

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Imunologie



Bc. Michaela Hornová

Funkce slizniční bariéry střeva: metodiky a možnosti ovlivnění

Function of gut mucosal barrier: methodology and modulation

Diplomová práce

Školitel: prof. MUDr. Helena Tlaskalová, DrSc.

Praha, 2012

Prohlášení

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

V Praze, 3. září 2012

Podpis

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat zejména své školitelce prof. MUDr. Heleně Tlaskalové, DrSc., za její vlídný přístup, výborné odborné vedení, rady, velikou trpělivost a morální podporu.

Dále bych chtěla velice poděkovat všem spolupracovníkům a kolegům z naší laboratoře – nejvíce MUDr. Miloslavu Kverkovi PhD., RNDr. Kláře Klimešové a RNDr. Zuzaně Zákostelské za podporu, hodnotné a vyčerpávající rady, trpělivost, ochotu a veškerou odbornou pomoc.

Zvláště bych chtěla poděkovat RNDr. Jiřímu Hrdému za jeho čas, odbornou pomoc a pečlivé rady při provedení a zpracování RT-PCR na pracovišti Ústavu imunologie a mikrobiologie, 1. lékařské fakulty UK v Praze, kde mi bylo umožněno provedení této metodiky.

Dále děkuji také kolegům na pracovišti v Novém Hrádku za možnost uskutečnění mého experimentu a poskytnutí bezmikrobních myší.

V neposlední řadě děkuji všem ostatním spolupracovníkům z MBÚ. Můj dík patří i Honzovi a mé rodině zejména tátovi, sestře a babičce a naší staré 13,5 leté labradorce Elli, která se pro sníženou pohyblivost ocitla u mě v pokoji v Praze, a byla přítomna celému psaní diplomové práce.

Diplomová práce vznikla za podpory grantu: P303/12/0535 - Mechanismy ovlivnění zánětu, metabolismu a farmakokinetiky léčiv kmenzálními a probiotickými bakteriemi (GAČR)

OBSAH

ABSTRAKT.....	4
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
1. ÚVOD.....	10
2. PŘEHLED LITERATURY.....	12
2.1. Střevo.....	12
2.1.1. Slizniční bariéra.....	12
2.1.2. Těsná spojení (tight junctions, TJs).....	13
2.1.3. Okludin.....	14
2.1.4. Klaudin.....	15
2.1.5. Adhezivní molekuly tvořící spoje (Junctional adhesion molecules - JAMs).....	16
2.1.6. Adaptorové proteiny těsných spojů.....	16
2.1.7. Adherentní spojení (Zonula adherens, AJs).....	17
2.2. Dysregulace těsných spojení.....	18
2.2.1. Exogenní regulace intestinální bariéry.....	18
2.2.1.1. Nesteroidní antirevmatika (NSAID).....	19
2.2.1.2. Alkohol.....	19
2.2.1.3. Bakteriální osídlení.....	19
2.2.1.4. Patofyziologie epiteliální bariéry.....	20
2.2.1.5. Potravinové alergie.....	21
2.2.1.6. Idiopatické střevní záněty (Inflammatory bowel diseases IBDs).....	21
2.2.1.7. Celiakie.....	22
2.2.1.8. Zonulin.....	23
2.2.1.9. Obezita.....	24
3. MATERIÁLY A METODY.....	25
3.1. Roztoky.....	25
3.2. Experimentální zvířata.....	28
3.3. Buněčné linie.....	29
3.3.1. Myší buněčná linie.....	29
3.3.2. Lidské buněčná linie.....	29
3.3.3. Kultivace buněčných linií.....	29
3.3.3.1. Rozmrazování buněk.....	29
3.3.4. Pasážování.....	30
3.3.5. Zamrazování.....	30
3.4. Kultivace bakterií.....	30
3.4.1. Bordetella pertussis.....	30
3.4.2. Příprava bakteriálního lyzátu Lactobacillus casei.....	30
3.5. Imunofluorescence.....	31
3.6. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	32
3.7. Barvení buněk podle Grama.....	33
3.8. Průtoková cytometrie.....	33
3.9. Stanovení střevní propustnosti pomocí FITC-DEXTRAN.....	34
3.10. Navození septického šoku intraperitoneálním podáváním LPS.....	34
3.11. ADJUVANS.....	34
3.12. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	35
3.13. Použité chemikálie.....	36
3.14. Použité programy a přístroje.....	37

4.	VÝSLEDKY	38
4.1.	Měření střevní bariérové funkce u myši	38
4.1.1.	Zavedení metody pro měření střevní propustnosti pomocí podání FITC-dextranu u myši	38
4.1.2.	Srovnání metody FITC-dextranu s expresí mRNA pro IL- 6 (prozánětlivý cytokin) a proteinů těsných spojů pro měření střevní propustnosti.	40
4.1.2.1.	Střevní propustnost u myši s vyvolaným septickým šokem	41
4.1.2.2.	Stanovení exprese mRNA IL-6, iNOS, ZO-1, klaudinu a okludinu pomocí RT-PCR ve střevní tkáni myši se septickým šokem a myši kontrolních	42
4.1.3.	Vliv probiotických bakteriálních komponent na střevní bariérovou funkci	45
4.1.4.	Vliv adjuvans na střevní propustnost	49
4.1.5.	Měření střevní propustnosti u bezmikrobních a konvenčních myši	52
4.2.	Využití myši epitelové linie pro studium efektu LPS a gliadinu	55
5.	DISKUZE.....	58
6.	ZÁVĚR	62
	CITACE:	63

ABSTRAKT

Funkce slizniční bariéry střeva: metodiky a možnosti ovlivnění

Správné fungování střevní bariéry je esenciální pro udržení rovnováhy vnitřního prostředí organismu a zároveň plní funkci mechanické izolace před průnikem makromolekulárních substancí a mikrobů ze zevního prostředí. Poškozená sliznice střeva tedy dostatečně nebrání průchodu infekčních mikroorganismů, antigenů ze stravy, bakterií, virů a xenobiotik do subepiteliálních vrstev střeva jako to zvládá zdravá slizniční bariéra. Nadměrná interakce mezi pohlcenými antigeny z lumen střeva a imunitním systémem může vést k imunologicky mediovanému poškození organismu. Porušená bariéra střeva hraje významnou roli v patogenezi zánětlivých a autoimunitních onemocnění, kterými jsou například idiopatické střevní záněty, diabetes, celiakie nebo revmatoidní artritida.

Cílem práce bylo zavést metody pro měření střevní propustnosti, které vypovídají o poškozené bariéře střeva. Měřením střevní propustnosti pomocí podávání 4,4 kDa FITC-dextranu jsme stanovili míru poškození způsobenou indomethacinem (nesteroidní antiflogistikum), alkoholem a bakteriálním LPS. Dále jsme hodnotili změny v kvantitativní expresi genů pro proteiny těsných spojů, IL-6 a iNOS u myši po intraperitoneálním podání LPS, který vyvolal septický šokový stav. Dalším cílem bylo zjistit působení probiotických bakteriálních komponent na střevní bariérovou funkci.

Na myším modelu DSS kolitidy jsme zjistili, že preventivní podávání lyzátu probiotické bakterie *L. casei* zlepšuje stav střevní bariéry. Imunofluorescencí jsme prokázali, že produkce a lokalizace proteinů těsných spojů zůstává po podání lyzátu *L. casei* zachována v podobné míře jako u zdravých myši. Tyto výsledky jsme poté ověřili pomocí RT-PCR. Dále jsme porovnali střevní propustnosti dospělých a kojených bezmikrobních myši po podání indomethacinu. Nenašli jsme rozdíl v propustnosti mezi dospělými myšmi chovanými v konvenčních a bezmikrobních podmínkách, avšak u bezmikrobních mláďat byly hodnoty střevní propustnosti statisticky signifikantně zvýšeny oproti konvenčním mláďatům.

Závěr: Výsledky ukazují na význam střevní bariéry, která bývá poškozena na počátku mnoha zánětlivých a imunitním systémem mediovaných onemocnění. Prozkoumání vnějších vlivů a nalezení látek ovlivňujících střevní propustnost a

pochopení mechanismů jejího poškození nám může pomoci v objasnění prevence i v úspěšné léčbě. Například vliv lyzátu probiotické bakterie *L. casei* na posílení střevní bariéry byl ověřen v experimentálním modelu DSS kolitidy. Naše výsledky ukazují, že kolonizace gastrointestinálního traktu ovlivňuje střevní propustnost, která se mění již brzy po narození.

Klíčová slova: bariérová funkce střeva, probiotika, střevní propustnost, FITC-dextran, bezmikrobní myši, LPS, septický šok, indomethacin

ABSTRACT

Function of gut mucosal barrier: methodology and modulation

Right function of the intestinal barrier is essential for maintaining the homeostasis of the inner environment and it serves as a mechanical barrier against penetration of macromolecular compounds and microbes from outer environment. Impaired gut mucosa cannot effectively protect from invasion of infectious microorganisms, antigens from food, bacteria, viruses and xenobiotics into the subepithelial gut layer. Excessive interaction among the immune system and antigens from intestinal lumen can lead to immune mediated damage of the organism. Damaged intestinal barrier plays an important role in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases, like inflammatory bowel disease, diabetes, celiac disease and rheumatoid arthritis.

The aim of this study was to define methods for measuring intestinal permeability, which would reflect the gut barrier damage. We were trying to detect the gut damage caused by indomethacin (non-steroidal anti-inflammatory drug), alcohol and bacterial LPS by measuring the intestinal permeability for 4,4 kDa FITC-dextran. We were also evaluating changes in gene expression of tight junction proteins, IL-6 and iNOS in mice after intraperitoneal administration of LPS, which induces septic shock. Another goal was to evaluate the effect of probiotic bacteria components on the intestinal barrier function.

On mice model of DSS colitis we have found out, that preventive administration of probiotic bacteria *L. casei* ameliorates the state of intestinal barrier. We have proved using the immunofluorescence method that production and localization of tight junction proteins remains the same in the group with *L. casei* as in the healthy mice. These results were confirmed by RT-PCR. Further we have compared the intestinal permeability of adult and young breast feeding germ free mice after administration of indomethacin. There was no statistically significant difference in permeability among adult mice, however there was a statistically significant difference in increased intestinal permeability in young germ free mice compared to conventional young mice.

Conclusion: Results are showing the importance of the intestinal barrier and its damage stands at the beginning of many inflammatory and immune system mediated diseases. Further analyzing of environmental factors and searching for compounds which could influence the intestinal permeability and understanding the mechanisms of its damage can help in prevention and successful treatment. For example a lysate of probiotic bacteria *L. casei* is improving the intestinal barrier, it was confirmed in experimental model of DSS colitis. Our results show that the bacterial colonization of gastrointestinal tract can influence the intestinal permeability, which changes soon after birth.

Key words: intestinal barrier function, probiotics, intestinal permeability, FITC-dextran, germ free mice, LPS, septic shock, indomethacin

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AJs	Adherentní spojení (Zonula adherens)
APC	buňka prezentující antigen
BALB/c	imbrední myší kmen
BSA	sérový bovinní albumin
CD	Crohnova choroba
CXCR3	chemokinový receptor
DMSO	dimethylsulfoxid
DSS	dextran sulfát sodný
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	průtokový cytofluorometr
FBS	fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)
FGÚ	Fyziologický ústav
GUK	guanylát kináza
HRP	křenová peroxidáza
IBD	nespecifické střevní záněty
IgA	imunoglobulin třídy A
IgM	imunoglobulin třídy M
IL	interleukin
iNOs	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
JAM	adhezivní molekuly tvořící spoje (junctional adhesion molecules)
kDa	kilodalton
LC	Lactobacillus casei DN114001
LPS	lipopolysacharid
MLC	myosinový lehký řetězec
NO	oxid dusnatý
NSAID	nesteroidní antiflogistikum
PBS	fosfátový fyziologický roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
sIgA	sekreční IgA (slizniční)
STAT3	signální převaděč a aktivátor transkripce 3
TJs	těsná spojení (tight junctions)

TLR	receptory rodiny Toll
TMB	3,3,5,5-tetramethylbenzidin
ÚMG AV ČR	Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky
ZO	zonula occludens

1. ÚVOD

Jednou z hlavních funkcí střeva je jeho schopnost vytvářet bariéru mezi vnitřním a zevním prostředím. Střevní epitelová bariéra je stabilizována především pomocí mezibuněčných těsných spojů, které jsou důležitými strukturálními znaky paracelulárního transportu. Nepoškozená střevní epitelová vrstva je kritickým parametrem chránící organismus před proniknutím patogenních bakterií a toxických antigenů např. endotoxinů. Porušení těsných spojů vede ke zvýšené střevní permeabilitě a ke zvýšenému průniku bakterií do organismu. Těsné spoje jsou specializované komplexní struktury složené z mnoha proteinů mezi něž patří například integrální membránový protein okludin, zástupci kladinové rodiny a zonula occludens (ZO). Poškozená těsná spojení hrají také významnou úlohu při vzniku různých onemocnění např. diabetu, celiakie, idiopatických zánětů střevních a mikrobiálních infekcí.

Tato diplomová práce je zaměřena na funkci slizniční bariéry střeva, především se zabývá zvýšenou střevní propustností, přítomností mikrobů a fungování střevní bariéry u bezmikrobních a konvenčních myší.

Cíle diplomové práce:

- Zavedení metody pro měření bariérové funkce střeva u myší
- Srovnání zavedené metody pro měření střevní propustnosti s kvantitativní genovou expresí proteinů těsných spojů ve střevní tkáni myší
- Stanovení vlivu probiotických bakteriálních komponent na střevní bariérovou funkci (změny v kvantitativní genové expresi a střevní propustnosti, imunohistologické srovnání)
- Zjištění působení adjuvans na střevní propustnost
- Porovnání střevní propustnosti bezmikrobních myší oproti myším konvenčním

2. PŘEHLED LITERATURY

2.1. Střevo

Střevo je nejdelší část trávicí trubice, plynule navazuje na žaludek v části vrátníku a je ukončeno řitním otvorem. Tento orgán při trávení a vstřebávání potravy přichází do úzkého kontaktu jak s vnějším prostředím, tak s faktory vlastního trávicího procesu (proteolytické enzymy, fosfolipázy, kyselé prostředí), proti kterým musí být odolný. Kontakt sliznice s různými látkami, rozličnými antigeny, léky, alergeny i bakteriemi a toxiny z potravy umožňuje spouštět a ovlivňovat mnohé imunitní reakce, které mají lokální i systémový vliv.

2.1.1. Slizniční bariéra

První zásadní mechanickou obranou proti působení vnějších látek a invazi mikroorganismů je neporušená sliznice. Funkce a skladba slizniční bariéry je ovlivňována různými faktory jako je běžná střevní mikroflóra, lysozomy, hlen, pH prostředí, epitelie a buňky imunitního systému a jejich produkty. Součástí slizničního imunitního systému jsou i lymfatické tkáně v gastrointestinálním traktu: Peyerovy plaky, malé diseminované lymfatické folikuly, izolované intraepiteliální lymfocyty, plazmatické buňky ve stěně tenkého střeva a lymfatické uzliny v mezenteriu.

Povrch střeva je tvořen z jednovrstevných polarizovaných epiteliálních buněk a u člověka zaujímá v průměru 200 m². Za normálního fyziologického stavu se ve střevě odehrává mnoho spletitých buněčných interakcí, které regulují odpovědi na antigeny v potravě a antigeny běžné bakteriální flóry. Výkonnou ochranu zajišťuje svými složkami přirozená a adaptivní imunita. Vedle humorálních faktorů přirozené imunity (lysozomy, komplementový systém, lektiny, laktoferrin, antibakteriální proteiny defensiny) jsou ve střevě zastoupeny i buněčné složky přirozené imunity (makrofágy, neutrofilové, dendritické buňky). Dendritické buňky tvoří spojnici mezi přirozenou a adaptivní imunitou. Antigeny, které pohltnou, zpracují a dále předkládají různým subpopulacím T- lymfocytů. Lokální cytokinové prostředí rozhodne, zda se budou aktivovat regulační T- lymfocyty a imunitní odpověď bude mít spíše tlumivý (regulační) směr, nebo se budou aktivovat efektorové T- lymfocyty, které budou bojovat proti patogenům. Humorální složkou adaptivní slizniční imunity je sekreční imunoglobulin A (sIgA), který je produkován v submukóze především

plazmatickými buňkami. V epitelu na povrchu Peyerových plaků se nacházejí tzv. M-buňky, které se specializují na transport antigenů z lumen střeva na opačnou stranu. Antigeny jsou předávány přítomným APC buňkám (jsou to antigen prezentující buňky, které umí vystavovat tyto antigeny lymfocytům), kde jsou antigeny rozpoznávány antigen specifickými B - buňkami, které později jako diferencované plazmatické buňky produkují protilátky a to především slizniční IgA a IgM, které difundují do extracelulárních prostorů sliznice, nebo jsou přeneseny do lumen střeva. Sekreční komponenta (zbytek polymerického imunoglobulinového receptoru) navázaná na IgA nebo IgM chrání tyto sekreční protilátky před proteolytickým rozštěpením enzymy v lumen.

Složité vzájemné interakce mezi imunitním systémem, mikroflórou a střevním epitelem jsou základem pro zachování neporušené střevní bariéry, jež je důležitá pro udržování zdravé homeostázy v těle. Jen nepoškozená integrita střeva brání průniku patogenů, toxinů a nadměrného množství antigenů skrze stěnu střeva.

Důležitou součástí střevní bariéry, vytvářející integritu intestinálního epitelu, jsou pevná spojení přilehlých epiteliálních buněk, která brání translokaci bakterií paracelulární cestou. Největší význam ve střevní bariéře mají těsná spojení. Další mezibuněčné komplexy vytvářejí adherentní spojení, desmosomy a mezerové spoje.

2.1.2. Těsná spojení (tight junctions, TJs)

Těsná spojení se nachází nejbliže k apikální straně laterální membrány epiteliálních a endoteliálních buněk a jsou odpovědné v řízení paracelulární permeability, zejména iontů, malých molekul, vody. V závislosti na situaci brání nebo umožňují jejich průchod mezi jednotlivými buňkami. Jsou to dynamické multiproteinové struktury, identifikované byly zatím čtyři hlavní rodiny těchto integrálních transmembranových proteinů: kladin 1, kladin 2, okludin, JAM (junctional adhesion molecule) a tricellulin. Na druhé straně uvnitř buněk se nacházejí intracelulární proteiny zonula occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3) a cingulin, které s transmembranovými proteiny interagují, a zároveň je ukotvují k aktinovému cytoskeletu [1].

Expresí proteinů spojení ve střevě je vysoce regulovaná a závisí na střevním kompartmentu, zda je to v tenkém či tlustém střevě, lokalizaci klků a krypt a orientaci buněčné membrány (apikální, laterální, basolaterální). Na buněčné úrovni

je exprese proteinů regulována pomocí fosforylace. Fosforylace může redistribuci TJ proteinů podporovat nebo jejich komplexy destabilizovat [2].

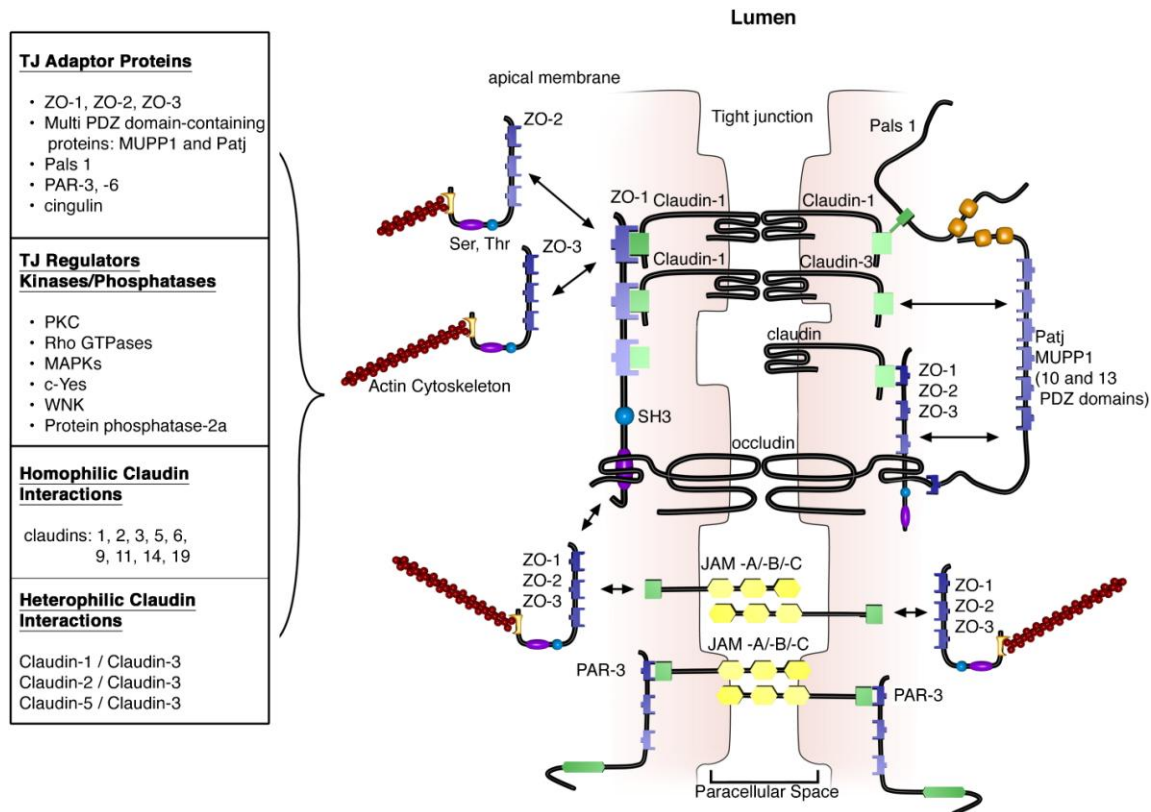
2.1.3. Okludin

Okludin je integrální transmembránový protein TJs, který je exprimován převážně v epiteliálních a endoteliálních buňkách, ale nachází se také v astrocytech, neuronech a dendritických buňkách.

Má velikost 60 až 82 kDa a čtyřikrát přechází integrální membránu, vytváří 2 extracelulární smyčky, krátký N - konec a dlouhý cytoplasmatický C - konec. C - konec se váže buď na ZO-1 nebo na ZO-2. Sousedící buňky vytváří vazbu pomocí extracelulárních smyček okludinů. Právě na základě funkčních analýz se zjistilo, že extracelulární smyčky a transmembranové domény okludinů regulují paracelulární permeabilitu. Okludin přenáší signály, které pochází z extracelulárního prostředí, dál do buňky a to pomocí Rho-GTPázových signálních kaskád, a tak působí reorganizaci aktinových vláken v cytoskeletu.

Přestože okludin je důležitou součástí komplexu TJs, výstavba TJs a paracelulární bariérová funkce není na okludinu závislá. Experimenty na okludin deficientních myších ukazují shodné množství a uspořádání TJs jako u konvenčních myší. Dále se překvapivě zjistilo, že i epiteliální transport a bariérová funkce střeva zůstávají u těchto myší zachovány[3].

In vitro analýzy dokazují, že okludinová lokalizace na TJ je regulována fosforylací.



Obr. 1 - Těsná spojení se sestávají z integrálních membránových proteinů (okludinů, klaudinů, JAMs), které interagují s proteiny přilehlých buněk v paracelulárním prostoru.[4]

2.1.4. Klaudin

Klaudiny jsou jedny z nejdůležitějších integrálních proteinů těsných spojů, protože zajišťují paracelulární bariéru. Název klaudin pochází z latinského *claudere*, které znamená zavírat. Jejich velikost se pohybuje od 20 kDa do 27 kDa, mají 4 hydrofobní transmembránové domény, dvě extracelulární smyčky tvořící interakce s klaudiny na sousedních buňkách a N- a C- koncové cytoplasmatické domény [4]. Extracelulární smyčky vytváří mezi sebou homofilní a heterofilní interakce a tím formují selektivní kanály pro ionty a malé molekuly. Zmíněná intracelulární C-doména připojuje klaudin k cytoskeletu pomocí proteinů PDZ vázající domény, které zahrnují ZO-1, ZO-2 a ZO-3 [6]. V současné době je známo 24 genů z klaudinové rodiny. Vyznačují se různými specifickými expresními znaky podle toho v jaké tkáni, nebo vývojové fázi tkáně či buněčném typu se nachází.

Role klaudinů v regulaci bariérové funkce střeva je nepochybně velmi podstatná. Klaudin 1 deficientní myši nepřezívají více jak jeden den po narození z důvodu transepidermálních ztrát vody [7]. Na druhé straně nadměrná exprese klaudinu - 6 v epidermis narušila formování těsných spojení s následnou zvýšenou

propustností [8]. Změny exprese genů kladinů zvyšují propustnost ve střevě. Nedávno byla u aktivní formy Crohnovy choroby popsána zvýšená exprese kladinu 2, která vede k tvorbě pórů, a naopak snížená exprese a redistribuce kladinů 5 a 8 [9].

Stejně jako okcludin, molekuly kladinů a jejich funkce jsou regulovány post-translační fosforylací skrze interakce s PDZ vázajícími doménami. Intracelulární C-koncová doména kladinů obsahuje mnoho regulačních míst včetně potenciálních sererin/ treonin fosforylačních míst a PDZ vázající domény [10].

2.1.5. Adhezivní molekuly tvořící spoje (Junctional adhesion molecules - JAMs)

JAMs jsou integrální membránové proteiny, které patří mezi imunoglobuliny produkované buňkami endotelu, epitelu, krevními destičkami a rozličnými buňkami imunitního systému [11].

JAMs můžeme rozdělit na základě přítomnosti typu I či II PDZ - vázajícího motivu na vnitřním C- konci. Z toho plyne, že každý typ I či II PDZ vázajícího motivu interaguje uvnitř buňky s jinými cytoplasmatickými proteiny, ale stejně jako další TJs proteiny, tyto JAMs - PDZ interakce umožňují ukotvení k aktinovému cytoskeletu. Extracelulární části JAMs se váží na různorodé ligandy pomocí homofilních a heterofilních interakcí a regulují buněčné funkce a i paracelulární permeabilitu. Homofilní interakce mezi JAM-A a JAM-B regulují především vytváření funkčních TJs (vazbou s okcludiny a vazbou na PDZ doménu ZO-1), zatímco heterofilní JAM interakce tvoří vazbu s integriny na povrchu leukocytů, a tedy hrají roli v leukocyto - endoteliální buněčné adhezi [12].

V případě deficientních JAM-A myši se prokázala jejich zvýšená náchylnost k chemicky indukovanému zánětu tlustého střeva. Podávání stejného množství dextran sodium sulfátu těmto myším vyvolalo mnohem vážnější střevní poškození než u kontrolních myši [13]. To ukazuje na význam poškození střevní bariéry, jako rizikového faktoru pro vznik střevních onemocnění.

2.1.6. Adaptorové proteiny těsných spojů

Zonula occludens jsou známé tři (ZO-1, ZO-2, ZO-3) a patří mezi fosfolipidy. Mají funkční vlastnosti a doménovou strukturu charakteristickou pro proteiny, které vytvářejí tzv. lešení. Obsahují mnoho „protein - protein“ interagujících domén

zahrnující tři PDZ domény, jednu SH3 doménu, doménu homologickou guanylát kináze (GUK) a také F - aktin vázající doménu.

ZO-1 interaguje s kladiny skrze první PDZ doménu, se ZO-2 a ZO-3 interaguje skrze druhou PDZ doménu, s okludinem interaguje pomocí GUK domény a s aktinem a α - cateninem pomocí velké C - koncové domény [14]. Dále se ZO-1 váže pomocí své SH domény na několik signálních proteinů, jako jsou serine/threoninové protein kinázy, Y box transkripční faktor ZONAB, heat shock protein Apg2 a též G α 12 a α podjednotku heterotrimerických G proteinů.

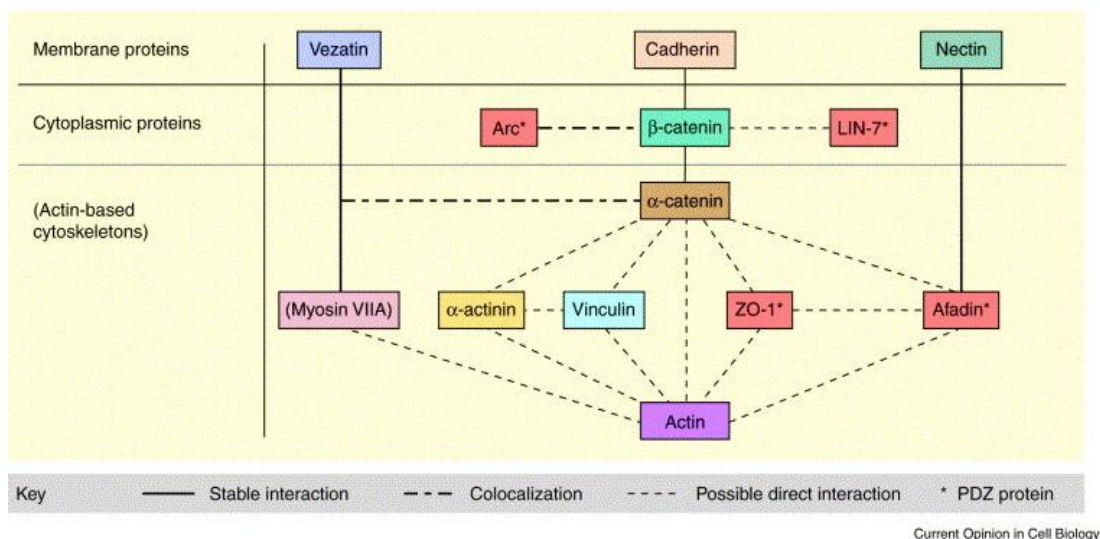
Tito interagující proteinové partneři mohou regulovat sebe navzájem, například Apg2 reguluje interakce mezi ZO-1 a ZONAB během heat shock odpovědi, což vede k nahromadění a aktivaci ZONAB [15].

2.1.7. Adherentní spojení (Zonula adherens, AJs)

Adherentní spojení jsou specializované proteinové komplexy na apikální části laterální membrány, kde zprostředkovávají mezibuněčný adhezivní kontakt buněk [16]. Podílejí se však i na regulaci transkripce, regulují intracelulární signalizace a aktinový cytoskelet.

Většina AJs je tvořena interakcí cadherin - catenin. E-cadheriny (kalcium dependentní adhezivní molekuly) jsou typem I přes membránu jedenkrát procházejícím glykoproteinem, mají C - terminální konec uvnitř buněk a N - konec vně buňky. Vnější doména vytváří homotypické interakce s cadheriny sousedících buněk. Vnitřní doména se skládá z catenin - vázající domény, která je spojena se skupinou cytoplasmatických proteinů cateninové superrodiny: β - catenin, γ - catenin a p120 catenin [17].

Cateniny propojují přímo AJs k cytoskeletární síti přes C- terminální domény F-aktinu, nebo nepřímo skrze interakce s adaptorovými proteiny např. afadinem. [18]. Cadherin-cateninové komplexy jsou důležité nejen pro propojení sousedících buněk, ale i pro udržování buněčné polarity, regulaci epiteliální migrace, proliferace a vytváření ostatních adhezivních struktur jako třeba desmozomů.



Obr. 2 - Komponenty adherentních spojení a jejich interakce [19].

α -catenin má významnou roli ve formování adherentních spojení, váže se na vinculin, α -aktin, ZO-1 a aktin. Vedle toho se v adherentních spojení nachází nectin, jež se váže přímo na afadin .[19]

2.2. Dysregulace těsných spojení

Intestinální permeabilita je regulovaná mnoha faktory: exogenními faktory, cytokiny, buňkami imunitního systému, epiteliální apoptózou etc.

Imunitně indukovaná dysfunkce intestinální bariéry je kritická pro vznik predispozic a zhoršení mnoha autoimunitních onemocnění a zánětlivých stavů včetně IBD, potravinových alergií, celiakie, diabetu [20].

INF - γ a TNF - α jsou centrální mediátory zánětlivých onemocnění střeva. Kultivace intestinální epiteliální buněčné linie Caco2 a T84 s INF- γ a TNF- α ukazuje reorganizaci několika TJs proteinů (ZO-1, JAM-A, okcludinu, klaudinu-1 a klaudinu-4). V mechanismu působení cytokinů hraje roli fosforylace myosinového lehkého řetězce (MLC) myosin light chain kinázou (MLCK), což napomáhá narušení TJs. [21]. Cytokin podporující intestinální bariérové funkce je protizánětlivý IL-10. IL-10 deficientní myši mají zvýšenou střevní propustnost a spontánně vyvinou chronický zánět.

2.2.1. Exogenní regulace intestinální bariéry

2.2.1.1. Nesteroidní antirevmatika (NSAID)

Užívání nesteroidních antirevmatik je spojeno s vysokým výskytem střevních potíží a jeví značný průkaz toho, že jejich chronické užívání pozměňuje střevní bariéru a způsobuje významné gastrointestinální poškození, vředy, perforace, krvácení a zhoršení IBD [22].

Následky podávání NSAID jsou připisovány inhibici cyklooxygenáz a následnému snížení syntézy prostaglandinů. Cyklooxygenázy jsou enzymy zodpovědné za syntézu prostaglandinů, jež jsou vytvářeny v místě zánětu a jsou zdrojem jeho lokálních projevů, jako je hyperémie, otok, zvýšená teplota, bolest etc. Vedle toho však prostaglandiny plní celou řadu fyziologických funkcí (např. ochrana žaludeční sliznice, regulace funkce destiček). Snížení těchto prostaglandinů, vzniklá důsledkem užívání NSAID, pak může vést k nežádoucím projevům léčby.

2.2.1.2. Alkohol

Chronická konzumace alkoholu je spojená se zvýšenou střevní propustností, sníženou resorpcí sodíku a vody a nižším vstřebáváním živin a vitamínů. Vedlejší produkty metabolismu ethanolu (acetaldehyd a oxid dusnatý) přispívají k dysfunkci střevní bariéry. Toxický acetaldehyd vzniká přeměnou ethanolu alkohol dehydrogenázou (alkohol dehydrogenáza je metaloenzym přítomný v celé řadě tkání). Vysoké hodnoty acetaldehydu byly naměřeny ve střevech potkanů po podání ethanolu a zároveň byly spojeny se zvýšenou střevní propustností a zvýšenou translokací endotoxinů [23].

Experimentální studie na hlodavcích prokazují poškození sliznice v horní části tenkého střeva po podávání alkoholu. Předpokládá se, že alkoholem vyvolaná zvýšená střevní propustnost usnadňuje zvýšenou translokaci endotoxinů do vzdálenějších orgánů, což vede k zánětu a poškození tkání [24].

2.2.1.3. Bakteriální osídlení

Vzájemná symbióza komensální mikroflóry a člověka je výsledkem dlouhodobého vývoje a přizpůsobení se okolnímu prostředí. K prvotnímu osídlení jedince dochází po porodu, v momentu kdy novorozenec opustí sterilní dělohu matky, se postupně jeho pokožka a slizniční povrchy začínají kolonizovat [25]. Ustálení těchto bakteriálních populací trvá dalších několik měsíců až prvních pár let časného

dětství. Stovky druhů bakterií kolonizují každého jedince unikátně v závislosti na vnějším prostředí a také na způsobu porodu. Porod přirozenou cestou umožní novorozenci získat první dávku komensálních bakterií pocházejících od matky. U těchto dětí se jejich střevní bakteriální osídlení výrazně liší od dětí narozených císařským řezem. Během celé doby osidlování mikroflóra ovlivňuje imunitní systém a napomáhá jeho zrání a vývoji [26].

Studium bakteriálního osidlování a jeho důsledků je možné díky gnotobiologickým přístupům. Bezmikrobní prostředí nám umožňuje zkoumat vlivy definovaných mikroorganismů. Zvířecí modely lidských onemocnění v bezmikrobních podmínkách umožňují sledovat nemoci již od prvopočátku bez vlivu kolonizace na začátek a vývoj onemocnění [25].

Nicméně za normálních okolností ekosystém střevní mikroflóry má své vlastní regulační schopnosti a brání namnožení a průniku nežádoucích bakterií a antigenů přes epitel střeva. K udržení stabilního prostředí napomáhají bakterie zvané probiotika. Jsou to živé mikroorganismy běžně konzumované jako součást jogurtů a sýrů [25]. Probiotika hrají důležitou roli při stimulaci slizničního imunitního systému a je jim přisuzována schopnost modulovat a utužovat stav střevní bariéry, indukovat tvorbu mucinů, defensinů a zvyšovat počet regulačních T- buněk v mezenterálních lymfatických uzlinách [27].

Střevní mikroflóra je také zdrojem patogenních organismů, toxinů a antigenů. Je to dynamický systém, kde interakce mezi patogeny a epitelem může vést až k poškození střevní bariéry, narušení transportu tekutin a rozvratu elektrolytové rovnováhy a rozvoji zánětlivé imunitní odpovědi. Například *Clostridium perfringens*, bakterie způsobující otravy z jídla, dokáže snadno destabilizovat komplexy těsných spojů. Působí tak, že se naváže na extracelulární smyčky klaudinu -3 a -4 na povrchu enterocytů, a vytvoří malý proteinový komplex v plasmatické membráně. Tyto komplexy způsobí oligomerizaci a vytvoření dalších větších plasmatických membránových komplexů, které jsou spojeny se zvýšenou membránovou permeabilitou. *Clostridium* taktéž interaguje s okludinem, redistribuje klaudiny a tím destabilizuje TJs. Následkem je zvýšená paracelulární permeabilita ve střevě .[28]

2.2.1.4. Patofyziologie epiteliální bariéry

Poškozená střevní bariéra umožňuje průnik antigenů či bakterií mimo lumen střeva. Následná zvýšená interakce se střevním imunitním systémem může vyústit v jeho nadměrnou aktivaci vedoucí k slizničnímu zánětu.

Disregulace střevní bariéry je spojena s predispozicí a vývojem chronických zánětlivých onemocnění jako jsou potravinové alergie, IBD, celiakie.

2.2.1.5. Potravinové alergie

Vývoj a vznik potravinové alergie je závislý na vystavení potravinového alergenu slizničnímu imunitnímu systému. To vede k antigenní senzitivaci, stimulaci antigenně specifických CD4⁺ T_H2 buněk a produkci IgE specifických protilátek. Za normálních okolností vyvolávají solubilní potravinové antigeny imunitní supresi neboli orální slizniční toleranci. Tato slizniční tolerance je specifická aktivní neodpovídavost imunitního systému na tělu známé antigeny.

Předpokládá se, že snížená funkce střevní bariéry umožňuje její zvýšenou propustnost pro antigeny ze stravy, a vystavení těchto antigenů slizničnímu imunitnímu systému vede ke vzniku specifické odpovědi na konkrétní antigen. Na základě této hypotézy byla změřena střevní propustnost u dětí s potravinovou alergií. Laktulóso - manitolový test prokázal významně zvýšenou propustnost v porovnání s kontrolními zdravými dětmi [30].

Pro určení zda pozměněná střevní bariéra je následek alergické reakce na antigen, byl lactuloso-manitolový test proveden u pacientů s potravinou alergií, kteří již jsou na hypoalergenní stravě po dobu minimálně šesti měsíců. Překvapivě střevní propustnost zůstala u těchto pacientů zvýšená i v nepřítomnosti potravinovo - antigenní stimulace [30].

2.2.1.6. Idiopatické střevní záněty (Inflammatory bowel diseases IBDs)

Crohnova choroba (CD) a ulcerózní kolitida jsou chronická, recidivující zánětlivá onemocnění. V patogeneze se účastní především tři esenciální faktory: 1) selhání funkce intestinální bariéry, 2) vystavení střevního obsahu imunitním buňkám v lamina propria a 3) nadměrná imunitní odpověď [29]. Nicméně není jasné, který faktor je zodpovědný za vyvolání onemocnění. Výsledky studií svědčí o tom, že zvýšená střevní propustnost je primární příčina podílející se na patogenezi IBD. Pacienti s klinicky aktivním CD onemocněním mají zvýšenou střevní propustnost a u

pacientů v remisi je zvýšená střevní propustnost prediktivní faktor přicházejícího relapsu [32].

2.2.1.7. Celiakie

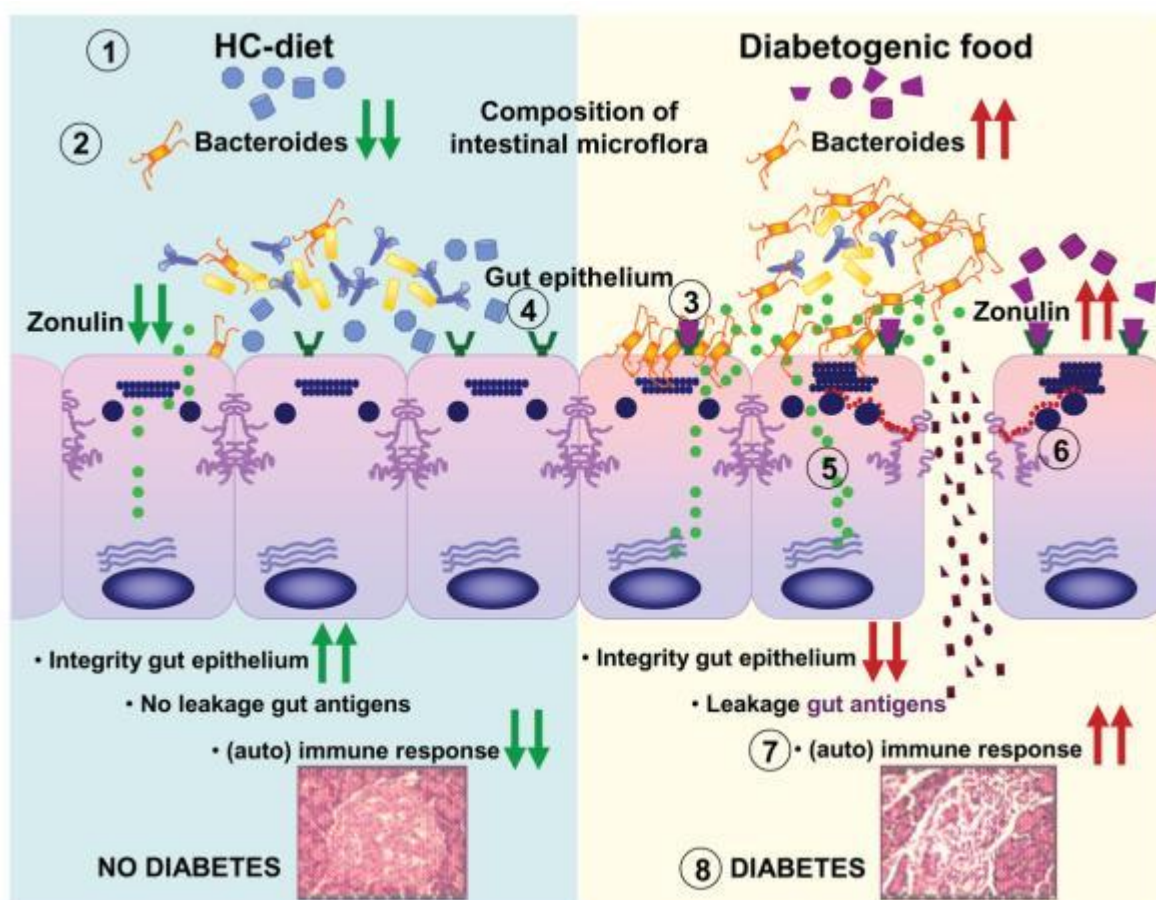
Celiakie je chronický zánět tenkého střeva způsobený nepřiměřenou T - buněčně zprostředkovanou odpovědí na potravinový pšeničný protein gluten u geneticky predisponovaných jedinců. Za normálního fyziologického stavu je epitel pro gluten a gliadin nepropustný. Předpokládá se, že poškozená střevní bariéra předurčuje vznik celiakie, jelikož umožní gliadinu dostat se přes bariéru a tak aktivovat imunitní systém. Patogenní mechanismy schopné spustit a zvýšit odpověď slizničního imunitního systému na gluten mají také některé střevní virové infekce (virová hepatitida C, adenovirus, rotavirus) a bakteriální infekce [33].

Hlavním rysem této nemoci je zvýšený počet intraepiteliálních lymfocytů, atrofie střevních klků a dysfunkce střevní bariéry. Nicméně se ukazuje, že zvýšená střevní propustnost existuje ještě před začátkem vlastního onemocnění a má zásadní podněcující vliv nejen pro rozvoj celiakie, ale také diabetu 1. typu [34] [35]. Zvýšená střevní propustnost a pozměněné těsné spoje střevního epitelu přetrvávají u asymptomatických pacientů na bezlepkové dietě [36].

Gliadin dokáže částečně regulovat funkci střevní bariéry a to pomocí upregulace zonulinu, gliadin se váže na chemokinový receptor CXCR3 na epiteliálních buňkách střeva a iniciuje MyD88 dependentní vyplavení zonulinu [37].(Obr. 3)

Strava ovlivňuje složení střevní mikrofóry. Bezlepková dieta redukuje počet bakterií kmene *Bacteroidetes* ve střevní mikroflóře, zatímco strava bohatá na gluten jejich počet zvyšuje. Kolonizace střeva mikroflórou, ve které převládá *Bacteroidetes* nad ostatními rody bakterií, jako jsou *Bifidobacteria* nebo *Lactobacili*, aktivuje zonulinovou dráhu. Paralelně se gliadin váže na chemokinový receptor CXCR3 a spouští MyD88 - dependentní aktivaci zonulinové dráhy. Aktivace zonulinové dráhy vede k zvýšenému uvolnění zonulinu a jeho vázání se na receptory na povrchu střevního epitelu, kde způsobuje rozpad těsných spojů a změny v dynamice těchto spojení. (To zahrnuje fosforylaci okludinu, ZO-1, změny v okludin-ZO-1 a ZO-1-myosinu IB „protein-protein“ interakci a polymeraci aktinu). Rozpad těsných spojů vede k poškození bariérové funkce střeva, zvýšené pasáži lumenálního obsahu (antigenů) do *lamina propria*, kde jsou tyto antigeny zpracovávány APC buňkami a

prezentovány T- buňkám. Celá tato kaskáda imunitních událostí může vést k autoimunitám [34].



Obr. 3 - Mechanismus působení glutenu v patogenezi diabetu 1 [34]

2.2.1.8. Zonulin

Zonulin je 47 kDa velký protein, který je znám jako fyziologický mediátor regulující střevní propustnost a proteiny těsných spojení. Cirkulující zonulin v séru se dá považovat za znak střevní integrity [38]. Jeho hodnoty v séru poměrně silně korelují s lactuloso / manitolovým testem, běžně používaným k měření střevní propustnosti v klinické praxi. Na základě studie, zahrnující soubor 123 lidí, se zonulin ukazuje jako spolehlivý marker střevní permeability, jehož koncentrace v séru stoupá spolu s inzulinovou rezistencí a obezitou [39]. Vztah mezi inzulinovou rezistencí a cirkulujícím zonulinem se zdá být zprostředkován prozánětlivým cytokinem IL – 6, jehož zvýšená hladina v krvi je spojována s obezitou [40].

Gen lidského zonulinu se shoduje s prekurzorem haptoglobinu 2 [41], jehož promotor je pod kontrolou IL - 6 skrze aktivaci STAT3 (signální převaděč a aktivátor

transkripce 3), který velice rychle iniciuje produkci proteinů akutní fáze jako je haptoglobin a fibrinogen. MikroRNA-18a dokáže tuto transkripční aktivitu STAT 3 ještě zesílit. [42].

2.2.1.9. Obezita

Střevo a zejména střevní obsah, který je složený z 10^{13} až 10^{14} mikroorganismů, hraje určitou roli v patogenezi obezity. Mikrobiální genom (mikrobiom) rozšiřuje možnosti a všestrannost lidského metabolismu, protože obsahuje nejméně stonásobně více genů než náš vlastní genom [43]. Metabolická aktivita mikrobiomu ve střevech člověka odpovídá dodatečnému orgánu lidského těla ekvivalentnímu k játrům.

Střevní mikroflóra může ovlivnit obě strany rovnováhy energetického metabolismu. Buď jako činitelé ovlivňující využívání energie ze složek potravy, nebo jako činitelé ovlivňující geny hostitele, které regulují spotřebu a ukládání energie [44]. Přijímání stravy s vysokým obsahem tuků mění střevní mikroflóru a tím i její metabolické vlastnosti, což ukazuje na její možnou roli ve vzniku obezity. Měření bakteriální 16S rRNA u potkanů krmených stravou s vysokým podílem tuků prokázalo celkové snížení množství bakterií a současně zvýšení relativního poměru řádů *Bacteroidales* a *Clostridiales*. U potkanů se sklonem k obezitě (DIO-P) byl navíc pozorován značný nárůst *Enterobacterií*. Požívání stravy s vysokým podílem tuků způsobuje změny ve složení střevních mikroflóry, avšak rozvoj zánětu je to, co způsobuje hyperfáгии (přejídání), a tedy finální fenotyp obezity [45]. Na základě těchto studií se ukazuje, že obezita spojená se zánětem v tenkém střevě a metabolickým rozvratem může vést ke zvýšené střevní propustnosti.

3. MATERIÁLY A METODY

3.1. Roztoky

Fosfátový fyziologický roztok (PBS):

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (Lachema, ČR)	1,2g
NaH ₂ PO ₄ ·1H ₂ O (Lachema, ČR)	0,2g
NaCl (Lachema, ČR)	9,0g

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

Promývací pufr

PBS	1000 ml
Tween 20 (Sigma, USA)	0,5 ml (vznikne 0,05 % roztok)

Blokovací roztok 1% BSA

BSA (Sigma, USA)	1g
------------------	----

Doplnit do 100 ml PBS

Standartní ředící roztok (viz 4.6)

BSA	50mg
Tris pufr:	121 mg Tris-
(hydroxymethyl)aminomethan + 438,3mg NaCl	

Tween 20 (Sigma, USA)	25 µl (vznikne 0,05 % roztok)
-----------------------	-------------------------------

Doplnit do 50 ml destilovanou vodou a upravit pH pomocí 4M NaOH na 7,2 -7,4

Roztok TMB

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

Roztok TMB v DMF stříkat pod hladinu destilované vody.

Citrátový pufr

Citronan sodný (Lachema, ČR)	2,94 g
------------------------------	--------

Destilovaná voda 100 ml
pH upraveno na 4,2 pomocí kyseliny citronové

Substrátový roztok

TMB 5 ml
Citrátový pufr 5 ml
Peroxid vodíku 1,5 μ l

Zastavovací roztok

1M H₂SO₄

Médium DMEM s 10% FCS (pro linii HT-29)

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

Dulbecco's Modified Eagle's médium (DMEM)	100 ml
Tkáňová voda	80 ml
Fetální bovinní sérum* (Biochrom AG, Německo)	20 ml
Glutamin 200 mM (Sigma, USA)	3 ml
Glukóza 25 % (ÚMG AV ČR)	3,6 ml
NaHCO 37,5 % (ÚMG AV ČR)	2 ml
ATB 10 000 U penicilin + 10 mg/ml streptomycin (Sigma, USA)	2 ml
Sodium pyruát	2 ml
Bikarbonát	4 ml
Směs neesenciálních aminokyselin	500 μ l

* Fetální bovinní sérum s inaktivovaným komplementem (komplement se inaktivoval ohřátím séra ve vodní lázni na teplotu 56 °C po dobu 1 h).

Médium DMEM s 10% FCS (pro linii MODE-K)	(Sigma,USA)
Fetální bovinní sérum 10% *	(BiochromAG, Německo)
Glutamin 4 mM	(Sigma, USA)
ATB 10 000 U penicilin + 10 mg/ml streptomycin	(Sigma, USA) 1%

Roztoky na průtokovou cytometrii

Propidium jodid (Sigma, ČR) 400 µl

HEPES pufr (20 mM HEPES; 50 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 0,1% Tween-20)

Roztok HCl

70 µl koncentrované 0,1 M HCl + 50ml H₂O(steril water, IKEM)

Roztok NaHCO₃

NaHCO₃ 0,63g

Doplnit 50 ml destilované vody a upravit hodnotu pH na 7.2- 7.3.

Roztok indomethacinu

Roztok indomethacinu jsme podávali myším v koncentraci 10 mg/kg myši v objemu 100µl jednou denně ve třech po sobě jdoucích dnech. Zkrácené schéma jsme zavedli z důvodu snížení četnosti manipulace s myši v bezmikrobních podmínkách. Mláďatům byla podávána dávka roztoku indomethacinu v max. objemu 50µl a to kanylou (G24, DeltaMed, Itálie).

Indomethacin byl navážen a rozpuštěn v 1 ml etanolu. Z tohoto zásobního roztoku bylo vždy odebráno množství 100µl a doplněno 900 µl NaHCO₃. Roztok indomethacinu byl připraven vždy těsně před aplikací.

Bakteriální lipopolysacharid (LPS)

Izolát z bakteriálního kmene *Salmonella enterica* serotyp *typhimurium*. Po rozředění v PBS byl uchováván při -20°C (Sigma, USA).

Roztoky pro Gramovo barvení

Krystalová violet:

10 g krystalové violeti se rozpustí ve 100 ml 96 % ethanolu, doplní se do 0,5 litru 1% roztokem šťavelanu amonného. Roztok se zfiltruje před použitím.

Lugolův roztok:

Jód	1 g
Jodid draselný	2 g

Destilovaná voda 100 ml

Karbofuchsin:

Fuchsin bazický	1 g
Ethanol -96 %	10 ml
Fenol – 5 % vodný roztok	100 ml

Prísady se dobře promíchají a zfiltrují.

Příprava Gliadinu

Neštěpený gliadin

příprava: gliadin se připravoval na zásobní koncentraci 10 mg/ml rozpuštěním v roztoku HCl (viz. 3.1) na třepače při 2000 rpm po dobu 45 minut.

Štěpený gliadin

štěpen enzymaticky pepsinem, trypsinem.

Gliadin nevařený

příprava: gliadin se rozpouštěl v 1050ul 96 % alkoholu + 390 µl destilované H₂O, z tohoto zásobního roztoku gliadinu se použilo množství 1 ml, ve kterém se rozpustilo 5 mg gliadinu. Po rozpuštění byl roztok doplněn na 5 ml a následně přefiltrován přes protibakteriální filtr.

Vařený gliadin

viz. gliadin vařený, byl povařen po dobu 20 minut v 100 °C

3.2.Experimentální zvířata

V pokusech byly využity myši kmene BALB/c a B6. Myši pocházely z chovu Fyziologického ústavu AV ČR (Praha - Krč) a byly umístěny v konvenčním zvěřinci s potravou a vodou *ad libitum*.

Bezmikrobní myši BALB/c pocházely z detašovaného pracoviště sektoru MBÚ AVČR v Novém Hrádku v Orlických horách. Myši byly chovány ve sterilních inkubátorech v gnotobiologických podmínkách až do zahájení pokusu. Poté byly bezmikrobní myši umístěny do sterilního laminárního boxu a přistupovalo se k nim

v rukavicích s přidáním prodloužením až k loktům, vše bylo desinfikované roztokem 70% ethanolu. Kovové sondy pro intragastrické podávání byly vyautoklávované.

3.3. Buněčné linie

3.3.1. Myší buněčná linie

MODE-K je myší buněčná epiteliální linie izolovaná z dvanáctníku myši C3H/HeJ.

3.3.2. Lidské buněčná linie

HT-29 je epiteliální buněčná linie izolovaná z kolorektálního adenokarcinomu střeva. Tato buněčná linie se kultivuje v médiu DMEM (viz.4.1.).

3.3.3. Kultivace buněčných linií

Všechny buněčné linie se kultivují v termostatu s teplotou 37 ° C, 5 % CO₂ a v 95 % vlhkosti. K pokusům jsme použili kultivační láhve velikosti 175 cm² s 20 ml kultivačního média.

3.3.3.1. Rozmrazování buněk

Buněčná linie se uchovávala v médiu spolu s kryoprotektivní látkou (5 % DMSO) v mrazáku při teplotě -80 °C. Kryozkumavka s linií se umístila do sterilního laminárního boxu Steril-Antares (Steril S.q.a, Itálie) v předpřipravené vodní lázni cca 70°C. V laminárním boxu byl obsah ampulky 1 ml přenesen do centrifugační zkumavky (50ml Falconka) s 10 ml média. Médium bylo již předem umístěno v termostatu kvůli vytemperování a stabilizaci hodnoty pH na 7,0-7,6. Následně byla buněčná linie centrifugována 5 minut při 1200 rpm, 4 °C a poté promyta.

Dále se buňky naředily na požadovanou koncentraci a krátce resuspendovaly. Životnost buněk byla ověřena pod mikroskopem pomocí trypanové modři. Do kultivačních láhví se buňky přenesly a doplnily médiem podle velikosti kultivační láhve. Láhve byly přeneseny do termostatu (Sanyo Electric CO., Japonsko), kde se buňky kultivovaly sterilně se stabilními podmínkami (teplota 37 °C, 5% CO₂, vlhkost 95 %).

K manipulaci s buňkami docházelo jedině uvnitř laminárního boxu Steril-Antares (Steril S.q.a, Itálie) kvůli zachování sterilních podmínek a ochraně před kontaminacemi.

3.3.4. Pasážování

Buněčné linie byly kultivovány v tkáňovém médiu v tkáňových kultivačních lahvích (NUNC, Německo). Každé tři dny bylo médium vyměněno za nové. Pasážování probíhalo přibližně jednou za týden v závislosti na hustotě buněk. Z kultivační láhve bylo nejprve odstraněno staré médium, buňky byly opláchnuty cca 5 ml čistým médiem bez séra. Poté se k buňkám přidalo cca 10 ml vytemperovaného 0,25 % Trypsinu EDTA (Sigma, USA), láhev se uzavřela a nechala se přibližně 2 minuty v termostatu. Poté se buňky uvolnily ze dna kultivační láhve. K buňkám se přidalo 10ml příslušného kultivačního média se sérem. Resuspendované buňky se centrifugovaly na 1300 otáček/min, 10minut. Supernatant se odstranil, peleta resuspendovala v čerstvém médiu a zopakovala se centrifugace. Poté se buňky opět resuspendovaly v čerstvém médiu, spočítaly v Bürkerově komůrce a rozředily pro další kultivace.

3.3.5. Zamrazování

Buňky se zamrazovaly v kultivačním médiu s 5 % DMSO (Sigma,USA). Kryozkumavky s obsahem 1ml buněk o koncentraci cca 4×10^6 buněk/ml byly ponechány po dobu 20 minut v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, následně byly přeneseny do mrazícího boxu (Sanyo, USA) s teplotou $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4. Kultivace bakterií

3.4.1. Bordetella pertussis

Bordetella pertussis byla poskytnuta laboratoří Ing. Šeba CSc. *B. pertussis* je drobná kokoidní gram - negativní bakterie, která způsobuje obávané onemocnění černý kašel. Ve vakcínách má adjuvantní vlastnosti. Podávaná dávka byla 3×10^9 tepelně inaktivovaných *B. pertusis* v objemu 100 μl na jednu myš. Tepelná inaktivace trvala 30 minut v $70\text{ }^{\circ}\text{C}$

3.4.2. Příprava bakteriálního lyzátu Lactobacillus casei

Lactobacillus casei DN-114 001 (LC) (Danone Institut, Francie), byl kultivován v anaerobní komoře v De Man, Rogosa a Sharpe (MRS) agaru (Oxoid, Basingstoke, UK) při 37 ° C. Kultivace LC byla skončena v pozdní logaritmické fázi růstu. LC byl z kultury získán centrifugací (4000x g, 30 minut) a následně dvakrát promyt sterilním fosfátovým pufrům (PBS). K přípravě bakteriálního lyzátu z kultury byla použita metoda French press (přístroj k drcení buněk vysokým tlakem). Následně byl lyzáat lyofilizován a zředěn ve sterilním PBS na koncentraci 30g/l. Aby došlo k usmrcení všech bakterií, zahřáli jsme lyzáat na 70 °C po dobu 30 minut. Sterilita byla potvrzena pomocí aerobní a anaerobní kultivace. Alikvoty skladujeme v lyofilizované formě při -80 °C.

3.5.Imunofluorescence

Stanovení proteinů těsných spojů bylo provedeno nepřímou imunofluorescencí.

Postup:

A) Buněčná linie se nechala narůst na sterilních krycích sklíčkách přibližně po 2 dny až dosahovala 80 % konfluence. Všechny sklíčka s buněčnou linií byly promyty dvakrát PBS a dvacet minut fixovány v 1 % paraformaldehydu.

B) Segmenty tlustého střeva a terminálního ilea byly zmrazeny na -80 °C. Zmražené řezy byly nanoseny na poly-L-Lysinová skla, osušeny a fixovány 4% paraformaldehydem.

Postup pro **A,B)** stejný. Následovala 5 min. permeabilizace, aby se fluorescenční barvivo dostalo do buněk, pomocí 0,5 % Tritonu v PBS. Sklíčka byla znovu promyta a blokována 1h 20 % normálním sérem, dle sekundární protilátky. Poté byla opět promyta dvakrát PBS a inkubována s primární protilátkou v PBS 1 hodinu, znovu promyta. Nakonec byla skla inkubována se sekundární protilátkou naředěnou v PBS na 1 hodinu ve tmě. Dále se vzorky promyly dvakrát PBS a propláchly v destilované vodě. Jednotlivá sklíčka byla lehce osušena a na sklíčka byl nakapán roztok DAPI. Po promytí destilovanou vodou bylo na podložní sklíčko nakapáno montovací médium a na ně byla přiložena krycí. Následovala vizualizace a focení na fluorescenčním konfokálním mikroskopu Olympus AX 70 (Olympus, Japonsko) za asistence Mgr. Žanety Růžičkové a RNDr. Jana Svobody.

3.6.ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Ke stanovení koncentrace IL-8 a IL-6 v buněčných supernatantech jsme použili metodu enzymaticky spřažené imunochemické analýzy. ELISA kity byly použity podle doporučených protokolů výrobce (firem PeproTech a R & D).

Všechny inkubace probíhaly při pokojové teplotě. Vazebná protilátka byla nanášena v PBS objemu 100 μ l do každé jamky 96 jamkové destičky (NUNC, Německo). Destička byla přelepená krycí folií a ponechána přes noc při pokojové teplotě v laboratoři. Další den byla navázaná protilátka v navazovacím pufru odstraněna a destička třikrát promyta pomocí 300 μ l promývacího pufru na promývače MultiWash II (Tricontinent, USA.). Poté následovala blokáce blokovacím pufrem (viz. Tabulka 1) nespecifických vazeb po dobu minimálně jedné hodiny. Objem blokovacího pufru byl 300 μ l na jamku. Po tomto kroku byl blokovací pufr odstraněn, destička byla promyta třikrát 300 μ l promývacího roztoku. Dále následovalo nanášení vzorků a standardů (viz. Tabulka 1) v množství 100 μ l na jamku na dobu dvou hodin. Za negativní kontrolu bylo považováno čisté médium. Standard byl ředěn dvojkovou řadou. Poté následovalo znovu odstranění roztoků z jamek a promytí promývacím pufrem na promývače. Po uplynutí dvou hodin byla nanášena biotinylovaná detekční protilátka (viz. Tabulka 1) v objemu 100 μ l na jamku opět na dobu dvou hodin. Následovalo promytí na promývače. Předposledním krokem byla inkubace s konjugátem avidin-HRP (křenuv peroxidáza) v koncentraci (viz. Tabulka 1) v objemu 100 μ l na jamku. Destička byla po napipetování uložena na 30 minut do temna a pak znovu promyta. Konečný krok se skládal z přidání substrátového roztoku (5ml TMB + 5ml citrátového pufru + 3 μ l H₂O₂ (viz. 3.1) na dobu 5 - 30 minut ve tmě v závislosti na intenzitě zbarvení způsobenou reakcí enzymu se substrátem. K zastavení reakce bylo použito množství 50 μ l 1,8N H₂SO₄ na jamku (kit firmy PeproTech pro IL-6 používá na místo substrátového roztoku a kyseliny sírové pouze ABTS substrát, který je součástí kitu). Barevný produkt byl vyhodnocen na spektrofotometru (Rainbow Thermo Tecan, Schoeller Ins., Německo) při vlnové délce 450 nm (pro cytokin IL-8) a 650 nm (pro cytokin IL-6). Výsledky byly vyhodnoceny v programu Ascent (Labsystems, Finsko).

Cytokin/Kit	IL-6 myší (PeproTech, USA)	IL-8 lidský (R&D systems, Velká Británie)
Navazovací protilátka	200 µg/ml ředěno v PBS	c.4 µg/ml ředěno v PBS
Blokovací roztok	Roztok 1% BSA, byl součástí kitu	Roztok 1% BSA
Standard	Počáteční c. 4000 pg/ml V ředícím pufru, byl součástí kitu	Počáteční c. 2000 pg/ml v 1% BSA
Detekční protilátka	c.500 ng/ml V ředícím pufru, byl součástí kitu.	c.20 ng/ml v 1% BSA
Streptavidin /HRP	5,5µl avidin –HRP přidáno do 11ml ředícího pufru.	Ředěno dle návodu výrobce v 1% BSA

Tab. č. 1. Hodnoty koncentrací jednotlivých složek ELISA kitů pro stanovení cytokinů IL-8 a IL-6.

3.7. Barvení buněk podle Grama :

Příprava roztoků viz 3.1.

Postup:

Sklíčko s nátěrem bylo na 30 s ponořeno do roztoku krystalové violeti, následně bylo barvivo slito a preparát byl krátce promyt vodou. Poté byl preparát převrstven Lugolových roztokem 30 s, promyt vodou a odbarvován ethanolem (20 s).

Po dalším promytí vodou byl preparát dobarven karbolfuchsinem (30–60 s), opět opláchnut vodou, usušen a pozorován pod olejovou imerzí na mikroskopu (se zvětšením 100×).

3.8. Průtoková cytometrie

Průtoková cytofluorometrie je metoda pro charakterizaci povrchových nebo intracelulárních znaků buněk v populaci. Používají se monoklonální protilátky, které se váží na povrchové nebo intracelulární antigeny charakteristické pro určité populace buněk, nebo se váží na znaky charakterizující vývojové stádium.

Klasifikace těchto znaků (antigenů) zahrnuje mezinárodní nomenklaturu CD (clusters of differentiation) obsahujících přes 350 CD znaků. V mém případě byla tato metoda použita k zjištění viability kultivovaných buněk měřením proteinu Annexinu V.

Buňky byly přeneseny do 96 jamkové destičky s plochým dnem (Nunc, Německo). Destička s nanesenými buňkami byla centrifugována po dobu 5 minut při 1200rpm a při teplotě 4°C. Poté buňky promyty 2x ve 200μl HEPES pufru. Posléze jsme buňky inkubovali v 10μl Annexinu a po 15 minutách doplnili HEPES pufrům celkový objem 20 μl. Následně bylo k buňkám přidáno 10μl propidium jodidu na jamku. Životnost buněk se měřila průtokovým cytometrem. Zpracování a měření na FACS bylo provedeno Mgr. Žanetou Růžičkovou. Výsledky byly vyhodnoceny programem FlowJo v4.5 (Tree Star, USA)

3.9. Stanovení střevní propustnosti pomocí FITC-DEXTRAN

Míru propustnosti střevní bariéry jsme měřili z krve detekcí fluorescence isothiokyanátu konjugovaného s dextransulfátem sodným (FITC-dextran, MW 4400, Sigma-Aldrich). 440 mg FITC-dextran na 1 kg myši váhy jsme rozpustili ve fyziologickém roztoku a pomocí gaváže ho podali myším kmene BALB/c. Po pěti hodinách jsme odebrali krev, kterou jsme po vysrážení 30 minut centrifugovali (3000 rpm při 4 °C). 50 μl séra a standardu jsme v párech napipetovali na 96 jamkovou destičku a vzorky změřili na spektrofotofluorescenčním přístroji Safire (Tecan group Ltd., Švýcarsko) s excitační délkou 483 nm a emisní délkou 525 nm.

3.10. Navození septického šoku intraperitoneálním podáváním LPS

Navození septického šoku bylo provedeno intraperitoneálním podáním LPS izolovaného z *Salmonella enterica* v dávce 10mg/kg u samic myši BALB/c (n=4). Kontrolní skupině byl podán intraperitoneálně fyziologický roztok (n=4). Koncentrace FITC- dextranu byla změřena z krve po 15 hodinách od podání.

3.11. ADJUVANS

Roztok adjuvans Dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA) o koncentraci 10 mg/ml byl připraven zahřátím na teplotu 62°C.v PBS. Při schlazení výsledného roztoku se vytvořily se lipozomální formy DDA (micely). Kompletní Freudovo adjuvans bylo pouze resuspendováno. LPS izolovaný ze *Salmonella enterica* byl

rozpuštěn v PBS o koncentraci 10mg/kg. *Bordetella pertussis* byla podávána v dávce $3 \cdot 10^9$ tepelně inaktivovaných *B. pertusis* v objemu 100 μ l/myš.

3.12. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Z odebraných vzorků střevní tkáně tlustého střeva byla stanovena exprese mRNA vybraných proteinů (IL-6, iNOS, okludin, klaudin, ZO-1 a vnitřní kontrola β -aktin). Vzorky o hmotnosti 10-30mg byly ihned umístěny do RNA stabilizujícího činidla (Qiagen GmbH, Hilden Německo). RNeasy Mini isolační kit (Qiagen GmbH) byl použit k izolaci celkové mRNA. Čistota RNA byla ověřena změřením poměru absorbancí vlnových délek 260 a 280 nm. Změřené hodnoty byly v rozmezí 2.06 – 2.11. Koncentrace RNA jsme změřily na detekčním přístroji nanodropu (Nanodrop 2000, GMP dodavatel Zlín). Vyizolovaná RNA byla zamrazena v - 20 °C. Po rozmrazení byla RNA přepsána na cDNA reverzní transkripcí pomocí kitu (High capacity cDNA reverse tr. kit, Applied Biosystems, USA). PCR směs v objemu 35 μ l byla podle následující tabulky amplifikována v termocykleru (Gradient cycler BioTech, Peltier Thermal Cycler PTC 200):

Složení PCR směsi v objemu 35 μ l:

PCR voda	11,2 μ l
10 \times RT pufr	7 μ l
25 \times dNTP (MIX)	2,8 μ l
10 \times RT Random primery	7 μ l
20 \times Multi Reverse Transkription	3,5 μ l
Inhibitor RNázy	3,5 μ l

Získaná cDNA se uložila do mrazáku – 20°C.

Další den byla reakční směs „Premix“ pro PCR namíchána (množství na 1 jamičku s nutnou rezervou):

PCR vody (voda bez RNáz).....	7,03 μ l
Taq – Man reakční směsi pro PCR (Gene Expression Master Mix).....	14,06 μ l
Genová sonda	1,375 μ l

K detekci mRNA jednotlivých proteinů byly použity následující sondy od firmy Applied Biosystems:

Mm00607939_s1 Actb
Mm0046191_m1 IL-6
Mm00516703_s1 Cldn2
Mm00500912_m1 Ocln
Mm00493699_m1 T3p1 (ZO-1)
Mm01309898_m1 Nos 2

Do každé jamky bylo napipetováno 5 µl cDNA a 20 µl reakční směsi a destička se zalepila folií. Dále byla destička vortextována a přenesena do PCR 7300 Real Time PCR systém AB Applera ČR.

Parametry amplifikace v 7300 Real Time PCR systém (AB, Applera ČR, 7300) Systém SDS Software byly následující:

	Tepolota	čas	cyklus
Počáteční denaturace	50 °C	2 minut	1
Denaturace	95 °C	10 minut	
Annealing	95°C	15 sekund	40
Elongace	60 °C	1 minuta	

Vyhodnocování probíhalo v programu Genex software (verze 4.3.8).

3.13. Použité chemikálie

3,3' ,5,5' - tetra methylbenzidine (TMB, Sigma, USA)

Bovinní sérový albumin (BSA, Sigma, USA)

Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, St. Louis, USA)

Ethanol (MERCK, Německo)

Gliadin (Sigma, St. Louis, USA)

Kyselina chlorovodíková (LACHEMA, Neratovice, ČR)

Kyselina sírová (LACHEMA, Neratovice, ČR)

Peroxid vodíku(CHEMAPOL, ČR)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (SERVA, Německo)
Tween 20 (Sigma, St. Louis, USA)
Lipopolysacharid ze *Salmonella enterica* serotyp typhimurium(Sigma, USA)
Indomethacin (Sigma, USA)
Freudovo adjuvans (Difco Laboratories,USA)
DDA bromide (Dimethyldioctadecylammonium bromide) (Sigma, USA)
Ethanol Absolute M = 46,7 g/mol (Merck, Německo)
TRIZMA Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) Sigma, Gliadin crude from
Wheat gluten (Sigma)
FITC- dextran (Fluorescein isothiocyanate–dextran, MW 4000, Sigma)
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma Aldrich)

3.14. Použité programy a přístroje

Váhy ADAM AQT 1500 (Adam Equipment comp., Velká Británie).
Analytické váhy GR-202 (A&D, Japonsko)
Spektrofotofluormetr (Safire, Tecan Group Ltd., Švýcarsko)
Termostat CO₂ Incubator (SANYO Electric CO., Japonsko)
Kývačka WS-10 (Edmund Bühler, Německo)
Centrifuga Universal 32R (Hettichlab zentrifugen, Německo)
FACS Sort, FACS Vantage SE (Becton Dickinson, USA)
French press (SLM-AMINCO Spectronic Instruments, USA)
pH metr Jenway 3505 (Baroworld Scientific Ltd., Essex, Anglie)
Promývačka MultiWash II (Tricontinent, USA)
Mrazící box -150 °C (Sanyo, USA)
Spektrofotometr Titertek Multiscan MCC/340 ELISA Reader (Helsinky, Finsko)
Tkáňový box Steril-Antares 72 (Foester Wheeler divison Steril Factory, Itálie)
FACS Sort, FACS Vantage SE (Becton Dickinson, USA)
Fluorescenční mikroskop Olympus AX 70 (Olympus, Tokyo, Japan)
Gradient cycler BioTech, Peltier Thermal Cycler PTC 200
PCR systém (AB, Applera ČR, 7300)

4. VÝSLEDKY

4.1. Měření střevní bariérové funkce u myší

4.1.1. Zavedení metody pro měření střevní propustnosti pomocí podání FITC-dextranu u myší

V naší laboratoři se zabýváme bariérovou funkcí střeva, která hraje významnou roli u mnoha zánětlivých a autoimunitních onemocnění. Zavedení metod pro měření bariérové funkce střeva u myší nám umožnilo sledovat změny ve střevní propustnosti. S použitím metody orálního podávání FITC-dextran (uvedenou v kapitole 4. Materiály a metody) byly měřeny hodnoty střevní propustnosti u myší, jimž byly podávány látky, o kterých je známo, že poškozují střevní bariéru tj. indomethacin a alkohol. Zjistili jsme, že užívání indomethacinu v třídním schématu značně poškozuje střevní sliznici a významně zvyšuje její propustnost.

NSAID (nesteroidní antiflogistika, léky proti bolesti), kam patří i indomethacin, způsobují poškození GIT u myší (dávka 10 mg/kg po 3 dny) Ukázka viz. fotografie č.1 a fotografie č.2:

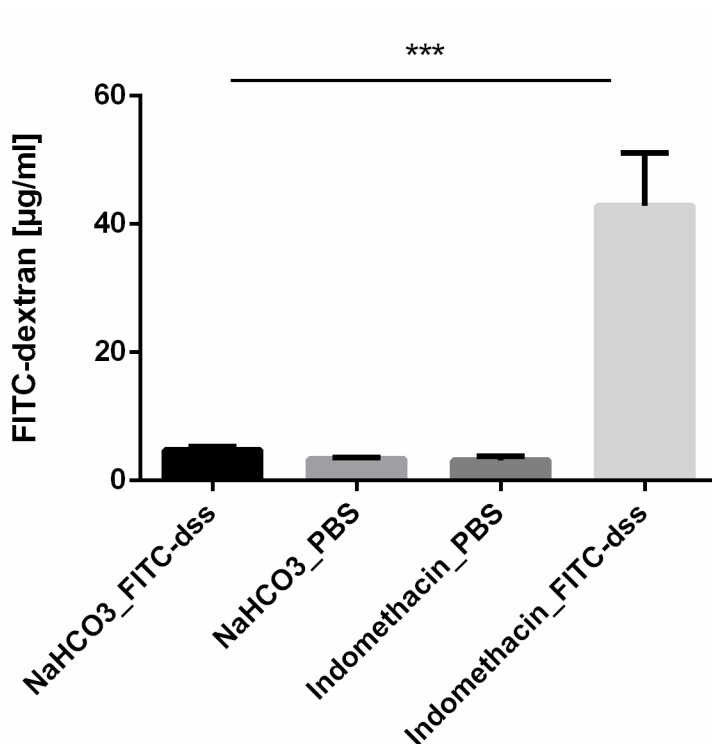


Fotografie č. 1. Poškozená trávicí soustava u myši BALB/c po podání indomethacinu.



Fotografie č. 2. Poškozené tlusté střevo u myši BALB/c po podání indomethacinu.

Výsledky v obr č. 1. dokumentují hodnoty změřené střevní propustnosti u čtyř skupin myši po podání indomethacinu.

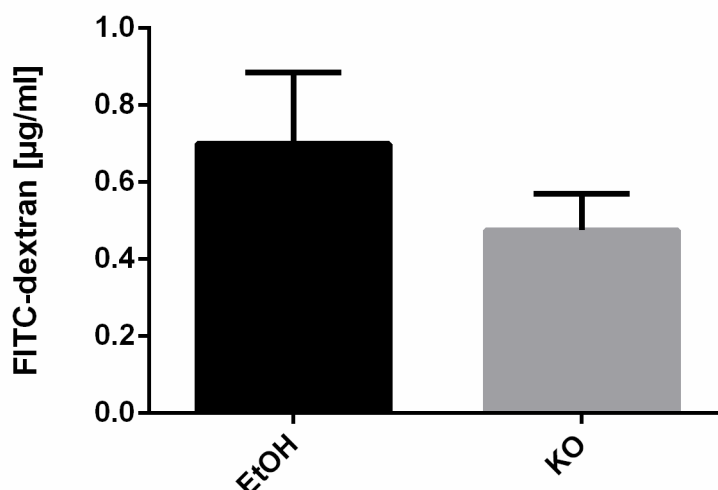


Obr. č. 1. Střevní propustnost pro FITC-dextran po podání indomethacinu. Indomethacin byl podáván v koncentraci 10 mg/kg ve třech po sobě jdoucích dnech. BALB/c myši (n = 3/skupina) byly před podáváním roztoku indomethacinu v NaHCO₃ vyhladovělé po dobu nejméně pěti hodin. Čtvrtý den byl podán FITC-dextran. Pro stanovení statistické významnosti byl použit test ANOVA (P=0,0001).

*** statisticky významný rozdíl skupiny s indomethacinem oproti kontrolní skupině (NaHCO₃) (P<0,001).

Chronická konzumace alkoholu vede k narušení střevní bariéry, proto jsme se rozhodli stanovit změny v její propustnosti. Hodnoty naměřené po podání ethanolu neukázaly statisticky signifikantní zvýšení ve střevní propustnosti oproti kontrolní skupině.

Výsledky v obr. č. 2. dokumentují hodnoty vlivu ethanolu na střevní propustnost.



Obr. č. 2. Střevní propustnost pro FITC-dextran po podání ethanolu.

Myším BALB/c byla intragastricky podána dávka ethanolu 3 g/kg jejich váhy. Roztok obsahoval 50% w/v množství ethanolu. Vliv ethanolu byl měřen 24 hodin po podání. Skupina myši s ethanolem (EtOH) (n = 8/skupina), kontrolní skupina (KO) s (n = 4/skupina). Pro stanovení statistické významnosti byl použit Mann Whitney test.

Statisticky významný rozdíl skupiny s podaným ethanolem oproti kontrolní skupině s PBS nebyl prokázán.

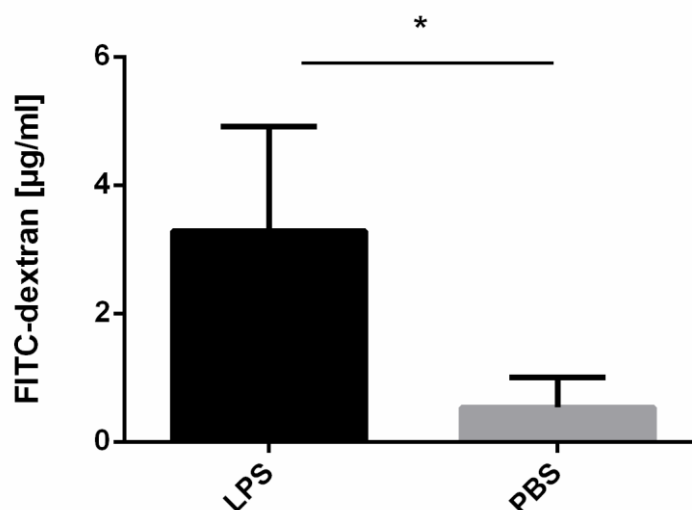
4.1.2. Srovnání metody FITC-dextranu s expresí mRNA pro IL-6 (prozánětlivý cytokin) a proteinů těsných spojů pro měření střevní propustnosti

V návaznosti na naše experimenty s FITC-dextranem jsme hodnotili střevní propustnost dalšími metodami. Pro stanovení změn v expresi genů proteinů těsných spojů, jež jsou umístěny mezi epiteliálními buňkami ve střevě a jsou odpovědné za paracelulární permeabilitu, jsme myším odebrali tkáň tlustého střeva. Z těchto

vzorků jsme izolovali celkovou mRNA, kterou jsme převedli reverzní transkripcí na cDNA. Kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí jsme získali informace o molekulárních změnách ve střevě souvisejících se změnou střevní propustnosti. Nejčastěji používaným modelem ovlivňujícím střevní propustnost je podání lipopolysacharidu, který vyvolává septický šok. Tkáň střeva odebraná z těchto myší sloužila jako reprezentativní vzorek pro PCR. Stanovovali jsme expresi mRNA pěti vybraných genů. Další metodou k průkazu bariérové funkce střeva byla imunofluorescence na histologických řezech střeva.

4.1.2.1. Střevní propustnost u myší s vyvolaným septickým šokem

Výsledky jasně ukazují, že indukovaný septický šok (pomocí LPS) statisticky signifikantně zvyšuje střevní propustnost měřenou metodou FITC-dextranu.



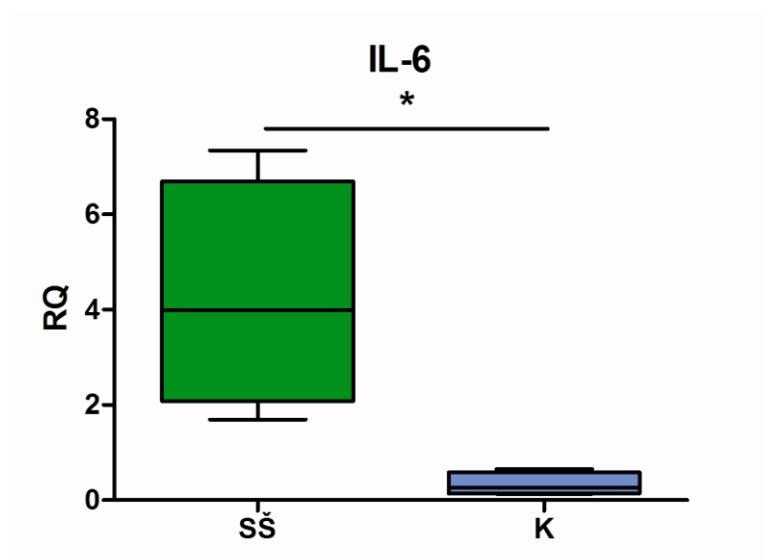
Obr. č. 3. Zvýšená střevní propustnost u septického šoku po intraperitoneálním podání LPS ze *Salmonella enterica* v dávce 10 mg/kg u samic myší kmene BALB/c (n=4). Kontrolní skupině byl podán intraperitoneálně sterilní fyziologický roztok (n=4). Bylo měřeno množství FITC-dextranu v séru po 15 hodinách po podání LPS.

Pro stanovení statistické významnosti byl použit Mann Whitney test. (P=0,0286)

* statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině (P<0,05).

4.1.2.2. Stanovení exprese mRNA IL-6, iNOS, ZO-1, kladinu a okcludinu pomocí RT-PCR ve střevní tkáni myši se septickým šokem a myši kontrolních

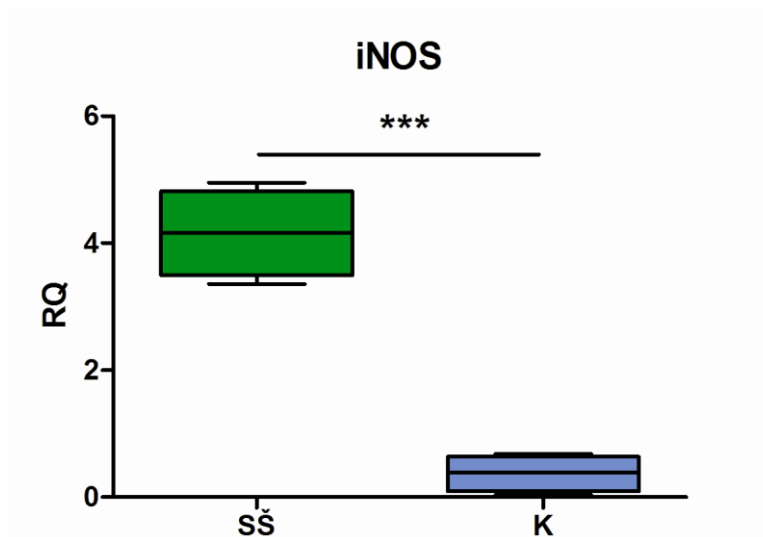
Výsledky jasně ukazují na statisticky významné zvýšení exprese prozánětlivého cytokinu IL-6 u myši, kterým byl navozen septický šok. Lipopolysacharid ze *Salmonella enterica* byl těmto myším podán v dávce 10 mg/kg, kontrolní skupině myši byl podán pouze PBS. Množství mRNA konkrétního genu je uvedeno jako hodnota relativní kvantifikace (RQ) vyjadřující relativní poměr RNA daného genu k množství RNA vnitřní kontroly (β -aktinu).



Obr. č. 4. Relativní kvantifikace (RQ) genové exprese mRNA genu pro cytokin IL-6 ve střevní sliznici myši po podání LPS a myši kontrolních. Hodnoty byly u myši (n=4) se septickým šokem (SŠ) zvýšeny oproti kontrolním myším (K) (n=4). Pro stanovení statistické významnosti byl použit t-test ($P = 0,0286$). *statisticky významný rozdíl skupiny septického šoku oproti kontrolní skupině ($P < 0,05$).

Z naměřených hodnot vyplývá, že cytokin IL-6 je ve zvýšené míře přítomný ve střevní tkáni a není vyloučeno, že má vliv na zvýšenou střevní propustnost.

Dalším genem u kterého byla měřena exprese mRNA ve vzorcích střevní tkáně byl gen pro inducibilní syntázu oxidu dusnatého (iNOS).

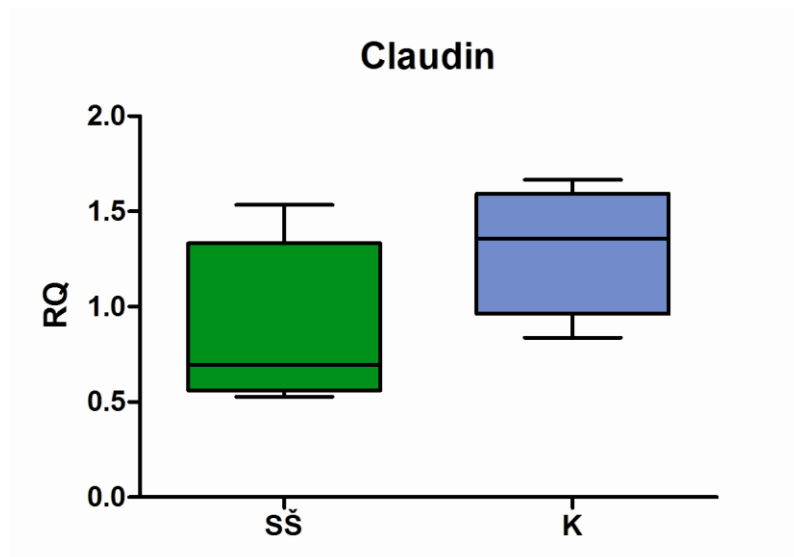


Obr. č. 5. Relativní kvantifikace (RQ) genové exprese mRNA genu pro iNOS ve střešní sliznici myši po podání LPS a myši kontrolních. Hodnoty byly u BALB/c myši (n=4) se septickým šokem (SŠ) výrazně zvýšeny oproti hodnotám kontrolních myši (K) (n=4).

Pro stanovení statistické významnosti byl použit t-test (P = 0,001).

***** statisticky významný rozdíl skupiny septického šoku oproti kontrolní skupině (P<0,001).**

Měřením kvantifikace genové exprese iNOS se prokázal statisticky výrazný nárůst oproti zdravé kontrolní skupině myši. Zvýšená hodnota iNOS je známkou zánětu ovlivňující propustnost.

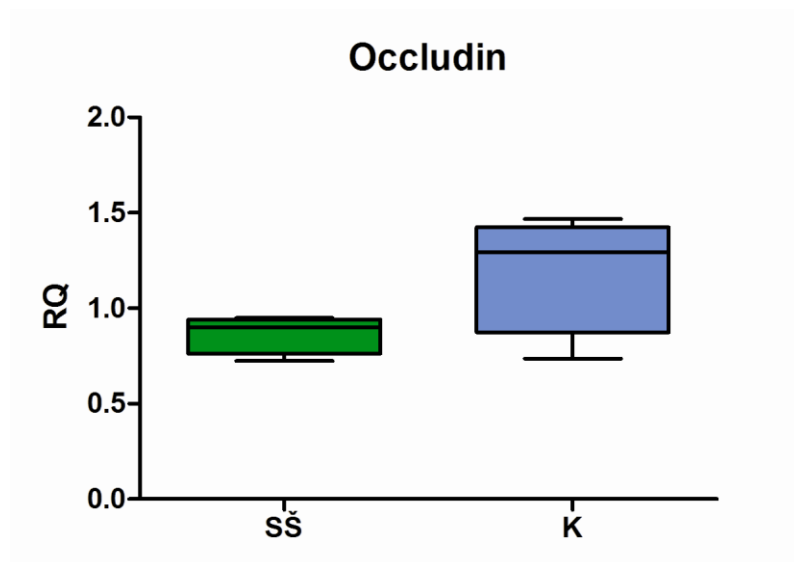


Obr. č. 6. Relativní kvantifikace (RQ) genové exprese mRNA genu pro klaudin (claudin) ve střešní sliznici myši po podání LPS a myši kontrolních. Hodnoty

byly u myší (n=4) se septickým šokem (SŠ) lehce sníženy oproti hodnotám kontrolních myší (K) (n=4).

Pro stanovení statistické významnosti byl použit t-test (P = 0,2).

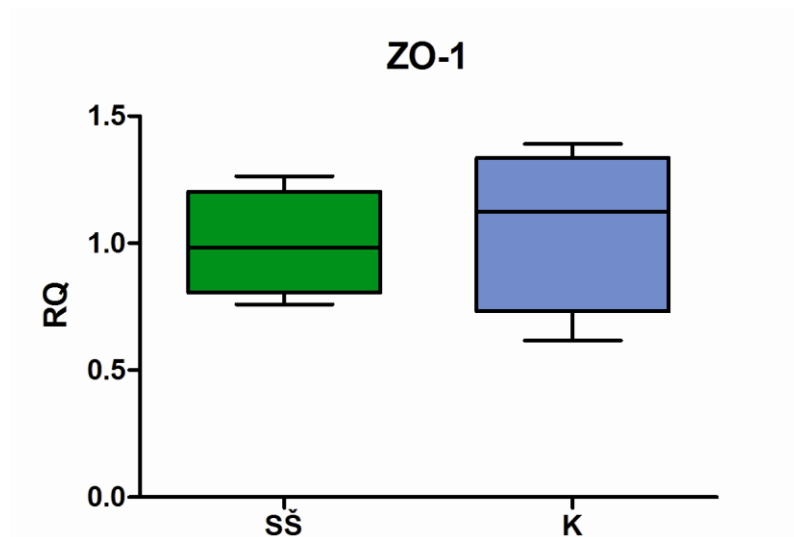
Statisticky významný rozdíl skupiny septického šoku oproti kontrolní skupině nebyl prokázán.



Obr. č. 7. Hodnoty relativní kvantifikace (RQ) genové exprese mRNA genu pro okludin (occludin) ve střevní sliznici myší po podání LPS a myší kontrolních. Hodnoty byly u myší (n=4) se septickým šokem (SŠ) lehce sníženy oproti hodnotám kontrolních myší (K) (n=4).

Pro stanovení statistické významnosti byl použit t-test (P = 0,0986).

Statisticky významný rozdíl skupiny septického šoku oproti kontrolní skupině nebyl prokázán.



Obr. č. 8. Relativní kvantifikace (RQ) genové exprese mRNA genu pro ZO-1 ve střevní sliznici myši po podání LPS a myši kontrolních. Hodnoty byly u myši (n=4) se septickým šokem (SŠ) lehce sníženy oproti hodnotám kontrolních myši (K) (n=4).

Pro stanovení statistické významnosti byl použit t-test (P = 0,06857).

Statisticky významný rozdíl skupiny septického šoku oproti kontrolní skupině nebyl prokázán.

Z měření vyplývá, že patogeneze sepse zahrnuje poškození bariérové funkce střeva. Působení velkého množství bakteriálních složek, především endotoxinů, na imunitní systém těla a indukce prozánětlivých mediátorů rozvíjí a zesiluje septickou reakci.

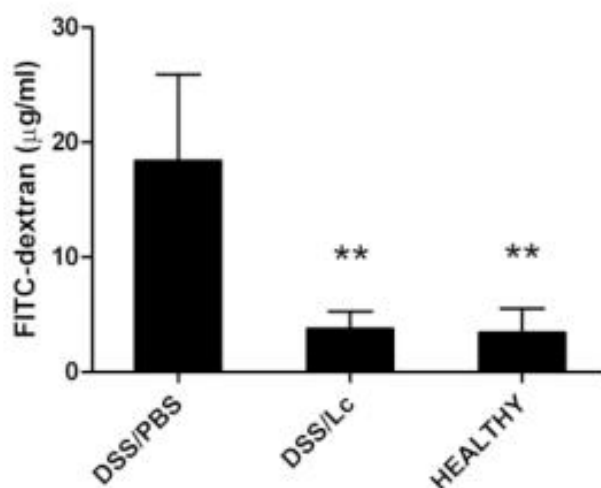
Provedení a zpracování RT-PCR proběhlo na pracovišti Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. lékařské fakulty UK v Praze, kde mi bylo umožněno uskutečnit tuto metodiku za spolupráce RNDr. Jiřího Hrdého.

4.1.3. Vliv probiotických bakteriálních komponent na střevní bariérovou funkci

Zesílení funkce střevní bariéry pomocí probiotických bakterií nebo jejich složek naznačuje možné ochranné mechanismy jejich podávání. Hledání pro zdraví prospěšných bakterií a jejich složek je náplní současného výzkumu. Proto i my jsme se rozhodli ověřit působení probiotik na slizniční bariéru ve střevě, jako jednoho

z hlavních mechanismů jejich účinku. Probiotické bakterie mohou dále tlumit prozánětlivou reakci či kompetovat s ostatními bakteriemi o životní prostor a živiny.

Abychom stanovili vliv některých komponent probiotických bakterií na střevní propustnost, aplikovali jsme metodu FITC-dextranu v modelu experimentální DSS kolitidy s preventivním podáváním bakteriálních komponent.



Obr. č. 9. Zvýšená střevní propustnost pro FITC-dextran po perorálním podání bakteriálních lyzátů z *L. casei*. Střevní paracelulární propustnost byla výrazně snížena u myši léčených bakteriálním lyzátem *L. casei* (n=5) ve srovnání s kontrolní skupinou (myši, které dostávaly PBS) v den ukončení experimentu (35. den preventivního podávání *L. casei* při DSS kolitidě).

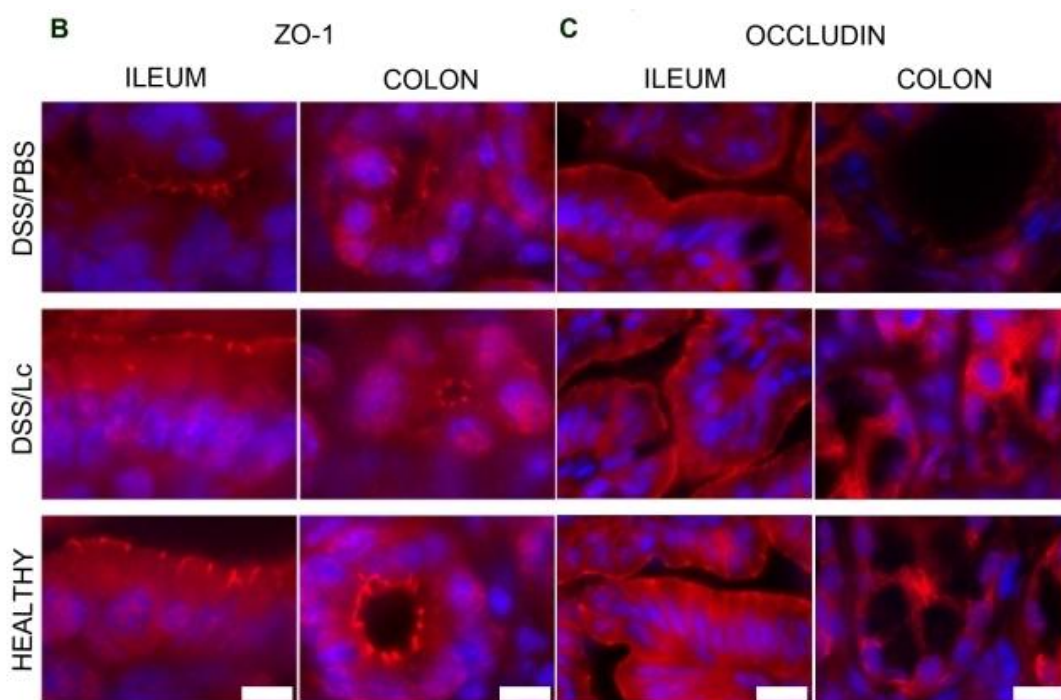
Pro stanovení statistické významnosti byly použity ANOVA s Dunnettovým testem.

**** statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině (kontrolní-myši, které dostávaly gavaží fyziologický roztok a 28. den jim byl na 7 dní podán DSS) ($p < 0,01$).**

Jednou z hlavních funkcí střeva je jeho schopnost vytvářet bariéru mezi vnitřním a zevním prostředím. K objevení významu bariérové funkce střeva ve vztahu k idiopatickým střevním zánětům přispěly studie, které našly zvýšenou střevní propustnost u pacientů jak s těmito záněty tak i u jejich příbuzných. Podpora funkce střevní bariéry pomocí lyzátů probiotik by mohla znamenat bezpečný způsob prevence či léčby těchto zánětů. Námí zavedenou metodu na testování střevní

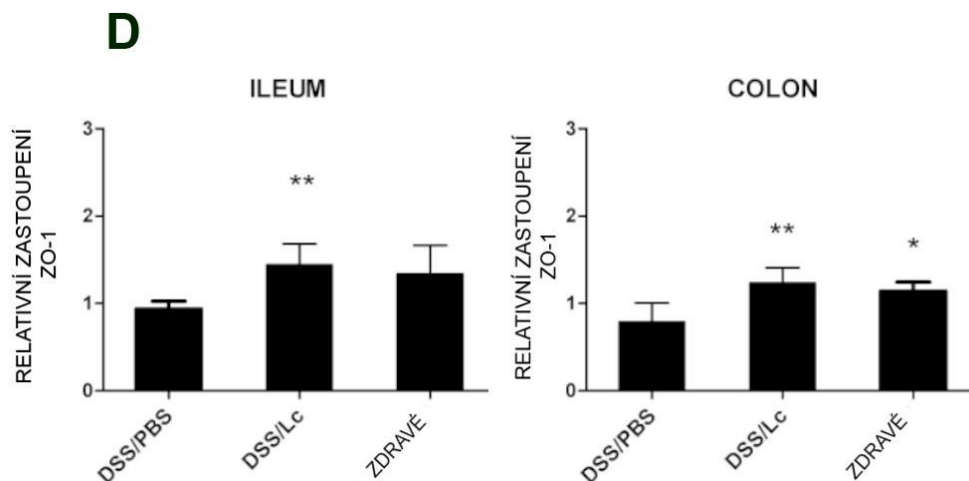
propustnosti jsme aplikovali v preventivním léčebném podání bakteriálních lyzátů z *L. casei* na modelu DSS kolitidy.

U myši léčených bakteriálním lyzátem z *L. casei* byla střevní paracelulární propustnost proteinů signifikantně snížena ve srovnání s kontrolní skupinou viz. obr. č. 9. Pomocí fluorescenční analýzy těsných spojů: ZO-1 a okludinu, jsme zjistili, že jejich produkce a lokalizace v kolon a ileu je po podání lyzátu zachována ve stejné míře, jakou můžeme pozorovat u zdravých myši.



Obr. č. 10. Imunofluorescence těsných spojů proteinů ZO-1 a okludinů v tkáňových řezech tlustého střeva a terminálního ilea u myši léčených *L. casei* a u kontrol. ZO-1 nebo okludin (červené značení), DAPI pro nabarvení jader (modré značení).

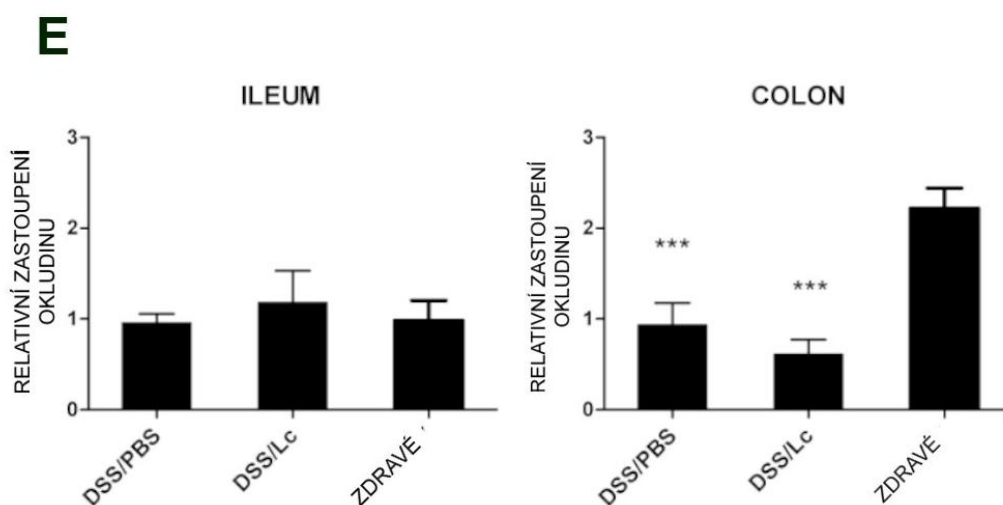
Naše výsledky z histologie jsme ověřili pomocí RT-PCR 1D. Stanovení exprese mRNA pro ZO-1 ukázala jeho stabilní hladinu, která se signifikantně liší od hladiny u PBS/DSS skupiny myši.



Obr. č. 11. Stanovení exprese mRNA ZO-1 u myši léčených *L. casei* a u kontrol. Pro stanovení statistické významnosti byly použity ANOVA s Dunnettovým testem.

*** statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině (kontrolní myši, dostávaly gavaži fyziologický roztok a 28. den jim byl na 7 dní podán DSS) ($p < 0,05$)**

**** statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině (kontrolní-myši, které dostávaly gavaži fyziologický roztok a 28. den jim byl na 7 dní podán DSS) ($p < 0,01$).**



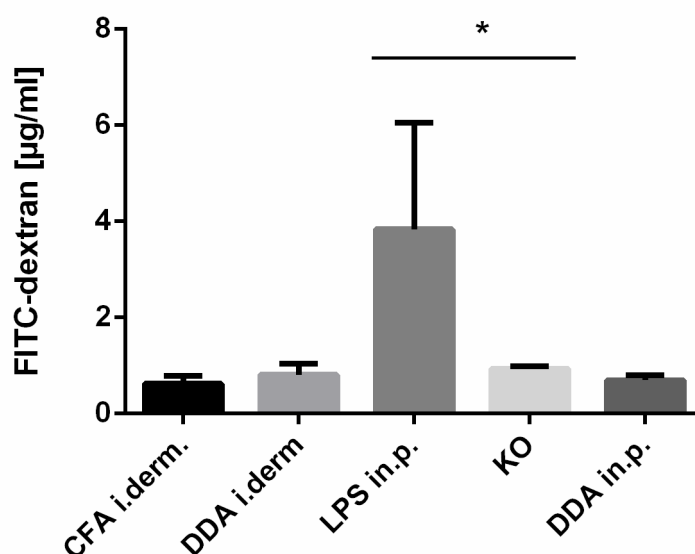
Obr. č. 12. Stanovení exprese mRNA okludinu u myši léčených *L. casei* a kontrol.

Pro stanovení statistické významnosti byly použity ANOVA s Dunnettovým testem.

*** statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině (kontrolní-myši, které dostávaly gavaží fyziologický roztok a 28. den jim byl na 7 dní podán DSS) ($p < 0,0001$).

4.1.4. Vliv adjuvans na střevní propustnost

Cílem bylo studium potenciální úlohy střevní bariéry u experimentálních modelů nemocí indukovaných podáním autoantigenů spolu s adjuvans. Poškození střevní bariéry by mohlo podpořit vznik imunopatologických následků podání autoantigenů. Ke studiu byla použita tato adjuvancia: kompletní Freudovo adjuvans (CFA), dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA), *Bordetella pertussis* a LPS.

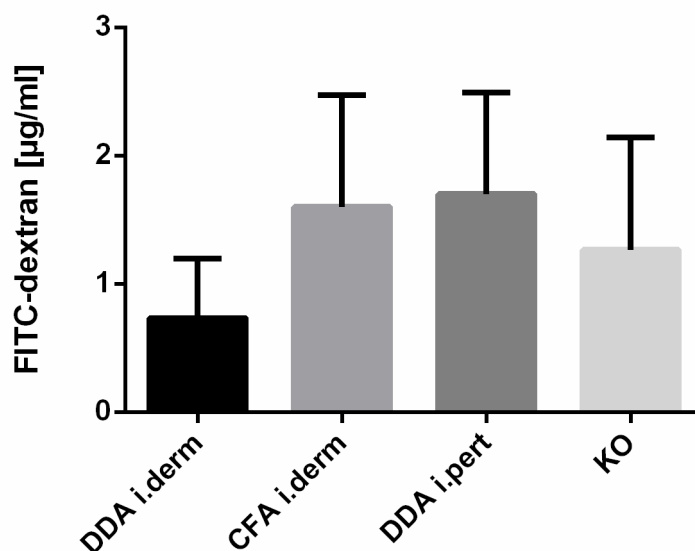


Obr. č. 13. Naměřená střevní propustnost po podání některých druhů adjuvans. Měřeno po 24 hodinách pomocí metody FITC-dextranu.

CFA je Freudovo adjuvans, DDA je Dimethyldioctadecylammonium bromide, LPS je lipopolysacharid ze *Salmonella enterica* o koncentraci 20mg/kg. Kontrolní skupina (KO) dostávala fyziologický roztok. I. derm. značí intradermální podání do ocásku, in.p. je zkratka pro intraperitoneální podání.

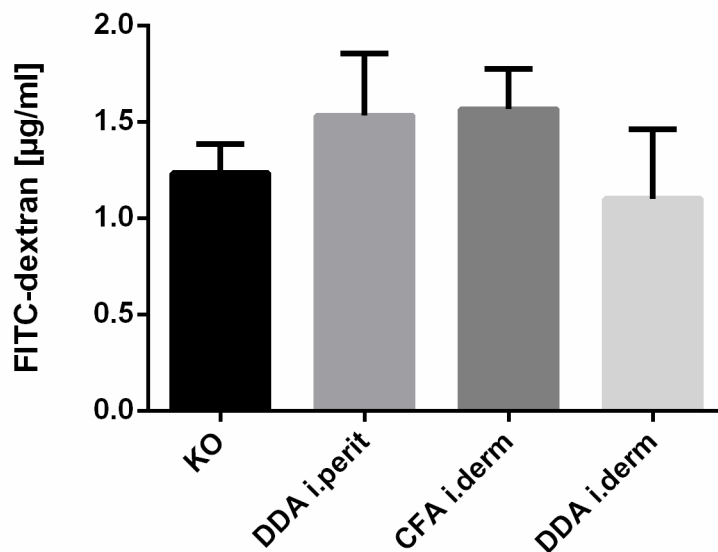
Každá skupina zahrnovala tři samice myši BALB/c. Pro stanovení statistické významnosti byla použita jednosměrná ANOVA s Dunnetovým testem. (P=0,0119)

* statisticky významný rozdíl skupiny s LPS oproti kontrolní skupině (P<0,05).



Obr. č. 14. Naměřená střevní propustnost po podání některých druhů adjuvans. Měřeno po 7 dnech pomocí metody FITC-dextranu (n= 3 myši/ skupinu).

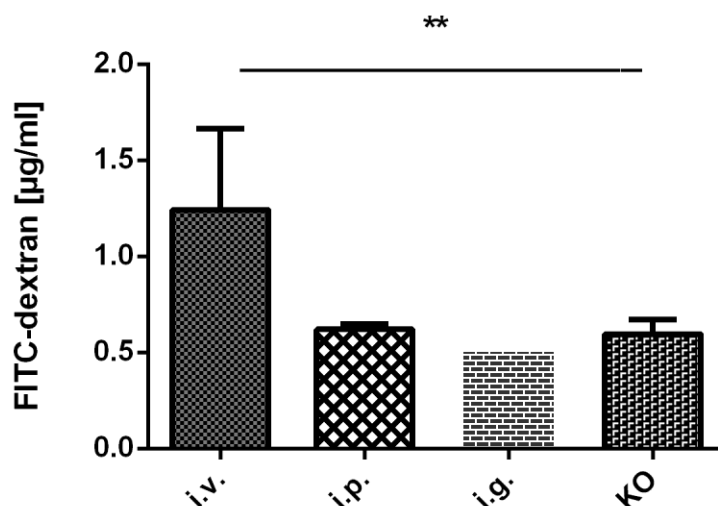
CFA je kompletní Freudovo adjuvans, DDA je Dimethyldioctadecylammonium bromide, i.derm. značí intradermální podání do kůže na ocásku, i.pert. je zkratka pro intraperitoneální podání. Kontrolní skupina (KO) dostávala fyziologický roztok. Skupina myši s i. p. aplikovaným LPS nepřežila do dalšího měření. Pro stanovení statistické významnosti byla použita jednosměrná ANOVA test s Dunnetovým testem. Statisticky významný rozdíl jednotlivých skupin adjuvans oproti kontrolní skupině nebyl prokázán.



Obr. č. 15. Naměřená střevní propustnost po podání některých druhů adjuvans. Měřeno po 14 dnech po podání pomocí metody FITC-dextran (n= 3 myši na skupinu).

CFA je kompletní Freudovo adjuvans, DDA je Dimethyldioctadecylammonium bromide. I. derm. značí intradermální podání do kůže na ocásku, i.pert. je zkratka pro intraperitoneální podání. Kontrolní skupina (KO) dostávala fyziologický roztok. Pro stanovení statistické významnosti byl použit jednosměrný ANOVA test s Dunnetovým testem. Statisticky významný rozdíl jednotlivých skupin adjuvans oproti kontrolní skupině nebyl prokázán.

Vliv *B. pertussis* jako adjuvans na střevní propustnost



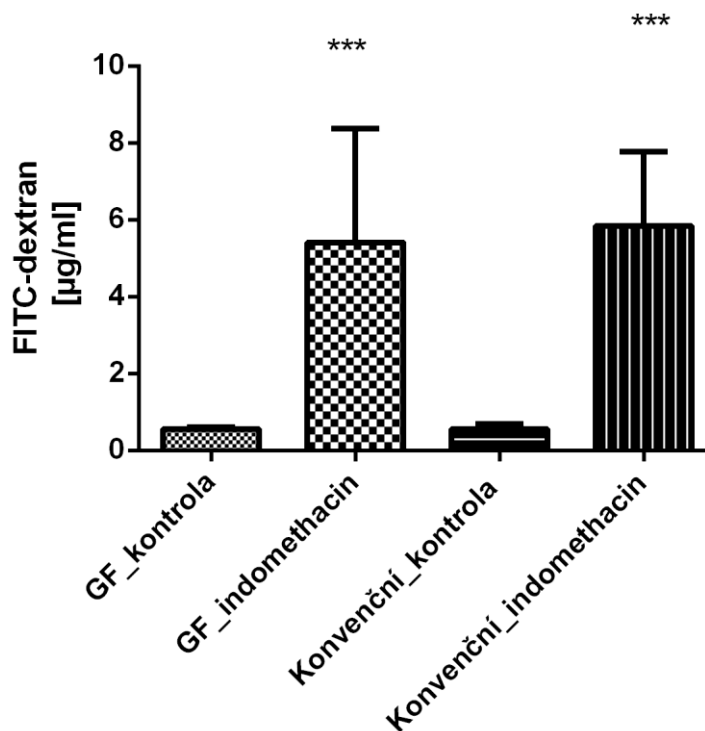
Obr. č. 16. Střevní propustnost pro FITC- dextran po podání *Bordetala pertussis*. *B. pertussis* byla podávána myším BALB/c intravenózně (i.v.) (n= 8/ skupina), intraperitoneálně(i.p.) (n= 2) a intragastricky (i.g.)(n=2), střevní propustnost byla měřena po 24 hodinách. Kontrolám (KO) byl podán fyziologický roztok. Pro stanovení statistické významnosti byla použita jednosměrná ANOVA test s Dunettovým srovnávacím testem (P=0,0084).

** statisticky významný rozdíl skupiny s intravenózním podáním *B. pertussis* oproti kontrolní skupině (P<0,01)

V porovnání s podáním LPS, který statisticky signifikantně zvyšoval střevní propustnost, vliv podání různých druhů adjuvans, s výjimkou *B. pertusis*, neukázal podstatný statisticky významný rozdíl ve změně střevní propustnosti.

4.1.5. Měření střevní propustnosti u bezmikrobních a konvenčních myší.

Cílem bylo zjistit, zda kolonizace mikroflórou ovlivní střevní bariérovou funkci.

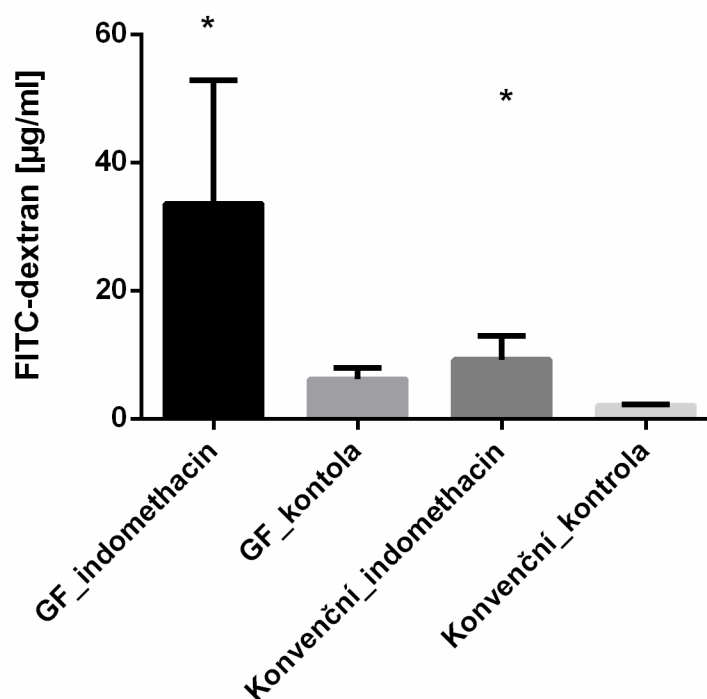


Obr. č. 17. Měření střevní propustnosti u dospělých bezmikrobních (GF) a konvenčních myší.

Myším BALB/c (n = 8 na skupinu GF_indomethacin; n = 3 na skupinu konvenční_indomethacin) byl podán intragastricky indomethacin v koncentraci 15 mg/kg střevní propustnost byla měřena po 24 hodinách, kontrolním myším byl podán pouze roztok NaHCO₃ (n = 3 konvenční skupina; n = 6 GF skupina). Myši byly vyhladovělé před podáváním roztoku indomethacinu v NaHCO₃ po dobu pěti hodin. Minimálně 4 hodiny před odebráním vzorků byl podán FITC-dextran. Pro stanovení statistické významnosti byl použitý nepárový t-test testem (P=0,0001).

*** statisticky významný rozdíl skupiny s indomethacinem oproti kontrolní skupině (P<0,001)

Překvapivě jsme nenašli rozdíl v propustnosti mezi dospělými myšmi chovanými v konvenčních a bezmikrobních podmínkách. Tento výsledek lze vysvětlit působením antigenů obsažených v krmných peletách, které tak podporují celistvost střevní bariéry i u bezmikrobních myší. Tyto pelety mohou obsahovat složky bakterií i jiné antigeny ovlivňující integritu střevní bariéry bezmikrobních myší. Proto jsme dále v experimentu pokračovali na kojených mláďatech.



Obr. č. 18. Měření střevní propustnosti u kojenných bezmikrobních (GF) a konvenčních myších mlád'at. 19 dní starým bezmikrobním mlád'atům (GF) myši BALB/c obou pohlaví byl intragastricky podáván indomethacin o koncentraci 15 mg na kg jejich váhy na dobu 24 hodin. Skupina GF myši dostávajících indomethacin (n=5), GF kontroly (n= 4). Mlád'atům myši B6 obou pohlaví 18 dní starým byl podáván indomethacin intragastricky o koncentraci 15 mg/kg jejich váhy na 24 hodin. Skupina myši dostávajících indomethacin (n= 8), kontroly (n=2). Pro stanovení statistické významnosti byl použitý test nepárový t-test (P=0,0265).

* statisticky významný rozdíl skupiny s indomethacinem oproti kontrolní skupině (P<0,05)

* statisticky významný rozdíl skupiny GF s indomethacinem oproti skupině konvenční s indomethacinem (P=0,0295) (P<0,05)

U bezmikrobních mlád'at po podání indomethacinu byly hodnoty střevní propustnosti statisticky signifikantně zvýšeny oproti konvenčním mlád'atům. Tento výsledek ukazuje, že kolonizace střevního traktu ovlivňuje střevní propustnost již brzy po narození.

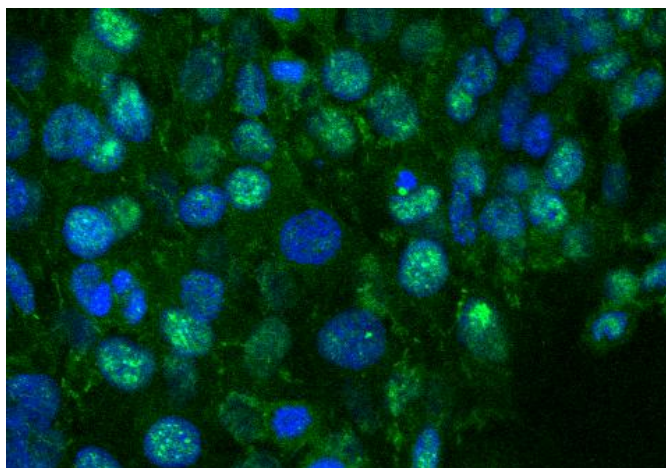
Sterilitu bezmikrobních myší jsme ověřovali barvením nátěru stolice podle Grama.

4.2. Využití myší epitelové linie pro studium efektu LPS a gliadinu

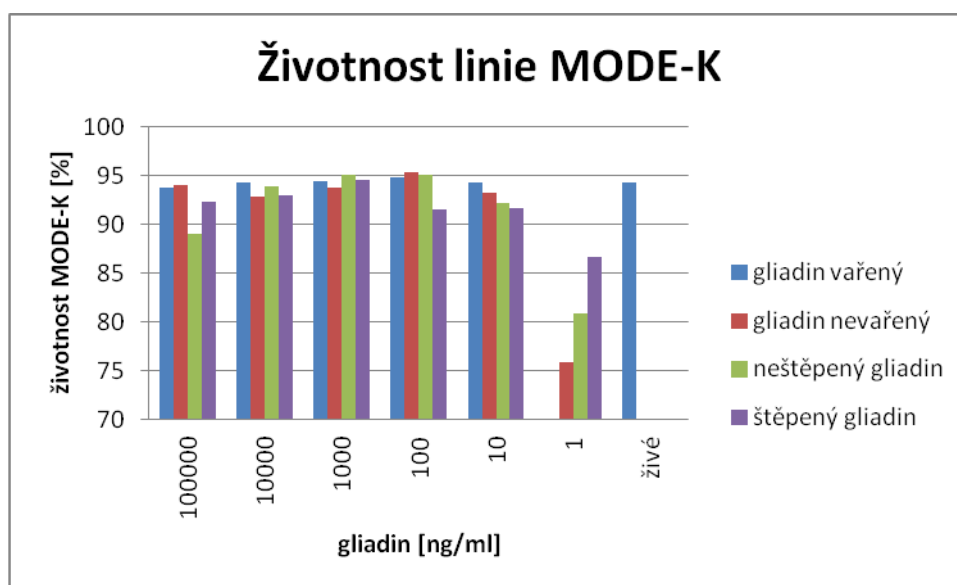
Dále jsme sledovali působení LPS na myší epitelovou linii MODE-K. Je obecně známo, že gliadin mění střevní propustnost a proto jsme otestovali gliadin po různých úpravách.

V naší laboratoři máme nově k dispozici tuto myší linii MODE-K, kterou jsme již stačili použít na předběžné pokusy k sledování bariérové funkce. V těchto našich předběžných experimentech jsme popsali chování těsných spojů, která ještě nejsou v literatuře u této linie popsána.

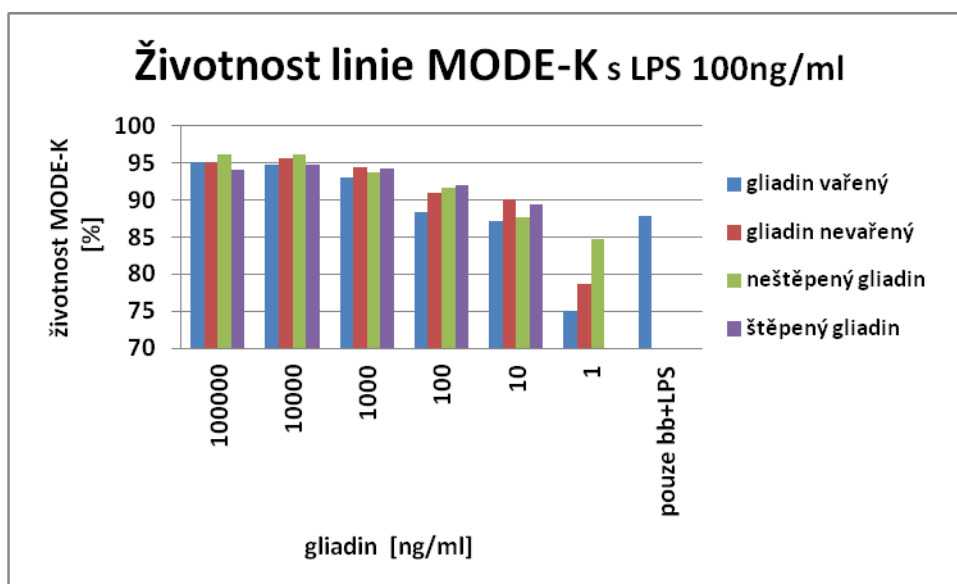
Předběžná ukázka z in vitro experimentů:



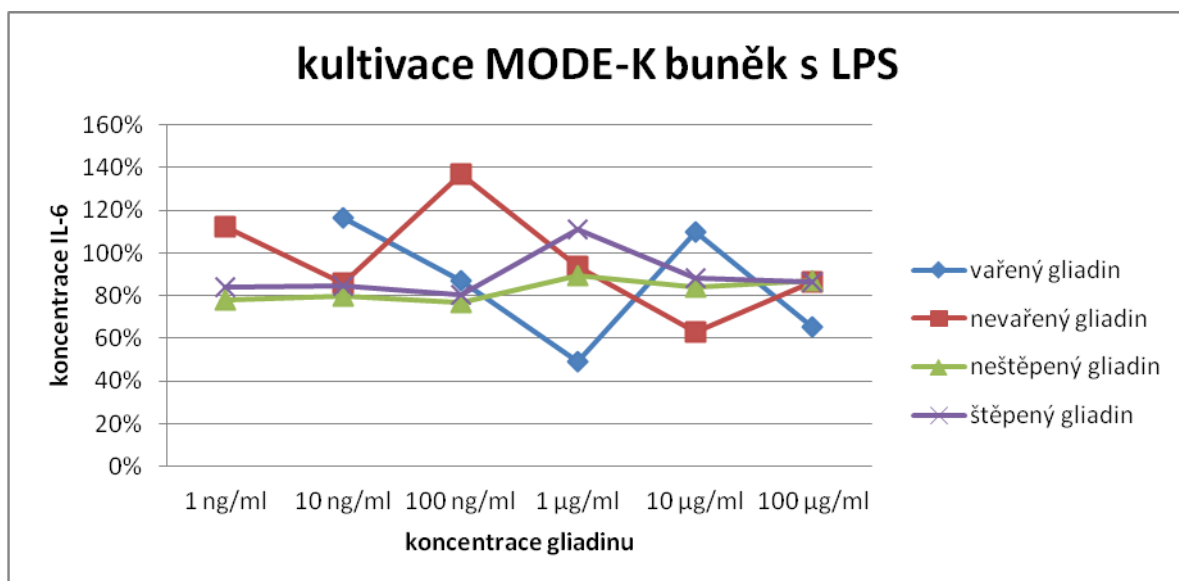
Obr. č. 19. Fluorescenční značení těsných spojů u linie MODE-K.



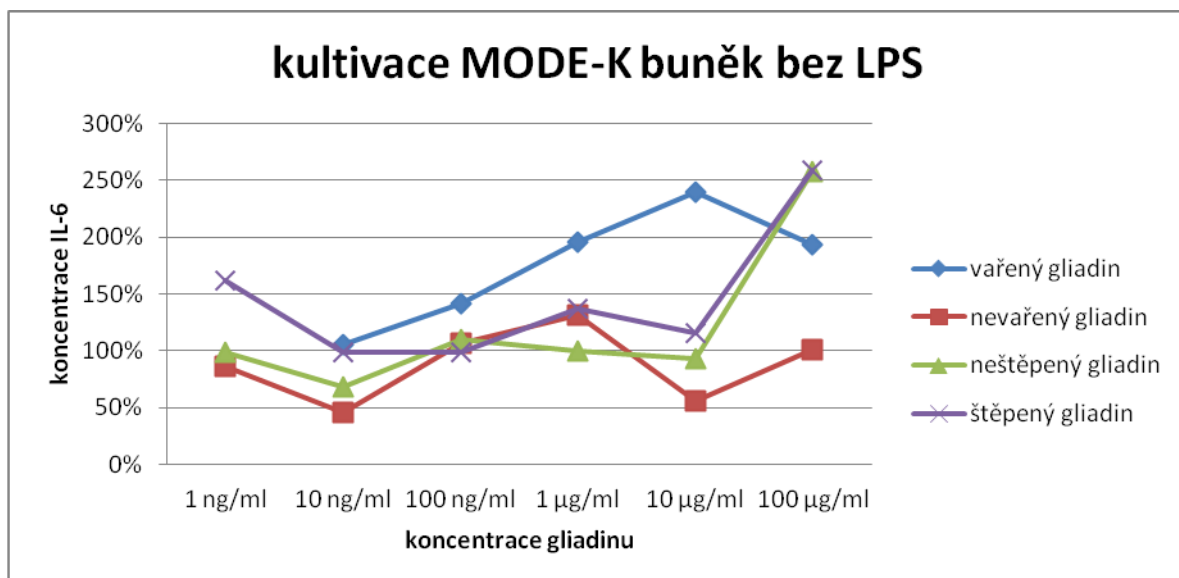
Obr. č. 20 Ověření životnosti buněčné linie MODE-K pomocí průtokové cytometrie.



Obr. č.21 Ověření životnosti buněčné linie MODE-K v přítomnosti LPS 100ng/ml pomocí průtokové cytometrie.



Obr. č. 22 Spojnicový graf změny produkce IL-6 buněčné linie MODE-K v přítomnosti různých druhů gliadinů a různých koncentrací těchto gliadinů v hodnotách koncentrace od 1 ng/ml až po 100 µg/ml a také přítomnosti LPS v koncentraci 100 ng/ml. Hodnoty jsou vyneseny jako procenta produkce IL-6 vztážená ke koncentraci MODE-K buněk v přítomnosti pouze LPS. Kultivace trvala 24 hodin.



Obr. č. 23 Spojnicový graf změny produkce IL-6 buněčné linie MODE-K v přítomnosti různých druhů gliadinů a různých koncentrací těchto gliadinů v hodnotách koncentrace od 1 ng/ml až po 100 µg/ml. Hodnoty jsou vyneseny jako procenta produkce IL-6 vztažená ke koncentraci MODE-K buněk samotných. Kultivace trvala 24 hodin.

5. DISKUZE

V posledních letech se zvyšuje povědomí o znalostech střevní bariéry a významnosti její integrity. Ztráta celistvosti střevní bariéry předchází mnoha nemocem, jako jsou např. nespecifické střevní záněty a celiakie. K narušení integrity střevního epitelu taktéž dochází u pacientů, kteří se nacházejí v kritického stavu, tj. jsou po náročné operaci, prodělali větší zranění, traumata, a jsou v riziku rozvoje sepse či multiorgánového selhání. Pochopení funkce střevní bariéry a případných patofyziologických mechanismů nám může pomoci ve vylepšení prevence i zvýšení úspěšnosti léčby.[46]

Způsobů provedení měření střevní propustnosti je mnoho, obzvláště pro lékařská využití se jich používá značné množství.

Látky ze střevního lumen se mohou vstřebávat dvěma rozdílnými způsoby, buď prostupují transcelulárně přes membránu a cytoplasmu enterocyty, nebo se buňce vyhnou a procházejí paracelulárně skrze mezibuněčný prostor mezi přilehlými buňkami. Lipofilní látky většinou využívají transcelulární cestu pomocí endocytózy. Hydrofilní látky zejména aminokyseliny a jednoduché cukry jdou pasáží vodních pórů. Makromolekulární substance a antigeny využívají paracelulární cestu transportu. Transcelulárně prochází manitol a L- rhamóza. Paracelulárně proniká laktulóza, rafinóza, cellobióza, PEG (polyethylenglykol), EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina). U střevních poškození, která vedou k atrofii střevního epitelu a zvýšení střevní permeability, dochází k snížení resorbce látek transcelulárně a na druhé straně se zvyšuje průchod látek paracelulární cestou.[47]

V současnosti se využívají dva hlavní přístupy v hodnocení poškození střevní bariéry. Buď se můžeme zaměřit na celkové poškození střevního epitelu nebo úžeji na poškození či ztrátu těsných spojení. Pro první uvedený příklad lze hodnotit poškození střevního epitelu měřením proteinu I-FABP. Jedná se o malý ve vodě rozpustný protein o velikosti 14-15 kDa, který se uvolňuje z enterocytů v tenkém a tlustém střevě. Jeho normální fyziologická funkce je transport mastných kyselin z apikální strany membrány enterocyty do endoplasmatického retikula, kde probíhá biosyntéza komplexních lipidů. V případě, kdy dojde k porušení membránové integrity enterocyty, I- FABP je uvolněn do cirkulace. Díky tomu se nárůst hladiny I-FABP může měřit v plazmě nebo moči.[48]

Konkrétní poškození střevního epitelu zjistíme stanovením ztrát proteinů tvořících těsná spojení. Klaudiny jsou transmembránové proteiny, které jsou hlavně zodpovědné za integritu epitelu a paracelulární bariérovou funkci. Pokud jsou tyto proteiny fyziologicky nefunkční, následkem jsou patologické změny ve střevě. Zeissig a spol. [48] ukázali na poškozenou bariérovou funkci střeva, která byla doprovázena sníženou expresí hned několika klaudinů (klaudinů 1,3 a 5,7 a 8 v biopsiích střevní sliznice pacientů s Crohnovou nemocí. Na druhé straně exprese claudinu 2 (proteinu tvořícího pór) byla zvýšená.[49]

My jsme se zaměřili na metodu střevní propustnosti, která spočívá v per-orálním podávání 4,4 kDa FITC-dextranu, který je velmi často používán ve zvířecích modelech. Tímto přístupem jsme stanovili střevní propustnost a tedy stav bariérové funkce po podání indomethacinu, ethanolu a LPS. Ve všech těchto případech byla střevní propustnost zvýšená. Pouze měření propustnosti střeva po podání ethanolu nebyla statisticky signifikantní. Avšak z literatury se ví, že konzumace alkoholu napomáhá růstu Gram negativních bakterií ve střevě, které způsobují zvýšenou akumulaci endotoxinů ve střevě. Navíc metabolismus alkoholu Gram negativními bakteriemi a střevními epiteliálními buňkami může ve výsledku podpořit nahromadění acetaldehydu. Acetaldehyd může zvyšovat střevní propustnost tím, že zesiluje tyrosinovou fosforylaci proteinů těsných spojení a adherentních spojení.[54]

Vliv mikrobiálních složek na epiteliální těsná spojení je také výrazný. Komenzální mikroflóra a její složky mohou vyvolat produkci mnoha mediátorů, které se podílejí na poškození tkání, imunitní dysregulaci, vzniku zánětlivých onemocnění a v těžkých klinických případech i smrti hostitele. V případech infekcí způsobených Gram negativními bakteriemi jsou tyto patologické stavy vyvolané endotoxiny. Především bakteriální endotoxin - lipopolysacharid (LPS) je považován za hlavní komponentu, jež je zodpovědná za vznik septického šoku.[50]

Sepse je spojená se změnami ve střevní bariérové funkci, ta se stává více propustná pro složky, které se za normálních fyziologických podmínek nedostávají mimo lumen střeva. Jde především o různé antigeny ze stravy a bakterie.[51]

Cílem této práce bylo zjistit, co nejvíce o funkci střevní bariéry a především o mechanismech podporujících integritu střevního epitelu, který za normálních podmínek, mechanicky brání translokaci bakterií mimo lumen střeva. Zásadní jsou těsná spojení mezi buňkami epitelu, která mají určující roli pro charakter bariéry. Těsná spojení musí selektivně umožnit paracelulární absorpci skrze proteiny těsných

spojů a na druhé straně zabránit průchodu bakterií a toxinů těmito spoji. Střevní bariéra je tedy nezbytná pro udržení fyziologického prostředí organismu a jeho ochranu před nemocemi. Nicméně mechanismus vzniku poškozených těsných spojení stále není plně objasněn. V našem experimentu jsme sledovali expresi proteinů těsných spojení u myši s vyvolaným septickým šokem. Pro zjištění poškození paracelulární cesty toku látek ve střevě myši s podaným LPS a navozeným septickým šokem jsme stanovovali expresi mRNA genů pro IL-6, iNOS, ZO-1, kladin a okcludin. Signifikantně zvýšený byl pouze prozánětlivý cytokin IL-6, který je pro septický šok typický. Práce Suzuki (20011)[52] uvádí, že IL-6 zvyšuje permeabilitu TJs stimulací exprese kladinů-2, kteří vytváří pórovité struktury. My jsme ho však potvrdili přímo i v tkáni střeva. Dále jsme stanovili statisticky významně zvýšenou genovou expresi iNOS. U ostatních stanovovaných genů jsme zjistili jen mírné změny. Domníváme se, že bariérová funkce střeva již byla tak značně poškozena, že genová exprese mRNA a produkce těchto proteinů byla znemožněna vážným poškozením epiteliálních buněk.

Bakterie osídlující gastrointestinální trakt představují nesmírně komplexní ekosystém. Změny ve složení střevní mikroflóry mohou onemocnění na jedné straně způsobit, ale na straně druhé mohou zabránit jeho vzniku. U lidí s nespecifickými střevními záněty jsou tyto změny předmětem intenzivního výzkumu. Manipulace se střevní mikroflórou pomocí probiotických bakterií (živé bakterie, jež mají pozitivní vliv na lidské zdraví) se ukazuje jako bezpečná a efektivní léčba nespecifických střevních zánětů. V předešlých experimentech naší laboratoře se ukázalo, že podávání 3%DSS vyvolává akutní kolitidu u BALB/c myši a zároveň mění zastoupení bakteriálních populací ve střevním obsahu. U zvířat s kolitidou veškerá stabilita mizí a složení mikroflóry neodpovídá druhům přítomným u zdravých zvířat.[53]

Podávání živých bakterií však není vždy optimální. U oslabených jedinců, starší populace, pacientů s mnoha četnými komorbiditami, novorozených dětí nejsou takovéto živé bakterie vhodné. Zavedením bakteriálních lyzátů probiotik umožňuje využívat jejich pozitivní účinky na lidský organismus bez toho, aby jej zbytečně zatěžovaly. Zlepšení bariérové funkce střeva pomocí takových to lyzátů by bylo velice snadnou prevencí a velmi bezpečnou pro většinu populace. Z těchto důvodů jsme studovali lyzát bakterie *L. casei*.

Testovali jsme permeabilitu střeva u myši na DSS kolitidě pomocí FITC-dextranu. U myši na kolitidě léčených bakteriálním lyzátem z *L.casei* byla střevní paracelulární propustnost statisticky signifikantně snížena ve srovnání s kontrolami. Dále jsme imunohistologií těsných spojů zjistili, že exprese ZO-1 v kolon a ileu je zachována ve stejné míře, jakou můžeme pozorovat u zdravých myši. Tento protektivní vliv lyzátu *L. casei* hraje nepřímou roli v ovlivnění intestinálního zánětu. Jeho role spočívá v ovlivnění imunitního systému a ostatních mikrobiot ve střevě.

V dalších experimentech jsme se zabývali bezmikrobními myšmi. Existuje jen velmi málo studií na takových to myších. Měřili jsme střevní propustnost u těchto bezmikrobních myši po podání indomethacinu pomocí FITC-dextranu.

Překvapivě jsme nenašli rozdíl mezi myšmi chovanými v konvenčních a bezmikrobních podmínkách. Tento výsledek lze vysvětlit působením antigenů obsažených v krmných peletách, které tak podporují celistvost střevní bariéry i u bezmikrobních myši a také to, že i tyto myši přichází v bezmikrobních podmínkách do styku s bakteriálními antigeny mrtvých bakterií například ve výše zmíněných krmných peletách. Znamená to, že i bezmikrobní myši jsou vystaveny antigenům. Proto jsme dále v experimentu pokračovali na kojenech mláďatech.

U bezmikrobních mláďat po podání indomethacinu byly hodnoty střevní propustnosti statisticky signifikantně zvýšeny oproti konvenčním mláďatům. Tento výsledek ukazuje, že kolonizace střevního traktu ovlivňuje střevní propustnost již brzy po narození.

6. ZÁVĚR

- Stanovili jsme míru poškození střevní propustnosti pomocí 4,4 kDa FITC-dextranu způsobenou indomethacinem, alkoholem a bakteriálním LPS.
- Zhodnotili jsme zavedené metody pro měření střevní propustnosti s kvantitativní genovou expresí proteinů těsných spojů ve střevní tkáni myší. Prokázal se statisticky výrazný nárůst kvantifikace genové exprese mRNA genu pro iNOS a IL-6 ve střevní tkáni oproti zdravým kontrolám.
- Prokázali jsme pozitivní vliv probiotických bakteriálních komponent na střevní bariérovou funkci.
- Zvýšení střevní propustnosti působením různých druhů adjuvans se nepotvrdila. Pouze jen u *B. pertussis* byla střevní propustnost zvýšená.
- Našli jsme rozdíl ve střevní propustnosti kojených mlád'at bezmikrobních myší oproti mlád'atům myší konvenčních

CITACE:

- [1] Niessen, C.M., Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(11), 2525-2532
- [2] Atkinson KJ, Rao RK. Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-induced disruption of epithelial tight junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;280:G1280–G1288
- [3] Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, et al. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1669:34–42
- [4] Katherine R. Groschwitz Simon P. Hogan, Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis *Immunology the Journal of Allergy and Clinical* Volume 124, Issue 1 , Pages 3-20, July 2009
- [5] Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *Journal of Cell Biology*. 1998;141(7):1539–1550.
- [6] Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol*. 1999;147:1351–1363
- [7] Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*. 2002;156:1099–1111
- [8] Turksen K, Troy TC. Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development*. 2002;129:1775–1784
- [9] Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD Changes in expression and distribution of

claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007 Jan;56(1):61-72. Epub 2006 Jul 5.

[10] Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:403–429

[11] Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, et al. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci*. 2000;113(suppl):2363–2374

[12] Bazzoni G. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15:525–530

[13] Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, Severson EA, Capaldo CT, Babbitt BA, et al. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med*. 2007;204:3067–3076

[14] Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M *et al.* (2006) ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126:741–754

[15] Maria S. Balda Tight junction at a glance *Jurnal of Cell Science* 2008, 3677-3686

[16] D'Souza-Schorey, C. Disassembling adherens junctions: braking up is hard to do. (2005). *Trends Cell Biol*. 15(1), 19-26.

[17] Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778:660–669

[18] Pokutta S, Weis WI. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:237–261

[19] Nagafuchi, A. (2001). Molecular architecture of adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol*.13(5), 600-603

- [20] Meddings JB, Jarand J, Urbanski SJ, Hardin J, Gall DG. Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1999;276:G951–G9570
- [21] Zolotarevsky Y, Hecht G, Koutsouris A, Gonzalez DE, Quan C, Tom J, et al. A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in vitro models of intestinal disease. *Gastroenterology*. 2002;123:163–172
- [22] Whittle BJ. Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in the rat. *Gastroenterology*. 1981;80:94–98
- [23] Ferrier L, Berard F, Debrauwer L, Chabo C, Langella P, Bueno L, et al. Impairment of the intestinal barrier by ethanol involves enteric microflora and mast cell activation in rodents. *Am J Pathol*. 2006;168:1148–1154
- [24] Lambert JC, Zhou Z, Wang L, Song Z, McClain CJ, Kang YJ. Prevention of alterations in intestinal permeability is involved in zinc inhibition of acute ethanol-induced liver damage in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;305:880–886
- [25] The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases Tlaskalová-Hogenová H, Stěpánková R, Kozáková H, Hudcovic T, Vannucci L, Tučková L, Rossmann P, Hrnčír T, Kverka M,
- [26] Adlerberth I, Wold AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr* 2009; 98: 229–238.
- [27] Zakostelska Z, Kverka M, Klimesova K, Rossmann P, Mrazek J, Kopecny J, Hornova M, Srutkova D, Hudcovic T, Ridl J, Tlaskalova-Hogenova H. Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PLoS One*. 2011;6(11):e27961. Epub 2011 Nov 22

- [28] Fujita K, Katahira J, Horiguchi Y, Sonoda N, Furuse M, Tsukita S. Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett.* 2000;476:258–261
- [29] Muza-Moons MM, Schneeberger EE, Hecht GA. Enteropathogenic Escherichia coli infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2004;6:783–793
- [30] Ventura MT, Polimeno L, Amoroso AC, Gatti F, Annoscia E, Marinaro M, Tursi A. Intestinal permeability in patients with adverse reactions to food. *Dig Liver Dis.* 2006;38:732–736
- [31] Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest.* 2004;84:282–291
- [32] D'Inca R, Di Leo V, Corrao G, Martines D, D'Odorico A, Mestriner C, Venturi C, Longo G, Sturniolo GC. Intestinal permeability test as a predictor of clinical course in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:2956–2960
- [33] Gombosova L, Jarcuska P, Benova B, Benicky M, Lazurova I. Celiac disease manifested during the treatment of chronic hepatitis C by pegylated alpha interferon and ribavirin. *Bratisl Lek Listy.* 2011;112(6):360-2
- [34] Visser J, Rozing J, Sapone A, Lammers K, Fasano A. Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: celiac disease and type 1 diabetes paradigms. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 May;1165:195-205.
- [35] Hall EJ, Batt RM. Abnormal permeability precedes the development of a gluten sensitive enteropathy in Irish setter dogs. *Gut.* 1991;32:749–753
- [36] Schulzke JD, Bentzel CJ, Schulzke I, Riecken EO, Fromm M. Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. *Pediatr Res.* 1998;43:435–441
- [37] Karen M. Lammers, Ruliang Lu, Julie Brownley, Bao Lu, Craig Gerard, Karen Thomas, Prasad Rallabhandi, Terez Shea-Donohue, Amir Tamiz, Sefik Alkan, Sarah Netzel–Arnett, Toni Antalis, Stefanie N. Vogel, Alessio Fasano Gliadin induces an

increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology*. 2008;135:194–204e3

[38] Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci*. 2000;113:4435–4440.

[39] Moreno-Navarrete JM, Sabater M, Ortega F, Ricart W, Fernández-Real JM (2012) Circulating Zonulin, a Marker of Intestinal Permeability, Is Increased in Association with Obesity-Associated Insulin Resistance. *PLoS ONE* 7(5): e37160. doi:10.1371/journal.pone.0037160

[40] Hansen D, Dendale P, Beelen M, Jonkers RA, Mullens A, et al. Plasma adipokine and inflammatory marker concentrations are altered in obese, as opposed to non-obese, type 2 diabetes patients. *Eur J Appl Physiol*. 2010;109:397–404.

[41] Tripathi A, Lammers KM, Goldblum S, Shea-Donohue T, Netzel-Arnett S, et al. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:16799–16804.

[42] Brock M, Trenkmann M, Gay RE, Gay S, Speich R, et al. MicroRNA-18a enhances the interleukin-6-mediated production of the acute-phase proteins fibrinogen and haptoglobin in human hepatocytes. *J Biol Chem*. 2011;286:40142–40150.

[43] Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006;312:1355–1359.

[44] Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 979–984.

[45] Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. De La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299:G440–G448.

- [46] Joep Grootjans, Geertje ThuijlsFroukje Verdam, Joep PM Derikx, Kaatje Lenaerts, and Wim A Buurman Non-invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut *World J Gastrointest Surg.* 2010 March 27; 2(3): 61–69
- [47] Sachlova M. Střevní propustnost a její význam v onkologii *Klinická onkologie* 15 1/2012
- [48] 21. Derikx JP, Vreugdenhil AC, Van den Neucker AM, Grootjans J, van Bijnen AA, Damoiseaux JG, van Heurn LW, Heineman E, Buurman WA. A pilot study on the noninvasive evaluation of intestinal damage in celiac disease using I-FABP and L-FABP. *J Clin Gastroenterol.* 2009;43:727–733
- [49] Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut.* 2007;56:61–72.
- [50] David L. Horn, David C. Morrison, 2 Steven M. Opal, Richard Silverstein, 4 Kumar Visvanathan and John B. Zabriskie What Are the Microbial Components Implicated in the Pathogenesis of Sepsis? *Clinical Infectious Diseases* 2000;31:851–8
- [51] Moriez R, Salvador-Cartier C, Theodorou V, Fioramonti J, Eutamene H, Bueno L. Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. *Am J Pathol.* 2005 Oct;167(4):1071-9
- [52] Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem.* 2011 Sep 9;286(36):31263-71. Epub 2011 Jul 19.
- [53] A. Kokešová, L. Frolová, M. Kverka, D. Sokol, P. Rossmann, J. Bártová and H. Tlaskalová-Hogenová Oral administration of probiotic bacteria (*E. coli* nissle, *E. coli* O83, *Lactobacillus casei*) influences the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis in BALB/c mice *Folia Microbiologica* Volume 51, Number 5 (2006), 478-484, DOI: 10.1007/BF02931595

[54] Purohit V, Bode JC, Bode C, Brenner DA, Choudhry MA, Hamilton F, Kang YJ, Keshavarzian A, Rao R, Sartor RB, Swanson C, Turner JR. Alcohol, intestinal bacterial growth, intestinal permeability to endotoxin, and medical consequences: summary of a symposium. *Alcohol*. 2008 Aug;42(5):349-61. Epub 2008 May 27