami NLR a povrchovými β_2 integriny (CD11b/CD18 a CD11c/CD18). Další osud je již velice podobný[52;66].

Po vazbě LPS na příslušný receptor (zde TLR 4) se na jeho cytoplazmatickou doménu váže některý z adaptorových proteinů - MyD88, TIRAP, TRIF nebo TRAM. Každý z adaptorových proteinů je následně pravděpodobně schopen aktivovat jinou signální kaskádu a zdá se, že jsou na sobě nezávislé. Patrně nejdůležitějším zástupcem adaptorových proteinů je MyD88. Protein MyD88 aktivuje kinázu IRAK 4 a transdukční protein TRAF 6. Další v řadě, kináza TAK 1 je spolu s proteinem TRAF 6 rozcestím, ze kterého dále pokračuje signalizace směrem k aktivaci NFκB či MAPK. Oproti tomu adaptorové proteiny TRIF a TRAM (TRIF related adaptor molecule) spouštějí kaskádu směrem k aktivaci transkripčního faktoru IRF 3 (interferon regulatory factor 3) iniciující transkripci pro geny interferonu α a β. Uvedená cesta je jedním z důležitých uzlů, ve kterých se překrývá signalizace zprostředkovaná LPS a IFNγ. Transkripční faktor IRF 3 navíc (jak bude zmíněno dále) sehrává patrně klíčovou úlohu i v sestavení inflamazómu při infekci *F. tularensis*.

Samotný NFκB je v cytoplazmě v neaktivní podobě vyskytuje v podobě dimeru a je vázán na inhibitor IκB (inhibitor κB). Dojde-li k fosforylaci inhibitoru prostřednictvím IKK (inhibitor κB kináza), je tento ze své vazby uvolněn a rozštěpen proteazómem. NFκB, nyní již aktivní, přechází do buněčného jádra a iniciuje transkripci řady genů pod regulačním vlivem signální sekvence κB (např.: prozánětlivé cytokiny, řada enzymů - např. inducibilní NO syntetáza (iNOS) či cyklooxygenáza 2 (COX 2) a apoptózu regulující proteiny - např. inhibitory apoptotických proteáz (XIAP) a samozřejmě i řada adhezních a povrchových kostimulačních molekul)[6;66;95].

Vrátíme-li se zpět k proteinu TRAF 6 a kináze TAK 1, je možné nasměrovat signální informaci do buněčného jádra i přes MAP kinásovou kaskádu. Konkrétně cestou aktivace kinázy MKK 4/7 (MAP kinases kinase 4/7), MKK 3/6 a MEK 1/2. MKK 4/7 dále fosforyluje cílovou kinázu JNK (c-Jun N terminal kinase), MKK 3/6 protein p38 a MEK 1/2 terminální kinázu ERK 1 a 2 (extracellular signal regulated kinase). Výsledkem uvedené cesty je aktivace transkripčního faktoru AP 1 (activator protein 1), která je opět dimerem složeným z proteinů c-Fos a c-Jun. Podobně jako u NFκB, i aktivace AP 1 následně vede k transkripci řady genů kódujících prozánětlivé produkty (např. řadu matrixových metaloproteináz (MMP), cyklin D1, GM-CSF a pod.)[142]. Zobecníme-li výše uvedené skutečnosti, lze zjednodušeně říci, že obě signální cesty jsou spojeny s komplexní prozánětlivou aktivací buňky, spojenou se zvýšením její životnosti a produkcí velkého množství mediátorů zánětu[115]. Schematicky viz. obr. 1.

Obr. 1: Signalizace TLR (komentář v textu)



2.4.2.2.2. Inflamazóm - signalizace zprostředkovaná NLR

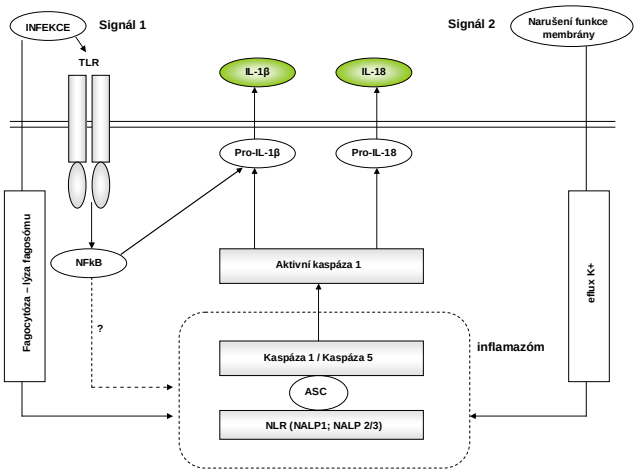
Inflamazóm je multiproteinový komplex o celkové molekulové hmotnosti překračující 700 kDa. První informace o jeho existenci se objevily v roce 2002, kdy byl popsán jako struktura sloužící k aktivaci prozánětlivých kaspáz[122]. Nejasnosti, které vyvstaly v souvislosti s jeho objevením do značné míry přetrvávají dodnes.

Komponenty inflamazómů se vyskytují volně v cytoplazmě a k jejich sestavení dochází vlivem doposud ne zcela jasných stimulů. Nicméně klíčovou úlohu zde hraje pravděpodobně opět interakce se strukturálními molekulami patogenů (jeho sestavení bylo popisováno např. při intracelulární infekci bakteriemi rodu *Staphylococcus, Listeria* nebo *Francisella)*[189]. Dále byla jeho aktivita prokázána v případě efluxu kalia z buňky při porušení funkcí buněčné membrány či vlivem volných kyslíkových radikálů[23].

Inflamazóm se skládá zpravidla ze tří komponent. Jednou z nich je protein z rodiny NLR, sloužící jako receptorová struktura, adaptorový protein ASC a konečně některá z kaspáz. Podle typu NLR proteinu se rozlišují minimálně na dva typy inflamazómů. První obsahuje protein NALP 1 a druhý NALP 2/3 (i když NALP proteinů bylo u lidí a myší popsáno již 14). Oba receptorové proteiny obsahují oblasti bohaté na leucin (LRR – podobně jako TLR či jiné NLR) sloužící k interakci se molekulárními složkami patogenu a pyrinovou doménu PYD, umožňující vazbu na adaptorový protein ASC. Na protein ASC se pak dále váže kaspáza-1 (ICE – interleukin 1β konvertující enzym) nebo 5. Aktivovaná kaspáza-1 štěpí pro-IL-1β (neaktivní forma interleukinu-1) a pro-IL-18 (neaktivní forma interleukinu-18) za vzniku jejich funkčních metabolitů[106]. IL-1 se řadí mezi komplexně prozánětlivě působící cytokiny. Oproti tomu IL-18 byl již delší dobu pozorován jako cytokin indukující spolu s

IL-12 poměrně selektivní diferenciaci naivních T-lymfocytů směrem k Th1 subsetu. Předpokládá se, že jeho synergický účinek s IL-12 spočívá ve stimulaci exprese receptoru pro IL-12 na povrchu pomocných T-lymfocytů ze subsetu Th1. Je třeba rovněž poznamenat, že aktivní kaspáza-1 je schopna zasahovat do mechanismů buněčné smrti. Podle současných znalostí se však nejedná o dnes již dobře známou buněčnou smrt - apoptózu, probíhající bez zánětlivé reakce. Uvedený mechanismus je totiž implicitně spojen s indukcí zánětu prostřednictvím IL-1β. Pro tuto formu buněčné smrti byl zaveden termín pyroptóza[62]. Zároveň se ukazuje že signalizace prostřednictvím NFκB působí synergicky, minimálně zvyšováním substrátů pro kaspázu 1, pro-IL-1β. Schématicky je tvorba inflamazómu znázorněna na obr. 2.

Obr. 2: Inflamazóm (komentář v textu)



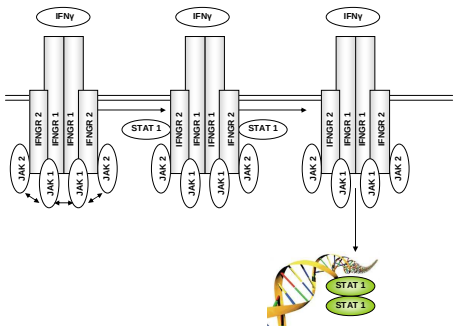
2.4.2.2.3. Signalizace IFNγ – signální cesta JAK/STAT

Stimulace makrofágů interferonem γ (IFNγ) produkovaným pomocnými T lymfocyty subsetu Th1 nabývá na své důležitosti zejména v případě infekce intracelulárními parazity. Tyto mikroorganismy jsou totiž často vybaveny celou řadou obranných mechanismů, pomocí nichž jsou schopné zabránit aktivaci signálních drah NFκB a MAPK, ale ne JAK/STAT (blíže viz. kapitola 2.4.3. a 2.5.) Navíc byly publikovány práce, které dokazují, že IFNγ je produkován širší skupinou buněk, než jen lymfocyty subsetu Th1, ale např. v časných fázích infekce *F.t.* i NK buňkami, dendritickými buňkami, samotnými makrofágy a dokonce i neutrofily[45].

Makrofágy na svém povrchu exprimují receptor pro IFNγ. Po vazbě IFNγ dojde k jeho konformačním změnami, při kterých se spojí dva hererodimery IFNGR 1 a 2, přičemž IFNγ přichází do kontaktu pouze s řetězci IFNGR 1. Na cytoplazmatických doménách obou řetězců jsou navázány kinázy JAK 1 a 2 (Janus kinases - na každém řetězci po jedné), které se po přiblížení obou řetězců aktivují a fosforylují ve své těsné blízkosti vazebná místa pro transkripční protein STAT 1 (Signal transducer and activator of transcription 1). Po navázání STAT 1 proteinů na svá fosforylovaná vazebná místa (po jenom na každý řetězec) se tyto navzájem spojí v homodimer STAT 1 - STAT 1, uvolní z vazby na receptor a přesune se do buněčného jádra. V buněčném jádře se nově vzniklý transkripční faktor váže na příslušné signální sekvence – ISRE/GAS (Interferon signaling response elements/gamma activation site). Mezi geny, které jsou pod regulačním vlivem ISRE/GAS se řadí např. transkripční faktor IRF 1 (viz. dále), MHC I. A II. třídy, beta-2-mikroglobulin, protein TAP (transportér antigenních peptidů), řadu chemokinů, adhezních a kostimulačních molekul.

Závěrem je třeba poznamenat, že signální sekvence pro STAT 1 (ISRE/GAS) jsou v těsné blízkosti signálních sekvencí pro NFκB (GAS/κB), což může z části vysvětlit synergický účinek obou signálních drah. STAT 1 navíc indukuje expresi genu pro transkripční faktor IRF 1 (interferon regulatory factor 1), proteinu, který dále iniciuje produkci interferonů α a β, podílí se na produkci inducibilní NO syntetázy (iNOS) a sehrává důležitou roli v regulaci apoptózy a patrně i pyroptózy (viz. výše)[100;140]. Druhá důležitá spojka již byla zmíněna v části zabývající se signalizací TLR (signální dráha TLR 4/TIRAM/TRIF/IRF 3). JAK/STAT signalizace je znázorněna na Obr. 3. Poznámky k metodologii využití průtokové cytometrie k analýze stavu aktivace buněk je předmětem kapitoly 2.7.1.

Obr. 3: Signalizace JAK/STAT (komentář v textu)



2.4.2.3. Oxid dusnatý ve fyziologii buňky a v obraně proti intracelulárním parazitům

První publikace o rozmanitých chemicko-biologických vlastnostech oxidu dusnatého (NO) se začaly objevovat v druhé polovině 20. století a v roce 1992 byl NO označen časopisem Science za molekulu roku. Intenzivně byla studována zejména souvislost mezi jeho produkcí buňkami cévního endotelu a cévní dilatací. V roce 1998 byla za uvedenou práci udělena americkým vědcům Furchgottovi, Ignarrovi a Muradovi Nobelova cena. Od konce 20. století až do současnosti nadále exponenciálně roste počet zpráv zaměřených na roli NO v biologii buňky a v medicíně. V souvislosti s obranyschopností vůči intracelulárním parazitům je nutno poznamenat, že vzhledem k časté rezistenci bakterií k aktivitě membránového NADPH oxidázového komplexu (oxidační vzplanutí) je tento produkt klíčový pro jejich destrukci.

NO je malá molekula plynu, který vzniká oxidací l-argininu na citrulin za přispění enzymu NO syntetázy (NOS). Samotná molekula NO je však velmi nestabilní a na místě vzniku setrvává v nezměněné formě jen velice krátkou dobu (řádově sekundy). Jednak se šíří po koncentračním spádu difúzí do svého okolí a jednak je (v závislosti na vlastnostech prostředí a koncentraci kyslíku) rychle oxidována na dusitany, dusičnany a mimořádně reaktivní peroxydusitany. Široké biologické vlastnosti tak závisí nejen na místě vzniku, jeho vyprodukovaném množství a biologickém poločase, ale i na jeho chemických vlastnostech oxidoredukčního a nitračního činidla. Ovlivňuje tak například aktivitu solubilní guanylát cyklázy, četných proteinových kináz a fosfatáz, zasahuje do procesů genové transkripce a apoptózy[26;96].

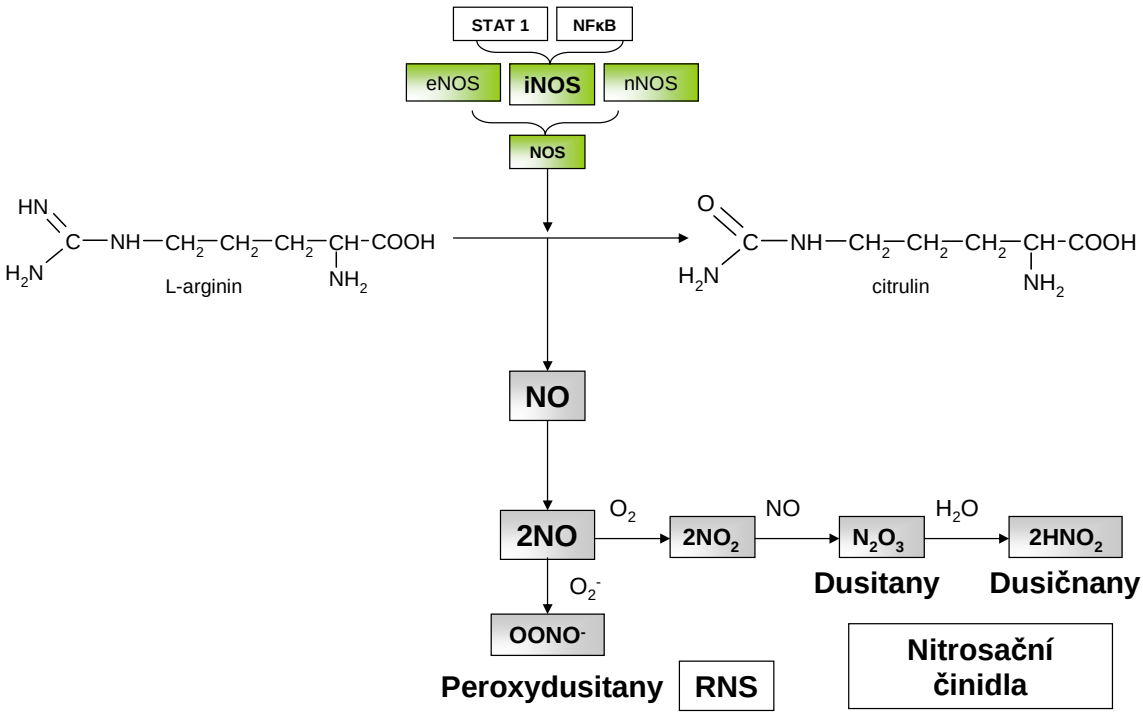
Jak již bylo zmíněno výše, za tvorbu NO jsou zodpovědné enzymy NO syntetázy (NOS). V současné době jsou známy tři druhy NOS, NOSI (neuronální, nNOS) a NOSIII (eNOS) jsou exprimovány v buňkách konstitutivně a NOSII (inducibilní, iNOS) je produkována pouze za přísně regulovaných okolností. Zmíněné enzymy se neliší pouze formou své transkripce, ale i katalytickou aktivitou. Předpokládá se, že iNOS je schopna katalyzovat oxidaci l-argininu až 1000x účiněji[84;93]. Hlavní rozdíly mezi jednotlivými isoformami NOS jsou shrnuty v tabulce 3.

Tab. 3: Isoformy NO syntetázy

Doporučené označení	**NOSI**	**NOSII**	**NOSIII**
Alternativní označení	**nNOS (neuronální),** ncNOS (neuronal constitutive),bNOS (brain=mozková)	**iNOS (inducibilní), mNOS** (makrofágová)	**eNOS (endoteliální),** ecNOS (endothelial constitutive)
Molekulová hmotnost	~160 kDa	~130 kDa	~133 kDa
Gen na chromosomu	12	17	7
Lokalizace v buňce	Cytosol	Cytosol	Buněčná membrána
Kde se vyskytuje	**Neurony** (centrální i periferní), buňky **epitelu, cévního hladkého svalu a kosterního svalu.** Není v glii.	Hlavně **makrofágy,** dále glie, hepatocyty, endotel, **epitel,** kardiomyocyty, **hladká svalovina, atd.**	Především cévní **endotel, dále plicní a renální epitel, kardiomyocyty, hipokampus, trombocyty**
Exprese proteinu	**Konstitutivní**	Většinou **inducibilní (po stimulaci cytokiny atd.)**	**Konstitutivní,** ale je modulována mechanickým namáháním endotelových buněk
Regulace aktivity	Ca2+, ser/tyr fosforylace, přítomnost kofaktorů a zpětnovazebná inhibice NO	Hlavně regulace genové transkripce. Po exprimaci proteinu není aktivita regulována, uplatňuje se je zpěznovazebná inhibice NO	Ca2+ , ser/tyr fosforylace, přítomnost kofaktorů, modulace exprese
Hlavní fyziologický a patofyziolo-gický význam	**Neurotransmiter a neuromodulátor**	**Cytotoxicita (**imunitní odpověď, účinkuje proti intracelulárním parazitům a nádorově změněným buňkám)	Reguluje **cévní tonus**, dále se podílí **na regulaci průtoku krve tkáněmi a regulaci krevního tlaku**

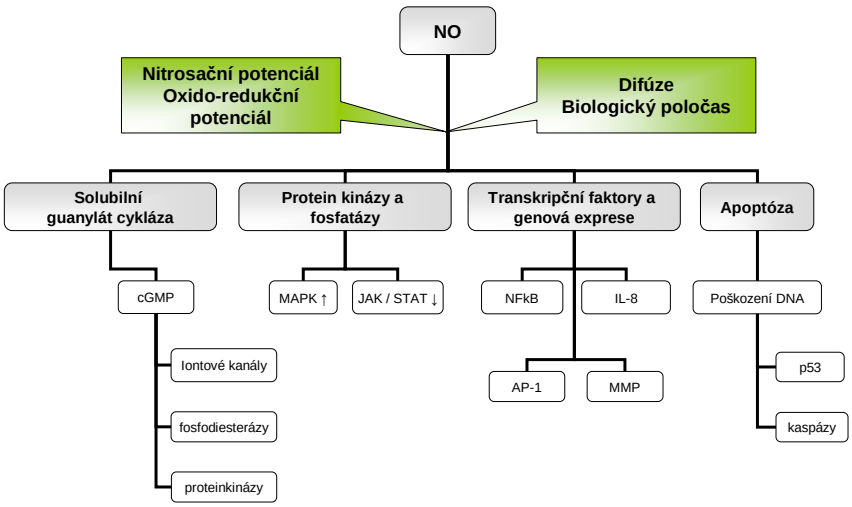
Katalytická činnost NOS spočívá v indukci oxidace l-argininu na citrulin za vzniku jedné molekuly NO. Jak již bylo zmíněno, je molekula NO vysoce nestabilní a rychle podléhá oxidaci. Rychlost této degradace závisí m.j. na množství vyprodukovaného NO, koncentraci kyslíku a na prostředí, ve kterém probíhá. Předpokládá se např., že v hydrofobním prostředí probíhá celá reakce až 300x rychleji. Celkový biologický efekt NO je tak dán jednak jeho nestabilitou, dále vysokou reaktivitou, schopností interagovat s dalšími molekulami za vzniku nitrosloučenin a jeho aktivitou oxidoredukčního činidla. Vše je navíc umocněno jeho téměř neomezenou možností difúze ve tkáních. Schématicky je syntéza NO, nitritů, nitrátů a peroxynitritů znázorněna na obr. 4.

Obr. 4: Syntéza NO z l-argininu (komentář v textu)



Budeme-li chtít blíže porozumět širokým účinkům NO ve fyziologii eukaryotické buňky, tkání a celého organismu, je třeba v prvé řadě akceptovat, že jeho efekty nevyplývají z jakékoli interakce s receptorem, ale z podstaty jeho chemismu. Tím je schopen měnit funkci či aktivitu terčových molekul a ovlivňovat tak osud celé buňky. Mezi nejčastěji popisované efekty se řadí aktivace solubilní guanylát cyklázy vedoucí k akumulaci nitrobuněčného cGMP a následné otevření některých iontových kanálů, aktivace enzymu fosfodiesterázy či některých proteinových kináz. V důsledku zvýšené tvorby volného NO se například aktivuje signální dráha MAPK, NFκB i AP1 a inhibuje signalizace JAK/STAT, je ovlivněna funkčnost některých matrixových metaloproteináz[13]. Konečně byla popisována asociace s apoptotickými mechanismy[7;22;93]. Navíc pro NO více než pro jakoukoli jinou molekulu platí, že jeho účinek je silně závislý na dávce. Bylo mimo jiné také pozorováno, že excesivní produkce NO či exogenní NO ve vysokých dávkách vede ke zcela opačným účinkům, než jaké byly výše popsány. Přehledně biologické účinky NO popisuje obrázek 5.

Obr. 5: Obecné nitrobuněčné účinky nízkých dávek NO



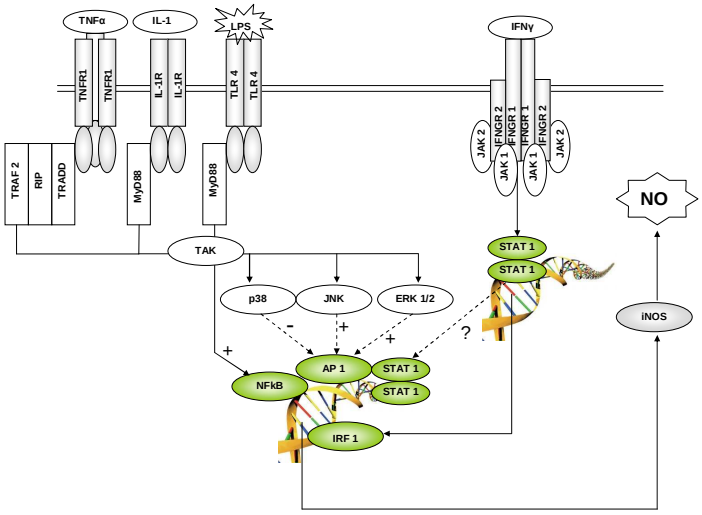
Komplexní působení NO v organismu se logicky nevyhýbá ani buňkám imunitního systému a do dnešní doby bylo popsána celá řada imunomodulačních efektů. Z výše uvedených důvodů je opět potřeba rozlišovat imunodulační působení NO na situace, kdy je jeho produkce nízká a na situace, kdy je jeho produkce nadměrná. Při jeho nízkých hladinách tak byl pozorován stimulační vliv na vyzrávání Th1 T-lymfocytů, pravděpodobně v souvislosti se zvýšenou expresí receptorů pro IL-12 při aktivaci solubilní guanylát cyklázy. Přehnané obranné reakci mediované Th1 subsetem T lymfocytů je velmi pravděpodobně zabráněno souběžnou zvýšenou produkcí regulačních Treg lymfocytů[20;88;131]. Stoupá-li produkce NO nad kritické hodnoty, byla oproti tomu opakovaně pozorována deplece Th1 T-lymfocytů při zachovaném množství Th2 T-lymfocytů, což představuje zcela opačné nasměrování imunitních mechanismů. Jedním z možných vysvětlení je snížení exprese některých povrchových adhezivních molekul (např. ICAM-1) z důvodu zvýšené produkce NO[133]. Imunomodulační působení NO je dále zmíněno v kapitole 2.4.4.1.

Ještě zajímavější je sledovat účinky produkovaného NO na bakterie. Byla popsána celá řada mikrobiálních změn, které se vyskytují v přímé souvislosti s přítomnosti NO[120;165]. Mezi ně patří např. inhibice syntézy bakteriální DNA (blokádou bakteriální ribonukleotid-reduktázy a tvorbou zlomů DNA), zvýšení vnímavosti vůči oxidativnímu stresu blokádou bakteriální respirace, oxidace některých bakteriálních lipidů[14]. Zajímavé je, že bakterie samy vlastní některé proteiny sloužící jako senzory pro NO (např. SoxRS), které mohou aktivovat

transkripci protektivních mechanismů (např. bakteriální superoxid dismutázu)[109]. Ještě zajímavější je zjištění, že některé bakterie jsou samy schopny NO syntetizovat, k čemuž mají uzpůsobený enzym – bakteriální NO syntetázu (bNOS). Význam syntézy NO přímo bakteriální buňkou není jasný, nicméně se předpokládá, že bude sehrávat roli v bakteriální rezistenci vůči antibiotikům[74].

Z praktického hlediska je ovšem patrně nejdůležitější položit si otázku, kdy a proč dochází v hostitelské buňce k produkci tak toxického produktu, jehož vznik a další působení navíc není lokalizováno do izolovaného buněčného kompartmentu? Je zřejmé, že daná produkce musí být přísně regulována a souvisí (za fyziologických i patologických okolností) se zvýšenou transkripcí genu pro iNOS. Zjednodušeně lze říci, že zvýšená produkce NO v souvislosti s nárůstem aktivity iNOS je vždy spojena se zánětlivou aktivací hostitelské buňky (makrofágu). Gen pro iNOS spadá pod regulační oblast κB resp. ISRE/GAS (viz. výše), je tedy přímo regulován transkripčním faktorem NFκB, AP 1 a pravděpodobně i STAT 1. Krom toho se na řízení jeho aktivity spolupodílí i transkripční faktor IRF 1 a 3 (viz. výše), který zvyšuje vazebnou kapacitu NFκB k signálním sekvencím DNA. Navíc bylo prokázáno, že (patrně nezávisle na NFκB a AP 1) je jeho aktivita ovlivňována i terminálními kinázami dráhy MAPK. Zatímco JNK a EKR 1/2 jeho transkripci zvyšují, p38 ji pravděpodobně inhibuje[28;150]. Při pohledu vně z buňky pak patrně nejvýznamnějším stimulátorem exprese iNOS a potažmo produkce NO jsou prozánětlivé cytokiny tumor nekrotizující faktor α (TNFα), interleukin-1 (IL-1) a IFNγ a některé molekuly PAMP, zejména LPS z gram-negativních bakterií (viz. obr. 6). Signalizace zprostředkovaná receptory pro IL-1 a TNFα jsou velmi podobné signalizaci TLR a sdílí spolu i většinu kináz (liší se jen na úrovni adaptorových proteinů)[51]. Byl navíc pozorován i synergismus uvedených signálních drah, účinek jednotlivých biologicky účinných látek tedy není kompetitivní (nicméně existují i výjimky – existují důkazy, že STAT 1 blokuje indukci signální dráhy NFκB po vazbě TNFα na svůj receptor)[187]. Při pokusu o maximální zobecnění dojdeme k závěru, že zvýšená transkripce iNOS je spojena obecně se zánětlivou aktivací buňky. Typickým příkladem, kdy je excesívní produkce NO spolu s dalšími efekty život ohrožující situací, je systémová zánětlivá odpověď imunitního systému (SIRS) v průběhu endotoxémie[64;77;107]. Stimulace transkripce iNOS je znázorněna na obr. 6. Praktické poznámky k metodologii detekce produkce NO jsou předmětem kapitoly 2.7.3.

Obr. 6: Indukce transkripce iNOS



2.4.2.4. Smrt infikovaných buněk

Smrt infikované buňky je nedílnou součástí patogeneze řady infekčních onemocnění. Zcela schematicky na ni lze nahlížet ze tří stran. Jednak se může jednat o smrt indukovanou samotným imunitním systémem (konkrétně NK buňkami či cytotoxickými T lymfocyty – viz. kapitola 2.4.3.1), jednak o altruistickou reakci infikovaných buněk na přítomnost cizorodého materiálu v cytoplazmě a jednak o způsob opouštění infikovaných buněk bakteriemi, které tak reagují na nedostatek životních substrátů. Dodnes však nejsou jednotné přístupy k nomenklatuře buněčné smrti jak programované tak nekrotické.

Před více než 40ti lety byl poprvé Richardem Lockshinem použit termín programovaná buněčná smrt. Odlišil tak dvě principiálně odlišné formy buněčné smrti. Jednu, která je organismem řízená a programovaná a druhou, která je náhodná. Podle dnešních kritérií by se Lockshinem popisovaná buněčná smrt dala definovat jako autofagická. V roce 1972 byl v literatuře poprvé Wylliem, Kerrem a Curriem navržen termín apoptóza. V 80. letech 20. století byly v lidských buňkách popsány enzymy zodpovědné za apoptotickou smrt buňky – kaspázy a v 90. letech geny regulující autofagii - ATG (autophagy genes). Množící se práce se stejným zaměřením ale lišící se terminologií vedla k nutnosti ustanovit Komisi pro nomenklaturu buněčné smrti (NCCD). Tato komise vypracovala doporučení pro definice jednotlivých forem buněčné smrti a to na mikroskopické i biochemické úrovni a publikovala je v letech 2005 a naposledy 2009[99]. Součástí doporučení je i definice buněčné smrti jako takové. Opírá se o princip, že smrt musí být nezvratným stavem a jako mrtvé jsou proto

popisovány pouze buňky u nichž došlo k minimálně jednomu ze tří dále popsaných jevů. Buď k porušení integrity buněčné membrány (prokazatelné akumulací vitálních barviv, jako např. propidium jodidu), nebo ke kompletní fragmentaci jádra či pozůstatky buněk jsou již ohraničeny a pohlcovány fagocytujícími buňkami. Tím je jasně dán rozdíl mezi mrtvou a umírající buňkou.

V závislosti na průběhu a morfologickém obrazu buněčné smrti je doporučeno odlišovat její tři klíčové typy. Prvním je smrt apoptózou, druhým autofagická smrt a třetím nekróza. Je však nezbytné poznamenat, že existuje i řada důkazů o specifických scénářích, které stírají hranice mezi těmito skupinami a to zejména mezi nekrózou a apoptózou. Na podkladě poznatků Degtereva a kol. v roce 2005 byla definován další mechanismus buněčné smrti nezávislý na apoptóze a mající rysy nekrózy, který byl autory označen jako nekroptóza[46]. Již více než 10 let jsou zpravidla v souvislosti s infekcí některými intracelulárně parazitickými bakteriemi pozorovány další atypické formy programované buněčné smrti, označované jako pyroptóza[62]. Tyto impulsy do značné míry narušily do té doby rigidní dichotomické paradigma o rozdílu mezi programovanou buněčnou smrtí, spojenou s organizovanou destrukcí buňky bez zánětlivé odpovědi na jedné straně (apoptóza a autofagická smrt) a náhodně se vyskytující destruktivní prozánětlivě působící nekrózou na straně druhé. V dalším textu se zaměříme pouze na hlavní charakteristiky apoptózy. Indukce pyroptózy byla zmíněna již v kapitole věnované signalizaci inflamazómu 2.4.2.2.2. Problematika autofagické smrti buňky je zmíněna pouze okrajově v sekci věnované osudu *F.t.* uvnitř hostitelské buňky.

Z biochemického hlediska se u apoptózy jedná o kaskádu na sebe navzájem navazujících reakcí. Na počátku dochází ke konformačním změnám povrchových molekul – apoptotických receptorů s následkem aktivace jejich nitrobuněčných domén (vnější cesta indukce apoptózy), případně k aktivaci skupiny specifických genů a expresi příslušných proteinů s následkem poškození mitochondriálních membrán (vnitřní cesta indukce apoptózy). Dělení apoptotických mechanismů na vnitřní a vnější cestu je ovšem pouze orientační, obě cesty spolu úzce souvisejí a prolínají se. Uvedená počáteční fáze se označuje jako fáze signalizační a jejím cílem je vytvoření nebo aktivace tzv. adaptorových proteinů, tedy jakési vstupní brány do fáze následující, efektorové. Ta je charakteristická postupnou aktivací latentních proteolytických enzymů (kaspáz - cysteinové proteázy štěpící bílkovinný řetězec za kyselinou asparágovou) a postupným štěpením substrátů přítomných jak v cytoplazmě, tak v buněčném jádře. Jsou jimi např. cytoskeletální struktury, regulační molekuly (kinázy), biomembrány (včetně mitochondriální membrány) a řada jaderných enzymů a transportních proteinů[97].

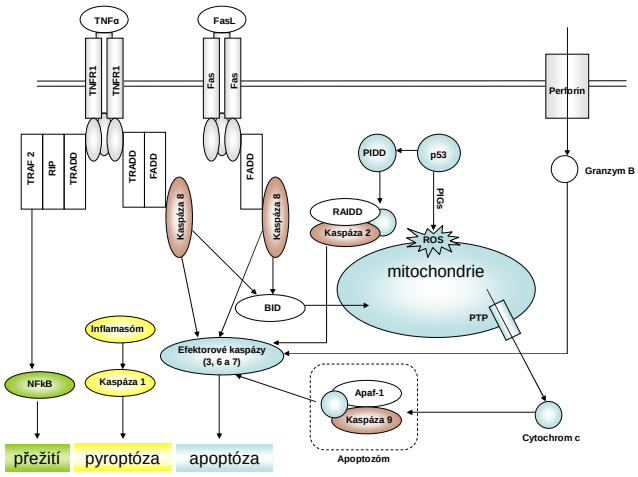
Mezi důležité induktory vnější cesty apoptózy tak je třeba zmínit jednak granzymy (serinové proteinázy), které vnikají do cytoplazmy otvorem tvořeným perforiny mechanismem analogickým vytvoření membránu atakujícího komplexu při aktivaci komplementu. Perforiny a granzymy (granzym B) jsou hlavní složkou granulí NK buněk a cytotoxických T lymfocytů[137] a jednak navázání ligandu na povrchový receptor z tzv. rodiny receptorů pro TNFα (TNFR-1, Fas/APO-1 (CD95), TRAMP, TRAIL- 1 a 2). Granzymy jsou následně schopny přímo aktivovat kaspázovou kaskádu (kaspáza 3, kaspáza 7), zatímco po navázání ligandu na receptor z rodiny TNFα dochází ke konformační změně cytoplazmatických konců molekul vedoucí k oligomerizaci s cytoplazmatickými proteiny FADD (Fas associated death domains) a TRADD (TNFαR associated death domains), za vzniku makromolekulárních komplexů. Protein FADD je následně schopný přímo vázat iniciační proteinázu kaspázové kaskády vnější cesty, enzym FLICE (FADD like interleukin 1-beta converting enzyme), tj. kaspázu 8[164].

Aktivátory vnitřní cesty apoptózy jsou signály z vnitřního prostředí buňky a mohou to být např.: buněčné metabolické změny, volné radikály, anoxie a působení intracelulárně parazitických mikroorganismů. Nejčastěji však na počátku vnitřní cesty stojí poškození DNA a následná aktivace proteinu p53. V buňce jsou následně prokazatelné zvýšené hladiny jím indukovaných transkriptů, z nichž je třeba jmenovat zejména protein PIDD a tzv. PIGs – proteiny pocházejících z asi 10 genů indukovaných proteinem p53 (p53 induced genes). Tyto proteiny (PIGs) produkují v buněčných mitochondriích ve zvýšené míře volné kyslíkové radikály (ROS), účastnící se oxidativní degradace širokého spektra cytosolových a strukturních molekul, zejména mitochondriálních membrán. Protein PIDD se váže na cytoplazmatický protein RAIDD a iniciační kaspázu 2, kterou tímto aktivují[125]. v dalších krocích dochází k narušení integrity mitochondriální membrány a k úniku aktivních složek z mitochondriální matrix, resp. z intermembranózního prostoru, zejména cytochromu c. Cytochrom c pak sehrává důležitou úlohu v aktivaci kaspázy 9, za spolupůsobení cytosolového proteinu Apaf-1 (Apoptotic proteases activating factor 1) a dATP po sestavení multimerního komplexu – apoptozómu. Aktivovaná kaspáza 9 je iniciační proteinázou vnitřní cesty, za adaptorový protein je považován Apaf-1[179].

V rámci efektorové fáze apoptózy, která navazuje na fázi signalizační, dochází k sukcesivní aktivaci kaspáz (kaspázy 3, 6 a 7) s postupnou degradací nitrobuněčných struktur a nakonec smrti buňky s charakteristickým mikroskopickým obrazem[152]. Celý proces navíc podléhá velmi přísné regulaci (např. proteiny z rodiny Bcl-2, řadou inhibitorů apoptotických proteáz (IAP) a podobně). V neposlední řadě je třeba si uvědomit, že o osudu

buňky jako takové vždy rozhoduje její celkové ladění, jinými slovy vytváření pomyslné rovnováhy mezi signály životnost zvyšujícími (např. zánětlivá aktivace - NFκB) a proapoptotickými[47]. Schematicky jsou základní cesty indukce apoptózy znázorněny na obr. 7.

Obr. 7: Vnější a vnitřní cesta aktivace apoptózy a pyroptózy a signálů přežití



2.4.3. Role granulocytů a komplementového systému

Většina intracelulárních parazitů je plně rezistentních vůči působení komplementu. V souvislosti s jeho nechopností iniciovat lýzu bakteriálních buněk byla opakovaně diskutována protektivní role kapsule u virulentních kmenů bakterií. Existují však rovněž doklady o možném opsonizačním účinku komplementu. U řady patogenů byla prokázána navíc jejich přítomnost v cytoplazmě neutrofilních granulocytů. Ty však nebyly schopny parazity zničit z důvodu blokády respiračního vzplanutí. Role těchto přirozených složek imunity v souvislosti s infekcí intracelulárními parazity stále zůstává nejasná[57;58].

2.4.4. Specifická imunitní odpověď na infekci intracelulárními parazity

V předchozích kapitolách byly shrnuty některé recentní pohledy na vzájemnou interakci mezi intracelulárním parazitem a hostitelskou buňkou, konkrétně makrofágem. Bylo konstatováno, že makrofágy jsou obdařeny velkým množstvím mechanismů, jimiž jsou schopny rozpoznat nebezpečí, rychle na ně reagovat a pokusit se je co nejdříve eliminovat. Jedině včasná a efektivní odpověď buněk vrozené imunity je schopna zabránit katastrofálním následkům infekce na organismus jako celek. Pokud by například bez zásahu přirozené imunity v organismu volně přežíval 24 hodin patogen s průměrným zdvojovacím časem 20

min., pak by byl hostitel zaplaven více než $2x10^{21}$ bakterií, což je jistě neslučitelné se životem. Další část bude zaměřena na adaptivní imunitní odpověď.

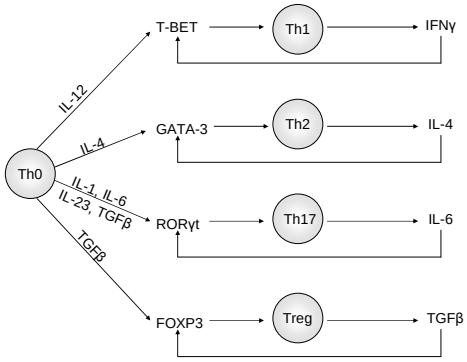
2.4.4.1. T lymfocyty

Konvenčně se T-lymfocyty dělí na pomocné (Th - exprimují na svém povrchu molekulu CD4) a cytotoxické (Tc - exprimují na povrchu molekulu CD8). Th lymfocyty jsou tradičně vnímány jako ústřední řídící buňky protektivní imunity. Jsou obdařeny schopnostmi, pomocí kterých řídí aktivitu celého imunitního systému. Oproti tomu hlavní úlohou Tc lymfocytů je cílená destrukce virem nebo jiným intracelulárním parazitem infikované či nádorové buňky.

Th lymfocyty se dále dělí na několik subsetů - Th0, Th1, Th2, Th17. Zvláštní skupinou jsou regulační lymfocyty Treg. Naivní Th0 jsou zralé imunokompetentní buňky (prošly vývojem v thymu), které doposud nepřišly do styku s cizorodým antigenem (tzv. naivní Th lymfocyty). Po kontaktu s antigen prezentující buňkou vystavující antigen ve spojení s molekulou HLA II. třídy (fenomén HLA restrikce) se následně vyvíjejí směrem k jednomu z dalších subsetů, které se navzájem liší typem aktivovaných transkripčních faktorů a s tím související cytokinovou produkcí ovlivňující chování celého imunitního systému. Th1 subset je charakteristický aktivací transkripčního faktoru T-bet spojenou s produkcí IL-2 a IFNγ. IFNγ stimuluje zejména buněčnou imunitní odpověď a inhibuje subsety Th2 a Th17. Oproti tomu subset Th2 je spojen s aktivací transkripčního faktoru GATA-3 spojenou s produkcí IL-4, IL-5, IL-9 a IL-13. Uvedené cytokiny podporují zejména protilátkovou aktivitu, produkci IgE a činnost eosinofilů a žírných buněk a naopak inhibují subsety Th1 a Th17. Subset Th17 je spojen s aktivací transkripčního faktoru RORγt, jehož dominujícím rysem je produkce IL-17, IL-21 a IL-22. Tyto cytokiny jsou odpovědné pravděpodobně za neutrofilní typ zánětu ve tkáních, obranu proti stafylokokům a kandidám a celou řadu imunopatologických stavů. Za specifických podmínek (zejména v případě prezentace antigenu nezralou dendritickou buňkou, která nastalou situaci nevyhodnotila jako nebezpečnou) vzniká regulační subset Treg (tzv. periferní regulační T-lymfocyty), který aktivací transkripčního faktoru FoxP3 a produkcí IL-10 a TGFβ tlumí zánětlivou odpověď jako takovou. O tom, kterým směrem se bude příslušný naivní T lymfocyt vyvíjet, rozhoduje velké množství proměnných (např. typ antigenu, způsob jeho prezentace, typ antigen prezentující buňky a zejména množství kostimulačních signálů). Důležitá je rovněž přítomnost tzv. diskriminačních cytokinů, které významně určují vývoj pro ně typickým směrem (IL-12 pro Th1; IL-4 pro Th2, TGFβ, IL-6, IL-1 a IL-23 pro Th17 a samotný TGFβ

pro Treg)[3;61;162]. Předpokládá se, že ladění imunitního systému jako celku je nasměrováno k neodpovídavosti, tedy za fyziologických okolností převládá aktivita regulačních Treg lymfocytů. Dojde-li k nerovnováze bez adekvátního stimulu na této úrovni a pžřeváží-li prozánětlivé stimuly nad protizánětlivými, může to vést k rozvoji imunopatologických stavů[90;98]. Vývoj naivních T lymfocytů směrem k jednomu z výjmenovaných subsetů znázorňuje obr. 8.

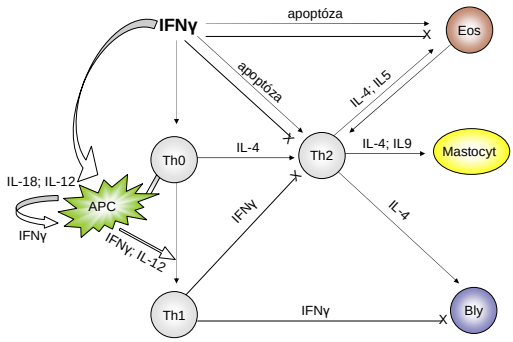
Obr. 8: Vývoj jednotlivých subsetů pomocných T lymfocytů (upraveno dle Schmidt-Weber[162])



Z hlediska protektivní imunity vůči intracelulárním parazitům se jako klíčový jeví subset Th1 pomocných T lymfocytů, který je produkcí IFNγ a TNFα zodpovědný m.j. za efektivní stimulaci makrofágů vedoucí k zneškodnění patogenu. Účinky IFNγ v organismu jsou však daleko komplexnější. Kromě stimulace makrofágů a podpory vyzrávání naivních T lymfocytů směrem k Th1 subsetu, za současné inhibice subsetů konkurenčních, indukuje apoptotickou smrt eosinofilů a zasahuje do činnosti B lymfocytů inhibicí tvorby protilátek třídy IgE a naopak stimulací tvorby IgG2 a IgG3. Dlouhou dobu bylo dogmatem, že IFNγ je tvořen výhradně lymfoidními elementy, jako jsou NK buňky, cytotoxické T lymfocyty a zejména Th1 T lymfocyty, přičemž hlavním diskriminačním faktorem vývoje Th1 T lymfocytů je IL-12 produkovaný zejména makrofágy. V dnešní době již máme dostatek důkazů o tom, že za příhodných okolností mohou tvořit IFNγ i antigen prezentující buňky (APC). Samy makrofágy tak mohou zasáhnout do dějů maturace naivních T lymfocytů a to ve smyslu stimulace Th1 subsetu na úkor subsetu Th2 a Th17. Otázkou nadále zůstává, jaké hlavní stimuly vedou APC k produkci IFNγ, nicméně předpokládá se úloha cytokinů IL-12 a IL-23[65]. Obecně lze říci, že intenzita produkce IFNγ makrofágy a dendritickými buňkami nedosahuje úrovně Th1 T lymfocytů a tudíž nemá tak komplexní imunomodulační efekty, slouží tedy spíše k podpoře vzájemné komunikace mezi zúčastněnými buňkami. Kooperace

mezi T lymfocyty a APC se opírá dále o působení IL-18. Již dlouhou dobu bylo pozorováno, že má IL-18 synergický účinek s IL-12 a posiluje tak jeho modulační vliv na naivní T lymfocyty. Následně bylo prokázáno, že tento cytokin brání poklesu exprese receptoru pro IL-12, ke kterému fyziologicky u vyvíjejících se T lymfocytů směrem k Th1 subsetu dochází[131]. Zajímavé jsou rovněž poznatky ohledně imunomodulačního působení NO. Bylo prokázáno, že malé množství tohoto mediátoru produkované např. infikovanými makrofágy vede podobně jako u IL-18 ke stimulaci exprese receptoru pro IL-12 na povrchu Th lymfocytů. Mechanismus je pravděpodobně závislý na aktivaci solubilní guanylát cyklázy (viz. výše)[131]. I tato jednoduchá molekula tak může sehrávat důležitou úlohu v mimořádně složitých vztazích mezi buňkami imunitního systému. Role IFNγ v regulaci imunitních reakcí je znázorněna na obr. 9.

Obr. 9: Role IFNγ v regulaci imunitních reakcí (upraveno dle Teixeira et al.[180])



Na komplexní reakci na infekci intracelulárním parazitem se podílejí dále i cytotoxické T lymfocyty a to zejména v případě, že byly stimulovány IFNγ a IL-2 produkovaným buňkami Th1. Na rozdíl od pomocných Th lymfocytů mají tyto buňky vytvořen aparát, pomocí kterého jsou schopny napadené buňky přímo zničit. Jejich praktický význam v boji proti intracelulárním parazitům byl opakovaně experimentálně dokázán již před více než desíti lety. Na pokusech s myším modelem infekce intracelulárními parazity bylo patrné, že myši bez funkčních cytotoxických T lymfocytů velmi rychle podléhaly letálnímu průběhu infekce[175]. Později byl vysvětlen i mechanismus cytotoxického působení. Opírá se jednak o interakci povrchových molekul FasL s receptory Fas na terčových buňkách a dále o produkci solubilních serinových proteáz (granzymů), které po vytvoření póru v cílové buňce molekulami perforinů vstupují do její cytoplazmy a aktivují kaspázovou kaskádu s následnou smrtí infikované buňky apoptózou[17;29;137]. Uvedený mechanismus je popsán v kapitole o apoptotických mechanismech 2.4.2.4.

Posledním subsetem T lymfocytů, které se spolupodílejí na efektivní eliminaci infekce, jsou atypické T lymfocyty exprimující na svém povrchu povrchový receptor TcRγδ. Tento subtyp lymfocytů se vyznačuje většinou absencí CD4 i CD8 na svém povrchu a výjimečnými vlastnostmi. Jejich receptor pro antigeny TcRγδ totiž interaguje s antigeny prezentovanými ve spojení s molekulou CD1 (na rozdíl od klasické HLA restrikce u Th a Tc lymfocytů). Navíc je díky jiné konformaci schopen vázat antigeny lipidového charakteru. Jejich skutečný praktický význam není zcela jasný, nicméně byly opakovaně prokázány ve vyšších procentech u myších modelů infekce intracelulárně parazitickými bakteriemi a u lidí[58].

2.4.4.2. B lymfocyty

Podle klasického konceptu protektivní imunity proti intracelulárním parazitům představují B lymfocyty s produkcí specifických protilátek pravděpodobně jen vedlejší roli. (Uvedený koncept buněčné a humorální imunity má kořeny již v pracech Mečnikova a Ehrlicha). Funkce B lymfocytů je pod vedením Th2 subsetu pomocných T lymfocytů a zdá se, že byť jsou po infekci často dlouhodobě přítomny specifické protilátky ve třídě IgG, nejsou tyto dostatečně protektivní proti reinfekci, zejména plně virulentními kmeny. V některých situacích dokonce mohou působit zcela kontraproduktivně, což bylo prokázáno např. u infekce *Leishmania*[126]. Důvodem selhání specifických protilátek je pravděpodobně fakt, že intracelulárně lokalizovaní parazité jsou od jejich působení dostatečně izolovány.

Oproti tomu se však v poslední době množí informace o jiných typech infekcí intracelulárními parazity, pro něž se zdá být protilátková produkce dostatečně protektivní (např. rody *Bartonella, Brucella* či *Ehrlichia*)[27] a tak skutečný význam produkce specifických imunoglobulinů v souvislosti s uvedenými typy infekcí musí být ještě podroben důkladné revizi. Obecně lze říci, že hlavní rolí produkovaných protilátek je opsonizace invadujících mikrobů spojená s jejich následnou fagocytózou či s aktivací komplementu. Interakcí s povrchovými strukturami mikrobů rovněž brání v jejich vstupu do hostitelských buněk.

2.4.5. Mechanismy překonání obranných funkcí hostitele obecně

Během více než miliardy let společné existence prokaryotních a eukaryotních organismů, včetně fenoménu intracelulárního parazitizmu, se vyvinulo nepřeberné množství mechanismů, jež bakterie využívají ve svůj prospěch v rámci osídlování nových prostor a získávání nových životních zdrojů. Vliv evoluce je v tomto ohledu bilaterální. Vzájemná

interakce vedla k selekčnímu tlaku jak na hostitele, tak na parazitující mikroorganismy a logicky i k vývoji efektivních způsobů obrany. Jak je schopen se vypořádat s infekcí hostitelský organismus bylo předmětem předchozích kapitol. Nyní se zaměříme na některé klíčové mechanismy bakteriální.

Již Paul Ehrlich ve své přednášce při udělování Nobelových cen v prosinci roku 1908 poukazoval na zvláštní jev „ztrácení receptorů" u afrických parazitů rodu *Trypanosoma*. Svými pozorováními nastartoval mnohaletou snahu imunologů a mikrobiologů o pochopení mikrobiálních mechanismů k překonání protektivní imunity. V dnešní době již existuje poměrně ucelená představa o možných bakteriálních způsobech obrany, které jsou u různých rodů nasměrovány proti odlišným složkám imunity hostitele. Mezi nejtypičtější se řadí např. změny povrchové výbavy bakterií vedoucí k selhání rozpoznávání, stimulaci a následně i fagocytózy profesionálními fagocyty. Bakterie, které již byly pohlceny, mohou zabránit vyzrávání fagozómu, vzniku fagolysozómu či z fagozómu unikají. Jsou schopny interferovat s nitrobuněčnými signálními drahami a bránit tak efektivnímu zabíjení či přímo indukovat apoptózu nebo pyroptózu. Selhání indukce specifické imunitní odpovědi může souviset se schopností bakterií zabránit zjejich zpracování a prezentaci patogenních antigenů na povrchu APC. Nakonec velký mutagenní potenciál znesnadňuje případou specifickou imunitní odpověď[48;49;160;161]. Některé stěžejní poznatky shrnuje tabulka 4.

Tab. 4: Interakce mezi imunitním systémem a intracelulárním parazitem (upraveno dle Schmid-Hempela[161])

Fáze obrany	Přirozená odpověď	Časná indukovaná odpověď	Adaptivní odpověď	Imunitní paměť
Čas	minuty	hodiny	dny - týdny	měsíce - roky
Reakce hostitele	Identifikace, fagocytóza, aktivace komplementu, uvolnění nekterých cytokinů a biologicky účinných substrátů (např. NO)	Uvolnění cytokinů, infiltrace tkání buňkami zánětu, diferenciace efektorových buněk, reakce akutní fáze, uvolnění TNFα	Transport antigenu do lymfatických uzlin, rozpoznávání T a B lymfocyty, klonální expanze, produkce protilátek	Vytvoření B a T lymfocytární paměti
Reakce mikroba	Zabránění rozpoznání změnou povrchových struktur, blokáda komplementu a činnosti neutrofilů, blokáda vyzrávání fagozómu	Blokáda zánětu, interference se signální sítí, degradace antimikrobiálních peptidů, manipulace s vakuolami a cytoskeletem fagocytů, indukce apoptózy	Blokáda NK buněk, indukce apoptózy, interference se signálními sítěmi, interference se zpracováním a prezentací antigenů, interference s maturací lymfocytů	Změna identity, antigenní variace

2.5. Průběh primární infekce *Francisella tularensis*

Obecný úvod věnovaný některým stěžejním parametrům vzájemné interakce mezi hostitelskou buňkou a intracelulárním parazitem bude nyní využit k lepšímu pochopení klíčových faktorů virulence *F.t.* Podobně jako v předchozí kapitole by bylo možné krok za krokem analyzovat aktivity celého imunitního systému hostitelského organismu. Zaměříme se nyní pouze na průběh primární infekce, t.j. období od prvního kontaktu bakterie s hostitelským makrofágem až do jeho smrti. Další šíření infekce do okolí je pak doprovázeno zpravidla indukcí specifické imunity s rozvojem sekundární imunitní odpovědi.

Doposud není přesně známo, které povrchové receptory makrofágů zprostředkovávají iniciální interakci s *F.t.* Předpokládá se však, že klíčovou úlohu sehrávají povrchové receptory TLR 2[2;39;94;111]. Některé práce rovněž poukazují na význam receptorů pro komplement CR3 a CR4[5] a receptor pro manózu[163], nicméně jejich role je nejasná. Je zajímavé, že přestože je *F.t.* gram-negativním patogenem, jehož vnější membrána obsahuje LPS, bylo opakovaně prokázáno, že tato molekula má u *F.t.* strukturální odlišnosti[73], díky kterým reaguje s TLR 4 (hlavním receptorem pro LPS) jen minimálně a pro jiné agonisty receptoru TLR 4 nepůsobí kompetitivně[53;75]. V kontrastu k uvedené skutečnosti, některé stresové proteny *F.t.* (např. DnaK), indukují cytokinovou odpověď závislou na TLR 4 a adaptorových proteinech MyD88 a zejména TRIF[4].

Po vazbě *F.t.* na zmiňovaný receptor TLR 2 (pravděpodobně hlavní senzor hostitelské buňky pro *F.t.*, viz. výše) byla pozorována aktivace signální dráhy NFκB a to prostřednictvím adaptorového proteinu MyD88[40]. Předpokládá se spoluúčast i jiných adaptorů (např. TIRAP), které však nejsou v buněčné signalizaci nezastupitelné[38]. Na straně *F.t.* se se na kontaktu s hostitelskou buňkou spolupodílí adheziny, byly popsány i povrchové pili spojené se sekrečními systémy bakterie (pili typu IV, sekreční systém typu II a VI)[117;195].

V poměrně rychlém sledu po kontaktu *F.t.* s fagocyty dochází k její fagocytóze. Ultramikroskopické studie demonstrovaly, že celý proces probíhá velmi netradičním a z morfologického hlediska ojedinělým způsobem, označovaným jako tzv. „looping phagocytosis“. Tento typ fagocytózy je popisován jako vytváření asymetrických panožek, které z jedné strany ohraničí *F.t.* s následným uzavřením do fagozómu Z časového hlediska je iniciace fagocytózy otázkou řádově minut a její průběh je závislý na přítomnosti fosfatidyl inositolu 3 (PI3), který je kinázou PI3K fosforylován s následnou přestavbou některých cytoskeletálních struktur, zejména aktinu[32;34].

Vzniklý fagozóm podléhá maturačním dějům, při kterých se mění jeho struktura a receptorová výbava. Zrající fagozómy postupně exprimují na svém povrchu některé molekulární markery, jako např. Rab proteiny, EEA 1 (early endosomal antigen) a u pozdních stádií LAMP 1 a 2. Fagolysozómy jsou definovány povrchovým výskytem katepsinu D (viz. výše, kapitola 2.4.2.1.). V případě infekce *F.t.* bylo s využitím fluorescenční mikroskopie prokázáno, že během 15ti minut exprimuje většina fagozómů obsahujících živou či mrtvou *F.t.* první z popisovaných antigenů – EEA 1. Jeho exprese klesá asi během 60ti minut, kdy se postupně na fagozomálním povrchu (v důsledku interakcí s endozómy) objevují molekuly LAMP 1 a LAMP 2 (maximum asi za 2-4 hodiny po prvním kontaktu). Do tohoto okamžiku nebylo rozhodující, zda pohlcená *F.t.* stále žije. Nyní se však již objevují první rozdíly mezi osudem živých a mrtvých mikrobů. Zatímco fagozómy s mrtvými *F.t.* po čase exprimují na svých površích i katepsin D (došlo tedy k vzniku fagolysozómu) a jsou postupně acidifikovány, živé bakterie jsou tomuto osudu schopny zabránit. Zrání fagozómu v této fázi zastavují a nedochází ani k jeho acidifikaci. Navíc bylo zjištěno, že během 16ti hodin od prvního kontaktu se méně než 15% všech intracelulárních mikrobů vyskytuje uvnitř fagozómů, takže je zřejmé, že nevyzrálý fagozóm opouštějí a vstupují do volné cytoplazmy hostitelské buňky. Mechanismus úniku *F.t.* z fagozómu není zcela jasný. Ultramikroskopické studie ukázaly, že zánik fagozómu má opět charakteristické strukturální vlastnosti. Již krátce po infekci získává 25-50% fagozómů denzní plášť z fibrilárního materiálu o tloušťce 25-34 nm. Tato povrchová vrstva se však záhy začíná rozrušovat, fagozómy vytváří na svém povrchu puchýřky a vezikulky a následně dochází k jeho lýze. Zatímco je do 90 min. od prvního kontaktu 80-90% všech bakterií uvnitř fagozómů, klesá tento poměr během 6 hod. na 50% a během 16ti hodin dokonce na 15% (viz. výše)[32;33;69;123;156].

Jakmile se *F.t.* ocitá volně v cytoplazmě, nestojí již nic v cestě její interakci se specifickými signálními drahami. Jeden z efektů intracytoplazmatického výskytu *F.t.* je aktivace inflamazómu a kaspázy 1 s následnou produkcí IL-1β a IL-18[68]. Principy sestavení inflamazómu byly popsány v kapitole 2.4.2.2.2. Přestože bylo sestavení a aktivace inflamazómu v souvislosti s infekcí *F.t.* opakovaně dokladováno, konkrétní receptorový peptid z rodiny NLR není doposud znám[79;111;121;189]. Detailní analýza podmínek aktivace inflamazómu odhalila, že jeho aktivace a další signalizace je závislá na aktivitě transkripčního faktoru IRF 3 (transkripční faktor, který může být m.j. aktivován signální dráhou TLR/TIRAM/TRIF/IRF 3). Jeho kódující gen spadá pod regulační oblast ISRE/GAS ovládanou transkripčním faktorem STAT 1, čili je pozitivně regulován IFNγ. Mezi jeho transkripční produkty patří m.j. i IFNα a β[189]. Aktivace inflamazómu je následována nejen

zvýšenou produkcí prozánětlivých cytokinů, ale i atypickou programovanou buněčnou smrtí (pyroptózou - někdy už do šesti hodin), jejíž nástup je zpravidla výrazně urychlen přidáním agonistů TLR (např. LPS), které zvyšují intracytoplazmatické hladiny pro-IL-1β a zároveň aktivují transkripční faktor IRF 3[78].

V kontrastu s výše uvedenými daty však existují důkazy, že intracytoplazmaticky se vyskytující *F.t.* během 24-48 hodin indukuje cytopatogenní změny kompatibilní se smrtí apoptózou (jak již bylo zmíněno výše, základní charakteristiky apoptózy jsou v přímém rozporu s povahou pyroptózy, apoptóza ve své podstatě působí protizánětlivě). Jejím spouštěcím momentem je pravděpodobně narušení integrity mitochondriálních membrán s následným uvolněním cytochromu c a aktivací kaspázy 9 a 3[103-105]. Některé recentní práce rovněž dokumentují zvýšení exprese Fas infikovanými buňkami v přímé souvislosti s únikem *F.t.* do buněčného cytosolu[147]. Jedna studie dokonce prokázala, že indukce apoptózy je závislá na fosforylaci ERK 1/2[86]. Mechanismy aktivace apoptózy jsou tedy pravděpodobně závislé jak na indukci výše zmíněných kaspáz 3 a 9, tak na zásahu do signalizačních kaskád MAPK. Telepnev et al.[181;182] navíc prokázal, že infekce *F.t.* interaguje jak se signální dráhou MAPK (c-Jun a p38), tak NFκB již během první hodiny infekce. Brání tak aktivaci infikovaných makrofágů včetně následné produkce prozánětových cytokinů, jako IL-1 a TNFα, což ve své podstatě ještě více přispívá nejen k anergii infikovaných buněk, ale i k jejich vnímavosti vůči proapoptotickým stimulům.

Při výčtu cytopatických změn infikovaných buněk je třeba vzpomenout i opakovaně pozorovaný fenomén opětovné cytosolové sekvestrace *F.t.* do autofagozómů. K uvedenému procesu tzv. autofágie dochází pravděpodobně v rámci snahy infikované buňky ohraničit bakterii zpět do uzavřeného prostoru a je jedním z průvodních jevů dalšího typu programované buněčné smrti (autofagická buněčná smrt). Tato forma programované buněčné smrti podobně jako apoptóza neindukuje zánětlivé změny, avšak je spojena s prezentací bakteriálních antigenů ve spojení s molekulami HLA II. třídy a dochází k ní cca po 24 hod. infekce[85]. Jak je vidět, jsou některé citované výsledky značně kontroverzní a bude jistě nezbytný další výzkum.

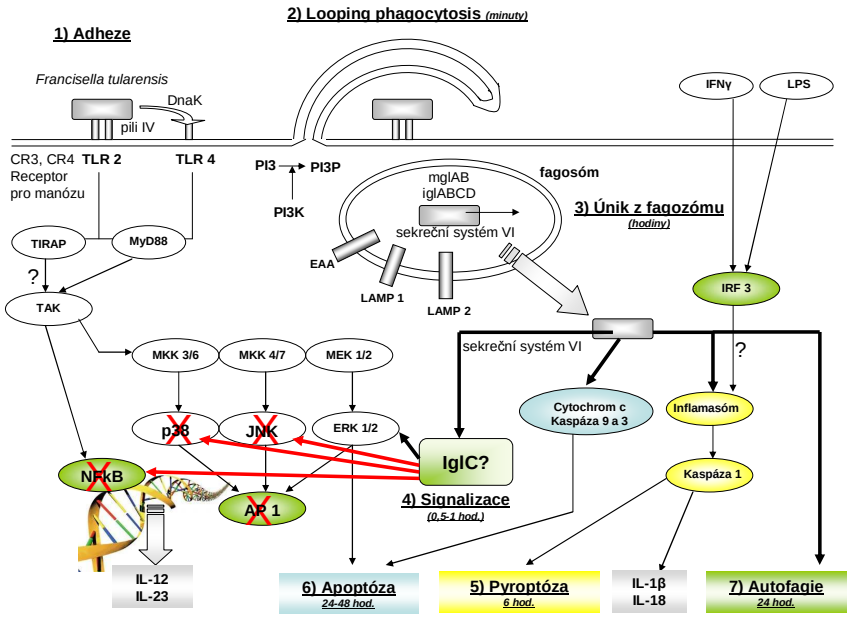
V průběhu primární infekce bylo dále opakovaně dokumentováno zvýšení produkce některých cytokinů infikovanými buňkami, např. IL-12 a IL-23, zejména po jejich stimulaci IFNγ. To může principiálně souviset (podobně jako indukce inflamazómu) se snahou infikovaných buněk vytvořit vhodné prostředí pro co nejlepší formu protekce a eliminace infekce, t.j. indukci vyzrávání Th0 lymfocytů směrem k Th1, ale pravděpodobně i k Th17[24;25;119]. Zároveň však existují důkazy o schopnosti *F.t.* aktivovat infikované makrofágy

alternativní cestou, která pravděpodobně prostřednictvím IL-4 a IL-23 moduluje specifickou imunitní reaktivitu směrem k Th2 subsetu se současnou inhibicí protektivních Th1 lymfocytů[167]. Na uvedeném účinku se podílí mimo jiné i opakovaně popsaná produkce PGE_2[191;193;194]. Otázka komplexního imunomodulačního vlivu infekce *F.t.* na hostitele je stále plna nejasností.

Na pozadí uvedených mechanismů stojí dnes již dobře zmapované oblasti genomu *F.t.*, označované jako ostrovy patogenity. Jako klíčové se jeví dva bakteriální operony, mglAB (macrophage growth locus) a iglABCD (intracellular growth locus). Předpokládá se, že oblast mglAB kóduje dva proteiny (MglA a MglB), které mají pravděpodobně funkci regulátorů genové exprese[18;108]. Funkce čtyř proteinů kódovaných v oblasti iglABCD je nejasná. Zvláštní pozornost si zaslouží protein IglC, 23kDa protein, ketrý nemá homologii v bakteriálním světě a byl proto označen jako hypotetický protein[110]. Bylo dokumentováno, že mutantní kmeny *F. novicida* s deletovaným genem iglC nejsou schopny proliferace v myších makrofázích. Uvedený protein je pravděpodobně zodpovědný i za popisovanou interakci *F.t.* se signálními drahami hostitelských buněk[181]. Další ostrovy patogenity se mohou spolupodílet na utváření sekrečního systému typu VI[117] či povrchových pilusů IV. typu[195].

Evoluční vývoj tedy obdařil *F.t.* celou řadou velmi účinných mechanismů, kterými je schopna zabránit lokální a generalizované zánětlivé reakci hostitele a tím i její následné eliminaci. Používá k tomu jak změny povrchových molekul (např. LPS), tak produkci řady biologicky aktivních proteinů, které brání v maturaci fagozómu, způsobují jeho lýzu a následně zasahují do nitrobuněčné signalizace. Díky ovlivnění cytokinové produkce infikovaných makrofágů navíc může zasahovat do regulace imunitní odpovědi jako takové. Schematicky jsou faktory virulence a mechanismy interakce *F.t.* s makrofágem znázorněny na obr.10.

Obr. 10: Interakce *F.t.* s hostitelskou buňkou (popis v textu)



2.6. Závěr k teoretické části

Intenzivní výzkum na poli bakteriologie, molekulární biologie a genetiky přinesl v posledních letech enormní množství informací o imunopatogenezi infekce *F.t.* I přes vyvinuté úsilí stále zůstává mnoho nevysvětleného. Jsou to zejména otázky úniku bakterie z fagozómu či její interakce se zánětlivou aktivací hostitelova imunitního systému. Stejně tak lze považovat za pouze dílčí úspěchy vytvoření některých subjednotkových vakcín (obsahujících např. složky LPS *F.t.*), které však doposud nepřinášejí kompletní protekci očkované osoby. V tomto ohledu zbývá ještě mnoho nejasností, k jejimž objasnění bude potřeby odvést ještě mnoho práce.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Problematika detekce aktivace makrofágů a její praktické využití

V poslední době přibývají situace, kdy má již vyšetření funkčního stavu buněk imunitního systému praktický a klinický význam. Typickým příkladem, kdy uvedený přístup přináší nezbytné informace, je test aktivace basofilů u pacientů s alergickým onemocněním. Ukazuje se, že funkční vyšetření v tomto ohledu poskytuje senzitivnější informaci o reaktivitě imunitního systému, než pouze vyšetření specifických IgE či prick testy[54]. Jinou situací, kdy může analýza funkčního stavu buněk mononukleárních leukocytů přinést důležité informace, je např. systémová zánětlivá odpověď imunitního systému jako součást syndromu SIRS[16;83;184]. Podstatou uvedených vyšetření je sledování specifických biomarkerů (bílkovinných molekul), jejichž exprese je typicky asociována s aktivací (nebo obecně změnou funkčního stavu) konkrétních buněk. Aby jakýkoli funkční test přinášel užitečné informace, je třeba vždy zodpovědět dvě základní otázky: 1) jaké markery vyšetřovat a 2) kdy, jak a za jakých okolností měření provádět. Důvodem je fakt, že všechny popisované fenotypové změny mají velmi dynamický a na čase závislý průběh. (Ke změnám funkčního stavu buněk dochází daleko rychleji než ke změnám v sérových koncentrací specifických markerů zánětu.)

Abychom mohli v *in vitro* podmínkách studovat funkční stav buněk monocyto-makrofágové linie v průběhu primární infekce, bylo nezbytné nejprve vytvořit a detailně popsat biologický model. To znamená protokolárním způsobem nastavit parametry průběhu laboratorní infekce či stimulace tak, aby změny co nejvíce kopírovaly skutečnost a zároveň byly reprodukovatelné. Bylo nezbytné stanovit koncentrace stimulačních reagencií s přihlédnutím na jejich toxicitu a biologickou účinnost. Dále zvolit nejvhodnější markery k detailnější analýze, které by splňovaly následující podmínky: 1) dochází k změně jejich exprese repetitivně a zcela charakteristickým způsobem s ohledem na vnější podmínky, 2) je možné je snadno měřit a výsledky hodnotit.

Výsledkem uvedené snahy bylo definování námi dále sledovaných povrchových markerů exprimovaných buňkami monocyto-makrofágové linie v průběhu jejich infekce či stimulace, a to molekul CD54, CD16/32 a CD86. Uvedené molekuly byly měřeny kvantitativně (síla exprese) pomocí průtokové cytometrie v průběhu opakovaných měření za standardizovaných podmínek. Funkční stav buněk byl dále analyzován pomocí kvantitativního stanovení produkce NO měřeném v buněčném supernatantu a korelován s přežíváním bakterií po lýze hostitelských buněk. Studie tedy měla smíšený design, byla hodnocena jak opakovaná, tak nezávislá měření (viz. též kap. 1.3. a kap. 3.10.)

3.1.1. Praktické využití průtokové cytometrie

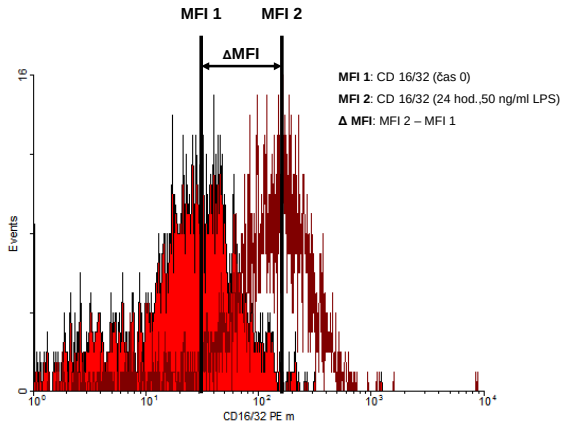
Imunofluorescenční analýza na průtokovém cytometru je instrumentální vyšetřovací metoda, založená na měření řady fyzikálních a chemických charakteristik jednotlivých elementů v analyzovaném vzorku současně. Rozvoj průtokové cytometrie se datuje od 70. let 20. století a byl umožněn pokroky v oblasti laserové technologie, počítačové techniky, specifických monoklonálních protilátek a fluorescenčních barviv. Při analýze pomocí průtokového cytometru jsou jednotlivé elementy ze vzorku hydrodynamicky usměrněny (hydrodynamická fokusace) tak, že postupně procházejí laserovým paprskem definované konstantní vlnové délky (u jednolaserových přístrojů 488nm). Při tomto průchodu jsou snímány parametry související s rozptylem a odrazem světelného záření laseru analyzovanými elementy (světelné záření o stejné vlnové délce jako má zdroj). Jedná se o parametry FSC (forward light scatter, rozptyl světla v přímém směru, odpovídající velikosti elementů) a SSC (side light scatter, odraz světla v pravém úhlu, odpovídající granularitě elementů). Velkým rozšířením je možnost použití fluorescenčních barviv, konjugovaných s monoklonálními protilátkami. Tato barviva po osvícení laserem excitují a následně emitují fluorescenční záření (světelné záření o větší vlnové délce, než má světlo zdroje) které je snímáno dalšími senzory a vyhodnocováno jako parametr FL 1-4 (podle počtu použitých barviv).

Fluorescenčním barvivem může být v podstatě jakákoli komplexní molekula obsahující ve své struktuře několik benzenových jader, které díky své prostorové konformaci umožňují excitaci elektronů po ozáření laserovým paprskem o specifické vlnové délce (488nm). Excitované eletrony mají tendenci se následně vracet na svou původní energetickou hladinu, při čemž je uvolňována energie v podobě fluorescenčního záření. Díky konsumpci energie však emitované fotony mají vždy menší energii, než fotony excitační a proto má fluorescenční záření delší vlnovou délku. Díky tomu je s použitím filtrů a senzorů PMT (photo multiplier tube) toto záření odlišitelné od záření zdroje. Mezi nejčastěji používané fluorescenční barviva (fluorochromy) se řadí FITC (fluorescein isothiokyanát s excitačním maximem 488 nm a emisním maximem 530 nm) či fluorochromem PE (phycoerythrin s excitačním maximem 488 nm a emisním maximem 580 nm). Pokud je fluorochrom konjugován s monoklonální protilátkou specificky vázající analyzovanou buněčnou strukturu, získáme velmi jednoduchý a přesný analytický systém. Uvedenou technikou je možné významně zvýšit výtěžnost měření. V současné době existuje velké množství komerčně dodávaných monoklonálních protilátek přímo konjugovaných s fluorescenčním barvivem.

Veškeré parametry a údaje o o vyšetřovaných buňkách (t.j. FCS, SSC a fluorescenční signály dle použitých fluorescenčních barviv FL1 - FL4) jsou simultánně zaznamenávány a analyzovány.

Průtokově-cytometrická analýza tedy v reálném čase generuje velké množství hodnot přiřazených k jednotlivým měřeným elementům, odpovídajících změně napětí na příslušných senzorech. Každý element (buňka) tak má v paměti počítače přiřazenu hodnotu FSC, SS a FL1-FL4. Analogová změna napětí je dále digitalizována do 1024 stupňové digitální škály (2^{10}), tyto hodnoty jsou zobrazovány formou grafů (bodových dot plotů nebo histogramů) a tabulek popisujících základní statistické parametry měřeného vzorku (jako je průměr aritmetický, geometrický, směrodatná odchylka apod.). Interpretace výsledků při měření fluorescence může být v zásadě dvojí: buď je hodnoceno procento buněk, u nichž je fluorescence vyšší než u negativní kontroly nebo je hodnocena průměrná fluorescence (MFI - mean fluorescence index) či její změna (ΔMFI) ve srovnání se vstupním vyšetřením. V naší práci jsme používali druhý přístup (viz. obr. 11)

Obr. 11: Odečet průměrné fluorescence buněk v jednotlivých fázích stimulace



Mezi hlavní výhody průtokové cytometrie patří rychlost, přesnost a objektivita provedených měření. V krátkém časovém horizontu po přípravě materiálu je možno analyzovat velké množství elementů a jejich parametrů a to při minimální spotřebě reagencií. S uvedenými výhodami souvisejí široké možnosti praktického využití. V našem případě bylo možné díky rychlosti metody provádět opakovaná vyšetření v pravidelných časových intervalech pro sledování dynamiky změn exprese sledovaných molekul a zvýšení výtěžnosti vyšetření. Určitými nevýhodami průtokové cytometrie jsou ovšem nemožnost vizuální (morfologické) analýzy, vysoké pořizovací náklady na průtokový cytometr a nutnost zázemí vyškoleného a zkušeného personálu.

3.1.2. Charakteristika zvolených povrchových znaků

3.1.2.1. Intracelulární adhezní molekula-I (CD54)

Molekula CD54 (ICAM-1; intercellular adhesion molecule 1) je adhezivní protein imunoglobulinové rodiny. Fyziologicky je přítomen na lymfocytech, endotelových buňkách, epiteliálních buňkách, makrofázích a dendritických buňkách. CD54 je ligandem dalších adhezivních molekul, LFA-1 (CD11a / CD18) a Mac-1 (CD11b / CD18). Exprese CD54 je charakteristicky zvýšena u buněk imunitního systému po jejich aktivaci, zejména cytokinové a pomocí LPS (spadá m.j. pod regulační oblast κB i ISRE/GAS). Zvýšení jeho exprese na neutrofilních granulocytech bylo pozorováno např. u pacientů v sepsi[128]. CD54 sehrává důležitou roli v mezibuněčných adhezích a signalizacích, což prokázaly pokusy na myších modelech s blokujícími monoklonálními protilátkami[173].

V našich měřeních byla použita komerčně dodávaná křeččí monoklonální protilátka třídy IgG1 κ proti myším molekulám CD54 (klon 3E2), přímo značená fluorescein isothiokyanátem (FITC), všechna měření byla prováděna s izotypovou negativní kontrolou.

3.1.2.2. Receptory pro Fc fragment IgG (CD16/32)

Monoklonální protilátka nasměrovaná proti CD16 a CD32 reaguje s nepolymorfním epitopem extracelulárních částí molekul CD16 (FcγRIII) a CD32 (FcγRII), tedy s receptory pro konstantní část molekuly IgG (gama řetězec). Předpokládá se, že může interagovat i s receptorem FcγRI (CD64). Exprese molekul CD16 a CD32 byla prokázána na NK buňkách, monocytech, makrofázích, v malé míře na dendritických buňkách, dále na granulocytech, mastocytech, B-lymfocytech a některých aktivovaných T-lymfocytech. Vzhledem k významné funkci v rámci interakce fagocytujících buněk s antigenem po jeho opsonizaci imunoglobuliny se předpokládá jeho zvýšená exprese po jejich aktivaci[12]. Geny pro tyto receptory jsou pravděpodobně pod dominantní regulací sekvencí κB. Vyšší hladiny exprese byly mimo jiné pozorovány i u pacientů se SIRS[83;172].

V naší práci byla použita krysí monoklonální protilátka třídy IgG2b (klon 2.4G2), přímo značená phycoerythrinem (PE). Měření byla opět prováděna s použitím izotypové negativní kontroly.

3.1.2.3. Kostimulační molekula CD86

Protein CD86 (B7-2) je jedním ze dvou zástupců proteinů B7 (druhým je molekula CD 80; B7-1), ligandů pro CD28 (kostimulační molekula přítomná na aktivovaných T-lymfocytech). CD86 je exprimován na různých buněčných typech, zejména antigen prezentujících buňkách, makrofázích a splenických dentritických buňkách a některých B-lymfocytech. Interakce mezi CD86 / CD28 je kritická v rámci indukce specifické imunitní odpovědi[166]. Předpokládá se zvýšení exprese u buněk stimulovaných v rámci indukce specifické imunitní odpovědi, což bylo prokázáno i v klinickém kontextu[129;132]. Gen pro CD86 spadá m.j. pod regulační oblast ISRE/GAS.

Pro naše analýzy byla použita krysí monoklonální protilátka třídy IgG2a (klon RMMP-1) přímo konjugovaná s phycoerythrinem (PE). Měření byla opět prováděna s využitím izotypové negativní kontroly.

3.1.3. Metodologické poznámky k detekci NO

K průkazu přítomnosti oxidu dusnatého (NO) v analyzovaném materiálu bylo vypracováno velké množství detekčních metod, které je možno z praktického hlediska rozdělit na metody přímé detekce (čili průkaz samotného NO - např. chemiluminiscenční metoda, elektrochemická metoda) a metody nepřímé detekce (průkaz metabolitů NO, zejm. dusitanů a dusičnanů - Griessova metoda, vznik methemoglobinu). Jednou z klíčových charakteristik každé metody, která určuje její potenciální využití, je detekční limit. Metody chemiluminiscenční a elektrochemické patří mezi nejcitlivější (jsou schopny detekovat řádově jednotky až stovky pM NO) ve srovnání s metodou dle Griesse (detekční limit se pohybuje kolem 5 μM).

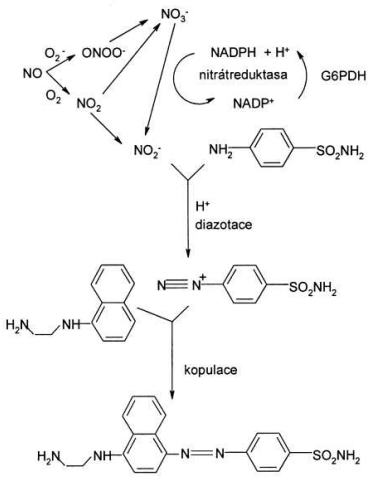
Principem chemiluminiscenční metody je měření luminiscenčního záření, t.j. světelného záření ve viditelné části spektra. V případě NO dochází k jeho reakci s ozónem za vzniku oxidu dusičitého v excitovaném stavu. Při návratu excitovaných molekul na základní hladinu dochází k emisi přebytečného záření ve formě světelného záření, jehož intenzita je úměrná koncentraci NO v analytu. Výhodou chemiluminiscenční metody je její velká citlivost, možnost detekovat přímo molekuly NO, nicméně nevýhodou je náročnost na přístrojové vybavení.

Elektrochemická analýza oproti tomu využívá principu galvanického článku. Součástí detektoru jsou dvě elektrody, jedna je měřící a druhá referenční. Na měřící elektrodě

odevzdávají molekuly NO elektrony za vzniku dusitanů a dusičnanů. Vzniklý elektrický proud je následně měřen amperometricky a jeho velikost je opět úměrná množství NO ve zkoumaném materiálu. Výhodou uvedené metodiky je její jednoduchost, vysoká přesnost a spolehlivost. Díky velké rychlosti je možné provádět kontinuální měření on-line. Nicméně i tato metoda vyžaduje speciální přístrojové vybavení v podobě detekční elektrody a měřícího zařízení.

Pro naše účely byla zvolena metoda nepřímého měření NO (tedy měření oxidačních produktů NO) podle Griesse. Její podstatou je spektrofotometrické stanovení přítomnosti dusitanů ve vyšetřovaném materiálu a to po diazotační reakci se sulfanilamidem a následné kopulaci s N-(1-naftyl) ethylendiaminem. Výsledný produkt je detekován v oblasti 540-550 nm. Vzhledem k možnosti ovlivnění výsledků analýzy přítomnými nitro skupinami proteinů, je nutné provést před samotnou analýzou deproteinaci materiálu, např. centrifugací při vysokých otáčkách nebo ultrafiltrací. Chemická podstata Griessovy reakce je znázorněna na obr. 12.

Obr. 12: Reakční mechanismus NO při Griessově reakci

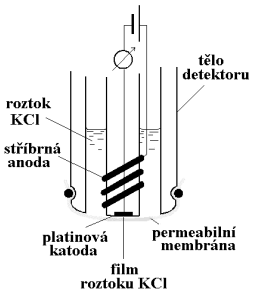
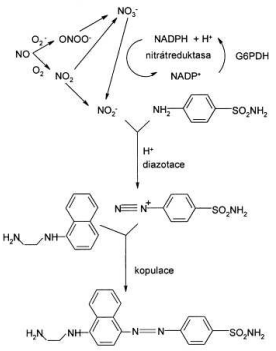


Griessova metoda sama o sobě stanovuje pouze dusitany. Vzhledem k chemické povaze NO a NO_2 tvořit dále dusičnany, je vhodné tyto nejprve redukovat na měřitelné dusitany. K tomu slouží enzym nitrát-reduktáza, kterou je možno použít ke zvýšení přesnosti měření. V našich pokusech byla použita pouze samotná Griessova reakce bez redukce dusičnanů, která byla podstatně méně pracná a časově náročná a výsledky byly srovnatelné.

Jednotlivé metody měření NO v analyzovaném vzorku včetně jejich předpokládaných detekčních limitů jsou znázorněny v tabulce 5. Přehledně jsou metody detekce popsány např.

v práci Kupkové a Beneše[101]. O biologických účincích a významu stanovení NO v analytu bylo pojednáno v kapitole 2.4.2.3.

Tab. 5: Metody přímě a nepřímé detekce NO v materiálů a detekční limity

Detekce NO		
Přímá detekce		**Nepřímá detekce**
Chemiluminiscence	Elektrochemická detekce	Griessova reakce
$NO + O_3 \rightarrow NO_2^* + O_2$ $NO_2^* \rightarrow NO_2 + h\nu$		
640–3000 nm		Spektrofotometrie: 540 nm
Detekční limit: 1-2 pM	Detekční limit: 300 pM	Detekční limit: 5 μM

3.2. Použitý materiál

3.2.1. Reagencie, buňky a infekce

Myší monocyto-makrofágová buněčná linie J774.2 odvozená z BALB/C myší *(ECACC, No. 85011428). Francisella tularensis* LVS *(ATCC 29684, American Type, Culture Collection, Manasas, Va.*).

Kultivační médium pro myší buňky: Dulbecco´s MEM (modified Eagle's medium) s obsahem glutamátu (Glutamax-1) (*GIBCO, 31966021*) s 10% FBS (fetální bovinní sérum - *GIBCO*). Kultivace buněk probíhala v kultivační lahvích 50ml, 25cm^2 (*Techno plastic products*). Gentamicin (*Sigma-Aldrich Co., G1272* - roztok o koncentraci 10 mg/ml v deionizované vodě, sterilně filtrován, testován na buněčných kulturách), v koncentraci pro použití při kultivaci buněk 5 ml/l.

Kultivační plotny pro *Francisella tularensis* LVS: McLeodův agar připravovaný za sterilních podmínek v laboratoři Ústavu klinické mikrobiologie FN HK, obsahující bovinní hemoglobin.

Lipopolysacharid z *E.coli (055:B5, Sigma-Aldrich Co., L2880)* a rekombinantní myší Interferon-γ *(Sigma-Aldrich Co., I4777).*

Monoklonální protilátky přímo konjugované s FITC a PE: CD86 *(PE, Immunotech)*, CD54 *(FITC, BD Pharmingen)*, CD16/32 *(PE, BD Pharmingen)*.

Griessovo reagens (*Sigma-Aldrich, G4410*) pro měření produkce NO.

Roztok fosfátového pufru PBS (NaCl 7,75g; K_2HPO_4 1,50g; KH_2PO_4 0,20g v 1 l dest. vody), propidium jodid *(Sigma-Aldrich Co., 81845*).

3.2.2. Přístrojové vybavení

Průtokový cytometr FACSCalibur (*Becton Dickinson, San Jose, USA, software Cell QuestTM ver. 3.3*), imunofluorescenční mikroskop Zeiss Axioskope 2 plus (*Carl Zeiss Vision Gmbh, Hallbergmoos, Germany*). ELISA reader MULTISKAN RC (*Thermo Scientific*), Laminární box Jouan, typ MSC.9 (*Thermo Scientific*), CO_2 inkubátor Heraeus (*Thermo Scientific*), centrifuga Allegra X-22 *(Beckman-Coulter)*. Statistická analýza byla prováděna pomocí programů MedCalc (ver. 5.00.017) a SPSS Statistics (ver. 17.0).

3.3. Časový protokol pokusů, prováděná měření v jednotlivých intervalech

Všechny pokusy měly smíšený design, t.j. byly analyzovány jak parametry jednotlivých buněčných populací opakovaně v pravidelných časových intervalech (opakovaná měření, within subjects effects), tak nezávisle na různých populacích při vytvoření odlišných podmínek (nezávislá měření, between subjects effects). Opakovaná měření byla prováděna v čase 0, dále v čase 3 hod., 6 hod., 9 hod., 12 hod. a 24 hod. V každém intervalu byly hodnoceny počty myších buněk, jejich životnost a přežívání bakterií, průtokově cytometrická analýza vybraných povrchových znaků myších buněk, fluorescenčně mikroskopická analýza pro optickou verifikaci a měření produkce NO v supernatantu.

Vzhledem k tomu, že v rámci nezávislých měření byl hodnocen efekt infekce a stimulace, byla navržena čtyři různá modelová schémata pro infekci a stimulaci. Jednak samotná stimulace neinfikovaných buněk, samotná infekce nestimulovaných buněk a dále infekce buněk po třech hodinách stimulace a nakonec stimulace buněk po třech hodinách kontaktu s infekcí. Čas 0 v případě smíšených pokusů byl stanoven vždy na okamžik, kdy byly v systému přítomny obě komponenty, tedy jak infekce, tak stimulace. Pro každou modelovou situaci byly vyhodnoceny minimálně tři pokusy, celkem bylo tedy provedeno 60 nezávislých pokusů. Statistické analýzy byly prováděny jak u celého souboru dat, tak separovaně na jednotlivých časových modelech pro ozřejmění specifických interakcí faktorů.

3.4. Metodika kultivace buněk před zahájením pokusu

Buňky myší monocyto-makrofágové linie J774.2 byly 48 hod. před zahájením pokusu nasazovány do kultivačních lahví s kultivačním médiem Dulbecco´s MEM s glutamátem a 10% fetálního bovinního séra bez gentamicinu. Koncentrace nasazovaných buněk do kultivační láhve byla $2x10^6$ na 10 ml média. Buňky byly následně kultivovány 48 hod. v inkubátoru při 37°C v 5% atmosféře CO_2.

3.5. Infekce buněk

Po 48 hodinové kultivaci buněk v mediu bez gentamicinu (a případně po dalších třech hodinách stimulace, viz. kap. 3.6.) byla přidána *F. tularensis* LVS kultivovaná 24 h při 36,6°C na Mc Leodově agaru. Počty bakterií byly stanovovány podle optických vlastností jejich suspenze ve fosfátovém pufru (PBS). Optická denzita byla odečítána při 550 nm (OD_{550nm}) pomocí ELISA readeru. Multiplicita infekce byla nastavena na 1:100. Buněčná linie byla vystavena *F.tularensis* LVS v dané multiplicitě na 2 h při 37°C v 5% atmosféře CO_2 a následně resuspendována do média s gentamicinem na 1 h při 37°C v atmosféře 5% CO_2 a promyta médiem bez gentamicinu centrifugací (300g, 7 min). Takto připravené infikované buňky byly dále v průběhu pokusu kultivovány v médiu bez gentamicinu.

3.6. Stimulace buněk

Pro stimulaci buněk (neinfikovaných nebo infikovaných - t.j. 3 hod. po prvním kontaktu s infekcí, viz. kap. 3.5.) byl použit lipopolysacharid *E.coli* v koncentraci 10 a 50 ng/ml média a rekombinantní myší interferon-γ v koncentraci 100 a 1000 IU/ml média. Stimulační agens byla přidávána buď izolovaně (samotný LPS či IFNγ) nebo v kombinacích (LPS 10 ng/ml média + IFNγ 100 IU/ml média a LPS 50 ng/ml média + IFNγ 1000 IU/ml média). Všechna opakovaná a nezávislá měření byla prováděna podle výše uvedených časových protokolů (t.j. opakovaná měření v časech 0, 3, 6, 9 a 24 hod.) a podle modelových schémat infekce a stimulace (t.j. stimulace infikovaných buněk, infekce stimulovaných buněk, samotná stimulace či samotná infekce, viz. kap. 3.3.).

3.7. Sledování životnosti buněk a proliferace bakterií

V jednotlivých intervalech byly hodnoceny počty a životnost myších buněk. Počty buněk byly ověřovány manuálně pomocí optické mikoskopie suspenze v Bürkerově komůrce, jejich životnost byla analyzována za pomocí barvení 0,5% roztokem trypanové modři a průtokově cytometricky pomocí barvení propidium iodidem (50μg/ml PBS).

Stejně tak bylo hodnoceno v každém intervalu i přežívání bakterií. Infikované buňky byly 1x promyty ve fosfátovém pufru a dále resuspendovány do 1ml fosfátového pufru. Vzorky o objemu 100 μl byly vysety na McLeodův agar a následně 24 hod. kultivovány za standardních podmínek v 36,6°C. Poté byly počítány kolonie formující jednotky (CFU). Udávaná hodnota je dekadickým logaritmem počtu CFU (log_{10}CFU/ml).

3.8. Průtokově cytometrická analýza

Příprava materiálu pro průtokově cytometrickou analýzu probíhala dle standardního postupu. Do sady zkumavek (dle počtu vyšetřovaných znaků a kombinací) bylo rozpipetováno 50 μl suspenze buněk ($1x10^6$ buněk) ve fosfátovém pufru (PBS) a následně přidány monoklonální protilátky přímo konjugované s fluorescenčním barvivem (1 μg/$1x10^6$ buněk). Protilátky byly inkubovány s buňkami po dobu 30 min. při teplotě 2-8°C. Nenavázané protilátky byly odstraněny promytím buněk v PBS a opakovanou centrifugací (200g, 3 min), celkem 3x. Připravený materiál byl následně analyzován průtokovým cytometrem, minimální počet analyzovaných buněk byl stanoven na 2000. Hodnocena byla průměrná intenzita fluorescence sledovaných buněk (MFI - mean fluorescence index) a její relativní změna ve srovnání s hodnotou v čase 0.

3.9. Měření produkce NO v supernatantu

Stanovení oxidu dusnatého (NO) ve formě oxidačního produktu (dusitanů - NO_2^-) v buněčných supernatantech bylo provedeno Griessovou metodou. Vzorky supernatantu buněk v jednotlivých časových intervalech byly nejprve deproteinizovány (centrifugací při 16 000g, 15 min) a následně inkubovány 30 minut s Griessovým reagens v poměru 1/1 (150 μl / 150 μl) při laboratorní teplotě na mikrotitrační destičce. Výsledná změna barvy, úměrná množství NO_2^- aniontů byla objektivizována spektrofotometricky, změnou absorbance světla o vlnové délce 550 nm (OD_{550mn}) pomocí ELISA readeru. Při každém pokusu byla zkonstruována

kalibrační křivka (pomocí referenčních roztoků $NaNO_2$), umožňující výpočet koncentrace NO_2^- v materiálu v μM/l. Výsledná hodnota je udávána jako relativní vzestup ve srovnání s hodnotou v čase 0.

3.10. Metodologie statistického zpracování výsledků, obecný lineární model

Vzhledem ke smíšenému designu experimentální studie (nezávislá a opakovaná měření, viz. též kapitoly 1.3., 3.1. a 3.3.) je nejvhodnější komplexní analytická metoda smíšená faktoriální ANOVA konceptualizovaná spolu s mnohočetnou regresí do obecného lineárního modelu (GLM – general linear model). Výhodou uvedeného analytického přístupu je minimalizace elementárních početních kroků a s tím spojená redukce kumulované statistické chyby I. druhu (t.j. při opakovaných testech exponenciálně se zvyšující pravděpodobnost náhodného nálezu statistické významnosti v situacích, které jsou prakticky bez vzájemného vztahu - experiment-wise error)[82].

Pro získání validních výsledků GLM je nutné, aby analyzovaná data splňovala některé podmínky. Mezi nejdůležitější patří normální rozdělení (hodnocení šikmosti, strmosti, Kolmogorovův-Smirnovův (K-S) test), u nezávislých měření je pak nezbytná jejich stejnorozptylovost (homoskedasticita dat, testována Leveneovým testem či poměr největšího a nejmenšího rozptylu musí být < 2) a u opakovaných měření symetrie rozptylů chyb (sféricita, testována Mauchlyho testem).

Je-li narušena podmínka sféricity dat (signifikantní Mauchlyho test), jsou aplikovány korekce epsilon upravující výsledek do akceptovatelné a zobecnitelné podoby. Principem uvedené korekce je redukce stupňů volnosti. V našem případě byla použita korekce epsilon dle Greenhouse a Geissera (je velmi konzervativní).

Každá analýza opakovaných měření je dále doplněna výpočtem jednoduchých kontrastů (srovnání všech měření s jedním referenčním), opakovaných kontrastů (porovnání vždy dvou po sobě následujících měření) a polynomiálních kontrastů (testují tendenci závislosti, t.j. lineární, kvadratickou, kubickou či vyššího řádu). U nezávislých měření jsou aplikovány post-hoc testy, nejčastěji test Tukey HSD a Bonferroniho test.

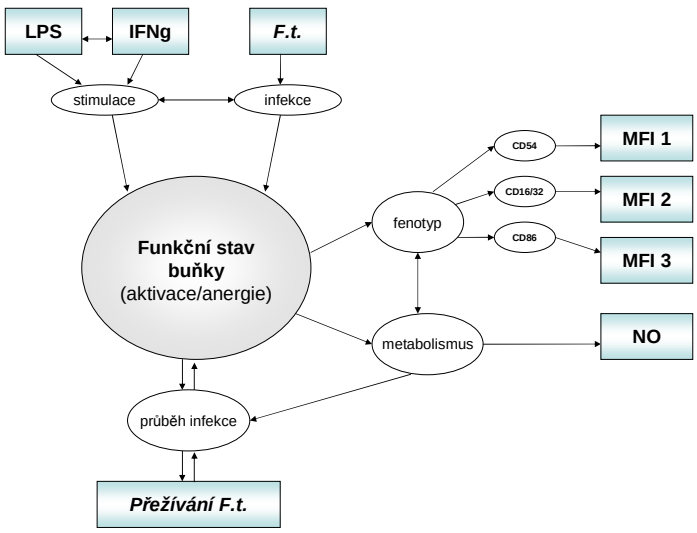
Komplexní výsledky popisující statistickou významnost jsou navíc doplněny standardizovanou velikostí efektu nezávisle proměnné na proměnnou závislou. V analýzách je používán zejména parametr partial eta squared (partial η^2), který je možné interpretovat (po vynásobení 100) jako procento unikátní variability závisle proměnné, které je vysvětleno nezávisle proměnnou[36].

Při výpočtech pravděpodobnosti eliminace infekce makrofágy byly aplikovány postupy logistické regrese. Hlavním výstupem pro jednotlivé faktory jsou hodnoty exp(B) (nebo e^B; či odds ratio), neboli kolikrát se zvýší šance (ODDS) eliminace infekce (pravděpodobnost eliminace / pravděpodobnost přežití) při zvýšení faktoru o jednotku. Velmi přehledným zdrojem informací o metodách aplikované statistiky je kniha A. Fielda[60].

Pro zjednodušení situace při statistické analýze je vhodné vztahy v analyzovaném souboru znázornit graficky (SEM – structural equation modelling). V následujícím schématu (obr. 13) jsou znázorněny nezávisle proměnné či prediktory (stimulace / infekce / vzájemný vztah vzhledem k časovému aspektu), latentní závisle proměnná (funkční stav buňky), tedy proměnná, kterou není možné měřit přímo a je k tomu třeba využít jiné parametry, v našem případě fenotyp (reprezentovaný konkrétními hodnotami MFI jednotlivých znaků v čase) a metabolismus buňky (hodnocená podle aktivity iNOS a produkce NO). Je zřejmé, že i mezi uvedenými závisle proměnnými existuje vzájemný vztah (minimálně lze předpokládat, že změny fenotypu korelují se změnami metabolickými). Funkční stav buňky je dále důležitým prediktorem průběhu infekce, na němž závisí i přežívání infekce *F.t.* LVS, které zpětně funkční stav buňky rovněž ovlivňuje. Vzhledem k nemožnosti přímo kvantifikovat stav aktivace hostitelské buňky, je možno k tomuto účelu použít parametry fenotypu a metabolické aktivity a predikovat tak osud infekce.

Statistická analýza byla prováděna pomocí programů MedCalc (ver. 5.00.017) a SPSS Statistics (ver. 17.0).

Obr. 13: Strukturální model pokusů pro statistickou analýzu

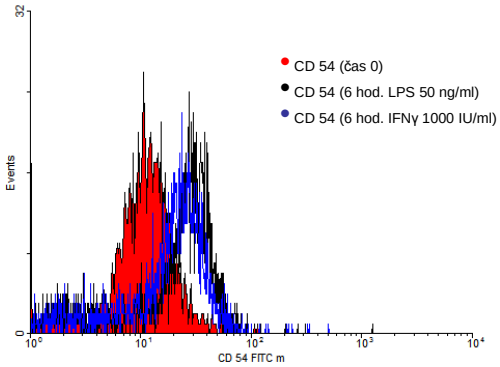


4. VÝSLEDKY

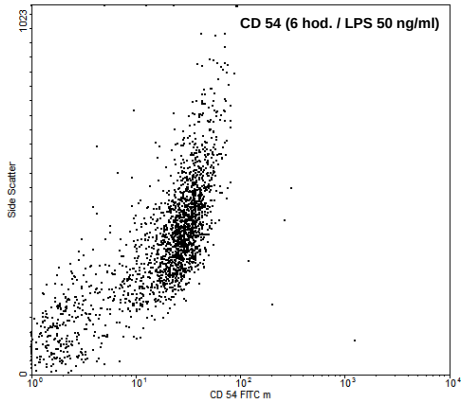
4.1. Příklady výstupů z cytometrické analýzy a fluorescenční mikroskopie

4.1.1. Exprese CD54

1) Histogram

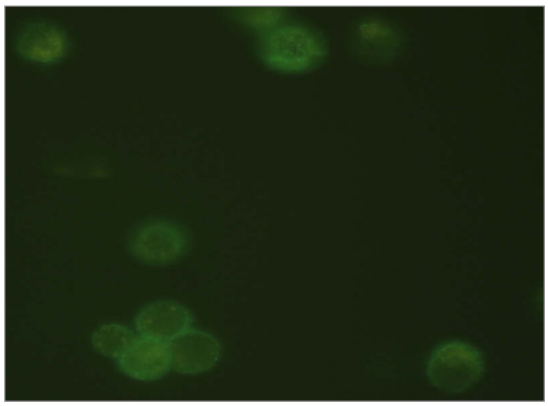


2) Dot plot

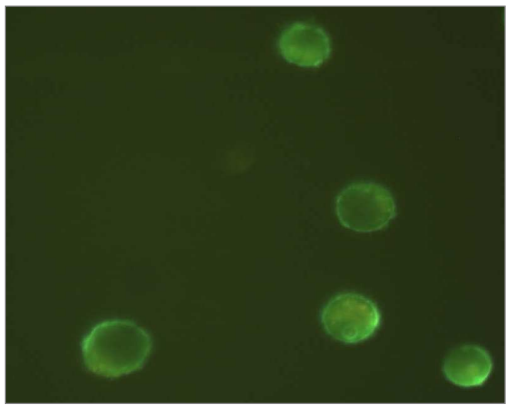


3) Fluorescenční mikroskopie

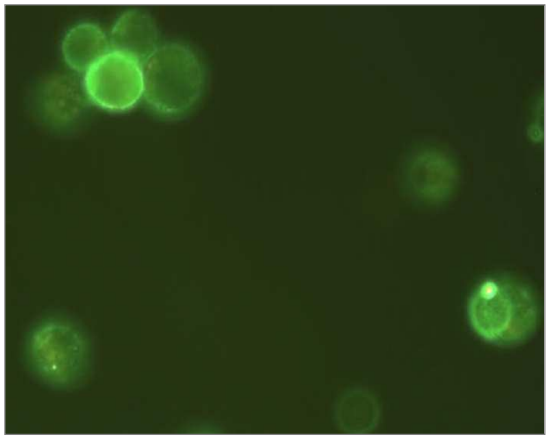
a)



b)



c)



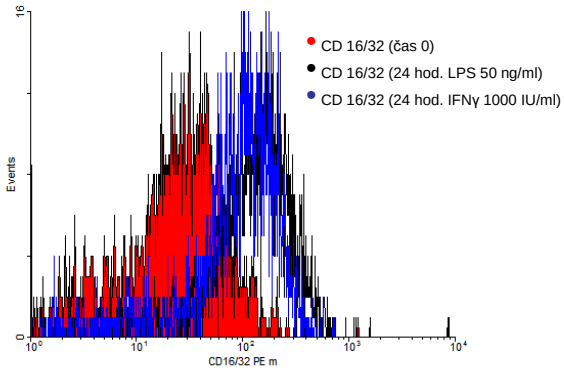
a) CD54 (čas 0)

b) CD54 (6 hod / IFNγ 1000 IU/ml)

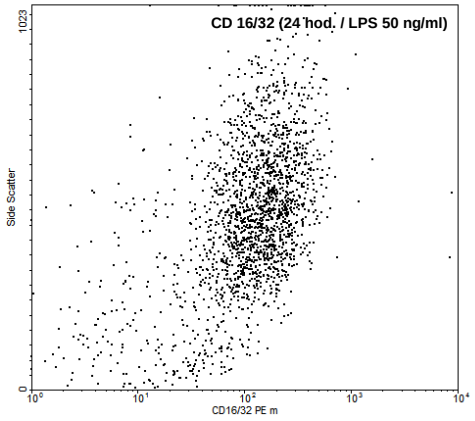
c) CD54 (6 hod / LPS 50 ng/ml)

4.1.2. Exprese CD16/32

1) Histogram

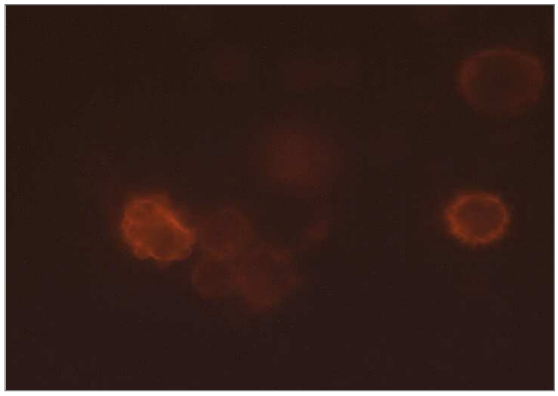


2) Dot plot

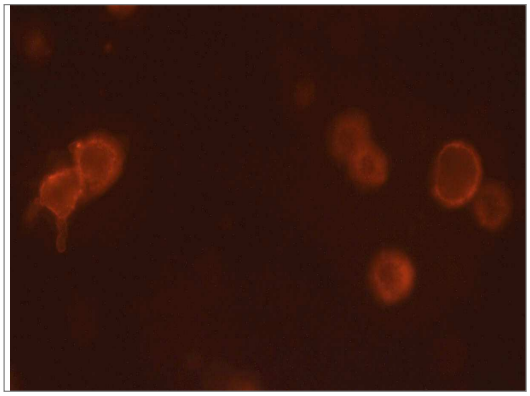


3) Fluorescenční mikroskopie

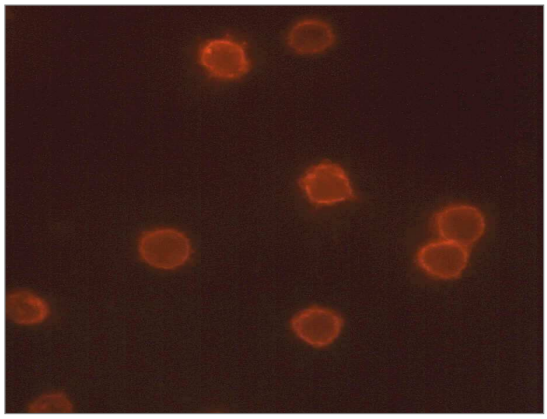
a)



b)



c)



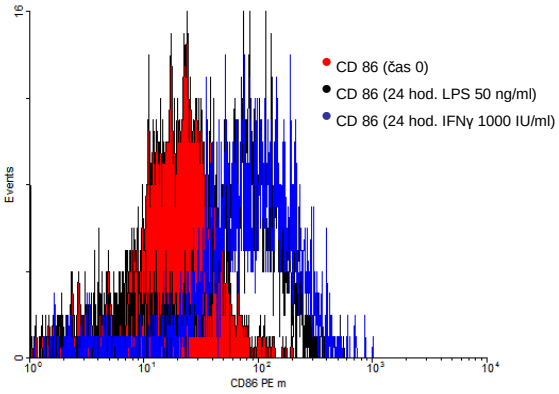
a) CD 16/32 (čas 0)

b) CD 16/32 (24 hod / IFNγ 1000 IU/ml)

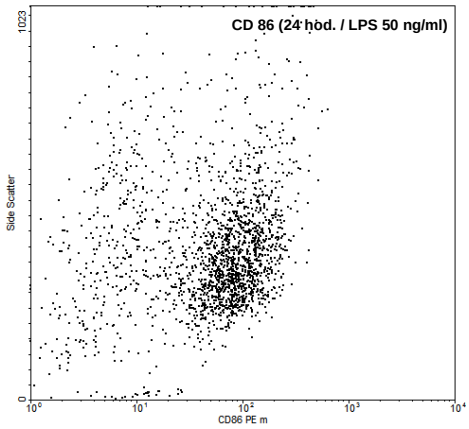
c) CD 16/32 (24 hod / LPS 50 ng/ml)

4.1.3. Exprese CD86

1) Histogram



2) Dot plot



3) Analýza ΔMFI pomocí Kolmogorova-Smirnova testu

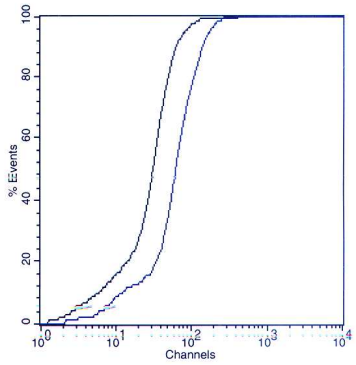
CD 86 (24 hod. / LPS 50 ng/ml)

Kolmogorov-Smirnov Statistics

File:	Cista.001	feno L2 24hod..010
Parameter:	FL1-H	FL1-H
Gate:	No Gate	No Gate
Sample ID:		
Patient ID:	Cista	feno L2 24hod.
Patient Name:		
Case Number:		
Tube:	54/86	54/86
Panel:	Dvojita pozit. mys	Dvojita pozit. mys
Acquisition Date:	27-Aug-03	28-Aug-03
Smooths:	0	0

Marker = No Marker
Channels = 1 - 9910
D/s(n) = 14.35
D = 0.45
Channel = 48.00
Log Data Units = Linear Values

p <= 0.001



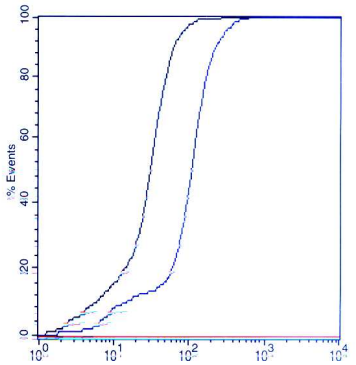
CD 86 (24 hod. / IFNγ 1000 IU/ml)

Kolmogorov-Smirnov Statistics

File:	Cista.001	feno I2 24hod..004
Parameter:	FL1-H	FL1-H
Gate:	No Gate	No Gate
Sample ID:		
Patient ID:	Cista	feno I2 24hod.
Patient Name:		
Case Number:		
Tube:	54/86	54/86
Panel:	Dvojita pozit. mys	Dvojita pozit. mys
Acquisition Date:	27-Aug-03	28-Aug-03
Smooths:	0	0

Marker = No Marker
Channels = 1 - 9910
D/s(n) = 21.85
D = 0.69
Channel = 59.00
Log Data Units = Linear Values

p <= 0.001



4.2. Závislost absolutních hodnot MFI a změny MFI CD54 na čase bez ohledu na další proměnné a s ohledem na přítomnost infekce a stimulace

Základní ANOVA:

Tests of Within-Subjects Effects

Measure:MEASURE_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
čas	Sphericity Assumed	9365,981	5	1873,196	30,869	,000
	Greenhouse-Geisser	9365,981	2,736	3422,878	30,869	,000
čas * stim_2	Sphericity Assumed	8952,039	15	596,803	9,835	,000
	Greenhouse-Geisser	8952,039	8,209	1090,533	9,835	,000
Error(čas)	Sphericity Assumed	16990,852	280	60,682		
	Greenhouse-Geisser	16990,852	153,232	110,883		

Trend vývoje MFI CD54 v čase bez ohledu na další proměnné:

Tests of Within-Subjects Contrasts (polynomial)

Source	čas	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
čas	Linear	4722,890	1	4722,890	18,726	,000
	Quadratic	10716,468	1	10716,468	91,455	,000
	Cubic	14,116	1	14,116	,560	,457

Významnost rozdílů mezi jednotlivými časovými intervaly bez ohledu na další proměnné:

Tests of Within-Subjects Contrasts (repeated)

Source	čas	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
čas	Level 1 vs. Level 2	6897,268	1	6897,268	70,946	,000
	Level 2 vs. Level 3	2878,396	1	2878,396	26,212	,000
	Level 3 vs. Level 4	21,473	1	21,473	,322	,572
	Level 4 vs. Level 5	3,753	1	3,753	,129	,721
	Level 5 vs. Level 6	4268,707	1	4268,707	44,814	,000

Významnost rozdílů mezi jednotlivými časovými intervaly a vstupní hodnotou bez ohledu na další proměnné:

Tests of Within-Subjects Contrasts (simple)

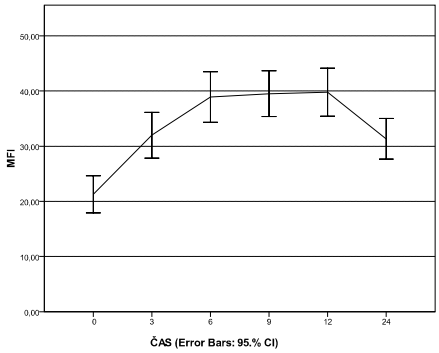
Source	čas	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
čas	Level 2 vs. Level 1	6897,268	1	6897,268	70,946	,000
	Level 3 vs. Level 1	18687,021	1	18687,021	64,969	,000
	Level 4 vs. Level 1	19975,417	1	19975,417	76,402	,000
	Level 5 vs. Level 1	20526,737	1	20526,737	61,405	,000
	Level 6 vs. Level 1	6074,052	1	6074,052	16,705	,000

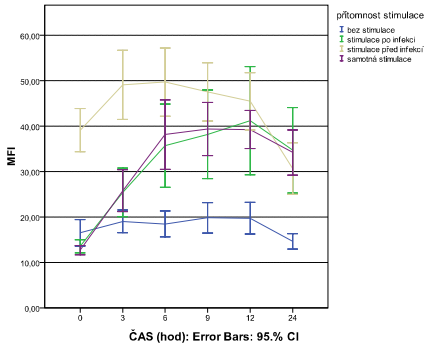
Významnost efektu časového modelu na MFI CD54 v čase (Post-hoc, Bonferroni)

(I) přítomnost stimulace	(J) přítomnost stimulace	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.[a]
bez stimulace	stimulace po infekci	-13,424*	5,248	,013
	stimulace před infekcí	-25,565*	5,248	,000
	samotná stimulace	-13,553*	5,248	,012
stimulace po infekci	bez stimulace	13,424*	5,248	,013
	stimulace před infekcí	-12,141*	3,711	,002
	samotná stimulace	-,130	3,711	,972
stimulace před infekcí	bez stimulace	25,565*	5,248	,000
	stimulace po infekci	12,141*	3,711	,002
	samotná stimulace	12,011*	3,711	,002
samotná stimulace	bez stimulace	13,553*	5,248	,012
	stimulace po infekci	,130	3,711	,972
	stimulace před infekcí	-12,011*	3,711	,002

(stim_2: samotná infekce / stimulace před infekcí / stimulace po infekci / samotná stimulace)

CD54: Závislost MFI na čase bez ohledu na další faktory a s přihlédnutím na časový model



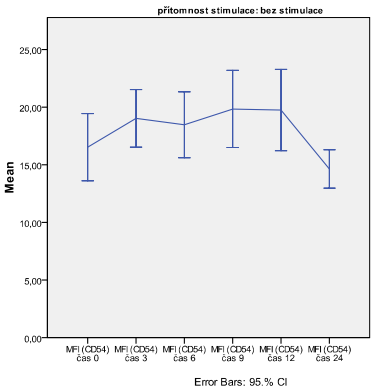


4.2.1. Závislost absolutních hodnot MFI CD54 na čase, základním časovém schématu a typu stimulace, přítomnosti infekce a dávce LPS a IFNγ

A) Samotná infekce:

Základní ANOVA pro samotnou infekci

Tests of Within-Subjects Effects[a]						
Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
čas	Sphericity Assumed	126,940	5	25,388	7,165	,000
	Greenhouse-Geisser	126,940	1,722	73,702	7,165	,017
Error(čas)	Sphericity Assumed	88,588	25	3,544		
	Greenhouse-Geisser	88,588	8,612	10,287		



B) Samotná stimulace

Základní ANOVA pro časovou změnu MFI CD54 s ohledem na zvolené stimulační agens a dávku bez infekce (pozn. proměnná stimulace nabývá hodnot: bez stimulace; LPS; IFNγ; LPS+IFNγ)

Tests of Within-Subjects Effects[a]							
Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Sphericity Assumed	10609,654	5	2121,931	117,857	,000	,908
	Greenhouse-Geisser	10609,654	2,001	5302,030	117,857	,000	,908
čas * stimulace	Sphericity Assumed	2485,646	10	248,565	13,806	,000	,697
	Greenhouse-Geisser	2485,646	4,002	621,084	13,806	,000	,697
čas * stimulace * lps	Sphericity Assumed	42,929	5	8,586	,477	,792	,038
	Greenhouse-Geisser	42,929	2,001	21,453	,477	,627	,038
čas * stimulace * lfng	Sphericity Assumed	322,637	5	64,527	3,584	,007	,230
	Greenhouse-Geisser	322,637	2,001	161,234	3,584	,043	,230
Error(čas)	Sphericity Assumed	1080,261	60	18,004			
	Greenhouse-Geisser	1080,261	24,013	44,987			

Jednoduché kontrasty analyzující rozdíly mezi jednotlivými měřeními a vstupní hodnotou (čas 0 – level 1) v závislosti na použitém stimulačním agens a jeho dávce:

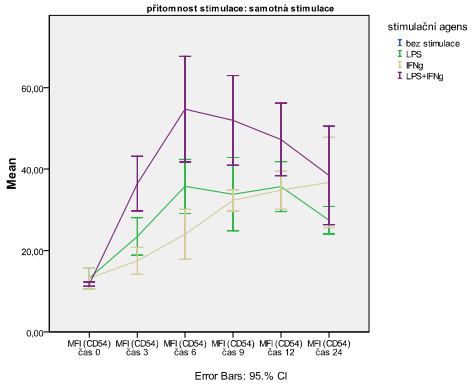
Source	čas	df	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Level 2 vs. Level 1	1	179,844	,000	,937
	Level 3 vs. Level 1	1	178,300	,000	,937
	Level 4 vs. Level 1	1	226,937	,000	,950
	Level 5 vs. Level 1	1	389,128	,000	,970
	Level 6 vs. Level 1	1	312,806	,000	,963
čas * stimulace	Level 2 vs. Level 1	2	34,143	,000	,851
	Level 3 vs. Level 1	2	22,283	,000	,788
	Level 4 vs. Level 1	2	13,820	,001	,697
	Level 5 vs. Level 1	2	10,759	,002	,642
	Level 6 vs. Level 1	2	9,245	,004	,606
čas * stimulace * lps	Level 2 vs. Level 1	1	,173	,685	,014
	Level 3 vs. Level 1	1	,018	,896	,001
	Level 4 vs. Level 1	1	,399	,539	,032
	Level 5 vs. Level 1	1	,007	,933	,001
	Level 6 vs. Level 1	1	,527	,482	,042
čas * stimulace * ifng	Level 2 vs. Level 1	1	,022	,885	,002
	Level 3 vs. Level 1	1	,029	,867	,002
	Level 4 vs. Level 1	1	,089	,771	,007
	Level 5 vs. Level 1	1	1,133	,308	,086
	Level 6 vs. Level 1	1	15,632	,002	,566
Error(čas)	Level 2 vs. Level 1	12			
	Level 3 vs. Level 1	12			
	Level 4 vs. Level 1	12			
	Level 5 vs. Level 1	12			
	Level 6 vs. Level 1	12			

Post-hoc test (Tukey HSD): srovnání signifikance efektů zvolených stimulačních agens.

Multiple Comparisons[a]

(I) stimulační agens	(J) stimulační agens	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LPS	IFNg	1,8123	3,04375	,825	-6,3080	9,9326
	LPS+IFNg	-11,8626*	3,04375	,006	-19,9829	-3,7423
IFNg	LPS	-1,8123	3,04375	,825	-9,9326	6,3080
	LPS+IFNg	-13,6749*	3,04375	,002	-21,7952	-5,5546
LPS+IFNg	LPS	11,8626*	3,04375	,006	3,7423	19,9829
	IFNg	13,6749*	3,04375	,002	5,5546	21,7952

Časová osa vývoje MFI CD54 u samotné stimulace v závislosti na zvoleném stimulačním agens:



C) Stimulace po infekci

Základní ANOVA pro časový vývoj MFI CD54 v čase v případě stimulace po infekci v závislosti na zvoleném stimulačním agens a jeho dávce:

Tests of Within-Subjects Effects[a]

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Sphericity Assumed	10848,857	5	2169,771	54,411	,000	,819
	Greenhouse-Geisser	10848,857	1,785	6079,460	54,411	,000	,819
čas * stimulace	Sphericity Assumed	4925,053	10	492,505	12,350	,000	,673
	Greenhouse-Geisser	4925,053	3,569	1379,945	12,350	,000	,673
čas * stimulace * lps	Sphericity Assumed	10,497	5	2,099	,053	,998	,004
	Greenhouse-Geisser	10,497	1,785	5,882	,053	,934	,004
čas * stimulace * ifng	Sphericity Assumed	99,951	5	19,990	,501	,774	,040
	Greenhouse-Geisser	99,951	1,785	56,011	,501	,592	,040
Error(čas)	Sphericity Assumed	2392,654	60	39,878			
	Greenhouse-Geisser	2392,654	21,414	111,733			

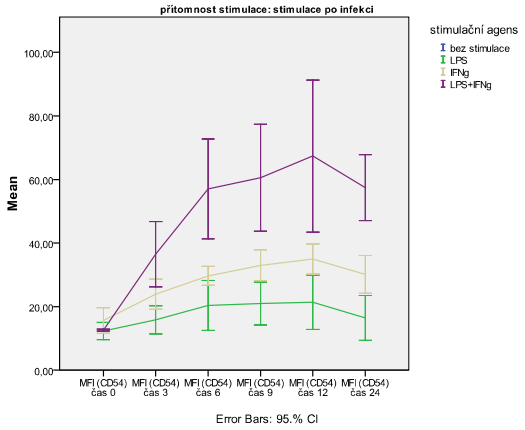
Jednoduché kontrasty (aktuální měření ve srovnání se vstupní hodnotou) v jednotlivých situacích:

Source	čas	df	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Level 2 vs. Level 1	1	65,387	,000	,845
	Level 3 vs. Level 1	1	94,742	,000	,888
	Level 4 vs. Level 1	1	100,577	,000	,893
	Level 5 vs. Level 1	1	65,834	,000	,846
	Level 6 vs. Level 1	1	181,446	,000	,938
čas * stimulace	Level 2 vs. Level 1	2	15,291	,001	,718
	Level 3 vs. Level 1	2	21,332	,000	,780
	Level 4 vs. Level 1	2	20,693	,000	,775
	Level 5 vs. Level 1	2	14,419	,001	,706
	Level 6 vs. Level 1	2	51,885	,000	,896
čas * stimulace * lps	Level 2 vs. Level 1	1	,000	,983	,000
	Level 3 vs. Level 1	1	,015	,904	,001
	Level 4 vs. Level 1	1	,013	,910	,001
	Level 5 vs. Level 1	1	,052	,824	,004
	Level 6 vs. Level 1	1	,173	,685	,014
čas * stimulace * ifng	Level 2 vs. Level 1	1	,002	,962	,000
	Level 3 vs. Level 1	1	,289	,601	,024
	Level 4 vs. Level 1	1	,381	,549	,031
	Level 5 vs. Level 1	1	,279	,607	,023
	Level 6 vs. Level 1	1	2,228	,161	,157
Error(čas)	Level 2 vs. Level 1	12			
	Level 3 vs. Level 1	12			
	Level 4 vs. Level 1	12			
	Level 5 vs. Level 1	12			
	Level 6 vs. Level 1	12			

Post-hoc test (Tukey HSD): efekt zvoleného stimulačního agens

Multiple Comparisons[a]						
(I) stimulační agens	(J) stimulační agens	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LPS	IFNg	-9,9683	4,66330	,124	-22,4094	2,4727
	LPS+IFNg	-30,6772*	4,66330	,000	-43,1183	-18,2362
IFNg	LPS	9,9683	4,66330	,124	-2,4727	22,4094
	LPS+IFNg	-20,7089*	4,66330	,002	-33,1499	-8,2678
LPS+IFNg	LPS	30,6772*	4,66330	,000	18,2362	43,1183
	IFNg	20,7089*	4,66330	,002	8,2678	33,1499

Časová osa vývoje MFI CD54 v čase při stimulaci po infekci v závislosti na zvoleném stimulačním agens:



D) Stimulace před infekcí

Základní ANOVA pro časový vývoj MFI CD54 v čase v případě stimulace před infekcí v závislosti na zvoleném stimulačním agens a jeho dávce:

Tests of Within-Subjects Effects[a]							
Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Sphericity Assumed	5150,461	5	1030,092	17,869	,000	,598
	Greenhouse-Geisser	5150,461	2,874	1792,301	17,869	,000	,598
čas * stimulace	Sphericity Assumed	811,540	10	81,154	1,408	,199	,190
	Greenhouse-Geisser	811,540	5,747	141,203	1,408	,241	,190
čas * stimulace * lps	Sphericity Assumed	14,015	5	2,803	,049	,998	,004
	Greenhouse-Geisser	14,015	2,874	4,877	,049	,983	,004
čas * stimulace * ifng	Sphericity Assumed	87,344	5	17,469	,303	,909	,025
	Greenhouse-Geisser	87,344	2,874	30,395	,303	,815	,025
Error(čas)	Sphericity Assumed	3458,731	60	57,646			
	Greenhouse-Geisser	3458,731	34,484	100,300			

Jednoduché kontrasty (aktuální měření ve srovnání se vstupní hodnotou) v jednotlivých situacích:

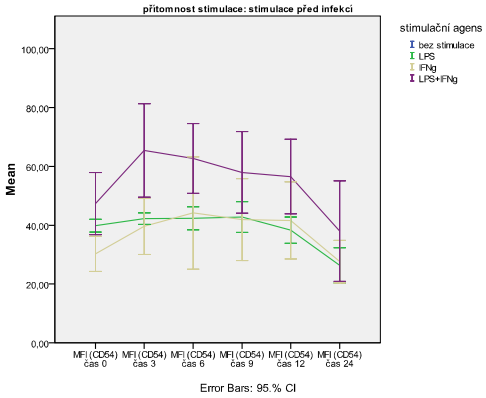
Source	čas	df	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Level 2 vs. Level 1	1	36,384	,000	,752
	Level 3 vs. Level 1	1	11,788	,005	,496
	Level 4 vs. Level 1	1	20,874	,001	,635
	Level 5 vs. Level 1	1	9,651	,009	,446
	Level 6 vs. Level 1	1	13,487	,003	,529
čas * stimulace	Level 2 vs. Level 1	2	6,757	,011	,530
	Level 3 vs. Level 1	2	1,657	,231	,216
	Level 4 vs. Level 1	2	2,179	,156	,266
	Level 5 vs. Level 1	2	3,626	,059	,377
	Level 6 vs. Level 1	2	1,880	,195	,239
čas * stimulace * lps	Level 2 vs. Level 1	1	,009	,926	,001
	Level 3 vs. Level 1	1	,028	,869	,002
	Level 4 vs. Level 1	1	,022	,885	,002
	Level 5 vs. Level 1	1	,195	,667	,016
	Level 6 vs. Level 1	1	,045	,836	,004
čas * stimulace * ifng	Level 2 vs. Level 1	1	,244	,630	,020
	Level 3 vs. Level 1	1	,718	,413	,056
	Level 4 vs. Level 1	1	,345	,568	,028
	Level 5 vs. Level 1	1	,002	,968	,000
	Level 6 vs. Level 1	1	,049	,829	,004
Error(čas)	Level 2 vs. Level 1	12			
	Level 3 vs. Level 1	12			
	Level 4 vs. Level 1	12			
	Level 5 vs. Level 1	12			
	Level 6 vs. Level 1	12			

Post-hoc test (Tukey HSD): efekt zvoleného stimulačního agens

Multiple Comparisons[a]

(I) stimulační agens	(J) stimulační agens	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LPS	IFNg	1,1028	4,41938	,966	-10,6875	12,8931
	LPS+IFNg	-16,0122*	4,41938	,009	-27,8025	-4,2219
IFNg	LPS	-1,1028	4,41938	,966	-12,8931	10,6875
	LPS+IFNg	-17,1150*	4,41938	,006	-28,9053	-5,3247
LPS+IFNg	LPS	16,0122*	4,41938	,009	4,2219	27,8025
	IFNg	17,1150*	4,41938	,006	5,3247	28,9053

Časová osa vývoje MFI CD54 v čase při stimulaci před infekcí v závislosti na zvoleném stimulačním agens:



4.2.2. Relativní vzestup MFI CD54 (ΔMFI(6) CD54) po šesti hodinách v závislosti na zvoleném modelu

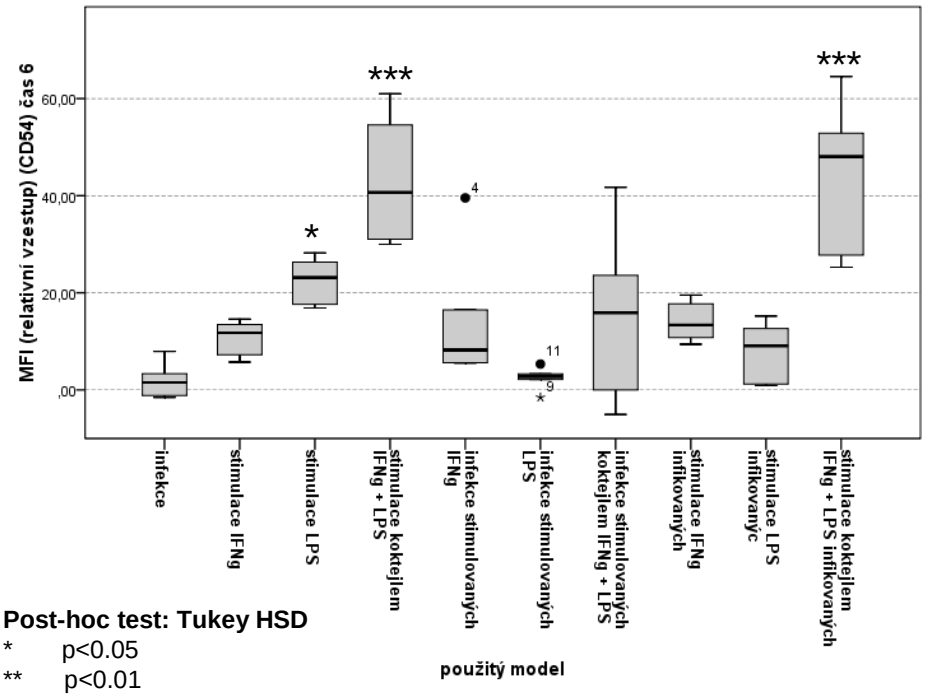
Základní ANOVA pro vztah zvoleného modelu stimulace a infekce (časový model x stimulační agens) na změnu MFI CD54 v čase 6 hod.:

ANOVA

MFI (absolutní vzestup) (CD54) čas 6

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12191,020	9	1354,558	14,172	,000
Within Groups	4778,944	50	95,579		
Total	16969,963	59			

Krabičkový graf: relativní vzestup exprese CD54 po 6ti hodinách v závislosti na podmínkách infekce a stimulace (pro post-hoc testy byla jako referenční zvolena změna při samotné infekci)



Post-hoc test: Tukey HSD

* p<0.05

** p<0.01

*** p<0.001

4.3. Závislost absolutních hodnot MFI a změny MFI CD16/32 na čase bez ohledu na další proměnné a s ohledem na přítomnost infekce a stimulace

Základní ANOVA:

Tests of Within-Subjects Effects

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
čas	Sphericity Assumed	31247,868	5	6249,574	32,849	,000
	Greenhouse-Geisser	31247,868	2,128	14682,827	32,849	,000
čas * stim_2	Sphericity Assumed	56041,645	15	3736,110	19,638	,000
	Greenhouse-Geisser	56041,645	6,385	8777,663	19,638	,000
Error(čas)	Sphericity Assumed	53270,934	280	190,253		
	Greenhouse-Geisser	53270,934	119,179	446,984		

Trend vývoje MFI CD16/32 bez ohledu na další proměnné:

Tests of Within-Subjects Contrasts (polynomial)

Source	čas	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
čas	Linear	53889,542	1	53889,542	49,872	,000
	Quadratic	2613,154	1	2613,154	4,452	,039
	Cubic	3,740	1	3,740	,049	,825

Významnost rozdílů mezi jednotlivými časovými intervaly bez ohledu na další proměnné:

Tests of Within-Subjects Contrasts (repeated)

Source	čas	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
čas	Level 1 vs. Level 2	7873,938	1	7873,938	31,628	,000
	Level 2 vs. Level 3	4714,584	1	4714,584	59,255	,000
	Level 3 vs. Level 4	4787,552	1	4787,552	22,295	,000
	Level 4 vs. Level 5	367,785	1	367,785	2,268	,137
	Level 5 vs. Level 6	1198,586	1	1198,586	1,456	,232

Významnost rozdílů mezi jednotlivými časovými intervaly a vstupní hodnotou bez ohledu na další proměnné:

Tests of Within-Subjects Contrasts (simple)

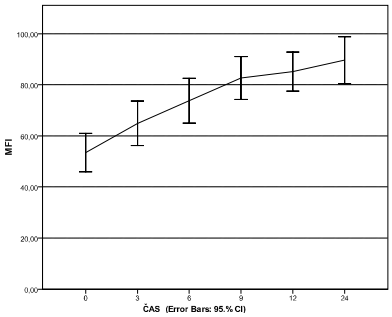
Source	čas	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
čas	Level 2 vs. Level 1	7873,938	1	7873,938	31,628	,000
	Level 3 vs. Level 1	24774,144	1	24774,144	74,003	,000
	Level 4 vs. Level 1	51343,110	1	51343,110	99,449	,000
	Level 5 vs. Level 1	60401,863	1	60401,863	106,209	,000
	Level 6 vs. Level 1	78617,712	1	78617,712	46,495	,000

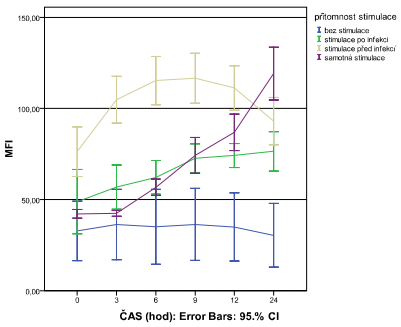
Významnost efektu časového modelu na MFI CD16/32 v čase (Post-hoc, Bonferroni)

(I) přítomnost stimulace	(J) přítomnost stimulace	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.[a]
bez stimulace	stimulace po infekci	-30,878*	8,496	,004
	stimulace před infekcí	-68,565*	8,496	,000
	samotná stimulace	-35,943*	8,496	,001
stimulace po infekci	bez stimulace	30,878*	8,496	,004
	stimulace před infekcí	-37,687*	6,008	,000
	samotná stimulace	-5,065	6,008	1,000
stimulace před infekcí	bez stimulace	68,565*	8,496	,000
	stimulace po infekci	37,687*	6,008	,000
	samotná stimulace	32,622*	6,008	,000
samotná stimulace	bez stimulace	35,943*	8,496	,001
	stimulace po infekci	5,065	6,008	1,000
	stimulace před infekcí	-32,622*	6,008	,000

(stim_2: samotná infekce / stimulace před infekcí / stimulace po infekci / samotná stimulace)

CD16/32: závislost MFI na čase bez ohledu na další faktory a s ohledem na zvolený model





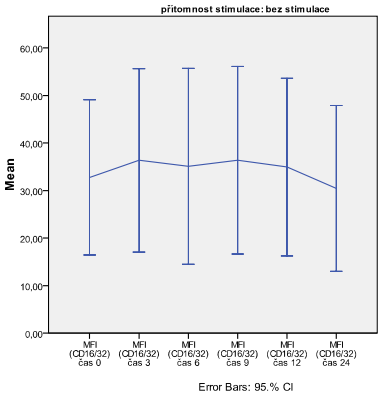
4.3.1. Závislost absolutních hodnot MFI CD16/32 na čase, základním časovém schématu a typu stimulace, přítomnosti infekce a dávce LPS a IFNγ

A) Samotná infekce:

Základní ANOVA pro samotnou infekci

Tests of Within-Subjects Effects[a]

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
čas	Sphericity Assumed	161,543	5	32,309	3,831	,010
	Greenhouse-Geisser	161,543	2,656	60,816	3,831	,039
Error(čas)	Sphericity Assumed	210,848	25	8,434		
	Greenhouse-Geisser	210,848	13,281	15,875		



B) Samotná stimulace

Základní ANOVA pro časovou změnu MFI CD16/32 s ohledem na zvolené stimulační agens a dávku bez infekce (pozn. proměnná stimulace nabývá hodnot: bez stimulace; LPS; IFNγ; LPS+IFNγ)

Tests of Within-Subjects Effects[a]

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Sphericity Assumed	77285,928	5	15457,186	208,917	,000	,946
	Greenhouse-Geisser	77285,928	1,474	52424,005	208,917	,000	,946
čas * stimulace	Sphericity Assumed	8032,730	10	803,273	10,857	,000	,644
	Greenhouse-Geisser	8032,730	2,948	2724,350	10,857	,000	,644
čas * lps * stimulace	Sphericity Assumed	2022,180	5	404,436	5,466	,000	,313
	Greenhouse-Geisser	2022,180	1,474	1371,670	5,466	,021	,313
čas * ifng * stimulace	Sphericity Assumed	3484,461	5	696,892	9,419	,000	,440
	Greenhouse-Geisser	3484,461	1,474	2363,553	9,419	,003	,440
Error(čas)	Sphericity Assumed	4439,231	60	73,987			
	Greenhouse-Geisser	4439,231	17,691	250,932			

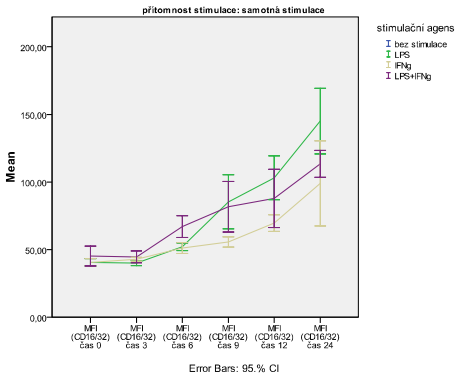
Jednoduché kontrasty analyzující rozdíly mezi jednotlivými měřeními a vstupní hodnotou (čas 0 – level 1) v závislosti na použitém stimulačním agens a jeho dávce:

Source	čas	df	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Level 2 vs. Level 1	1	,043	,840	,004
	Level 3 vs. Level 1	1	154,363	,000	,928
	Level 4 vs. Level 1	1	81,194	,000	,871
	Level 5 vs. Level 1	1	150,487	,000	,926
	Level 6 vs. Level 1	1	1264,459	,000	,991
čas * stimulace	Level 2 vs. Level 1	2	,593	,568	,090
	Level 3 vs. Level 1	2	8,563	,005	,588
	Level 4 vs. Level 1	2	6,109	,015	,504
	Level 5 vs. Level 1	2	7,215	,009	,546
	Level 6 vs. Level 1	2	43,386	,000	,879
čas * lps * stimulace	Level 2 vs. Level 1	1	,111	,744	,009
	Level 3 vs. Level 1	1	,029	,868	,002
	Level 4 vs. Level 1	1	2,588	,134	,177
	Level 5 vs. Level 1	1	1,412	,258	,105
	Level 6 vs. Level 1	1	30,401	,000	,717
čas * ifng * stimulace	Level 2 vs. Level 1	1	,110	,745	,009
	Level 3 vs. Level 1	1	1,177	,299	,089
	Level 4 vs. Level 1	1	,271	,612	,022
	Level 5 vs. Level 1	1	,695	,421	,055
	Level 6 vs. Level 1	1	53,397	,000	,817
Error(čas)	Level 2 vs. Level 1	12			
	Level 3 vs. Level 1	12			
	Level 4 vs. Level 1	12			
	Level 5 vs. Level 1	12			
	Level 6 vs. Level 1	12			

Post-hoc test (Tukey HSD): srovnání signifikance efektů zvolených stimulačních agens.

Pairwise Comparisons[d]

(I) stimulační agens	(J) stimulační agens	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.[c]	95% Confidence Interval for Difference[c]	
					Lower Bound	Upper Bound
LPS	IFNg	17,881*,a,b	2,961	,000	9,652	26,111
	LPS+IFNg	4,369,a,b	2,961	,497	-3,861	12,599
IFNg	LPS	-17,881*,a,b	2,961	,000	-26,111	-9,652
	LPS+IFNg	-13,512*,a,b	2,961	,002	-21,742	-5,282
LPS+IFNg	LPS	-4,369,a,b	2,961	,497	-12,599	3,861
	IFNg	13,512*,a,b	2,961	,002	5,282	21,742



C) Stimulace po infekci

Základní ANOVA pro časový vývoj MFI CD16/32 v čase v případě stimulace po infekci v závislosti na zvoleném stimulačním agens a jeho dávce:

Tests of Within-Subjects Effects[a]

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Sphericity Assumed	11610,236	5	2322,047	9,403	,000	,439
	Greenhouse-Geisser	11610,236	1,334	8701,837	9,403	,004	,439
čas * stimulace	Sphericity Assumed	4595,600	10	459,560	1,861	,069	,237
	Greenhouse-Geisser	4595,600	2,668	1722,194	1,861	,180	,237
čas * lps * stimulace	Sphericity Assumed	898,954	5	179,791	,728	,605	,057
	Greenhouse-Geisser	898,954	1,334	673,763	,728	,445	,057
čas * ifng * stimulace	Sphericity Assumed	1065,631	5	213,126	,863	,511	,067
	Greenhouse-Geisser	1065,631	1,334	798,688	,863	,398	,067
Error(čas)	Sphericity Assumed	14816,228	60	246,937			
	Greenhouse-Geisser	14816,228	16,011	925,393			

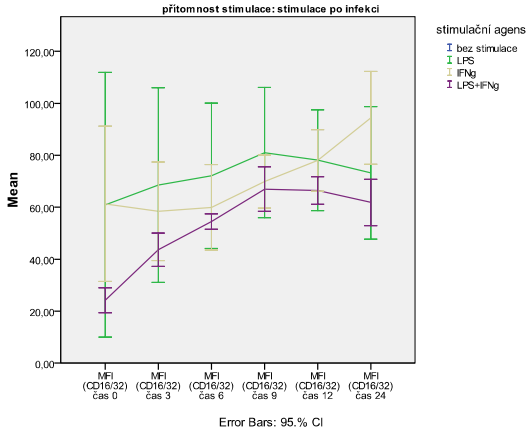
Jednoduché kontrasty (aktuální měření ve srovnání se vstupní hodnotu) v jednotlivých situacích:

Source	čas	df	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Level 2 vs. Level 1	1	10,648	,007	,470
	Level 3 vs. Level 1	1	13,413	,003	,528
	Level 4 vs. Level 1	1	15,892	,002	,570
	Level 5 vs. Level 1	1	20,205	,001	,627
	Level 6 vs. Level 1	1	7,863	,016	,396
čas * stimulace	Level 2 vs. Level 1	2	5,612	,019	,483
	Level 3 vs. Level 1	2	5,351	,022	,471
	Level 4 vs. Level 1	2	2,539	,120	,297
	Level 5 vs. Level 1	2	2,049	,172	,255
	Level 6 vs. Level 1	2	,600	,564	,091
čas * lps * stimulace	Level 2 vs. Level 1	1	,003	,956	,000
	Level 3 vs. Level 1	1	,062	,808	,005
	Level 4 vs. Level 1	1	,107	,749	,009
	Level 5 vs. Level 1	1	,036	,853	,003
	Level 6 vs. Level 1	1	,674	,428	,053
čas * ifng * stimulace	Level 2 vs. Level 1	1	,002	,965	,000
	Level 3 vs. Level 1	1	,036	,854	,003
	Level 4 vs. Level 1	1	,459	,511	,037
	Level 5 vs. Level 1	1	,549	,473	,044
	Level 6 vs. Level 1	1	,734	,408	,058
Error(čas)	Level 2 vs. Level 1	12			
	Level 3 vs. Level 1	12			
	Level 4 vs. Level 1	12			
	Level 5 vs. Level 1	12			
	Level 6 vs. Level 1	12			

Post-hoc test (Tukey HSD): efekt zvoleného stimulačního agens

Pairwise Comparisons[d]

(I) stimulační agens	(J) stimulační agens	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.[c]	95% Confidence Interval for Difference[c]	
					Lower Bound	Upper Bound
LPS	IFNg	1,955[a,b]	9,875	1,000	-25,492	29,401
	LPS+IFNg	19,384[a,b]	9,875	,220	-8,062	46,831
IFNg	LPS	-1,955[a,b]	9,875	1,000	-29,401	25,492
	LPS+IFNg	17,430[a,b]	9,875	,309	-10,017	44,876
LPS+IFNg	LPS	-19,384[a,b]	9,875	,220	-46,831	8,062
	IFNg	-17,430[a,b]	9,875	,309	-44,876	10,017



D) <u>Stimulace před infekcí</u>

Základní ANOVA pro časový vývoj MFI CD16/32 v čase v případě stimulace před infekcí v závislosti na zvoleném stimulačním agens a jeho dávce:

Tests of Within-Subjects Effects[a]

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Sphericity Assumed	22751,417	5	4550,283	37,641	,000	,758
	Greenhouse-Geisser	22751,417	2,682	8484,003	37,641	,000	,758
čas * stimulace	Sphericity Assumed	4762,842	10	476,284	3,940	,000	,396
	Greenhouse-Geisser	4762,842	5,363	888,032	3,940	,006	,396
čas * lps * stimulace	Sphericity Assumed	415,167	5	83,033	,687	,635	,054
	Greenhouse-Geisser	415,167	2,682	154,816	,687	,551	,054
čas * ifng * stimulace	Sphericity Assumed	286,033	5	57,207	,473	,795	,038
	Greenhouse-Geisser	286,033	2,682	106,662	,473	,682	,038
Error(čas)	Sphericity Assumed	7253,266	60	120,888			
	Greenhouse-Geisser	7253,266	32,180	225,395			

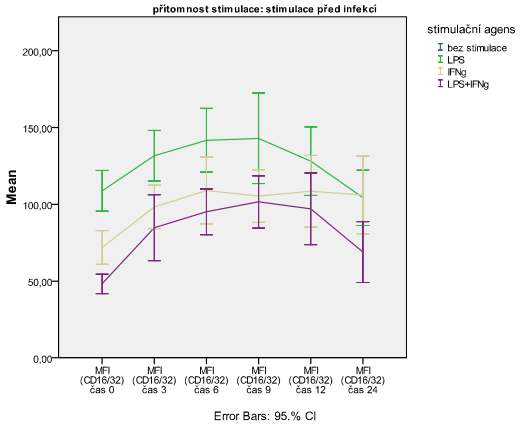
Jednoduché kontrasty (aktuální měření ve srovnání se vstupní hodnotu) v jednotlivých situacích:

Source	čas	df	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Level 2 vs. Level 1	1	85,898	,000	,877
	Level 3 vs. Level 1	1	304,844	,000	,962
	Level 4 vs. Level 1	1	168,115	,000	,933
	Level 5 vs. Level 1	1	77,294	,000	,866
	Level 6 vs. Level 1	1	11,974	,005	,499
čas * stimulace	Level 2 vs. Level 1	2	1,731	,219	,224
	Level 3 vs. Level 1	2	3,388	,068	,361
	Level 4 vs. Level 1	2	4,230	,041	,414
	Level 5 vs. Level 1	2	4,413	,037	,424
	Level 6 vs. Level 1	2	5,351	,022	,471
čas * lps * stimulace	Level 2 vs. Level 1	1	,894	,363	,069
	Level 3 vs. Level 1	1	5,174	,042	,301
	Level 4 vs. Level 1	1	2,709	,126	,184
	Level 5 vs. Level 1	1	2,024	,180	,144
	Level 6 vs. Level 1	1	,475	,504	,038
čas * ifng * stimulace	Level 2 vs. Level 1	1	,123	,731	,010
	Level 3 vs. Level 1	1	4,745	,050	,283
	Level 4 vs. Level 1	1	,944	,350	,073
	Level 5 vs. Level 1	1	,475	,504	,038
	Level 6 vs. Level 1	1	,576	,462	,046
Error(čas)	Level 2 vs. Level 1	12			
	Level 3 vs. Level 1	12			
	Level 4 vs. Level 1	12			
	Level 5 vs. Level 1	12			
	Level 6 vs. Level 1	12			

Post-hoc test (Tukey HSD): efekt zvoleného stimulačního agens

Pairwise Comparisons[d]

(I) stimulační agens	(J) stimulační agens	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.[c]	95% Confidence Interval for Difference[c]	
					Lower Bound	Upper Bound
LPS	IFNg	26,409[*,a,b]	6,861	,007	7,339	45,478
	LPS+IFNg	43,687[*,a,b]	6,861	,000	24,617	62,757
IFNg	LPS	-26,409[*,a,b]	6,861	,007	-45,478	-7,339
	LPS+IFNg	17,278[a,b]	6,861	,081	-1,791	36,348
LPS+IFNg	LPS	-43,687[*,a,b]	6,861	,000	-62,757	-24,617
	IFNg	-17,278[a,b]	6,861	,081	-36,348	1,791



4.3.2. Relativní vzestup MFI CD16/32 po 24 hodinách (ΔMFI(24) CD16/32) v závislosti na zvoleném modelu

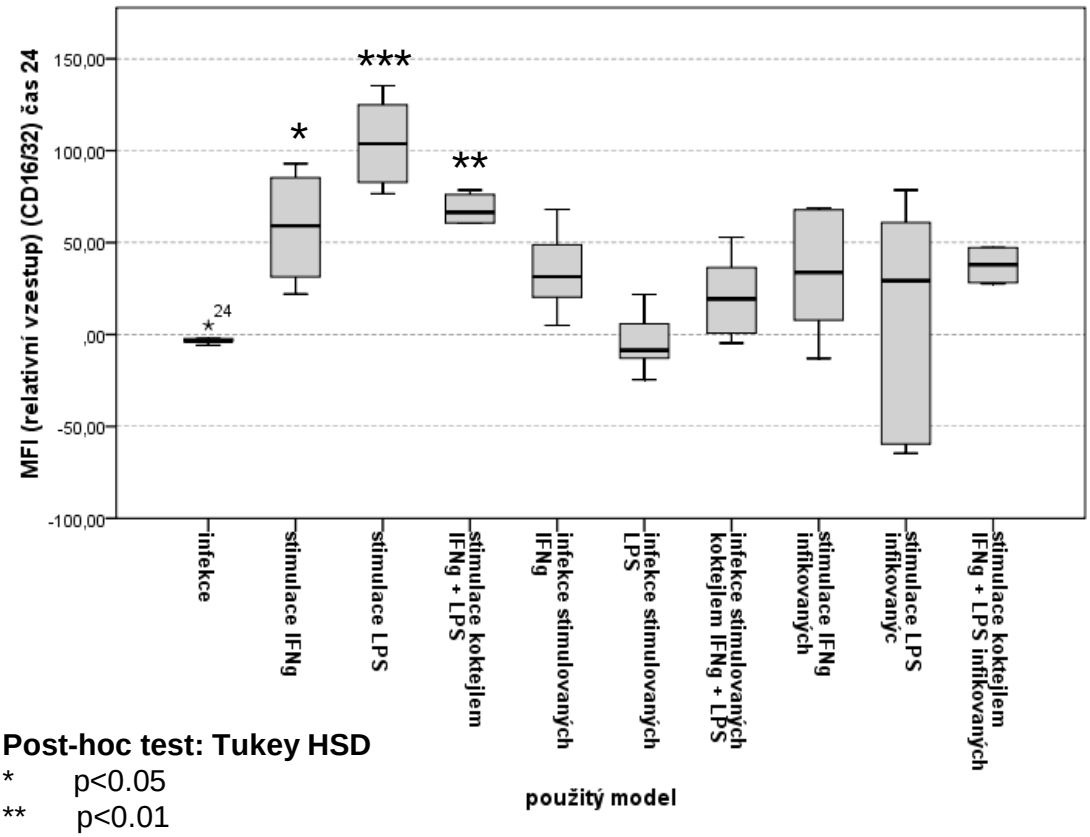
Základní ANOVA pro vztah zvoleného modelu stimulace a infekce (časový model x stimulační agens) na změnu MFI CD16/32 v čase 24 hod.:

ANOVA

MFI (absolutní vzestup) (CD16/32) čas 24

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	60875,267	9	6763,919	8,697	,000
Within Groups	38886,371	50	777,727		
Total	99761,638	59			

Krabičkový graf: relativní vzestup exprese CD16/32 po 24 hodinách v závislosti na podmínkách infekce a stimulace (pro post-hoc testy byla jako referenční zvolena změna při samotné infekci)



Post-hoc test: Tukey HSD

* p<0.05

** p<0.01

*** p<0.001

4.4. Závislost absolutních hodnot MFI a změny MFI CD86 na čase bez ohledu na další proměnné a s ohledem na přítomnost infekce a stimulace

Základní ANOVA:

Tests of Within-Subjects Effects

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
čas	Sphericity Assumed	34912,014	5	6982,403	51,504	,000
	Greenhouse-Geisser	34912,014	2,460	14190,845	51,504	,000
čas * stim_2	Sphericity Assumed	20384,180	15	1358,945	10,024	,000
	Greenhouse-Geisser	20384,180	7,381	2761,883	10,024	,000
Error(čas)	Sphericity Assumed	37959,283	280	135,569		
	Greenhouse-Geisser	37959,283	137,770	275,526		

Trend vývoje MFI CD86 bez ohledu na další proměnné:

Tests of Within-Subjects Contrasts (polynomial)

Source	čas	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
čas	Linear	57792,625	1	57792,625	112,625	,000
	Quadratic	63,955	1	63,955	,209	,649
	Cubic	28,821	1	28,821	,383	,538
	Order 4	20,459	1	20,459	,348	,558
	Order 5	49,643	1	49,643	1,386	,244

Významnost rozdílů mezi jednotlivými časovými intervaly bez ohledu na další proměnné:

Tests of Within-Subjects Contrasts (repeated)

Source	čas	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
čas	Level 1 vs. Level 2	4455,276	1	4455,276	24,106	,000
	Level 2 vs. Level 3	3192,292	1	3192,292	67,385	,000
	Level 3 vs. Level 4	3986,980	1	3986,980	36,495	,000
	Level 4 vs. Level 5	1824,748	1	1824,748	15,396	,000
	Level 5 vs. Level 6	3983,557	1	3983,557	7,164	,010

Významnost rozdílů mezi jednotlivými časovými intervaly a vstupní hodnotou bez ohledu na další proměnné:

Tests of Within-Subjects Contrasts (simple)

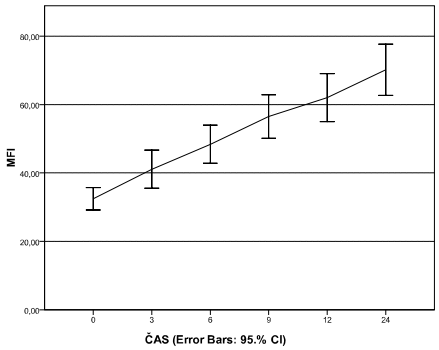
Source	čas	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
čas	Level 2 vs. Level 1	4455,276	1	4455,276	24,106	,000
	Level 3 vs. Level 1	15190,126	1	15190,126	81,452	,000
	Level 4 vs. Level 1	34741,518	1	34741,518	100,336	,000
	Level 5 vs. Level 1	52490,401	1	52490,401	113,809	,000
	Level 6 vs. Level 1	85394,436	1	85394,436	102,370	,000

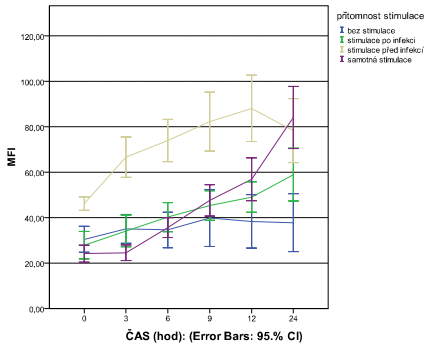
Významnost efektu časového modelu na MFI CD86 v čase (Post-hoc, Bonferroni)

(I) přítomnost stimulace	(J) přítomnost stimulace	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.[a]
bez stimulace	stimulace po infekci	-6,577	6,598	1,000
	stimulace před infekcí	-36,584*	6,598	,000
	samotná stimulace	-9,485	6,598	,937
stimulace po infekci	bez stimulace	6,577	6,598	1,000
	stimulace před infekcí	-30,008*	4,666	,000
	samotná stimulace	-2,909	4,666	1,000
stimulace před infekcí	bez stimulace	36,584*	6,598	,000
	stimulace po infekci	30,008*	4,666	,000
	samotná stimulace	27,099*	4,666	,000
samotná stimulace	bez stimulace	9,485	6,598	,937
	stimulace po infekci	2,909	4,666	1,000
	stimulace před infekcí	-27,099*	4,666	,000

(stim_2: samotná infekce / stimulace před infekcí / stimulace po infekci / samotná stimulace)

CD86: Závislost MFI na čase bez ohledu na další faktory a s ohledem na zvolený model





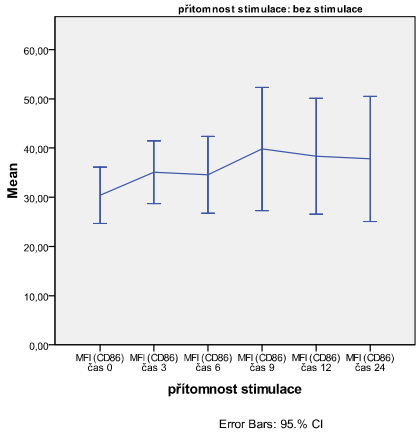
4.4.1. Závislost absolutních hodnot MFI CD86 na čase, základním časovém schématu a typu stimulace, přítomnosti infekce a dávce LPS a IFNγ

A) Samotná infekce:

Základní ANOVA pro samotnou infekci

Tests of Within-Subjects Effects[a]

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
čas	Sphericity Assumed	343,600	5	68,720	1,642	,186
	Greenhouse-Geisser	343,600	1,718	200,023	1,642	,247
Error(čas)	Sphericity Assumed	1046,268	25	41,851		
	Greenhouse-Geisser	1046,268	8,589	121,814		



B) Samotná stimulace

Základní ANOVA pro časovou změnu MFI CD86 s ohledem na zvolené stimulační agens a dávku bez infekce (pozn. proměnná stimulace nabývá hodnot: bez stimulace; LPS; IFNγ; LPS+IFNγ)

Tests of Within-Subjects Effects[a]

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Sphericity Assumed	47742,297	5	9548,459	77,839	,000	,866
	Greenhouse-Geisser	47742,297	1,848	25831,959	77,839	,000	,866
čas * stimulace	Sphericity Assumed	1317,202	10	131,720	1,074	,396	,152
	Greenhouse-Geisser	1317,202	3,696	356,350	1,074	,390	,152
čas * lps * stimulace	Sphericity Assumed	182,180	5	36,436	,297	,913	,024
	Greenhouse-Geisser	182,180	1,848	98,572	,297	,729	,024
čas * ifng * stimulace	Sphericity Assumed	669,866	5	133,973	1,092	,374	,083
	Greenhouse-Geisser	669,866	1,848	362,445	1,092	,348	,083
Error(čas)	Sphericity Assumed	7360,177	60	122,670			
	Greenhouse-Geisser	7360,177	22,178	331,865			

Jednoduché kontrasty analyzující rozdíly mezi jednotlivými měřeními a vstupní hodnotou (čas 0 – level 1) v závislosti na použitém stimulačním agens a jeho dávce:

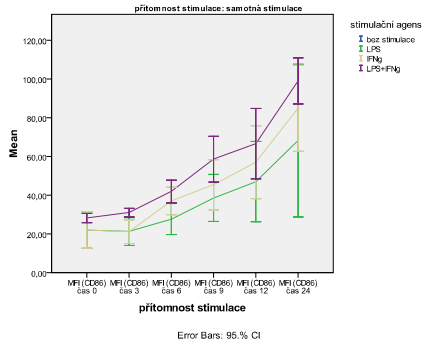
Tests of Within-Subjects Contrasts[a]

Source	čas	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Level 2 vs. Level 1	6,266	1	6,266	,519	,485	,041
	Level 3 vs. Level 1	2417,373	1	2417,373	117,691	,000	,907
	Level 4 vs. Level 1	10266,050	1	10266,050	116,920	,000	,907
	Level 5 vs. Level 1	19614,832	1	19614,832	138,339	,000	,920
	Level 6 vs. Level 1	65759,154	1	65759,154	131,299	,000	,916
čas * stimulace	Level 2 vs. Level 1	50,098	2	25,049	2,075	,168	,257
	Level 3 vs. Level 1	306,822	2	153,411	7,469	,008	,555
	Level 4 vs. Level 1	573,911	2	286,955	3,268	,074	,353
	Level 5 vs. Level 1	579,602	2	289,801	2,044	,172	,254
	Level 6 vs. Level 1	1894,198	2	947,099	1,891	,193	,240
čas * lps * stimulace	Level 2 vs. Level 1	,077	1	,077	,006	,938	,001
	Level 3 vs. Level 1	3,937	1	3,937	,192	,669	,016
	Level 4 vs. Level 1	15,073	1	15,073	,172	,686	,014
	Level 5 vs. Level 1	33,135	1	33,135	,234	,637	,019
	Level 6 vs. Level 1	254,020	1	254,020	,507	,490	,041
čas * ifng * stimulace	Level 2 vs. Level 1	,583	1	,583	,048	,830	,004
	Level 3 vs. Level 1	,028	1	,028	,001	,971	,000
	Level 4 vs. Level 1	89,089	1	89,089	1,015	,334	,078
	Level 5 vs. Level 1	432,650	1	432,650	3,051	,106	,203
	Level 6 vs. Level 1	701,569	1	701,569	1,401	,260	,105
Error(čas)	Level 2 vs. Level 1	144,837	12	12,070			
	Level 3 vs. Level 1	246,480	12	20,540			
	Level 4 vs. Level 1	1053,648	12	87,804			
	Level 5 vs. Level 1	1701,458	12	141,788			
	Level 6 vs. Level 1	6010,020	12	500,835			

Post-hoc test (Tukey HSD): srovnání signifikance efektů zvolených stimulačních agens.

Pairwise Comparisons[a]

(I) stimulační agens	(J) stimulační agens	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.[c]	95% Confidence Interval for Difference[c]	
					Lower Bound	Upper Bound
LPS	IFNg	-7,149[a,b]	6,425	,863	-25,006	10,707
	LPS+IFNg	-16,793[a,b]	6,425	,068	-34,650	1,064
IFNg	LPS	7,149[a,b]	6,425	,863	-10,707	25,006
	LPS+IFNg	-9,643[a,b]	6,425	,478	-27,500	8,214
LPS+IFNg	LPS	16,793[a,b]	6,425	,068	-1,064	34,650
	IFNg	9,643[a,b]	6,425	,478	-8,214	27,500



C) Stimulace po infekci

Základní ANOVA pro časový vývoj MFI CD86 v čase v případě stimulace po infekci v závislosti na zvoleném stimulačním agens a jeho dávce:

Tests of Within-Subjects Effects[a]

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Sphericity Assumed	12129,816	5	2425,963	24,143	,000	,668
	Greenhouse-Geisser	12129,816	2,521	4812,459	24,143	,000	,668
čas * stimulace	Sphericity Assumed	3652,110	10	365,211	3,635	,001	,377
	Greenhouse-Geisser	3652,110	5,041	724,480	3,635	,011	,377
čas * lps * stimulace	Sphericity Assumed	436,574	5	87,315	,869	,507	,068
	Greenhouse-Geisser	436,574	2,521	173,209	,869	,452	,068
čas * ifng * stimulace	Sphericity Assumed	1274,301	5	254,860	2,536	,038	,174
	Greenhouse-Geisser	1274,301	2,521	505,574	2,536	,084	,174
Error(čas)	Sphericity Assumed	6028,959	60	100,483			
	Greenhouse-Geisser	6028,959	30,246	199,331			

Jednoduché kontrasty (aktuální měření ve srovnání se vstupní hodnotu) v jednotlivých situacích:

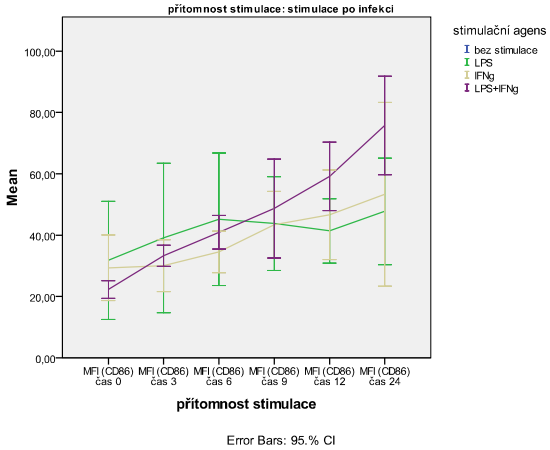
Tests of Within-Subjects Contrasts[a]

Source	čas	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Level 2 vs. Level 1	793,870	1	793,870	6,682	,024	,358
	Level 3 vs. Level 1	2948,707	1	2948,707	47,479	,000	,798
	Level 4 vs. Level 1	5874,087	1	5874,087	41,588	,000	,776
	Level 5 vs. Level 1	8979,820	1	8979,820	57,289	,000	,827
	Level 6 vs. Level 1	19204,439	1	19204,439	50,307	,000	,807
čas * stimulace	Level 2 vs. Level 1	324,996	2	162,498	1,368	,292	,186
	Level 3 vs. Level 1	554,033	2	277,016	4,460	,036	,426
	Level 4 vs. Level 1	733,161	2	366,580	2,595	,116	,302
	Level 5 vs. Level 1	2383,894	2	1191,947	7,604	,007	,559
	Level 6 vs. Level 1	4680,204	2	2340,102	6,130	,015	,505
čas * lps * stimulace	Level 2 vs. Level 1	2,208	1	2,208	,019	,894	,002
	Level 3 vs. Level 1	11,900	1	11,900	,192	,669	,016
	Level 4 vs. Level 1	6,304	1	6,304	,045	,836	,004
	Level 5 vs. Level 1	18,691	1	18,691	,119	,736	,010
	Level 6 vs. Level 1	526,407	1	526,407	1,379	,263	,103
čas * ifng * stimulace	Level 2 vs. Level 1	44,173	1	44,173	,372	,553	,030
	Level 3 vs. Level 1	98,010	1	98,010	1,578	,233	,116
	Level 4 vs. Level 1	262,285	1	262,285	1,857	,198	,134
	Level 5 vs. Level 1	71,070	1	71,070	,453	,513	,036
	Level 6 vs. Level 1	2041,677	1	2041,677	5,348	,039	,308
Error(čas)	Level 2 vs. Level 1	1425,614	12	118,801			
	Level 3 vs. Level 1	745,267	12	62,106			
	Level 4 vs. Level 1	1694,936	12	141,245			
	Level 5 vs. Level 1	1880,954	12	156,746			
	Level 6 vs. Level 1	4580,907	12	381,742			

Post-hoc test (Tukey HSD): efekt zvoleného stimulačního agens

Pairwise Comparisons[d]

(I) stimulační agens	(J) stimulační agens	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.[c]	95% Confidence Interval for Difference[c]	
					Lower Bound	Upper Bound
LPS	IFNg	1,938[a,b]	6,309	1,000	-15,597	19,472
	LPS+IFNg	-5,192[a,b]	6,309	1,000	-22,726	12,342
IFNg	LPS	-1,938[a,b]	6,309	1,000	-19,472	15,597
	LPS+IFNg	-7,130[a,b]	6,309	,841	-24,664	10,405
LPS+IFNg	LPS	5,192[a,b]	6,309	1,000	-12,342	22,726
	IFNg	7,130[a,b]	6,309	,841	-10,405	24,664



D) Stimulace před infekcí

Základní ANOVA pro časový vývoj MFI CD86 v čase v případě stimulace před infekcí v závislosti na zvoleném stimulačním agens a jeho dávce:

Tests of Within-Subjects Effects[a]

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Sphericity Assumed	20887,858	5	4177,572	48,154	,000	,801
	Greenhouse-Geisser	20887,858	3,047	6854,144	48,154	,000	,801
čas * stimulace	Sphericity Assumed	7368,613	10	736,861	8,494	,000	,586
	Greenhouse-Geisser	7368,613	6,095	1208,969	8,494	,000	,586
čas * lps * stimulace	Sphericity Assumed	195,098	5	39,020	,450	,812	,036
	Greenhouse-Geisser	195,098	3,047	64,020	,450	,722	,036
čas * ifng * stimulace	Sphericity Assumed	1197,469	5	239,494	2,761	,026	,187
	Greenhouse-Geisser	1197,469	3,047	392,937	2,761	,055	,187
Error(čas)	Sphericity Assumed	5205,246	60	86,754			
	Greenhouse-Geisser	5205,246	36,570	142,337			

Jednoduché kontrasty (aktuální měření ve srovnání se vstupní hodnotu) v jednotlivých situacích:

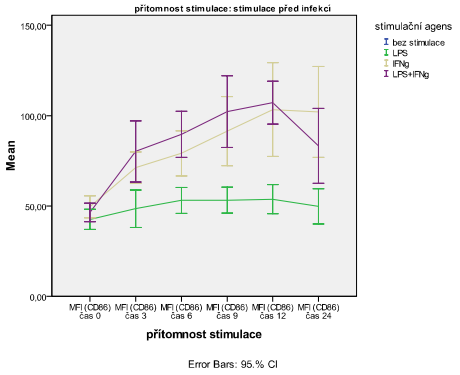
Tests of Within-Subjects Contrasts[a]

Source	čas	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Level 2 vs. Level 1	8200,644	1	8200,644	47,732	,000	,799
	Level 3 vs. Level 1	14928,028	1	14928,028	188,273	,000	,940
	Level 4 vs. Level 1	25189,509	1	25189,509	113,807	,000	,905
	Level 5 vs. Level 1	33441,453	1	33441,453	201,585	,000	,944
	Level 6 vs. Level 1	18850,813	1	18850,813	72,877	,000	,859
čas * stimulace	Level 2 vs. Level 1	2344,575	2	1172,288	6,823	,010	,532
	Level 3 vs. Level 1	3240,525	2	1620,262	20,435	,000	,773
	Level 4 vs. Level 1	6419,368	2	3209,684	14,501	,001	,707
	Level 5 vs. Level 1	8632,310	2	4316,155	26,018	,000	,813
	Level 6 vs. Level 1	6344,866	2	3172,433	12,265	,001	,671
čas * lps * stimulace	Level 2 vs. Level 1	10,454	1	10,454	,061	,809	,005
	Level 3 vs. Level 1	82,956	1	82,956	1,046	,327	,080
	Level 4 vs. Level 1	74,624	1	74,624	,337	,572	,027
	Level 5 vs. Level 1	136,041	1	136,041	,820	,383	,064
	Level 6 vs. Level 1	121,860	1	121,860	,471	,506	,038
čas * ifng * stimulace	Level 2 vs. Level 1	18,691	1	18,691	,109	,747	,009
	Level 3 vs. Level 1	147,114	1	147,114	1,855	,198	,134
	Level 4 vs. Level 1	615,499	1	615,499	2,781	,121	,188
	Level 5 vs. Level 1	898,661	1	898,661	5,417	,038	,311
	Level 6 vs. Level 1	1562,352	1	1562,352	6,040	,030	,335
Error(čas)	Level 2 vs. Level 1	2061,667	12	171,806			
	Level 3 vs. Level 1	951,470	12	79,289			
	Level 4 vs. Level 1	2656,028	12	221,336			
	Level 5 vs. Level 1	1990,713	12	165,893			
	Level 6 vs. Level 1	3103,984	12	258,665			

Post-hoc test (Tukey HSD): efekt zvoleného stimulačního agens

Pairwise Comparisons[d]

(I) stimulační agens	(J) stimulační agens	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.[c]	95% Confidence Interval for Difference[c]	
					Lower Bound	Upper Bound
LPS	IFNg	-32,633[*,a,b]	3,492	,000	-42,338	-22,928
	LPS+IFNg	-34,682[*,a,b]	3,492	,000	-44,387	-24,977
IFNg	LPS	32,633[*,a,b]	3,492	,000	22,928	42,338
	LPS+IFNg	-2,049[a,b]	3,492	1,000	-11,754	7,656
LPS+IFNg	LPS	34,682[*,a,b]	3,492	,000	24,977	44,387
	IFNg	2,049[a,b]	3,492	1,000	-7,656	11,754



4.4.2. Relativní vzestup MFI CD86 po 24 hodinách (ΔMFI(24) CD86) v závislosti na zvoleném modelu

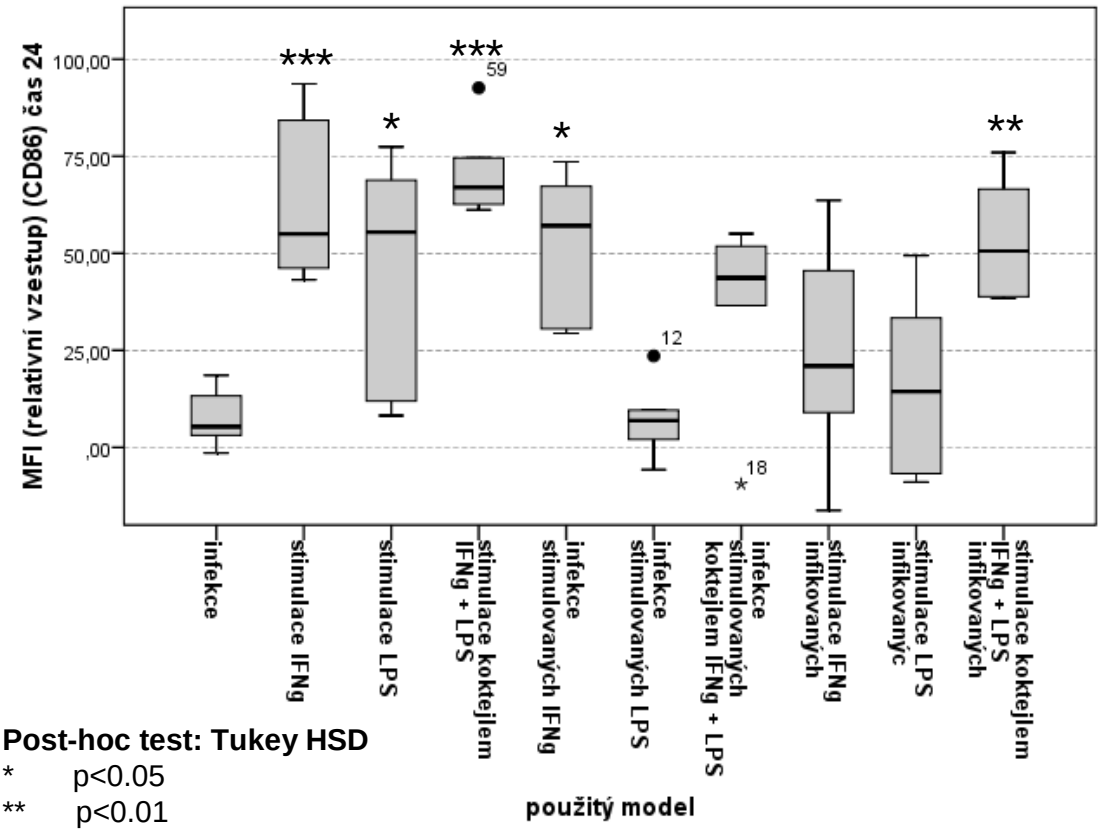
Základní ANOVA pro vztah zvoleného modelu stimulace a infekce (časový model x stimulační agens) na změnu MFI CD86 v čase 24 hod.:

ANOVA

MFI (absolutní vzestup) (CD86) čas 24

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28681,268	9	3186,808	7,760	,000
Within Groups	20534,769	50	410,695		
Total	49216,037	59			

Krabičkový graf: relativní vzestup exprese CD86 po 24 hodinách v závislosti na podmínkách infekce a stimulace (pro post-hoc testy byla jako referenční zvolena změna při samotné infekci)



Post-hoc test: Tukey HSD

* p<0.05

** p<0.01

*** p<0.001

4.5. Závislost kombinace fenotypových změn (relativní vzestup ΔMFI) CD54, CD16/32 a CD86 na čase, zvoleném časovém schématu a stimulačním agens

Základní ANOVA:

Tests of Within-Subjects Effects

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
fenotyp * čas	Sphericity Assumed	17116,897	10	1711,690	25,836	,000	,341
	Greenhouse-Geisser	17116,897	5,169	3311,170	25,836	,000	,341
fenotyp * čas * stim_2	Sphericity Assumed	22976,913	20	1148,846	17,340	,000	,410
	Greenhouse-Geisser	22976,913	10,339	2222,379	17,340	,000	,410
fenotyp * čas * stimulace	Sphericity Assumed	5099,066	20	254,953	3,848	,000	,133
	Greenhouse-Geisser	5099,066	10,339	493,193	3,848	,000	,133
fenotyp * čas * stim_2 * stimulace	Sphericity Assumed	11751,477	40	293,787	4,434	,000	,262
	Greenhouse-Geisser	11751,477	20,678	568,315	4,434	,000	,262
Error(fenotyp*čas)	Sphericity Assumed	33126,660	500	66,253			
	Greenhouse-Geisser	33126,660	258,472	128,163			

(stim_2: samotná infekce / stimulace před infekcí / stimulace po infekci / samotná stimulace; stimulace: žádná / LPS / IFNγ / LPS + IFNγ)

Post-hoc test pro obecný efekt modelu stimulace a infekce (Bonferroni)

(I) přítomnost stimulace	(J) přítomnost stimulace	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.[c]
bez stimulace	stimulace po infekci	-13,478*,a,b	3,045	,000
	stimulace před infekcí	-16,279*,a,b	3,045	,000
	samotná stimulace	-19,893*,a,b	3,045	,000
stimulace po infekci	bez stimulace	13,478*,a,b	3,045	,000
	stimulace před infekcí	-2,801,a,b	2,153	1,000
	samotná stimulace	-6,416*,a,b	2,153	,027
stimulace před infekcí	bez stimulace	16,279*,a,b	3,045	,000
	stimulace po infekci	2,801,a,b	2,153	1,000
	samotná stimulace	-3,615,a,b	2,153	,596
samotná stimulace	bez stimulace	19,893*,a,b	3,045	,000
	stimulace po infekci	6,416*,a,b	2,153	,027
	stimulace před infekcí	3,615,a,b	2,153	,596

Post-hoc test pro obecný efekt stimulačního agens (Bonferroni)

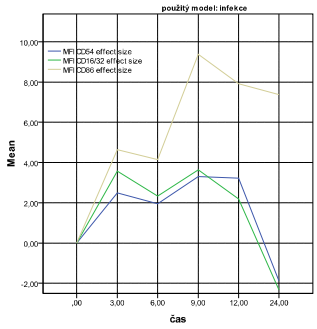
(I) stimulační agens	(J) stimulační agens	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.[c]
bez stimulace	LPS	-10,232[*,a,b]	3,045	,009
	IFNg	-14,340[*,a,b]	3,045	,000
	LPS+IFNg	-25,078[*,a,b]	3,045	,000
LPS	bez stimulace	10,232[*,a,b]	3,045	,009
	IFNg	-4,109[a,b]	2,153	,372
	LPS+IFNg	-14,846[*,a,b]	2,153	,000
IFNg	bez stimulace	14,340[*,a,b]	3,045	,000
	LPS	4,109[a,b]	2,153	,372
	LPS+IFNg	-10,737[*,a,b]	2,153	,000
LPS+IFNg	bez stimulace	25,078[*,a,b]	3,045	,000
	LPS	14,846[*,a,b]	2,153	,000
	IFNg	10,737[*,a,b]	2,153	,000

Analýza kontrastů (jednoduché a opakované) pro vzájemnou interakci faktorů: čas x fenotyp (jednotlivé znaky) x časový model pokusu x zvolené stimulační agens

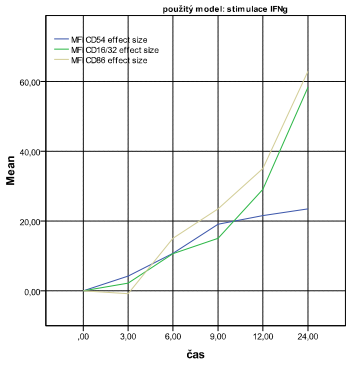
Tests of Within-Subjects Contrasts

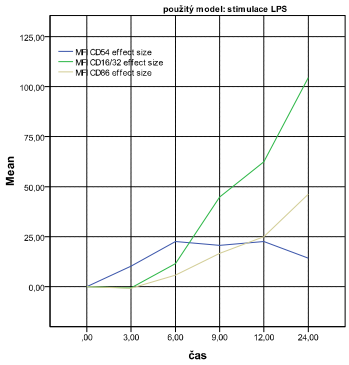
Source	fenotyp	čas	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
fenotyp * čas * stim_2 * stimulace	Level 1 vs. Level 2 (CD54 vs. CD16/32)	Level 2 vs. Level 1	1773,355	4	443,339	3,176	,021
		Level 3 vs. Level 1	2178,625	4	544,656	2,935	,030
		Level 4 vs. Level 1	2507,416	4	626,854	1,678	,170
		Level 5 vs. Level 1	4876,757	4	1219,189	3,260	,019
		Level 6 vs. Level 1	13682,134	4	3420,534	5,032	,002
	Level 2 vs. Level 3 (CD16/32 vs. CD86)	Level 2 vs. Level 1	1109,838	4	277,460	3,078	,024
		Level 3 vs. Level 1	1730,548	4	432,637	3,641	,011
		Level 4 vs. Level 1	2267,075	4	566,769	2,170	,086
		Level 5 vs. Level 1	2247,669	4	561,917	1,782	,147
		Level 6 vs. Level 1	10915,840	4	2728,960	4,843	,002
	Level 3 vs. Level 1 (CD86 vs. CD54)	Level 2 vs. Level 1	1822,493	4	455,623	4,167	,005
		Level 3 vs. Level 1	6081,718	4	1520,429	9,499	,000
		Level 4 vs. Level 1	6268,037	4	1567,009	8,430	,000
		Level 5 vs. Level 1	5141,804	4	1285,451	6,638	,000
		Level 6 vs. Level 1	2469,325	4	617,331	1,669	,172
Error(fenotyp*čas)	Level 2 vs. Level 1	Level 2 vs. Level 1	6979,063	50	139,581		
		Level 3 vs. Level 1	9279,588	50	185,592		
		Level 4 vs. Level 1	18681,520	50	373,630		
		Level 5 vs. Level 1	18701,083	50	374,022		
		Level 6 vs. Level 1	33990,426	50	679,809		
	Level 3 vs. Level 1	Level 2 vs. Level 1	5467,406	50	109,348		
		Level 3 vs. Level 1	8003,466	50	160,069		
		Level 4 vs. Level 1	9294,360	50	185,887		
		Level 5 vs. Level 1	9682,979	50	193,660		
		Level 6 vs. Level 1	18491,342	50	369,827		
	Level 1 vs. Level 2	Level 2 vs. Level 1	6979,063	50	139,581		
		Level 3 vs. Level 1	9279,588	50	185,592		
		Level 4 vs. Level 1	18681,520	50	373,630		
		Level 5 vs. Level 1	18701,083	50	374,022		
		Level 6 vs. Level 1	33990,426	50	679,809		

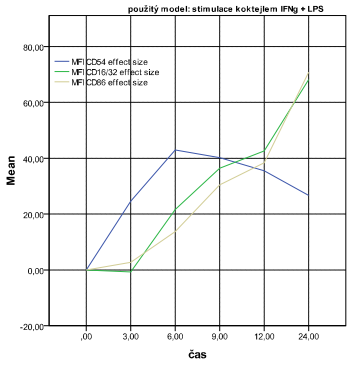
Samotná infekce:



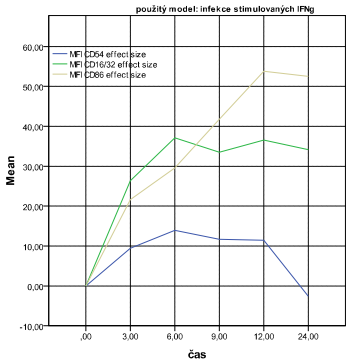
Samotná stimulace:

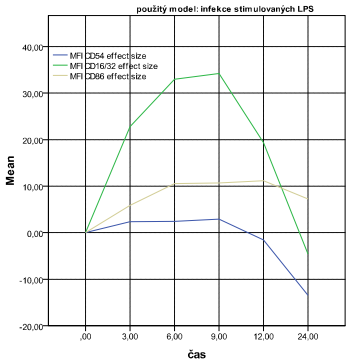


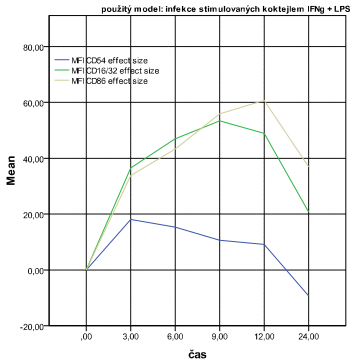




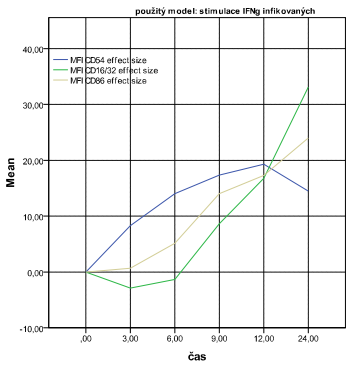
Infekce stimulovaných:

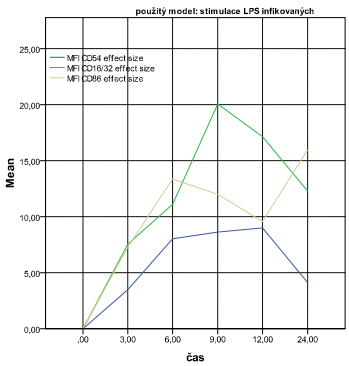


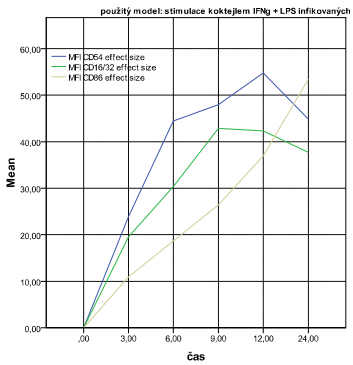




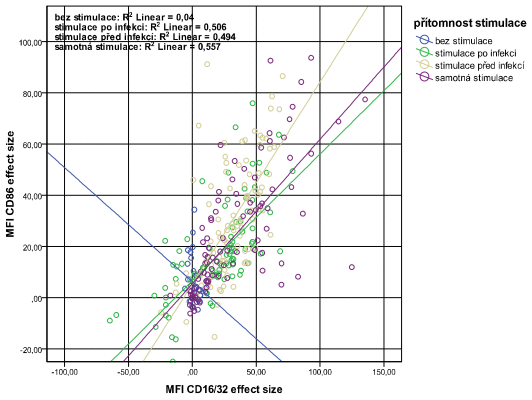
Stimulace infikovaných:

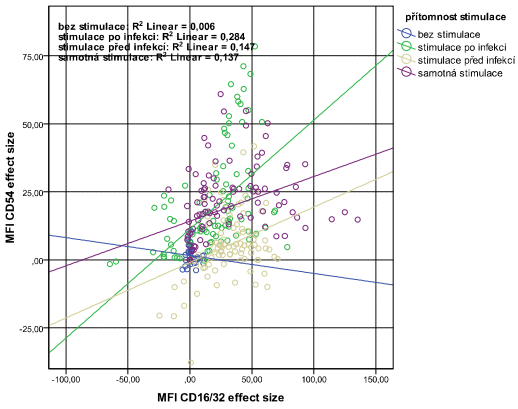






Vzájemný vztah mezi CD54 (ΔMFI), CD86 (ΔMFI) a CD16/32 (ΔMFI):



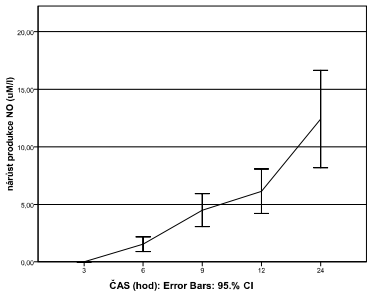


4.6. Závislost změny produkce NO na čase bez ohledu na další proměnné

Friedmanův test:

Test Statistics[a]

N	18
Chi-Square	79,624
df	5
Asymp. Sig.	,000



4.6.1. Relativní produkce NO (μM/l) v závislosti na zvoleném modelu stimulace resp. infekce a stimulačním agens

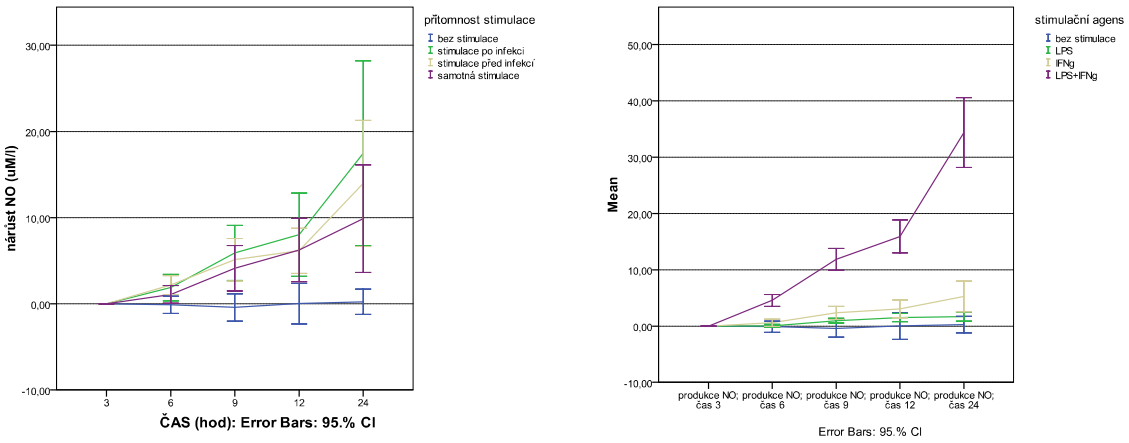
Základní ANOVA pro analýzu vlivu času a vzoru stimulace a stimulačním agens na relativní vzestup produkce NO

Tests of Within-Subjects Effects

Measure:MEASURE_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Sphericity Assumed	3910,422	4	977,605	140,588	,000	,738
	Greenhouse-Geisser	3910,422	1,575	2483,352	140,588	,000	,738
čas * stim_2	Sphericity Assumed	343,767	8	42,971	6,180	,000	,198
	Greenhouse-Geisser	343,767	3,149	109,156	6,180	,001	,198
čas * stimulace	Sphericity Assumed	6870,980	8	858,873	123,514	,000	,832
	Greenhouse-Geisser	6870,980	3,149	2181,741	123,514	,000	,832
čas * stim_2 * stimulace	Sphericity Assumed	619,663	16	38,729	5,570	,000	,308
	Greenhouse-Geisser	619,663	6,299	98,381	5,570	,000	,308
Error(čas)	Sphericity Assumed	1390,734	200	6,954			
	Greenhouse-Geisser	1390,734	78,733	17,664			

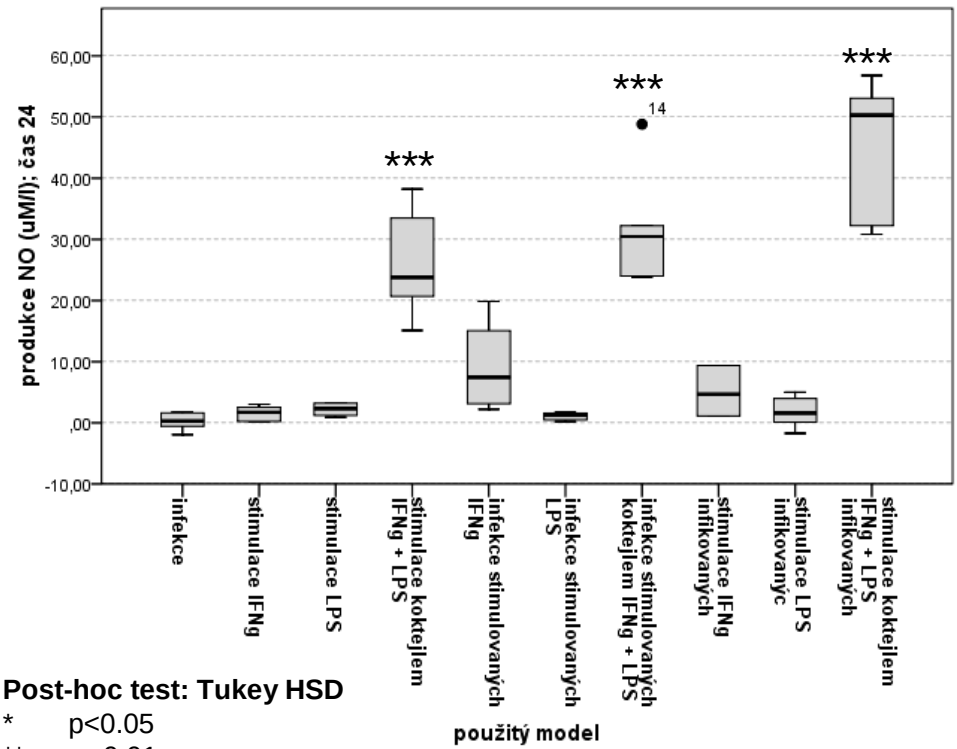
(stim_2: samotná infekce / stimulace před infekcí / stimulace po infekci / samotná stimulace; stimulace: žádná / LPS / IFNγ / LPS + IFNγ)



4.6.2. Závislost relativní produkce NO (µM/l) po 24 hodinách s ohledem na zvolený model stimulace a infekce

Kruskal-Wallisův test

Test Statistics[a,b]	
	produkce NO; čas 24
Chi-Square	46,321
df	9
Asymp. Sig.	,000



Post-hoc test: Tukey HSD

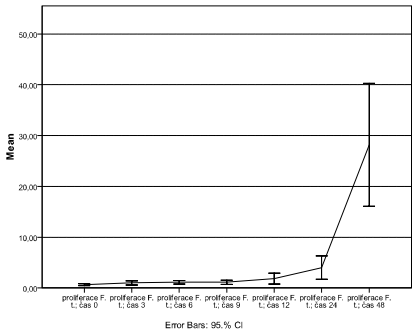
* p<0.05
** p<0.01
*** p<0.001

4.7. Závislost proliferace *F.t.* LVS (log_{10}CFU/ml) na čase bez ohledu na další proměnné

Friedmanův test

Test Statistics[a]

N	36
Chi-Square	18,063
df	6
Asymp. Sig.	,006



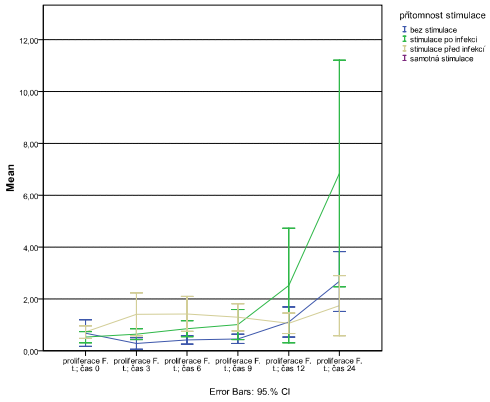
4.7.1. Závislost proliferace *F.t.* LVS (log_{10}CFU/ml) na čase, zvoleném časovém schématu a stimulačním agens

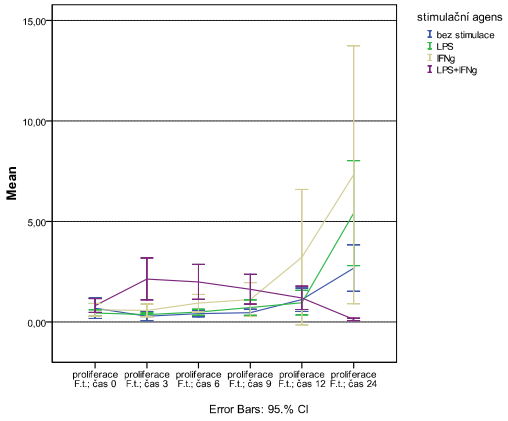
smíšená faktoriální ANOVA

Tests of Within-Subjects Effects

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
čas	Sphericity Assumed	286,271	5	57,254	12,877	,000	,269
	Greenhouse-Geisser	286,271	1,586	180,498	12,877	,000	,269
čas * stim_2	Sphericity Assumed	228,585	5	45,717	10,282	,000	,227
	Greenhouse-Geisser	228,585	1,586	144,126	10,282	,000	,227
čas * stimulace	Sphericity Assumed	371,470	10	37,147	8,355	,000	,323
	Greenhouse-Geisser	371,470	3,172	117,108	8,355	,000	,323
čas * stim_2 * stimulace	Sphericity Assumed	176,080	10	17,608	3,960	,000	,185
	Greenhouse-Geisser	176,080	3,172	55,510	3,960	,011	,185
Error(čas)	Sphericity Assumed	778,086	175	4,446			
	Greenhouse-Geisser	778,086	55,510	14,017			

(stim_2: samotná infekce / stimulace před infekcí / stimulace po infekci / samotná stimulace; stimulace: žádná / LPS / IFNγ / LPS + IFNγ)



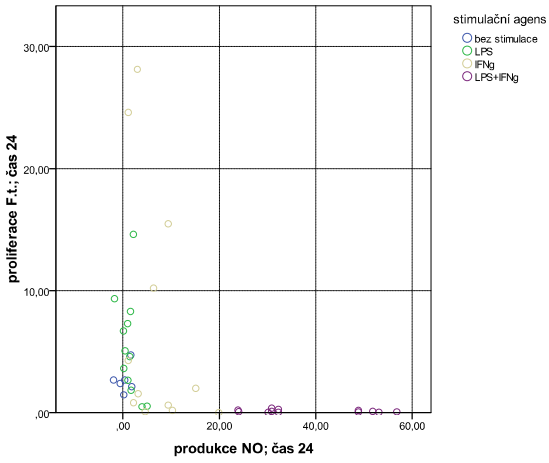


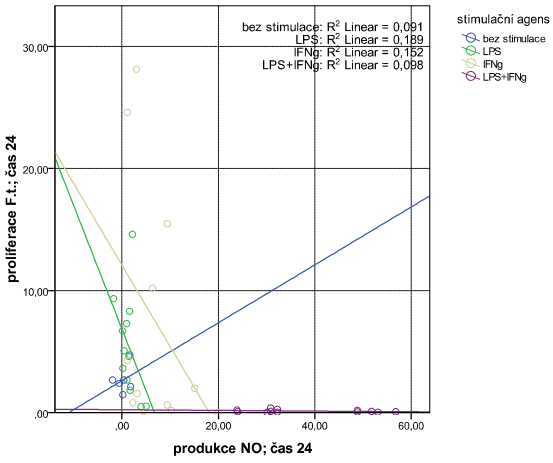
4.8. Korelace mezi relativní produkcí NO (µM/l) v čase 24 hod. a proliferací *F.t.* LVS (log_{10} CFU/ml) v čase 24

Spearmanův koeficient

Correlations

			produkce NO; čas 24	proliferace F.t.; čas 24
Spearman's rho	produkce NO; čas 24	Correlation Coefficient	1,000	-,722**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	60	42
	proliferace F.t.; čas 24	Correlation Coefficient	-,722**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	42	42

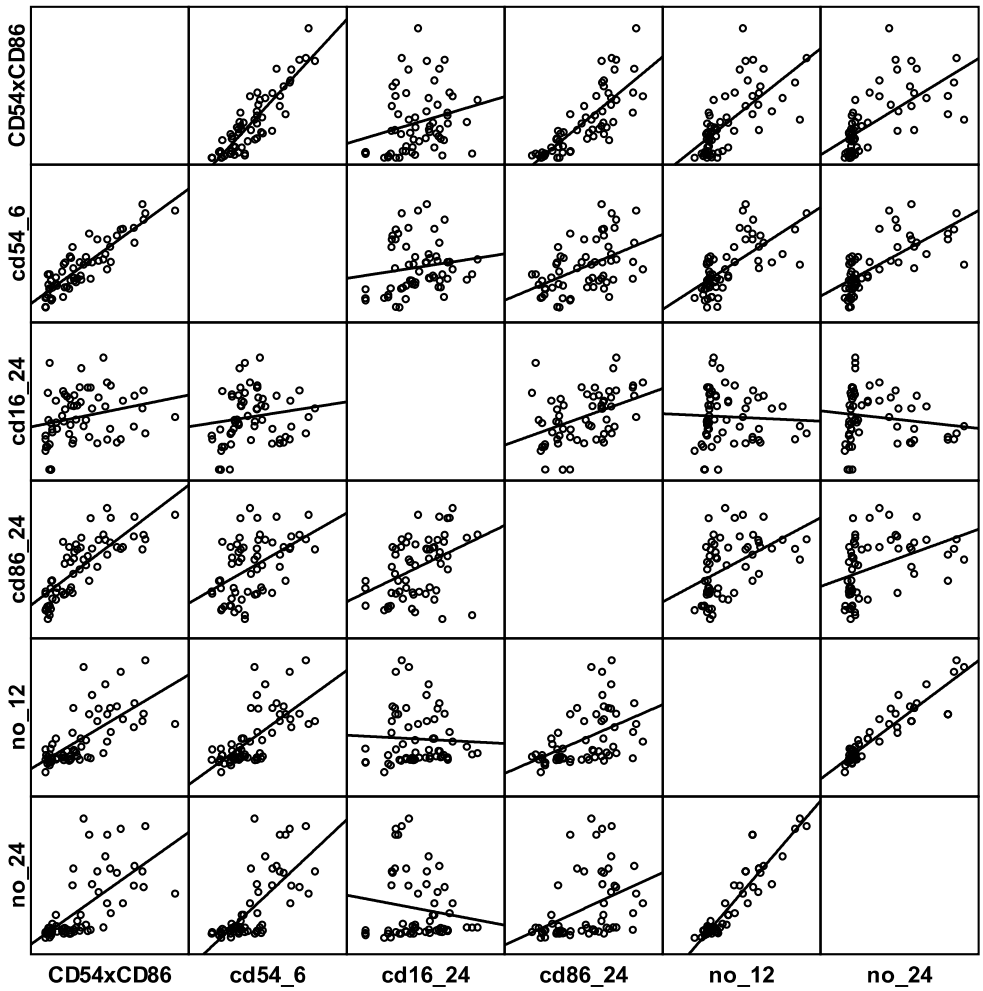




4.9. Korelace mezi fenotypovými změnami a produkcí NO

Spearmanův koeficient

		CD54xCD86	MFI (CD54) čas 6	MFI (CD16/32) čas 24	MFI (CD86) čas 24	produkce NO; čas 12	produkce NO; čas 24
CD54xCD86	Correlation Coefficient	1,000	,853**	,330*	,849**	,738**	,761**
	Sig. (2-tailed)	.	,000	,010	,000	,000	,000
MFI (CD54) čas 6	Correlation Coefficient	,853**	1,000	,241	,490**	,689**	,726**
	Sig. (2-tailed)	,000	.	,063	,000	,000	,000
MFI (CD16/32) čas 24	Correlation Coefficient	,330*	,241	1,000	,431**	,101	,109
	Sig. (2-tailed)	,010	,063	.	,001	,444	,408
MFI (CD86) čas 24	Correlation Coefficient	,849**	,490**	,431**	1,000	,551**	,537**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,001	.	,000	,000
produkce NO; čas 12	Correlation Coefficient	,738**	,689**	,101	,551**	1,000	,879**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,444	,000	.	,000
produkce NO; čas 24	Correlation Coefficient	,761**	,726**	,109	,537**	,879**	1,000
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,408	,000	,000	.



4.10. Statistická závislost přežívání *F.t.* LVS na modelových podmínkách, fenotypových změnách a produkci NO

Závislost pravděpodobnosti eliminace infekce na vstupních podmínkách: (logistická regrese)

Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	15,653[a]	,561	,804

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1[a]	LPS_IFNgd(1)	5,765	1,458	15,638	1	,000	319,000
	Constant	-3,367	1,017	10,961	1	,001	,034

Variables not in the Equation

		Score	df	Sig.
Step 1 Variables	LPSd(1)	,690	1	,406
	IFNgd(1)	1,552	1	,213
Overall Statistics		1,552	2	,460

Classification Table[a]

Observed		Predicted		
		Eliminace F.t.		Percentage Correct
		,00	1,00	
Step 1 Eliminace F.t.	,00	29	1	96,7
	1,00	1	11	91,7
Overall Percentage				95,2

Závislost pravděpodobnosti eliminace infekce na produkci NO (μM/l) v čase 24 hod.

Model Summary

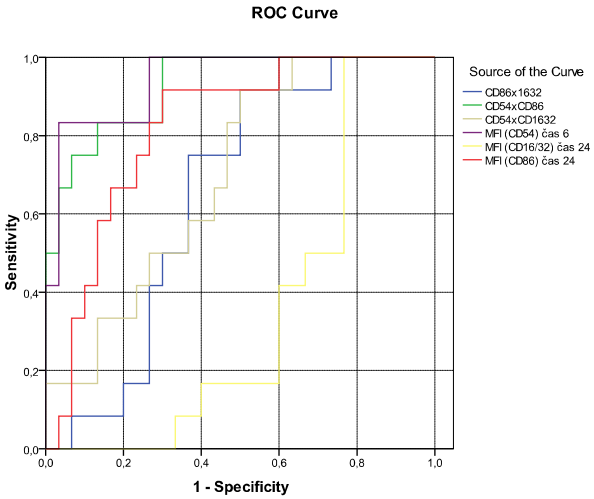
Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	17,865[a]	,538	,770

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1[a]	no_24	,180	,054	11,148	1	,001	1,197
	Constant	-3,928	1,151	11,638	1	,001	,020

Classification Table[a]

Observed		Predicted		
		Eliminace F.t.		Percentage Correct
		,00	1,00	
Step 1 Eliminace F.t.	,00	29	1	96,7
	1,00	1	11	91,7
Overall Percentage				95,2

ROC analýza možného využití vybraných fenotypových charakteristik k predikci eliminace infekce:



Area Under the Curve

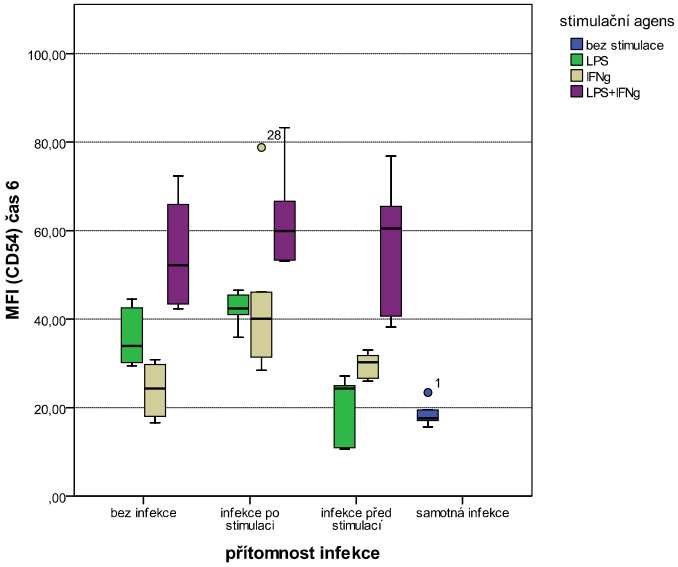
Test Result Variable(s)	Area	Std. Error[a]	Asymptotic Sig.[b]	Asymptotic 95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
CD86x1632	,650	,084	,133	,485	,815
CD54xCD86	,928	,040	,000	,839	1,000
CD54xCD1632	,697	,082	,048	,536	,858
MFI (CD54) čas 6	,942	,036	,000	,000	1,000
MFI (CD16/32) čas 24	,350	,084	,133	,186	,514
MFI (CD86) čas 24	,819	,067	,001	,688	,951

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s)	Positive if Greater Than or Equal To[a]	Sensitivity	1 - Specificity
CD54xCD86	479,6620	1,000	1,000
	2921,0440	,833	,167
	3057,4875	,833	,133
	3243,2087	,750	,133
	9594,0406	,000	,000
CD54xCD1632	240,9448	1,000	1,000
	2852,3992	,833	,500
	3005,7859	,833	,467
	3087,9345	,750	,467
	8458,1840	,000	,000
MFI (CD54) čas 6	9,6500	1,000	1,000
	36,7200	1,000	,300
	37,8500	1,000	,267
	39,4550	,917	,267
	84,2400	,000	,000
MFI (CD86) čas 24	24,8500	1,000	1,000
	65,8725	,833	,300
	69,2900	,833	,267
	71,3100	,750	,267
	129,3500	,000	,000

4.11. Efekt infekce na MFI CD54 v šesté hodině, CD86 ve 24. hodině a index MFI CD54(6) x CD86(24)

A) CD54 v 6. hodině:



Tests of Between-Subjects Effects

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	13571,592[a]	9	1507,955	15,157	,000	,732
inf_2	2013,110	2	1006,555	10,118	,000	,288
stimulace	7770,496	2	3885,248	39,053	,000	,610
inf_2 * stimulace	1001,239	4	250,310	2,516	,053	,168
Error	4974,302	50	99,486			
Total	109441,273	60				
Corrected Total	18545,894	59				

pozn.: Tukey HSD: stimulace IFNγ vs. ifekce stimulovaných IFNγ (p=0,03)

Pravděpodobnost dosažení kritické hodnoty MFI po 6 hodinách vlivem infekce:

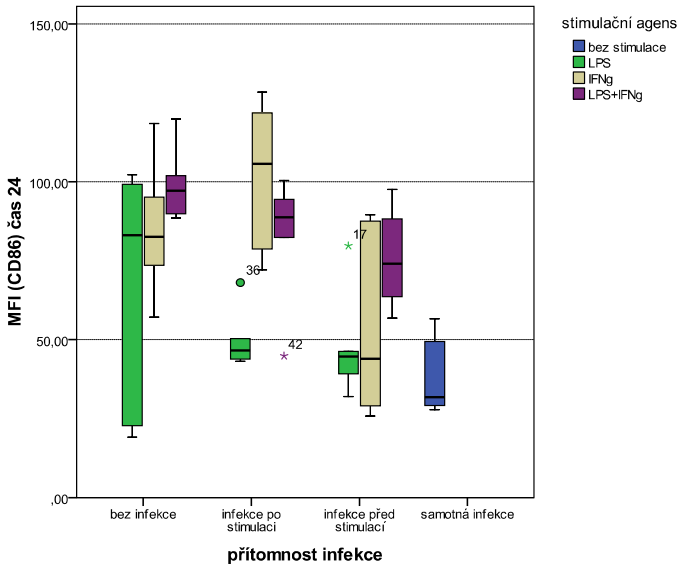
Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	66,715[a]	,237	,316

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1[a]	Bez infekce			7,024	3	,071	
	Inf. po stimulaci	1,476	,739	3,986	1	,046	4,375
	Inf. před stimulací	-,470	,689	,465	1	,495	,625
	Samotná infekce	-20,980	16408,713	,000	1	,999	,000
	Constant	-5,217	4102,178	,000	1	,999	,005

B) CD86 ve 24. hodině:



Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:MFI (CD86) čas 24

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	27164,405[a]	9	3018,267	6,690	,000	,546
inf_2 * stimulace	4309,107	4	1077,277	2,388	,063	,160
inf_2	6253,818	2	3126,909	6,931	,002	,217
stimulace	9600,163	2	4800,082	10,639	,000	,299
Error	22558,206	50	451,164			
Total	345391,673	60				
Corrected Total	49722,611	59				

pozn.: Tukey HSD: změny hodnot MFI v jednotlivých situacích vlivem infekce jsou nesignif.

Pravděpodobnost dosažení kritické hodnoty MFI po 24 hodinách vlivem infekce:

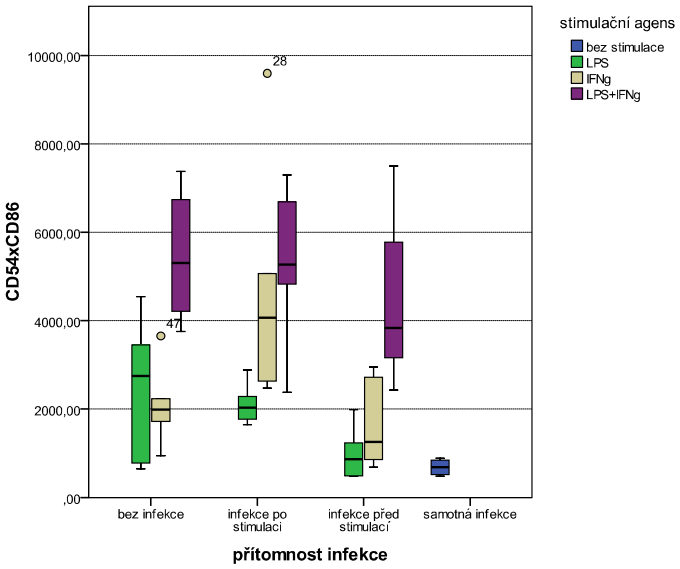
Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	64,334[a]	,262	,351

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1[a]	Bez infekce			6,759	3	,080	
	Inf. po stimulaci	-1,157	,796	2,114	1	,146	,314
	Inf. před stimulací	-2,061	,796	6,705	1	,010	,127
	Samotná infekce	-22,812	16408,713	,000	1	,999	,000
	Constant	-4,898	4102,178	,000	1	,999	,007

C) index CD54(6) x CD86(24)



Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:CD54xCD86

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	1,751E8	9	1,946E7	9,583	,000	,633
stimulace * inf_2	1,739E7	4	4348658,596	2,142	,089	,146
stimulace	9,713E7	2	4,857E7	23,919	,000	,489
Inf_2	2,546E7	2	1,273E7	6,269	,004	,200
Error	1,015E8	50	2030420,868			
Total	8,092E8	60				
Corrected Total	2,766E8	59				

pozn.: Tukey HSD: změny hodnot MFI v jednotlivých situacích vlivem infekce jsou nesignif.

Pravděpodobnost dosažení kritické hodnoty indexu po 6 a 24 hodinách vlivem infekce:

Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	71,177[a]	,135	,183

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1[a]	Bez infekce			2,353	3	,502	
	Inf. po stimulaci	,000	,667	,000	1	1,000	1,000
	Inf. před stimulací	-,956	,707	1,829	1	,176	,385
	Samotná infekce	-21,203	16408,713	,000	1	,999	,000
	Constant	-5,540	4102,178	,000	1	,999	,004

4.12. Pravděpodobnost eliminace infekce při dosažení kritických hodnot sledovaných fenotypových parametrů

Logistická regrese:

A) MFI CD54 v 6. hodině větší nebo roven 37,85

Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	26,920[a]	,426	,611

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1[a]	CD54activ(1)	21,608	8569,170	,000	1	,998	2,423E9
	Constant	-10,399	4284,585	,000	1	,998	,000

B) MFI CD86 ve 24. hodině větší nebo roven 69,29

Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	38,499[a]	,244	,350

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1[a]	CD86activ(1)	2,621	,878	8,917	1	,003	13,750
	Constant	-1,087	,439	6,139	1	,013	,337

C) index MFICD54 v 6. hodině X MFI CD86 ve 24. hodině větší nebo roven 3057,4875

Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	31,161[a]	,365	,524

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1[a]	index5486_activ(1)	3,481	,943	13,640	1	,000	32,500
	Constant	-,824	,471	3,059	1	,080	,439

5. ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE

5.1. Modelování vzájemného vztahu mezi hostitelem a patogenem *in vitro*

Pro studium vzájemného vztahu mezi hostitelem a invadujícím intracelulárním parazitem – *F.t.* bylo vyvinuto velké množství *in vitro* modelů. Využití myší monocyto-makrofágové buněčné linie J774.2 a bakterie *F. tularensis* LVS (kmen odvozený od subtypu *F. tularensis, subsp. holarctica*) patří mezi nejpoužívanější. Mezi jeho výhody patří velká receptorová a funkční stabilita myších buněk v čase a při opakovaných pasážích, nízká virulence kmene LVS pro lidské buňky (a tudíž i bezpečnost) a naopak vysoká infekciozita pro použité myší makrofágy[148]. Podstatou použitého modelu je vytváření specifických experimentálních podmínek (prediktory či nezávisle proměnné) a měření zvolených parametrů (výstupní nebo též závisle proměnné) s následnou analýzou vzájemných vztahů a závislostí extrapolovatelných na celek. Vzhledem k jeho jednoduchosti jsou minimalizovány rušivé (matoucí) faktory a výsledky jsou tak dobře interpretovatelné. Je možné navíc velmi dobře provádět opakovaná měření v čase, sledovat dynamiku změn a zvýšit tak statistickou sílu při následné analýze (t.j. pravděpodobnost, že existující efekty budou skutečně označeny jako statisticky významné). Je však třeba upozornit i na nesporné nevýhody – model je zaměřen pouze na izolovanou buněčnou populaci. Simplifikace vzájemného vztahu mezi bakterií a hostitelem usnadňuje interpretaci nálezů nicméně vzdaluje výsledky od reality. Je třeba rovněž zmínit, že i statisticky významný test v pravém smyslu slova nevypovídá o podstatě jevu či kauzalitě, která je problémem daleko přesahujícím simplifikované biologické a následně statistické modelování. V následujících kapitolách budou interpretovány hlavní výsledky z analýz statistických modelů a dávány do souvislostí s poznatky o patogenezi infekce *F.t.*

5.2. Změny exprese jednotlivých znaků v závislosti na čase a dalších faktorech

5.2.1. Exprese CD54

Molekula CD54 (viz. 4.1.1.; 1-3) vykazuje vysoce signifikantní závislost exprese na čase bez ohledu na další faktory, $F(2,74; 153,23)=30,9$, $p<0.001$ (vzhledem k porušení podmínek sféricity dat, jsou všechny následující výsledky korigovány dle Greenhouse-Geissera, viz. kap. 4.2., základní ANOVA). Časové změny MFI CD54 jsou navíc signifikantně závislé na zvoleném časovém modelu pokusu (t.j. samotná infekce, samotná

stimulace, stimulace infikovaných či infekce stimulovaných), F(8,21; 153,23)=9,84, p<0.001. Analýza kontrastů v případě jednoduchého efektu času prokázala, že při srovnání s referenční vstupní hodnotou jsou všechny následující signifikantně odlišné (jednoduchý kontrast) a závislost má kvadratický charakter (polynomiálni kontrast). Nástup indukce exprese je velice rychlý a svého maxima zpravidla dosahuje již během šesti hodin.

Díky post-hoc analýze jednoduchého efektu časových modelů na průměrnou expresi CD54 (Bonferroniho test) je zřejmé, že jakákoli forma stimulace statisticky významně mění průměrnou expresi CD54 ve srovnání se samotnou infekcí. V tomto duchu je možné rovněž tvrdit, že přítomnost infekce v systému statisticky významně ovlivňuje průměrnou MFI CD54 a to v případě, že je infekce přidána až ke stimulovaným buňkám, rozdíl mezi samotnou stimulací a stimulací po infekci je nevýznamný.

Vzhledem k faktu, že časový průběh exprese CD54 významně závislý na zvoleném časovém modelu pokusu, byla další analýza (stejně jako pro všechny osatatní povrchové znaky) vedena samostatně pro všechny čtyři základní situace (viz. kap. 4.2.1).

V případě samotné infekce docházelo sice k časově závislým změnám exprese CD54, nicméně detailnější analýza kontrastů nepokázala charakteristické signifikantní změny v jednotlivých časových intervalech (viz. kap. 4.2.1. A).

Oproti tomu v případě samotné stimulace docházelo k vysoce signifikantním změnám a to jak v případě jednoduchého efektu času, tak v případě interakce mezi časem a zvoleným stimulačním agens (LPS, IFNγ, LPS+IFNγ), F (4; 24)=13.8, p<0,001, partial η^2=0,7 (viz. kap. 4.2.1. B). Pokud byla zvlášť hodnocena i dávka použitého stimulačního agens, byl prokázán signifikantní rozdíl pouze v případě IFNγ (100 IU vs. 1000 IU/ml média), F (2; 24)= 3,58, p=0,043, partial partial η^2=0,23. Při analýze jednoduchého kontrastu se ukazuje, že tento rozdíl je vyjádřen pouze v posledním pozorovaném časovém úseku (24 hod.). Jinými slovy, signifikantní rozdíl při průběhu stimulace IFNγ mezi oběma dávkami je přítomen pouze hodnotíme-li relativní vzestup MFI v čase 24 hod. Díky post-hoc analýze (Tukey HSD) byly navíc hodnoceny jednoduché efekty jednotlivých stimulačních agens. Uvedený test prokázal, že není signifikantní rozdíl v efektu LPS a IFNγ na průměrnou expresi CD54, ale je vysoce signifikantní rozdíl mezi stimulací LPS (resp. IFNγ) a jejich kombinací (LPS + IFNγ) (p=0,006; p=0,002). Tuto modelovou situaci (samotnou stimulaci) je možno považovat za pozitivní kontrolu v dalších analýzách hodnotících efekt přidané infekce (před stimulací či k předem stimulovaným buňkám).

Pokud byly stimulovány již předem infikované buňky, byl opět přítomen významný efekt času F(1,78; 21,4)=54,4, p<0,001, partial η^2=0,82 tak interakce mezi časem a zvoleným stimulačním agens F (3,57; 21,4)=12,4, p<0,001, partial η^2=0,67 (viz. kap. 4.2.1. C). Efekt dávky jednotlivých stimulačních agens je nesignifikantní. Post-hoc test jednoduchých efektů (Tukey HSD) prokázal opět signifikantní rozdíl mezi efektem kombinace LPS+IFNγ a samotným LPS či IFNγ (p<0,001; p=0,002). I v tomto případě nebyl signifikantní rozdíl mezi efekem samotného LPS a IFNγ, i když z grafického znázornění je patrný trend indukovat vyšší hladiny CD54 v případě přidání IFNγ. Jak vyplynulo z předchozích výpočtů, je průměrná exprese CD54 v případě stimulace předem infikovaných buněk nesignifikantně odlišná od samotné stimulace.

Jestliže bylo stimulační agens přidáno k buňkám před kontaktem s infekcí (infekce stimulovaných buněk), byl patrný pouze signifikantní efekt času F(2,87; 34,5)=17,9, p<0,001, partial η^2=0,6 (viz. kap. 4.2.1. D), efekt zvoleného stimulačního agens byl celkově nesignifikantní i když post-hoc test jednoduchých efektů prokázal signifikantně rozdílnou průměrnou expresi CD54 v případě přidání kombinace IFNγ+LPS ve srovnání se samotným LPS a IFNγ (p=0,009; p=0,006). Závěrem lze konstatovat, že přidání infekce ke stimulovaným buňkám (bez ohledu na zvolené stimulační agens) statisticky významně změní průměrnou expresi CD54 ve srovnání se samotnou stimulací. Rozdíl je významný i u samotné infekce, nicméně lze předpokládat, že je způsoben pouze vyššími vstupními hodnotami MFI CD54 v čase 0 (z důvodu předchozí stimulace).

Změny exprese CD54 jsou velmi rychlé a již po 6ti hodinách kontaktu se stimulačním agens dosahují téměř svého maxima, po 24 hod. již dochází k mírnému poklesu, který pravděpodobně souvisí s imunomodulačním efektem produkovaného NO (viz. dále). Cíleně byla proto hodnocena změna MFI po 6ti hodinách v závislosti na zvoleném časovém modelu a stimulačním agens. Výsledkem jsou vysoce signifikantní rozdíly F(9; 59)=14,2, p<0,001 (viz. kap. 4.2.2.). Pokud byla za referenční hladinu zvolena změna vyvolanou samotnou infekcí (negativní kontrola), lze říci, že nejvýznamnější rozdíl je v případě samotné stimulace kombinací IFNγ+LPS a stimulace kombinací IFNγ+LPS infikovaných buněk (v obou případech p<0,001).

5.2.2. Exprese CD16/32

Exprese CD16/32 byla analyzována stejným způsobem, jako CD54 (viz. kap. 4.1.2.). I zde je přítomna vysoce signifikantní závislost na čase bez ohledu na další

faktory, $F(2,13; 119,2)=32,9$, $p<0.001$ (Vzhledem k porušení podmínek sféricity dat, jsou i v případě CD16/32 všechny následující výsledky korigovány dle Greenhouse-Geissera) (viz. kap. 4.3.). Časové změny MFI CD16/32 jsou signifikantně závislé i na zvoleném modelu stimulace a infekce (t.j. samotná infekce, samotná stimulace, stimulace infikovaných či infekce stimulovaných), $F(6,39; 119,2)=19,6$, $p<0.001$. Analýza kontrastů v případě jednoduchého efektu času prokázala, že při srovnání s referenční vstupní hodnotou jsou všechny následující signifikantně odlišné (jednoduchý kontrast) a závislost má lineární charakter (polynomiální kontrast). Nástup indukce exprese je ve srovnání s CD54 pomalejší a svého maxima zpravidla dosahuje po 24 hodinách stimulace.

Díky post-hoc analýze jednoduchého efektu jednotlivých časových modelů na průměrnou expresi CD16/32 (Bonferroniho test) je zřejmé, že jakákoli forma stimulace statisticky významně mění průměrnou MFI CD16/32 ve srovnání se samotnou infekcí. V tomto duchu je možné rovněž tvrdit, že přítomnost infekce v systému statisticky významně ovlivňuje expresi CD16/32 a to (podobně jako v případě CD54) pouze v případě, že je infekce přidána až ke stimulovaným buňkám (bez ohledu na stimulační agens). Rozdíl mezi průměrnou expresí CD16/32 u samotné stimulace a stimulace po infekci je (opět bez znalosti stimulačního agens) nevýznamný.

I u CD16/32 byla další analýza vedena samostatně pro všechny čtyři základní situace.

V případě samotné infekce docházelo sice k časově závislým změnám exprese CD16/32, nicméně detailnější analýza kontrastů nepokázala charakteristické signifikantní změny v jednotlivých časových intervalech (stejně jako u CD54) (viz. kap. 4.3.1.A).

Oproti tomu v případě samotné stimulace docházelo k vysoce signifikantním změnám a to jak v případě jednoduchého efektu času, tak v případě interakce mezi časem a zvoleným stimulačním agens (LPS, IFNγ, LPS+IFNγ), $F(2,95; 17,7)=10,9$, $p<0,001$, partial $\eta^2=0,64$. Pokud byla zvlášť hodnocena i dávka použitého stimulačního agens, byl prokázán signifikantní rozdíl v případě IFNγ (100 IU vs. 1000 IU /ml média), $F(1,47; 17,7)=9,42$, $p=0,003$, partial $\eta^2=0,44$ i LPS (10 ng vs. 50 ng/ml média) $F(1,47; 17,7)=5,46$, $p=0,021$, partial $\eta^2=0,31$ (viz. kap. 4.3.1. B). Při analýze jednoduchého kontrastu se ukazuje, že tento rozdíl je vyjádřen pouze v posledním pozorovaném časovém úseku (24 hod.). Jinými slovy, signifikantní rozdíl při průběhu stimulace IFNγ či LPS mezi oběma dávkami je přítomen pouze hodnotíme-li relativní vzestup MFI v čase 24 hod. Díky post-hoc analýze jednoduchých efektů (Tukey HSD) jednotlivých stimulačních agens bylo prokázáno, že je vysoce signifikantní rozdíl v efektu LPS a IFNγ

na průměrnou MFI CD16/32 ($p<0.001$), a mezi stimulací IFNγ a kombinací (LPS + IFNγ) ($p=0,002$). Oproti CD54 není významný rozdíl mezi průměrnou MFI CD16/32 v případě stimulace samotným LPS a kombinací LPS+IFNγ. Z grafického znázornění vyplývá (viz. kap. 4.3.1 B; post-hoc test), že největší nárůst exprese CD16/32 byla zaznamenána v případě stimulace samotným LPS.

Pokud byly stimulovány již předem infikované buňky, byl opět přítomen významný efekt času $F(1,33; 16)=54,4$, $p=0,004$, partial $\eta^2=0,44$ (viz. kap. 4.3.1. C), nicméně interakce mezi časem a zvoleným stimulačním agens včetně dávek byla nevýznamná. Post-hoc test jednoduchých efektů (Tukey HSD) prokázal nesignifikantní rozdíl mezi efektem kombinace LPS+IFNγ a samotným LPS či IFNγ. Obecně lze říci, že infekce buněk před samotnou stimulací ovlivní její průběh (anulují se signifikantní rozdíly v efektech jednotlivých stimulačních agens), i když analýza jednoduchého efektu modelu stimulace a infekce (Bonferroniho test, viz. kap. 4.3.) vykazuje nesignifikantní rozdíl mezi průměrnou expresí CD16/32 u samostatné stimulace a stimulace po infekci, podobně jako v případě CD54.

Jestliže bylo stimulační agens přidáno k buňkám před kontaktem s infekcí (infekce stimulovaných buněk), byl patrný signifikantní efekt času $F(2,68; 32,1)=37,6$, $p<0,001$, partial $\eta^2=0,76$ i interakce času se zvoleným stimulačním agens $F(5,36; 32,1)=3,94$, $p=0,006$, partial $\eta^2=0,4$ (viz. kap. 4.3.1. D). Uvedený rozdíl v efektu interakce byl patrný při hodnocení relativního vzestupu MFI CD16/32 v čase 6 hod. Post-hoc analýza jednoduchých efektů (Tukey HSD) prokázala signifikantně rozdílnou průměrnou expresi CD16/32 v případě přidání kombinace IFNγ+LPS ve srovnání se samotným LPS ($p<0,001$), ale ne samotným IFNγ. Mezi efektem LPS a IFNγ je významný rozdíl ($p=0,007$). Závěrem lze opět konstatovat, že přidání infekce ke stimulovaným buňkám (bez ohledu na zvolené stimulační agens) statisticky významně změní průměrnou expresi CD16/32 ve srovnání se samotnou stimulací (Bonferroniho test, viz. kap. 4.3.) i změny závislé na čase. Rozdíly jsou patrné i ve srovnání se samotnou infekcí či stimulací po infekci, nicméně (podobně jako v případě CD54) lze předpokládat, že uvedený rozdíl je způsoben opět zejména vyššími vstupními hodnotami MFI CD16/32 v čase 0 (z důvodu předchozí stimulace).

Změny exprese CD16/32 jsou poněkud pomalejší, než je tomu v případě CD54 a dosahují tak svého maxima až po 24 hodinách kontaktu se stimulačním agens. Byla proto cíleně dále analyzována změna MFI po 24 hodinách v závislosti na zvoleném modelu stimulace a infekce a konkrétním stimulačním agens. Výsledkem jsou opět vysoce

signifikantní rozdíly $F(9; 59)=8,7$, $p<0,001$ (viz. kap. 4.3.2). Pokud byla za referenční hladinu zvolena změna vyvolaná samotnou infekcí (negativní kontrola), lze říci, že nejvýznamnější rozdíl je v případě samotné stimulace LPS, méně již při kombinaci IFNγ+LPS či samotného IFNγ. Pokud však stimulace byla kombinována s infekcí, rozdíly v nárůstu nebyly signifikantní.

CD16/32 tedy vykazuje (ve srovnání s CD54) pomalejší nástup exprese v případě stimulace (maxima dosahuje většinou až po 24 hod., nicméně absolutní hodnoty MFI a Δ MFI jsou vyšší. Dále lze říci, že zatímco CD54 dosahuje maxima v případě stimulace kombinací LPS+IFNγ, u CD16/32 je tomu při stimulaci pomocí LPS. U obou znaků dochází k signifikantním změnám jejich časového průběhu exprese v závislosti na čase, zvoleném stimulačním agens a v případě CD16/32 i na dávce.

5.2.3. Exprese CD86

Stejně jako v případě CD54 a CD16/32 byla analyzována i exprese CD86 (viz. kap. 4.1.3.). I v tomto případě je přítomna vysoce signifikantní závislost exprese na čase bez ohledu na další faktory, $F(2,46; 137,8)=51,5$, $p<0.001$ (stejně jako u předchozích znaků jsou u CD86 všechny výsledky korigovány dle Greenhouse-Geissera, viz. kap. 4.4.). Časové změny MFI CD86 jsou signifikantně závislé i na zvoleném modelu infekce a stimulace pokusu (t.j. samotná infekce, samotná stimulace, stimulace infikovaných či infekce stimulovaných), $F(7,39; 137,7)=10$, $p<0.001$. Analýza kontrastů u jednoduchého efektu času prokázala, že ve srovnání s referenční vstupní hodnotou jsou všechny následující signifikantně odlišné (jednoduchý kontrast) a stejně tak i každá následující hodnota ve srovnání s hodnotou předchozí (opakovaný kontrast). Závislost má lineární charakter (polynomiální kontrast). Nástup indukce exprese podobně jako u CD16/32 pomalejší a svého maxima zpravidla dosahuje po 24 hodinách stimulace.

Post-hoc analýza jednoduchého efektu časových modelů na průměrnou expresi CD86 (Bonferroniho test) prokázala, že pouze stimulace před infekcí vykazuje signifikantně odlišnou průměrnou expresi CD86 od všech ostatních modelů, bez ohledu na zvolené stimulační agens. Ve zbylých situacích se průměrná MFI CD86 liší jen nevýznamně. Rozdíl mezi průměrnou expresí CD86 v případě stimulace předcházející infekci od ostatních modelů je pravděpodobně (stejně jako u předchozích znaků) zejména z důvodu vyšších hladin MFI v čase 0.

I u CD86 byla další analýza vedena samostatně pro všechny čtyři základní situace.

V případě samotné infekce byly časově závislé změny MFI CD86 statisticky nevýznamné (viz. kap. 4.4.1. A).

Při samotné stimulaci docházelo sice k vysoce signifikantním změnám v případě jednoduchého efektu času F(1,85; 22,2))=77,8, p<0,001, partial η^2=0,87 (viz. kap. 4.4.1. B), nicméně efekt zvoleného stimulačního agens a jeho dávky je nevýznamný. Jednoduché kontrasty tento fakt dokumentují statistickou významností elevace exprese ve srovnání se vstupní hodnotou od šesté hodiny stimulace po celý zbytek sledování. I přes nesignifikantní efekt zvoleného stimulačního agens je dle grafického znázorněný patrný trend k vyšší expresím v případě stimulace kombinací LPS+IFNγ ve srovnání se samotným IFNγ a LPS.

Pokud byly stimulovány již předem infikované buňky, byl opět přítomen významný efekt času F(2,52; 30,2)=24,1, p<0,001, partial η^2=0,67, ale v této situaci již i efekt zvoleného stimulačního agens F(5,04; 30,2)=3,64, p=0,011, partial η^2=0,37 (viz. kap. 4.4.1. C). Uvedený efekt je dle analýzy jednoduchých kontrastů pro interakce času se stimulačním agens patrný zejména ve 12. a 24. hodině pokusu. V případě stimulace IFNγ je zřetelná i závislost na dávce, která se projeví ve 24. hodině pokusu. Post-hoc test jednoduchého efektu formy stimulace (Tukey HSD) však neprokázal signifikantní rozdíl mezi stimulačními agens. Obecně lze říci, že infekce buněk před samotnou stimulací ovlivní průměrnou expresi CD86 pouze nevýznamně.

Jestliže však bylo stimulační agens přidáno k buňkám před kontaktem s infekcí (infekce stimulovaných buněk), byl patrný vysoce signifikantní efekt času F(3,05; 36,6)=48,2, p<0,001, partial η^2=0,80 i interakce času se zvoleným stimulačním agens F(6,1; 36,6)=8,49, p<0,001, partial η^2=0,59 (viz. kap. 4.4.1. D). Uvedený rozdíl efektu interakce byl patrný při hodnocení relativního vzestupu MFI CD86 ve všech časových intervalech. V hodině 12 a 24 byl navíc patrný signifikantní efekt dávky IFNγ. Post-hoc analýza jednoduchých efektů (Tukey HSD) prokázala signifikantně rozdílnou průměrnou expresi CD86 v případě přidání kombinace IFNγ+LPS ve srovnání se samotným LPS (p<0,001) ale ne samotným IFNγ. Mezi efektem LPS a IFNγ je rovněž významný rozdíl (p<0,001). Opět lze říci, že přidání infekce ke stimulovaným buňkám (bez ohledu na zvolené stimulační agens) statisticky významně změní časový průběh exprese CD16/32 ve srovnání se samotnou stimulací. Průběh je odlišný i od samotné infekce či stimulace po infekci, nicméně (podobně jako v případě CD54 a CD16/32) lze předpokládat, že uvedený rozdíl je způsoben jednak vyššími vstupními hodnotami MFI CD16/32 v čase 0 (z důvodu

předchozí stimulace), ale zároveň tato situace dá vyniknout rozdílným efektům stimulačních agens na rozdíl od ostatních modelů.

Změny exprese CD86 dosahují tak svého maxima až po 24 hodinách kontaktu se stimulačním agens. Proto byla analyzována změna MFI po 24 hodinách v závislosti na zvoleném časovém modelu a stimulačním agens. Výsledkem jsou i zde vysoce signifikantní rozdíly $F(9; 59)=7,7$, $p<0,001$ (viz. kap. 4.4.2.). Pokud byla za referenční hladinu zvolena změna vyvolaná samotnou infekcí (negativní kontrola), byl nejvýznamnější rozdíl v případě samotné stimulace IFNγ a stimulace kombinací IFNγ+LPS, méně již při stimulaci samotným LPS. Významný rozdíl je i v případě stimulace koktejlem LPS+IFNγ infikovaných buněk.

Závěrem lze říci, že CD86 vykazuje (na rozdíl od CD54 a podobně jako u CD16/32 pomalejší nástup exprese v případě stimulace (maxima dosahuje většinou po 24 hod.). Dále lze říci, že zatímco CD54 dosahuje maxima v případě stimulace kombinací LPS+IFNγ, a CD16/32 při stimulaci pomocí LPS, CD86 nejvíce odpovídá jak na stimulaci kombinací LPS+IFNγ tak samotným IFNγ. U předchozích znaků dochází k signifikantním změnám průběhu jejich exprese v závislosti na čase, zvoleném stimulačním agens a na jeho dávce (v případě CD16/32 jak LPS tak IFNγ u samotné stimulace, pro CD54 pouze IFNγ), u CD86 se uvedené rozdíly (agens a dávka IFNγ) projeví pouze při infekci předem stimulovaných buněk.

5.2.4. Kombinace všech znaků

V předchozím textu byly vyhodnoceny základní zákonitosti chování jednotlivých povrchových znaků v čase v závislosti na zvoleném časovém modelu stimulace a infekce a v závislosti na stimulačním agens a jeho dávce. Nyní půjde o komplexní zhodnocení chování všech znaků (resp. jejich relativních vzestupů, ΔMFI) (příklad možnosti hodnocení ΔMFI viz. kap. 4.1.3., 3) zároveň s vyhodnocením vzájemných rozdílů v závislosti na čase, modelu stimulace a infekce a zvoleném stimulačním agens. Hodnoceny jsou nyní v rámci opakovaných měření faktory: čas (0-24 hod.) a fenotyp (změna MFI CD54; CD16/32; CD86) a zejména jejich vzájemná interakce čas x fenotyp. Pro nezávislá měření byl hodnocen efekt časového modelu stimulace (žádná stimulace / samotná stimulace / stimulace před infekcí / stimulace po infekci) a stimulačního agens (bez stimulace / LPS / IFNγ / LPS+IFNγ) a samozřejmě vzájemné interakce spolu s opakovanými měřeními, t.j. čas x fenotyp x model x stimulační agens.

Pro komplexní zhodnocení byl opět aplikován obecný lineární model s kořenovým testem - smíšená faktoriální ANOVA. Vzhledem k porušení požadavku sféricity dat je opět na všechny výsledky aplikována korekce epsilon dle Greenhouse a Geissera. Z velkého množství výsledků jsou vybrány pouze ty nejzajímavější (viz. 4.5.).

Již z první výsledkové tabulky (viz. kap. 4.5. základní ANOVA) je zřejmé, že všechny výše citované efekty a vzájemné interakce (které jsou z praktického hlediska nejdůležitější) vykazují vysoce signifikantní výsledky. Je velmi významný rozdíl v časovém průběhu jednotlivých fenotypových znaků bez ohledu na další faktory $F(5,17; 258,5)=25,8$, $p<0.001$, partial $\eta^2=0,34$. V případě interakce fenotypu s časem a modelem stimulace resp. infekce je dosaženo podobně signifikantního výsledku $F(10,3; 128,5)=17,3$, $p<0.001$, partial $\eta^2=0,41$. Přestože tento výsledek vykazuje nižší hodnotu F (čili znalost konkrétního znaku a časového intervalu spolu s modelem stimulace je méně užitečná pro odhad MFI, než tomu bylo v předchozím případě, kde nebyl časový model brán v potaz), díky hodnocení síly efektu partial η^2 je zřejmé, že tento statistický model vysvětluje 41% unikátní variability všech ΔMFI (t.j. variability, která není vysvětlitelná žádným z dalších faktorů). Oproti tomu, interakce času s fenotypem a zvoleným stimulačním agens vykazuje sice statisticky významný efekt $F(10,3; 258,5)=3,85$, $p<0.001$, partial η^2 je pouze 0,13, čili znalost uvedených proměnných vysvětluje jen 13% unikátní variability ΔMFI. O něco lépe je na tom komplexní interakce mezi fenotypem, časem, modelem stimulace a stimulačním agens, která má opět vysoce signifikantní efekt na výsledné naměření ΔMFI $F(20,7; 258,5)=4,434$, $p<0.001$, partial $\eta^2=0,26$. Uvedený výsledek je tedy možné interpretovat tak, že pokud budeme znát znak, časový interval, časový model i stimulační agens (pokud bylo použito) vysvětlíme asi čtvrtinu unikátního celkového rozptylu naměřených ΔMFI. Zbylá variabilita je ovlivněna dalšími faktory, které nebyly v našich analýzách brány v potaz.

V dalším kroku byla provedena post-hoc analýza jednoduchých efektů podle Bonferroniho k vyjádření vlastních rozdílů mezi jednotlivými modelovými situacemi a stimulačními agens. Z výsledků vyplývá (viz. kap. 4.5. post-hoc test pro obecný efekt modelu stimulace a infekce), že jakákoli forma stimulace (ať už samotná či v kombinaci s infekcí) statisticky významně ovlivní sílu změny průměrné exprese jednotlivých povrchových znaků (všechna $p<0.001$). Zajímavější je posouzení vlivu infekce přidané do systému (v jednotlivých časových schématech) ve srovnání se samotnou stimulací (viz. kap. 4.5. post-hoc test pro obecný efekt modelu stimulace a infekce). Zde je zřejmý velmi signifikantní rozdíl mezi samotnou stimulací a infekcí ($p<0.001$) a o něco méně

významný rozdíl mezi samotnou stimulací a stimulací infikovaných buněk (p=0,027). Pokud však nebereme v potaz další proměnné, je průměrná exprese dednotlivých znaků při samotné stimulaci nesignifikantně odlišná od stimulace před infekcí.

Post-hoc analýza jednoduchých efektů stimulačních agens (Bonferroni) rovněž prokázala, že přidání jakékoli formy stimulace (LPS, IFNγ či LPS+ IFNγ) statisticky velmi významně ovlivní průměrnou změnu exprese všech analyzovaných znaků, bez ohledu na to, kdy jsou měřeny a jaký model stimulace je aplikován (p=0,009, p<0.001, p<0.001). Dále je zřejmé, že efekt samotného LPS (pokud nejsou brány v potaz další faktory) se jen nesignifikantně liši od efektu IFNγ, ale oba samotné stimulační agens indukují významně nižší průměrnou změnu exprese jednotlivých znaků ve srovnání se stimulací jejich kombinací (p<0.001).

Z praktického hlediska nejzajímavější byla analýza kontrastů pro interakce všech hodnocených faktorů. Budeme-li hodnotit rozdíl v ΔMFI mezi znaky CD54 a CD16/32, pak u jednotlivých časových modelů a s použitím různých stimulátorů dochází k signifikantním rozdílům a to v hodinách 3, 6, 12 a nejvíce ve 24. hodině F(4; 50)=5,03, p=0,002. K velmi obdobně signifikantním rozdílům dochází v případě srovnání CD16/32 a CD86 s maximálním rozdílem ve 24. hodině F(4; 50)=4,84, p=0,002. Nejvýznamnější rozdíl časově závislého průběhu exprese v závislosti na vnějších podmínkách je mezi znaky CD54 a CD86, přičemž svého maxima dosahuje v šesté hodině F(4; 50)=9,5, p<0,001. Výše uvedené závěry jsou znázorněné na sadě grafů časových průběhů Δ MFI jednotlivých znaků v konkrétních situacích (model x stimulační agens). Pro přehlednost jsou grafy bez chybových úseček (viz. kap. 4.5. analýza kontrastů a grafy časových řad pro jednotlivé modely stimulace a infekce).

V případě samotné infekce dochází sice k časově závislým změnám Δ MFI jednotlivých znaků, nicméně maximální změna nepřevyšuje 10 (bezrozměrné číslo), což je zhruba o jeden řád nižší hodnota, než v případě jakékoli stimulace. Pokud jsou buňky pouze stimulovány IFNγ, je patrný poměrně vyrovnaný vzestup všech znaků, který dosahuje svého maxima po 24 hodinách a je nejvyšší pro CD16/32 a CD86. Oproti tomu stimulace samotným LPS vede k rozdílnému průběhu všech znaků. CD16/32 a CD86 oba dosahují maxima ve 24. hodině, ale s významným rozdílem, průměrná ΔMFI CD16/32 je až dvojnásobná ve srovnání s CD86. CD54 má největší nárůst již v šesté hodině, poté pozvolna klesá. Kombinace IFNγ+LPS vede k změnám, které stojí někde mezi oběma výše popisovanými průběhy. CD16/32 i CD86 harmonicky stoupají s maximem ve 24. hodině s podobnými maximy, CD54 je na vrcholu již v šesté hodině a poté pozvolna

klesá. Nárůst MFI pro CD54 je v průměru téměř dvojnásobný ve srovnání se samotným LPS. Pokud byla ke stimulovaným buňkám následně přidána infekce byl časový průběh změn všech znaků opět odlišný. V prvních šesti hodinách byl průběh přibližně podobný, nicméně poté došlo k obratu a zejména CD16/32 následně klesá při všech typech stimulací. CD86 má tendenci k vyššímu růstu, zejména, je-li ve stimulaci přítomen IFNγ (sám, či v kombinaci s LPS). Podobně reaguje i CD54, které v případě stimulace LPS před infekcí nevede k významnějšímu nárůstu exprese, na rozdíl od stimulace IFNγ či IFNγ+LPS, kdy jeho exprese roste na maximum během 3-6 hodin. Poslední testovanou situací byla stimulace již předem infikovaných buněk. Zjednodušeně lze říci, že průběh se velmi podobá samotné stimulaci nicméně s nižšími maximy. U stimulace samotným LPS navíc (podobně jako u infekce stimulovaných buněk) dochází k obratu v deváté hodině s následným poklesem. Největší nárůsty všech znaků byly pozorovány v případě stimulace kombinací LPS+IFNγ. Vzhledem k enormnímu množství zpracovávaných dat a absence statisticky významného efektu dávky pro většinu situací a znaků nebyly tyto zvlášť hodnoceny.

Pro další analýzy (zejména logistickou regresi) bylo nezbytné ohodnotit kolinearitu jednotlivých znaků v příslušných situacích. Ukázalo se, že navzájem nejvíce korelují znaky CD86 a CD16/32 a to zejména při samotné stimulaci (r=0,75) a stimulaci po infekci (r=0,71). Z toho důvodu uvedené znaky nemohly být navzájem kombinovány pro výpočty pravděpodobností eliminace infekce (viz. dále).

5.3. Produkce NO

Rozložení naměřených hodnot relativního nárůstu produkce NO (μM/l) mělo nenormální rozložení (významně pozitivní šikmost), které nebylo odstranitelné logaritmickou transformací dat a zároveň nebyla naplněna podmínka homoskedasticity ani sféricity. Při hodnocení jeho obecné závislosti na čase byl proto použit neparametrický Friedmanův test (pro závislé soubory), který prokázal vysoce signifikantní výsledek $\chi^2(5)=79,6$, $p<0.001$ (viz. kap. 4.6.). Pro ozřejmění efektu jednotlivých stimulačních agens a časových modelů stimulace (vč. Interakce) byla použita s výhradami (nenormální rozdělení souboru, nehomoskedasticita a porucha sféricity) smíšená faktoriální ANOVA. Výsledkem je statisticky velmi významný efekt obou faktorů (časový model $F(3,15; 78,73)=6,18$, $p=0,001$, partial $\eta^2=0,74$ a stimulační agens $F(3,15; 78,7)=123,5$, $p<0.001$, partial $\eta^2=0,83$) a jejich interakcí $F(6,3; 78,7)=5,57$, $p<0.001$, partial $\eta^2=0,31$ (viz. kap.

4.6.1.). Přestože je možné vznést námitku ohledně signifikance při nesplnění podmínky normality, jsou hodnoty F (zejména v případě stimulačního agens) tak vysoké, že výsledek je možné jistě přijmout. Z grafického znázornění (viz. kap. 4.6.1., grafy časových řad) je patrné, že samotná infekce prakticky neindukovala produkci NO hostitelskými buňkami, na rozdíl od všech forem stimulace (nejvíce v případě stimulace předem infikovaných buněk), mezi jednotlivými stimulacemi nejsou signifikantní rozdíly. Ještě zajímavější je rozlišení nárůstu tvorby NO podle použitého stimulačního agens, kde se významně odděluje skupina buněk stimulovaných kombinací LPS+IFNγ. Uvedený výsledek je plně v souladu s velmi vysokým F pro efekt stimulačního agens a vysokému partial η^2. Jinými slovy znalost stimulačního agens vysvětlí až 83% unikátní variability nárůstu produkce NO.

Vzhledem k tomu, že z předchozí analýzy vyplývá, že produkce NO dosahuje svého maxima po 24 hodinách od počátku pokusu, zajímalo nás bližší rozlišení její závislosti na stimulačním agens i časovém modelu stimulace. Kruskal-Wallisův test vykazuje vysoce signifikantní výsledek $\chi^2(9)=46,3$, $p<0.001$ (viz. kap. 4.6.2.). Následný test jednoduchého efektu podmínek pokusu (Tukey HSD) ukázal, že ve srovnání se samotnou infekcí jsou všechny případy, kdy byla do systému přidána kombinace LPS+IFNγ (jak samostatně, bez infekce, tak před či po infekci) velmi významně vyšší ($p<0.001$).

5.4. Přežívání *Francisella tularensis* LVS

Podobně jako v případě hodnocení NO, i výsledky přežívání *F.t.* LVS v jednotlivých časových intervalech a modelových podmínkách, vyjadřované v podobě dekadického logaritmu kolonie formujících jednotek na ml ($\log_{10}$CFU/ml) vykazovala významné odchylky od normality, homoskedasticity i sféricity. Pro analýzu efektu času na přežívání byl proto rovněž zde použít neparametrický test (Friedmanův test), který však vykazoval vysoce signifikantní výsledek $\chi^2(6)=18,1$, $p=0,006$ (viz. kap. 4.7.).

Pro ozřejmění efektu použitého modelu stimulace a stimulačního agens bylo nutné použít i smíšenou faktoriální ANOVU (neexistuje neparametrická analogie), výsledky jsou však spíše orientační (díky nenormálnímu rozložení souboru klesá statistická síla a roste chyba I. řádu), nicméně díky vysoké statistické signifikanci do značné míry zobecnitelné. Lze tedy tvrdit, že proliferace je vysoce závislá na čase $F(1,59; 55,5)=12,9$, $p<0.001$, partial $\eta^2=0.27$, modelu stimulace $F(1,59; 55,5)=10,3$, $p<0.001$, partial $\eta^2=0.23$,

stimulačním agens F(3,17; 55,5)=8,36, p<0.001, partial η^2=0.32 a vzájemné interakci čas x model x stimulační agens F(3,17; 55,5)=3,96, p=0,011, partial η^2=0.19 (viz. kap. 4.7.1.).

Při grafickém znázornění (viz. kap. 4.7.1., grafy časových řad) je patrný zajímavý vztah, že po 24 hodinách infekce, *F.t.* nejvíce proliferovala v případě, že byly buňky po kontaktu s bakterií následně stimulovány (bez ohledu na stimulační agens) a nejméně, pokud byla stimulace provedena ještě před infekcí. Z prezentovaného výsledku ANOVY je zřejmé, že samotný model stimulace a infekce predikuje průběh infekce (ve smyslu proliferace *F.t.*) zhruba z 20 %. Oproti tomu, pokud se zaměříme na rozdíl v proliferaci infekce v závislosti na stimulačním agens, je zřejmá zajímavá závislost, že jak stimulace LPS, tak IFNγ sama o sobě proliferaci nebrzdí, nicméně k jejímu úplnému zablokování po 24 hodinách dochází v případě použití kombinace LPS+ IFNγ a to zjevně v jakékoli koncentraci a bez ohledu na časový model stimulace. Závěr koreluje s výsledkem ANOVY, z něhož vyplývá, že stimulační agens predikuje proliferaci infekce téměř z jedné třetiny. Závěry jsou navíc v souladu s tvrzením, že uvedená kombinace stimulačních agens významně indukuje nárůst tvorby NO a podtrhuje jeho pravděpodobně esenciální roli v kontrole infekce.

5.5. Korelace mezi produkcí NO a proliferací infekce ve 24. hodině

Zjištěné skutečnosti o souběhu mezi produkcí NO a proliferací infekce vedly k další analýze hodnotící míru korelace mezi produkcí NO a proliferací *F.t.* po 24 hodinách pokusu. Vzhledem k odchylkám od normality byla použita neparametrická pořadová korelace podle Spearmana, která v tomto případě prokázala vysoce signifikantní vztah mezi oběma proměnnými, r=-0,722, p<0.001, R^2=0,52 (viz. kap. 4.8.). Výsledek je možné interpretovat tak, že je přítomna vysoce signifikantní negativní závislost mezi proliferací infekce a produkcí NO po 24 hodinách pokusu, bez ohledu na vnější podmínky. Pokud uvedený vztah vneseme do bodového grafu (viz. kap. 4.8., graf lineární regrese), je patrný dvoufázový průběh reagresní závislosti proliferace na produkci NO. V první části dochází k dramatickému poklesu (v intervalu relativního nárůstu produkce NO 0 - cca 20 μM/l) až k nulové proliferaci, při všech vyšších koncentracích NO již *F.t.*neproliferuje vůbec. Z analýzy produkce NO po 24 hodinách vyplývá, že všechny tyto body, odpovídající pokusům, kdy infikované buňky indukovaly nárůst produkce NO o více než 20 μM/l odpovídají stimulaci kombinací LPS+IFNγ a to jak před infekcí, tak po infekci.

5.6. Korelace mezi fenotypovými změnami a produkcí NO ve 12. a 24 hodině

Hodnoceny byly rovněž vzájemné vztahy mezi hodnotami MFI CD54 v 6. hodině, CD16/32 a CD86 ve 24. hodině a produkcí NO ve 12. a 24. hodině. Se všemi výše zmíněnými parametry byl dále korelován násobek MFI CD54 v 6. hodině a MFI CD86 ve 24. hodině, který byl dále využit v rámci ROC analýzy (viz. kap. 5.7.). K tomuto účelu byla vytvořena jednoduchá korelační matice (spolu s maticovým bodovým grafem a regresními přímkami) umožňující snažší orientaci ve vzájemných kolinearitách jednotlivých parametrů (díky kterým jsou tyto obtížně kombinovány jako nezávislé faktory v regresních modelech) (viz. kap. 4.9., maticová tabulka korelace a maticový bodový graf). Pro vyčíslení vzájemných korelací byl použit neparametrický Spearmanův pořadový koeficient, jehož interpretace je v zásadě stejná, jako u parametrického Spearmanova koeficientu, tento test je však robusnější a má menší požadavky na normalitu rozložení souboru. Z výsledků je patrné, že největší úroveň korelace je přítomna mezi hodnotami produkce NO ve 12. a 24. hodině ($r=0,879$, $p<0,001$). Zároveň i fenotypové parametry navzájem významně korelují, nejvíce CD54 a CD86 ($r=0,49$, $p<0,001$). Naměřené hodnoty MFI jednotlivých znaků v příslušných časových intervalech navíc korelují i s produkcí NO ve 12. a 24. hodině, a to opět zejména MFI CD54 v 6. hodině ($r=0,689$, $p<0,001$, resp. $r=0,726$, $p<0,001$). Oproti tomu MFI CD16/32 ve 24. hodině vykazuje signifikantní pozitivní korelaci pouze se znakem CD86 ve 24. hodině. Není nezajímavé, že počítaný index vzniklý násobením MFI CD54 v 6. hodině a CD86 ve 24. hodině vykazuje nejvyšší hodnoty korelačního koeficientu, se všemi ostatními parametry (včetně CD16/32 a produkcí NO) a zdá se být tudíž užitečný coby jednoduchý nezávislý faktor popisující funkční stav stimulované buňky.

5.7. Statistická závislost přežívání infekce na modelových podmínkách, fenotypových změnách a produkci NO

Pro potřeby následující analýzy byla vytvořena nová závislá binární proměnná - eliminace infekce, která nabývá hodnoty 0 (je přítomna jakákoli proliferace po 24 hodinách pokusu) a 1 (došlo k eliminaci infekce, *F.t.* po 24 hodinách pokusu neproliferuje). K hodnocení jakéhokoli vztahu závislosti, kdy sledovaná závisle proměnná nabývá pouze hodnoty 1 a 0 je určena binominální logistická regrese. Jedná se ve své podstatě o upravený lineární regresní model, ve kterém je počítán logit proliferace, což je

přirozený logaritmus poměru pravděpodobnosti, že došlo k eliminaci infekce (hodnota 1) k pravděpodobnosti, že k eliminaci nedošlo (hodnota 0). Poměr pravděpodobností je možné rovněž označit jako šanci, nebo ODDS. Výsledkem jsou (podobně jako v jakékoli jiné lineární regresi) hodnoty koeficientů B pro jednotlivé nezávisle proměnné spolu s testovými statistikami jejich významnosti. Důležitým výstupem je rovněž hodnota exp(B) (matematicky e^B), která představuje poměr šancí eliminace infekce při platnosti nezávislé podmínky k šanci eliminace infekce není-li nezávislá podmínka naplněna (čili v našem případě, kolikrát je větší šance eliminace infekce při splnění příslušné podmínky než pokud splněna není). Tento parametr se označuje také jako ODDS ratio. Odhad parametrů je matematicky prováděn metodou maximální věrohodnosti (maximum likelihood) a jeho přesnost je velmi závislá na počtu pozorování.

V našem případě byl vytvořen model závislosti eliminace infekce na zvolených podmínkách, konkrétně stimulaci LPS, IFNγ a kombinaci LPS+IFNγ (z analýzy efektů stimulačních agens na přežívání *F.t.* vyplývala nejvyšší partial η^2=0.32) (viz. kap. 4.7.1.). Jak vyplývá z úvodní tabulky, tento model je vysoce signifikantní (čili významně lépe predikuje průběh infekce ve smyslu její eliminace, než pouhý aritmetický průměr) a nabývá i vysoké hodnoty Negelkerkeho R^2=0,8 (uvedený model vysvětlí až 80% variability pravděpodobnosti eliminace infekce) (viz. kap. 4.10., souhrn modelu). Další analýza prokázala, že jediným signifikantním prediktorem eliminace infekce je přítomnost stimulace kombinací LPS+IFNγ (binární proměnná 1-přítomna; 0-nepřítomna) (B=5,77, p<0.001). Vzhledem k nesignifikantním koeficientům B (koeficienty se jen nevýznamně liší od nuly) byly z rovnice vyřazeny proměnné LPS a IFNγ (rovněž binární proměnné hodnotící pouze přítomnost příslušného stimulačního agens). Hodnoty exp(B) pro proměnnou LPS+IFNγ nabývá vysoké hodnoty 319, čili přidání kombinace LPS a IFNγ do modelového systému s infekcí zvýší šanci eliminace infekce 319x (viz. kap. 4.10., závislost pravděpodobnosti eliminace infekce na vnějších podmínkách, variables in equation). Z klasifikační tabulky (viz. kap. 4.10., závislost pravděpodobnosti eliminace infekce na vnějších podmínkách, classification table) rovněž vyplývá, že přítomnost či nepřítomnost uvedeného stimulačního agens v systému predikuje eliminaci infekce s 91,7% senzitivitou (ze 12ti případů, kdy došlo k eliminaci infekce, byla tato stimulace přítomna 11x a pouze 1x byla infekce eliminována bez přítomnosti této kombinace) a 96,7% specificitou (z 30ti případů přežívání infekce bylo 29 bez přítomnosti uvedené stimulace).

Podobným způsobem byla sestavena rovnice k vyjádření prediktivní hodnoty produkce NO ve 24. hodině (viz. kap. 4.10., závislost pravděpodobnosti eliminace infekce na produkci NO). Uvedená proměnná (na rozdíl od výše aplikované přítomnosti konkrétního stimulačního agens) je kontinuální. Zvolený model opět poměrně dobře popisuje reálnou situaci (Negelkerkeho R^2=0,77) a výslednou hodnotu exp(B)=1,2 je možno interpretovat, že zvýšení relativní produkce NO ve 24. hodině o 1 μM/l zvýší šanci eliminace infekce 1,2x. Díky vysokému stupni korelace mezi produkcí NO ve 24. hodině a stimulací kombinací LPS+IFNγ je dle klasifikační tabulky pro produkci NO vyčíslena i stejná senzitivita a specificita.

Vzhledem k faktu, že těžištěm zájmu bylo hodnocení buněčného fenotypu, bylo z praktického hlediska důležité, zda konkrétní změny v expresi sledovaných povrchových znaků mohou sloužit k predikci průběhu infekce ve smyslu její eliminace. Bylo proto zvoleno několik typických nálezů (hodnoty MFI CD54 v 6. hodině, hodnoty MFI CD16/32 a CD86 ve 24. hodině a dále násobky MFI CD54 v 6. hodině x MFI CD86 resp. CD16/32 ve 24. hodině a konečně násobek CD86 a CD16/32, obojí ve 24. hodině) a sestrojena pro ně ROC křivka (receiver operating curve) s následným výpočtem možných kritických hodnot (cut-off) a příslušných senzitivit a specificit pro predikci eliminace infekce (viz. kap. 4.10., ROC analýza, coordinates of the curve). Křivka je představována linií bodů odpovídajících jednotlivým naměřeným hodnotám sledované nezávisle proměnné (v našem případě MFI příslušných znaků a vypočítané indexy) s přiřazenými souřadnicemi X (1-specificita) a Y (senzitivita). Za optimálních okolností (kdy je analyzovaný parametr užitečným prediktorem hodnoceného jevu) výsledná křivka kopíruje levý okraj grafu (t.j. s rostoucí senzitivitou neklesá specificita), v opačném případě vytváří diagonálu z levého dolního rohu do pravého horního a s rostoucí senzitivitou úměrně klesá specificita.

Součástí uvedené analýzy je v prvním kroku vyhodnocení obecné schopnosti parametru separovat navzájem situace, kdy hodnocený jev nastal či nenastal (došlo či nedošlo k eliminaci infekce) pomocí vypočtené plochy pod křivkou (AUROC, pohybující se v intervalu 0,5-1) a signifikance testu, že je větší než 0,5 (t.j. situace, kdy studovaná proměnná je zcela neužitečná a ROC křivka tvoří diagonálu, viz. kap. 4.10., ROC analýza, area under the curve). V tomto případě se jako nejužitečnější jeví parametry MFI CD54 v 6. hodině ($p<0,001$) a součin MFI CD54 v 6. hodině a MFI CD86 ve 24. hodině ($p<0,001$), o něco méně samotné MFI CD86 ve 24. hodině ($p=0,001$) a hraničně součin MFI CD54 v 6. hodině a MFI CD16/32 ve 24. hodině ($p=0,048$). Pro uvedené znaky jsou

vyčísleny i příslušné kritické hodnoty. Na podkladě těchto vypočtených hodnot je tedy možné tvrdit, že pokud byla u myších buněk v 6. hodině naměřena hodnota MFI pro CD54 větší než 37,9, pak bylo možné se 100% senzitivitou a 73,3% specificitou tvrdit, že došlo následně ve 24. hodině k úplné eliminaci infekce. O něco méně senzitivnější, ale zato specifičtější se v tomto směru jeví index vypočtený násobkem MFI CD54 v 6. hodině a MFI CD86 ve 24. hodině. Pokud přesahoval hodnotu 3057,5, pak předpovídal eliminaci infekce s 83% senzitivitou a 87% specificitou. Z praktického hlediska pak lze na podkladě získaných výsledků usuzovat, že indukce exprese CD54 již v 6. hodině je senzitivnějším (t.j. dochází k ní pokaždé, má-li být eliminována infekce), nicméně méně specifickým parametrem (t.j. k indukci dochází i za jiných situací, které nemusejí nutně vést k eliminaci infekce). Jako takový má výsledek při nedosažení kritické hladiny vysokou negativní prediktivní hodnotu (100%), ale nižší pozitivní prediktivní hodnotu (60%). Oproti tomu součin MFI CD54 v 6. hodině a CD86 ve 24. hodině je méně senzitivní, ale podstatně více specifický marker eliminace infekce a jako takový má i vyšší pozitivní prediktivní hodnotu (70%) a nižší negativní prediktivní hodnotu (92%).

5.8. Efekt infekce na fenotypové změny

F.t. významně ovlivňuje chování infikovaných buněk, což je možné prokázat změnami v typickém průběhu jejich aktivace. V předchozím textu byly definovány typické parametry, které mají velkou výpovědní hodnotu ve smyslu predikce chování infikovaných a stimulovaných buněk. V další analýze bylo hodnoceno, které z kontrolovaných vnějších faktorů k nim vedou a do jaké míry jsou jejich efekty ovlivněny vstupující infekcí ať už před samotnou stimulací či *ex post*. Z toho důvodu byla vedena nezávislá faktoriální ANOVA počítající efekty přítomnosti infekce a stimulačního agens na hodnotu MFI CD54 v 6. hodině, MFI CD86 ve 24. hodině a index MFI CD54 v 6. hodině X MFI CD86 ve 24. hodině (viz. kap. 4.11.). Už orientační krabičkové grafy (viz. kap. 4.11., A, B a C) naznačují významné rozdíly mezi jednotlivými měřeními MFI CD54, CD86 a počítanými indexy. Díky výsledkům ANOVY je zřejmé, že daleko větší efekt na výslednou hodnotu u všech tří sledovaných parametrů má zvolené stimulační agens (t.j. žádné, LPS, IFNγ či kombinace LPS+IFNγ) ve srovnání s efektem modelu infekce a stimulace (t.j. žádná infekce, infekce po stimulaci, infekce před stimulací či samotná infekce). Rozdíl je možné hodnotit jak podle výsledné hodnoty F, tak podle vyčíslené standardizované síly efektu – partial η^2. Není bez zajímavosti, že ve všech třech

případech (tedy CD54, CD86 i v případě vypočítaného indexu) není signifikantní efekt interakce mezi modelem infekce a zvoleným stimulačním agens, což je možné interpretovat, že není signifikantní rozdíl mezi účinkem jednotlivých stimulačních agens v příslušných modelech stimulace. Přesto je patrný trend v dosahování vyšších hodnot MFI (jak CD54, tak CD86 či počítaného indexu) v případě přidání infekce ke stimulovaným buňkám a naopak nižších v případě, že byly stimulovány již infikované buňky. Zároveň všechny tři parametry mají tendenci reagovat více na IFNγ než na LPS a zdaleka nejvíce na jejich kombinaci (a to bez ohledu na zvolený model infekce). Samotná infekce indukuje pouze minimální změny fenotypu.

V dalším kroku byly vyčísleny pomocí logistické regrese hodnoty ODDS ratio vztahující se k jednotlivým modelovým situacím infekce ve smyslu pravděpodobnosti (resp. šance) dosáhnout kritických hodnot sledovaných fenotypových parametrů, t.j. hodnot, při kterých je dle ROC analýzy vysoká pravděpodobnost eliminace infekce (viz. kap. 4.11., pravděpodobnost dosažení kritické hodnoty MFI CD54 po 6 hod.). Pro MFI CD54 v šesté hodině je možné tvrdit, že přidání infekce po stimulaci zvýší šanci dosažení kritických hodnot více než 4x, zatímco infekce buněk ještě před stimulací tuto šanci snižuje zhruba o jednu třetinu. Oproti tomu samotná infekce kritických hodnot nedosahuje vůbec. V případě CD86 dochází ke snižování šance v obou případech infekce (před i po stimulaci), více při infekci dosud nestimulovaných buněk (viz. kap. 4.11., pravděpodobnost dosažení kritické hodnoty MFI CD86 po 24 hod.). U indexu CD54 X CD86 infekce stimulovaných buněk šance vůbec neovlivní, zatímco infekce před stimulací ji sníží asi na jednu třetinu (viz. kap. 4.11., pravděpodobnost dosažení kritické hodnoty indexu po 6 a 24 hod.). Ke všem výše prezentovaným výsledkům logistické regrese je třeba poznamenat, že z důvodu omezeného počtu pokusů pro jednotlivé stituace jsou uvedené hodnoty spíše orientační.

Poslední výpočet, využívající logistickou regresi, bylo vyčíslení efektu dosažení kritických hodnot na šanci eliminace infekce (jde v podstatě o explicitní vyjádření výsledků z ROC analýzy) (viz. kap. 4.12.). Lze tedy tvrdit, že dosažení vysoce senzitivní kritické hodnoty MFI CD54 v šesté hodině zvýší šanci eliminace infekce enormním způsobem ($exp(B)=2,4x10^9$), nicméně tento výsledek je opět jen orientační (nesignifikantníi parametr B z důvodu, že nenastala situace, kdy infekce přežívala i při dosažení kritických hodnot MFI pro CD54), i když výpovědní hodnota tohoto statistického modelu je poměrně vysoká (Negelkerkeho $R^2=0,61$) (viz. kap. 4.12., A). Podobně v případě dosažení kritických hodnot MFI pro CD86 ve 24. hodině se šance na

eliminaci infekce zvyšují téměř 14x (viz. kap. 4.12., B) a v případě indexu MFI CD54 (6) x MFI CD86 (24) je tomu až 32,5x (viz. kap. 4.12., C).

Závěrem lze tedy říci, že i přes statistickou nesignifikanci některých interpretovaných hodnot se sledování fenotypových parametrů průtokovou cytometrií jeví jako velmi perspektivní způsob odhadu aktivace buňky ve smyslu její schopnosti eliminovat infekci.

5.9. Diskuze

Cílem této práce bylo vytvořit funkční *in vitro* model infekce buněk myší monocyto-makrofágové linie J774.2 *Francisella tularensis* LVS, vakcinačním kmenem odvozeným od subtypu *F.t. holarctica*, se zaměřením na analýzu časově závislých změn fenotypu myších buněk a jejich korelaci s markery úspěšnosti eliminace infekce a metabolické aktivace infikovaných buněk. Experimentální studie měla smíšeny design, byla tedy prováděna jak opakovaná, tak nezávislá měření a tomu odpovídala i aplikace inferenčních statistických metod, které se opíraly zejména o obecný lineární model s kořenovým testem - smíšenou faktoriální ANOVOU.

Díky poměrně bohatému písemnictví je k dispozici mnoho informací o průběhu primární infekce *F.t.* a o osudu infikovaných makrofágů. Přesto nadále zůstává velké množství nezodpovězených otázek, které se týkají jak faktorů patogenity na straně bakterie, tak protektivních mechanismů na straně hostitelské buňky.

Z metodologického hlediska se v současné době nové poznaky o interakci *F.t.* s makrofágem opírají zejména o genomické a proteomické studie, v menší míře o pokusy na živých zvířecích modelech. Oproti tomu je velmi omezené množství informací orientovaných na časově závislé chování infikovaných buněk v *in vitro* podmínkách se zaměřením na využití průtokové cytometrie. V tomto ohledu byly publikovány práce mapující intracelulární výskyt infekce *F.t.* s využitím geneticky upravené bakterie produkující zelený fluorescenční protein (GFP)[1;141], dále např. práce mapující cytoplazmatickou cytokinovou produkci infikovaných buněk[45], typy buněk hostitelova imunitního systému podléhající infekci[76] či změny související s infekcí a indukcí imunitní paměti[31;59]. Průtoková cytometrie byla rovněž využita jako diagnostická metoda pro přítomnost bakterií s využitím značených monoklonálních protilátek proti bakteriální stěně[144]. I když se z principiálního hlediska cytometrická měření fenotypových změn na *in vitro* modelech dají jen obtížně extrapolovat na organismus jako celek a pouze

s výhradami mohou přispět k vysvětlení kauzality sledovaných jevů, díky současným přístrojovým možnostem, jednoduchosti a časové nenáročnosti zpracování materiálu umožňující získat výsledky v horizontu desítek minut, mají jistě své velké opodstatnění při hledání pomocných diagnostických metod.

Není bez zajímavosti, že některé z námi sledovaných povrchových znaků již nalezly alespoň v experimentálních studiích své místo při monitoraci zánětlivé aktivity buněk monocyto-makrofágové vývojové linie a to zejména u pacientů se systémovou zánětlivou odpovědí (SIRS) z různých příčin[44;81;83;132;172]. Funkční testy opírající se o průtokově cytometrickou analýzu specifických buněčných subpopulací (např. basofilů) jsou v posledních letech žhavým tématem v diagnostice alergických onemocnění, a to zejména v oblastech, kde klasické testování *in vitro* a *in vivo* selhává, nebo je pro pacienty rizikové či zatěžující. Uvedené testy aktivace bazofilů tak mohou vnést světlo např. do jinak obtížně vyšetřovatelných problémů, jako je potravinová či léková alergie[54]. Z tohoto úhlu pohledu se využití podobně navrženého *in vitro* modelu (využívajícího stimulované makrofágy jako pozitivní kontrolu) jeví jako velmi jednoduchá a informačně přínosná metoda analýzy funkční interakce mezi bakterií a hostitelskou buňkou. Tento přístup umožňuje vizualizaci jinak obtížně postihnutelných efektů infekce.

V předchozích kapitolách bylo citováno množství prací, které jasně prokázaly, že již několik minut po kontaktu *F.t.* s makrofágem dochází k její internalizaci[34] a v horizontu řádově několika hodin i k úniku z fagozómu za ne zcela jasných okolností[32]. Zhruba paralelně s tímto jevem (30 min. až jedna hodina) se začínají projevovat první účinky ve smyslu interference s nitrobuněčnou signalizací[181], rezultující ve změněné chování infikované buňky za klidových podmínek, ale zejména při její stimulaci[182]. Během 24-48 hodin *F.t.* indukuje v infikovaných buňkách cytopatické změny kompatibilní s apoptózou[103-105;157]. Předpokládá se, že jak interference s nitrobuněčnou signalizací, tak indukce apoptózy je jakýmsi „Trojským koněm“ invadující bakterie, umožňujícím její nerušenou proliferaci v cytoplazmě hostitelské buňky a další šíření do okolí bez indukce zánětlivých změn.

Výsledný obraz infekce však samozřejmě souvisí se souběžnou reakcí hostitelova imunitního systému a to jak ve smyslu samotných makrofágů, které poskytují infekci první útočiště a tvoří v organismu její rezervoár, tak imunitního systému jako celku (cytokinová produkce vedoucí k imunomodulaci, změnám ve vyzrávání Th0 lymfocytů a následné reakci ostatních buněk imunitního systému, včetně makrofágů)[2;4;53;58;79;124].

První reakce fagocytujících buněk na kontakt s bakterií je pravděpodobně zprostředkován dominantně receptory TLR 2 a pravděpodobně se na vzájemné adhezi spolupodílí i receptory pro komplement a manózu. Oproti očekávání, bakterií modifikovaný LPS téměř neinteraguje s receptorem TLR 4, což lze opět chápat jako formu pasivní obrany bakterií[2;4;8]. Stimulace fagocytu samotnou bakterií však sama o sobě pravděpodobně není dostatečná a nevede k eliminaci infekce, což je v souladu s našimi pozorováními, kdy samotné myší makrofágy po kontaktu s infekcí neindukovaly ani zdaleka tak intenzivní fenotypové změny jako po kontaktu s LPS *E. coli*.

Během prvních hodin uniká *F.t.* z fagozómu a je schopna replikace ve volné cytoplasmě. Nejsou bezezbytku známé faktory virulence, které tento fenomén umožňují, nicméně zdá se, že je nezbytným předpokladem dalšího šíření infekce. Některé jí produkované proteiny (podezříván je zejm. 23 kDa hypotetický protein IglC) pravděpodobně přímo zasahují do signálních kaskád a brání aktivaci fagocytu[9;39;116]. V našich pozorováních tomu dobře odpovídají odlišné trendy ΔMFI jednotlivých znaků v případě přidání infekce do systému stimulovaných buněk či v případě stimulace buněk předem infikovaných ve srovnání se samotnou stimulací. V obou případech (s jinak vyjádřenou dynamikou a s jinými vstupními hodnotami) však dochází (na rozdíl od samotné stimulace) k obratu nárůstu v šesté až deváté hodině a následným poklesem. Uvedený efekt je nejvíce vyjádřen v případě stimulace LPS, což dobře odpovídá hypotéze o interakci infekce *F.t.* se signálními drahami NFκB a MAPK, která již byla dokumentována snížením produkce prozánětlivých cytokinů, zejména IL-1 a TNFα infikovanými makrofágy[181;182]. V této souvislosti je potřeba dále upozornit na možný imunomodulační vliv buňkou produkovaného NO, který pravděpodobně sám o sobě snižuje expresi některých povrchových molekul, zejm. CD54[133], což bylo patrné při měřeních v průběhu pokusů se samotnou stimulací. Některé v nedávné minulosti publikované práce navíc poukazují na schopnost *F.t.* stimulovat protizánětlivě působící PGE_2, jehož prostřednictvím potlačuje funkce Th1 lymfocytárního subsetu produkujícího IFNγ. Tak mimo jiné dochází k ovlivnění funkce i buněk, které doposud do přímého styku s infekcí nepřišly[191;193;194]. Naše měření přinášejí v tomto ohledu další důkazy, o komplexním vlivu infekce na fyziologii hostitelské buňky, který je navíc dobře prokazatelný dynamickými změnami jejího fenotypu při opakovaných měření v pravidelných časových intervalech.

Hostitelská buňka je pro tuto situaci vybavena sadou cytoplasmatických receptorů (z rodiny NLR), které jsou schopny rozpoznat přítomnost patogenu a iniciovat funkční a

strukturální změny vedoucí k jeho eliminaci a to s využitím signálních drah nezávislých na aktivaci NFκB a MAPK. U infekce *F.t.* bylo opakovaně popsáno, že dochází k sestavení multimerního komplexu - inflamazómu, aktivujícímu kaspázu 1 a následně i IL-1β a IL-18, rezultujícímu v indukci kvalitativně odlišné formy smrti od apoptózy - k pyroptóze asociované s prozánětlivou aktivitou[79;111]. Předpokládá se, že uvedený scénář (ačkoliv je sám o sobě nezávislý na signalizaci zprostředkované TLR), je významně urychlen konkomitující aktivací TLR 4 (např. LPS *E. coli*) vedoucí k akumulaci pro-IL-1β v cytoplazmě. Již dlouhou dobu je rovněž známo, že eliminace infekce je do značné míry závislá na stimulačním účinku IFNγ a signální cestě JAK / STAT 1[55;113]. Řada prací rovněž v nedávné minulosti prokázala mimo jiné i esenciální roli IFNγ v procesu sestavování inflamazómu a to zejména indukcí transkripčního faktoru IRF 3[78]. Uvedené hypotézy podporují pozorování, že teprve kombinace LPS a IFNγ vedla k efektivní eliminaci infekce, která byla charakteristicky spojena s prozánětlivou aktivací makrofágů se souběžnou elevací sledovaných povrchových markerů. Tato pozorování dokladuje i fakt, že z hlediska síly efektu se pro aktivaci buněk jeví významnější zvolené stimulační agens (v pořadí kombinace LPS+IFNγ > IFNγ > LPS) než samotný model infekce. Z výsledku výpočtů ODDS ratio pro jednotlivé modely stimulace ve smyslu zvýšení šance dosažení kritických hodnot MFI CD54 v šesté hodině vyplývá, že jednoznačně tuto šanci zvyšuje infekce předem stimulovaných buněk (a to cca 4x).

Řada prací se již v minulosti zabývala rolí NO z hlediska kontroly infekce *F.t.*[42;70;113]. Opakovaně bylo dokladováno, že jeho role je odlišná od role běžných volných kyslíkových radikálů a na jeho indukci se dominantním způsobem podílí stimulace buňky prostřednictvím IFNγ[113;114]. Enzym, jehož aktivita stojí na pozadí produkce dostatečného množství baktericidního NO je označován jako inducibilní NO syntetáza (iNOS) a v dnešní době je již známo, za jakých okolností dochází k indukci exprese genu pro tento enzym v průběhu zánětlivé aktivace buňky. Podobně, jako v případě sestavení inflamazómu, i zde se ukazuje jako nejúčinnější způsob synergický účinek jak NFκB, tak AP1, STAT 1 a IRF 1[28], což naše měření relativní produkce NO potvrzují. Stimulace kombinací LPS+IFNγ významně zvyšuje relativní nárůst jeho koncentrace v supernatantu ve srovnání s efektem samotného LPS či IFNγ a to na čase závislým způsobem. Tento výsledek koreluje se dvěma již výše zmíněnými výsledky, a to, že kombinace obou stimulačních agens významně zvyšuje pravděpodobnost dosažení kritických hodnot MFI jednotlivých stimulačních parametrů (t.j. hodnot, při kterých se významně zvyšuje pravděpodobnost eliminace infekce) a pochopitelně i eliminace infekce jako takové.

Důležitou roli NO v kontrole infekce dále potvrdila i významná negativní korelace mezi jeho produkcí a proliferací *F.t.* ve 24. hodině. Podle regresní analýzy je dokonce zřejmý jasně dvoufázový průběh závislosti, při vzestupu relativní produkce NO do 20 μM/l dochází ke strmému poklesu log_{10}CFU/ml až k nulovým hodnotám, na kterých již setrvává při všech vyšších produkcích NO. Statisticky významně rovněž narůstající produkce NO ve 24. hodině zvyšuje šanci eliminace infekce (vzestup o každý μM/l zvyšuje uvedenou šanci 1,2x - ODDS ratio). Stejná analýza rovněž prokázala, že samotné přidání kombinace LPS+IFNγ do systému, bez ohledu na koncentrace a časové schéma stimulace a infekce, zvyšuje šanci eliminace infekce až 319x. Výše uvedené výsledky jsou dokresleny statisticky významnou korelací nejen mezi produkcí NO a proliferací *F.t.*, ale i mezi produkcí NO a hodnotami MFI v klíčových časových intervalech. Souhrně lze tedy říci, že na kontrole infekce se pravděpodobně spolupodílí několik nitrobuněčných signálních drah a to zejména sestavení inflamazómu s permisívním účinkem drah NFκB a MAPK zvyšujícími koncentrace jeho substrátů (pro IL-1β) a dráhy JAK / STAT 1, zvyšujícím IRF 3 s doposud ne zcela jasnou úlohou v aktivaci inflamazómu. Krom prozánětlivého účinku inflamazómu se jako esenciální podmínka eliminace infekce jeví produkce NO. Role IFNγ navíc dalece přesahuje pouze imunomodulační efekty namířené pouze na makrofágy. Jeho produkce se zdá být esenciální i v souvislosti s indukcí imunitní paměti[56].

S vědomím faktu, že fenotyp významně kopíruje průběh stimulace, koreluje s produkcí NO a potažmo i se schopností infikovaných buněk eliminovat infekci, byla provedena další analýza zkoumající, jaké jsou kritické hodnoty pro fenotypové změny, které by s dostatečně vysokou senzitivitou a specificitou byly schopny predikovat průběh infekce ve smyslu odhadu její eliminace. V tomto směru se ukázaly jako nejužitečnější následující parametry: MFI CD54 v 6. hodině, MFI CD86 ve 24. hodině a index získaný součinem obou MFI. V modelových podmínkách *in vitro* tak je možné tímto jednoduchým způsobem odhadnout s vysokým stupněm pravděpodobnosti aktivační stav infikované buňky (čili námi vytvořenou latentní proměnnou, t.j. proměnnou přímo neměřitelnou, která se nachází v samém středu strukturální analýzy statistického modelu, viz. kapitola 3.10.)

Fenotypová analýza, která byla stěžejním momentem této práce s *in vitro* modelem infekce *F.t.*, přinesla řadu nových informací o komplexní povaze vzájemného vztahu utvářeného mezi bakterií a hostitelskou buňkou. Funkční změny infikovaných buněk svými projevy však dalece přesahují pouze odlišnou aktivaci konkrétních genů a

transkripci jimi kódovaných proteinů. Jsou vyjádřeny jak změněnou denzitou řady proteinů na buněčném povrchu, produkcí informačních molekul a s tím spojeným narušením regulace imunitního systému jako celku. Je tudíž zřejmé, že simplifikované podmínky *in vitro* bez matoucích proměnných nemůže uceleně postihnout fenomén infekce ve své celistvosti, ale pouze jeho velmi úzké výseky. I ty však mohou přinést důležitá fakta do mozaiky současného poznání.

6. ZÁVĚR

6.1. Odpovědi na otázky formulované v úvodu

1) V *in vitro* podmínkách je možné vytvořit model infekce intracelulárním parazitem *F.t.* LVS vhodný k studiu vzájemného vztahu mezi bakterií a hostitelem.

2) Infekce zásadním způsobem zasahuje do fyziologických mechanismů hostitelské buňky v průběhu její aktivace. Tento efekt je reprodukovatelný a vykazuje specifické fenotypové projevy, které jsou měřitelné v různých časových intervalech probíhající infekce.

3) Prostřednictvím stimulace infikovaných makrofágů a to zejména kombinací LPS a IFNγ je možné docílit eliminace infekce zpravidla již během 24 hodin. Tato kombinace obou stimulačních agens se jeví jako optimální forma aktivace nitrobuněčných signálních drah makrofágů vedoucí k infekcí neovlivnitelné lýze patogenů.

4) Podařilo se stanovit velmi senzitivní a specifické fenotypové markery, pomocí jejichž měření je možné s vysokou pravděpodobností odhadnout průběh infekce.

5) Infekce makrofágů bakterií *F.t.* LVS vede k významnému ovlivnění jejich fyziologických funkcí, zejména ve smyslu redukce odpovídavosti na stimulaci. Tento jev se v souladu s aktuálními informacemi o imunopatogenezi onemocnění tularemie vysvětluje schopností invadující bakterie interferovat s nitrobuněčnými signálními drahami, zejm. NFκB a MAPK.

6) Samotná infekce nevyvolává významné fenotypové změny infikovaných buněk, nicméně svým komplexním imunomodulačním působením bránícím efektivní aktivaci makrofágů je její aktivita dobře prokazatelná a vizualizovatelná po přidání stimulačních agens.

7) Výsledky pokusů v *in vitro* systému jsou ve své konkrétní podobě jen nesnadno extrapolovatelné na organismus jako celek. Ve zjednodušených laboratorních podmínkách pochopitelně nejsou (a ani nemohou být) brány v potaz všechny matoucí proměnné, které by výsledek mohly významně ovlivnit. Přesto však

podobné funkční modely dávají nahlédnout k samotné podstatě komplikované interakce mezi infekcí a hostitelem alespoň v principiální podobě. Dokáží tak nasměrovat další výzkum k analýze komplexnějších modelových situací. Přinášejí zároveň důležité informace o faktorech virulence, které jsou pak předmětem dalšího výzkumu, zejména vakcinologického. V neposlední řadě je třeba zmínit, že model aktivovaných makrofágů je univerzálním nástrojem pro výzkum v daleko širších souvislostech, než pouze při studiu infekcí jako takových. Poskytuje užitečný substrát pro studie imuno-toxikologické či alergologické.

6.2. Závěr

Cílem práce bylo vytvořit biologický model vhodný ke studiu interakce mezi hostitelskou buňkou a intracelulárním parazitem, *F.t.* LVS. Na podkladě uvedených měření a analýz se domnívám, že uvedený model přináší řadu důležitých informací o podstatě vzájemného vztahu mezi eukaryotní a prokaryotní buňkou, o fenoménu intracelulárního parazitismu a principech jeho regulace. Každý poznatek je však potřeba vnímat pouze v těch souvislostech, v jakých byl získán a nemělo by docházet k zevšeobecňování skutečností, které nemají atributy kauzality, tak jak je chápali ve svých myšlenkách již v 18. století David Hume či John Stuart Mills. Trefnou parafrází by mohl být citát Williama Butlera Yeatse: „Přemýšlej jako moudrý člověk, ale mluv jazykem lidí“. Navíc jsou všechna fakta kontinuálně filtrována úrovní našeho současného poznání a jak řekl Johann Wolfgang Goethe: „Každý slyší jen to, čemu rozumí“.

7. LITERATURA

(1) Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandstrom G, Forsman M. Survival and growth of Francisella tularensis in Acanthamoeba castellanii. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:600-606.

(2) Abplanalp AL, Morris IR, Parida BK, Teale JM, Berton MT. TLR-Dependent Control of Francisella tularensis Infection and Host Inflammatory Responses. *PLoS One* 2009;4:e7920.

(3) Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:735-746.

(4) Ashtekar AR, Zhang P, Katz J et al. TLR4-mediated activation of dendritic cells by the heat shock protein DnaK from Francisella tularensis. *J Leukoc Biol* 2008;84:1434-1446.

(5) Balagopal A, MacFarlane AS, Mohapatra N, Soni S, Gunn JS, Schlesinger LS. Characterization of the receptor-ligand pathways important for entry and survival of Francisella tularensis in human macrophages. *Infect Immun* 2006;74:5114-5125.

(6) Balistreri CR, Colonna-Romano G, Lio D, Candore G, Caruso C. TLR4 polymorphisms and ageing: implications for the pathophysiology of age-related diseases. *J Clin Immunol* 2009;29:406-415.

(7) Baltrons MA, Pedraza C, Sardon T, Navarra M, Garcia A. Regulation of NO-dependent cyclic GMP formation by inflammatory agents in neural cells. *Toxicol Lett* 2003;139:191-198.

(8) Barker JH, Weiss J, Apicella MA, Nauseef WM. Basis for the failure of Francisella tularensis lipopolysaccharide to prime human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 2006;74:3277-3284.

(9) Barker JR, Klose KE. Molecular and genetic basis of pathogenesis in Francisella tularensis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1105:138-159.

(10) Beckstrom-Sternberg SM, Auerbach RK, Godbole S et al. Complete genomic characterization of a pathogenic A.II strain of Francisella tularensis subspecies tularensis. *PLoS ONE* 2007;2:e947.

(11) Bell JF, Owen CR, Larson CL. Virulence of Bacterium tularense. I. A study of the virulence of Bacterium tularense in mice, guinea pigs, and rabbits. *J Infect Dis* 1955;97:162-166.

(12) Benhamou M, Bonnerot C, Fridman WH, Daeron M. Molecular heterogeneity of murine mast cell Fc gamma receptors. *J Immunol* 1990;144:3071-3077.

(13) Benz D, Cadet P, Mantione K, Zhu W, Stefano G. Tonal nitric oxide and health--a free radical and a scavenger of free radicals. *Med Sci Monit* 2002;8:RA1-RA4.

(14) Benz D, Cadet P, Mantione K, Zhu W, Stefano G. Tonal nitric oxide and health: anti-bacterial and -viral actions and implications for HIV. *Med Sci Monit* 2002;8:RA27-RA31.

(15) Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004;430:257-263.

(16) Bhandari V, Wang C, Rinder C, Rinder H. Hematologic profile of sepsis in neonates: neutrophil CD64 as a diagnostic marker. *Pediatrics* 2008;121:129-134.

(17) Boivin WA, Cooper DM, Hiebert PR, Granville DJ. Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. *Lab Invest* 2009;89:1195-1220.

(18) Bonquist L, Lindgren H, Golovliov I, Guina T, Sjostedt A. MglA and Igl proteins contribute to the modulation of Francisella tularensis live vaccine strain-containing phagosomes in murine macrophages. *Infect Immun* 2008;76:3502-3510.

(19) Borio L, Inglesby T, Peters CJ et al. Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management. *JAMA* 2002;287:2391-2405.

(20) Brahmachari S, Pahan K. Suppression of regulatory T cells by IL-12p40 homodimer via nitric oxide. *J Immunol* 2009;183:2045-2058.

(21) Broussard LA. Biological agents: weapons of warfare and bioterrorism. *Mol Diagn* 2001;6:323-333.

(22) Brune B, Zhou J, von KA. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. *Kidney Int Suppl* 2003;S22-S24.

(23) Bryant C, Fitzgerald KA. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol* 2009;19:455-464.

(24) Butchar JP, Parsa KV, Marsh CB, Tridandapani S. IFNgamma enhances IL-23 production during Francisella infection of human monocytes. *FEBS Lett* 2008;582:1044-1048.

(25) Butchar JP, Rajaram MV, Ganesan LP et al. Francisella tularensis induces IL-23 production in human monocytes. *J Immunol* 2007;178:4445-4454.

(26) Carreras MC, Franco MC, Peralta JG, Poderoso JJ. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol Aspects Med* 2004;25:125-139.

(27) Casadevall A. Antibody-mediated immunity against intracellular pathogens: two-dimensional thinking comes full circle. *Infect Immun* 2003;71:4225-4228.

(28) Chan ED, Riches DW. IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C441-C450.

(29) Chavez-Galan L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chavez R, Lascurain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 2009;6:15-25.

(30) Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nunez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol* 2009;4:365-398.

(31) Chen W, Kuolee R, Austin JW, Shen H, Che Y, Conlan JW. Low dose aerosol infection of mice with virulent type A Francisella tularensis induces severe thymus atrophy and CD4+CD8+ thymocyte depletion. *Microb Pathog* 2005;39:189-196.

(32) Clemens DL, Horwitz MA. Uptake and intracellular fate of Francisella tularensis in human macrophages. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1105:160-186.

(33) Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. Virulent and avirulent strains of Francisella tularensis prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect Immun* 2004;72:3204-3217.

(34) Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. Francisella tularensis enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun* 2005;73:5892-5902.

(35) Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. Francisella tularensis phagosomal escape does not require acidification of the phagosome. *Infect Immun* 2009;77:1757-1773.

(36) Cohen J. A power primer. *Psychol Bull* 1992;112:155-159.

(37) Cole LE, Elkins KL, Michalek SM et al. Immunologic consequences of Francisella tularensis live vaccine strain infection: role of the innate immune response in infection and immunity. *J Immunol* 2006;176:6888-6899.

(38) Cole LE, Laird MH, Seekatz A et al. Phagosomal retention of Francisella tularensis results in TIRAP/Mal-independent TLR2 signaling. *J Leukoc Biol* 2009.

(39) Cole LE, Santiago A, Barry E et al. Macrophage proinflammatory response to Francisella tularensis live vaccine strain requires coordination of multiple signaling pathways. *J Immunol* 2008;180:6885-6891.

(40) Collazo CM, Sher A, Meierovics AI, Elkins KL. Myeloid differentiation factor-88 (MyD88) is essential for control of primary in vivo Francisella tularensis LVS infection, but not for control of intra-macrophage bacterial replication. *Microbes Infect* 2006;8:779-790.

(41) Coutinho A, Poltorack A. Innate immunity: from lymphocyte mitogens to Toll-like receptors and back. *Curr Opin Immunol* 2003;15:599-602.

(42) Cowley SC, Myltseva SV, Nano FE. Phase variation in Francisella tularensis affecting intracellular growth, lipopolysaccharide antigenicity and nitric oxide production. *Mol Microbiol* 1996;20:867-874.

(43) Cronquist SD. Tularemia: the disease and the weapon. *Dermatol Clin* 2004;22:313-vii.

(44) Danikas DD, Karakantza M, Theodorou GL, Sakellaropoulos GC, Gogos CA. Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clin Exp Immunol* 2008;154:87-97.

(45) De PR, Taylor BC, Elkins KL. Diverse myeloid and lymphoid cell subpopulations produce gamma interferon during early innate immune responses to Francisella tularensis live vaccine strain. *Infect Immun* 2008;76:4311-4321.

(46) Degterev A, Huang Z, Boyce M et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 2005;1:112-119.

(47) Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:378-390.

(48) Denkers EY. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by Toxoplasma gondii. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;39:193-203.

(49) Denkers EY, Butcher BA. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol* 2005;21:35-41.

(50) Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA et al. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 2001;285:2763-2773.

(51) Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519-550.

(52) Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect* 2002;4:903-914.

(53) Duenas AI, Aceves M, Orduna A, Diaz R, Sanchez CM, Garcia-Rodriguez C. Francisella tularensis LPS induces the production of cytokines in human monocytes and signals via Toll-like receptor 4 with much lower potency than E. coli LPS. *Int Immunol* 2006;18:785-795.

(54) Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH et al. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 2006;61:1028-1039.

(55) Edwards JA, Rockx-Brouwer D, Nair V, Celli J. Restricted cytosolic growth of Francisella tularensis subsp. tularensis by IFN-{gamma} activation of macrophages. *Microbiology* 2009.

(56) Elkins KL, Colombini SM, Meierovics AI, Chu MC, Chou AY, Cowley SC. Survival of secondary lethal systemic Francisella LVS challenge depends largely on interferon gamma. *Microbes Infect* 2009.

(57) Elkins KL, Cowley SC, Bosio CM. Innate and adaptive immune responses to an intracellular bacterium, Francisella tularensis live vaccine strain. *Microbes Infect* 2003;5:135-142.

(58) Elkins KL, Cowley SC, Bosio CM. Innate and adaptive immunity to Francisella. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1105:284-324.

(59) Ericsson M, Kroca M, Johansson T, Sjostedt A, Tarnvik A. Long-lasting recall response of CD4+ and CD8+ alphabeta T cells, but not gammadelta T cells, to heat shock proteins of francisella tularensis. *Scand J Infect Dis* 2001;33:145-152.

(60) Field A. *Discovering statistics using SPSS*. Third ed. London: SAGE Publications Ltd., 2009.

(61) Fietta P, Delsante G. The effector T helper cell triade. *Riv Biol* 2009;102:61-74.

(62) Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 2005;73:1907-1916.

(63) Foley JE, Nieto NC. Tularemia. *Vet Microbiol* 2009.

(64) Fortin CF, McDonald PP, Fulop T, Lesur O. Sepsis, leukocytes and nitric oxide (NO): an intricate affair. *Shock* 2009.

(65) Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* 2001;22:556-560.

(66) Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin Immunol* 2009;21:242-253.

(67) Fuller CL, Brittingham KC, Hepburn MJ et al. Dominance of human innate immune responses in primary Francisella tularensis live vaccine strain vaccination. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1186-1188.

(68) Gavrilin MA, Bouakl IJ, Knatz NL et al. Internalization and phagosome escape required for Francisella to induce human monocyte IL-1beta processing and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:141-146.

(69) Golovliov I, Baranov V, Krocova Z, Kovarova H, Sjostedt A. An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium Francisella tularensis can escape the phagosome of monocytic cells. *Infect Immun* 2003;71:5940-5950.

(70) Green SJ, Scheller LF, Marletta MA et al. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol Lett* 1994;43:87-94.

(71) Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:413-433.

(72) Grunow R, Splettstoesser W, McDonald S et al. Detection of Francisella tularensis in biological specimens using a capture enzyme-linked immunosorbent assay, an immunochromatographic handheld assay, and a PCR. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:86-90.

(73) Gunn JS, Ernst RK. The structure and function of Francisella lipopolysaccharide. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1105:202-218.

(74) Gusarov I, Shatalin K, Starodubtseva M, Nudler E. Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science* 2009;325:1380-1384.

(75) Hajjar AM, Harvey MD, Shaffer SA et al. Lack of in vitro and in vivo recognition of Francisella tularensis subspecies lipopolysaccharide by Toll-like receptors. *Infect Immun* 2006;74:6730-6738.

(76) Hall JD, Woolard MD, Gunn BM et al. Infected-host-cell repertoire and cellular response in the lung following inhalation of Francisella tularensis Schu S4, LVS, or U112. *Infect Immun* 2008;76:5843-5852.

(77) Heemskerk S, Masereeuw R, Russel FG, Pickkers P. Selective iNOS inhibition for the treatment of sepsis-induced acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 2009;5:629-640.

(78) Henry T, Brotcke A, Weiss DS, Thompson LJ, Monack DM. Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during Francisella infection. *J Exp Med* 2007;204:987-994.

(79) Henry T, Monack DM. Activation of the inflammasome upon Francisella tularensis infection: interplay of innate immune pathways and virulence factors. *Cell Microbiol* 2007;9:2543-2551.

(80) Hermann C. Review: variability of host-pathogen interaction. *J Endotoxin Res* 2007;13:199-218.

(81) Hirsh M, Mahamid E, Bashenko Y, Hirsh I, Krausz MM. Overexpression of the high-affinity Fcgamma receptor (CD64) is associated with leukocyte dysfunction in sepsis. *Shock* 2001;16:102-108.

(82) Hofacker CF. Abuse of statistical packages: the case of the general linear model. *Am J Physiol* 1983;245:R299-R302.

(83) Hoffmann JJ. Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:903-916.

(84) Hong H, Sun J, Cai W. Multimodality imaging of nitric oxide and nitric oxide synthases. *Free Radic Biol Med* 2009;47:684-698.

(85) Hrstka R, Krocova Z, Cerny J, Vojtesek B, Macela A, Stulik J. Francisella tularensis strain LVS resides in MHC II-positive autophagic vacuoles in macrophages. *Folia Microbiol (Praha)* 2007;52:631-636.

(86) Hrstka R, Stulik J, Vojtesek B. The role of MAPK signal pathways during Francisella tularensis LVS infection-induced apoptosis in murine macrophages. *Microbes Infect* 2005;7:619-625.

(87) Hubalek M, Hernychova L, Havlasova J et al. Towards proteome database of Francisella tularensis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;787:149-177.

(88) Ibiza S, Victor VM, Bosca I et al. Endothelial nitric oxide synthase regulates T cell receptor signaling at the immunological synapse. *Immunity* 2006;24:753-765.

(89) Isherwood KE, Titball RW, Davies DH, Felgner PL, Morrow WJ. Vaccination strategies for Francisella tularensis. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:1403-1414.

(90) Jaeckel E, Kretschmer K, Apostolou I, von BH. Instruction of Treg commitment in peripheral T cells is suited to reverse autoimmunity. *Semin Immunol* 2006;18:89-92.

(91) Jensen WA, Kirsch CM. Tularemia. *Semin Respir Infect* 2003;18:146-158.

(92) Joffre O, Nolte MA, Sporri R, Reis e Sousa. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009;227:234-247.

(93) Kanwar JR, Kanwar RK, Burrow H, Baratchi S. Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. *Curr Med Chem* 2009;16:2373-2394.

(94) Katz J, Zhang P, Martin M, Vogel SN, Michalek SM. Toll-like receptor 2 is required for inflammatory responses to Francisella tularensis LVS. *Infect Immun* 2006;74:2809-2816.

(95) Khan KN, Kitajima M, Hiraki K et al. Toll-like receptors in innate immunity: role of bacterial endotoxin and toll-like receptor 4 in endometrium and endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2009;68:40-52.

(96) Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 2004;500:255-266.

(97) Krejsek J, Kopecký O. *Klinická imunologie*. First ed. Hradec Kralove: Nucleus HK, 2004.

(98) Kretschmer K, Apostolou I, Jaeckel E, Khazaie K, von BH. Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunol Rev* 2006;212:163-169.

(99) Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009;16:3-11.

(100) Kroger A, Koster M, Schroeder K, Hauser H, Mueller PP. Activities of IRF-1. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22:5-14.

(101) Kupková Z, Beneš L. Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chem Listy* 2004;98:116-122.

(102) La SB, Elkarkouri K, Li W et al. Rapid comparative genomic analysis for clinical microbiology: the Francisella tularensis paradigm. *Genome Res* 2008;18:742-750.

(103) Lai XH, Golovliov I, Sjostedt A. Francisella tularensis induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. *Infect Immun* 2001;69:4691-4694.

(104) Lai XH, Golovliov I, Sjostedt A. Expression of IglC is necessary for intracellular growth and induction of apoptosis in murine macrophages by Francisella tularensis. *Microb Pathog* 2004;37:225-230.

(105) Lai XH, Sjostedt A. Delineation of the molecular mechanisms of Francisella tularensis-induced apoptosis in murine macrophages. *Infect Immun* 2003;71:4642-4646.

(106) Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev* 2009;227:95-105.

(107) Lange M, Enkhbaatar P, Nakano Y, Traber DL. Role of nitric oxide in shock: the large animal perspective. *Front Biosci* 2009;14:1979-1989.

(108) Lauriano CM, Barker JR, Yoon SS et al. MglA regulates transcription of virulence factors necessary for Francisella tularensis intraamoebae and intramacrophage survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4246-4249.

(109) Lee JH, Lee KL, Yeo WS, Park SJ, Roe JH. SoxRS-mediated lipopolysaccharide modification enhances resistance against multiple drugs in Escherichia coli. *J Bacteriol* 2009;191:4441-4450.

(110) Lenco J, Hubalek M, Larsson P et al. Proteomics analysis of the Francisella tularensis LVS response to iron restriction: induction of the F. tularensis pathogenicity island proteins IglABC. *FEMS Microbiol Lett* 2007;269:11-21.

(111) Li H, Nookala S, Bina XR, Bina JE, Re F. Innate immune response to Francisella tularensis is mediated by TLR2 and caspase-1 activation. *J Leukoc Biol* 2006;80:766-773.

(112) Lindgren H, Golovliov I, Baranov V, Ernst RK, Telepnev M, Sjostedt A. Factors affecting the escape of Francisella tularensis from the phagolysosome. *J Med Microbiol* 2004;53:953-958.

(113) Lindgren H, Stenman L, Tarnvik A, Sjostedt A. The contribution of reactive nitrogen and oxygen species to the killing of Francisella tularensis LVS by murine macrophages. *Microbes Infect* 2005;7:467-475.

(114) Lindgren H, Stenmark S, Chen W, Tarnvik A, Sjostedt A. Distinct roles of reactive nitrogen and oxygen species to control infection with the facultative intracellular bacterium Francisella tularensis. *Infect Immun* 2004;72:7172-7182.

(115) Liu SF, Malik AB. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L622-L645.

(116) Loegering DJ, Drake JR, Banas JA et al. Francisella tularensis LVS grown in macrophages has reduced ability to stimulate the secretion of inflammatory cytokines by macrophages in vitro. *Microb Pathog* 2006;41:218-225.

(117) Ludu JS, de Bruin OM, Duplantis BN et al. The Francisella pathogenicity island protein PdpD is required for full virulence and associates with homologues of the type VI secretion system. *J Bacteriol* 2008;190:4584-4595.

(118) Macela A, Stulik J, Trebichavsky I, Janovska S. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus*. first ed. Prague: Grada Publishing, a.s., 2006.

(119) Malefyt RW. Interleukin-17 kick-starts T helper 1 cell differentiation. *Immunity* 2009;31:700-702.

(120) Mancinelli RL, McKay CP. Effects of nitric oxide and nitrogen dioxide on bacterial growth. *Appl Environ Microbiol* 1983;46:198-202.

(121) Mariathasan S, Weiss DS, Dixit VM, Monack DM. Innate immunity against Francisella tularensis is dependent on the ASC/caspase-1 axis. *J Exp Med* 2005;202:1043-1049.

(122) Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002;10:417-426.

(123) McCaffrey RL, Allen LA. Francisella tularensis LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *J Leukoc Biol* 2006;80:1224-1230.

(124) Metzger DW, Bakshi CS, Kirimanjeswara G. Mucosal immunopathogenesis of Francisella tularensis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1105:266-283.

(125) Meulmeester E, Jochemsen AG. p53: a guide to apoptosis. *Curr Cancer Drug Targets* 2008;8:87-97.

(126) Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen Leishmania. *J Exp Med* 2005;201:747-754.

(127) Morner T. The ecology of tularaemia. *Rev Sci Tech* 1992;11:1123-1130.

(128) Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG et al. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med* 2000;26:883-892.

(129) Newton S, Ding Y, Chung CS, Chen Y, Lomas-Neira JL, Ayala A. Sepsis-induced changes in macrophage co-stimulatory molecule expression: CD86 as a regulator of anti-inflammatory IL-10 response. *Surg Infect (Larchmt)* 2004;5:375-383.

(130) Ng WL, Bassler BL. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annu Rev Genet* 2009.

(131) Niedbala W, Cai B, Liew FY. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann Rheum Dis* 2006;65 Suppl 3:iii37-iii40.

(132) Nolan A, Weiden M, Kelly A et al. CD40 and CD80/86 act synergistically to regulate inflammation and mortality in polymicrobial sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:301-308.

(133) Norman MU, Zbytnuik L, Kubes P. Interferon-gamma limits Th1 lymphocyte adhesion to inflamed endothelium: a nitric oxide regulatory feedback mechanism. *Eur J Immunol* 2008;38:1368-1380.

(134) Olsufiev NG, Emelyanova OS, Dunayeva TN. Comparative study of strains of B. tularense in the old and new world and their taxonomy. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1959;3:138-149.

(135) Oyston PC, Quarry JE. Tularemia vaccine: past, present and future. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2005;87:277-281.

(136) Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009;227:221-233.

(137) Pardo J, Aguilo JI, Anel A et al. The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes Infect* 2009;11:452-459.

(138) Parker CT, Sperandio V. Cell-to-cell signalling during pathogenesis. *Cell Microbiol* 2009;11:363-369.

(139) Pavkova I, Hubalek M, Zechovska J, Lenco J, Stulik J. Francisella tularensis live vaccine strain: proteomic analysis of membrane proteins enriched fraction. *Proteomics* 2005;5:2460-2467.

(140) Perez-Rodriguez R, Roncero C, Olivan AM, Gonzalez MP, Oset-Gasque MJ. Signaling mechanisms of interferon gamma induced apoptosis in chromaffin cells: involvement of nNOS, iNOS, and NFkappaB. *J Neurochem* 2009;108:1083-1096.

(141) Perroud TD, Kaiser JN, Sy JC et al. Microfluidic-based cell sorting of Francisella tularensis infected macrophages using optical forces. *Anal Chem* 2008;80:6365-6372.

(142) Pimienta G, Pascual J. Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle* 2007;6:2628-2632.

(143) Plancon L, Du ML, Le FS et al. Recognition of the cellular beta1-chain integrin by the bacterial AfaD invasin is implicated in the internalization of afa-expressing pathogenic Escherichia coli strains. *Cell Microbiol* 2003;5:681-693.

(144) Porsch-Ozcurumez M, Kischel N, Priebe H, Splettstosser W, Finke EJ, Grunow R. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:1008-1015.

(145) Pukatzki S, McAuley SB, Miyata ST. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr Opin Microbiol* 2009;12:11-17.

(146) Qin A, Scott DW, Thompson JA, Mann BJ. Identification of an essential Francisella tularensis subsp. tularensis virulence factor. *Infect Immun* 2009;77:152-161.

(147) Rajaram MV, Butchar JP, Parsa KV et al. Akt and SHIP Modulate Francisella Escape from the Phagosome and Induction of the Fas-Mediated Death Pathway. *PLoS One* 2009;4:e7919.

(148) Rick LC, Wu TH. Animal models of Francisella tularensis infection. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1105:238-265.

(149) Rosenstiel P, Schreiber S. NOD-like receptors--pivotal guardians of the immunological integrity of barrier organs. *Adv Exp Med Biol* 2009;653:35-47.

(150) Saldeen J, Welsh N. p38 MAPK inhibits JNK2 and mediates cytokine-activated iNOS induction and apoptosis independently of NF-KB translocation in insulin-producing cells. *Eur Cytokine Netw* 2004;15:47-52.

(151) Salem H. Issues in chemical and biological terrorism. *Int J Toxicol* 2003;22:465-471.

(152) Salvesen GS, Riedl SJ. Caspase mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 2008;615:13-23.

(153) Sandstrom G. The tularaemia vaccine. *J Chem Technol Biotechnol* 1994;59:315-320.

(154) Sandstrom G, Sjostedt A, Forsman M, Pavlovich NV, Mishankin BN. Characterization and classification of strains of Francisella tularensis isolated in the central Asian focus of the Soviet Union and in Japan. *J Clin Microbiol* 1992;30:172-175.

(155) Santic M, Khodor SA, Kwaik YA. Cell biology and molecular ecology of Francisella tularensis. *Cell Microbiol* 2009.

(156) Santic M, Molmeret M, Klose KE, Abu KY. Francisella tularensis travels a novel, twisted road within macrophages. *Trends Microbiol* 2006;14:37-44.

(157) Santic M, Pavokovic G, Jones S, Asare R, Kwaik YA. Regulation of apoptosis and anti-apoptosis signalling by Francisella tularensis. *Microbes Infect* 2009.

(158) SASLAW S, CARLISLE HN. Studies with tularemia vaccines in volunteers. IV. Brucella aggiutinins in vaccinated and nonvaccinated volunteers challenged with Pasteurella tularensis. *Am J Med Sci* 1961;242:166-172.

(159) Sauer FG, Mulvey MA, Schilling JD, Martinez JJ, Hultgren SJ. Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2000;3:65-72.

(160) Schaible UE, Kaufmann SH. A nutritive view on the host-pathogen interplay. *Trends Microbiol* 2005;13:373-380.

(161) Schmid-Hempel P. Parasite immune evasion: a momentous molecular war. *Trends Ecol Evol* 2008;23:318-326.

(162) Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA. TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:247-254.

(163) Schulert GS, Allen LA. Differential infection of mononuclear phagocytes by Francisella tularensis: role of the macrophage mannose receptor. *J Leukoc Biol* 2006;80:563-571.

(164) Scott FL, Stec B, Pop C et al. The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature* 2009;457:1019-1022.

(165) Shank JL, Silliker JH, Harper RH. The effect of nitric oxide on bacteria. *Appl Microbiol* 1962;10:185-189.

(166) Sharpe AH. Analysis of lymphocyte costimulation in vivo using transgenic and 'knockout' mice. *Curr Opin Immunol* 1995;7:389-395.

(167) Shirey KA, Cole LE, Keegan AD, Vogel SN. Francisella tularensis live vaccine strain induces macrophage alternative activation as a survival mechanism. *J Immunol* 2008;181:4159-4167.

(168) Silverblatt FJ, Ofek I. Interaction of bacterial pili and leukocytes. *Infection* 1983;11:235-238.

(169) Sjostedt A. Virulence determinants and protective antigens of Francisella tularensis. *Curr Opin Microbiol* 2003;6:66-71.

(170) Sjostedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1105:1-29.

(171) Sjostedt A, Eriksson U, Berglund L, Tarnvik A. Detection of Francisella tularensis in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J Clin Microbiol* 1997;35:1045-1048.

(172) Skrzeczynska J, Kobylarz K, Hartwich Z, Zembala M, Pryjma J. CD14+CD16+ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scand J Immunol* 2002;55:629-638.

(173) Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-434.

(174) Staros EB. Innate immunity: New approaches to understanding its clinical significance. *Am J Clin Pathol* 2005;123:305-312.

(175) Stenger S, Modlin RL. Cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol* 1998;10:471-477.

(176) Tarnvik A, Berglund L. Tularaemia. *Eur Respir J* 2003;21:361-373.

(177) Tarnvik A, Chu MC. New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1105:378-404.

(178) Tarnvik A, Priebe HS, Grunow R. Tularaemia in Europe: an epidemiological overview. *Scand J Infect Dis* 2004;36:350-355.

(179) Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:231-241.

(180) Teixeira LK, Fonseca BP, Barboza BA, Viola JP. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100 Suppl 1:137-144.

(181) Telepnev M, Golovliov I, Grundstrom T, Tarnvik A, Sjostedt A. Francisella tularensis inhibits Toll-like receptor-mediated activation of intracellular signalling and secretion of TNF-alpha and IL-1 from murine macrophages. *Cell Microbiol* 2003;5:41-51.

(182) Telepnev M, Golovliov I, Sjostedt A. Francisella tularensis LVS initially activates but subsequently down-regulates intracellular signaling and cytokine secretion in mouse monocytic and human peripheral blood mononuclear cells. *Microb Pathog* 2005;38:239-247.

(183) Titball RW, Petrosino JF. Francisella tularensis genomics and proteomics. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1105:98-121.

(184) Tsokos M, Fehlauer F. Post-mortem markers of sepsis: an immunohistochemical study using VLA-4 (CD49d/CD29) and ICAM-1 (CD54) for the detection of sepsis-induced lung injury. *Int J Legal Med* 2001;114:291-294.

(185) Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* 2002;366:689-704.

(186) Waldo RH, Cummings ED, Sarva ST et al. Proteome cataloging and relative quantification of Francisella tularensis tularensis strain Schu4 in 2D PAGE using preparative isoelectric focusing. *J Proteome Res* 2007;6:3484-3490.

(187) Wang Y, Wu TR, Cai S, Welte T, Chin YE. Stat1 as a component of tumor necrosis factor alpha receptor 1-TRADD signaling complex to inhibit NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 2000;20:4505-4512.

(188) Wayne CJ, Oyston PC. Vaccines against Francisella tularensis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1105:325-350.

(189) Weiss DS, Henry T, Monack DM. Francisella tularensis: activation of the inflammasome. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1105:219-237.

(190) Wickstrum JR, Bokhari SM, Fischer JL et al. Francisella tularensis induces extensive caspase-3 activation and apoptotic cell death in the tissues of infected mice. *Infect Immun* 2009;77:4827-4836.

(191) Wilson JE, Katkere B, Drake JR. Francisella tularensis induces ubiquitin-dependent major histocompatibility complex class II degradation in activated macrophages. *Infect Immun* 2009;77:4953-4965.

(192) Woolard MD, Frelinger JA. Outsmarting the host: bacteria modulating the immune response. *Immunol Res* 2008;41:188-202.

(193) Woolard MD, Hensley LL, Kawula TH, Frelinger JA. Respiratory Francisella tularensis live vaccine strain infection induces Th17 cells and prostaglandin E2, which inhibits generation of gamma interferon-positive T cells. *Infect Immun* 2008;76:2651-2659.

(194) Woolard MD, Wilson JE, Hensley LL et al. Francisella tularensis-infected macrophages release prostaglandin E2 that blocks T cell proliferation and promotes a Th2-like response. *J Immunol* 2007;178:2065-2074.

(195) Zogaj X, Chakraborty S, Liu J, Thanassi DG, Klose KE. Characterization of the Francisella tularensis subsp. novicida type IV pilus. *Microbiology* 2008;154:2139-2150.

8. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA

Původní práce v časopisech s IF:

Loudová M., **Novosad J.**: Rapid test for the early detection of mycoplasma contamination of the continuous cell line J774.2. Immunology Letters 2004;92:215-216 *(IF: 2,858; 5 year IF: 2,409)*

Holicka M., **Novosad J.**, Kudlova M., Loudova M., Andrys C., Krejsek J.: J774 macrophage-like cell line cytokine and chemokine patterns are modulated by Francisella tularensis LVS strain infection. Folia Microbiol. 2010; 55(2). (IF=1.172). Přijato k publikaci.

Původní práce v recenzovaných časopisech:

Novosad J., Loudová M., Holická M., Krejsek J.: Phenotype profile of effectively activated macrophage J774.2 cells. Vojenské zdravotnické listy 2004;vol 73(suppl.1):1-5

Holická M., **Novosad J.**, Loudová M., Andrýs C., Krejsek J.: Effect of IFN gamma, LPS and *Francisella tularensis* LVS infection on production of cytokines by murine macrophage-like cell line J774.2 *in vitro*. Vojenské zdravotnické listy 2004;vol 73(suppl 1):5-7

Jankovičová K, Krejsek J, Kopecký O, Voglova J, Škrabková Z, **Novosad J**.: The multidrug resistance and apoptosis evaluation in acute myeloid leukemia cells after the in vitro doxorubicin treatment. Acta Medica (Hradec Kralove). 2004;47(3):181-5

Jankovičová K, Krejsek J, Kopecký O, Voglová J, **Novosad J.**: Sledování vybraných znaků mnohočetné rezistence k cytostatikům u leukemických buněk pacientů s diagnózou akutní myeloidní leukémie. Cas Lek Cesk. 2004;143(7):471-5

Novosad J., Kudlová M., Loudová M., Holická M., Krejsek J.: Funkční model aktivace a infekce makrofágů in vitro. Alergie, 2006;3:233-237

Holická M., **Novosad J.**, Loudová M., Kudlová M., Krejsek J.: The effect of interferon-γ and lipopolysaccharide on the growth of *Francisella tularensis* LVS in murine macrophage-like cell line J774. Acta Medica 2009; 52(3):101-106

Novosad J., Krčmová I., Kleiberová M., Králíčková P.: Principy měření oxidu dusnatého ve vydechovaném vzduchu, srovnání dvou přístrojů pro elektrochemickou analýzu. Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL 2009; 6(4):13-18

Přehledové práce v recenzovaných časopisech:

Novosad J., Kodydková K., Krejsek J.: Apoptóza, její mechanismy a medicínský význam. II. Poruchy regulace apoptózy a jejich souvislost s rozvojem onemocnění. Vnitr Lek. 2001 Jun;47(6):387-90.

Novosad J., Kodydková K., Krejsek J.: Apoptóza, její mechanismy a medicínský význam. I. Definice apoptózy a její průběh na buněčné úrovni. Vnitr Lek. 2001 Jun;47(6):381-6.

Novosad J., Jankovičová K., Krejsek J.: Protein Bcl-2 a jeho úloha v maligní transformaci buňky. Klinická onkologie. 2002, 15(1): 2-6

Novosad J., Fiala Z., Borská L., Krejsek J.: Immunosuppressive effect of polycyclic aromatic hydrocarbons by induction of apoptosis of pre-B lymphocytes of bone marrow. Acta Medica (Hradec Kralove). 2002;45(4):123-8.

Krejsek J., **Novosad J.,** Kopecký O.: Protilátková odpověď závislá a nezávislá na T lymfocytech. Alergie 2003;3:204-205.

Krejsek J., **Novosad J.**, Kopecký O.: Společenství mikroorganismů a člověka. Alergie 2003;3:206-210

Hrudková M., Fiala Z., Borská L., **Novosad J**., Smolej L.: Účinky polycyklických aromatických uhlovodíků na kostní dřeň. Acta Medica Suppl 2004;47(2):75-81

Krejsek J., **Novosad J.**, Kopecký O. Imunopatogeneze diabetu mellitu I. typu. Vnitr Lek. 2004;50(5):408-11

Krejsek J., Kuneš P., Andrýs C., Holická M., **Novosad J.**, Kudlová M., Koláčková M.: Přirozená imunita, receptory pro exogenní a endogenní nebezpečné vzory v imunopatogenezi aterosklerózy. I. část: Přirozená imunita, rozlišení signálů nebezpečí. Čas Lék Čes 2005; 144:785-789

Krejsek J., Kuneš P., Andrýs C., holická M., **Novosad J.**, Kudlová M., Koláčková M.: Přirozená imunita, receptory pro exogenní a endogenní nebezpečné vzory v imunopatogenezi aterosklerózy. II. část: receptory TLR, význam polymorfizmu receptorů pro nebezpečné vzory. Čas Lék Čes 2005; 144:790-794

Krejsek J., Kudlová M., Koláčková M., **Novosad J.**: Imunita na sliznicích se zřetelem na sliznici urogenitálního traktu a diabetes. Vnitr Lek. 2008; 54(5):478-81.

Krčmová I., **Novosad J.**, Chládková I.: Měření nazálního NO - přínos pro klinickou praxi? Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL 2009; 6(4): 25-27

Krčmová I., **Novosad J.**: Bronchiální astma – praktické aspekty. Interní medicína pro praxi 2010; 12(3): 48-51

Novosad J., Holická M., Novosadová M., Krčmová I., Malá E., Krejsek J.: Imunopatogeneze infekce Francisellou tularensis a rizika bioterorismu. Alergie 2010 – přijato do tisku

Práce v časopisech bez recenzního řízení:

Novosad J.: Zánět a nádorové bujení. Sanquis, 2007;49:36-38

Abstrakta:

Loudová M., Holická M., **Novosad J.**: Phenotypic and morphological changes in J774.2 cell line during *in vitro* infection of *Francisella tularensis.* Fourth international conference on tularemia. City of Bath, UK, 15.-18. 9. 2003

Krejsek J., **Novosad J.,** Kopecký O.: Imunopatogenese autoimunitních onemocnění. Compendium patologie a léčby chorob pojiva. Společnost pro výzkum a využití pojivových tkání, Praha, 2004:31-35. Soubor přednášek IX. Konference o patologii a léčbě chorob pojiva, Praha, 25. 4. 2003

Novosad J., Holická M., Loudová M.: FcgIII/IIR (CD16/32)- a promising marker for monitoring of J774.2 macrophages stimulation? 1st European workshop on the analysis of the phagocyte function, Brno, 7.-9. 9. 2003

Loudová M., **Novosad J.,** Holická M.: Phenotype analysis of J774.2 macrophages during stimulation. 1st European workshop on the analysis of the phagocyte function, Brno, 7.-9. 9. 2003

Holická M., Loudová M., **Novosad J.**: Cell viability and nitric oxide production by J774.2 macroprages during stimulation. 1st European workshop on the analysis of the phagocyte function, Brno, 7.-9. 9. 2003

Loudová M., **Novosad J.,** Holická M.: Efekt in vitro infekce Francisella tularensis LVS na stimulaci monocyto-makrofágové linie J774.2 pomocí LPS a IFN -γ. V. dny průtokové cytometrie, Nemocnice Na Homolce, Praha, 19. – 20. 4. 2004

Holická M., **Novosad J.,** Loudová M., Andrýs C., Krejsek J.: Effect of IFN gamma, LPS and *Francisella tularensis* LVS infection on production of cytokines by murine macrophage-like cell line J774.2 *in vitro*. Disccusion forum 2004, Molecular and evolutionary aspects of host - pathogen interactions. Tři Studně, 26.-29.4.2004

Krejsek J., Holická M., **Novosad J.,** Loudová M., Kudlová M., Andrýs C.: Influence of simultaneous stimulation by LPS and Interferon gamma and Francisella tularensis infection on production of IL-6, IL-10, IL-12 and TNF alpha by macrophage J774 cells. 3rd International conference on Innate Immunity, Crete Greece, October 10-15, 2004

Krocova Z., Stulik J., Andelova H., Hartmanova B., Hernychova L., Hubalek M., Lenco J., Brychta M., Holicka M., Loudova M., **Novosad J.,** Hrstka R., Macela A.: Interaction of *Francisella tularensis* with Eukaryotic Cells. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montreal, Canada, July 18-23, 2004

Červinka M., Krejsek J., Rudolf E., Andělová H., Holická M., **Novosad J.,** Loudovám M., Kudlová M.: Proteome centre for the study of intracellular parasitism. In Acta Medica (Hradec Králové), 2005, 48(2), 102

Kudlová M., Holická M., **Novosad J.,** Krejsek J.: In vitro infekce myší monocyto-makrofágové linie J774.2 patogenní baktérií F. tularensis LVS a její experimentální ovlivnění ve smyslu efektivní eliminace infekce. XXIII. sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, XI. kongres českých a slovenských imunologů, Hradec Králové, 25.-28.10.2006

Smolej L., Andrýs C., Vroblová V., **Novosad J.,** Belada D., Žák P., Krejsek J., Hrudková M., Široký O., Malý J.: Association of ZAP-70 expression with plasma levels of angiogenic activators in chronic lymphocytic leukemia. Haematologica, 2007 92, Suppl. 1:353-353 *(IF: 5,978, 5 year IF: 5,513)*

Smolej L., Andrýs C., Vroblová V., **Novosad J.**, Krejsek j.: Relationship of ZAP-70 expression and circulating angiogenic cytokines in chronic lymphocytic leukaemia British Journal of Haematology, 2007, 137, č. Suppl. 1:59-59 *(IF:4,478, 5 year IF: 4,248)*

Novosad J., Loudová M., Holická M., Kudlová M., Krejsek J, Krčmová I.: Functional model of *in vitro* infection of murine macrophages by *F. tularensis* LVS. World Allergy Organisation Journal 2007; (Suppl. 11): S116

Krčmová I., Andrýs C., Drahošová M., **Novosad J.**: Two different application forms of grass pollen immunotherapy – the changes in the levels of cytokines IL-4 anf IFNγ after 36 months of immunotherapy. World Allergy Organisation Journal 2007; (Suppl. 11): S239

Novosad J., Novosadová M., Holická M., Krejsek J., Krčmová I.: Phenotype changes during activation of infected macrophage J774.2 cells. Allergy 2009; 64 (Suppl. 90): 265 *(IF: 6,204; 5 year IF: 5,553)*

Krčmová I., **Novosad J.**, Kralickova P., Kleiberova M., Chládkova J., Melicharova J.: Asthma control test, FeNO, functional parameters. Allergy 2009; 64 (Suppl. 90): 301-302 *(IF: 6,204; 5 year IF: 5,553)*

Krčmová I., Paráková Z., Sedlák V., **Novosad J.:** Jak Xolair ovlivňuje kvalitu života astmatiků? XV. Kongres ČPFS a SPFS, Praha, Česká republika, 25. - 28. 6. 2009

Krčmová I., **Novosad J.,** Králíčková P., Kleiberová M., Malá E., Burešová E., Horynová E.: Comparative study of two devices for FeNO analysis (NIOX MINO and HypAir FeNO). XXI. WAC 2009, Buenos Aires, Argentina, 6.-10.12.2009

Novosad J., Malá E., Holická M., Novosadová M., Krčmová I., Krejsek J.: Stimulation of macrophages by INFγ in combination with LPS leads to effective elimination of *F. tularensis* experimental infection. 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WorldPharma 2010), Copenhagen, Denmark, 17 - 23 July 2010

Novosad J., Novosadová M, Holická M., Malá E., Krčmová I., Krejsek J.: ICAM-1 expression on macrophages infected by *Francisella tularensis* LVS is a usefull predictor of an effective infection elimination. EAACI 2010, London, United Kingdom, 5.-9.6.2010

Salajka F., Bartoš V., Šťásek J., Bis J., Brtko M., Polanský P., **Novosad J.:** Možnosti neinvazivního stanovení plicní hypertenze u nemocných s plicní fibrózou. Kongres ČPFS v Bratislavě 2010

Bartoš V., Salajka F., Šťásek J., Bis J., Brtko M., Polanský P., **Novosad J.**: Lze stanovit plicní hypertenzi u pacientů s plicními fibrózami pomocí funkčního vyšetření plic? Naše zkušenosti. Hradecké pneumologické dny, Hradec Králové 2010