

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Jana Hadrabová

Vývoj experimentálního modelu pro testování žloutkových protilátek
jako prostředku profylaxe bakteriálních infekcí

Development of an experimental model for yolk antibody prophylaxis
of bacterial infections

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2015

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

Poděkování

Ráda bych poděkovala zejména vedoucímu mé práce prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení, pomoc a množství cenných rad při realizaci experimentální práce i při zpracování získaných výsledků. Dále pak mé kolegyni, Mgr. Boženě Kubíčkové za spolupráci na experimentech a prof. MUDr. Václavu Mandysovi za zpracování vzorků plicní tkáně.

Abstrakt

Respirační systém pacientů s cystickou fibrosou (CF) je ovlivněn geneticky podmíněným defektem v proteinovém transportéru pro chloridové ionty CFTR („Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“). Hlavní komplikací tohoto onemocnění jsou chronické infekce dýchacích cest, zejména bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Tato bakterie má vzhledem k asialyzovanému povrchu plicního epitelu CF pacientů usnadněnou adhezi např. pomocí lektinu PAIIL. Protože již byla prokázána schopnost slepičích protilátek bránit adhezi *Pseudomonas aeruginosa* na plicní buňky, byl v této práci sledován vliv protilátek IgY specifických proti PAIIL na rozvoj infekce v plicích experimentálních zvířat. Cílem byla optimalizace experimentálního modelu, na kterém by bylo možné sledovat vývoj infekce luminiscenčního kmene bakterií *in vivo* na optickém tomografu. Experimenty byly nejprve prováděny na potkanech Wistar. Protože však bakterie v potkaních plicích nebyly na dostupném zařízení měřitelné *in vivo*, ukázal se experimentální model potkana jako nevhodný. Dále bylo pokračováno na myších modelech. Byly provedeny experimenty pro optimalizaci inhalačního podání protilátek IgY a intratracheální aplikace bakteriální suspenze. Na vytvořeném systému byly testovány účinky protilátkové profylaxe na vznik bakteriální infekce ve srovnání s kontrolními inhalacemi pufru PBS. Bylo zjištěno, že protilátky inhalované před aplikací bakterií zvyšují pravděpodobnost bakteriální infekce.

Klíčová slova

Bakteriální infekce, slepičí protilátky, optický tomograf, intubace myši

Abstract

Respiratory system of the cystic fibrosis patients is affected by the defect in gene coding for protein transporter for chloride ions – CFTR (“Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”). The main complication of this disease is airways chronic inflammation, in particular caused by bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. Due to asialylation of the lung surfaces the bacterial adhesion is facilitated, for example via lectin PAIIL. The ability of the chicken yolk antibodies to protect lung epithelial cells against *Pseudomonas aeruginosa* adhesion has been already proven. Therefore this thesis has mainly focused on the influence of the yolk antibodies specific against PAIIL on the development of infection in lungs of experimental animals. The objective was the optimization of the experimental model on which it would be possible to observe the infection development caused by luminescent bacteria strain *in vivo* using the optical tomography. At first the experiments have been performed on Wistar rats. Since the bacteria colonies in the rat lungs were not detectable *in vivo* on the available equipment, the rat experimental model showed up as not suitable. Further on only the mouse models were used. Experiments for the inhalation of the antibodies and intratracheal instillation of the bacteria suspension have been carried out. Using already established system the effects of antibody prophylaxis on the bacterial infection development in comparison with the control group inhaled buffer PBS were tested. It was found that the antibodies inhaled before the application of the bacteria do increase probability of the bacterial infection.

Key words

Bacterial infection, chicken yolk antibodies, optical tomography, mouse intubation

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1 ÚVOD	9
1.1 Cíl práce	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Imunitní systém	10
2.1.1 Nespecifické imunitní mechanismy	10
2.1.2 Antigeny	13
2.1.3 Proces zánětu	13
2.1.4 Specifické imunitní mechanismy	14
2.2 Respirační systém	16
2.2.1 Cystická fibrosa	16
2.3 Bakterie rodu Pseudomonas	18
2.4 Pasivní imunizace protilátkami IgY	21
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1 Použitý materiál, pomůcky	23
3.1.1 Použité chemikálie	23
3.1.2 Použité přístroje	24
3.2 Použité metody	26
3.2.1 Práce s protilátkami	26
3.2.2 Práce s bakteriemi	28
3.2.3 Experimenty provedené na potkanech	30
3.2.4 Experimenty provedené na myších	34
3.2.5 Ověření produkce bakteriálního lektinu PAIIL	37
4 VÝSLEDKY	40
4.1 Porovnání luminiscence bakterií a výběr vhodného kmene	40
4.2 Imunochemická analýza protilátek	41
4.3 Experimenty provedené na potkanech	42
4.4 Experimenty provedené na myších	45
4.5 Ověření produkce bakteriálního lektinu PAIIL	51
5 DISKUSE	52
6 SOUHRN	57
7 Citovaná literatura	58

Seznam použitých zkratek

AM	alveolární makrofágy
AP	alkalická fosfatasa („Alkaline phosphatase“)
APS	peroxidisíran amonný („Ammonium persulphate“)
A ₂₈₀	absorbance při 280 nm
A ₄₀₅	absorbance při 405 nm
A ₆₀₀	absorbance při 600 nm
BAL	bronchoalveolární laváž
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolyl fosfát
C – domény	konstantní domény imunoglobulinu („Constant“)
C – proteiny	proteiny komplementu („Complement“)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBB	barvivo („Coomassie brilliant blue“)
CF	cystická fibrosa
CFTR	chloridový kanál („Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“)
CFU	počet buněk v 1 ml („Colony forming units“)
CNS	centrální nervová soustava
ELISA	imunochemická analýza („Enzyme linked immunosorbent assay“)
Fab	protilátkový fragment vázající antigen („Antigen binding“)
Fc	krystalizující protilátkový fragment („crystallizing“)
H	těžké řetězce imunoglobulinu („Heavy“)
L	lehké řetězce imunoglobulinu („Light“)
LecB	označení pro bakteriální lektin (též PAIIL)
M – forma	mukoidní růstová forma PA („Mucoid“)
MAC	terminální komplex komplementu („Membrane attack complex“)
MBL	sérový lektin („Mannose binding lectin“)
MSD	membránová doména CFTR („Membrane spanning domain“)
NBD	doména CFTR vázající nukleotidy („Nucleotid binding domain“)

NBT	barvivo „Nitro-blue tetrazolium“
NK buňky	přirozeně cytotoxické buňky („Natural killers“)
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAIL, PAIIL	bakteriální lektiny
PBS	fosfátový pufr („Phosphate buffered saline“)
pNPP	paranitrofenyl fosfát
PS	označení média pro kultivaci pseudomonád
PVDF	polyvinylidenfluorid
R – doména	regulační doména CFTR („Regulatory“)
R – forma	„hrubá“ růstová forma PA („Rough“)
RPM	počet otáček za minutu („Revolutions per minute“)
S – forma	„hladká“ růstová forma PA („Smooth“)
SDS	dodecylsulfát sodný („Sodium dodecyl sulphate“)
SPF	pokusná zvířata bez specifických patogenů („Specific pathogen free“)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
V – domény	variabilní domény imunoglobulinu („Variable“)

1 ÚVOD

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je oportunní lidský patogen, který může způsobit závažné komplikace zejména u jedinců s oslabenou imunitou či s poškozením tkání. Zvláště nebezpečný je pro pacienty s respiračními onemocněními, protože kolonizuje zejména respirační trakt. Tam se může dostat například z nesterilních respiračních pomůcek v nemocnicích. U pacientů s cystickou fibrosou (CF) často tvoří mukoidní plaky – tedy alginátovým „slizem“ obalené kolonie, které jsou velmi odolné vůči standardní léčbě antibiotiky.

Profylaxe pacientů s CF slepičími žloutkovými protilátkami by mohla být vhodnou alternativou standardní léčby a obranou před recidivujícími bakteriálními infekcemi v plicích. Takto by mohla být zvýšena obranyschopnost těchto pacientů a tím i kvalita a délka života.

V dosavadních výzkumech týkajících se cystické fibrosy jsou často používány geneticky upravené myší modely, simulující toto onemocnění. Pro výzkum prezentovaný v této práci však nejsou použitelné.

1.1 Cíl práce

Cílem této práce byl vývoj experimentálního modelu, na němž by bylo možné *in vivo* sledovat vývoj infekce v respiračním traktu a vliv profylaxe slepičími žloutkovými protilátkami (IgY) na adhezi bakterií *Pseudomonas aeruginosa*.

Pro splnění tohoto cíle bylo nutné splnit dílčí úkoly:

- Výběr vhodného zvířecího modelu
- Výběr luminiscenčního bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa*
- Vypracování metodiky inhalačního podání protilátky IgY
- Optimalizace aplikace bakterií do dýchacích cest experimentálních zvířat
- Sledování průběhu plicní infekce *in vivo*

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Imunitní systém

Hlavní funkcí imunitního systému je udržování integrity organismu tím, že je schopen rozeznat škodlivé látky uvnitř organismu i ty, které se vyskytují v okolí. Identifikací cizorodých patogenů je zajištěna obranyschopnost, rozpoznáním vlastních tkání je udržována tolerance vůči nim. Dalším úkolem imunitního systému je jakýsi „dohled“ na vnitřní prostředí, odstraňování starých, poškozených či mutovaných buněk. Patří tedy mezi hlavní homeostatické mechanismy organismu. Imunitní systém informace o vnitřním prostředí zprostředkovává centrálnímu nervovému systému (CNS) a zároveň podléhá nervové a hormonální regulaci. (1)

Správná funkce imunitního systému je zajišťována specifickými a nespecifickými mechanismy, které jsou navíc tvořeny humorálními a buněčnými složkami. Pomocí specifických (adaptivních) mechanismů lze vytvořit v imunitním systému „databázi“ antigenů, se kterými se již organismus setkal a dokáže proti nim produkovat specifické protilátky. K celkové obraně organismu pak dopomáhá samozřejmě i přirozená mechanická bariéra zajištěná kůží a sliznicemi a mikroflórou na jejich povrchu.

2.1.1 Nespecifické imunitní mechanismy

Nespecifické, jinak řečeno vrozené či neadaptivní mechanismy představují molekuly a buňky, které jsou v organismu „předpřipravené.“ Patogeny v organismu rozpoznávají prostřednictvím společných strukturních či funkčních rysů. Při opakovaném setkání se stejným antigenem reagují totožně. Cílem je rychlá eliminace škodliviny. Humorální složky nespecifické imunity tvoří komplement, lektiny, interferony a další proteiny obsažené v séru. Hlavním cílem je zejména obrana proti bakteriální infekci. (2)

Komplementový systém

Komplement tvoří skupina membránových a sérových proteinů (cca třicet), které jsou postupně aktivovány v komplementové kaskádě. Hlavní z nich jsou označovány C1 – C9, z nichž nejvýznamnější je C3, jehož fragment C3b je schopen se kovalentně navázat na mikrobiální povrch a způsobí následnou opsonizaci. Úkolem terminálního komplexu

označovaného MAC („Membrane attack complex,“ složený z C5b – C9) je perforace mikrobiální membrány.

Byly popsány tři různé cesty aktivace komplementu. První (proto nazvaná klasická), začíná vazbou protilátky na mikrobiální povrch a odhalení vazebného místa pro protein C1. Komplex C1 se naváže, dojde ke změně jeho konformace a začne štěpit proteiny C4 a C2, jejich fragmenty pak vazbou na povrch napadeného mikroorganismu vytvoří C3-konvertasu. Po štěpení C3 se vytvoří C5-konvertasa štěpící C5. Fragmenty C5 pak tvoří komplex s C6, C7 a C8, který se zanoří do mikrobiální membrány a spojí se se skupinou molekul C9 do kruhu, tvořícího v membráně pór. Následkem je únik cytoplazmatických komponent a lyze buňky.

Alternativní cesta aktivace je rozdílná v samovolném štěpení C3 a odhalení thioesterové skupiny, která reaguje s hydroxy- a aminoskupinami na povrchu buněk. Často reaguje nejen s nežádoucími mikrobiálními buňkami, ale i vlastními při aktivaci po kontaktu např. s povrchem implantátu (kloub, chlopeč), či při dialýze.

Podobná klasické je lektinová cesta, kde k aktivaci kaskády dojde (namísto protilátky) prostřednictvím sérového lektinu („Mannose-binding lectin“ – MBL), jež se váže na sacharidové struktury na mikrobiálních površích. (3)

Buňky, reprezentující nespecifické imunitní mechanismy jsou dvojího druhu – fagocyty a NK buňky („Natural killers“ – přirozeně cytotoxické buňky).

Fagocyty

Fagocytosa je děj, při němž buňky – takzvané profesionální fagocyty – pohlcují částice z okolí („fagein“ = požírat). Fagocyty lze dále rozdělit na:

- Neutrofilní, eosinofilní a bazofilní granulocyty
- Monocyty
- Lymfocyty

Neutrofilny jsou přítomné v krvi a jsou přenášeny na místo potřeby, kde mohou např. při zánětu přestoupit do tkáně. Monocyty takto přestupují do tkání průběžně a tam se mění na usazené tkáňové makrofágy, které vyčkávají, až budou potřeba při zánětu, nebo likvidují vlastní buňky po apoptose. Z monocytů dále vznikají dendritické buňky (zvláštní druh fagocytujících buněk), které se nacházejí zejména v kůži a sliznicích

dýchacího a trávicího traktu, kde tvoří cca 1 – 2 % celkového počtu buněk a jsou zodpovědné za prezentaci antigenu a stimulaci imunitní odpovědi prostřednictvím T a B buněk. (4)

Fagocyty jsou schopny rozpoznat struktury (endotoxiny) na povrchu mikroorganismů (např. lipopolysacharidy gramnegativních bakterií, peptidoglykany grampozitivních bakterií), nebo apoptotické komponenty buněk organismu. Dále reagují při střetu s opsonizovanými částicemi. Fagocytosa probíhá tak, že fagocyt nejprve kontaktuje cizorodou částici svými povrchovými receptory, postupně ji obklopuje až do uzavření do fagosomu. Již během uzavírání dochází ke spojení fagosomu s lysosomy (fagolysosom) obsahujícími baktericidní látky (reaktivní kyslíkové intermediáty, oxid dusnatý a hydrolytické enzymy), které ničí pohlcený mikroorganismus. Tyto látky však mohou být nebezpečné i pro organismus v případě chronických zánětů, při nichž může dojít k uvolnění do okolí a poškození cévní stěny. (3)

NK buňky

„Natural killers“ jsou přirozeně cytotoxické buňky, účastníci se nespecifických imunitních mechanismů. Jsou to velké granulární lymfocyty bez antigenně specifických receptorů (na rozdíl od B a T lymfocytů). Jsou aktivovány pomocí interferonů α a β , které buňka produkuje v případě napadení např. virovou infekcí. Následnou produkci cytotoxických granulí, které obsahují perforin a granzymy, se pak podílí na eliminaci patogenů. Stejně jako fagocyty chrání organismus před viry, plísněmi a parazity.

Lymfatické tkáně a orgány

Výše popsané molekuly a buňky imunitního systému spolu s dalšími strukturami tvoří lymfatické tkáně a lymfatické orgány. Ty se dále dělí na primární (kostní dřev, thymus) a sekundární (slezina, lymfatické uzliny). Jsou propojeny s ostatními orgány sítí lymfatických a krevních cév (aferentních), které posbíranou lymfu z tkání přivádějí do lymfatických uzlin. Ta pak zase s částí lymfocytů odchází do krevního řečiště tzv. eferentními cévami. (3)

Primární lymfatické orgány slouží k dozrávání buněk. V kostní dřevě vznikající neutrofilů se dostávají do krve už jako „hotové“ funkční buňky. Lymfocyty naopak potřebují dozrát a to buď v kostní dřevě na B lymfocyty, potřebné k tvorbě protilátek,

nebo v thymu na T lymfocyty, které jsou pak schopné interakce s antigeny. (1)

Důležitými složkami membrán imunitních buněk jsou MHC glykoproteiny („major histocompatibility complex“) I a II třídy. První třída MHC glykoproteinů má za úkol vazbu peptidových fragmentů o délce 8 – 10 aminokyselin produkovaných buňkou, druhá třída pak fragmentů o 15 – 35 aminokyselinách, které buňka pohlcuje. Po uskutečnění vazby pak MHC glykoproteiny tyto částice prezentují T lymfocytům.

2.1.2 Antigeny

Látky, které vyvolávají imunitní reakci, jsou antigeny. Podle původu je lze rozdělit na antigeny z vnějšího prostředí (exoantigeny) a antigeny, které produkuje organismus sám (autoantigeny). Imunitní systém je musí být schopen rozlišovat, v opačném případě může dojít ke vzniku autoimunitních onemocnění. Antigeny bývají zejména proteiny, polysacharidy či lipoproteiny s epitopem, tzn. malou oblastí, kterou rozeznává receptor imunitního systému. Po střetu s B lymfocyttem dochází k tvorbě různě velkých imunokomplexů s protilátkami (s různým poměrem protilátky a antigenu). (3)

B lymfocyty pohltnou vzniklý komplex, rozloží antigen a jeho část vrátí zpět na svůj povrch. Tento fragment pak vytvoří na povrchu B lymfocytu komplex s MHC glykoproteinem třídy II a dojde k navázání T buňky (pomocné). B lymfocyty jsou následným uvolněním interleukinů stimulovány k množení a diferenciaci na efektorové buňky. K diferenciaci dochází po celou dobu přítomnosti antigenu – tvoří se specifické protilátky - dochází tedy k aktivní imunizaci.

2.1.3 Proces zánětu

Narušení integrity organismu zraněním či vnikem cizorodého organismu může být doprovázeno zánětlivou reakcí. Taková odpověď může být místní (začervenání – rubor, lokální nárůst teploty – calor, bolest – dolor, či otok – tumor) i celková. Zánět pak může být akutní, po němž tkáň zregeneruje, nebo chronický, který může působit nevratná jizvení tkáně.

Proces po vniku cizorodého mikroorganismu začíná akumulací fagocytů a následnou stimulací sekrece cytokinů. Mikrobi v místě zánětu uvolňují antigeny, jež jsou identifikovány specifickými složkami imunity a dojde ke stimulaci diferenciaci T

a B lymfocytů. (5) Při větším rozsahu infekce pak může dojít až k anafylaktickému či septickému šoku, jež může být pro organismus fatální. Uvolnění obrovského množství cytokinů a dalších mediátorů zánětu totiž následnou vazodilatací a způsobenou hypotenzí může způsobit až selhání oběhu. U běžných infekcí je obvyklým projevem zvýšená tělesná teplota následkem působení některých cytokinů na termoregulační centrum hypotalamu. Jiné cytokiny zase stimulují tvorbu proteinů akutní fáze zánětu, hlavně C - reaktivního proteinu a komplementových proteinů C3 a C4, které se podílejí na opsonizaci a stimulaci fagocytosy. Závěrečnou fází zánětlivého procesu by měla být reparace poškozené tkáně. (5)

2.1.4 Specifické imunitní mechanismy

Specifické (adaptivní) mechanismy mají schopnost zapamatovat si antigen po prvním setkání a schopností produkce specifických protilátek pro případ dalšího setkání.

Protilátky

Konečné stadium diferenciací B lymfocytů – tzv. plazmatické buňky (plazmocyty) produkují protilátky proti specifickým antigenům. Antigeny, které tvorbu protilátek vyvolají, mohou B lymfocyty stimulovat přímo (tzv. T-nezávislé antigeny, obvykle polysacharidy), nebo ve spolupráci s pomocnými T lymfocyty. Ve druhém případě pak reakce probíhá ve dvou fázích – v první dojde k produkci nízkoafinních imunoglobulinů M (IgM), ve druhé IgG, IgA a IgE. Většinou jde o protilátkovou odpověď polyklonální, kdy výsledkem jsou stovky až tisíce podobných molekul imunoglobulinů produkovaných velkým počtem různých plazmocyty. Protilátky s jedinou specifitou jsou naproti tomu produkovány jedním klonem plazmocyty, jsou tedy monoklonální. Jednotlivé monoklonální protilátky lze v organismu nalézt ve velmi malém množství. Jejich počet ale může narůst v případě patologického nálezu – nádorového bujení z plazmatických buněk, tzv. myelomu. Myelomových linií lze využít *in vitro* k imortalizaci B lymfocytů pěstovaných v buněčné kultuře pro produkci konkrétních specifických protilátek.

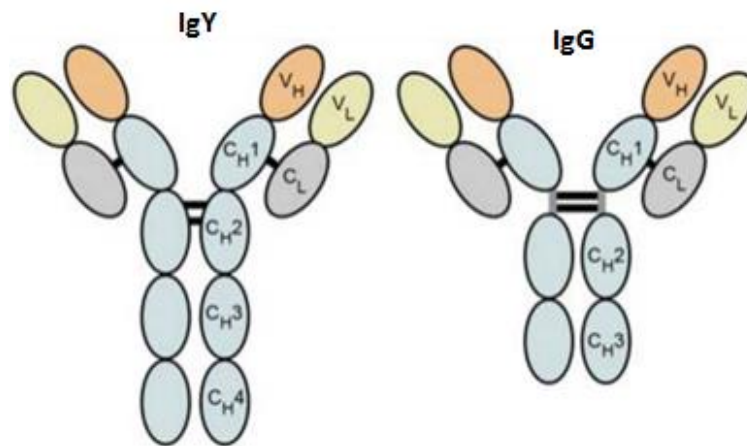
Protilátková imunitní reakce spočívá v neutralizaci toxinů, virů či jiných mikroorganismů vazbou na adhezivní epitopy. Oponizované buňky (s navázanými protilátkami) pak podléhají fagocytose. Vazbou protilátky na antigen také může dojít k aktivaci komplementu (klasická cesta), následkem je oponizace, případně rozvoj zánětlivé reakce.

Pro léčebné účely se nejprve začaly používat uměle vyrobené myší monoklonální protilátky. Lidské tělo je však odmítalo jako cizorodý protein, byla tedy potřeba jejich humanizace nahrazením těch částí, které netvoří vazebné místo pro antigen, odpovídajícími částmi lidského imunoglobulinu. (3)

Samotné protilátky jsou většinou glykoproteiny tvořené čtyřmi podjednotkami: dvěma lehkými (L – „light“) o velikosti přibližně 23 kDa a dvěma těžkými řetězci (53 – 75 kDa; H – „heavy“). Lehké a těžké řetězce jsou vzájemně kovalentně propojeny disulfidovými (cystinovými) můstky do symetrické makromolekuly ve tvaru písmene Y. V řetězcích dále rozlišujeme domény - konstantní (C – „constant“), nesoucí obvykle sacharidy a variabilní (V – „variable“), jež tvoří vazebná místa pro antigen. Podle úloh v imunitní reakci se lidské imunoglobuliny dělí do tříd A, D, E, G a M. Odpověď na antigen začíná IgM, dojde k vazbě proteinu C1 a aktivaci komplementu. Přibližně po dvou dnech se tvoří nejhojnější imunoglobuliny – IgG. Imunoglobulin A pak zprostředkovává oponizaci bez aktivace komplementu. (6)

Slepičí protilátky IgY se strukturou velmi podobají lidskému IgG (molekulová hmotnost asi 150 kDa). (obr. 1, str. 16) Rozdíl je v těžkých řetězcích, jež jsou u IgY rozděleny na tři v IgG na dvě části. Třetí část je u IgY spojena, u IgG spoj tvoří tzv. pantovou oblast, díky níž je flexibilnější. Molekulová hmotnost IgY je přibližně 180 kDa, tedy těžší o hmotnost domény navíc (cca 30 kDa) než IgG. (7)

Imunoglobuliny Y lze nalézt ve slepičí krvi, ale až dvojnásobná koncentrace je obsažena ve vaječném žloutku, odkud mohou přecházet do krve kuřete. Použití vajec pro izolaci je pak nejen vhodnější z hlediska výtěžku, ale i nenáročnosti provedení. Vzhledem k možné produkci až dvacet vajec měsíčně lze při obsahu 100 mg IgY ve žloutku získat za každý měsíc cca dva gramy od každé slepice. (8)



Obrázek 1: Srovnání struktury slepičí protilátky IgY a lidské IgG. L, H – lehké („Light“) a těžké („Heavy“) řetězce; C, V – konstantní („Constant“) a variabilní („Variable“) domény. (Převzato, upraveno) (9)

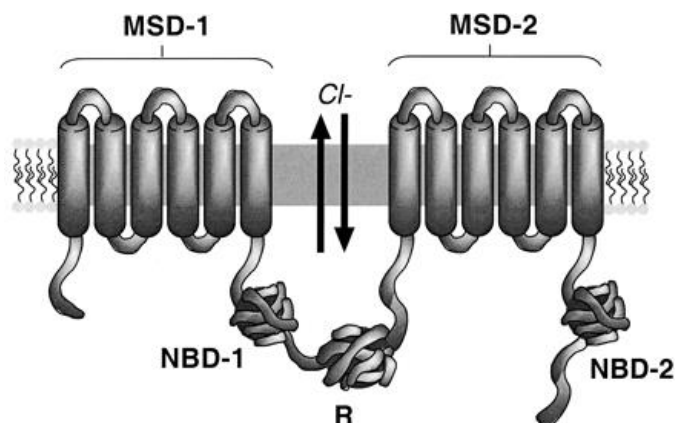
2.2 Respirační systém

Lidský dýchací systém slouží k výměně plynů (zejména kyslíku a oxidu uhličitého) mezi atmosférou a krví. Pravá a levá část plic je dále dělena na laloky, jejichž povrch je pokryt lesklou blánou (pleura). Uvnitř jsou plice tvořeny sítí krevních cév a plicních sklípků, které přes průdušinky přecházejí v průdušky a ty se spojují v tracheu. Vnitřní povrch plic (zejména plicní sklípky, alveoly) je pokryt tenkostěnným epitelem s řasinkami, jež je velmi bohatě prokrven. Na tomto epitelu ulpívá vrstva hlenu, který zachytává vdechnuté mikročástice a mikroorganismy. Částice větší než 5 μm jsou eliminovány prostřednictvím posunu hlenu po řasinkovém epitelu. Hlen se dostane ven z plic a může být odstraněn vykašláním. Na mikroorganismy zároveň může hlen zdravého jedince působit baktericidně. (2) Menší částice podléhají přímo v plicních sklípcích fagocytose alveolárními makrofágy.

2.2.1 Cystická fibrosa

Cystická fibrosa (CF) je genetické onemocnění diagnostikované u jednoho z 2500 – 4500 narozených dětí. (10) Vlivem mutace v genu pro chloridový kanál CFTR („Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), dochází u pacientů s CF ke snížení až ztrátě funkce tohoto proteinu. Jde o pětiodoménový protein složený ze dvou

transmembránových domén (MSD – „Membrane spanning domain“), dvou domén, které vážou nukleotidy a nukleotidfosfáty (NBD – „Nucleotid binding domain“) a z jedné domény regulační (R) (obr. 2).



Obrázek 2: Chloridový kanál CFTR. MSD – membránová doména („Membrane spanning domain“); NBD – doména vázající nukleotidy („Nucleotid binding domain“); R – regulační doména („Regulatory“) (11)

Tento iontový kanál se vyskytuje např. na membránách epitelálních buněk, přenos chloridových iontů je aktivován pomocí cAMP (cyklický adenosinmonofosfát) a regulační doména (R) pak funguje jako „ventil,“ který při uzavření brání průchodu iontů. (10) Četnost výskytu mutací je pro jeden gen u přibližně každého dvacátého sedmého člověka, zatímco nositelem obou mutovaných kopií genu pro tento protein je jeden z 2500. (12) Gen pro CFTR můžeme nalézt na dlouhém raménku chromosomu 7. Mutace v tomto genu - nejčastěji $\Delta F508$ (tedy ztráta fenylalaninu na pozici 508) – způsobí narušení činnosti CFTR, začne procházet více chloridových a sodných iontů, tím se zahustí mukoidní sekrety na sliznicích zejména v dýchacích cestách a pankreatu. V pankreatu je tím potlačena produkce trávicích enzymů, což má za následek zvýšení objemu stolice. (13) Zhuštěný hlen v plicích pak má za následek vyšší náchylnost k bakteriálním infekcím, zejména *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Staphylococcus aureus* či *Burkholderia cepacia*. (14) Tyto infekce pak ohrožují funkci plic natolik, že pacienti umírají následkem rozsáhlých poškození plicní tkáně či selhání srdce. (15)

2.3 Bakterie rodu *Pseudomonas*

Pseudomonády patří spolu s rodem *Burkholderia* a *Stenotrophomonas* do skupiny gammaproteobakterií, mezi gramnegativní tyčky s aerobním metabolismem. Pro tento rod je typický pohyb prostřednictvím jednoho nebo dvou polárních bičíků. Jedinou nepohyblivou výjimkou je *Burkholderia mallei*. Dalšími faktory, které zvyšují pohyblivost těchto bakterií, jsou fimbrie (pili). Dále je častá produkce pigmentů různých barev – modrý pyocyanin, hnědý pyomelanin, červený pyorubin či aereuginosin A a B, žlutozelený fluorescein a fluoreskující pyoverdín. Poslední dva jmenované pro bakterie působí jako siderofory, tedy umožňují získávání kationtů železa z okolí. (16)

Tyto bakterie mají značný ekologický význam, protože se účastní aerobní dekompozice syntetických sloučenin, biodegradace a přírodních cyklů uhlíku a dusíku. Jsou schopny rozkládat organické sloučeniny jako plasty, obtížně odbouratelné chemikálie používané v zemědělství (pesticidy, herbicidy, insekticidy), ropné sloučeniny, mastné kyseliny – mnohé alifatické i aromatické uhlovodíky a jiné odolné látky poškozující životní prostředí. Jejich metabolismus je respirační, tedy nejsou schopny fermentace – anaerobní degradace se prakticky neúčastní – nemohou zpracovat jednoduhlíkaté sloučeniny (methanol, formaldehyd, methan), teflon, biopolymery (celulosa, lignin). (17)

Mohou růst na různých organických substrátech, nutričně i kultivačně jsou velice nenáročné, pseudomonády dobře rostou v neutrálním pH, tolerují vyšší koncentrace solí, barviv a teploty mezi 4 – 42 °C, optimální teplota pro růst je však 30 – 37 °C. V přírodě se snadno množí zejména v odpadních či stojatých vodách a v půdě a ve střevním traktu zvířat i člověka. Problematický je jejich výskyt v nemocničním prostředí, zejména v nesterilních infuzních roztocích, zředěných roztocích dezinficiencí a na povrchu lékařských pomůcek. Zvláště nebezpečné z hlediska potenciálního vzniku infekce jsou inhalační pomůcky pro pacienty s respiračním onemocněním.

Některé druhy pseudomonád jsou výhradně fytopatogenní a parazitují na úzkém okruhu hostitelů, jiné, parazitující na zvířatech, naopak nebývají druhově specifické. Výjimkou je *Pseudomonas mallei*, napadající výhradně lichokopytníky. Řada pseudomád pak patří mezi oportunní lidské patogeny. (18)

2.3.1 Druh *Pseudomonas aeruginosa*

Z pohledu lékařské mikrobiologie je *Pseudomonas aeruginosa* nejdůležitějším a díky tomu i nejlépe prozkoumaným druhem pseudomonád. Spolu s dalšími patogenními druhy (např. *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mallei*, *Stenotropomonas maltophilia*) patří mezi původce nosokomiálních infekcí. (18) *Pseudomonas aeruginosa* dokáže infikovat jakýkoli lidský orgán, či místo na povrchu těla. Nebezpečný je zejména její výskyt na resuscitačních a novorozeneckých odděleních a jednotkách intenzivní péče, kde může kontaminovat dýchací přístroje, nebulizátory či katetry. (19) Je nejčastější příčinou nákaz pacientů při použití nesterilních terapeutických či diagnostických lékařských pomůcek. (20) Rychlý rozvoj infekce byl zjištěn zejména u pacientů po imunosupresi, podávání kortikoidů či širokospektrých antibiotik a u diabetiků. Nejvíce ohrožení jsou však osoby s těžkými popáleninami a pacienti s cystickou fibrosou. Těžké infekce mohou vést až k nekrotizující pneumonii či smrtelné sepsi.

Nejčastější infekce a způsobené zdravotní komplikace:

- respirační systém - po chemoterapii; při chronických plicních onemocněních
- močové cesty - infekce následkem nesterilní katetrizace
- trávicí trakt - rozvoj gastroenteritidy až nekrotizující enterokolitidy
- kůže - infekce zejména popálených či poraněných tkání
- oční infekce - poškození očního epitelu proteasami
- ušní infekce - po koupání ve stojatých vodách
- CNS - z ušní infekce či po invazivní operaci
- kosti - rozšíření z jiného místa infekce – vznik osteomyelitidy

Morfologie

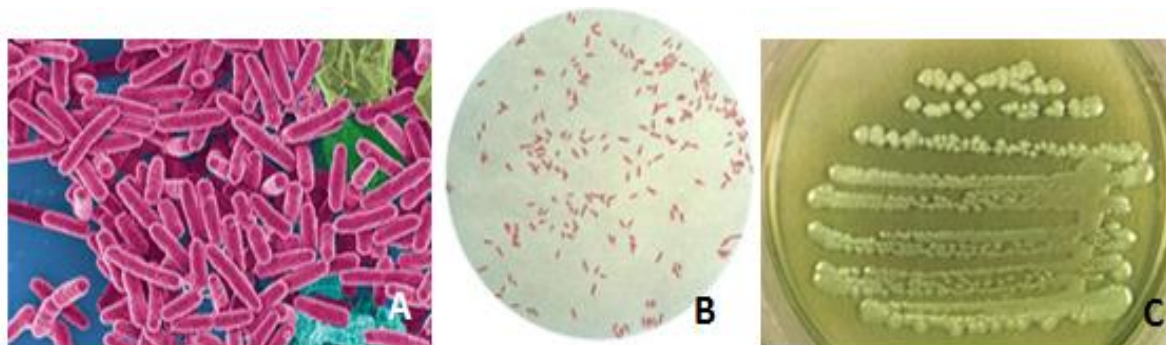
PA je nesporulující tyčinka o velikosti přibližně 0,5 – 0,8 x 1,5 – 3,0 μm. V Gramově barvení vypadá stejně jako ostatní gramnegativní tyčinky, nemá bakteriální pouzdro, ale často je obalena slizovou vrstvou (obr. 3, str. 20).

Podle schopnosti tvořit kolonie lze rozlišit tři růstové formy:

S – „smooth,“ rozsáhlé hladké kolonie s ohraničením – pozorované u bakterií izolovaných od pacientů s akutní infekcí

R – „rough,“ malé, nepravidelné kolonie ze vzorků odebraných z přírodních zdrojů (stojaté vody, půda)

M – mukoidní forma (spojená s tvorbou alginátu) typická např. pro pacienty s cystickou fibrosou. (18)



Obrázek 3: Bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. A – snímek z elektronového mikroskopu; B – Gramovo barvení; C – kolonie PA na agaru. (Převzato, upraveno) (21) (22)

Pseudomonas aeruginosa se vyznačuje velkým množstvím virulencních faktorů (např. bičíky, fimbrie) a svojí invazivitou a multifaktoriální patogenitou. Při infekcích se uplatňují jednak faktory vázané na bakteriální buňku (extracelulární polysacharid, slizová vrstva, stěnový lipopolysacharid) a vnitrobuněčné produkty (pigmenty, enzymy, toxiny). (23)

Adheze na buněčný povrch

Bakterie PA produkuje extracelulární proteasy – elastasu a alkalickou proteasu, usnadňující vazbu bakterie na buňky epitelu narušením jeho povrchu. Na porušenou tkáň se pak váže s vysokou selektivitou například pomocí lektinu PAII a PAIIL, které specificky rozpoznávají sacharidové struktury.

Lektin PAIIL, často označovaný také jako LecB, je tetramer specificky rozpoznávající L-fukosu. Bylo prokázáno, že s vyšší produkcí tohoto lektinu stoupá i schopnost bakterií tvořit při kolonizaci tkání biofilm. (24)

Bakteriální infekce pacientů s cystickou fibrosou

Jak již bylo napsáno výše, pacienti s CF mají v plicích vysoce zahuštěný hlen, v němž se PA lehce zachytí a začne produkovat alginátový biofilm, kterým se brání vůči antibiotické léčbě – znemožňuje opsonizaci a následnou fagocytosu. (25) *Pseudomonas aeruginosa* byla podle studie mapující období 1984 – 2005 zjištěna v plicích u 11 % šestiměsíčních, 48 % sedmiletých a 85 % osmnáctiletých pacientů s cystickou fibrosou. (26) Buňky epitelu fibrotické plicní tkáně CF pacientů obsahují vyšší množství asialylovaných glykolipidů, tzn. receptorů pro vazbu lektinů bakterií (tedy i výše zmíněného PAIIIL). (27) Většinou dochází nejprve ke kolonizaci nemukoidní formou PA, která později začne produkovat alginát a enzymy, které štěpí protilátky a proteiny komplementu. Vzniklý biofilm odolává podaným preparátům, jelikož přes něj nemohou difundovat k buňce. Bakterie se tak stává rezistentní vůči antibiotikům i fagocytose. (28) Akutní fázi infekce provází tvorba C-reaktivního proteinu v játrech, dochází k aktivaci komplementu, nárůstu počtu leukocytů a zvýšení tělesné teploty. V případě, že je organismus dlouhodobě a opakovaně vystavován infekčním činitelům, imunitní systém je již nedokáže identifikovat, zánět pak přechází v chronický a neléčitelný. V místě zánětu vzniká fibrosa – nenávratně poškozená (jizvená) tkáň. (10) Pacienti s rezistentní formou bakterie pak bez transplantace umírají na rozsáhlé poškození plic v důsledku chronické infekce. (29)

2.4 Pasivní imunizace protilátkami IgY

Oproti aktivní imunizaci, kdy jsou při očkování k získání protilátek použity vakcíny (ať už s oslabenými živými, či inaktivovanými mikroorganismy či jejich částmi), pasivní imunizace spočívá v přímém podání již vytvořených protilátek. Přirozeně dochází k pasivní imunizaci při těhotenství, kdy mateřské protilátky přecházejí do krve plodu, či při kojení z mateřského mléka do oběhu novorozenců. (30) Lidské imunoglobuliny od imunizovaných jedinců lze využít k profylaxi jedinců ohrožených např. vzteklinou či tetanickým toxinem. Zvířecí imunoglobuliny byly použity k sérové terapii již před objevem antibiotik. V České republice jsou používána např. koňská séra proti vzteklině, či botulotoxinu, nebo ovčí protilátkový fragment Fab proti působení hadího jedu. (31)

Vzhledem k výše popsané dostupnosti slepičích protilátek IgY, by tyto mohly být velmi výhodnou alternativou k savčím IgG pro použití při pasivních imunizacích.

Prokázány byly jejich neutralizační účinky na některé mikroorganismy a toxiny. (32) Pro použití při pasivní imunizaci jsou vhodné zejména proto, že nezpůsobují aktivaci komplementu. Díky této vlastnosti mohou být využívány např. při xenotransplantacích prasečích orgánů, kde mohou vytvořit bariéru mezi lidskými imunoglobuliny a prasečími antigeny a bránit tak imunitní reakci a přispět k přijetí orgánu. (33) IgY byly použity také pro prevenci zánětů v dutině ústní, gastritidy, ulcerosní kolitidy a rotavirových průjmů u novorozenců. (34)

V souvislosti s cystickou fibrosou byl již prokázán pozitivní vliv podaných IgY získaných z vajec slepic imunizovaných bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. (35) Po dlouhodobém používání roztoku slepičích protilátek formou kloktadla byl potvrzen protiadhezivní vliv na PA. (36) Schopnost protilátek IgY bránit adhezi PA byla studována *in vitro* na modelovém systému plicních buněk. Specifické protilátky proti bakteriálnímu lektinu PA-IIL snížily adhezi *Pseudomonas aeruginosa* na plicní buňky až o 50 %. (37)

Protože by samotná protilátka IgY jako cizorodý protein mohla být potenciálně problematická, byl testován vliv celé protilátky a jejích fragmentů *in vitro* na buňky plicního epitelu a *in vivo* na skupině experimentálních zvířat. V obou případech výsledky dokazují, že celá protilátka včetně sacharidového Fc fragmentu nevyvolává zánětlivé reakce. (38) (39)

Experimentální modely

Pro výzkum zabývající se cystickou fibrosou byly vyvinuty myší experimentální modely s geneticky modifikovanou funkcí CFTR. Chov takových myší je vzhledem k jejich snížené životaschopnosti velmi náročný. Například při vyřazení funkce genu pro CFTR se dospělosti dožívalo pouze 5 % jedinců. Takové modely jsou použitelné zejména pro experimenty týkající se funkce gastrointestinálního traktu. Stav plicního epitelu ovšem neodpovídá situaci u pacientů s cystickou fibrosou, proto takto upravené myši nelze použít jako model pro testování bakteriální adheze v plicích pacientů s CF. (40) Proto tento model nebyl v předkládané práci použit.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použitý materiál, pomůcky

3.1.1 Použité chemikálie

BioRad (USA)

- TGX™ Fast Cast™ Acrylamide Kit 12 %
- Trans-Blot® Turbo™ RTA Transfer kit, PVDF
- 4 x Laemmli Sample Buffer
- vyvolávací roztok pro AP – BCIP/NBT Color Development Substrate (5-bromo-4-chloro-3'-indolyl fosfát; nitro-blue tetrazolium)

Fluka (Německo)

- Coomassie Brilliant Blue R250 (barvicí lázeň); 2-merkaptoethanol; Tween® 20

Lachema (Česká republika)

- ethanol; glycerol; hydrogenuhličitan sodný; chlorid sodný; kyselina chlorovodíková; kyselina octová; methanol

Nutricia Mléčná výživa a.s. (Česká republika)

- sušené mléko – odtučněné

Penta (Česká republika)

- azid sodný; hydrogenfosforečnan sodný; hydroxid sodný

Serva (Německo)

- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin), Triton X-100

Sigma (USA)

- protilátka Rabbit-Anti-chicken IgY – Alkaline Phosphatase, antibody produced in rabbit

ostatní:

- zvlhčující oční kapky Visine (McNeil)
- Mesocain gel 200 mg/ml (Zentiva)
- destilovaná voda
- Formol - neutrální formalín (pH 7,2)

3.1.2 Použité přístroje

analytické váhy	PESA
aparatura pro elektroforesu	BioRad (USA)
aparatura pro Western blot	BioRad (USA)
aparatura pro inhalaci – Pari Boy 037G 6000	Pari (Německo)
centrifuga Eppendorf 5430	Eppendorf (USA)
centrifuga K23	Janetzky (Německo)
centrifuga K70-D	Janetzky (Německo)
centrifuga Micro Centaur	Sanyo (UK)
centrifuga T30B	Janetzky (Německo)
centrifuga 5415R	Eppendorf (USA)
ELISA Sunrise Reader	Tecan (Švýcarsko)
fotometr Spekol 11	Carl-Zeis (Německo)
inkubátor s funkcí třepání	New Brunswick Scientific (USA)
laminární box Bio 126	Labox
magnetická míchačka KMO2 Basic	IKA (USA)
mikroskop Eclipse E400	Nikon (Japonsko)
optický tomograf IVIS [®] Lumina XR	Caliper Life Sciences (USA)
pH metr HI 2211	HANNA instruments (USA)
promývací aparatura Hydro FLEX (ELISA)	Tecan (Rakousko)
předvážky EW 600	Kern (Německo)
spektrofluorimetr Infinite [®] M200 PRO	Tecan (Švýcarsko)
spektrofotometr Spektromom 195D	Mom Budapest
třepačka	ČSAV Vývojové dílny (ČR)

3.1.3 Použitý software

- XRead Plus (spektrofotometr ELISA Sunrise Remote)
- Living Image[®] (verze 4.2.0; PerkinElmer – pro optický tomograf Caliper IVIS[®] Lumina)

3.1.4 Pokusná zvířata

Velaz (ČR)

- potkani – kmen Wistar, samci

Anlab (ČR)

- myši – kmen ICR, samci

3.1.5 Ostatní pomůcky

destičky CellBind[®]

Corning (USA)

dialyzační trubice, svorky

Novagen (USA)

injekční stříkačky

Chirana, B. Braun, Omnican

intravenosní kanyly Surflo[®]

Terumo (Japonsko)

sterilní mikrofiltry 0,22 µl

Corning (USA)

3.2 Použité metody

3.2.1 Práce s protilátkami

V práci byly použity vaječné protilátky IgY připravené v laboratoři prof. Hodka. (41) Protože bylo k dispozici více frakcí o různých koncentracích, bylo na základě spektrofotometricky změřené koncentrace provedeno porovnání jejich reaktivity pomocí imunochemické analýzy ELISA a vybrána pro další použití frakce s nejlepší reaktivitou.

3.2.1.1 Dialýza

Protože byly protilátky uchovány v roztoku PBS, který obsahoval azid sodný jako ochranu před jejich mikrobiální degradací při dlouhodobém uchování, bylo nutné roztok dialyzovat, aby protilátka mohla být použita při *in vivo* experimentech.

Použité roztoky:

- pufr PBS (134 mM NaCl; 2,8 mM Na₂HPO₄; 2,8 mM NaH₂PO₄; pH 7,2)

Postup:

Nejprve byla dialyzační trubice o vhodných rozměrech (pro objem cca 25 ml) namočena několik minut v destilované vodě, aby bylo možné lehce oddělit stěny a po přidání svorky ji naplnit. Roztok protilátky byl do trubice opatrně pipetován a poté byla uzavřena druhou svorkou. Po kontrole těsnosti byla takto připravená trubice vložena do nádoby naplněné dialyzačním pufrem PBS (10 litrů). Dialýza probíhala v chladu (5 °C) za stálého mírného míchání přibližně 40 hodin. Během této doby byly provedeny celkem tři výměny dialyzačního pufru. Po třetí výměně bylo možné považovat koncentraci azidu za dostatečně sníženou, aby nedošlo k ovlivnění růstu bakterií.

3.2.1.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace

Pro měření koncentrace protilátek IgY byla použita spektrofotometrie.

Použité roztoky:

- pufr PBS (4 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaCl; pH 7,2)

Postup:

Vzorek IgY po naředění (50 x) byl pipetován do křemenné kyvety a vložen do spektrofotometru (Spektromom), vlnová délka byla pro toto měření nastavena na 280 nm.

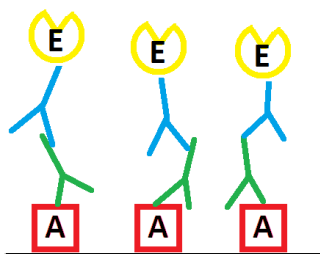
Jako slepý vzorek byl použit pufr PBS. Naměřená hodnota byla pro výpočet koncentrace dosazena do vzorce:

$$c = A_{280} \cdot n \cdot f \cdot k \text{ [mg/ml]}$$

- c koncentrace proteinu (mg/ml)
A₂₈₀ naměřená absorbance při 280 nm
n násobek ředění
f faktor pro přepočítání koncentrace protilátky; pro IgY: $f = 1,094$
k faktor pro přepočítání optické dráhy (závislý na použité kyvetě);
pro optickou dráhu 2 mm $k = 5$, pro 10 mm $k = 1$

3.2.1.3 Imunochemická analýza protilátek IgY

ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) je imunochemická metoda pomocí které bylo ověřováno, zda jsou frakce protilátek IgY schopny rozpoznávat bakteriální lektin PAIIL. Bylo použito uspořádání (obr. 4) se sekundární protilátkou značenou alkalickou fosfatase (AP). Vyvolání bylo provedeno pomocí chromogenního substrátu paranitrofenyl fosfátu (pNPP). Absorbance pak byla měřena spektrofotometricky při 405 nm.



Obrázek 4: Uspořádání stanovení ELISA. A – antigen (PAIIL); Y – primární protilátka (IgY); Y – sekundární protilátka (Rabbit-Anti-Chicken IgY – AP) s kovalentně vázanou alkalickou fosfatase (E).

Použité chemikálie:

- PBS-ELISA (0,134 M NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH 7,2)
- PBS-ELISA + Tween (PBS-ELISA; 0,1 % (v/v) Tween[®] 20)
- imobilizační pufr (25 mM NaHCO₃; 13 mM Na₂CO₃; pH 9,6)
- blokovací roztok (PBS-ELISA + Tween; 2 % (w/v) řídký bílek)
- roztok bakteriálního lektinu PAIIL (4 µg/ml v imobilizačním pufru)

- roztoky protilátek IgY (41)
- roztok sekundární králičí protilátky proti slepičí protilátce IgY s konjugovanou alkalickou fosfatasou (Rabbit-Anti-chicken IgY-AP – ředěno 1:2000 pufrem PBS-ELISA)
- vyvolávací roztok pro alkalickou fosfatasu (0,1 % pNPP; 30 mM NaHCO₃; 20 mM Na₂CO₃; 1 mM MgCl₂)
- zastavovací roztok pro alkalickou fosfatasu (3 M NaOH)

Postup:

Do jamek v modulárních destičkách Polysorb byl pipetován roztok lektinu PAIIL po 100 µl. Směs lektinu s imobilizačním pufrem byla připravena těsně před aplikací, aby nedošlo k nespecifickému navázání antigenu na skleněný povrch nádoby. Imobilizace probíhala přibližně 18 hodin při 4 °C. Po imobilizaci antigenů byly jamky promyty třikrát po 200 µl pufru PBS + Tween (Hydro Flex, Tecan). Poté byl nanesen blokovací roztok (po 150 µl). Blokování jamek probíhalo jednu hodinu při 37 °C.

Po dalším promývání byly pipetovány roztoky protilátek IgY o koncentracích 90 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml a 3 µg/ml v PBS-ELISA (po 100 µl) a destička byla inkubována dvě hodiny při 37 °C.

Následoval další promývací krok a poté byl aplikován roztok sekundární protilátky s alkalickou fosfatasou v PBS-ELISA (po 100 µl). Po hodinové inkubaci při 37 °C a dalším promytí bylo provedeno vyvolání pomocí substrátu pro alkalickou fosfatasu – paranitrofenyl fosfátu. Vyvolání probíhalo přibližně 10 – 15 minut a bylo ukončeno přidáním 100 µl roztoku hydroxidu sodného. Intenzita vzniklého zbarvení byla měřena jako absorbance při 405 nm (ELISA Sunrise Reader, Tecan).

3.2.2 Práce s bakteriemi

3.2.2.1 Kultivace bakterií *Pseudomonas aeruginosa*

V práci byly použity dva kmeny pseudomonád s vnesenou luminiscencí *Pseudomonas aeruginosa* PA-lux (získány jako dar – prof. B. Hancock, University of British Columbia, Canada) a PA-Xen41 (Caliper Sciences). Pro přípravu bakteriálních suspenzí pro aplikace laboratorním zvířatům byly bakterie kultivovány v kapalném médiu s optimálním složením pro pseudomonády (PS médium).

Použitá kultivační média a roztoky:

- médium PS (1,6 % (w/v) pepton; 1 % (w/v) enzymatický kaseinový hydrolyzát; 0,5 % (v/v) glycerol; 57 mM K₂SO₄; 15 mM MgCl₂)
- kryoprezervační médium (40 % (w/v) glycerol v pufru PBS-ELISA)

Postup:

Pro inokulaci média byly použity připravené kryokonzervy s bakteriální suspenzí. V laminárním boxu byly bakterie přeneseny očkovací kličkou z „konzervy“ do čerstvého média (cca 4 ml) a suspenze byla inkubována přes noc při 37°C za stálého mírného třepání (New Brunswick Scientific, stupeň „2“).

Z části získané bakteriální suspenze narostlé v PS médiu pak byly připraveny nové „konzervy“ ze 100 µl suspenze a 100 µl kryoprezervačního média a uchovávány při - 80 °C. (37)

3.2.2.2 Fotometrické měření optické denzity

K určování optické denzity bakteriální suspenze po kultivaci byl použit fotometr (Spekol 11) a byla měřena absorbance při 600 nm.

Použité roztoky:

- pufr PBS (viz. 3.2.1.2)

Postup:

Bakteriální suspenze získaná po kultivaci byla centrifugována 10 minut při 13000 RPM (Micro Centaur). Po odlití supernatantu byla vzniklá peleta resuspendována v malém objemu PBS. Centrifugace a resuspendace byla provedena dvakrát. Z takto „přečištěné“ bakteriální kultury byla připravena v PBS suspenze (výsledný objem cca 2 ml), 50 µl naředěno do 2,5 ml PBS a měřeno proti slepému vzorku (PBS) v kyvetě s optickou dráhou 10 mm při vlnové délce 600 nm (A_{600}).

Koncentrace buněk (CFU – „Colony forming units“) pak byla vypočtena ze vztahu (42):

$$CFU = A_{600} \cdot 6 \cdot 10^8 \cdot n \cdot k \text{ [buněk/ml]}$$

n násobek ředění

k faktor pro přepočet optické dráhy (závislý na použité kyvetě);
pro optickou dráhu 10 mm $k = 1$

3.2.2.3 Ověření luminiscence bakterií a výběr vhodného kmene

K použitému optickému tomografu (IVIS[®] Lumina XR) byl výrobcem doporučen bakteriální kmen *Pseudomonas aeruginosa* označený PA-Xen41. Pro porovnání luminiscence byl použit kmen PA-lux. Luminiscence byla měřena CCD snímačem a následně vyhodnocena pomocí software Living Image[®] (verze 4.2.0; PerkinElmer).

Postup:

Bakteriální suspenze kultivované popsanou metodou (3.2.2.1) byly nanесeny do jamek destičky (PS Black 96, Corning) v tetraplikátech po 200 μ l v řadě desítkovou řadou z původní suspenze, která obsahovala $6 \cdot 10^8$ buněk/ml.

Zároveň byla testována citlivost PA na isofluran (inhalační anestetikum), podávaný pro navození krátkodobé anestezie. Destička byla vložena do polyethylenového sáčku, do něhož byl napuštěn isofluran a byla sledována luminiscence PA v čase.

3.2.3 Experimenty provedené na potkanech

3.2.3.1 Měření závislosti optického signálu na dávce bakterií

Protože byl použitý přístroj konstruován zejména pro experimenty na myších, bylo potřeba zjistit, zda je měřitelná luminiscence při použití potkana a zda síla signálu odpovídá aplikovanému množství bakterií.

Postup:

Pod kůži potkana byla injekční stříkačkou aplikována bakteriální suspenze (200 μ l) v dávkách přibližně: $6 \cdot 10^6$, $6 \cdot 10^5$, $6 \cdot 10^4$ CFU. Byla měřena síla signálu při expozici 1 minutu, 3 minuty a 5 minut.

3.2.3.2 Aplikace protilátek IgY a bakterií PA-lux

Použitá experimentální zvířata:

- potkani – kmen Wistar; samci; SPF („Specific Patogen Free“); dieta nesterilizovaná; hmotnost 300 - 340 g (Velaz, ČR)

Roztoky použité k aplikacím:

- protilátky IgY v PBS – 5 mg/ml (3.2.1)
- bakteriální suspenze (3.2.2.1)

Použitá anestezie:

- ketamin 50 mg/ml
- xylazin 23,3 mg/ml
- isofluran 1 % a 2% - pro inhalační podání

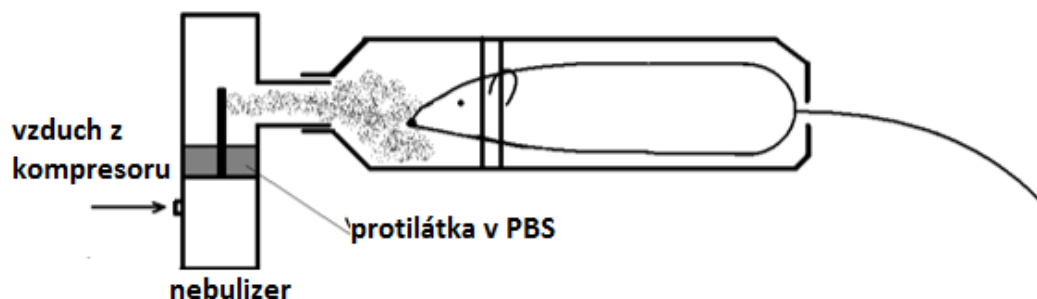
Postup:

Dvanáct potkanů bylo rozděleno po 4 jedincích do skupin a provedena aplikace protilátek IgY a bakterií PA dle schématu pokusu (tab. 1).

Tabulka 1: Rozdělení potkanů pro experiment

Číslo skupiny	1. - 4. den	5. den	6. – 9. den
1	inhalace IgY	aplikace PA	-
2	-	aplikace PA	-
3	-	aplikace PA	inhalace IgY

Dialyzované roztoky protilátek v pufru PBS byly před použitím sterilizovány přes mikrobiální filtr porozity 0,22 μm a následně změřena jejich koncentrace (spektrofotometricky). Pro inhalační podání byly připraveny jednotlivé dávky (2 ml/potkan/den; koncentrace 5 mg/ml). Byla sestavena aparatura (obr. 5), do které byly potkani umístěni tak, aby do prostoru s nebulizovaným roztokem vyčnívala pouze hlava. (44) Připravené dávky byly pomocí kompresoru a nebulizeru (PARIBOY) převedeny na jemnou mlhu, která byla experimentálními zvířaty inhalována. Každé zvíře ze skupiny 1 nebo 3 čtyři dny inhalovalo (vždy ve stejnou dobu) po dobu 10 minut při průtoku 0,2 ml nebulizovaného roztoku za minutu.



Obrázek 5: Inhalační aparatura pro podání protilátek potkanům (44).

Invazivní intratracheální aplikace bakterií

Bakteriální suspenzi bylo potřeba aplikovat co nejbližší plicím, aby k případnému rozvoji infekce docházelo právě tam. Proto byla zvolena metoda intratracheální aplikace. Experimenty byly provedeny ve Státním zdravotním ústavu v Praze (Centrum toxikologie a zdravotní bezpečnosti). Provedené pokusy (projekt pokusu č. 29/2015) byly schváleny na základě podané žádosti Ministerstvem zdravotnictví podle §16a zákona č. 246/1992 na ochranu zvířat a podle § 5 vyhlášky č. 419/2012 Sb., o ochraně pokusných zvířat.

Zvířata byla uspávána subkutánním vpichem 120 - 180 μ l připravené směsi narkotik (ketamin, xylazin a voda v poměru 4:2:2) dle rozsahu hmotnosti. Zvíře bylo zajištěno proti případnému pohybu a v oblasti trachey bylo vyholeno břitvou pro snadnější manipulaci. Na kůži krku byl skalpelem proveden vodorovný řez dlouhý cca 1,5 cm a byla odhalena trachea. Injekční stříkačkou bylo mezi prstence trachey aplikováno 200 μ l (45) bakteriální suspenze s obsahem 10^6 buněk v pufru PBS.

Rána byla zašita a potkan byl umístěn na vyhřívanou desku s termostatem (Alpine Dual Thermo, stupeň „4“) až do probuzení.

3.2.3.3 Měření bioluminiscence bakterií *in vivo*

K *in vivo* pozorování bakteriální infekce experimentálních zvířat byl použit optický tomograf (IVIS[®] Lumina XR, Caliper). Do tohoto přístroje byla vkládána zvířata v anestezii a byla měřena luminiscence bakterií. Po celou dobu měření byl zajištěn přívod inhalačního anestetika (1% isofluran).

3.2.3.4 Odběr a zpracování experimentálního materiálu

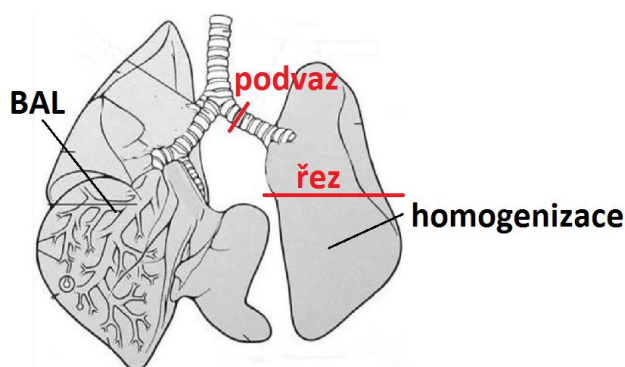
Pro biochemické rozborů po provedení experimentu byly zvířatům odebrány plíce a byla provedena bronchoalveolární laváž (BAL).

Použité chemikálie:

- směs anestetik (ketamin a xylazin, (3.2.3.2))
- pufr PBS (3.2.1.2)
- formol (neutrální formaldehyd 10 %; pH 7,2)
- PS médium (3.2.2.1)

Postup:

Experimentálním zvířatům byla podána přibližně dvojnásobná dávka anestetik, než při aplikaci bakterií (3.2.3.2). Po připevnění na operační desku byl pomocí nůžek otevřen hrudník a odhalena trachea a plíce. Trachea byla (u potkana ve výšce cca 1,5 cm nad plícemi) nastřížena a byla do ní vložena gavážní jehla. Provázkem byla trachea podvázána tak, aby nemohla sklouznout přes olivku. Pak byla trachea úplně odstřižnuta a vyjmuta i s plícemi. Jehla byla nasazena na skleněnou stříkačku se zábrusovým pístem upevněnou ve stojanu. Stříkačka byla naplněna pufrem PBS a byla provedena bronchoalveolární laváž (BAL). Výplach plic byl proveden dvakrát objemem 2,5 ml pufru. Laváž byla u potkana provedena jen z pravého plicního laloku, levý byl podvázáán (obr. 6) a použit pro další analýzy. Nakonec byly plíce napuštěny formolem a v nádobce s formolem uchovány pro možnost histologického vyšetření.



Obrázek 6: Rozdělení potkaních plic pro více analýz.

Odebrané vzorky BAL z potkaních plic (50 μ l) byly smíchány s 200 μ l PS média pro kultivaci PA. Oddělená část levého plicního laloku byla homogenizována ve zkumavce ponorným mixérem. Ten musel být po každém vzorku kvůli případné kontaminaci pečlivě omyt a desinfikován. Z každého vzorku pak bylo odebráno 10 μ l homogenátu a smícháno s 200 μ l PS média.

Takto připravené vzorky byly aplikovány na destičku (Corning Assay plate CellBind Black with Clear bottom) a kultivovány 18 hodin při 37 °C (Spektrofluorimetr, Tecan). Po dobu inkubace byla každou hodinu zaznamenána hodnota relativní absorbance.

3.2.4 Experimenty provedené na myších

3.2.4.1 Neinvazivní intratracheální aplikace bakterií

Použitá experimentální zvířata:

- myši – kmen ICR; samci; SPF („Specific Patogen Free“); dieta nesterilizovaná; hmotnost 30 - 40 g (Anlab, ČR)

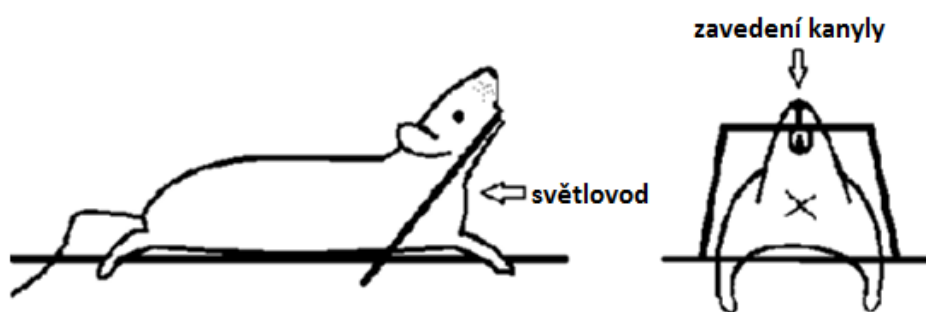
Roztoky použité k aplikacím:

- bakteriální suspenze (3.2.2.1)

Použitá anestezie:

- směs anestetik
 - ketamin 1 mg/10 g váhy myši
 - xylazin 0,1 mg/10 g váhy myši
- trimecain – gel (200 mg/ml, Mesocain - Zentiva)
- isofluran 1 % a 2% - pro inhalační podání

Myš byla zvážena a byla jí subkutánně aplikována směs anestetik (50 μ l). Použitá dávka byla zvolena pro navození dostatečně rychlé anestezie (do dvou až tří minut) a dostatečně dlouhé pro manipulaci a aplikaci (třicet minut). Pro neinvazivní intratracheální aplikaci byl použit aplikační rám, na který bylo možné uspanou myš „zachytit“ za horní zuby (obr. 7). Přední končetiny byly vytaženy vpřed tak, aby poloha trachey byla přibližně kolmá k podložce.



Obrázek 7: Neinvazivní intratracheální aplikace. X – označení hloubky zavedení kanyly a umístění světlovodu.

Protože myš během anestezie nedokáže sama zvlhčovat oční sliznici, byly jí naneseny oční kapky (Visine). Pomocí jedné pinzety s připravenou smyčkou z tenkého lněného provázku a druhé špičaté pinzety byl vytažen jazyk a uchycen do smyčky. Levou rukou byl takto držen po celou dobu aplikace, aby byly zpřístupněny hlasivky. Před myš

byl instalován světlovod tak, aby osvětloval místo vyznačené na obrázku č. 7 (str. 34) a bylo možné sledovat pohyb hlasivek.

Plastová kanyla s teflonovým povrchem (Surflo) o průměru 1,1 mm a délce 32 mm byla smočena v gelovém lokálním anestetiku (trimecain), zasunuta do prostoru mezi hlasivkami do hloubky cca 1 cm (obr. 7, str. 34). Do ústí kanyly byla nanesena bakteriální suspenze (30 μ l), k jejíž aplikaci do trachey a plic následně došlo samovolně – nádechem myši. Plastovou stříkačkou (1 ml) pak bylo vpraveno 200 μ l vzduchu pro efektivní distribuci suspenze. Výše popsané kroky je nutné provést velmi opatrně a rychle (5 - 10 vteřin), aby nedošlo k pohmoždění a následnému otoku hlasivek či jazyka, což by znemožnilo opětovné aplikace. Po odstranění kanyly byl pinzetou stažen z jazyka provázek a jazyk byl navlhčen vodou pomocí vatové tyčinky. Myš pak byla umístěna na vyhřívanou desku s termostatem (Alpine Dual Thermo, stupeň „4“) až do probuzení.

Optimalizace dávky bakterií pro aplikaci

Na myším modelu bylo nutné optimalizovat dávku bakterií ze dvou hledisek. Počet bakterií musí být dostatečný pro monitorování průběhu infekce a zároveň tak nízký, aby neohrozil přežití v průběhu experimentu, ale vyvolal přetrvávající kolonizaci plic.

Postup:

Patnáct myši ICR bylo rozděleno po 5 jedincích do skupin a byla provedena aplikace PA dle schématu pokusu (tab. 2).

Tabulka 2: Rozdělení myši pro pokus.

Skupina	Dávka PA-lux
1	10^5
2	10^6
3	10^7

3.2.4.2 Měření bioluminiscence *in vivo*

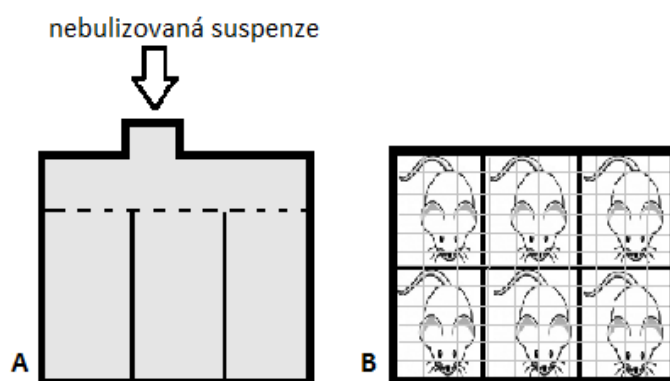
Myši byly před měřením vloženy do uspávací komory (součást přístroje) a přívod isofluranu byl nastaven na 2 %. Přibližně po dvou minutách bylo možné myš přemístit do zobrazovací komory, kde byl opět zajištěn přívod isofluranu (1 %) v průběhu měření.

3.2.4.3 Protilátková profylaxe před aplikací bakterií

Roztoky použité k aplikacím:

- protilátky IgY v PBS – 5 mg/ml (3.2.1)
- pufr PBS (3.2.1.2)

Vzhledem k velikosti jednotlivých myší i k početnosti experimentální skupiny nebylo možné využít výše popsanou aparaturu. Pro tento účel byla tedy vyvinuta aparatura (obr. 8) s inhalační komorou s přihrádkami oddělujícími jednotlivé myši. Při jedné aplikaci tedy mohlo inhalovat až šest myší zároveň. Inhalační komora byla zakryta mřížkou, bránící pohybu myší mezi jednotlivými přihrádkami. Aerosol byl do inhalační komory přiveden hadicí připevněnou na nebulizer.



Obrázek 8: Inhalační aparatura pro myši. A – pohled z boku; B – půdorys, komory pro jednotlivé myši.

Postup:

Dvacet čtyři myši bylo rozděleno po 12 jedincích do dvou skupin a byla provedena aplikace IgY, PBS a PA (v množství $5 \cdot 10^5$) dle schématu pokusu (tab. 3).

Tabulka 3: Rozdělení myší pro pokus

Číslo skupiny	1. - 5. den	5. den
1	inhalace IgY	aplikace PA
2	inhalace PBS	aplikace PA

Inhalace byly prováděny pět dní, vždy ve stejnou dobu po 10 minut. Poslední inhalace proběhly přibližně 3 hodiny před intratracheální aplikací bakterií. Další dva dny pak probíhalo měření bioluminiscence *in vivo*. Po ukončení byly vyjmuty plíce a uchovány ve formolu.

3.2.5 Ověření produkce bakteriálního lektinu PAIIL

V této práci byly použity k pasivní imunizaci zvířat protilátky připravené z vajec od slepic imunizovaných lektinem PAIIL. Bylo potřeba ověřit, zda vybraný bakteriální kmen PA-lux tento lektin produkuje. K rozdělení proteinů byla použita elektromigrační metoda elektroforesa v polyakrylamidovém gelu a k detekci pomocí protilátek pak metoda „Western blot.“

3.2.5.1 Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu

Nabité molekuly jsou schopny se pohybovat v elektrickém poli a rychlost tohoto pohybu závisí na jejich náboji, velikosti a tvaru. Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (dodecylsulfát sodný) je metoda, která umožňuje rozdělit proteiny na základě jejich molekulové hmotnosti. Konkrétní hodnoty molekulové hmotnosti pak lze zjistit srovnáním s proteinovými standardy.

Použité chemikálie:

- roztoky pro SDS elektroforesu - TGX™ Fast Cast™ Acrylamide Kit 12 %
- vzorkový pufr - 4 x Laemmli Sample buffer
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin)
- APS (peroxosíran amonný; 100 mg/ml)
- elektrodový pufr (0,1 % (w/v) SDS; 129 mM glycin; 25 mM TRIS/HCl; pH 8,3)
- barvicí lázeň (0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB); 46 % (v/v) ethanol; 9,2 % (v/v) kyselina octová)
- odbarvovací lázeň (10 % (v/v) ethanol; 10 % (v/v) kyselina octová)
- marker molekulových hmotností – Precision Plus Protein™ Unstained Standards

Postup:

Byla sestavena elektroforetická aparatura (BioRad), skla (pro sílu gelu 0,75 mm) byla pečlivě očištěna a odmaštěna a byla provedena zkouška těsnosti. Byla připravena polymerační směs pro gel s porozitou 12 % s přídavkem iniciátoru polymerace (APS) a katalyzátoru polymerace (TEMED). Směs byla pipetována do prostoru mezi skly. Na separační gel byla nanášena polymerační směs pro zaostřovací gel (4 %) a do ní byl vložen hřeben pro vytvoření 15 jamek.

V době polymerace byly připraveny vzorky bakterií PA – lux po kultivaci ($2 \cdot 10^8$ CFU) a roztoku standardu lektinu PAIII (1 mg/ml). Vzorky byly smíchány v poměru 3:1 se čtyřikrát koncentrovaným vzorkovým pufrem (4 x Laemmli Sample buffer) a 5 minut povařeny ve vodní lázni. Po vychladnutí byly vzorky ve zkumavkách (eppendorf) krátce centrifugovány pro zbavení se bakteriálních zbytků a kvůli případné kondenzaci na stěny zkumavky, jež by mohla mít vliv na koncentraci.

Z hotového gelu byl odstraněn hřeben a aparatura byla vložena do elektroforetické vany. Elektrodový prostor byl naplněn elektrodovým pufrem a do jamek byly aplikovány připravené vzorky (14 μ l) a marker molekulových hmotností (7 μ l). Elektroforetická vana byla doplněna elektrodovým pufrem a kompletní aparatura byla připojena ke zdroji. Elektromigrace probíhala přibližně jednu hodinu při napětí 200 V.

Po odpojení byl gel opatrně oddělen od skel a vložen do barvicí lázně CBB. Přibližně po hodině barvení byl přenesen do odbarvovací lázně. Odbarvení probíhalo asi 12 hodin za stálého míchání (třepačka ČSAV Vývojové dílny, stupeň „2“).

3.2.5.2 Metoda „Western blot“

Termín „Western blot“ označuje metodu, s jejíž pomocí lze proteiny z gelu po elektroforese přenést působením elektrického proudu na membránu s vysokou afinitou k proteinům (PVDF – polyvinylidenfluorid). Aby nedošlo k dalším reakcím na membráně, jsou zbývající vazebná místa blokována balastními proteiny (např. z roztoku sušeného mléka). Detekce proteinů je pak realizována inkubací s primárními a sekundárními protilátkami. Sekundární bývají zpravidla značeny enzymy (alkalická fosfatasa). Přídavkem chromogenního substrátu pro daný enzym lze celý imunokomplex s proteiny na membráně zobrazit.

Použité chemikálie:

- souprava pro metodu Western blot – Trans-Blot[®] Turbo[™] RTA Transfer kit, PVDF (přenosový pufr, membrána, filtrační papír)
- pufr PBS (3.2.1.2)
- pufr PBS-Triton (0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; 0,3% (v/v) Triton X-100; pH 7,2)
- blokovací roztok – 5% (w/v) sušené nízkotučné mléko v PBS-Triton
- methanol

- vyvolávací roztok pro alkalickou fosfatasu (10 ml 100 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; pH 9,0; 33 µl NBTTM; 16,5 µl BCIPTM)

Postup:

Nejprve byla provedena elektroforesa na polyakrylamidovém gelu (3.2.5.1), byl použit však barevný marker molekulových hmotností Precision Plus Protein WesternC Standards. Do aparatury pro přenos proteinů (Trans-Blot® Turbo Transfer systém, BioRad) byl vložen filtrační papír (smočený v přenosovém pufu), na něj byla přiložena PVDF membrána (předtím inkubovaná 30 vteřin v methanolu, 30 vteřin ve vodě a 5 minut v přenosovém pufu), na membránu byl umístěn gel (po dvacetiminutové inkubaci v přenosovém pufu) a další vrstva papíru. Vrstvy byly skládány tak, aby mezi nimi nebyly vzduchové bubliny.

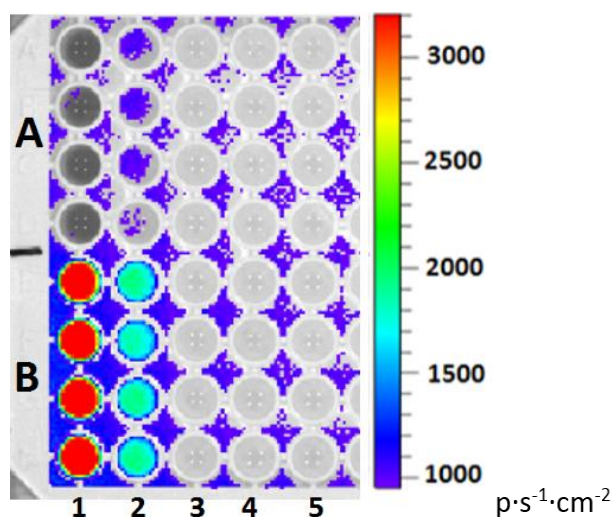
Aparatura byla připojena ke zdroji (2,5 A; maximálně 25 V) a přenos probíhal 5 minut. Membrána byla přes noc blokována v roztoku mléka. Poté proběhla dvouhodinová inkubace s primární protilátkou proti PAIIL (30 µg/ml) a po čtyřnásobném promytí v roztoku mléka (vždy dvě minuty za stálého míchání) následovala hodinová inkubace se sekundární protilátkou (Rabbit-Anti-chicken IgY – Alkaline Phosphatase; ředění 1:2000). Membrána pak byla promyta dvakrát mlékem a dvakrát pufem PBS. Vizualizace byla provedena ve vyvolávacím roztoku pro alkalickou fosfatasu (AP). Membrána poté byla osušena filtračním papírem.

4 VÝSLEDKY

4.1 Porovnání luminiscence bakterií a výběr vhodného kmene

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PA-lux a PA-Xen41 byly kultivovány v kapalném PS médiu za výše popsaných podmínek (3.2.2.1). Získané bakteriální kultury po inkubaci přes noc měly srovnatelnou optickou denzitu, naměřená hodnota A_{600} se pohybovala kolem 1,5, což odpovídá $9 \cdot 10^8$ CFU (3.2.2.2).

Pomocí přístroje IVIS Lumina (měřen počet fotonů $(p) \cdot s^{-1} \cdot cm^{-2}$) byla porovnána intenzita luminiscence kultivovaných kmenů bakterie PA s koncentrací bakterií (CFU). Vizualizace a vyhodnocení proběhlo pomocí software Living Image.



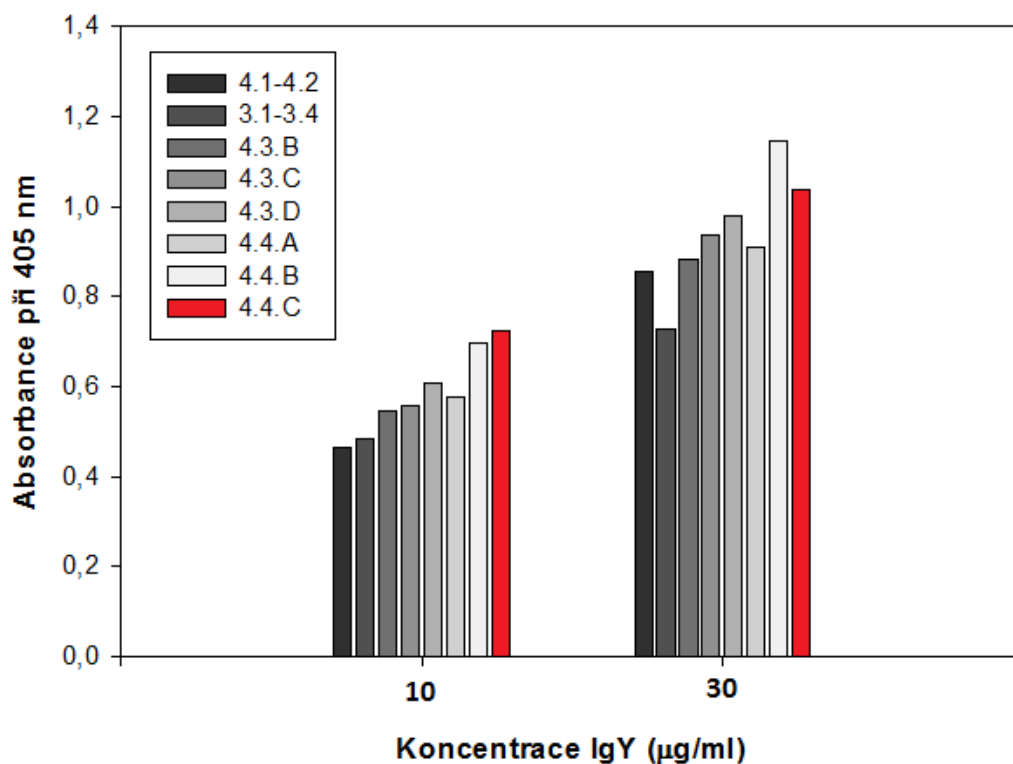
Obrázek 9: Srovnání luminiscence bakteriálních kmenů PA-Xen41 a PA-lux. **A** – PA-Xen41; **B** – PA-lux; 1-5 – ředění desítkovou řadou z původního roztoku ($6 \cdot 10^8$ CFU).

I přesto, že je kmen PA-Xen41 přímo doporučován a dodáván výrobcem použitého přístroje, na základě získaných výsledků byl zvolen jako vhodný kmen PA-lux, který i při desetinásobném zředění vykazoval vyšší signál než PA-Xen41 v původní koncentraci. Luminiscence PA-lux je tedy nejméně desetkrát vyšší (obr. 9).

Po vložení destičky do polyethylenového sáčku a jeho napuštění isofluranem (2 %) bylo ověřeno, že isofluran při použití jako inhalační anestetikum nebude mít vliv na bakterie (resp. jejich luminiscenci) v dýchacích cestách experimentálních zvířat.

4.2 Imunochemická analýza protilátek

Pomocí imunochemické analýzy (ELISA) byly porovnávány jednotlivé frakce protilátek po imunizaci z hlediska jejich reaktivity s použitým antigenem (PAIIL). Frakce byly označeny dle slepic imunizovaných PAIIL (č. 3 a 4). (41)



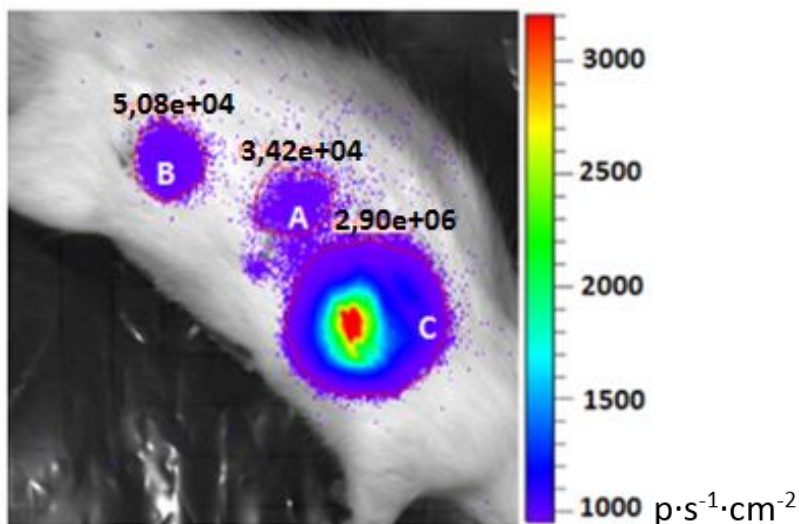
Obrázek 10: ELISA protilátkových frakcí izolovaných ze dvou slepic (č. 3 a 4) imunizovaných PAIIL.

Prezentované výsledky (obr. 10) ukazují nejvyšší reaktivitu frakce 4.4.B a 4.4.C. Zároveň byla vzhledem k plánovaným inhalačním pokusům uvažována poměrně vysoká spotřeba protilátek. Na základě získaných hodnot a dostupnosti potřebného množství dané frakce tedy byla vybrána frakce 4.4.C. Tato byla dále použita v inhalačních experimentech.

4.3 Experimenty provedené na potkanech

4.3.1 Odhad dávky pro měření *in vivo*

Byla ověřena luminiscence bakterií skrz kůži. Injekční stříkačkou bylo do podkoží potkana aplikováno po 200 μl bakteriální suspenze v množství $6 \cdot 10^6$, $6 \cdot 10^5$ a $6 \cdot 10^4$ CFU.



Obrázek 11: Vizualizace bakterií po aplikaci suspenze do podkoží a kvantifikace signálu luminiscence. Dávky: A - $6 \cdot 10^4$ CFU; B - $6 \cdot 10^5$ CFU; C - $6 \cdot 10^6$ CFU. Expozice 3 minuty.

Ze získaných hodnot byla potvrzena korelace mezi aplikovanou dávkou a naměřeným signálem. Kvantifikace signálu na plochu u nejvyšší dávky odpovídá přibližně stonásobku signálu stokrát nižší dávky.

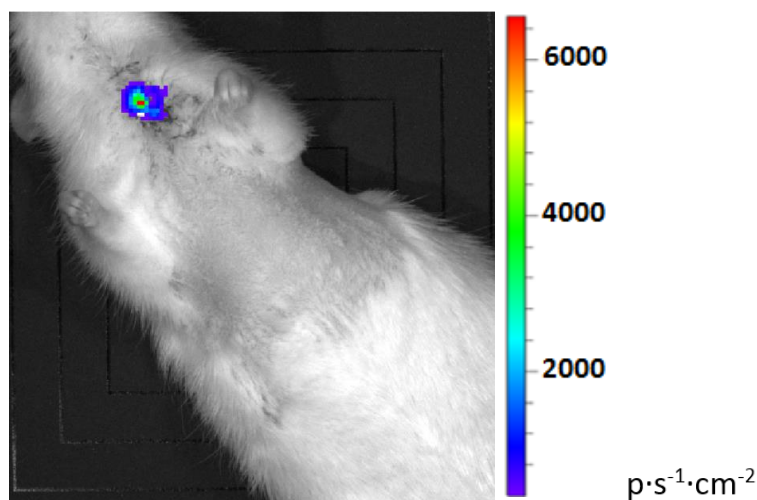
Tabulka 4: Závislost celkového signálu PA na dávce

Dávka	CFU	Celkový signál ($\text{p} \cdot \text{s}^{-1}$)
A	$6 \cdot 10^4$	$3,42 \cdot 10^4$
B	$6 \cdot 10^5$	$5,08 \cdot 10^4$
C	$6 \cdot 10^6$	$2,90 \cdot 10^6$

Z naměřených hodnot (tab. 4) byla určena minimální dávka, která je ještě přístrojem detekovatelná (A). Dále byla na základě tohoto pokusu určena dávka bakterií, která byla v dalším experimentu potkanům aplikována do trachey.

4.3.2 Invazivní intratracheální aplikace bakterií

Dvanácti potkanům, rozdělených do skupin 3 skupin podle toho, zda inhalovali protilátky před či po zavedení bakterií (3.2.3.2), byla intratracheálně aplikována dávka 200 μ l bakteriální suspenze obsahující 10^6 buněk. Protože výsledky při *in vivo* měření jedinců ve všech skupinách byly srovnatelné, na obrázku je pouze jedině reprezentativní zobrazení potkana ze skupiny, která inhalovala protilátky až po aplikaci bakterií.

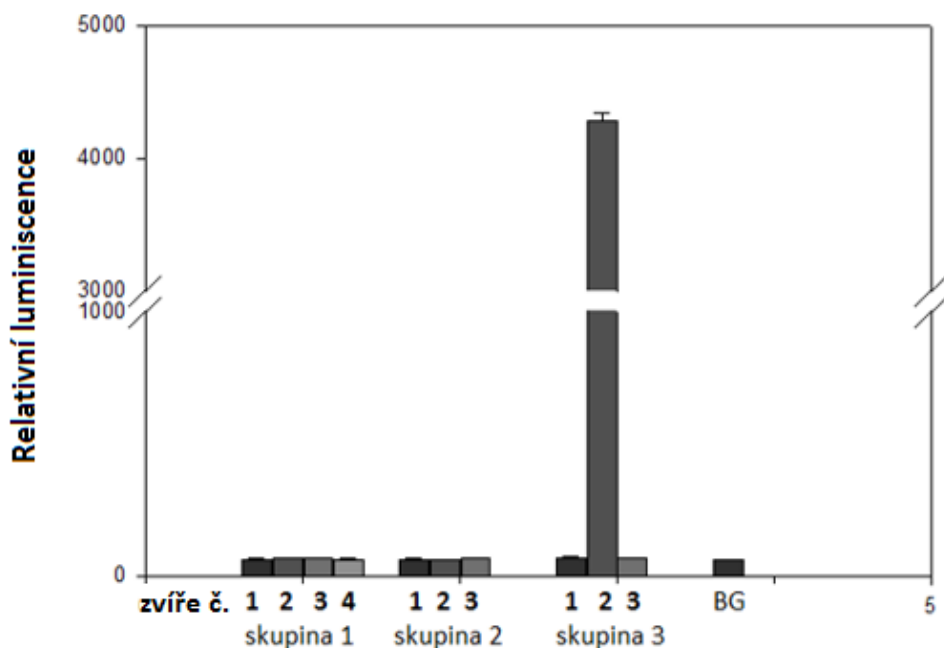


Obrázek 12: Luminiscence místa aplikace bakteriální suspenze. Potkan třetí den po invazivní intratracheální aplikaci bakterií a následných inhalacích protilátek. Expozice 5 minut.

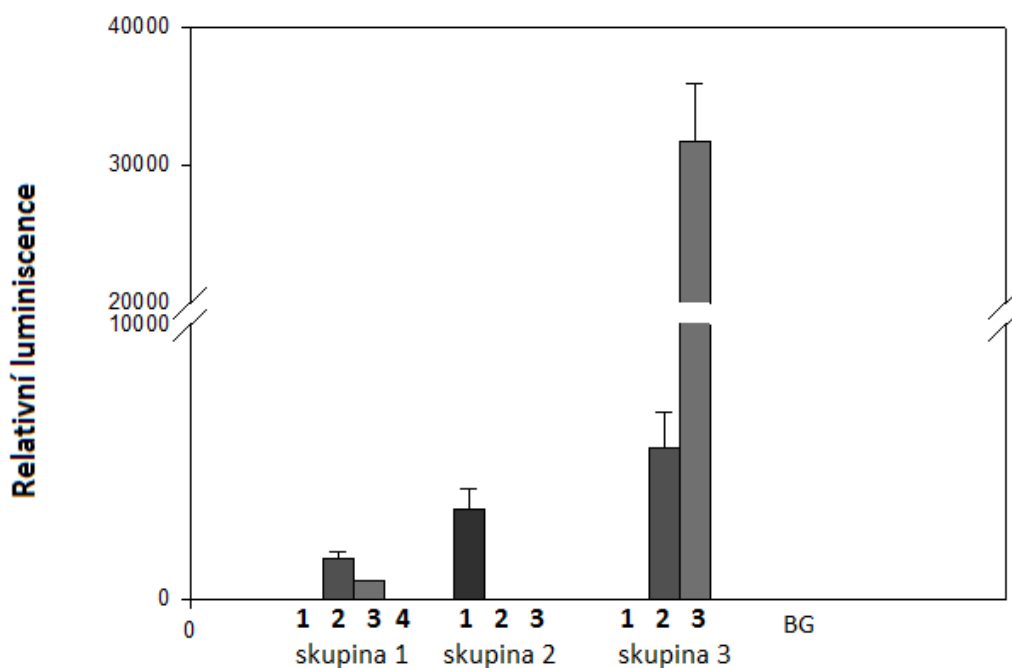
Z uvedených výsledků lze odhadnout, že popsáním způsobem aplikace a použitou dávkou (10^6 bakterií) se nepodařilo způsobit infekci v plicích, která by byla pozorovatelná *in vivo* použitou zobrazovací technikou (IVIS® Lumina XR).

4.3.2.1 Kultivace PA v získaném experimentálním materiálu

Ve vzorcích BAL byla kultivačně prokazována přítomnost PA. Vzorky BAL z potkaních plic byly kultivovány s PS médiem 18 hodin při 37 °C. V uvedeném grafu (obr. 13, str. 44) lze vidět prudký nárůst signálu (relativní luminiscence) u jediného vzorku, konkrétně od zvířete, které po aplikaci bakteriální suspenze PA po 4 dny inhalovalo nebulizovaný roztok protilátek. Skupiny č. 2 a 3 obsahují pouze 3 členy, protože došlo k úhynu dvou potkanů následkem nepovedené intratracheální aplikace bakterií.



Obrázek 13: Relativní luminiscence vzorků BAL. Skupina 1 – inhalace IgY před aplikací PA; skupina 2 – pouze aplikace PA; skupina 3 – inhalace IgY po aplikaci PA. BG – pozadí. 1 - 4 – označení zvířat v rámci skupiny. Měřeno po 10 hodinách kultivace v PS médiu při 37 °C.



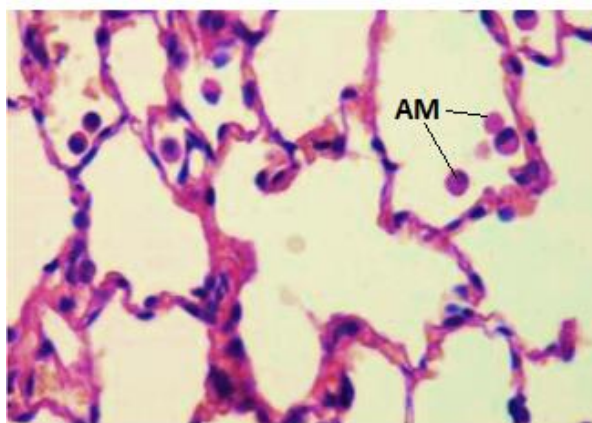
Obrázek 14: Relativní luminiscence vzorků homogenátů plic. Skupina 1 – inhalace IgY před aplikací PA; skupina 2 – pouze aplikace PA; skupina 3 – inhalace IgY po aplikaci PA. BG – pozadí. 1 - 4 – označení zvířat v rámci skupiny. Měřeno po 10 hodinách kultivace v PS médiu při 37 °C.

Vzorky homogenátů plic byly kultivovány za stejných podmínek jako vzorky BAL. Opět byly zaznamenány vyšší hodnoty relativní luminiscence u vzorků odebraných ze skupiny č. 3 (obr. 14, str. 44).

4.3.2.2 Mikroskopie plicní tkáně

Plíce konzervované ve formolu byly histologicky vyšetřeny prof. MUDr. Václavem Mandyssem, CSc. (Vinohradská nemocnice, Praha).

Na získaných snímcích histologických preparátů potkaních plic (obr. 15) nejsou znatelné patologické změny. Plicní parenchym byl bez zánětlivých změn a množství alveolárních makrofágů také neodpovídalo začínajícímu zánětu. Pro ilustraci byl vybrán reprezentativní snímek plic zdravého potkana. (44)

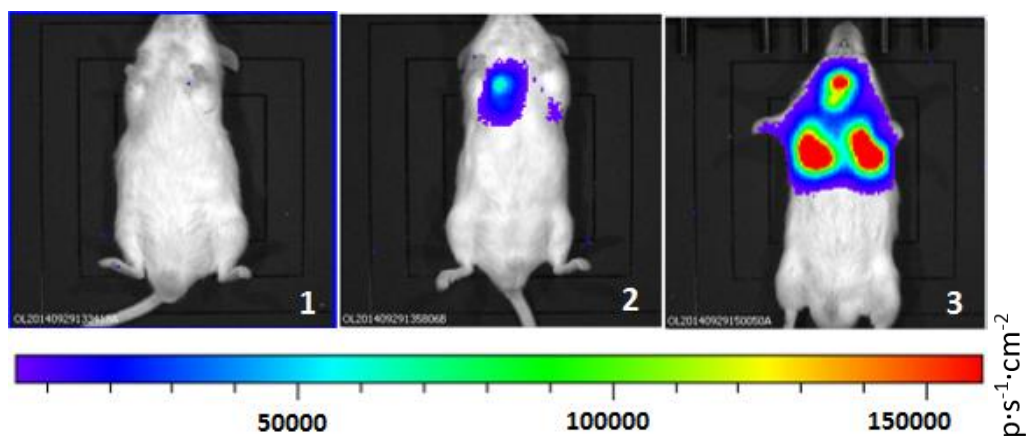


Obrázek 15: Řez potkaních plic reprezentativního jedince bez projevů zánětu. AM – alveolární makrofágy. Zvětšeno 400x. Řezy byly obarveny (hematoxylin a eoxin) a vyšetřeny na mikroskopu (Nikon Eclipse E400). (44)

4.4 Experimenty provedené na myších

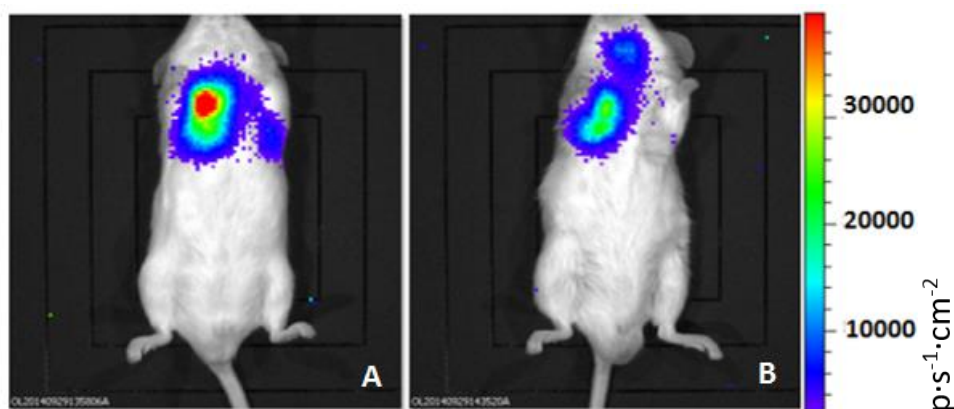
4.4.1 Optimalizace dávky bakterií

Na myším modelu bylo nutné optimalizovat dávku bakterií. Na obrázku č. 16 (str. 46) jsou znázorněny myši tři hodiny po aplikaci dávky 10^5 , 10^6 a 10^7 bakterií PA-lux. U myši č. 3 už lze pozorovat masivní infekci v dýchacích cestách, jež byla letální do čtyř hodin po aplikaci. Dávka 10^5 CFU nebyla po 3 hodinách od aplikace již měřitelná. Na základě tohoto pokusu byla odhadnuta jako vhodná dávka $5 \cdot 10^5$ bakterií ve 30 μ l.



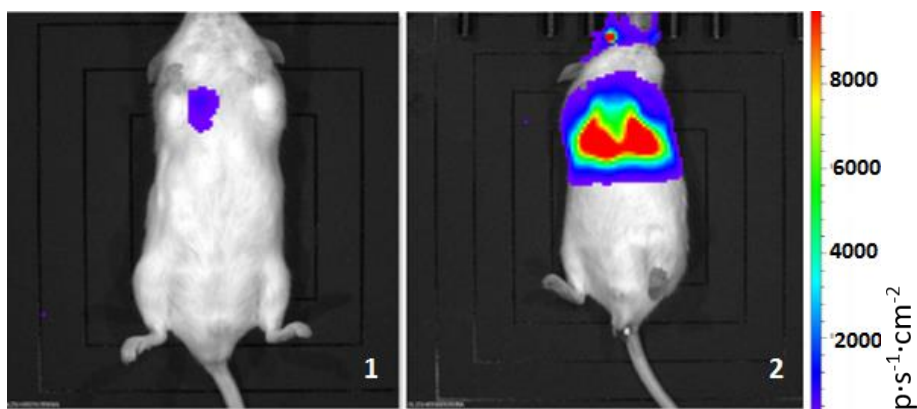
Obrázek 16: Porovnání dávky bakterií tři hodiny po intratracheální aplikaci. 1 – 10^5 buněk; 2 – 10^6 buněk; 3 – 10^7 buněk v 30 μ l. Expozice 5 minut.

Dále byla testována reprodukovatelnost intratracheální instilace PA-lux. Porovnáním myší po aplikaci stejné dávky bakterií lze odhadnout míru opakovatelnosti neinvazivní intratracheální aplikace. Obrázek č. 17 ukazuje dvě myši tři hodiny po aplikaci dávky 10^6 bakterií. Patrná variabilita související s technikou aplikace znamená, že je třeba při těchto pokusech použít dostatečně početné skupiny myší.



Obrázek 17: Porovnání myší se stejnou dávkou. Byly vybrány 2 reprezentativní mezní příklady (nejméně podobné) po aplikaci 10^6 bakterií ve 30 μ l. Expozice 5 minut.

Pozorován byl také vývoj infekce ve stejném zvířeti v čase. Pro znázornění (obr. 18, str. 47) byl vybrán reprezentativní jedinec po aplikaci dávky 10^6 bakterií.



Obrázek 18: Vývoj infekce u stejného zvířete v čase. 1 – 3 hodiny po aplikaci; 2 – 24 hodin po aplikaci dávky 10^6 bakterií. Expozice 5 minut.

4.4.2 Měření účinku protilátkové profylaxe bakteriální infekce

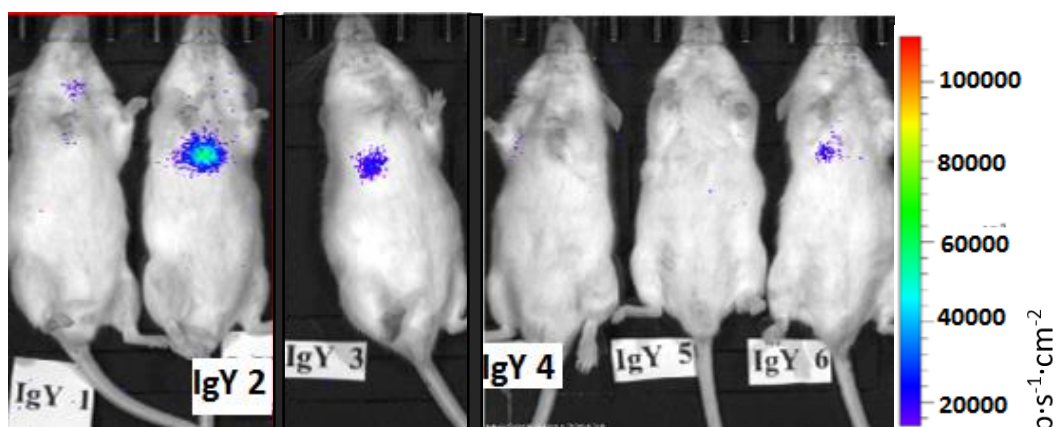
Dvacet dva myši nejprve pět dní inhalovalo roztoky IgY a PBS (dle rozdělení ve skupinách) a poté jim byla aplikována dávka bakterií určená optimalizací ($5 \cdot 10^5$). Byl zaznamenáván pozorovaný stav myši v průběhu experimentu (tab. 5)

Tabulka 5: Subjektivní pozorování zdravotního stavu myši

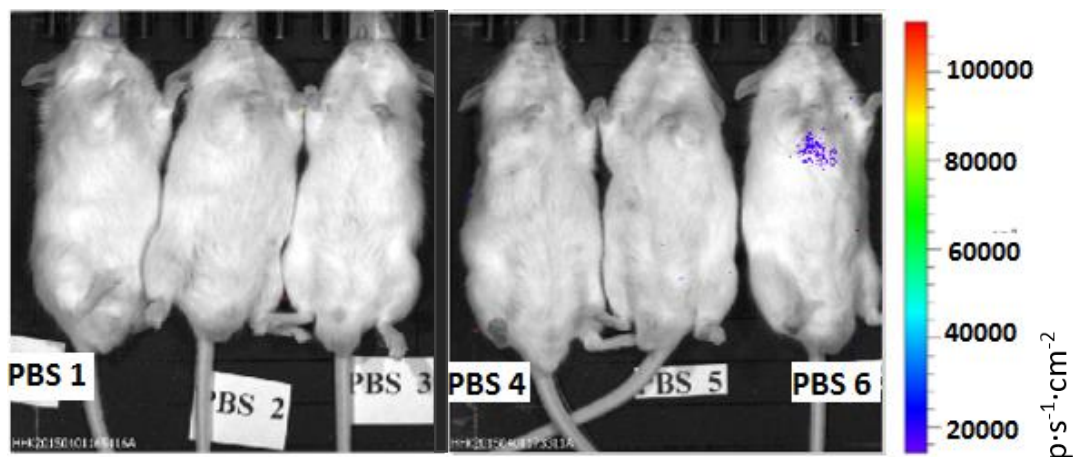
Skupina	Inhalace	Den po aplikaci PA	2 dny po aplikaci PA
1	IgY	úhyn: 1	úhyn: 2
		zhoršený stav: 1	zhoršený stav: 5
2	PBS	úhyn: 0	úhyn: 2
		zhoršený stav: 0	zhoršený stav: 2

4.4.2.1 Měření vývoje infekce *in vivo*

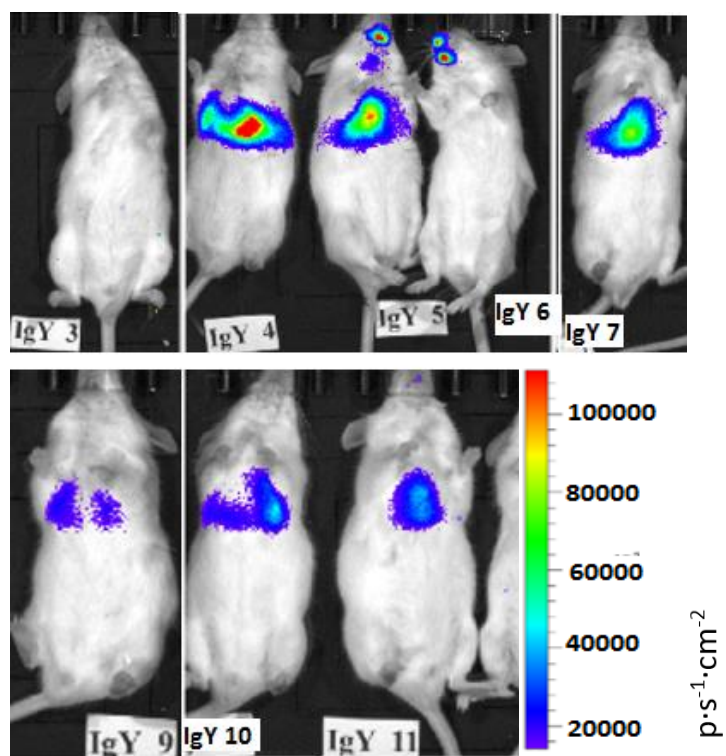
Šestý a sedmý den experimentu bylo provedeno měření luminiscence.



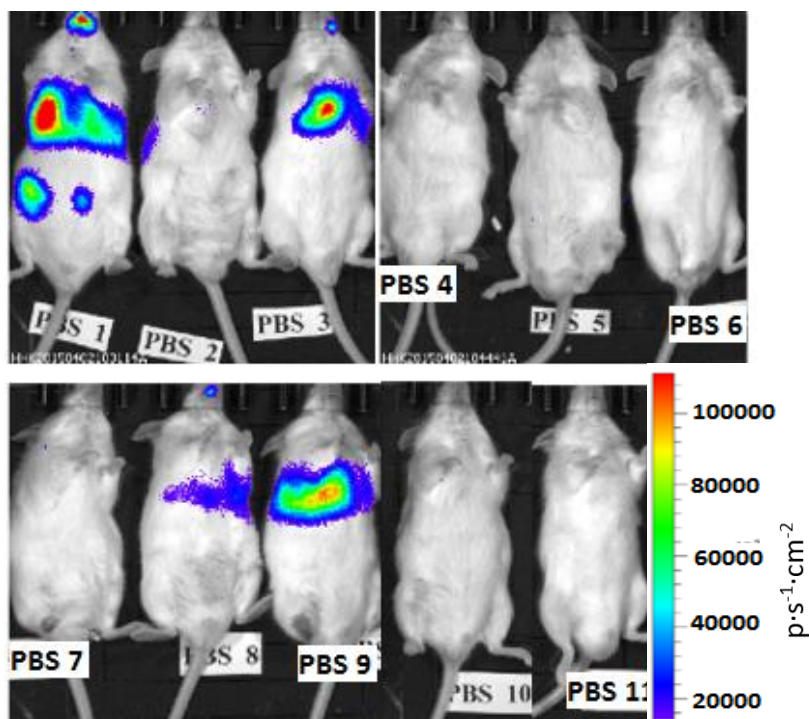
Obrázek 19: Vývoj infekce po předchozí protilátkové profylaxi. Měřeno den po aplikaci bakterií. Zobrazení reprezentativní jedinci ze skupiny 1. Expozice 2 minuty.



Obrázek 20: Vývoj infekce po předchozí inhalaci pufru PBS. Měřeno den po aplikaci bakterií. Zobrazení reprezentativní jedinci ze skupiny 2. Expozice 2 minuty.

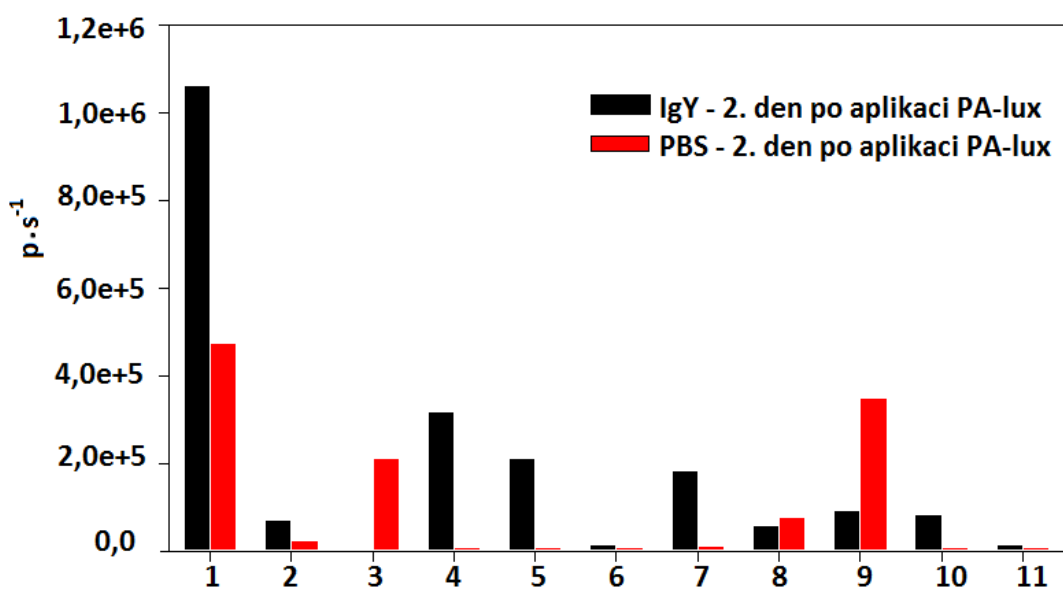


Obrázek 21: Vývoj infekce po předchozí protilátkové profylaxi. Měřeno 2 dny po aplikaci bakterií. Zobrazení reprezentativní jedinci ze skupiny 1. Expozice 2 minuty.



Obrázek 22: Vývoj infekce po předchozí inhalaci pufru PBS. Měřeno 2 dny po aplikaci bakterií. Zobrazení reprezentativní jedinci ze skupiny 2. Expozice 2 minuty.

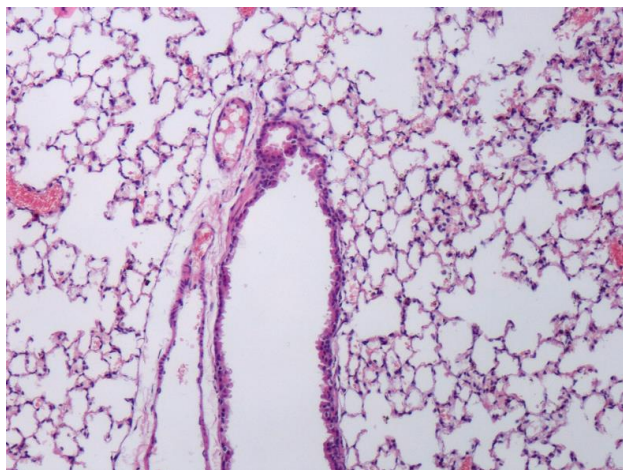
Zobrazené signály v oblasti plic, naměřené po aplikaci bakterií, byly kvantifikovány na plochu a porovnávány (obr. 23). Z obrázků i hodnot v grafu je patrné, že u myši po protilátkové profylaxi se zánět rozvinul více.



Obrázek 23: Porovnání skupin myši z pohledu celkové luminiscence. Čísla 1 – 11 označují zvířata ve skupině.

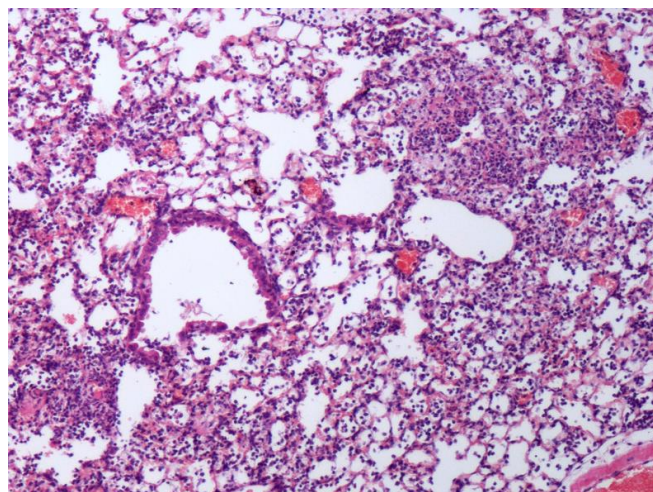
4.4.2.2 Mikroskopie plicní tkáně

V případě myšního modelu bylo u plic myši (skupina inhalující PBS před aplikací bakterií), u kterých se nerozvinula infekce pozorováno normální množství buněk, plicní parenchym byl beze změn (obr. 24).



Obrázek 24: Řez myších plic po aplikaci PA. Reprezentativní snímek myši, která inhalovala PBS a byly jí aplikovány bakterie. Zvětšeno 100x.

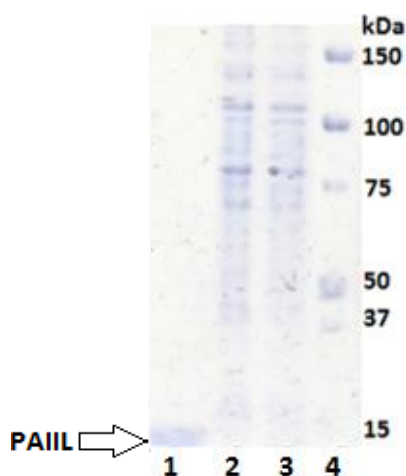
Řez myších plic po aplikaci $5 \cdot 10^5$ bakterií (obr. 25) již ukazuje po dvou dnech od aplikace rozsáhlý zánět, lokálně až akutní katarální bronchopneumonii – tedy závažné poškození sliznice, které však ještě nezpůsobuje rozpad tkáně. Vyznačuje se hustým výskytem neutrofilních granulocytů. U menší části vzorků byla pozorovatelná i počínající nekrosa tkáně.



Obrázek 25: Řez myších plic po aplikaci PA. Reprezentativní snímek myši, která inhalovala IgY a byly jí aplikovány bakterie. Zvětšeno 100x.

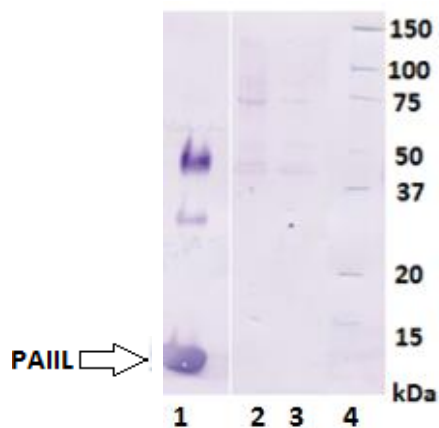
4.5 Ověření produkce bakteriálního lektinu PAIIL

Nejprve byla provedena elektroforesa bakteriálního výluhu na polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS.



Obrázek 26: Elektroforesa bakteriálních proteinů na polyakrylamidovém gelu. 1 – standard PAIIL; 2 – PA-lux; 3 – PA-Xen41; 4 – marker molekulových hmotností (Precision Plus Protein Unstained Standards).

Dle získaných výsledků po obarvení elektroforetického gelu v barvicí lázni CBB (obr. 26) nelze s jistotou potvrdit přítomnost lektinu PAIIL srovnáním s použitým standardem (dráha 1). Proto byla provedena imunochemická detekce s primární protilátkou proti PAIIL (Western blot).



Obrázek 27: Imunodetekce PAIIL na membráně PVDF po horizontálním přenosu proteinů. 1 – standard PAIIL; 2 – PA-lux; 3 – PA-Xen41; 4 – marker molekulových hmotností (Precision Plus Protein WesternC Standards).

Z prezentovaného obrázku membrány (obr. 27) opět nelze přítomnost lektinu v bakteriích potvrdit. Citlivost metody však byla dostatečná, což lze odhadnout z detekovaného tetrameru PAIIL v oblasti mezi standardy 37 a 50 kDa.

5 DISKUSE

Slepičí protilátky IgY jsou imunoglobuliny podobné nejhojnějšímu imunoglobulinu savců IgG. Obsahují jednu doménu navíc a chybí u nich tzv. „pantová oblast,“ takže jsou méně flexibilní. V roce 1893 bylo potvrzeno, že kromě krve slepic, lze tyto protilátky ve velkém (oproti krvi až dvojnásobném) množství izolovat i z vaječných žloutků, což představuje jednoduchý a efektivní způsob při produkci většího množství IgY. (46) (32) Díky tomuto zjištění začaly být více využívány při výzkumu účinku protilátek na mnohé patogeny. Byly prokázány jejich neutralizační účinky na některé toxiny a mikroorganismy. (7) (8) Jejich nesporná výhoda spočívá v tom, že v savčím (lidském) organismu nereagují s Fc-receptory („crystallizing fragment“) a nezpůsobují aktivaci komplementu – jsou tedy vhodné pro použití při pasivní imunizaci zejména před bakteriálními infekcemi. (47) Díky těmto vlastnostem byly také využity při xenotransplantacích, kde byl prokázán jejich pozitivní vliv na přijetí transplantovaného orgánu. (33) Dále mají slepičí protilátky prokazatelný vliv na adhezi bakterií *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního epitelu. (37)

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (PA) jsou významným patogenem zejména dýchacích cest a častou příčinou rozsáhlých poškození plic pacientů s cystickou fibrosou. (10) Plicní epitel těchto pacientů je vlivem chronických infekcí poškozen a následkem jizvení (fibrosy) tkání vykazuje sníženou sialyzaci, což přispívá k adhezi bakterií PA pomocí adhezivních struktur (jako je např. lektin PAIIL). (24) Schopnost bránit adhezi PA na plicní epitel byla potvrzena při experimentech s modelovým systémem *in vitro* za použití plicních buněk. (37) Cílem předkládané práce bylo nalezení a optimalizace použití experimentálního modelu pro *in vivo* testování pasivní imunizace protilátkami IgY před bakteriální infekcí.

Pro experimenty byly k dispozici dva luminiscenční bakteriální kmeny. Výrobce optického tomografu (Caliper), jež byl použit pro měření *in vivo* luminiscence, doporučuje pro pokusy kmen PA-Xen41. Při porovnávání s kmenem PA-lux však vykazoval minimálně desetkrát nižší signál luminiscence (obr. 9, str. 40). Proto byl v dalších experimentech použit kmen PA-lux.

Protilátky používané v rámci tohoto výzkumu byly izolovány z vajec slepic imunizovaných lektinem PAIIL. (41) Protože izolace těchto protilátek proběhla již roku 2009, bylo jedním z úkolů této práce ověřit, zda je reaktivita protilátek s lektinem PAIIL

i po dlouhodobém uchování v roztoku PBS zachována. V prezentovaných výsledcích lze pozorovat zvyšující se trend v grafu závislosti navázaných protilátek na jejich koncentraci při imunochemickém stanovení ELISA (obr. 10, str. 40). Protilátky tedy mohly být dále používány.

Potkaní model byl v práci (44), na kterou tato diplomová práce navazuje, použit pro testování potenciální imunogenicity protilátky IgY při inhalaci. Byla vyvinuta optimální metoda pro inhalační podání protilátek a bylo prokázáno, že protilátky IgY při tomto způsobu aplikace nezpůsobují zánět. (39) V zavazujících pokusech na potkaním modelu při injekčním intratracheálním zavádění suspenze PA však nastala řada zásadních problémů, kvůli kterým nebyly získány relevantní výsledky a kvůli kterým byly tyto pokusy přerušeny. Při intratracheální aplikaci bakterií, která byla provedena invazivně, nastaly potíže s podanou dávkou bakterií. I přesto, že byl objem 200 μ l použit na základě publikovaných informací (45) (49), po injekční aplikaci do trachey se v ní dávka několik vteřin viditelně pohybovala a po jejím vniknutí do plic došlo u většiny zvířat k zástavě dechu. Bez improvizované resuscitace by tedy došlo k úhynu zvířat již po aplikaci. V průběhu pokusu byl u některých zvířat pozorován zhoršený zdravotní stav, často výtoky z očí. Ani přes důkladné vyhlení srsti, která by mohla měření komplikovat, však nebylo možné zachytit na optickém tomografu žádný signál v oblasti plic. Poměrně silný signál vykazovala místa výtoku kolem očí a nosu a u většiny zvířat také ošetřené rány na krku, které vznikly při aplikaci bakterií. U jiných zvířat zase došlo k rozvoji infekce v zažívacím traktu, což bylo potvrzeno luminiscencí tráveniny. Dávka bakterií tedy nebyla dostatečná, aby způsobila zánět v plicích zdravých potkanů a došlo k přirozené eliminaci bakterií obrannými mechanismy dýchacích cest.

Pro ověření, že se bakterie v plicích opravdu nezachytily, byly provedeny analýzy odebraného experimentálního materiálu. Vzorky bronchoalveolárních laváží (BAL) a homogenátů plic byly kultivovány v PS médiu. Při měření relativní luminiscence kultivovaných laváží byla získána pouze jedna výrazně zvýšená hodnota – laváž potkana, kterému byly aplikovány bakterie a následně 4 dny inhaloval nebulizovaný roztok protilátek (obr. 13, str. 44). Tento výsledek by mohl být přisuzován náhodné kontaminaci při odběru BAL, například z rány na krku, která byla silně infikovaná. Ve stejné skupině se však zvýšené hodnoty ukázaly i ve vzorcích homogenátů, tentokrát byla výrazně vyšší hodnota u jiného jedince (obr. 14, str. 44). Protilátky inhalované až po aplikaci bakterií

tedy překvapivě mohly v dýchacích cestách usnadnit kolonizaci PA. Při histologickém vyšetření však nebyly v plicích patrné žádné známky zánětlivého procesu.

Druhá část práce se věnuje experimentům na myších ICR. Optimalizace použití myšího modelu byla vzhledem k malé velikosti experimentálních objektů a k početnosti skupiny velice náročná. Inhalační aparatura vyvinutá pro potkany nebyla vzhledem k přibližně desetkrát menší velikosti myši použitelná, proto musela být sestrojena nová. Protože skupiny při použití myšího modelu byly početnější, musela tato aparatura sloužit pro společnou inhalaci více zvířat zároveň (obr. 8, str. 36). Použití této aparatury by mohlo zaručit i jednoduchý způsob aplikace bakterií. Dle publikovaných výzkumů však bylo podání bakterií myším prostřednictvím aerosolu neefektivní a bakterie byly z plic velmi rychle odstraněny vlastními obrannými mechanismy. (43) Dále byla zvažována metoda intranasálního zavedení, avšak ani ta se podle dostupných zdrojů nezdá být vhodná. Její provedení totiž vede především ke kolonizaci gastrointestinálního traktu. (43) Bylo tedy přistoupeno k intratracheálnímu zavedení prostřednictvím intubace. (50) Při optimalizaci tohoto způsobu bylo nejprve nutné najít hmotnostní hranici jedince, kdy je ještě možné aplikaci provést. Zavedení kanyly myším s hmotností pod 30 gramů bylo téměř nemožné, úspěšnost byla minimální a více méně náhodná. Pro myši o přibližné hmotnosti 35 gramů pak byl hledán optimální způsob anestezie. Při lehké anestezii navozené inhalací isofluranu (2 %) myš sice byla zprvu nehybná, avšak horní cesty dýchací zůstaly natolik citlivé, že při pokusu o zavedení kanyly docházelo k probouzení a vyvolání dávivého reflexu. Jako vhodná se prokázala směs ketaminu a xylazinu (1 mg a 0,1 mg na 10 g zvířete) pro navození hlubší anestezie v takové dávce, aby spánek byl dostatečně hluboký pro aplikaci, ale zároveň aby se myši budily cca do třiceti minut, a nedošlo k jejich podchlazení či ohrožení vitálních funkcí.

Protože sliznice krku a jazyka reaguje velmi citlivě při mechanickém podráždění, docházelo při prvních pokusech vytahování jazyka a zavádění kanyly k otokům, jež znemožnily další pokusy. Nejenže omezovaly respirační funkci zvířete, ale za použití peanu (50) pro uchycení jazyka dokonce došlo k nevratnému poškození sliznice. Toto by, vzhledem k virulenci *Pseudomonas aeruginosa* mohlo mít za následek rozvoj infekce v dutině ústní a tím rozšíření zánětu v nežádoucích partiích. Popsanou metodou s použitím jednoduché smyčky pro upevnění jazyka k takovému poškození nedocházelo a po následném navlhčení byl během několika minut pozorován normální stav. Případným

otokům hlasivek bylo zabráněno nanesením lokálního anestetika, jež díky gelové formě ulpí v dostatečném množství na špičce kanyly a lze provést znecitlivění přímo při zavádění kanyly. Jako vhodná byla z mnoha testovaných zvolena plastová kanyla s teflonovým povrchem a průměrem 1,1 mm, jež se vyznačuje větší pevností (menší pružností) než běžněji používaná polyethylenová. Pokud jsou všechny popsané kroky provedeny s dostatečnou přípravou, pečlivostí a opatrností, lze aplikaci provést během několika málo vteřin (5 – 10) a může být označena jako neinvazivní.

Výhodou této metody je také to, že při zavedení bakteriální suspenze pipetou pouze do ústí kanyly (nikoli přímo injekčně), dojde k aplikaci samovolně nádechem myši a tím je zároveň potvrzena i správnost intratracheální instilace. Při optimalizaci tohoto kroku byl použit roztok s barvivem, aby bylo možné lokalizovat místo aplikace.

Nejprve byly provedeny experimenty pro optimalizaci dávky bakterií. Z porovnávání myši se stejnou dávkou bakterií a sledování vývoje infekce v čase (obr. 16, str. 46) byla jako vhodná dávka určena $5 \cdot 10^5$ bakterií v 30 μ l PBS. Při podání nižších dávek nebyla měřitelná luminiscence v plicích a vyšší dávky způsobily úhyn myši příliš brzy (dávka 10^7 dokonce do 4 hodin po aplikaci).

Pro inhalační pokus bylo použito 22 myši, polovina z nich před aplikací bakterií inhalovala roztok protilátek, druhá polovina sloužila jako kontrolní a inhalovala PBS. Výsledky tohoto pokusu byly překvapivé, protože zvířata po protilátkové profylaxi vykazovala výrazně horší stav, než jedinci z druhé skupiny. Tato skutečnost by mohla být způsobena tím, že se při inhalaci dostalo do plic tak malé množství specifické protilátky, které již nedokázalo infekci zabránit. Naopak vlivem interakce bakteriálních lektinů se sacharidy protilátek může dojít k zesílení bakterií a podpoření rozvoje infekce. Takové efekty byly pozorovány při studiu adherence PA na epiteliální buňky v přítomnosti nespecifických protilátek. (38) Infekce pozorovaná *in vivo* byla potvrzena i při histologickém vyšetření plic (obr. 24, str. 50)

Záměr použít protilátky proti bakteriálnímu lektinu PAIIL jako prostředek profylaxe PA infekcí vycházel z předpokladu, že tento lektin je jedním z významných virulenčních faktorů PA. Pomocí protilátek proti PAIIL bylo prokázáno, že je tento lektin bakterií významně exprimován. (41) Předpokládaný ochranný účinek protilátek připravených proti lektinu byl ověřen při studiu adherence PA na epiteliální buňky. (37) Vzhledem k tomu, že při experimentech *in vivo* vedla aplikace protilátek ke zhoršení

stavu jak potkanů, tak myši infikovaných PA, byla exprese lektinu PAIIL u luminiscenčního bakteriálního kmene PA-lux ověřována. Imunochemická analýza bakteriálního výluhu PA-lux metodou Western blotting však neprokázala přítomnost lektinu (obr. 27, str. 51). I při adhečních testech tento luminiscenční kmen nevykazuje citlivost na přítomnost protilektinových protilátek. Tyto výsledky by mohly vysvětlit zhoršený stav skupiny potkanů, kteří byli nejprve infikováni a až poté inhalovali protilátky IgY, případně špatný stav myši po protilátkové profylaxi. Další výzkum by se tedy s ohledem na prezentované výsledky měl zabývat bližším zkoumáním bakteriálního kmene PA-lux, aby bylo možné lépe porozumět mechanismu jeho kolonizace v respiračním traktu.

Přestože by se popisované pokusy daly označit jako „pilotní,“ byly díky nim zejména optimalizovány metody důležité pro navození a výzkum bakteriální infekce v dýchacích cestách experimentálních zvířat. Další experimenty by měly být zaměřeny na úpravu plicního epitelu tak, aby situace odpovídala prostředí v plicích pacientů s cystickou fibrosou. Desialyzovaný povrch (pomocí enzymu neuraminidasy) by totiž mohl napodobit fibrotickou tkáň CF pacientů, která usnadňuje adhezi *Pseudomonas aeruginosa* pomocí lektinu PAIIL.

6 SOUHRN

Dle prezentovaných výsledků se podařilo splnit následující cíle:

- Místo geneticky upravených myší byly pro pilotní experimenty s testováním pasivní imunizace zvoleny myši ICR.
- Z luminiscenčních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* byl vybrán PA-lux pro použití v provedených experimentech.
- Byla sestavena aparatura pro účinné inhalační podání nebulizovaných roztoků IgY myším.
- Na myším modelu byla optimalizována aplikace a dávka *Pseudomonas aeruginosa* do dýchacích cest experimentálních zvířat.
- Pro sledování *in vivo* průběhu plicní infekce se osvědčil přístroj Caliper IVIS® Lumina.

7 Citovaná literatura

1. Jílek, P.: *Imunologie stručně, jasně, přehledně*. Grada Publishing, Praha (2014).
2. Bals, R.; Weiner, D. J.; Wilson, J. M.: The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest.* **1999**:103, 303-307.
3. Hořejší, V.; Bartůňková, J.; Brdička, T.; Špíšek, R.: *Základy imunologie*. Triton, Praha (2013).
4. Bartůňková, J.: *Imunodeficiency*. Grada Publishing, Praha (2007).
5. Krejsek, J.; Kopecký, O.: *Klinická imunologie*. Nucleus, Hradec Králové (2004).
6. Iida, N.; Grotendorst, G.: Cloning and sequencing of a new gro transcript from activated human monocytes: expression in leukocytes and wound tissue. *Mol Cell Biol* **1990**:10, 5596-5599.
7. Hatta, H.; Tsuda, K.: Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. *Biosci Biotechnol Biochem.* **1993**:57, 1077-1081.
8. Chalghoumi, R.; Beckers, Y.; Portetelle, D.; Thewis, A.: Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken. *Biotechnol Agron Soc Environ.* **2009**:13, 295-308.
9. Hussack, G.; Tanha, J.: Toxin-Specific Antibodies for the treatment of *Clostridium difficile*: current status and future perspectives. *Toxins (Basel).* **2010**:2, 998-1018.
10. Vávrová, V. a kol.: *Cystická fibróza*. Grada Publishing, Praha (2006).
11. Lyczak, J. B.; Cannon, C. L.; Pier, G. B.: Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* **2002**:15, 194-222.
12. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.: *The molecular biology of the Cell*. GS-Garland Science, USA (2002).
13. Murray, R.; Bender, D.; Botham, K.: *Harper's Illustrated Biochemistry*. McGraw-Hill Publishing Company, USA (2012)
14. Saiman, L.: Microbiology of early CF lung disease. *Paediatr Respir Rev.* **2004**:5, 367-369.
15. Taglia, A.; Picillo, E.; D'Ambrosio, P.; Cecio, M. R.; Viggiano E.; Politano, L.: Genetic counseling in Pompe disease. *Acta Myol.* **2011**:30, 179-181.
16. Britigan, B. E.; Rasmussen, G. T.; Olakanmi, O.; Cox, C. D.: Iron acquisition from *Pseudomonas aeruginosa* siderophores by human phagocytes: an additional mechanism

of host defense through iron sequestration? *Infect Immun.* **2000**:68, 1271-1275.

17. Van Alst, N. E.; Picardo, K. F.; Iglewski, B. H.; Haidaris, C. G.: Nitrate sensing and metabolism modulate motility, biofilm formation, and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* **2007**:75, 3780-3790.

18. Bednář, M.; Fraňková, V.; Schindler, J.; Souček, A.; Vávra, J.: *Lékařská Mikrobiologie*. Triton, Praha (2009).

19. Ader, F.; Le Berre, R.; Faure, K.; Epaulard, O.; Toussaint, B.; Polack, B.; Nowak, E.; Viget, N. B.; Kipnis, E.; Guery, B. P.: Alveolar response to *Pseudomonas aeruginosa*: role of the type III secretion system. **2005**:73, 4263-4271.

20. Zavascki, A. P.; Barth A. L.: Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo-beta-lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study. *Crit Care.* **2006**:10, 1-7

21. <https://microbewiki.kenyon.edu/>. (červenec 2015)

22. <http://textbookofbacteriology.net/>. (červenec 2015)

23. Brenner, Don J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T.: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Springer, USA (2005).

24. Tielker, D.; Hacker, S.; Loris, R.; Strathmann, M.; Wingender, J.; Wilhelm, S.; Rosenau, F.; Jaeger, K. E.: *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology.* **2005**:151, 1313-1323.

25. Malone, J. G.: Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. **2015**:8, 237-247.

26. Laurans, M.; Arion, A.: *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: first colonization to chronic infection. *Arch Pediatr.* **2006**:13, 22-29.

27. Dosanjh, A.; Muchmore, E. A.: Expression of DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) decreases membrane sialylation. *Open Respir Med J.* **2009**:3, 79-84.

28. Sajjan, U.; Reisman, J.; Doig, P.; Irvin, R. T.; Forstner, G.; Forstner, J.: Binding of nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* to normal human intestinal mucin and respiratory mucin from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest.* **1992**:89, 657-665.

29. Mallory, G. B.: Inflammation in lung transplantation for CF. Immunosuppression and modulation of inflammation. *Clin Rev Allergy Immunol.* **2002**: 23, 105-122.

30. Voet, D.; Voet, J. G.: *Biochemistry*. Wiley, USA (2004).

31. Fusek, M.; Vitek, L.; Blahoš, J.; Hajdúch, M.; Ruml, T.: *Biologická léčiva: Teoretické základy a klinická praxe*. Grada publishing, Praha (2012).
32. Kovacs-Nolan, J.; Philips, M.; Mine, Y.: Advances in the value of eggs and egg components for human health. *J Agric Food Chem.* **2005**:53, 8421-8431.
33. Leventhal, J. R.; Su, A.; Kaufman, D. B.; Abecassis, M. I.; Stuart, F. P.; Anderson, B.; Fryer, J. P.: Altered infectivity of porcine endogenous retrovirus by 'protective' avian antibodies: implications for pig-to-human xenotransplantation. *Transplant Proc.* **2001**:33, 1-2.
34. Rahman, S.; Van Nguyen, S.; Icatlo, F. C.; Umeda, K.; Kodama, Y.: Oral passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Hum Vaccin Immunother.* **2013**:9, 1039-1048.
35. Nilsson, E.; Larsson, A.; Olesen, H. V.; Wejaker, P. E.; Kollberg, H.: Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol.* **2008**: 892-899.
36. Kollberg, H.; Carlander, D.; Olesen, H.; Wejaker, P. E.; Johannesson, M.; Larsson, A.: Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. *Pediatr Pulmonol.* **2003**:35, 433-440.
37. Nosková, L.: *Diplomová práce*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze (2013).
38. Kubíčková, B.; Majerová, B.; Hadrabová, J.; Nosková, L.; Stiborová, M.; Hodek, P.: Effect of chicken antibodies on inflammation in human lung epithelial cell lines. *Neuro Endocrinol Lett.* **2014**:35, 99-104.
39. Hadrabová, J.; Majerová, B.; Černá, V.; Moserová, M.; Holuša, R.; Mandys, V.; Stiborová, M.; Stříž, I.; Hodek, P.: Chicken immunoglobulins for prophylaxis: Effect of inhaled antibodies on inflammatory parameters in rat airways. *J Appl Biomed.* **2015**:13, 19-22.
40. Guilbault, C.; Saeed, Z.; Downey, G. P.; Radzioch, D.: Cystic fibrosis mouse models. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2007**:36, 1-7.
41. Bláhová, B.: *Diplomová práce*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze (2010).
42. Chi, E.; Mehl, T.; Nunn, D.; Lory, S.: Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with

A549 pneumocyte cells. *Infect Immun.* **1990**:59, 822-828.

43. Revelli, D. A.; Boylan, J. A.; Gherardini, F. C.: A non-invasive intratracheal inoculation method for the study of pulmonary melioidosis. *Front Cell Infect Microbiol.* **2012**:2, 1-8.

44. Hadrabová, J.: *Bakalářská práce.* Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze (2013).

45. Osier, M.; Oberdöster, G.: Intratracheal inhalation vs intratracheal instillation: Differences in particle effects. *Fundam Appl Toxicol.* **1997**:40, 220-227.

46. Lee, K. E.; Han, B. K.; Han, J. Y.; Hong, J. Y.; Kim, M. N.; Sohn, M. H.; Kim, K. W.; Kim, K. E.: Production of egg yolk antibodies specific to house dust mite proteins. *Yonsei Med J.* **2014**:55, 999-1004.

47. Gorof, D. K.; Finkelman, F. D.: Activation of B-cells in vivo by Fab/Fc fragment of a monoclonal anti-IgD antibody requires an interaction between the antibody fragment and a cellular IgG Fc receptor. *J Immunol.* **1988**:140, 2919-2924.

48. Cioffi, D. L.; Pandey, S.; Alvarez, D. F.; Cioffi, E. A.: Terminal sialic acids are an important determinant of pulmonary endothelial barrier integrity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2012**:302, 1067-1077.

49. Hasegawa-Baba, Y.; Kubota, H.; Takata, A.; Miyagawa, M.: Intratracheal instillation methods and the distribution of administered material in the lung of the rat. *J Toxicol Pathol.* **2014**:27, 197-204.

50. DuPage, M.; Dooley, A. L.; Jacks, T.: Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase. *Nat Protoc.* **2009**:4, 1064-1072.