

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



**Ovlivnění infekce *Francisella tularensis* LVS *in vitro* působením interferonu- γ
a lipopolysacharidu**

Mgr. Monika Holická

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program Lékařská imunologie

Hradec Králové

2010

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Lékařská imunologie na Ústavu klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT České Republiky, č. LN00A033 a výzkumného záměru MSM VZ 0021620812.

Autor: Mgr. Monika Holická
Ústav klinické imunologie a alergologie
Lékařská fakulta UK v Hradci Králové

Školitel: prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.
Ústav klinické imunologie a alergologie
Lékařská fakulta UK v Hradci Králové a Fakultní nemocnice
Hradec Králové

Oponenti: doc. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.
Univerzita obrany Brno, Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové
Ústav molekulární patologie

PharmDr. Petr Jílek, CSc.
Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických věd

*Obhajoba disertační práce se koná dne _____ před komisí pro obhajoby
disertačních prací oborové rady Lékařská imunologie v budově Ústavu klinické imunologie
a alergologie LF UK a FN, budova č. 17, areál Fakultní nemocnice Hradec Králové.*

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská imunologie

1. OBSAH

1. OBSAH	3
2. SOUHRN	4
3. SUMMARY	5
4. ÚVOD	6
5. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	8
6. MATERIÁL A METODIKA	9
6.1 <i>In vitro</i> infekce monocyto-makrofágové buněčné linie J774.2.....	9
6.2 Proliferace <i>Francisella tularensis</i> (LVS), životnost (viabilita) a počet buněk	9
6.3 Stimulace makrofágové linie J774	10
6.4 Stanovení cytokinů a chemokinů v supernatantech	10
6.5 Stanovení NO	11
6.6 Statistická analýza	11
7. VÝSLEDKY	12
7.1 VÝSLEDKY I.	12
7.1.1 Standardizace <i>in vitro</i> J774.2 buněčného modelu	12
7.2 VÝSLEDKY II.....	12
7.2.1 Infekce buněk monocyto-makrofágové linie J774.2 prostřednictvím <i>F. tularensis</i> LVS s následnou stimulací pomocí INF- γ a/nebo LPS	12
7.2.1.1 <i>F. tularensis</i> LVS + INF- γ	12
7.2.1.2 <i>F. tularensis</i> LVS + LPS	13
7.2.1.3 <i>F. tularensis</i> LVS + (INF- γ + LPS)	13
7.2.2 Stimulace buněk monocyto-makrofágové linie J774.2 pomocí INF- γ a/nebo LPS s následnou infekcí buněk prostřednictvím <i>F. tularensis</i> LVS	14
7.2.2.1 INF- γ + <i>F. tularensis</i> LVS	14
7.2.2.2 LPS + <i>F. tularensis</i> LVS	14
7.2.2.3 (INF- γ + LPS) + <i>F. tularensis</i> LVS	15
7.3 VÝSLEDKY III.	15
7.3.1 Hodnocení produkce NO ₂ ⁻ buňkami monocyto-makrofágové linie J774.2 pod vlivem infekce <i>F. tularensis</i> LVS	15
7.4 VÝSLEDKY IV.	16
7.4.1 Hodnocení produkce cytokinů a chemokinů aktivovanými buňkami monocyto- makrofágové linie J774.2 pod vlivem infekce <i>F. tularensis</i> LVS	16
7.4.1.1 IL-12p40.....	16
7.4.1.2 IL-18.....	17
7.4.1.3 IL-6.....	18
7.4.1.4 TNF- α	19
7.4.1.5 MCP-5	20
7.4.1.6 RANTES	21
7.4.1.7 MIP-2	22
7.4.1.8 MIP-1	23
8. SHRNU TÍ VÝSLEDKŮ	24
9. DISKUSE	25
9.1 Diskuse k výsledkům I.	25
9.2 Diskuse k výsledkům II.	26
9.3 Diskuse k výsledkům III.	27
9.4 Diskuse k výsledkům IV.	28
10. ZÁVĚR.....	31
POUŽITÁ LITERATURA.....	32
PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORKY	34

2. SOUHRN

Francisella tularensis je vysoce virulentní bakterie zodpovědná za onemocnění zvané tularémie. Bakterie je diskutována vzhledem ke své schopnosti množení a růstu v savčích buňkách. Nicméně, imunopatogeneze této infekce není stále kompletně známa. Předkládaná práce je zaměřena na sledování vzájemného vztahu mezi touto intracelulární parazitickou bakterií a myší monocyto-makrofágovou buněčnou linií J774.2.

Cíle: Sledovat schopnost myšního rekombinantního cytokinu **interferonu- γ** (INF- γ) a/nebo **lipopolysacharidu** (LPS) odvozeného z *E. coli in vitro* stimulovat antimikrobiální aktivitu buněčné linie J774.2 vůči živému vakcinačnímu kmenu (LVS) *Francisella tularensis* skrze schopnost těchto buněk produkovat prozánětlivé cytokiny a chemokiny a inhibovat růst bakterie ve sledovaných buňkách.

Metody: Proliferace bakterie v *in vitro* kultuře byla sledována metodou populační analýzy. Pro stimulaci okamžitě po infekci, nebo 3 hod před infekcí byl použit rekombinantní myší INF- γ , v koncentraci 100 I.U./ml nebo 1000 I.U./ml media a/nebo bakteriální LPS odvozený z *E. coli*, serotyp O55:B5, v koncentraci 10 ng/ml nebo 50 ng/ml media. Pro hodnocení cytokinů a chemokinů v buněčném supernatantu byla použita metoda ELISA. Hodnoceny jsou následující cytokiny a chemokiny: interleukin 12p40 (IL-12 p40), interleukin 18 (IL-18), interleukin 6 (IL-6), tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α), MCP-5 (Monocyte Chemoattractive Protein-5), RANTES (Regulated upon Activation, Normal T Expressed, and presumably Secreted), MIP-1 γ (Macrophage Inflammatory Protein 1 gamma) and MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein 2). Životnost buněk byla sledována použitím trypanové modře (0,5% roztok). Koncentrace NO₂⁻ byla sledována pomocí Griessova činidla. Výsledky tří nezávislých pokusů jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.D.

Výsledky: Práce ukazuje protektivní vliv především kombinace INF- γ a LPS na buňky linie J774.2. Takto ovlivněné buňky jsou schopny potlačit růst *F. tularensis* LVS především z hlediska dlouhodobé stimulace buněk před následnou infekcí buněk J774.2 *F. tularensis* LVS. V případě již rozvinuté infekce, je třeba použít vyšší dávku kombinace INF- γ a LPS pro potlačení růstu bakterie v buňkách J774.2. *F. tularensis* LVS infekce zvyšuje produkci IL-12p40, snižuje produkci TNF- α a není schopna ovlivnit produkci IL-18, IL-6, MCP-5, RANTES, MIP-1 a MIP-2 stimulovanými buňkami linie J774.2. Generační čas bakterie v buňkách J774.2 je 3,5 hodiny, stabilita buněčné kultury je zaručena prvních 12 hodin.

Závěr: Infekce *F. tularensis* LVS ovlivňuje syntézu cytokinů monocyto-makrofágovou buněčnou linií J774.2. Stimulace buněk J774.2 kombinací INF- γ s LPS inhibuje růst *F. tularensis* LVS.

3. SUMMARY

Modulation of *Francisella tularensis* LVS *in vitro* infection by interferon- γ and lipopolysaccharide

Background: *Francisella tularensis*, highly virulent bacteria responsible for tularaemia, is known to replicate within the host macrophages. However, the immunopathogenesis of this infection is still incompletely understood. We focused on mutual interactions between intracellular parasitic bacteria *F. tularensis* and murine macrophage-like cell line J774.2.

Aims: To examine the capability of recombinant murine lymphokine **interferon- γ** (INF- γ) and/or **lipopolysaccharide** (LPS) derived from *E. coli* to stimulate *in vitro* antimicrobial activity of macrophage-like J774.2 cell line against the live vaccine strain (LVS) of *Francisella tularensis* through their ability to produce proinflammatory cytokines and chemokines and to inhibit the growth of bacteria.

Methods: Proliferation of microbes in *in vitro* culture was acquired by technique of population analysis. Recombinant murine INF- γ , in concentrations 100 I.U./ml or 1000 I.U./ml of medium, and/or bacterial LPS derived from *E. coli*, serotype O55:B5 in concentrations 10 ng/ml of medium or 50 ng/ml of medium, was used for stimulations immediately after infection or 3 hrs before infection. ELISA method was used for evaluation of cytokines and chemokines in culture supernatants. Following cytokines and chemokines, interleukin 12p40 subunit (IL-12 p40), interleukin 18 (IL-18), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), monocyte chemotactic protein 5 (MCP-5), RANTES (Regulated upon Activation, Normal T Expressed, and presumably Secreted), MIP-1 γ (Macrophage Inflammatory Protein 1 gamma) and MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein 2) were tested. Viability of cells was calculated using Trypan blue exclusion test (0,5% TB in saline) and concentration of NO₂⁻ was determined by Griess reagent. Results expressed as mean \pm S.D. were derived from three independent experiments.

Results: We demonstrated that *F. tularensis* LVS infection up-regulates IL-12p40 production by stimulated macrophages and down-regulates TNF- α production. *F. tularensis* LVS infection was not capable to affect the production of IL-18, IL-6, MCP-5, RANTES, MIP-1 and MIP-2 by stimulated macrophages. Both stimulation of J774.2 cells either by INF- γ alone or especially in combination with LPS before infection *F. tularensis* LVS revealed protective effects. Higher concentrations of INF- γ with LPS were needed to inhibit ongoing *F. tularensis* LVS infection. The generation time of *F. tularensis* in J774.2 cells was calculated to be 3.5 h and the stability of culture is guaranteed for the first 12 hours after infection.

Conclusions: *F. tularensis* LVS infection modulates the cytokine synthesis by J774.2 macrophage-like cell line. On the other hand, stimulation of J774.2 cell line by combination of INF- γ with LPS inhibits the growth of *F. tularensis* LVS.

4. ÚVOD

Francisella tularensis je Gram-negativní fakultativní bakterie způsobující onemocnění zvané tularémie (19). Tularémie patří do kategorie zoonóz, tedy do kategorie onemocnění, která jsou přenosná na člověka. I když se v současné době jedná o onemocnění vyskytující se převážně sporadicky, byl na území České Republiky v posledních deseti letech (1999 – 2009) hlášen výskyt celkem 1045 případů tohoto onemocnění (epidemiologická data SZÚ ČR <http://www.czu.cz>). S ohledem především na biologické vlastnosti *F. tularensis*, jako původce tohoto onemocnění, stoupá význam nových poznatků o tomto patogenu.

Francisella tularensis náleží mezi tzv. intracelulární patogeny, tj. patogenní mikroorganismy schopné přežít v buňkách obratlovců (10, 15). Je jednou z nejméně infekčních dosud známých bakterií. Vážné až fatální onemocnění může být vyvoláno pouze průnikem okolo 10 bakterií intradermální nebo inhalační cestou (4).

Vzhledem k vysoké infekční schopnosti bakterie, jak ve vnějším, tak laboratorním prostředí, schopnosti snadného šíření a nescifické klinické prezentace, byla *Francisella tularensis* zařazena mezi zástupce potenciálních biologických zbraní (kategorie A) (5).

F. tularensis může iniciovat vznik onemocnění několika různými způsoby zahrnujícími ingesci, inhalaci, slizniční nebo kožní poškození nebo přenos prostřednictvím hmyzích vektorů. Člověk se většinou nakazí hmyzím kousnutím nebo kontaktem s infikovaným zvířetem. Klinická prezentace tularémie je závislá na virulenci konkrétního kmene rodu *F. tularensis* (11) a může se manifestovat několika různými formami: ulceroglandulární, glandulární, okuloglandulární, oropharyngeální, intestinální, pneumonické, tyfoidální (30).

Fakt, že pouze několik málo mikroorganismů, které proniknou kožní nebo slizniční cestou, může způsobit fatální onemocnění, ukazuje, že tento mikroorganismus je schopen účinně uniknout přirozené imunitní obraně. Protože manipulace s plně virulentními kmeny *Francisella tularensis* přináší jisté praktické komplikace, je řada studií zkoumajících časnou odpověď organismu k *F. tularensis* prováděny s živým vakcinačním kmenem (live vaccine strain - LVS), který je oslabený pro člověka, ale u myši, jako přirozeného hostitele *F. tularensis*, vyvolává těžké infekce (2).

LVS byla vyvinuta v Sovětském svazu odvozením z virulentního kmene *F. tularensis holartica* opakovaným pasážováním na agaru s následným pasážováním pomocí intraperitoneální (i.p.) inokulace myši. Takto upravený kmen byl následně transportován do Spojených států amerických, kde byla zahájena jeho produkce jako atenuované vakcíny (26).

F. tularensis se replikuje především v makrofázích a v buňkách odvozených z makrofágů. Makrofágy hrají klíčovou úlohu v obraně hostitele proti infekci díky jejich přímému zabíjení

mikrobů a díky regulaci imunitní odpovědi hostitele (18). Makrofágy disponují řadou potentních antimikrobiálních mechanismů, mezi něž patří respirační vzplanutí, funkce fagolysosomů obsahující degradační enzymy, nízké pH a široká řada toxických sekrečních produktů, například reaktivní meziprodukty metabolismu dusíku a kyslíku (9). Role aktivace makrofágů a antimikrobiálních mechanismů v makrofázích aktivovaných cytokiny je evidentní především v případě systémových intracelulárních infekcí způsobených patogeny, kteří se replikují v nestimulovaných klidových makrofázích. Růst uvnitř makrofágů je strategie, kterou řada prokaryotických i eukaryotických patogenů využívá k tomu, aby unikly z dosahu hostitelského imunitního systému. Růst uvnitř makrofágů nechrání pouze mikroorganismus v průběhu akutní fáze onemocnění, ale slouží také jako nika pro dlouhodobé přežívání patogenu uvnitř hostitele (6).

Nedávné poznatky však naznačují, že *F. tularensis* je schopna unikat z fagosomů makrofágů cestou mechanismu, který umožňuje degradaci fagosomální membrány (11). V důsledku toho dochází k následnému množení bakterie uvnitř cytosolu. *F. tularensis* disponuje řadou proteinů s charakteristikami faktorů virulence (16) a virulentních determinant (8, 5). Mezi známé virulentní determinanty *F. tularensis* patří například LPS, který ale indukuje pouze tvorbu malého množství prozánětlivých cytokinů, především interleukinu (IL)-1 β a TNF- α . Další determinantou je kapsula, která je součástí především plně virulentních kmenů a zajišťuje rezistenci bakterie ke komplementu (7).

Jak již bylo naznačeno, virulence *F. tularensis* závisí na schopnosti bakterie proliferovat do vysokého počtu před rozvojem efektivní imunitní odpovědi, která je zprostředkována především T lymfocyty. T lymfocytární odpověď na proteinové antigeny *F. tularensis* je především Th1 typu a odpověď hostitelských buněk je závislá na schopnosti těchto buněk produkovat především cytokin interferon gamma (INF- γ) (12). INF- γ je znám jako potentní aktivátor makrofágů. Tato aktivace zahrnuje jak aktivaci antimikrobiálních mechanismů, tak aktivaci antitumorových mechanismů, stejně tak regulaci zpracování antigenu a antigení prezentaci (25). INF- γ společně s dalším aktivátorem makrofágů, tumor nekrotizujícím faktorem alfa (TNF α), jsou zásadní pro efektivní kontrolu primární myší tularemie (15, 3).

Výše zmíněný lipopolysacharid (LPS) je integrální součástí vnější membrány Gram-negativních bakterií, která vykazuje řadu imunobiologických a farmakologických aktivit (28). Během bakteriální infekce jsou LPS, bakteriální lipoproteiny (28) a ostatní tzv. s patogenem asociované molekulární vzory (pathogen-associated molecular patterns- PAMPs) rozpoznávány hostitelskými buňkami jako součástí bakteriálního povrchu (7), které následně aktivují tzv. Toll-like receptory (TLR) mononukleárních fagocytů, čímž indukují produkci prozánětlivých cytokinů a antimikrobiální aktivitu makrofágů (28). TLR 4 je důležitou součástí signálního receptorového

komplexu rozpoznávajícího LPS a hraje tedy významnou roli v přirozené imunitě vůči Gram-negativním bakteriím (15). LPS *F. tularensis* LVS se však strukturálně liší od LPS ostatních Gram-negativních bakterií, např. LPS *E. coli* (8). Nedávné *in vitro* studie ale přinesly další poznatky, které poukazují na roli TLR2 a kaspázy-1 v obraně hostitelského organismu vůči *F. tularensis* LVS (19).

V předkládané práci je sledována schopnost rekombinantního myšího lymfokinu INF- γ a LPS odvozeného z bakterie *Escherichia coli* *in vitro* stimulovat antimikrobiální aktivitu makrofágové buněčné linie J774.2 v obraně proti živému vakcinačnímu kmenu *Francisella tularensis* LVS prostřednictvím schopnosti aktivovaných makrofágů redukovat proliferaci této bakterie. V práci je také sledován vliv dávky uvedených stimulujících látek na proliferaci *F. tularensis* LVS a možný protektivní vliv ošetření makrofágových buněk před vlastní infekcí pomocí jednotlivých stimulujících látek nebo jejich kombinací. V našich experimentech jsme dále sledovali schopnost makrofágů linie J774.2 ovlivněných prostřednictvím stimulujících látek a infekce reagovat na tyto vnější faktory produkcí cytokinů a chemokinů.

5. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Základním cílem práce bylo charakterizovat primární interakci fagocytujících hostitelských buněk s intracelulární bakterií *Francisella tularensis* LVS

Specifické cíle:

- sledovat proliferaci *Francisella tularensis* LVS a určit generační čas mikrobů v *in vitro* kultuře
- sledovat stabilitu systému (počet buněk, viabilita)
- sestavit jednoduchý buněčný model intracelulární proliferace mikrobů ve fagocytujících buňkách

Vlastní pokusy:

- vliv stimulace (INF γ , LPS) na *in vitro* infekci monocyto-makrofágových buněk linie J774.2 intracelulární bakterií *Francisella tularensis* LVS

6. MATERIÁL A METODIKA

6.1 *In vitro* infekce monocyto-makrofágové buněčné linie J774.2

Buňky monocyto-makrofágové linie J774.2 derivované ze samičích BALB/c myší (ECACC, No: 85011428) byly kultivovány v kompletním kultivačním mediu (Dulbecco's MEM s obsahem Glutamax-1 (2 mmol/l L-glutamine), gentamicin (5 µg/ml) obohaceném o 10% fetálního bovinního séra (FCS), Gibco™.

Buňky linie J774.2 byly před vlastním pokusem kultivovány po dobu 48 hod v kompletním kultivačním mediu bez přítomnosti gentamicinu. *Francisella tularensis* kmen LVS (ATCC 29684, American Type Culture Collection, Manassas, Va.) byla kultivována na Petriho miskách obsahujících agar McLeod po dobu 48 hodin ve 37°C v atmosféře obsahující 5% CO₂.

Podmínky infekce byly voleny tak, aby multiplicita infekce byla 200 (MOI) (t.j. poměr bakteriálních buněk k buňkám J774.2). Buňky linie J774.2 byly kultivovány s kmenem LVS po dobu 2 hodin při teplotě 37°C v kultivačním mediu bez přítomnosti gentamicinu. Po té byly infikované buňky za účelem odstranění extracelulárních bakterií kultivovány v kultivačním mediu obohaceném o gentamicin po dobu 1 hodiny při teplotě prostředí 37°C v atmosféře obsahující 5% CO₂ a následně třikrát promyty v kultivačním mediu bez gentamicinu. Infikované makrofágové buňky J774.2 byly následně rozděleny a inkubovány v 6ti jamkových kultivačních destičkách (2x10⁶ buněk/4 ml MEM). Nasazení do kultivačních destiček bylo stanoveno jako výchozí čas experimentu, T₀. V následujících časových intervalech nebylo do kultivace buněk žádným způsobem zasahováno.

6.2 Proliferace *Francisella tularensis* (LVS), životnost (viabilita) a počet buněk

Proliferace bakterií byla stanovena metodou populační analýzy.

Za účelem standardizace buněčného modelu infekce *F. tularensis* byly nejprve infikované buňky odebírány v časových intervalech 3 hodin v průběhu 24 hodin po čase T₀ (tj. 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 a 24 hodin kultivace infikovaných buněk).

V následujících experimentech, včetně experimentů hodnotících produkci cytokinů a chemokinů, byly vzorky odebírány každé 3 hodiny kultivace buněk po dobu 12 hodin (tj. 3, 6, 9, 12 hod) a po té po 24 hodinách, event. po 48 hodinách.

Pro každý časový interval a sledovaný parametr byla odebrána jedna kultivační jamka. Infikované buňky byly centrifugovány při 1200 ot/min po dobu 10 minut, po té byly jedenkrát promyty v PBS (pufrovaný fyziologický roztok) a následně byl k buňkám přidán přesně 1 ml PBS. Byl odebrán podíl 100 µl z každého stanovovaného vzorku, resuspendovaného v PBS, a vytvořena ředící řada (100 µl vzorku + 900 µl PBS). Z posledních dvou ředění ředící

řady (-3,-4) byl odebrán podíl 50 μ l, infikované buňky byly vysety a bakterie následně kultivovány na McLeod agarových půdách pro stanovení CFU. Pro každé ředění byly použity 3 Petriho misky.

Počet buněk a viabilita byly stanoveny použitím Bürkerovy komůrky, ředěním buněk v poměru 1:1 0,5% roztokem trypanové modře.

6.3 Stimulace makrofágové linie J774

Rekombinantní myší interferon γ (Mouse Recombinant, Expressed in *E. coli*, SIGMA, Saint Louis, Missouri, USA), v koncentracích 100 I.U. na 1ml nebo 1000 I.U. na 1ml media, a/nebo bakteriální lipopolysaccharid derivovaný z *E. coli* (from *Escherichia coli* Serotype O55:B5, SIGMA, Saint Louis, Missouri, USA), v koncentracích 10 ng na 1 ml media nebo 50 ng na 1 ml media, byly použity pro stimulaci okamžitě po infekci (tj. v čase T_0) nebo 3 hodiny před následnou infekcí pomocí *F. tularensis* LVS.

6.4 Stanovení cytokinů a chemokinů v supernatantech

Chemokiny a cytokiny byly analyzovány v buněčném supernatantu odebraném každé 3 hodiny během prvních 12ti hodin kultivace buněk (3, 6, 9, 12 hod) a dále v čase 24 hod, event. 48 hodin kultivace buněk. Odběr buněčného supernatantu byl prováděn následně po výsevu buněk na McLeodově půdě (viz. Proliferace *F.t.* LVS). Buněčná suspenze použita pro výsev byla centrifugována a po té byl odebrán buněčný supernatant. Buněčné supernatanty byly uchovány při teplotě -20 °C.

Hodnoceny byly následující cytokiny a chemokiny:

- **IL-12p40** (p40 podjednotka interleukinu 12) – Mouse IL-12p40 Quantikine M ELISA Kit (kat.č. M1240), R&D system
- **IL-18** (interleukin 18) – Mouse IL-18/IL-1F4 ELISA Kit, MBL (kat.č.7625), R&D system
- **IL-6** (interleukin 6) - Mouse IL-6 Quantikine M ELISA Kit (kat.č. M6000), R&D system
- **TNF- α** (Tumor necrosis factor alpha) - Mouse TNF-alpha/TNFSF2 Quantikine M ELISA Kit (kat.č. MTA00), R&D system
- **MCP-5** (Monocyte Chemotactic Protein 5) - Mouse MCP-5/CCL12 Quantikine M ELISA Kit (kat.č. MCC120), R&D system
- **RANTES** (Regulated upon Activation, Normal T Expressed, and presumably Secreted)- Mouse RANTES/CCL5 Quantikine M ELISA Kit (kat.č. MMR00), R&D system
- **MIP-1 γ** (Macrophage Inflammatory Protein 1 gamma) - Mouse MIP-1 gamma/CCL9/10 Quantikine M ELISA Kit (kat.č. MCC90), R&D system

- **MIP-2** (Macrophage Inflammatory Protein 2) – Mouse MIP-2 Quantikine M ELISA Kit (kat.č. MM200), R&D system

6.5 Stanovení NO

Stanovení NO zahrnuje stanovení nitritů (NO_2^-) a stanovení nitrátů (NO_3^-). Stanovení NO_3^- je poměrně časově i finančně náročné. Pro potřeby našeho hodnocení by bylo neefektivní, a proto jsme stanovovali pouze koncentraci nitritů v průběhu sledovaných časových intervalů u jednotlivých skupin buněk.

Protokol stanovení NO_2^- byl modifikován dle protokolu stanovení NO_2^- laboratoře doc. RNDr. Antonína Lojka, CSc., Biofyzikální ústav MU Brno.

NO_2^- byl stanovován v buněčném supernatantu odebraném dle stejného protokolu, uvedeného u stanovení chemokinů a cytokinů prostřednictvím metody ELISA, tedy ve tříhodinových intervalech prvních 12 hodin a dále ve 24 hodin kultivace buněk. Buněčné supernatanty byly opět uchovány při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Vlastní měření NO_2^- bylo provedeno smícháním 150 μl Griessova činidla (SIGMA – Aldrich, lot 012KJ029) a 150 μl deproteinizovaného vzorku nebo kalibrátoru. Po 30ti minutové inkubaci při pokojové teplotě a v nepřítomnosti světla, byly vzorky změřeny pomocí Universal Microplate Reader EL 800 při 550 nm. Deproteinace vzorků a kalibrátorů byla provedena centrifugací (16 000 g po dobu 15 minut). Koncentrace NO_2^- byla stanovena porovnáním se standardní kalibrační křivkou NaNO_2 v koncentracích 26–0,41 $\mu\text{M/l}$, ředěnou pomocí kultivačního media s obsahem 10% FCS. Pro posledním nulový bod kalibrační křivky bylo použito samotné kultivační medium s 10% FCS.

6.6 Statistická analýza

Statistické hodnocení bylo provedeno analýzou rozptylu s následným hodnocením kontrastů Scheffého metodou. Výsledky pocházejí ze tří až čtyř nezávislých experimentů a jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka.

Před statistickým zpracováním byly stanovené hodnoty logaritmovány, kromě hodnot koncentrace NO_2^- , vzhledem k výskytu záporných hodnot.

Statistické hodnocení bylo realizováno ve spolupráci s Mgr. Václavem Bláhou, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové.

7. VÝSLEDKY

7.1 VÝSLEDKY I.

7.1.1 Standardizace *in vitro* J774.2 buněčného modelu

Na základě růstu bakterie *F. tularensis* LVS v průběhu sledovaných 24 hodin byl vypočten generační čas bakterie a sestaven jednoduchý buněčný model intracelulární replikace bakterie *Francisella tularensis* LVS v buňkách monocyto-makrofágové linie J774.2.

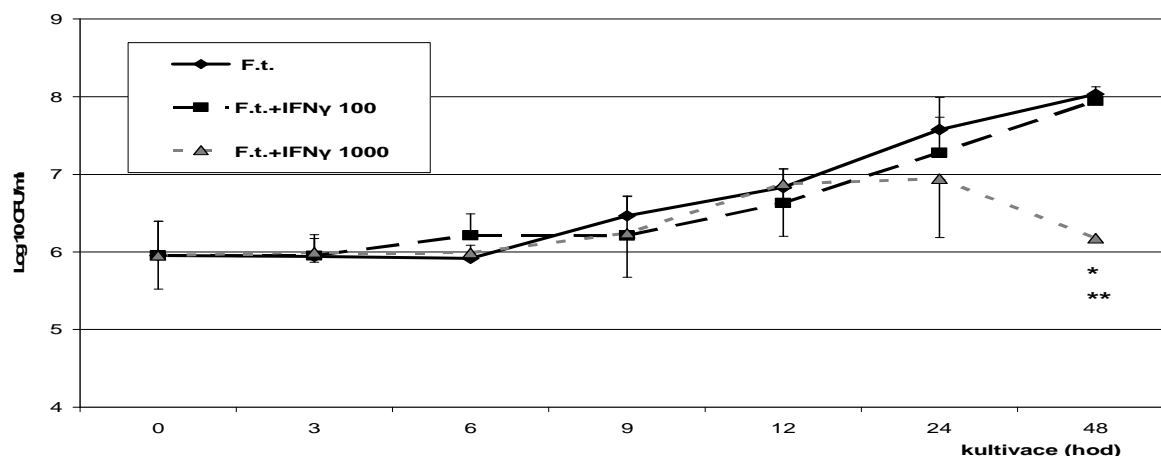
Proliferace *F. tularensis* LVS v buňkách linie byla sledována metodou populační analýzy, prostřednictvím hodnocení CFU (colony forming units). Současně byl sledován počet živých buněk v kultuře a životnost těchto buněk.

Generační čas bakterie v buňkách monocyto-makrofágové linie J774.2 je 3,5 hodiny, přičemž stabilita buněčné kultury je zachována po dobu 12ti hodin kultivace.

7.2 VÝSLEDKY II.

7.2.1 Infekce buněk monocyto-makrofágové linie J774.2 prostřednictvím *F. tularensis* LVS s následnou stimulací pomocí INF- γ a/nebo LPS

7.2.1.1 *F. tularensis* LVS + INF- γ

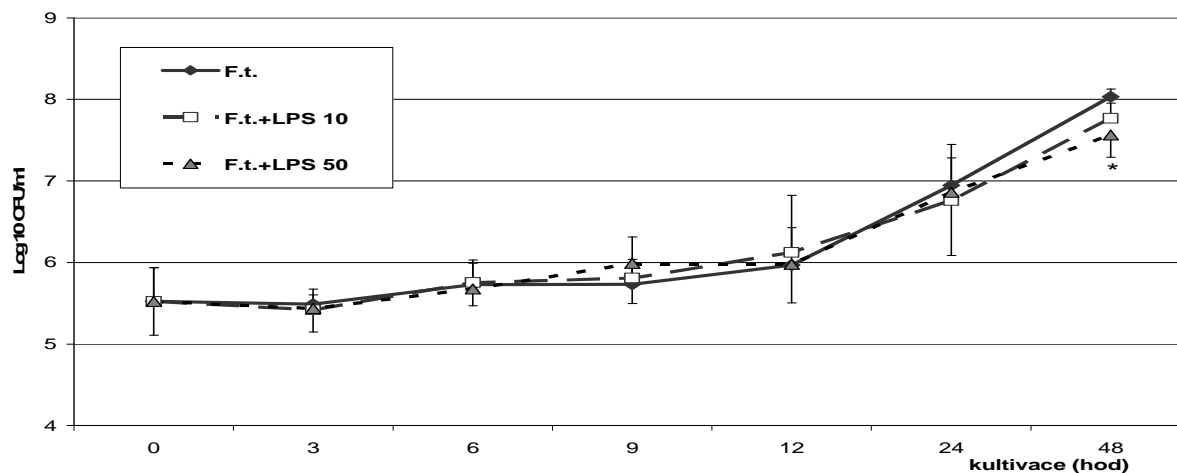


Obr. 1: Proliferace *F. tularensis* LVS bez stimulace vs. s následnou stimulací 100 IU/ml nebo 1000 IU/ml INF- γ ($n = 3$; průměr \pm S.D.). Jisté odchylky nejsou pro příliš nízké hodnoty na grafu viditelné. * $p < 0,01$ v porovnání se samotnou infekcí *F.t.* LVS, ** $p < 0,01$ v porovnání s *F.t.* LVS + 100 IU/ml INF- γ .

Koncentrace 1000 IU/ml INF- γ efektivně potlačovala ($p < 0,01$) růst *F. tularensis* LVS v intervalu 48 hod kultivace infikovaných buněk. Počet bakterií se snížil přibližně o 2 log₁₀. Tento efekt však již nebyl pozorován v případě použití koncentrace 100 IU/ml INF- γ . Dokonce byl prokázán statisticky významný pokles proliferace *F. tularensis* LVS po aplikaci 1000 IU/ml INF- γ i vůči podání 100 IU/ml INF- γ ($p < 0,01$) v čase 48 hod kultivace buněk J774.2.

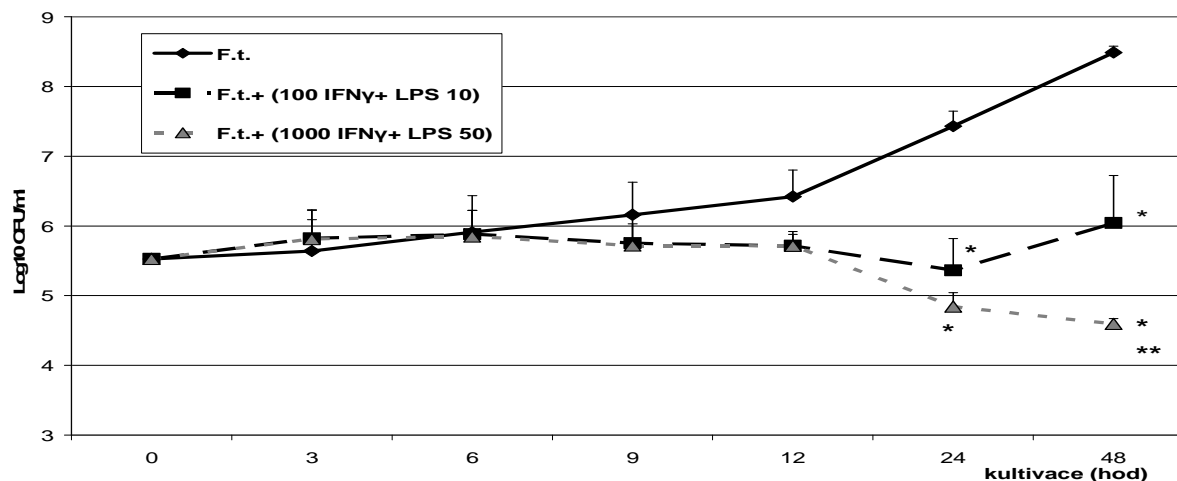
7.2.1.2 *F. tularensis* LVS + LPS

Stimulace makrofágů pomocí LPS neměla přímý vliv na proliferaci *F. tularensis* LVS. Pouze v intervalu 48 hodin kultivace, došlo k mírnému snížení růstu bakterie po aplikaci 50 ng/ml LPS ($p < 0,05$).



Obr. 2: Proliferace *F. tularensis* LVS bez stimulace vs. s následnou stimulací 10 ng/ml nebo 50 ng/ml LPS. ($n=3$; průměr \pm S.D.)* $p < 0,05$ v porovnání se samotnou infekcí *F. tularensis* LVS.

7.2.1.3 *F. tularensis* LVS + (INF- γ + LPS)



Obr. 3: Proliferace *F. tularensis* LVS bez stimulace vs. s následnou stimulací 100 IU/ml INF- γ + 10 ng/ml LPS nebo 1000 IU/ml INF- γ + 50 ng/ml LPS ($n = 3$; průměr \pm S.D.). Jisté odchylky nejsou pro příliš nízké hodnoty na grafu viditelné, * $p < 0,01$ v porovnání se samotnou infekcí *F. t.* LVS, ** $p < 0,01$ v porovnání s infekcí *F. t.* LVS se stimulací 100 IU/ml INF- γ + 10ng/ml LPS.

Proliferace *F. tularensis* LVS byla potlačena po ovlivnění buněk prostřednictvím obou koncentrací INF- γ a LPS ($p < 0,01$) v porovnání s proliferací bakterie *F. tularensis* LVS v případě nestimulované infekce, a to v intervalu 24 hod. kultivace. V intervalu 48 hodin byl růst bakterie potlačen kombinací vyšších hladin INF- γ a LPS efektivněji, než v případě použití kombinace

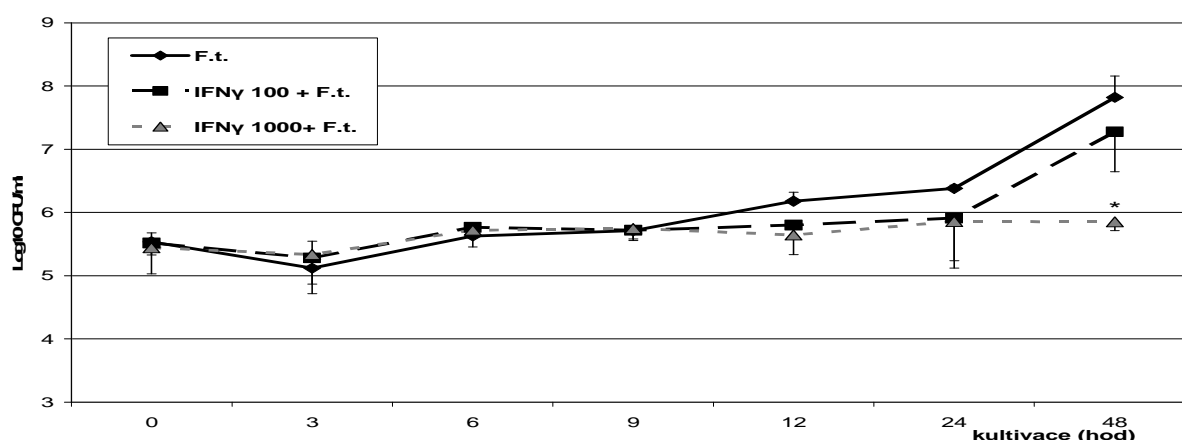
nižších hladin $\text{INF-}\gamma$ a LPS ($p < 0,01$). Proliferace *F. tularensis* LVS v buňkách J774.2 se po aplikaci kombinace vyšších dávek $\text{INF-}\gamma$ s LPS snížila přibližně o 4 \log_{10} v porovnání s nestimulovanou infekcí buněk.

7.2.2 Stimulace buněk monocyto-makrofágové linie J774.2 pomocí $\text{INF-}\gamma$ a/nebo LPS s následnou infekcí buněk prostřednictvím *F. tularensis* LVS

Stimulace buněk linie J774.2 probíhala 3 hodiny před infekcí *F. tularensis* LVS

7.2.2.1 $\text{INF-}\gamma$ + *F. tularensis* LVS

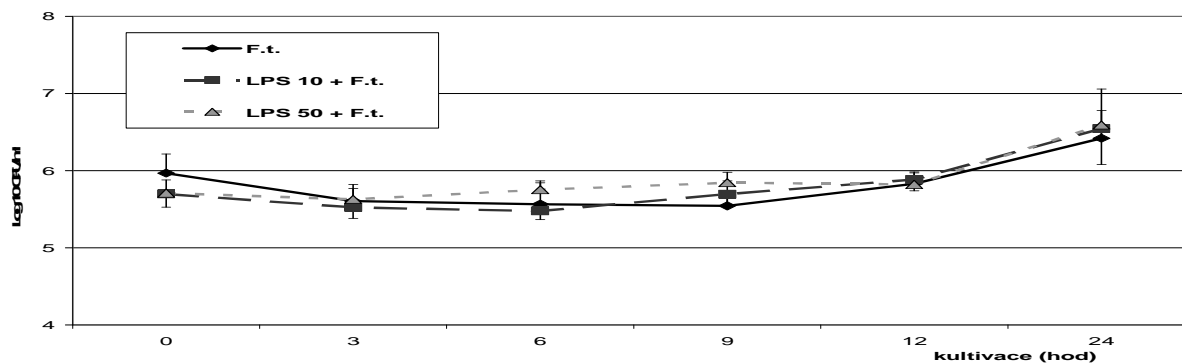
Počet bakterií *F. tularensis* LVS v intervalu 48 hodin kultivace buněk v přítomnosti 1000 IU/ml $\text{INF-}\gamma$ se statisticky významně snížil v porovnání s buňkami, které byly ovlivněny pouze samotnou infekcí ($p < 0,05$). Počet bakterií poklesl přibližně o 2 \log_{10} .



Obr. 4: Proliferace *F. tularensis* LVS v buňkách linie J774.2, předem stimulovaných $\text{INF-}\gamma$ ($n = 3$; průměr \pm S.D.). Jisté odchylky nejsou pro příliš nízké hodnoty na grafu viditelné. * $p < 0,05$ v porovnání se samotnou infekcí *F. tularensis* LVS.

7.2.2.2 LPS + *F. tularensis* LVS

Stimulace buněk LPS před následnou infekcí neměla efekt na růst *F. tularensis* LVS, ale tento vliv byl monitorován pouze 24 hodin kultivace buněk.

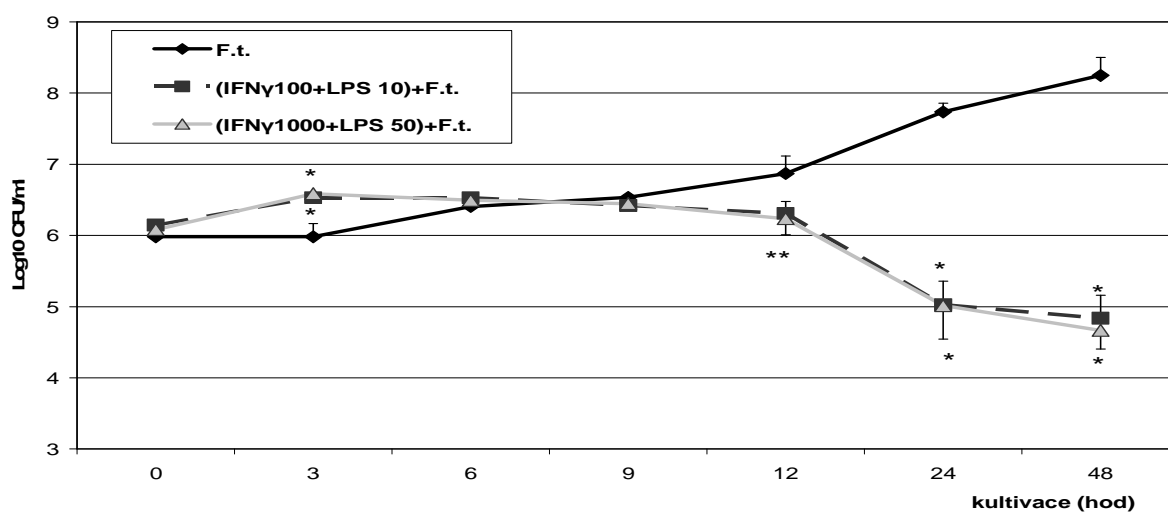


Obr. 5: Proliferace *F. tularensis* LVS v buňkách linie J774.2, předem stimulovaných LPS ($n = 3$; průměr \pm S.D.). Jisté odchylky nejsou pro příliš nízké hodnoty na grafu viditelné.

7.2.2.3 (INF- γ + LPS) + *F. tularensis* LVS

Vliv obou kombinací stimulujících látek, jak 100 IU/ml INF- γ s 10 ng/ml LPS, tak 1000 IU/ml INF- γ s 50 ng/ml LPS, na proliferaci *F. tularensis* LVS byl statisticky významný. Akumulace bakterií uvnitř buněk byla pozorována v čase 3 hodiny kultivace buněčné linie J774.2. Tento efekt byl pozorován jak v případě nižší, tak vyšší kombinace stimulujících látek ($p < 0,01$).

Potlačení růstu *F. tularensis* LVS byl pozorován již po 12ti hodinách kultivace buněk, kdy pouze vyšší kombinace stimulujících látek potlačovala proliferaci bakterií v porovnání s pouze infikovanými kontrolními buňkami ($p < 0,05$). Přímý efekt na *F. tularensis* LVS byl pozorován po 24 hodinách kultivace buněk, kde došlo k snížení bakteriálního počtu přibližně o 3 log₁₀. Tento efekt také nebyl závislý na dávce stimulujících látek.



Obr. 6: Proliferace *F. tularensis* LVS v buňkách linie J774.2 předem stimulovaných kombinací INF- γ a LPS ($n = 3$; průměr \pm S.D.). Jisté odchylky nejsou pro příliš nízké hodnoty na grafu viditelné.* $p < 0,01$ v porovnání se samotnou infekcí *F.t.*LVS, ** $p < 0,05$ stimulace kombinací 1000 IU/ml INF- γ s 50 ng/ml LPS v porovnání se samotnou infekcí *F. t.* LVS.

7.3 VÝSLEDKY III.

7.3.1 Hodnocení produkce NO₂⁻ buňkami monocyto-makrofágové linie J774.2 pod vlivem infekce *F. tularensis* LVS

Produkce NO₂⁻ stoupá především po použití kombinace obou stimulujících látek, a to i v přítomnosti infekce *F. tularensis* LVS. Byl nalezen patrný rozdíl v produkci NO₂⁻ v závislosti na způsobu podání stimulující dávky v přítomnosti infekce. Buňky, které byly ošetřeny kombinací INF- γ s LPS před vlastní infekcí *F. tularensis* LVS, produkovaly statisticky významně vyšší množství NO₂⁻ než buňky, které byly stimulovány až následně po infekci.

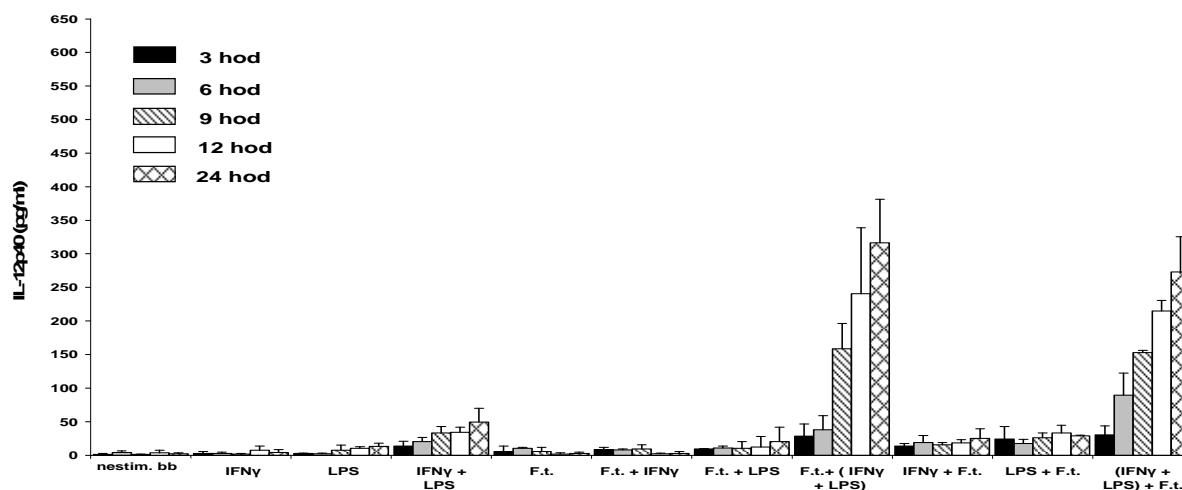
Aktivované buňky tedy reagovaly na přítomnost infekce *F. tularensis* LVS větší produkcí NO₂⁻.

7.4 VÝSLEDKY IV.

7.4.1 Hodnocení produkce cytokinů a chemokinů aktivovanými buňkami monocytomakrofágové linie J774.2 pod vlivem infekce *F. tularensis* LVS

7.4.1.1 IL-12p40

Cytokin IL-12p40 byl statisticky významně ($p < 0,01$ event. $p < 0,05$) produkován po ovlivnění buněk linie J774.2 kombinací INF- γ a LPS, a to v přítomnosti infekce *F. tularensis* LVS provedené po stimulaci buněk. V případě stimulace buněk kombinací INF- γ s LPS před vlastní infekcí, docházelo ke zvýšené produkci IL-12p40 již po 6ti hodinách kultivace buněk ($p < 0,05$). Stimulace buněk prostřednictvím kombinace INF- γ a LPS bez přítomnosti infekce vykazoval statisticky významný ($p < 0,05$) nárůst produkce IL-12p40 v intervalu 24 hodin kultivace buněk v porovnání s intervalem 3 hod. kultivace.



Obr. 7: Produkce IL-12p40 buňkami linie J774.2 v přítomnosti infekce *F. tularensis* LVS a/nebo 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS nebo jejich kombinace ($n = 3$; průměr \pm S.D.).

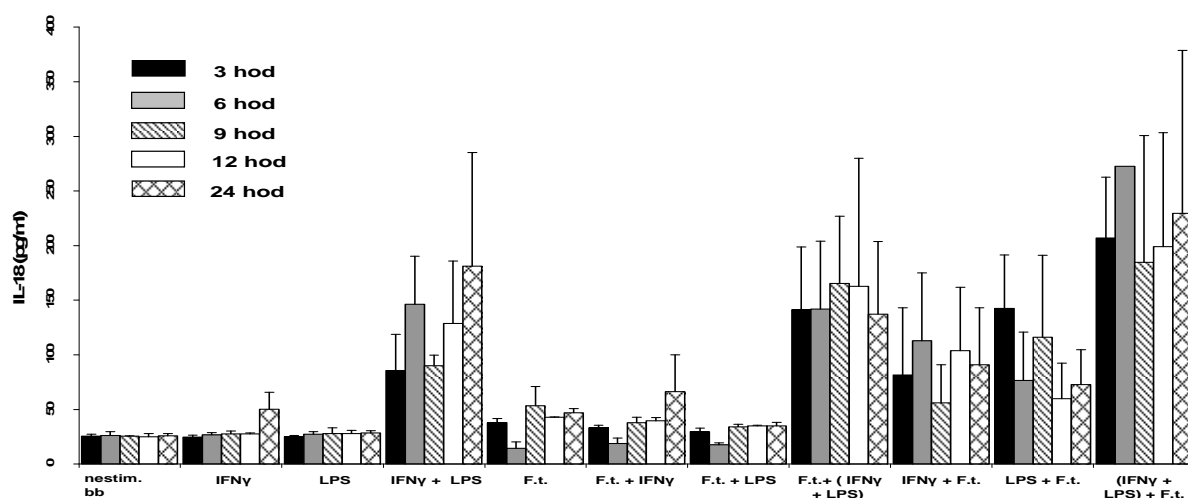
IL-12p40	hod	(IFN γ + LPS) + F.t.	LPS + F.t.	IFN γ + F.t.	F.t. + (IFN γ + LPS)	F.t. + LPS	F.t. + IFN γ	F.t.	IFN γ + LPS	LPS	IFN γ	nestimul. bb
nestimulované bb	6	$\uparrow p < 0.01$										
	9	$\uparrow p < 0.01$			$\uparrow p < 0.01$							
	12	$\uparrow p < 0.05$										
	24	$\uparrow p < 0.05$										
IFN γ	6	$\uparrow p < 0.01$			$\uparrow p < 0.05$							
	9	$\uparrow p < 0.01$			$\uparrow p < 0.05$							
	24	$\uparrow p < 0.05$										
LPS	6	$\uparrow p < 0.01$			$\uparrow p < 0.01$							
	9	$\uparrow p < 0.01$			$\uparrow p < 0.05$							
IFN γ + LPS												
F.t.	9	$\uparrow p < 0.05$										
	24	$\uparrow p < 0.05$										
F.t. + IFN γ	24	$\uparrow p < 0.05$										
F.t. + LPS												
F.t. + (IFN γ + LPS)												
IFN γ + F.t.	6	$\uparrow p < 0.01$										
LPS + F.t.												
(IFN γ + LPS) + F.t.												

Tab. 1: Statistické významnosti mezi jednotlivými sledovanými kategoriemi po stimulaci 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS v kombinaci s infekcí *F. tularensis* LVS. Výchozími kategoriemi, vůči kterým jsou ostatní vztaženy, jsou hodnoty ve svislých sloupcích.

7.4.1.2 IL-18

Cytokin IL-18 stoupal po stimulaci buněk prostřednictvím kombinace LPS a INF- γ , a to především v přítomnosti infekce *F. tularensis* LVS, ale nezávisle na způsobu podání infekce. Tento efekt se projevoval již v prvních třech hodinách kultivace buněk.

Buněk pouze infikované *F. tularensis* LVS vykazovaly nejnižší produkci IL-18 v intervalu 6 hodin (interval 6 hod vs. interval 3 hod ($p < 0,01$), interval 6 hod vs. interval 9, 12 a 24 hod ($p < 0,05$)). Podobný vývoj s poklesem produkce IL-18 v intervalu 6 hodin kultivace buněk byl sledován i v případě infekce buněk pomocí *F. tularensis* LVS s následnou stimulací těchto buněk pomocí 1000 IU/ml INF- γ nebo 50 ng/ml LPS ($p < 0,05$), respektive ($p < 0,01$). V jiných sledovaných kategoriích časová závislost nalezena nebyla.

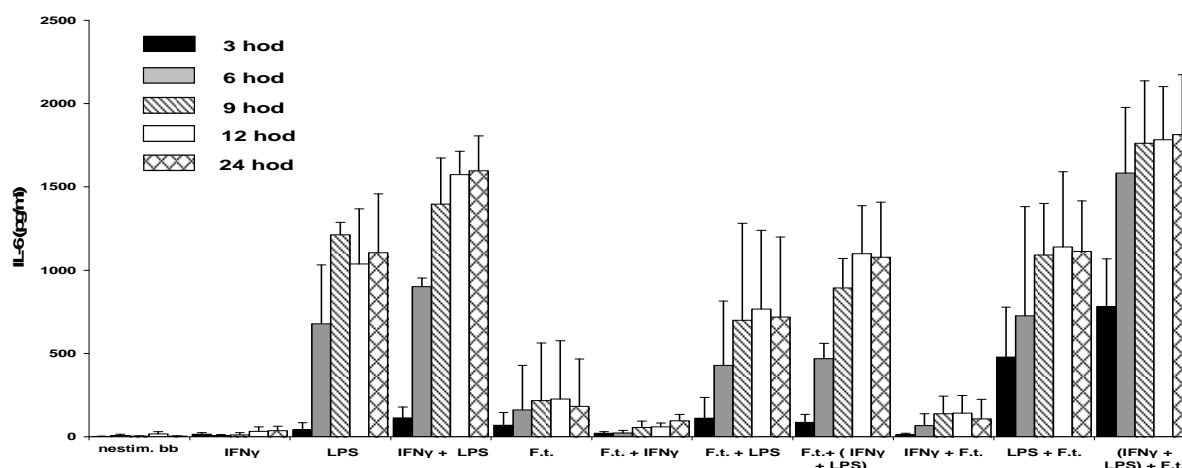


Obr. 8: Produkce IL-18 buňkami linie J774.2 v přítomnosti infekce *F. tularensis* LVS a/nebo 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS nebo jejich kombinace ($n = 3$; průměr \pm S.D.).

IL-18	hod	(IFN γ + LPS) + F.t.	LPS + F.t.	IFN γ + F.t.	F.t. + (IFN γ + LPS)	F.t. + LPS	F.t. + IFN γ	F.t.	IFN γ + LPS	LPS	IFN γ	nestimul. bb
nestimulované bb	3											
	6	$\uparrow p < 0.05$	$\uparrow p < 0.05$		$\uparrow p < 0.05$							
	9	$\uparrow p < 0.05$										
	12	$\uparrow p < 0.01$			$\uparrow p < 0.05$							
	24	$\uparrow p < 0.05$			$\uparrow p < 0.05$				$\uparrow p < 0.05$			
IFN γ	3	$\uparrow p < 0.05$	$\uparrow p < 0.05$		$\uparrow p < 0.05$							
	6	$\uparrow p < 0.05$			$\uparrow p < 0.05$							
	9	$\uparrow p < 0.05$			$\uparrow p < 0.05$							
	12	$\uparrow p < 0.01$			$\uparrow p < 0.05$							
LPS	3	$\uparrow p < 0.05$	$\uparrow p < 0.05$		$\uparrow p < 0.05$							
	6	$\uparrow p < 0.05$			$\uparrow p < 0.05$							
	9	$\uparrow p < 0.05$			$\uparrow p < 0.05$							
	12	$\uparrow p < 0.01$			$\uparrow p < 0.05$							
IFN γ + LPS	3	$\uparrow p < 0.05$	$\uparrow p < 0.05$		$\uparrow p < 0.05$							
	6	$\uparrow p < 0.05$			$\uparrow p < 0.05$							
	9	$\uparrow p < 0.05$			$\uparrow p < 0.05$							
	12	$\uparrow p < 0.01$			$\uparrow p < 0.05$							
F.t.	3											
	6	$\uparrow p < 0.01$		$\uparrow p < 0.05$	$\uparrow p < 0.05$							
	9											
	12											
F.t. + IFN γ	3	$\uparrow p < 0.01$			$\uparrow p < 0.05$							
	6											
	9											
	12											
F.t. + LPS	3	$\uparrow p < 0.05$	$\uparrow p < 0.05$		$\uparrow p < 0.05$							
	6	$\uparrow p < 0.01$			$\uparrow p < 0.05$							
	9	$\uparrow p < 0.05$			$\uparrow p < 0.05$							
	12	$\uparrow p < 0.05$			$\uparrow p < 0.05$							
F.t. + (IFN γ + LPS)	3											
	6											
	9											
	12											
IFN γ + F.t.	3											
	6											
	9											
	12											
LPS + F.t.	3											
	6											
	9											
	12											
(IFN γ + LPS) + F.t.	3											
	6											
	9											
	12											

Tab. 2: Statistické významnosti mezi jednotlivými sledovanými kategoriemi po stimulaci 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS v kombinaci s infekcí *F. tularensis* LVS. Výchozími kategoriemi, vůči kterým jsou ostatní vztaženy, jsou hodnoty ve svislých sloupcích.

7.4.1.3 IL-6



Obr. 9: Produkce IL-6 buňkami linie J774.2 v přítomnosti infekce *F. tularensis* LVS a/nebo 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS (n = 3; průměr \pm S.D.).

IL-6	hod	(IFN γ + LPS) + F.t.	LPS + F.t.	IFN γ + F.t.	F.t. + (IFN γ + LPS)	F.t. + LPS	F.t. + IFN γ	F.t.	IFN γ + LPS	LPS	IFN γ	nestimul. bb
nestimulované bb	3	↑ p < 0.01	↑ p < 0.01						↑ p < 0.05			
	9	↑ p < 0.01	↑ p < 0.01		↑ p < 0.01	↑ p < 0.01			↑ p < 0.01	↑ p < 0.01		
	12	↑ p < 0.01	↑ p < 0.01		↑ p < 0.01	↑ p < 0.05			↑ p < 0.01	↑ p < 0.01		
	24	↑ p < 0.01	↑ p < 0.01		↑ p < 0.01	↑ p < 0.01			↑ p < 0.01	↑ p < 0.01		
IFN γ	9	↑ p < 0.01	↑ p < 0.01		↑ p < 0.01	↑ p < 0.05			↑ p < 0.01	↑ p < 0.01		
	12	↑ p < 0.01	↑ p < 0.05		↑ p < 0.05				↑ p < 0.01	↑ p < 0.05		
	24	↑ p < 0.01	↑ p < 0.05		↑ p < 0.05				↑ p < 0.01	↑ p < 0.05		
LPS												
IFN γ + LPS												
F.t.												
F.t. + IFN γ												
F.t. + LPS												
F.t. + (IFN γ + LPS)												
IFN γ + F.t.												
LPS + F.t.												
(IFN γ + LPS) + F.t.												

Tab. 3: Statistické významnosti mezi jednotlivými sledovanými kategoriemi po stimulaci 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS v kombinaci s infekcí *F. tularensis* LVS. Výchozími kategoriemi, vůči kterým jsou ostatní vztaženy, jsou hodnoty ve svislých sloupcích.

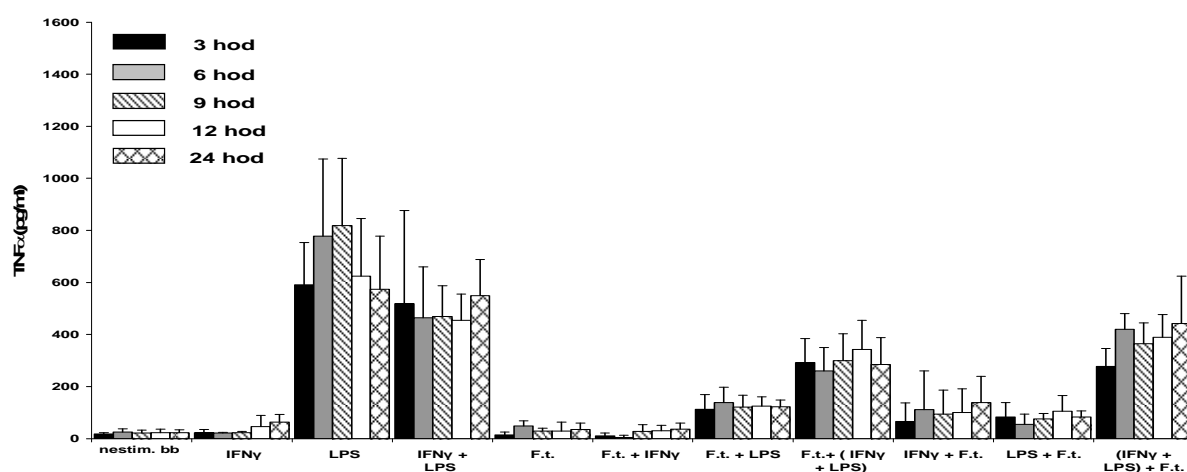
Buňky linie J774.2 výrazně reagovaly na stimulaci pomocí LPS, a to i v přítomnosti INF γ , event. infekce *F. tularensis* LVS. V přítomnosti samotného LPS nebo v jeho kombinaci s infekcí, docházelo nezávisle na použité dávce stimulujících látek k nárůstu produkce IL-6 sledovanými buňkami již po 3 hodinách kultivace buněk (p<0,01 nebo p<0,05). Výraznější rozdíly v produkci IL-6 mezi jednotlivými sledovanými parametry, a to především mezi neovlivněnými buňkami a pouze stimulovanými buňkami pomocí INF- γ , vůči buňkám ovlivněných přítomností LPS, byly nalezeny až po 9ti hodinách kultivace buněk (p<0,01 nebo p<0,05).

Buňky pouze infikované pomocí *F.tularensis* LVS produkovaly malé množství IL-6 v průběhu sledovaných intervalů. Jeho množství se však statisticky nelišilo od množství IL-6 produkovaného ostatními sledovanými buňkami v průběhu hodnocených intervalů.

7.4.1.4 TNF- α

Produkce TNF- α buňkami monocyto-makrofágové linie J774.2 byla v rámci sledované kategorie buněk prakticky stabilní během 24 hodin. K výrazné produkci TNF- α docházelo především po stimulaci prostřednictvím LPS nebo v jeho kombinaci s INF- γ . Vliv INF- γ na produkci TNF- α buňkami linie bude však pravděpodobně nulový, protože samotná stimulace buněk prostřednictvím samotného INF- γ žádnou výraznou produkci tohoto cytokinu nevyvolává ($p < 0,05$). Podobně, samotné neovlivněné buňky a buňky pouze infikované pomocí *F. tularensis* LVS produkují statisticky významně nižší množství TNF- α ($p < 0,01$ až $p < 0,05$).

Pokud jsme sledovali společný vliv infekce a stimulace na produkci TNF- α , došlo k nejnižší produkci tohoto cytokinu buňkami, které byly předem infikovány pomocí *F. tularensis* LVS a následně stimulovanými prostřednictvím samotného INF- γ .

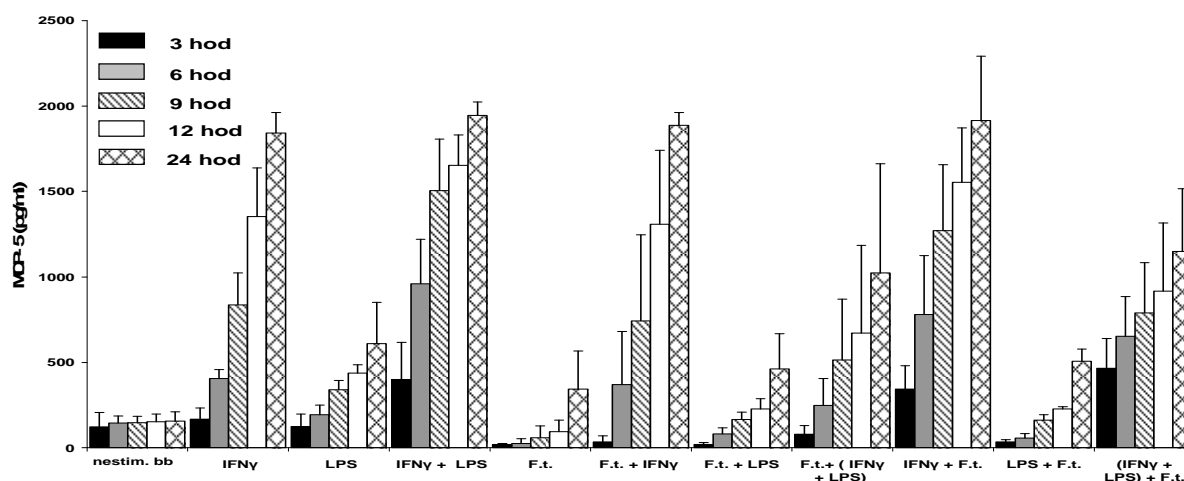


Obr. 10: Produkce TNF- α buňkami linie J774.2 v přítomnosti infekce *F. tularensis* LVS a/nebo 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS ($n = 3$; průměr \pm S.D.).

TNF α	hod	(IFN γ + LPS) + F.t.	LPS + F.t.	IFN γ + F.t.	F.t. + (IFN γ + LPS)	F.t. + LPS	F.t. + IFN γ	F.t.	IFN γ + LPS	LPS	IFN γ	nestimul. bb
nestimul. bb	3								↑ $p < 0,05$	↑ $p < 0,05$		
IFN γ												
LPS	3						↓ $p < 0,01$	↓ $p < 0,01$				
	6						↓ $p < 0,01$					
IFN γ + LPS	3						↓ $p < 0,01$	↓ $p < 0,05$				
	6						↓ $p < 0,05$					
F.t.												
F.t. + IFN γ	3	↑ $p < 0,05$			↑ $p < 0,05$							
	6	↑ $p < 0,05$										
F.t. + LPS												
F.t. + (IFN γ + LPS)												
IFN γ + F.t.												
LPS + F.t.												
(IFN γ + LPS) + F.t.	6											

Tab. 4: Statistické významnosti mezi jednotlivými sledovanými kategoriemi po stimulaci 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS v kombinaci s infekcí *F. tularensis* LVS. Výchozími kategoriemi, vůči kterým jsou ostatní vztaženy, jsou hodnoty ve svislých sloupcích.

7.4.1.5 MCP-5



Obr. 11: Produkce MCP-5 buňkami linie J774.2 v přítomnosti infekce *F. tularensis* LVS a/nebo 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS (n = 3; průměr \pm S.D.).

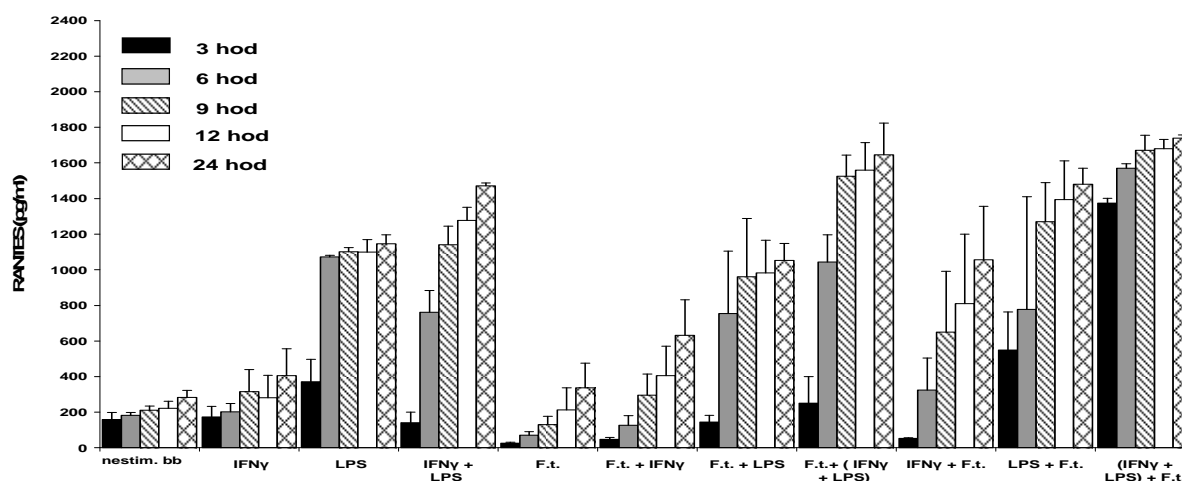
MCP-5	hod	(IFN γ + LPS) + F.t.	LPS + F.t.	IFN γ + F.t.	F.t. + (IFN γ + LPS)	F.t. + LPS	F.t. + IFN γ	F.t.	IFN γ + LPS	LPS	IFN γ	nestimul. bb
nestimulované bb	9											
	12	\uparrow p < 0.05		\uparrow p < 0.05								
	24	\uparrow p < 0.01		\uparrow p < 0.01	\uparrow p < 0.01		\uparrow p < 0.01		\uparrow p < 0.05		\uparrow p < 0.01	
IFN γ	6											
	9											
	12		\downarrow p < 0.01			\downarrow p < 0.01						
	24											
LPS	6											
	9											
	12											
	24											
IFN γ + LPS	3											
	6		\downarrow p < 0.01			\downarrow p < 0.05	\downarrow p < 0.05					
	9		\downarrow p < 0.05			\downarrow p < 0.05	\downarrow p < 0.01					
	24		\downarrow p < 0.01			\downarrow p < 0.01	\downarrow p < 0.01					
F.t.	3	\uparrow p < 0.01		\uparrow p < 0.05								
	6	\uparrow p < 0.01		\uparrow p < 0.01								
	9	\uparrow p < 0.01		\uparrow p < 0.01	\uparrow p < 0.01							
	24	\uparrow p < 0.01		\uparrow p < 0.01	\uparrow p < 0.01		\uparrow p < 0.01					
F.t. + IFN γ	3	\uparrow p < 0.05										
	12		\downarrow p < 0.05			\downarrow p < 0.05						
F.t. + LPS	3	\uparrow p < 0.01		\uparrow p < 0.05								
	12			\uparrow p < 0.05								
F.t. + (IFN γ + LPS)	3											
	12											
IFN γ + F.t.	6		\downarrow p < 0.01									
	12		\downarrow p < 0.01									
LPS + F.t.	3	\uparrow p < 0.05										
	6	\uparrow p < 0.05										
(IFN γ + LPS) + F.t.	3											
	6											

Tab. 5: Statistické významnosti mezi jednotlivými sledovanými kategoriemi po stimulaci 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS v kombinaci s infekcí *F. tularensis* LVS. Výchozími kategoriemi, vůči kterým jsou ostatní vztaženy, jsou hodnoty ve svislých sloupcích.

Koncentrace chemokinů MCP-5 produkovaná buněčnou linií J774.2 ve všech sledovaných parametrech v průběhu dne statisticky stoupala (p < 0,01 nebo p < 0,05). Hladina produkovaného MCP-5 buňkami linie J774.2 byla statisticky výrazně vyšší (p < 0,01 nebo p < 0,05) po stimulaci buněk prostřednictvím samotného INF- γ , a to nezávisle na přítomnosti infekce *F. tularensis* LVS.

Pokud jsme však sledovali průběh produkce MCP-5 po aplikaci kombinace INF- γ a LPS v přítomnosti infekce, zdálo se, že přítomnost LPS v kombinaci s infekcí snižuje produkci MCP-5 oproti pouhé stimulaci buněk kombinací INF- γ a LPS. Tento vliv však nebyl statisticky prokázán a prakticky samotná stimulace LPS také nevyvolávala příliš vysokou produkci tohoto chemokinů.

7.4.1.6 RANTES



Obr. 12: Produkce RANTES buňkami linie J774.2 v přítomnosti infekce *F. tularensis* LVS a/nebo 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS (n = 3; průměr \pm S.D.).

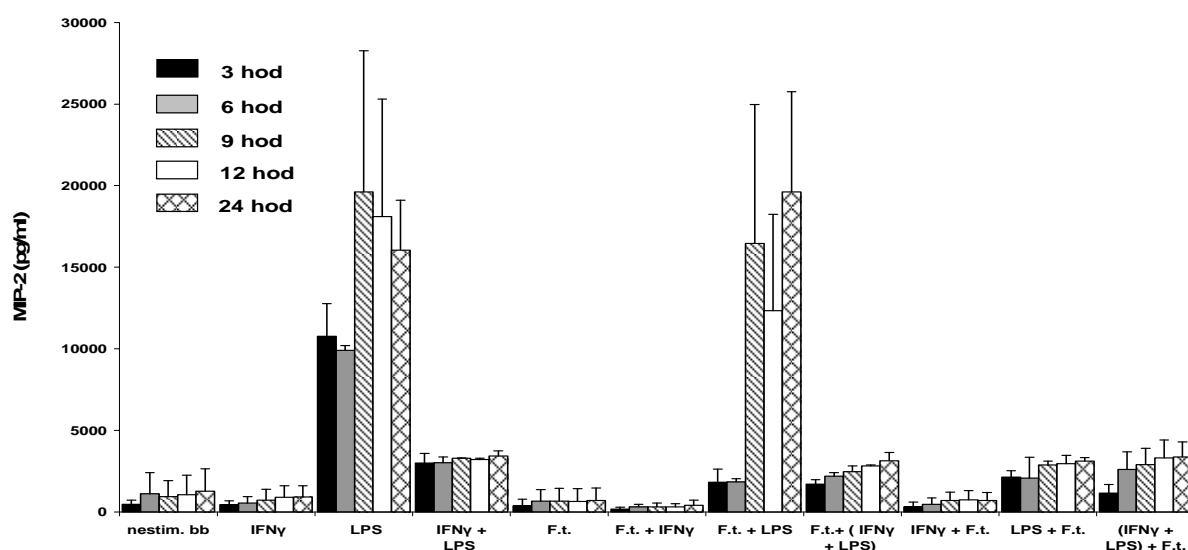
RANTES	hod	(IFN γ + LPS) + F.t.	LPS + F.t.	IFN γ + F.t.	F.t. + (IFN γ + LPS)	F.t. + LPS	F.t. + IFN γ	F.t.	IFN γ + LPS	LPS	IFN γ	nestimul. bb
nestimulované bb	3	↑ p < 0.05										
	9	↑ p < 0.05			↑ p < 0.05							
	12	↑ p < 0.01	↑ p < 0.05		↑ p < 0.05							
	24	↑ p < 0.01	↑ p < 0.01	↑ p < 0.05	↑ p < 0.01	↑ p < 0.05			↑ p < 0.01	↑ p < 0.01		
IFN γ	12	↑ p < 0.05			↑ p < 0.05							
	24	↑ p < 0.01	↑ p < 0.01		↑ p < 0.01				↑ p < 0.01	↑ p < 0.05		
LPS												
IFN γ + LPS	3	↑ p < 0.05										
F.t.	3	↑ p < 0.01	↑ p < 0.05									
	9	↑ p < 0.05										
	12	↑ p < 0.05										
	24	↑ p < 0.05			↑ p < 0.05							
F.t. + IFN γ	3	↑ p < 0.01	↑ p < 0.05									
	9	↑ p < 0.05										
F.t. + LPS	3	↑ p < 0.05										
F.t. + (IFN γ + LPS)												
IFN γ + F.t.	3	↑ p < 0.01	↑ p < 0.05									
LPS + F.t.												
(IFN γ + LPS) + F.t.												

Tab. 6: Statistické významnosti mezi jednotlivými sledovanými kategoriemi po stimulaci 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS v kombinaci s infekcí *F. tularensis* LVS. Výchozími kategoriemi, vůči kterým jsou ostatní vztaženy, jsou hodnoty ve svislých sloupcích.

Prakticky u všech hodnocených kritérií docházelo k růstu produkce RANTES během 24 hodin (p < 0,01). Po 3. hodině kultivace buněk došlo k vzestupu koncentrace RANTES a poté již byla hladina produkovaného chemokinů během dne konstantní. Buňky vystavené samotné infekci produkovaly stoupající množství RANTES po 3 (3 hod vs. 6-24 hod; p < 0,01) i 6 hodinách kultivace infikovaných buněk (6 hod vs. 12 hod; p < 0,05, 6 hod vs. 24 hod; p < 0,01).

Již po 3 hodinách kultivace buněk se objevila nejvyšší produkce RANTES u buněk předem stimulovaných kombinací INF- γ a LPS s následnou infekcí, a to i v případě použití nižší stimulující dávky (p < 0,01 nebo p < 0,05).

7.4.1.7 MIP-2



Obr. 13: Produkce MIP-2 buňkami linie J774.2 v přítomnosti infekce *F. tularensis* LVS a/nebo 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS (n = 3; průměr \pm S.D.).

MIP-2	hrs	(IFN γ + LPS) + F.t.	LPS + F.t.	IFN γ + F.t.	F.t. + (IFN γ + LPS)	F.t. + LPS	F.t. + IFN γ	F.t.	IFN γ + LPS	LPS	IFN γ	nestimul. bb
nestimul. bb	3											
IFN γ	3											
	6											
	9											
	12											
	24											
LPS	3											
	6											
	9											
	12											
	24											
IFN γ + LPS	3											
	6											
	9											
	12											
	24											
F.t.	3											
	6											
	24											
F.t. + IFN γ	3											
	12											
	24											
F.t. + LPS	3											
	12											
	24											
F.t. + (IFN γ + LPS)	3											
	12											
	24											
IFN γ + F.t.	3											
	6											
	24											
LPS + F.t.	3											
	6											
	24											
(IFN γ + LPS) + F.t.	3											
	6											
	24											

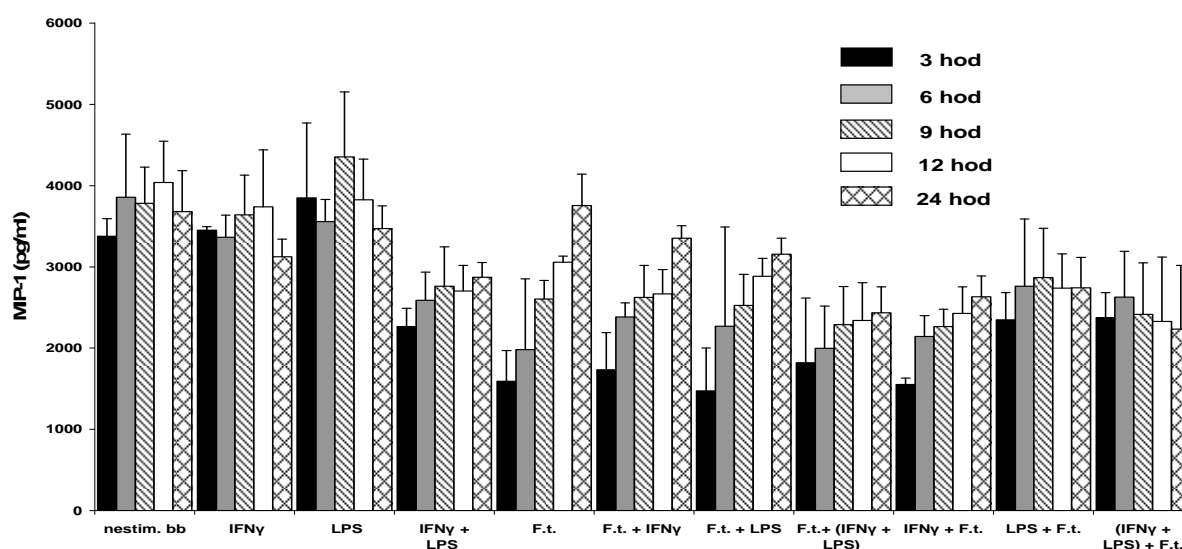
Tab. 7: Statistické významnosti mezi jednotlivými sledovanými kategoriemi po stimulaci 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS v kombinaci s infekcí *F. tularensis* LVS. Výchozími kategoriemi, vůči kterým jsou ostatní vztaženy, jsou hodnoty ve svislých sloupcích.

V nízkých dávkách INF- γ a LPS se neprojeví výrazné rozdíly mezi jednotlivými sledovanými kategoriemi buněk. Pouze v intervalu 3, respektive 6 hodin kultivace buněk je patrný mírný nárůst MIP-2 v případě stimulace buněk kombinací INF- γ a LPS vůči buňkám, které byly pouze infikovány, nebo infekce kombinována s INF- γ .

Stimulace buněk prostřednictvím 50 ng/ml LPS má zřetelnou převahu v produkci MIP-2 oproti buňkám, které jsou ovlivněny INF- γ samotným nebo v kombinaci s infekcí *F. tularensis* LVS, nezávisle na způsobu podání INF- γ . Rozdíl produkce MIP-2 je v tomto případě patrný nad nižší i vyšší koncentrací INF- γ . Dokonce ve dvou intervalech (3 a 6 hodin kultivace) dochází k snížené produkci MIP-2 buňkami, které jsou pouze infikované oproti stimulaci 50 ng/ml LPS.

7.4.1.8 MIP-1

Produkce chemokinu MIP-1 buňkami linie J774.2 po stimulaci a infekci prostřednictvím *F. tularensis* LVS nevykazovala příliš výrazné změny u sledovaných skupin. Prakticky všechny skupiny sledovaných buněk vykazovaly poměrně vysokou produkci MIP-1. Zajímavé je, že prakticky čisté neovlivněné buňky, buňky stimulované samotným INF- γ , nebo samotným LPS vykazovaly ve 3. hodině kultivace buněk vyšší produkci MIP-1, než buňky s infekcí, respektive infekcí a stimulací samostatně stimulující látky (INF- γ nebo LPS). Nenalezla jsem však žádnou souvislost, neboť tato skutečnost nebyla prokázána u jiných skupin, které např. také obsahovaly infekci.



Obr. 14: Produkce MIP-1 buňkami linie J774.2 v přítomnosti infekce *F. tularensis* LVS a/nebo 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS (n = 3; průměr \pm S.D.).

MIP-1	hod	(IFN γ + LPS) + F.t.	LPS + F.t.	IFN γ + F.t.	F.t. + (IFN γ + LPS)	F.t. + LPS	F.t. + IFN γ	F.t.	IFN γ + LPS	LPS	IFN γ	nestimul. bb
nestimul. bb	3			↓ p < 0.05		↓ p < 0.05		↓ p < 0.05				
IFN γ	3			↓ p < 0.05		↓ p < 0.05		↓ p < 0.05				
LPS	3			↓ p < 0.05		↓ p < 0.05		↓ p < 0.05				
IFN γ + LPS												
F.t.												
F.t. + IFN γ												
F.t. + LPS												
F.t. + (IFN γ + LPS)												
IFN γ + F.t.												
LPS + F.t.												
(IFN γ + LPS) + F.t.												

Tab. 8: Statistické významnosti mezi jednotlivými sledovanými kategoriemi po stimulaci 1000 IU/ml INF- γ a/nebo 50 ng/ml LPS v kombinaci s infekcí *F. tularensis* LVS. Výchozími kategoriemi, vůči kterým jsou ostatní vztaženy, jsou hodnoty ve svislých sloupcích.

8. SHRNU TÍ VÝSLEDKŮ

- Proliferace bakterie *F. tularensis* LVS v buňkách monocyto-makrofágové buněčné linie J774.2 je 3,5 hodiny.
- Proliferace *F. tularensis* LVS byla nejučinněji potlačena v případě stimulace buněk linie J774.2 kombinací INF- γ a LPS ještě před následnou infekcí buněk, přičemž vyšší z obou kombinací INF- γ a LPS snižovala proliferaci bakterie již v intervalu 12 hodin kultivace buněk, obě kombinace INF- γ a LPS po 24 hodinách kultivace.
- Stimulace kombinací INF- γ a LPS již po proběhlé infekci *F. tularensis* LVS má menší vliv na proliferaci bakterie. Proliferace *F. tularensis* LVS se snížila po 24 hodinách kultivace. Po 48 hodinách byl patrný vliv vyšší dávky INF- γ a LPS.
- Samotný INF- γ redukoval proliferaci *F. tularensis* LVS až po 48 hodinách kultivace infikovaných buněk.
- Samotný LPS neměl významný vliv na proliferaci *F. tularensis* LVS.
- Použití kombinace INF- γ a LPS však významněji snižovalo životnost (viabilitu) buněk a počet buněk v kultuře.
- V souhlasu se snižující se proliferací bakterie *F. tularensis* LVS ve stimulované kultuře docházelo k nejvyšší produkci NO₂⁻ především v buňkách předem stimulovaných kombinací INF- γ a LPS.
- Produkce cytokinu IL-12p40 byla opět nejvýznamnější po aplikaci kombinace INF- γ a LPS již před následnou infekcí, nelišila se však od aplikaci kombinace stimulujících látek až po proběhlé infekci.
- Nejvýznamnější vliv na produkci cytokinu IL-18 buňkami linie J774.2 měla opět stimulace kombinací INF- γ a LPS v přítomnosti infekce *F. tularensis* LVS, a to nezávisle na způsobu aplikace infekce.
- Podobně, nejvýraznější produkce cytokinu IL-6 byla po stimulaci kombinací INF- γ a LPS, a to především v případě stimulace před následnou infekcí *F. tularensis* LVS. Produkce IL-6 výrazně reagovala na stimulaci LPS.
- Cytokin TNF- α byl produkován po stimulaci LPS nebo v jeho kombinaci s INF- γ . Nejnižší produkce TNF- α byla shledána po infekci buněk *F. tularensis* LVS s následnou stimulací pomocí INF- γ .
- Buňky linie J774.2 reagovaly na stimulaci INF- γ produkcí chemokinu MCP-5, a to i v přítomnosti LPS a/nebo infekce *F. tularensis* LVS. Nebyl pozorován významný vliv stimulujících látek, aplikovaných před následnou infekcí, na produkci MCP-5.
- Chemokin RANTES byl produkován buňkami linie J774.2 především po stimulaci samotným LPS nebo v jeho kombinaci s INF- γ . Především byl významný rychlejší nástup produkce RANTES po stimulaci kombinací INF- γ a LPS před následnou infekcí *F. tularensis* LVS.
- Produkce chemokinu MIP-2 byla nejvíce patrná po stimulaci buněk pomocí LPS bez přítomnosti infekce. Naopak, samotná infekce *F. tularensis* LVS a/nebo samotná stimulace INF- γ vyvolávaly pouze nízkou produkci MIP-2.
- Chemokin MIP-1 byl produkován prakticky všemi buňkami nezávisle na přítomnosti LPS a/nebo INF- γ a/nebo infekce *F. tularensis* LVS.

9. DISKUSE

9.1 Diskuse k výsledkům I.

Existuje řada prací, které dokumentují schopnost bakterie *F. tularensis* pronikat a replikovat se v různých typech prokaryotických buněk, ale i v různých orgánech (15, 10, 3). Mezi tyto buňky patří i makrofágy. Makrofágy jsou důležitými efektorovými buňkami jak humorální, tak buněčné imunity a buňkami, které hrají klíčovou úlohu v obraně proti intracelulárním parazitům (17), mezi něž *F. tularensis* bezpochyby patří.

Vzhledem k důležitosti makrofágů v obraně proti *F. tularensis*, byly vybrány jako optimální buňky pro zkoumání vzájemného vztahu mezi vakcinačním kmenem *F. tularensis* LVS a hostitelskou buňkou právě mononukleární buňky, a to buňky monocyto-makrofágové linie J774.2. Pro zjišťování vzájemných vztahů mezi hostitelskou buňkou a patogenem bylo nutné nejprve ustanovit buněčný model intracelulární replikace v buňkách linie J774.2.

Z výsledků našich experimentů vyplývá, že replikační čas bakterie *F. tularensis* LVS v buňkách linie J774.2 je 3,5 hodiny, přičemž stabilita infikované kultury je zaručena v prvních 12ti hodinách kultivace. Proliferace *F. tularensis* LVS v buňkách linie během sledovaných 24 hodin kultivace infikovaných buněk stoupla přibližně o 1,5 log 10.

V souhlasu s pracemi na neaktivovaných makrofázích buněčné linie J774 (18, 14) docházelo v našich experimentech k rapidní multiplikaci *F. tularensis* po 12ti hodinách kultivace infikovaných buněk. Práce Fortier et al. (10) ukazuje rychlejší proliferaci *F. tularensis* LVS v zánětlivých peritoneálních buňkách, v porovnání s proliferací bakterie v residentních peritoneálních buňkách. Generační čas bakterie v zánětlivých peritoneálních buňkách byl dle této práce 3 hodiny, zatímco v residentních peritoneálních buňkách byl generační čas bakterie 6 hodin. Generační čas bakterie byl v obou typech buněk ustanoven stejným postupem jako v naší práci, a to metodou populační analýzy. Macela ve své práci prokázal (22), že generační čas bakterie *F. tularensis* v adheřujících peritoneálních buňkách a tzv. „immune“ peritoneálních buňkách je 4,6 hodin.

Prakticky bychom očekávali, že generační čas bakterie *F. tularensis* LVS v naší práci bude srovnatelný s generačním časem v residentních peritoneálních buňkách. Makrofágy v naší práci nebyly totiž, podobně jako residentní peritoneální makrofágy v práci Fortier et al., žádným způsobem předem stimulovány, na rozdíl od zánětlivých peritoneálních buněk. Na druhou stranu, buňky linie J774 patří dle kvantitativní imunocytochemické charakterizace mezi jedny z nejzralejších makrofágových buněčných linií (24).

Vypracovaný model *in vitro* infekce v naší práci byl obecně přijatelný a umožňoval další studie časné interakce intracelulární bakterie *F. tularensis* LVS s hostitelskými fagocyty.

9.2 Diskuse k výsledkům II.

Po ustanovení buněčného modelu infekce *F. tularensis* LVS na buňkách monocyto-makrofágové buněčné linie J774.2 byly další experimenty této práce zaměřeny na sledování vlivu infekce na stimulované makrofágy. V této fázi práce nás zajímala otázka, zda a jakým způsobem ovlivňuje rekombinantní INF- γ , respektive LPS *E. coli*, proliferaci bakterie *F. tularensis* LVS.

In vivo nejsou makrofágy schopny eliminovat infekci *F. tularensis* bez pomoci ostatních buněk. INF- γ , jako produkt Th1 lymfocytů, je důležitý k obraně hostitelského organismu, především v odpovědi k primární infekci *F. tularensis* prostřednictvím jeho schopnosti aktivovat makrofágy k efektivnějšímu zabíjení bakterie (2, 10). Plná aktivace efektorových mechanismů makrofágů závisí také na rozpoznání tzv. nebezpečných vzorů patogenů prostřednictvím tzv. Toll-like receptorů. LPS *E. coli*, který byl použit v této práci, zprostředkovává aktivaci mononukleárních buněk vazbou právě na jejich Toll-like receptory, a tím hraje centrální roli v časné odpovědi na mikrobiální stimuly (8).

Pozitivní vliv INF- γ na redukci počtu bakterií *F. tularensis* LVS byl pozorován po 48. hodinách kultivace infikovaných buněk. V tomto intervalu došlo k poklesu proliferace *F. tularensis* LVS v buňkách, které byly bezprostředně po infekci stimulovány prostřednictvím vyšší koncentrace INF- γ . Toto snížení bylo statisticky významné nejen vůči proliferaci bakterie v nestimulovaných makrofázích, ale i v porovnání s proliferací *F. tularensis* LVS v buňkách ovlivněných po infekci nižší koncentrací INF- γ . Pokud byly buňky nejprve předem stimulovány INF- γ s následnou infekcí *F. tularensis* LVS, došlo ve stejném intervalu, tedy až po 48. hodinách kultivace buněk, k poklesu proliferace bakterie při použití vyšší hladiny INF- γ v porovnání s proliferací bakterie v nestimulovaných buňkách. V tomto případě však nebyl prokázán efekt vyšší koncentrace INF- γ , v porovnání s nižší koncentrací, na proliferaci *F. tularensis* LVS.

Publikovaná práce (10) ukazuje proliferaci bakterie *F. tularensis* LVS v zánětlivých a residentních peritoneálních makrofázích. Prakticky v soulasu s touto prací docházelo v našich experimentech k snížení proliferace *F. tularensis* LVS v buňkách ovlivněných INF- γ po infekci. V publikované práci došlo v intervalu 24. hodin k poklesu proliferace bakterie přibližně v rozsahu 1 log 10, zatímco v našich experimentech se proliferace *F. tularensis* LVS snížila v rozsahu 2 log 10. Autoři publikace ke stimulaci buněk použily 50 U/ml INF- γ , zatímco v našich experimentech statisticky významně redukovala proliferaci bakterie koncentrace až 20x vyšší. Nicméně, tato část naší práce ukazuje, že k aktivaci prozánětlivých mechanismů buněk linie J774.2 pod vlivem INF- γ dochází až po 48 hodinách infekce.

Vliv samotného LPS na proliferaci bakterie v průběhu sledovaných intervalů, a to v případě obou použitých koncentrací LPS, byl prakticky nulový. Telepnev et al. (28)

publikovali práci, ve které uvádějí, že *F. tularensis* je schopna v buněčné linii J774A.1 potlačovat schopnost buněk odpovídat na stimulaci LPS nebo bakteriálním lipopeptidem. Možná právě tato skutečnost by mohla být důvodem, proč buňky stimulované pomocí LPS nedokáží v prvních 24 hodinách potlačit růst *F. tularensis* LVS.

Jiná situace nastala, pokud jsme v našich experimentech použili kombinaci INF- γ a LPS. Pokud byly infikované buňky J774.2 bezprostředně po infekci vystaveny účinkům kombinace INF- γ a LPS, došlo k poklesu proliferace *F. tularensis* LVS již po 24 hodinách kultivace buněk, přičemž obě kombinace koncentrací významně snižovaly proliferaci bakterie *F. tularensis* LVS.

Na druhou stranu, v buňkách předem stimulovaných kombinací INF- γ a LPS došlo neočekávaně ve 3 hodinách kultivace buněk k sice mírnému, ale významnému, zvýšení počtu bakterií oproti nestimulované infekci. Tento vzestup počtu bakterií se objevil společně po aplikaci obou sledovaných kombinací INF- γ a LPS. Ve sledovaných 3 hodinách byly buňky linie J774.2 prakticky 9 hodin pod vlivem INF- γ s LPS (3 hodiny inkubace + 3 hodiny infekce + tříhodinový interval). Nabízí se otázka, zda nemohlo např. dojít ke zvýšení fagocytujících schopností takto předem ovlivněných buněk? Tento nárůst bakteriálního počtu se již v jiných intervalech neobjevoval. Naopak, podobně jako v případě následné stimulace infikovaných buněk, došlo k poklesu bakteriálního počtu v buňkách linie J774.2. Pokles počtu bakterií při ovlivnění buněk kombinací 1000 IU/ml INF- γ a 50 ng/ml LPS před infekcí byl patrný již ve 12ti hodinách kultivace buněk. Podobně, jako v naší práci, docházelo ke snížení proliferace bakterie *F. tularensis* LVS v residentních peritoneálních makrofázích pod vlivem samotného INF- γ , přičemž tento účinek byl ještě podporován současnou přítomností LPS (1).

9.3 Diskuse k výsledkům III.

Mechanismy závislé na iNOS a v menší míře na NADPH oxidáze přispívají k zabíjení *F. tularensis* LVS v makrofázích aktivovaných prostřednictvím INF- γ (20).

V naší práci není vliv samotného INF- γ na produkci NO_2^- tak výrazný, ale je to pravděpodobně způsobeno tím, že jsme se zaměřili na hodnocení produkce NO_2^- nejen v souvislosti se samotnou infekcí, ale byl hodnocen i vliv INF- γ v kooperaci s LPS. V souhlasu s prací Green et al. (13) byl v naší práci patrný vliv použití kombinace INF- γ s LPS před samotnou infekcí. V porovnání s produkcí NO_2^- buňkami, které byly nejprve infikovány *F. tularensis* LVS, byla produkce NO_2^- v předem stimulovaných buňkách vyšší již v intervalu 9 hodin, respektive 6 hodin při použití kombinace nižších, respektive vyšších koncentrací INF- γ s LPS. Výsledky této části práce korelují i s výsledky proliferace bakterie *F. tularensis* LVS uvedených v předcházejících částech této práce.

9.4 Diskuse k výsledkům IV.

Jak již bylo opakovaně zdůrazněno, INF- γ je jedním z cytokinů, který hraje nepostradatelnou úlohu v aktivaci makrofágů. Produkce INF- γ Th1 lymfocyty je kontrolována dalšími cytokiny, které jsou produkovány převážně antigen prezentujícími buňkami, včetně makrofágů. Jedná se především o cytokiny IL-12 a IL-18. Oba tyto interleukiny jsou známy svojí schopností synergicky stimulovat produkci INF- γ (17). Předem zmiňované PAMPs, např. bakteriální LPS nebo bakteriální lipoproteiny, přímo ovlivňují produkci IL-12. Cytokiny IL-12 a TNF- α jsou zahrnovány v protekci hostitele vůči tularémii (27).

V našich experimentech docházelo ke zvýšené produkci jak IL-12, tak IL-18 především po podání kombinace INF- γ s LPS. Námi studovaný IL-12p40 byl výrazně produkován buňkami po jejich ovlivnění kombinací INF- γ a LPS, a to především v přítomnosti infekce. Cytokin IL-18 byl buňkami produkován, podobně jako IL-12p40, výrazně pod vlivem kombinace INF- γ a LPS, a to opět i v přítomnosti infekce *F. tularensis* LVS, nezávisle na způsobu jejího podání. Zajímavým se zdá být pokles produkce IL-18 v intervalu 6 hodin kultivace infikovaných buněk linie J774.2 pomocí *F. tularensis* LVS, a infekce s následnou stimulací prostřednictvím INF- γ nebo LPS. Pokles IL-18 byl prokázán pouze v těchto třech případech a pouze v šesti hodinách kultivace buněk.

Podle práce kolektivu autorů Loegering et al. (21) ztratila *F. tularensis* kultivovaná v makrofázích před následnou infekcí peritoneálních makrofágů schopnost vyvolat produkci cytokinů, v porovnání s *F. tularensis* kultivovanou před infekcí v Mueller-Hinton mediu. Růst *F. tularensis* v makrofázích způsobil reverzibilní fenotypické změny bakterie vedoucí právě ke snížení stimulace cytokinové sekrece a inhibici LPS-stimulované sekrece prozánětlivých cytokinů makrofágy. V souvislosti s těmito poznatky je otázkou, zda po šesti hodinách kultivace buněk došlo již k uvolnění bakterie z primárně infikovaných makrofágů a následné infekci dalších makrofágů, ve kterých byla dočasně potlačena produkce cytokinů. Golovliov et al. (11) publikoval práci, ve které bylo pozorováno, že již po 2 hodinách infekce buněk s *F. tularensis* je bakterie schopna unikat z fagosomu do cytosolu. Na druhou stranu, únik bakterie do cytosolu ještě neznamena rozpad buňky a sekundární infekci dalších makrofágů. I v naší práci je dle generačního času bakterie zaručena stabilita infikované kultury po dobu 12ti hodin. Podobně byla popsána schopnost *F. tularensis* LVS unikat z fagosomu lidských neutrofilů a přetrvávat uvnitř cytosolu bohatém na živiny po dobu nejméně 12ti hodin (23).

LPS jako součást buněčné stěny Gram-negativních bakterií aktivuje mikrobicidní efektorové funkce makrofágů s následnou produkcí prozánětlivých cytokinů jako je TNF- α , IL-1, IL-6 (25). V našich experimentech buňky linie J774.2 reagovaly, v souladu s těmito pracemi,

na stimulaci samotného LPS, a to i v kombinaci s INF- γ , produkcí TNF- α . Samotný INF- γ nevyvolával produkci TNF- α buňkami monocyto-makrofágové linie J774.2.

Dle grafů produkce TNF- α by se zdálo, že dokonce nižší kombinace INF- γ a LPS stimuluje produkci TNF- α buňkami efektněji, než kombinace vyšších stimulačních látek. Tento fenomén může být způsobený většími směrodatnými odchylkami, které jednotlivé rozdíly stírají. Nebo dochází k tomu, že podněty udávané vyšší koncentrací stimulačních látek jsou tak mohutné, že pokud by buňka zachovala standardní produkci TNF- α , mohla by být směřována do apoptózy. Z tohoto důvodu se v buňce mohou otevírat signální cesty směřující ke snížené produkci TNF- α .

Tyto předpoklady dokonce potvrzuje práce Telepnev et al. (28). Podle autorů této práce je *F. tularensis* schopná v buňkách linie J774 přímo rušit produkci TNF- α a IL-1 makrofágy vyvolanou prostřednictvím LPS *E. coli* a bakteriálního lipoproteinu. Tato inhibice probíhá mechanismem inhibice několika intracelulárních cest, včetně potlačení aktivace nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B) a závisí na expresi bakteriálního 23-kDa proteinu.

K podobnému vlivu INF- γ , LPS a infekce *F. tularensis* LVS samostatně nebo v jejich kombinacích na produkci TNF- α sledovanými buňkami linie J774.2 docházelo i v případě produkce prozánětlivého cytokinu IL-6. Lišila se pouze rychlost nástupu IL-6, kdy k výraznější produkci IL-6 většinou docházelo až po 6ti hodinách kultivace buněk. Bohužel stanovená koncentrace IL-6 po samotné infekci *F. tularensis* LVS vykazovala velké odchylky, tudíž koncentrace IL-6 v ostatních sledovaných parametrech s infekcí byla pravděpodobně tímto faktem ovlivněna a nebyl statisticky prokázán pokles koncentrace IL-6 po přidání infekce vůči produkci IL-6 po samotné stimulaci LPS nebo v jeho kombinaci s INF- γ . Nicméně, výsledky jsou v souladu s tím, že výrazným stimulem tvorby IL-6 buňkami je LPS (25), nikoliv však LPS *F. tularensis* LVS.

Identifikace konzervovaných bakteriálních struktur PAMPs prostřednictvím tzv. receptorů rozpoznávajících molekulové vzory patogenů (PRRs), může vest k indukci řady tzv. „early immediate genes“ jako jsou chemokiny. Chemokin znám pod názvem RANTES, je důležitým elementem pro chemotaxi v místě zánětu (17). Dle našich pozorování, byl chemokin RANTES produkován v minimálním množství po třech hodinách kultivace. Prakticky nejvýraznější nástup produkce chemokinu RANTES měly buňky, které byly před infekcí stimulovány kombinací INF- γ a LPS. Celkově opět dochází ke stejnému efektu, kdy buňky linie J774.2, které byly pouze infikovány prostřednictvím *F. tularensis* LVS, jsou schopny pouze omezené podpory produkce chemokinu RANTES, ve srovnání s buňkami pod vlivem LPS *E. coli*.

K výčtu sledovaných cytokinů v této práci náleží i chemokin MCP-5. Myší MCP-5 je členem MCP/eotaxin podrodiny s C-C chemokinovou rodinou prozánětlivých

a imunoregulačních cytokinů (29). O vztahu MCP-5 a *F. tularensis*, stejně tak RANTES vs. *F. tularensis*, jsem v literatuře nenalezla dostupné informace.

Nejvýraznější produkce MCP-5 buňkami J774.2 byla po jejich stimulaci prostřednictvím INF- γ . Ačkoliv produkce MCP-5 po ovlivnění LPS v průběhu dne stoupala také, vliv LPS na produkci MCP-5 buňkami byl výrazně nižší. Buňky ovlivněné pouze infekcí *F. tularensis* LVS, produkovaly větší množství MCP-5 až ve 24 hodinách kultivace buněk. I přesto je produkce MCP-5 takto ovlivněnými buňkami výrazně redukována. Jak již vyplývá z názvu chemokinu MCP-5 (Monocyte Chemotactic Protein 5), je chemotaktický především pro monocyty a makrofágy. Tato skutečnost koreluje i s našimi výsledky, kdy chemokin MCP-5 tvořen pod vlivem INF- γ , jako prozánětlivého cytokinu, láká do místa infekce další řadu monocytů a makrofágů, které amplifikují zánětlivou reakci na infekci. Na druhou stranu, pro bakterii *F. tularensis* je nežádoucí vysoká produkce tohoto chemokinu, která by lákala další efektorové buňky do místa infekce a tudíž tak zvyšovala pravděpodobnost její eliminace.

Posledními cytokiny sledovanými v této práci byly další dva chemokiny, a to MIP-1 a MIP-2. Oba tyto chemokiny také patří do skupiny tzv. C-C chemokinů a jejich hlavní funkcí je regulace pohybu monocyto-makrofágových buněk a T a B lymfocytů (17).

Zajímavým zjištěním je fakt, že prakticky všechny sledované skupiny buněk produkovaly poměrně vysoké koncentrace chemokinu MIP-1, přičemž statisticky významné rozdíly v produkci mezi jednotlivými kategoriemi buněk byly zanedbatelné. I buňky linie J774.2, které byly pouze infikovány podporovaly tvorbu MIP-1.

Tyto výsledky však nekorelují s dalším sledovaným chemokinem prakticky se stejnou funkcí, a to chemokinem MIP-2. I když, v zásadě byla prokázána nejvyšší koncentrace tohoto chemokinu v případě stimulace buněk vyšší koncentrací LPS bez přítomnosti infekce. Bohužel v jiných parametrech nebyla prokázána výrazná statistická významnost. Buňky linie J774.2, které byly pouze infikovány *F. tularensis* LVS vykazují v produkci chemokinu MIP-2 výrazné odchylky, takže srovnání se stimulovanými buňkami je problematické.

10. ZÁVĚR

Francisella tularensis LVS zasahuje do rozvoje prozánětlivé odpovědi v časně fázi infekce. *F. tularensis* LVS ovlivňovala jak produkci prozánětlivých cytokinů sledovanou monocyto-makrofágovou buněčnou linií J774.2, tak produkci chemokinů touto linií. V drtivé většině však bakterie *F. tularensis* LVS již nedokázala snížit produkci sledovaných cytokinů pokud byly buňky předem ovlivněny kombinací LPS a INF- γ .

Podobně je z našich výsledků patrný protektivní vliv jak samotného INF- γ , tak především v jeho kombinaci s LPS na proliferaci *F. tularensis* LVS v buňkách monocyto-makrofágové linie J774.2 v průběhu sledovaných 48 hodin kultivace buněk.

Při dlouhodobé stimulaci buněk, a to ještě před následnou infekcí buněk linie J774.2, je i desetinásobně (INF- γ), respektive pětinásobně (LPS) nižší dávka dostačující k potlačení proliferace *F. tularensis* LVS v buňkách makrofágové linie J774.2. V případě již rozvinuté infekce, je třeba použít vyšší dávku kombinace INF- γ a LPS pro potlačení růstu bakterie v buňkách J774.2.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Anthony L.S.D., Morrissey P.J., Nano F.E.: Growth inhibition of *Francisella tularensis* live vaccine strain by INF-gamma – activated macrophages is mediated by reactive nitrogen intermediates derived from L-arginine metabolism. *The Journal of Immunology*, 148: 1829-1834, 1992.
2. Barker J.H., Weiss J., Apicella M., Nauseef W.M.: Basis for the failure of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to prime human polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity*, 74: 3277-3284, 2006.
3. Bosio C.M., Elkins K.L.: Susceptibility to secondary *Francisella tularensis* live vaccine strain infection in B-cell-deficient mice is associated with neutrophilia but not with defects in specific T-cell-mediated immunity. *Infection and Immunity*, 69: 194-203, 2001.
4. Carlson Jr. P.E., Carrol J.A., O'Dee D.M., Nau G.J.: Modulation of virulence factors in *Francisella tularensis* determines human macrophage response. *Microbial Pathogenesis*, 42: 204-214, 2007.
5. Cieslak T.J., Talbot T.B., Hartstein B.H.: Biological warfare and the skin I: Bacteria and toxins. *Clinics in Dermatology*, 20: 364-354, 2002.
6. Cowley S.C., Myltseva S.V., Nano F.E.: Phase variation in *Francisella tularensis* affecting intracellular growth, lipopolysaccharide antigenicity and nitric oxide production. *Molecular Microbiology*, 20: 867-874, 1996.
7. Dreisbach V.C., Cowley S., Elkins K.L.: Purified lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* live vaccine strain [LVS] induces protective immunity against LVS infection that requires B cells and gamma interferon. *Infection and Immunity*, 68: 1988-1996, 2000.
8. Duenas A.I., Aceves M., Orduna A., Díaz R., Sánchez Crespo M., García-Rodríguez C.: *Francisella tularensis* LPS induces the production of cytokines in human monocytes and signals via Toll-like receptors 4 with much lower potency than *E. coli* LPS. *International Immunology*, 18: 785-795, 2006.
9. Fortier A.H., Leiby D.A., Narayanan R.B., Asafodjei E., Crawford R.M., Nacy C.A., Meltzer M.S.: Growth of *Francisella tularensis* LVS in macrophages: the acid intracellular compartment provides essential iron required for growth. *Infection and Immunity*, 63: 1478-1483, 1995.
10. Fortier A.H., Polsinelli T., Green S.J., Nacy C.A.: Activation of macrophages for destruction of *Francisella tularensis*: Identification of cytokines, effector cells, and effector molecules. *Infection and Immunity*, 60: 817-825, 1992.
11. Golovliov I., Baranov V., Krocová Z., Kovarova H., Sjöstedt A.: An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. *Infection and Immunity*, 71: 5940-5950, 2003.
12. Golovliov I., Sandström G., Ericsson M., Sjöstedt A., Tärnvik A.: Cytokine expression in the liver during the early phase of murine tularemia. *Infection and Immunity*, 63: 534-538, 1995.
13. Green S.J., Scheller L.F., Marletta M.A., Seguin M.C., Klotz F.W., Slayter M., Nelson B.J., Nacy C.A.: Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunology Letters*, 43: 87-94, 1994.
14. Hrstka R., Stulík J., Vojtěšek B.: The role of MAPK signalling pathway during *Francisella tularensis* LVS infection-induced apoptosis in murine macrophages. *Microbes and Infection*, 7: 619-625, 2005.

15. Chen W., KuoLee R., Shen H., Busa M., Conlan J.W.: Toll-like receptor 4 (TLR4) plays a relatively minor role in murine defence against primary intradermal infection with *Francisella tularensis* LVS. *Immunology Letters*, 97: 151-154, 2005.
16. Janovská S., Pávková I., Hubálek M., Lenčo J., Macela A., Stulík J.: Identification of immunoreactive antigens in membrane proteins enriched fraction from *Francisella tularensis* LVS. *Immunology Letters*, 108: 151-159, 2007.
17. Krejsek J., Kopecky O.: *Klinická imunologie*, Nucleus Hradec Králové, 2004.
18. Lai X.H., Golovliov I., Sjöstedt A.: *Francisella tularensis* induced cytophagocytosis and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. *Infection and Immunity*, 69: 4691-4694, 2001.
19. Li H., Nookala S., Bina X.R., Bina J.E., Re F.: Innate immune response to *Francisella tularensis* is mediated by TLR2 and Caspase-1 activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 80: 766-773, 2006.
20. Lindgren H., Stenman L., Tärnvik A., Sjöstedt A.: The contribution of reactive nitrogen and oxygen species to the killing of F.T. LVS by murine macrophages. *Microbes and Infection*, 7: 467-75, 2005.
21. Loegering D.J., Drake J.R., Banas J.A., McNealy T.L., Mc Arthur D.G., Webster L.M., Lennartz M.R.: *Francisella tularensis* LVS growth in macrophages has reduced ability to stimulate the secretion of inflammatory cytokines by macrophages *in vitro*. *Microbial Pathogenesis*, 41: 218-225, 2006.
22. Macela A.: *Francisella tularensis* - model buňkami zprostředkované imunitní reakce", disertační práce, Praha 1980.
23. McCaffrey R., Allen L.A.H.: Pivotal advance: *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *Journal of Leukocyte Biology*, 80: 1224-1230, 2006.
24. Nibbering P.H., Van Furth R.: Quantitative immunocytochemical characterization of four murine macrophage-like cell lines. *Immunobiology*, 176: 432-439, 1988.
25. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A.: Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75: 163-189, 2004.
26. Sjöstedt A.: Intracellular survival mechanisms of *Francisella tularensis*, a stealth pathogen. *Microbes and Infection*, 8: 561-567, 2006.
27. Stenmark S., Sjöstedt A.: Transfer of specific antibodies results in increased expression of TNF- α and IL-12 recruitment of neutrophils to the site of cutaneous *Francisella tularensis* infection. *Journal of Medical Microbiology*, 53: 501-504, 2004.
28. Telepnev M., Golovliov I., Grundström T., Tärnvik A., Sjöstedt A.: *Francisella tularensis* inhibits Toll-like receptor-mediated activation of intracellular signalling and secretion of TNF- α and IL-1 from murine macrophages. *Cellular Microbiology*, 5: 41-51, 2003.
29. Van Coillie E., Van Damme J., Opdenakker G.: The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 10: 61-86, 1999.
30. Wong J.D., Shapiro D.S.: *Francisella*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. Washington, D.C.: ASM Press, 647-51, 1999.

PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORKY

Původní práce v časopisech s IF

1. **Holická 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). Přijato k publikaci. (IF=1.172)
2. Kunes P., Mandak J., Harrer J., Kolackova M., Andrys C., **Holická M.**, Krejsek J.: Up-regulation of the Apo/Fas (CD95) complex on neutrophils harvested during cardiac surgery: distinct findings in patients operated on with or without the use of cardiopulmonary bypass. *Perfusion*, 2010; 25(1): 41-46. (IF=0.667)

Původní práce v recenzovaných časopisech:

1. Novosad J., Loudová M., **Holická M.**, Krejsek J.: Phenotype profile of effectively activated macrophage J774.2 cells. *Vojenské zdrav. listy*, 2004; LXXIII(Suppl. 1): 1-5.
2. **Holická M.**, Novosad J., Loudová M., Andrýs C., Krejsek J.: Effect of interferon γ , lipopolysaccharide and *Francisella tularensis* LVS infection on *in vitro* production of cytokines by murine macrophage-like cell line J774. *Vojenské zdrav. listy*, 2004; LXXIII(Suppl.1): 5-7.
3. 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(12): 785-789.
4. 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(12): 790-794.
5. Novosad J., Kudlová M., Loudová M., **Holická M.**, Krejsek J.: Funkční model aktivace a infekce makrofágů *in vitro*. *Alergie*, 2006; 8(3): 249-253.
6. **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.

Přehledové práce v recenzovaných časopisech:

1. Novosad J., **Holická M.**, Novosadová M., Krčmová I., Malá E., Krejsek J.: Imunopatogeneze infekce *Francisellou tularensis* a rizika bioterorismu. *Alergie*, 2010 (přijato k publikaci).

Abstrakta

1. **Černá M.**, Macela A., Krejsek J.: An *in vitro* model of *Francisella tularensis* LVS infection. *Vojenské zdravotnické listy, suppl. 1, LXXI 2002, ISSN 0372-7025.*

2. Loudová M., **Černá M.**, Krejsek J., Macela A.: Phenotypic profile of phagocytic cells J774.2 infected with *Francisella tularensis* LVS microbes. Vojenské zdravotnické listy, 2002; Suppl. 1, 22-25, LXXI 2002, ISSN 0372-7025.
3. Krejsek J., Kopecký O., **Holická M.**: Imunopatogeneze mykobakteriálních infekcí. Konference o mikrobiologii a epidemiologii tuberkulózy a nespecifických plicních infekcí. Sborník přednášek. 2002; s. 11.(ISBN 80-902753-7-0)
4. Loudová M., **Černá M.**, Krejsek J., Macela A.: Expres vybraných molekulárních znaků u linie J774.2 po infekci in vitro intracelulárním bakteriálním patogenem *Francisella tularensis*. Alergie, 2002; 4(Suppl.3): 83-84.
5. **Holická-Černá M.**, Macela A., Krejsek J.: Infekce myší monocyto-makrofágové buněčné linie J774.2 mikrobem *Francisella tularensis* LVS. Alergie, 2002; 4(Suppl.3): 84.
6. Červinka M., Krejsek J., Rudolf E., Andělová H., Fiedler Z., **Holická M.**, Havlasová J., Loudová M.: Advances in understanding of intracellular parasitism of *Francisella tularensis*. Acta Med. (Hradec Králové), 2003; 46(2): 43-44.
7. Červinka M., Krejsek J., Rudolf E., Andělová H., Fiedler Z., **Holická M.**, Havlasová J., Loudová M., Novosad J.: Advances in understanding of intracellular parasitism of *Francisella tularensis*. Acta Med., 2004; 47(2): 70.
8. Kročová Z., Stulík J., Andělová H., Hartmanová B., Hernychová L., Hubálek M., Lenčo J., Brychta M., **Holická M.**, Loudová M., Novosad J., Kroča M., Macela A.: Interaction of *Francisella tularensis* live vaccine strain with eukaryotic cells. Immunology 2004, by Medimond S.r.l., 2004; 417-421, ISBN 88-7587-069-1.
9. Krejsek J., Andrýs C., Novosad J., **Holická M.**, Kopecký O.: Faktory vnějšího světa určující atopickou reaktivitu – klíč k prevenci alergických onemocnění. Alergie, 2004; 6(Suppl.2): 8.
10. Červinka M., Krejsek J., Rudolf E., Andělová H., Fiedler Z., **Holická M.**, Novosad J., Loudová M., Kudlová M.: Proteome centre for the study of intracellular parasitism. Acta Medica (HK), 2005; 48(2): 102.
11. 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. Alergie, 2006; 8(Suppl.2): 12.
12. 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.
13. 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.

Přednášky a poster

1. **Černá M.**, Berger J.: The AgNOR size in rat blood lymphocytes. Poster na konferenci Buňky II/Cells II, České Budějovice 5.-6.9.2000, abstrakt uveden v J. Berger (ed.): Cells II. Koop, České Budějovice, 2000, p.152.
2. **Černá M.**, Macela A., Krejsek J.: An *in vitro* model of *Francisella tularensis* LVS infection. Přednáška na mezinárodním diskusním fóru na téma Intracellular bacterial pathogens: from structure to pathogenicity. Jablonné nad Orlicí, 22.-24.5.2002.

3. Loudová M., **Černá M.**, Krejsek J., Macela A.: Phenotypic profile of phagocytic cells J774A.1 infected with *Francisella tularensis* LVS microbes. Přednáška na mezinárodním diskusním fóru na téma Intracellular bacterial pathogens: from structure to pathogenicity. Jablonné nad Orlicí, 22.-24.5.2002.
4. **Holická-Černá M.**, Macela A., Krejsek J.: Infekce myši monocyto-makrofágové buněčné linie J774.2 mikroblem *Francisella tularensis* LVS. Poster na 19. sjezdu ČSAKI, Karlovy Vary 6.-9.10.2002, abstrakt uveden ve sborníku abstraktů Alergie, 4,supp. 3, 2002, ISSN 1212-3536, s. 83-84.
5. Loudová M., **Černá M.**, Krejsek J., Macela A.: Expres vybraných molekulárních znaků u linie J774.2 po infekci *in vitro* intracelulárním bakteriálním patogenem *Francisella tularensis*. Poster na 19. sjezdu ČSAKI, Karlovy Vary 6.-9.10.2002, abstrakt uveden ve sborníku abstraktů Alergie, 4(suppl.3): 2002, ISSN 1212-3536, s. 83-84.
6. Krejsek J., Kopecký O., **Holická M.**: Imunopatogeneze mykobakteriálních infekcí. Přednáška na Konferenci o mikrobiologii a epidemiologii tuberkulózy a nespecifických plicních infekcí, Hradec Králové 16.-18.10.2002, abstrakt uveden ve sborníku přednášek, HK Credit, 2002, ISBN 80-902753-7-0, s.11.
7. Kročová Z., Loudová M., **Holická M.**: Změny v povrchových znacích u buněk z peritoneálního výplachu myši BALB/c po *in vivo* a *in vitro* infekci *F. tularensis* LVS v porovnání s buněčnou linií J774. Přednáška na interním semináři Ústavu radiobiologie a imunologie, VLA JEP, Hradec Králové 12.-13.2002.
8. Krejsek J., **Holická M.**, Kopecký O.: Infekce a nespecifická polyklonální tvorba protilátek. Přednáška na 2. setkání lékařů ČR a SR "Astma a alergie z různých pohledů". Litomyšl, 30.-31.5.2003.
9. Loudová M., Novosad J., **Holická M.**: Phenotype analysis of J774.2 macrophage cell line during *in vitro* stimulation. Pouster: 1ST EUROPEAN WORKSHOP ON THE ANALYSIS OF PHAGOCYTE FUNCTIONS, Brno, September 7 - 9th, 2003, abstrakt uveden ve sborníku abstraktů, s.46.
10. **Holická M.**, Loudová M., Novosad J.: Cell viability and nitric oxide production by J774.2 macrophages during stimulation. Poster na 1ST EUROPEAN WORKSHOP ON THE ANALYSIS OF PHAGOCYTE FUNCTIONS, Brno, September 7 - 9th, 2003, abstrakt uveden ve sborníku abstraktů, s. 48.
11. Novosad J., **Holická M.**, Loudová M.: FcγIII/IIR (CD16/32) – A promising marker for monitoring of J774.2 macrophages stimulation? Poster: 1ST EUROPEAN WORKSHOP ON THE ANALYSIS OF PHAGOCYTE FUNCTIONS, Brno, September 7 - 9th, 2003, abstrakt uveden ve sborníku přednášek, s. 50.
12. Loudová M., **Holická M.**, Novosad J.: The phenotypic and morphologic changes in J774.2 cell line during *in vitro* infection by *Francisella tularensis*. Poster: FOURTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON TULAREMIA, City of Bath, United Kingdom, September 15 – 18th, 2003, abstrakt uveden ve sborníku abstraktů, s. P53.
13. Novosad J., **Holická M.**, Loudová M.: Effect of *Francisella tularensis* LVS *in vitro* infection on stimulation of J774.2. cell line by LPS and IFN γ . Přednáška na Výjezdním zasedání Ústavu radiobiologie a imunologie, VLA JEP, Hradec Králové, 11/2003.

14. Novosad J., Loudová M., **Holická M.**: Fenotypové změny myší monocyto-akrofágové linie J774.2 v souvislosti s *in vitro* infekcí *Francisella tularensis* LVS a stimulací LPS a IFN- γ . Přednáška na V. dnech průtokové cytometrie, Nemocnice Na Homolce, Praha, 19.– 20. 4. 2004. 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 . Poster na V. dnech průtokové cytometrie, Nemocnice Na Homolce, Praha, 19. – 20. 4. 2004.
16. Novosad J., Loudová M., **Holická M.**, Krejsek J.: Phenotype profile of effectively activated J774.2 cells. Přednáška na mezinárodním diskusním fóru na téma Molecular and evolutionary aspects of host-pathogen interactions. Tři Studně, 26 - 29.4.2004.
17. **Holická M.**, Novosad J., Loudová M., Andrýs C., Krejsek J.: Effect of interferon γ , lipopolysaccharide and *Francisella tularensis* LVS infection on *in vitro* production of cytokines by murine macrophage-like cell line J774. Přednáška na mezinárodním diskusním fóru na téma Molecular and evolutionary aspects of host-pathogen interactions. Tři Studně, 26.-29.4.2004.
18. 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. Poster. 3rd International Conference on Innate Immunity. Kréta, Řecko, 10.-15.10.2004.
19. Kudlová M., **Holická M.**, Novosad J., Krejsek J.: In vitro interakce *Francisella tularensis* LVS s buňkami monocyto-makrofágové linie J774. Přednáška na výročním zasedání Ústavu molekulární patologie FVZ UO Hradec Králové, Malá Úpa, 2.-3.12.2004.
20. Novosad J., Loudová M., **Holická M.**, Kudlová M.: Průtokově cytometrická analýza molekulární patogeneze infekce *F. tularensis* (přednáška). Výroční zasedání Ústavu molekulární patologie FVZ UO Hradec Králové, Malá Úpa, 2.-3.12.2004.
21. Kudlová M., **Holická M.**, Novosad J., Krejsek J.: The impact of stimulation and *F.tularensis* LVS infection on *in vitro* production of Fas and FasL by murine macrophage like cell line J774.2, Přednáška na Discussion Forum 2005, Valtice 25.-28.4.2005.
22. Kudlová M., **Holická M.**, Novosad J., Krejsek J.: Phenotype profile of murine macrophage-like cell line J774.2 after stimulation by LPS derived from *E.coli* and *F.tularensis* LVS, Přednáška na Discussion Forum 2006, Hradec Králové 2.-5.5.2006.
23. Novosad J., Kudlová M., Loudová M., **Holická M.**, Krejsek J.: Funkční model aktivace a infekce makrofágů *in vitro* (přednáška). XI. Rožnovské alergo-imunologické dny, 19.-20.5.2006.
24. 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 Congress, WAC 2007. Bangkok, Thailand, 2.-6.12.2007. No. 367.
25. Novosad J., Novosadová M., **Holická M.**, Krejsek J., Krčmová I.: Phenotype changes during activation of infected macrophage J774.2 cells. Poster. XXVIII. Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Warszawa, Polsko, 6.-10.6.2009. No. 662.