

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

STUDIJNÍ PROGRAM: BIOCHEMIE

STUDIJNÍ OBOR: BIOCHEMIE



LIBUŠE NOSKOVÁ

**Vývoj modelového systému pro studium bakteriální adheze na  
plicní epitel pacientů s CF**

**Development of model system for study of bacterial adhesion  
on lung epithelium of CF patients**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Petr Hodek, Csc.

Praha, 2011

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod odborným vedením Prof. RNDr. Petra Hodka, Csc. 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 dne .....

.....  
Libuše Nosková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda vyjádřila své poděkování Prof. RNDr. Petru Hodkovi, Csc. za odborné vedení této bakalářské práce, cenné rady a připomínky při jejím vypracování.

Dále děkuji svým kolegům Mgr. Martinu Růžičkovi a Bc. Lence Pacholíkove za spolupráci během experimentální činnosti.

## Abstrakt

Cystická fibróza (CF) je geneticky podmíněné onemocnění nesoucí sebou řadu zdravotních komplikací. Hlavní komplikací je chronická kolonizace a infekce dýchacích cest pacientů specifickými mikroorganismy – zejména *Pseudomonas aeruginosa*. Právě infekce plic tímto mikroorganismem je nejčastější příčinou smrti pacientů s cystickou fibrózou. Ke kolonizaci dýchacích cest dochází prostřednictvím řady adhezivních struktur jako je například lektin PA-IIL. V současné době je nepoužívanější terapií léčba antibiotiky, ale vzhledem ke vzniku rezistencí jsou hledány i jiné způsoby léčby. Jednou z možností je pasivní imunizace pacientů pomocí slepičích protilátek. Pro tento účel byly připraveny protilátky proti jedné z adhezivních struktur *P. aeruginosa*, proti rekombinantnímu lektinu PA-IIL. Tyto protilátky rozpoznávaly i nativní lektin PA-IIL exprimovaný bakterií *P. aeruginosa*. Pro testování schopnosti protilátek zabránit adhezii bakterií na buňky plicního epitelu bylo třeba vyvinout vhodný modelový systém. Byly připraveny základní komponenty systému, epiteliální buňky a bakterie *P. aeruginosa*. Z dýchacích cest CF pacientů byly izolovány buňky 2 metodami – izolací přímo z tkáně a technikou „brushing“. K vyhodnocení adhezních testů byl hledán vhodný objektivní způsob vyhodnocení založený na vizualizaci epiteliálních buněk a *P. aeruginosa*. Využito bylo fluorescenčního značení bakterií *Pseudomonas aeruginosa* pomocí PKH 26 poskytující fluorescenci v červené oblasti spektra a značení buněk epitelu pomocí CellTracker Green CMFDA, který poskytuje fluorescenci v zelené oblasti spektra. Tento modelový systém pro studium adheze bakterií na buňky plicního epitelu byl dále optimalizován pomocí plicní buněčné linie A549.

**Klíčová slova:** cystická fibróza, epiteliální buňky, *Pseudomonas aeruginosa*, adhezní testy, fluorescenční značení, slepičí protilátky IgY

## Abstract

Cystic fibrosis is an inherited disease bearing a number of health difficulties. The main complication is a chronic colonization and infection of respiratory tract with specific microorganisms – especially *Pseudomonas aeruginosa*. The lung infection with this microorganism is the most common cause of all of death in these patients. The colonization of respiratory tract is mediated by the series of adhesive structures such as lectin PA-IIL. Currently, the most widely used therapy is an antibiotic treatment. Due to the increasing resistance to antibiotics another methods for treatment are being searched. One possibility is a passive immunization of patients with chicken antibodies. For this purpose, we prepared antibodies against one of the adhesive structures of *P. aeruginosa* - recombinant lectin PA-IIL. These antibodies be able to recognize a native lectin PA-IIL, expressed by *P. aeruginosa*. To test the ability of antibodies to prevent adhesion of bacteria on the lung epithelial cells a suitable model system was necessary to develop. The basal components of this system include epithelial cells and *P. aeruginosa*. Epithelial cells from airways of cystic fibrosis patient were isolated by two methods. One method is based on the direct isolation from the dissected tissue and the second one is a brushing technique. To evaluate an adhesion tests we were searching for a suitable objective method of interpretation based on the visualization of epithelial cells and *P. aeruginosa*. We used fluorescent staining of bacteria *P. aeruginosa* by the PKH26 providing the red fluorescence and labeling of the epithelial cells by CellTracker Green CMFDA, which gives a green fluorescence. This model system for study of bacterial adhesion on lung epithelial cells was then optimized through lung cell line A549.

**Key words:** cystic fibrosis, epithelial cells, *Pseudomonas aeruginosa*, adhesive tests, fluorescent labeling, chicken antibodies

# Obsah

Seznam použitých zkratek.....	3
<b>1 Úvod.....</b>	<b>5</b>
1.1 Cystická fibróza.....	5
1.1.1 Charakteristika onemocnění.....	6
1.1.2 Příznaky nemoci, diagnosa.....	8
1.1.3 Terapie.....	11
1.2 Funkce plic a respirační problémy u pacientů.....	13
1.2.1 Respirační systém.....	13
1.2.2 Plicní systém pacientů s CF.....	15
1.3 Mikrobiologie spojená s CF.....	16
1.3.1 Pseudomonas aeruginosa.....	16
1.3.2 Problematika infekce Pseudomonas aeruginosa.....	19
1.3.3 Burkholderia cepacia.....	20
1.3.4 Další mikroorganismy.....	22
1.4 Imunitní systém .....	22
1.4.1 Imunitní systém CF pacientů.....	22
1.4.2 Slepíčí protilátky proti Pseudomonas aeruginosa.....	23
<b>2 Cíl práce.....</b>	<b>26</b>
<b>3 Materiál a metody.....</b>	<b>27</b>
3.1 Použitý materiál a přístrojové vybavení.....	27
3.1.1 Přístrojové vybavení.....	27
3.1.2 Použitý materiál.....	28
3.2 Elektroforesa a Western blotting.....	30
3.2.1 Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu.....	30
3.2.2 Western blot.....	32
3.3 ELISA.....	35
3.4 Izolace plicních epitelálních buněk.....	37
3.4.1 Izolace buněk z tkáně.....	37
3.4.2 Izolace buněk získaných pomocí „brushingu“.....	39
3.4.3 Kultivace buněk plicního epitelu.....	39
3.5 Štěpení protilátek.....	41
3.6 Kultivace bakterií.....	42

3.7 Adhezní testy, interakce epitelu s bakteriemi.....	43
3.7.1 Test adheze bakterií.....	43
3.7.2 Internalizace bakterií .....	44
3.8 Fluorescenční značení buněk.....	45
3.8.1 Značení bakterií pomocí FITC.....	45
3.8.2 Značení bakterií pomocí CellTracker.....	46
3.8.3 Značení bakterií pomocí PKH 67.....	47
3.8.4 Značení bakterií pomocí resazurinu.....	48
3.8.5 Značení bakterií pomocí PKH 26.....	48
3.8.6 Značení buněk A549 pomocí CellTracker.....	49
<b>4 Výsledky.....</b>	<b>50</b>
4.1 Ověření produkce lektinu na povrchu bakterií.....	50
4.2 Izolace a kultivace buněk plicního epitelu.....	51
4.2.1 Izolace z plicní tkáně.....	51
4.2.2 Izolace pomocí „brushingu“.....	54
4.2.3 Kultivace jednotlivých typů buněk.....	55
4.3 Štěpení protilátek a separace fragmentů Fab.....	57
4.4 Detekce antigenních struktur.....	60
4.4.1 Detekce lektinu na povrchu bakterií.....	60
4.4.2 Interakce lektinu s buňkami epitelu .....	61
4.4.3 Detekce bakterií adherovaných na buňkách epitelu.....	61
4.5 Adhezní testy.....	63
4.5.1 Adheze bakterií na A549.....	63
4.5.2 Internalizace bakterií do epiteliálních buněk linie A549.....	64
4.6 Fluorescenční značení bakterií.....	65
4.6.1 Značení pomocí FITC.....	65
4.6.2 Značení pomocí CellTracker Green CMFDA.....	66
4.6.3 Značení pomocí PKH 67.....	67
4.6.4 Značení pomocí resazurinu.....	67
4.6.5 Značení pomocí PKH 26.....	69
4.7 Fluorescenční značení buněk A549.....	71
<b>5 Diskuse .....</b>	<b>73</b>
<b>6 Shrnutí.....</b>	<b>77</b>
<b>7 Seznam použité literatury.....</b>	<b>78</b>

## Seznam použitých zkratk

AP	alkalická fosfatasa
ATP	Adenosintrifosfát
Bcc	<i>Burkholderia cepacia</i> komplex
BIS	N,N'-methylen-bis-akrylamid
bp	páry bazí v DNA („Base pairs“)
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CF	cystická fibróza
CFTR	„Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator“
CFU	vyjádření koncentrace bakterií - „colony forming units“
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	fetální telecí sérum („fetal calf serum“)
FITC	fluoresceinisothiokyanát
FN	fakultní nemocnice
Fuc	fukosa
Gal	galaktosa
Glc	glukosa
GlcNAc	N-acetylglukosamin
HLA	„Human leukocyte antigen“
Hu	označení vzorků od pacientů („human“ - lidský)
IgG	imunoglobulin třídy G
IgY	imunoglobulin Y (analogický s třídou G, vyskytuje se u ptáků)
IL-1 (-6,8,10,..)	interleukiny, chemokiny
kDa	kilo- Dalton, jednotka molekulové hmotnosti
LB medium	„Luria Broth“ medium
MBL	mannosu vázající lektin („mannose binding lectin“)
Neu5Ac	kyselina sialová (neuraminová)



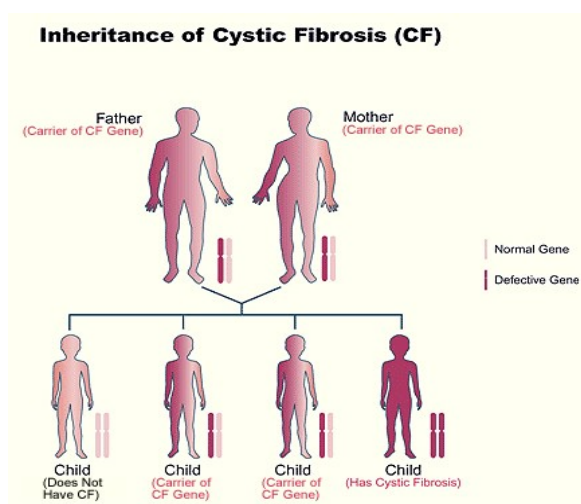
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor $\kappa$ B, transkripční faktor
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	„phosphate buffered saline“
PVDF	polyvinylidendifluorid
Px	křenová peroxidasa
RPM	počet otáček za minutu („revolutions per minute“)
SDS	dodecyl sulfát sodný
SP -A (D)	surfaktantový protein A (D)
TB	trypanová modř („trypan blue“)
TBS	„TRIS buffered saline“
TEMED	N,N'-methylen-bis-akrylamid
Th	pomocný T lymfocyt („helper T cell“)
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor $\alpha$
TRIS	tris-(hydroxymethyl)aminomethan
V	volt, jednotka napětí

# 1 Úvod

Cystická fibróza je geneticky podmíněné onemocnění, jedná se o mutaci genu pro protein CFTR (z angl. „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“). Tento protein slouží především jako kanál pro transport chloridových iontů. Defekt v tomto proteinu u pacientů s cystickou fibrózou sebou nese celou řadu zdravotních komplikací. Jednou z nejzávažnějších je postižení dýchacího ústrojí. Pacienti s CF jsou ohrožováni častými mikrobiálními infekcemi plic a některé patogeny způsobují chronické infekce plic, případně další život ohrožující komplikace. Z tohoto důvodu se tato práce zabývá vývojem vhodného modelového systému pro studium adheze a interakcí bakterií a plicního epitelu a možností jejich ovlivnění pomocí protilátek.

## 1.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza je poměrně rozšířené genetické onemocnění. Obvykle je uváděn výskyt 1 nemocného dítěte na 2500 – 4500 novorozenců [1]. Jedná se o recesivní autozomální dědičné onemocnění. Obligátní heterozygoti jsou zdraví nositelé mutace v příslušném genu. Při jejich „křížení“ platí Mendelovy zákony dědičnosti, v potomstvu se tedy bude vyskytovat 50% zdravých nositelů mutace, 25% zdravých jedinců bez mutace a 25% nemocných jedinců (Obr. 1.1.1 [2]).



Obr. 1.1.1: Schéma dědičnosti genu pro CFTR.

Příčinou onemocnění jsou změny v proteinu CFTR, který je produktem genu CFTR [1]. Bylo nalezeno zatím celkem asi 1700 mutací, nicméně tzv. „panevropská“ mutace se vyskytuje u zhruba 66-70% pacientů s CF a jedná se o mutaci označovanou jako F508del. Většina nezpůsobuje

manifestní onemocnění, protože některé z nich jsou lokalizovány v nekódujících oblastech genu, v intronech. Zhruba o 30 mutacích se ví, že manifestní onemocnění způsobit mohou. Typické varianty CF bývají diagnostikovány poměrně časně v dětském věku a jsou spojeny s pankreatickou nedostatečností. Obvykle bývá touto nemocí postiženo vedle dýchacího i trávicího ústrojí, v některých případech pak i reprodukční. Nejvíce komplikací je však vázaných na respirační systém [3].

### 1.1.1 Charakteristika onemocnění

Jak již bylo zmíněno výše, jedná se o geneticky podmíněné onemocnění. Vlivem mutace dochází ke snížené funkci, případně úplné ztrátě funkce tohoto proteinu a s tím související řadou komplikací. Míra a závažnost zdravotních komplikací závisí mimo jiné i na typu mutace CFTR [4].

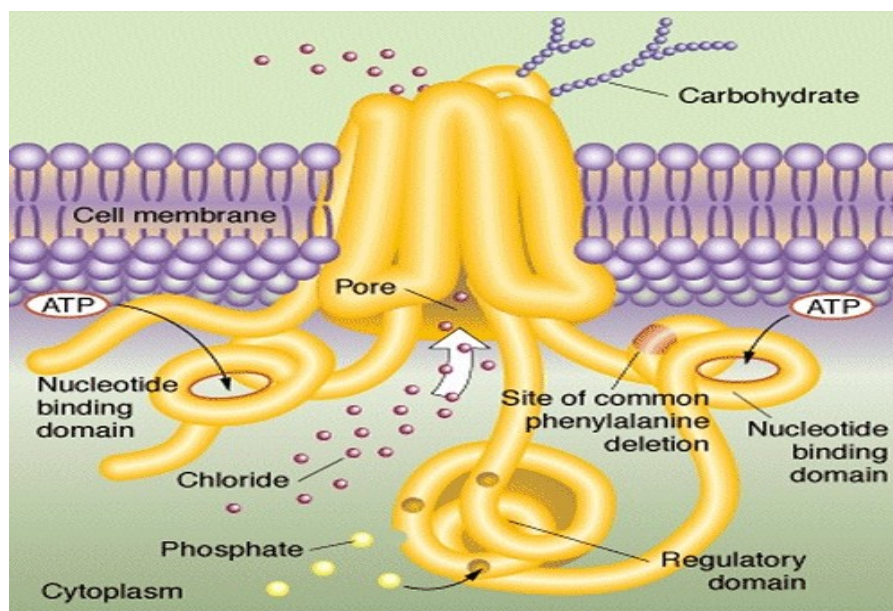
#### CFTR

Gen pro protein CFTR se nachází na chromosomu 7, skládá se ze 27 exonů a kóduje protein o 1480 aminokyselinových zbytcích. Byla popsána celá řada mutací v tomto genu, jak již bylo zmíněno výše, většina nositelů má stejnou mutaci F508del. Tato mutace znamená delecí 3bp, která vede k vyřazení fenylalaninu v pozici 508 proteinu [5]. Dle alterací příslušného proteinu lze mutace rozdělit do 6 tříd [4]:

1. třída - neprobíhá žádná syntéza proteinu
2. třída - je blokován „processing“, tedy posttranslační modifikace a transport z endoplasmatického retikula do Golgiho aparátu a na apikální membránu buněk, regulace pomocí chaperonů (toto je případ nejčastější mutace F508del)
3. třída – je blokována regulace iontového kanálu
4. třída – alternativní konduktance
5. třída – redukováná syntéza
6. třída – zrychlená, vystupňovaná degradace

Obecně lze říci, že lidé s mutacemi tříd 1-3 mají závažný průběh onemocnění, zatímco pro pacienty s mutacemi tříd 4-6 je charakteristický „mírnější“ průběh, a spíše atypické formy CF [1].

Protein CFTR se skládá z 5 domén – 2 transmembránové, 2 vázající nukleotidy a nukleotidfosfáty (především ATP) a 1 regulační (Obr. 1.1.2 [2]). Základní funkce tohoto proteinu je chloridový kanál řízený pomocí cAMP a lokalizovaný na apikální membráně epitheliálních buněk (byl detekován i na apikální membráně řasinkových buněk vnitřní části epitelu [6]).



Obr. 1.1.2: Schéma proteinu CFTR, znázornění jednotlivých domén.

Funkce chloridového kanálu není jedinou funkcí proteinu CFTR, předpokládá se i celá řada dalších, ať už přímých, nebo na bázi regulace dalších systémů, jak je uvedeno s následujícím seznamu.

**Předpokládané funkce CFTR [7]:**

- transport  $\text{Cl}^-$  a  $\text{HCO}_3^+$  iontů
- regulace ostatních iontových kanálů, především epiteliální sodíkový kanál
- kontrola extracelulárního pH
- intravesikulární acidifikace
- endocytická cirkulace
- regulace aquaporinu 3 (účastní se transportu vody přes membrány, umožňuje výstup reabsorbované vody)
- apoptosa epiteliálních buněk
- vazba a internalizace *Pseudomonas aeruginosa*
- komunikace na bázi gap junction
- vliv na viskozitu extracelulární kapaliny

- transport glutathionu
- zvýšená sulfatace a snížená sialylace hlenu
- vliv na aktivitu NF- $\kappa$ B
- produkce chemokinů

Z uvedeného je patrné, že cystická fibrosa není onemocnění omezené na respirační a gastrointestinální trakt, ale jedná se o multisystémové onemocnění.

## 1.1.2 Příznaky nemoci, diagnosa

Onemocnění postihuje zejména dýchací a trávicí ústrojí, nicméně lze shrnout, že s výjimkou CNS postihuje určitou měrou i ostatní systémy. Většina nemocných má symptomy od časného dětského věku a kromě respiračních symptomů (sinopulmonálních) také známky pankreatické nedostatečnosti (typická CF), menší část pacientů s CF pak trpí mírnějšími formami postižení (bez pankreatické insuficience). První příznaky se u většiny nemocných dají vypočítat již v prvních měsících či rocích života. V některých případech jsou nemocní diagnostikováni pozdě, často již s velmi rozvinutými příznaky, potížemi a komplikacemi.

### 1.1.2.1 Příznaky nemoci

V důsledku poruchy transportu iontů chloridovými kanály se u 85 % nemocných objevuje nedostatečná exokrinní činnost pankreatu. Dětsí pacienti proto neprospívají, nepřibývají na váze, ačkoli většinou hodně jedí, a mívají objemné, mastné stolice. U 10–15 % novorozenců s CF dochází ke vzniku mekoniového ileu (jedná se o střevní neprůchodnost způsobenou obsahem střeva plodu). Postnatálně vzniklou komplikací je pak distální intestinální obstrukční syndrom (DIOS). Recidivující pankreatitida je častá hlavně u nemocných se zachovalou, tedy exokrinní funkcí pankreatu.

Narušení produkce potu je další charakteristickou známkou CF. Pot nemocných CF je výrazně slanější než pot zdravých, obsahuje až pětkrát více solí. Velké ztráty solí potem mohou vést až k těžkému rozvratu vnitřního prostředí, charakterizovaném nedostatkem sodíku, chloridů a metabolickou alkalózou.

Ke komplikacím CF řadíme i CF vázaný diabetes mellitus (z angl. „cystic fibrosis related diabetes“, CFRD). Svoji patogenezi se liší jak od diabetu mellitu 1. typu (na inzulínu závislý) tak od diabetu mellitu 2. typu (na inzulínu nezávislý). Podílí se na něm útlak Langerhansových ostrůvků fibrotickou tkání pankreatu a autoimunitní zánět. U řady nemocných se rozvíjí postižení jater (cystic fibrosis liver disease, CFLD). CFTR protein se totiž exprimuje v buňkách epitelu žlučových cest. Poškozená sekreční funkce epitelu žlučových cest spolu se zvýšenou hustotou a sníženou alkalitou žluči vedou k obstrukci žlučových cest, duktulární proliferaci, zánětu a rozvoji

fokální biliární cirhózy. Častou komplikací je i osteoporóza, která bývá i po řadu let často asymptomatická. Na pozadí jejího vzniku se uplatňuje malabsorpce, snížená funkce produkce pohlavních hormonů, nízká fyzická aktivita, vysoká hladina osteoklasty aktivujících cytokinů v důsledku chronického zánětu a léčba kortikoidy. Komplikujícím faktorem je i kardiomyopatie, která může být i příčinou náhlého úmrtí. Proč k ní dochází, není zcela zřejmé. Zvažuje se i vztah k anémii a hypoproteinémii. Reprodukční trakt je u 98 % mužů s CF postižen kongenitální bilaterální absencí (agenezí) vas deferens - CBAVD (spermie se normálně tvoří, ale chybí schopnost ejakulace, nedochází k oplodnění), což je příčinou obstrukivní azoospermie [8], [9].

Kompletní výčet zdravotních komplikací a systém na který jsou vázány je uveden v tabulce 1.1.1

<b>Sino-pulmonální</b>	<b>Vedlejší nosní dutiny</b>	Nosní polypy a pansinusitida
	<b>Bronchy, bronchioly, plíce</b>	Chronický produktivní kašel a plicní hyperinflace (chronická bronchitida či CHOPN-like)
		Suchý kašel a pískoty na hrudníku (astma-like)
		Bronchiektazie, hemoptýza, alergická bronchopulmonální aspergilóza
		Lobární, segmentární a subsegmentární atelektázy
		Chronická plicní konsolidace (pneumonické infiltráty)
		Sekundární spontánní či iatrogenní pneumotorax
<b>Gastroenterologické</b>	<b>Pankreas</b>	Recidivující pankreatitida, pankreatická nedostatečnost a proteinová a energetická malnutrice (kachexie, edémy, hypovitaminózy)
	<b>Hepar a kolon</b>	Steatóza, biliární cirhóza
<b>Urogenitální</b>	<b>muži</b>	obstrukivní azoospermie
	<b>ženy</b>	Neprostupnost cervikálního hlenu, inkontinence moči
<b>Další</b>	Paličkovité prsty, akutní ztráta solí, chronická metabolická alkalóza, osteoporóza, CF artropatie	

Tabulka 1.1.1: (Pneumologie 32.1)

### 1.1.2.2 Diagnostika CF

Nejčastěji se CF diagnostikuje na základě klinických příznaků. Klinické podezření se potvrdí potním testem a následně molekulárněgenetickým vyšetřením DNA.

V prenatálním období je diagnosticky významný nález hyperechogenity dutiny břišní u plodu v 17.–20. týdnu těhotenství v důsledku obstrukce terminální části ilea abnormálně vazkým mekoniem u plodů s prenatální formou CF. Většinou se jedná o přechodný nález, protože zahuštěný obsah terminálního ilea se po 20.–21. týdnu rozpustí a jen v 10–15 % případů přetrvá do narození a projeví se mekoniovým ileem [1], [8].

Symptomy v důsledku nedostatečnosti exokrinní funkce pankreatu mezi něž patří například řídké, objemné, mastné, páchnoucí stolice. Porucha vstřebávání vede k neprospívání, typickému vzhledu postavy s velkým břískem, tenkými končetinami; při dobré chuti k jídlu však stav výživy na první pohled může být dobrý. V důsledku malabsorpce jsou časté i příznaky hypoproteinémie, hypoalbuminémie s edémy, anémie, popřípadě kožní projevy nedostatku stopových prvků a vitamínů. V imunologickém nálezu může být nápadné snížení nebo naopak zvýšení hladin imunoglobulinů (hlavně IgG) a pozitivita autoprotilátek, zvláště proti cytoplazmě neutrofilů.

- **Potní test** neboli vyšetření chloridů v potu je standardní metodou diagnostiky CF. Provádí se ambulantně a je zcela bezbolestný. Trvá okolo 45 minut. Výsledek je znám do 3 hodin. Ke stimulaci pocení se standardně používá pilokarpinová iontoforéza (metoda Gibson & Cooke, 1959 [10]). Normální koncentrace chloridů v potu se pohybuje mezi 10–30 mmol/l potu, většina normálních dětí má koncentraci 10–20 mmol/l potu, s věkem hodnota koncentrace mírně stoupá. U CF jsou hodnoty nad 60 mmol/l. Hraniční hodnoty, tj. mezi 30 a 60 mmol/l potu, diagnózu ani jednoznačně nepotvrdí ani nevyloučí. V případě hraničních nebo vysokých hodnot diagnózu pak upřesní, resp. potvrdí molekulárněgenetické vyšetření [8], [9].
- **Molekulárněgenetickým vyšetřením DNA** získané z krve se hledají mutace v CFTR genu, které způsobují CF. V rizikových rodinách, kde se již narodilo dítě s CF, resp. rodiče jsou zjištěnými nosiči mutací CFTR genu, lze provést **prenatální molekulárněgenetickou diagnostiku**, a to již od 13. týdne těhotenství vyšetřením mikrovilárních buněk z biopsie choria nebo od 17. týdne z buněk plodové vody získaných amniocentézou. Prokáže-li se vývoj plodu s klasickou formou CF, je možné navrhnout zákonem povolené přerušení těhotenství do 24. týdne. V současné době lze rodičům, kteří mají 25% riziko, že se jim narodí dítě s CF, nabídnout umělé oplodnění, při kterém jsou k těhotenství vybrána pouze „zdravá“ embrya, tedy taková, která nemají dvě mutace genu pro CF (preimplantační

genetická diagnostika) [8], [11]. Další možností je v případě sporného nálezu potního testu a molekulárněgenetického vyšetření průkaz **abnormálního transepiteliálního rozdílu potenciálů na nosní, případně rektální sliznici.**

- **Novorozenecký screening** cystické fibrózy se provádí vyšetřením kapky krve odebrané z patičky novorozence, ze které se testují i další vrozená onemocnění. Od října 2009 se novorozenecký screening CF stává součástí inovovaného celoplošného screeningu vybraných vrozených onemocnění. Ze suché kapky krve, získané z patičky novorozence, se na filtračním papírku vyšetřuje imunoreaktivní trypsin (IRT), což je produkt buněk acinů pankreatu, jehož zvýšená hladina je způsobena jeho únikem do cirkulace v pankreatu. Je poměrně senzitivní, ale relativně málo specifický. Zjištěnou zvýšenou koncentraci IRT tedy následuje molekulárněgenetická analýza nejčastějších mutací CFTR genu. Pokud jsou nalezeny 2 mutace, je diagnóza jistá a následuje zahájení léčby. Pokud je nalezena pouze 1 mutace, je dítě voláno k potnímu testu. Je-li potní test negativní, dítě je s největší pravděpodobností zdravým nosičem mutace. Je-li test pozitivní, je velká pravděpodobnost, že se o cystickou fibrózu jedná, a následuje pátrání po druhé, vzácnější mutaci; současně však, aby nedošlo k časové prodlevě, je nutné zahájit komplexní vyšetření dítěte a preventivní péči hlavně o dobrou průchodnost a čistotu dýchacích cest k zabránění rozvoje komplikací [12], [13].

### 1.1.3 Terapie

Základem terapie je péče o dobrou průchodnost dýchacích cest inhalacemi a následnou fyzioterapií (dechová fyzioterapie a pohybové aktivity), dále péče o dobrý stav výživy, tj. vysokokalorická strava a užívání trávicích enzymů v kapslích, potlačení infekce a zánětu agresivní protizánětlivou antibiotickou léčbou a léčba komplikací.

- **Inhalační terapii** provádějí pacienti třikrát denně formou speciálního inhalačního dýchání, které je naučí fyzioterapeut. Každá inhalace trvá 10–15 minut. Inhalují se léky ředící hustý hlen. Roztok amiloridu ve fyziologickém roztoku působí jako blokátor reabsorpce sodíku, upravuje tak porušenou funkci chloridového kanálu; jeho nevýhodou je však velmi krátkodobý účinek, nemá však žádné vedlejší účinky a je velmi dobře tolerován. Hypertonický 3–7% roztok NaCl poměrně vydatně ředí sputum, zvažují se i jeho baktericidní účinky, ale řadu pacientů dráždí a může vyvolat i bronchospasmus. Velmi účinná v případě hnisavého sputa je rekombinantní lidská DNAasa – dornasa alfa, která v purulentním hleně CF štěpí DNA uvolněnou z rozpadlých polymorfonukleárů a tím zkapalňuje sputum.



Nemocní CF s nedostatečností exokrinní funkce pankreatu musí užívat před každým jídlem **substituci pankreatických enzymů** ve formě acidorezistentních minimikropelet v želatinových kapslích. Strava musí být vysokokalorická, zastoupeny musí být všechny živiny, v přiměřeném množství i vláknina. 35–45 % energetického příjmu mají hradit tuky, zejména rostlinné. Nutná je suplementace vitaminů rozpustných v tucích a suplementace NaCl. Vhodná jsou probiotika, zvláště při léčbě antibiotiky. Při každé akutní exacerbaci **respirační infekce** je na místě ordinovat širokospektrá antibiotika, s protistafylokokovým účinkem (amoxicilin s klavulanátem, kotrimoxazol, cefalosporiny I. a II. generace, doxycyklin).

Při záchytu *Pseudomonas aeruginosa* (PA) je nutná cílená antibiotická terapie (tobramycin) proti tomuto patogenu, a to i v případě, že nejsou přítomny klinické příznaky exacerbace respirační infekce. Poměrně časté jsou i infekce mykotické, zvláště *Candida spp.* a *Aspergillus fumigatus*. V takových případech, zvláště při masivním nálezu těchto patogenů ve sputu, je nutná léčba antimykotiky. Antibiotickou léčbu se vyplatí doplnit o léčbu protizánětlivou. Na tomto poli je prokázán pozitivní vliv ne-antibakteriálních účinků makrolidů, zvláště azitromycinu, který nejen zlepšuje reologické vlastnosti sputa, ale působí i proti zánětlivým cytokinům IL-1 a IL-8. Kortikoidy se celkově podávají jen krátkodobě při těžkých exacerbacích nebo v případě komplikace alergickou bronchopulmonální aspergilózou. [14], [15].

V současné době velkou nadějí přinášejí léky, které by upravovaly transport iontů chloridovými kanály na apikální membráně buněk. V současné době probíhá studie s tzv. korektory a potenciátory defektního CFTR proteinu, které buď upravují chybu ve vycestování (trafficking) špatně sbalené bílkoviny CFTR směrem k buněčné membráně, nebo které zvyšují omezené otevírání (gating) CFTR kanálu pro chloridové ionty.

Transplantace plic je jedinou léčebnou možností pro pacienty v konečném stadiu progredujícího plicního onemocnění, limitem je kolonizace *Burkholderia cenocepacia*, představující značné riziko infekčních komplikací po transplantaci [8].

- **Imunizace.** Dosavadní terapie infekcí *Pseudomonas aeruginosa* je založena především na antibiotikách. Tato terapie je ovšem komplikována vznikem rezistencí a často i řadou nežádoucích účinků na lidský organismus vlivem vysokých dávek antibiotik. Mezi nové možnosti terapie tak určitě patří i využití imunizace.

Formou aktivní imunizace je vakcinace pacientů specifickými vakcínami. V současné době se například studuje multivalentní vakcína cílená na řadu bakteriálních antigenů, která je připravena kombinací 3-4 oslabených mukosních kmenů PA, které se liší sérotypy bakteriálního lipopolysacharidu (LPS). U této vakcíny byla prokázána odezva protektivní imunity proti infekci PA [16]. Nevýhodou aktivní imunizace je skutečnost, že daná skupina pacientů musí být proti danému antigenu imunizována v dostatečném předstihu a imunitní odpověď organismu musí mít dostatečnou intenzitu. V případě pacientů s CF je třeba zvážit vhodnost aktivní imunizace vzhledem ke skutečnosti, že po kolonizaci dýchacích cest PA už protilátková odpověď organismu není obvykle účinná.

Naopak pasivní imunizace nevyžaduje časový předstih a je zde menší riziko nežádoucích odpovědí organismu. Pasivní imunizace navíc může být prováděna opakovaně po delší dobu jako prevence. Jako jedna z možností pasivní imunizace se jeví slepičí protilátky proti určitým antigenům bakterií ohrožujících pacienty s CF. Slepičí protilátky jsou dobře dostupné a pro lidský organismus nejsou škodlivé i díky příbuznosti s lidskými IgG.

## 1.2 Funkce plic a respirační problémy u pacientů

U pacientů s cystickou fibrosou je hlavním problémem postižení respiračního ústrojí. Vlivem změn v respiračním traktu dochází ke kolonizaci řadou mikroorganismů a v případě patogenů typických pro CF (*Pseudomonas aeruginosa* - PA, *Burkholderia cepacia* komplex -Bcc) i k rozvoji chronické infekce, což je jedna z hlavních příčin postupného poškození plicní funkce. U zdravých jedinců bez dalších zdravotních komplikací (imunodeficience, oslabení organismu např. po transplantaci) jsou tyto patogenní mikroorganismy obrannými mechanismy na bázi vrozené imunity eradikovány a nedochází ke kolonizaci a rozvoji chronické infekce.

### 1.2.1 Respirační systém

Dýchací systém zprostředkovává nepřímý kontakt vnitřního prostředí organismu s atmosférickým vzduchem. Sestává se z dýchacích cest, plic, plicní cirkulace, aparátu zajišťující ventilaci a z řídicího centra nervového systému včetně systému specifických receptorů. Dýchací ústrojí člověka zajišťuje rovnováhu i při expozici zevním vlivům, včetně inhalace různých částic, mikroorganismů.

Velmi důležitá je tubuloalveolární anatomická struktura dýchacího ústrojí, která umožňuje dokonalou disperzi inhalovaných antigenů a zachycení celé řady částic již v dýchacích cestách. Malé částice v průměru 5-10  $\mu\text{m}$  jsou odstraňovány mukociliárním transportem po zachycení ve

vrstvě hlenu, který pokrývá dýchací cesty. Pohyb řasinek epitelu směrem orálním umožňuje posun hlenu s částicemi až do laryngu, kde jsou spolknuty nebo vykašlány. Částice pod 2  $\mu\text{m}$  jsou z velké míry fagocytovány až alveolárními makrofágy v plicních sklípcích [17]

Nedílnou součástí respiračního systému je i imunitní systém plic, který je důležitý pro zachování homeostázy a jehož funkce je narušena u chronických zánětlivých stavů včetně cystické fibrózy. V rámci kooperace v imunitním systému dochází k aktivaci jak přirozené (zejména fagocytující buňky), tak adaptivní imunity (zprostředkovaná pomocí lymfocytů).

V současné době se pozornost upíná zejména na funkci **epiteliálních buněk**, které nezajišťují pouze mechanickou bariéru, ale mají velmi vysoký metabolický obrat s bohatou produkcí chemokinů, prozánětlivých cytokinů jako jsou TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$ , dále IL-6 [18]. Stoupá i produkce oxidu dusnatého a leukotrienů [19]. Epiteliální buňky jsou také schopny řídit kontraktilitu fibroblastů [20].

Pneumocyty II. typu jsou významným zdrojem **surfaktantu**, což je směs fosfolipidů a proteinů pokrývající stěnu plicních sklípků. U CF jsou popsány změny ve složení těchto fosfolipidů [21]. Nedílnou součástí surfaktantu jsou i proteiny, v současné době jsou známy 4 hlavní proteiny surfaktantu, označované jako SP (z ang. „surfactant protein“) - A, B, C, D. A a D jsou rozpustné, zatímco B a C jsou membránové. Tyto proteiny patří mezi kolektiny (lektiny mající „collagen-like region“ a „lectin-region“), selektivně rozeznávají oligomannosidy a účastní se především opsonizace a fagocytózy (jsou součástí lektinové cesty aktivace komplemetu) [22]. SP-A a D jsou syntetizovány pneumocyty II. typu. Oba tyto proteiny regulují funkci řady imunitních buněk., je popsán jejich vliv na aktivaci alveolárních makrofágů. SP-D působí spíše jako opsonin [22]. Zánětlivá odpověď v CF plicích se podílí na narušení syntézy, sekrece a případné cirkulaci pulmonárního surfaktantu [21].

**Plicní makrofágy** představují profesionální fagocyty. Pohlcení částic umožňuje jejich transport v makrofázích směrem proximálním a pomocí mukocilárního transportu jsou pak tyto částice odstraňovány z nižších partií dýchacích cest nebo jsou přímo degradovány.

Významnou součástí plicní imunity jsou i **dendritické buňky**, které vykazují proteolytickou aktivitu. Ve spojení s antigeny HLA II. třídy exprimují na svém povrchu antigeny a stimulují T-lymfocyty specifické pro daný antigen. **Lymfocyty** v normální plíci jsou zastoupeny jak v paratracheálních a hilových uzlinách, tak na epiteliálních površích. Většinu zahrnují T lymfocyty. V rámci CF se zdá, že významnou roli hrají Th17 lymfocyty, které produkují IL-17A, IL-17F, IL-6.

**Neutrofil**y fungují jako likvidátory bakteriálních, zejména gram-negativních infekcí, a také infekcí mykotických. Neutrofily hrají negativní úlohu v patogenezi fibrotizujících procesů. **Eosinofil**y se uplatňují fyziologicky v obraně proti parazitárním infekcím. Doprovázejí ve velké míře zejména alergické procesy včetně astmata bronchiale. Bazofily se uplatňují zejména v pozdějších fázích zánětu.

### 1.2.2 Plicní systém pacientů s CF

Defekt v CFTR sebou nese celou řadu změn, které mají zásadní vliv na funkci plic a dýchacích cest. Poruchy nejsou dány pouze poruchou v transportu  $\text{Cl}^-$  iontů, ale jak již bylo zmíněno výše, CFTR má celou řadu funkcí a vlivem defektu v tomto proteinu jsou tyto funkce narušeny. Například změna extracelulárního pH může vést k inaktivaci řady sloučenin (např. antimikrobiálních jako jsou třeba defensiny), porucha v sialylaci povrchových glykokonjugátů umožňuje lepší specifickou adhezi mikroorganismů, a další.

Postižením respiračního traktu trpí všichni nemocní s CF. Podstatou je snížení sekrece chloridových iontů serózními buňkami respiračních žlázek [1], [9]. Současně s tím dochází ke zvýšené resorpci sodíkových iontů z oblasti řídké tekutiny (periciliárního solu) na povrch epitelálních respiračních buněk, ve které se pohybují respirační cilie. Tato tekutina je u pacientů s CF zahuštěna a redukována, což vede k omezení ciliárního pohybu. Dochází i ke změně složení vazké gelové hlenové vrstvy nad ní, do které jsou zachycovány škodliviny. Všechny tyto změny se pak uplatňují v poruše mukociliární clearance, která vede k zadržování hlenu v dolních dýchacích cestách. Zadržovaný hnis a později v důsledku zánětlivých změn vznikající hlenohnis je ideální živnou půdou pro bakterie. V tomto prostředí je také nižší hladina kyslíku a s tím souvisí přechod bakterií na anaerobní respiraci, což vede k přechodu v mukoidní kmen tvořící alginát a biofilm. Tato bakteriální kolonizace jindy sterilních dolních dýchacích cest pak přerůstá v onemocnění, které vede k chronickému zánětu respirační sliznice. Výsledkem chronického zánětu je tvorba četných bronchiektazií, s následnou fibrotizací parenchymu a emfyzému, následně dochází až k destrukci sliznice a plic s prohlubujícím se zhoršením mukociliární clearance. V pokročilé fázi se objevuje sekundární plicní hypertenze a pravostranné srdeční selhání [17]. Vlivem hustoty hlenu a tvorby biofilmu je problém pro neutrofily dostat se přímo k mikroorganismu, uvolňují sice antimikrobiální látky, ale ty přes biofilm pronikají jen obtížně a účastní se naopak postupného poškození plic [23].

Jedním z důsledků defektu v CFTR je i dysregulace cytokinové sítě. Zvýšená aktivita NF- $\kappa$ B má za následek nadprodukcii prozánětlivých cytokinů jakými jsou IL-1, IL-6, IL-8 a TNF- $\alpha$ . Účinkem těchto cytokinů dochází k migraci neutrofilů k místu zánětu. Ovšem v případě CF

dochází k abnormálnímu fungování neutrofilů – produkují více prozánětlivých mediátorů (IL-8) a uvolňují velké množství volných kyslíkových radikálů a proteas (elastasa, myeloperoxidasa). U jedinců s CF dochází také ke zvýšené expresi prozánětlivé adhezivní molekuly ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, CD54) na povrchu epiteliálních buněk bronchiální sliznice, která je receptorem neutrofilů a přispívá tak významnou měrou k přetrvávání zánětu v respiračním traktu. Na druhé straně je v případě CF menší produkce protizánětlivých cytokinů IL-10 a solubilního receptoru TNF- $\alpha$  (TNFsR). IL-10 má hlavní úlohu v zesílení tvorby inhibitoru NF- $\kappa$ B. [24]

Vzniká tak bludný kruh, kdy retence hlenu, kolonizace bakteriemi a zánětlivá odpověď včetně destrukce pokračuje a postupně vede k progresi plicního postižení.

## 1.3 Mikrobiologie spojená s CF

Jak již bylo zmíněno, onemocnění CF bývá nejčastěji spojováno s postižením respiračního a gastrointestinálního traktu. V případě dýchacích cest je jednou z nejzávažnějších komplikací mikrobiální infekce, kdy osídlení některými mikroorganismy vede k rozvoji chronické infekce, která je těžko potlačitelná i antibiotickou léčbou a postupně dochází ke zhoršení funkce plic a přispívá k vyšší morbiditě a mortalitě pacientů s CF [1]. Pro CF je typický záchyt poměrně neobvyklých mikroorganismů (*Burkholderia cepacia*) z nichž celá řada je pro normální, zdravé (bez imunodeficiencí nebo imunosupresí) jedince bez patogenního účinku.

Mezi nejvýznamnější patogeny, které se vyskytují v souvislosti s CF patří: *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*.

### 1.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Běžně se vyskytující gram-negativní aerobní bakterie tyčinkovitého tvaru (obr. 1.4. [25]) Můžeme ji najít v půdě, ve vodě (vodovodní potrubí, kohoutky), vyskytuje se i na čerstvé zelenině a běžně se vyskytuje i v nemocničním prostředí, kde hrozí kontaminace nebulizátorů, katetrů, atd. Jedná se o mobilní mikroorganismus, pohyb je zajišťován polárními bičíky. Patří mezi nefermentující bakterie, sacharidy disimuluje přes Entner-Doudoroff cestu. V případě nedostupnosti kyslíku je schopna jako elektronový akceptor využít  $\text{NO}_3^-$ . Optimální teplotní rozmezí pro růst je v tomto případě 30-37°C. Tato bakterie je odolná vůči poměrně vysokým koncentracím solí a je také přirozeně rezistentní na řadu antibiotik.

Tvoří rozpustné pigmenty – modro-zelený pyocyanin a fluoreskující žluto-zelený pyoverdin. Kromě pigmentů produkuje i extracelulární proteasy – elastasu a alkalickou proteasu, které usnadňují vazbu bakterie na buňky epitelu, zasahují do ciliární funkce a narušují epitel.



**Obr. 1.3.1:** Struktura *Pseudomonas aeruginosa*, snímek z elektronového mikroskopu

Existují 3 typy kolonií *Pseudomonas aeruginosa* (PA):

- malé, hrubé a nepravidelné kolonie – izolované s přírodních zdrojů (např. voda)
- velké, hladké, s plochými okraji – z klinických vzorků
- mukoidní, tvorba alginátu - z klinických vzorků pacientů s CF (případně jiných pacientů s chronickou kolonizací touto bakterií)



**Obr. 1.3.2:** Příklad kolonií PA na agaru.

Pro pacienty s CF je typická především mukoidní forma PA spojená s tvorbou alginátu a biofilmu. Jedná se o exopolysacharid, který tvoří matrix biofilmu, který představuje bariéru vůči hostitelově obraně. Chemicky se jedná o lineární kopolymer sestávající ze zbytků  $\beta$ -D-mannuronové a  $\alpha$ -L-guluronové kyseliny.

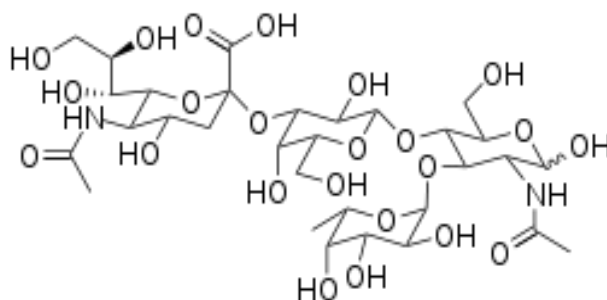
*Pseudomonas aeruginosa* je oportunní lidský patogen. Nejvíce ohrožuje právě pacienty trpící cystickou fibrózou, ale způsobuje problémy i u pacientů s oslabenou imunitou. Mezi nejčastější zdravotní komplikace jejichž původcem může být právě PA patří [25]:

- endokarditida – vlivem rozšíření bakterie krevním řečištěm, nejčastěji při použití protetických pomůcek (vnitřní výztuže)
- respirační infekce – vyskytují se hlavně u jedinců s oslabenými systémovými obrannými mechanismy, v případě pneumonie jsou rizikovou skupinou například pacienti po chemoterapii. Primární pneumonie postihuje pacienty s chronickým plicním onemocněním a s městnavým srdečním selháním.
- bakteremie a septikemie – k rozvoji dochází u pacientů s oslabenou imunitou – hematologické malignity, neutropenie, diabetes mellitus
- infekce CNS – bakterie se do CNS může dostat díky infekci ucha, případně po úrazu hlavy a invazivních operacích; způsobuje meningitidu, případně mozkový absces
- infekce ucha – obvykle vznik zánětu, především z vody (u plavců), popřípadě jako důsledek zranění
- oční infekce – kolonizace očního epitelu a poškození zraku vlivem bakterií produkovaných proteas
- kosti – vlivem rozšíření z jiného, primárního místa infekce, může způsobit chronickou osteomyelitidu
- infekce močových cest – zdrojem nákazy je obvykle nemocniční prostředí – katetrizace, operace; až 12% takto vyvolaných infekcí močových cest je způsobeno PA
- infekce gastrointestinálního traktu – primárně u oslabených jedinců, možný rozvoj gastroenteritidy a nekrotizující enterokolitidy
- ostatní – především dermatitidy a kožní infekce související s poraněním, ve velké míře se vyskytují u popálenin

V případě pacientů s CF je celá řada faktorů, které se podílejí na citlivosti vůči tomuto patogenu a které mají vliv na obvykle následující chronickou infekci vedoucí ke zhoršení funkce plic. Jednotlivé aspekty ohledně PA budou rozebrány v následující kapitole.

### 1.3.2 Problematika infekce *Pseudomonas aeruginosa*

Celá řada mikroorganismů je vybavena lektiny, které zprostředkovávají vysoce selektivní adhezi na buňku specifickým rozpoznáváním sacharidových struktur. Jde například o patogeny typu *E. coli*, *Helicobacter*, *Kluyveromyces*, *Streptococcus* a samozřejmě *Pseudomonas* (i *B. cepacia*). *Pseudomonas aeruginosa* má 2 lektiny označované jako PA-II (rozpoznává D-galaktosu) a PA-III (rozpoznává L-fukosu). Vzhledem ke změnám glykosylace struktur na povrchu epitelů a plicních mucinů u pacientů s CF, které vedou k vyšší četnosti fukosylovaných oligosacharidů Lewis typu (např. sialyl Le<sup>x</sup>), dochází ke specifické adhezi PA na epitel [26].



**Obř. 1.3.3:** Struktura determinantu sialyl-Lewis typu (Neu5Ac  $\alpha$ 2-3 Gal  $\beta$ 1-4 [Fuc  $\alpha$ 1-3] GlcNAc...)

V plicích CF pacientů jsou pozmeněny vlastnosti hlenu (viskozita, koncentrace solí) a je porušen mechanismus mukociliární clearance a zachycené bakterie tak nejsou včas eradikovány. Dochází tak k lokálnímu množení bakterií, na které reaguje imunitní systém zvýšením hladiny neutrofilů v příslušném místě. PA ale vlivem vhodných podmínek (nízká hladina O<sub>2</sub>, dostatek NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve viskozím hlenu, atd) přechází na anaerobní respiraci a původně nemukoidní forma se mění v mukoidní, tvoří alginát a postupně biofilm (anaerobní podmínky představují vhodné prostředí pro tvorbu robustního biofilmu [27], čímž je znemožněna opsonizace a následná fagocytóza. Vytvořený biofilm také omezuje prostupnost antibiotik. Dochází postupně k zánětu a rozvoji chronické infekce vedoucí k poškození plicní tkáně.

Fakt, že PA obvykle nenapadá zdravé jedince, ale kolonizuje 80% pacientů s CF je spojován právě se změnou glykosylace (sialylace) glykokonjugátů na povrchu epiteliálních buněk, které jsou rozpoznávány lektiny bakterie PA. Vlivem podmínek vhodných pro tvorbu biofilmu pak postupně dochází k výše popsaným komplikacím.



### 1.3.3 *Burkholderia cepacia*

Jedná se o gram-negativní aerobní tyčku (obr. 1.3. [28], [29]). Běžně se vyskytuje v přírodě – stojaté vody, jezera a především v půdě, kde se často nachází v symbióze s kořeny rostlin. Vyznačuje se mimo jiné i produkcí rostlinných hormonů, řady antibiotik a látek s antifungálním účinkem (cepacin, chinolon pseudan). Může se uplatnit i jako biodegradační agens, neboť jako zdroj uhlíku je schopna využívat celou řadu organických látek včetně ftalátů a chlorovaných uhlovodíků. Některé kmeny jsou schopné takto využít dokonce i penicilin G [30].



**Obr. 1.3.4:** *Burkholderia cepacia* – zobrazení struktury (snímek z el. mikroskopu) a kolonií na agaru

*B. cepacia* je lidským oportunním patogenem, riziková je především pro pacienty s CF a dále pro pacienty s primárním či sekundárním poškozením imunity. Také na anesteziologicko-resuscitačních odděleních může být původcem některých infekcí [1].

Poprvé byla posána kolem roku 1950 botanikem Walterem Burkholderem jako příčina hniloby cibule. Nejprve byla chybně zařazena do rodu *Pseudomonas*. Teprve začátkem 90. let dostala název *Burkholderia* a později se dále formovala její taxonomie až do dnešního stavu, kdy je určována především pomocí molekulárně-genetických metod [29]. Pomocí těchto metod byly rozlišeny jednotlivé kmeny a pro tento mikroorganismus byla vytvořena nová taxonomická jednotka genomvar. Genomvar je vlastně druh, ale je definován pomocí molekulárně genetických metod, neboť jednotlivé genomvary nelze spolehlivě rozlišit běžnými mikrobiologickými metodami (kultivace, biochemické testy). Přehled jednotlivých genomvarů a k nim příslušejícím názvů je uveden v Tab. 1.3. [1].

Taxonomie <i>Burkholderia cepacia</i> komplexu		
genomovar I	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> komplex
genomovar II	<i>Burkholderia multivorans</i>	
genomovar III	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	
genomovar IV	<i>Burkholderia stabilis</i>	
genomovar V	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	
genomovar VI	<i>Burkholderia dolosa</i>	
genomovar VII	<i>Burkholderia ambifaria</i>	
genomovar VIII	<i>Burkholderia anthina</i>	
genomovar IX	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	
genomovar X	<i>Burkholderia ubonensis</i>	

Tabulka 1.3.1: Taxonomie *Burkholderia cepacia* komplexu

Do rodu *Burkholderia* patří i další zástupci, kteří ale už nejsou řazeni do *B. cepacia* komplexu. Jsou to například *B. gladioli*, *B. pseudomallei* a *B. mallei*.

Z hlediska zdravotních komplikací jsou pro CF pacienty nejrizikovější genomovary II, III a VI [23]. Byly popsány i případy nákazy více genomovary současně. Velkým problémem je přenos mezi pacienty, proto byla mezinárodní organizací Cystic Fibrosis Foundation doporučena separace pacientů s Bcc (*Burkholderia cepacia* komplex) [31]. Ve většině CF center je zavedena separace pacientů podle mikrobiologického nálezu [1].

Problémem v případě infekce Bcc je přirozená rezistence těchto mikroorganismů na celou řadu antibiotik. Navíc v případě dlouhodobého podávání použitelných antibiotik (ceftazidim, piperacilin) dochází ke ztrátě citlivosti a bakteriální kmeny se tak mohou stát rezistentní vůči všem použitelným antibiotikům [1]. Bcc jsou také schopny tvořit exopolysacharid zvaný cepacian podobný alginátu *Pseudomonas aeruginosa* a také může vytvářet biofilm [32]. Byla popsána i schopnost Bcc přežít intracelulárně v buňkách epitelu, případně v makrofázích [33]. Obecně bývá Bcc označován jako rizikovější a více virulentní než *P. aeruginosa*. Infekce navíc může probíhat různě od asymptomatické chronické kolonizace po okamžité a náhlé zhoršení stavu a rozvoj pneumonie a sepse - „cepacia syndrom“ [1]. Infekce Bcc je spojena se snížením dlouhodobých šancí na přežití a zhoršení klinického stavu [34]. Pacienti s touto infekcí obvykle nejsou indikováni k transplantaci plic vzhledem ke komplikacím po transplantaci a rizikem rychlé reinfekce brzy po transplantaci [1].

### 1.3.4 Další mikroorganismy

Mezi další mikroorganismy vyskytující se v případě CF patří i *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, netuberkulózní mycobacteria případně *Achromobacter xylosoxidans* či *Stenotrophomonas maltophilia*.

***Staphylococcus aureus*** – je gram-positivní mikroorganismus. Běžně se vyskytuje v populaci, zdrojem nákazy tak může být například zdravý přenašeč. Problémem může být nákaza methicilin-rezistentním *S. aureus* (MRSA) – problematická léčba. Byla prokázána vyšší adherence *S. aureus* k epitelálním buňkám respiračního traktu s defektem v CFTR [35]

***Haemophilus influenzae*** – je gram-negativní bakterie, která může způsobit u pacientů akutní exacerbace a byly popsány i případy chronické infekce. U pacientů s CF zatím není objasněno, do jaké míry se podílí na zánětlivém poškození plic [36].

U zde zmíněných mikroorganismů není zatím zcela objasněn jejich vliv a nežádoucí účinky na klinický stav pacienta a poškození plic. Někdy bývá jejich záchyt u CF pacientů dáván do souvislosti s již rozvinutým poškozením a oslabením dýchacích cest v důsledku chronické infekce výše zmíněnými nejvýznamnějšími CF patogeny.

## 1.4 Imunitní systém

Jak již bylo popsáno, pacienty s CF ohrožují především mikrobiální infekce, se kterými se ovšem imunitní systém pacientů nedokáže správně vyrovnat. Imunitní systém jako takový není u pacientů poškozen, při narození je stejný jako u zdravých jedinců. Až následně, vlivem probíhajícího onemocnění a s tím souvisejícími změnami dochází k rozvoji sekundárních poškození obranných mechanismů organismu. Imunitní systém má dvě základní složky – buněčnou a humorální. Kromě vrozené imunity se uplatňuje také adaptivní (specifická) imunita, jejíž podstatou je tvorba protilátek specifických proti určitému antigenu.

### 1.4.1 Imunitní systém CF pacientů

Nejprve se obrany proti patogenu účastní vrozená imunita, sloužící jako „bariéra“ proti kolonizaci a infekci. Teprve poté dochází k zapojení druhotné, specifické imunitní odpovědi aktivované určitým antigenem a vázané na odpověď T a B lymfocytů. V dýchacích cestách jsou odpovědi vrozené imunity doplněny ještě dalšími obrannými mechanismy jako je produkce hlenu a

jeho vykašlávání a především mukociliární clearance. Do buněčné složky nespecifické imunity zde řadíme neutrofilů, alveolární makrofágy i samotné epiteliální buňky. Buněčná složka se především uplatňuje jako efektor v eradikaci mikroorganismů. Právě pomocné mechanismy jsou u CF pacientů poškozeny jak již bylo zmíněno výše (vlastnosti hlenu, porušení mukociliární clearance). Vlivem těchto změn je znemožněno neutrofilům a makrofágům plnit jejich funkci a dochází tak k jejich hromadění v místě zánětu [37].

Imunitní systém produkuje řadu antimikrobiálních látek, především na bázi peptidů. Tyto látky jsou produkovány jednak neutrofilů ( $\alpha$ -defensiny) a také epiteliálními buňkami a submukosními žlázami ( $\beta$ -defensiny, katelicidiny). U pacientů s CF je účinnost těchto látek snížena a je to vysvětlováno jednak vysokou koncentrací solí ve viskózním hlenu a také postupným poškozením buněk, které je sekretují [1].

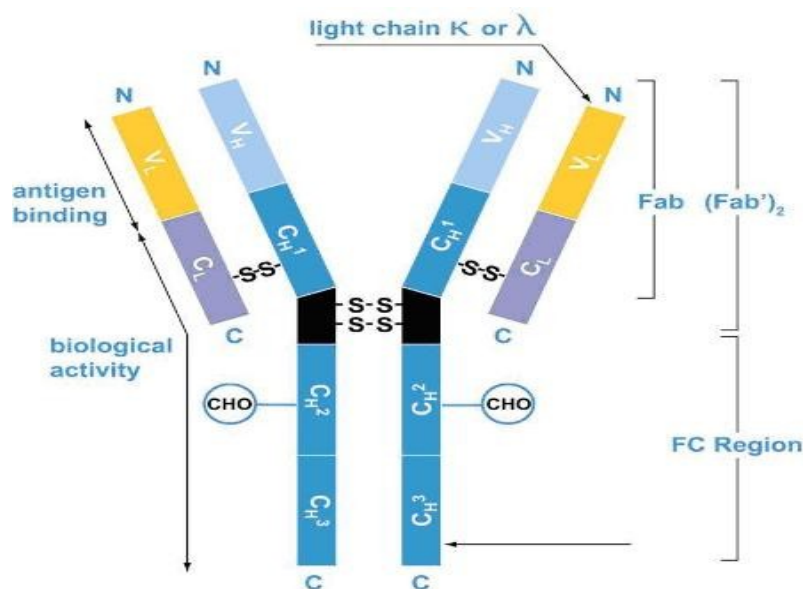
Další složkou vrozené imunity, která se účastní obrany proti mikroorganismům je komplement. Mezi jeho hlavní funkce řadíme opsonizaci, chemotaxi a osmolýzu mikroorganismů. Komplement může být aktivován třemi cestami a sice klasickou, alternativní a lektinovou [38]. V souvislosti s CF je studována hlavně lektinová cesta a především její klíčová molekula MBL („mannose-binding lectin“), který specificky rozpoznává sacharidové struktury mikroorganismů a podílí se na jejich opsonizaci ať už přímo, nebo právě aktivací imunitní odpovědi komplementu. Existuje řada polymorfismů v genu kódujícím tento lektin, z nichž některé vedou k deficitu tohoto lektinu. U CF pacientů je produkce MBL nižší, ale nebyl prokázán přímý vliv této skutečnosti na plicní funkci ani vznik chronické infekce PA [39].

Z mechanismů adaptivní (specifické) imunity se zde uplatňují především obranné mechanismy založené na protilátkách. Protilátky specificky rozpoznávají určitý antigen za vzniku komplexu antigen-protilátka, čímž je antigen buď „neutralizován“ nebo opsonizován, případně je zprostředkována imunitní odpověď vedoucí k aktivaci komplementu [38]. V případě CF pacientů je však účinek protilátek silně zeslaben (bakterie nejsou opsonizovány ani eradikovány z organismu).

## 1.4.2 Slepíčí protilátky proti *Pseudomonas aeruginosa*

Protilátkami je obecně označována skupina imunoglobulinů, což jsou glykoproteiny s molekulovou hmotností v rozmezí 150 - 900 kDa. V organismu zajišťují specifickou imunitu. Mohou se vyskytovat jako volně sekretované v krevní plasmě, nebo jako povrchové receptory některých lymfocytů. Existuje několik tříd imunoglobulinů (IgA, IgE, IgG, IgM...)[38]. Ve vaječném žloutku nacházíme protilátky typu IgY (analogické s lidskými IgG), zatímco ve vaječném bílku můžeme najít protilátky tříd IgM a IgA. Pro naše účely se dále zabýváme pouze problematikou slepičích protilátek typu IgY.

Slepičí protilátky typu IgY mají molekulovou hmotnost asi 170 000Da, strukturně jsou příbuzné s lidskými IgG. Obsahují jednak dva těžké (H) řetězce spojené v pantové oblasti disulfidickými můstky a 2 lehké (L) řetězce [40]. Strukturu zobrazuje obr. 1.4.1 [41].



**Obr. 1.4.1:** Struktura imunoglobulinu IgY. Znázorněna je i struktura fragmentů získaných štěpením pomocí proteas.

Štěpením protilátky pomocí proteas je možno získat přesně definované fragmenty dané protilátky (obr. 1.4.1). Štěpení lze provést pepsinem (získáme fragment  $F(ab')_2$ ) či papainem (získáme fragmenty Fab), v závislosti jaký fragment požadujeme [38], odštěpuje se část označovaná Fc. Fc doména je silně glykosylovaná, což může způsobit aktivaci komplementu v lidském organismu. Proto s výhledem použití slepičích protilátek jako prostředku pro pasivní imunizaci je uvažováno i využití pouze některého z fragmentů místo celé protilátky.

Použití slepičích protilátek proti PA k zabránění interakce bakterie s hostitelem je jednou z možností terapie. Bakterie má celou řadu virulencních faktorů, je tedy otázkou zda pro imunizaci vybrat pouze některé (lektin PA-III, proteiny z bičíku – zprostředkování adheze), nebo se zaměřit na bakterii jako celek. Oba přístupy jsou studovány. Bylo prokázáno, že orální podávání slepičích protilátek proti PA má pozitivní efekt u pacientů s CF. Bylo zjištěno, že jedinci, kteří takto používali slepičí protilátky měli méně pozitivních kultivačních nálezů, došlo k prodloužení intervalu mezi první a následnou kolonizací a funkčnost plic byla zachována po delší čas [42]. Je tedy vhodné pokračovat ve studiu této problematiky a detailně prozkoumat jak protilátky ovlivňují

interakce mezi PA a epitelem plic a vysvětlit tak pozitivní vliv těchto protilátek u pacientů s CF. Další výhodou slepičích protilátek je i jejich ekonomická a technologická dostupnost ve srovnání s vývojem vakcín proti *Pseudomonas aeruginosa*.

## 2 Cíl práce

Cílem této práce bylo vyvinout vhodný modelový systém pro studium adheze bakterií *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního epitelu pacientů trpících cystickou fibrosou a studovat ovlivnění této adheze pomocí slepičích protilátek.

V širším kontextu jde o vývoj vhodného systému pro otestování účinnosti slepičích protilátek a jejich využití jako agens pro pasivní imunizaci pacientů s cystickou fibrosou. Protilátky byly připraveny proti bakteriálnímu lektinu PA-III.

Pro splnění hlavního cíle práce bylo třeba zvládnout následující dílčí úkoly:

- ověřit, zda slepičí protilátky připravené proti rekombinantnímu lektinu rozpoznávají nativní lektin PA-III na bakteriálních buňkách
- odvodit primární kulturu buněk plicního epitelu pacientů s cystickou fibrosou (optimální kultivační podmínky, izolace buněk)
- zavedení vhodné metodiky adhezních testů vhodných k průkazu účinnosti slepičích protilátek proti bakteriálnímu lektinu
- navržení technik pro vizualizaci bakterií a epitelálních buněk vhodných pro adhezní testy

# 3 Materiál a metody

## 3.1 Použitý materiál a přístrojové vybavení

### 3.1.1 Přístrojové vybavení

analytické váhy 40 SM	PESA
aparát pro elektroforesu	Amersham Biosciences, USA
aparát pro horizontální přenos	Biometra, Německo
centrifuga Eppendorf 5430	Eppendorf, USA
centrifuga K23	Janetzky, Německo
centrifuga K70D	Janetzky, Německo
centrifuga Micro Centaur	Sanyo, UK
CO <sub>2</sub> inkubátor	ShellLab
čtecí zařízení ELISA Sunrise Remote	TEKAN, Rakousko
laminární box BIO 126	Labox
mikroskop	Carl-Zeis, Německo
mikroskop Nikon ECLIPSE TE2002-U s programem NIS-Elements AR 2.30	
pH metr model 370	ATI Orion
předvážky EW 600	KERN
sonikátor ELMasonic E 30 H	P-Lab, ČR
spektrofotometr HP 8453 E	Hawlett-Packard
spektrofluorimetr Perkin Elmer L55 + program FL Winlab	
spektrofluorimetr Varioscan Flash V7	
spektrofluorimetr Biotek Synergy 2	
spektrokolorimetr Spekol	Carl-Zeis, Německo
třepačka MiniRocker	Eppendorf, USA



### 3.1.2 Použitý materiál

**AstraZeneca, GB:** Meronem

**Biochrom, Německo:** FCS Superior

**Biomérieux – Baxter, Francie:** Count-tact irradiated agar

**Corning, USA:** destičky CellBind® 12 a 96 jamek (i černé)

**Duchefa:** Chloramfenikol; Kanamycin

**Fluka, Německo:** 2-amino-1-methyl-1-propanol; Coomassie Brilliant Blue R-250; DMSO (dimethylsulfoxid); NaN<sub>3</sub> (azid sodný); Giemsa stain; *p*-nitrofenylfosfát; Trizma Base; TWEEN® 20

**Invitrogen, UK:** CellTracker Green CMFDA – fluorescenční barva; LHC-9 medium

**Koch-Light Laboratories, GB:** Deoxyribonuclease I ex bovine pancreas

**Lachema, Brno, Česká republika:** 2-merkapt ethanol; bromfenolová modř; CaCl<sub>2</sub>; D-glukosa; DMF (dimethylformamid); EDTA; ethanol; glycerol; glycin; HCl; jodacetamid; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; KOH; kyselina citronová; kyselina octová; L-alanin; L-asparagin; L-asparagová kyselina; L-cystein; L-fukosa; L-glutamin; L-prolin; methanol; MgCl<sub>2</sub>; MgSO<sub>4</sub>; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; NaCl; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; NaHCO<sub>3</sub>; NaOH; NH<sub>4</sub>Cl; peroxosíran amonný

**Merck, USA, Německo:** Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen

**Millipore, USA:** Immobilon™ Transfer Membranes – PVDF; ultrafiltrační zkumavka Amicon Ultra 30K

**Nunc, InterMed, Dánsko:** Nunc Immuno Modules Polysorb a Maxisorb

**Nutricia Mléčná výživa a.s., Opava, Česká republika:** nízkotučné sušené mléko

**PAA Laboratories, Rakousko:** Dulbecco's MEM High Glucose

**Peroxides s.r.o., Sokolov, Česká republika:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Pharmacia, Švédsko:** Ficoll

**Rockland, USA:** BSA fraction V

**Serva, Německo:** Ampicilin; BIS (N,N'-metylenbisakrylamid); papain, krist. reinst, 15 EU/mg; pepsin; TEMED(N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin); TRIS(tris-(hydroxymethyl)aminomethan); TRIS/HCl; Triton X-100

**SIGMA, Německo, USA:** 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazlolin-6-sulfonová kyselina) ABTS; Anti-Chicken IgY (IgG)-Alkaline Phosphatase; Collagen type I from human lung (C5983); Concanavalin A – Sepharose 4B; elastasa; Fast Red; naphtol AS phosphate; PKH 26 Red Fluorecent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling; PKH 67 Green Fluorecent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling;

tablety BCIP/NTB SIGMA FAST™; TRIS Base; Trypsin (TPCK threated, Type XIII Bovine);

Wide Molecular Range – standard molekulových hmotností pro SDS-ELFO

**SVUS Pharma a.s., Hradec Králové:** Ceftazidim Genim

**Vidia:** protilátka proti slepičím IgY konjugovaná s peroxidasou

**Whatmann, GB:** papír Whatmann 3

**Ostatní:** řídký bílek – připraven v laboratoři (5 ml řídkého bílku / vejce, dialyzován proti destilované vodě)

## 3.2 Elektroforesa a Western blotting

Elektroforesa i „blotting“ (v překladu přenos) jsou velmi rozšířenými metodami s širokým využitím včetně biochemie nebo molekulární biologie. Existuje celá řada modifikací a uspořádání (například agarosová elektroforesa, Southern blot). V této práci bylo využito SDS elektroforesy v polyakrylamidovém gelu a Western „blottingu“.

### 3.2.1 Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu

Jedná se o elektromigrační metodu. Využívá pohybu nabitých částic vlivem elektrického pole. Migrace částice s nábojem závisí (kromě náboje) i na velikosti a tvaru molekuly. Abychom mohli využít elektroforesu k dělení proteinů pouze na základě jejich molekulových hmotností, je třeba aby separované molekuly měly uniformní náboj. Toho docílíme použitím dodecyl sulfátu sodného - SDS. SDS tak v tomto případě slouží jako detergent, má záporný náboj a pomocí své hydrofobní části se váže na proteiny (až 1,4 g SDS na 1 g proteinu) a denaturuje je. Za těchto podmínek jsou tedy molekuly separovány pouze na základě jejich molekulové hmotnosti, jejíž hodnoty se přibližně určí pomocí dostupných standardů.

Separace probíhá v gelu o určité porozitě (dáno procenty obsahu akrylamidu). Rozlišujeme gel zaostřovací (má nižší obsah akrylamidu a nižší pH) a gel separační (vyšší obsah akrylamidu a obvykle i vyšší pH). Porozitu gelů volíme i s ohledem na předpokládanou velikost našeho proteinu, například 15% gel je vhodný spíše pro separaci proteinů s nižší molekulovou hmotností (udává se 10-50 kDa), zatímco 8% gel se hodí spíše pro proteiny o vyšší molekulové hmotnosti (kolem 80 kDa).

#### **Použité roztoky:**

- redukující vzorkový pufr: 0,063 M TRIS/HCl; 2% (w/v) SDS; 10% (v/v) glycerol; 0,003% (w/v) bromfenolová modř; 5% (v/v) 2-merkaptoethanol; pH 6,8
- neredukující vzorkový pufr: 0,063 M TRIS/HCl; 2% (w/v) SDS; 10% (v/v) glycerol; 0,003 (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8
- elektrodový pufr: 0,129 M glycin; 0,025 M TRIS/HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3
- polymerační roztok A: 30% (w/v) akrylamid; 0,08% BIS v pufru A
- pufr A: 0,375 M TRIS/HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,8
- polymerační roztok B: 30% (w/v) akrylamid; 0,8% (w/v) BIS; v pufru B

- pufir B: 0,125 M TRIS; 0,1% (w/v) SDS; pH 6,8
- peroxosíran amonný (APS): 10% (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  v destilované vodě
- barvicí lázeň: 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 9,2% kyselina octová; 46% (v/v) ethanol
- odbarvovací lázeň: 10% (v/v) kyselina octová; 25% (v/v) ethanol; destilovaná voda

### **Postup:**

Elektroforetická skla o rozměrech 10x10,5 cm byla nejprve odmaštěna pomocí ethanolu, na boční strany skel byly vloženy „spacery“ o rozměru 1cm a následně byla skla vložena do aparatury. Správné sestavení aparatury je důležité, byla proto provedena kontrola, zda aparatura těsní a nedojde nám k podtečení gelu. Pak už následuje samotná příprava gelů. Byly používány dvě hustoty gelů zaostřovacích i dvě gelů separačních. Pro provedení k ověření produkce bakteriálního lektinu byly použity tyto gely:

5% zaostřovací gel o složení: 2,5 ml pufir B; 500  $\mu\text{l}$  polymerační roztok B; 3  $\mu\text{l}$  TEMED;  
60  $\mu\text{l}$  APS

15% separační gel o složení: 3,5 ml pufir A; 3,5 ml polymerační roztok A; 7  $\mu\text{l}$  TEMED;  
70  $\mu\text{l}$  APS

Naopak v případě detekce výsledků štěpení protilátek byly použity gely o nižší hustotě a to následující:

4% zaostřovací gel o složení: 2,6 ml pufir B; 400  $\mu\text{l}$  polymerační roztok B; 3  $\mu\text{l}$  TEMED;  
60  $\mu\text{l}$  APS

10% separační gel o složení: 5 ml pufir A; 2,5 ml polymerační roztok A; 7,5  $\mu\text{l}$  TEMED;  
75  $\mu\text{l}$  APS

Nejprve byl mezi skla nanesen roztok pro vytvoření separačního gelu (6 ml). Ten byl převrstven destilovanou vodou a následně nechán polymerovat 30-45minut. Po polymeraci separačního gelu byla odstraněna destilovaná voda a nalit roztok gelu zaostřovacího do kterého byl vložen hřeben pro vytvoření nanášecích jamek. Polymerace probíhala nejméně 15 minut. Následně byla aparatura umístěna do elektroforetické vany a byl přidán elektrodotový pufir, teprve poté byl opatrně vyjmut hřeben.

V případě detekce bakteriálního lektinu bylo využito redukujícího prostředí (redukující vzorkový pufir), zatímco při detekci výsledků štěpení protilátek prostředí neredukující (neredukující vzorkový pufir). Vzorky pro elektroforesu byly připravovány tak, aby koncentrace proteinu byla 1mg/ml a takto připravený vzorek byl smísen 1:1 se vzorkovým pufrem. Dále byl použit již předem připravený standard molekulových hmotností, v našem případě se jednalo o standard Sigma Wide

Range (rozsah a složení uvedeno v tab 3.1.). Připravené vzorky byly vystaveny na 5 minut teplotě 100°C (správné fungování SDS) a po vychladnutí krátce zcentrifugovány na stolní mikrocentrifuze, aby se předešlo ztrátám vlivem kondenzace na víčku mikrozkuřavky. Hotové vzorky byly nanášeny do jamek v gelu.

Poté již probíhala vlastní elektroforesa. Nejprve bylo napětí nastaveno na 70 V a podle postupu v zaostřovacím gelu bylo po 30-45 minutách zvýšeno na hodnotu 150 V. Při tomto napětí probíhala separace ještě přibližně 90 minut – elektroforesa byla ukončena ve chvíli, kdy čelo (bromfenolová modř jako ukazatel) dosáhlo vzdálenosti asi 0,5 cm od okraje (spodního) skla.

Po ukončení elektroforesy následovalo odstranění zaostřovacího gelu a separační gel byl podle dalšího uspořádání buď vložen do barvicí lázně na 45 minut a poté do odbarvovací lázně do optimálního odbarvení, nebo byl vložen do transferového pufru pro pokračování metodou Western „blot“.

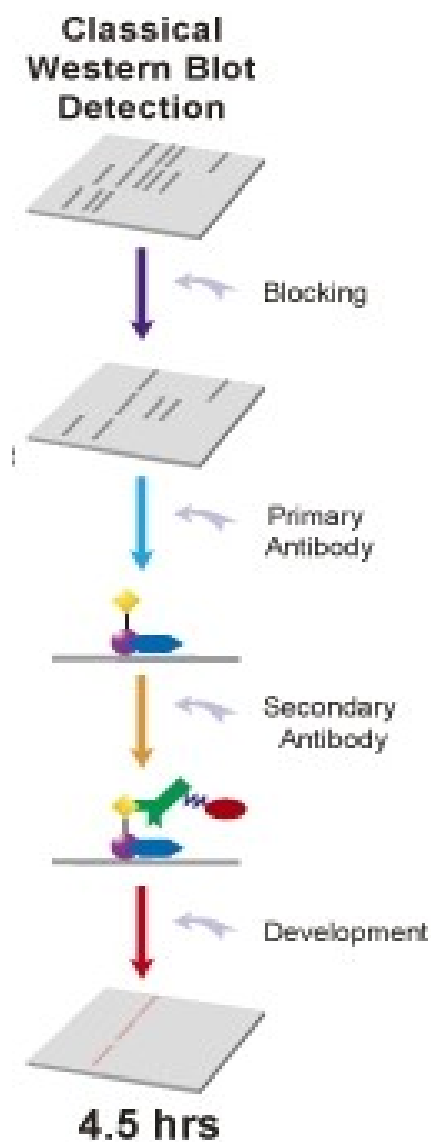
Molekulová hmotnost (Da)	Protein
205000	myosin
116000	$\beta$ -galaktosidasa
97000	fosforylaza
84000	fruktosa-6-fosfát kinasa
66000	albumin
55000	glutamát dehydrogenasa
45000	ovalbumin
36000	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
29000	karbonát anhydrasa
24000	trypsinogen
20000	trypsin inhibitor
14200	$\alpha$ -laktalbumin
6500	aprotinin

Tabulka 3.2.1: Složení standardu Sigma Wide Range

### 3.2.2 Western blot

Western „blotting“ je metoda využívající přenos (blot) proteinů z gelu (z elektroforesy) na membránu působením elektrického proudu. Jedná se o velmi rozšířenou metodu použitelnou nejen pro proteiny. Používají se nitrocelulosové nebo PVDF membrány. Jakmile jsou proteiny přeneseny na membránu, je nutné zablokovat volná vazebná místa membrány, aby se předešlo nespecifickým

reakcím protilátky se strukturami membrány. Po zablokování membrány je dalším krokem detekce pomocí primární a sekundární protilátky (obvykle konjugovaná s enzymem umožňujícím vizualizaci – křenuvá peroxidasa – Px, alkalická fosfatasa – AP). Následné vyvolání je obvykle založeno na enzymatické reakci - příslušný enzym přeměňuje bezbarvý, rozpustný substrát na nerozpustný barevný produkt, který vidíme jako zbarvení membrány v místě detekovaného proteinu. Zjednodušené schéma průběhu přenosu je znázorněno na obrázku 3.1



**Obr. 3.2.1:** Schéma Western „blottingu“

### **Použité roztoky:**

- transferový pufr: 0,025 M TRIS/HCl; 0,192 M glycin; 10% (v/v) methanol; pH 8,3
- PBS-Triton: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; 0,3% (v/v) Triton X-100; pH 7,2
- roztok sušeného mléka: 5% (w/v) nízkotučné sušené mléko v PBS-Triton
- vyvolávací roztok pro AP: tableta BCIP/NTB SIGMA FAST™; 1 tableta do 20ml destilované vody
- vyvolávací roztok pro peroxidasu: 2,4 mM AEC (3-amino-9-ethylcarbonate) - 5 mg rozpuštěno v 0,5 ml DMF; 0,05% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 50 mM acetátový pufr pH 5,0 (na 10 ml roztoku použito 9,5 ml pufru)

### **Postup:**

Před vlastním přenosem proběhla separace proteinů pomocí elektroforesy v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS. Po skončení separace byl gel změřen a vložen na 30 minut do transferového (přenosového) pufru s 10% methanolem. Mezitím byly vystřiženy PVDF membrána a 6x papír Whatman o stejných rozměrech jako gel. Membrána byla nejprve na 30 sekund vložena do methanolu, poté do destilované vody a nakonec do transferového pufru. Papíry Whatman byly ponořeny pouze do transferového pufru. Následuje uspořádání vlastního „blotu“ - do aparatury byly vloženy jako první 3x papír Whatman, poté PVDF membrána a na ni gel a opět 3x Whatman. Dalším krokem bylo sestavení celé aparatury a její zapojení do zdroje elektrického napětí. Proud byl nastaven tak, aby jeho hodnota odpovídala 4 mA/ cm<sup>2</sup> membrány po dobu 40 minut.

Po dokončení přenosu byl gel vložena do barvicí lázně (i další postup jako u SDS-elektroforesy), část membrány se standardem byla odstřižena a vložena také do barvicí lázně, ale pouze na 10 sekund a poté odbarvována. Zbývá část membrány byla označena a rozstříhána na příslušných místech podle inkubace s primární protilátkou. Následně byly již jednotlivé membrány vloženy do blokovacího roztoku mléka v PBS-Triton a inkubovány buď 1 hodinu za laboratorní teploty, případně přes noc v chladu (4°C). Po zablokování byly membrány inkubovány s primární protilátkou – 30 µg/ml protilátky (v případě afinitně purifikované protilátky 1 µg/ml) v roztoku mléko / PBS-Triton po dobu 2 hodin za stálého třepání za laboratorní teploty. Po skončení inkubace byly membrány 5x důkladně promyty roztokem mléka v PBS-Triton a poté následovala inkubace se sekundární protilátkou. Jako sekundární protilátka byla použita anti-IgY protilátka s konjugovanou alkalickou fosfatou nebo peroxidasou (pro obě protilátky stejná koncentrace:

1:10000 v roztoku mléka v PBS-Triton). Tato inkubace trvala 1 hodinu za stejných podmínek jako u primární protilátky. Po inkubaci následovalo opět promytí (3x za stejných podmínek jako v prvním případě a 3x už jen PBS-Triton) membrán.

Posledním krokem je vyvolání. Promyté membrány byly ponořeny do vyvolávacího roztoku (pro alkalickou fosfátasu případně peroxidasu) a inkubovány do optimálního vybarvení proužků (obvykle 5-20 minut). Poté byla vyvolávací reakce zastavena přenesením membrán do destilované vody a membrány poté osušeny na filtračním papíře.

### 3.3 ELISA

Jedná se o imunochemickou metodu založenou na reakci antigen-protilátka. Název je odvozen jako zkratka z počátečních písmen anglického označení metody: Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Díky specifické reakci tak lze kvantitativně měřit koncentraci antigenu případně protilátky. V naší práci bylo využito několik uspořádání.

V prvním případě bylo pomocí této metody zjišťováno, zda slepičí protilátky proti lektinu z *Pseudomonas aeruginosa* – PA-III specificky rozpoznávají tento lektin. Imobilizovaným antigenem byl rekombinantně připravený lektin PA-III - **A**)

V dalším kroku byla ELISA využita pro detekci lektinu PA-III přímo na bakteriálních buňkách. Antigenem byly celé bakterie PA - **B**)

V posledním uspořádání bylo naší snahou určit množství bakterií navázaných na plicních epitelálních buňkách a to prostřednictvím měření koncentrace lektinu na povrchu bakterií - **C**)

Antigen je specificky rozpoznán primární protilátkou, která je dále detekována pomocí protilátky sekundární konjugované s enzymem katalyzujícím chromogenní reakci (obdobně jako sekundární protilátka u metody Western „blot“). V posledním kroku tak vzniká barevný produkt, jehož koncentrace odpovídá koncentraci primární protilátky, vyhodnocení je obvykle spektrofotometrické.

#### **Použité roztoky:**

- PBS-ELISA: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; pH 7,2
- imobilizační pufr: 13 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; pH 9,6
- PBS-ELISA + TWEEN: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; 0,1% (v/v) TWEEN® 20; pH 7,2
- blokovací roztok: 2% (w/v) řídký bílek nebo 2% (w/v) BSA fraction V v PBS-ELISA + TWEEN
- vyvolávací roztok pro AP: 30 mM NaHCO<sub>3</sub>; 20 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% pNPP (p-nitro-fenolfosfát)



- vyvolávací roztok pro peroxidasu: 0,05 M citráto-fosfátový pufr pH 5,0; 0,02 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0,01 % (w/v) ABTS

Bylo použito několik uspořádání s různými antigeny. Po imobilizaci obvykle následovala i fixace.

#### **A) Imobilizace lektinu:**

Byl připraven roztok rekombinantně připraveného lektinu PA-IIL o koncentraci 4 µg/ml v imobilizačním pufru. Do jednotlivých jamek destičky Polysorb bylo pipetováno 100 µl. Inkubace byla provedena přes noc v chladu (4°C).

#### **B) Imobilizace bakterií *Pseudomonas aeruginosa*:**

Namnožené bakterie byly centrifugačně promyty od media a naředěny na koncentraci 10<sup>7</sup> bakteriálních buněk/ml v imobilizačním pufru. Z tohoto výchozího roztoku byly podle potřeby dále ředěny. Nanášelo se 100 µl / jamka na destičky Polysorb. Následně byla destička centrifugována při 3000 RPM 20 minut na K70D (Janetzky). K usazeným bakteriím bylo přidáno 150 µl čistého ethanolu na 10 minut a po opatrném vyklepnutí pak 150 µl methanolu na 15 minut pro fixaci bakterií. Methanol byl vyklepnut a destičky se zafixovaným antigenem byly ponechány vyschnout přes noc.

#### **C) Imobilizace plicních epitelálních buněk:**

Ve snaze docílit adheze epitelálních buněk byla kromě destiček Polysorb vyzkoušena řada povrchů potažených různými sloučeninami – želatina, poly-L-lysin, L-lysin, BSA a také destičky Cell Bind (Corning). Množství buněčné suspence na jamku bylo optimalizováno za pomoci mikroskopického pozorování, byla snaha dodržet takové množství buněk, aby pokryly asi 50% plochy jamky. Buňky byly nejprve 2-3 dny kultivovány v příslušném mediu (DMEM, antibiotika viz kultivace buněk kap. 3.4.3) v inkubátoru při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Po kultivaci bylo medium opatrně odsáto a k buňkám bylo přidáno 100 µl roztoku bakterií (10<sup>7</sup> b/ml) s příslušnými protilátkami (30 µg/ml) a 2% (w/v) BSA v PBS-ELISA nebo 100µl roztoku lektinu PA-IIL (100 µg/ml) v PBS-ELISA. Buňky byly s bakteriemi inkubovány 1 hodinu při 37°C a poté následovala fixace pomocí ethanolu a methanolu jako při imobilizaci samotných bakterií.

Po imobilizaci antigenů byly jamky 5x promyty 200 µl PBS-ELISA + TWEEN a následně zablokovány blokovacím roztokem (2% w/v BSA nebo řídký bílek, v PBS-ELISA+ TWEEN nebo imobilizačním pufru) – 150 µl / jamka. Blokování bylo prováděno 1 hodinu při 37°C a poté promyta opět 5x 200 µl PBS-ELISA + TWEEN.

Na zablokované povrchy jamek (kvůli vyloučení nespecifických interakcí) byly aplikovány roztoky primárních protilátek proti lektinu PA-IIL o daných koncentracích v PBS-ELISA (později ještě spolu s 2% BSA). Primární protilátky byly nanášeny v koncentraci 30 µg/ml (pouze afinitně purifikovaná protilátka byla nanášena v koncentraci 1 µg/ml). Byly použity tyto protilátky: 4K (kontrolní protilátka proti lektinu PA-IIL), 4S (specifická protilátka proti lektinu PA-IIL), 4P (afinitně purifikovaná protilátka proti lektinu PA-IIL), K (kontrolní protilátka proti celé bakterii PA), © (specifická protilátka proti celé bakterii PA). Inkubace s primárními protilátkami trvala 2 hodiny při 37°C. Po inkubaci následovalo promytí 5x 200 µl PBS-ELISA + TWEEN. Dalším krokem byla inkubace se sekundární protilátkou – konjugovaná s alkalickou fosfatase (1:2500) nebo s křenuvou peroxidase (1:1000) v PBS-ELISA (případně s 2% BSA). Tato inkubace probíhala 1 hodinu při 37°C, poté opět promytí jako v předchozím kroku.

K vyvolání bylo pipetováno do každé jamky 100 µl vyvolávacího roztoku (složení pro oba enzymy viz výše). Vyvolávací roztok byl inkubován 5-15 minut. Poté byla reakce zastavena, v případě alkalické fosfatasy přidavkem 50 µl 3 M NaOH a v případě peroxidasy 100 µl 10% SDS. Spektrofotometrické stanovení koncentrace bylo prováděno na přístroji Sunrise Remote při vlnové délce 405 nm (pro oba enzymy), referentní vlnová délka byla 630 nm.

### **3.4 Izolace plicních epiteliálních buněk**

Buňky plicního epitelu mohou plnit funkci receptorů adhesivních molekul bakterií. Tento jev je velmi častý u pacientů s CF, kde jsou buňky často pozměněné (např. nižší úroveň sialylace glykokonjugátů buněk). Pro studium interakce buněk plicního epitelu s bakteriemi (zejména PA) byly proto izolovány buňky z tkáně pacientů s CF. Dále byly buňky izolovány pomocí techniky „brushing“. Ke srovnání byla využita i odvozená linie buněk - A549 (nádorová linie pneumocytů). Z hlediska skladby buněk v plicním epitelu jsou pro naše účely nejdůležitější pneumocyty II. typu, které tvoří asi 5% buněk v plicích.

#### **3.4.1 Izolace buněk z tkáně**

Kontrolní izolace pro optimalizaci metody byly prováděny na potkaních plicích, bylo využito informací z [43] a [44]. Materiál z lidských plic pro izolaci buněk vyštěpením z tkáně byl získán ve spolupráci s Transplantačním oddělením, FN Motol a Ústavem lékařské mikrobiologie 2. LF, Motol.

### **Použité roztoky:**

- 0,15 M NaCl v destilované vodě
- 0,15 M NaCl + 3 mM EDTA v destilované vodě
- PBS-Glc: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; 0,4% (w/v) glukosa; pH 7,2
- TRIS bazický pufr – TBS: 0,15 M NaCl; 7,6 mM TRIS Base; 15,2 mM TRIS/HCl; pH 8,0
- roztok pro štěpení tkáně: 0,025 mg/ml trypsin; 1,3 U/ml elastasa; 10 µg/ml DNasa I; v TBS
- roztoky Ficoll o definované hustotě: Ficoll v PBS-Glc; roztoky o hustotách 1,077 g/cm<sup>3</sup>; 1,060 g/cm<sup>3</sup>; 1,040 g/cm<sup>3</sup>

### **Postup:**

Plicní tkáň byla uchovávána v chladu. Nejprve byla několikrát promyta roztokem NaCl (případně s EDTA). Promytý materiál byl nastříhán na menší části, které byly zváženy. Jedna část (asi 2 g) byla zamrazena pomocí kapalného dusíku a poté uchovávána při -80°C, druhá část (asi 6 g) byla zamrazena v roztoku NaCl spolu s 10% DMSO a také při -80°C a zbývající část (22 g) byla dále nastříhána na menší kousky a podrobena několikanásobnému promytí již v PBS-Glc. Tyto části byly podrobeny enzymatickému štěpení roztokem trypsinu a elastasy (přesné složení viz výše) po dobu 25 minut při 37°C za míchání. Následně bylo štěpení zastaveno přidavkem 10% (v/v) FCS, trypsin inhibitoru (250 µg/ml) a DNasy I (50 µg/ml). Tato směs byla inkubována 10 minut při 37°C. Po štěpení tkáně byly části plic dále nastříhány.

Buněčná suspence spolu s malými kousky tkáně byla několikrát filtrována nejprve přes sítko o porozitě 200 µm a takto získaný filtrát byl dále přenesen na sítko o porozitě 80 µm. Filtrát byl centrifugován 15 minut 3000 RPM na K23. Peleta byla poté resuspendována v 5 ml PBS-Glc. Do vychlazené centrifugační kyvety byly opatrně navrstveny jednotlivé roztoky Ficollu (postupně vždy 5 ml, vytemperované na 5°C) o hustotách 1,077; 1,060 a 1,040 g.cm<sup>-3</sup> a na ně 5 ml buněčné suspence získané z plicní tkáně. Centrifugace na vrstvách Ficollu probíhala 35-45 minut při 3000 RPM (K23). Buňky rozdělené podle odpovídající hustoty byly opatrně odebrány z rozhraní jednotlivých vrstev a takto získané buněčné frakce byly dále zpracovány. Frakce bylo nutné promýt od zbytků ficollu. Byly centrifugovány 10 minut při 5000 RPM na MicroCentaur (Sanyo). Pelety poté resuspendovány ve 2 ml PBS-Glc a opět centrifugovány za stejných podmínek a po centrifugaci opět pelety resuspendovány ve 2 ml PBS-Glc. Část buněčné suspence byla zamrazena s 10% (v/v) DMSO při -80°C a zbylá část byla uchována na ledu pro další použití a kultivaci.

### 3.4.2 Izolace buněk získaných pomocí „brushingu“

Vzhledem k faktu, že získání buněk štěpením tkáně je metoda při níž může dojít k poškození řady důležitých povrchových struktur buněk, bylo využito i jiné, šetrnější metody k získání buněk plicního epitelu. Touto metodou je takzvaný „brushing“ [45]. Buňky jsou získány od pacientů s CF při bronchoskopickém vyšetření pomocí speciálního kartáčku na který jsou zachyceny (odtud název „brushing“). Vlastní „brushing“ byl proveden ve FN Motol.

#### **Použité roztoky:**

- roztok DNasy I: 50 µg/ml DNasy I v PBS-ELISA
- zásobní roztok trypanové modři: 4 mg/ml v PBS-ELISA
- 0,5 nebo 0,1% (w/v) Giemsa v destilované vodě

#### **Postup:**

Kartáček se zachycenými buňkami byl vložen do media LHC-9 s 10% (v/v) FCS. Takto získané buňky byly uchovány v chladu. Poté jsme ke vzorku přidali roztok DNasy I (50 µg/ml), abychom uvolnili i buňky zachycené v hlenu. Suspense byla inkubována 10 minut na ledu. Dalším krokem byla filtrace přes mikrofiltr o porozitě 70 µm (Falcon, BD). Získaná suspence byla centrifugována 10 minut při 2000 RPM (150 x g) na MicroCentaur. Peleta byla resuspendována v 400 µl LHC-9 media. Z 10 µl suspence byl udělán roztěr na mikroskopické sklíčko, vzorek zafixován 10% (v/v) formaldehydem a nabarven Giemsa. Viabilita získaných buněk byla ověřena pomocí barvení trypanovou modří (1 µl trypanové modři na 10 µl suspence buněk).

### 3.4.3 Kultivace buněk plicního epitelu

Buňky plicního epitelu získané z izolací i linie A549 byly kultivovány za různých podmínek. Obecně lze říci, že byly kultivovány jednak ve speciálních lahvičkách určených pro tyto účely (používány byly lahvičky o ploše: 75 cm<sup>2</sup>, 25 cm<sup>2</sup> a 12,5 cm<sup>2</sup>) a také na destičkách se specifickými povrchy. Jednalo se o destičky Cell Bind (Corning) – 12 jamek, 96 jamek a 96 jamek černé. Byly použity i mikrotitrační destičky (96 jamek, Polysorb) potažené různými povrchy – želatina (2,5 – 1 mg/ml), poly-L-lysin (1 mg/ml), L-lysin (1 M roztok), fibronectin (2 µg/cm<sup>2</sup>) a kolagen typ I (3 µg/cm<sup>2</sup>). Povrchy jamek (případně kultivačních lahviček) byly upraveny nanesením příslušného množství dané látky (podle velikosti potahovaných jamek), poté byly inkubovány 2 hodiny za laboratorní teploty na třepačce a poté vmyty PBS-ELISA, připravené povrchy byly poté nechány vyschnout.

Veškeré inkubace buněk probíhaly v inkubátoru při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Pasážování buněk probíhalo – digesčním roztokem 0,25% (w/v) trypsinu s 0,53 mM EDTA v PBS-ELISA. Digescní roztok byl nechán působit při 37°C 5-10minut (v závislosti na typu buněk a velikosti povrchu), průběh pasáže byl sledován mikroskopicky. Reakce byla zastavena přidávkem 20-50% (v/v) FCS a buněčná suspence byla centrifugována 2000-3000 RPM, 10 minut na MicroCentaur. Poté byly buňky přeneseny do nové kultivační nádoby, případně zamrazeny v mediu s 10% (v/v) DMSO nebo glycerolem.

• **Kultivace buněk linie A549:**

Buňky A549 jsou linií lidských plicních pneumocytů odvozených z plicního karcinomu [46]. Vzhledem k faktu, že se jedná o odvozenou linii, nevyžaduje některé růstové faktory, je tedy méně náročná na složení kultivačního media oproti buňkám izolovaným z tkáně („primární kultura“), buňky ochotně přisedají k povrchu a dělí se.

Kultivace probíhala v mediu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) doplněném o aminokyseliny: 0,28 mM L-alanin; 0,25 mM L-asparagin.H<sub>2</sub>O; 0,225 mM L-asparagová kyselina; 0,51 mM L-glutamová kyselina; 0,35 mM L-prolin a 4 mM L-glutamin. Dále bylo medium doplněno 10% (v/v) FCS a antibiotiky – Ampicilin (100 µg/ml), Amphotericin B (0,5 µg/ml), Gentamicin (50 µg/ml), Chloramfenikol (100 µg/ml) a Kanamycin (100 µg/ml).

• **Kultivace buněk získaných izolací :**

Buňky získané izolací z tkáně mají do jisté míry při vyštěpování porušeny povrchové struktury a nevykazují snahu dále se dělit pokud nemají optimální složení media pro obnovu struktur. Bezprostředně po izolacích z tkáně byly buňky kultivovány v mediu o obdobném složení jako linie A549, ale byl problém s přisedáním a dělením buněk, proto bylo hledáno vhodnější medium.

Buňky získané pomocí „brushingu“ a rozmražené buňky získané izolací z tkáně byly již kultivovány v selektivním mediu LHC-9 (Invitrogen-Gibco), které je vhodné pro buňky plicního epitelu. Buňky byly kultivovány v tomto mediu doplněném antibiotiky (viz A549). Podle potřeby doplněno ještě o Ceftazidim Genim (4 µg/ml) a Meronem (8 µg/ml). Kultivace probíhala bez přidavku FCS.

### 3.5 Štěpení protilátek

Protilátky skládají z několika částí. Použitím enzymů, je lze štěpit na definované fragmenty, kde ke štěpení dojde závisí na použitém enzymu. Obecně lze říci, že se odštěpí fragment Fc (viz obr. V kap. 1.4.2 věnované protilátkám, str. 23) a fragment F(ab)<sub>2</sub> nebo Fab' a Fab. Fc fragment je silně glykosylován, čehož lze využít při jeho separaci. Při štěpení pepsinem i papainem bylo postupováno podle Akita a Nakai [47].

#### **Použité roztoky:**

- PBS-ELISA: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; pH 7,2
- 100 mM fosfátový pufr: 0,15 M NaCl; 64 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 17 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; pH 7,0
- 50 mM acetátový pufr: 50 mM kyselina octová; pH upraveno na požadovanou hodnotu NaOH; pH 4,1
- 1 M roztok NaOH
- 20 mM TRIS/HCl: 0,5 M NaCl; 20 mM Trizma Base; titrace HCl; pH 7,4

#### **Postup:**

Štěpení pepsinem probíhalo v poměru 1:50 (byl zkoušen i poměr 1:100) s protilátkou v 50 mM acetátovém pufru. Nejprve byl pepsin rozpuštěn v acetátovém pufru (0,2 mg/ml) a poté bylo přidáno příslušné množství protilátky (10 mg/ml), celkový objem reakční směsi byl 5 ml. Směs byla promíchána a ihned byl odebrán vzorek 0. Štěpení probíhalo za kontinuálního třepání a při teplotě 37°C 15 hodin. Reakce byla zastavena přidáním 1 M NaOH (1 ml NaOH / 5ml). Pro detekci výsledků štěpení byla použita SDS elektroforesa v polyakrylamidovém gelu následovaná Western „blotem“. Separace štěpených fragmentů nebyla provedena.

Při štěpení protilátek pomocí papainu byla prvním krokem preinkubace papainu (0,1 mg/ml) s cysteinem (10 mM) ve 100 mM fosfátovém pufru o pH 7,0 po dobu 30 minut při 37°C a třepání. Poté byla přidána protilátka (10 mg/ml), aby poměr enzym:protilátka byl 1:100 (w/w) a EDTA (3 mM), celkový objem reakční směsi byl 5ml. Byl odebrán vzorek 0 a poté byla směs inkubována za stejných podmínek jako při použití pepsinu po dobu 15 hodin. Zastavení štěpení bylo provedeno přidáním jodacetamidu tak, aby jeho finální koncentrace byla 30 mM.

Výsledky štěpení byly vyhodnoceny pomocí elektroforesy a Western „blotu“ stejně jako v případě štěpení pepsinem. Vzhledem ke kladnému výsledku štěpení, byl produkt dialyzován přes noc proti 5l 20 mM TRIS/HCl o pH 7,4 pro další zpracování.

Pro odstranění Fc fragmentů z reakční směsi bylo použito Sephaphrosy s kovalentně vázaným konkanavalinem. Do separační kolony byly nanесeny 2 ml suspenze Concanavalin A Sepharose 4B (Sigma), což odpovídalo asi 1,7 ml gelu. Takto připravená kolona byla nejprve 5x promyta 20 mM TRIS/HCl o pH 7,4. Následně byl na kolonu nanесen produkt štěpení, jímán eluát ve frakcích 0,6 ml. Nakonec byla kolona ještě 4x promyta vždy 600  $\mu$ l pufru TRIS/HCl a tyto frakce byly také jímány. Pro detekci frakcí obsahujících Fab jsme využili SDS elektroforesu. Příslušné frakce byly spojeny a dialyzovány 3x proti 2l PBS-ELISA o pH 7,2 při 5°C. Posledním krokem bylo změření koncentrace a sterilizace (použit filtr o porozitě 0,22  $\mu$ m) takto připravených fragmentů.

### 3.6 Kultivace bakterií

V této práci byla použity následující kmeny bakterie *Pseudomonas aeruginosa* z Ústavu lékařské mikrobiologie FN Motol:

- PAK – sbírkový kontrolní kmen *Pseudomonas aeruginosa*;
- PA – sbírkový kmen mukosní formy *Pseudomonas aeruginosa*;
- PACF – kmen *Pseudomonas aeruginosa* izolovaný z pacienta s CF;

Vzhledem k optimalizaci řady metod byly používány především kmeny PA a PAK, které se od sebe téměř nelišily. Kmen PACF vykazoval odlišnosti během kultivací a dalších experimentů.

Pro kultivaci bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byly využívány 2 typy medií. Jednalo se o medium s optimálním složením označované jako PS, a také medium minimální označované jako M9. Při kultivaci v minimálním mediu M9 dochází u bakterie ke stimulaci tvorby lektinu Pa-III [48]. Složení jednotlivých medií je následující:

PS médium: 1,6% (w/v) pepton; 1% (w/v) enzymatický kaseinový hydrolyzát; 57 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5% (v/v) glycerol; (sterilizováno v autoklávu 20 min při 121°C)

M9 minimální médium: 16,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5 mM NaCl; 49 mM NH<sub>4</sub>Cl; (sterilizováno v autoklávu 20 min při 121°C); 2 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,2 % (w/v) glukosa; (sterilizováno přes mikrobiální filtr porozity 0,22  $\mu$ m)

Bakterie byly kultivovány při 37°C, v případě použití kapalných medií probíhala kultivace v inkubátoru umožňujícím i pravidelné třepání.

Pro dlouhodobé uchování bakterií bylo využito kryoprezervace. Postup byl následující: namnožené bakterie v PS mediu byly alikvotovány po 100 µl do mikrozkuvek eppendorf. K bakteriální suspensi bylo přidáno 100 µl kryoprezervačního media (složení: 40% (w/v) glycerol v PBS-ELISA; sterilizováno přes mikrobiální filtr porozity 0,22 µm). Následovalo rychlé zamražení v tekutém dusíku a poté byly kultury uchovávány při -80°C.

Koncentrace bakteriálních buněk v suspensi byla určována pomocí měření absorbance (optické denzity) při 600 nm (na přístroji Spekol). Pro výpočet koncentrace slouží převodní vztah [49] :

$$CFU = A_{600} \cdot 10^8$$

CFU koncentrace bakterií v b/ml (z angl. Colony-forming Units)

$A_{600}$  absorbance při 600 nm

## 3.7 Adhezní testy, interakce epitelu s bakteriemi

Při adhezních testech provedených dle Mehl, Chi, Nunn *et al.* 1991 [46] byla sledována adheze a internalizace bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Jako modelový systém plicního epitelu byly využity buňky linie A549.

### 3.7.1 Test adheze bakterií

Buňky A549 byly inkubovány na destičce Cell Bind – 12 jamek po dobu 3 dnů pro vytvoření souvislé vrstvy („monolayer“), kultivace byla provedena ve DMEM s aminokyselinami (viz výše), 10% FCS a antibiotiky. Kromě linie plicních buněk byly namnoženy i bakterie *Pseudomonas aeruginosa* v minimálním mediu M9.

#### Použité roztoky:

- PBS-S: PBS-ELISA (viz výše) s 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM HEPES; pH 7,2
- 2,5% (v/v) roztok glutaraldehydu v PBS-ELISA
- Giemsa: 1% (w/v) roztok v destilované vodě
- 1% (w/v) roztok L-fukosy v PBS-S
- 1% (w/v) roztok D-glukosy v PBS-S
- roztok antibiotik: Ampicilin (100 µg/ml), Amphotericin B (0,5 µg/ml), Gentamicin (50 µg/ml), Chloramfenikol (100 µg/ml), Kanamycin (100 µg/ml)



### **Postup:**

Mono vrstva buněk A549 byla 3x promyta vytemperovaným (37°C) PBS-S a poté převrstvena 1 ml tohoto roztoku. K buňkám v PBS-S bylo přidáno do jednotlivých jamek 0,2 ml bakteriální suspence o koncentraci  $5 \cdot 10^4$  bakterií (což je asi 50ti násobek vzhledem k množství A549), nebo stejné množství bakteriální suspence spolu s glukosou, fukosou či s roztokem 5 antibiotik. Takto připravené reakční směsi byly inkubovány 2 hodiny při 37°C za mírného třepání. Po skončení inkubace byly neadherované bakterie odstraněny trojnásobným promytím 1,5 ml PBS-S. Následovala fixace 2,5% glutaraldehydem po dobu 2 hodin. Po zafixování byly jamky promyty destilovanou vodou a buňky barveny pomocí Giemsa. Barvení trvalo 10 minut a poté byly jamky 3x promyty destilovanou vodou. Destička byla ponechána vyschnout přes noc v chladu a poté vyhodnocena mikroskopicky.

## **3.7.2 Internalizace bakterií**

### **Použité roztoky:**

- PBS-S; roztoky glukosy a fukosy a 5 antibiotik viz. výše
- směs pro pasáž: 0,53 mM EDTA, 0,25% (w/v) trypsin v PBS-ELISA
- LB medium: trypton; „yeast“ extrakt; NaCl

### **Postup:**

Buňky A549 a bakterie PA byly připraveny stejně jako v kap. 3.6.1. Vrstva buněk A549 na destičce Cell Bind byla 3x promyta PBS-S. a k buňkám bylo přidáno 1,5 ml suspence bakterií (případně spolu s dalšími složkami, jako u adhezního testu, roztoky stejné složení jako v kap. 3.6.1) na jamku. Inkubace trvala 2 hodiny při 37°C za mírného třepání reakční směsí. Po skončení inkubace byla směs 3x promyta PBS-S o teplotě 37°C, poté byl aplikován roztok gentamicinu (50 µg/ml) a inkubováno 90 minut. Následovalo opět promytí.

Buněčná vrstva byla poté uvolněna pomocí trypsinu a EDTA (inkubace 5 minut) obdobně jako při pasážování kultury, reakce byla zastavena 0,005% (w/v) roztokem trypsin-inhibitoru. Uvolněné buňky byly centrifugovány 2000 RPM, 10 minut (MicroCentaur, Sanyo). Získané pelety byly resuspendovány ve 20 µl Triton X-100 (inkubace 10 minut) k uvolnění intracelulárně pohlcených bakterií. Získaný lyzát byl poté smísen s 1 ml sterilního LB media. Jednotlivé vzorky byly postupně ředěny 10-řadou. Z každého vzorku bylo 100 µl nanášeno na agarovou plotnu (Baxter). Po 2 dnech inkubace při 37°C byly spočítány vyrostlé kolonie.

## 3.8 Fluorescenční značení buněk

Pro studium adheze bakterií na buňky plicního epitelu byly hledány možnosti objektivního vyhodnocení nejen metodou ELISA. Jednou z dalších metod je fluorescenční značení bakterií a epiteliálních buněk a následná kvantifikace fluorescence. Cílem fluorescenčního značení bylo získat fluoreskující bakterie, které i po označení jsou životaschopné a nemají modifikované povrchové struktury.

### 3.8.1 Značení bakterií pomocí FITC

Fluorescein-isothiokyanát – FITC je často využívaná chemicky reaktivní fluorescenční sloučenina, která má excitační vlnovou délku 495 nm a emisní 521 nm. Jedná se o zeleně fluoreskující sloučeninu, která kovalentně modifikuje primární aminoskupiny.

#### Použité roztoky:

- uhličitanový pufr: 0,1 M NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,; pH 9,5 (upraveno pomocí HCl)
- zásobní roztok FITC : 1 mg/ ml FITC v uhličitanovém pufru

#### Postup:

Namnožené bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byly centrifugačně promyty od media. Následně byly připraveny vzorky pro značení a kontroly o následujícím složení:

kontrola 1 – bakterie v PBS-ELISA

kontrola 2 – bakterie v uhličitanovém pufru

vzorek 1 – bakterie v uhličitanovém pufru s 0,1 mg/ml FITC

vzorek 2 – bakterie v PBS-ELISA s přidavkem 100 µl zásobního roztoku FITC

Vzorky i kontroly byly inkubovány 1 hodinu při 37°C. Dalším krokem bylo vymytí činidla centrifugací na 7000 RPM (MicroCentaur) 10 minut a peleta byla resuspendována PBS-ELISA. Centrifugační promytí bylo provedeno celkem 3x. Vyhodnocení bylo provedeno mikroskopicky – pomocí mikrobiologické kličky byl udělán na podložní sklíčko roztěr, který byl fixován několikerým protažením plamenem. Tento vzorek byl mikroskopován za pomoci fluorescenčního mikroskopu Nikon-Eclipse (filtr 31001 FITC C87701). Dále bylo testováno zda označené bakterie jsou životaschopné a jak dochází k poklesu fluorescence bakterií vlivem jejich dělení. Viabilita

byla testována roztěrem na agarové plotny a následnou inkubací po dobu 2 dnů při 37°C, případně sledováním růstové křivky. Z jednotlivých časů byly dělány roztěry, které byly vyhodnoceny mikroskopicky (viz výše).

### **3.8.2 Značení bakterií pomocí CellTracker**

V případě barviva CellTracker Green CMFDA bylo nejprve postupováno dle návodu poskytnutého výrobcem (Invitrogen) a poté bylo přistoupeno k modifikace v postupu.

#### **Základní postup:**

Podle návodu jsme si připravili 10 mM zásobní roztok CellTrackeru (dále CT) rozpuštěním 50 µg látky v 11 µl DMSO. Z tohoto zásobního roztoku byly dále připraveny pracovní roztoky o koncentraci 10 µM v PBS-ELISA. K 1 ml pracovního roztoku CT bylo přidáno 50 µl bakteriální suspence ( $OD_{600\text{ nm}} \sim 1,1$ ) a vzorek byl dobře promíchán. Inkubace probíhala 30 minut při 37°C. Poté byl centrifugačně oddělen barvicí roztok a bakteriální peleta byla resuspendována v 1 ml temperovaného (37°C) PBS-ELISA a vzniklá suspence byla dále inkubována 30 minut při 37°C. Následovalo další promytí a mikroskopické vyhodnocení.

#### **Modifikovaný postup:**

Kromě základního, návod dodržujícího postupu byl použit i námi modifikovaný postup pro značení PA touto sloučeninou. Bylo testováno více uspořádání.

- 1) vzorek připraven stejně jako v základním postupu – 10 µM roztok CT v PBS-ELISA a stejné množství bakterií
- 2) změna složení pracovního roztoku - 10 µM roztok CT v PBS- ELISA s doplněním obsahu NaCl na 5% (w/v) a přidavkem 0,5 mM EDTA a upraveným pH na 8,5
- 3) upravený pracovní roztok + „teplotní šok“ – použito stejné upravení pracovního roztoku jako u 2) a bakterie byly vystaveny „teplotnímu šoku“ (inkubace 10 minut na ledu, poté 37°C)
- 4) upravený pracovní roztok + „teplotní šok“ + CaCl<sub>2</sub> – pracovní roztok viz 2), bakterie byly vystaveny „teplotnímu šoku“ a po inkubaci ve 37°C opět inkubovány 15 minut na ledu s přidavkem CaCl<sub>2</sub> (výsledná koncentrace v roztoku 100 mM)
- 5) značení „kompetentních buněk“ - bakterie byly nejprve inkubovány 10 minut na ledu, poté centrifugovány (10 000 RPM, 5 minut, MicroCentaur) a peleta resuspendována v 0,5 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> a inkubována 15 minut na ledu a bakterie opět centrifugovány, poté peleta resuspendována v upraveném pracovním roztoku CT.

Takto připravené jednotlivé vzorky byly inkubovány 30 minut při 37°C. Poté bylo barvivo centrifugačně odmyto. Centrifugace byla provedena 1x při 13 000 RPM po dobu 10 minut na centrifuze MicroCentaur. Bakterie byly poté přeneseny do nového kultivačního media (Ps) a kultivovány přes noc při 37°C za mírného třepání. Následně byly centrifugovány a připraveny roztěry pro mikroskopické vyhodnocení (postup stejný jako u FITC).

### **3.8.3 Značení bakterií pomocí PKH 67**

Další fluorescenční sloučeninou (zelená fluorescence) která byla vyzkoušena pro značení bakterie *Pseudomonas aeruginosa* bylo barvivo označované jako PKH 67 (Sigma – PKH 67 fluorescent cell linker Mini kit). Nejprve byl vyzkoušen pracovní postup doporučený firmou Sigma, poté bylo přistoupeno k jeho modifikaci, obdobně jako v případě CellTrackeru.

#### **Použité roztoky:**

- Mini kit: PKH 67 Cell Linker v ethanolu (1 mM); diluent C
- PBS-ELISA: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; pH 7,2
- PBS + Tween: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; 0,1% (v/v) TWEEN® 20; pH 7,2
- BSA: 1% w/v BSA fraction V v PBS-ELISA

#### **Základní postup (dle Sigma):**

Namnožené bakterie byly centrifugačně promyty. Z nich byla připravena bakteriální suspence o koncentraci 3.10<sup>8</sup> b/ml v Diluentu C. Dále byl připraven 4 µM roztok barvy PKH 67 v Diluentu C. Oba připravené roztoky byly rychle smíseny a důkladně promíchány. Vzhledem k optimalizaci postupu byly zkoušeny různé doby inkubace a sice 5, 10 a 30 minut. Inkubace probíhaly za laboratorní teploty.

Reakce byla zastavena přidáním 1% BSA a krátkou inkubací (1-2 minuty) s tímto roztokem. Následným krokem byla centrifugace při 13 000 RPM 10 minut na MicroCentaur. Vzhledem k hustotě Diluentu C byl problém s vytvořením pelet, proto bylo přistoupeno k filtraci přes mikrofiltr (0,22 µm) a následnému mikroskopickému vyhodnocení pokusu (obdobně jako v případě předchozích sloučenin).

#### **Modifikovaný postup:**

Modifikace postupu spočívala ve zvýšení permeability membrány, umožňující vstup barviva do bakteriální buňky. Bylo připraveno několik typů vzorků:

- 1) kontrola – použity bakterie bez jakékoliv modifikace po promytí od kultivačního media

- 2) bakterie modifikovány – jako příprava „kompetentních buněk“ (10 minut na ledu, centrifugace, do 100 mM CaCl<sub>2</sub> a 15 minut na ledu, centrifugace)
- 3) bakterie byly podrobeny sonikaci 20 vteřin (použit sonikátor ELMasonic E 30 H, P-Lab)
- 4) bakterie byly 5 minut inkubovány v PBS+Tween

Všechny vzorky byly po jednotlivých modifikačních krocích centrifugovány (10 000 RPM, 10 minut, MicroCentaur) a pelety byly resuspendovány 1,5 ml PBS-ELISA a suspence opět centrifugována za stejných podmínek. Pelety byly resuspendovány ve 100 µl Diluentu C. K této bakteriální suspensi bylo přidáno 100 µl 40 µM PKH 67 v Diluentu C. Inkubace s barvivem probíhala 10 minut za laboratorní teploty. Poté byla reakce zastavena přidáním 1,7 ml PBS-ELISA a vzorky byly centrifugovány 13 000 RPM, 10 minut (MicroCentaur) a poté ještě jednou vymyty od barviva. Vyhodnocení bylo provedeno mikroskopicky (stejné nastavení mikroskopu jako pro FITC).

### **3.8.4 Značení bakterií pomocí resazurinu**

Resazurin sám nefluoreskuje, ovšem uvnitř buňky je pomocí bakteriálních reduktas přeměněn na fluoreskující resorufin. Pro značení touto látkou byla využita metodika podle [50].

K bakteriální suspensi kultivované v mediu byl přidán zásobní roztok resazurinu v PBS (100 µg/ml) v poměru 1:9 dílů na bakteriální suspensi. Vzniklá směs byla promíchána a inkubace dále pokračovala při 37°C za třepání. Byly odebrány 1 ml vzorky inkubační směsi v časech 0, 2, 4, 6 a 8 hodin. Přebytek resazurinu byl odstraněn centrifugací (13 000 RPM, 10 minut, MicroCentaur) a pelety přeneseny do PBS-ELISA. Ze získaných sedimentů byly připraveny roztěry pro mikroskopii (roztěr na sklíčko pomocí kličky, nativní kapka sledována na křemenném skle). Na základě mikroskopického pozorování byl určen optimální čas inkubace. V dalších krocích následovala stanovení fluorescence pomocí spektrofluorimetru Perkin Elmer L55 (program FL WinLab, metoda wpr, excitační vlnová délka 530 nm, emisní vlnová délka 585 nm). Pomocí spektrofluorimetru byla sledována závislost fluorescence na koncentraci bakterií, vliv centrifugace a různé typy destiček.

### **3.8.5 Značení bakterií pomocí PKH 26**

Jedná se o fluorescenční barvivo, které se váže do membrány buněk. Excitační maximum má tato sloučenina při 551 nm a emisní maximum při 567 nm. Značení bylo provedeno dle doporučení výrobce (Sigma).

### **Použité roztoky:**

- PKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Kit: PKH 26 Cell Linker (1 mM) v ethanolu, Diluent C
- roztok BSA: 1% (w/v) BSA fraction V v PBS-ELISA

Namnožené bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byly centrifugačně promyty od media. Následně byla připravena bakteriální suspence v Diluentu C o koncentraci  $6 \cdot 10^8$  b/ml. Ke 250  $\mu$ l bakteriální suspence jsme přidali 250  $\mu$ l barvy v Diluentu C (20 nebo 40  $\mu$ M). Takto získaná reakční směs byla dobře promíchána a inkubována za laboratorní teploty. Pro optimalizaci metody bylo vyzkoušeno několik časů inkubace - 5, 20, 30 a 60 minut. Po inkubaci byla reakce zastavena přidávkem 100  $\mu$ l 1% BSA. Po prvním přidávku BSA a krátké inkubaci bylo přidáno ještě 1,2 ml BSA, směs byla poté centrifugována 10 minut při 13 000RPM (MicroCentaur). Pelety byly poté resuspendovány v PBS-ELISA. Následně byly připraveny roztěry na sklíčko. Vyhodnocení bylo provedeno mikroskopicky s využitím fluoresenčního mikroskopu Nikon Eclipse (filtr 31002 RdiI C87702) a byla provedena i spektrofluorimetrická měření za účelem sledování závislosti fluorescence na koncentraci bakterií.

### **3.8.6 Značení buněk A549 pomocí CellTracker**

Reagencie CellTracker má poměrně široké spektrum aplikací, co se týče buněk, které se touto barvou dají značit. Označené buňky jsou životaschopné a jejich fluorescence přetrvává 2-5 dní. Vzhledem k tomu, že pro další studium potřebujeme fluorescenčně označit i buňky plicního epitelu, bylo testováno značení touto barvou na linii A549.

Buňky A549 byly nejprve kultivovány asi 5 dní (do tvorby jednotné vrstvy) v mediu DMEM s FCS, (viz kultivace buněk) na destičkách vhodných k použití ve fluorimetru – černá CellBind, Polysorb a bílá destička pro fluorimetr Perkin Elmer. Po dostatečné době kultivace buněk bylo medium odpipetováno a přidán pracovní roztok CellTrackeru v PBS. Byly testovány 2 koncentrace pracovního roztoku – 5 a 10  $\mu$ M a také různá doba inkubace s barvivem – 15, 30 a 45 minut. Inkubace probíhala při 37°C, na jednu jamku bylo pipetováno 100  $\mu$ l pracovního roztoku barviva CT. Po inkubaci byl roztok barvy odpipetován a k buňkám bylo přidáno nové, vytemperované (37°C) kultivační medium bez přidávku FCS. S mediem byly buňky inkubovány 30 minut a poté byly jednou promyty PBS. Vyhodnocení bylo provedeno mikroskopicky i pomocí spektrofluorimetru.

# 4 Výsledky

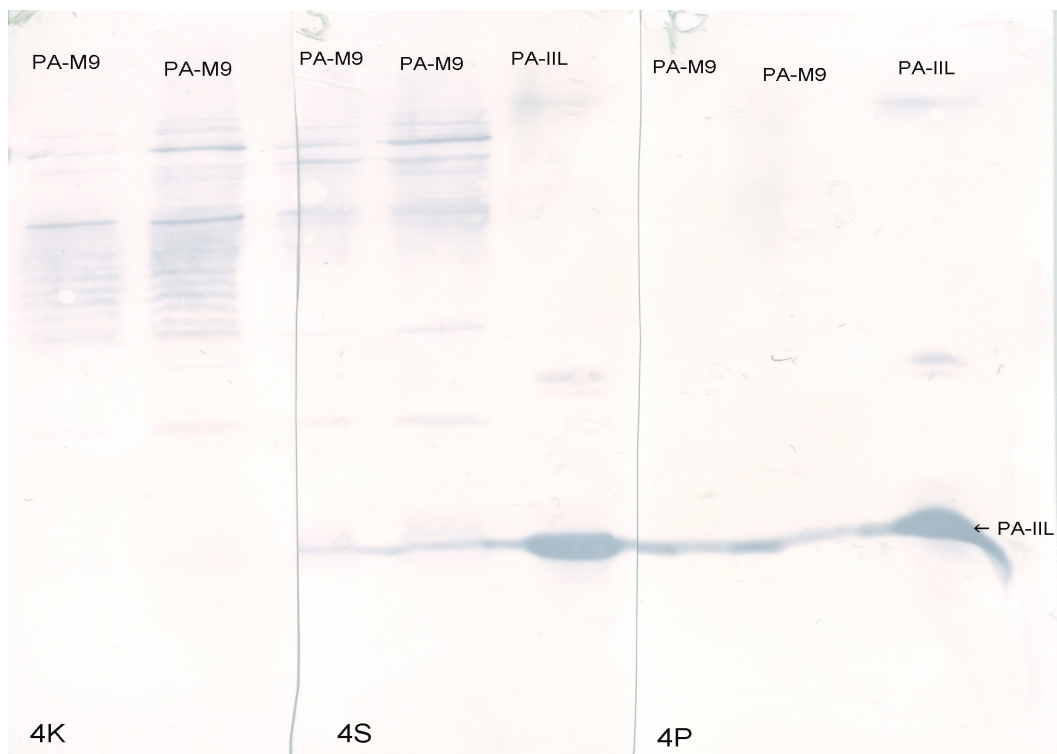
## 4.1 Ověření produkce lektinu na povrchu bakterií

V průběhu práce bylo třeba ověřit fakt, že bakterie kultivované v minimálním mediu M9 produkují lektin PA-IIL. Využili jsme k tomuto účelu metodu Western „blotting“.

Z bakterií namnožených v mediu M9 byl připraven extrakt sonikací v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut. Takto získaný extrakt byl 5x naředěn a smísen 1:1 s redukujícím vzorkovým pufrem a podroben elektroforetické separaci (podmínky a roztoky viz kap. 3.2.1).

Lektin PA-IIL byl detekován v rozděleném extraktu bakterií metodou Western „blotting“ za podmínek popsanych v kap. 3.2.2., s využitím slepičích protilátek proti rekombinantnímu lektinu. Výsledek je zobrazen na obrázku 4.1.

Z obrázku je patrné, že bakterie PA kultivované v minimálním mediu lektin PA-IIL produkují a lektin je rozpoznáván připravenými slepičími protilátkami. Je jasně patrné, že v případě kontrolní protilátky 4K není lektin rozpoznán, protilátka detekuje pouze jiné antigenní struktury z bakterií. Specifická protilátka rozpoznává příslušný lektin a některé další struktury, zatímco afinitně purifikovaná protilátka detekuje pouze lektin. Zóna odpovídající lektinu je přibližně 13-14 kDa, což odpovídá jedné podjednotce tetramerního lektinu [51]. Jako standard a kontrola byl detekován i samotný rekombinantně připravený lektin.



**Obr. 4.1.1:** Výsledek detekce lektinu na povrchu bakterií PA. PA – *Pseudomonas aeruginosa*; M9 – minimální medium; PA-IIL – rekombinantně připravený lektin; 4K, S, P – slepičí protilátky proti lektinu. V případě kontrolní a specifické protilátky bylo použité množství 20  $\mu\text{g/ml}$ , zatímco v případě afinitně purifikované pouze 1  $\mu\text{g/ml}$ . Dále byla použita sekundární protilátka konjugovaná s alkalickou fosfataseou.

## 4.2 Izolace a kultivace buněk plicního epitelu

Pro studium bakteriální adheze je třeba kromě bakteriálních kmenů odvodit i vhodnou buněčnou kulturu z buněk plicního epitelu. Vzhledem k zaměření celé problematiky na cystickou fibrosu, byly buňky primárně získávány od pacientů s CF ve spolupráci s FN Motol. Jako kontrola a modelový systém byly využívány buňky linie A549 z pacientů bez CF.

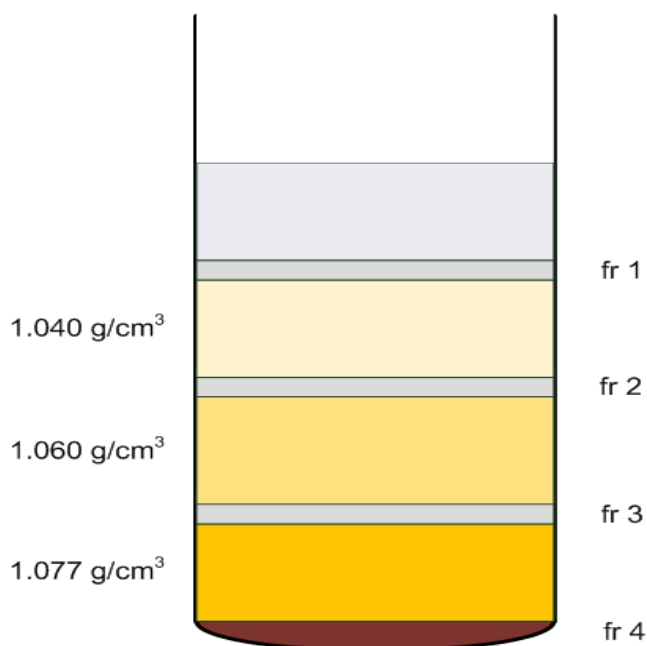
### 4.2.1 Izolace z plicní tkáně

Pro získání buněk plicního epitelu bylo využito části plicního laloku pacientů s CF poskytnutých z transplantace ve FN Motol. Celkem byly provedeny 3 izolace z patientských plic, pro další práci byly využívány především vzorky Hu 2 a Hu 3. Pro izolaci buněk plicního epitelu



byla vybírána co nejméně poškozená či přeměněná tkáň bez zánětlivých ložisek atd. Pro izolaci tak obvykle bylo vybráno asi 20-25 g tkáně. Před vlastní izolací byla tkáň nejprve důkladně promyta fyziologickým roztokem a PBS-Glc. Poté byla podrobena enzymatickému štěpení (postup viz kap. 3.4.1). Získaná buněčná suspence byla opatrně navrstvena na Ficollové „polštáře“.

Buněčná suspence byla centrifugována na vrstvách Ficollu a poté rozdělena podle jednotlivých hustotních frakcí. Výsledek rozdělení do jednotlivých vrstev je schematicky znázorněn na obrázku 4.2.1.



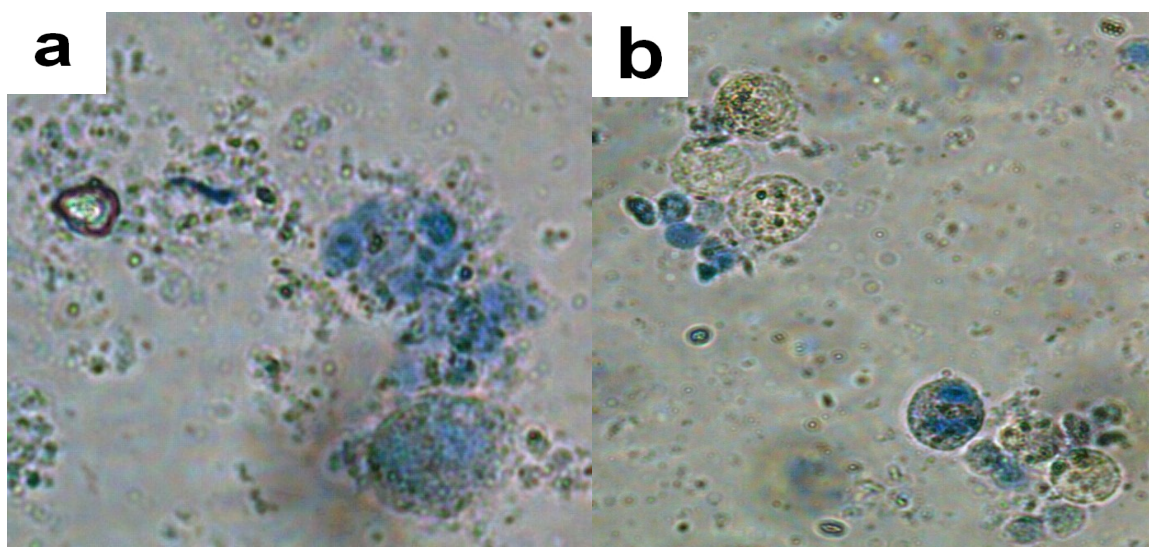
**Obr. 4.2.1:** Schématické znázornění situace po centrifugaci buněčné suspence na vrstvách Ficollu. Jednotlivé Ficollové vrstvy o definovaných hustotách 1,077; 1,060 a 1,040 g/cm<sup>3</sup> byly připraveny ze zásobního 40% (w/v) roztoku Ficollu a hodnota hustoty příslušné vrstvy byla zkontrolována pomocí pyknometru. Nejdůležitější jsou frakce 2 a 3, frakce 4 obsahuje zejména krevní buňky.

Frakce 1 o nejnižší hustotě obsahovala značné množství bakterií a malé buňky, frakce 2 z rozhraní obsahovala menší a střední buňky a malé množství bakterií, frakce 3 obsahovala větší buňky a malé množství bakterií a frakce 4 obsahovala z velké většiny pouze krevní buňky a to zejména erythrocyty.

Získané buňky byly dále kultivovány. Bezprostředně po izolaci probíhala kultivace na jednotlivých destičkách s modifikovanými jamkami (viz kap. 3.4.2-3) v mediu DMEM spolu s antibiotiky a případně FCS. Kultivace za těchto podmínek se ukázala jako nevhodná, neboť

medium DMEM neobsahuje důležité růstové faktory a další složky potřebné pro růst, adhezenci a množení buněk plicního epitelu získaného štěpením tkáně. Buňky kultivované za těchto podmínek nejevily známky růstu případně dělení.

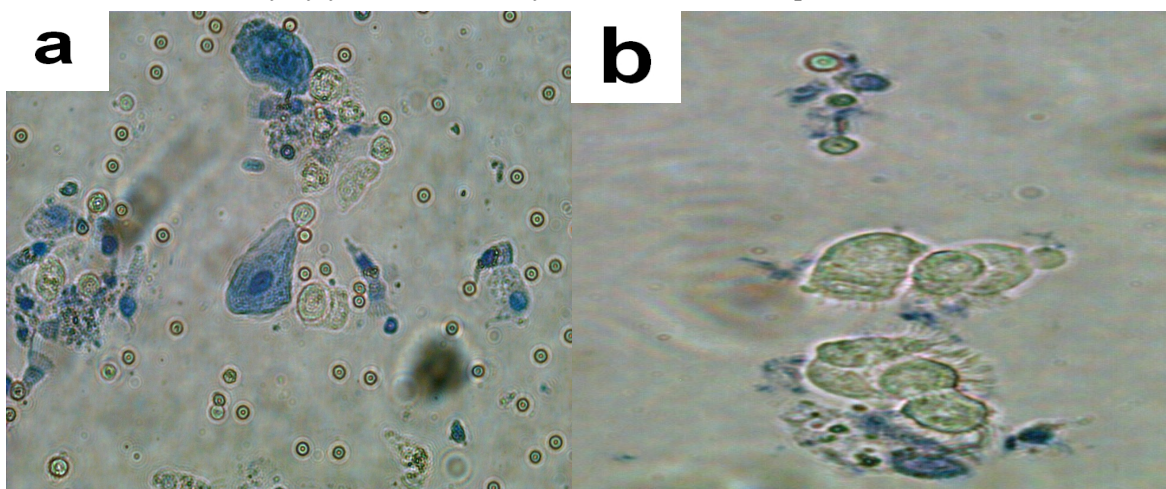
Uschované buňky v  $-80^{\circ}\text{C}$  byly rozmrazeny a kultivovány již v mediu vhodném pro buňky plicního epitelu – LHC-9. Bezprostředně po rozmražení byla zkoumána viabilita buněk pomocí vitálního barvení trypanovou modří. Vitalita buněk po rozmražení se pohybuje mezi 20-50% živých buněk ( v závislosti na frakci a vzorku – Hu 2-3) viz obr. 4.2.2. Kultivace probíhala v lahvičkách s povrchem potaženým kolagenem typu I.



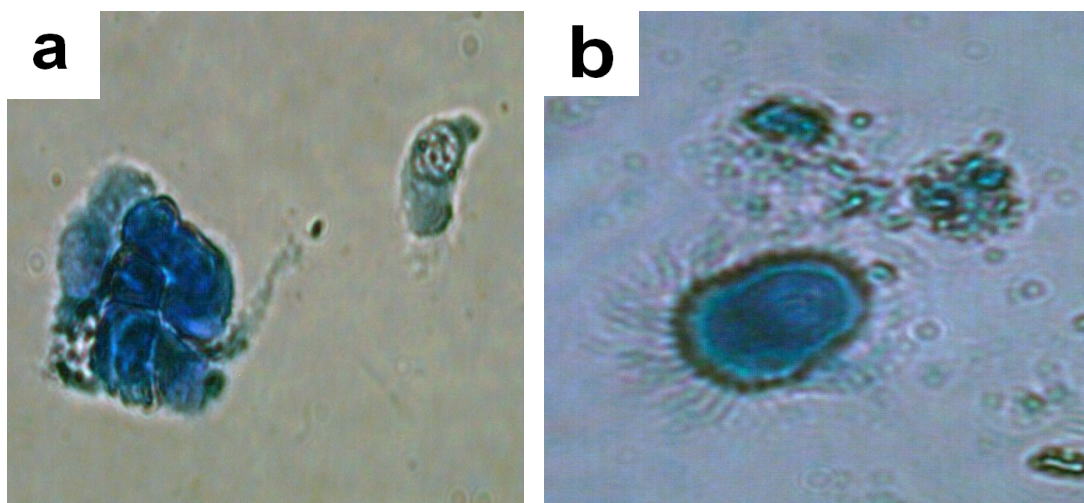
**Obr. 4.2.2:** Izolované buňky po vitálním barvení trypanovou modří. Modře zbarvené buňky jsou odumřelé. a - buňky z frakce 2 Hu3 jsou zobrazeny na obrázku; b - zachycuje buňky z frakce 3 Hu3. (Nikon, 1500x)

## 4.2.2 Izolace pomocí „brushingu“

Šetrnějším způsobem získání buněk plicního epitelu je metoda zvaná „brushing“. Touto metodou byly získány zatím 4 vzorky značené B-Hu 1-4. Princip získání buněk je popsán v kap. 3.4.2. Byla testována viabilita buněk pomocí trypanové modři (10  $\mu$ l suspence buněk a 1  $\mu$ l zásobního roztoku TB) a také byla sledována morfologie získaných buněk – z 10  $\mu$ l buněčné suspence byl udělán roztěr na mikroskopické sklo, který byl poté fixován 10% (v/v) formaldehydem a barven 0,1% (w/v) roztokem barvy Giemsa, oboje viz.obrázky 4.2.3 a 4.2.4. Viabilita buněk se pohybovala v rozmezí 50-80%. Buňky byly dále kultivovány v mediu LHC-9 bez přídavku FCS.



**Obr. 4.2.3:** Buňky získané pomocí „brushingu“ po vitálním barvení trypanovou modří. a - zobrazuje buňky s B-Hu2, vidět jsou typické buňky epitelu. b - odpovídá buňkám B-Hu3, jsou dobře patrné ciliární buňky. (Nikon, 1500x)



**Obr. 4.2.4:** Buňky z „brushingu“ nabarvené pomocí Giemsa. a - zachycuje buňky z B-Hu3, viditelný je agregát buněk. b - zobrazuje buňky B-Hu4, zachycena je ciliární buňka. (Nikon, 1500x)

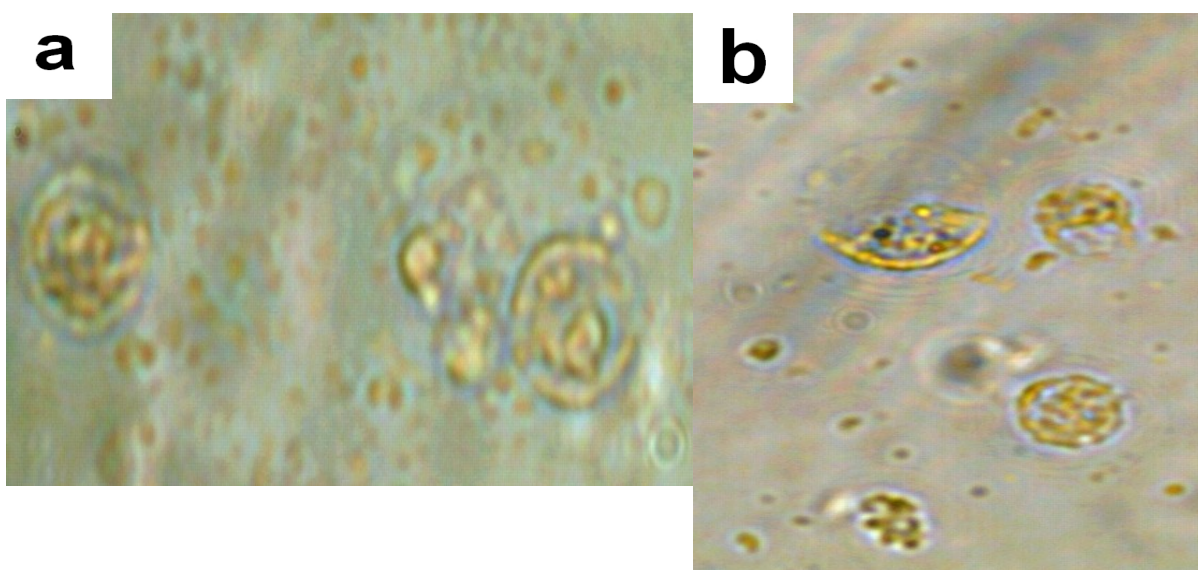
### 4.2.3 Kultivace jednotlivých typů buněk

Bylo testováno několik kultivačních medií, jejichž přesné složení je popsáno v kapitole 3.4.3. Obecně lze říci, že pro kultivaci buněk získaných ze vzorků pacientů s CF, ať již izolací z tkáně nebo pomocí „brushingu“ bylo nejvhodnější medium LHC-9. Vzhledem k faktu, že se jednalo o vzorky od pacientů, bylo nutné přidávat do media antibiotika kvůli přítomnosti bakterií (použitá antibiotika i jejich koncentrace viz. kap 3.4.3).

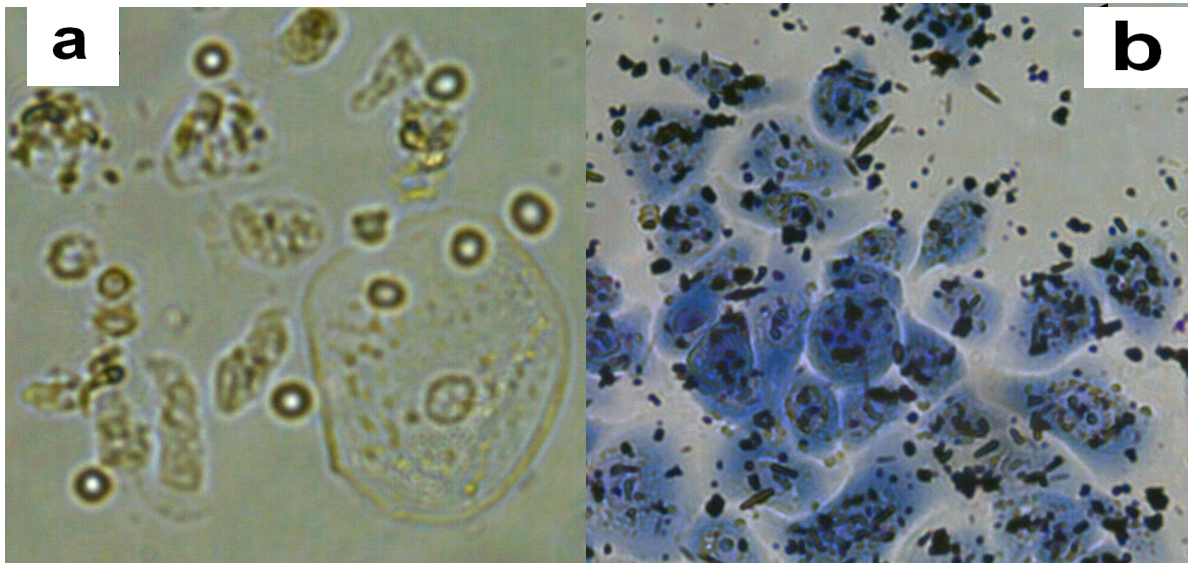
Při kultivaci buněk získaných „brushingem“ bylo využito kultivačních lahviček s povrchem potaženým fibronectinem ( $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). V případě buněk izolovaných z tkáně byla zkoušena celá řada povrchů, z nichž byly používány lahvičky s povrchem potaženým kolagenem typu I.

Kultivace linie A549 ze zdravých jedinců probíhala v kultivačních lahvičkách bez modifikace povrchu, v mediu DMEM doplněném o další aminokyseliny (viz kap. 3.4.3) a preventivně také o antibiotika.

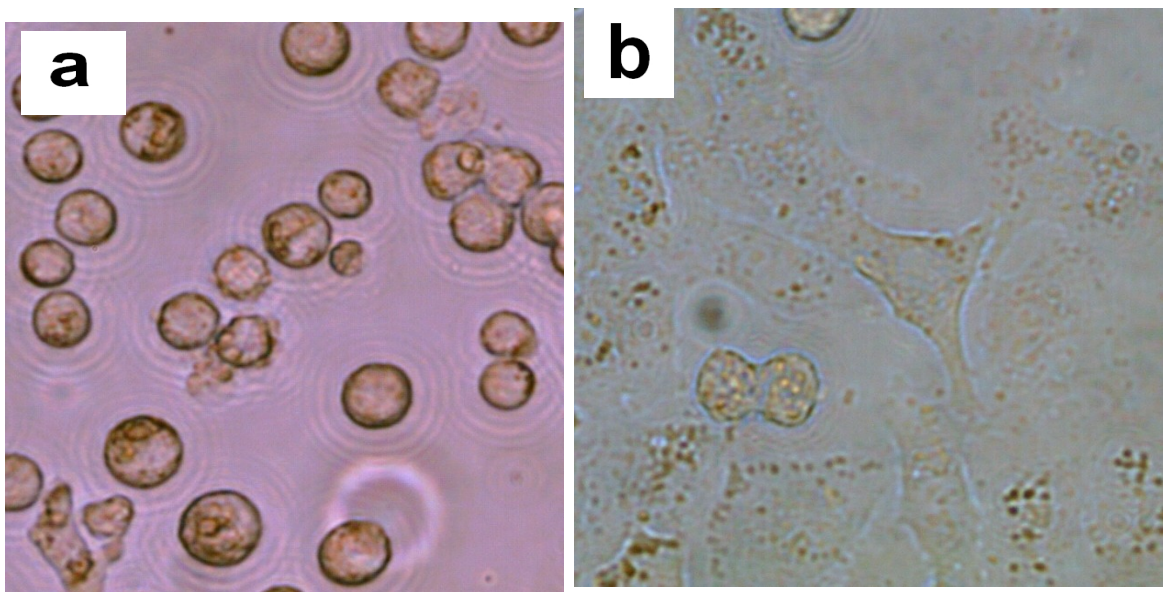
Průběh kultivací je zachycen na obrázcích 4.2.5 – 4.2.7.



**Obr. 4.2.5:** Buňky plicního epitelu získané izolací z tkáně, 2. den kultivace v mediu LHC-9. a - Hu2, frakce 2. b - Hu3, frakce 3, je viditelná adherující buňka. (Nikon, 1500x)



**Obr. 4.2.6:** Buňky plicního epitelu získané pomocí „brushingu“, B-Hu1. a - 3.den kultivace v LHC-9 mediu na neošetřeném povrchu. b - po týdnu kultivace v LHC-9 mediu na neošetřeném povrchu po fixaci a nabarvení pomocí Giemsa. (Nikon, 1500x)

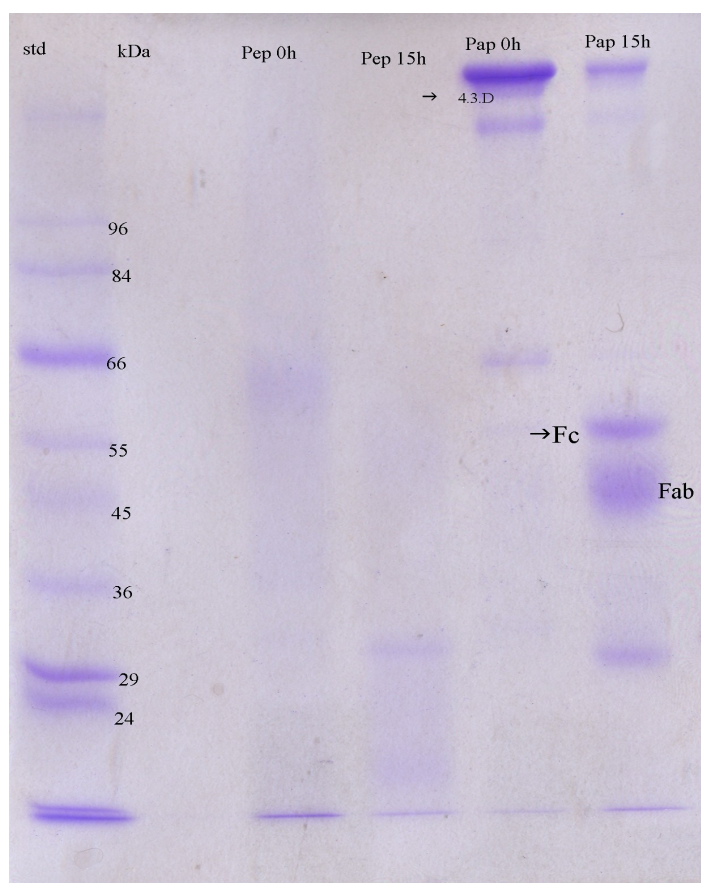


**Obr. 4.2.7:** Buňky linie A549. a – bezprostředně po pasážování; b - 3.den po pasážování, viditelná tvorba „monolayer“. (Nikon, 1500x)

## 4.3 Štěpení protilátek a separace fragmentů Fab

Protilátky lze pomocí proteas papainu a pepsinu štěpit na definované fragmenty. Použijeme-li papain, protilátka je rozštěpena na fragment Fc a 2 fragmenty Fab zodpovědné za specifitu vazby. Při použití pepsinu je odštěpen fragment F(ab)<sub>2</sub> a fragment Fc, který je dále štěpen na menší fragmenty.

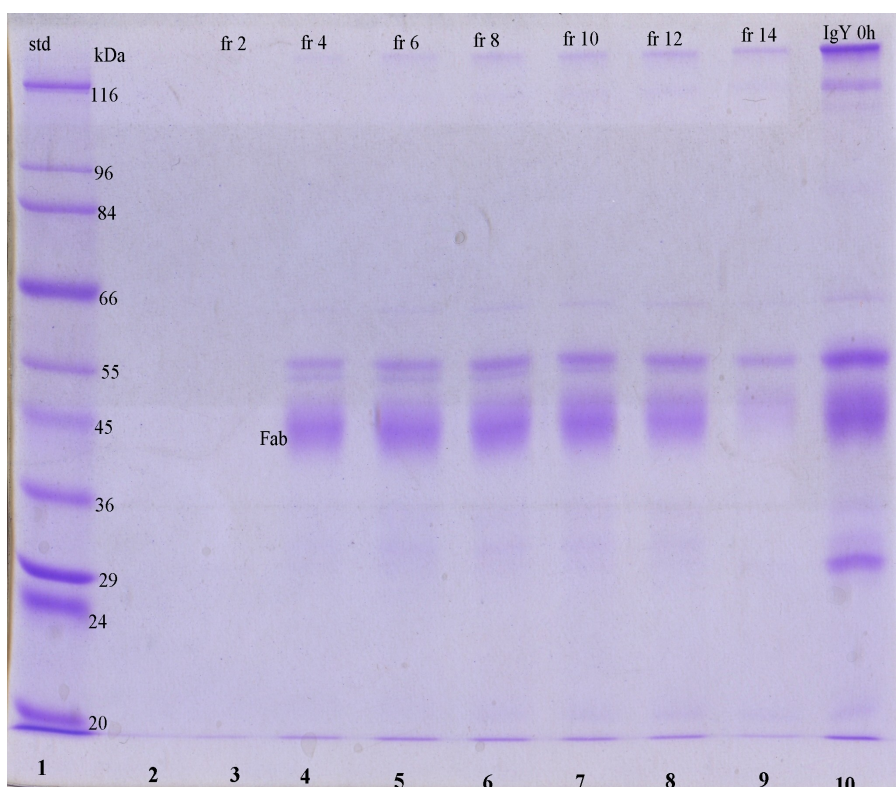
Pro štěpení bylo využito specifické slepičí protilátky proti lektinu PA-IIL (frakce 4.3.D – jedná se o méně koncentrovanou frakci z izolace protilátky 4S). Celý postup štěpení včetně složení digesční směsi je popsán v kapitole 3.5. Inkubace s enzymem probíhala 15 hodin, výsledky štěpení byly analyzovány pomocí SDS elektroforesy. Kontrolou byly vzorky odebrané z reakční směsi v čase 0. Výsledky štěpení zachycuje obrázek 4.3.1.



**Obr. 4.3.1:** Výsledky štěpení protilátek. SDS elektroforesa – 10% separační gel, neredukující podmínky. Pap – papain; Pep – pepsin; Std – standard mol. hmotností. Zóna v oblasti 170 kDa odpovídá celé protilátce před štěpením, po 15 hodinách je zřetelně slabší a naopak se objevily nové zóny v oblasti 55 kDa (odpovídající fragmentu Fc) a 45 kDa (odpovídá fragmentu Fab).

Z obrázku je patrné, že v případě použití pepsinu neproběhlo štěpení dle očekávání, v oblasti kde bychom čekali F(ab)2 fragment není patrná žádná výrazná zóna. Proto nebyla provedena separace produktů štěpení, ani dále nebyl pepsin k tomuto účelu využíván. V případě použití papainu je z obrázku jasně patrné, že došlo k naštěpení protilátky.

Pro separaci fragmentů Fab odpovídajících za specifické rozpoznávání jsme využili Sepharosy 4B s kovalentně navázaným konkanavalinem A, která zachycuje fragmenty Fc pomocí vazby na sacharidové struktury tohoto fragmentu. K identifikaci frakcí obsahujících fragment Fab bylo využito opět elektroforezy za stejných podmínek jako v případě vyhodnocení štěpení. Jednotlivé eluční frakce zobrazuje obr. 4.3.2

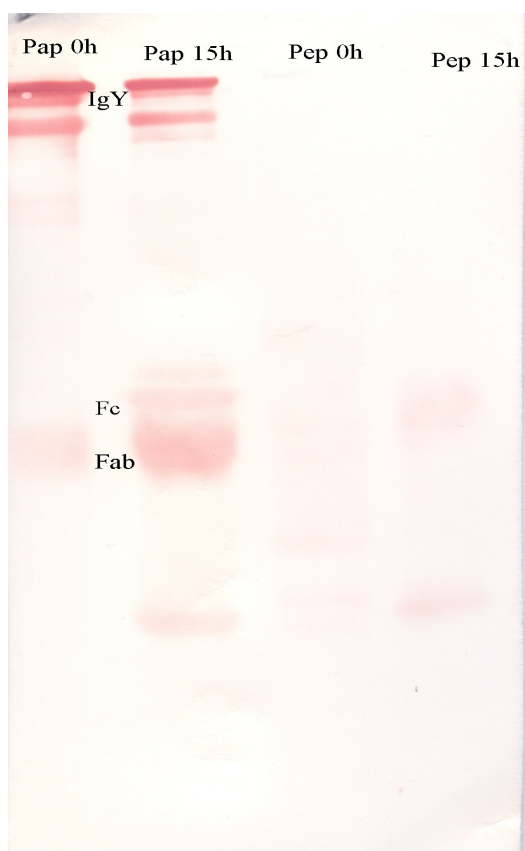


**Obr. 4.3.2:** Výsledek separace fragmentů protilátky na koloně s konkanavalinem. V dráze 1 je standard molekulových hmotností. Dráhy 3-9 obsahují jednotlivé frakce získané separací na koloně (pro elektroforetické vyhodnocení byly použity sudé frakce). Dráha 10 obsahuje protilátku před štěpením. Fragmentu Fab odpovídá široká zóna v oblasti 45 kDa.

Pro další použití byly spojeny frakce 3-13, které jednoznačně obsahovaly fragmenty Fab (zóna v oblasti 45 kDa). Poté byla změřena koncentrace získaných fragmentů Fab – 5,4 mg/ml.

Pro další využití získaných fragmentů bylo ještě nutné ověřit, zda jsou rozpoznávány sekundární protilátkou. Výsledek provedeného Western „blottingu“ jsou znázorněny na obrázku 4.3.3. Při provedení přenosu byla použita sekundární protilátka konjugovaná s peroxidasou – Rachi. Pro vyvolání byl použit roztok jehož složení je popsáno v kap. 3.2.2.

Z výsledků „blottingu“ je patrné, že sekundární protilátka jednotlivé fragmenty rozpoznává. Viditelné jsou zóny v oblasti 45 kDa (Fab), 55 kDa (Fc) a zóny v oblasti asi 180 kDa (celá protilátka před štěpením na fragmenty).



**Obr. 4.3.3:** Výsledek „blotu“ pro ověření rozpoznávání fragmentu Fab sekundární protilátkou. Pap – papain; Pep – pepsin; IgY – celá protilátka před štěpením; Fc – fragment, zóna 55 kDa; Fab – fragment, zóna 45 kDa

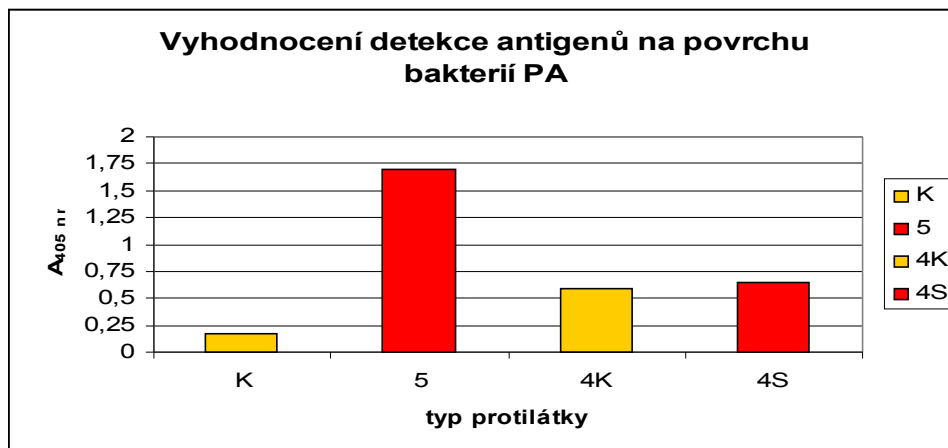


## 4.4 Detekce antigenních struktur

Pro detekci antigenních struktur na povrchu bakterií PA a plicních buněk bylo využito metody ELISA. Před provedením adhezních testů, k průkazu ovlivnění nebo případného zablokování vazby bakterií PA na buňky plicního epitelu pacientů s CF bylo třeba ověřit některé dílčí předpoklady. Mezi tyto předpoklady patří jednak schopnost připravených protilátek rozpoznat lektin PA-IIL na povrchu bakterií. Dále bylo ověřováno, zda se na buňkách plicního epitelu pacientů s CF nacházejí struktury se kterými lektin PA-IIL interaguje. V posledním kroku byl proveden experiment ve kterém byla sledována adheze bakterií PA na buňky plicního epitelu a vliv slepičích protilátek na adhezi.

### 4.4.1 Detekce lektinu na povrchu bakterií

Pro detekci lektinu na povrchu bakterií byly bakterie PA namnoženy v minimálním mediu M9. Jako sekundární protilátka byla použita Anti-Chicken IgY konjugovaná s alkalickou fosfataseou (metodika viz kap. 3.3). Je patrné, že specifické protilátky rozpoznávají antigenní struktury na povrchu bakterií, specifické protilátce proti celé bakterii 5 odpovídá vyšší hodnota signálu, zatímco specifické protilátce 4S pouze proti lektinu odpovídá o něco nižší signál. Poměrně vysoká hodnota signálu u protilátky 4K je způsobena tím, že protilátka je schopna rozpoznat některé antigenní struktury na bakteriálním povrchu, jak se ukázalo již při Western „blottingu“ (kap. 4.1). Získané výsledky jsou shrnuty v obr. 4.4.1.

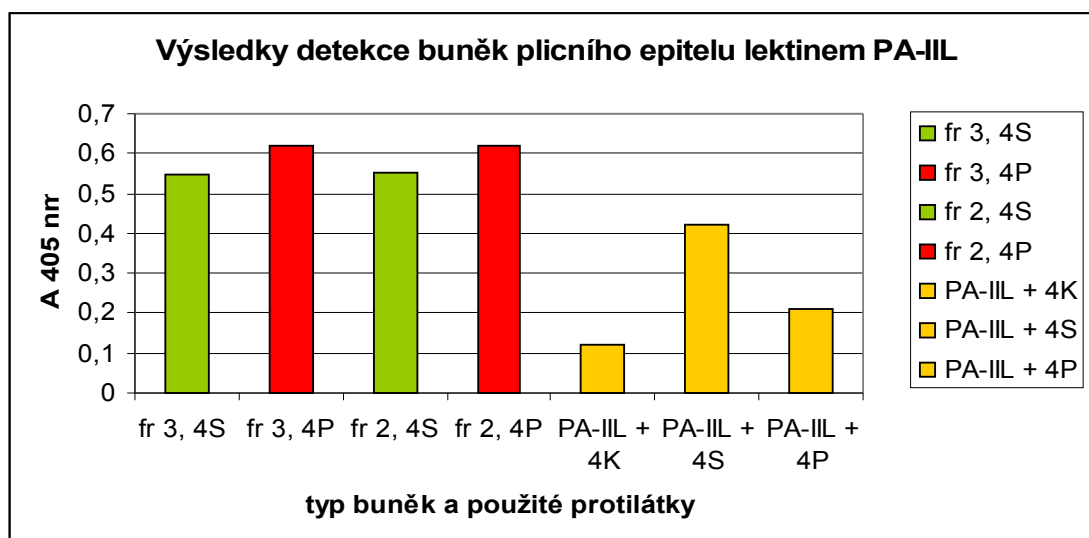


**Obr. 4.4.1:** Detekce lektinu na povrchu bakterií PA. Kontrolní protilátky jsou označeny žlutě, specifické protilátky červeně. K – kontrolní protilátka proti celé bakterii; 5 – specifická protilátka proti celé bakterii; 4K – kontrolní protilátka proti lektinu PA-IIL; 4S – specifická protilátka proti lektinu PA-IIL

#### 4.4.2 Interakce lektinu s buňkami epitelu

Buňky plicního epitelu získané izolací z tkáně pacientů s CF byly nejprve kultivovány, teprve poté byly provedeny další kroky popsané v kapitole 3.3.

Bylo prokázáno, že na buňkách plicního epitelu izolovaných z tkáně pacientů s CF se nacházejí struktury, na které se váže lektin PA-III, který je rozpoznáván příslušnými protilátkami. Nejsou patrné žádné výrazné rozdíly mezi frakcemi 2 a 3 ani mezi buňkami získanými od 2 různých pacientů (vzorky Hu 2 a 3). Získaná data jsou uvedena na obrázku 4.4.2.



**Obr. 4.4.2:** Interakce lektinu PA-III s buňkami epitelu. Uvedená data odpovídají vzorku Hu3. Jsou rozlišovány frakce buněk 2 a 3 (viz izolace buněk). Kontrolní stanovení, kdy na jamkách nebyly kultivovány buňky epitelu jsou vyznačeny žlutě. 4S – specifická protilátka proti lektinu (zelená barva v obrázku); 4P – afinitně purifikovaná protilátka proti lektinu (červená barva v obrázku). Purifikovaná protilátka poskytuje vyšší odezvu než specifická.

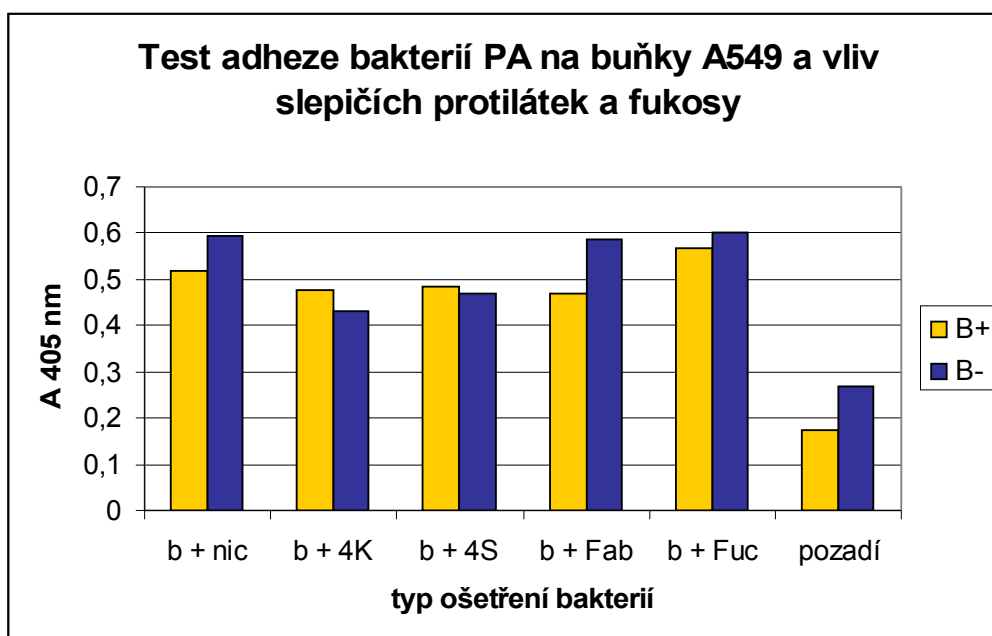
#### 4.4.3 Detekce bakterií adherovaných na buňkách epitelu

Vzhledem k problematice kultivace buněk plicního epitelu izolovaných z tkáně pacientů s CF bylo pro tento adhezní test využito linie buněk A549. Buňky byly kultivovány na destičce CellBind 96 jamek 2 dny, mikroskopicky bylo ověřeno, že v jedolité vrstvě pokrývají jamky. Bakterie PA byly namnoženy v minimálním mediu M9 a naředěny na koncentraci  $10^7$  b/ml v PBS-ELISA s 2% (w/v) BSA fraction V. V adhezním testu byl sledován vliv jednak slepičích protilátek 4K, 4S a Fab (ze 4.3 – což odpovídá 4S) a také L-fukosy na adhezi bakterií PA na buňky A549.

Bakterie v roztocích s protilátkami a fukosou inkubovány 30 minut při 37°C a poté byly jednotlivé roztoky nanášeny na destičku 100  $\mu$ l/jamka kde byly inkubovány opět 30 minut při 37°C. Jamky byly poté fixovány ethanolem a methanolem a následně ponechány vyschnout. Jako

primární protilátka byla použita směs 4S a ⑤ (obě 30 µg/ml) s 2% BSA fr. V (pro lepší kvantifikaci odezvy byla použita směs 2 protilátek). Pro vyvolání byla využita sekundární protilátka konjugovaná s alkalickou fosfátasou.

Tento test adheze bakterií PA na buňky A549 prokázal, že protilátky proti lektinu PA-IIL do určité míry ovlivňují adhezi bakterií na buňku (odezva je nižší než u neošetřených bakterií nebo v případě ošetření fukosou). Nejsou patrné velké rozdíly mezi kontrolní protilátkou 4K a specifickou 4S, při použití fragmentu specifické protilátky Fab je v případě jamek s buňkami odezva obdobná jako při použití protilátky 4S. Vysoká odezva kontrolní protilátky 4K je patrně způsobena faktem, že tato protilátka rozpoznává některé antigenní struktury na povrchu bakterií i když nerozpoznává lektin PA-IIL (viz kap. 4.1.). Použití fukosy se ukazuje jako neúčinné z hlediska ovlivnění adheze (signál obdobný jako u neošetřených bakterií). Data jsou shrnuta v obr. 4.4.3.



**Obr. 4.4.3:** Vyhodnocení testu adheze bakterií PA na buňky A549. B+ jsou hodnoty pro jamky pokryté buňkami (žlutá barva), B- jsou hodnoty pro jamky bez buněk (modrá barva). 4K – kontrolní protilátka proti lektinu; 4S – specifická protilátka proti lektinu; Fab – fragment protilátky 4S; Fuc - fukosa.

Složení jednotlivých roztoků je následující:

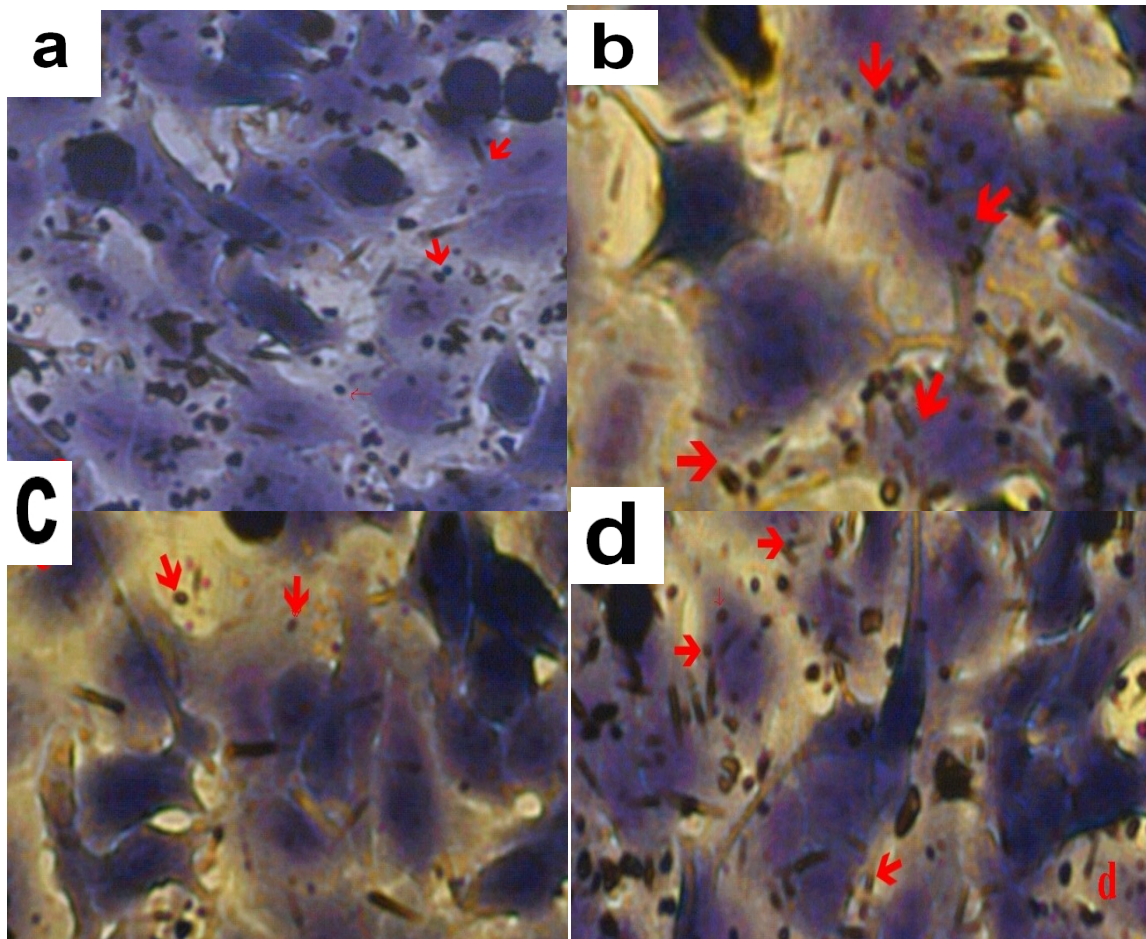
- bakterie a specifická protilátka (b + 4S): 100 µg/ml frakce 4.3;
- bakterie a specifická protilátka (b + 4K): 100 µg/ml frakce 4K;
- bakterie a Fab fragment specifické protilátky (b + Fab): 50 µg/ml Fab z 4.3;
- bakterie a L-fukosa (b + Fuc): 1% (w/v) L-fukosa
- bakterie bez ošetření (b + nic)

## 4.5 Adhezní testy

Adhezní testy byly provedeny pro získání bližší představy o chování bakterií PA při adhezi na plicní epitel. Jako model pro vyzkoušení metody dle Mehl, Chi, Nunn *et al.* 1991 [46] byly použity buňky linie A549. Pro studium možného ovlivnění adheze byly využity sacharidy – L-fukosa a D-glukosa (potenciální blokace vazného místa bakteriálního lektinu) a antibiotika (inhibice bakterií).

### 4.5.1 Adheze bakterií na A549

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (kmen PA) byly inkubovány spolu se souvislou vrstvou („monolayer“) buněk A549. Jamky byly fixovány a nabarveny roztokem Giemsa. Druhý den bylo provedeno mikroskopické vyhodnocení (Nikon Eclipse) – dokumentace viz obr. 4.5.1.



**Obr. 4.5.1:** Výsledek adhezního testu. Jamky byly fixovány 2,5% (v/v) glutaraldehydem a barveny 1% Giemsa. Bakterie jsou značeny červenými šipkami. a - odpovídá nijak neovlivněným bakteriím; b - odpovídá bakteriím inkubovaným s antibiotiky; c - odpovídá bakteriím inkubovaným s L-fukosou; d - odpovídá bakteriím inkubovaným s D-glukosou

Dle subjektivního mikroskopického vyhodnocení lze říci, že nebyl pozorován žádný patrný rozdíl v množství přítomných bakterií mezi nijak neovlivněným testem a testem při němž byla inkubace buněk s bakteriemi provedena v přítomnosti antibiotik. Nepatrně nižší množství přítomných bakterií bylo zaznamenáno u jamek, kde byly bakterie inkubovány spolu se sacharidy a to zejména v případě inkubace s L-fukosou. Popsané skutečnosti jsou ovšem pouze subjektivní vyhodnocení na základě mikroskopického pozorování, v dalších experimentech bude proto třeba využít vhodnou metodu pro objektivní kvantifikaci adherovaných bakterií (například detekce fluorescence).

#### 4.5.2 Internalizace bakterií do epitelálních buněk linie A549

Kromě adheze bakterií *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního epitelu byla zkoumána i jejich internalizace do buňky. Jako modelový systém byly opět využity buňky linie A549. Celý experiment probíhal na destičkách CellBind 12 jamek. Připravený „monolayer“ těchto buněk byl převrstven 1,5 ml roztoku bakterií PA o koncentraci  $5 \cdot 10^4$  bakt./ml v PBS-sup, případně roztokem bakterií spolu s obsahem 1% (w/v) L-fukosy, D-glukosy a nebo spolu s roztokem 5 antibiotik.

V dalším kroku byla buněčná vrstva uvolněna z jamky. Uvolnění internalizovaných bakterií bylo provedeno pomocí Tritonu X-100. Získané lyzáty byly smíseny s 1 ml LB media a z nich poté byly připraveny jednotlivé vzorky ředěné desítkovou řadou (z prvního vzorku odebráno 100  $\mu$ l a přidáno k 900  $\mu$ l nového LB media, pokračováno stejným systémem). Z každého vzorku bylo 100  $\mu$ l rozetřeno na plotny (Biomérieux-Baxter), které byly poté inkubovány při 37°C. Vzhledem k pomalé tvorbě kolonií (po prvním dnu inkubace byly kolonie miniaturní a teprve se tvořící) byl odečet z jednotlivých ploten proveden 3. den inkubace. Počty bakteriálních kolonií v jednotlivých vzorcích jsou zaznamenány v tabulce 4.5.1.

Ředění	Pouze bakterie	Bakterie + 5 atb.	Bakterie + Fuc	Bakterie + Glc
Vzorek 1	36 kolonií	32 kolonií	18 kolonií	26 kolonií
10 x zředěný	4 kolonie	1 kolonie	1 kolonie	4 kolonie
100 x zředěný	0 kolonií	0 kolonií	1 kolonie	0 kolonií
1000 x zředěný	0 kolonií	0 kolonií	1 kolonie	0 kolonií
10000 x zředěný	0 kolonií	0 kolonií	0 kolonií	0 kolonií

Tabulka 4.5.1: Vyhodnocení internalizace bakterií PA do buněk A549

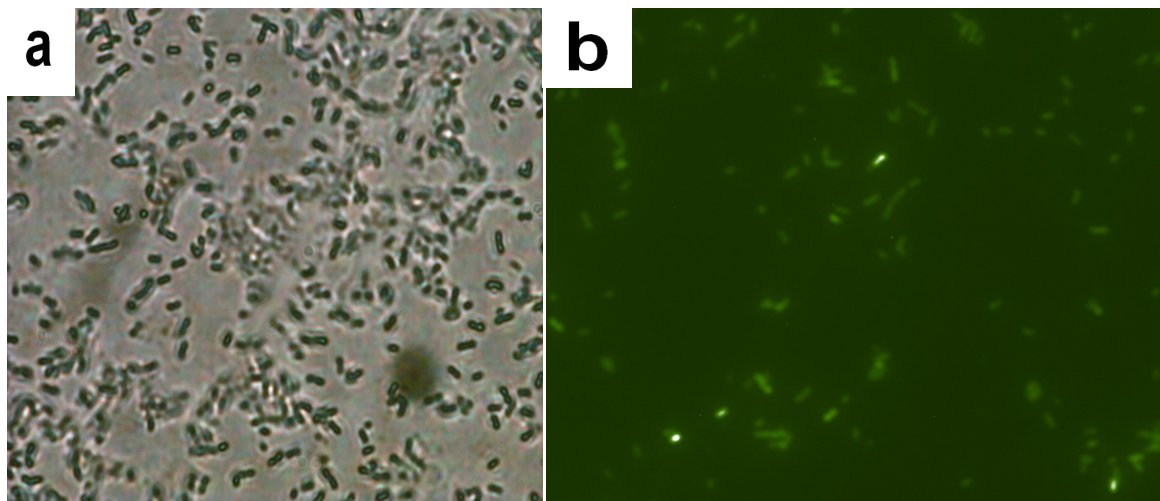
## 4.6 Fluorescenční značení bakterií

Během vývoje práce bylo potřeba najít vhodný způsob pro kvantifikaci bakterií v adhezních testech. Jako vhodný a dostupný způsob se jeví fluorescenční značení a detekce fluorescence pomocí fluorescenčního mikroskopu a spektrofluorimetru.

### 4.6.1 Značení pomocí FITC

Fluorescein-isothiokyanát (FITC) je chemicky reaktivní sloučenina kovalentně modifikující primární aminoskupiny proteinů. Toto činidlo je jednou z nejběžněji využívaných sloučenin pro fluorescenční značení, byla tedy v této práci zkoušena jako první.

Vlastní postup značení je popsán v kap. 3.8.1. Po vymytí činidla byly bakterie PA resuspendovány v malém množství PBS-ELISA (150 – 300  $\mu$ l). Z této suspence byl za pomoci mikrobiologické kličky nanesen na mikroskopické sklíčko a rozetřeny do rovnoměrné vrstvy. Získaný nátěr byl fixován několikerým protažením nad plamenem. Následovalo mikroskopické vyhodnocení. Pomocí mikroskopu byla prokázána fluorescence bakterií – obr. 4.6.1



Obr. 4.6.1: Fluorescenčně označené bakterie PA pomocí FITC. a - odpovídá nativnímu snímku; b - fluorescenčnímu. Vyhodnoceno pomocí mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U (1500x, filtr 31001 FITC C87701).

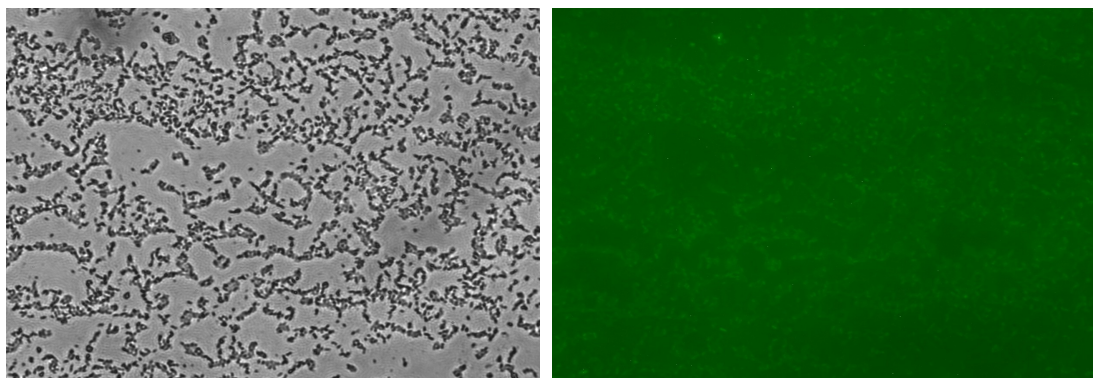
Následně byla sledována viabilita označených bakterií a změna intenzity fluorescence v závislosti na dělení bakteriálních buněk. Byla proto sledována růstová křivka označených bakterií a z jednotlivých časů byly dělány roztěry (postupem viz výše) nebo byly sledovány v kapce – 10  $\mu$ l suspence bylo na naneseo na křemenné sklo a pozorováno přímo. Provedení v kapce umožnilo sledovat pohyb a tedy viabilitu bakterií zároveň s fluorescencí. Z vyhodnocení růstové křivky bylo

zjištěno, že za přírůstek optické denzity jsou odpovědné bakteriální buňky, které jsou životaschopné ale nevykazují fluorescenci. Naopak buňky vykazující fluorescenci se ukázaly být odumřelé. Vzhledem k faktu, že fluorescenci vykazující bakterie nejsou životaschopné, není FITC pro další použití vhodnou sloučeninou. Pro adhezní testy je třeba využít bakterie životaschopné a pokud možno bez velké modifikace povrchových struktur.

#### 4.6.2 Značení pomocí CellTracker Green CMFDA

CellTracker Green CMFDA je chemická sloučenina pronikající přes membrány buněk, která je schopna reagovat s intracelulárními strukturami buňky. Chemicky se jedná o 5-chloromethylfluorescein diacetát. Označené buňky jsou životaschopné až 24 hodin po značení [52].

Postup značení je podrobně popsán v kap. 3.8.2. Vzhledem k faktu, že postup podle návodu poskytnutého výrobcem nevedl k požadovanému efektu, bylo přistoupeno k modifikaci pracovního postupu. Změna postupu spočívala v ovlivnění bakteriálních buněk tak, aby sloučenina snáze pronikla do bakterie a mohla reagovat s vnitřními strukturami. Ani za pomoci upraveného postupu nebylo dosaženo požadované fluorescence bakterií. Bakterie sice vykazovaly určitou fluorescenci, ovšem v malé intenzitě blízké pozadí. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí fluorescenčního mikroskopu, filtr a objektiv byly použity stejné jako v případě FITC. Pro vyhodnocení byly připraveny jednak nátěry na podložní skla výše popsaným způsobem a také byla ověřována viabilita pozorováním v kapce – obr. 4.6.2. Pro značení bakterií PA tato sloučenina nebyla vhodná.



**Obr. 4.6.2:** Fluorescenční značení bakterií PA pomocí CellTracker Green. Srovnání nativního a fluorescenčního snímku. (Nikon, 1500x, filtr pro FITC).

### 4.6.3 Značení pomocí PKH 67

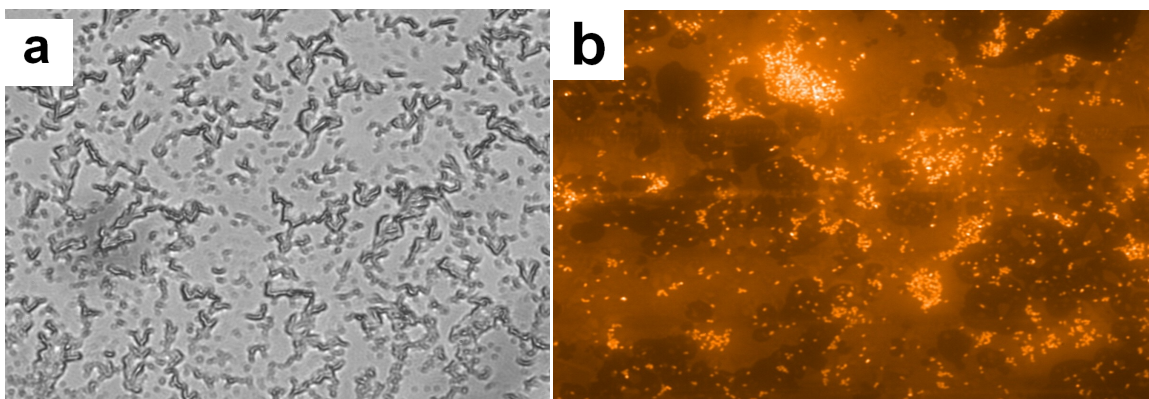
PKH 67 je sloučenina, která se váže do buněčné membrány a poté vykazuje fluorescenci. Není cytotoxická a buňky by měly být po označení životaschopné a jejich povrchové struktury nepozměněné.

Nejprve byl vyzkoušen pracovní postup doporučený firmou Sigma, vzhledem k neuspokojivému výsledku bylo přistoupeno k modifikaci postupu ve smyslu ovlivnění bakteriálních buněk pro snadnější vstup barviva do membrány (sonikace, působení detergentu viz kap. 3.8.3). V případě *Pseudomonas aeruginosa* se tato sloučenina ukázala jako nevyhovující, po vyhodnocení vzorků (příprava nátěrů, sledování v kapce) pomocí fluorescenčního mikroskopu (parametry stejné jako pro FITC) byla pozorována pouze nepatrná fluorescence obdobně jako při použití CellTracker Green – minoritní část (asi 5%) bakterií vykazovala fluorescenci. S touto sloučeninou nebylo dále pracováno.

### 4.6.4 Značení pomocí resazurinu

Resazurin je sloučenina která je pomocní bakteriálních reduktas uvnitř buňky přeměněna na fluoreskující resorufin. Kromě fluorescenčního značení lze touto sloučeninou také detekovat viabilitu bakteriálních buněk, neboť pouze živé bakterie přeměňují resazurin na resorufin [50].

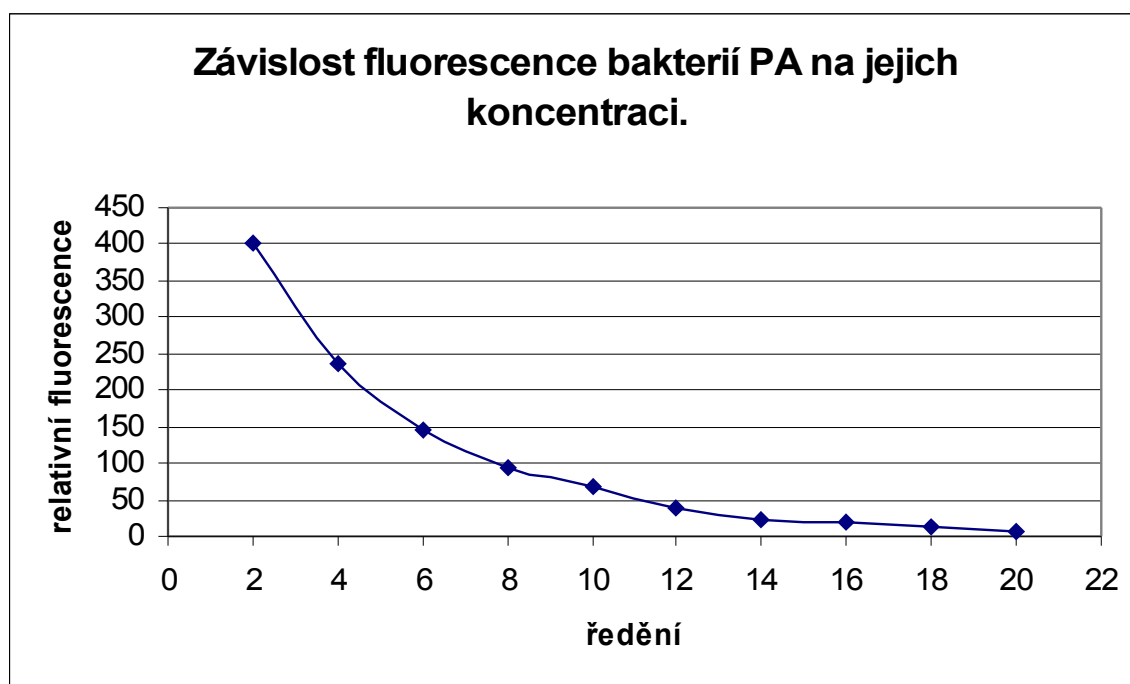
Zásobní roztok resazurinu (100 µg/ml) byl přidán k rostoucí bakteriální suspensi (optimálně v exponenciální fázi růstu). Inkubace resazurinu s bakteriální suspensí trvala až 8 hodin. Postupně byly odebírány 1 ml alikvoty suspence v časech 2, 4, 6 a 8 hodin. Z alikvotů odpovídajících jednotlivým časům byl připraven nátěr na podložní sklíčko pomocí mikrobiologické kličky. Nátěr byl fixován několikerým protažením plamenem a poté vyhodnocen pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon - obr. 4.6.3. Ze získaných výsledků byl optimální čas kultivace určen na 6 hodin.



**Obr. 4.6.3:** Bakterie PA označené pomocí resazurinu. Čas inkubace byl 6 hodin. Pozorováno pomocí mikroskopu Nikon Eclipse (1500x, filtr 31002 RdiI C87702). a - odpovídá nativnímu snímku; b - zachycuje fluorescenci.



Kromě mikroskopického vyhodnocení byla měřena fluorescence bakterií na spektrofluorimetru Perkin Elmer L55. V těchto měřeních byla sledována závislost fluorescence na koncentraci bakterií, vliv centrifugace a také vyzkoušení destiček – bílá (pro přístroj Perkin Elmer- 96 jamek) a černá (CellBind 96 jamek). Pro sledování koncentrační závislosti byla základní bakteriální suspenze ( $6 \cdot 10^8$  b/ml) ředěna 2x řadou. Destička byla centrifugována na 2000g 2 minuty (centrifuga Eppendorf 5430). Uvedená data jsou zpracována z hodnot získaných při měření na bílé destičce. V případě černé destičky CellBind nebyla získána reprodukovatelná data. Výsledky získané měření na fluorimetru jsou shrnuta v Tabulce 4.6.2. Ze získaných dat je zřejmé, že závislost mezi fluorescencí a koncentrací bakterií není lineární, ale vyšší koncentraci bakterií odpovídá i vyšší fluorescence (viz graf). Ze získaných hodnot je dále patrné, že optimální detekční mez množství fluoreskujících bakterií je v tomto případě v oblasti přibližně  $0,9 \cdot 10^7$ . Po centrifugaci destičky nedošlo po odečtení slepého vzorku od jednotlivých vzorků k žádnému výraznému zlepšení linearitě fluorescence (případně detekovatelné meze).



**Obr. 4.6.4:** Grafické znázornění závislosti fluorescence bakterií PA označených pomocí resazurinu na jejich koncentraci. Byla použita 2x ředící řada ze základní bakteriální suspenze o koncentraci  $6 \cdot 10^8$  b/ml. Hodnoty v grafu jsou po odečtení slepého vzorku.

Ředění základní suspenze	Koncentrace bakterií (b/ml)	Fluorescence bakterií bez odečtení blanku	Fluorescence bakterií po odečtení blanku	Fluorescence bakterií po centrifugaci destičky (s blankem)	Fluorescence bakterií po centrifugaci dest. a odečtení blanku
2 x	3,0.10 <sup>8</sup>	705,787	402,416	655,208	405,960
4 x	1,5.10 <sup>8</sup>	538,554	235,183	491,560	242,312
6 x	7,5.10 <sup>7</sup>	449,034	145,663	400,330	151,082
8 x	3,6.10 <sup>7</sup>	397,822	94,451	357,994	108,746
10 x	1,9.10 <sup>7</sup>	370,687	67,316	345,093	95,845
12 x	9,4.10 <sup>6</sup>	343,323	39,952	271,182	21,934
14 x	4,7.10 <sup>6</sup>	327,026	23,655	280,059	30,811
16 x	2,3.10 <sup>6</sup>	323,581	20,210	283,155	33,907
18 x	1,2.10 <sup>6</sup>	317,091	13,720	276,588	27,340
20 x	0,6.10 <sup>6</sup>	309,943	6,572	250,080	0,832
blank	PBS-ELISA	303,371		249,25	

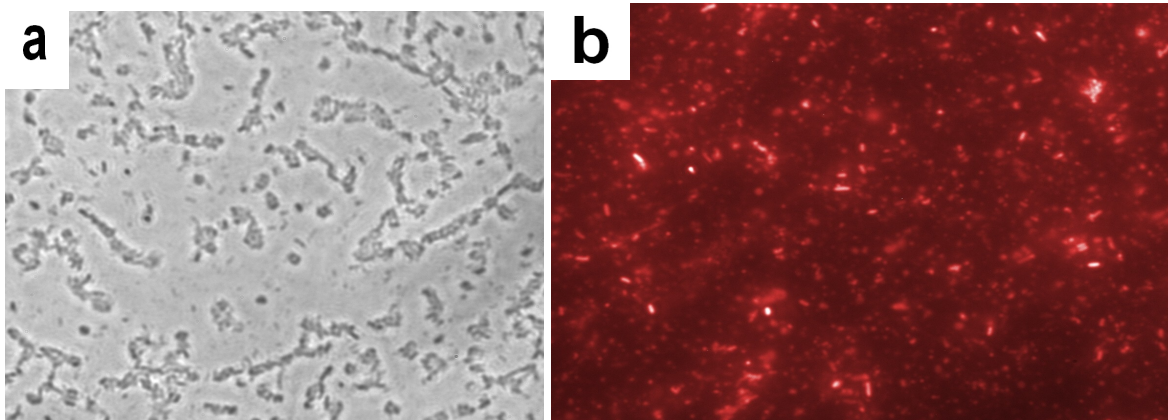
Tabulka 4.6.1: Data získaná měřením na fluorimetru Perkin Elmer

#### 4.6.5 Značení pomocí PKH 26

PKH 26 je sloučenina, která je schopna se vázat do membrány buněk. Jde o sloučeninu podobnou výše zmiňované PKH 67. Excitační maximum vykazuje tato sloučenina při 551 nm, emisní potom při 567 nm.

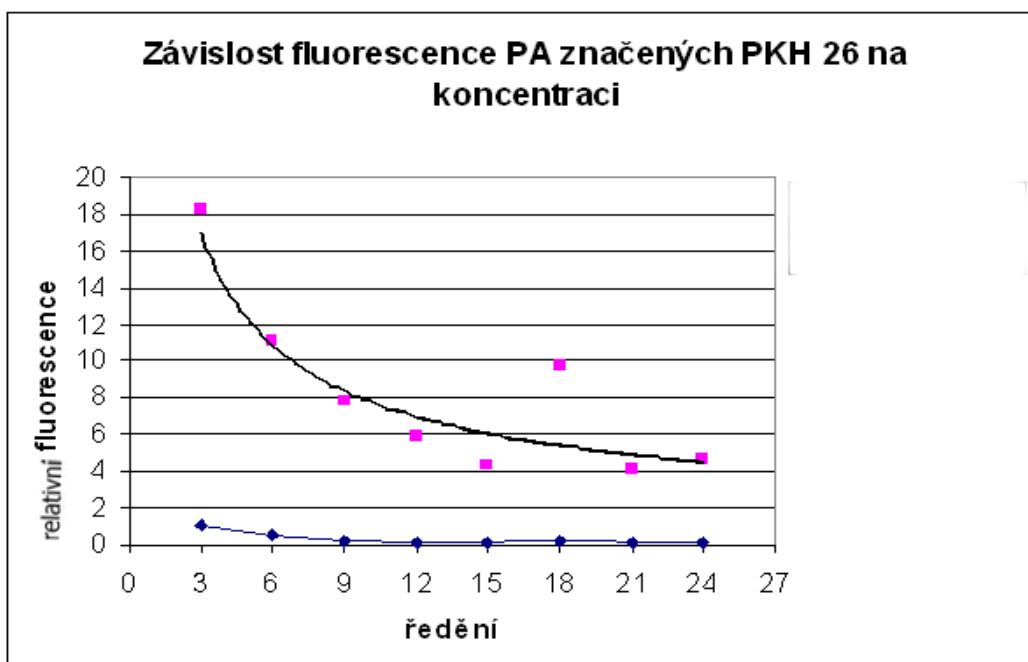
Pro vlastní pracovní postup byl využit návod od firmy Sigma s drobnými úpravami pro naše podmínky – viz kap. 3.8.5. Byly zkoušeny různé doby inkubace se značícím roztokem a sice 5, 20, 30 a 60 minut. Z jednotlivých vzorků byly udělány nátěry na podložní sklo (postup už uveden výše) a ty byly vyhodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon – obr. 4.6.6. Jako optimální čas inkubace byl na základě mikroskopických výsledků určen čas 30 minut. Označené bakterie jsou živé (pozorování v kapce, způsob popsán výše).

Vzhledem k použití této sloučeniny byla prováděna i fluorimetrická měření. Fluorimetr Perkin Elmer L55 se ukázal jako nevyhovující, měření proto byla provedena na přístrojích Varioscán Flesh V7 (obr. 4.6.7) a Biotek Synergy 2 (obr. 4.6.8.). Byla sledována závislost fluorescence na koncentraci – vzorky byly ředěny 3x řadou ze základní bakteriální suspenze o koncentraci 1.10<sup>8</sup> b/ml (Tab. 4.6.3). Odchyly v případě ředění 15x jsou pravděpodobně způsobeny nepřeností při pipetování.



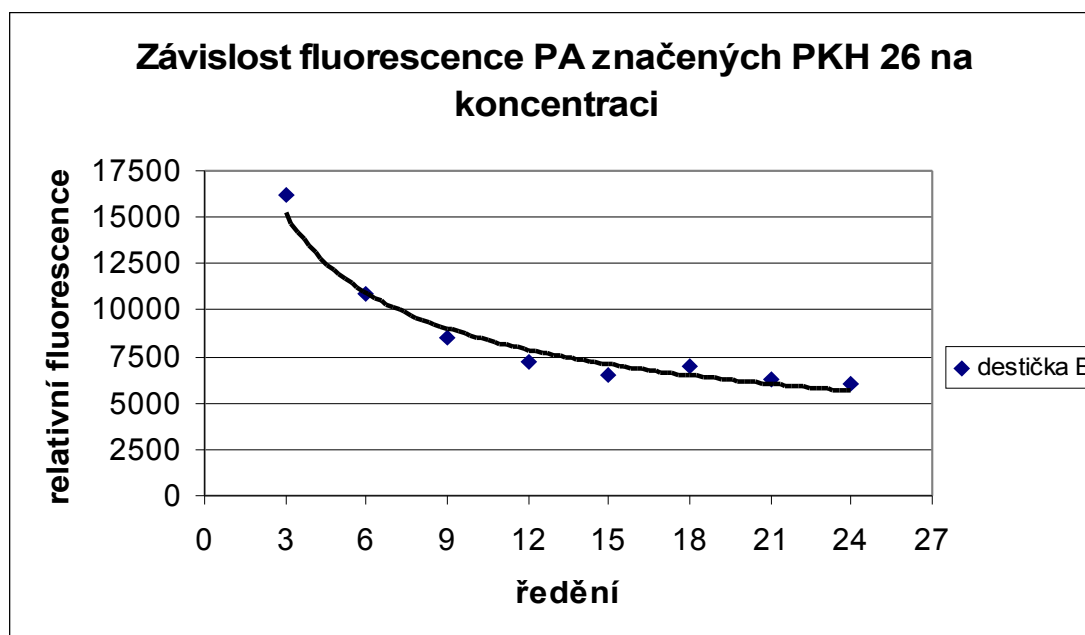
**Obr. 4.6.5:** Bakterie PA označené pomocí PKH 26. a - odpovídá nativnímu snímku; b - odpovídá fluorescenčnímu snímku. Doba inkubace byla 60 minut. Použit byl fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse (1500x, filtr 31002 RdiI C87702).

Podle dat získaných pomocí přístroje Varioscan Flash se jeví jako nejvhodnější destička A- bílá (Perkin). Jistá korelace mezi fluorescencí a koncentrací bakterií je viditelná i v případě černé destičky (CellBind). Nevýhodou černé destičky - B je nižší citlivost. Pro obě destičky v případě tohoto přístroje je reprodukovatelná mezní koncentrace bakterií řádově  $10^5$ .



**Obr. 4.6.6:** Závislost fluorescence na koncentraci bakterií PA. Růžová křivka odpovídá destičce A (bílá Perkin); modrá křivka odpovídá destičce B (černá Cell Bind). Hodnoty získané z Varioscan Flash V7.

V případě použití přístroje Biotek Synergy 2 bylo zkoušeno několik filtrů, jako nejlepší pro oba typy destiček se ukázala kombinace excit. 530/25 a emis. 590/35. Závislost fluorescence na koncentraci vykazuje i v případě použití tohoto přístroje obdobnou korelaci pro obě destičky, pouze destička A je opět několikanásobně citlivější. Reprodukovatelná mezní koncentrace bakterií je i v tomto případě řádově  $10^5$ .



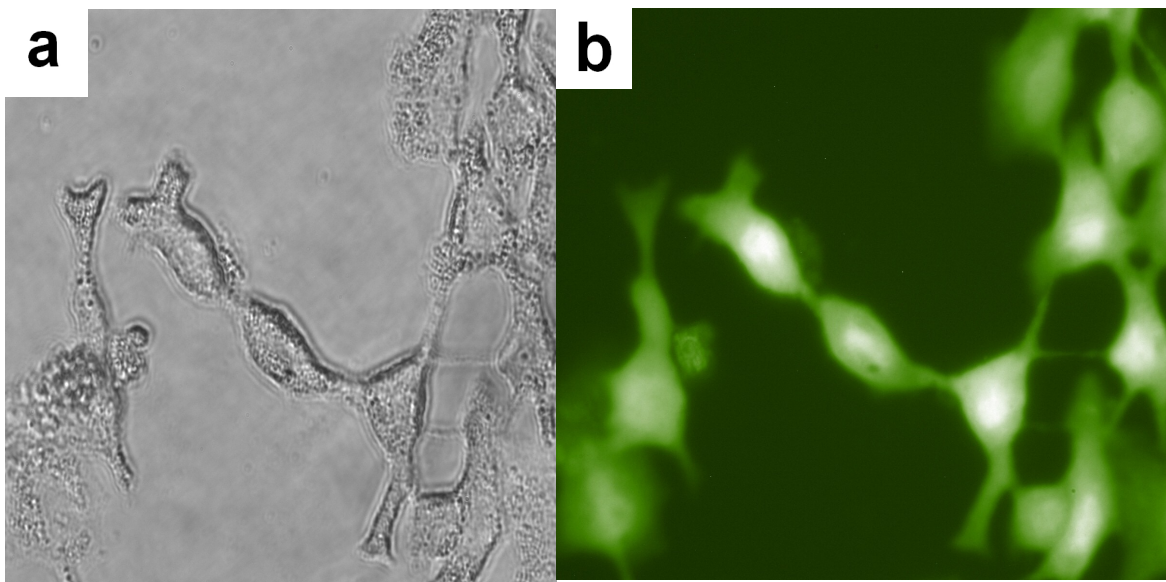
**Obr. 4.6.7:** Závislost fluorescence na koncentraci bakterií PA. Hodnoty odpovídají destičce B – černá Cell Bind. Použita byla 3x ředící řada. Data jsou získána pomocí Biotek Synergy 2.

## 4.7 Fluorescenční značení buněk A549

Bylo zkoušeno i fluorescenční značení buněk plicního epitelu. Jako první krok bylo vyzkoušeno značení linie A549. Ke značení bylo využito sloučeniny CellTracker Green CMFDA.

Buňky linie A549 byly nejprve adherovány na povrch destičky. Byly zkoušeny 3 typy destiček : A - bílé pro fluorimetr Perkin Elmer; B - černé CellBind 96j.; C - mikrotitrační destičky Polysorb (Nunc). Teprve po pokrytí povrchu bylo přistoupeno k vlastnímu značení. Pracovní postup je popsán v kap. 3.8.6. Zkoušeny byly 2 koncentrace značící látky (5 a 10  $\mu\text{M}$ ) a 3 doby inkubace buněk s touto látkou (15, 30 a 45 minut). Vyhodnocení bylo provedeno pomocí fluorescenčního mikroskopu (nastavení uvedeno v kapitole 4.6.1 – stejné jako pro FITC) přímo na destičkách – obr. 4.7.1.. Z výsledků je zřejmé, že pro označení buněk A549 stačí nižší

koncentrace značící látky (5  $\mu$ l), v případě vyšší koncentrace je fluorescence nepatrně výraznější, optimální doba inkubace je nejméně 30 minut. I po fixaci buněk 10% formaldehydem fluorescence přetrvává.



**Obr. 4.7.1:** Výsledek fluorescenčního značení buněk linie A549. Doba inkubace 45 minut, koncentrace barviva 10  $\mu$ M, destička B. a - odpovídá nativnímu snímku; b - zobrazuje fluorescenci. (Nikon, 1500x, filtr pro FITC).

## 5 Diskuse

Cystická fibróza je geneticky podmíněné onemocnění, podstatou nemoci je chybné fungování proteinu CFTR, jehož funkcí je transport iontů (chloridový kanál). Chybné fungování tohoto proteinu sebou nese řadu změn a zdravotních komplikací. Jednou z hlavních komplikací je kolonizace dýchacích cest pacientů mikroorganismy (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia komplex*), která je nejčastější příčinou úmrtí pacientů. Z tohoto důvodu je studována adheze těchto mikroorganismů na buňky plicního epitelu pacientů a možnost ovlivnění adheze pomocí slepičích protilátek jako agens pasivní imunizace, neboť léčba antibiotiky je komplikována vznikem rezistencí. Pro studium adheze bakterií na epitelální buňky je třeba vytvořit vhodný modelový systém.

Jedním ze základních kroků je izolace a následná kultivace buněk plicního epitelu pacientů s cystickou fibrosou. Buňky pacientů s CF se do jisté míry odlišují od buněk zdravých jedinců - změny v glykosylaci glykokonjugátů na povrchu buněk [23], proto chceme-li studovat celou problematiku v kontextu s cystickou fibrosou, je naší snahou vytvořit modelový systém co nejpodobnější reálné situaci. Řada metod v této práci byla nejprve optimalizována na plicních buňkách z potkana, případně bylo využito buněčné linie A549. Poté byly nebo budou tyto metody využity i v případě buněk epitelu získaných ze vzorků pacientů s CF. Při izolaci buněk přímo z tkáně pacientů s CF bylo k jejich uvolnění využito nejprve trypsinu a poté směsi elastasy a trypsinu. Směs obsahující elastasu se ukázala jako vhodnější [44]. Pro separaci jednotlivých typů plicních buněk bylo využito Ficollu. Během optimalizace metody na potkaních buňkách se ukázalo, že je třeba využít jiné hodnoty hustoty jednotlivých roztoků než je uváděno v literatuře [43]. Namísto využití pouze dvou rozdílných hustot ( $1,040 \text{ g/cm}^3$  a  $1,089 \text{ g/cm}^3$ ), jejichž použití nevedlo k dostatečné separaci zejména krevních buněk, byly používány 3 různé hustoty Ficollu -  $1,077 \text{ g/cm}^3$ ,  $1,060 \text{ g/cm}^3$  a  $1,040 \text{ g/cm}^3$ . V tomto uspořádání se již dařilo dostatečně oddělit krevní buňky do frakce 4 (viz obr. 4.2.1) a většinu bakteriálních buněk do frakce 1. Buňky plicního epitelu, zejména pneumocyty typu II – [53], byly zachyceny do frakcí 2 a 3, které byly nejvíce využívány v dalších experimentech.

Buňky získané vyštěpením z plicní tkáně byly kultivovány v mediu DMEM spolu s FCS a antibiotiky na různě upravených površích, ale i když vykazovaly jistou adherenci, nedocházelo k jejich růstu případně dělení a nepodařilo při těchto kultivacích získat linii buněk plicního epitelu.

Později bylo využito medium LHC-9 určené pro kultivaci plicních buněk s obsahem důležitých růstových faktorů (např. Epidermal growth factor – EGF). V tomto mediu vykazovaly buňky lepší adherenci, růst však byl velmi pomalý.

Vzhledem k faktu, že izolace epitelálních plicních buněk přímo z plicní tkáně za pomoci enzymů je poměrně invazivní technika, bylo pro získání buněk plicního epitelu využito také metody „brushing“. Jedná se o neinvazivní techniku díky které je získána směsná buněčná kultura plicních buněk [45]. Můžeme pozorovat typické dlaždicovité epitelální buňky a také řadu ciliárních buněk. Stav takto získaných plicních buněk může být ovlivněn i použitým lokálním anestetikem na kartáčku („brush“), bylo popsáno, že například použití lidokainu snižuje viabilitu takto získaných buněk [45], což bylo pozorováno i v případě některých našich vzorků (použit byl mezokain). Nevýhodou je fakt, že v případě vzorků z plic pacientů s CF jsou kromě buněk přítomny i bakterie případně spory dalších mikroorganismů (*Aspergillus*, *Candida*), které způsobovaly problémy během kultivace, bylo proto nutné do media přidávat antibiotika.

Kultivované buňky plicního epitelu byly využívány pro test adheze bakterií PA na tyto buňky. V tomto systému byla sledována možnost ovlivnění adheze bakterií na buňky epitelu pomocí slepičích protilátek proti lektinu PA-III. Jako vhodná metoda pro studium adheze v systému plicní buňky – bakterie PA se zdála být ELISA. Nejprve bylo s využitím této metody zjišťováno, zda jsou bakterie PA produkující daný lektin rozpoznávány slepičími protilátkami. V další fázi bylo testováno zda se na buňkách plicního epitelu získaných ze vzorků pacientů s CF vyskytují struktury, se kterými lektin interaguje. Po ověření těchto dílčích faktů, které byly uspokojivě pozorovány, bylo přistoupeno k adheznímu testu k průkazu účinnosti slepičích protilátek v zabránění adheze bakterií PA na buňky plicního epitelu. Získané výsledky ovšem neodpovídaly předpokladům, očekávané výsledky nevykazovala ani kontrolní uspořádání. Ukázalo se, že dochází k řadě nespecifických interakcí, ať již adheze bakterií PA na samotný povrch použité destičky (tato interference byla pozorována při použití všech typů povrchů), nebo možná vazba protilátek na struktury na povrchu plicních buněk. Vedle specifické protilátky proti lektinu PA-III 4S i kontrolní protilátka proti lektinu – 4K vykazuje silnou odezvu, což je patrně způsobeno faktem, že protilátka sice nedetekuje lektin PA-III, ale rozpoznává jiné antigenní struktury na povrchu bakterií. Pro docílení lepší kvantifikace bylo zkoušeno i použití směsi 2 protilátek (4S a 5) jako primární protilátky – 4S sloužila k zabránění adheze bakterií na buňky a 5 jako primární protilátka, podobné testy byly provedeny i v [54], kde bylo použito specifické antibakteriální sérum. Zkusili jsme provést adhezní test s využitím metody ELISA i s buňkami linie A549, které rovnoměrně adherují na destičku a tvoří uniformní vrstvu. Ovšem i v tomto případě se projevil nespecifické interakce.

Obecně ale lze z těchto adhezních testů říci, že slepičí protilátky proti lektinu PA-IIL mají schopnost snížit adhezi bakterií na buňky plicního epitelu. Byla proto dále hledána vhodnější technika než je ELISA, ačkoliv byla popsána analogická využití této metody v [54] a [55].

Jako další experiment studující chování bakterie PA a buněk plicního epitelu byla metoda dle Chi, Mehl, Nunn *et al* [46], která využívala linii A549. Došlo i k internalizaci bakterií PA do buněk, byly pozorovány vyrostlé kolonie i v případě inkubace bakterií s antibiotiky. Nejvíce vyrostlých kolonií bylo pozorováno v případě nijak neošetřených bakterií a naopak menší počet kolonií byl zaznamenán v případech inkubace bakterií spolu se sacharidy, což by potvrdovalo hypotézu o blokování vazného místa lektinu vedoucí ke snížení adheze a v souvislosti s tím i internalizace [56]. V případě sledování adheze bylo těžké vyhodnotit výsledky pouze na základě mikroskopického pozorování systému nabarveného pomocí Giemsa. Jedná se o subjektivní vyhodnocení, bylo proto přistoupeno k hledání vhodného způsobu objektivního vyhodnocení adhezních testů.

Pro vyhodnocení adhezních testů bylo přikročeno k fluorescenčnímu značení jednotlivých komponent systému plicní buňky – bakterie PA. Pomocí značených komponent s různou barvou emise je možno na základě intenzity fluorescence získat objektivní vyhodnocení adhezních testů. Nejprve bylo přistoupeno k fluorescenčnímu značení bakterií PA. Pro další využití v adhezních testech bylo potřeba, aby fluorescenční barvivo bylo účinné a bakterie jednoznačně vykazovaly fluorescenci (odstup od pozadí) a zároveň aby po označení byly co nejméně modifikované povrchové struktury bakterií pro využití v adhezních testech a bakterie zůstaly živé. Při použití FITC došlo k usmrcení bakterií, a proto nebylo toto barvivo dále využíváno. Pro fluorescenční značení bakterií byly dále zkoušeny reagenty, u kterých bylo popsáno, že buňky i po obarvení vykazují životnost po dobu řádově hodin. Těmito sloučeninami byly CellTracker Green CMFDA a PKH 67, ovšem tyto sloučeniny nedostatečně značily bakterie PA. Označení bakterií nebylo dosaženo ani když byl modifikován pracovní postup za účelem usnadnění vstupu dané látky do bakteriální buňky (bakterie vystaveny teplotnímu šoku, atd viz 3.6.4). Následně byl použit resazurin, který sám o sobě nefluoreskuje. Pomocí bakteriálních reduktaf je přeměněn na fluoreskující resorufin. Tato reakce slouží i jako indikátor viability bakteriálních buněk – mrtvá buňka není této přeměny schopna [50]. Značení touto látkou bylo úspěšné, bakterie vykazovaly jednoznačnou fluorescenci i viabilitu. Nevýhodou této látky je, že ji bakterie PA po obarvení a přenesení do nového roztoku stále uvolňují do media. V případě přenesení do media nebo PBS je tento jev poměrně slabý, barvivo je uvolňováno v menší míře, pouze do ustanovení rovnováhy. Při přenesení bakterií do vody je tento jev výrazný a barvivo je uvolněno téměř všechno. Během



stanovení fluorescence takto označených bakterií pomocí spektrofluorimetru byla pozorována korelace mezi fluorescencí a koncentrací bakterií. Pro další využití je tato sloučenina pro *Pseudomonas aeruginosa* jako jedna z možností.

Dále byla vyzkoušena sloučenina PKH 26. V případě této látky bylo popsáno úspěšné značení bakterie *Pseudomonas aeruginosa* [57]. Značení bylo úspěšné i v našem provedení, bakterie i po označení byly životaschopné. V případě měření fluorescence bakterií značených PKH 26 bylo nutné využít spektrofluorimetrů s malou šířkou spektrální čáry, protože hodnoty excitačního a emisního maxima jsou poměrně blízko u sebe. Pro měření na spektrofluorimetru bylo zkoušeno i více typů destiček – destička CellBind 96 jamek v černém provedení, dále destička pro fluorimetr Perkin Elmer 96 jamek, bílé provedení a mikrotitrační destička Polysorb. Z hlediska citlivosti byla nejlepší destička Perkin Elmer bílá, nevýhodou této destičky je neprůhledné dno a není tedy možné mikroskopicky sledovat povrch jamek, což je v případě adhezních testů důležité.

Po úspěšném značení první komponenty modelového systému – bakterií, bylo dalším krokem fluorescenční značení druhé základní komponenty modelového systému - buněk plicního epitelu. Zatím bylo vyzkoušeno pouze značení linie A549, které proběhlo úspěšně a buňky vykazovaly jasnou fluorescenci i viabilitu. Pro kontrolu bylo ještě ověřeno, zda buňky A549 fluoreskují i po fixaci formaldehydem, výsledek byl kladný.

Cíle práce byly splněny, získali jsme fluorescenčně označené bakterie PA pomocí PKH 26 vykazující červenou fluorescenci a také označené buňky plicního epitelu A549 pomocí CellTracker Green CMFDA vykazující zelenou fluorescenci. Máme tedy vhodný modelový systém pro provedení adhezních testů s objektivním způsobem vyhodnocení výsledků pomocí spektrofluorimetrických měření. Dalšími kroky jsou tedy jednak provedení adhezních testů v tomto systému a pak také provedení příslušných kroků s primárními buňkami získanými ze vzorků pacientů s CF (ať již izolací nebo pomocí „brushingu“).

## 6 Shrnutí

- Byly úspěšně kultivovány bakterie *Pseudomonas aeruginosa* produkující lektin PA-III a byly rozpoznávány slepičími protilátkami připravenými proti rekombinantnímu lektinu.
- Podařilo se izolovat a kultivovat buňky plicního epitelu pacientů trpících cystickou fibrosou.
- Byla vyzkoušena a optimalizována metodika testů adheze bakterií na plicní epiteliální buňky s využitím linie A549.
- Byla studována možnost ovlivnění adheze bakterií na buňky plicního epitelu pomocí slepičích protilátek proti lektinu.
- Podařilo se fluorescenčně označit bakterie *Pseudomonas aeruginosa* sloučeninou PKH 26 se zachováním viability bakterií. Pro fluorescenční značení epiteliálních buněk lze využít Cell Tracker Green CMFDA. Těchto skutečností lze dále využít při provádění adhezních testů.

# 7 Seznam použité literatury

## Seznam použité literatury

- 1: Vávrová Věra a kol., Cystická fibróza. Grada Publishing 2006
- 2: <https://runkle-science.wikispaces.com/Cystic+Fibrosis>, 1.3.2011
- 3: <http://www.zdrava-rodina.cz/med/med1002/med100225.html>, 2001
- 4: Rosenstein B., Zeitlin P., Lancet 1998; 351: 277-282
- 5: Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J. A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald M., Tsui L.C., Science 1989; 245: 1078-1080
- 6: Kreda S. M., Mall M., Mengos A., Rochelle L., Yankaskas J., Riordan J.R., Boucher R.C., Mol. Biol. Cell 2005; 16: 2154-2167
- 7: Bush A., Götz M., Eur. Respir. Mon. 2006; 37: 234-290
- 8: Skalická V., Fila L., Zemková D., Smolíková L., Vávrová V., Postgraduální medicína 2010; 07: 817-824
- 9: Hodson M. E., Geddes D. M., Cystic fibrosis, 2nd ed. London: Arnold
- 10: Gibson L. E., Cooke R. E., Pediatrics 1959; 23: 545-549
- 11: Balašćáková M., Holubová A., Piskáčková T., Čes-slov. Pediat. 2008; 2: 62-75
- 12: Castellani C., Southern K. V., Brownlee K., a kol., J. Cyst. Fibros. 2009; 8: 153-173
- 13: Balašćáková M., Holubová A., Skalická V., Zemková D., Kracmar P., Gonsorčíková L., Camajová J., Piskáčková T., Lebl J., Drevínek P., Gregor V., Vávrová V., Votava F., Macek M. Jr., J. Cyst. Fibrosis 2009; 8: 224-227
- 14: Elborn J.S., Hodson M., Bertram C., J. Cyst. Fibrosis 2009; 8: 211-217
- 15: Chernish R. N., Aaron S. D., Curr. Opin. Pulm. Med 2003; 9: 509-515
- 16: Kamei A. Pier G. B., Goldberg J. B., Coutinho-Sledge Y. S., Priebe G.P., Infect. Immun. 2011; 79: 1289-1299
- 17: Stříž I., Interní medicína 2008; 10: 184-187
- 18: Stříž I., Mio T., Adachi Y., Romberger D.J., Rennard S.I., Immunol. Lett. 1999; 70: 83-88
- 19: Jame A. J., Lackie P.M., Cazaly A. M., Sayers I., Penrose J.F., Holgate S.T., Sampson A.P., Clin. Exp. Allergy 2007; 37: 880-892
- 20: Mio T., Liu X. D., Stříž I., Adachi Y., Sköld C.M., Romberger D.J., Spurzem J.R., Illing M.G., Ertl R., Rennard S.I., Am. J. Physiol. 1998; 274: 119-126
- 21: Griese M., Birrer P., Demirsoy A., Eur. Resp. J. 1997; 10: 1983-1988
- 22: Restrepo C. I., Dong Q., Savov J., Mariencheck W.I., Wright J.R., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1999; 21: 576-585
- 23: Döring G., Eur. Respir. Mon. 2006; 35: 1-20
- 24: <http://www.helpnet.cz/monitoring-medii/2821-3>, 2007
- 25: <http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>, 14.3.2011
- 26: Wu A. M., Wu J. H., Singh T., Liu J.-H., Tsai M.-S., Gilboa-Garber N., Biochimie 2006; 88: 1479-1492
- 27: Young Y. M., Kang-Mu L., Yongjin Park, Sang S. Y., PLoS ONE 2011; 6: e161-05
- 28: <http://cepacia.wz.cz/burkholderia/burkholderia.html>, 10.3.2011
- 29: <http://www.burkholderia.com>, 10.3.2011

- 30: Isles A., Maclusky I., Corey M., Gold R., Prober C., Fleming P., Levison H., *J. Pediatr.* 1984; 104: 206-210
- 31: Kalish L. A., Waltz D. A., Dovey M., Potter-Bynoe G., McAdam A.J., Lipuma J.J., Gerard C., Goldmann D., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 173: 421-425
- 32: Sist P., Cescutti P., Skerlavaj S., Urbani R., Leitao J.H., Sá-Correia I., Rizzo Rl., *Carbohydr. Res.* 2003; 338: 1861-1867
- 33: Martin D. W., Mohr C. D., *Infect. Immun.* 2000; 68: 24-29
- 34: Frangolias D. D., Mahenthiralingam E., Rae S., Raboud J.M., Davidson A.G., Wittmann R., Wilcox P.G., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 160: 1572-1577
- 35: Schwab U. E., Wold A. E., Carson J. L., Leigh M.W., Cheng P.W., Giligan P.H., Boat T.F., *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; 148: 365-369
- 36: Barker A. F., *N. Eng. J. Med.* 2002; 346: 1383-1393
- 37: Bals R., Weiner D. J., Wilson J. M., *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 303-307
- 38: Hořejší V., Bartůňková J., *Základy imunologie.* Triton 2009
- 39: Carlsson M., Sjöholm A. G., Eriksson L., Thiel S., Jensenius J.C., Segelmark M., Truedsson L., *Clin. Exp. Immunol.* 2005; 139: 306-313
- 40: Warr G. W., Magor K. E., Hoggins D. A., *Immunol. Today* 1995; 16: 392-398
- 41: <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11258&pid=11287>, 20.5.2011
- 42: Nilson E. : Characterisation of IgY for oral Immunotherapy and Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections in Cystic fibrosis patients. *Acta Universitatis Uppsaliensis, Uppsala* 2009
- 43: Kováčiková Z., Tátrai E., Adamis Z., *Physiol. Res.* 1999; 48: 309-314
- 44: Chen J., Chen Z., Narasaraju T., Jin N., Liu L., *Lab. Invest.* 2004; 84: 727-735
- 45: Kelsen S. G., Mardini I. A., Benovic J. L., Zhou S., Higgins N.C., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1992; 7: 66-72
- 46: Chi E., Mehl T., Nunn D., Lory S., *Infect. Immun.* 1991; 59: 822-828
- 47: Akita E. M., Nakai S., *J. Immunol. Methods* 1993; 162: 155-164
- 48: Scharfman A., Kroczyński H., Carnoy C., Van Brussel E., Lamblin G., Ramphal R., Roussel P., *Infect. Immun.* 1996; 64: 5417-5420
- 49: Wong S. M., Chu W., Sun D., Huang H.S., Chen J.H., Tsai P.J., Lin N.T., Yu M.S., Hsu S.F., Wang S.L., Chang H.H., *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 6111-6116
- 50: Vidal-Aroca F., Meng A., Minz T., Page M.G.P., Dreier J., *J. Microbiol. Methods* 2009; 79: 232-237
- 51: Imberty A., Wimmerová M., Mitchell E.P., Gilboa-Garber N., *Microbes Infect.* 2004; 6: 221-228
- 52: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/C2925>, duben 2011
- 53: Bingle L., Bull T. B., Fox B., Guz A., Richards R.J., Tetley T.D., *Environ. Health Perspect.* 1990; 85: 71-80
- 54: Ofek I., Courtney H. S., Schifferli D. M., Beachey E. M., *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24: 512-516
- 55: Athamna A., Ofek I., *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 62-66
- 56: Lerrer B., Zinger-Yosovich K. D., Avrahami B., Gilboa-Garber N., *ISME J.* 2007; 1: 149-155
- 57: Kierbel A., Diagne-Gassama A., Rocha C., Radoshevich L., Olson J., Mostov K., Engel J., *J. Cell Biol.* 2007; 177: 21-27

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

<b>Jméno a příjmení s adresou</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>