

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Barbora Majerová

Studium procesu zánětu na buňkách plicního epitelu

Study of inflammation using epithelial cells

Bakalářská práce

Školitel: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

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

V Praze, 30. 5. 2011

.....
Barbora Majerová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala mému školiteli Prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady, všestrannou pomoc při řešení problémů a trpělivost při vypracování mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala prof. MUDr. Iljovi Střížovi, CSc. za umožnění realizace experimentální části této práce a Mgr. Evě Brabcové za asistenci a trpělivost při práci na experimentu.

Abstrakt

Lidský dýchací systém je ve stálém kontaktu s cizorodými činiteli z okolního prostředí. Protože v respiračním traktu dochází k ukládání různých částic, musí existovat jak efektivní způsob jejich mechanického odstraňování, tak imunitní ochranné mechanismy. Vzájemná rovnováha mezi přirozenou a adaptivní imunitou plic umožňuje likvidaci infekčních činitelů bez iniciace zánětlivé reakce. Nadměrná aktivace imunitního systému plic však může vést k produkci nejrůznějších zánětlivých mediátorů a cytokinů, např. interleukinů IL-1 β , IL-6 a IL-18. Jednou z možností pro zjištění imunogenicity určité látky je stimulace plicních epiteliálních buněk požadovaným činitelem s následným měřením koncentrace produkovaných cytokinů. Pro zjištění imunogenicity savčích imunoglobulinů typu G a slepičích imunoglobulinů typu Y byla provedena jejich čtyřiaadvacetihodinová expozice plicním buňkám nádorové linie A549. Koncentrace produkovaných cytokinů IL-1 β a IL-6 byla změřena metodou Luminex, která naznačila imunogenicitu jak kozích imunoglobulinů typu G, tak určitých slepičích imunoglobulinů typu Y.

klíčová slova: plíce, imunita, savčí imunoglobuliny, slepičí protilátka, cytokiny, buněčné linie

Abstract

The human respiratory system is in constant contact with heterogeneous agents from the environment. There must be effective mechanical lung barriers and sufficient immune protection due to continuous deposition of various substances in the respiratory system. The mutual balance between the mechanisms of natural and adaptive immunity of the lungs is essential for destruction of infectious agents without initiation of inflammatory response. Overreaction of the immune system of the lungs may lead to the production of various inflammatory mediators and cytokines such as interleukins IL-1 β , IL-6 and IL-18. When determining the immunogenicity of a substance, it has to be exposed to lung epithelial cells, and then the concentration of cytokines produced is measured. To determine the immunogenicity of mammalian immunoglobulin G and chicken immunoglobulin Y the subsequent twenty-four hour exposure to A549 lung cancer cell line was made. Concentration measurement of cytokines IL-1 β and IL-6 was performed using Luminex method, which pointed out the immunogenicity of goat immunoglobulin G and certain chicken immunoglobulins Y.

key words: lungs, immunity, mammal immunoglobulins, chicken antibody, markers, cell lines

OBSAH

Seznam použitých zkratk	1
1 Úvod	3
1.1 Plicní imunita	3
1.1.1 Nespecifické obranné mechanismy plic	3
1.1.1.1 Obrana horních cest dýchacích	4
1.1.1.2 Dýchací cesty vedoucí do plic	4
1.1.1.3 Oblast výměny plynů	6
1.1.1.4 Odstranění vdechnutých částic	7
1.1.2 Specifické obranné mechanismy plic	7
1.1.2.1 Buňky imunitního systému plic	8
1.1.2.2 Vrozené imunitní odpovědi zdravých plic	12
1.1.2.3 Regulace imunitních odpovědí v plicích	14
1.1.2.4 Pozměněné imunitní reakce a plicní choroby	14
1.1.3 Záněty plic	15
1.1.3.1 Inhalační profesní alergie	16
1.1.3.2 Cytokiny přítomné při zánětech plic	18
1.2 Protilátky	22
1.2.1 Savčí protilátky	22
1.2.2 Ptačí protilátky	23
1.2.3 Výhody ptačích protilátek oproti savcím	24
1.2.4 Monoklonální a polyklonální protilátky	24
2 Cíl práce	27
3 Materiál a metody	28
3.1 Použité chemikálie a materiál	28
3.2 Použité pomůcky	29
3.3 Použité přístroje	30
3.4 Použité metody	31
3.4.1 Dialýza protilátek	31
3.4.1.1 Stanovení koncentrace imunoglobulinů spektrofotometricky	32
3.4.2 Pasážování buněk A549 a jejich příprava k aplikaci protilátek	32
3.4.3 Aplikace protilátek a sběr supernatantů	33
3.4.4 Měření koncentrace cytokinů metodou Luminex	34

4	Výsledky	37
4.1	Aplikace protilátek a sběr supernatantů	37
4.2	Měření koncentrace cytokinů metodou Luminex	38
5	Diskuze	40
6	Shrnutí	42
	Seznam použité literatury	43

Seznam použitých zkratk

A549	buňky lidského adenokarcinomu odvozené od epitelálních buněk
APC	„antigen presenting cells“ (antigen prezentující buňky)
BALT	„bronchus-associated lymphoid tissue“ (plicní lymfatická tkáň)
CD	„cluster of differentiation“ (diferenční antigen)
CDR	„complementarity determining region“ (oblast určující komplementaritu)
CTL	cytotoxické lymfocyty
Fab	„antigen-binding fragment“ (fragment vázající antigen)
Fc	„crystallizable fragment“ (krystalizovatelný fragment)
FI	„fluorescence intensity“ (intenzita fluorescence)
FTS	fetální sérum
gIgG	„goat immunoglobulin G“ (kozy imunoglobulin typu G)
GM-CSF	„granulocyte-monocyte colony-stimulating factor“ (faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů)
hIgG	„human immunoglobulin G“ (lidský imunoglobulin typu G)
ICAM	„intracellular adhesive molecule“ (mezibuněčná adhezivní molekula)
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IgY1	slepičí imunoglobulin typu Y, vzorek č. 1
IgY2	slepičí imunoglobulin typu Y, vzorek č. 2
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
IMDM	„Iscove's Modified Dulbecco's Medium“ (obohacené syntetické médium vhodné pro rychle proliferující buňky)

IL	interleukin
LFA	„leukocyte-function-associated antigen“ (adhezivní molekula leukocytů)
LPS	lipopolysacharid
MAP	„multi analyte profilig“ (analýza více analytů)
MHC	„major histocompatibility complex“ (hlavní histokompatibilní komplex)
MCP	„monocytes chemoattractant protein“ (monocyty chemoatrahující protein)
NK	„natural killer“ (přirozený zabíječ)
PBS	„phosphate buffered saline“ (fosfátový pufr)
PMN	polymorfonukleární neutrofily
PSG	penicilin-streptomycin-gentamicin
Tc	cytotoxické T-lymfocyty
TCR	„T-cell receptor“ (receptor T-lymfocytů pro antigen)
TGF	„transforming growth factor“ (transformující růstový faktor)
Th	pomocné T-lymfocyty
TLR	„Toll-like receptor“ (receptor podobný genu Toll)
TNF	„tumor necrosis factor“ (faktor nekrotizující nádory)
TNFR	„tumor necrosis factor receptor“ (receptor faktoru nekrotizující nádory)
Tr	regulační T-lymfocyty

1 Úvod

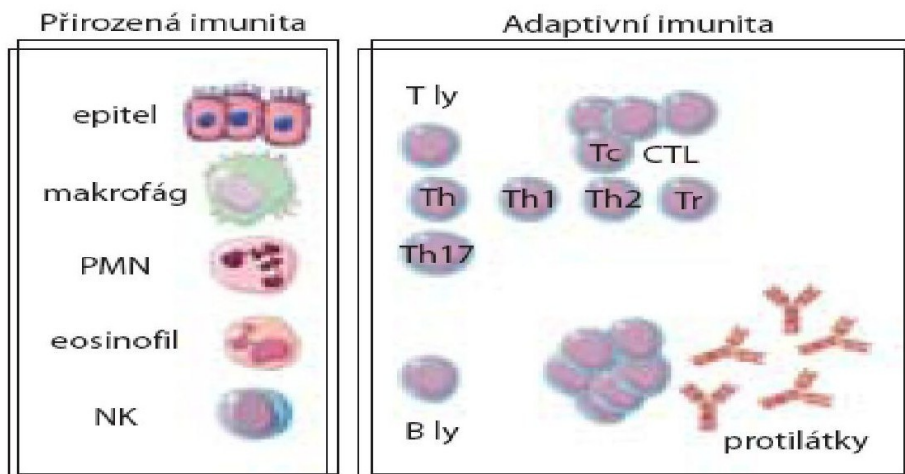
1.1 Plicní imunita

Respirační trakt je v důsledku vdechování vystaven až 10 000 l inhalovaného vzduchu denně. Takto velký objem plynu s sebou nese mnoho částic, mikroorganismů a dalších potencionálních infekčních činitelů, které jsou neustále v kontaktu s plochou plic o velikosti okolo 100 m² [Stříž, 2008]. Proto je potřeba aktivovat značný počet obranných mechanismů, které chrání hranici mezi vnějším prostředím a vnitřními tkáněmi. Pro jejich optimální funkci je potřeba vzájemné koordinace adaptivní imunity, tj. antigeně specifických imunitních pochodů, jako jsou tvorba protilátek a aktivace cytotoxických T-lymfocytů, s mechanismy přirozené imunity (viz. Obr. 1, str. 4) [Tlaskalova-Hogenova a kol., 2002]. Když je tato koordinace narušena, dochází ke vzniku plicních onemocnění. Iniciační faktory mohou být různého druhu, např. vdechování kouře a infekčních agens, inhalace organického a anorganického prachu nebo expozice toxickým plynům. Schopnost těchto faktorů vyvolat plicní chorobu závisí na způsobu ukládání částic v plicích, celkovém zatížení organismu inhalovanými látkami, přiměřené funkci čistících mechanismů, adekvátní činnosti mechanismů chránících sliznici a na správném průběhu imunitních odpovědí na cizorodé látky. Vdechnutý činitel může vyvolat chorobu dýchacích cest vedoucích do plic, způsobit chorobu zasahující distální plicní parenchym (místa, kde dochází k výměně plynů), nebo ji nemusí vyvolat vůbec. Vedle mechanických bariér, které představují primární obranu před cizorodými látkami, existují i antigeně specifické obranné mechanismy, které jsou založeny na specifických imunitních odpovědích [Meyer, 2002]. Následující kapitoly se věnují popisu obou těchto složek respirační imunity.

1.1.1 Nespecifické obranné mechanismy plic

Celkové obranné mechanismy plic lze rozdělit do několika skupin:

- mechanická obrana – kašel, zachycení částic v horních cestách dýchacích, bariéra tvořená hlenem a epitelem, mukociliární odstranění
- fagocytární aktivita – makrofágy, polymorfonukleární leukocyty
- imunitní obrana – surfaktant, lymfocyty, imunoglobuliny, dendritické buňky, fagocytující buňky, cytokiny, adhezní molekuly, antimikrobiální peptidy



Obr. 1: Buňky přirozené a adaptivní imunity. PMN – polymorfonukleární neutrofily, NK – z angl. „natural killer“ přirozený zabíječ, T ly – T-lymfocyty, B ly – B lymfocyty, CTL, Tc – cytotoxické lymfocyty, Th – pomocné T-lymfocyty, Tr – regulační T-lymfocyty. Převzato z [Stříž, 2007].

1.1.1.1 **Obrana horních cest dýchacích**

Reflexní mechanismy a mechanické bariéry tvoří základní ochranu horních cest dýchacích. Patří mezi ně kašel, kýchání a zachycení inhalovaných částic na nosních chloupkách nebo ve sliznici horních cest dýchacích v oblastech turbulentního proudění vzduchu. Dále je to hlen, který pokrývá epitelální sliznici a brání průniku zachycených částic, které jsou odstraněny ciliární aktivitou epitelálních buněk sliznice a následným vykašláním. Důležitou roli hraje normální bakteriální flóra nosohltanu (aktivní v boji proti kolonizaci cizorodými bakteriálními a houbovitými patogeny), imunoglobuliny třídy A a proteiny asociované se surfaktantem (brání virům a patogenním bakteriím v adhezi na epitelální povrchy) [Votava, 2006].

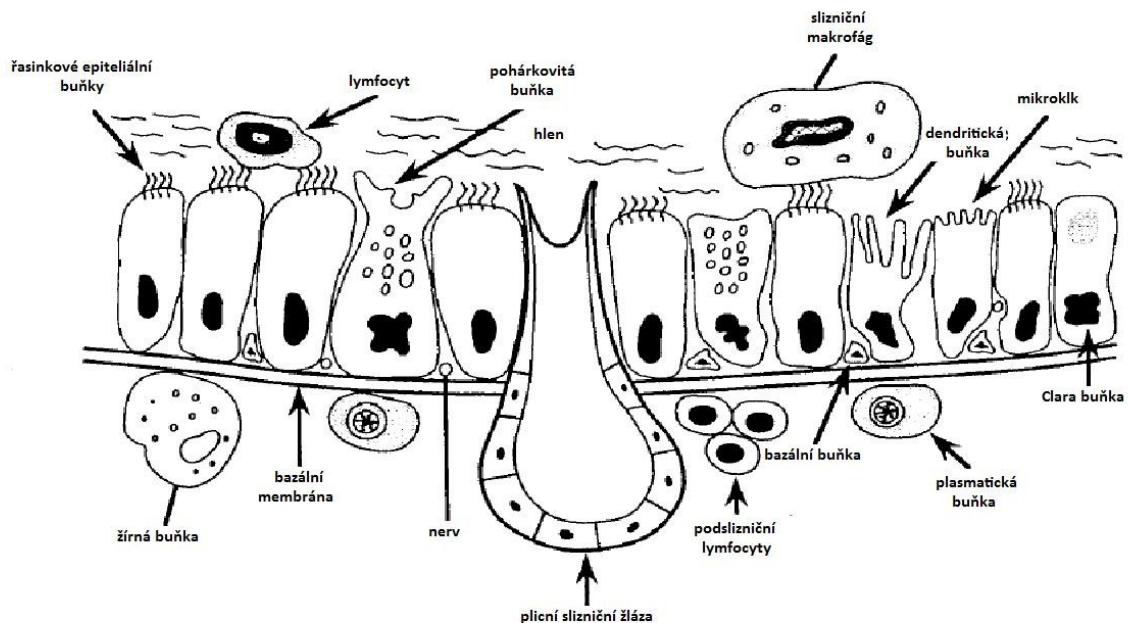
1.1.1.2 **Dýchací cesty vedoucí do plic**

Vstupující částice se v závislosti na své velikosti ukládají různě hluboko v dýchacích cestách:

- $\geq 10 \mu\text{m}$: převážně v horních cestách dýchacích v oblasti turbulentního proudění vzduchu
- $5\text{-}8 \mu\text{m}$: v tracheobronchiální sliznici, odstraněny mukociliární aktivitou

- 2-5 μm : v plicních sklípcích, odstranění může trvat až 100 dní nebo déle
- pod 2 μm : fagocytovány alveolárními makrofágy v plicních sklípcích [Stříž, 2008]
- <0,01 μm : téměř nedosahují plicních sklípků díky difuznímu ukládání v nosohltanu a v proximální tracheobronchiální sliznici [Meyer, 2002].

Tracheobronchiální strom je krytý pseudostratifikovaným cylindrickým epitelem s řasinkami (viz. Obr. 2). Je pokrytý hlenem produkovaným pohárkovitými buňkami a podslizničními žlázami a rozprostírá se od průdušnice k plicním sklípkům. Činnost řasinkových buněk pohání hlen proximálním směrem, je důležitým mechanismem pro odstranění uložených částic a je následována jeho vykašláním. Pacienti s nadměrným množstvím hlenu (př. cystická fibróza) jsou náchylní k opakovaným bakteriálním infekcím vedoucím k postupnému selhání plic a bronchiektázii, projevující se opakovanými záněty průdušek a průdušinek, které mají za následek jejich permanentní rozšíření [Koblížek a kol., 2009]. Kromě mechanických čistících mechanismů chrání sliznici i imunoglobuliny, antimikrobiální peptidy a proteiny vázající železo. U člověka jsou uvedenými antimikrobiálními peptidy defensiny β , složené z 30-42 aminokyselin a vykazující chemotaktickou aktivitu vůči T-lymfocytům [Tlaskalová-Hogenová a kol., 2004].



Obr. 2: Komponenty sliznice plic. Obrázek zobrazuje povrch sliznice krytý pseudostratifikovaným řasinkovým epitelem a hlenem, který je produkovan podslizničními

žlázami a pohárkovitými buňkami. Hlen je díky aktivitě řasinkových buněk posouván směrem k hrtanu tzv. mukociliárním transportem. Znázorněné plasmatické buňky sekretují imunoglobuliny, žírné buňky uvolňují mediátory, jakým je např. histamin. Na povrchu dýchacích cest se vyskytují makrofágy, lymfocyty a dendritické buňky, které patří do skupiny APC buněk (z angl. „antigen presenting cells“ neboli antigen prezentující buňky) a prezentují antigen lymfocytům. Sliznice dýchacích cest je vyplněna hustou sítí nervů a cév. Obrázek upraven a převzat z [Meyer, 2002].

1.1.1.3 Oblast výměny plynů

Oblasti, kde dochází k výměně plynů, se skládají z plicních kanálek a plicních sklípků. Jejich plocha se u dospělého člověka pohybuje v rozmezí 75 m² až 150 m². Plicní sklípky jsou tvořeny jednovrstevným epitelem s minimální řasinkovou výbavou. Nedochozí zde tedy k ciliární aktivitě, a tak je odstranění částic z těchto oblastí odkázáno na fagocytózu plicními makrofágy. Odstranění částic z plicních sklípků trvá od několika dnů do jednoho roku [Meyer, 2002].

V těchto oblastech je důležitá přítomnost pneumocytů II. typu produkujících surfaktant. Surfaktant je tekutina obsahující fosfolipidy a proteiny, která usnadňuje neutralizaci a odstranění vdechnutých částic. Čtyřmi hlavními proteiny typickými pro surfaktant jsou proteiny A, B, C a D, které přispívají jak ke snížení povrchového napětí, tak k mobilizaci obranných mechanismů [Stříž, 2008]. Proteiny surfaktantu společně s imunoglobuliny, komplementem a fibronektinem adherují na povrch mikroorganismu za pomoci specifických receptorů (proces opsonizace), čímž je usnadněna fagocytóza plicními makrofágy a polymorfonukleárními leukocyty. V případě zánětu dochází k porušení těsných spojů (z angl. „tight junctions“) mezi pneumocyty, a tím ke zvýšení propustnosti epitelu pro plazmatické komponenty, které tak mohou proniknout do prostoru plicních sklípků. Tyto a další lokálně produkované komponenty mají ochrannou funkci, ale pokud jsou přítomny ve větším množství, mohou poškodit funkci plicního surfaktantu. Mezi další ochranné látky, vyskytující se v epiteliální tekutině, patří glutathion, který je nejrozšířenějším extracelulárním antioxidantem v plicích, a proteolytické enzymy, jakým je např. neutrofilní elastasa.

V bronchoalveolární laváži zdravého pacienta lze nalézt buňky v následujícím zastoupení: 85-90 % makrofágy, 10 % lymfocyty, 1-3 % neutrofilní granulocyty,

<1 % eosinofilní granulocyty [Meyer, 2002]. Během infekce vzrůstá relativní zastoupení těchto buněk (viz. kap. 1.1.3. Záněty plic, str. 15). Lymfocyty, monocyty, neutrofilní a eosinofilní granulocyty mohou infiltrovat skrz plicní intersticiium až k epiteliálnímu povrchu, kam přilnou pomocí specifických receptorů (adhezní molekuly a k nim komplementární ligandy) a reagují buď na chemoatrahující glykoproteiny (např. IL-8, MCP-1 z angl. „monocytes chemoattractant protein“ neboli protein chemoatrahující monocyty), nebo na další chemoatraktanty produkované v místě zánětu.

1.1.1.4 Odstranění vdechnutých částic

Jakmile jsou částice zachyceny v hlenu, dochází k jejich mukociliárnímu transportu směrem k průduškám a trachei [Votava, 2006]. Dále mohou být pohlceny volnými nebo přisedlými makrofágy. Nepohlcené částice pronikají dále do plic, kde mohou být uloženy buď v průdušinkách a dýchacích trubicích, nebo v plicních sklípcích, kde nedochází k mukociliární aktivitě. Malý podíl je prostřednictvím surfaktantu transportován do oblastí s řasinkovými buňkami, většina však přímo proniká skrz surfaktant a je odstraněna transcelulární cestou, připojuje se k lymfatickému systému nebo je pohlcena makrofágy a odstraněna pomocí intracelulární degradace.

V případě uložení nadměrného množství cizorodých částic nebo při nesprávném průběhu fagocytózy není odstranění efektivní (př. vlákna azbestu způsobující dezintegraci a rozpad makrofágů).

1.1.2 Specifické obranné mechanismy plic

Adaptivní imunita (nebo také antigeně specifická imunita) je řízena T a B lymfocyty, které jsou odvozeny z pluripotentních kmenových buněk ve fetálních játrech a kostní dřeni. Je založena na produkci antigeně specifických imunoglobulinů pomocí B-lymfocytů, a na tvorbě povrchových receptorů pomocí T-lymfocytů. Pro vyvolání imunitní odpovědi na určitý antigen je těchto látek, i přes jejich velkou nadprodukcí, potřeba jen velmi málo. T-lymfocyty sice dokončí svůj vývoj až po průchodu thymem, imunitní odpověď je však generována ze sekundární lymfoidní tkáně, kam se řadí slezina, lymfatické uzliny a lymfatická tkáň sliznic, vyskytující se podél celého povrchu plic.

Vrozený imunitní systém je neustále aktivní a nezávisí na odpovědích antigeně specifických lymfocytů. Pro okamžitý vznik vrozené imunitní odpovědi je potřebná

správná funkce receptorů specifických pro patogen (např. lektiny vázající mannan), fagocytů, signálních receptorů (např. TLR, z angl. „Toll-like receptor“ neboli receptor podobný genu Toll, který indukuje expresi cytokinů a kostimulačních molekul determinujících diferenciaci Th0 lymfocytů – viz. kap. 1.1.2.1 Buňky imunitního systému plic [Tlaskalová-Hogenová, 2004]), antimikrobiálních peptidů a korektní průběh alternativní cesty aktivace komplementu. Mezi vysoce konzervované molekulární struktury patogenu, které jsou rozpoznávány receptory vrozeného imunitního systému, patří mannan, lipopolysacharidy, peptidoglykan, lipoteichoová kyselina, glukan, bakteriální DNA a dvouvláknová RNA. Vrozený imunitní systém také podněcuje adaptivní imunitu pomocí exprese kostimulačních molekul k vytvoření druhotných imunitních odpovědí.

1.1.2.1 Buňky imunitního systému plic

- **APC buňky**

Buňky prezentující antigen neboli APC buňky rozpoznávají, pohlcují a zpracovávají cizorodé částice. Jakmile je antigen pohlcen a proteolyticky degradován, jsou jeho fragmenty o velikosti zhruba 20 aminokyselin vystaveny na povrchu těchto buněk a rozpoznány příslušnými lymfocyty [Krejsek a kol., 2005]. Důležitou roli ve zpracování antigenu hrají i MHC glykoproteiny (z. angl. „major histocompatibility complex“ neboli hlavní histokompatibilní komplex) na povrchu APC buněk, zvláště MHC glykoproteiny typu II. Do skupiny APC buněk patří makrofágy a dendritické buňky.

Makrofágy se vyskytují v hlnu pokrývajícím epitel, plicním intersticiu, plicní mikrovaskulatuře a pohrudnici. Jsou odvozeny z periferních krevních monocytů a z makrofágů replikovaných *in situ*. Makrofágy jsou schopné antigen nejen pohltit, rozložit a prezentovat na svém povrchu, ale také sekretují velké množství monokinů a růstových faktorů, které mohou autokrinně, parakrinně a endokrinně ovlivňovat okolní buňky. Cytokiny, které jsou produkty makrofágů, ovlivňují chování lymfocytů, neutrofilních granulocytů, endoteliálních buněk a fibroblastů. Makrofágy rovněž likvidují cizorodé částice, pohlcují a odstraňují zbytkové makromolekulární struktury a mikroorganismy a zajišťují reparaci plicního parenchymu pomocí produkce faktorů, které ovlivňují chování endoteliálních buněk a fibroblastů. Nepohyblivé buňky (např. fibroblasty, endoteliální buňky nebo epiteliální buňky) nejsou pouze pasivními

prvky imunity, ale modulují imunitní odpovědi pomocí reakcí na různé imunostimulační signály, nebo pomocí produkce a sekrece cytokinů, antimikrobiálních peptidů a dalších imunoregulačních molekul.

Dendritické buňky jsou odvozeny z prekursorů v kostní dřeni a exprimují MHC glykoproteiny typu II. Proliferaci T-lymfocytů ovlivňují až stokrát účinněji, než monocyty či makrofágy. Díky své účinnosti a přítomnosti v plicním epitelu, intersticiu plicních sklípků a podél pohrudnice, hrají klíčovou roli v imunitních odpovědích. Po střetu s antigenem se rychle přemísťují do lymfatických uzlin [Meyer, 2002].

• **Lymfocyty**

Lymfoidní tkáň přímo sousedí s rozhraním mezi tkání a okolním vnějším prostředím po celé délce plic. U zdravého člověka se lymfocyty vyskytují v plicním intersticiu a v podslizniční tkáni dýchacích cest [Votava, 2006]. Jsou rovněž rozptýleny v celém intersticiu, intraalveolárním septu, pohrudnici a na epiteliálních površích. Lymfocyty tvoří vysoce organizovanou tkáň, tzv. BALT (z angl. „bronchus-associated lymphoid tissue“ neboli plicní lymfatická tkáň), která je podobná „Peyerovým plakům“ ve střevech. Plicní tkáň je protkaná bohatou sítí eferentních lymfatických cév, které se sbíhají v bronchovaskulárních svazcích a končí v lymfatických uzlinách. Důležitou roli v imunitě hrají hilové a paratracheální uzliny. Kromě lymfocytů vyskytujících se v intersticiu a bronchoalveolárních oblastech existuje také široká škála intravaskulárních lymfocytů, jejichž množství je ještě větší, než počet lymfocytů v ledvinách či játrech.

Částice absorbované z respiračního traktu se mohou během cesty z plicních sklípků nebo průdušinek do lymfatických uzlin střetnout s rozmanitou škálou lymfoidní tkáně. Lymfocyty mohou migrovat z plicních lymfoidních agregátů skrz endotelium postkapilárních žil, setrvat v tkáních různě dlouhou dobu, a poté znovu vstoupit do lymfatických cév a opět získat přístup do systémového oběhu. Tato cesta je jim zprostředkována specifickými adhezními molekulami přítomnými na povrchu endoteliálních buněk. V případě zánětlivého podnětu mohou lymfocyty rychle a ve velkém množství infiltrovat do parenchymu plic. V takových případech hrají podstatnou roli hilové uzliny, které jsou zodpovědné za tvorbu imunitních odpovědí, protože obsahují jak APC buňky a makrofágy, tak B a T lymfocyty reagující na antigen.

Pro identifikaci jednotlivých typů lymfocytů se používají monoklonální protilátky, které detekují specifické antigeny na povrchu buněk. T-lymfocyty se v plicích vyskytují převážně ve dvou odlišných typech:

- pomocné/indukující T-lymfocyty (CD4+ buňky z angl. „cluster of differentiation“ neboli diferenciacní antigen) – Th lymfocyty
- cytotoxické/supresorové T-lymfocyty (CD8+ buňky) – Tc lymfocyty

Každý T-lymfocyt nese jeden ze dvou druhů TCR (z angl. „T-cell receptor“ neboli receptor T-lymfocytů pro antigen), buď $\alpha\beta$ receptor, který se vyskytuje u 90-95 % plicních T-buněk, nebo $\gamma\delta$ receptor. T-lymfocyty nesoucí $\alpha\beta$ receptor jsou schopné rozpoznat mnohem větší škálu antigenů, než T-lymfocyty nesoucí $\gamma\delta$ receptor. Symboly α a β (resp. γ a δ) označují dva transmembránové řetězce, ze kterých se TCR skládá. Jejich N-terminální konce jsou variabilní a tvoří vazebné místo pro antigen [Hořejší, Bartůňková, 2005]. Je potřeba zdůraznit, že T-lymfocyty jako takové rozeznávají antigen, který je přítomen na povrchu APC buněk. T-lymfocyt nejprve kontaktuje APC buňku pomocí několika druhů „nespecifických“ adhezivních molekul, a teprve potom se může uskutečnit kontakt mezi TCR a antigenem. Pomocné/indukující T-lymfocyty (CD4+) pomáhají vázat komplexy obsahující MHC glykoproteiny typu II, zatímco cytotoxické/supresorové T-lymfocyty (CD8+) váží komplexy s obsahem MHC glykoproteinů typu I.

CD4+ a CD8+ se liší jak v odpovědích na MHC/antigen, tak v efektorových funkcích. CD4+ poskytuje signál, který spouští proliferaci jak CD4+ i CD8+ buněk, pomáhá B-lymfocytům při proliferaci a diferenciaci, a uvolňuje faktory aktivující eosinofilní granulocyty a žírné buňky. Také stimuluje mononukleární fagocyty k expresi MHC glykoproteinů, prezentaci antigenu a usmrcení parazitů. Tyto pochody zprostředkovávají lymfokiny, které působí na cílovou buňku [Meyer, 2002].

T-lymfocyty z linie CD8+, mohou buď ovlivňovat lysi buněk, nebo tlumit imunitní odpovědi (odtud název cytotoxické/supresorové T-lymfocyty), ale nejsou schopny vykonávat obě funkce zároveň. Cytotoxické CD8+ lymfocyty zabijí buňky exprimující cizorodé antigeny ve spojení s MHC glykoproteiny typu I, např. buňky infikované virem nebo intracelulárním parazitem. Když cytotoxický CD8+ lymfocyt interaguje s cílovou buňkou exprimující MHC glykoproteiny typu I ve spojení s antigenem, adhezivní molekuly umožní buněčný kontakt a CD8+ lymfocyt uvolní cytotoxické granule s obsahem

cytolytického, komplementu podobného proteinu perforinu [Shresta a kol., 1998]. Dalšími uvolňovanými mediátory cytotoxicity jsou serinové proteasy. Přesný průběh supresivní funkce CD8⁺ T-lymfocytů není dosud známý. CD8⁺ T-lymfocyty dokážou také potlačit proliferaci CD4⁺ T-lymfocytů, jako odpověď na rozpustný antigen, a rovněž mohou potlačit pomocnou funkci CD4⁺ T-lymfocytů potřebnou při syntéze imunoglobulinů [Meyer, 2002].

Podle rozsahu produkovaných cytokinů dělíme T-lymfocyty do několika podskupin [Stříž, 2008]:

- Th1 T-lymfocyty (produkce cytokinů IFN- γ neboli interferon- γ , dále IL-2 neboli interleukin-2 a TNF- β z angl. „tumor necrosis factor“ neboli faktor nekrotizující nádory)
- Th2 T-lymfocyty (produkce cytokinů IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 a GM-CSF z angl. „granulocyte-monocyte colony-stimulating factor“ neboli faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů)
- Th17 T-lymfocyty (produkce cytokinu IL-17)

T-lymfocyty, které produkují TNF- α a další cytokiny, se označují jako Th0 a jsou považovány za prekurzory pro Th1 a Th2. Lymfocyty produkující velké množství TGF- β (z angl. „transforming growth factor“ neboli transformující růstový faktor), jsou označovány jako Th3. Cytokiny produkované Th1 buňkami (IFN- γ) inhibují tvorbu Th2 buněk a cytokiny produkované Th2 buňkami (IL-4) naopak potlačují tvorbu Th1 buněk. Th1 buňky jsou zapojeny do zánětlivých reakcí zprostředkovaných buňkami a vyvolávají pozdní hypersenzitivní reakce. Th1 buňky jsou rovněž nepostradatelné při imunitních odpovědích plic, infikovaných mykobakteriální infekcí, nebo zasažených sarkoidózou. Sarkoidóza je multisystémová choroba neznámé příčiny, projevující se přítomností granulí v orgánech, nejčastěji v plicích [Crystal, 1981]. Cytokiny pocházející z Th2 buněk podporují produkci protilátek (obzvláště IgE neboli imunoglobulinů třídy E) a zvyšují proliferaci a funkci eosinofilních granulocytů. Th2 buňky úzce souvisí s parazitickými infekcemi a astmatem.

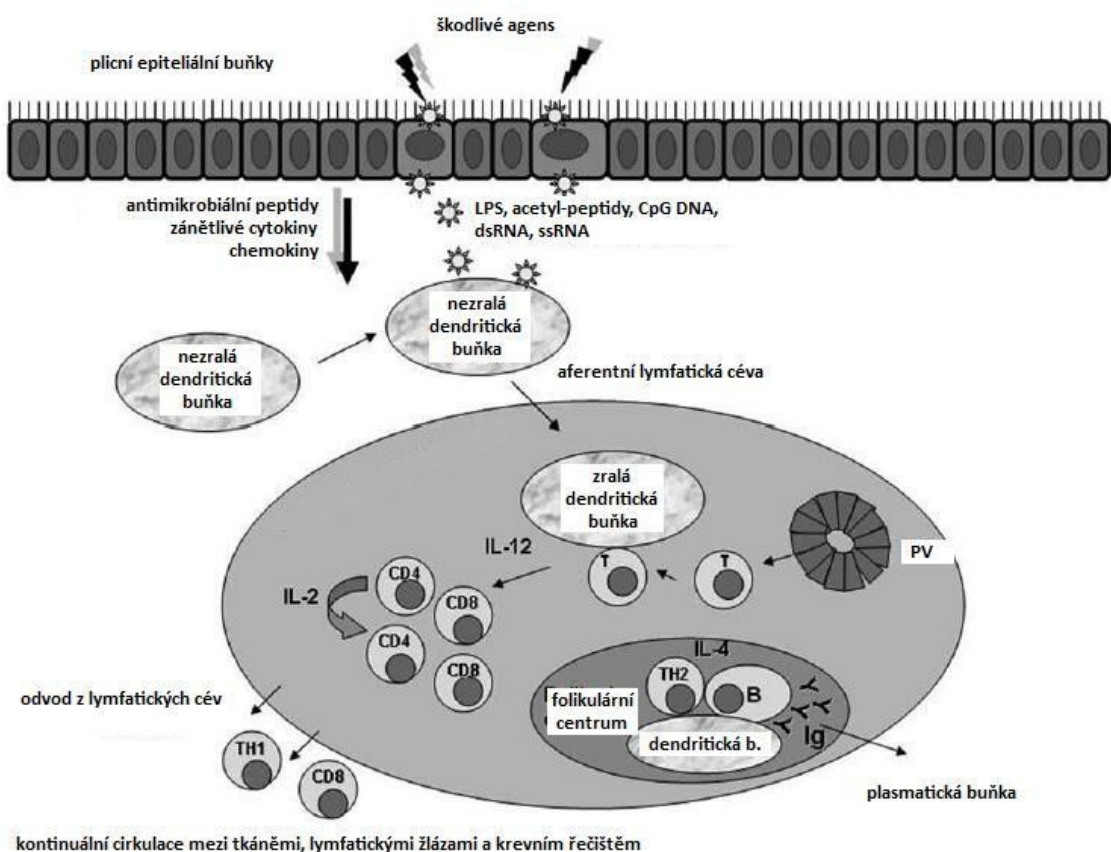
1.1.2.2 Vrozené imunitní odpovědi zdravých plic

Při podání cizorodé látky by měly plicní obranné mechanismy hostitele zabránit její penetraci hluboko do respiračního traktu, nebo cizorodou látku neutralizovat či odstranit, pokud je uložena v dolních cestách dýchacích. Imunitní odpovědi by měly být adekvátně účinné, aby chránily hostitele, a zároveň nepříliš agresivní. Pokud jsou imunitní reakce nepřiměřené, dochází během neadekvátní eradikace patogenů k ireverzibilnímu poškození plic. I přesto, že jsou cizorodé látky nepřetržitě ukládány v dýchacím traktu, mukosální a alveolární čistící mechanismy pracují s vysokou účinností. Nespecifické čistící mechanismy (mechanické bariéry a makrofágová fagocytóza) konstantně odstraňují částice a zabraňují jim ve vyvolání imunitní odpovědi.

Antigenně specifické imunitní odpovědi jsou komplexní, založené na aktivaci různých typů buněk a vzájemné interakci imunitních odpovědí. Správný sled imunitních odpovědí zajišťují nejen lymfocyty, ale také makrofágy nebo polymorfonukleární leukocyty, které interagují buď přímo pomocí adhezních molekul, nebo nepřímo pomocí cytokinů, s endoteliálními buňkami, epiteliálními buňkami nebo fibroblasty. Epiteliální buňky uvolňují cytokiny, např. IL-8, který je potencionálním chemoatraktantem pro neutrofile. Endoteliální buňky produkují adhezní molekuly pro krevní lymfocyty, neutrofile, eosinofily a monocyty, čímž zajišťují jejich přísun z extrapulmonárních částí těla do zánětlivých oblastí plic. Dalšími důležitými buňkami, které zajišťují imunitní odpovědi, jsou fibroblasty, žírné buňky, neuroendokrinní epiteliální buňky a krevní destičky [Meyer, 2002].

Pro správný průběh imunitní odpovědi je potřeba, aby došlo k interakci mezi adhezivní molekulou dendritické buňky (ICAM-1, ICAM-3 z angl. „intracellular adhesive molecule“ neboli mezibuněčná adhezivní molekula) a T-lymfocytu (LFA-1, LFA-3 z angl. „leukocyte-function-associated antigen“ neboli adhezivní molekula leukocytů). Tato interakce stimuluje T-lymfocyty k produkci IL-2 a k indukci povrchové CD40L, což je signalizační molekula z rodiny TNF na povrchu aktivovaných Th lymfocytů [Hořejší, Bartůňková, 2005], a která po ligaci s CD40, tedy s receptorovou molekulou na povrchu dendritických buněk z rodiny TNF, zvyšuje produkci IL-12 a dalších kostimulačních molekul (CD80, CD86). Důležitým krokem je exprese dalších molekul z rodiny TNF/TNFR (z angl. „tumor necrosis factor receptor“ neboli receptor faktoru nekrotizujícího nádory) dendritickými buňkami a T-lymfocyty, např. molekul

OX40/OX40L (též známé jako CD134 a jeho ligand), které podporují diferenciaci a přežití výše uvedených buněk během prvních dnů infekce. Souběžně s produkcí IL-2 exprimují T-lymfocyty i IL-2 receptory, což vede k proliferaci CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů, které opouští lymfatické uzliny a míří do krevního řečiště a do tkání [Papadaki, Velegraki, 2007]. Sled imunitních odpovědí shrnuje Obr. 3.



Obr. 3: Přehled imunitních odpovědí dýchacího traktu. Určité druhy poškození dýchacího traktu stimuluje epitelální buňky k produkci antimikrobiálních peptidů, zánětlivých cytokinů a chemokinů, které aktivují dendritické buňky. Dendritické buňky prochází skrz lymfatické cévy do lymfatických uzlin, kde prezentují antigen T-lymfocytům, které do uzlin vcestovaly postkapilárními venulami. Tato interakce stimuluje T-lymfocyty, resp. dendritické buňky, k produkci IL-2 a IL-12. IL-2 způsobuje proliferaci antigenně specifických CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů, které pronikají do krevního řečiště a do tkání. IL-12 stimuluje Th1 T-lymfocyty k imunitní odpovědi. Některé z antigenně specifických CD4⁺ lymfocytů migrují do folikulů, kde interagují s dendritickými buňkami a produkují antigenně specifické protilátky a paměťové B-lymfocyty. T – T-lymfocyt, B – B-lymfocyt,

Ig – imunoglobuliny, PV – postkapilární venuly (specializované žilky v lymfatické tkáni, podporující infiltraci lymfocytů z krve [Girard, Springer, 1995]), LPS – lipopolysacharid, CpG DNA – bakteriální DNA obsahující nemetylované CpG dinukleotidy, dsDNA - dvouvláknová DNA, ssRNA - jednovláknová RNA. Obrázek upraven a převzat z [Papadaki, Velegraki, 2007].

1.1.2.3 Regulace imunitních odpovědí v plicích

Při neustálém ukládání antigenů v plicích musí existovat mechanismy, které potlačují zánětlivé reakce, a tím zajišťují normální homeostázu plic. Spuštění imunitních reakcí brání rychlá fagocytóza, nedostatečná prezentace antigenu makrofágy a plicní surfaktant, který potlačuje lymfocyty. Když jsou nespecifické obranné mechanismy přetíženy, spustí se mechanismy specifické, řízené antigenem. Aktivace specifických imunitních odpovědí je podmíněna prozánětlivými a inhibičními cytokiny, které jsou produktem makrofágů, lymfocytů a endoteliálních a epiteliálních buněk. Rovnováha mezi těmito cytokiny určuje, zda dojde ke spuštění imunitní odpovědi. Inhalace antigenu z okolního prostředí, následovaná neadekvátními imunitními reakcemi, má za následek různá granulomatózní (plicní sarkoidóza) a negranulomatózní (idiopatická intersticiální pneumonie) zánětlivá onemocnění. Tyto odpovědi se mohou projevit po podání antigenu pacientům s nedostatečnými imunosupresivními mechanismy. Někteří jedinci, např. pracovníci vystavení působení beryllia, mohou být náchylnější k neadekvátním imunitním reakcím, pokud k tomu mají genetické dispozice [Meyer, 2002].

1.1.2.4 Pozměněné imunitní reakce a plicní choroby

Vrozená imunitní obrana může být v mnoha ohledech narušena. Častým onemocněním, které je vyvoláno sníženou funkcí obranných mechanismů, je pneumonie. Může být získána v nemocnici po tracheální intubaci, čímž dojde k porušení mechanických bariér. Potlačení mukociliární funkce má za následek inhibici čistících mechanismů, např. Kartagenerův syndrom, neboli syndrom nepohyblivých řasinek projevující se v respiračním traktu a často zapříčiňující mužskou sterilitu [Rott, 1979]. Toto potlačení vede k bakteriální kolonizaci a k periodickým infekcím dýchacích cest. Následuje porušení sliznice a plicního parenchymu, čímž dojde k další inhibici řasinkových buněk a k prohloubení onemocnění. Pneumonie způsobená bakterií *Staphylococcus aureus* je často doprovázena chřipkovou virovou infekcí. Společně potlačují čistící mechanismy,

jejichž inaktivace vytváří příhodné prostředí pro pozdější bakteriální pneumonii. Dalšími vnějšími podněty pro propuknutí této nemoci jsou kouření tabáku a zvýšená konzumace alkoholu. Mezi specifické imunitní defekty řadíme deficienci komplementu, chronické granulomatózní onemocnění nebo hypogammaglobulinémii. Další faktory, které způsobují bakteriální, plísňovou, nebo mykobakteriální pneumonii, jsou podvýživa, diabetes mellitus, podávání kortikosteroidů, imunosupresivní terapie, zhoubný nádor, cytotoxická chemoterapie a transplantace orgánu [Hořejší, Bartůňková, 2005].

Ačkoliv jsou imunitní odpovědi nepostradatelné při kontrole infekce, v některých případech mohou způsobit nevratné poškození. Inhalace anorganického prachu (např. azbestu nebo sloučenin beryllia) nemusí všem exponovaným jedincům způsobit onemocnění, projev nemoci závisí na genetických dispozicích exponovaného a na schopnosti alergenu aktivovat imunitní mechanismy. U náchylných jedinců může inhalace organických sloučenin přivodit hypersenzitivní odpověď s infiltrováním lymfocytů plicního parenchymu, např. onemocnění zvané farmářovy plíce, které je způsobeno opakovaným kontaktem s prašným a plesnivým organickým materiálem [Dickie, Rankin, 1958]. Další skupinou jsou onemocnění způsobená nedostatkem antioxidantů (ztráta glutathionu u idiopatické plicní fibrózy nebo chybějící antioxidanty u cystické fibrózy) nebo antiproteázových obranných mechanismů (např. α_1 -antitrypsinová deficience vedoucí k rozedmě plic) [Meyer, 2002].

1.1.3 Záněty plic

Zánět plic neboli pneumonie je akutní zánětlivé onemocnění, které postihuje plicní sklípky, průdušinky a plicní intersticiu. V České republice je každoročně hlášeno 80 000-150 000 pneumonií a mortalita na toto onemocnění je 29,6/100 000. Z celosvětového hlediska jsou pneumonie na třetím místě ze všech příčin úmrtí a na prvním místě ze všech infekčních onemocnění.

Pneumonie mohou být různého původu, buď infekčního (virové a bakteriální pneumonie), nebo neinfekčního. Neinfekční se dělí do několika kategorií [Babičková a kol., bez vrocení]:

- inhalační (většinou profesní původ)
- hypersenzitivní (alergické)
- iatrogenní (polékové, postiradiační)

Hypersenzitivní pneumonie neboli exogenní alergická alveolitida se v akutním stadiu projevuje zhruba po čtyřech až šesti hodinách po expozici exogennímu agens. Dochází ke zvýšení teploty, dušnosti, kašli, a pokud nenastane další expozice, symptomy spontánně vymizí do dvanácti hodin. Při opakovaných expozicích přechází akutní hypersenzitivní pneumonie do chronického stadia, které je doprovázeno závažnějšími dechovými změnami. Iatrogenní pneumonie je následkem léčby např. plicní rakoviny, kdy radiace nutná k její terapii poškozuje plicní parenchym v blízkosti nádoru, dochází k „olupování“ alveolárních buněk a vzniku žilních trombóz [Votava, 2006]. Inhalační pneumonii je věnována následující kapitola.

1.1.3.1 *Inhalační profesní alergie*

V pracovním prostředí se vyskytuje velká škála faktorů, které mohou vyvolat tzv. profesní alergii, která vzniká v přímé souvislosti s výkonem práce, resp. kontaktem s alergizující či iritující látkou [Litzman a kol., 2001].

Profesní inhalační alergeny mohou být nízkomolekulární a vysokomolekulární. Alergeny o molekulové hmotnosti větší než 3 kDa se považují za vysokomolekulární a působí jako kompletní antigeny. Za zdroje vysokomolekulárních proteinových antigenů považujeme živočišnou výrobu, potravinářský, textilní a dřevařský průmysl.

Potravinářský průmysl je významným zdrojem alergenů v podobě obilných proteinů, pylů, plísní, živočišných a hmyzích exkrementů a insekticidů. Tyto podněty způsobují nejčastěji bronchiální astma, a to především u cukrářů a pekařů, u kterých byly nalezeny specifické IgE protilátky proti albuminu a glutenu. Dalšími významnými původci inhalační profesní alergie jsou vaječné bílkoviny, na jejichž frakce byl při kožním testování potvrzen vyšší stupeň citlivosti, konkrétně na konalbumin, ovalbumin, lysozym a ovomukoid [Krčmová, 2004].

Při bronchiálním astmatu neboli chronickém zánětlivém onemocnění dýchacích cest dochází k narušení hladin Th1 a Th2 lymfocytů, jejichž základní poměr je geneticky daný. Vlivem infekce nebo alergenů se zvyšuje hladina Th2 lymfocytů. Dochází k aktivaci monocytů a vzniku makrofágů, které produkují „proastmatické“ interleukiny IL-4, IL-5, IL-9 a IL-13. Ty jsou signálem k tvorbě protilátek IgE. Při opakovaném kontaktu s alergenem dochází k vazbě komplexu antigen-IgE na povrch žírných buněk, které

uvolňují granula a zánětlivé produkty (histamin, bradykinin, prostaglandiny, leukotrieny). Následuje aktivace makrofágů, T-lymfocytů, eosinofilů, neutrofilů a rozvoj zánětu. Při opakovaném působení spouštěčů dochází k plicní hyperreaktivitě, tedy ke zvýšené citlivosti na zevní podněty s tendencí k bronchospazmům, neboli k zúžení průdušek. Následuje zvětšení hladkých svalů, edém, zvýšená produkce hlenu a aktivace nervových zakončení. Tyto procesy mohou být základem ireverzibilní neprůchodnosti plic [Babičková a kol., bez vřechení].

Profesní astma je velkým problémem nejen rozvinutých, ale i rozvojových zemí. Z celosvětového hlediska trpí profesním astmatem zhruba 10-15 % dospělých jedinců. V rozvinutých a rychle se rozvíjejících zemích je podíl nemocných přibližně stejný, a to 13-15 %, v rozvojových zemích je to okolo 6 % [Jeebhay, 2007]. V České republice je známo zhruba 250 000 astmatiků, přičemž každým rokem přibývá 80-100 případů. Celkový podíl pacientů s profesním astmatem představuje podle různých zdrojů 2-15 %, resp. 30 % všech jedinců postižených astmatem v České republice. Jedním z nejčastějších alergenů podle Mezinárodního webového serveru pro profesionální astma bývá moučný prach a alergeny vyskytující se v potravinářském průmyslu jako takovém. To potvrzuje studie uskutečněná v letech 1994-2000 na Klinice nemocí z povolání v Hradci Králové. Zde bylo v uvedeném období sledováno 112 pacientů trpících bronchiálním astmatem, alergickou rýmou nebo kombinací těchto dvou onemocnění. Výsledky potvrzují, že pacienti, zasažení oběma chorobami zároveň, byli nejčastěji zpracovatelé mouky, zejména ženy okolo 39. roku věku. K projevu alergie došlo u 29 osob po 16 a více letech profesní expozice alergenu [Boušová, 2004]. Konkrétnější studie se uskutečnila v letech 2006-2007 v Thajsku, kde byl na 167 zaměstnancích zkoumán vliv sušeného mléka, se kterým přicházeli denně do bezprostředního kontaktu, a dále na 24 zaměstnancích, pracujících v administrativě v této a třech dalších továrnách s možným výskytem podobných alergenů. Sušené mléko obsahuje kasein, α -laktalbumin a β -laktoglobulin, které jako typické vysokomolekulární alergeny vyvolávají hypersenzitivní reakce zprostředkované protilátkami IgE. V této studii bohužel nebyly proměřeny hladiny specifických IgE protilátek. Průměrná koncentrace vdechovaného prachu v továrně zpracovávající sušené mléko se ve výrobě pohybovala v rozmezí 0,02-2,18 mg/m³. Koncentrace prachu v oddělení administrativy není uvedena. Studie potvrdila, že pracovníci vystavení působení alergenu přímo, trpěli dýchacími obtížemi ve větší míře,

než pracovníci v administrativě, konkrétně sítáním a ztíženým dýcháním, které se projevilo s 24%, respektive 30% zastoupením, oproti 12%, respektive 16% zastoupení u skupiny administrativních pracovníků [Sripaiboonkij a kol., 2008].

1.1.3.2 Cytokiny přítomné při zánětech plic

Jelikož se ve své práci zabývám procesy zánětu na buňkách plicního epitelu, je tato kapitola věnována podrobnějšímu popisu nejdůležitějších cytokinů přítomných při zánětu plic.

Často se opakující zánětlivá onemocnění dýchacích cest vedou k bronchiálnímu astmatu. U takto postižených jedinců způsobuje zánět hyperreaktivitu na řadu podnětů. Astma se v ČR vyskytuje asi u 5 % obyvatel a jeho výskyt stále stoupá, mortalita se pohybuje okolo dvou set osob za rok. Onemocnění postihuje především osoby mladšího věku [Babičková a kol., bez vrocení]. Cytokiny jsou v poslední době nejstudovanějšími mediátory astmatu. Velký podíl na zkoumání v této oblasti má použití myších modelů, které umožnily tento výzkum zejména díky své známé genové výbavě, dostupnosti a rozsáhlé možnosti genetické modifikace. Alergický zánět plic je u myši vyvolán ve dvou fázích. V první, indukční fázi, dochází k senzibilizaci zvířete pomocí alergenu podaného subkutánně nebo intraperitoneálně, v druhé, udržovací fázi, je myš vystavena stejnému alergenu, který je nyní podán dýchacími cestami. Indukční fáze vede ke vzniku T-buněčných odpovědí doprovázených rozvojem protilátek IgE proti alergenu. Udržovací fáze je provázena rozvojem neadekvátních imunitních odpovědí a zvyšující se koncentrací zánětlivých buněk. Ty jsou z plic pokusného zvířete získány pomocí bronchoalveolární laváže s následnou centrifugací. Tím dojde ke vzniku pelety s usazenými buňkami a v takto získaném supernatantu se zkoumá hladina a typ jednotlivých cytokinů, které svědčí o různých druzích a úrovních zánětu [Dakhama, Gelfand, 2006].

Jak bylo již uvedeno v kap. 1.1.1.3 Oblast výměny plynů, str. 6, během plicního zánětu se zvyšuje koncentrace eosinofilních granulocytů v plicích. Mechanismy transportu eosinofilů do plic mohou být dvojího typu, závislé a nezávislé na imunoglobulinech typu E, přičemž existence obou mechanismů byla potvrzena řadou studií. V jedněch byla zvířata pasivně imunizována pomocí IgE protilátek proti ovalbuminu a následně vybuzena pomocí antigenu. Výsledkem byl transport eosinofilních granulocytů do plic. Jiné studie zkoumající alternativní mechanismy zánětu potvrzují pravý opak. Zde byly použity myši

s potlačenou schopností produkce protilátek IgE. I navzdory této inhibici byly myši schopné infiltrace eosinofilů do plic. Tyto studie společně potvrzují existenci mechanismů závislých i nezávislých na imunoglobulinech [Riffo-Vasquez a kol., 2000]. Následující odstavce se věnují funkci a vzájemné interakci nejdůležitějších zánětlivých cytokinů.

- **IL-4 a IL-13**

Lidský IL-4 je glykoprotein o molekulové hmotnosti 20 kDa. Je produkován T-lymfocyty, žírnými buňkami a basofily po navázání antigenu na TCR, respektive po vazbě IgE na receptor žírných buněk a basofilů. Jeho produkce nastupuje během několika hodin a má přechodné trvání, řádově jeden až dva dny. Na přítomnost IL-4 odpovídají buňky endotelu úpravou exprese nejrůznějších adhezivních molekul, což vede k selektivnímu vychytávání eosinofilů z krevního řečiště a jejich distribuci do tkáně, kde dochází k zánětu. Tento proces je doprovázen mediátory, které jsou produkovány žírnými buňkami. IL-4 zároveň podporuje růst žírných buněk [Panzner, 2004]. Schopnost IL-4 vychytávat eosinofily z krevního řečiště potvrzují studie na myších modelech, kterým byly po potlačení exprese genu pro IL-4 podány protilátky proti IL-4, což vyvolalo pokles transportu eosinofilů do zanícených tkání. Existují i studie, které potvrzují, že k influxu eosinofilů do postižených tkání dochází i bez účasti IL-4. Přijatelným vysvětlením tohoto diskutabilního problému je skutečnost, že výsledků jednotlivých experimentů bylo dosaženo při různých podmínkách. Ať už jsou tyto mechanismy na přítomnosti IL-4 závislé nebo ne, v obou případech dochází k intenzivnímu rozvoji zánětu.

IL-13 je pleiotropní cytokin, který stimuluje B-lymfocyty k produkci protilátek IgE, podporuje diferenciaci Th2 lymfocytů, brání T-lymfocytům v produkci IFN- γ , podporuje aktivaci lidských eosinofilů *in vitro* a zvyšuje expresi lipoxygenasy v makrofázích a plicním epitelu, která se podílí na syntéze mediátorů žírných buněk. U pokusných zvířat vystavených působení IL-13 je pozorována produkce mucinu a IgE a influx eosinofilů do zanícených oblastí. Současné studie prokázaly pozitivní vliv protilátek proti IL-13, kterými byly imunizovány experimentální myši vystavené působení alergenu. Imunizace vedla k inhibici nadměrných imunitních reakcí a potlačení produkce mucinu.

Uvedené studie společně potvrzují fakt, že IL-4 a IL-13 plní podobné funkce a potlačení produkce obou cytokinů vede k plnému utlumení zánětlivých odpovědí [Riffo-Vasquez, 2000].

- **IL-5**

IL-5 je homodimer glykoproteinového typu, který je produkován Th2 lymfocyty, žírnými buňkami a eosinofily. Účinky IL-5 se projevují proliferací eosinofilních prekurzorů v kostní dřeni a jejich diferenciací na zralé eosinofily, jejichž pohotovost a degranulaci IL-5 rovněž stimuluje. IL-5 má na eosinofilech a basofilech svůj receptor, který je složen z podjednotek α a β , přičemž podjednotka α je hlavním místem vazby IL-5, zatímco podjednotka β IL-5 neváže, ale podílí se na přenosu signálu do buňky [Panzner, 2004].

Existují experimentální studie, které prokazují zvýšený výskyt imunitních odpovědí experimentálních myší, kterým byly před expozicí alergenu aplikovány monoklonální protilátky proti IL-5. Dále byly provedeny experimenty, jejichž výsledkem je snížený výskyt imunitních odpovědí a plicní eosinofilie u myší postrádajících gen pro IL-5. Těmto poznatkům však odporují jiné pokusy potvrzující fakt, že myš s vyřazeným genem pro IL-5 je stále schopna influxu eosinofilů do zánětlivých míst. Je tedy možné, že zvýšená eosinofilie je i po vyřazení genu pro IL-5 řízena alternativní cestou. Tato hypotéza vyžaduje další objasnění [Riffo-Vasquez, 2000]. Zároveň bylo zjištěno, že snížená hladina IL-5 je doprovázena poklesem hodnot IL-13 v bronchoalveolární laváži experimentálních myší, což potvrzuje fakt, že produkce IL-13 se řídí přítomností IL-5. Tato skutečnost byla prokázána pro myší CD4+ T-lymfocyty a lidské eosinofily.

Hladina IL-5 byla v několika studiích sledována i na lidských dobrovolnících. U zdravých jedinců i astmatických pacientů byla po expozici oxidu dusičitému zjištěna zvýšená hladina IL-5, která byla rovněž pozorována i u astmatických pacientů po kontaktu s ozonem [Wu a kol., 2010]. Je tedy experimentálně prokázáno, že během plicního zánětu dochází k produkci IL-5 i u člověka.

- **IL-6, IL-9, IL-10**

Zdrojem IL-6 jsou převážně makrofágy, v menší míře eosinofily, Th2 lymfocyty a epitelové a žírné buňky. Zvýšená exprese IL-6 během astmatického zánětu vede k produkci IgE a k nadměrnému růstu hladkého svalstva průdušek [Panzner, 2004]. Zvýšené hladiny tohoto cytokinu byly pozorovány po aplikaci metacholinu zdravým dobrovolníkům [Riffo-Vasquez, 2000]. Metacholin se používá k vyvolání bronchokonstrikce, neboli zúžení

průdušek, při bronchoprovokačních testech používaných pro diagnózu astmatu nebo ke zjištění zvýšené reaktivity průdušek [Connolly a kol., 1992].

IL-9 byl původně považován za růstový faktor pro T-lymfocyty. Jeho produkce je však převážně umožněna Th2 lymfocyty a jeho hlavní funkcí je stimulace zrání aktivovaných T-lymfocytů, stimulace tvorby IgE a stimulace tvorby a diferenciací žírných buněk [Panzner, 2004].

Zvýšená produkce IL-10 během zánětu je způsobena Th1 lymfocyty, Th2 lymfocyty a makrofágy. Provedené experimenty uvádí, že vyšší hladiny IL-10 inhibují aktivaci makrofágů a Th1 lymfocytů a snižují hladinu eosinofilů, čímž prodlužují dobu trvání nadměrné imunitní odpovědi a produkce prozánětlivých cytokinů. Výsledky dalších studií potvrzují fakt, že IL-10 se chová jako endogenní supresor alergických reakcí [Riffo-Vasquez, 2000].

• **IL-1 β a TNF- α**

IL-1 β patří společně s IL-1 α do rodiny IL-1 cytokinů. Tento cytokin obsahuje ve své struktuře 12-14 β skládaných listů, uspořádaných do tvaru „barelu“. Je syntetizován z biologicky inaktivního proteinového prekurzoru proIL-1 β o molekulové hmotnosti 31 kDa. Po rozštěpení na peptid o velikosti 17 kDa se stává biologicky aktivní [Dinarello, 1994]. K rozštěpení dochází v místech sousedících s alaninem pomocí trypsinu, elastasy, chymotrypsinu, chymasy žírných buněk a nejrůznějších proteas [Dinarello, 1998]. Hlavními zdroji IL-1 β jsou makrofágy a epitelie. Je nepostradatelným růstovým faktorem pro Th2 lymfocyty a je rovněž důležitý pro stimulaci epitelu k sekreci hlenu [Panzner, 2004].

TNF- α je pluripotentní cytokin, který je produktem monocytů, neutrofilů, alveolárních makrofágů, žírných buněk a buněk plicního epitelu. Potencionálním zdrojem mohou být i T-lymfocyty [Kips a kol., 1993]. Vyskytuje se ve formě trimeru, přičemž jeden jeho monomer o molekulové hmotnosti 17 kDa obsahuje ve své struktuře antiparalelní β skládané listy. Ty jsou uspořádány do tvaru připomínajícího „roládu“, v jejímž jádře se nachází disulfidická vazba. Většina vzájemných interakcí mezi podjednotkami tohoto trimeru je zprostředkována hydrofobními zbytky aminokyselin [Eck, Sprang, 1989]. Produkce TNF- α během plicního zánětu vede k infiltraci neutrofilů do plic, aktivaci

zánětlivých buněk a proliferaci fibroblastů [Panzner, 2004]. Experimenty provedené na potkanech vystavených bakterii *Corynebacterium parvum* zjistily, že nejvyšší koncentrace TNF- α je dosaženo po 8 hodinách a největší infiltrace neutrofilů je pozorována 16 hodin po expozici [Li a kol., 1995].

Pro stimulaci buněk k produkci cytokinů se používá cytokin TNF- α a lipopolysacharid (LPS). LPS je komplexní molekula složená z lipidů a sacharidů, vzájemně spojených kovalentními vazbami. Vyskytuje se na vnější membráně gramnegativních bakterií a je častým podnětem k vyvolání imunitní reakce [Brabcová, bez vrocení].

1.2 Protilátky

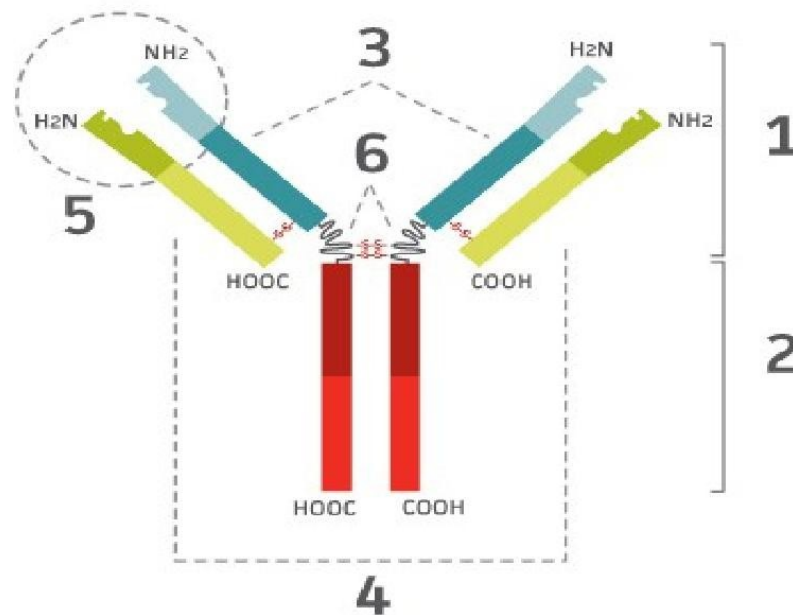
Protilátky neboli imunoglobuliny jsou glykoproteiny schopné vázat velmi specificky antigeny. Jsou produkovány plazmatickými buňkami, které jsou konečným vývojovým stádiem B-lymfocytů.

1.2.1 Savčí protilátky

Savčí protilátky se dělí do pěti tříd: IgG, IgM, IgA, IgE a IgD. Složení molekul imunoglobulinů se liší podle jednotlivých tříd, základem je však struktura obsahující dva lehké (z angl. „light“) a dva těžké řetězce (z angl. „heavy“) [Litzman a kol., 2001]. Těžké řetězce se skládají ze čtyř strukturně podobných domén složených ze 110-120 aminokyselin. Těžké řetězce jsou známy v pěti základních typech: γ řetězec přítomen v IgG, α v IgA, μ v IgM, ϵ v IgE a δ v IgD. Lehké řetězce se skládají ze dvou imunoglobulinových domén a jsou známy ve dvou typech: κ a λ , přičemž oba druhy se mohou objevovat ve všech třídách imunoglobulinů. Molekulová hmotnost lehkých řetězců je přibližně 25 kDa, hmotnost těžkých řetězců se pohybuje v rozmezí 50-75 kDa v závislosti na třídě.

Domény přítomné na N-konci obou řetězců jsou variabilní, označují se V_H a V_L a jsou součástí tzv. Fab fragmentu (z angl. „antigen-binding fragment“ neboli fragment vázající antigen), který umožňuje specifickou vazbu na antigen a je od zbytku imunoglobulinu oddělitelný pomocí enzymu papainu. Právě díky specifitě vazby na příslušný antigen se tato doména u jednotlivých imunoglobulinů strukturně liší. Ostatní domény jsou konstantní, tedy shodné pro všechny imunoglobuliny určité třídy, mezi jednotlivými třídami se však odlišují. Označují se C_L nebo C_H v závislosti na typu řetězce. Součástí

konstantní domény je Fc fragment (z angl. „crystallizable fragment“ neboli krystalizovatelný fragment), který zajišťuje aktivaci komplementu a opsonizaci [Hořejší, Bartůňková, 2005]. Strukturu protilátky znázorňuje Obr. 4.



Obr. 4: Struktura protilátky. 1 – Fab fragment, 2 – Fc fragment, 3 – těžké řetězce s V_H doménou (světle modrá) a C_H doménou (tmavě modrá + červená), 4 – lehký řetězec s V_L doménou (tmavě zelená) a C_L doménou (světle zelená), 5 – místo vazby antigenu, 6 – pantová oblast vyznačující se ohebností a přizpůsobivostí struktury protilátky vůči antigenu. Jednotlivé řetězce jsou navzájem propojeny disulfidickými (cystinovými) můstky. Obrázek upraven a převzat z [<http://www.bioatla.com>, 2011].

1.2.2 Ptačí protilátky

Na rozdíl od savců existují u ptáků pouze tři třídy imunoglobulinů: IgM, IgY a IgA. Strukturně se liší od lidských imunoglobulinů, jejichž lehké řetězce se skládají ze dvou domén κ a λ , zatímco lehké řetězce ptačích protilátek obsahují pouze jednu doménu λ . Nejvýraznější rozdíl mezi savčími a ptačími protilátkami je patrný u IgY, který byl dlouhou dobu označován jako IgG, jelikož plní stejnou funkci. IgY se v ptačím séru vyskytuje v koncentraci 4,5-5 mg/ml. Na rozdíl od savčího IgG má ptačí IgY nižší izoelektrický bod a je elektronegativnější. Ptačí IgY má také delší těžký řetězec složený ze čtyř konstantních domén, chybí však pantová oblast, zatímco savčí IgG disponuje třemi doménami a již výše zmíněnou pantovou oblastí [Tizard, 2002]. Dalším rozdílem

mezi ptačím IgY a savčím IgG je různý obsah sacharidů. Ptačí IgY je glykosylován z 4 %, zatímco savčí IgG disponuje pouze 2 % sacharidů.

1.2.3 Výhody ptačích protilátek oproti savčím

Izolace ptačích protilátek z vajec je snadnější než izolace savčích protilátek z krve. Specifické protilátky např. proti H5N1 viru ptačí chřipky lze izolovat z komerčně dostupných slepičích vajec ve Vietnamu [Nguyen a kol., 2010]. Výhodou je také značná produkce vajec. Uvádí se, že z vajec jedné slepice lze připravit takové množství IgY, které odpovídá IgG připravenému z krve třiceti králíků. Roční zisk z jednoho produkčního zvířete je tedy přibližně 25 g protilátek [Hatta, 1990]. Oproti savčím protilátkám rozpoznávají ptačí protilátky více epitopů na antigenu. Ptačí protilátky při kontaktu s antigenem také neaktivují systém komplementu u savců. Naopak při interakci antigenu se savčí protilátkou může docházet u savců k aktivaci systému komplementu, která iniciuje zánětlivé procesy a tím poskytuje falešně pozitivní výsledky v testech [Ntakarutimana, 1992].

1.2.4 Monoklonální a polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky jsou produktem mnoha aktivovaných klonů B-lymfocytů. Jelikož jsou antigeny často značně komplexní sloučeniny, prezentují řadu epitopů, které jsou rozpoznávány velkým množstvím T-lymfocytů. Každý takto aktivovaný T-lymfocyt se diferencuje na plazmatickou buňku a výsledná protilátková odpověď je polyklonální. Při vzniku polyklonální odpovědi dochází k produkci stovek či tisíců individuálně odlišných molekul imunoglobulinů, jejichž směs poté reaguje s řadou epitopů na určitém antigenu. Naproti tomu monoklonální protilátky jsou produktem klonální populace jednoho aktivovaného B-lymfocytu, mají přesně definované vlastnosti, váží antigen s vysokou specifitou a díky tomu jsou cílené pouze proti jedinému antigenu a epitopu [Lipman a kol., 2005].

Pro přípravu polyklonálních protilátek je potřeba imunizovat myš antigenem nebo jejich směsí a následně odebrat sérum s obsahem protilátek [Wang a kol., 2006].

Princip přípravy monoklonálních protilátek vyžaduje složitější postup. Myš je nejprve imunizována antigenem, následně usmrcena a jsou jí odebrány B-lymfocyty. Při maligním

zvrhnutí plazmatické buňky schopné produkce monoklonálních protilátek dochází ke vzniku nádoru, označovaného jako myelom. Odebrané B-lymfocyty jsou „fúsovány“ s buňkami myšního myelomu za vzniku konstruktů zvaného hybridom. Ten získává od myelomu „nádorovou nesmrtnost“ a schopnost tvorby imunoglobulinů a od B-lymfocytů informaci, proti jakému antigenu budou protilátky produkovány. Takto vytvořený hybridom je možno v podstatě neomezeně množit, kultivovat a využít k produkci požadované monoklonální protilátky [Litzman a kol., 2001]. Kultivace *in vitro* umožňuje jednodušší izolaci čistých imunoglobulinů, než kultivace *in vivo*. Při *in vitro* kultivaci se získá monoklonálních protilátek pohybuje v rozmezí 10-200 µg na ml kultivačního média. Z pohledu výtěžku je však vhodnější kultivace *in vivo*, při které je produkční myš intraperitoneálně injikován výše zmíněný hybridom. Každý ml získané ascitické tekutiny pak poskytuje 2-20 mg monoklonálních protilátek [Zajoncová, bez vrocení].

Produkce polyklonálních protilátek není finančně náročná a nevyžaduje odbornou technickou způsobilost, s jakou by měly být produkovány monoklonální protilátky. Doba přípravy polyklonálních protilátek se pohybuje řádově v měsících, zatímco monoklonální protilátky je možné získat až po roce, někdy i po delší době. Hlavní výhodou monoklonálních protilátek je jejich vysoká specifita vůči konkrétnímu antigenu, což umožňuje rozpoznávat změny v molekulárních strukturách, protein-proteinové interakce nebo identifikovat jednotlivé členy proteinových rodin. Naproti tomu i malá změna ve struktuře epitopu, např. důsledkem genetického polymorfismu, denaturace nebo glykosylace, značně omezuje účinnost monoklonální protilátky rozpoznávající tento epitop na antigenu. Přesto jsou monoklonální protilátky hojně vyhledávaným imunoterapeutickým prostředkem [Lipman a kol., 2005].

Důsledkem aplikace myších monoklonálních protilátek do lidského těla ale často bývá produkce anti-myších protilátek, což urychluje eliminaci monoklonálních protilátek z organismu a znemožňuje jejich terapeutické působení. Proto se používají tzv. vysoce humanizované protilátky, které jsou z větší části lidské, pouze CDR oblast (z. angl. „complementarity determining region“ neboli oblast určující komplementaritu), která je součástí variabilní domény, je myšního původu. [Wang a kol., 2006].

Současné studie také zkoumají možnost přípravy chimérních monoklonálních protilátek kombinací savčích konstantních domén se slepičími variabilními doménami. Chimérní monoklonální protilátky složené z myší konstantní domény a slepičí variabilní domény vykazovaly stejnou afinitu k příslušnému antigenu jako parentální slepičí protilátka. Experimentální myš, které byly tyto protilátky injikovány, pak nevykazovala známky zánětlivých reakcí. Pro klinickou praxi byly vytvořeny i humanizované protilátky, jejichž CDR obsahovaly úseky aminokyselinové sekvence shodné se sekvencí slepičích protilátek. Takto vytvořené protilátky vykazovaly stejnou afinitu k určitému antigenu jako chimérní protilátky složené z lidských a myších domén. Jako testovací antigen byl použit lidský a myší cytokin IL-12. Vzhledem k tomu, že se jedná o relativně nedávné experimenty, bylo by vhodné je rozšířit o další poznatky. Nicméně už nyní je zřejmé, že umožňují širší využití monoklonálních slepičích protilátek [Zhang, 2010].

2 Cíl práce

Účelem této práce je objasnit funkce mechanických plicních bariér a plicní imunity a prostudovat proces zánětu na buňkách plicního epitelu. Dalším záměrem je zjištění produkce zánětlivých cytokinů lidskými buňkami nádorové linie A549, které jsou vystaveny působení savčích a ptačích protilátek, konkrétně slepičích imunoglobulinů typu Y a lidských a kozích imunoglobulinů typu G.

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie a materiál

Biochrom

penicilin-streptomycin-gentamicin (PSG)

Gibco

Iscove's Modified Dulbecco's Medium GlutaMAX™-I (IMDM)

(obohacené syntetické médium vhodné pro rychle proliferující buňky)

fetální sérum Fetal Bovine Serum (FBS)

trypsin-EDTA 0,05%

Lach-Ner

NaCl, p. a.

Penta

Na₂HPO₄ · 12 H₂O, p. a.

R&D Systems

mikročástice LUH201 (pro IL-1β) a LUH206 (pro IL-6)

souprava Fluorokine MAP Human Base Kit A

TNF-α

Sigma-Aldrich

lipopolysacharid (LPS)

ostatní

destilovaná voda

kozí imunoglobulin typu G (gIgG)

(lyofilizovaný prášek)

poskytnuto prof. P. Hodkem

lidský imunoglobulin typu G (hIgG)

(lyofilizovaný prášek)

poskytnuto prof. P. Hodkem

slepičí imunoglobulin typu Y, vzorek č. 1 (IgY1) poskytnuto prof. P. Hodkem
(kontrolní frakce po gelové filtraci)

slepičí imunoglobulin typu Y, vzorek č. 2 (IgY2) poskytnuto prof. P. Hodkem
(zvířata imunizována peptidem z cytochromu P450, lyofilizovaný prášek, nepurifikováno)

3.2 Použité pomůcky

Axygen

mikrozkumavky MCT-200-C 2,0 ml

Biohit

mikropipety a špičky – různé druhy

Corning

6-jamkové destičky

96-jamková destička

centrifugační tuba 15 ml

kultivační nádobka 75 cm² a 25 cm², filtr 2 μm

Eppendorf

mikropipety a špičky – různé druhy

Chirana

injekční stříkačky 2 ml, 20 ml

Millipore

mikrofiltr Milex 6V 0,22 μm

Omnifix

injekční stříkačky 5 ml

R&D Systems

96-jamková destička s membránou

(součástí soupravy Fluorokine MAP Human Base Kit A)

Roth

dialyzační střevo Visking 8/32

Sartorius

mikrofiltr Minisart NML SM 16534 0,2 µm

3.3 Použité přístroje

ATI Orion

pH metr model 370

BioAir

laminární box TopSafe 1.2

Eppendorf

centrifuga MiniSpin Plus

Heidolph

třepačka Rotamax 120

Hettich

centrifuga Rotanta 96

IKA

magnetická míchačka KMO 2 Basic

třepačka Yellowline TTS 2

Kern

předvážky EW 600

Laboratorní přístroje Praha

magnetická míchačka MM 2A

Labox

laminární box Bio 126

Leitz

mikroskop Fluovert

Luminex

analyzátor Luminex 100™

program Luminex 100 IS software

Mada Medical Products

vakuová pumpa Mada Vac II No. 178

Mom Budapest

spektrofotometr Spektromom 195 D

Pesa

analytické váhy 40 SM-2M

Sanyo

centrifuga Micro Centaur

CO₂ inkubátor MCO 17AI

3.4 Použité metody

3.4.1 Dialýza protilátek

- *použité roztoky:*

PBS: 0,01 M Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 0,1 M NaCl, pH 7,2

Protilátka IgY1 byla obdržena ve formě roztoku. Zbývající protilátky, tedy IgY2, gIgG a hIgG byly obdrženy ve formě lyofilizovaného prášku.

Do tří mikrozkušavek bylo postupně odváženo jednotlivé protilátky o přibližně stejné hmotnosti a každá byla rozpuštěna ve 2 ml PBS. Ze vzorku IgY1 byly do mikrozkušavky pipetovány 2 ml roztoku, který byl centrifugován 7 min při 13000 RPM (Sanyo). Supernatant byl 2x zředěn roztokem PBS. Protilátky byly dialyzovány za stálého mírného míchání (Laboratorní přístroje Praha) po dobu tří dnů s každodenní výměnou PBS.

3.4.1.1 Stanovení koncentrace imunoglobulinů spektrofotometricky

Protilátky byly centrifugovány 10 min při 13000 RPM (Sanyo). Ze supernatantu bylo odebráno 50 μ l a pipetováno do 2,5 ml PBS v křemenné kyvetě (ředěno 51x). Byla změřena absorbance při 280 nm proti 2,5 ml PBS. Uvedený postup byl aplikován na všechny protilátky. Koncentrace imunoglobulinů ve vzorku byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$c = A_{280} \cdot f_x \cdot n$$

c – koncentrace vzorku [mg/ml]

A_{280} – absorbance při 280 nm

f_{IgY} – empirický faktor pro IgY = 1,094

f_{IgG} – empirický faktor pro IgG = 1,360

n – ředění vzorku

Veškerý objem protilátek a 30 ml PBS byly sterilně pipetovány do mikrozkušavek a centrifugačních tub a uchovány při teplotě 4°C.

3.4.2 Pasážování buněk A549 a jejich příprava k aplikaci protilátek

- *použité roztoky:*

0,05% trypsin-EDTA

10% (v/v) FTS

IMDM médium s 1% (v/v) obsahem PSG a 10% (v/v) obsahem FTS

Buňky z linie A549 jsou buňky lidského adenokarcinomu odvozené od alveolárních buněk II. typu, které při kultivaci tvoří konfluentní vrstvu na povrchu kultivační nádoby. Veškeré níže uvedené experimenty byly provedeny na oddělení Klinické a transplantační imunologie v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM).

Z kultivační nádoby s buňkami bylo odlito staré médium a přidáno 5 ml roztoku trypsin-EDTA pro odstranění buněk z povrchu kultivační lahve. Po pěti minutách působení byl povrch lahve několikrát opláchnut stejným roztokem pro získání maximálního počtu

buněk. Do centrifugační tuby byl pipetován veškerý objem suspenze v kultivační lahvi a 1 ml FTS pro zastavení účinku roztoku trypsin-EDTA. Roztok byl doplněn 10 ml IMDM média a centrifugován po dobu 5 min při 1300 RPM (Hettich). Po odlití veškerého supernatantu byla vzniklá peleta resuspendována ve 25 ml IMDM média, bylo přidáno 2,5 ml FTS, suspenze byla promíchána a do každé jamky na 6-ti jamkové destičce byly pipetovány 2 ml. Zbylý objem byl pipetován do kultivační lahve o velikosti 25 cm² pro další kultivaci buněk. Tento postup byl proveden celkem třikrát, bylo tedy připraveno 18 jamek. Buňky byly uchovány 2-3 dny při 37°C v prostředí 5% CO₂.

3.4.3 Aplikace protilátek a sběr supernatantů

- *použité roztoky:*

IMDM médium s 1% (v/v) obsahem PSG a 10% (v/v) obsahem FTS

LPS (výchozí koncentrace: 1 mg/ml, výsledná koncentrace ve směsi: 1 mg/ml)

PBS: 0,01 M Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 0,1 M NaCl, pH 7,2 (výsledná koncentrace ve směsi: 1 mg/ml)

roztoky protilátek (výsledná koncentrace ve směsi: 1 mg/ml)

TNF-α (výchozí koncentrace: 100 μg/ml, výsledná koncentrace ve směsi: 100 μg/ml)

Po uplynutí 2-3 dnů od přípravy buněk (podle jejich stavu) byla mikroskopicky překontrolována konfluentní vrstva buněk. Jako pozitivní kontrola pro navození produkce cytokinů byl použit cytokin TNF-α a LPS. Jako negativní kontrola sloužilo IMDM médium a PBS. Do každé ze sedmnácti jamek bylo pipetováno IMDM médium a příslušné protilátky, stimulanty a PBS v takovém objemu, aby bylo dosaženo jejich vhodné koncentrace ke stimulaci. Celkový objem směsi v každé jamce byl 2 ml. Do osmnácté jamky bylo pipetováno pouze IMDM médium. Buňky byly kultivovány po dobu 24 hod v prostředí příslušných protilátek, TNF-α, LPS, PBS nebo pouhého IMDM média. Poté byly supernatanty pipetovány do mikrozkuvek a uchovány při -18°C po dobu 8 dnů.

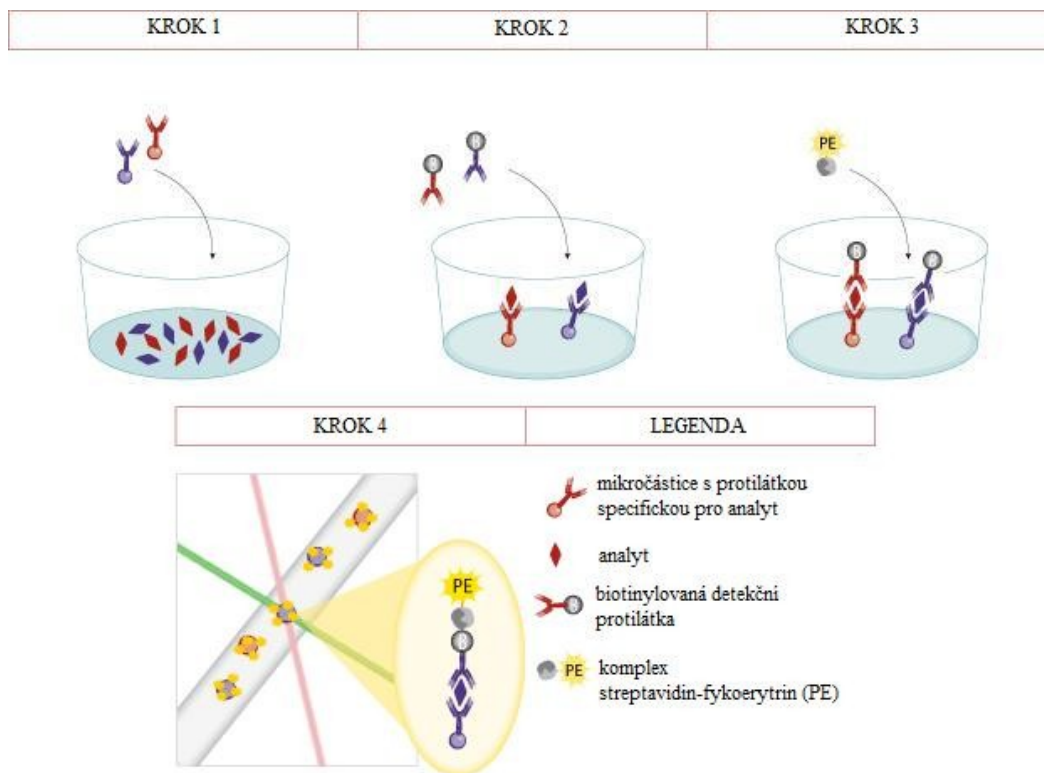
3.4.4 Měření koncentrace cytokinů metodou Luminex

- *použité roztoky:*

mikročástice LUH201 (pro IL-1 β) a LUH206 (pro IL-6)

roztoky ze soupravy Fluorokine MAP Human Base Kit A: 2 směsi standardů, rozpouštědlo pro mikročástice, kalibrační rozpouštědlo, promývací roztok, rozpouštědlo pro biotinylovanou protilátku, roztok streptavidin-fykoerytrin (PE)

Metoda Luminex MAP (z angl. „multi analyte profilig“ neboli analýza více analytů) umožňuje hromadnou analýzu několika analytů, např. cytokinů, najednou. Příprava vzorků probíhá v 96-jamkové destičce s membránou, která umožňuje promývání vzorků pomocí odsávání. Princip přípravy vzorků analytů a měření koncentrace cytokinů je znázorněn na Obr. 5, str. 35. Základem měření jsou univerzální mikročástice, na jejichž povrch jsou navázány specifické protilátky proti analytu, které po přidání vzorku selektivně váží příslušný analyt. Po odmytí všech nenavázaných mikročastic se směs nechá reagovat s biotinylovanou detekční protilátkou, která se opět specificky váže na příslušný analyt. Po dalším promytí se ke směsi pipetuje komplex streptavidin-fykoerytrin, který se specificky váže na detekční protilátku. Po posledním promytí je reakční směs analyzována samotným přístrojem Luminex. Komplex mikročastic se vzorkem protéká tenkým kanálem, který je ozařován dvěma lasery. Jeden laser detekuje intenzitu fluorescence mikročastic, čímž určuje typ stanovovaného analytu, druhý laser je specifický pro fykoerytrin a měří intenzitu fluorescence fykoerytrinu, která je přímo úměrná koncentraci navázaného analytu.



Obr. 5: Princip přípravy vzorků analytů a měření koncentrace cytokinů metodou Luminex. Krok 1 – ke vzorku jsou pipetovány mikročástice s protilátkou; krok 2 – mikročástice s protilátkou váží příslušný analyt, ke vzorku jsou pipetovány mikročástice s biotinylovanou detekční protilátkou; krok 3 – biotinylovaná detekční protilátka váže příslušný analyt, ke vzorku je pipetován komplex streptavidin-PE; krok 4: streptavidin v komplexu s PE váže biotin na biotinylované detekční protilátce, mikročástice jsou analyzovány dvěma lasery přístroje Luminex, které určují typ a koncentraci příslušného analytu. Obrázek upraven a převzat z [http://www.rndsystems.com/product_detail_objectname_fmap_panels.aspx, 2011].

Nejprve byl připraven promývací roztok a kalibrační rozpouštědlo ředěním v destilované vodě. Poté byly připraveny roztoky standardů ředěním v kalibračním rozpouštědle. Trojkovou ředící řadou bylo připraveno osm roztoků standardů o různých koncentracích. Mikročástice s navázanými protilátkami proti IL-1 β a mikročástice s protilátkami proti IL-6 byly naředěny rozpouštědlem pro mikročástice. Do jamek v 96-jamkové destičce byly pipetovány standardy v paralelním provedení a vzorky supernatantů. Následovala inkubace s mikročasticemi s navázanými protilátkami proti IL-1 β a IL-6 a po promytí promývacím roztokem byly vzorky a standardy

inkubovány s biotinylovanou protilátkou, předem naředěnou příslušným rozpouštědlem. Po dalším promytí následovala inkubace s komplexem streptavidin-PE, který byl předem naředěn promývacím roztokem. Následovalo poslední promytí promývacím roztokem a samotné měření přístrojem Luminex. Nastavení a měření byla provedena dle přiloženého návodu výrobce. Podrobnější popis přípravy roztoků je uveden v příloze.

4 Výsledky

4.1 Aplikace protilátek a sběr supernatantů

Buňky nevytvořily při první kultivaci požadovanou konfluentní vrstvu, i přesto však byly vystaveny působení protilátek (destička č. 1). Pro získání věrohodných výsledků byly buňky kultivovány na dvou dalších 6-ti jamkových destičkách (destička č. 2 a 3) za účelem vytvoření konfluentní vrstvy buněk vhodné pro aplikaci protilátek v paralelním provedení. Tabulka č. 1 uvádí schéma experimentálního uspořádání aplikace protilátek, stimulantů a negativních kontrol.

Tab. č. 1: Schéma experimentálního uspořádání aplikace protilátek, stimulantů a negativních kontrol

destička č. 1 seminokonfluentní v.	s-IgY1	s-gIgG	s-TNF- α
	s-IgY2	s-hIgG	s-PBS
destička č. 2 konfluentní vrstva	k1-IgY1	k1-IgY2	k1-gIgG
	k2-IgY1	k2-IgY2	k2-gIgG
destička č. 3 konfluentní vrstva	k1-hIgG	k-TNF- α	k-PBS
	k2-hIgG	k-LPS	k-IMDM

s – vzorek protilátky na semikonfluentní vrstvě buněk

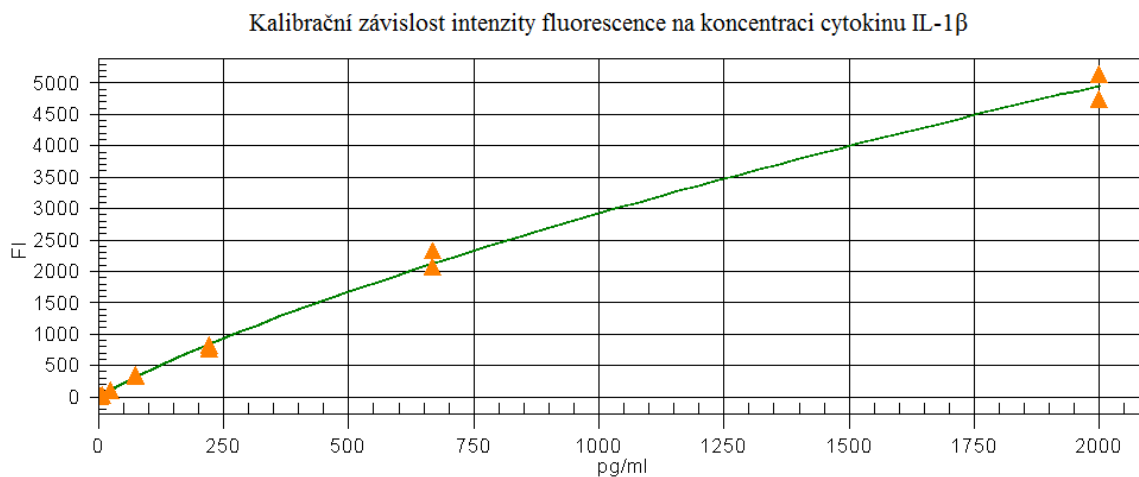
k1 – první vzorek protilátky z paralelní aplikace na konfluentní vrstvě buněk

k2 – druhý vzorek protilátky z paralelní aplikace na konfluentní vrstvě buněk

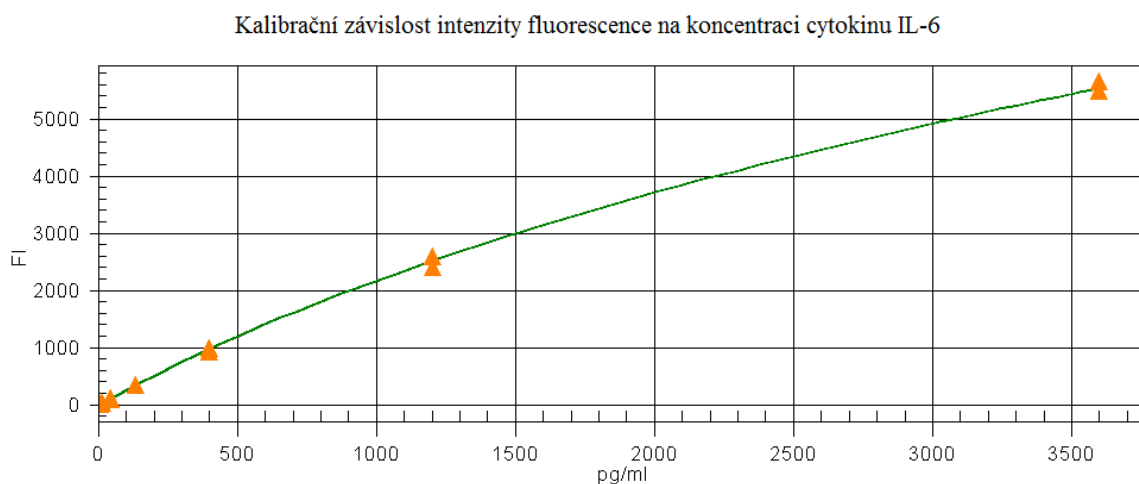
k – samostatný vzorek na konfluentní vrstvě buněk

4.2 Měření koncentrace cytokinů metodou Luminex

Následující grafy na Obr. 6 a Obr. 7 znázorňují závislost relativní FI (z angl. „fluorescence intensity“ neboli intenzita fluorescence) na koncentraci cytokinů IL-1 β a IL-6. Grafy byly vytvořeny v programu Luminex 100 IS.

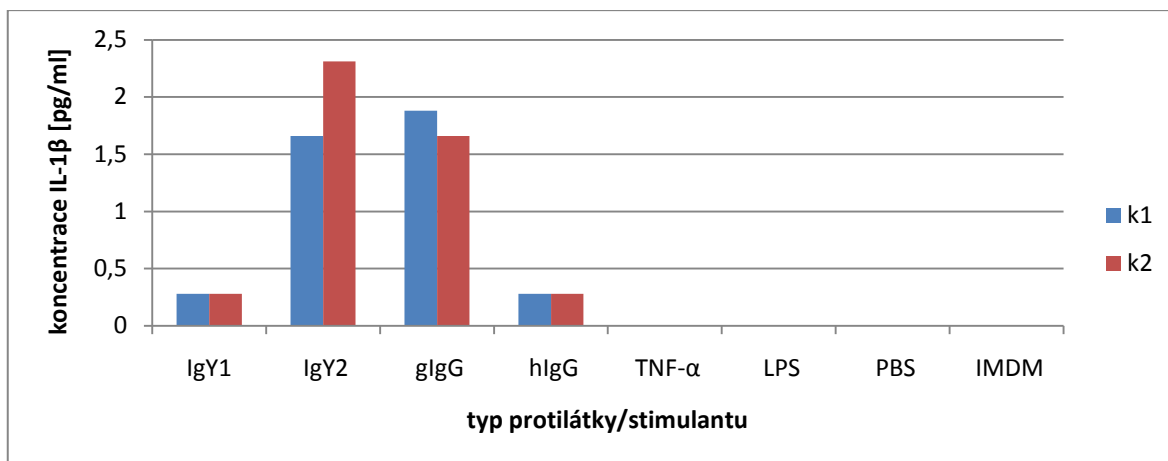


Obr. 6: Graf kalibrační závislosti FI na koncentraci cytokinu IL-1 β



Obr. 7: Graf kalibrační závislosti FI na koncentraci cytokinu IL-6

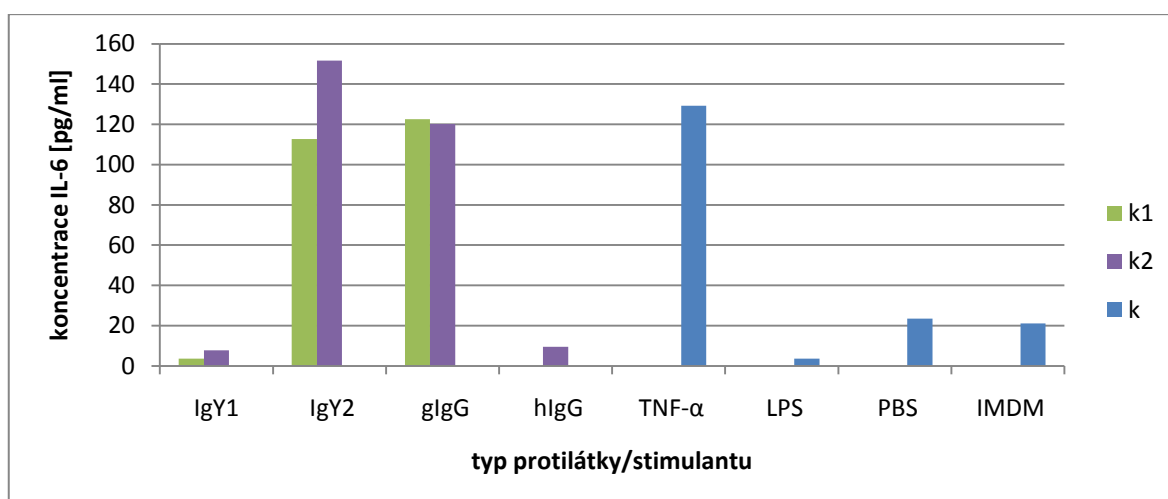
Následující grafy na Obr. 8 a Obr. 9, str. 39, znázorňují závislost produkovaných cytokinů IL-1 β a IL-6 na typu působící protilátky, resp. stimulantu. Data použitá k sestrojení těchto grafů jsou uvedena v Tab. č. 2 v příloze. Pro sestrojení těchto grafů byly použity pouze hodnoty koncentrací cytokinů produkovaných buňkami, které vytvořily konfluentní vrstvu, protože pouze tato vrstva poskytla věrohodné výsledky.



k1 – první vzorek protilátky z paralelní aplikace na konfluentní vrstvě buněk

k2 – druhý vzorek protilátky z paralelní aplikace na konfluentní vrstvě buněk

Obr. 8: Graf závislosti koncentrace produkovaného cytokinu IL-1β na typu působící protilátky/stimulantu. Koncentrace látek ve výsledné směsi: protilátky: 1 mg/ml; LPS: 1 mg/ml; TNF-α: 100 μg/ml, PBS: 1 mg/ml.



k1 – první vzorek protilátky z paralelní aplikace na konfluentní vrstvě buněk

k2 – druhý vzorek protilátky z paralelní aplikace na konfluentní vrstvě buněk

k – samostatný vzorek na konfluentní vrstvě buněk

Obr. 9: Graf závislosti koncentrace produkovaného cytokinu IL-6 na typu působící protilátky/stimulantu. Koncentrace látek ve výsledné směsi: protilátky: 1 mg/ml; LPS: 1 mg/ml; TNF-α: 100 μg/ml, PBS: 1 mg/ml.

5 Diskuze

Cílem této práce bylo popsat mechanické bariéry plic, mechanismy plicní imunity, průběh zánětu na buňkách plicního epitelu a prostudovat produkci cytokinů buňkami A549 lidského adenokarcinomu po jejich vystavení savčím imunoglobulinům typu G a ptačím imunoglobulinům typu Y. Pro stanovení imunogenicity uvedených protilátek byly proměřeny koncentrace zánětlivých cytokinů IL-1 β a IL-6, protože právě tyto cytokiny jsou jedny z nejčastěji produkováných látek při plicním zánětu a jejich koncentrace je snadno měřitelná metodou Luminex.

Při první kultivaci buněk A549 došlo k vytvoření semikonfluentní vrstvy buněk. Druhá kultivace již vytvořila vrstvu konfluentní. Obě vrstvy byly vystaveny působení stimulantů TNF- α a LPS a výše zmíněným protilátkám, a tak umožnily porovnání koncentrací vyprodukovaných cytokinů při rozdílných výchozích podmínkách. Semikonfluentní vrstva produkovala oproti konfluentní vrstvě podstatně nižší koncentrace cytokinů IL-1 β a IL-6. Tyto rozdíly v koncentracích vznikly důsledkem vystavení menšího počtu buněk protilátkám a stimulantům, proto je semikonfluentní vrstva považována za méně věrohodnou (např. koncentrace IL-6 po působení gIgG: semikonfluentní vrstva – 5,90 pg/ml; konfluentní vrstva, první vzorek protilátky z paralelní aplikace – 122,57 pg/ml).

Hladiny cytokinu IL-1 β poskytují zajímavá zjištění. Působení IMDM média s PSG a FTS a působení PBS nevyvolalo dle očekávání produkci tohoto cytokinu. Stimulanty TNF- α a LPS však produkci IL-1 β nezpůsobily. Cytokin IL-6 byl těmito stimulanty produkován ve vyšších koncentracích (TNF- α : 129,29 pg/ml, LPS: 3,66 pg/ml). Lze tedy tvrdit, že TNF- α a LPS nestimulují buňky A549 k produkci IL-1 β .

Produkce cytokinu IL-6 vyvolává několik otázek. Po aplikaci PBS a IMDM média s PSG a FTS byla evidentní tvorba tohoto cytokinu, ze které lze vyvodit buď imunogenní vlastnosti uvedených látek, nebo kontaminaci z prostředí, která mohla indukovat produkci IL-6. PBS poskytlo IL-6 o koncentraci 23,49 pg/ml, IMDM médium s PSG a FTS indukovalo produkci IL-6 o koncentraci 21,03 pg/ml. Stimulanty TNF- α (129,29 pg/ml) a LPS (3,66 pg/ml) poskytly určité hodnoty koncentrací IL-6, nicméně na základě velkého rozdílu hodnot můžeme tvrdit, že TNF- α je efektivnějším stimulantem. Koncentrace IL-6 vyvolané působením IgY1 (3,66 pg/ml a 7,69 pg/ml) a hIgG (0 pg/ml a 9,49 pg/ml) jsou vzhledem k vysoké koncentraci IL-6 po působení TNF- α (129,29 pg/ml) relativně nízké,

můžeme tedy vyloučit imunogenicitu těchto protilátek. Koncentrace IgY2 (112,73 pg/ml a 151,73 pg/ml) a gIgG (122,57 pg/ml a 120,21 pg/ml) relativně korespondují s vysokými koncentracemi TNF- α (129,29 pg/ml), a tak můžeme potvrdit imunogenicitu těchto protilátek.

Vzájemná odlišnost v imunogenicitě jednotlivých slepičích imunoglobulinů typu Y může být způsobena několika faktory, např. rozdílným skupenstvím výchozích vzorků (IgY1 – roztok; IgY2 – prášek) nebo odlišnou přípravou (IgY1 – kontrolní frakce po gelové filtraci; IgY2 – lyofilizace). Vzájemná odlišnost v imunogenicitě savčích imunoglobulinů typu G může být způsobena původem protilátky a typem buněk, na kterých byla imunogenicita testována. Bylo provedeno testování imunogenicity lidských a kozích imunoglobulinů typu G na lidských buňkách nádorové linie A549. Vzhledem k tomu, že humanizované protilátky nevyvolávají zánětlivé reakce, neměly by ani lidské protilátky, které byly použity v této práci, vykazovat imunogenicitu. Naproti tomu použité kozí protilátky, pro lidské tělo nepřírozené, způsobovaly zvýšenou tvorbu zánětlivých cytokinů.

Vzhledem ke zvýšené tvorbě cytokinů IL-1 β a IL-6 můžeme usuzovat na prozánětlivé vlastnosti kozích imunoglobulinů typu G. S přihlédnutím k nízkým hladinám cytokinů IL-1 β a IL-6 můžeme vyloučit imunogenicitu lidských imunoglobulinů typu G. Pro další upřesnění prozánětlivých vlivů slepičích imunoglobulinů typu Y by bylo v následujících experimentech vhodné změřit hladiny dalších zánětlivých cytokinů, např. IL-18 metodou ELISA, případně použít TNF- α nejen jako stimulant, ale také jako cytokin značící zánět plic.

6 Shrnutí

- Byly prostudovány funkce mechanických bariér plic, princip působení plicní imunity a mechanismus zánětu na buňkách plicního epitelu.
- Byla úspěšně připravena konfluentní vrstva buněk A549 vhodná pro expozici lidským a kozím imunoglobulinům typu G a slepičím imunoglobulinům typu Y.
- Byla prokázána schopnost stimulantů TNF- α a LPS podněcovat buňky nádorové linie A549 k produkci cytokinu IL-6, nikoliv však IL-1 β .
- Byl pozorován zánětlivý vliv kozích imunoglobulinů typu G a určitých slepičích imunoglobulinů typu Y na buňky A549 lidského adenokarcinomu.

Seznam použité literatury

Babičková, L., Brhel, P., Hrazdírová, A., Jančíková, J., Kubová, O., Matuška, P., Merta, Z., Pilařová, O., Salajka, F., Skříčková, J.: Pneumologie, bez vnočení, dostupné na http://spolek1.med.muni.cz/files/skripta_pneumologie.pdf, staženo 21. 4. 2011

Boušová, K.: Acta Medica Suppl. 2, 97-106 (2004)

Brabcová, E.: osobní sdělení

Connolly, J. M., Crowley, J. J., Charan, B. N., Nielson, P. C., Vestal, E. R.: Thorax 47, 410-413 (1992)

Crystal, G. R.: Annals of Internal Medicine 94, 73-94 (1981)

Dakhama, A., Gelfand, E. W.: Murine models of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation, v knize *In vivo Models of Inflammation* (Stevenson, S., Marshall, L. A., Morgan, D. W. ed.) Birkhäuser Verlag Basel, Švýcarsko, str. 59-83 (2006)

Dickie, A. H., Rankin, J.: JAMA 167, 1069-1076 (1958)

Dinarello, Ch. A.: The FASEB Journal 8, 1314-1325 (1994)

Dinarello, Ch. A.: Elsevier Science Ltd. 8, 253-265 (1998)

Eck, J. M., Sprang, R. S.: The Journal of Biological Chemistry 29, 17595-17605 (1989)

Girard, J. P., Springer, A. T.: Immunology Today 16, 449-457 (1995)

Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T.: Agric. Biol. Chem. 54, 2531-2535 (1990)

Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie. Triton, Praha (2005)

<http://www.bioatla.com/wp-content/uploads/antibody-structure.jpg>, staženo 7. 5. 2011

http://www.rndsystems.com/product_detail_objectname_fmap_panels.aspx,
staženo 29. 5. 2011

Jeebhay, F. M., Quirce, S.: Int J Tuberc Lung Dis. 2, 122-133 (2007)

- Kips, C. J., Tavernier, H. J., Joos, F. G., Peleman, A. R., Pauwels, A. R.: *Clinical and Experimental Allergy* 23, 247-250 (1993)
- Koblížek, V., Sedlák, V., Prachařová, Š.: *Interní Med.* 12, 539-543 (2009)
- Krčmová, I.: Profesní alergie, v knize *Alergologie* (Houdek, L. ed.) Galén, Praha, str. 315-328 (2004)
- Krejsek, J., Kudlová, M., Koláčková, M.: *Čes Ger Rev* 4, 36-42 (2005)
- Li, Y. X., Donaldson, K., Brown, D., MacNee, W.: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2, 185-195 (1995)
- Lipman, S. N., Jackson, L. R., Trudel, J. L., Weis-Garcia, F.: *ILAR Journal* 46, 258-268 (2005)
- Litzman, J., Kuklínek, P., Rybníček, O.: *Alergologie a klinická imunologie. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno* (2001)
- Meyer, K. C.: Lung Immunology and Host Defense, v knize *Pulmonary Biology in Health and Disease* (Bittar, E. E. ed.) Springer, New York, str. 332-345 (2002)
- Nguyen, H. H., Tumpey, M. T., Park, H.-J., Byun, Y.-H., Tran, D. L., Nguyen, D. V., Kilgore, E. P., Czerkinsky, C., Katz, M. J., Seong, L. B., Song, M. J., Kim, B. Y., Do, T. H., Nguyen, T., Nguyen, V. C.: *PLoS ONE* 5, 1-11 (2010)
- Ntakarutimana, V., Demedts, P., van Sande, M., Scharpé, S.: *J. Immunol. Methods* 153, 133-140 (1992)
- Panzner, P.: Imunologické základy alergické odpovědi, v knize *Alergologie* (Houdek, L. ed.) Galén, Praha, str. 33-47 (2004)
- Papadaki, H., Velegraki, M.: *Pneumon* 20, 384-394 (2007)
- Riffo-Vasquez, Y., Pitchford, S., Spina, D.: *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 32, 833-853 (2000)
- Rott, D. H.: *Hum. Genet.* 46, 249-261 (1979)
- Shresta, S., Pham T. N. Ch., Thomas, D., Graubert, A. T., Ley, J. T.: *Current Opinion in Immunology* 10, 581-587 (1998)

- Sripaiboonkij, P., Phanpravit, W., Jaakkola, S. M.: *Eur Respir J* 31, 807-814 (2008)
- Stříž, I.: *Alergie Suppl.* 2, 28-32 (2007)
- Stříž, I.: *Interní Med.* 4, 184-187 (2008)
- Tizard, I.: *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 11, 2-14 (2002)
- Tlaskalova-Hogenova, H., Tuckova, L., Lodinova-Zadnikova, R., Stepankova, R., Cukrowska, B., Funda, D. P., Striz, I., Kozakova, H., Trebichavsky, I., Sokol, D., Rehakova, Z., Sinkora, J., Fundova, P., Horakova, D., Jelinkova, L., Sanchez, D.: *Int Arch Allergy Immunol* 128, 77-89 (2002)
- Tlaskalová-Hogenová, H., Tučková, L., Lodinová-Žádníková, R.: Slizniční imunita a její význam v alergii, v knize *Alergologie* (Houdek, L. ed.) Galén, Praha, str. 21-32 (2004)
- Votava, V.: *Pneumologie*, v knize *Vnitřní lékařství* (Houdek, L. ed.) Galén, Praha, str. 257-265 (2006)
- Wang, W., Singh, S., Zeng, L. D., King, K., Nema, S.: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96, 1-26 (2006)
- Wu, C. A., Peluso, J. J., Zhu, L., Lingenheld, E. G., Walker, S. T., Puddington, L.: *Cellular Immunology* 264, 32-41 (2010)
- Zajoncová, L.: *Imunochemie, bez vrocení*, dostupné na <http://www.biochemie.upol.cz/doc/skripta/imch/>, staženo 25. 5. 2011
- Zhang, X., Chen, H., Tian, Z., Chen, S., Schade, R.: *Avian Biology Research* 3, 97-106 (2010)

Příloha č. 1

Příprava vzorků pro měření koncentrace cytokinů metodou Luminex

V následujících krocích byly použity chemikálie ze soupravy Fluorokine MultiAnalyte Profiling Human Base Kit A a mikročástice LUH201 (pro IL-1 β) a LUH206 (pro IL-6).

Příprava promývacího roztoku a kalibračního rozpouštědla

Pro přípravu promývacího vzorku bylo smícháno 20 ml promývacího vzorku Wash Buffer Concentrate a 480 ml destilované vody. Pro přípravu kalibračního rozpouštědla bylo smícháno 20 ml Calibrator Diluent RD5K Concentrate a 20 ml destilované vody.

Příprava standardů

Do lahvíček se standardy Standard Cocktail 1 a Standard Cocktail 2 bylo přidáno po 0,95 ml připraveného kalibračního rozpouštědla Calibrator Diluent RD5K. Obsah lahvíček byl míchán na třepačce po dobu 15 min.

Bylo připraveno 8 mikrozkušavek s označením S0 až S7. Do mikrozkušavky S0 bylo pipetováno 200 μ l kalibračního rozpouštědla Calibrator Diluent RD5K. Do mikrozkušavky S1 bylo pipetováno 300 μ l kalibračního rozpouštědla Calibrator Diluent RD5K, 100 μ l standardu Standard Cocktail 1 a 100 μ l standardu Standard Cocktail 2. Do zkušavek S2 až S7 bylo pipetováno 200 μ l kalibračního rozpouštědla Calibrator Diluent RD5K. Z mikrozkušavky S1 bylo přeneseno 100 μ l roztoku do mikrozkušavky S2 a vortexováno (IKA). Stejný postup byl opakován s mikrozkušavkou S2 až S6. Po přidání 100 μ l roztoku z mikrozkušavky S6 do mikrozkušavky S7 byl obsah mikrozkušavky S7 vortexován (IKA).

Příprava mikročástic

Dvě mikrozkušavky s obsahem mikročástic s navázanými protilátkami proti IL-1 β a IL-6 (Microparticle Concentrate) byly centrifugovány po dobu 30 s při 4000 RPM (Eppendorf) a krátce vortexovány (IKA). Z každé mikrozkušavky bylo odebráno 18 μ l roztoku a dohromady naředěno 1800 μ l ředícího roztoku (Microparticle Diluent) v přiložené lahvičce.

Příprava destičky se standardy a vzorky

Pro účely měření koncentrace cytokinů bylo využito 34 jamek na 96-ti jamkové destičce s membránou. Každá jamka byla navlhčena 100 μ l promývacího roztoku, který byl odsát vakuovou pumpou. Do prvních 16 jamek bylo pipetováno po 50 μ l standardů v paralelním provedení v pořadí S0, S7-S1. Do dalších 18 jamek bylo pipetováno po 50 μ l jednotlivých rozmražených vzorků supernatantů.

Inkubace supernatantů s mikročásticemi s navázanými protilátkami proti IL-1 β a IL-6

Ke standardům i vzorkům bylo pipetováno po 50 μ l připravených mikročástic s navázanými protilátkami proti IL-1 β a IL-6. Destička byla přikryta fólií, zabalena do alobalu a inkubována na třepačce po dobu 3 hod při 500 RPM (Heidolph). Poté byla fólie odstraněna, roztok byl odsát pomocí vakuové pumpy a jamky byly třikrát promyty 100 μ l promývacího roztoku.

Příprava a inkubace supernatantů s biotinylovanou protilátkou

Dvě mikrozkušavky s příslušnými biotinylovanými protilátkami (Biotin Antibody Concentrate) byly centrifugovány po dobu 30 s při 4000 RPM (Eppendorf) a krátce vortexovány (IKA). Do 1800 μ l ředícího roztoku Biotin Antibody Diluent bylo pipetováno po 18 μ l těchto biotinylovaných protilátek. Do každé jamky bylo pipetováno po 50 μ l naředěné biotinylované protilátky, destička byla přikryta fólií, zabalena do alobalu a inkubována na třepačce po dobu 1 hod při 500 RPM (Heidolph). Poté byla fólie odstraněna, roztok byl odsát pomocí vakuové pumpy a jamky byly třikrát promyty 100 μ l promývacího roztoku.

Příprava a inkubace supernatantů s komplexem streptavidin-fykoerytrin

Mikrozkušavka s komplexem streptavidin-fykoerytrin byla centrifugována po dobu 30 s při 4000 RPM (Eppendorf) a krátce vortexována (IKA). K 1800 μ l promývacího roztoku bylo pipetováno 18 μ l komplexu streptavidin-fykoerytrin. Do každé jamky bylo pipetováno 50 μ l naředěného komplexu streptavidin-fykoerytrin, destička byla přikryta fólií, zabalena do alobalu a inkubována na třepačce po dobu 30 min při 500 RPM (Heidolph). Poté byla fólie odstraněna, roztok byl odsát pomocí vakuové pumpy a jamky byly třikrát promyty 100 μ l promývacího roztoku.

Závěrečná úprava vzorků

K vytvořeným komplexům bylo pipetováno po 100 μ l promývacího roztoku a komplexy byly resuspendovány na třepačce po dobu 2 min při 500 RPM (Heidolph). Vzorky byly pipetovány na měřicí destičku, která byla součástí vybavení přístroje Luminex. Přístroj byl pro měření koncentrace cytokinů IL-1 β a IL-6 nastaven dle návodu. Byly proměřeny koncentrace cytokinů IL-1 β a IL-6.

Příloha č. 2

Tab. č. 2: Koncentrace cytokinů IL-1 β a IL-6 po vystavení buněk A549 protilátkám a stimulantům

protilátka/stimulant	koncentrace IL-1 β [pg/ml]	koncentrace IL-6 [pg/ml]
s-IgY1	0	1,49
s-IgY2	1,21	7,23
s-gIgG	1,21	5,90
s-hIgG	0,28	1,00
s-TNF- α	0	54,75
s-PBS	0	3,40
k1-IgY1	0,28	3,66
k2-IgY1	0,28	7,69
k1-IgY2	1,66	112,73
k2-IgY2	2,31	151,73
k1-gIgG	1,88	122,57
k2-gIgG	1,66	120,21
k1-hIgG	0,28	0
k2-hIgG	0,28	9,49
k-TNF- α	0	129,29
k-LPS	0	3,66
k-PBS	0	23,49
k-IMDM	0	21,03

s – vzorek protilátky na semikonfluentní vrstvě buněk

k1 – první vzorek protilátky z paralelní aplikace na konfluentní vrstvě buněk

k2 – druhý vzorek protilátky z paralelní aplikace na konfluentní vrstvě buněk

k – samostatný vzorek na konfluentní vrstvě buněk

Od hodnot koncentrací cytokinů produkovaných po působení protilátek, TNF- α a LPS byly odečteny hodnoty koncentrací příslušných cytokinů produkovaných po působení PBS, jelikož protilátky a uvedené stimulanty byly v PBS ředěny. Data uvedená v Tab. č. 2 jsou výsledkem tohoto odečtení.

