

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Hana Freislebenová

Metody stanovení prozánětlivých cytokinů
Methods for assessment of proinflammatory cytokines

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Jan Lašovička, CSc.

Praha, 2016

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V dne

Podpis autora

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Lašovičkovi, CSc. za věnovaný čas a poskytnuté rady. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a svým přátelům za podporu během studia.

Abstrakt: Sepsa a septický šok jsou celosvětově hlavní příčinou úmrtí na jednotkách intenzivní péče. Cytokiny jsou důležitými regulátory imunitní odpovědi, která hraje klíčovou roli v patofyziologii sepsy. Tato práce klade hlavní důraz na prozánětlivé cytokiny, hlavně interleukin 1, interleukin 6 a TNF- α a metody jejich detekce. Účelem práce je porovnat nejčastěji používané metody, teda imunochemické metody – ELISA a ELISPOT, a stanovení intracelulárních cytokinů pomocí průtokové cytometrie.

Klíčová slova: cytokin, interleukin, sepsa, imunochemické metody, průtoková cytometrie

Abstract: Sepsis and septic shock are the leading causes of death in intensive care units worldwide. Cytokines are important regulators of the immune response, which have crucial role in sepsis pathophysiology. This work deals with proinflammatory cytokines mainly interleukin 1, interleukin 6 and TNF- α and methods of their assessment. The purpose of this work is to compare immunohistochemistry methods like ELISA and ELISPOT with assessment of intracellular cytokines by flow cytometry.

Keywords: cytokin, interleukin, sepsis, immunohistochemistry methods, flow cytometry

Obsah

Úvod	2
1 Sepse	4
1.1 Zánět	4
1.2 Sepse	4
1.2.1 Definice sepse	4
1.2.2 Patofyziologie sepse	5
1.2.3 Iniciace imunitní odpovědi	5
2 Cytokiny	7
2.1 Prozánětlivé cytokiny	7
2.2 IL-1 a TNF- α	8
2.3 IL-6	10
3 Imunochemické metody	11
3.1 ELISA	11
3.1.1 Sendvičová ELISA	11
3.1.2 Nepřímá sendvičová ELISA	11
3.1.3 Kompetitivní ELISA	11
3.2 ELISPOT	12
4 Průtoková cytometrie	14
4.1 Metody detekce intracelulárních cytokinů	14
4.2 Průtoková cytometrie	14
4.3 Intracelulární barvení cytokinů	14
4.4 Vzorky a jejich zpracování	15
4.5 Příprava vzorků pro průtokovou cytometrii	16
4.6 Analýza výsledků	16
Závěr	17
Seznam použité literatury	18
Seznam použitých zkratk	21

Úvod

Cytokiny jsou nízkomolekulární proteiny produkované buňkami imunitního systému, které působí jako základní regulátory imunitního systému. Většina cytokinů je pleiotropních, jeden cytokin indukuje tvorbu druhého a celý systém je do určité míry redundantní, kdy jednotlivé cytokiny mohou být do značné míry nahrazeny jinými, mohou se vzájemně ovlivňovat antagonisticky i synergicky a cílové buňky mohou stimulovat i inhibovat.

Klasifikace cytokinů byly v průběhu let opakovaně přepracovávány a jednotlivé klasifikační systémy zohledňovaly různé aspekty. Základním dělením je rozdělení na interleukiny, chemokiny, interferony, transformující růstové faktory, faktory nekrotizující nádory a faktory stimulující kolonie. Podle funkce se cytokiny dělí na prozánětlivé, protizánětlivé, cytokiny s aktivitou růstových faktorů, cytokiny uplatňující se v humorální imunitě, cytokiny uplatňující se v buněčně zprostředkované imunitě a na cytokiny s antivirovým účinkem.

V této práci je kladen hlavní důraz na prozánětlivé cytokiny, zejména IL-1, IL-6 a TNF- α a na metody jejich detekce v biologickém materiálu. (viz Hořejší a kol., 2013)

Sepse, těžká sepsa a septický šok jsou hlavními problémy v oblasti zdravotní péče na celém světě. Postihují miliony lidí každý rok a jejich incidence se každoročně zvyšuje. Dle epidemiologických studií na jednotkách intenzivní péče je septický šok nejčastější příčinou úmrtí a desátou nejčastější příčinou úmrtí v zemích s vysokými příjmy. (viz Sweep a kol., 2007)

Cytokiny, chemokiny a růstové faktory jsou signálními molekulami, které zprostředkovávají imunitní odpověď na infekci a často jsou jejich hodnoty zvýšeny u pacientů se septickým šokem (Sweep a kol., 2007). Jakožto prozánětlivé i protizánětlivé mediátory imunitní odpovědi, vzory cytokinů nacházející se v určitém testovaném vzorku, jsou velmi slibnými biomarkery pro určení prognózy a pro vývoj nových terapeutických metod.

Stanovení cytokinů pro diagnostické účely lze rozdělit na *in vivo*, *in vitro* a *ex vivo*. Při *in vivo* detekci je přímo stanovovaná přítomnost cytokinu v krvi, jiné tělesné tekutině nebo tkáni a jako rutinní diagnostická metoda má jen pouze omezené použití, jelikož imunitní reakce probíhá v různých kompartmentech a změny související s jejím průběhem se nemusí vždy projevit na systémové úrovni. (viz Bartůňková a kol., 2011) Cytokiny *in vivo* jsou velmi účinné již při velmi nízkých koncentracích a jsou produkovány pouze v krátkém časovém úseku, což klade velké nároky na senzitivitu metod, které jsou používány k jejich detekci.

Při *in vitro* stanovení cytokinů je buněčná populace nejdříve stimulována k produkci cytokinů a poté se diagnostickými metodami zjišťuje schopnost populace produkovat cytokiny.

Během *ex vivo* stanovení jsou buňky nejprve stimulovány *in vivo* a poté je produkce cytokinů stanovována *in vitro*. Při těchto pokusech je periferní krev odebrána do nesrážlivého media, krátkodobě kultivována a následně je detekována přítomnost cytokinů v supernatantu.

Přítomnost cytokinů ve vzorcích může být určována pomocí řady metod, z nichž nejčastější je přímé měření bílkovinné molekuly a pro tento účel je nejčastěji používaná metoda ELISA, která zjišťuje produkci cytokinů v supernatantu. Da-

lími metodami je chemiluminiscence, kdy se zjišťuje přítomnost IL-10 a IL-6, Bead Array Systém, který využívá průtokové cytometrie, ELISPOT či detekce cytokinů pomocí určení hladiny exprese cytokinové mRNA. (Bartůňková a kol., 2011)

1. Sepse

1.1 Zánět

Jako zánět je označována odpověď na porušení integrity organismu. Zánět mohou vyvolat infekční mikroorganismy (imunologický podnět), ale také poranění způsobená chemickými či fyzikálními vlivy nebo ischemií tkáně (neimunologický podnět). Odpověď organismu na poškození v závislosti na jeho rozsahu a délce trvání může být místní, anebo celková.

Zánětlivá odpověď probíhá nejprve lokálně, kdy jsou klasické projevy zčervenání, otok, bolestivost a zvýšení místní teploty. Po lokální následuje systémová odpověď, u které se liší míra intenzity v závislosti na rozsahu poškození a délce trvání lokálního zánětu. (Hořejší a kol., 2013)

Prvotní signály k rozvoji zánětlivých reakcí dávají degranulované tkáňové žírné buňky, fagocyty a látky uvolněné z poškozených buněk. Fagocyty v místě poškození začnou vylučovat cytokiny a jiné mediátory, které zánětlivé děje amplifikují. Při déle trvajícím zánětu dochází k aktivaci antigenně specifických složek imunity. Antigeny uvolněné z mikroorganismů způsobujících zánět se společně s buňkami prezentujícími antigen dostávají do mízních uzlin, kde stimulují aktivaci a diferenciaci T-lymfocytů a aktivaci specifických B-lymfocytů, ty se přeměňují na plazmocytů sekretující protilátky, které napomáhají opsonizaci mikroorganismů a aktivaci komplementu.

Zralé T_H -1 buňky migrují do místa zánětu, kde svými produkty stimulují makrofágy ke zvýšení fagocytární a cytotoxické aktivity, která napomáhá odstraňovat mikroorganismy a zbytky poškozených tkání.

Systémovým projevem zánětu je horečka, která je způsobena stimulací hypotalamového centra termoregulace prozánětlivými cytokiny, zejména interleukin 1 (IL-1), tumor nekrotizující faktor (TNF) a interferon γ (IFN- γ).

Cytokiny produkované v místě zánětu se při větším rozsahu zánětlivé reakce dostávají do krevního oběhu a v játrech stimulují produkci sérových proteinů akutní fáze, mezi které patří C-reaktivní protein (CRP) a komplementové složky C3 a C4. Tyto proteiny mají opsonizační funkci a účastní se aktivace komplementu.

Během rozsáhlejší nebo chronické zánětlivé reakce dochází k uvolňování dalších cytokinů, které působí na kostní dřeň a způsobují novotvorbu a vylití většího množství leukocytů, což vede k leukocytóze.

Při proniknutí masivního množství mikroorganismů do krevního oběhu dochází k tzv. septickému šoku, během kterého dochází k uvolňování velkého množství různých mediátorů jako jsou cytokiny, kininy, histamin aj., které vedou k vazodilataci, při níž může dojít k výrazné hypotenzi či oběhovému selhání. (Hořejší a kol., 2013)

1.2 Sepse

1.2.1 Definice sepse

Sepse je vnímána jako odpověď hostitele na napadající patogen či toxin.

V roce 1991 se konala konference organizovaná American College of Chest Physicians (ACCP) a Society of Critical Care Medicine (SCCM), na které měla být stanovena jednotná a univerzální definice sepse, což mělo vést ke zlepšení a urychlení diagnózy, léčby a v neposlední řadě k usnadnění výzkumu. Výsledkem této konference bylo zavedení termínu – systemic inflammatory response syndrome (SIRS), který je rozpoznáván na základě znaků, které zahrnují například tachypnoi, horečku či hypotermii, tachykardii a leukocytozu nebo leukopenii. SIRS může vznikat za zánětlivých či nezánětlivých podmínek, kdy nezánětlivé podmínky, které vyvolávají SIRS mohou být například trauma, popáleniny, hemoragický nebo hypovolemický šok a pankreatitida. (viz Jr. a kol., 1996)

Naproti tomu k diagnóze sepse je vyžadována přítomnost infekce společně se základními charakteristikami SIRS, těžká sepse je charakterizována jako sepse komplikovaná akutní orgánovou dysfunkcí, hypoperfúzí nebo hypotenzí a může vést až k multiple organ dysfunction syndrome (MODS) nebo k septickému šoku. (viz Bone a kol., 1992)

V roce 2001 se uskutečnila International Sepsis Definition Conference, jejímž cílem bylo evaluovat předchozí definici SIRS, sepse, těžké sepse a septického šoku. Po konferenci byl zveřejněn rozšířený seznam klinických a biochemických diagnostických kritérií, které lépe reflektovaly tento komplexní chorobný stav.

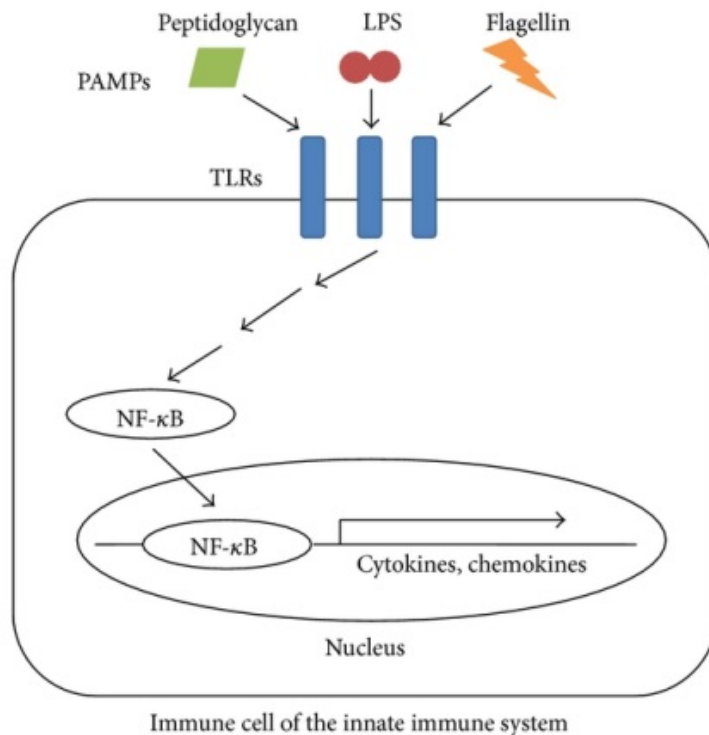
1.2.2 Patofyziologie sepse

Tradičně je na sepsi nahlíženo jako na přehnanou systémovou prozánětlivou reakci na invazivní mikrobiální patogen. V posledních letech převažuje mínění, že počáteční hyperzánětlivá fáze je následována nebo se překrývá se stavem imunosuprese, označovaným jako septicky indukovanou imunoparalýzou (viz Hotchkiss a Opal, 2010). Imunoparalytický stav je charakterizovaný narušenou počáteční a adaptivní imunitní odpovědí a nejspíše hraje klíčovou roli v patogenezi poškozené tkáně, MODS a smrti indukované sepsí.

Počáteční imunitní odpověď hraje významnou roli v zahájení septické patofyziologie a sepse se rozvíjí ve chvíli, kdy dochází k nerovnováze mezi prozánětlivou a protizánětlivou odpovědí (viz Hansen a kol., 2011) K aktivaci první linie buněčné obrany dochází v závislosti na nadměrné produkci cytokinů, chemokinů a dalších zánětlivých mediátorů. Cytokiny regulují velké množství zánětlivých odpovědí včetně migrace buněk imunitního systému do místa zánětu, což je klíčový krok k lokalizaci infekce. (Rivers a kol., 2011)

1.2.3 Iniclace imunitní odpovědi

Imunitní systém detekuje invadující mikroorganismy přes pathogen recognition receptors (PRRs), které jsou exprimovány na epitelové bariéře, stejně jako na buňkách imunitního systému, jako jsou dendritické buňky a makrofágy. (Akira a kol., 2006) Specifická rodina PRRs Toll-like receptors (TLRs) rozpoznává mikrobiální, evolučně velmi konzervované motivy, nazývané pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Stimulace TLRs nebo NOD-like receptorů (NLR) intracelulárních PRRs spouští následnou signální kaskádu. Tento proces vede k aktivaci jaderného transkripčního faktoru NF- κ B a následuje produkce a sekrece cytokinů, chemokinů a NO.



Obrázek 1.1: Iniciací imunitní odpovědi na infekci. Buňky imunitního systému rozpoznávají patogeny pomocí TLRs. Vazba PAMPs, jako jsou například flagelin, LPS či peptidoglykan, na TLRs spouští signální kaskádu vedoucí k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B. NF- κ B je lokalizován v jádře, kde indukuje expresi cytokinů a chemokinů. Zdroj: Schulte a kol. (2013)

Bodová mutace v TLR-4 receptorech u lidí je spojena s odlišnou reakcí na LPS, což naznačuje, že změna genové sekvence může změnit odpověď hostitele na environmentální stres jako je infekce, což může vést k rozvoji sepse, zatímco jindy k ní vést nemusí (viz Das, 2013). To ukazuje, že spolupráce adekvátního množství zánětlivě bioaktivních molekul může omezit infekci a zranění a obnovit běžnou funkci a zotavení ze sepse. Vedle tohoto objevu je zajímavé, že TLRs regulují generaci volných radikálů, funkci makrofágů a leukocytů, modulují syntézu eikosanoidů, čímž hrají významnou roli v zánětlivé odpovědi. (Das, 2013)

2. Cytokiny

Termín cytokiny popisuje skupinu malých nízkomolekulárních proteinů či glykoproteinů sloužících jako mediátory imunitního systému. Cytokiny jsou produkovány leukocyty či jinými buňkami a působí na buňky imunitního systému, ale i na buňky mimo něj, prostřednictvím specifických receptorů. Kromě sekretovaných forem existují a i membránové formy některých cytokinů, které jsou v cytoplazmatické membráně zakotveny pomocí transmembránových proteinů. Výhodou u membránových cytokinů je, že nedochází k jejich zředování difuzí ani odplavování a je tak zajištěno jejich lokální působení. (Hořejší a kol., 2013)

Cytokiny působí pleiotropně, ovlivňují tedy několik různých druhů buněk, působí v kaskádě, jeden cytokin vyvolává produkci druhého, čímž se zvyšuje síla reakce a jednotlivé cytokiny mohou být zastoupeny jinými, systém je tedy značně redundantní. Cytokiny působí buď autokrinně, parakrinně anebo endokrinně. Ovlivňují tedy buď buňku, kterou byly produkovány (autokrinní působení) nebo buňku v těsné blízkosti (parakrinně) anebo jsou transportovány krevním řečištěm ke vzdálenějším tkáním (endokrinní působení). Při některých reakcích imunitního systému je třeba koordinovaného spolupůsobení několika cytokinů, zahrnuje to složité synergistické a antagonistické interakce, které se označují jako cytokinová síť. (Lee a Margolin, 2011)

Dřívější rozdělení cytokinů na monokiny a lymfokiny (podle buněk, které je produkuje) se poté, co bylo zjištěno, že jsou produkovány i jinými buněčnými typy, nepoužívá. Proto bylo zavedeno označení interleukiny, kde byly číslovány v pořadí, v jakém byla poznána jejich struktura. Některé molekuly, které měly mezi interleukiny patřit, tam ovšem nebyly zahrnuty, což nakonec vedlo k zavedení pojmu cytokiny.

Cytokiny se klasifikují z několika hledisek, podle struktury, či podle jejich funkce nebo je lze rozdělit do několika skupin, jejichž názvy mají spíše historický význam než funkční. (Hořejší a kol., 2013)

2.1 Prozánětlivé cytokiny

V 90. letech převládala představa, že sepse je způsobena uvolněním množství prozánětlivých cytokinů jako jsou interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), interleukin 12 (IL-12), tumornekrotizující faktor α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) a macrophage migration inhibitory factor (MIF). (viz Aikawa, 1996)

Pozdější výzkumy mechanismu sepse ukázaly, že prozánětlivá odpověď je následována uvolněním protizánětlivých cytokinů zahrnujících transforming growth factor- β (TGF- β), interleukin 10 (IL-10) a interleukin 4 (IL-4). (Junger a kol., 1996)

Nicméně nebyl nalezen žádný ustálený vzorec v genové expresi hlavních prozánětlivých cytokinů, což ukazuje na to, že hostitelská odpověď na sepsi nefunguje podle jednoduchého vzorce, kde je počáteční prozánětlivá odpověď následována protizánětlivou odpovědí, ale je to vysoce interaktivní a dynamický proces. Přísně regulovaná rovnováha mezi prozánětlivými a protizánětlivými cytokiny má zásadní význam v eliminaci invadujícího patogenu. (van der Poll a van Deventer, 1999)

Hlavními prozánětlivými cytokiny jsou IL-1, IL-6 a TNF- α . Jsou to molekuly, které navozují a posilují každou zánětlivou odpověď a jsou secernovány v počáteční fázi zánětu většinou buněk. Jejich účinek spočívá v mobilizaci buněk prezentujících antigen a v aktivaci endotelových buněk k expresi adhezních molekul. To se projeví vývojem a pomnožením zánětlivých buněk, tedy leukocytů a monocytů. IL-1 a TNF také vedou k navození akutní fáze, včetně vzniku horečky. (Hořejší a kol., 2013)

2.2 IL-1 a TNF- α

IL-1 a TNF- α jsou nejvíce studovanými cytokiny, co se týče sepse a její patofyziologie. Oba dva jsou silnými prozánětlivými cytokiny, které jsou implikovány v řadě infekčních či neinfekčních zánětlivých onemocněních zahrnujících aterosklerózu, osteoartritidu (105-mediators of cytokine), revmatoidní artritidu a Alzheimerovu chorobu (viz Schulte a kol., 2013).

TNF- α je protein o molekulové hmotnosti 17 kDa, který není odvozený pouze z aktivovaných imunitních buněk tedy (makrofágů), ale také z neimunitních buněk (fibroblastů). TNF- α je uvolněný do 30 minut od iniciace a může tak velmi brzy regulovat imunitní odpověď organismu. Působí přes specifické transmembránové receptory tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) a tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2), na které se váží přes doménu bohatou na cystein. (Locksley a kol., 2001) Po navázání dochází k aktivaci buněk imunitního systému a uvolněním řady imunoregulátorů.

IL-1 je stejně jako TNF- α produkovaný především aktivovanými makrofágy, IL-1 se naváže na IL-1 receptor typu 1 (IL-1R1), čímž se spouští signální kaskáda vedoucí k aktivaci buněk imunitního systému. IL-1 soutěží o vazebná místa na receptoru s IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), který slouží jako negativní regulátor pro IL-1 a váže se na receptor, aniž by docházelo k iniciaci signalizace. (O'Neill, 2008)

V organismu se vyskytuje ve dvou formách IL-1 α a IL-1 β . Představuje jednu z nejdůležitějších molekul imunitního systému a tvoří významnou část cytokinové sítě, která zajišťuje regulaci složek imunitního systému v případě zánětu.

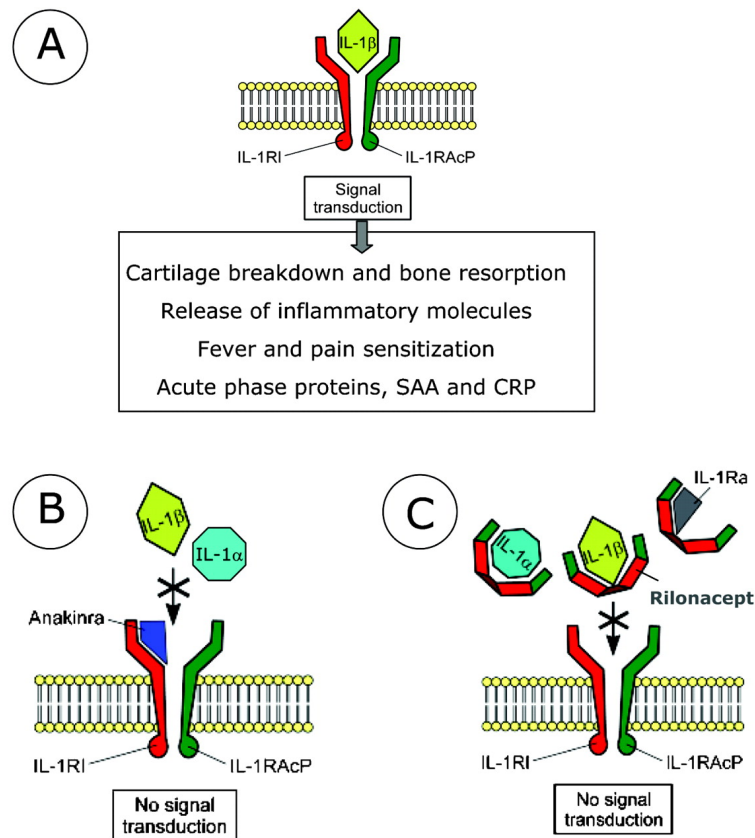
IL-1 α je ve formě prekurzoru neustále v malém množství přítomný v cytoplazmě buněk epitelu, naproti tomu makrofágy a monocyty vyžadují de novo syntézu IL-1 α . Prekuzor IL-1 α je zpracován proteázou calpainem, která odstříhne N-koncovou doménu za vzniku propiece cleavage product

IL-1 α (ppIL-1 α), ten obsahuje jadernou lokalizační sekvenci (NLS) a je translokován do jádra, kde nasedá na chromatin a funguje jako transkripční faktor.

Prekuzor IL-1 α se chová jako damage associated molecular patterns (DAMP) molekula a je rozpoznávaný pattern recognition receptor (PRR) receptory na povrchu buněk imunitního systému a dává signál k tomu, že se v organismu vyskytují molekuly, které zde za běžných fyziologických podmínek přítomny nejsou. (Cohen a kol., 2010)

IL-1 α indukuje infiltraci neutrofilů do stresových tkání a funguje tak spíše jako spouštěč imunitní reakce, oproti tomu IL-1 β funguje jako amplifikátor zánětu prostřednictvím stimulace makrofágů.

IL-1 α prekurzor není sekretovaný klasickou sekreční dráhou, ale nekonvenční sekreční dráhou. (Contassot a kol., 2012)



Obrázek 2.1: Navázání interleukinu 1β (IL- 1β) na IL-1R1 vede k přenosu signálu. IL- 1β se naváže na extracelulární doménu receptoru IL-1R1, který interaguje s IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP). Na komplex se naváže protein kináza IL-1R1-associated kinase (IRAK) a dochází k signální transdukcí a aktivaci transkripčních faktorů. V kostní dřeni IL- 1β mobilizuje progenitory granulocytů a zralé neutrofile, zvyšuje tvorbu krevních destiček a zvyšuje odpovědi lymfocytů na mitogeny a antigen, což vede ke zhoršení zánětlivé odpovědi. V mozku IL- 1β spouští IL-1 receptory v hypotalamu, dochází k produkci cyklooxygenázy a prostaglandinu E a ke vzniku horečky. Zdroj: So a Busso (2009)

Prekurzor IL- 1β je syntetizovaný až po stimulaci buněk imunitního systému alarminy (DAMP) přes Toll-like receptory (TLR) a jeho exprese je indukovaná transkripčním faktorem nuclear factor kappa B (NF- κ B). Maturovaná forma vzniká po zpracování prekurzoru cystein proteázou kaspáza 1. Kaskádu kaspázy 1 aktivuje inflamatozom, což je proteinový oligomer, v tomto případě se jedná o multimolekulární komplex NLR family, pyrin domain containing 1 (NLRP1). (Martinon a kol., 2002)

IL- 1β je stejně jako IL- 1α sekretovaný nekonvenční sekreční dráhou, která na rozdíl od klasické sekretorické dráhy obchází endoplazmatické retikulum (ENR) a golgiho aparát (GA). Nekonvenčních sekrečních drah je několik typů, přičemž IL- 1β je translokován pomocí sekrece zprostředkované autofagií. Donedávna nebylo jasné, jak IL- 1β vstupuje do autofagosomu. Zhang et. al se zabývali bližšími detaily této dráhy a zjistili, že když byla autofagie spuštěna hladověním, sekrece IL- 1β byla posílena, naopak když byla autofagie inhibována, docházelo k hromadění IL- 1β uvnitř buňky a protein nemohl být sekretován. Přišli také na to,

že IL-1 β není pohlcen do stejného útvaru jako materiál určený k odstranění, ale vstupuje do menších vesíklů, které se promění v autofagosom. Na IL-1 β se váže protein HSP90, který mu umožňuje se translokovat do váčku a IL-1 β tak spočívá v prostoru mezi vnitřní a vnější membránou autofagosomu. Nicméně spousta detailů, co se sekrece IL-1 β týče ještě není známo a toto téma vyžaduje další výzkum. (Zhang a kol., 2015)

2.3 IL-6

IL-6 je glykoprotein o molekulové hmotnosti 21 kDa produkovaný velkým množstvím buněk především makrofágy, dendritickými buňkami, lymfocyty, endoteliálními buňkami, fibroblasty a buňkami hladkých svalů. Jeho produkci vyvolává stimulace LPS, IL-1 a TNF- α . Zvýšená koncentrace IL-6 je měřena u mnoha akutních stavů jako je například sepsa.

Jeho funkcí je aktivace T a B-lymfocytů, aktivace koagulačního systému, modulace hematopoézy, stimulace sekrece imunoglobulinu (Ig). (Papanicolaou a kol., 1998)

Je schopný průchodu přes hematoencefalickou bariéru a iniciace syntézy prostaglandinu E v hypotalamu, který posléze stimuluje termoregulační centrum a navozuje horečku. Jeho hlavní funkcí je zprostředkování reakce akutní fáze a systémové reakce na zánětlivý stimul, jako je horečka, leukocytóza a uvolnění proteinů akutní fáze jako jsou feritin, fibrinogen, C-reaktivní protein (CRP) a komponenty komplementu. (Hořejší a kol., 2013)

IL-6 kromě zánětlivé reakce podporuje i protizánětlivou tím, že inhibuje uvolňování IL-1 a TNF- α a zvyšuje hladinu protizánětlivých mediátorů jako je IL-1Ra, interleukin 10 (IL-10), sTNFRs (inhibitor TNF- α) a kortizolu (viz Papanicolaou a kol., 1998).

3. Imunochemické metody

Jsou to metody, které jsou založeny na interakci antigen-protilátka. Pomocí imunochemických metod zjišťujeme, zda vzorek obsahuje specifické protilátky proti danému antigenu. Antigen je makromolekulární látka, která je organismem rozpoznána jako cizí a navozuje imunitní odpověď. Po rozpoznání antigenu dochází ke stimulaci B-lymfocytů, které se nakonec diferencují v plazmocyty sekretující protilátky. Protilátka se poté váže na antigen a spouští imunitní reakci.

Produkce cytokinů z T-lymfocytů jako odpověď na antigenní stimulaci může být měřena buď jako celková produkce v supernatantu pomocí metody ELISA, či pomocí kvantifikace jednotlivých T-lymfocytů produkujících cytokiny pomocí metody ELISPOT. (Bartůňková a kol., 2011)

3.1 ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) je jedna z nejpoužívanějších imunochemických metod sloužících k detekci různých analytů (protilátek nebo antigenů). Ke značení protilátky se využívá enzym nejčastěji křenová peroxidáza) navázaný na fc fragment protilátky. Reakce enzymu se substrátem se projeví vznikem barevného produktu. Výsledná detekce intenzity barevného produktu se stanovuje pomocí spektrofotometru.

Pro průkaz antigenů a specifických protilátek existují různé modifikace ELISA testu.

3.1.1 Sendvičová ELISA

Pevný nosič, většinou jamka polystyrenové destičky je pokryta specifickou protilátkou, na kterou se vyváže antigen z vyšetřovaného vzorku. Po promytí se na antigen váže druhá protilátka, která je konjugovaná s enzymem. Po promytí se do jamky přidá substrát, který reaguje s enzymem a tím změní svoji barvu. Výsledné zabarvení konečného produktu je přímo úměrné koncentraci antigenu ve vzorku. Hodnocení výsledku je provádí podle kalibrační křivky ze standardů o známé koncentraci.

3.1.2 Nepřímá sendvičová ELISA

V tomto případě nejsou detekční protilátky značené enzymem, ale nesou molekulu se specifickou vazebnou kapacitou pro jinou molekulu. Jako nejčastější marker se používá biotin, který má vazebné místo pro avidin. Po přidání komplexu avidin a enzym dochází k jeho navázání na biotin, čímž vznikne enzymatická protilátka a to se projeví přeměnou substrátu na barevný produkt.

3.1.3 Kompetitivní ELISA

Na pevný nosič jsou navázány antigeny. Do jamky jsou společně přidány enzymaticky značené protilátky i vzorek a jsou-li ve vzorku zkoumané antigeny, nastává kompetice o vazebná místa. Značené protilátky se přednostně váží na

antigeny ve vzorku. Během promývání je komplex antigen protilátka odstraněn. Oproti výše zmíněným metodám, zde se pozitivní průkaz zkoumaných antigenů ve vzorku projeví velmi slabým nebo žádným zbarvením.

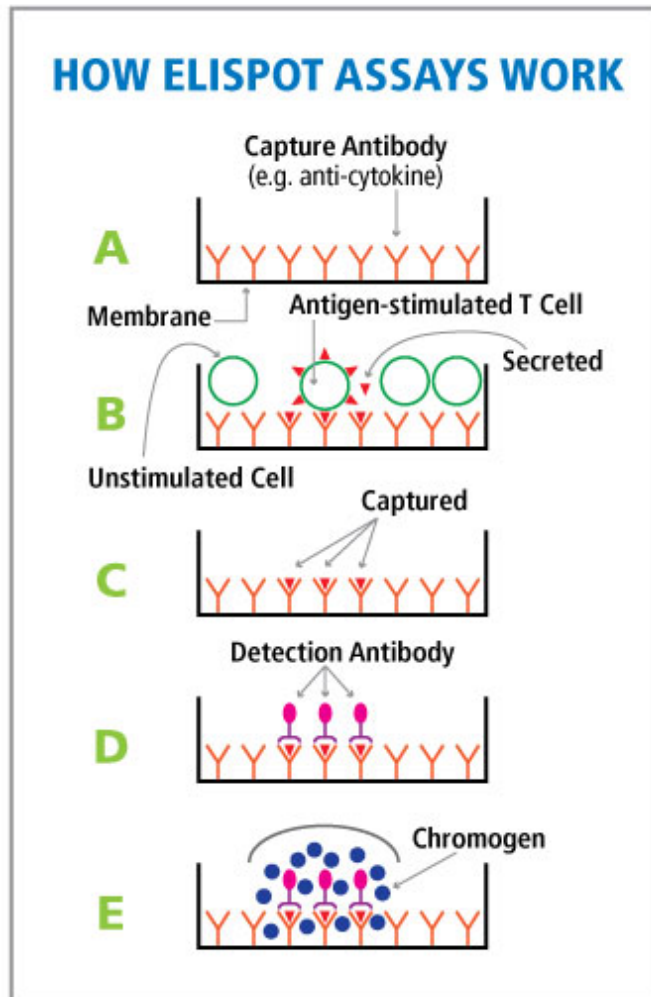
Velkou výhodou této metody je její jednoduchost a rychlost – provedení testu trvá 2 až 3 hodiny. ELISA metody mají dostatečnou specifitu a citlivost v řádu pikogramů/mililitr díky používaným protilátkám, které mají vysokou afinitu k cílovým antigenům. (Toman, 2000)

3.2 ELISPOT

Enzyme-linked immunospot (ELISPOT) je metoda, která byla původně vyvinutá pro detekci B lymfocytů produkujících protilátky pro určitý antigen. Dnes už je vyvinutá i pro detekci T-lymfocytů produkujících cytokiny. (Protocol Online)

Test pro cytokiny je navržený tak, aby umožnil zjistit počet buněk sekretujících cytokiny v buněčné suspenzi. Výhodou této metody je, že detekuje pouze aktivované T lymfocyty, tudíž uvolňování cytokinů je detekováno na úrovni jednotlivých buněk, což umožňuje přímé stanovení frekvence T-lymfocytů. (ELISPOT)

Vyhodnocení výsledků je možné provádět manuálně pomocí inverzního mikroskopu, ovšem při větším počtu vzorků je to časově náročné. Při vyhodnocování většího množství vzorků lze použít automatický přístroj – ELISPOT reader, který vyhodnocuje vzorky na základě digitální analýzy obrazu.

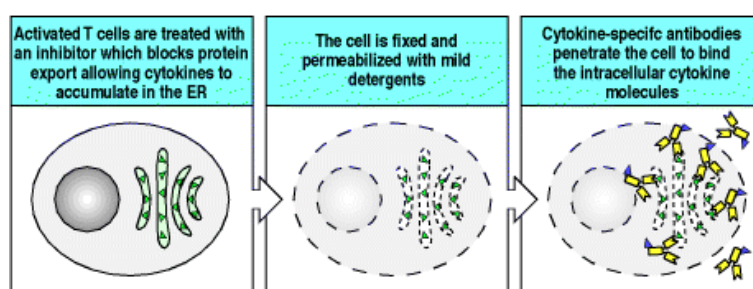


Obrázek 3.1: A) Polyvinil-difluoridová (PVDF) membrána je pokryta primární specifickou protilátkou B) Čerstvě izolované, rozmražené či kultivované buňky jsou umístěny společně s antigeny a inkubovány, aby proběhla aktivace T-lymfocytů specifických pro antigen a aby byla indukována sekrece cytokinů C) Buňky jsou vymyty z místičky a zůstává analyt navázaný na protilátku D) Je přidána detekční protilátka, která je specifická pro jiný determinant analytu. Protilátka může být buď značena přímo, nepřímo či prostřednictvím streptavidin-biotin interakce E) Přidání chromogenu vede k rozvoji enzymem katalyzované reakce v reakčním místě a místo, kde T-lymfocyt produkovat detekovaný cytokin se projeví jako barevný bod na dně jamky Zdroj: Immunospot

4. Průtoková cytometrie

4.1 Metody detekce intracelulárních cytokinů

Největším problémem při detekci intracelulárních cytokinů je, že jsou uvolňovány z buněk ven, čímž se ztrácí přehled o tom, která buňka imunitního systému produkuje daný cytokin. Export proteinů se musí nejprve inhibovat a následně dochází k akumulaci cytokinů ve vezikulárním aparátu. Buňky jsou poté fixovány, permeabilizovány a poté dochází k průniku specifických protilátek do kompartmentů (viz. 4.1).



Obrázek 4.1: Zdroj: Janeway (2013)

4.2 Průtoková cytometrie

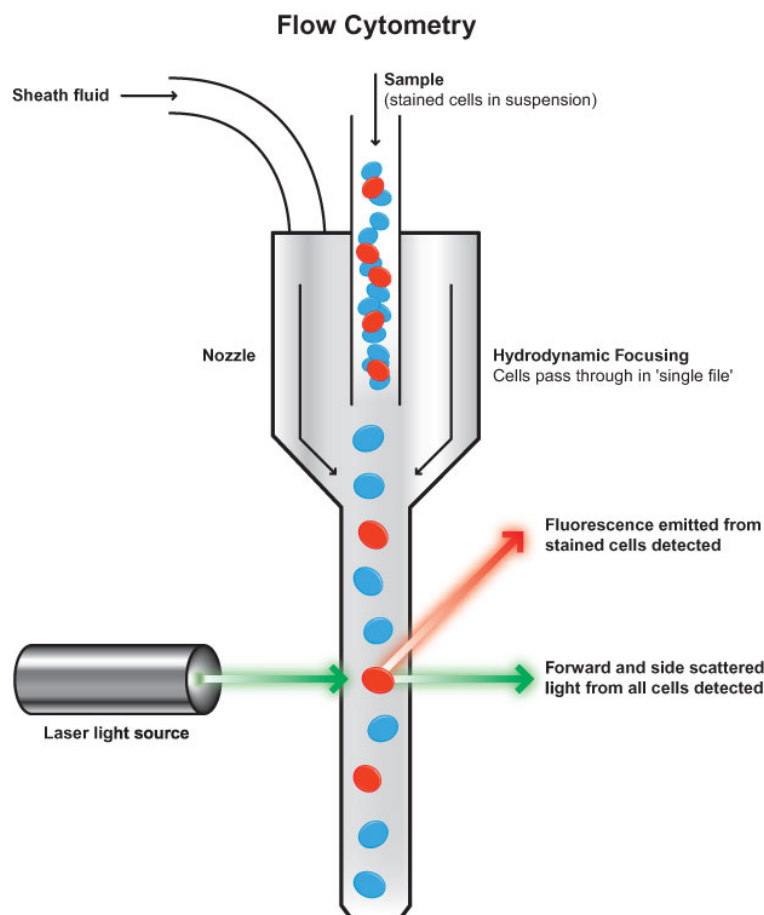
Průtoková cytometrie je moderní přístrojová metoda, která je využívána jak ve výzkumných laboratořích, tak i v klinické praxi ke stanovení frekvence různých buněčných populací v krvi. Měřený vzorek obsahuje suspenzi buněk ve fyziologickém roztoku.

Ve fluidické části průtokového cytometru je laminární tekutina pomocí hydrodynamické fokusace usměrněna tak, aby za sebou byly popouštěny jednotlivé buňky. Fyzikální a chemické vlastnosti buněk jsou měřeny pomocí průchodu laserového paprsku a na základě jeho odklonu jsme schopni určit granularitu a velikost buněk.

Suspenzi buněk lze označit monoklonálními protilátkami s navázaným fluorochromem, který je excitovaný pomocí procházejícího laserového paprsku. Fluorochrom následně emituje světlo specifické vlnové délky, které je detekováno a kvantifikováno a které je přímo úměrné množství navázané protilátky.

4.3 Intracelulární barvení cytokinů

Intracelulární barvení cytokinů (ICS) je rozšířená metoda založená na průtokové cytometrii, která detekuje produkci, resp. nárůst intracelulární koncentrace cytokinů po stimulaci. Pro intracelulární detekci je výhodné zablokovat transport cytokinů z buňky pomocí inhibitorů transportu proteinů (Brefeldin A, monensin). To umožňuje zadržení cytokinů v buňce a jejich následnou detekci pomocí specifických protilátek. (Preffer a Dombkowski, 2009)



Obrázek 4.2: Vzorek vstupuje do průtokové komory přiváděcí jehlou. Unášecí tekutina je do komory vháněna pod vyšším tlakem než vzorek, čímž je docíleno toho, aby se vzorek s buněčnou suspenzí pohyboval jen v úzké centrální oblasti vodního sloupce (hydrodynamická fokusace). Zúžení a zrychlení u výtokového otvoru komory je takové, aby v centru vodního sloupce ideálně procházela vždy jedna buňka. Na vodní sloupec poté působí laserový zdroj excitačního světla, jehož vlnová délka je nastavena tak, aby excitovala fluorochromy, kterým je buněčná suspenze označena. Zdroj: Flow Cytometry

Vzhledem k tomu, že průtoková cytometrie umožňuje vybrání (tzv. gating) zkoumaného typu buněk, lze ji aplikovat na celou buněčnou populaci, přičemž lze získat podrobné informace o jejich podskupinách. K analýze používáme buď plnou krev, nebo izolovanou mononukleární frakci. Mononukleární frakce je získána pomocí centrifugace v hustotním gradientu (Ficoll-Paque). (Nomura a kol., 2008)

Výhodami průtokové cytometrie je rychlost této metody, velké množství analyzovaných buněk a relativní finanční nenáročnost.

4.4 Vzorky a jejich zpracování

Stanovení buněk produkujících cytokiny se provádí přímo ze vzorků heparinizované periferní krve. Při stanovení intracelulární produkce cytokinů je třeba vybrat stimulant podle toho, u které buněčné populace stanovení provádíme. Pro

stimulaci T-lymfocytů k produkci cytokinů se využívá nejčastěji kombinace phorbol myrystát acetátu (PMA) a ionomycinu (IM). PMA/IM je extrémně silný stimulator a proto není třeba před jeho použitím přidávat kostimulátory (viz Gauduin, 2006). Ke stimulaci monocytů k produkci cytokinů se používají TLR ligandy. Při in vitro stimulaci je nezbytné zablokovat sekreci cytokinů pomocí inhibitorů. Nejčastěji se využívá buď Brefeldin A (BFA), který narušuje strukturu a funkci GA, čímž inhibuje sekreci cytokinů přes buněčnou membránu. Dalším často používaným inhibitorem je monensin, který narušuje funkci ENR, což vede k akumulaci cytokinů v GA a ENR (viz Jung a kol., 1993). Po přidání inhibitorů sekrece jsou vzorky inkubovány 4-6 hodin v závislosti na použité látce a na detekovaném cytokinu a na buněčné populaci, na které je pokus prováděn.

4.5 Příprava vzorků pro průtokovou cytometrii

Značení buněk monoklonálními protilátkami se provádí ve dvou fázích. V první fázi jsou naznačeny povrchové antigeny, ve druhé fázi se provádí permeabilizace buněk a následné intracelulární značení cytokinů.

Počet a typ použitých flouorchromů by měl být navržen tak, aby byla citlivost metody co nejvyšší. Je možné použít i několik různých flouorchromů zároveň, kdy každý z nich může mít stejnou excitační, ale jinou emitující vlnovou délku, což umožňuje simultánní měření různých parametrů zároveň. Nejsilnější fluorochromy (např. fykoerythrin (PE)) by měly být použity k označení proteinů, které mají nejnižší expresi, například pro cytokiny. (Horton a kol., 2007)

4.6 Analýza výsledků

Signál, který vzniká interakcí fotonů s analyzovanými částicemi, je poté detekován dvěma způsoby v závislosti na jeho hodnotách. Signál vyšší intenzity, který je generovaný rozptylem fotonů v přímém směru (tzv. forward scatter, FSC) je měřený fotodiodou a intenzita je přímo úměrná velikosti buňky. Signál nižší intenzity je generovaný bočním rozptylem (tzv. side scatter SSC) a proto je třeba jeho intenzitu znásobit fotonásobičem. Intenzita paprsků SSC je přímo úměrná granularitě buněk. Podle FCS lze od sebe odlišit živé a mrtvé buňky a pomocí SSC granulozní a agranulozní buňky. Signály z optiky cytometru jsou převedeny na elektrické impulsy a dále zpracovány počítačovým programem. Při zpracování je ještě třeba provést kompenzaci přesvitu flouorchromů a odstranit případy, kdy byly měřeny dvě buňky najednou. Výsledky jsou pak vyjádřeny pomocí dot plotů, kde je vybrána pomocí gatování populace buněk, která se bude dále analyzovat pomocí dot plot histogramu, kde jsou vyneseny parametry, které jsou oblastí výzkumu. (Bernard)

Závěr

I přes roky intenzivního výzkumu sepse její patofyziologie stále není zcela prozkoumána. Z důvodu, že sepsa je dynamický a komplexní proces, který ovlivňuje heterogenní skupinu pacientů s různými příčinami onemocnění, není specifická anticytokinová léčba zatím v klinických testech úspěšná. Nicméně studie odhalily důležitou regulační úlohu pro a protizánětlivých cytokinů v patofyziologii sepse, ovšem je nutný další výzkum.

V této práci jsem se snažila porovnat nejčastější metody stanovení intracelulární cytokinů, zjistit jejich výhody či naopak nevýhody, porovnávala jsem hlavně imunochemické metody s průtokovou cytometrií.

ELISA metoda je citlivější než ICS a umožňuje výpočet množství produkováných cytokinů. Je ovšem finančně náročnější a neumožňuje detekci více typů cytokinů v rámci jednoho experimentu. ICS je tak v současné době jediná metoda, která umožňuje současně výpočet antigen specifických T lymfocytů a určení jejich fenotypu. Probíhá neustálý vývoj nových činidel a fluorochromů, jejichž použití v průtokové cytometrii umožňuje získat tolik nových informací, že jeho optimální citlivost je považována za nevýrazný problém.

Seznam použité literatury

- AIKAWA, N. (1996). Cytokine storm in the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome associated with surgical insults. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*, **97**(9), 771–777.
- AKIRA, S., UEMATSU, S. a TAKEUCHI, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**(4), 783–801.
- BARTŮŇKOVÁ, J., MILAN, P. A KOL. (2011). *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. přepracované vydání. Grada Publishing, Praha. ISBN 978-80-247-3533-7.
- BERNARD, V. *Průtoková cytometrie: flow-cytometrie*. Biofyzikální ústav LF Masarykovy univerzity, Brno. URL http://www.med.muni.cz/biofyz/files/gerontologie/prutokova_cytometrie_prezentace.pdf.
- BONE, R. C., BALK, R. A., CERRA, F. B. A KOL. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, **101**(6), 1644–1655.
- COHEN, I., RIDER, P., CARMİ, Y., BRAİMAN, A., DOTAN, S., WHITE, M. R., VORONOV, E., MARTIN, M. U., DINARELLO, C. A. a APTE, R. N. (2010). Differential release of chromatin-bound IL-1 α discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**(6), 2574–2579.
- CONTASSOT, E., BEER, H. D. a FRENCH, L. E. (2012). Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Medical Weekly*, **142**, w13590.
- DAS, U. N. (2013). Is sepsis a pro-resolution deficiency disorder. *Medical Hypotheses*, **80**(3), 297–299.
- ELISPOT. ELISPOT. <https://www.ucytech.com/elispot>. 10.8.2016.
- Flow Cytometry. Flow Cytometry. <http://flowcytometry.med.ualberta.ca/>. 10.8.2016.
- GAUDUIN, M. C. (2006). Intracellular cytokine staining for the characterization and quantitation of antigen-specific T lymphocyte responses. *Methods*, **38**(4), 263–273.
- HANSEN, J. D., VOJTECH, L. N. a LAING, K. J. (2011). Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. *Developmental and Comparative Immunology*, **35**(9), 886–887.
- HORTON, H., THOMAS, E. P., STUCKY, J. A., FRANK, I., MOODIE, Z., HUANG, Y., CHIU, Y. L., McELRATH, M. J. a DE ROSA, S. C. (2007).

- Optimization and validation of an 8-color intracellular cytokine staining (ICS) assay to quantify antigen-specific T cells induced by vaccination. *Journal of Immunological Methods*, **323**(1), 39–54.
- HOTCHKISS, R. S. a OPAL, S. (2010). Immunotherapy for sepsis—a new approach against an ancient foe. *The New England Journal of Medicine*, **363**(1), 87–89.
- HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J., BRDIČKA, T. a SPÍŠEK, R. (2013). *Základy imunologie*. 5. vydání. TRITON, Praha. ISBN 978-80-7387-713-2.
- Immunospot. How ELISPOT Assays Work. <http://www.immunospot.com/index.php?id=514>. 8.8.2016.
- JANEWAY, C. A. (2013). *Immunobiology*. 5th edition. ISBN 978-0815336426.
- JR., C. J. F., M. AGOSTI, J., OPAL, S. M. A KOL. (1996). Treatment of septic shock with tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein, The soluble TNF receptor study group. *The New England Journal of Medicine*, **334**(26), 1697–1702.
- JUNG, T., SCHAUER, U., HEUSSER, C., NEUMANN, C. a RIEGER, C. (1993). Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, **159**(1-2), 197–207.
- JUNGER, W. G., HOYT, D. B., LIU, F. C., LOOMIS, W. H. a COIMBRA, R. (1996). Immunosuppression after endotoxin shock: the result of multiple anti-inflammatory factors. *The Journal of Trauma*, **40**(5), 702–709.
- LEE, S. a MARGOLIN, K. (2011). Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers*, **3**(4), 3856–3893.
- LOCKSLEY, R. M., KILLEEN, N. a LENARDO, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, **104**(4), 487–501.
- MARTINON, F., BURNS, K. a TSCHOPP, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular Cell*, **10**(2), 417–426.
- NOMURA, L., MAINO, V. C. a MAECKER, H. T. (2008). Standardization and optimization of multiparameter intracellular cytokine staining. *Cytometry, Part A*, **73**(11), 984–991.
- O’NEILL, L. A. (2008). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunological Reviews*, **226**, 10–18.
- PAPANICOLAOU, D. A., WILDER, R. L., MANOLAGAS, S. C. a CHROUSOS, G. P. (1998). The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Annals of Internal Medicine*, **128**(2), 127–137.
- PREFFER, F. a DOMBKOWSKI, D. (2009). Advances in complex multiparameter flow cytometry technology: Applications in stem cell research. *Cytometry, Part B*, **76**(5), 295–314.

- Protocol Online. The usage of ELISPOT techniques to measure Cytokines. <http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/ELISPOT-3456.html>. 10.8.2016.
- RIVERS, E., NGUYEN, B., HAVSTAD, S. A KOL. (2011). Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *The New England Journal of Medicine*, **345**(19), 1368–1377.
- SCHULTE, W., BERNHAGEN, J. a BUCALA, R. (2013). Cytokine in sepsis: Potent Immunoregulator and Potential Therapeutic targets – An update view. *Mediators of inflammation*.
- SO, A. a BUSO, N. (2009). A magic bullet for gout? *Annals of the Rheumatic Diseases*, **68**(10), 1517–1519.
- SWEEP, F., GREBENITCHOV, N. A KOL. (2007). Association between high level of blood macrophage migration inhibitory factor, inappropriate adrenal respons, and early death in patients with severe sepsis. *Clinical infectious diseases*, **44** (10), 1321–1328.
- TOMAN, M. (2000). *Veterinární imunologie*. KOSMAS, Praha.
- VAN DER POLL, T. a VAN DEVENTER, S. J. (1999). Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infectious disease clinics of North America*, **13** (2), 413–426.
- ZHANG, M., KENNY, S. J., GE, L., XU, K. a SCHEKMAN, R. (2015). Translocation of interleukin-1beta into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion. *eLife*, **4**.

Seznam použitých zkratek

ACCP	American College of Chest Physicians
BFA	Brefeldin A
CRP	C-reaktivní protein
DAMP	damage associated molecular patterns
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunospot
ENR	endoplazmatické retikulum
FSC	forward scatter
GA	golgiho aparát
HSP90	heat shock protein - protein teplotního šoku
ICS	intracelulární barvení cytokinů
IFN- γ	interferom γ
Ig	imunoglobulin
IL-1	interleukin 1
IL-10	interleukin 10
IL-12	interleukin 12
IL-1R1	IL-1 receptor typu 1
IL-1Ra	IL-1 receptor antagonist
IL-1RAcP	IL-1 receptor accessory protein
IL-1 α	interleukin 1 α
IL-1 β	interleukin 1 β
IL-4	interleukin 4
IL-6	interleukin 6
IM	ionomycin
IRAK	IL-1R1-associated kinase
kDa	kilodalton
LPS	lipopolysacharid
MIF	migration inhibitory factor
MODS	multiple organ dysfunction syndrome
mRNA	mediatorová RNA
NF- κ B	jaderný transkripční faktor κ B
NLR	NOD-like receptor
NLRP1	NLR family pyrin domain containing 1
NO	oxid dusnatý
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PE	fykoerythrin
PMA	phorbol myrystát acetátu
ppIL-1 α	prekurzor IL-1 α
PRR	pattern recognition receptor
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	systemic inflammatory response syndrom
SSC	side scatter

sTNFRs	inhibitor TNF- α
T _h	pomocné lymfocyty
T _h -1	subpopulace pomocných lymfocytů T _h
TGF- β	transforming growth factor- β
TLR	Toll-like receptor
TLR-4	poddruh TLRs
TNFR1	tumor necrosis factor receptor 1
TNFR2	tumor necrosis factor receptor 2
TNF- α	tumornekrotizující faktor α