

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra Fyziologie živočichů a vývojové biologie

**Testování protizánětlivého účinku bakteriálních
komponent na buňkách makrofágových a
epitelových linií**

Zuzana Zákostelská

Praha 2007

Tato diplomová práce byla vypracována pod odborným vedením školitelky Prof.,
MUDr. Heleny Tlaskalové, DrSc.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, s použitím citované
literatury, pod vedením vedoucí diplomové práce.

Praha, srpen 2007

Zuzana Zákostelská.....

V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce prof. MUDr. Heleně Tlaskalové-Hogenové, DrSc. za odborné vedení mé diplomové práce, za cenné rady a pomoc při řešení zadaných úkolů.

Neméně bych chtěla poděkovat MUDr. Miloslavu Kverkovi za neocenitelnou odbornou i morální podporu.

Dále chci poděkovat svým spolupracovníkům z Laboratoře specifické buněčné imunity – Jaroslavě Burianové, Mgr. Kláře Klimešové, Mgr. Petru Šotkovskému za pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji také Mgr. Janu Svobodovi, RNDr. Miladě Šírové, CSc., RNDr. Jiřině Kolínské, CSc., Ing. Janu Kopečnému, DrSc., Ing. Peterovi Šebo, CSc za odbornou a materiální pomoc.

Můj dík patří také všem nejmenovaným kolegyním a kolegům z ústavů AV ČR v.v.i., kteří projevili ochotu pomoci mi při práci.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, která mě během celého studia podporovala. Bez její pomoci by tato diplomová práce nemohla vzniknout.

Diplomová práce vznikala za podpory grantu: 1QS500200572 Vývoj nových nástrojů pro diagnostiku a terapii Crohnovy choroby a ulcerosní kolitidy (AV ČR, v.v.i.)

Testování protizánětlivého účinku bakteriálních složek na buněčných liniích RAW 264.7, J774,A1 a na makrofázích izolovaných z peritonea myši BALB/c

Idiopatické střevní záněty (ISZ) zahrnující Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu vznikají u geneticky predisponovaných jedinců v důsledku abnormální imunitní odpovědi na složky komenzální mikroflóry. Mechanismus tohoto působení zůstává navzdory intenzivně probíhajícímu výzkumu neobjasněn. Naše předchozí studie potvrdily, že bakteriální lyzáty izolované z kmene *Lactobacillus casei* DN114001, *Bacteroides distasonis* a mykobakteriální proteiny tepelného šoku (HSP) zmírňují průběh kolitidy u experimentálních myších modelů ISZ.

Cílem naší studie bylo objasnit vliv bakteriálních složek na makrofágy, jež hrají důležitou úlohu při vzniku chronického zánětu. Efekt bakteriálních komponent jsme testovali na makrofágových liniích RAW 264.7 a J774A.1 a na makrofázích izolovaných z peritonea myši BALB/c. Životnost makrofágů byla testována průtokovou cytometrií. Kvalitativní a kvantitativní zastoupení cytokinů v supernatantech bylo stanoveno proteinovými mikročipy a metodou ELISA. Dalším cílem bylo prokázat změny v aktivaci signální dráhy NFκB pomocí kitu TransAM.

Zjistili jsme, že bakteriální komponenty neovlivňují životnost kultivovaných buněk. Prokázali jsme, že bakteriální komponenty snižují produkci TNF- α a NO u lipopolysacharidem aktivovaných makrofágů buněčných linií. U makrofágů izolovaných z peritonea k této inhibici nedocházelo. Samotné bakteriální lyzáty nestimulovaly makrofágy k produkci TNF- α a NO. Ve srovnání s ostatními bakteriálními lyzáty jsme pozorovali signifikantně vyšší produkci IL-10 makrofágy stimulovaných HSP.

Tyto výsledky naznačují, že jedním z možných protektivních mechanismů působení orálně aplikovaných bakteriálních komponent může být jejich schopnost pozměnit cytokinové prostředí ve prospěch imunologické tolerance.

Klíčová slova: slizniční imunita, makrofágy, bakteriální komponenty, HSP, TNF- α , NFκB, nespecifické střevní záněty, probiotika

Anti-inflammatory effects of bacterial components tested on RAW 264.7, J774.A1 macrophage cell lines and on macrophages isolated from the peritoneum of BALB/c mice.

Inflammatory bowel diseases (IBD) including Crohn's disease and ulcerative colitis results from a dysregulated inflammatory response of the host to intestinal microbes in genetically predisposed individuals. Despite intensively proceeding research the mechanism of this action remains unclear. In our previous studies we confirmed that some bacterial lysates isolated from *Lactobacillus casei* DN11400, *Bacteroides distasonis* and mycobacterial heat shock proteins (HSP) mitigate the severity of experimental colitis in mice.

The aim of our study was to investigate whether these bacterial components have an influence on macrophages which play an important role in mediating chronic inflammation. We tested the effect of bacterial components on macrophage cell lines RAW 264.7 and J774.A1 and on macrophages isolated from the peritoneum of BALB/c mice. Viability of the macrophages we tested by flow cytometry. Qualitative and quantitative determination of cytokines in supernatants was evaluated by protein microarrays and by ELISA. Another aim was to provide evidence of changes in the activation of the NF κ B signaling pathway.

We observed that the bacterial components do not change the viability of cells and proved that the bacterial components downregulate TNF- α and NO production in LPS activated macrophage cell lines. We did find this inhibition in macrophages isolated from the peritoneum. Bacterial components without LPS did not give rise to any production of TNF- α and NO. We found higher production of IL-10 in HSP stimulated macrophages in comparison to other bacterial lysates.

These results indicate, that one of the possible protective mechanisms of action of orally applied bacterial components could be their ability to change the cytokine milieu in the gut, favoring tolerance induction.

Key words: mucosal immunity, macrophages, bacterial components, HSP, TNF- α , NF κ B, inflammatory bowel disease, probiotics

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK	8
2. ÚVOD	10
3. PŘEHLED LITERATURY	12
3.1. Slizniční imunitní systém.....	12
3.1.1. Slizniční imunitní systém trávicího traktu.....	12
3.1.1.1. Složky přirozené imunity.....	13
3.1.1.1.1. Makrofágy.....	13
3.1.1.1.1.1. Cytokiny produkované makrofágy.....	14
3.1.1.1.1.2. Syntéza NO.....	14
3.1.1.1.2. Epitelové buňky střeva.....	15
3.1.1.1.3. Rozpoznávání mikrobiálních složek buňkami přirozené imunity.....	17
3.1.1.2. Složky specifické imunity.....	18
3.2. Bakteriální mikroflóra a její význam a úloha při vzniku ISZ.....	20
3.2.1. Složení mikroflóry gastrointestinálního traktu.....	21
3.2.2. Poruchy gastrointestinálního traktu – ISZ.....	22
3.2.3. Střevní mikroflóra v patogenezi ISZ.....	24
3.2.4. Probiotika a jejich funkce při zmírňování střevního zánětu.....	25
3.2.5. Mechanismy působení bakteriálních lyzátů	28
3.3. HSP – proteiny tepelného šoku.....	29
4. MATERIÁL A METODY	31
4.1. Roztoky.....	31
4.2. Experimentální zvířata.....	33
4.2.1. Příprava suspenze peritoneálních buněk.....	33
4.3. Buněčné linie.....	34
4.3.1. Myší buněčné linie.....	34
4.3.2. Potkaní buněčné linie.....	34
4.3.3. Pasážování a příprava suspenze buněk buněčné linie.....	34
4.4. Kultivace buněčných linií a buněk izolovaných z peritonea.....	35
4.5. Průtoková cytometrie.....	35
4.6. ELISA pro stanovení cytokinů.....	36
4.7. Stanovení produkce NO buňkami Griessovou reakcí.....	38
4.8. Proteinové mikročipy.....	38
4.9. Izolace jaderného extraktu.....	39
4.10. Stanovení koncentrace bílkovin.....	39
4.11. Stanovení aktivace dráhy NFκB.....	40
4.12. Kultivace bakterií a příprava bakteriálních komponent.....	40
4.12.1. Kultivace bakterie <i>Bacteroides distasonis</i>	40

4.12.2. Kultivace bakterie <i>Lactobacillus casei</i> DN114001.....	41
4.12.3. Kultivace bakterie <i>Lactobacillus plantarum</i>	41
4.12.4. Kultivace bakterie <i>Escherichia coli</i> 083.....	41
4.12.5. Příprava bakteriálních lyzátů.....	41
4.12.6. Proteiny tepelného šoku.....	42
4.12.6.1. HSP60.....	42
4.12.6.2. HSP70.....	42
4.13. Použité přístroje a programy.....	42
5. VÝSLEDKY	43
5.1. <i>In vivo</i> experimenty naší laboratoře.....	43
5.1.1. Změny střevní mikroflóry po podání frakce bakteriálního lyzátu izolovaného z <i>B. distasonis</i>	45
5.1.2. Protilátková odpověď IgA, IgG a IgM po podání lyzátu mBd.....	46
5.1.3. Změny v produkci cytokinů v jednotlivých částech střeva u skupiny léčené mBd.....	47
5.2. <i>In vitro</i> experimenty	47
5.2.1. <i>In vitro</i> experimenty – makrofágy.....	47
5.2.1.1. Stanovení optimální koncentrace LPS pro aktivaci makrofágů.....	47
5.2.1.2. Stanovení životnosti buněčných linií pomocí průtokové cytofluorometrie.....	49
5.2.1.3. Změna produkce TNF- α , IL-10, NO LPS aktivovanými buňkami RAW 264.7 po stimulaci bakteriálními lyzáty a jejich komponentami.....	50
5.2.1.4. Semikvantitativní analýza spektra cytokinů produkovaných makrofágy po aktivaci LPS a bakteriálními složkami pomocí proteinového mikročipu.....	54
5.2.1.5. Stanovení koncentrace podjednotky p65 v signální dráze NF κ B u makrofágů linie RAW 264.7 po stimulaci LPS a bakteriálními komponentami.....	56
5.2.1.6. Stanovení produkce TNF- α a IL-10 peritoneálními buňkami BALB/c myši po <i>in vitro</i> kultivaci s bakteriálními komponentami a LPS.....	58
5.2.2. <i>In vitro</i> experimenty – střevní epitelové buňky.....	60
5.2.2.1. Stanovení optimální koncentrace LPS pro aktivaci epitelové buněčné linie IEC-6..	60
6. DISKUZE	61
7. ZÁVĚR	66
8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	67

1. SEZNAM ZKRATEK

AVČR	Akademie věd ČR
BALB/c	imbrední myši kmen
BCG	bacillus Calmette-Gue´rin
Bd	<i>Bacteroides distasonis</i>
BSA	sérový bovinní albumin
c	koncentrace
CD	diferenční antigen
CrD	Crohnova choroba
DGGE	gelová elektroforéza s denaturačními podmínkami
DMEM	Eaglovo médium upravené podle Dulbecca
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSS	dextran sulfát sodný
EC 083	<i>Escherchia coli</i> 083
ELISA	enzymově spřažená imunoanalýza
FACS	průtokový cytofluorometr
FCS	fetální telecí sérum
FGÚ	Fyziologický ústav
GALT	lymfatická tkáň asociovaná se zažívacím traktem
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů
GIT	gastrointestinální trakt
HLA	lidský antigen asociovaný s leukocyty
HRP	křenová peroxidáza
HSP	proteiny tepelného šoku
IEC	střevní epitelové buňky
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IFN	interferon
ISZ	idiopatické střevní záněty

kDa	kilodalton
LAC	<i>Lactobacillus casei</i> DN114001
LAP	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LPS	lipopolysacharid
mBd	membránová frakce <i>Bacteroides distasonis</i>
MBÚ	Mikrobiologický ústav
MIP	chemotaktický faktor pro monocyty
ml	mililitr
mLAC	membránová frakce <i>Lactobacillus casei</i> DN114001
M.R.S.	de Man, Rogosa, Sharp
NFκB	jaderný faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
NP	navazovací pufr
PBS	fosfátový fyziologický roztok
RANTES	chemotaktický faktor
Rpm	otáčky za minutu
RPMI	Roswell park memorial Institute
SD	směrodatná odchylka
SR	Slovenská republika
TGF	transformující růstový faktor
TLR	receptory rodiny Toll
TMB	3,3',5,5'tetramethyl-benzidin
TNF	faktor nekrotizující nádory
UC	ulcerózní kolitida
ÚMG	Ústav molekulární genetiky
ÚŽFG	Ústav živočišné fyziologie a genetiky

2. ÚVOD

Každý organismus je vystaven neustálým interakcím se svým prostředím. Tyto interakce jsou pro život velice důležité, ale zároveň mohou být i život ohrožující. K největšímu a nejdůležitějšímu kontaktu mezi mikroorganismy a savci dochází na slizničních površích. Největší slizniční povrch představuje střevo, jenž má plochu přibližně 200 m² a je hustě osídleno mikroorganismy.

Střevní komenzální mikroflóra má důležitou úlohu v obraně organismu proti různým onemocněním. A to svou přímou interakcí s patogenními bakteriemi a také tím, že ovlivňuje imunitní systém. Složky střevní mikroflóry mají velký význam v postnatálním vývoji imunitního systému a zdá se, že po období, kdy je střevní mikroflóra hlavním stimulem pro rozvoj lokální a systémové imunity, navozují naopak supresivní mechanismy, kterými se udržuje rovnováha ve slizničním systému i v systémové imunitě.

V poslední době je rostoucí pozornost věnována úloze střevní mikroflóry v lidském zdraví a je snaha ovlivnit optimálním způsobem její složení pomocí probiotik. Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v přiměřeném množství, přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele.

Stále přibývá důkazů o tom, že idiopatické střevní záněty, mezi něž patří Crohnova choroba a ulcerózní kolitida vznikají v důsledku abnormální imunitní odpovědi na složky komenzální mikroflóry, což je patrně způsobeno poškozením přirozené imunologické tolerance vůči nepatogenním bakteriím.

Probiotika se již dlouhodobě používají k zlepšování průběhu nespecifických střevních zánětů u experimentálních zvířat. Podávané perorálně jsou schopny pozměňovat rovnováhu determinující množství komenzálních bakterií ve střevě. V poslední době se však ukazuje, že i jednotlivé části mrtvých bakterií mají pozitivní účinky na průběh nespecifických střevních zánětů. Mechanismus tohoto působení však dosud nebyl objasněn.

Tato diplomová práce je zaměřena na analýzu mechanismu protizánětlivého účinku bakteriálních komponent na buňkách makrofágových a epitelových linií.

Cíle diplomové práce jsou:

- Kultivace bakterií a příprava bakteriálních lyzátů a jejich komponent
- Aktivace makrofágů a epitelových buněk pomocí LPS a stanovení vhodných podmínek
- Sledování vlivu bakteriálních lyzátů a jejich komponent na životnost makrofágů
- Stanovení kvantitavních změn v produkci TNF- α , IL-10, NO lipopolysacharidem aktivovanými makrofágy po kultivaci s bakteriálními lyzáty a jejich komponentami
- Semikvantitativní analýza spektra cytokinů produkovaných makrofágy po aktivaci LPS a kultivaci s bakteriálními lyzáty a jejich komponentami
- Stanovení změn koncentrace podjednotky p65 v signální dráze NF κ B u makrofágů linie RAW 264.7 po stimulaci LPS a bakteriálními komponentami

3. PŘEHLED LITERATURY

3. 1. SLIZNIČNÍ IMUNITNÍ SYSTÉM

Slizniční imunitní systém představuje významnou část imunitního systému. Je vystaven největší antigenní zátěži mikrobiálních, enviromentálních a potravních nox. Dělí se podle anatomické lokalizace na slizniční imunitní systém trávicího traktu (GALT, Gut-Associated Lymphoid Tissue), slizniční systém dýchacího traktu (BALT, Bronchus-Associated Lymphoid Tissue), nasální slizniční systém (NALT-Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue), slizniční systém močopohlavní soustavy, prsních žláz a v menší míře na konjunktivální slizniční systém, slizniční systém středního ucha a slinných žláz.

Slizniční imunitní systém musí řešit permanentní dilema, jak nalézt vyvážený vztah mezi imunitní reaktivitou zaměřenou na ochranu před rozmanitými škodlivinami a zabránit přitom poškození vlastních tkání. Mechanismy slizniční imunity, zvláště střeva, jsou balancovány spíše k udržení stavu neodpovídavosti. Na druhou stranu musí slizniční imunitní systém vyvinout efektivní obranu především proti invadujícím mikroorganismům, pokud je toho zapotřebí. Rozdíly v imunitní reaktivitě na rozdílné podněty jsou výsledkem komplikovaných regulací slizniční imunity, která musí být schopna odlišit od sebe neškodné podněty, kterým je v obrovské míře vystavena v podobě potravních antigenů a podnětů zprostředkovaných fyziologickou mikroflórou sliznic, od nebezpečných podnětů představovaných zvláště mikrobiálními noxami. Imunitní systém sliznic je vzájemně propojen. Buňky imunitního systému mohou migrovat z indukčních míst slizničního imunitního systému do míst efektorových. Interakce slizničního imunitního systému s vnějšími podněty určují individuální imunologickou reaktivitu člověka a vývoj imunity jedince jako celku.

3.1.1 Slizniční imunitní systém trávicího traktu

Imunitní systém gastrointestinálního traktu vykazuje určité rozdíly pro jednotlivé části trávicí trubice. Je to způsobeno především rozdíly v intenzitě cizorodých podnětů, kterým jsou tyto oddíly vystaveny. Svou úlohu zde hrají jak složky přirozené, tak i složky specifické imunity.

3.1.1.1 Složky přirozené imunity

Základním mechanismem imunity na sliznicích je imunita přirozená, jež chrání od prvního okamžiku po průniku patogenu svého hostitele. Přirozené imunitní mechanismy jsou tvořeny složkami humorálními a buněčnými.

Humorální složky přirozené imunity tvoří komplementový systém, interferony, laktoferin. Dále lysozym, který je schopen zabít gram-negativní bakterie. Laktoperoxidasa, která pomocí volných radikálů usmrcuje bakterie. Další důležitou součástí přirozených mechanismů sliznic jsou antimikrobní peptidy. U savců mezi ně patří defensiny a kromě toho, že dokáží usmrcovat bakterie, ovlivňují i buňky hostitele.

Mezi buňky přirozené imunity zahrnujeme NK-buňky (natural killer), dendritické buňky, makrofágy, žírné buňky, neutrofile, epitelové buňky a další.

Na rozdíl od specifických složek imunity nemají buňky přirozené imunity takzvanou imunologickou paměť, což znamená, že nejsou výrazně ovlivněny předchozím setkáním s antigenem.

3.1.1.1.1 Makrofágy

Makrofágy jsou považovány za jednu z důležitých efektorových populací buněk imunitního systému zúčastňujících se většiny imunitních dějů, především však zánětlivé reakce. Proliferace makrofágů probíhá nejprve pod vlivem GM-CSF ze společného prekursoru makrofágů a granulocytů, vznikajících v kostní dřeni. V pozdějších fázích proliferace se začínají uplatňovat M-CSF a IL-3 (ULBRICH 2000) a vzniká monocyt. Cirkulující monocyt se může změnit ve tkáňovou formu, označovanou makrofág. Vlivem okolního prostředí a působení určitých cytokinů je makrofág schopen diferenciovat se v určité buněčné typy, ať už osteoklasty v kostech, nebo mikroglie v mozku atd. Aby makrofág byl schopen vykonávat své efektorové funkce, je nutné, aby byl aktivován. Nejvýznamnějšími aktivačními faktory jsou $IFN\gamma$, produkovaný především T buňkami a LPS, což je mitogen charakteristický pro buněčné stěny gramnegativních bakterií.

Sliznice gastrointestinálního traktu obsahuje největší množství makrofágů v lidském těle (LEE *et al.*, 1985). Tyto makrofágy jsou první buňky přirozeného imunitního systému, které se dostávají do kontaktu s mikroorganismy a jejich

bakteriálními produkty na pověších epitelu.. Makrofágy strategicky umístěné v sliznici mají za úlohu regulovat zánětlivou reakci namířenou proti cizím patogenům a zároveň rozpoznat neškodné komenzální bakterie.

3.1.1.1.1. Cytokiny produkované makrofágy

Cytokiny jsou hlavním prostředkem mezibuněčné komunikace. Hlavním zdrojem cytokinů a kyslíkových intermediátů během přirozených imunitních mechanismů jsou makrofágy. Cytokinové prostředí do značné míry určuje povahu imunitní odpovědi. Zatímco protizánětlivé cytokiny produkované makrofágy např. IL-10, TGF- β , IL-4 vedou k potlačení imunitní odpovědi a navození tolerance, prozánětlivé cytokiny např. IL-6, TNF- α , IFN- γ vedou k zesílení imunitní reakce a ke vzniku a udržování zánětu. Další skupinou cytokinů produkovaných makrofágy jsou takzvané růstové faktory hematopoetických buněk např. IL-2, IL-3, IL-4, G-CSF, CD30L. A v neposlední řadě cytokiny se schopností chemotaxe např. MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 γ , MIP-2, CXCL16 a RANTES.

Mezi jeden z nejdůležitějších cytokinů produkovaný makrofágy patří TNF- α . TNF- α je cytokin, který bývá prokazován jako klíčový mediátor v řadě zánětlivých onemocnění. Má silný prozánětlivý a proapoptotický účinek, působí jako endogenní pyrogen a endogenní mediátor toxického účinku lipopolysacharidu gramnegativních bakterií. V malých lokálních koncentracích stimuluje TNF- α obrannou aktivitu lymfocytů, neutrofilů, makrofágů a monocytů, ale ve vysokých koncentracích má pro hostitele nežádoucí účinky, jako je horečka nebo poškozující zánět.

IL-10 je produkován především pomocnými Th-2 lymfocyty, v menším množství také monocyty a makrofágy. Tento cytokin má protizánětlivý účinek. Je schopen inhibovat syntézu prozánětlivých cytokinů jako např. IL-1, IL-6, TNF- α , IL-8, IL-12 a tak deaktivovat makrofágy. IL-10 také blokuje prezentaci proteinových antigenů. Působí jako endogenní imunosupresivní a protizánětlivá látka. Proto se předpokládá možnost jeho klinického využití při léčbě chronických zánětlivých stavů.

3.1.1.1.2. Syntéza NO

Tvorbu NO v buňkách zajišťuje enzym zvaný NO syntáza (NOS). Existuje několik typů těchto enzymů, označovaných nNOS (neural), eNOS (endothelial) a

iNOS (inducible) lišících se v lokalizaci, způsobu jejich regulace a efektorových mechanismech (ALDERTON *et al.* 2001). Makrofágy obsahují inducibilní NO syntázu, lokalizovanou v cytoplasmě. Syntéza NO probíhá hydroxylací L-argininu s následnou oxidací za přítomnosti redukčního činidla NADPH a O₂ a za vzniku citrulinu a NO (MARLETTA 1988). Za anaerobních podmínek je NO stabilní. Za přítomnosti kyslíku však oxiduje na reaktivní intermediáty, jako je peroxinitrit (ONOO⁻) a jiné. Finálním produktem oxidace je stabilní NO₂ a v menší míře také NO₃. Těchto produktů se velice často užívá ke stanovování produkce NO makrofágy, neboť jejich koncentraci lze snadno měřit (viz. 4.7.) Vznik jednotlivých forem závisí na konkrétních oxidačních podmínkách (STAMLER 1992). Stejně jako většina ostatních efektorových funkcí makrofágů je i produkce NO výrazně ovlivněna jednak působením cytokinů, především IFN γ , a také vlivem patologických procesů, nejčastěji mikrobiální infekce, spojených s uvolňováním některých látek např. LPS (STUEHR a MARLETTA 1985). Exprese genu pro iNOS je ovlivněna TNF- α nebo IL-1 β signální dráhou vedoucí k NF- κ B. A tak imunitní odpověď na komenzální bakterie či probiotika zprostředkovaná hlavně cytokiny a kyslíkovými intermediáty je mimořádně důležitá pro pochopení imunomodulačních mechanismů hostitele.

3.1.1.1.2. Epitelové buňky střeva

Střevní sliznice je tvořena jedinou vrstvou epitelových buněk a její povrch je rozšířený nespočetným množstvím klků a krypt. Tyto buňky jsou schopny absorbovat, trávit potravu, regulovat střevní propustnost a přenášet tekutiny, ionty a živiny. Enzymy přítomné v kartáčkovém lemu epitelových buněk se uplatňují při konečném trávení potravy.

Střevní epitelové buňky vznikají diferenciací multipotentní kmenové buňky, která je lokalizována na bázi Lieberkühnových krypt. Multipotentní kmenové buňky se diferencují do čtyř základních epitelových buněčných linií, enterocytů, pohárkových buněk, enteroendokrinních buněk a Panethových buněk. Progenitorové buňky prvních tří linií vyžívají při své migraci nahoru do apikální části klku, zatímco Panethovy buňky se diferencují při své migraci dolů do báze střevních krypt.

Střevní epitelová vrstva obsahuje také zvláštní druh epitelových buněk označovaných jako M buňky, pokrývající Peyerovy pláty. M buňky nemají kartáčový lem a jsou charakteristické cytoplazmatickými výběžky, které jim umožňují interakci

s buňkami lymfatických folikulů. tyto specializované buňky intenzivně pohlcují antigeny. Nemají však na svém povrchu MHC molekuly II. třídy, a proto se předpokládá, že jejich hlavní funkcí je translokace antigenů z lumen střeva k folikulům, čímž přispívají k indukci slizniční imunity (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ *et al.* 1995).

Epitelové buňky střevní sliznice jsou buňky relativně krátce žijící. V průběhu diferenciací a migrace na apex střevních klků prodělávají proces apoptózy a jsou z povrchu střevního epitelu odlučovány. Tento mechanismus je součástí antimikrobiální obrany sliznic. Celková obměna všech buněk se uskuteční za tři až pět dnů (TLASKALOVA-HOGENOVA *et al.* 2005).

Je to však i místo potenciálního vstupu bakterií do organismu. Epiteliální buňky rozpoznávají mikroorganismy a komunikují s buňkami přirozené i získané imunity. Tyto buňky mohou zapojit do odpovědi i další typy buněk např. dendritické buňky a makrofágy, a to v řádu minut od vystavení účinku patogenu.

Zároveň mohou potlačit aktivaci T buněk, a tak utlumit imunitní odpověď. BLAND se spolupracovníky (1998) ukázal, že epitelové buňky jsou schopny prezentovat antigen pomocí hlavního histokompatibilního komplexu.

Vrstva epitelu střevní sliznice je zpevněna těsnými spoji, které jsou umístěny v paracelulárním prostoru a tvoří propojenou síť. Těsné spoje tvoří dynamická a přísně regulovaná místa, která se otvírají a zavírají v odpovědi na různé signály přicházející z lumen střeva, z lamina propria i epitelu samotného a jsou tedy klíčovými elementy v mechanismu difuze. Molekuly tvořící těsné spoje jsou napojeny na cytoskelet. Kromě apikálně umístěných těsných spojů (*zonula occludens*), jsou v paracelulárním prostoru přítomny takzvané indermediální spoje (*zonula adherens*) a desmosomy (FASANO 2001, TLASKALOVA-HOGENOVA *et al.* 2005).

Epitelové buňky střevní sliznice produkují po aktivaci cytokiny. Invadující mikroorganismy stimulují v epitelových buňkách tvorbu prozánětlivých cytokinů například TNF- α , IL-6 a cytokinů s prozánětlivými a chemotaktickými účinky například IL-8 a MCP-1.

3.1.1.1.3. Rozpoznávání mikrobiálních složek buňkami přirozené imunity

Charakteristickým rysem přirozené imunity je schopnost odlišit strukturální znaky mikroorganismů nazývaných struktury charakteristické pro mikrobiální nebo patogenní mikroorganismy (MAMP nebo PAMP) pomocí receptorů rozpoznávající opakující se motivy na mikroorganismech (PRR) od antigenů těla neškodných. Jako příklad receptorů rozpoznávajících charakteristické strukturální znaky mikroorganismů můžeme uvést rodinu receptorů skupiny Toll (TLR) (ULEVITCH *et al.* 1999, MEDZHITOV *et al.* 2000, AKIRA *et al.* 2003). Savčí buňky přirozené imunity jako například makrofágy, dendritické buňky, epitelové buňky a další těmito receptory rozpoznávají například bakteriální lipopolysacharidy, peptidoglykany a další složky mikrobů. Tato interakce vede k signalizaci a aktivaci transkripčního faktoru NFκB, který je zodpovědný za aktivaci genů kodujících produkci cytokinů, chemokinů a dalších mediátorů zánětu (TLASKALOVA-HOGENOVÁ *et al.* 2004)

Transkripční faktor NFκB hraje důležitou úlohu při zánětlivé odpovědi buněk na stresové podněty, v karcinogenezi a při autoimunitních onemocněních (DELHALLE *et al.* 2000). Z toho vyplývá, že NFκB je hlavním mediátorem zánětu a imunitních reakcí. U savců rozpoznáváme několik členů rodiny NFκB. Těmito členy jsou následující podjednotky p50, p52, c-Rel, RelB, a RelA (p65). Nejvíce zastoupená forma NFκB u savčích buněk je heterodimer složený ze dvou proteinových podjednotek p50 a p65.

Předchozí studie naznačují, že LPS aktivuje NFκB postranlačním mechanismem, který působí prostřednictvím degradace a modifikace inhibitoru NFκB, IκB, následovanou translokací NFκB do jádra a navázáním se na promotor (ZHANG *et al.* 2000, WANG *et al.* 2002).

Aktivace NFκB byla prokázána in situ u makrofágů a střevních epitelových buněk ve sliznici u pacientů s ISZ (ROGLER *et al.* 1998). Důležitost tohoto transkripčního faktoru v regulaci ISZ spočívá v aktivaci produkce prozánětlivých cytokinů.

Stimulace IEC-6 pomocí LPS vede ke zvýšení produkce mRNA podjednotek p50 a p65 signální dráhy NFκB (CHANCHEVALAP *et al.* 2006).

Některé studie se zabývaly vlivem komenzálních bakterií na signální dráhu NFκB (O'HARA a SHANAHAN 2006). A se zdá, že některé druhy probiotických bakterií mohou zmírňovat zánětlivé signály vyvolané bakterií *Salmonella typhimurium* a jejím flagelinem prostřednictvím signální dráhy vedoucí k NFκB (O'HARA *et al.* 2006). Je popsáno několik různých mechanismů, kterými mohou komenzální a probiotické bakterie inhibovat NFκB. A to například inhibicí funkce proteasomu v epitelových

buňkách, degradací NF κ B regulačního faktoru I κ B α nebo jaderným transportem podjednotky NF κ B p65 přes růstový-aktivační receptor peroxisomu (NEISH *et al.* 2000, KELLY *et al.* 2004, PETROF *et al.* 2004).

Nedávno byly nalezeny nové negativní regulátory přirozené imunitní odpovědi, které interferují s tvorbou funkčního TLR-4 signálního komplexu přerušením interakce s kritickými signálními proteiny. Zmíněné negativní regulátory zahrnují proteiny IRAK-M, SIGIRR (jednoduchý imunoglobulin příbuzný IL-1R), TOLLIP (protein interagující s Toll) a A20 (zinkový-prstový protein)(HALLER a JOBIN 2004, KOBAYASHI *et al.* 2002). Příklady negativních regulačních drah zapojených v řízení přirozené a získané imunity ve střevě jsou IL-10 a TGF- β signální kaskády (HALLER a JOBIN 2004). Tvorba IL-10 a TGF- β vede k aktivaci regulačních buněk, které obratem inhibují imunitní odpověď a navozují slizniční toleranci (MALOY a POWRIE 2001, SINGH *et al.* 2001). Kromě toho vede TGF- β signalizace k indukci inhibičních molekul SMAD6 a SMAD7, které působí jako endogenní negativní regulátory TGF- β /SMAD kaskády (HALLER a JOBIN 2004, HAYASHI *et al.* 1997). Některé komensální a probiotické bakterie také regulují zvýšení exprese supresorů z rodiny signálních cytokinů, tzv. SOCS (supresor cytokinové signalizace) (ELLIOT *et al.* 2004).

3.1.1.2. Složky specifické imunity

Slizniční lymfatická tkáň (MALT) se skládá zčásti z organizovaných struktur, které zahrnují jak samostatné, tak vícečetné lymfatické uzliny (Peyerovy plaky, appendix) a zčásti z difúzně rozprostřených lymfocytů pod celým povrchem sliznic v *lamina propria mucosae*. Tyto komponenty společně s nespecifickou částí slizničního imunitního systému tvoří specifickou (adaptivní) odpověď.

Organizovaná část slizničního imunitního systému zastupuje indukční funkci. Terminální centra lymfatických uzlin jsou tvořeny převážně B lymfocyty, T lymfocyty zauímají místo především v interfolikulárním prostoru v blízkosti venul s vysokým endotelem. Organizovaná slizniční tkáň je kryta vrstvou epitelu (tzv. epitel asociovaný s folikuly, FAE), který v sobě obsahuje speciální typ membranózních epitelových buněk. Nazývají se M-buňky a jsou velmi efektivní v pohlcování některých antigenů a jejich transportu z lumen do folikulárního prostoru (Peyerovy plaky), kde dochází

k aktivaci T lymfocytů a tedy indukci slizniční imunitní odpovědi (OGRA *et al.* 1999, FUJIHASHI *et al.* 2001)

Difuzní lymfocyty reprezentují účinnou efektorovou část slizničního imunitního systému. Lymfocyty, které jsou přítomné v epitelu na bazolaterální straně enterocytů, se nazývají intraepiteliální lymfocyty (IEL). Jedná se o T lymfocyty především CD8⁺ fenotypu, které se liší od lymfocytů přítomných v krevním řečišti. Tyto lymfocyty jsou charakterizovatelné jako CD8⁺, CD45RO⁺ s adhesivními molekulami (integrin $\alpha E\beta 7$) a cytoplazmatickými granulami s obsahem cytolytických proteinů (perforin). Předpokládá se, že intraepiteliální lymfocyty jsou schopny rozpoznat některé proteiny, které normálně nejsou přítomné v epitelu, a reagovat cytologicky na poškozené nebo pozměněné epiteliální buňky.

Difuzní lymfocyty v lamina propria jsou nejpočetnější a neaktivnější slizniční efektorové buňky. Jsou to především B lymfocyty produkující polymerní IgA a T lymfocyty fenotypu CD4⁺ produkují různé cytokiny, kde velmi zajímavá a důležitá subpopulace je tvořena T regulačními lymfocyty (T_{reg}), které jsou významné hlavně díky své supresorové funkci. Tyto regulační T buňky exprimují CD25 a produkují inhibiční cytokiny IL-10 a TGF- β (MESTECKY *et al.* 1995, POWRIE *et al.* 1995, HAYDAY *et al.* 2001, SINGH *et al.* 2001, TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ *et al.* 2002).

IgA patří mezi jeden z nejdůležitějších humorálních obranných mechanismů na slizničním povrchu. Jeho polymerní forma dominuje při sekreci, monomerní forma je dominantní v krevním oběhu. Hlavním zdrojem monomerního IgA je kostní dřev, naproti tomu polymerní forma je produkována hlavně plazmatickými buňkami ve sliznici a exokrinních žlázách. Lymfatická tkáň asociovaná se zažívacím traktem GALT je největším lymfatickým orgánem v těle. Celkové množství IgA produkujících buněk (7×10^{11}) a denní produkce IgA ve střevě (2-5 g) poukazuje na skutečnost, že IgA je nejvíce prezentovanou třídou imunoglobulinů v organismu. Jeho polymerní struktura mu umožňuje pronikat do sekretů, odolávat enzymatickým aktivitám a fungovat jako efektorová molekula na slizničních površích (MESTECKY *et al.* 1995, OGRA *et al.* 1999, BOS *et al.* 2000, MACPHERSON *et al.* 2000, FAGARASAN *et al.* 2003). Sekretované IgA, tj. jeho dimerní forma, je odolná k proteolýze a její hlavní úkol je znemožnit bakteriím adherovat na sliznici a zabránit průniku antigenů do vnitřních prostor organismu. Navíc je IgA schopné reagovat s některými nespecifickými baktericidními látkami, jako je laktoperoxidáza nebo laktoferin a transportovat je k

bakteriálnímu povrchu (MESTECKY *et al.* 1999, PHALIPON *et al.* 2002, FAGARASAN *et al.* 2003).

3.2. BAKTERIÁLNÍ MIKROFLÓRA A JEJÍ VÝZNAM A ÚLOHA PŘI VZNIKU ISZ

Mikroorganismy žijí v těsném spojení s okolním prostředím, které je životně důležité pro jeho přežití, ale zároveň tak mohou být i život ohrožující. K největším a nejdůležitějším interakcím mezi organismem a okolním prostředím dochází na površích, které jsou pokryty epiteliálními buňkami. Je důležité si uvědomit, že například u člověka tvoří pokožka cca 2m², zatímco mukózní povrchy zaujímají cca 300 m². Ačkoli se savčí plod rodí bezmikrobní, už během porodu dochází k nezvratné kolonizaci mikroorganismy. Za prvotní a hlavní místa kolonizace lze považovat pokožku a slizniční povrchy gastrointestinálního traktu, pohlavní soustavy a plic. Tyto interakce za fyziologických podmínek vedou ke kolonizaci epitelových povrchů, harmonickému soužití hostitele s mikroorganismy. Tím je vytvořen velmi složitý, otevřený a dynamický ekosystém, tvořený přítomnými bakteriemi a krátkodobě i mikroby. Za určitých podmínek ovšem také může docházet k tomu, že některý z členů tohoto ekosystému se stane pro hostitele parazitem a může docházet k oportunním infekcím (SAVAGE 1999, BERG 1999, HENDERSSON 1999, TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ *et al.* 2004).

Mikroflóra interaguje s organismem jak lokálně, tak i na úrovni celého systému. Tyto interakce jsou založené na oboustranně aktivní účasti a vykazují shodnou strategii, protože dlouhá koevoluce vybavila mikroorganismy i imunitní systém podobnými mechanismy diverzifikace a selekce (BOMAN 2000).

Počet mikroorganismů tvořících tento ekosystém se odhaduje na cca 10¹⁴ jedinců, což je o řád více než buněk, které tvoří lidský organismus. Normální mikroflóra je převážně tvořena bakteriemi, ale vyskytují se v ní i houby, prvoci a viry. Odhaduje se, že se na jejím složení podílí více jak 1000 druhů. Bohužel se naše současná znalost tohoto ekosystému omezuje na informace získané známými mikrobiologickými kultivačními postupy. Například střevní mikroflóra je tvořena převážně anaerobními bakteriemi, které jsou právě těmito technikami obtížně identifikovatelné (SCHAEDLER 1965). Navíc je až 80 % bakterií přítomných v normální mikroflóře

nekultivovatelných (SCHAEDLER 1965, SAVAGE 1999, BERG 1999, HOOPER 2001). Proto se v poslední době přistupuje k použití nových molekulárně biologických metod, jako jsou sekvenční analýza knihoven amplifikované ribozomální DNA nebo gelové elektroforézy s teplotním gradientem nebo denaturačními podmínkami (DGGE). Obě tyto metody jasně dokazují, jak různorodá je střevní mikroflóra. Další velmi efektivní metodou je polymerázová řetězová reakce (PCR), společně s oligonukleotidy na bázi 16S ribozomální RNA. Tyto oligonukleotidy lze také použít pro *in situ* fluorescenční hybridizaci (FISH). Tak již byly popsány sondy pokrývající zhruba 80% střevní mikroflóry (RAPPUOLI 2000, HARMSSEN 2002, SALZMAN 2002, WILSON 2002).

Nespočet klinických a experimentálních studií jasně demonstrovalo klíčovou roli komenzálních bakterií ve vývoji imunitního systému (NEUMANN *et al.* 1998, DUARTE *et al.* 2004, SOUZA *et al.* 2004, OLIVIERA *et al.* 2005). Např. délka života lymfocytů, jež jsou typem bílých krvinek (dělí se na T a B buňky), závisí na podnětech od komenzálních bakterií. Celková aktivace regulačních T buněk u novorozenců může trvat až 2 roky a závisí na stimulaci bakteriemi (SHANAHAN 2000, SARTOR 2004). Stimulace bezmikrobních zvířat komenzálními bakteriemi spouští vývoj a aktivaci imunitního systému interagujícího s povrchy sliznic, které spojují trávicí, dýchací a urogenitální trakt (CRABBE *et al.* 1970, TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ *et al.* 1970, 1981, 1983, 1997, 2002, 2005, ŠTEPÁNKOVÁ *et al.* 1998, NEUMANN *et al.* 1998, SHANAHAN 2000, SARTOR 2004, WILLIAMS *et al.* 2006).

Je zajímavé, že osazení střeva bezmikrobních zvířat, vede i ke změně fyziologických funkcí střeva a to například ke zrychlenému vyžrávání enzymů kartáčkového lemu na enterocytech (KOZÁKOVÁ *et al.* 1998, 2001, 2006).

3.2.1. Složení mikroflóry gastrointestinálního traktu

Ačkoliv se intestinální mikroflóra mění v závislosti na věku, životním stylu a způsobu stravování (HOPKINS *et al.* 2001), je také do značné míry ovlivněna genotypem hostitele (ZOETENDAL *et al.* 2001). Struktura a složení střevní mikroflóry odráží přirozenou selekci organismu, která se podílí na udržení tohoto složitého ekosystému.

Gastrointestinální trakt (GIT) je kolonizován velkým množstvím převážně anaerobních bakterií. Vzhledem ke kyselému prostředí a velkému množství proteolytických enzymů obsažených v GIT je přístup bakterií z prostředí do distálních částí GIT značně omezen. Jednotlivé části GIT se liší v počtu zastoupení jednotlivých bakterií. Duodenum a jejunum obsahuje daleko menší množství bakterií ve srovnání s ileem, které je hustě osídleno. Největší diverzitu a množství jednotlivých druhů bakterií, a to jak přichycených k sliznici tak přítomných ve střevním obsahu, můžeme pozorovat v kolon (10^{11} - 10^{12} bakterií na gram střevního obsahu). Více jak 90% bakteriální populace jsou obligátní anaeroby, z nichž nejčastěji se vyskytujícími druhy jsou kmeny rodu *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* a další. Mezi další kmeny pravidelně se vyskytující v mikroflóře GIT patří *Escherichia coli*, *Enterobacter* (SAVAGE 1999, WILSON 2002).

Také bakterie kmene *Lactobacillus* patří mezi běžné složky slizniční mikroflóry ve střevě a urogenitálním traktu člověka (REUTER 2001) a jsou často využívány jako probiotika (viz.3.2.4.). Tento kmen gram-pozitivních fakultativních anaerobních bakterií je hlavní součástí skupiny bakterií mléčného kvašení, které jsou schopné přeměňovat laktózu a další cukry na kyselinu mléčnou.

Bakterie kmene *Bacteroides* jsou anaerobní gram-negativní bakterie, které netvoří endospory. Zvláštností tohoto kmene bakterií je, že jejich buněčná stěna obsahuje sfingolipidy. Tyto komenzální bakterie se ve střevě účastní mnoha metabolických pochodů. Jsou schopny fermentovat karbohydráty, využívat dusíkaté sloučeniny a přeměňovat žlučové kyseliny (HENTGES 1983). Jako anareobní bakterie mohou napomáhat k eliminaci patogenních bakterií a to těmito čtyřmi způsoby: 1. kompeticí o živiny 2. kompeticí o místo na střevním povrchu 3. produkcí nestabilních mastných kyselin 4. uvolňováním volných žlučových kyselin (HENTGES 1983). Ačkoliv tento kmen bakterií je převážně znám jako součást normální střevní mikroflóry, může být i oportunistickým patogenem (WERNER 1974).

3.2.2. Poruchy gastrointestinálního traktu - ISZ

Mezi nespecifické střevní záněty (tj. záněty, u kterých neznáme příčinu) zahrnujeme různá zánětlivá onemocnění s překrývajícími se klinickými,

patologickoanatomickými a epidemiologickými nálezy. Hlavními představiteli této skupiny onemocnění jsou Crohnova choroba (CrD) a ulcerózní kolitida (UC).

CrD je granulomatózní a transmurální zánět postihující segmentálně nebo plurisegmentálně kteroukoliv část trávicí trubice. UC je hemoragicko-katarální zánět sliznice tlustého střeva, postihující vždy rektum a šířící se kontinuálně na různě rozsáhlou část tlustého střeva nebo celé tlusté střevo. Charakteristický endoskopický a histologický nález těchto onemocnění (obr. 3.1.)

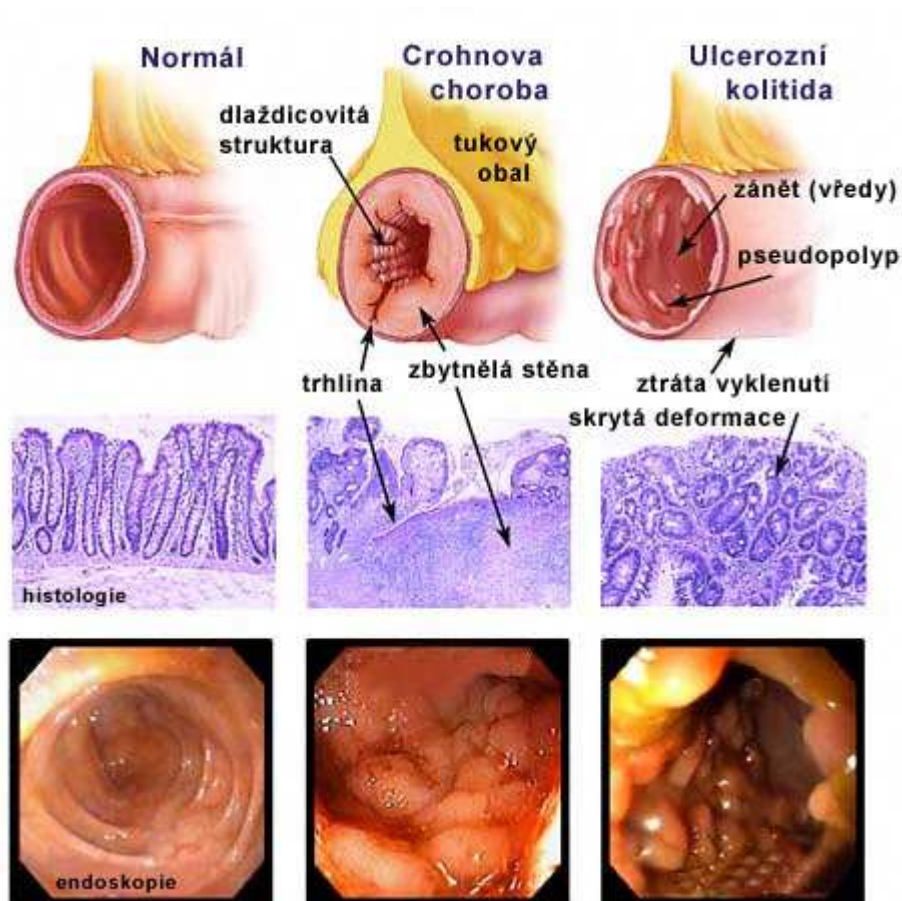
Průběh obou chorob je charakterizován relapsy a remisemi. CrD a UC nelze medikamentózně definitivně vyléčit. K definitivnímu odstranění UC vede jen chirurgická léčba (proktokolektomie).

Současná léčba ISZ se zaměřuje celkem úspěšně na léčení symptomů. U některých pacientů však není tak účinná nebo vyvolává spoustu vedlejších příznaků (VAN ASSCHE *et al.*, 2006).

Na léčbu zvířecích modelů experimentální kolitidy se často využívá monoklonální protilátka proti TNF- α (POWRIE *et al.* 1994, KOSIEWICZ *et al.* 2001). To poukazuje na význam tohoto cytokinu při rozvoji ISZ. V důsledku toho je tento cytokin v popředí zájmu a monoklonální protilátka namířená proti TNF- α se hojně používá při léčbě lidského onemocnění. Mezi léky tohoto typu patří Infliximab, Adalimumab, Onercept

Proto by léčba probiotiky, jež zaznamenává rozvoj v posledních letech, mohla splňovat kritéria zdraví nezávadné léčby bez vedlejších efektů.

V současné době existuje několik placebo kontrolovaných studií, které ukazují na protektivní efekt a zdravotní nezávadnost probiotik při prevenci a léčbě ISZ (KRUIS *et al.* 2004, MIMURA *et al.* 2004, SUMMERS *et al.* 2005a, SUMMERS *et al.*, 2005b).



Obr. č. 1. Srovnání histologických a endoskopických nálezů při ISZ (převzato z www.colitis.crohn.cz).

3.2.3. Střevní mikroflóra v patogenezi ISZ

Spojitosť mezi vznikem ISZ a poruchou rovnováhy v bakteriálním ekosystému byla popsána mnoha autory (SARTOR 1997, TLASKALOVÁ *et al.* 1998, 2003, FARRELL 2002, SARTOR 2004, TAMBOLI 2004).

Účast střevní mikroflóry při vzniku ISZ je podpořena následujícími třemi nálezy. Zaprvé míra zánětu ve střevě je závislá na míře osídlení střeva. Největší zánět je pozorován v distálním kolon. Zadruhé manipulace se složením střevního obsahu pomocí probiotik nebo antibiotik hraje důležitou úlohu při léčbě střevních onemocnění (GIONCHETTI *et al.* 2006). Zatřetí, střevní zánět se obvykle neprojeví u bezmikrobních myší (STROBER a EHRHARDT 1993, HUDCOVIC *et al.* 2001) a také u bezmikrobních HLA-B27 transgenních krys (TAUROG *et al.* 1994, SELTON *et al.* 1998) A to i v případě, kdy myši mají deletovanou produkci protizánětlivých cytokinů a v normálních podmínkách se u nich střevní zánět objevuje spontánně. Všechny tyto

výsledky naznačují, že ISZ mohou vznikat jako důsledek abnormální imunitní odpovědi na složky přirozené kmenzální mikroflóry. Stále však není zcela jasné, zda vznik ISZ je způsoben přítomností jedné specifické bakterie či několika bakteriálních kmenů nebo vzniká jako následek celkové destabilizace rovnováhy ve střevní mikroflóře. Další předpokládaný mechanismus, který vede ke vzniku zánětu by mohl být způsoben poruchou slizniční tolerance ke složkám střevní mikroflóry (DUCHMANN *et al.* 2003).

Dále je známo, že v různých zvířecích modelech se ukazují některé bakterie jako patogenní (SHOMER *et al.* 2001). Při rozvoji ISZ hraje důležitou roli kvantitativní změna v zastoupení určitých skupin mikroorganismů. Bylo prokázáno, že u bezmikrobních SCID (těžká kombinovaná imunodeficiencie) myši s přenesenými T-lymfocyty z myši kmene BALB/c a osídlených SPF (bez specifických patogenů) mikroflórou po přidání vláknitých bakterií dojde k vyvolání chronické kolitidy, zatímco u těchto bezmikrobních myši osídlených pouze SPF nebo vláknitými bakteriemi nikoli (ŠTEPÁNKOVÁ *et al.* 2007).

3.2.4. Probiotika a jejich funkce při zmírňování střevního zánětu

Vzájemné vztahy mezi hostitelem a kmenzálním mikroorganismem a vzájemné působení mikroorganismů je důležité pro zdravotní stav hostitele. Správný vývoj lidského imunitního systému je závislý na stimulaci mikroby. Probiotické organismy mohou přinášet výhody svému hostiteli a to ovlivněním jak přirozené, tak i adaptivní buněčné imunity. Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které podávány v přiměřeném množství, přispívají ke zlepšení zdravotního stavu svého hostitele (FAO/WHO, 2001). Existuje mnoho způsobů jakými probiotika mohou zmírňovat zánětlivý stav u střevních onemocnění.

Jedním z cílů probiotické léčby může být buď stimulace, nebo omezení různých imunitních komponent vrozené imunity. Cílem je udržení homeostázy v imunitním systému; tělo musí být schopno odpovědět na kmenzální mikroby stejně jako na potenciální patogeny, bez způsobení nadměrného zánětu. Způsoby jakými probiotika působí na slizniční imunitní systém jsou následující : 1. zvýšení fagocytózy (SHU a GILL 2002) a aktivity NK (natural killer) buněk (GILL *et al.* 2001, SHEIH *et al.* 2001, OGAWA *et al.* 2006) 2. ovlivněním aktivační dráhy NFκB (JIJON *et al.* 2004,

PETROF *et al.* 2004, TIEN *et al.* 2006) 3. indukci apoptózy T-buněk (DIMARZIO *et al.* 2001).

Obecně, probiotika dokáží zvyšovat produkci protizánětlivých cytokinů, jako například IL-10 a TGF- β , a tlumit produkci prozánětlivých cytokinů například TNF- α , IFN- γ , IL-8 (MADSEN *et al.* 1999,2001, HALLER *et al.* 2000, MORITA *et al.* 2002). Ukázalo se, že některé probiotické bakterie, například *Bifidobacterium breve*, *B. bifidum*, *Ruminococcus gnavus*, *Streptococcus thermophilus*, jsou schopny snižovat LPS-vyvolanou produkci TNF- α (MENARD *et al.* 2004). Inhibice jaderné translokace NF κ B a zamezení obourávání I κ B vede ke snížení produkce TNF- α po podání *Lactobacillus reuteri*, zatímco *Salmonella typhimurium* zvyšuje produkci IL-8 v *in vitro* systému (MA *et al.* 2004). Podávání probiotického koktejlu VSL#3, který obsahuje například *Lactobacillus acidophilus*, *L.bulgaricus*, *L.casei*, *L. plantarum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *S. thermophilus*, myším s deletovaným genem pro IL-10 vedlo k zmírnění kolitidy provázené snižováním sekrece TNF- α a IFN- γ na sliznicích (MADSEN *et al.* 2001). U *E. coli* Nissle 1917 se prokázalo, že dokáže snižovat rozšiřování nově maturovaných T- buněk do sliznic a omezovat tak chronický střevní zánět (STURM *et al.* 2005). Dále u SAMP1/Yit myši dokáže *L.casei* kmene Shirota inhibovat produkci IL-6 u LPS-aktivovaných mononukleárních buněk izolovaných z *lamina propria* a snižuje jadernou translokaci NF κ B (MATSUMOTO *et al.* 2005).

Ve slizničních biopsiích izolovaných z ilea u pacientů s Crohnovou chorobou, které byly kultivovány v tkáňových kulturách dokázala probiotika snižovat produkci TNF- α a populaci CD4+ T- buněk (LAMMERS *et al.* 2005). Nejenom živá probiotika ale i komponenty izolované z probiotických bakterií mohou mít podobné účinky na slizniční imunitní systém. Například genomová DNA izolovaná z VSL#3 inhibuje TNF- α indukovanou sekreci IL-8, protein kinasy aktivované mitogeny a aktivaci NF κ B u epitelových buněk HT-29 (JIJON *et al.* 2004).

Probiotika také mohou pozměňovat zastoupení jednotlivých druhů bakterií pozměňováním koncentrace mastných kyselin v kolon. VSL#3 koktejl dokáže převést linolovou kyselinu na její konjugovanou formu, která má protizánětlivé a protirakovinné účinky (EWASCHUK *et al.* 2006).

Probiotika také mohou indukovat produkci mikrobiálních defensinů prostřednictvím Panethových buněk, jenž se nacházejí v kryptách tenkého střeva.(HOOPER *et al.*, 2003). Nedávno bylo objeveno, že sekreční IgA, které je

indukováno komenzální flórou chrání myši proti infekci *Salmonely enterica* var Typhimurium (WIJBURG, et al., 2006).

Další způsob ovlivnění mechanismů přirozené imunity pomocí probiotik je možné prostřednictvím PRR (pattern recognition receptors) a to konkrétně prostřednictvím receptorů skupiny Toll (TLRs). TLRs jsou transmembránové proteiny, které jsou součástí přirozeného imunitního systému, ovšem u obratlovců mohou také sloužit k aktivaci adaptivního imunitního systému. Studie ukázaly, že myši, kterým chybí myeloidní diferenciatní gen prvotní odpovědi 88 (Myd88) (který je součástí signální dráhy TLR) a jsou vystaveni dextranu sulfátu sodnému dostanou mnohem horší formu kolitidy než myši bez této delecce, což značí, že signální dráhy TLR mohou být nezbytné pro udržení střevní homeostázy (SARTOR 2004). Probiotické kmeny mohou zprostředkovat interakce mezi ostatními bakteriemi a TLRs na buňkách epitelu (LAN *et al.*, 2005). Tato schopnost regulovat některé reakce TLR např. zvýšením produkce TLR4 během zánětlivé reakce, může být jedním z přínosů, které komenzálové poskytují svým hostitelům. Jsou zde určité náznaky, že adhesiny mohou být regulovány skrze TLRs (SARTOR 2004; SHANAHAN 2004). Existují důkazy, že reakce na komenzální bakterie zprostředkované TLR jsou regulovány aktivací ostatních PRRs přítomných uvnitř cytosolu buněk přirozené imunity a epitelových buňek. NOD2 (nucleotide oligomerization domain 2) může v případě přítomnosti jeho ligandy muramyl dipeptidu podporovat nebo omezovat TLR2 signalizaci, které je schopno pozměnit produkci prozánětlivých versus protizánětlivých cytokinů (STROBER *et al.* 2006). Mutace genu NOD2 byla nalezena u 10-15% pacientů s Crohnovou chorobou (OGURA *et al.* 2001, HUGOT *et al.* 2001, LESAGE *et al.* 2002).

Mezi další protektivní mechanismy působení probiotik patří zlepšení bariérové funkce sliznice. Různé druhy probiotických bakterií jsou schopny zesílit vrstvu epitelu na sliznicích. Například orální podávání koktejlu VSL#3, ale i jeho proteinová frakce, vede k znovuobnovení poškozené epitelální vrstvy u myši s deletovaným genem pro IL-10 (MADSEN *et al.* 2001). Několik kmenů *Lactobacilu* je schopno zvyšovat expresi střevního MUC3 mRNA (gen pro mucin) a tak zvyšovat slizniční vrstvu (MACK *et al.* 1999, MACK *et al.* 2003). *Lactobacillus GG* zlepšuje funkci bariéry tím, že inhibuje apoptózu střevních epitelových buněk (YAN *et al.* 2002).

Probiotika jsou také schopna ovlivňovat kvalitativní a kvantitativní složení střevní mikroflóry. A to různými způsoby potlačování růstu a průniku patogenů. Na sliznici střeva a epitelových buňkách jsou schopny kompetitivním způsobem kolonizovat

velkou část dostupného prostoru. Navíc mohou do svého okolí produkovat antimikrobiální substance například peroxid vodíku a organické kyseliny. Studie SHIBA *et al.* (2003) popisuje v *in vivo* i v *in vitro* experimentech potlačení růstu bakterie *Bacteroides vulgatus* prostřednictvím *Bifidobacterium infantis*.

Přirozený imunitní systém ovlivňuje imunitní systém získaný. Z tohoto důvodu mohou probiotika působit na adaptivní imunitu. Například interakce bakterie a makrofágů vede k produkci stimulačních cytokinů, které následně ovlivňují T-buňky. Bylo prokázáno, že složky střevní mikroflóry mají velký význam při vývoji imunitního systému na vývoj T-lymfocytů v postnatálním období (SHANAHAN 2000, SARTOR 2004, WILLIAMS *et al.* 2006).

Sekreční IgA je vhodným obranným mechanismem v sekretech. Jeho hlavní funkcí je bránit adhezenci bakterií na slizniční povrch a zabránit průniku antigenů do vnitřního prostředí organismu (FAGARASAN 2003). Ve studii Cukrowska a spolupracovníci (2002) bylo popsáno, že pokud byly předčasně narozené děti kolonizovány *E. coli* Nissle 1917 produkovaly více IgA specifických protilátek.

3.2.5. Mechanismy působení bakteriálních lyzátů

Etiologii a patogenetické mechanismy ISZ pomáhají objasnit zvířecí modely lidských chorob (TLASKALOVÁ 1997, STROBER *et al.* 2002). Kromě zánětů indukovaných chemicky např. kyselinou octovou, dextran sulfátem, etanolem a dalšími látkami, byla popsána řada experimentálních modelů, kde zánět vzniká spontánně. Jsou to jednak zvířata se spontánní mutací nebo geneticky modifikované myši modely s cílenou delecí genů kódujících některé T buněčné funkce a genů kódujících molekuly důležité pro funkci slizniční bariéry.

Přibývá důkazů, alespoň u myších experimentálních modelů, že rozsah střevního zánětu může být zmírněn nejenom pomocí živých probiotických bakterií (MADSEN *et al.* 1999, JIJON *et al.* 2004, KOKEŠOVÁ *et al.* 2006), ale také jejich komponentami a produkty (RACHMILEWITZ *et al.* 2004). V naší laboratoři bylo zjištěno, že perorální podávání sonikátu připraveného z bakterií mikroflóry ovlivňuje průběh střevního zánětu indukovaného dextran sulfátem, a to navozením slizniční tolerance. Bylo zjištěno, že protektivní efekt u myší se střevním zánětem indukovaným dextran sulfátem byl prokazatelný pouze po opakovaném podávání anaerobních bakterií

mikroflóry a nebyl přítomný po podání sonikátů připravených z aerobních složek mikroflóry (VERDÚ *et al.* 2001).

3. 3. PROTEINY TEPELNÉHO ŠOKU (HSP)

Proteiny tepelného šoku tvoří rodinu vysoce konzervovaných proteinů, jejíž zástupci se vyskytují ve všech říších organismů. Exprese proteinů tepelného šoku je indukována vystavením buněk zvýšené teplotě, dále při oxidativním stresu, odnětí živin, buněčné infekci nebo radiaci. Tyto proteiny však můžeme v buňkách najít i za normálních podmínek. HSP také mají důležitou úlohu při sbalování proteinů.

Podle molekulové hmotnosti rozdělujeme HSP do několika rodin: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 a malé proteiny tepelného šoku. HSP proteiny patřící do jedné rodiny se vyznačují vysokou homologií a funkční příbuzností, zatímco HSP proteiny jiných rodin žádnou homologii nesdílí. Například sekvenční homologie HSP60 u dvou rozdílných savců (člověk, křeček, krysa, myš) může být větší než 95%. Pokud porovnáme HSP60 savců a mikroorganismů nalezneme asi 50% sekvenční homologii.

Z imunologického hlediska přitahují HSP stále více pozornosti. HSP jsou obecně známy jako velmi imunogenní proteiny. Mnoho studií využívajících rozdílné způsoby podávání HSP60 a HSP70 ukázalo, že HSP vykazují imunomodulační účinky u různých modelů autoimunitních chorob (VANEDEN *et al.* 2007).

Při preventivní vakcinaci krys DNA mykobakteriálního HSP65 nebo DNA savčího původu nedochází k manifestaci adjuvantní artritidy (QUINTANA *et al.* 2004). Například nasální i orální podávání mykobakteriálního HSP60 či jeho části má protektivní efekt na průběh artritidy u krysího modelu tohoto onemocnění (VAN DEN BROEK *et al.* 1989, PRAKKEN *et al.* 1997, ULMANSKY *et al.* 2002). U NOD (non-obese diabetic) myši záleží na způsobu podání mykobakteriálního HSP60. Podávané v PBS dokáže zabránit rozvoji onemocnění, avšak podané v inkompletním Freudovu adjuvans naopak diabetes vyvolává (ELIAS *et al.* 1991). Z mnoha studií vyšlo najevo, že podávání mikrobiálního HSP60 vyvolává imunitní odpověď T-buněk, které mají imunoregulační fenotyp (exprese CD25 a CD30) a produkují cytokiny TGF- β , IL-10 a IL-4. Tato odpověď je závislá na T-buněčné populaci závislé na HSP (VAN EDEN *et al.* 2007).

Další poznatky poukazující na význam T-regulačních buněk při mechanismu působení HSP byly popsány při stresové situaci. HSP je produkován buňkami vystavených stresové zátěži, tyto buňky jsou většinou tkáňovými buňkami hostitele a neexprimují kostimulační molekuly. V nepřítomnosti kostimulačních molekul přecházejí T-buňky do stavu anergie nebo se mění na regulační (TAAMS *et al.* 1998). Další vysvětlení zvýšené produkce T-regulačních buněk v odpověď na HSP může být v indukcii slizniční tolerance. Časté vystavování mikrobiálních HSP pocházejících ze střevní mikroflory vede k aktivaci T-regulačních buněk v sliznici střeva, které mohou posléze cirkulovat v periferním imunitním systému.

V současné době existuje velice málo poznatků týkajících se interakcí makrofágů s HSP60. Je známo, že vazba HSP60 na makrofágy se uskutečňuje přes agregáty TLR4 a CD14 a také přes TLR-2/TLR-6 (HABICH 2002, BULUT *et al.* 2002). Funkční a aktivní TLR4 je nezbytný pro spuštění zánětlivé reakce (VABULAS *et al.* 2001, FLOHÉ *et al.* 2003, OHASHI *et al.* 2000, HABICH *et al.* 2003). C-koncový úsek aa 481-500 na molekule HSP60 má schopnost vázat se na povrch makrofágů myši linie J774A.1 (HABICH *et al.* 2004).

Studie týkající se míry exprese jednotlivých HSP v gastrointestinálním traktu ukázaly, že rozložení HSP podél GIT je značně rozdílné. Největší zastoupení HSP můžeme nalézt v místech největší expozice potravinovým antigenům a bakteriálním podnětům tzn. v žaludku (KONTUREK *et al.* 2002) a v kolon (TANGUAY *et al.* 1993). Zdá se, že největšími producenty HSP v GIT jsou epiteliální buňky kolon (SARTOR 1997, KOJIMA *et al.* 2003). Tyto HSP mají cytoprotektivní účinky. Bylo prokázáno, že jejich zvýšená exprese v kolon vede k inaktivaci signální dráhy NFκB (ODASHIMA *et al.* 2000). Mezi další producenty HSP patří mononukleární buňky v *lamina propria* (BACA-ESTRADA *et al.* 1994). Indukce produkce HSP pomocí bakteriální flóry vede udržení slizniční bariérové funkce a chrání sliznici před škodlivými vlivy například před reaktivními kyslíkovými radikály (KOJIMA *et al.* 2003).

4. MATERIÁL A METODY

4. 1. ROZTOKY

Fosfát –fyziologický roztok (PBS)

NaCl (Lachema, ČR) 9,0g

Na₂HPO₄.12H₂O (Lachema, ČR) 1,2g

NaH₂PO₄.1H₂O (Lachema, ČR) 0,2g

Doplnit do 1 l destilovanou vodou a upravit pH pomocí 4M NaOH na 7,35.

Promývací pufr (PBT) (viz. 4.6.)

PBS 1000 ml

Tween 20 (Sigma, USA) 0,5 ml (vznikne 0,05 % roztok)

Roztok 1% BSA (viz. 4.6.)

BSA (Sigma, USA) 1g

Doplnit do 100 ml PBS

Navazovací pufr (NP) (viz. 4.6.)

NaHCO₃ 4,3 g

Na₂CO₃ 5,3 g

Doplnit do 1 l destilovanou vodou a upravit pH pomocí 4M NaOH na 9,4

Standartní ředící roztok (SŘR) (viz. 4.6.)

NaCl 8.0 g

Na₂HPO₄•2H₂O 1.42 g

KH₂PO₄ 0.2 g

KCl 0.2 g

BSA 5g

Tween 20 1ml

Doplnit do 1 l destilovanou vodou a upravit pH pomocí 4M NaOH na 7,4

Roztok TMB (viz. 4.6.)

TMB (Sigma, USA)	40 mg
DMF (Lachema, ČR)	27 ml
Destilovaná voda	73 ml

Roztok TMB v DMF stříkat pod hladinu destilované vody.

Citrátový pufr (viz. 4.6.)

Citronan sodný (Lachema, ČR)	2,94 g
Destilovaná voda	100 ml

ph upraveno na 4,2 pomocí kyseliny citronové

DMEM s 10% FCS: médium pro buněčné kultury (viz.4.3.)

Základní kultivační médium dodává Ústav molekulární genetiky AV ČR (ÚMG AV ČR)

450 ml DMEM

6 ml glutamin 200 mM (Sigma, USA)

7,8 ml glukóza 25 % (ÚMG AV ČR)

5 ml antibiotika -10 000 U penicilin + 10 mg/ml streptomycin (Sigma, USA)

10 ml NaHCO₃ 7,5 % (ÚMG AV ČR)

50 ml FCS (Biochrom AG, Německo) s inaktivovaným komplementem (komplement byl inaktivován zahřátím séra ve vodní lázni na teplotu 56 °C po dobu 1 h)

RPMI 1640 s 10% FCS: médium pro buněčné kultury (viz.4.3.)

Základní kultivační médium vyvinuté G. E. Moorem z **Roswell Park Memorial Institute** (odtud zkratka).

450 ml RPMI 1640:

základní aminokyseliny: Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Tyr;

solí: Na₂HPO₄, NaCl, KCl;

pufrovací roztoky: NaHCO₃ -7,5% roztok

tkáňová H₂O (Sigma, USA)

5 ml glutamin 200 mM (Sigma, USA)

5 ml antibiotika-10 000 U penicilin + 10 mg streptomycin/ml (Sigma, USA)

5 ml HEPES 1,5 M, pH 7,2 (Sigma, USA)

50 ml FCS (Biochrom AG, Německo)

Roztok na průtokovou cytometrii (viz. 4.5.)

PBS 200 ml

EDTA 4mmol

BSA 2g

Bakteriální lipopolysacharid (LPS) (viz. 4.4.)

Polyklonální mitogen indukující proliferaci a stimulaci makrofágů a epitelových buněk. Izolát z bakteriálního kmene *Salmonella typhimurium*. Uchovávat při -20°C (Sigma, USA).

4.2. EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA

K experimentům byly využity myši inbredního kmene BALB/c /H-2^d/, které byly získávány z chovu Fyziologického ústavu AV ČR (Praha). Před zahájením pokusu byly myši umístěny v podmínkách konvenčního zvěřince s potravou a vodou *ad libitum*.

4.2.1 Příprava suspenze peritoneálních buněk

Myši mladší jak dva měsíce byly usmrceny cervikální dislokací. Peritoneální dutina byla jedenkrát vypláchnuta 10 ml sterilního PBS (Imuna Pharm, SR). Odebrané suspenze byly dány dohromady a zcentrifugovány (1300 x g., 5 min.). Poté byly buňky dvakrát promyty a resuspendovány v RPMI médiu s 10 % FCS. Koncentrace buněk byla stanovena naředěním trypanové modři 1:10 (Sigma, USA) a spočítáním v Bürkerově komůrce.

4.3. BUNĚČNÉ LINIE

4.3.1. Myší buněčné linie

RAW 264.7 monocyt/makrofágová nádorová linie BALB/c (/H-2^d/, samec) původu indukovaná virem Abelsonovy myší leukemie. Linie produkuje NO. Buňky jsou kultivovány v médiu DMEM (viz. 4.1.) (ATCC (TIB-71), USA).

J774.A1 monocyt/makrofágová nádorová linie BALB/cN (samice) původu izolovaná z ascitu z retikulárního buněčného sarkomu. Linie spontánně produkuje IL-1 β a lyzozym. Buňky jsou kultivovány v médiu DMEM (viz. 4.1.) (ATCC (TIB-71), USA).

4.3.2. Potkaní buněčné linie

IEC-6 epiteliální buněčná linie normálního původu izolovaná z tenkého střeva. Buňky jsou kultivovány v kompletním médiu DMEM (viz. 4.1.) s přidavkem 78 μ l insulínu (c. 10mg/ml) (Sigma, USA) na 200 ml média.

4.3.3 Pasážování a příprava suspenze buněk buněčné linie

Buňky všech námi používaných buněčných linií byly kultivovány v tkáňovém médiu (viz. 4.1.) buď na Petriho miskách (Nunc, Německo), nebo ve sterilních polystyrenových kultivačních láhvích (NUNC, Německo). Kultivace probíhala v kultivačním boxu (Sanyo) při 37°C, 100% vlhkosti a v atmosféře 5% CO₂. Pasážování se provádělo vždy po 2 až 7 dnech podle hustoty buněk v kultivační láhvi, která byla stanovena opticky pod mikroskopem. Adherentní buněčné linie byly ze dna kultivační láhve odstraněny buď mechanicky pomocí škrabky u linií RAW 264.7, J774.A1, nebo chemicky pomocí 0,25% Trypsin-EDTA (Sigma, USA) u buněčné linie IEC-6. Pro další použití byla suspenze buněk přepipetována do 50 ml sterilní kyvety, zcentrifugována (1200 ot./min., 5 min.) a 2x promyta. Poté byly buňky resuspendovány v čerstvém médiu. Koncentrace buněk byla stanovena naředěním buněk 1:10 trypanovou modří a spočítáním v Bürkerově komůrce.

Zamrazování buněk bylo prováděno v kultivačním mediu s 20% fetálního telecího séra a 10% DMSO (Sigma, USA). Buňky v koncentraci 2×10^6 - 10^7 buněk/ml byly rozaliquetovány do zamrazovacích ampulích (Nunc, Německo) po 1 ml a ponechány nejprve cca 20 min. v -20°C , poté přes noc v -70°C a nakonec byly uloženy při -150°C v mrazícím boxu (Sanyo, USA).

Buňky byly co nejrychleji rozmrazeny ve vodní lázni cca 60°C , poté převedeny do 50 ml kyvety (Nunc, Německo) a 2x promyty větším objemem (20-30 ml) tkáňového media (viz. 4.1.). Životnost buněk byla určena pod mikroskopem pomocí trypanové modři a vždy se pohybovala mezi 65-95 %.

S buňkami bylo manipulováno v laminárním boxu Steril-Antares (Steril S.q.a., Itálie) za sterilních podmínek. Tkáňové kultury s podezřením na kontaminaci nebyly do pokusu použity.

4.4. KULTIVACE BUNĚČNÝCH LINIÍ A BUNĚK IZOLOVANÝCH Z PERITONEA

Suspenze buněk (viz. 4.3.3.) byla rozpipetována do 96-jamkové sterilní kultivační destičky (NUNC, Německo) v určité koncentraci (konkrétní údaje viz. 5.2.1.3, 5.2.1.6., 5.2.2.1.). Do jamek byl přidán LPS a různé koncentrace bakteriálních sonikátů (konkrétní údaje viz. 5.2.1.3, 5.2.1.6., 5.2.2.1.). Poté byl objem jednotlivých jamek doplněn médiem na 200 μl a destička byla kultivována v termálním boxu při 37°C v 5% CO_2 atmosféře po dobu 24 až 48 hodin. Všechny vzorky byly analyzovány vždy v dupletu.

4.5. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Průtokovou cytofluorometrii lze využít pro charakterizaci různých buněčných typů v heterogenní populaci a pro zjištění relativní velikosti a granularity buněk. Námí byla tato metoda použita ke stanovení viability kultivovaných buněk. Značení a promývání buněk bylo prováděno v 96-ti jamkových destičkách s plochým dnem (NUNC, Německo). Každý vzorek (jamka) obsahoval 4×10^5 buněk. Centrifugace buněk (v destičce) byla prováděna při 1200 rpm při 4°C , 5 minut.

Po 24 hodinové kultivaci byla destička centrifugována (viz. výše), supernatant byl rychlým vyklepnutím odstraněn, pelety roztřepány a resuspendovány ve 200 μ l (na vzorek) chlazeného FACS roztoku. Následovala opět centrifugace a další promytí 200 μ l chlazeného FACS roztoku. Po promytí byly buňky resuspendovány v 50 μ l chlazeného FACS roztoku. Bezprostředně před analýzou na průtokovém cytofluorometru LSR II (Becton Dickinson, USA) bylo k buňkám přidáno 10 μ l Hoechst 33342 (Sigma, USA). Do analýzy bylo zahrnuto 30 000 buněk. Jako kontrola pro nastavení parametrů přístroje byly použity zcela čisté buňky. Výsledky byly vyhodnoceny programem FlowJo v4.5 (TreeStar, USA).

4.6. ELISA PRO STANOVENÍ CYTOKINŮ

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je imunochemická analytická metoda, která ke kvantitativnímu stanovení komplexu antigen-protilátka používá jako značkovací molekuly enzymy. Metoda byla použita pro stanovení koncentrace cytokinů ze supernatantů po 24 hodinové kultivaci.

Při používání jednotlivých ELISA kitů byl dodržován protokol od výrobce. Pokud není psáno jinak, probíhaly všechny inkubace při pokojové teplotě. Na dno 96-jamkové mikrotitrační destičky (NUNC, Německo) byla nanesena v množství 100 μ l navazovací protilátka rozředěná v navazovacím pufru (NP) v koncentraci (viz. tab. č. 1.) Destička byla inkubována přes noc při 2-8°C. Druhý den byla nenavázaná protilátka z jednotlivých jamek odstraněna a následovala dvouhodinová blokáce nespecifických vazeb pomocí blokovacího roztoku (viz. tab. č. 1.) v množství 250 μ l na jamku. Po blokáci byla destička promyta 3x 300 μ l PTB a poté byly nanесeny vzorky v množství 50 μ l na jamku, standard (viz. tab. č. 1.), který byl ředěn dvojkovou řadou a negativní kontrola, médium. U myšního cytokinu TNF- α byla biotinylovaná detekční protilátka v množství 50 μ l na jamku (viz. tab. č. 1.) nanесena ihned po napipetování standardu. U ostatních myších i krysích cytokinů byly vzorky 2 hod inkubovány, poté promyty 3x300 PTB a následně inkubovány s biotinylovanou detekční protilátkou (viz. tab. č. 1.) v množství 100 μ l na jamku

Cytokin/Kit	TNF-α myší (Biosource, Belgie)	TNF-α kryší (R&D systems, Velká Británie)	IL-10 myší (Biosource, Belgie)
Navazovací protilátka	c.1,25 μ g/ml ředěno v NP1	c.4 μ g/ml ředěno v PBS	c.1,25 μ g/ml ředěno v NP1
Blokovací roztok	SŘR	Roztok 1% BSA	SŘR
Standard	Počáteční c. 4000 pg/ml v SŘR	Počáteční c. 4000 pg/ml v 1% BSA	Počáteční c. 2000 pg/ml v SŘR
Detekční protilátka	c.50 ng/ml v SŘR	c.100 pg/ml v 1% BSA	c.60 ng/ml v SŘR
Streptavidin /HRP	c.200 ng/ml v SŘR	Ředěno dle návodu výrobce v 1% BSA	c.200 ng/ml v SŘR

Tab. č. 1. Tabulka s hodnotami vhodných koncentrací potřebných pro stanovení myších cytokinů TNF- α a IL-10 a kryšího TNF- α u ELISA kitů

U ostatních myších i kryších cytokinů byly vzorky 2 hod inkubovány, poté promyty 3x300 PTB a následně inkubovány s biotinylovanou detekční protilátkou (viz. tab. č. 1.) v množství 100 μ l na jamku. Po promytí 3x 300 μ l PTB byl na destičku napipetován roztok streptavidinu s konjugovanou křenovou peroxidázou v koncentraci (viz. tab. č. 1.) a v množství 100 μ l na jamku. Destička byla ponechána 30 minut ve tmě a poté opět promyta 3x300 μ l PTB. Po přidání 100 μ l substrátového roztoku (5ml TMB + 5ml citrátového pufru + 3 μ l H₂O₂ (viz. 4.1.) byla destička inkubována 5-30 minut v temnu v závislosti na intenzitě zbarvení po reakci enzymu se substrátem. Reakce byla zastavena 100 μ l 1,8N H₂SO₄. Barevný produkt byl změřen na spektrofotometru (Rainbow Thermo Tecan, Schoeller Ins., Německo) při vlnové délce 450 nm. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Ascent (Labsystems, Finsko).

4.7. STANOVENÍ PRODUKCE NO GRIESSOVOU REAKCÍ

Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení nitritů – stabilních oxidačních produktů NO. Po diazotaci sulfanilamidu a kopulaci s N-(naftalen-1-yl)-etylendiaminem dochází ke vzniku purpurového azobarviva, jehož absorbanci jsme schopni změřit pomocí spektrofotometru.

Po 24 hod kultivaci makrofágů bylo odebráno 50 μ l supernatantu do 96-jamkových destiček (NUNC, Německo). Do každé jamky bylo k odebranému supernatantu přidáno 50 μ l Griessova činidla (Sigma, USA). Poté se destička nechala inkubovat 10 minut v temnu při 37°C. Absorbance v jednotlivých jamkách byla změřena spektrofotometrem (Rainbow Thermo Tecan, Schoeller Ins., Německo) pomocí programu Biolise 2.01 při vlnové délce 540 nm. Kalibrační křivka byla získána z roztoků NaNO₂ v rozsahu koncentrací 125-8 μ M/ml. Koncentrace NO u jednotlivých vzorků byla stanovena lineární regresí.

4.8. PROTEINOVÉ MIKROČIPY

Pro semikvantitativní stanovení proteinového spektra u vybraných vzorků byl použit komerční kit RayBioTM Mouse Cytokine Array III (Raybiotech, Inc., USA). Tato metoda je založena na principu sendvičové enzymatické imunoanalýzy. Pomocí jednoho nitrocelulóзовého mikročipu můžeme současně detekovat 62 cytokinů v jednom vzorku. Každý obsahuje zmíněný počet specifických protilátek proti jednotlivým cytokinům, pozitivní a negativní kontroly

K zablokování nescifických vazeb byly označené mikročipy inkubovány v 8-jamkové destičce v 2 ml blokovacího pufru (BP) po dobu 90 minut při pokojové teplotě. Po odsátí BP byl přidán na každý mikročip 1 ml vzorku, který byl ponechán na mikročipu 90 minut. Následovalo promytí na třepačce nejdříve promývacím pufrem č.1 (PP1) 3x à 5 min, poté promývacím pufrem č. 2 (PP2) 2x à 5 min. Dále byl na každý mikročip napipetován 1 ml biotinylovaných protilátek proti cytokinům, který byl po 90 minutách opět promyt PP1 3x à 5 min a PP2 2x à 5 min na třepačce. Nakonec byly mikročipy inkubovány přes noc se strepavidinem konjugovanou peroxidázou v koncentraci 1:1000 ředenu v BP. Po promytí PP1 3x à 5 min a PP2 2x à 5 min byl každý mikročip vložen do 500 μ l směsi detekčních pufrů C a D na 2 minuty. Osušené

mikročipy byly vyfoceny na luminiscenčním detektoru LAS -1000 (Fujifilm, Japonsko) a získaná data vyhodnocena pomocí softwaru AIDA (verze 3.28, Raytest, Germany).

4.9. IZOLACE JADERNÉHO EXTRAKTU

K izolaci jaderného extraktu z makrofágů byl použit komerční kit Nuclear extract kit (Active motif, USA). Všechny roztoky použité při této metodě byly součástí tohoto kitu.

Po 24 hodinové kultivaci makrofágů byl opatrně odebrán supernatant z 24-jamkových destiček (NUNC, Německo). Naadherované buňky byly omyty 1,25 ml ledově vychlazeného PBS/fosfátového inhibičního roztoku (IR). Po odsátí tohoto média bylo znovu přidáno 0,5 ml IR. Poté byly buňky opatrně seškrabány škrabkou a přeneseny do namrazených zkumavek. Suspenze buněk byla zcentrifugována 5 minut při 500 rpm. Vzniklá peleta buněk byla resuspendována v 0,5 ml hypotonického roztoku a poté byla inkubována 15 minut na ledu. Po 15 minutách bylo připipetováno 25 μ l detergentu a suspenze byla zvortexována 10 sekund při nejvyšším nastavení. Dále byla suspenze zcentrifugována 30 sekund při 14000*g. Vzniklá peleta byla rozmíchána v 50 μ l kompletního lyzovacího roztoku (CLB) a zvortexována jako v předchozích kroku.. Poté byla suspenze inkubována na kývačce nastavené na 150 rpm na ledu. Po opětovném zvortexování byla suspenze zcentrifugována na 10 minut při 14000*g. Poté byl supernatant (jaderná frakce) odebrán a přenesen do -80 °C.

4.10. STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN

BCA metoda stanovení koncentrace proteinů (Pierce, USA) využívá jejich schopnosti redukovat dvojmocnou měď na jednomocnou, která pak reaguje s kyselinou bicinchoninovou (BCA) za vzniku barevného komplexu s absorpčním maximem při 562 nm.

Na mikrotitrační destičku byly nanесeny vzorky o objemu 10 μ l, které byly naředeny destilovanou vodou v poměru 1:5 a 1:10, standard (BSA o počáteční koncentraci 2mg/ml) a negativní kontrola. Poté bylo na vzorky a standard napipetováno 200 μ l roztoku BCA (směs od výrobce připraveného roztoku A a B v poměru 50:1) a destička byla ponechána na 30 minut v 37°C. Barevný produkt byl změřen na

spektrofotometru Tibertek Multiscan MCC/340 (Flow Lab. Irvine, Skotsko) při vlnové délce 562 nm.

4.11. STANOVENÍ AKTIVACE DRÁHY NFκB

Stanovení míry aktivace dráhy vedoucí k NFκB pomocí kitu TransAM (Active motif, USA) je založeno na principu sendvičové enzymatické imunoanalýzy, kdy na destičku s navázanými oligonukleotidy se specificky váží podjednotky transkripčního faktoru NFκB p50 a p65, které jsou následně označeny protilátkou a analyzovány.

Na 96-jamkovou destičku s navázanými oligonukleotidy bylo napipetováno 30 μl kompletního navazovacího roztoku (CNR). Poté byly přidány vzorky v množství 5 μg jaderného extraktu ve 20 μl CLB. Jako pozitivní kontrola byl použit jaderný extrakt z buněčné linie Raji a jako negativní kontrola CLB. Použité jamky byly zakryty krycí fólií a inkubovány 1 hodinu na kývačce při pokojové teplotě. Nato byla destička promyta 3x200 μl promývacího pufru. Po promytí 3x200 μl byl na destičku napipetován roztok protilátky proti podjednotce p65 s navázanou křenovou peroxidázou v množství 100 μl na jamku. Po hodinové inkubaci a promytí 4x200 μl byl na destičku napipetován vyvolávací roztok. Tato reakce byla zastavena zastavovacím roztokem. Barevný produkt byl změřen na spektrofotometru (Rainbow Thermo Tecan, Schoeller Ins., Německo) při vlnové délce 450 nm.

4.12. KULTIVACE BAKTERIÍ A PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍCH LYZÁTŮ A JEJICH KOMPONENT

4.12.1 Kultivace bakterie *Bacteroides distasonis*

Bakteriální lyzát z kmene bakterie *Bacteroides distasonis* byl izolován ze střevního obsahu myší kmene BALB/c. Tento kmen bakterií byl následně kvalifikován pomocí genetické analýzy genu 16S rRNA.

Bakteriální kultura byla pěstována na Wilkins-Chalgren anaerobním agaru (Oxoid, Velká Británie) obohaceném defibrilovanou krví. Po 24 hod inkubaci byla část agaru odebrána a přemístěna do mozkosrdcového infúzního média (Oxoid, Velká Británie) na 48 hod při 37°C. Všechny kultivace byly prováděny za anaerobních

podmínek vytvořených pomocí AnaeroGenu (Oxoid, Velká Británie). Poté byla kultura centrifugována (4000 x g, 30 min) a dvakrát promyta sterilní destilovanou vodou.

4.12.2. Kultivace bakterie *Lactobacillus casei* DN114001

Bakteriální kulturu *L. casei* DN114001 jsme získali z Institutu Danone ČR. Po rozmražení byla pěstována na M.R.S. agaru (Oxoid, Velká Británie). Kultivace probíhala aerobně při 37°C po dobu 24 hod.. Následně byla ověřena čistota kultury a vzhled kolonií. Poté byla kultura přenesena do 50 ml sterilní zkumavky, centrifugována (4000 x g, 30 min) a dvakrát promyta sterilní destilovanou vodou.

4.12.3. Kultivace bakterie *Lactobacillus plantarum*

Bakteriální kulturu *Lactobacillus plantarum* nám poskytl Ing. Jan Kopečný DrSc. z ÚŽFG AV ČR.

4.12.4. Kultivace bakterie *Escherichia coli* 083

Po rozmražení byla kultura pěstována na M.R.S. agaru (Oxoid, Velká Británie). Kultivace probíhala aerobně při 37°C po dobu 24 hod.. Následně byla ověřena čistota kultury a vzhled kolonií. Poté byla kultura přenesena do 50 ml sterilní zkumavky, centrifugována (4000 x g, 30 min) a dvakrát promyta sterilní destilovanou vodou.

4.12.5. Příprava bakteriálních lyzátů

K přípravě bakteriálního lyzátu z kultury byl použit French press (přístroj k drcení buněk vysokým tlakem). Část lyzátu byla rozdělena centrifugací (8500 x g, 30 min) na frakci cytoplazmatickou (rozpustná) a membránovou (nerozpustná). Následně byl lyzát a jeho frakce lyofilizován a zředěn ve sterilním PBS na koncentraci 15mg/ml. Sterilita kultury byla potvrzena pomocí aerobní a anaerobní kultivace.

4.12.6. Proteiny tepelného šoku (HSP)

4.12.6.1. HSP60

Přečištěný rekombinantní HSP60 vyizolovaný z *Mycobacterium bovis* BCG a vyšlechtěný v *E. coli* nám poskytl Dr. R. van der Zee z Utrechtské univerzity v Nizozemí.

4.12.6.2. HSP70

Přečištěný rekombinantní HSP70 vyizolovaný z *Mycobacterium avium* paratuberculosis a vyšlechtěný v *E. coli* nám poskytl Dr. R. van der Zee z Utrechtské univerzity v Nizozemí.

4.13. POUŽITÉ PŘÍSTROJE A PROGRAMY

Analytické váhy GR-202 (A&D, Japonsko)

Centrifuga Universal 32R (Hettichlab zentrifugen, Německo)

FACS Sort, FACS Vantage SE (Becton Dickinson, USA)

French press (SLM-AMINCO Spectronic Instruments, USA)

Chemiluminiscenční detektor LAS -1000 (Fujifilm, Japonsko)

Kývačka WS-10 (Edmund Bühler, Německo)

pH metr Jenway 3505 (Baroworld Scientific Ltd., Essex, Anglie)

Promývačka MultiWash II (Tricontinent, USA)

Program AIDA (verze 3.28, Raytest, Německo)

Spektrofotometr Titertek Multiscan MCC/340 ELISA Reader (Helsinki, Finsko)

Spektrofotometr (Rainbow Thermo Tecan, Schoeller Ins., Německo)

Statistické hodnocení – Statgraphics plus 5.1 (StatPoint Inc., Herndon, Virginie)

Termostat CO₂ Incubator (SANYO Electric CO., Japonsko)

Tkáňový box Steril-Antares 72 (Foester Wheeler divison Steril Factory, Itálie)

Váhy ADAM AQT 1500 (Adam Equipment comp., Velká Británie).

5. VÝSLEDKY

5.1. IN VIVO EXPERIMENTY NAŠÍ LABORATOŘE

Naše laboratoř se dlouhodobě zabývá účastí mikroflóry při vzniku zánětlivých a autoimunitních onemocnění (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ *et al.* 1998). Testováním lyzátů připravených z celého spektra různých typů bakterií pocházejících ze střevní mikroflóry nebo bakterií probiotických byly určeny směsi bakterií, jejichž lyzáty vykazovaly protektivní efekt při léčbě DSS kolitidy (VERDU *et al.* 2000) Jednou z účinných bakterií se ukázala být gram-negativní bakterie *Bacteroides distasonis* (SOKOL *et al.*, nepublikovaná data). Další bakterie, s již klinicky potvrzenými protektivními účinky, kterou se zabýváme v naší laboratoři je anaerobní gram-pozitivní bakterie *Lactobacillus casei* DN114001. A v neposlední řadě se zabýváme testováním mykobakteriálních HSP60 a HSP70 . U všech výše jmenovaných bakteriálních komponent jsme prokázali jejich protektivní účinek *in vivo* při léčbě experimentální kolitidy indukované DSS, a to při jejich orálním podávání.

Níže uvedené výsledky (viz. 5.1.) jsou signifikantní pro *B. distasonis* (KVERKA *et al.*, osobní sdělení, autor souhlasí s uveřejněním následujících dat).

Myším kmene BALB/c jsme nejprve podávali lyzáty z bakterie *B. distasonis* v týdenních intervalech po dobu čtyř týdnů. Jedna dávka obsahovala 1,5 mg bakteriálního lyzátu. Následně jsme u nich vyvolali akutní experimentální kolitidu podáváním DSS. Poté jsme zhodnotili závažnost kolitidy.

Při hodnocení stupně experimentální kolitidy používáme následující kritéria: 1. klinický stav – v průběhu DSS kolitidy dochází k poklesu hmotnosti, k průjmům a objevuje se okultní krvácení z rekta 2. délku tlustého střeva - v průběhu DSS kolitidy dochází ke zkrácení délky tlustého střeva. Zkrácení je přímo úměrné tíži kolitidy 3. Histologické hodnocení – v průběhu DSS kolitidy dochází k infiltraci střevní stěny leukocyty, vznikají vředy a exudát v lumen. V těžkých případech vznikají i metaplazie epitelu.

Preventivní perorální podávání membránové frakce (mBd) a DNA izolované z *B. distasonis* vede ke snížení stupně experimentální kolitidy u myší kmene BALB/c (viz.tab. č. 2.).

Skupina	Exitus n/N	Délka kolon (cm)	Klinický stav	Histologické hodnocení
PBS	0/10	5,97±0,46	2,70±0,87	2,05±0,58
mBd	0/10	6,77±0,40*	1,50±0,92*	1,46±0,53*
<i>B. distasonis</i>	1/7	7,02±0,45*	3,33±0,42	1,92±0,48
DNA	0/10	7,32±0,44*	1,30±0,66*	1,11±0,51*
LPS	1/10	6,70±0,36*	1,77±1,25	1,68±0,43
mBd /DSS	0/10	8,97±0,40*	0,00±0,00*	0,15±0,13*

^aHodnoty jsou průměry±SD

*Statisticky významný rozdíl (P<0.05) od kontrolní skupiny vypočítaný pomocí Studentova T - testu

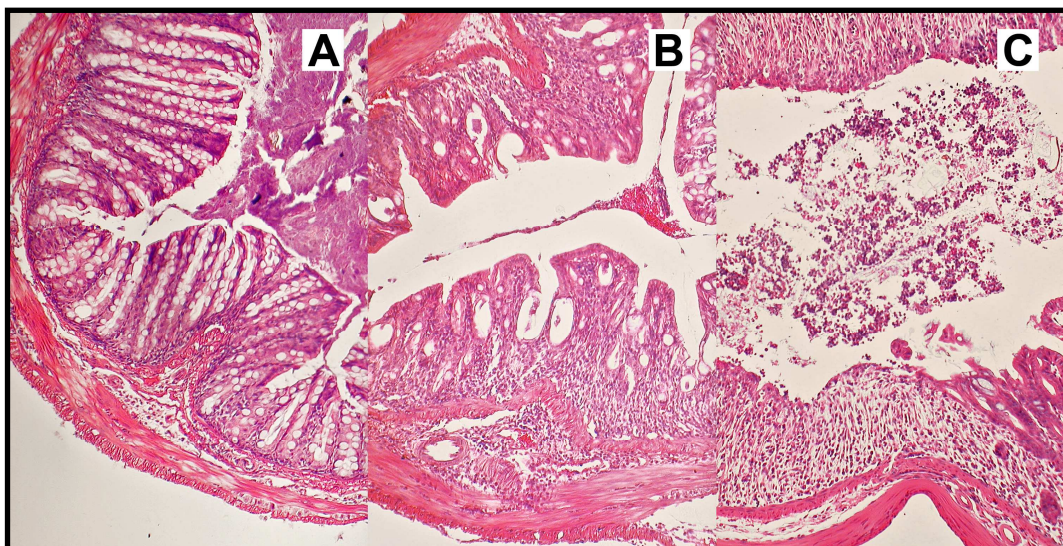
Tab. č. 2. Hodnocení akutní DSS - vyvolané kolitidy u myši BALB/c léčených perorálně

V porovnání s kontrolní skupinou dochází u myši léčených mBd a DNA Bd ke zlepšení ve všech sledovaných parametrech.

Vliv na délku střeva a změny v histologii jsou znázorněny na obr. č. 2 a obr. č. 3. Perorální podání celého lyzátu nebo LPS izolovaného z *B. distasonis* má vliv na zkrácení délky kolon, ale ostatní parametry hodnocení kolitidy zůstávají nezměněny v porovnání s kontrolní skupinou, která dostávala pouze PBS.



Obr. č. 2. Změny v délce kolon. A) kontrolní skupina- PBS B) skupina léčená mBd C) kolon zdravé myši BALB/c



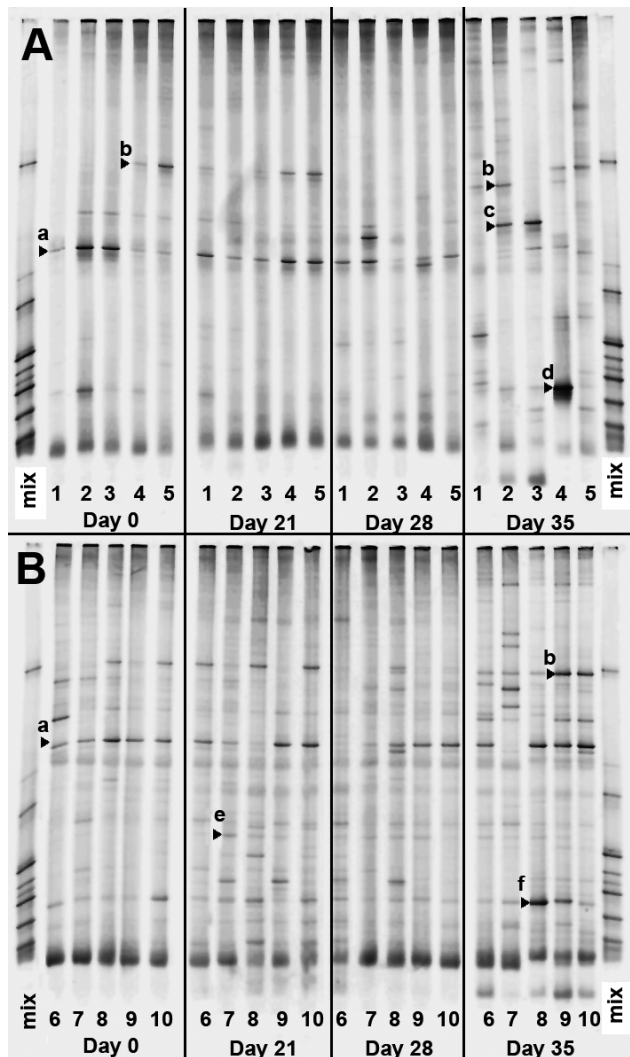
Obr. č. 3. Histologické hodnocení - stupeň poškození sliznice. Fotografie parafinových řezů barvené hematoxilin - eozinem A) zdravé kolon B) kolon po podávání mBd - mírná kolitida C) kolon po podávání PBS - těžký stupeň kolitidy

V současné době se zabýváme analýzou možných mechanismů působení bakteriálních lyzátů. Detaily těchto pokusů jsou uvedeny dále v textu.

5.1.1. Změny střevní mikroflóry po podání frakce bakteriálního lyzátu izolovaného z *B. distasonis*

V našich předešlých experimentech se ukázalo, že podávání 3% DSS vyvolává akutní kolitidu u BALB/c myši a zároveň mění zastoupení bakteriálních populací ve střevním obsahu. Toto mikrobiologické vyšetření střevní mikroflóry hodnotí Ing. Jan Kopečný, DrSc. ÚŽFG, AV ČR v.v.i.

Složení mikroflóry u kontrolní skupiny se během pokusu měnilo jen mírně. Velké zastoupení tu mají kmeny *Lactobacillus sp.* a bakterie *Bacteroides acidofaciens*. U zvířat s kolitidou veškerá stabilita mizí a složení mikroflóry neodpovídá druhům přítomným u zdravých zvířat. Množství lactobacilů výrazně klesá a objevují se nové bakteriální druhy. V kontrastu s tímto pozorováním u skupiny léčené mBd dochází pouze k minoritním změnám ve složení mikroflóry a populace lactobacilů zůstává zachována (viz. obr. č. 4.)



Obr. č. 4. DGGE analýza střevní mikroflóry ze vzorku stolice. Čísla pod jednotlivými DGGE proužky označují číslo myši (myš č. 1-5 kontrolní skupina, myš číslo 6-10 mBd léčené myši). a) *L. johnsonii* a *L. gaseri* (b) *B. acidofaciens* (c) nekultivovatelné bakterie (d) *L. murinus* (e) *H. muridatum* (f) *Lactobacillus* sp. pomocí sekvenční analýzy 16rRNA.

5.1.2. Protilátková odpověď IgA, IgG a IgM po podání lyzátu mBd

U myši léčených lyzátem mB dochází po indukci DSS kolitidy ke zvýšení titru cirkulujících specifických protilátek v séru, což naznačuje důležitost zapojení systémové specifické imunity (viz. tab. č. 3.)

Isotyp	PBS	mBd	p
IgA	0,05±0,02	0,19±0,07	0,000
IgG	0,02±0,02	0,46±0,17	0,000
IgM	0,15±0,05	0,56±0,19	0,000

Tab. č. 3. Hladina specifických sérových protilátek třídy IgA, IgG a IgM po peronální aplikaci komponent mBd. Skupina PBS – neléčená DSS indukovaná kolitida. Skupina mBd byla léčena membránovou frakcí *Bacteroides distasonis*.

5.1.3. Změny v produkci cytokinů v jednotlivých částech střeva u skupiny léčené mBd

Abychom odhalili změny v reaktivitě slizničního imunitního systému střeva, odebrali jsme pět různých částí (Peyerské pláty, jejunum, ileum, cekum a kolon) od myši v kontrolní a léčené skupině. Tyto vzorky jsme kultivovali 48 hodin při 37°C a odebrali supernatant, v němž jsme změřili koncentraci pěti cytokinů (IL-10, TGF-β, IL-6, TNF-α, IFN-γ) (viz. tab. č. 4.)

Skupina	Úsek střeva	Produkce cytokinů (pg/mg tkáňe)				
		IL-10	TNF-α	IL-6	TGF-β	IFN-γ
PBS	pp	3,96±4,28	2,42±1,48	60,33±41,76	10,09±6,28	2,19±1,22
	Je	0,30±0,73	0,24±0,41	2,06±1,61	1,54±1,65	0,02±0,04
	Ile	3,20±2,66	1,02±0,90	18,89±27,24	1,92±3,23	0,65±0,59
	Ce	10,17±5,48	2,18±1,60	12,88±7,07	6,23±6,04	4,67±1,90
	Co	8,62±7,90	2,82±1,58	52,18±32,40	6,30±3,75	3,20±2,26
mBd	pp	2,45±4,51	0,77±0,96	7,86±6,42*	3,86±2,49*	0,61±1,03*
	Je	1,16±2,07	0,41±0,50	1,32±1,46	0,55±0,74	0,53±0,87
	Ile	1,46±1,72	0,95±1,11	3,55±2,70	2,41±2,47	1,28±2,41
	Ce	1,56±2,63**	0,48±0,67*	11,51±17,84	0,62±0,88*	1,67±2,61**
	Co	0,91±1,55*	0,55±0,88*	4,65±5,92**	0,22±0,33**	0,60±0,93*

Tab. č. 4. Produkce cytokinů TNF-α, IL-10, IL-6, TGF-β, IFN-γ v různých částech střeva. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD. (pp- Peyerské pláty, je-jejunum, il-ileum, ce-cekum, co-kolon)

5.2. IN VITRO EXPERIMENTY

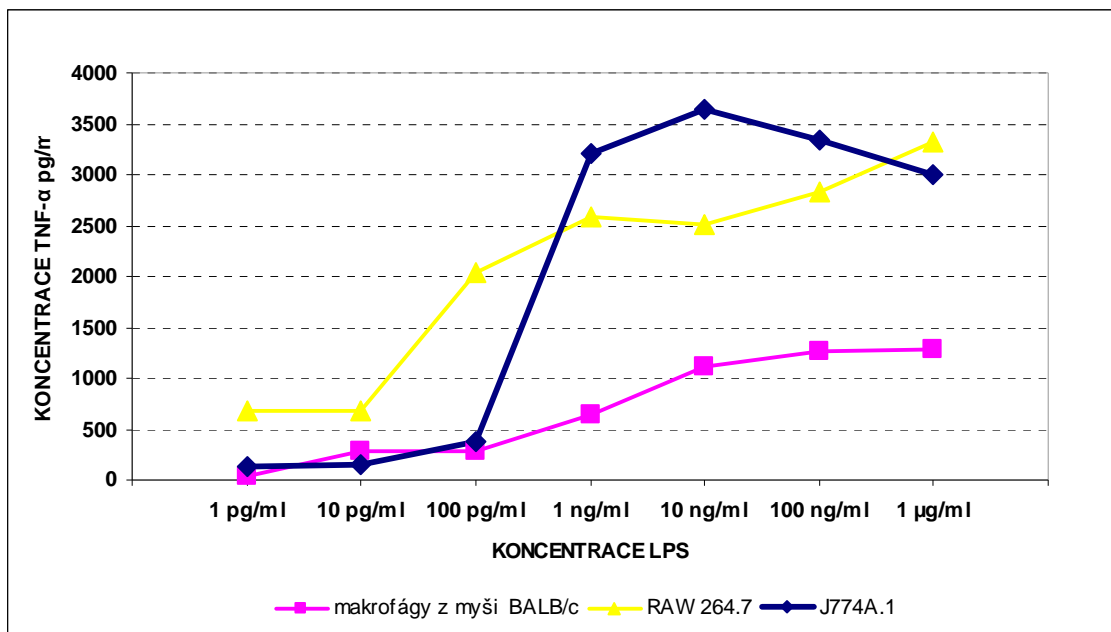
5.2.1. In vitro experimenty - makrofágy

5.2.1.1. Stanovení optimální koncentrace LPS pro aktivaci makrofágů

V návaznosti na naše *in vivo* experimenty jsme studovali efekt bakteriálních komponent na LPS aktivovanou produkci TNF-α, NO, IL-10 a dalších cytokinů u makrofágových linií RAW 264.7 a J774A.1 a buněk izolovaných z peritonea myši BALB/c.

Nejprve bylo nutné experimentálně stanovit optimální koncentrace LPS (viz. 4.1.), nutných pro aktivaci makrofágů izolovaných z peritonea myši BALB/c a pro makrofágy buněčných linií. Makrofágy z peritonea (viz. 4.2.1.) a makrofágy buněčných linií (viz. 4.3.1.) byly kultivovány v 96-jamkových destičkách v koncentraci 1×10^6 buněk/ml v 200 μ l kultivačního média (viz. 4.1.) a 1 hodinu ponechány přilnout k povrchu jamek po dobu 24 hodin za přítomnosti různých koncentrací LPS v rozmezí 1 pg/ml - 1 μ g/ml (řaděno desítkovou řadou). Po 24 hodinách bylo odebráno 100 μ l supernatantu z každé jamky a metodou ELISA byla stanovena koncentrace TNF- α (viz. 4.6.) Vzorokly byly vždy analyzovány v dupletech.

Provedli jsme dva nezávislé pokusy se stejným protokolem a srovnatelnými výsledky. Pouze výsledky z jednoho experimentu jsou zde prezentovány (viz. obr. č. 4.). Jako optimální koncentraci pro aktivaci peritoneálních makrofágů a buněčné linie RAW 264.7 jsme zvolili koncentraci LPS 1 ng/ml. Pro aktivaci buněčné linie J774A.1 byla vybrána jako nejvhodnější koncentrace LPS 10 ng/ml. Nižší koncentrace už nevedou k silné stimulaci makrofágů. Makrofágy byly stimulovány těmito koncentracemi LPS ve všech následujících kultivacích.

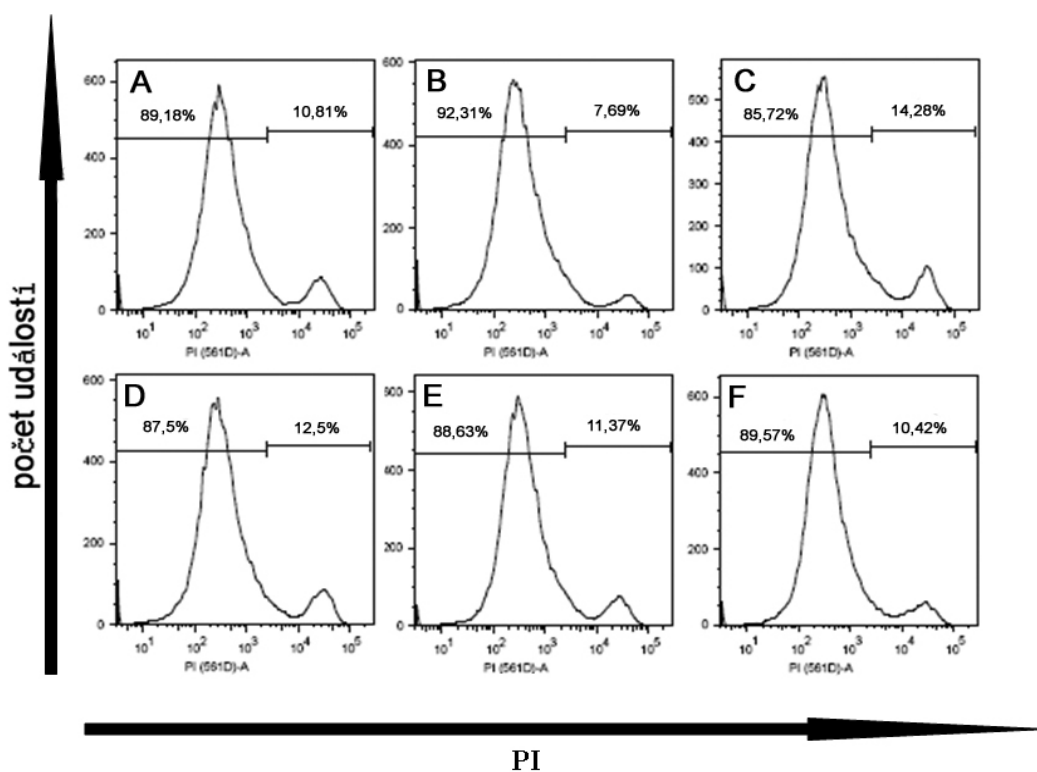


Obr. č. 5. Produkce TNF- α peritoneálními buňkami myši BALB/c a makrofágy buněčných linií RAW 264.7 a J774A.1 po 24 hodinové kultivaci za přítomnosti různých koncentrací LPS

5.2.1.2. Stanovení životnosti buněčných linií pomocí průtokové cytofluorometrie

Jednou z nezbytných vlastností probiotik je jejich zdravotní nezávadnost. K ověření, zda námi používané bakteriální komponenty (viz. 4.12.5.) neovlivňují při kultivaci životnost makrofágových linií, jsme zvolili průtokovou cytofluorometrii. S buněčnými liniemi RAW 264.7 a J774A.1 jsme pracovali, jako v části 5.2.1.3.

Výsledky jasně ukazují, že námi používané lyzáty nesnižují životnost makrofágů. Statistickým zhodnocením vypočítaným pomocí párového Studentova t-testu jsme zjistili, že samotný antigen, u buněčné linie RAW264.7 životnost makrofágů nemění ať už v jakékoli koncentraci (Studentův t-test, $p=0,979$) (viz. obr. č. 6.)



Obr. č. 6. Znázornění histogramové statistiky životnosti u buněčné linie RAW 264.7 pomocí programu pro vyhodnocování dat z průtokové cytometrie FlowJo v4.5. Histogram A) znázorňuje nestimulované makrofágy, B) Bd, C) mBd, D) LAC, E) mLAC a F) HSP 70

Zatímco u buněčné linie J774A.1 bakteriální komponenty a jejich lyzáty životnost makrofágů mírně zvyšují (Studentův t-test, $p<0,001$, $3,4\pm 2,2\%$; průměr \pm SD). Větší mortalitu pozorujeme u makrofágů aktivovaných LPS, který je známý svou proapoptotickou aktivitou, a to přibližně o 10% při porovnání s makrofágy nestimulovanými. Bakteriální komponenty při současném podání LPS u buněčné linie

RAW 264.7 životnost makrofágů mírně zvyšují (Studentův t-test, $p=0,042$, $1\pm 2,2\%$; průměr \pm SD) ve srovnání s makrofágy stimulovaných pouze LPS. Buněčná linie J774A.1 stimulovaná LPS a bakteriálními komponentami vykazuje statisticky signifikantně vyšší úmrtnost, než je životnost makrofágů stimulovaných pouze LPS (Studentův t-test, $p<0,001$, $7,2\pm 4,6\%$; průměr \pm SD).

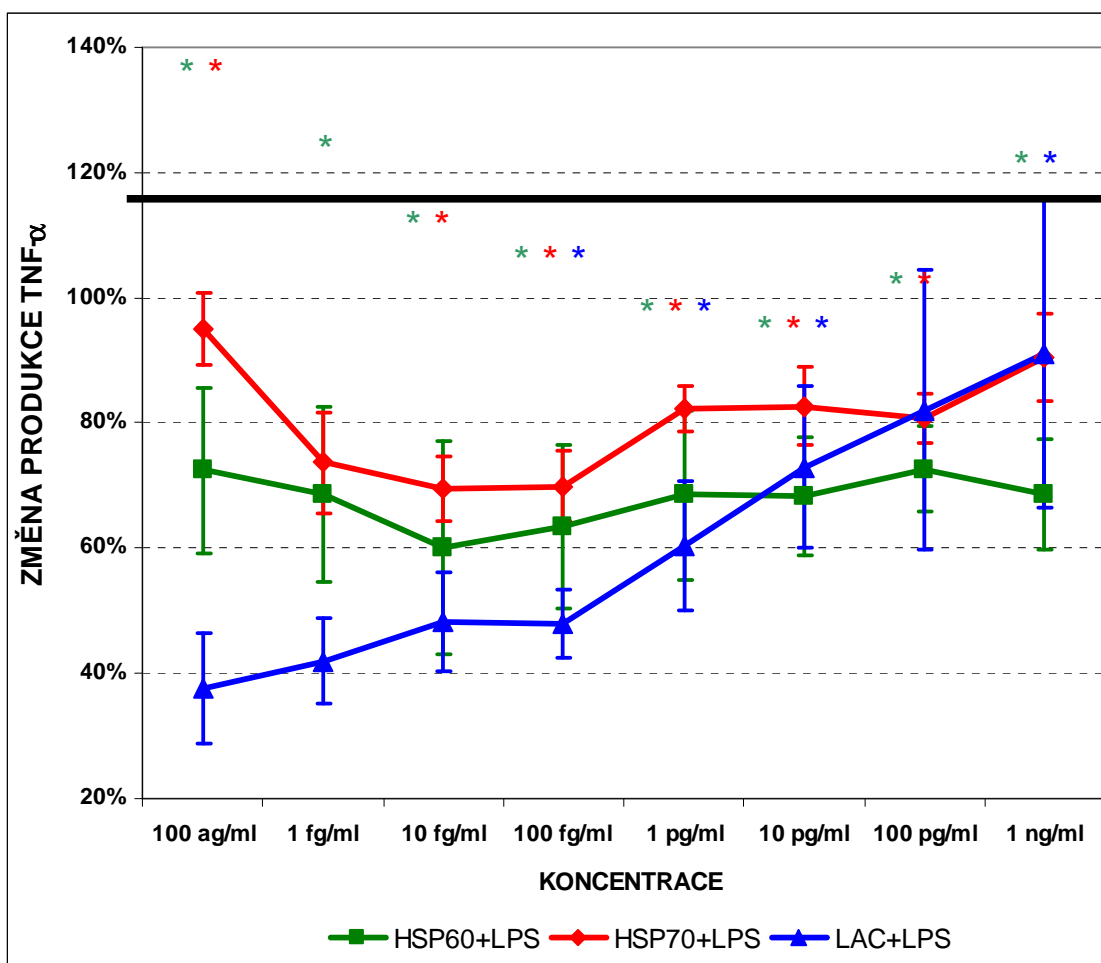
5.2.1.3. Změna produkce TNF- α , IL-10, NO LPS aktivovanými buňkami RAW 264.7 po stimulaci bakteriálními lyzáty a jejich komponentami

Oproti buňkám z peritonea využívaných v dalších pokusech, kde makrofágy tvoří jen určitou část celkové populace, buněčné linie představují homogenní a jasně definovaný typ buněk. Tím se redukuje možný vliv mezipopulačních buněčných interakcí, které jsou jinak pro imunitní systém charakteristické.

Buňky linie RAW 264.7 (viz. 4.3.1.) byly napipetovány do 96 jamkových destiček o hustotě 1×10^6 buněk/ml v kultivačním mediu (viz. 4.1.) v celkového objemu 100 μ l a 1 hodiny nechány přilnout k povrchu jamek. Poté byly kultivovány po dobu 24 hodin za přítomnosti bakteriálních lyzátů či jejich komponent v různých koncentracích (1 ng/ml - 100 μ g/ml, ředěno desítkovou řadou) a \pm 1 ng/ml LPS celkový objem kultivačního media byl doplněn do 200 μ l. Následně byla stanovena koncentrace TNF- α supernatantu kultivovaných buněk (viz. 4.6.).

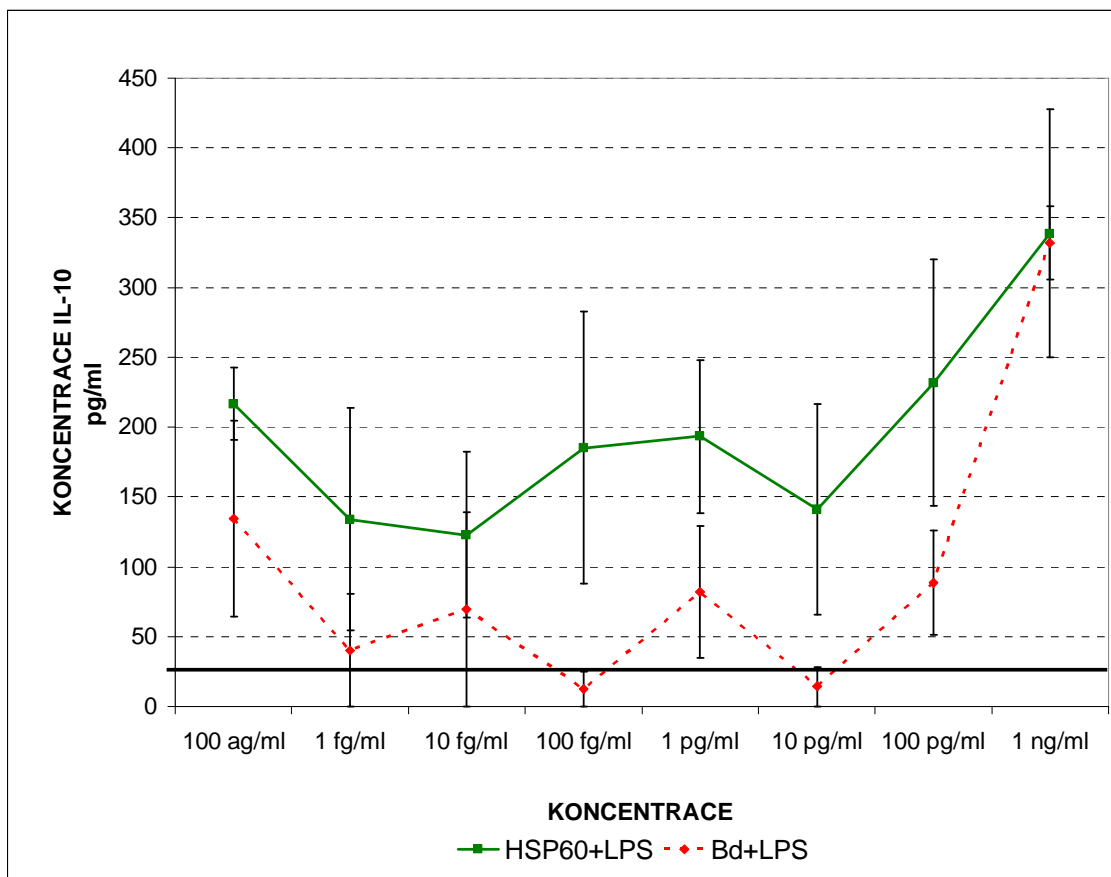
Buněčné lyzáty a bakteriální komponenty Bd, mBd, LAC, mLAC, HSP60 a HSP70 snižují v určitých koncentracích LPS aktivovanou produkci TNF- α (viz. obr. č. 7. a obr. č. 9). Největší schopnost snižovat TNF- α ve všech koncentracích má HSP60 (viz. obr. č. 7. a obr. č. 9.).

Dále je také velice účinný LAC a mLAC, a to především v nižších koncentracích (viz. obr. č. 7.). Na obr. č. 9. vidíme shrnutí všech antigenů, a to včetně kontrol *L. plantarum* a *E.coli* 083, které LPS stimulovanou produkci TNF- α nesnižují.



Obr. č. 7. Změna produkce TNF- α lipopolysacharidem aktivovaných makrofágů buněčné linie RAW264.7 po 24 hod kultivaci s různými koncentracemi HSP60, HSP70 a LAC. Produkce TNF- α makrofágy aktivovanými pouze LPS=100%. Hodnoty jsou vyneseny jako průměr \pm SEM a hvězdičky poukazují na statistickou významnost ($p < 0,05$). Zelená barva označuje antigen HSP60, červená HSP70 a modrá LAC

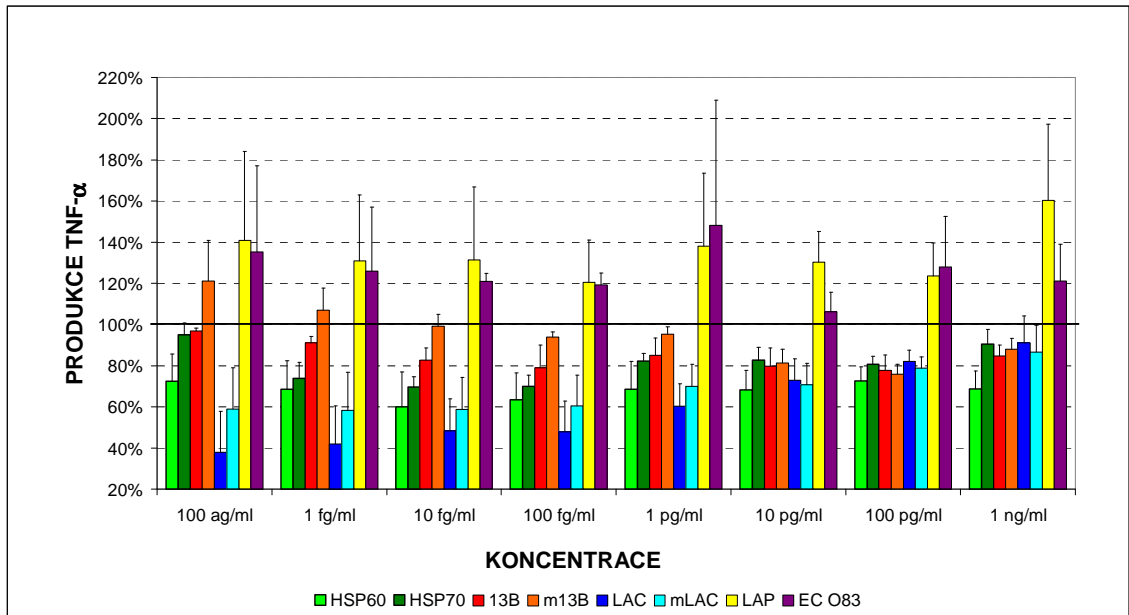
Nestimulované makrofágy linie RAW 264.7 neprodukují IL-10. Po přidání samotného LPS je jejich produkce IL-10 také zanedbatelná, proto jsme se rozhodli nevyjadřovat jejich produkci procentuálním vyjádřením. Dále jsme nezaznamenali žádnou produkci IL-10 u buněk stimulovaných LAC, mLAC, mBd. Naopak u buněk aktivovaných lipopolysacharidem a mykobakteriálním HSP60 docházelo k vysoké produkci IL-10 ve všech koncentracích antigenu a to v rozmezí 130-340 pg/ml (viz. obr. č. 8.). Zdá se, že se zvyšující se koncentrací antigenu, množství produkovaného IL-10 stále stoupá. Také samotný HSP60 stimuluje makrofágy k produkci IL-10 (data neukázána), a to ve stejné míře jako u buněk stimulovaných LPS, což jsme nepozorovali u žádných dalších bakteriálních komponent. Také u bakteriálního lyzátu Bd jsme naměřili produkci IL-10, a to v závislosti na koncentraci v rozmezí od 20 – 335 pg/ml (viz. obr. č. 8.).



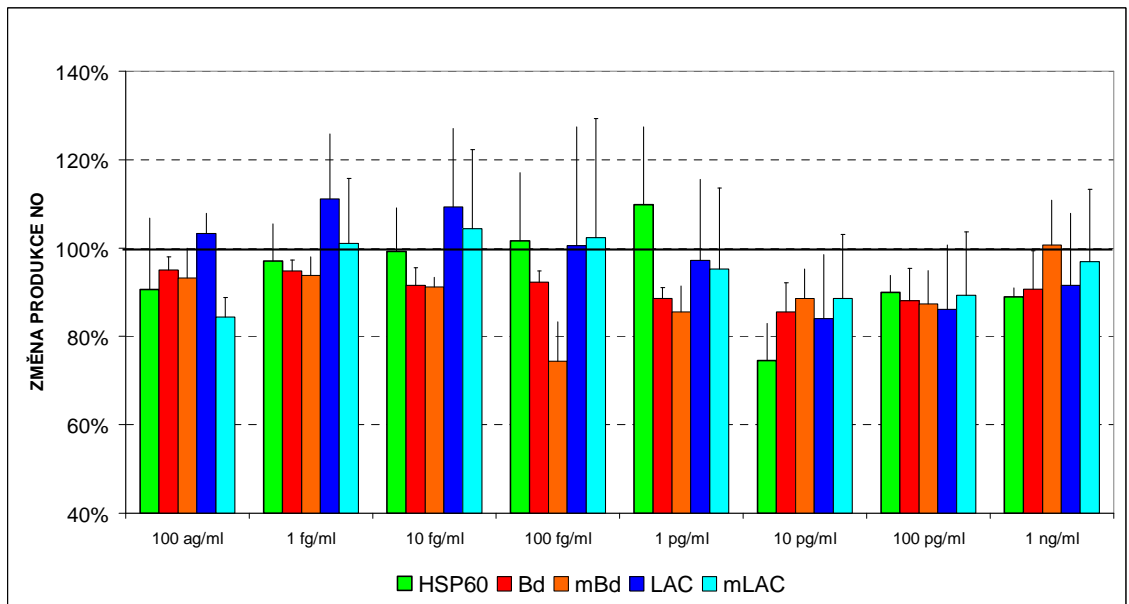
Obr. č. 8. Produkce IL-10 lipopolysacharidem aktivovaných makrofágů buněčné linie RAW264.7 po 24 hod kultivaci s různými koncentracemi HSP60 a Bd. Zelená barva označuje antigen HSP60 a červená mBd

Produkce NO makrofágy představuje jednak jejich hlavní mikrobicidní mechanismus, zároveň je však možné ji využít také jako poměrně jasně definovaný aktivační marker makrofágů. Již dříve byl popsán efekt LPS na produkci NO makrofágy. Koncentrace nitritů, vzniklá místním působením NO uvolněného z makrofágů byla změřena Griessovou metodou (viz. 4.7.) Z výsledků vyplývá, že po 24 hodinách se koncentrace NO u makrofágů stimulovaných pouze LPS a makrofágů stimulovaných bakteriálními komponentami a LPS od sebe výrazně nelišila (viz. obr. č. 10.) Koncentrace NO LPS aktivovanými makrofágy se pohybovala okolo 25 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (data neukázána). Nestimulované makrofágy a makrofágy stimulované pouze bakteriálními komponentami neprodukuje detekovatelné množství NO.

Výsledky z kultivací makrofágové linie J774A.1 byly srovnatelné s linií RAW 264.7. Z důvodu přílišného narůstání objemu diplomové práce zde nejsou uvedeny. Některé význačné rozdíly jsou diskutovány v kapitole 6.



Obr. č. 9. Změna produkce TNF- α lipopolysacharidem aktivovanými makrofágy buněčné linie RAW264.7 po 24 hod kultivaci s různými koncentracemi HSP60, HSP70, Bd, mBd, LAC, mLAC. Produkce TNF- α makrofágy aktivovanými pouze LPS=100% (označeno černou linkou). Světle zelená barva označuje antigen HSP60, tmavě zelená HSP70, červená Bd, oranžová mBd, tmavě modrá LAC, světle modrá mLAC, žlutá LAP, vínová EC 083.



Obr. č. 10. Změna produkce NO lipopolysacharidem aktivovanými makrofágy buněčné linie RAW 264.7 po 24 hod kultivaci s různými koncentracemi HSP60, HSP70, Bd, mBd, LAC, mLAC. Produkce NO makrofágy aktivovanými pouze LPS=100%. (označeno černou linkou) Světle zelená barva označuje antigen HSP60, červená Bd, oranžová mBd, tmavě modrá LAC, světle modrá mLAC.

5.2.1.4. Semikvantitativní analýza spektra cytokinů produkovaných makrofágy po aktivaci LPS a bakteriálními složkami pomocí proteinového mikročipu

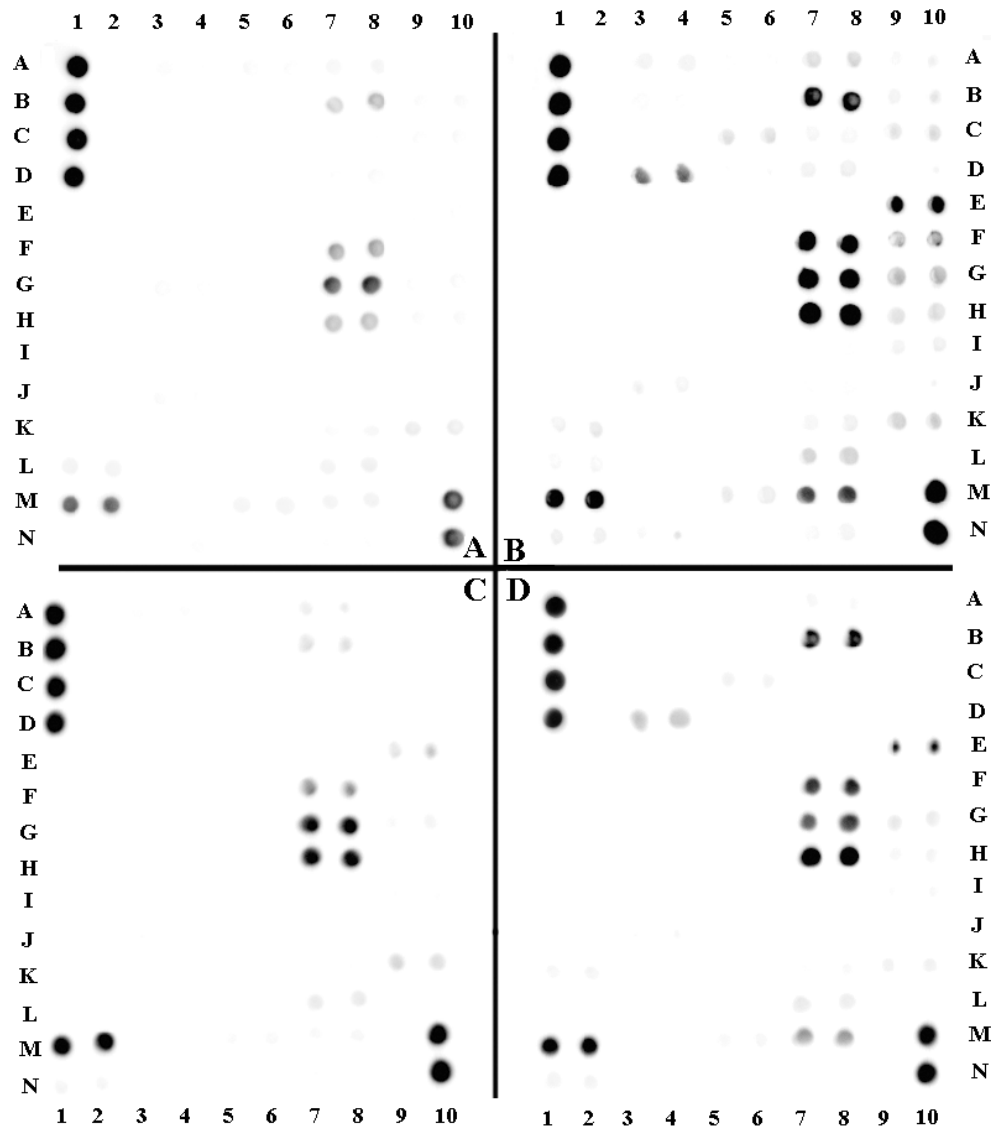
Po zjištění, že bakteriální komponenty jsou schopny snižovat produkci TNF- α u LPS stimulovaných makrofágů, zajímali jsme se i další cytokiny produkované buněčnou linií RAW 264.7 v našem kultivačním schématu.

Koncentrace aplikovaného bakteriálního antigenu použitá na mikročipy byla stanovena podle předchozích výsledků získaných z TNF- α ELISA testů. Vždy jsme použili tu koncentraci daného antigenu u kterého jsme naměřili nejvyšší inhibici produkce TNF- α u LPS aktivovaných makrofágů (viz. obr. č. 8.)

K detekci cytokinového spektra jsme použili komerčně dostupné proteinové mikročipy. Tyto proteinové mikročipy jsou schopny detekovat současně 62 různých cytokinů a chemokinů (viz. obr. č. 11.). Jejich rozložení je znázorněno v tab.č.5.

Ne všechny cytokiny obsažené na mikročipu (viz. obr. č.11.) byly makrofágovou linií RAW 264.7 produkovány (viz. obr. 11 a tab. č. 5.). Z velkého množství cytokinů jsme vybrali několik zástupců, u kterých se produkce výrazně lišila v našem schématu kultivace (makrofágy aktivované LPS *versus* makrofágy aktivované LPS a bakteriálními komponentami) (viz. tab. č. 6.). Pozorovali jsme téměř u všech bakteriálních komponent sníženou produkci TNF- α , což podporuje naše kvantitativní výsledky zjištěné pomocí ELISA testů. Dále jsme pozorovali výrazné rozdíly v produkci cytokinů a chemokinů IL-6, MCP-1, G-CSF, MIP-1 α , MIP-1 γ , MIP-2, RANTES, sTNFR1, CXCL16 podrobnější informace viz. tab.č. 6.

Pro vysokou finanční náročnost metody nebyl prozatím tento pokus opakován.



Obr. č. 11. Analýza obrazu proteinových mikročipů. Vyhodnoceno programem Aida. Proteinový mikročip inkubovaný s A) neaktivovanými makrofágy, B) makrofágy aktivovanými LPS, C) makrofágy stimulovanými HSP70 a D) makrofágy aktivovanými LPS a HSP70

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	POS	NEG	Eotaxin-2	Eotaxin-2	IL-4	IL-4	Lymphotactin	Lymphotactin	SDF-1 α	SDF-1 α
B	POS	NEG	Fas ligand	Fas ligand	IL-5	IL-5	MCP-1	MCP-1	TARC	TARC
C	POS	NEG	Fractalkine	Fractalkine	IL-6	IL-6	MPC-5	MPC-5	TCA-3	TCA-3
D	POS	NEG	G-CSF	G-CSF	IL-9	IL-9	M-CSF	M-CSF	TECK	TECK
E	Blank	Blank	GM-CSF	GM-CSF	IL-10	IL-10	MIG	MIG	TIMP-1	TIMP-1
F	Axl	Axl	INF-g	INF-g	IL-12 p40/p70	IL-12 p40/p70	MIP-1 α	MIP-1 α	TNF- α	TNF- α
G	BLC	BLC	IGFBP-3	IGFBP-3	IL-12p70	IL-12p70	MIP-1 γ	MIP-1 γ	sTNF RI	sTNF RI
H	CD30 L	CD30 L	IGFBP-5	IGFBP-5	IL-13	IL-13	MIP-2	MIP-2	sTNF RII	sTNF RII
I	CD30 T	CD30 T	IGFBP-6	IGFBP-6	IL-17	IL-17	MIP-3 β	MIP-3 β	TPO	TPO
J	CD40	CD40	IL-1 α	IL-1 α	KC	KC	MIP-3 α	MIP-3 α	VCAM-1	VCAM-1
K	CRG-2	CRG-2	IL-1 β	IL-1 β	Leptin R	Leptin R	PF-4	PF-4	VEGF	VEGF
L	CTACK	CTACK	IL-2	IL-2	Leptin	Leptin	P-Selectin	P-Selectin	Blank	Blank
M	CXCL 16	CXCL 16	IL-3	IL-3	LIX	LIX	RANTES	RANTES	Blank	POS
N	Eotaxin	Eotaxin	IL-3 Rb	IL-3 Rb	L-Selectin	L-Selectin	SCF	SCF	Blank	POS

Tab. č. 5. Schéma rozložení jednotlivých cytokinů, pozitivních a negativních kontrol na proteinovém mikročipu

	HSP60	HSP70	Bd	mBd	LAC	mLAC
TNF- α	↓↓	↓↓	ns	ns	↑	↓
IL-6	↑↑	↑	↑	↑	↑	↓
MCP-1	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
G-CSF	↑↑	↑	ns	ns	↑	↓
MIP-1 α	↓	↓	↑	↑	↑↑	↓↓
MIP-1 γ	↓	↓↓	↑	↓	↑↑	↓↓
MIP-2	↓	↓	↓	↓	↓↓	↓↓
RANTES	↑↑	↑	↓	↓	↑	↓
sTNFRI	↑↑	Ns	ns	ns	↑	↓
CXCL16	↑↑	↑↑	ns	↓	↑	↓

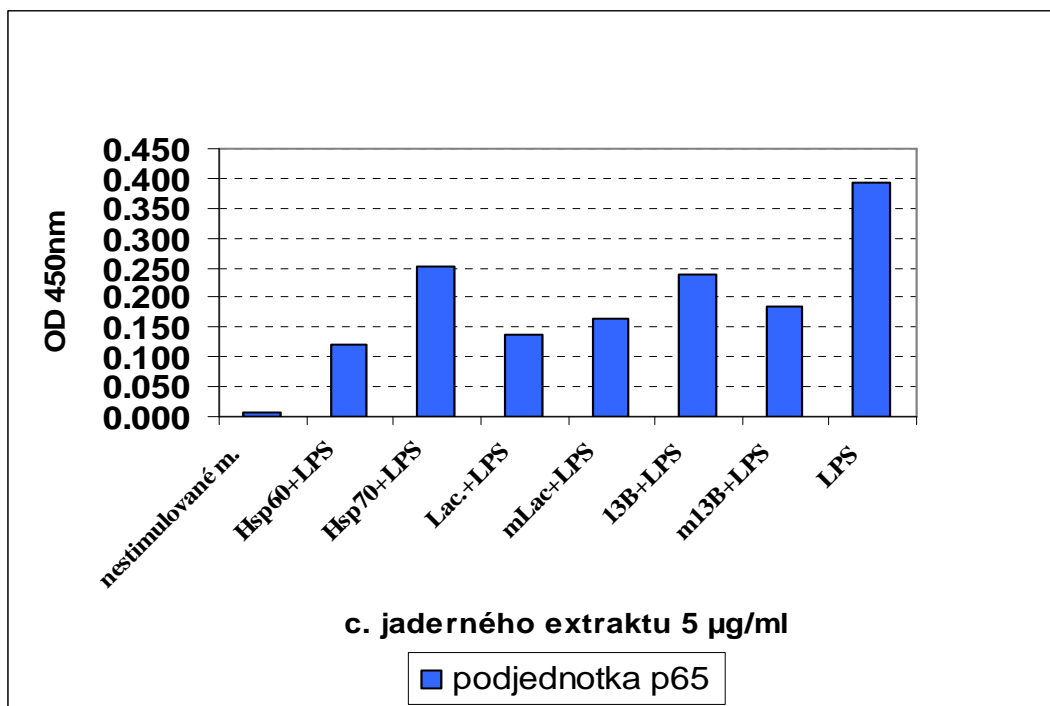
Tab. č. 6. Tabulka vybraných cytokinů detekovaných na proteinových mikročipech. U výše uvedených cytokinů jsme našli velký rozdíl v jejich produkci při srovnání makrofágů aktivovaných LPS oproti makrofágům aktivovaných LPS a bakteriálními komponentami HSP60, HSP70, Bd, mBd, LAC nebo mLAC. Vysvětlivky: ↑↑ - velmi zvýšená produkce cytokinu oproti buňkám aktivovaným pouze LPS, ↑- zvýšená produkce cytokinu oproti buňkám aktivovaným pouze LPS, ns – nevýznamný rozdíl, ↓- snížená produkce cytokinu oproti buňkám aktivovaným pouze LPS, ↓↓- velmi snížená produkce cytokinu oproti buňkám aktivovaným pouze LPS

5.2.1.5. Stanovení koncentrace podjednotky p65 v signální dráze NF κ B u makrofágů linie RAW 264.7 po stimulaci LPS a bakteriálními komponentami

V návaznosti na změnu produkce cytokinů u makrofágové linie RAW 264.7 se snažíme objasnit mechanismus, kterým dochází k inhibici aktivovaných makrofágů na intracelulární úrovni.

Abychom stanovili míru aktivace signální dráhy vedoucí k NF κ B u makrofágů linie RAW 264.7 po stimulaci bakteriálními komponentami a LPS, změřili jsme vazebnou NF κ B/DNA aktivitu podjednotky p65 v jaderných extraktech pomocí kitu TransAM NF κ B Family. Množství proteinů v jaderném extraktu bylo změřeno a vyhodnoceno pomocí komerčního BCA kitu (viz. 4.10.) (data neukázána).

Kultivace LPS aktivovaných makrofágů s bakteriálními komponentami vedla ke snížení vazebné aktivity NF κ B podjednotky p65 ve srovnání s makrofágy aktivovanými pouze LPS (viz. obr.č. 12.).



Obr. č. 12. Stanovení vazebné aktivity podjednotky p65 v signální dráze NFκB. Obrázek znázorňuje míru vazebné aktivity podjednotky p65 po aktivaci buněk LPS a bakteriálními antigeny

Nejnižší vazebnou aktivitu podjednotky p65 jsme naměřili po kultivaci LPS aktivovaných makrofágů s HSP60. Naopak nejvyšší vazebnou aktivitu podjednotky p65 vykazovaly makrofágy stimulované pouze LPS. U nestimulovaných makrofágů je detekce podjednotky p65 téměř nulová.

Z výsledků vyplývá, že kultivace aktivovaných makrofágů se všemi testovanými bakteriálními složkami měla inhibiční efekt, a naznačuje, že testované bakteriální složky působí protizánětlivě tak, že inhibují signalizační dráhu NFκB.

Tento výsledek je závěrem jednoho pokusu, který však souvisí s prokázanou sníženou produkcí cytokinu TNF-α u této linie metodou ELISA a tudíž má vypovídající hodnotu.

5.2.1.6. Stanovení produkce TNF- α a IL-10 peritoneálními buňkami

BALB/c myši po in vitro kultivaci s bakteriálními komponentami a LPS

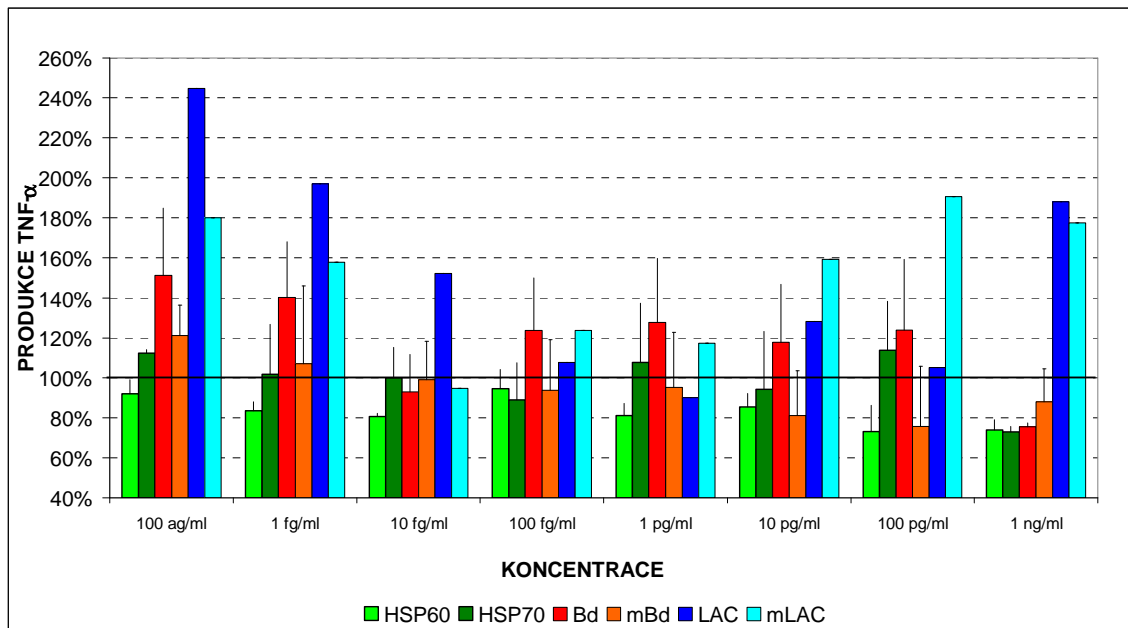
Tato část mé práce si klade za cíl ověřit zda inhibiční vliv jednotlivých buněčných lyzátů a bakteriálních komponent 13B, m13B, LAC, mLAC, HSP60 a HSP70 na produkci TNF- α bude prokazatelný také u LPS stimulovaných makrofágů izolovaných z peritonea.

Myším kmene BALB/c byly odebrány peritoneální buňky (viz. 4.2.1.) a inkubovány v 96-jamkových destičkách v koncentraci 2×10^5 buněk na jamku za přítomnosti různých koncentrací bakteriálních lyzátů a jejich komponent (1ng/ml - 100 ag/ml, ředěno desítkovou řadou) a v přítomnosti či nepřítomnosti 1 ng/ml LPS. Celkový objem kultivačního media byl doplněn do 200 μ l. Po 24 hodinách kultivace byla stanovena koncentrace TNF- α a IL-10 metodou ELISA (viz. 4.6.)

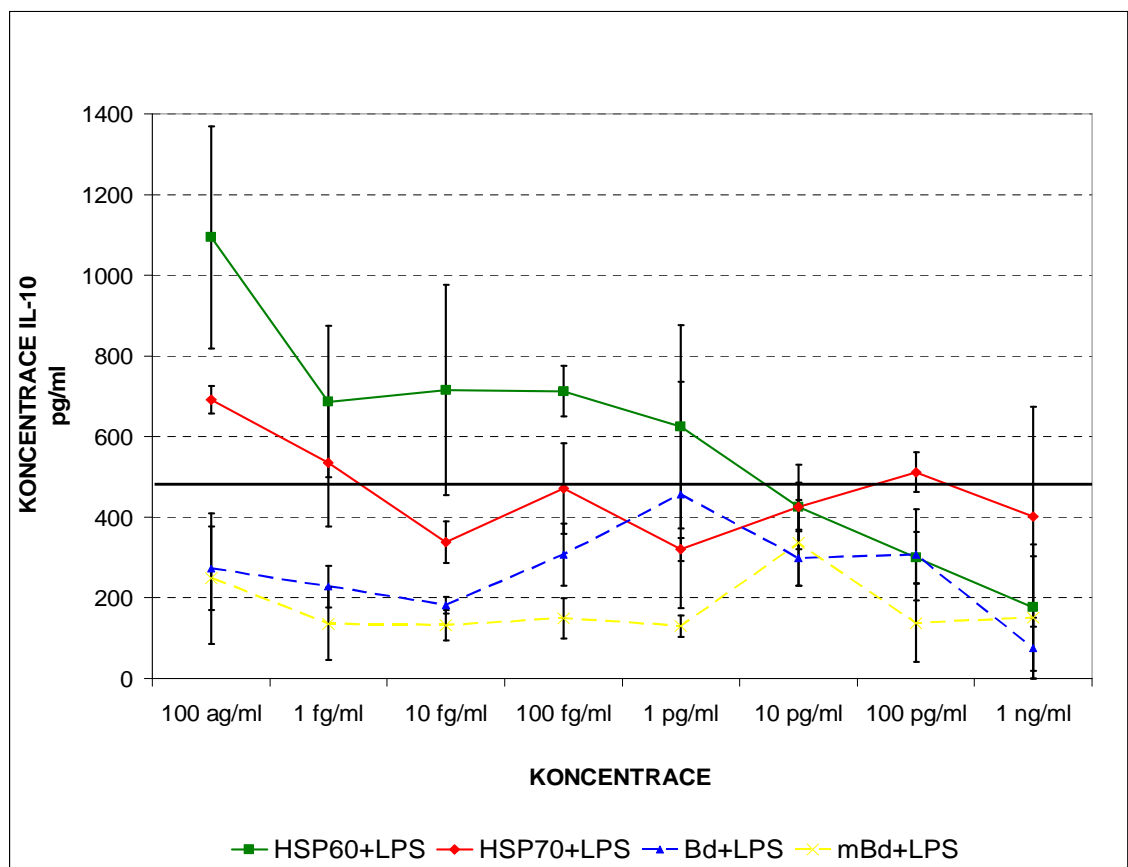
Z našich výsledků vyplývá, že LPS aktivované makrofágy kultivované s LAC a mLAC neinhibují produkci TNF- α (viz. obr. č. 13.). Bd se zdá být účinný pouze v nejvyšší koncentraci a to v 1 ng/ml, kde je inhibice produkce TNF- α vyšší než 20 %. Membránová frakce Bd téměř nezmění produkci TNF- α u LPS stimulovaných makrofágů (viz. obr. č. 13). Nejúčinnější antigen se zdá být HSP60 a to především ve vyšších koncentracích. Produkce TNF- α zprostředkovaná HSP70 v jednotlivých koncentracích kolísá okolo 100% (100% = koncentrace TNF- α po aktivaci makrofágů LPS), pouze u koncentrace antigenu 1 ng/ml je produkce TNF- α snížena a to o 23% (viz. obr. č. 13.).

Samotné peritoneální buňky prakticky neprodukují IL-10 (okolo 20pg/ml) (data neukázána). Po přidání samotného LPS se jejich produkce IL-10 výrazně zvýší, a to přibližně na 300-700 pg/ml. Produkce IL-10 peritoneálními buňkami po kultivaci s LPS a bakteriálními komponentami je znázorněna na obr. č. 14.

Výše popsané výsledky reprezentují průměr ze dvou na sobě nezávislých měření.



Obr. č. 13. Změna produkce TNF- α lipopolysacharidem aktivovanými makrofágy izolovanými z peritonea myši BALB/c po 24 hod kultivaci s různými koncentracemi HSP60, HSP70, Bd, mBd, LAC, mLAC. Produkce TNF- α makrofágy aktivovanými pouze LPS=100% (označeno černou linkou) Světle zelená barva označuje antigen HSP60, tmavě zelená HSP70, červená Bd, oranžová mBd, tmavě modrá LAC, světle modrá mLAC.



Obr. č. 14. Produkce IL-10 LPS aktivovanými peritoneálními makrofágy myši BALB/c po 24 hod kultivaci s různými koncentracemi HSP60, HSP70, Bd, mBd. Zelená barva označuje antigen HSP60 červená HSP70, modrá Bd, žlutá mBd

5.2.2. In vitro experimenty – epitelové buňky

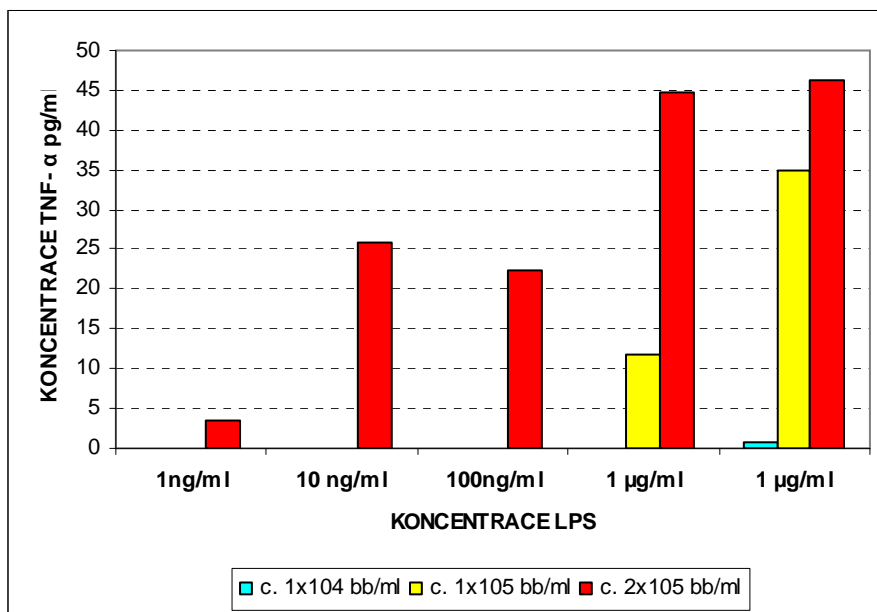
5.2.2.1 Stanovení optimální koncentrace LPS pro aktivaci střevní epitelové buněčné linie IEC-6

Mnoho studií potvrdilo, že LPS vyvolává expresi prozánětlivých genů, které kodují cytokiny v signální kaskádě závislé na NFκB.

Nechali jsme adherovat ke dnu jamek různé koncentrace IEC-6 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 buněk/ml na 24 hodin a poté jsme je kultivovali ve 200 μl kompletního média (viz. 4.3.2.) s různými koncentracemi LPS (1 ng/ml -10 μg/ml, ředěno desítkovou řadou) po dobu 24 hodin za účelem zjistit optimální koncentrace LPS pro aktivaci těchto buněk.

Jako optimální koncentraci buněk jsme zvolili 2×10^5 buněk/ml a vhodnou koncentraci LPS pro stimulaci IEC-6 jsme stanovili na 10 μg/ml. U koncentrací buněk nižších než 5×10^4 buněk/ml jsme nedetekovali žádnou produkci TNF-α.

V dalších experimentech budeme pokračovat s touto buněčnou linií.



Obr. č. 15. Produkce TNF-α krysí epitelovou linií IEC-6 po 24 hodinové kultivaci s různými koncentracemi LPS. Jednotlivé sloupce reprezentují různé koncentrace buněk. Červená barva označuje koncentraci buněk 5×10^4 buněk/ml, žlutá- 1×10^5 bb/ml a modrá- 2×10^5 buněk/ml

6. DISKUZE

Vzájemné vztahy mezi hostitelem a komenzálními mikroorganismy, stejně tak jako vztahy mikroorganismů mezi sebou mohou mít zásadní dopad na zdravotní stav hostitele. Pokusy s gnotobiologickými zvířaty jasně ukázaly, že správný vývoj lidského imunitního systému je závislý právě na interakci s mikroby. Probiotické i patogenní mikroorganismy mohou přinášet výhody svému hostiteli a to ovlivněním jak vrozené tak i získané imunity.

Všeobecně přijímaná teorie vzniku ISZ je definována jako abnormální imunitní odpověď na antigeny běžné střevní mikroflóry. Pozměňování střevní mikroflóry pomocí perorálního podávání probiotických bakterií nebo antibiotik se zdá být slibnou terapií lidských ISZ (VERTURI *et al.* 1999, KRUIS *et al.* 2004). Přibývá důkazů, alespoň u myších experimentálních modelů, že rozsah střevního zánětu může být zmírněn nejenom pomocí živých probiotických bakterií (MADSEN *et al.* 1999, JIJON *et al.* 2004, KOKEŠOVÁ *et al.* 2006), ale také jejich komponentami a produkty (RACHMILEWITZ *et al.* 2004, ZHANG *et al.* 2005).

Výsledky vycházející z naší laboratoře ukázaly, že perorálně aplikované lyzáty z anaerobních bakterií dokáží zmírnit střevní zánět vyvolaný DSS (VERDU *et al.* 2000). Tyto poznatky nás vedly k dalšímu výzkumu zaměřenému na odhalení specifické bakterie nebo její komponenty, které jsou zodpovědné za tento protizánětlivý efekt. Ze směsi anaerobních bakterií se nám podařilo izolovat jednu, která měla stejný efekt i bez přítomnosti ostatních bakterií. Tuto bakterii jsme identifikovali jako *Bacteroides distasonis* (SOKOL *et al.*, nepublikovaná data). Z našich posledních experimentálních studií vyplývá, že bakteriální lyzáty připravené z *Bacteroides distasonis*, *Lactobacillus casei* DN114001 stejně tak jako mykobakteriální HSP60 jsou schopny zmírňovat u myši průběh akutní kolitidy vyvolané DSS (KVERKA *et al.*, rukopis v přípravě).

V této studii, která bezprostředně navazovala na naše *in vivo* experimenty jsme studovali efekt bakteriálních komponent na LPS aktivovanou produkci TNF- α , NO, IL-10 a dalších cytokinů u makrofágových linií RAW 264.7 a J774A.1 a buněk izolovaných z peritonea myši BALB/c. Náš cíl byl vysvětlit možné mechanismy protizánětlivého působení výše jmenovaných bakteriálních složek. Sledovali jsme proto

aktivaci signální dráhy NF κ B u linie RAW 264.7. Také jsme udělali pilotní pokusy s epitelovou linií IEC-6, ve které jsme stanovili optimální dávku LPS vedoucí k aktivaci těchto buněk.

Aktivovat makrofágy je možné několika způsoby. Nejčastěji se makrofágy v pokusech *in vitro* stimulují pomocí LPS a IFN- γ . Cílem naší studie bylo nejvíce napodobit prostředí lumen střeva, které je vystaveno velkému množství LPS pocházejícího z bakterií přítomných v GIT. Proto jsme v našich experimentech pro aktivaci makrofágů používali LPS, který obsahuje gramnegativní komenzální bakterie. Optimální kultivační koncentrace LPS pro použitý počet buněk a dobu kultivace jsme stanovili na 1 ng/ml u linie RAW 264,7 a peritoneálních makrofágů a na 10 ng/ml u linie J774A.1, což je přibližně stokrát až tisíckrát méně než je běžně používáno (MATTHEW *et al.* 2003, MATSUMOTO *et al.* 2005, JIANG *et al.* 2005). Cílem naší práce však bylo detekovat případné změny způsobené velice nízkými koncentracemi bakteriálních antigenů, tudíž jsme použili tu nejnižší možnou koncentraci LPS, která makrofágy aktivovala. Je známo, že LPS pocházející z různých kmenů bakterií mohou makrofágy aktivovat s rozdílnou intenzitou, proto v budoucnu budeme naše pokusy opakovat s LPS pocházejícím z jiné bakterie. Při zavádění nových probiotických organismů či jejich komponent do klinické praxe musí být kladen velký důraz na bezpečnost testovaných probiotik a to hlavně u lidí majících oslabený imunitní systém, u novorozenců a starších lidí. V našem *in vitro* modelu jsme testovali, zda námi používané složky bakterií neovlivňují životnost buněčných linií. Prokázali jsme, že samotné bakteriální antigeny neovlivňují životnost pozorovaných buněk, což je nezbytným předpokladem pro jejich případné použití jako probiotik. Větší mortalitu jsme pozorovali u makrofágů aktivovaných LPS, který je známý svou proapoptotickou aktivitou. Tento výsledek je v souladu s pracemi dalších autorů (MORRISON a RYAN 1987) a nemá vliv na biologickou aktivitu makrofágů.

TNF- α je jeden z hlavních prozánětlivých cytokinů účastnící se zánětlivé kaskády u ISZ (PAPADAKIS *et al.* 2000). Zablokování jeho aktivity pomocí monoklonálních protilátek se dnes běžně používá na zastavení zánětlivého procesu u ISZ nebo revmatoidní artritidy (SIDDIQUI *et al.* 2005). Nevýhoda tohoto přístupu je, že působí pouze na vlastní zánětlivou kaskádu a tudíž nezabrání následujícím vzplanutím choroby po vysazení léčby. Z tohoto důvodu se snažíme ovlivnit produkci TNF- α pomocí probiotik. Změny v produkci TNF- α antigen prezentujícími buňkami např. makrofágy

mohou ovlivnit první fázi antigenní prezentace a celkově tak pozměnit průběh imunitní odpovědi. V naší práci jsme se proto věnovali právě ovlivnění tohoto mechanismu.

Samotné bakteriální antigeny HSP60, HSP70, Bd, mBd, LAC, mLAC neaktivují makrofágy k produkci TNF- α . Naše výsledky se shodují s pozorováním CHEN *et al.* 1999, který prokázal, že koncentrace HSP nižší než 0,1 μ g nestimulují makrofágy k produkci TNF- α a NO. Po aktivaci buněk LPS a jejich kultivací s bakteriálními lyzáty a jejich komponentami dochází k inhibici produkce TNF- α , která je závislá na jejich koncentraci. Největší inhibici jsme našli u HSP60 a to u všech testovaných koncentrací, což je v souladu s našimi výsledky ze stanovení aktivace signální dráhy vedoucí k NF κ B.

U bakterie *Lactobacillus casei* DN114001 se jako neúčinnější ukázaly nižší koncentrace, tento výsledek se shoduje s tvrzením ZHANG a spolupracovníků (2005), kteří pozorovali protektivní účinek *Lactobacillus rhamnosus* GG u nízkých koncentrací, zatímco u vyšších už protektivní efekt nebyl tak výrazný.

Změna produkce TNF- α u makrofágů linií RAW 264.7, J774A.1 a makrofágů izolovaných z peritonea se značně liší. Inhibice produkce TNF- α u peritoneálních makrofágů nebyla zdaleka tak výrazná jako u buněčných linií. Tento rozdílný výsledek můžeme vysvětlit tím, že imortalizovaná buněčná linie RAW 264,7 má rozdílnou buněčnou odpověď, než jakou můžeme pozorovat u nativních makrofágů (RASCHKE *et al.* 1978). Navíc představuje homogenní populaci buněk, čímž se redukuje vliv možných mezipopulačních interakcí. Naopak buňky izolované z peritonea obsahují kromě monocytů a makrofágů i B-lymfocyty, T-lymfocyty a NK buňky (HO *et al.* 1997). Zůstává však otázkou, zda se přítomností těchto dalších buněčných populací skutečně mění charakter zodpovědných buněk, tj. makrofágů a zda to má vliv na jejich cytokinový profil. Na okraj bych chtěla uvést, že zastoupení jednotlivých buněčných populací v peritoneu se liší i mezi různými kmeny myši (FESTING *et al.*, 1990). My jsme použili buňky izolované z peritonea myši BALB/c z toho důvodu, že naše předchozí pokusy se složkami bakterií byly prováděny právě na tomto kmenu.

HSP60 zvyšoval produkci IL-10 u makrofágů buněčných linií i u buněk izolovaných z peritonea myši BALB/c a to nezávisle na přítomnosti LPS. Po kokultivaci s LPS byla produkce IL-10 srovnatelná s produkcí IL-10 po kultivaci pouze s HSP60. Nižší produkci IL-10 jsme naměřili u Bd a mBd. Při posuzování biologického účinku cytokinů musíme vzít v úvahu dvě jejich základní vlastnosti a to redukanci a lokální působení. A tak ačkoliv například IL-10 je obecně znám jako

protizánětlivý cytokin (MOORE *et al.* 2001), v *in vitro* systému se ukázalo, že není nezbytný k snížení produkce TNF- α u makrofágů (KIM *et al.* 2006). Studie prováděné u myši s deletovaným genem pro IL-10 ukazují, že cytokin IL-10 je postradatelný při protizánětlivém účinku některých probiotických bakterií (MCCARTHY *et al.* 2003, PENA *et al.* 2005). *In vivo* by však mohla zvýšená produkce IL-10 vyvolaná HSP, indukovat vznik regulačních T-lymfocytů, s následným utlumením zánětlivé reakce.

Je obecně známo, že LPS vyvolává produkci NO (NODA a AMANO, 1997), proto jsme si ho zvolili jako detekční ukazatel aktivace makrofágů a jejich schopnosti reagovat na patogenní podněty. Sledovat produkci NO jsme se rozhodli pomocí Griessovy reakce, protože se jedná o metodu jednoduchou, přesnou a také dobře reprodukovatelnou. Sledování vlivu bakteriálních komponent na produkci NO jsme prováděli na buňkách monocyt/makrofágové linie RAW 264.7 a J774A.1. Výše uvedené buněčné linie se v produkci NO poměrně výrazně lišily. V souladu s prací ROYLE a spolupracovníků (2003) linie RAW 264.7 po aktivaci LPS produkovala detekovatelná množství NO. Námi naměřené produkce NO po aktivaci makrofágů LPS a bakteriálními složkami se výrazně nelišily od produkce makrofágů aktivovanými pouze LPS. Mírné rozdíly mezi různými koncentracemi mohou být následkem, jak rozdílného působení jednotlivých bakteriálních antigenů a jejich koncentrace, tak i rozdílnou buněčnou odpovědí na cytokiny IL-10, TNF- α a další.

Zatímco u linie J774A.1 jsme nedetekovali žádnou produkci NO, což zdůvodňujeme tím, že námi stanovená koncentrace LPS byla příliš nízká pro aktivaci buněk. Existuje mnoho studií, které detekují produkci NO u linie J774A.1, ve všech je ale používána vyšší koncentrace LPS (RUCKDESCHEL *et al.* 1998, CHANG *et al.* 1998). Z důvodu nedostatku pokusných zvířat nebyla stanovena produkce NO u makrofágů izolovaných z peritonea.

Cytokiny jsou hlavním prostředkem mezibuněčné komunikace. Cytokinové prostředí v dané oblasti do značné míry určuje vlastní povahu imunitní odpovědi. Proto jsme se rozhodli analyzovat změny cytokinového spektra pomocí proteinového mikročipu.

Po aktivaci makrofágů linie RAW 264.7 LPS a kultivaci s optimální koncentrací bakteriální složky (nejúčinnější při inhibici TNF- α), jsme pomocí proteinových mikročipů zjistili přítomnost mnoha cytokinů a chemokinů.

Každá námi testovaná bakteriální složka, představuje komplexní směs různých antigenů. Proto není divu, že se spektrum cytokinů u každé bakteriální složky liší.

Jedním z cílů naší laboratoře je právě odhalit tento účinný antigen nebo alespoň nejúčinnější směs antigenů.

V souladu s našimi výsledky z proteinových mikročipů a ELISA testů, popisuje studie Kim a spolupracovníci (2006) schopnost bakterií kmene *Lactobacillus rhamnosus* GG vyvolat produkci IL-10 a G-CSF a neaktivovat produkci TNF- α u makrofágů. Zajímavá je také zvýšená produkce sTNFR1 u buněk stimulovaných HSP60 a LPS, která by mohla mít význačný účinek *in vivo* a to snížením množství TNF- α přítomného ve střevě při ISZ.

Řada genů je regulována transkripčními faktory rodiny NF κ B, které se účastní zánětlivých reakcí imunitního systému (GHOSH *et al.* 1998). U savců je známo celkem pět členů této rodiny (podjednotky p50, p65 (RelA), p52, RelB a c-Rel), z nichž nejčastější je podjednotka p65. Bylo dokázáno, že některé druhy probiotických bakterií a HSP mohou zmírňovat zánětlivé signály prostřednictvím signální dráhy vedoucí k transkripčnímu faktoru NF κ B (O'HARA *et al.* 2006, SHI *et al.* 2006) a zároveň indukovat expresi proteinů tepelného šoku (PETROF *et al.* 2004). Tuto hypotézu navíc podporuje další studie (MATSUMOTO *et al.* 2005), která prokázala, že teplem usmrcené bakterie kmene *Lactobacillus casei* kmene Shirota snižují aktivitu signální dráhy vedoucí k NF κ B a to prostřednictvím podjednotky p65. Tato inhibice je dávkově závislá. Z výsledků našeho experimentu je zřejmé, že schopnost zmírňovat zánětlivé signály prostřednictvím signální dráhy vedoucí k transkripčnímu faktoru NF κ B mají i námi vybrané bakteriální antigeny.

Epitelové buňky střeva jsou v přímé interakci s mikrobiálními složkami. Pro naše pokusy jsme si vybrali potkaní epitelovou linii IEC-6 z toho důvodu, že pochází z kryptových buněk tenkého střeva. A také proto, že nemá nádorový původ, a tudíž má srovnatelnější fenotyp s nativními buňkami (QUARONI *et al.* 1978).

V našich pilotních pokusech s touto buněčnou linií jsme stanovili optimální koncentrace LPS pro aktivaci těchto buněk. Naše výsledky se shodují s pracemi dalších autorů (CHANCHEVALAP *et al.* 2006). V budoucnu plánujeme na této buněčné linii otestovat naše bakteriální lyzáty a jejich komponenty.

Předpokládáme tedy, že buněčné komponenty izolované z bakterií, ovlivňují imunitní odpověď hostitele a to prostřednictvím změny produkce cytokinů. Tato změna by mohla vést ke změně cytokinového prostředí ve prospěch imunologické tolerance.

7. ZÁVĚR

- Stanovili jsme optimální koncentraci LPS pro aktivaci makrofágů linie RAW 264.7, J774A.1 a buněk izolovaných z peritonea myši BALB/c.
- Zjistili jsme, že bakteriální lyzáty a jejich komponenty nemají vliv na životnost makrofágových linií RAW 264.7 a J774.A1.
- Prokázali jsme, že bakteriální lyzáty a jejich komponenty snižují produkci TNF- α u makrofágů linie RAW 264.7 a J774A.1 po aktivaci lipopolysacharidem. U buněk izolovaných z peritonea myši BALB/c jsme nedetekovali tuto inhibici v takovém rozsahu.
- Mykobakteriální HSP60 stimuluje makrofágy buněčných linií k produkci IL-10.
- Po kokultivaci makrofágů linie RAW 264.7 s LPS a bakteriálními složkami dochází k inhibici v signální dráze NF κ B.