



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Vliv metabolitů streptomycet na změnu Th1 a Th2 imunitní odpovědi

Effect of streptomycete metabolites on alteration of Th1 and Th2 immune response

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor bakalářské práce: Markéta Štáhlavská

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Kladno 2022

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Šťáhlavská** Jméno: **Markéta** Osobní číslo: **486489**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Vliv metabolitů streptomycet na změnu Th1 a Th2 imunitní odpovědi

Název bakalářské práce anglicky:

Effect of Streptomycete Metabolites on Alteration of Th1 and Th2 Immune Response

Pokyny pro vypracování:

V teoretické části bakalářské práce bude provedena rešerše literatury popisující schopnost bakterií rodu *Streptomyces* tvořit různé metabolity. Některé z metabolitů již našly uplatnění v klinické praxi (např. takrolimus). Autorka se také zaměří na charakterizaci námi nedávno izolovaných látek – antibiotik manumycinového typu. V praktické části bakalářské práce bude studentka izolovat frakci mononukleárních leukocytů z buffy coatů periferní krve. Takto získaná frakce mononukleárních leukocytů bude následně stimulována různými koncentracemi metabolitů streptomycet a bude sledován vliv těchto metabolitů na změnu genové exprese. Vliv metabolitů na změnu genové exprese vybraných cytokinů Th1, Th2, Th17 a Treg imunitní odpovědi bude kvantifikován pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase.

Seznam doporučené literatury:

- [1] HRDÝ, Jiří, Lenka SÚKENÍKOVÁ, Petra PETRÁSKOVÁ, Olga NOVOTNÁ, David KAHOUN, Miroslav PETŘÍČEK, Alica CHRONÁKOVÁ a Kateřina PETŘÍČKOVÁ, Inhibition of Pro-Inflammatory Cytokines by Metabolites of Streptomyces—A Potential Alternative to Current Anti-Inflammatory Drugs? , online, Microorganisms , ed. 2020, ročník 8, číslo 5, Přístupné z: doi: 10.3390/microorganisms8050621, ISSN 2076-2607
- [2] HERBRÍK, Andrej, Erika CORRETTO, Alica CHRONÁKOVÁ, et al. , A Human Lung-Associated Streptomyces sp. TR1341 Produces Various Secondary Metabolites Responsible for Virulence, Cytotoxicity and Modulation of Immune Response, online, Frontiers in Microbiology , ed. 2020, ročník 10, číslo 1, Přístupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.03028 , ISSN 1664-302X
- [3] ČIHÁK, Matouš, Zdeněk KAMENÍK, Klára ŠMÍDOVÁ, Natalie BERGMAN, Oldřich BENADA, Olga KOFROŇOVÁ, Kateřina PETŘÍČKOVÁ a Jan BOBEK, Secondary Metabolites Produced during the Germination of Streptomyces coelicolor, online, Frontiers in Microbiology, ed. 2017, ročník 8, číslo 1, Přístupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.02495, ISSN 1664-302X

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

doc. RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **20.09.2021**

Platnost zadání bakalářské práce: **22.09.2023**

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Vliv metabolitů streptomycet na změnu Th1 a Th2 imunitní odpovědi vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 03.05.2022

.....
Markéta Šťáhlavská

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Jiřímu Hrdému, Ph.D., za odborné vedení, ochotu, vstřícnost, věcné připomínky a veškerý čas, který mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Olze Novotné a Ing. Petře Petráskové za spolupráci při realizaci praktické části bakalářské práce.

ABSTRAKT

Teoretická část bakalářské práce se zabývá skupinou aktinomycetárních bakterií – streptomycet, která je významná svou schopností produkovat sekundární metabolity. Zmíněné sekundární metabolity streptomycet zahrnují vybraná klinicky významná antibiotika a látky manumycinového typu (s hlavním zástupcem manumycinem A), jež by se pro své imunomodulační účinky mohly v blízké budoucnosti využít k terapii některých imunopatologických stavů nebo nádorových onemocnění. Dále se teoretická část bakalářské práce věnuje detailní charakteristice buněk imunitního systému s důrazem na subpopulace T lymfocytů (především Th1 a Th2). Nakonec jsou představeny vybrané cytokiny jako prostředek mezibuněčné komunikace a regulace imunitních dějů. Speciální pozornost je věnována zejména interleukinům, protože stanovení jejich genové exprese je předmětem praktické části bakalářské práce.

Praktická část bakalářské práce popisuje metodické postupy použité při izolaci mononukleární frakce leukocytů z buffy coatu a stimulaci buněk manumycinem A, lipopolysacharidem (LPS) a fytohemaglutininem (PHA). Následně je charakterizován vliv různých koncentrací manumycinu A na změnu genové exprese cytokinů, která je stanovena pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR).

Zjistili jsme, že genová exprese cytokinů v leukocytech mononukleární frakce periferní krve (PBMC) nebyla statisticky významně ovlivněna stimulací polyklonálním stimulem fytohemaglutininem a manumycinem A o různých koncentracích, což nebylo v souladu s naším předpokladem. Manumycin A má podle četných studií imunosupresivní efekt na genovou expresi zvláště prozánětlivých cytokinů Th1 lymfocytů. V rámci našeho experimentu jsme ale nepozorovali žádný statisticky významný efekt. Pro vyvození jednoznačných

závěrů o imunomodulačních vlastnostech sekundárních metabolitů streptomycet budou muset být provedeny další studie.

Klíčová slova

mononukleární frakce leukocytů; periferní krev; imunomodulace; Th1 a Th2 lymfocyty; sekundární metabolity streptomycet; genová exprese; kvantitativní PCR v reálném čase

ABSTRACT

The theoretical part of the bachelor thesis deals with a group of actinomycete bacteria – streptomyces, which is important for its ability to produce secondary metabolites. Secondary metabolites of streptomyces listed include selected clinically important antibiotics and manumycin-type substances (with the main agent manumycin A), which could be used in the near future for the treatment of certain immunopathological disorders or cancerous diseases. Furthermore, the theoretical part of the bachelor thesis is devoted to detailed characteristics of immune system cells with an emphasis on subpopulation of T cells (especially Th1 and Th2). Finally, selected cytokines are introduced as a mean of intercellular communication and immune responses regulation. Special attention is paid to interleukins, because the determination of their gene expression is the subject of the practical part of the bachelor thesis.

The practical part of the bachelor thesis describes the methodological procedures used in the isolation of the mononuclear fraction of leukocytes from the buffy coat and the stimulation of cells with manumycin A, lipopolysaccharide (LPS) and phytohemagglutinin (PHA). Subsequently, the effect of different concentrations of manumycin A on the alteration of cytokine gene expression is characterized and determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

We found out that cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) was not statistically significantly affected by stimulation with polyclonal stimulator phytohemagglutinin and manumycin A at different concentration levels, which differed from our hypothesis. According to numerous studies, manumycin A has an immunosuppressive effect on the gene expression, particularly on Th1 lymphocytes proinflammatory cytokines. However, in our experiment we have observed no statistically significant effect.

Further studies will be needed to draw definite conclusions regarding the immunomodulatory properties of streptomycete secondary metabolites.

Keywords

mononuclear fraction of leukocytes; peripheral blood; immunomodulation; Th1 and Th2 lymphocytes; secondary metabolites of streptomyces; gene expression; quantitative real-time PCR

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Cíle práce.....	12
3	Přehled současného stavu.....	13
3.1	Streptomycety	13
3.2	Sekundární metabolity streptomycet	15
3.2.1	Klinicky významná antibiotika	15
3.2.2	Látky manumycinového typu	27
3.3	Buňky imunitního systému.....	29
3.3.1	Monocyty, makrofágy	29
3.3.2	B lymfocyty	30
3.3.3	T lymfocyty	31
3.4	Cytokiny.....	36
3.4.1	Interleukiny	37
3.4.2	Interferony, transformující růstové faktory.....	40
4	Metodika.....	41
4.1	Izolace mononukleární frakce leukocytů z buffy coatu.....	41
4.2	Stanovení viability a počtu buněk.....	42
4.3	Stimulace buněk manumycinem A, lipopolysacharidem (LPS) a fytohemaglutininem (PHA).....	43
4.4	Izolace RNA.....	44
4.5	Stanovení koncentrace RNA	46
4.6	RT-PCR.....	47
4.7	qPCR.....	48

5	Výsledky.....	51
5.1	Genová exprese cytokinů v PBMC po jednohodinové stimulaci LPS, PHA a manumycinem A.....	53
5.2	Genová exprese cytokinů v PBMC po čtyřhodinové stimulaci LPS, PHA a manumycinem A.....	61
6	Diskuze	69
7	Závěr	76
8	Seznam použitých zkratk.....	77
9	Seznam použité literatury	81
10	Seznam použitých obrázků	94
11	Seznam použitých tabulek.....	96

1 ÚVOD

Bakalářská práce podává ucelený přehled o sekundárních metabolitech bakterií streptomycet. Kromě toho se také zaměřuje na popis cytokinů, speciální pozornost věnuje interleukinům. Interleukiny zastávají v imunitním systému nezastupitelnou roli při vzniku a regulaci imunitní odpovědi. V další kapitole představuje buňky mononukleární frakce leukocytů izolovaných z buffy coatu, které plní důležité imunitní funkce a produkují cytokiny.

V posledních desetiletích narůstá po celém světě počet osob s autoimunitními chorobami na úkor chorob infekčních, které se významnými medicínskými pokroky daří poměrně úspěšně léčit. Autoimunitní zánět mohou potlačit imunosupresiva. Imunosupresiva jsou léky tlumící imunitní děje probíhající v organismu, užívají se i v případě orgánových transplantací za účelem potlačení případné rejekce štěpu. Jako další vhodná terapeutická možnost se jeví sekundární metabolity streptomycet, jmenovitě manumycin A. Manumycin A disponuje imunosupresivními, protizánětlivými, proapoptotickými a protinádorovými účinky. Má obrovský imunomodulační potenciál, ale detailní mechanismus působení není dosud dostatečně probádaný.

Pro objasnění možného vlivu manumycinu A na imunitní buňky jsme stimulovali buňky mononukleární frakce leukocytů získané z buffy coatu různými koncentracemi manumycinu A (5; 1; 0,25 a 0,0125 $\mu\text{mol/l}$) po dobu jedné a čtyř hodin *in vitro*. V předchozích studiích byla popsána schopnost manumycinu A potlačovat genovou expresi některých cytokinů. Předpokládali jsme, že v závislosti na použité koncentraci manumycinu A dojde ke koncentračně závislému útlumu tvorby prozánětlivých cytokinů spojených s činností Th1 a Th17 lymfocytů.

2 CÍLE PRÁCE

V teoretické části bakalářské práce je provedena literární rešerše týkající se schopnosti bakterií z rodu *Streptomyces* tvořit sekundární metabolity, které nachází uplatnění v klinické praxi, nebo se jedná o teprve nedávno objevené látky – antibiotika manumycinového typu. Tyto látky mají prozánětlivý a antibakteriální účinek. Teoretická část bakalářské práce se dále zabývá funkčním popisem buněk imunitního systému. Bakalářská práce se podrobně věnuje Th1 a Th2 lymfocytům a rovněž regulačním T lymfocytům (Treg) a Th17 lymfocytům. V poslední části bakalářské práce jsou charakterizovány vybrané cytokiny, které jsou s těmito buněčnými populacemi T lymfocytů asociovány. Bakalářská práce podává ucelený pohled na složitou problematiku imunoregulace v lidském organismu.

Praktická část bakalářské práce se zaměřuje na izolaci mononukleární frakce leukocytů z buffy coatu periferní krve (PBMC) metodou gradientové centrifugace. Takto získaná buněčná frakce bílých krvinek byla stimulována různými koncentracemi sekundárního metabolitu streptomycet manumycinem A. Jako pozitivní kontroly byly použity PBMC stimulované samotným lipopolysacharidem (LPS) či PHA. Efekt manumycinu A na alteraci genové exprese Th1, Th2, Th17 a Treg cytokinů byl kvantifikován polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase. Předpokládali jsme, že genová exprese Th1 a Th17 cytokinů, jež se podílí na průběhu zánětlivé reakce, bude výrazně snížena. Vycházeli jsme z výsledků předchozích experimentů provedených se vzorky periferní a pupečnickové krve, kde byl popsán protizánětlivý efekt manumycinu A.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

3.1 Streptomycety

Streptomycety jsou bakteriální rod patřící do kmenu aktinobakterií, svou morfologií připomínají houby. Stavebními jednotkami těl – mycelií streptomycet jsou větvená filamenta a hyfy. Jejich buňky jsou velké přibližně jeden mikrometr. Řadí se mezi striktně aerobní a chemoheterotrofní mikroorganismy. V laboratoři jsou obvykle kultivovány na půdách s příměsí glukózy či laktátu a za přístupu kyslíku [1].

Při studiu streptomycet se zjistilo, že se jedná o grampozitivní bakterie s vysokým podílem párů bazí guanin – cytosin v genomu. U streptomycet je obsaženo 70 % dvojic G – C, u stafylokoků je obsaženo pouze 36 % dvojic G – C. K přesné identifikaci bakterií se po zhodnocení procentuálního zastoupení guaninu a cytosinu v genomu provádí hybridizace DNA [1].

Streptomycety způsobují onemocnění především zvířat a rostlin. U psa byl popsán případ pyogranulomatózní dermatitidy s původcem *Streptomyces cyaneus*. *Streptomyces scabies* je hlavní fytopatogen, který zapříčiňuje strupovitost brambor – přítomnost černých skvrn na hlízách [1, 2, 3].

Dalším významným zástupcem streptomycet je *Streptomyces avidinii*. *Streptomyces avidinii* exprimuje protein – streptavidin, který nachází široké uplatnění v imunologii (například v metodě ELISA – enzymové imunoanalýze). Streptavidin se ochotně váže k vitamínu B₁₂ (biotinu) a zdatně odolává extrémním teplotním a pH podmínkám. Ve formě kuliček se streptavidin používá k označení protilátek a následné vizualizaci přítomného antigenu [1, 4].

Pro některé streptomycety je typická produkce pigmentů. Například *Streptomyces coelicolor* tvoří žlutý coelimirin P₁, modré actinorhodinové

substance, červený undecylprodigiosin a šedý pigment spor. Antibiotika se společně s pigmenty řadí mezi sekundární produkty metabolismu streptomycet [6].

Streptomycety zahrnují kolem pěti set druhů a disponují zajímavými biochemickými vlastnostmi. Streptomycety mají rovněž velký ekologický význam. Syntetizují enzymy (proteázy, amylázy, celulázy a chitinázy), které degradují organické látky přítomné v půdě (proteiny, škrob, celulózu a chitin). Některé streptomycety jsou navíc schopné rozkládat pektin, latex, lignin a keratin. Až dvacet procent hmotnosti půdy tvoří streptomycety, které patří mezi významné saprofyty [1]. Mezi konečné produkty metabolismu streptomycet patří oxid uhličitý, voda a soli. Dalším metabolitem těchto bakterií je geosmin – netoxická těkavá sloučenina na bázi terpenů podílející se na tvorbě typického zápachu půdy. Geosmin produkuje například *Streptomyces coelicolor* [1, 5].

Streptomycety se neuplatňují pouze v životním prostředí jako dekompozitory, ale zastávají důležité místo ve farmaceutickém průmyslu. Jsou významnými producenty antibiotik různých farmakologických skupin. Vybraná antibiotika produkovaná streptomycetami jsou popsána v kapitole 3.2.1. Souhrn informací o vybraných klinicky významných antibiotikách poskytuje Tabulka 1 [1].

3.2 Sekundární metabolity streptomycet

3.2.1 Klinicky významná antibiotika

Amfotericin B

Amfotericin B nachází uplatnění při léčbě mykotických a protozoálních infekcí. Je syntetizovaný bakterií *Streptomyces nodosus*. Svou chemickou strukturou se řadí mezi polyeny. Jedná se o lipofilní molekulu, která je v prostředí koloidní disperze s deoxycholátem sodným rozpustná ve vodě. Váže se na lipozómy a molekuly cholesterolu za vzniku derivátních léčiv [7, 8].

Amfotericin B narušuje integritu buněčné membrány mikromycet. Buněčná membrána hub a prvoků je tvořená ergosterolem, na který se amfotericin B ochotně váže. Amfotericin B také iniciuje produkci reaktivních kyslíkových intermediátů způsobujících destrukci lipidových komponent buněčné membrány mikromycet [8].

Amfotericin B je širokospektré antibiotikum, u něhož se ojediněle vyskytují rezistence. Klinicky význam má při terapii aspergilózy, kandidózy a leishmaniózy; disponuje antimykotickým účinkem. Po podání se amfotericin B většinou váže na plazmatické proteiny a hromadí se v tkáních, později se žlučovými cestami dostává do střevních prostor [8].

U amfotericinu B navázaného na tukovou částici byly prokázány nefrotoxické účinky. Amfotericin se v ledvinách váže na cholesterol tubulů glomerulu, způsobuje hypokalémii a renální insuficienci. Méně často se projevuje hematotoxicita, především ve formě anémie. Amfotericin B poškozují buňky kostní dřeně a snižuje syntézu erytropoetinu [8].

Chloramfenikol

Chloramfenikol je širokospektré antibiotikum izolované z kmene *Streptomyces venezuelae*. Má bakteriostatický účinek a inhibuje proteosyntézu navázáním na peptidyltransferázové místo 50S velké podjednotky prokaryotního ribozómu [9].

Chloramfenikol účinkuje proti mnoha grampozitivním a gramnegativním bakteriím, včetně spirochet a ricketsií. Obvykle se užívá při terapii závažných infekcí *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a *Neisseria meningitidis* [9].

Mezi vzácné nežádoucí účinky aplikace chloramfenikolu u dospělé populace patří rozvoj aplázie kostní dřeně spojené s aplastickou anémií. Tyto obtíže se rozvíjejí pravděpodobně z důvodu narušeného metabolismu jater. Výhradně novorozence postihuje v souvislosti s podáváním chloramfenikolu „syndrom šedého dítěte“. Nezralé hepatocyty nejsou schopné antibiotikum efektivně detoxifikovat. Symptomy tohoto onemocnění zahrnují abdominální distenzi, cyanózu (nemocní jedinci mají šedou barvu kůže), zvracení, poruchy krevního oběhu a v krajním případě smrt. Z těchto důvodů je užití chloramfenikolu omezené [9, 10].

Kyselina klavulanová

Kyselina klavulanová je inhibitorem β -laktamáz (způsobujících rezistenci na peniciliny) a sekundárním metabolitem *Streptomyces clavuligerus*. Obvykle je předepisována v kombinaci s β -laktamovými antibiotiky (například s amoxicilinem v přípravku Augmentin). Mezi další β -laktamová antibiotika patří cefamycin C, jenž *Streptomyces clavuligerus* také syntetizuje. Cefamycin C chrání kyselinu klavulanovou před enzymatickým rozkladem [11, 12].

Augmentin se užívá k léčbě zánětů vedlejších dutin nosních, průdušek, středního ucha, kůže a komunitně získaných pneumonií způsobených rozličnými bakteriálními patogeny produkujícími β -laktamázu. Mezi nejčastější vedlejší účinky podávání Augmentinu patří průjem, zvracení a nevolnost. Byly popsány případy, kdy Augmentin poškodil jaterní buňky pacientů a způsobil cholestázu. Tato aktivita se připisuje pouze kyselině klavulanové [12].

Erytromycin

Erytromycin je klasifikovaný jako makrolidové antibiotikum, způsobuje inhibici proteosyntézy navázáním na podjednotku 50S bakteriálního ribozómu (podobně jako chloramfenikol). Je tvořený *Streptomyces erythreus* (novějším názvem *Saccharopolyspora erythraea*). V přítomnosti žaludeční kyseliny podléhá erytromycin hydrolyze, má schopnost stimulovat motilinové receptory v žaludku. Může způsobovat gastrointestinální potíže – průjemy a křeče [13, 14].

Používá se mimo jiné k léčbě infekcí způsobených streptokoky skupiny A, mezi které patří *Streptococcus pyogenes* jako původce faryngitidy a impetiga. V terapii proti těmto onemocněním je indikován v případě výskytu alergie na penicilin. Dále má prokázaný účinek proti pneumoniím vyvolaným *Mycoplasma pneumoniae* nebo *Legionella pneumophila*. Erytromycin nachází uplatnění v léčbě některých dalších infekcí způsobených například *Campylobacter jejuni*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* a *Chlamydia trachomatis* [14, 15].

Neomycin

Neomycin je produkován *Streptomyces fradiae* a řadí se mezi zástupce aminoglykosidových antibiotik. Inhibuje proteosyntézu na úrovni 30S

podjednotky bakteriálního ribozómu a narušuje činnost bakteriální DNA polymerázy [16].

Neomycin se obvykle aplikuje topicky na kůži ke zhojení některých ran (bylo prokázáno, že podporuje reepitelizaci tkání) a tuberkulózních ložisek. Má bakteriostatický účinek proti mnoha grampozitivním a gramnegativním bakteriím, včetně kmenů *Mycobacterium tuberculosis* rezistentních na streptomycin. Uplatňuje se například při léčbě nálezů *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* nebo *Staphylococcus aureus* [16, 17].

Mezi závažné nežádoucí účinky způsobené užíváním neomycinu patří ototoxicita (zvláště u pacientů s narušenou funkcí ledvin) či hypersenzitivita manifestující ve formě kontaktní dermatitidy. Neomycin může zapříčinit degranulaci žírných buněk s následnou exkrecí histaminu [16].

Nystatin

Nystatin lze charakterizovat jako polyenové makrolidové antibiotikum s funkcí ionoforu syntetizované *Streptomyces noursei*. Svou chemickou strukturou je nystatin podobný amfotericinu B, který má také antimykotické účinky [18, 19].

Nystatin se používá k léčbě kožních a slizničních kvasinkových infekcí, které můžeme rozdělit na orální, vulvovaginální a anální kandidózy. Působí proti *Candida albicans*. V kombinaci s metronidazolem je nystatin indikován v terapii kombinované nákazy s *Trichomonas vaginalis* [18, 19].

Nystatin disponuje jak fungistatickými, tak fungicidními účinky. Váže se na ergosterolovou složku buněčné membrány kvasinek. Rozvrací iontovou rovnováhu buňky, ze které následně unikají některé intracelulární komponenty.

U parenterálně užívaného nystatinu byla prokázána spojitost se systémovou toxicitou [18, 19].

Streptomycin

Streptomycin je aminoglykosidové antibiotikum s baktericidním účinkem tvořené *Streptomyces griseus*. Používá se při léčbě závažné formy tuberkulózy – dříve letální tuberkulózní meningitidy u dětí, kdy se etiologické agens dostává do likvoru. Streptomycin objevili v roce 1944 Selman Walksman a Albert Schatz, za což jim byla později udělena Nobelova cena za lékařství [20, 21].

Mycobacterium tuberculosis se postupem času stává rezistentní na streptomycin, proto se užívá v kombinaci s dalšími antituberkulotiky (izoniazidem, rifampicinem, pyrazinamidem a etambutolem) po dobu několika měsíců. Streptomycin se uplatňuje i v boji s mnoha dalšími patogeny, například *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Calymmatobacterium granulomatis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus viridans* nebo *Enterococcus faecalis* [20, 21].

Streptomycin působí silně neurotoxicky, nevratně poškozuje vestibulokochleární aparát. Může způsobit ztrátu sluchu až hluchotu. Byly popsány případy, kdy streptomycin zapříčinil exantém a anafylaxi. Po terapii streptomycinem byla u některých pacientů pozorována proteinurie a zvýšená hladina močoviny v krvi [20, 21].

Tetracykliny

Tetracykliny jsou antibiotika tvořená jako sekundární metabolity *Streptomyces aureofaciens*. Inhibují vazebné místo aminoacyl-tRNA (transferové tRNA) na ribozomální podjednotce 30S nebo celém ribozómu 70S. Mají bakteriostatický

a protizánětlivý účinek. Inhibují enzymatickou aktivitu metaloproteináz, zpomalují procesy angiogeneze a apoptózy [22, 23].

Tetracykliny se obvykle užívají orálně. Patří mezi ně přirozený zástupce tetracyklinů chlortetracyklin a jeho syntetické deriváty doxycyklin (obvykle vyráběný v hydratované formě) a minocyklin. Všechny tetracykliny se zapíjí sklenicí vody, aby nedošlo ke vzniku jícnových vředů. Z důvodu nárůstu rezistence byly laboratorně vytvořeny glycylykliny. Zástupcem glycylyklinů je například tigecyklin [22, 23].

U tetracyklinu již bylo popsáno velké množství nežádoucích vedlejších účinků. V závislosti na dávce se může u pacienta rozvinout fotosenzitivita nebo nastat stav závratě. Potíže v oblasti trávicího ústrojí korelují s pH lékové formy. Minocyklin se vyznačuje tím, že indukuje syntézu autoprotilátek proti složkám buněčného jádra (ANA – antinuclear antibodies), proti cytoplazmě neutrofilů (ANCA – antineutrophilic cytoplasmic antibodies) nebo antifosfolipidových protilátek (APA – antiphospholipid antibodies). Tigecyklin se užívá při terapii kožních a intraabdominálních infekcí. Tetracykliny podporují vznik vaginálních a orálních kandidóz a mohou nalézt uplatnění v léčbě některých infekcí způsobených gramnegativními bacily [22, 23].

Mimo *Streptomyces aureofaciens* je syntéza tetracyklinů charakteristická i pro *Streptomyces rimosus*. Tento kmen produkuje antibiotikum oxytetracyklin. Oxytetracyklin je nepostradatelný především ve veterinární medicíně při léčbě infekcí prasat a dalších zvířat, které způsobují *Brucella* spp., *Vibrio* spp. či chlamydie, mykoplazmata a rickettsie [1, 24, 25, 26].

Kanamycin

Kanamycin patří do skupiny aminoglykosidových antibiotik. Je syntetizovaný *Streptomyces kanamyceticus* ve dvou hlavních formách. Kanamycin B je vedlejším produktem vzniku kanamycinu A, vzájemně se liší pouze umístěním hydroxyskupiny a aminoskupiny na C2' atomu uhlíku. Kanamycin interaguje s podjednotkou 30S prokaryotického ribozómu, čímž způsobuje inhibici proteosyntézy. Nejčastěji se užívá ve formě sulfátu [28].

Kanamycin působí proti mnoha bakteriím, například *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* či *Serratia marcescens*. Aminoglykosidy jsou vhodné především k léčbě infekcí způsobených gramnegativními aerobními bakteriemi a *Mycobacterium tuberculosis*. Dříve byly indikovány společně s peniciliny v případě streptokokové endokarditidy [29].

Amikacin se jako derivát kanamycinu hromadí v proximálních tubulech ledvin, které může poškodit. Jeho akumulace probíhá také v tekutinách vnitřního ucha, kde dochází k poruše vláskových buněk hlemýždě a ampulární krusty. Pacienti ztrácí sluch nejprve v oblasti vysokých frekvencí. Užíváním amikacinu může dojít i k narušení funkce vestibulokochleárního nervu s příznaky závratě. Z důvodu mnoha závažných vedlejších účinků se doporučuje délka terapie maximálně dva týdny [29, 30].

Rifampicin

Rifampicin patří do rodiny antibiotik rifamycinů. Jedná se o produkt sekundárního metabolismu přímořského druhu *Streptomyces mediterranei* (novějším názvem *Amycolatopsis mediterranei*). Rifampicin se řadí mezi antituberkulotika, působí proti většině mykobakterií. Jeho mechanismus účinku se uplatňuje na úrovni transkripce, jelikož zastavuje činnost enzymu DNA

dependentní RNA polymerázy v bakteriální buňce. Pokud v tomto enzymu dojde k mutaci v β řetězci u mikrobiální DNA polymerázy, rozvíjí se rezistence [9, 31].

Rifampicin se vstřebává do trávicího traktu po perorálním podání. Poté se distribuuje do těla a dává například moči nebo sputu červenou až oranžovou barvu. Dostává se až do jater a tenkého střeva sekrecí žluči. V játrech podléhá deacetylační reakci a následně je vyloučen močí nebo stolicí [9, 31].

Rifampicin je vhodný k léčbě nákazy *Mycobacterium tuberculosis* rezistentní na izoniazid a *Mycobacterium leprae*. Používá se v komplikovanějších případech infekcí *Streptococcus pneumoniae* a meticilin-rezistentních stafylokoků [9, 31].

Nejčastějším vedlejším účinkem je poškození jater. V souvislosti s imunologickými poruchami byly popsány případy dysfunkce T lymfocytárních populací nebo lokální alergické reakce v oblasti ústní dutiny. V případě užívání hormonální antikoncepce nebo glukokortikosteroidů byla reportována snížená účinnost rifampicinu, jelikož dochází k zvýšení tvorby mikrozomálních enzymů působením antibiotika [9].

Vankomycin

Vankomycin je klinicky významné antibiotikum syntetizované bakterií *Streptomyces orientalis* (nyní *Amycolatopsis orientalis*). Vzorek tohoto půdního patogena byl získán před více než šedesáti lety v džungli Bornea za účelem nalezení látky s aktivitou proti stafylokokům, jelikož byl zaznamenán prudký nárůst rezistence mikroorganismů na peniciliny. O tento objev se zasloužili E. Kornfeld a E. Lilly. Izolovaná substance získala název vankomycin podle anglického *vanquish*, což v předkladu z angličtiny znamená porazit [32].

Chemickou strukturou se řadí vankomycin mezi tricyklické glykopeptidy. Mechanismus účinku vankomycinu spočívá v inhibici syntézy buněčné stěny grampozitivních bakterií, která se sestává z peptidoglykanu. Vankomycin zabraňuje zařazení N-acetylmuramové kyseliny a N-acetylglukosaminu do peptidoglykanu [33, 34].

Prvotní studie prokázaly ototoxické a nefrotoxické účinky vankomycinu, proto se nejdříve stal lékem „druhé“ volby po meticilinu. Později se zjistilo, že k poškození vnitřního ucha nebo ledvin dochází především v kombinaci s aminoglykosidy. V dnešní době jsou obrovským problémem meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) a vankomycin rezistentní enterokoky (VRE) způsobující obtížně léčitelné nozokomiální infekce. Užívá se také při terapii průjmu způsobeného *Clostridium difficile*, který se může rozvinout po oslabení organismu MRSA [32, 34].

Linkomycin

Linkomycin je produkován *Streptomyces lincolnensis*. Linkomycin patří do menší skupiny linkosamidových antibiotik, obsahuje aminokyselinovou (kyselina propylhygrová) a sacharidovou složku (metylthiolinkosamid). Linkosamidy syntetizují i *Streptomyces roseolus* a *Streptomyces caelestis*. Linkomycin se společně s derivátem klindamycinem užívá k léčbě infekcí horních dýchacích cest u pacientů s prokázanou rezistencí na penicilin. Ve vysokých dávkách může způsobit imunopatologickou kožní reakci – erythema exsudativum multiforme [35, 36].

Terapie linkomycinem je obvykle indikována k zástavě tvorby proteinů u grampozitivních koků a anaerobních mikroorganismů (například *Clostridium tetani*). Mezi bakterie citlivé na linkomycin patří *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* a *Streptococcus pyogenes*. Klindamycin disponuje

antiprotozoálním účinkem; působí proti *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* nebo *Pneumocystis carinii* [35, 37].

Takrolimus

Takrolimus je makrolidové antibiotikum s imunosupresivním, protizánětlivým účinkem a metabolit *Streptomyces tsukubaensis*. Funguje jako inhibitor kalcineurinu, který napomáhá zejména syntéze interleukinu 2 (IL-2) Th1 lymfocyty. Má vysokou afinitu k erytrocytům, stanovuje se obvykle v plné krvi [38, 39].

Kalcineurin je enzym lokalizovaný v cytoplazmě. Defosforylací NFAT (jaderných faktorů aktivovaných T buněk) umožňuje transport tohoto souboru transkripčních faktorů do buněčného jádra T lymfocytů aktivovaných antigenem. Na kalcineurin se váže takrolimus v komplexu s proteinem FKBP12 a potlačuje expresi cytokinů (mimo IL-2 také IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF – faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů, TNF- α – tumor nekrotizující faktor alfa a IFN- γ – interferon gama). Pro správnou činnost kalcineurinu musí být intracelulárně přítomný dostatek vápenatých kationtů a protein kalmodulin [38, 39].

Interleukin 2 ovlivňuje nejen Th lymfocyty, ale i další buněčné populace – Tc lymfocyty, přirozené zabíječe (NK, natural killers), makrofágy, dendritické buňky a B lymfocyty. Zajišťuje interakci MHC II glykoproteinů přítomných na buňkách prezentujících antigeny (APC, antigen presenting cells) s T- buněčnými (TCR) receptory Th lymfocytů a kostimulaci signálu molekulami B7 na APC a CD28 přítomných na T lymfocytech. Například Th1 cytokin IL-2 podněcuje klonální expanzi Th1 a Th2 buněk nebo aktivaci NK buněk a B lymfocytů (za produkce imunoglobulinů a vzniku paměťových buněk). Dendritické buňky epidermis nebo mastocyty s receptory pro imunoglobulin E

(IgE) a Th2 lymfocyty se svým vzájemným působením podílí na patogenezi atopické dermatitidy [38, 40, 41].

Takrolimus se užívá v kombinaci s kortikosteroidy nebo jinými přípravky (podobnou farmakokinetiku má cyklosporin) k potlačení rozvoje akutní rejekce štěpu po transplantaci jater, plic, ledvin, pankreatu (β buněk Langerhansových ostrůvků), tenkého střeva a kostní dřeně. Samostatně je užíván k terapii některých autoimunitních onemocnění – již zmíněné atopické dermatitidy, revmatoidní artritidy, psoriázy a endogenní uveitidy [38, 39].

Mezi vedlejší účinky patří nefrotoxicita (projevuje se zvýšenou koncentrací kreatininu v plazmě), neurotoxicita a diabetogenicita (způsobuje potransplantační *diabetes mellitus*). Méně často se manifestuje hypertenze a hyperlipoproteinémie, které poukazují na poruchu kardiovaskulárního systému [38, 39].

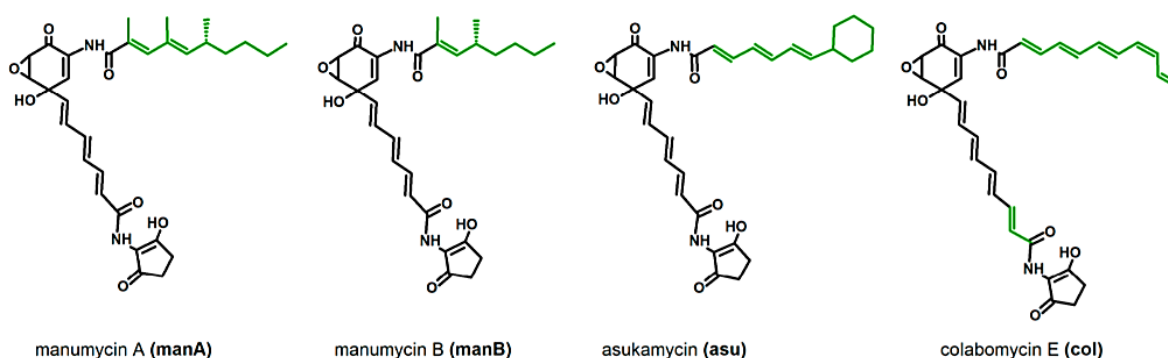
Takrolimus proniká placentou a dostává se do mateřského mléka, proto není doporučeno podávání léku v období těhotenství a kojení. Katabolismus takrolimu probíhá v játrech s pomocí cytochromu P-450, a proto souběžně užívaná farmaka ovlivňující tento membránový enzym podporují vznik nežádoucích lékových interakcí. Jako u ostatních imunosupresiv je nevhodná aplikace živé (atenuované) vakcíny [38, 39].

Tabulka 1 – Vybraná klinicky významná antibiotika a antimykotika [vlastní zdroj, upraveno podle 1 a 27]

Antibiotikum	Producent	Účinek, efekt
Amfotericin B	<i>Streptomyces nodosus</i>	Proti mykózám a protozoózám
Chloramfenikol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Bakteriostatický
Kyselina klavulanová	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Inhibice β -laktamáz
Erytromycin	<i>Streptomyces erythreus</i>	Baktericidní na <i>Streptococcus pyogenes</i>
Neomycin	<i>Streptomyces fradiae</i>	Bakteriostatický
Nystatin	<i>Streptomyces noursei</i>	Antimykotický
Streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>	Baktericidní na <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Tetracykliny	<i>Streptomyces aureofaciens</i> , <i>Streptomyces rimosus</i>	Bakteriostatický
Kanamycin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Baktericidní na <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Rifampicin	<i>Streptomyces mediterranei</i>	Baktericidní na <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Vankomycin	<i>Streptomyces orientalis</i>	Baktericidní na <i>Staphylococcus aureus</i> a enterokoky
Linkomycin	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Proti grampozitivním kokům a anaerobním bakteriím
Takrolimus	<i>Streptomyces tsukubaensis</i>	Imunosupresivní, protizánětlivý

3.2.2 Látky manumycinového typu

Manumycin A a B, asukamycin a colabomycin E se řadí mezi nově objevené polyketidové sekundární metabolity *Streptomyces parvulus*, *Streptomyces asukaensis* a *Streptomyces aureus*, které mají významný protizánětlivý účinek a teprve čekají na plné využití svého imunomodulačního potenciálu v klinické praxi. Jsou chemicky odlišné stavbou svého horního řetězce, což je patrné z Obrázku 1 [42].



Obrázek 1 – Sekundární metabolity streptomycet manumycinového typu [42]

V nedávné době byla provedena stimulace monocyto-makrofágové buněčné linie THP-1 těmito látkami, jejichž koncentrace se pohybovala v rozmezí 0,25–0,5 $\mu\text{mol/l}$. Nejvýznamnějším zástupcem těchto metabolitů je manumycin A. Manumycin A působí protinádorově a protizánětlivě, potlačuje genovou expresi některých cytokinů a podporuje průběh apoptotických procesů [42].

Sekundární metabolity streptomycet manumycinového typu interagují s leukocyty různými mechanismy. Neprokázal se u nich výrazný antibiotický efekt, ale v určitých případech by mohly zastoupit makrolidy, například erytromycin [42].

Protinádorová a proapoptotická aktivita je zprostředkována inhibicí farnesyltransferázy, čímž dochází k zabránění aktivace Ras proteinů, ovlivnění metabolismu GTP (guanointrifosfátu) a narušení signální dráhy MAPK (mitogenem aktivovaných proteinkináz). Tento mechanismus lze použít k léčbě akutní T lymfoblastické leukémie (ATLL). Na podobném principu funguje inhibice cytosolické thioredoxin reduktázy (TrxR-1), která podněcuje vznik superoxidového radikálu s využitím NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfát) oxidázy [42, 43, 44].

Protizánětlivé účinky jsou podmíněny inhibicí kaspázy 1 a kinázy IKK- β (inhibitoru jaderného faktoru). Kaspáza 1 se podílí na syntéze IL-1 β a IL-18, kináza IKK- β produkuje TNF- α s využitím transkripčního faktoru NF- κ B. Manumycin A také participuje v inhibici neurální sfingomyelinázy, která zmírňuje neurodegenerativní změny způsobené ukládáním amyloidu v mozku, což bylo demonstrováno na experimentálním myším modelu [42, 45, 46].

Na myším modelu bylo také potvrzeno, že kombinace manumycinu A a paklitaxelu působí proti vzniku anaplastického karcinomu štítné žlázy bez výrazné toxicity. Manumycin A potencuje cytotoxické účinky paklitaxelu a potlačuje angiogenezi spojenou s neoplastickými změnami v organismu. Paklitaxel je cytostatikum, které inhibuje mikrotubulární struktury. Také bylo zjištěno, že manumycin A je vhodný k terapii kolorektálního karcinomu a indukuje apoptózu syntézou reaktivních kyslíkových intermediátů [47, 48, 49].

3.3 Buňky imunitního systému

Buňky imunitního systému se nazývají leukocyty. Vznikají z pluripotentní kmenové buňky v kostní dřeni, která má na svém povrchu molekulu CD34. Rozlišujeme myeloidní a lymfoidní vývojovou větev leukocytů. Z myeloidního progenitoru vznikají megakaryocyty (prekurzory trombocytů – krevních destiček), erytroblasty (prekurzory erytrocytů – červených krvinek), monocyty a granulocyty (neutrofil, eozinofil a bazofil). Z myeloidní linie se rovněž vyvíjejí monocyty (nachází se v krvi), tkáňovou formou monocytů jsou makrofágy. Z monocytů se mohou diferencovat myeloidní dendritické buňky, které jsou schopné prezentace antigenu T lymfocytům. Lymfoidní progenitor dává vzniknout NK buňkám – přirozeným zabíječům a populacím B a T lymfocytů [40].

Periferní krev lze centrifugací v hustotním gradientu rozdělit do několika fází na základě jejich hustoty. Svrchní vrstvu tvoří plazma, ve spodní vrstvě jsou usazené erytrocyty spolu s granulocyty. Mezi plazmou a erytrocyty se nachází prstenčitá vrstva – buffy coat, jež se skládá z trombocytů a mononukleární frakce leukocytů. Z buffy coatu získaného z transfuzní stanice můžeme izolovat PBMC (peripheral blood mononuclear cells) – frakci mononukleárních buněk periferní krve složenou z monocytů a lymfocytů. Mononukleární buňky představují 22– 48 % celkového počtu leukocytů v krvi [50, 52].

3.3.1 Monocyty, makrofágy

Monocyty se nachází v krevním řečišti, patří mezi agranulocyty. Pokud se dostanou procesem diapedézy do tkáně (kde nesou speciální název), označují se jako makrofágy. Osídlují játra (Kupfferovy buňky), centrální nervstvo (mikroglie) a resorbují kostní matrix (osteoklasty). Plní funkci antigen prezentujících a fagocytujících buněk. Ničí bakterie působením oxidu dusnatého,

reaktivních kyslíkových intermediátů a lysozomálních enzymů. Po aktivaci Th1 lymfocyty produkují prozánětlivé cytokiny TNF- α , IL-1, IL-12 a IFN- γ . TNF- α a IL-1 atrahují leukocyty do místa zánětu, IL-12 podporuje diferenciaci Th1 lymfocytů a indukuje syntézu IFN- γ [50, 51].

3.3.2 B lymfocyty

B lymfocyty vznikají v kostní dřeni – primárním lymfatickém orgánu. V sekundárním lymfatickém orgánu (mízní uzlina, Peyerovy pláty, slezina) se setkají s antigenem a dozrávají v plazmatické buňky schopné syntézy imunoglobulinů. Některé B a T lymfocyty se přeměňují v paměťové buňky, které zajišťují rychlejší a efektivnější imunitní odpověď po opětovném styku s antigenem [40].

Chemickým složením jsou antigeny nejčastěji proteiny nebo sacharidy. T-dependentní antigeny mají bílkovinnou povahu a vyvolávají tvorbu protilátek, u kterých je nutná spolupráce B lymfocytů s Th2 lymfocyty. T-independentní antigeny mají cukernou či lipidovou povahu a vyskytují se například u bakterií (například lipopolysacharid či flagelin) a vyvolávají tvorbu protilátek, u kterých není nutná spolupráce B lymfocytů s Th2 lymfocyty. Novorozenci s nevyvinutým imunitním systémem a nezralými B lymfocyty tvoří protilátky proti T-dependentním antigenům a některým T-independentním antigenům (například LPS). Nezralé B lymfocyty novorozenců nejsou schopné správně syntetizovat protilátky proti polysacharidovým antigenům (MAMP, struktury asociované s mikroby). Novorozenci jsou proto náchylnější k infekcím, IgG specifické proti mikrobiálním antigenům jsou přenášeny prenatálně přes placentu do krevního oběhu novorozence a postnatálně kojením. Mateřské mléko obsahuje mimo IgG i vysoké koncentrace IgA poskytující další ochranu novorozence proti infekcím [40, 41].

B lymfocyty mohou mimo Th lymfocytů spolupracovat i s folikulárními dendritickými buňkami. Folikulární dendritické buňky na svém povrchu ukládají imunokomplexy, které mohou být rozpoznány paměťovými buňkami [40].

Mezi významné populace B lymfocytů patří B1, B2, B10 a B_{MZ} buňky (B lymfocyty marginální zóny). Po interakci T-independentního antigenu s B1 nebo B_{MZ} lymfocytem je indukována syntéza nízkoafinitního IgM. V případě styku T-dependentního antigenu s B2 lymfocytem jsou v různé míře tvořeny všechny izotypy imunoglobulinů. Podle druhu antigenu se na signalizaci spojenou s B lymfocyty podílí TLR (toll-like receptory), CD21, C3d (složka komplementu) a celá řada cytokinů. Cytokiny se podílí například na diferenciaci B lymfocytů nebo izotopových přesmyků protilátek [41].

3.3.3 T lymfocyty

Tc lymfocyty

Tc lymfocyty jsou typické svou cytotoxickou aktivitou. Podobnou funkci mají také NK buňky. Ničí virem napadené nebo nádorové buňky lidského organismu. Obvykle působí na cílové buňky přímým kontaktem nebo skrze sekreční produkty. Spolupracují s antigen prezentujícími buňkami (dendritickými buňkami a makrofágy). V cytoplazmě Tc lymfocytů se nachází granula obsahující perforiny a granzymy. Perforiny jsou proteiny, které způsobují tvorbu pórů do cytoplazmatické membrány buněk. Granzymy patří mezi proteázy, které spouští programovanou buněčnou smrt (apoptózu). V signalizační dráze apoptózy je významný komplex CD95 a FasL. Tc lymfocyty produkují mediátor apoptózy – lymfotoxin (TNF-β) [40].

Th lymfocyty

T lymfocyty, které mají na svém povrchu umístěnou molekulu CD8 (CD – shluk odlišností, cluster of differentiation), se označují jako cytotoxické T lymfocyty (Tc). T lymfocyty, které mají na svém povrchu umístěnou molekulu CD4, se označují jako pomocné T lymfocyty (Th, helper). Mezi významné populace Th lymfocytů patří především Th1, Th2, Th17 a regulační T lymfocyty (Treg). Vlastnosti Th lymfocytů jsou shrnuty v Tabulce 2 [40, 41].

Th1 lymfocyty mají transkripční faktor T-bet, jehož exprese zajišťuje fenotypový projev Th1 (produkci cytokinů IFN- γ a IL-2). Th1 se účastní boje proti intracelulárním parazitům. Mezi intracelulární parazity patří například *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium leprae*. Mykobakterie dokáže odolat fagocytóze a je schopná přežít v nehostinném prostředí hostitelské buňky uvnitř fagozómu. Charakteristický Th1 cytokin IL-2 podporuje proliferaci CD4+ T lymfocytů. Další typický cytokin produkovaný populací lymfocytů Th1 IFN- γ podporuje aktivaci makrofágů. Makrofágy patří mezi fagocyty a antigen prezentující buňky, syntetizují oxid dusnatý, který má baktericidní účinek. Th1 lymfocyty hrají důležitou roli v zánětlivé imunopatologické reakci čtvrtého typu, která je charakterizována opožděnou přecitlivělostí na antigen. Patologicky se podílí také na průběhu autoimunitních dějů a spolupracují s Tc lymfocyty, například v boji proti infekčnímu agens [40, 41].

Th2 lymfocyty mají transkripční faktor GATA3. Populace Th2 secernuje cytokiny IL-4, IL-5, IL-6 a IL-13. B lymfocyty mohou být aktivovány na plazmatické buňky na základě prezentace T-dependentního antigenu dendritickými buňkami a následné pomoci od Th2 lymfocytů. Tohoto procesu se zúčastní signální molekuly TCR a CD28 T lymfocytů a MHC II glykoproteinů a B7 antigen prezentujících buněk (APC) v prostředí Th1 cytokinu IL-2.

B lymfocyty mohou být aktivovány na plazmatické buňky na základě prezentace T-dependentního antigenu dendritickými buňkami. Plazmatické buňky poté produkují různé izotypy protilátek s pomocí Th2 lymfocytů a cytokinů ovlivňujících izotypový přesmyk. T-dependentní antigeny jsou závislé na thymu (T lymfocytech), mají charakter proteinů. Imunitní odpověď na T-dependentní antigeny zahrnuje afinitní maturaci, izotypový přesmyk a vznik paměťových buněk. Cytokin IL-4 se podílí na izotypovém přesmyku na IgE, IFN- γ se podílí na tvorbě IgG₃, TGF- β (transformující růstový faktor) se podílí na syntéze IgA společně s IL-5. Také vznikající IgE poskytuje ochranu proti extracelulárním parazitům – červům a účastní se alergické reakce u vnímavých jedinců. V rámci imunitní odpovědi na antigen se jako první tvoří protilátky izotypu IgM [40, 41].

Z rozdílných funkcí Th1 a Th2 lymfocytů vyplývá, že aktivita buněk musí být v organismu udržována v křehké rovnováze, aby nedošlo k jeho poškození. Jakým směrem se imunitní odpověď bude ubírat, záleží na mikroprostředí cytokinů IFN- γ a IL-4. V případě mykobakteriální nákazy dochází k aktivaci makrofágů Th1 lymfocyty a produkci IFN- γ . Naopak k překonání helmintózy je potřeba syntetizovat IgE plazmatickými buňkami s podporou Th2 lymfocytů, čemuž napomáhá potlačení činnosti Th1 lymfocytů tvorbou IL-4, jenž podporuje expresi GATA3. V souvislosti se vzájemnou regulací Th1 a Th2 prostřednictvím cytokinů se hovoří o IL-12, který ale spíše napomáhá expresi transkripčního faktoru T-bet podporujícího Th1 fenotyp. Podobnou funkci jako IL-4 má IL-13. Nicméně v současné době víme, že populace CD4⁺ T lymfocytů není reprezentována pouze Th1 a Th2 subpopulacemi, ale i dalšími (Th3, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 či Treg), což činí problematiku imunoregulace komplikovanější [40, 41].

Folikulární pomocné T lymfocyty (Tfh, follicular helper cells) pomáhají B lymfocytům, podobně jako Th2 lymfocyty. Nachází se ve folikulech

a zárodečných centrech B lymfocytů. Efektorovými cytokiny Tfh lymfocytů jsou IL-6 a IL-21. Předpokládá se, že jejich transkripčním faktorem je Bcl-6. Syntéza Bcl-6 inhibuje tvorbu jiných transkripčních faktorů (T-bet, ROR γ t, GATA3), a proto dochází k potlačení diferenciaci naivních Th lymfocytů v subpopulaci Th1, Th2 a Th17 ve prospěch Tfh buněk [40].

Th17 lymfocyty mají transkripční faktor ROR γ t. Syntetizují cytokin IL-17, podle kterého dostaly svůj název. Tvorba cytokinu IL-17 je důležitá při imunitní obraně proti bakteriím a plísním či se podílí na rozvoji autoimunitních a zánětlivých reakcí v případě dysregulace imunitních odpovědí vedoucích k rozvoji imunopatologických reakcí. Ačkoliv Th17 lymfocyty mohou podporovat vznik autoimunitních onemocnění, jsou důležité i pro udržení homeostatických interakcí mezi mikrobiotou a imunitním systémem hostitele. U myši s chybějícími Th17 lymfocyty se rozvinula roztroušená skleróza [41]. IL-17 podporuje Th1 imunitní odpověď, mimo to stimuluje neutrofile. Dalším cytokinem Th17 lymfocytů je IL-22, jenž napomáhá funkci NK buněk a inhibuje Th2 imunitní odpověď. IL-22 je důležitý pro udržení homeostázy střeva, kde podporuje tvorbu antimikrobiálních peptidů regulujících jeho mikrobiální složení [40, 41].

Treg lymfocyty mají supresorovou a regulační funkci. Rozlišujeme přirozené a indukované Treg. Přirozené Treg vznikají v thymu, zajišťují centrální toleranci vůči autoantigenům. Indukované Treg vznikají v sekundárních mízních orgánech (lymfatických uzlinách a slezině) po setkání s antigenem a jsou zodpovědné za nastavení a udržení periferní tolerance. Jejich transkripčním faktorem je FOXP3 (forkhead box P3). Treg udržují rovnováhu mezi jednotlivými subpopulacemi CD4⁺ T lymfocytů. Typické efektorové imunoregulační cytokiny Treg (IL-10, IL-35 a TGF- β) tlumí zánětlivé a neadekvátní autoimunitní reakce. Treg ovlivňují činnost dendritických buněk obdobně jako Tc lymfocyty skrze

sekreci perforinů a granzymů [40]. Jsou schopné přeměňovat jiné T lymfocyty na buňky sobě podobné prostřednictvím cytokinů, tento jev se nazývá infekční tolerance. Vyšší zastoupení Treg u pacientů s nádorovým onemocněním je spojeno s horší prognózou a nižší účinností léčby těchto onkologických pacientů. Treg zastávají nepostradatelnou funkci při navození tolerance matky vůči plodu [40, 41].

Při regulaci Th17 a Treg aktivity je důležitý TGF- β a další cytokiny, které s ním spolupracují. Jestliže se v organismu nachází TGF- β bez IL-6, je preferována indukce Treg s potlačením autoimunity. Pokud je TGF- β přítomný s IL-6, rozvíjí se preferenčně Th17 imunitní odpověď s potenciální schopností podporovat vznik autoimunitních onemocnění. IL-6 umocňuje zánětlivý proces a je asociován s Th2 lymfocyty. TGF- β se podílí na expresi transkripčních faktorů ROR γ t a FOXP3 [40, 41].

Tabulka 2 – Th lymfocyty [vlastní zdroj]

Subopulace T lymfocytů	Transkripční faktor	Efektorové cytokiny	Autoimunita
Th1	T-bet	IFN- γ , IL-2	+
Th2	GATA3	IL-4, IL-13	-
Th17	ROR γ t	IL-17, IL-22	+
Treg	FOXP3	TGF- β , IL-10, IL-35	-

3.4 Cytokiny

Buňky imunitního systému spolu vzájemně komunikují prostřednictvím cytokinů. Cytokiny můžeme charakterizovat jako proteinové hormony, které se váží na vysoce specifické, zpravidla membránové receptory na cílových buňkách. Tvorba a sekrece cytokinů je přísně regulována. Schopnost rychlé sekrece cytokinů s většinou krátkým poločasem rozpadu se významnou měrou podílí jak na vzniku, tak průběhu imunitních procesů. Cytokiny mohou působit autokrinně (secernovaný cytokin ovlivňuje buňku, která jej tvoří), parakrinně (secernovaný cytokin ovlivňuje funkce buněk v těsné blízkosti buňky produkující daný cytokin) nebo endokrinně (nejméně častá možnost, kdy cytokin ovlivňuje cílové buňky vzdálené od buňky secernující daný cytokin). Na větší vzdálenost musí být transportovány krevním řečištěm k cílové tkáni. Některé cytokiny spolu spolupracují (synergismus, zesilují daný efekt), jiné účinkují proti sobě (antagonismus, jedny cytokiny potlačují funkci druhých cytokinů) [40, 51].

Cytokiny lze klasifikovat podle mnoha parametrů. Velkou a rozmanitou skupinu tvoří interleukiny. Interleukiny jsou nezbytné pro činnost a regulaci funkce leukocytů. Další skupinou jsou interferony, které mají antivirový účinek. Rozdělujeme je na interferony 1. třídy (IFN- α , IFN- β) a interferony 2. třídy (IFN- γ). Interferony 1. třídy se více uplatňují jako inhibitory virové replikace. Podle funkce se cytokiny často dělí na prozánětlivé a protizánětlivé. Syntéza cytokinů může být typická pro určité buněčné populace. Níže je stručně pojednáno o cytokinech studovaných v rámci této bakalářské práce [40, 51].

3.4.1 Interleukiny

Interleukin 2

IL-2 je cytokin, jehož molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 15–20 kDa. Patří do skupiny růstových faktorů T lymfocytů. Na jeho produkci se významně podílí Th1 lymfocyty. IL-2 podporuje aktivaci T lymfocytů, B lymfocytů a NK buněk. Stimulací těchto buněk nepřímo ovlivňuje tvorbu jiných cytokinů, například IFN- γ a TGF- β . Stimuluje také LAK (lymfokiny aktivované zabíječe), které jsou společně s TIL (tumor infiltrujícími lymfocyty) využívány při podpoře protinádorové buněčné imunity [41, 51, 53].

Interleukin 4

IL-4 se řadí mezi typické Th2 cytokiny. Jeho molekulová hmotnost je variabilní, nabývá hodnot 15–19 kDa. IL-13 se strukturně podobá Th2 cytokinu IL-4. Minoritně má vliv na makrofágy a endotelie. Působí především na B lymfocyty, konkrétně podporuje expresi povrchové receptorové molekuly CD23. Dále hraje důležitou roli v izotypovém přesmyku protilátek z IgG na IgE. Z tohoto důvodu se dá IL-4 označit jako mediátor alergických reakcí. Uvažuje se o jeho terapeutickém využití – inhibici IL-4 v rámci léčby astma bronchiale [41, 51, 53].

Interleukin 5

IL-5 je zodpovědný za fenotypový projev Th2 lymfocytů. Jeho molekulová hmotnost je 15 kDa. Podílí se na vývoji mastocytů, bazofilů a eozinofilů. Tyto buněčné populace jsou schopné degranulací působků (například histaminu nebo granzymů) moderovat imunopatologické reakce. IL-5 se účastní i maturace B lymfocytů [41, 51, 53].

Interleukin 6

IL-6 je charakteristický svým pleiotropním působením. Má molekulovou hmotnost 26 kDa. Nejvíce ovlivňuje B a T lymfocyty, ale působí i na gliové buňky, keratinocyty nebo hepatocyty. Reguluje správný průběh hematopoézy, patologicky indukuje tvorbu plasmocytomu. Jedná se o prozánětlivý cytokin s pyrogenní funkcí, který podporuje syntézu proteinů akutní fáze v játrech [41, 51, 53].

Interleukin 10

Molekulová hmotnost IL-10 je 35–40 kDa. Jde o zástupce cytokinů s imunoregulační funkcí tvořených například Treg lymfocyty, který výrazně inhibuje syntézu IFN- γ . Ve spolupráci s TGF- β podněcuje B lymfocyty k produkci IgA. Působí na většinu T lymfocytárních subpopulací, ale i makrofágy a dendritické buňky. Lokálně se uplatňuje v podpoře funkce Langerhansových buněk. IL-10 má protizánětlivý účinek, mírní průběh potransplantační rejekce štěpu [41, 51, 53].

Interleukin 12

IL-12 je heterodimer, skládá se ze dvou podjednotek o obvyklých molekulových hmotnostech 35 kDa a 40 kDa. Náleží k Th1 cytokinům, společně s IFN- γ zastává prozánětlivou funkci. Účastní se imunitní obrany proti intracelulárním bakteriím prostřednictvím aktivace makrofágů dohromady s IFN- γ . Je klíčový pro aktivitu NK buněk a Tc lymfocytů [41, 51, 53].

Interleukin 13

IL-13 má molekulovou hmotnost 10 kDa. Strukturou a funkcí se příliš neliší od dalšího Th2 cytokinu IL-4. Podílí se na vzniku protilátek izotypu IgE, účastní se alergických a atopických reakcí, ale stěžejní je jeho schopnost tlumit zánětlivé procesy spojené s Th1 imunitní odpovědí. V přítomnosti IL-13 je syntetizován eotaxin – chemotaktický faktor eozinofilů [41, 51, 53].

Interleukin 17

Charakteristickou vlastností Th17 lymfocytů je produkce cytokinu IL-17 o molekulové hmotnosti 28–31 kDa. Pod pojmem IL-17 rozumíme cytokinovou rodinu s hlavním a v současné chvíli nejvíce prostudovaným zástupcem IL-17A. IL-17 interaguje s nekonvenčními T lymfocyty s TCR $\gamma\delta$ nebo intraepiteliálními T lymfocyty. TCR $\gamma\delta$ buňky syntetizují IL-17. IL-17 zvyšuje produkci cytokinů IL-6 či TNF- α (a mnohých dalších), skrze chemokiny atrahuje monocyty a neutrofile do místa zánětu [41, 53].

Interleukin 22

IL-22 je homodimerický Th17 a Th22 cytokin s molekulovou hmotností 25 kDa. Patří do rodiny cytokinů IL-10 a podílí se na udržení homeostatických interakcí na střevní sliznici. Má podíl na patogenezi onemocnění kožního, trávicího a dýchacího ústrojí. Působí jako hepatoprotektivum, inhibuje syntézu IL-4 Th2 lymfocyty [41, 53].

3.4.2 Interferony, transformující růstové faktory

Interferon γ

IFN- γ se vyskytuje v monomerní a dimerní formě, které se liší svými molekulovými hmotnostmi (17 kDa a 40 kDa). Jedná se o glykoprotein, který je asociovaný s buněčnou populací Th1. Zprostředkovává izotypový přesmyk protilátek na IgG. Podporuje tvorbu MHC glykoproteinů II. třídy a aktivuje makrofágy k fagocytóze. Uplatňuje se především v boji proti virovým patogenům. Ve spolupráci s TNF- α disponuje antiproliferační aktivitou [41, 53].

Transformující růstový faktor β

Molekulová hmotnost TGF- β je přibližně 25 kDa. TGF- β patří mezi typické Treg cytokiny, jeho syntéza však byla popsána i u trombocytů. Může existovat v aktivní nebo neaktivní formě. Funguje zejména jako inhibitor diferenciaci a proliferace lymfocytů, monocytů a makrofágů. Potlačuje zánětlivé procesy a svou přítomností tvoří vhodné mikroklimatické podmínky k hojení tkání. Svým působením se podílí na izotypovém přesmyku protilátek na IgA. Ve spolupráci s IL-6 indukuje vznik Th17 buněk [41, 53].

4 METODIKA

4.1 Izolace mononukleární frakce leukocytů z buffy coatu

Izolaci mononukleárních buněk periferní krve (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) jsme provedli z transfúzních přípravků – buffy coatů, které nám laskavě poskytlo Transfúzní oddělení Fakultní Thomayerovy nemocnice a Všeobecné fakultní nemocnice. V buffy coatu jsou obsaženy monocyty, lymfocyty, granulocyty a trombocyty. K separaci mononukleární frakce jsme použili techniku gradientové centrifugace [52].

1. Do kádinky jsme odebrali cca 25 ml objemu buffy coatu.
2. 25 ml buffy coatu jsme naředili 25 ml Dulbeccova fyziologického roztoku pufovaného fosfátem (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, D-PBS; Sigma Aldrich, USA).
3. Do deseti 5 ml zkumavek jsme přidali 3 ml Ficoll-Paque Plus (Cytiva, USA) a převrstvili 5 ml zředěné krve z buffy coatu.
4. Centrifugovali jsme vzorky při 500 g, 30 min, 21 °C, bez brzdění.
5. Odpipetovali jsme plazmu a odsáli prstýnek leukocytů, který jsme přenesli do nové zkumavky a doplnili do objemu 10 ml fyziologickým roztokem.
6. Centrifugovali jsme vzorky při 900 g, 10 min, 20 °C.
7. Odlili jsme supernatant a roztřepali peletu, vzniklou suspenzi buněk jsme promíchali pipetou.
8. Přenesli jsme pelety z deseti zkumavek do pěti a doplnili do objemu 10 ml fyziologickým roztokem.
9. Centrifugovali jsme vzorky při 500 g, 10 min, 20 °C.
10. Odlili jsme supernatant a roztřepali peletu, vzniklou buněčnou suspenzi jsme promíchali pipetou.
11. Přenesli jsme pelety z pěti zkumavek do dvou a doplnili do objemu 10 ml fyziologickým roztokem.

12. Centrifugovali jsme vzorky při 500 g, 10 min, 20 °C.
13. Odlili jsme supernatant a spojili pelety ze dvou zkumavek do jedné, vzniklá buněčná suspenze byla resuspendována v 5 ml kultivačního média.
14. U 2 µl buněčné suspenze jsme určili jejich životnost a koncentraci buněk ve vzorku.

Na přípravu 400 ml kultivačního média jsme použili:

- 90 ml média RPMI 1640 s obsahem L-glutaminu a hydrogenuhličitanu sodného (Sigma Aldrich, USA);
- 10 ml fetálního bovinního séra (FBS; Biosera, South America);
- 100 µl antibiotika gentamycin (Sandoz, Slovenia);
- 200 µl pufovacího činidla kyseliny sulfonové – HEPES (Sigma Aldrich, USA).

4.2 Stanovení viability a počtu buněk

Stanovení viability a počtu buněk jsme provedli před stimulací mononukleárních buněk periferní krve sekundárními metabolity streptomycet. Alespoň 80 % buněk by mělo být živých a v každé jamce mikrotitrační destičky by se mělo nacházet přesně $2 \cdot 10^6$ buněk v celkovém objemu 2 ml [54].

Stanovení viability buněk

1. Ke 2 µl buněčné suspenze jsme přidali 2 µl trypanové modři.
2. S pomocí krycího a podložního sklíčka jsme připravili preparát k mikroskopování.
3. Stanovili jsme procentuální životnost na sto buněk (modře obarvené buňky byly mrtvé).

Stanovení počtu buněk

1. K 50 μl buněčné suspenze jsme přidali 950 μl Türkova roztoku v mikrozkuhavce.
2. Nechali jsme proběhnout inkubaci – lýzu erytrocytů po dobu 10 min.
3. Promíchali jsme obsah mikrozkuhavky na vortexu a spočítali buňky v Bürkerově komůrce v jednom mililitru.
4. Vypočítali jsme koncentraci buněk. Stanovili jsme objem buněčné suspenze obsahující právě dva milióny buněk.

4.3 Stimulace buněk manumycinem A, lipopolysacharidem (LPS) a fytohemaglutininem (PHA)

V rámci našeho experimentu jsme provedli inkubaci buněk v kultivačním médiu s přidavkem manumycinu A, LPS a PHA v termostatu po dobu 1 a 4 hodiny. Inkubace proběhla v prostředí 5,5% CO_2 při 37 °C [42].

Jako stimulanty jsme použili:

- manumycin A, v tabulce též A (Sigma Aldrich, USA) – koncentrace zásobního roztoku byla 1000 $\mu\text{mol/l}$ a v jamkách mikrotitrační destičky byla konečná koncentrace manumycinu A 5; 1; 0,25 a 0,0125 $\mu\text{mol/l}$;
- lipopolysacharid (LPS; Sigma Aldrich, USA) o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$;
- fytohemaglutinin (PHA; Sigma Aldrich, USA) o koncentraci 5 mg/ml .

Každá jamka mikrotitrační destičky měla objem 2 ml. Obsah stimulantů v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky je uvedený v Tabulce 3.

Tabulka 3 – Stimulace buněk manumycinem A (A), LPS a PHA [vlastní zdroj]

Jamka mikrotitrační destičky	Stimulátor A	Stimulátor LPS	Stimulátor PHA	Buňky	RPMI
K (kontrola)	–	–	–	200 µl	1800 µl
PHA	–	–	10 µl	200 µl	1790 µl
PHA + A ₅	50 µl	–	10 µl	200 µl	1740 µl
PHA + A ₁	50 µl	–	10 µl	200 µl	1740 µl
PHA + A _{0,25}	50 µl	–	10 µl	200 µl	1740 µl
PHA + A _{0,0125}	50 µl	–	10 µl	200 µl	1740 µl
LPS	–	2 µl	–	200 µl	1798 µl

PHA – fytohemaglutinin, A – manumycin A (dolní index udává jeho koncentraci v µmol/l), LPS – lipopolysacharid, RPMI – kultivační médium

4.4 Izolace RNA

Po stimulaci buněk následovala izolace RNA pomocí RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). V této fázi experimentu jsme použili ještě lyzační roztok pro lýzu buněčné membrány za účelem uvolnění RNA (součást komerčního kitu). V rámci izolace byl použit doporučený krok zahrnující aplikaci DNázy za účelem rozštěpení genomické DNA, která by mohla způsobit znečištění RNA (falešně vysoké hodnoty koncentrace RNA při měření na přístroji NanoDrop) [55, 56].

Lyzační roztok jsme připravili z 2500 µl RLT Lysis Buffer (Qiagen, Germany) a 25 µl β-merkaptoetanolu (Sigma Aldrich, USA). Připravený roztok vystačil na sedm vzorků.

DNázu jsme připravili z 10 μ l DNázy a 70 μ l RDD Buffer ze RNase Free DNase Set (Qiagen, Germany). Objem 10 μ l DNázy vystačil na jeden vzorek. Celkový objem připraveného roztoku obsahujícího DNázu byl 80 μ l na jeden vzorek.

1. Buňky jsme pipetou přenesli z mikrotitrační destičky do 2 ml zkumavky.
2. Centrifugovali jsme při 500 g, 10 min, 21 °C a opatrně jsme odsáli supernatant.
3. K peletě jsme přidali 350 μ l lyzačního roztoku a nechali jsme inkubovat 5 min.
4. Přidali jsme 350 μ l 75% chlazeného etanolu.
5. Přenesli jsme 700 μ l roztoku do RNeasy Mini Kit setu 2 ml zkumavky v dolní části a kolonky se semipermeabilní membránou v horní části.
6. Centrifugovali jsme při 8000 g, 15 s, 21°C a proteklou kapalinu jsme vylili do odpadní nádoby.
7. Přidali jsme 350 μ l RW1 Buffer.
8. Centrifugovali jsme při 8000 g, 15 s, 21°C a proteklou kapalinu jsme vylili do odpadní nádoby.
9. Přidali jsme 80 μ l DNázy a nechali jsme inkubovat 15 minut.
10. Přidali jsme 350 μ l RW1 Buffer.
11. Centrifugovali jsme při 8000 g, 15 s, 21°C a proteklou kapalinu jsme vylili do odpadní nádoby.
12. Přidali jsme 500 μ l RPE Buffer.
13. Centrifugovali jsme při 8000 g, 15 s, 21°C a proteklou kapalinu jsme vylili do odpadní nádoby.
14. Zopakovali jsme kroky 12 a 13.
15. Kolonku jsme přenesli do nové 2 ml zkumavky a centrifugovali jsme při 8000 g, 60 s, 21°C.
16. Kolonku jsme přenesli do nové 1,5 ml zkumavky bez RNázy.
17. Přidali jsme 20 μ l vody bez RNáz a centrifugovali jsme 8000 g, 60 s, 21°C.

18. Získanou RNA jsme zmrazili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další použití.

4.5 Stanovení koncentrace RNA

Ke stanovení koncentrace RNA jsme použili NanoDrop One^c (Thermo Scientific, USA). NanoDrop One^c je UV spektrofotometr, který slouží k měření absorbance vzorku nukleové kyseliny při vlnové délce 260 nm podle Lambert-Beerova zákona. Přístroj také měří absorbanci vzorku při vlnové délce 230 nm a 280 nm, ze získaných hodnot stanovuje poměry čistoty RNA jako poměr A_{260}/A_{230} a A_{260}/A_{280} . Vlnová délka 230 nm je vhodná pro detekci organických činidel (fenolu, izothiokyanátu a dalších); vlnová délka 280 nm je vhodná pro detekci absorbance proteinů, které tvoří hlavní kontaminanty vzorku RNA. Hodnoty poměrů čistoty RNA by se měly optimálně pohybovat kolem 2,0 [57].

1. Podstavec a rameno přístroje jsme očistili ubrouskem.
2. Na obrazovce přístroje jsme z nabídky vybrali New Experiment, Nucleic Acids a zvolili stanovení RNA.
3. Napipetovali jsme 2 μl vody bez RNáz (Qiagen, Germany) na podstavec a sklopili jsme rameno přístroje.
4. Na obrazovce přístroje jsme vybrali Blank a nechali jsme proběhnout měření.
5. Zvedli jsme rameno přístroje a osušili jsme podstavec ubrouskem.
6. Napipetovali jsme postupně 2 μl jednotlivých vzorků RNA na podstavec a poté jsme sklopili rameno přístroje.
7. Provedli jsme měření koncentrace RNA ve vzorcích v jednotkách $\text{ng}/\mu\text{l}$.
8. Po každém měření jsme zvedli rameno přístroje a osušili jsme podstavec ubrouskem.
9. Pro ukončení měření jsme na obrazovce přístroje zvolili End Experiment.
10. Zvedli jsme rameno přístroje a vyčistili jsme podstavec ubrouskem.

11. Napipetovali jsme 2 μ l vody bez RNáz na podstavec, který jsme osušili a rameno přístroje jsme ponechali odklopené.

4.6 RT-PCR

Pro průběh kvantitativní PCR (qPCR, quantitative polymerase chain reaction) je potřeba izolovanou RNA přepsat na komplementární DNA (cDNA). K tomu slouží metoda reverzní transkripce (RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction), která využívá enzym reverzní transkriptázu. Reverzní transkriptáza vytváří jednořetězcovou komplementární DNA (cDNA), která neobsahuje úseky intronů a je vhodná ke kvantifikaci genové exprese cytokinů pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Druhý řetězec cDNA je dosyntetizován polymerázovou řetězovou reakcí [58, 59].

K provedení RT-PCR jsme použili:

- přístroj MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Marshall Scientific, USA);
 - High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Lithuania).
1. Provedli jsme přepočty pro vyrovnání koncentrací u jednotlivých vzorků RNA.
 2. Všechny vzorky jsme naředili vodou tak, aby v 5 μ l roztoku obsahovaly 250 ng RNA.
 3. K 5 μ l vzorku RNA v mikrozkušavce jsme přidali 5 μ l premixu pro reverzní transkripci, jehož složení je uvedeno v Tabulce 4.
 4. V reakční směsi proběhla reverzní transkripce.
 5. Všechny mikrozkušavky se vzorky RNA jsme umístili do přístroje MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler.

6. Nechali jsme proběhnout RT-PCR. Reakční směs jsme inkubovali při 37 °C 60 min, poté jsme ji zahřáli na 95 °C 5 min.
7. Polymerázovou řetězovou reakcí vzniklo 10 µl cDNA.
8. Po skončení reverzní transkripce jsme ke vzorku přidali 40 µl vody a získanou cDNA jsme zmrazili na –80 °C pro další použití.

Tabulka 4 – Složení premixu RT-PCR [vlastní zdroj]

Složka	Objem (µl)
Pufr reverzní transkriptázy	1,0
Mix deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP)	0,4
Náhodné primery	1,0
Reverzní transkriptáza	0,5
Inhibitor RNázy	0,5
Voda	1,6
Celkem	5,0

4.7 qPCR

Kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci (qPCR) jsme použili ke kvantifikaci genové exprese cytokinů v reálném čase. Na amplifikovaný úsek DNA cílového genu nasedají primery označené jako forward a reverse primer, které jsou svojí sekvencí oligonukleotidů komplementární s templátovou cDNA. qPCR se dále účastní polymeráza s exonukleázovou aktivitou a TaqMan próba (hydrolyzační sonda) [60].

TaqMan próba se specificky váže na amplifikovaný úsek DNA ohraničený primery a je nositelkou dvou značkových molekul – reportéru (fluoroforu) a quencheru (zhaševče), se kterými interaguje polymeráza. V určitých momentech

průběhu qPCR TaqMan próba překáží polymeráze v činnosti, a proto v rámci exonukleázové aktivity polymerázy dojde k rozštěpení spojení mezi reportérem zhášečem. Nastává okamžitá emise fluorescence charakterizující proběhlý cyklus. Tento nárůst fluorescence je následně detekován [60].

Jako referenční gen jsme zvolili β -aktin, který patří mezi tzv. housekeeping geny. Housekeeping geny by měly být v buňkách lidského organismu exprimovány konstantě a nezávisle na stimulaci či genové expresi námi sledovaných cytokinů. Uplatňují se jako endogenní kontroly průběhu qPCR [61].

K provedení qPCR jsme použili:

- přístroj LightCycler 480 Real-Time PCR Instrument (Roche, Switzerland);
 - destičky s fóliemi Light Cyler 480 Multiwell Plate 384 (Roche, Switzerland);
 - TaqMan eseje pro IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22, IFN- γ a β -aktin (Thermo Fisher, USA);
 - próbu s forward a reverse primery TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA);
 - Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, USA).
1. Do každé jamky jsme napipetovali 2 μ l cDNA a 8 μ l premixu, jehož složení je uvedeno v Tabulce 5.
 2. Destičku jsme překryli fólií a umístili do přístroje LightCycler 480 Real-Time PCR Instrument.
 3. Nechali jsme proběhnout qPCR – denaturační cyklus jedenkrát 50 °C 2 min, annealingový cyklus jedenkrát 95 °C 10 min a elongační cyklus čtyřicetkrát 95 °C 15 s a následně 60 °C 1 min.

Tabulka 5 – Složení premixu qPCR [vlastní zdroj]

Složka	Objem (μl)
Master Mix	5,0
TaqMan esej	0,5
Voda bez RNáz	2,5
Celkem	8,0

5 VÝSLEDKY

Frakci mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) jsme stimulovali po dobu jedné a čtyř hodin různými koncentracemi manumycinu A (5; 1; 0,25 a 0,0125 $\mu\text{mol/l}$). Jako pozitivní kontroly jsme použili polyklonální stimulatory produkce cytokinů lipopolysacharid (LPS) a fytohemaglutinin (PHA), oba o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Po ukončení stimulace jsme z buněk izolovali RNA, kterou jsme pomocí RT-PCR (polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí) přepsali na komplementární DNA (cDNA). Hladinu genové exprese cytokinů jsme stanovili kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR). Experiment jsme provedli pro vzorky periferní krve od čtyř různých dárců pro cytokiny IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22 a IFN- γ . Jako referenční gen jsme zvolili β -aktin.

Jako negativní kontrolu jsme použili PBMC, které nebyly stimulovány manumycinem A, LPS nebo PHA. Předpokládali jsme, že manumycin A bude mít koncentračně závislý vliv na genovou expresi zkoumaných cytokinů.

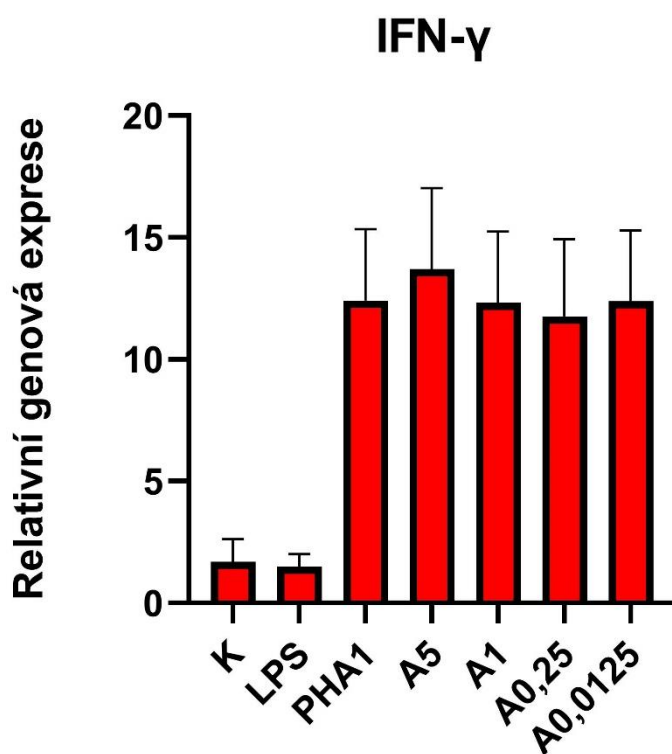
Z qPCR jsme získali hodnoty ct (cycle of treshold, cyklus prahu) pro jednotlivé cytokiny, které lze interpretovat jako počet cyklů nutných k překročení prahové hladiny fluorescence. Z nich jsme vypočítali relativní genovou expresi cytokinů metodou $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$. Ze dvou získaných hodnot ct pro každý gen jsme vypočítali průměrnou hodnotu Δct pro všechny geny. Hodnotu Δct genu pro cytokin jsme odečetli od hodnoty Δct referenčního genu (β -aktinu). Výslednou hodnotu jsme odečetli od průměrné hodnoty Δct nestimulovaných kontrol a získali jsme hodnotu $\Delta\Delta\text{ct}$. Podle vzorce $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ jsme vypočítali relativní genovou expresi.

Výsledky jsme statisticky a graficky zpracovali v programu GraphPad. K otestování normality dat jsme vybrali Shapiro-Wilkův test. K dalšímu statistickému zpracování dat jsme použili Kruskal-Wallisův test, jako post-hoc test jsme vybrali Dunnův test. Výsledky jsme vyjádřili sloupcovými grafy

ve formě průměrů a středních chyb průměrů. Za statisticky významné výsledky jsme považovali ty, u kterých jsme zjistili hodnotu $p \leq 0,05$ (v grafech označeno *). Hodnota $p \leq 0,1$ je v grafech označena ■.

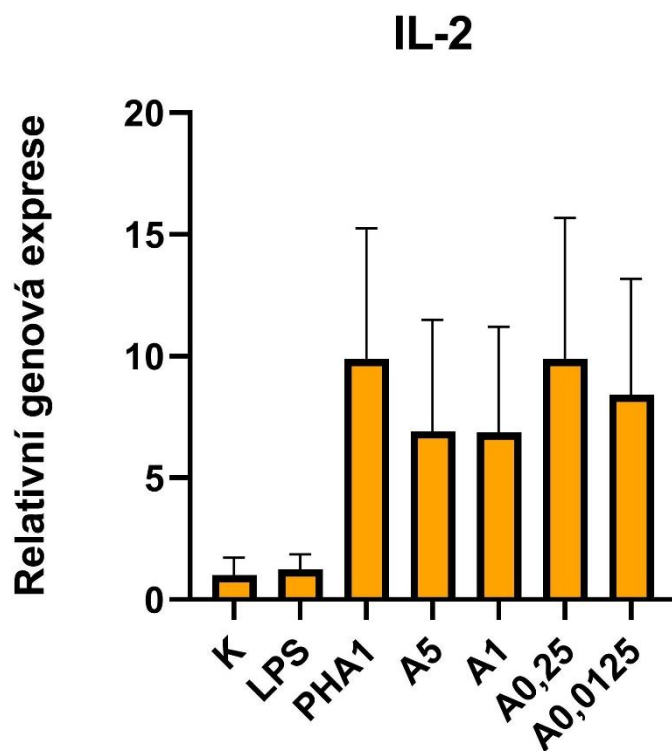
5.1 Genová exprese cytokinů v PBMC po jednorodinové stimulaci LPS, PHA a manumycinem A

Pro ověření schopnosti manumycinu A indukovat imunitní odpověď Th1 typu jsme stimulovali PBMC různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace fytohemaglutininem (PHA). Jako pozitivní kontroly jsme použili lipopolysacharid (LPS) a samotný PHA. Po jedné hodině stimulace PBMC jsme nepozorovali žádný statisticky významný vliv námi použitých látek na genovou expresi *IFN- γ* v porovnání s nestimulovanými buňkami, Obrázek 2.



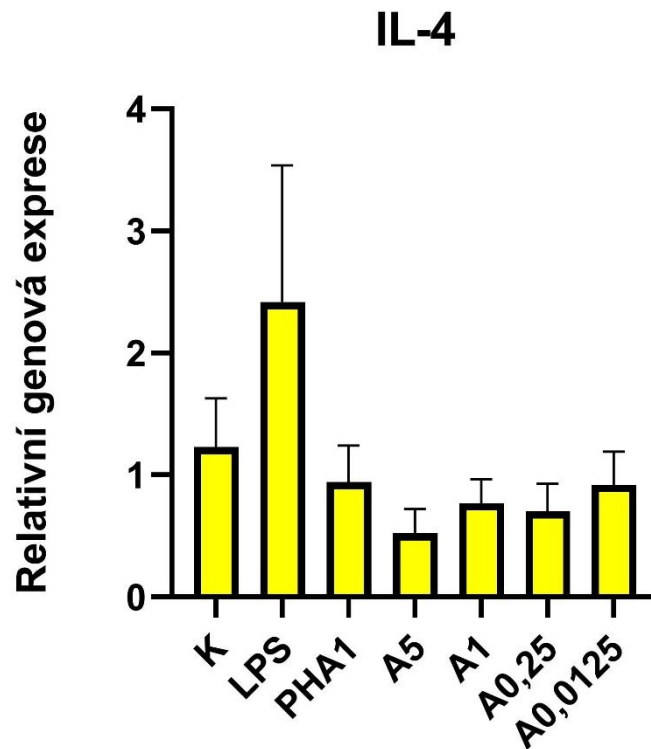
Obrázek 2 – Genová exprese *IFN- γ* po jednorodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj]; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin A (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

Také jsme testovali imunomodulační schopnost manumycinu A ovlivnit genovou expresi *IL-2* po stimulaci trvající jednu hodinu. Nezaznamenali jsme však žádný koncentračně závislý efekt manumycinu A na změnu genové exprese tohoto cytokinu typického pro Th1 imunitní odpověď, Obrázek 3.



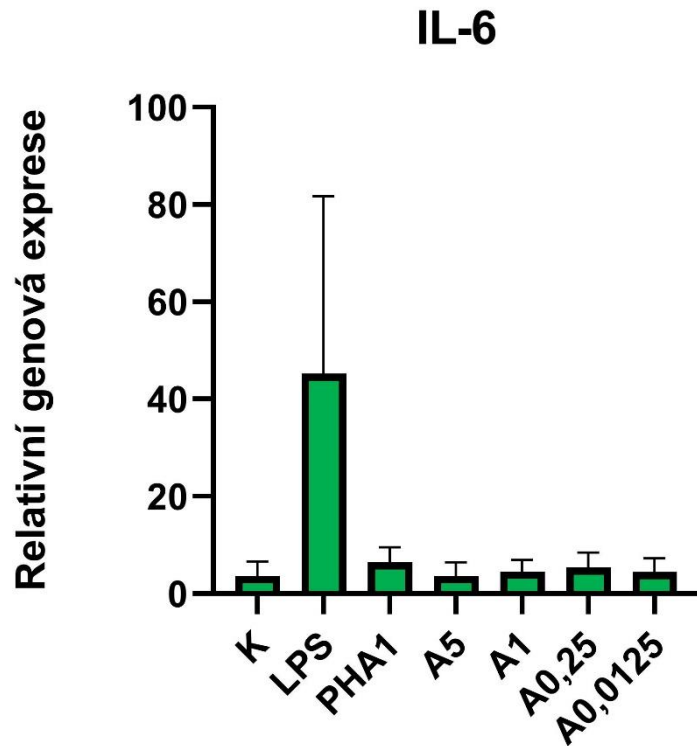
Obrázek 3 – Genová exprese *IL-2* po jednohodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj]; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin A (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

Pro studium účinku manumycinu A na Th2 imunitní odpověď jsme vybrali cytokin IL-4. Jedn hodinová stimulace cytokinu IL-4 s LPS, PHA a manumycinem A nevedla v žádné ze sledovaných situací ke statisticky signifikantní modulaci intenzity genové exprese *IL-4*, Obrázek 4.



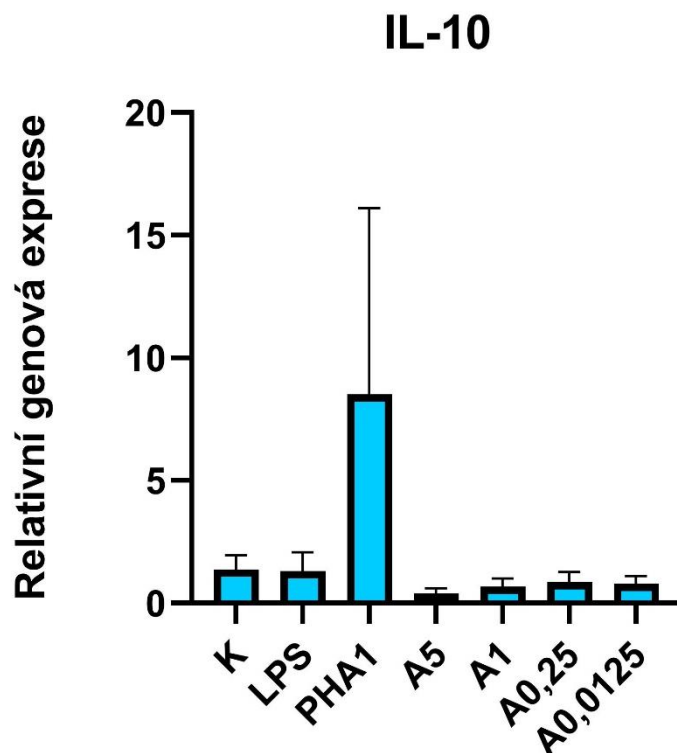
Obrázek 4 – Genová exprese *IL-4* po jedn hodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj]; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin A (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

Dalším zkoumaným zástupcem cytokinů byl IL-6, který je asociovaný s činností Th2 lymfocytů. Z grafu je patrné, že po stimulaci PBMC manumycinem A, ale i samotným PHA nebo LPS o délce jedné hodiny, nedošlo ze statistického hlediska k významné změně v genové expresi IL-6 v porovnání s nestimulovanou kontrolou, Obrázek 5.



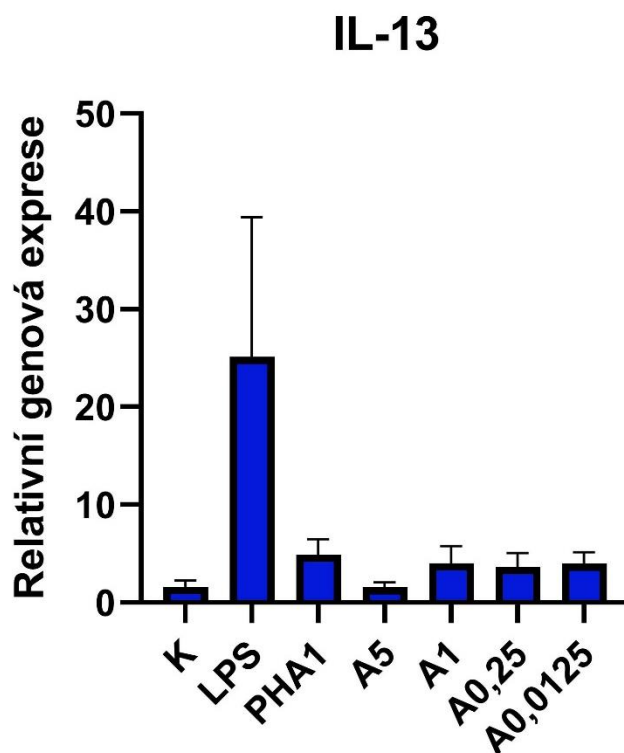
Obrázek 5 – Genová exprese IL-6 po jednohodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj]; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin A (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

Sledovali jsme vliv různých koncentrací manumycinu A na genovou expresi *IL-10* v PBMC po jednohodinové stimulaci. *IL-10* je charakteristický imunoregulační cytokin sekretovaný Treg, u jehož genové exprese v PBMC stimulovaných námi zvoleným sekundárním metabolitem streptomycet v porovnání s LPS, PHA a nestimulovanou kontrolou nepozorujeme statisticky významný rozdíl, Obrázek 6.



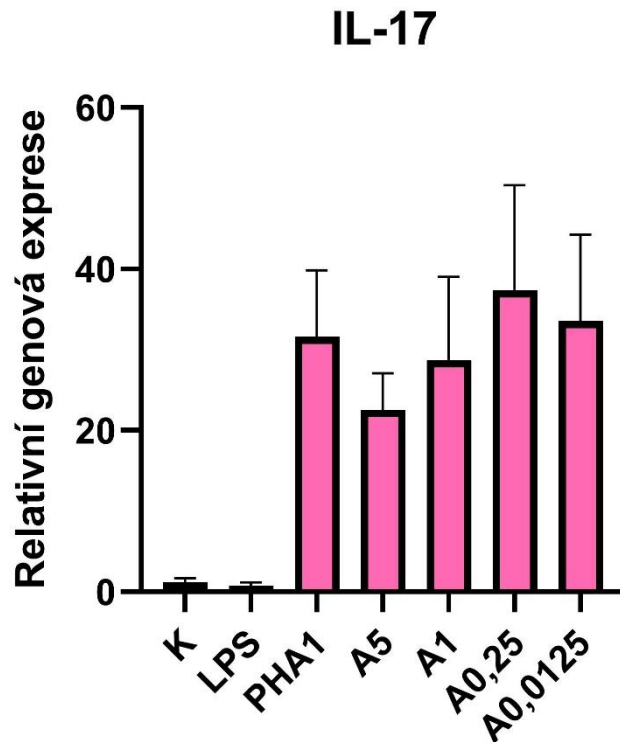
Obrázek 6 – Genová exprese *IL-10* po jednohodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj]; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin A (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

Mezi cytokiny, které jsou spjaty s aktivitou Th2 buněk, patří IL-13. Hodnota genové exprese pro *IL-13* po jednohodinové stimulaci manumycinem A a dalšími látkami nebyla statisticky signifikantně zvýšená nebo snižená oproti hodnotě genové exprese *IL-13* v nestimulovaných PBMC, Obrázek 7.



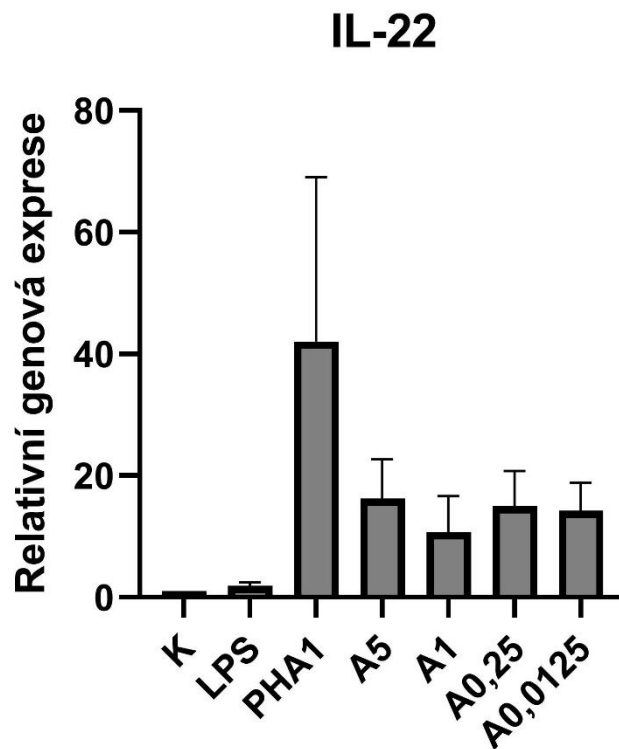
Obrázek 7 – Genová exprese *IL-13* po jednohodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj]; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin A (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

Th17 lymfocyty syntetizují cytokin IL-17. Po jedné hodině stimulace PBMC manumycinem A o různých koncentracích jsme došli k závěru, že genová exprese *IL-17* v mononukleární frakce periferních krve není statisticky signifikantně změněna, ve srovnání s PBMC stimulovanými jinými látkami a kontrolním vzorkem, Obrázek 8.



Obrázek 8 – Genová exprese *IL-17* po jednohodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj]; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin A (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

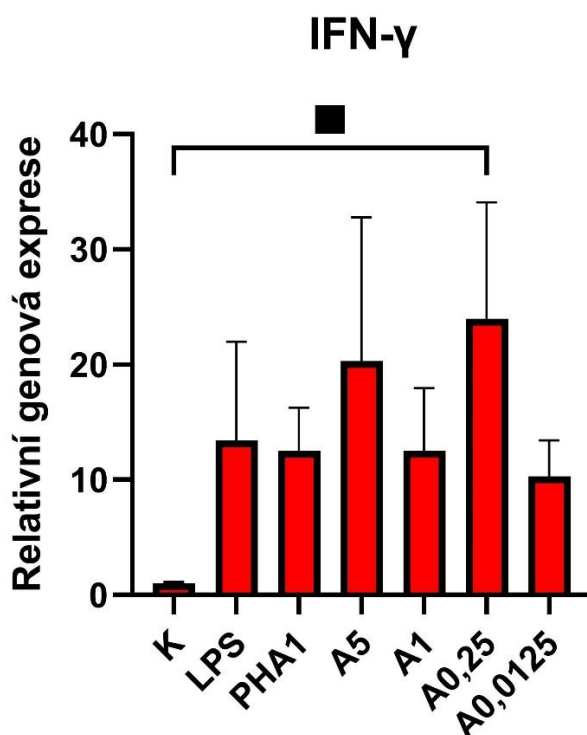
Posledním studovaným cytokinem byl IL-22, který patří mezi hlavní efektorové cytokiny Th17. I v tomto případě se vliv různých koncentrací manumycinu A na změnu genové exprese *IL-22* v PBMC stimulovaných jednu hodinu LPS či PHA nebo v kontrolním vzorku výrazně nelišil a nedosáhl statisticky významných hodnot, Obrázek 9.



Obrázek 9 – Genová exprese IL-22 po jednohodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj]; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin A (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

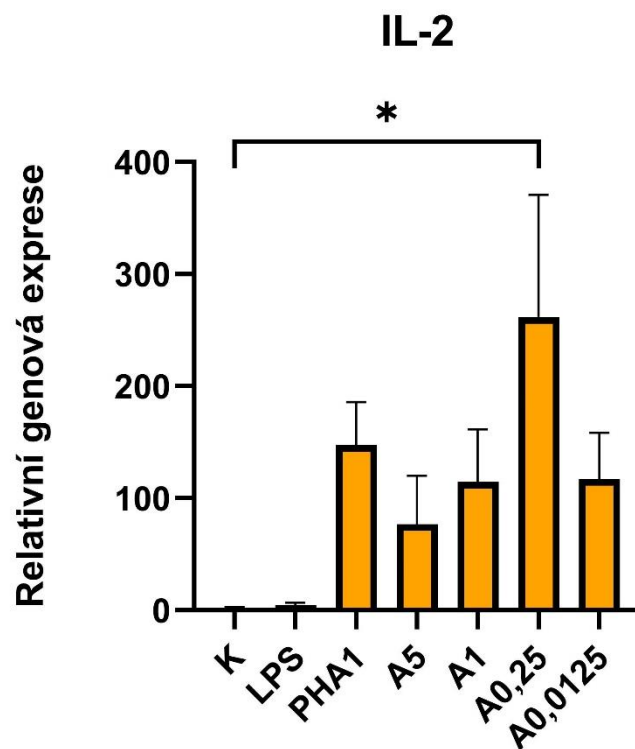
5.2 Genová exprese cytokinů v PBMC po čtyřhodinové stimulaci LPS, PHA a manumycinem A

Stimulovali jsme PBMC po dobu čtyř hodin s různými koncentracemi manumycinu A a zjistili jsme trend zvýšení genové exprese *IFN- γ* při srovnání nestimulované kontroly a buněk mononukleární frakce leukocytů periferní krve po působení manumycinu A o koncentraci 0,25 $\mu\text{mol/l}$. Výsledek můžeme považovat pouze za nalezený trend, jelikož $p \leq 0,1$ (konkrétně $p = 0,08$), Obrázek 10.



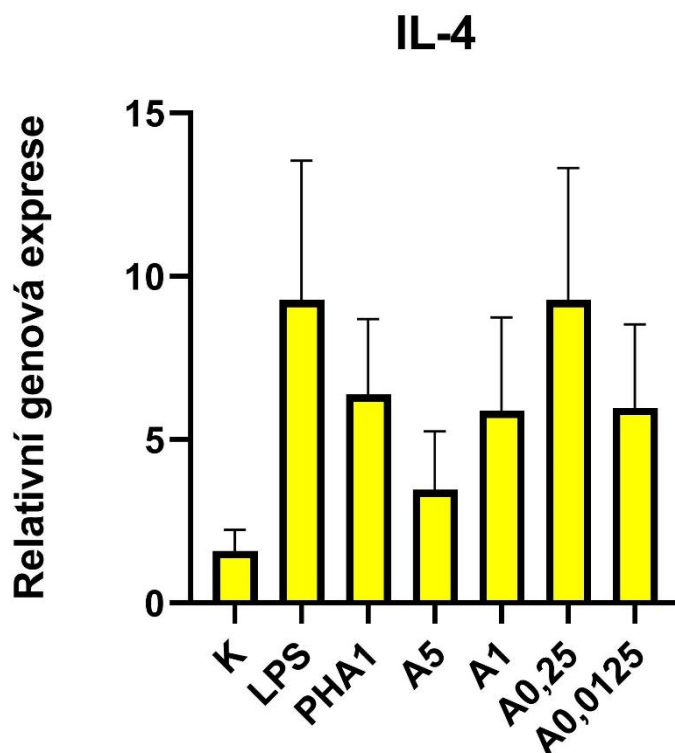
Obrázek 10 – Genová exprese *IFN- γ* po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj], ■ $p \leq 0,1$; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin A (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

Zjistili jsme, že výsledek nárůstu genové exprese *IL-2* je statisticky významný ($p = 0,04$) po stimulaci manumycinem o koncentraci $0,25 \mu\text{mol/l}$ v porovnání s kontrolou, u které jsme neprovedli žádnou stimulaci. Znamená to, že v takto stimulovaných PBMC byla podnícena překvapivě cesta prozánětlivé imunitní odpovědi moderovaná Th1 lymfocyty. U ostatních koncentrací manumycinu nebyl v tomto případě stejný imunomodulační efekt pozorován, Obrázek 11.



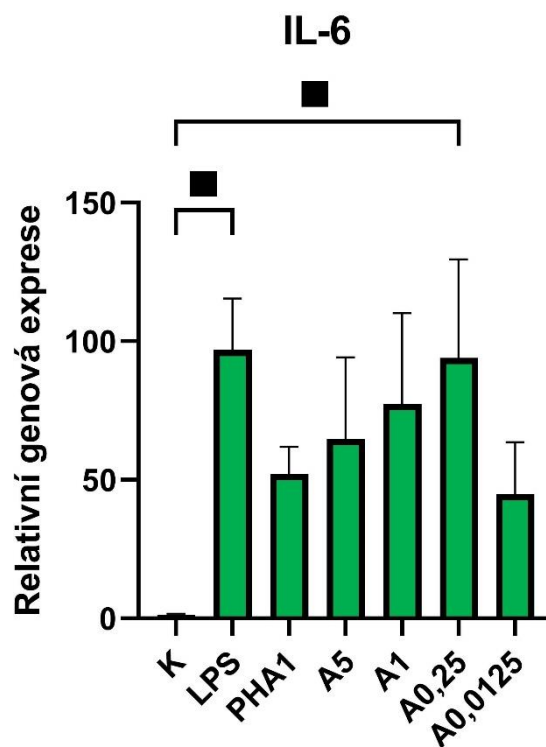
Obrázek 11 – Genová exprese *IL-2* po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu *A* za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj], * $p \leq 0,05$; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin *A* (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

Prodloužení stimulace PBMC různými látkami, včetně manumycinu A, na dobu čtyř hodin nevedlo k alteraci genové exprese *IL-4* v těchto buňkách. Můžeme konstatovat, že manumycin A zřejmě nemá statisticky významný vliv na tvorbu tohoto cytokinu v mononukleární frakci periferní krve, Obrázek 12.



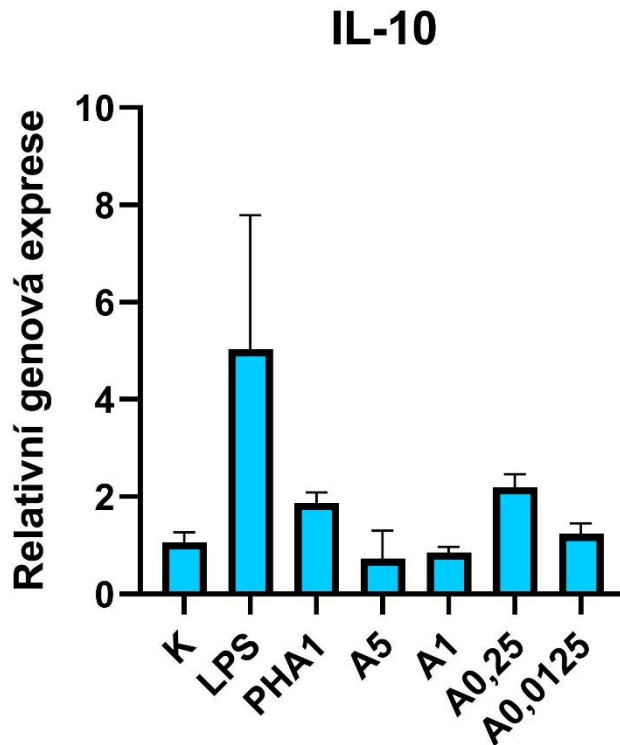
Obrázek 12 – Genová exprese *IL-4* po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj]; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin A (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

Při vyhodnocování genové exprese *IL-6* po stimulaci PBMC manumycinem A a LPS jsme zaznamenali určité trendy, které by bylo vhodné ověřit dalšími experimenty. V porovnání s kontrolou došlo v rámci našeho pozorování k nárůstu genové exprese *IL-6* u buněk stimulovaných LPS ($p = 0,07$) a manumycinem o koncentraci 0,25 $\mu\text{mol/l}$ ($p = 0,09$). Tento poznatek není v souladu s naším předpokladem o snížení genové exprese prozánětlivých cytokinů v PBMC po stimulaci manumycinem A, Obrázek 13.



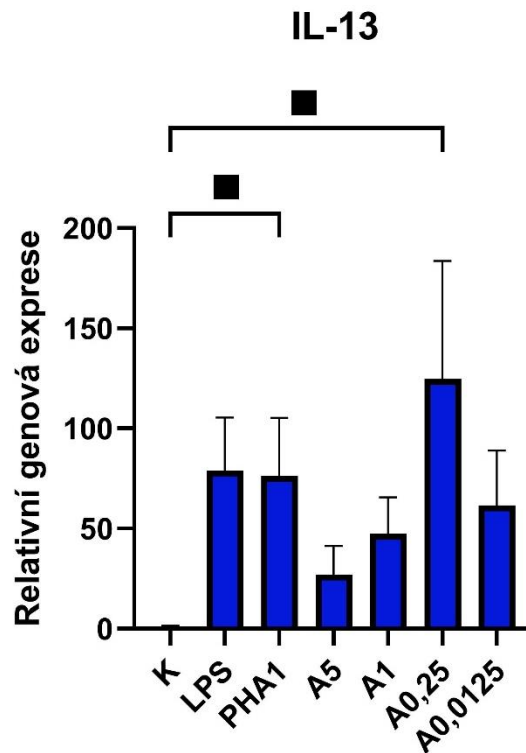
Obrázek 13 – Genová exprese *IL-6* po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj], ■ $p \leq 0,1$; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin A (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

Delší doba stimulace PBMC manumycinem A po dobu čtyři hodiny nejspíše nemá zásadní vliv na sledovanou změnu genové exprese *IL-10*. Nespatriili jsme žádný signifikantní rozdíl mezi genovou expresí buněk stimulovaných různými koncentracemi manumycinu A ve srovnání s nestimulovanou kontrolou nebo PBMC stimulovanými LPS či PHA, Obrázek 14.



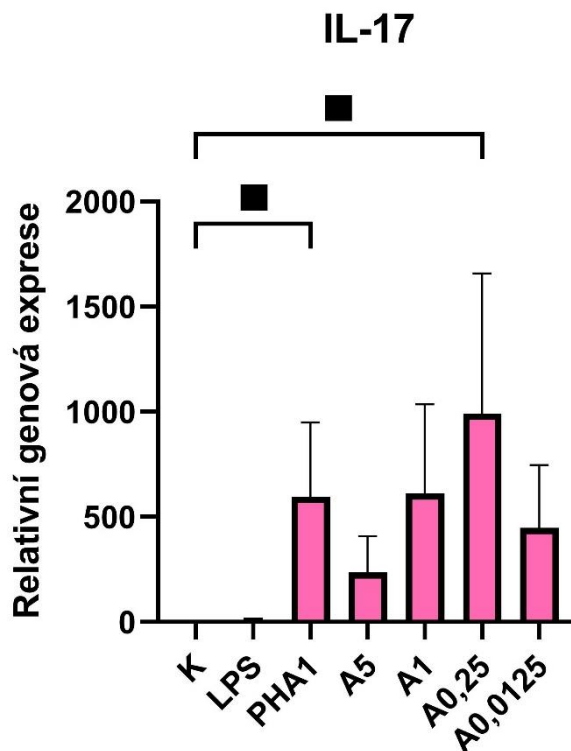
Obrázek 14 – Genová exprese *IL-10* po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj]; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin A (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

U cytokinu IL-13 jsme opět pozorovali jisté trendy, a to při sledování zvýšení genové exprese *IL-13* po stimulaci manumycinem A o koncentraci 0,25 $\mu\text{mol/l}$ ve vztahu k negativní kontrole ($p = 0,08$) a také při srovnání negativní kontroly s PBMC, které byly stimulovány pouze LPS ($p = 0,09$). Bylo by na místě naše závěry potvrdit dalším pokusem, Obrázek 15.



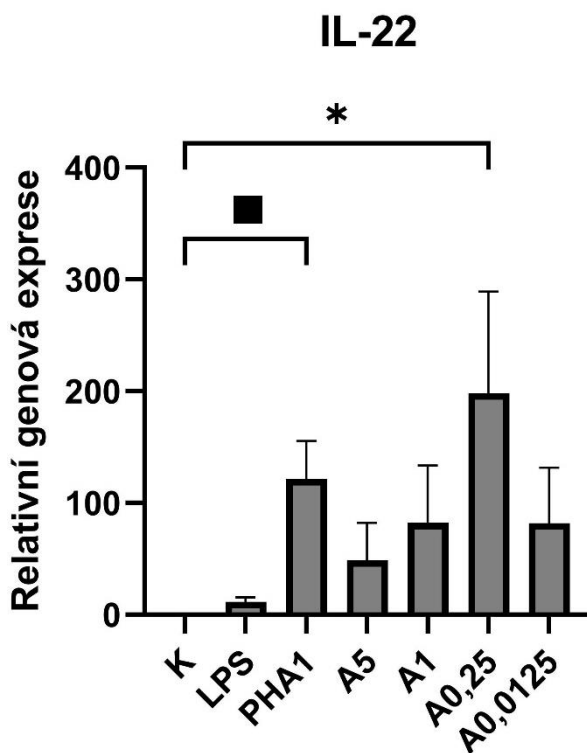
Obrázek 15 – Genová exprese *IL-13* po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj], ■ $p \leq 0,1$; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin A (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

Genovou expresi *IL-17* jsme stimulovali LPS, PHA a manumycinem A v několika koncentracích a sledovali jsme účinek těchto stimulantů na genovou expresi tohoto Th17 cytokinu, když stimulace probíhala v časovém intervalu čtyř hodin. Nejedná se o statistickou signifikanci, ale spatřili jsme náznak trendu zvýšení genové exprese ve dvou případech. První vyplývá z porovnání kontroly bez stimulace a PHA ($p = 0,10$) a druhý vyvstává ze srovnání nestimulované kontroly se stimulací PBMC manumycinem A o koncentraci $0,25 \mu\text{mol/l}$ ($p = 0,06$), Obrázek 16.



Obrázek 16 – Genová exprese *IL-17* po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj], ■ $p \leq 0,1$; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin A (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

Zajímavé výsledky jsme objevili u cytokinu IL-22. Genová exprese IL-22 po čtyřhodinové stimulaci PBMC manumycinem A o koncentraci 0,25 $\mu\text{mol/l}$ je statisticky významně zvýšená vůči kontrole, na kterou manumycin A nebyl aplikován ($p = 0,04$). V tomto případě jsme zaregistrovali podobný trend nárůstu genové exprese IL-22 u buněk stimulovaných PHA v porovnání s kontrolou ($p = 0,08$). V rámci imunitní odpovědi byla preferována indukce Th17 lymfocytů v prozánětlivém smyslu, Obrázek 17.



Obrázek 17 – Genová exprese IL-22 po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem) [vlastní zdroj], * $p \leq 0,05$, ■ $p \leq 0,1$; K – nestimulovaná kontrola, LPS – PBMC (frakce mononukleárních buněk periferní krve) stimulované lipopolysacharidem, PHA1 – PBMC stimulované fytohemaglutininem, A – manumycin A (uvedené číslo udává jeho koncentraci v $\mu\text{mol/l}$)

6 DISKUZE

V rámci této bakalářské práce jsme zkoumali ovlivnění genové exprese cytokinů v mononukleární frakci leukocytů (PBMC) získaných z buffy coatů po stimulaci manumycinem A, lipopolysacharidem a fytohemaglutininem. Manumycin A patří mezi sekundární metabolity streptomycet s protizánětlivým účinkem, a proto jsme předpokládali, že jeho působením dojde ke snížení genové exprese u prozánětlivých cytokinů ze skupiny Th1, Th2 a Th17 cytokinů (IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-17). Sledovali jsme také změnu genové exprese imunoregulačního cytokinu IL-10 a protizánětlivých cytokinů (IL-4, IL-13, IL-22).

Z výsledků vyplývá, že genová exprese cytokinů v mononukleární frakci periferní krve nebyla výrazně ovlivněna různými koncentracemi manumycinu A po jednodinové nebo čtyřhodinové kultivaci. Po čtyřhodinové kultivaci jsme pozorovali určité trendy, kdy genová exprese některých prozánětlivých (IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-17) a protizánětlivých cytokinů (IL-13, IL-22) byla při srovnání nestimulované kontroly a buněk s přidavkem fytohemaglutininu a manumycinu A o koncentraci 0,25 $\mu\text{mol/l}$ zvýšená. Tento poznatek je v rozporu s naším předpokladem a pro jeho jednoznačné potvrzení by bylo vhodné experiment za stejných podmínek zopakovat, abychom získali dostatečný počet experimentů pro validní statistické zpracování.

Jednodinová a čtyřhodinová stimulace monocyto-makrofágové linie buněk THP-1 ve studii Hrdého a spol. [42] potvrdila proapoptotický a protizánětlivý účinek manumycinu A, jelikož došlo ke snížení genové exprese prozánětlivých cytokinů IL-1 β a TNF- α . Jako další stimulátor byl použit lipopolysacharid. Studie Čechrdlové a spol. [45] prokázala imunosupresivní efekt manumycinu A v kombinaci s TNF- α . Buňky THP-1 byly stimulovány TNF- α o koncentraci 20 ng/ml a zároveň různými koncentracemi manumycinu A v rozmezí 0,25–5 $\mu\text{mol/l}$. Došlo ke snížení genové exprese prozánětlivých cytokinů IL-1 β ,

IL-6 a imunoregulačního cytokinu IL-10. Stimulace probíhala po dobu čtyř a osmi hodin. V rámci studie Herbríka a spol. [62] byl ze sputa imunokompromitovaného pacienta vyizolován kmen streptomycet TR1341, který byl po kultivaci *in vitro* přidán k buněčné linii THP-1. Došlo k indukci syntézy cytotoxických, hemolytických a protizánětlivých substancí, které se zřejmě podílí na invazi těchto bakterií do plicního parenchymu člověka. Z větší části jsme genovou expresi stejných cytokinů uvedených ve studiích Hrdého, Čechrdlové, Herbríka a kolektivu autorů [42, 45, 62] nezkoumali, ale s ohledem na výsledky těchto experimentů jsme zvolili leukocyty mononukleární frakce periferní krve pro charakterizaci vlivu manumycinu A na polarizaci jednotlivých subpopulací CD4+ T lymfocytů a předpokládali jsme útlum prozánětlivé imunitní odpovědi.

Podobným způsobem probíhala studie Mahmoudiho a spol. [63]. V rámci ní byla provedena inkubace leukocytů mononukleární frakce periferní krve (PBMC) po dobu dvou dnů se sekundárními metabolity *Streptomyces calvus* (z textu vyplývá, že se nemuselo jednat výhradně o námi použitý manumycin A) o koncentracích 10–50 µg/ml. Jako pozitivní kontrola byl použit fytohemaglutinin (PHA), v negativní kontrole nebyl k testovaným PBMC přidán žádný stimulátor. Stimulace probíhala čtyřicet osm hodin, což je výrazně delší časový úsek než v našem experimentu použitá doba jedné a čtyř hodin. Byl prokázán koncentračně závislý vliv sekundárních metabolitů *Streptomyces calvus* na genovou expresi mRNA. U Th1 prozánětlivých cytokinů IL-2 a IFN- γ došlo ke statisticky signifikantnímu zvýšení genové exprese, u imunoregulačního cytokinu IL-10 došlo ke statisticky signifikantnímu snížení genové exprese. Tento výsledek – snížení imunoregulační funkce a současná podpora Th1 imunitní odpovědi – je nejvíce ve shodě ve srovnání se všemi studiemi uvedenými v diskuzi s naším pozorováním, i když podmínky průběhu porovnávaných experimentů nebyly zcela identické. Autoři se domnívají, že jejich závěry poukazují na schopnost sekundárních metabolitů *Streptomyces calvus* působit

jako imunostimulanty na všechny složky adaptivní buněčné imunity, tedy nejenom subpopulace Th lymfocytů.

Mezi sekundární metabolity streptomycet nepatří pouze manumycin A. Sekundární metabolity streptomycet zahrnují různé látky na bázi polyketidových antibiotik – například manumycin A, manumycin B, kolabomycin E, asukamycin A a D, β -rubromycin nebo deoxynybomycin. Uvedené metabolické produkty byly v koncentracích 0,5; 1 a 5 $\mu\text{mol/l}$ využity ke stimulaci buněčné linie THP-1 ve výzkumu Kopecké [64], společně s kostimulátory IFN- γ o koncentraci 100 ng/ml a TNF- α o koncentraci 20 ng/ml. V modelovém Th1 prostředí indukovaném TNF- α o koncentraci 20 ng/ml byla stanovena genová exprese *IL-6*, *IL-1 β* , *IL-10* a *IL-8*, výsledné vyhodnocení však proběhlo výhradně pro stimulaci 0,5 $\mu\text{mol/l}$ manumycinem A po čtyřech a osmi hodinách inkubace. Pouze v případě chemokinu IL-8 došlo ke zvýšení genové exprese, v ostatních situacích byla genová exprese snížena. Tento závěr koresponduje se zjištěním vyplývajícím ze studie Čečrdlové a spol. [45], že manumycin A snižuje genovou expresi proinflamatorních cytokinů.

Při realizaci praktické části výzkumu jsme vycházeli také z nedávno provedeného výzkumu České [65], který byl zaměřen na buňky pupečnickové krve (CBMC, cord blood mononuclear cells). CBMC byly stimulovány manumycinem A o různých koncentracích (0,0125–5 $\mu\text{mol/l}$) a lipopolysacharidem o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ po dobu jedné hodiny a čtyř hodin. Výsledky tohoto pokusu naznačovaly, že manumycin A má koncentračně závislý tlumivý vliv na genovou expresi některých cytokinů typických pro T buněčné populace (konkrétně *IL-4*, *IL-10* a IFN- γ), který by bylo vhodné ověřit zopakováním experimentu na leukocytech mononukleární frakce periferní krve (PBMC). Z výsledků experimentů provedených s CBMC dále vyplývalo, že vhodným stimulem pro PBMC bude spíše fytohemaglutinin, který byl použit

rovněž ve studii Mahmoudiho a spol. [63], než lipopolysacharid. Při použití buněk periferní krve a fytohemaglutininu jsme nedospěli ke stejným výsledkům jako v experimentu realizovaném s pupečnickovou krví. Je třeba zdůraznit, že novorozenec má méně vyvinutý imunitní systém oproti dospělému člověku, nesetkal se ve svém krátkém životě s tolika antigeny a umí si hůře poradit s infekcemi z důvodu menšího počtu zralých lymfocytů přítomných organismu. Tedy obecná nezralost buněk imunitního systému novorozence může vysvětlit pozorované rozdíly v případě použití PBMC izolovaných z buffy coatů dospělého jedince.

Manumycin A tedy nedisponuje pouze protizánětlivými účinky, což bylo ověřeno studiemi na myších modelech. Širší spektrum jeho účinků vychází z inhibice enzymu Ras farnesyltransferázy. Ve studii Sahy a spol. [66] byla nejprve testovaným subjektům podána dávka 400 mg/kg acetaminofenu a následně 1 mg/kg manumycinu A s časovým odstupem jedné hodiny. Z histologického obrazu myších jater a sérových koncentrací alaninaminotransferázy v době šest a dvanáct hodin po podání acetaminofenu bylo prokázáno, že manumycin A zmírňuje hepatotoxický účinek acetaminofenu. V pozdější fázi tohoto patologického procesu sehraává důležitou roli produkce mediátorů oxidativního stresu mitochondriemi, jejichž produkce byla manumycinem A také snížena. Dále bylo zjištěno, že manumycin A inhibuje prozánětlivou cytokinovou odpověď na úrovni IFN- γ a TNF- α .

Studie Solára a spol. [67] se zaměřila na objasnění protinádorového účinku manumycinu A s využitím experimentálního myšího modelu karcinomu prsu vpravením nádorové buněčné linie 4T1 do pokusných zvířat. Po detekovaném nárůstu tumoru byl vybrané skupině myši přibližně každý druhý den po dobu jedenácti dní podáván manumycin A v dávce 100 μ g/myš. Po ukončení terapie byl odebrán pokusným zvířatům vzorek krve ke stanovení některých

hematologických parametrů. Ve skupině myší s malignitou léčenou manumycinem A byl zaznamenán výrazný pokles počtu monocytů (oproti skupině myší s neléčenou malignitou). Autoři se domnívají, že monocyty byly z periferní krve mobilizovány a aktivovány na makrofágy typu M1 pro výkon efektorové fagocytární funkce v nádorové tkáni. Tato transformace nejspíše probíhá pod vlivem prozánětlivého cytokinového mikroprostředí s vyšším zastoupením IFN- γ [68].

Výzkum Petanidise a spol. [69] se týkal vlivu manumycinu A na průběh tumorigeneze, konkrétně u kolorektálního karcinomu. Podobně jako ve studii Sahy a spol. [66] byl charakterizován vztah tohoto sekundárního metabolitu streptomycet k průběhu buněčné signalizace cestou Ras proteinů. Inkubace nádorových buněk Caco-2 s manumycinem A o koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$ po jeden den vedla k indukci proapoptotických procesů a významně snížila jejich viabilitu. V enterocytech pacientů v pokročilém stádiu rakoviny tlustého střeva po čtyřiaadvacetihodinové stimulaci manumycinem A o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ byla na úrovni mRNA zjištěna snížená exprese IL-17, IL-22 a neočekávaně zvýšená exprese IFN- γ . Podle článku Jorgovanovičové a spol. [70] by mohl být tento stav zapříčiněný progredujícími stavem choroby. Znamená to tedy, že IFN- γ nezastává za všech okolností výlučně antitumorózní roli, ale vždy záleží na podmínkách *in situ*.

Důležitým hráčem na poli Th1 imunitní odpovědi je IFN- γ , který se účastní rozličných imunopatologických procesů probíhajících v lidském organismu a uplatňuje se často jako mediátor zánětlivé reakce. Nejnovější poznatky ze studie Gadottiové a spol. [71] ukazují, že zvyšuje riziko úmrtí pacientů s těžkým průběhem koronavirového onemocnění Covid-19. Přestože disponuje antivirovým účinkem a podněcuje cytotoxickou aktivitu CD8⁺ T buněk proti infekčnímu agens, příliš vysoká koncentrace IFN- γ v séru (podle zmíněné studie

s mediánem 323 pg/ml) způsobuje disbalanci ve vůdčích mechanizmech Th1 a Th2 imunitní odpovědi. Terapie manumycinem A s antivirotyky by mohla přinést slibné výsledky. V poslední době se dostává zasloužené pozornosti i IL-2, dalšímu prozánětlivému cytokinu asociovanému s činností Th1 lymfocytů. Role IL-2 v imunopatogenezi autoimunitních onemocnění není prozatím zcela objasněna. Ze současných poznatků je zřejmé, že je nesmírně komplikovaná, protože IL-2 ovlivňuje každou subpopulaci Th1, Th2 a Treg rozdílnými mechanismy. Funkci IL-2 v imunitní odpovědi podrobně studovali Rossová a spol. [72].

V souvislosti s Th2 imunitní odpovědí se hovoří o cytokinu IL-6, i když s leukocyty není výhradně spjat, je tvořený i dalšími buňkami mimo imunitní systém. Aktuální výzkumy postulují, že pokud je ve zvýšeném množství syntetizován neurony v mozkové tkáni, dochází v kombinaci s patologicky změněnou signalizací (na úrovni receptoru) ke vzniku závažných neurodegenerativních onemocnění – například Alzheimerovy nebo Parkinsonovy choroby, což bylo zjištěno ve výzkumu Rothaugové a spol. [73]. V nynější době se realizuje i studium ostatních Th2 cytokinů, jmenovitě IL-4 a IL-13, jejichž nižší hladiny v plicní tkáni jsou klíčové pro zmírnění příznaků astma bronchiale. Ve studii realizované Liravim a spol. [74] byly jako pokusná zvířata vybrány ovce, jejichž plicní parenchym byl senzibilizován běžnými roztoči domácího prachu. Ve vzorku lymfocytů získaných z bronchoalveolární laváže čtyři hodiny po expozici alergenem došlo ke zvýšení genové exprese především u cytokinů IL-4 a IL-13, což svědčí pro polarizaci imunitní odpovědi cestou Th2 lymfocytů.

Regulaci imunitních dějů na úrovni Th1 a Th2 lymfocytů zprostředkovávají Th17 a Treg lymfocyty, které jsou schopné syntetizovat cytokiny IL-10, IL-17 a IL-22. IL-17 je obvykle klasifikován jako prozánětlivý cytokin. Th17 a Treg

lymfocyty pečlivě dohlíží na to, aby se imunitní odpověď prostřednictvím Th1 a Th2 lymfocytů ubírala po expozici antigenem správným směrem a byla adekvátního rozsahu. Dle článku Skye a spol. [75] však při vhodné stimulaci TCR receptorů mohou IL-10 tvořit i Th1 a Th2 lymfocyty, které podporují vznik efektorových Th1 lymfocytů a aktivovaných dendritických buněk v důsledku inhibice sekrece protizánětlivého cytokinu IL-4. IL-10 lze tedy v určitých souvislostech klasifikovat jako Th2 cytokin. Také byl Eyerichem a spol. [76] popsán synergismus IL-17 a IL-22 s Th1 cytokinem TNF- α . Zmíněné cytokiny se různými způsoby účastní zánětlivých procesů probíhajících na střevní sliznici ve spojitosti s nespecifickými střevními záněty nebo revmatoidní artritidou. Zejména u IL-22 byl ve studiích provedených Eyerichem, Valeriovou a kolektivem autorů reportován protektivní účinek [76, 77].

Nepodařilo se nám prokázat statisticky signifikantní imunosupresivní vliv manumycinu A na produkci především prozánětlivých cytokinů v PBMC, pro učinění jednoznačných závěrů by bylo vhodné experiment provést s větším množstvím vzorků periferní krve. V naší pilotní studii byly použity pouze čtyři vzorky buffy coatů. Zajímavé by bylo provést podrobnější analýzu komplexního cytokinového mikroprostředí v jednotlivých vzorcích, jelikož všechny geny kódující další cytokiny nebudou exprimovány ve všech případech stejnou měrou. Prozatím tedy můžeme konstatovat, že ve výsledcích pozorujeme poměrně zřejmé trendy, které poukazují zejména na schopnost manumycinu A ne zcela jednoznačně inhibovat genovou expresi cytokinů asociovaných s Th1 lymfocyty (IFN- γ , IL-2, IL-6) a Th17 lymfocyty (IL-17, IL-22). V mnoha pokusech, se kterými jsme se snažili naše závěry porovnat, byla použita nádorová buněčná linie THP-1. Můžeme se domnívat, že imunitní procesy v těchto buňkách probíhají odlišně než v PBMC. Také genová exprese studovaných cytokinů v laboratorních podmínkách nemusí zcela odpovídat reálné situaci *in vivo*.

7 ZÁVĚR

Cílem praktické části bakalářské práce bylo zjistit, jestli má sekundární metabolit streptomycet manumycin A použitý jako stimulator v různých koncentracích společně s fytohemaglutininem vliv na genovou expresi cytokinů v leukocytech izolovaných z mononukleární frakce periferní krve. Zaměřili jsme se na charakterizaci cytokinů, které se uplatňují v průběhu imunitní odpovědi prozánětlivě (*IFN- γ* , *IL-2*, *IL-6*, *IL-17*) nebo protizánětlivě či imunoregulačně (*IL-4*, *IL-10*, *IL-13*, *IL-22*). Výsledek byl stanoven amplifikací cDNA kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase.

Předpokládali jsme, že dojde ke snížení genové exprese prozánětlivých cytokinů v leukocytech mononukleární frakce periferní krve, které jsou asociované s lymfocyty Th1 a Th17, jelikož takový účinek manumycinu A byl popsán v předchozích studiích zaměřených zejména na buněčnou linii THP-1. Tuto hypotézu se v rámci našeho experimentu nedařilo potvrdit, nezískali jsme žádné statisticky signifikantní výsledky (ani při nejdelší době stimulace buněk a nejvyšší použité koncentraci manumycinu A). Z naměřených dat vyplývá, že manumycin A má pravděpodobně vliv na leukocyty mononukleární frakce periferní krve, ale v našem experimentu jsme nezaznamenali jeho imunosupresivní účinek. Po čtyřech hodinách stimulace s manumycinem A o koncentraci 0,25 $\mu\text{mol/l}$ došlo v porovnání s nestimulovanou kontrolou v několika případech ke zvýšení genové exprese (nejvýrazněji *IL-2* a *IL-22*), ale očekávali jsme, že budou prokázány imunomodulační účinky manumycinu A ve větším rozsahu. Vliv manumycinu A na Th1 a Th2 odpověď bude muset být ověřen dalšími studiemi.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANA	autoprotilátky proti jádru
ANCA	autoprotilátky proti cytoplazmě neutrofilů
APA	antifosfolipidové protilátky
APC	antigen prezentující buňka
ATLL	akutní T lymfoblastická leukémie
B7	kostimulační molekula antigen prezentujících buněk
B _{MZ} lymfocyty	B lymfocyty marginální zóny
C3d	složka komplementu
CBMC	mononukleární frakce pupečnickové krve
CD	shluk odlišnosti
cDNA	komplementární DNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
D-PBS	Dulbecův fyziologický roztok pufrovaný fosfátem
ELISA	enzymová imunoanalýza
FasL	Fas ligand, apoptotický transmembránový protein T buněk

FBS	fetální bovinní sérum
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
GTP	guanosintrifosfát
HEPES	pufrovací činidlo kyseliny sulfonové
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin, protilátka
IKK	inhibitor jaderného faktoru
IL	interleukin
LAK	lymfokiny aktivovaní zabíječi
LPS	lipopolysacharid
MAMP	struktury asociované s mikroby
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MRSA	meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NFAT	nukleární faktor aktivovaných T lymfocytů
NK buňky	přirození zabíječi

PBMC	frakce mononukleárních buněk periferní krve
PCR	polymerázová řetězová reakce
PHA	fytohemaglutinin
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverzní transkripce s polymerázovou řetězovou reakcí
Tc lymfocyt	cytotoxický T lymfocyt
TCR	T-buněčný receptor
Tfh	folikulární pomocné buňky
TGF	transformující růstový faktor
Th lymfocyt	pomocný T lymfocyt
THP-1	monocytární buněčná linie
TIL	tumor infiltruující lymfocyty
TLR	toll-like receptory
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
TNF- β	tumor nekrotizující faktor beta, lymfotoxin
Tr1 lymfocyty	subpopulace Treg lymfocytů

Treg lymfocyt	regulační lymfocyt
TrxR-1	cytozolická thioredoxin reductáza
VRE	vankomycin rezistentní enterokoky

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MACZULAK, Anne. *Encyclopedia of Microbiology*. First Edition. New York: Facts On File, 2011. ISBN 978-1-4381-3406-2.
- [2] ISMAIL, Sohaib, Bo JIANG, Zohreh NASIMI, et al. Investigation of *Streptomyces scabies* Causing Potato Scab by Various Detection Techniques, Its Pathogenicity and Determination of Host-Disease Resistance in Potato Germplasm. *Pathogens* [online]. 2020, 9(9), 1-26 [cit. 2021-9-8]. ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens9090760
- [3] NICHOLLS, P.K., G. ALLEN a P.J. IRWIN. *Streptomyces cyaneus* dermatitis in a dog. *Australian Veterinary Journal* [online]. 2014, 92(1-2), 38-40 [cit. 2021-9-8]. ISSN 00050423. Dostupné z: doi:10.1111/avj.12135
- [4] LU, Xiao-Yun, Dao-Cheng WU, Zheng-Jun LI a Guo-Qiang CHEN. Polymer Nanoparticles. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [online]. 2011, 2011(104), 299-323 [cit. 2021-9-8]. ISSN 1877-1173. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-416020-0.00007-3
- [5] JIANG, Jiaoyang, Xiaofei HE a David E CANE. Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. *Nature Chemical Biology* [online]. 2007, 3(11), 711-715 [cit. 2021-9-8]. ISSN 1552-4450. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio.2007.29
- [6] ČIHÁK, Matouš, Zdeněk KAMENÍK, Klára ŠMÍDOVÁ, Natalie BERGMAN, Oldřich BENADA, Olga KOFROŇOVÁ, Kateřina PETŘÍČKOVÁ a Jan BOBEK. Secondary Metabolites Produced during the Germination of *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Microbiology* [online].

- 2017, 2017(8), 1-13 [cit. 2021-9-8]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.02495
- [7] ZHANG, Bo, Yi-Teng ZHOU, Sheng-Xian JIANG, Yu-Han ZHANG, Kai HUANG, Zhi-Qiang LIU a Yu-Guo ZHENG. Amphotericin B biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: quantitative analysis of metabolism via LC-MS/MS based metabolomics for rational design. *Microbial Cell Factories* [online]. 2020, 19(1), 1-2 [cit. 2021-9-10]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-020-1290-y
- [8] Systémová antimykotika. *Klinická farmakologie* [online]. 2008, 22(1), 40-44 [cit. 2021-9-10]. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2008/01/09.pdf>
- [9] KUMAR, Purnima. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*. Seventh Edition. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-323-39307-2
- [10] Nežádoucí účinky léků specifické pro dětský věk. *Klinická farmakologie* [online]. 2011, 25(3), 137-141 [cit. 2021-9-10]. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2011/03/08.pdf>
- [11] PARADKAR, Ashish. Clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*: biogenesis, regulation and strain improvement. *The Journal of Antibiotics* [online]. 2013, 66(7), 411-420 [cit. 2021-9-10]. ISSN 0021-8820. Dostupné z: doi:10.1038/ja.2013.26
- [12] Amoxicillin-Clavulanate. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* [online]. Bethesda, Maryland: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2020 [cit. 2021-9-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548517/>

- [13] IMAI, Yu, Tatsuya FUJIWARA, Kozo OCHI a Takeshi HOSAKA. Development of the ability to produce secondary metabolites in *Streptomyces* through the acquisition of erythromycin resistance. *The Journal of Antibiotics* [online]. 2012, 65(6), 323-326 [cit. 2021-9-13]. ISSN 0021-8820. Dostupné z: doi:10.1038/ja.2012.16
- [14] BRADLEY, John S. a Jason B. SAUBERAN. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. Fourth Edition. London: Elsevier, 2012, s. 1453-1484. ISBN 9781437720594
- [15] BARNETT, T. C., A. C. BOWEN a J. R. CARAPETIS. The fall and rise of Group A *Streptococcus* diseases. *Epidemiology and Infection* [online]. 2019, 147(4), 1-6 [cit. 2021-9-13]. ISSN 0950-2688. Dostupné z: doi:10.1017/S0950268818002285
- [16] O'DONNELL, Judith A., Steven P. GELONE a Amar SAFDAR. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Eight Edition. Philadelphia: W.B. Saunders, 2015, s. 452-462. ISBN 9781455748013
- [17] VASTRAD, B. M. a S. E. NEELAGUND. Optimization of Medium Composition for the Production of Neomycin by *Streptomyces fradiae* NCIM 2418 in Solid State Fermentation. *Biotechnology Research International* [online]. 2014, 2014, 1-11 [cit. 2021-9-13]. ISSN 2090-3138. Dostupné z: doi:10.1155/2014/674286
- [18] JONSBU, Einar, Mhairi MCINTYRE a Jens NIELSEN. The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *Journal of Biotechnology* [online]. 2002, 95(2), 133-144 [cit. 2021-9-13]. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1656(02)00003-2

- [19] Nystatin: Uses, Interactions, Mechanism of Action. *DrugBank* [online]. Alberta: OMx Personal Health Analytics, 2021 [cit. 2021-9-13]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00646>
- [20] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. 2. české vydání. Praha: Grada, 2004, s. 524–526. ISBN 80-247-0836-1
- [21] Streptomycin: Uses, Interactions, Mechanism of Action. *DrugBank* [online]. Alberta: OMx Personal Health Analytics, 2021 [cit. 2021-9-13]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01082>
- [22] HOLLAND, Edward J., Mark J. Mannis a W. Barry LEE. *Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film*. First Edition. Philadelphia: W.B. Saunders, 2013, s. 271–281. ISBN 9781455728763
- [23] COHEN, Jonathan, William G. POWDERLY a Steven M. OPAL. *Infectious Diseases*. Fourth Edition, Volume Two. Amsterdam: Elsevier, 2017, s. 1256–1260. ISBN 9780702062858
- [24] O'DONNELL, Judith A., Steven P. GELONE a Amar SAFDAR. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Eight Edition. Philadelphia: W.B. Saunders, 2015, s. 322-338. ISBN 9781455748013
- [25] Engemycin 100 mg/ml injekční roztok. *Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv* [online]. Brno: Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, 2020 [cit. 2021-9-20]. Dostupné z: <http://www.uskvbl.cz/attachments/spc/0910f7c7800907e0.doc>

- [26] OXY-KEL 800 mg/g prášek pro přípravu perorálního roztoku. *Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv* [online]. Brno: Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, 2018 [cit. 2021-9-20]. Dostupné z: <http://www.uskvbl.cz/attachments/spc/0910f7c78009cdc1.doc>
- [27] BATT, Carl A. a Mary L. TORTORELLO. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Second Edition. Cambridge, Massachusetts (USA): Academic Press, 2014, s. 560–566. ISBN 978-0-12-384733-1
- [28] GAO, Wenli, Zheng WU, Junyang SUN, Xianpu NI, Huanzhang XIA a Marie-Joelle VIROLLE. Modulation of kanamycin B and kanamycin A biosynthesis in *Streptomyces kanamyceticus* via metabolic engineering. *PLOS One* [online]. 2017, 12(7), 1-4 [cit. 2021-9-20]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0181971](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181971)
- [29] Kanamycin: Uses, Interactions, Mechanism of Action. *DrugBank* [online]. Alberta: OMx Personal Health Analytics, 2021 [cit. 2021-9-20]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01172>
- [30] Amikacin. *Drugs.com* [online]. Auckland: Drugsite Trust, 2021 [cit. 2021-9-20]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/monograph/amikacin.html>
- [31] FINCH, Roger G., David GREENWOOD, S. Ragnar NORRBY a Richard J. WHITLEY. *Antibiotic and Chemotherapy*. Ninth Edition. Philadelphia: Saunders, 2011, s. 326-333. ISBN 978-0-7020-4064-1
- [32] MOELLERING, Robert C. Vancomycin: A 50-Year Reassessment. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2006, 42(1), 3-4 [cit. 2021-9-21]. ISSN 1537-6591. Dostupné z: [doi:10.1086/491708](https://doi.org/10.1086/491708)

- [33] Vankomycin. *Laboratorní příručka* [online]. Pracoviště laboratorních metod: IKEM, 2016 [cit. 2021-9-21]. Dostupné z: https://www2.ikem.cz/plm_lp/HVEZDALAEK.htm
- [34] Vankomycin: Uses, Interactions, Mechanism of Action. *DrugBank* [online]. Alberta: OMx Personal Health Analytics, 2021 [cit. 2021-9-21]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00512>
- [35] SPÍŽEK, Jaroslav, Jitka NOVOTNÁ a Tomáš ŘEZANKA. Lincosamides: Chemical Structure, Biosynthesis, Mechanism of Action, Resistance, and Applications. *Advances in Applied Microbiology* [online]. Elsevier, 2004, 2004(56), 121-154 [cit. 2021-9-21]. *Advances in Applied Microbiology*. ISBN 9780120026586. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2164(04)56004-5
- [36] Lincomycin: Uses, Interactions, Mechanism of Action. *DrugBank* [online]. Alberta: OMx Personal Health Analytics, 2021 [cit. 2021-9-21]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01627>
- [37] SPÍŽEK, J. a T. ŘEZANKA. Lincomycin, clindamycin and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2004, 64(4), 455-464 [cit. 2021-9-21]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-003-1545-7
- [38] SAUDEK, František. Tacrolimusum: Lékové profily. *Remedia* [online]. Praha: Medical Tribune, 2006 [cit. 2021-11-08]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-profily/Tacrolimusum/6-I-ei.magarticle.aspx>
- [39] Takrolimus. *Laboratorní příručka* [online]. Pracoviště laboratorních metod: IKEM, 2018 [cit. 2021-11-08]. Dostupné z: https://www2.ikem.cz/plm_lp/HVEZDAADCG.htm

- [40] HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: Triton, 2009. ISBN 978-80-7387-280-9
- [41] OWEN, Judith, Jenni PUNT a Sharon STRANFORD. *Kuby Immunology*. 7. edice. New York: W. H. Freeman and Company, 2013. ISBN 978-14641-3784-6
- [42] HRDÝ, Jiří, Lenka SÚKENÍKOVÁ, Petra PETRÁSKOVÁ, Olga NOVOTNÁ, David KAHOUN, Miroslav PETŘÍČEK, Alica CHROŇÁKOVÁ a Kateřina PETŘÍČKOVÁ. Inhibition of Pro-Inflammatory Cytokines by Metabolites of Streptomycetes—A Potential Alternative to Current Anti-Inflammatory Drugs? *Microorganisms* [online]. 2020, 8(5), 1-12 [cit. 2021-9-22]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi: 10.3390/microorganisms8050621
- [43] COSTA, Carlos Bruno et al. Farnesyltransferase inhibitors: molecular evidence of therapeutic efficacy in acute lymphoblastic leukemia through cyclin D1 inhibition. *Anticancer Research* [online]. 2012, 32(3), 831-838 [cit. 2021-9-22]. PMID 22399601. Dostupné z: <https://ar.iijournals.org/content/32/3/831>
- [44] TULADHAR, Anupama a Kathleen S. REIN. Manumycin A Is a Potent Inhibitor of Mammalian Thioredoxin Reductase-1 (TrxR-1). *ACS Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2018, 9(4), 318-322 [cit. 2021-9-22]. ISSN 1948-5875. Dostupné z: doi:10.1021/acsmchemlett.7b00489
- [45] CECRDLOVA, Eva, Katerina PETRICKOVA, Libor KOLESAR, Miroslav PETRICEK, Alena SEKERKOVA, Veronika SVACHOVA a Ilja STRIZ. Manumycin A downregulates release of proinflammatory cytokines from TNF alpha stimulated human monocytes. *Immunology Letters* [online].

- 2016, 169(1), 8-14 [cit. 2021-9-22]. ISSN 01652478. Dostupné z: doi:10.1016/j.imlet.2015.11.010
- [46] BERNIER, Michel, Yong-Kook KWON, Sanjay K. PANDEY, et al. Binding of Manumycin A Inhibits I κ B Kinase β Activity. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2006, 281(5), 2551-2561 [cit. 2021-9-22]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M511878200
- [47] XU, Guangpu, Jingxuan PAN, Charles MARTIN a Sai-Ching Jim YEUNG. Angiogenesis Inhibition in the in Vivo Antineoplastic Effect of Manumycin and Paclitaxel against Anaplastic Thyroid Carcinoma 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2001, 86(4), 1769-1777 [cit. 2021-9-22]. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jcem.86.4.7374
- [48] YEUNG, S. C., G. XU, J. PAN, M. CHRISTGEN a A. BAMIAGIS. Manumycin Enhances the Cytotoxic Effect of Paclitaxel on Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells. *Cancer Research* [online]. 2000, 60(3), 650-656 [cit. 2021-9-22]. PMID: 10676649. Dostupné z: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/60/3/650>
- [49] ZHANG, Jingyu, Li XIE, Jing HU, et al. Antitumor effect of manumycin on colorectal cancer cells by increasing the reactive oxygen species production and blocking PI3K-AKT pathway. *OncoTargets and Therapy* [online]. 2016, 2016(9), 2885-2895 [cit. 2021-9-22]. ISSN 1178-6930. Dostupné z: doi:10.2147/OTT.S102408
- [50] MESCHER, Anthony L. *Junqueirovy základy histologie*. 14. edice. Praha: Galén, 2018. ISBN 978-80-7492-324-1

- [51] ŠTERZL, Ivan. *Základy imunologie*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-0972-0
- [52] BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7
- [53] Cytokine Atlas. *Thermo Fisher Scientific* [online]. San Diego: eBioscience, 2015 [cit. 2021-9-25]. Dostupné z: http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/Q311058-Cytokines-Booklet-0712-web_20150831124232_287222.pdf
- [54] KORECKÁ, Lucie. Počítání leukocytů. *Laboratoř z fyziologie a patologické fyziologie* [online]. Pardubice: Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, 2012 [cit. 2021-11-09]. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/fyziologie-a-patofyziol./pocitani-leukocytu.pdf>
- [55] BIRD, Ian M. Extraction of RNA From Cells and Tissue. *Hypertension* [online]. New Jersey: Humana Press, 2005 (108), 139-148 [cit. 2021-9-17]. ISBN 1-59259-850-1. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-850-1:139
- [56] *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 4. vydání. New York: Cold Spring Laboratory, 2012. ISBN 1936113422
- [57] *NanoDrop One: Uživatelská příručka* [online]. Zlín: M.G.P., 2017 [cit. 2021-9-16]. Dostupné z: https://www.mgp.cz/wp-content/uploads/2020/03/NanoDrop_One_manual_CZ.pdf

- [58] Syntéza cDNA. *LabGuide* [online]. Brno: LabGuide, 2014 - 2019 [cit. 2021-10-6]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/synteza-cdna/>
- [59] Polymerázová řetězová reakce. *Biogen* [online]. Praha: Biogen, 2021 [cit. 2021-10-6]. Dostupné z: <https://biogen.cz/polymerazova-retezova-reakce>
- [60] TaqMan sondy. *LabGuide* [online]. Brno: LabGuide, 2014 - 2019 [cit. 2021-10-7]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/synteza-cdna/>
- [61] HRDÝ, J., P. ZANVIT, O. NOVOTNÁ, I. KOCOURKOVÁ, J. ŽIŽKA a L. PROKEŠOVÁ. Cytokine expression in cord blood cells of children of healthy and allergic mothers. *Folia Microbiologica* [online]. 2010, 55(5), 515-519 [cit. 2021-11-09]. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-010-0085-7
- [62] HERBRÍK, Andrej, Erika CORRETTO, Alica CHROŇÁKOVÁ, et al. A Human Lung-Associated *Streptomyces* sp. TR1341 Produces Various Secondary Metabolites Responsible for Virulence, Cytotoxicity and Modulation of Immune Response. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2020, 10, 1-17 [cit. 2022-03-08]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.03028
- [63] MAHMOUDI, Fariba, Behzad BARADARAN, Alireza DEHNAD, Dariush SHANEHBANDI, Leila MOHAMED KHOSROSHAHI a Mahyar AGHAPOUR. The immunomodulatory activity of secondary metabolites isolated from *Streptomyces calvus* on human peripheral blood mononuclear cells. *British Journal of Biomedical Science* [online]. 2016, 73(3), 97-103 [cit. 2022-03-08]. ISSN 0967-4845. Dostupné z: doi:10.1080/09674845.2016.1188476

- [64] KOPECKÁ, Kristýna. *Vliv polyketidových antibiotik na signalizaci a funkční aktivitu lidské monocytární linie*. Praha, 2015. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.
- [65] ČESKÁ, Lenka. *Vliv manumycinu A na změnu genové exprese cytokinů v mononukleární frakci leukocytů pupečnickové krve*. Kladno, 2021. Bakalářská práce. České vysoké učení technické, Fakulta biomedicínského inženýrství.
- [66] SAHA, Banishree a Dipankar NANDI. Farnesyltransferase inhibitors reduce ras activation and ameliorate acetaminophen-induced liver injury in mice. *Hepatology* [online]. 2009, 50(5), 1547-1557 [cit. 2022-03-08]. ISSN 02709139. Dostupné z: doi:10.1002/hep.23180
- [67] SOLÁR, Peter, Veronika SAČKOVÁ, Gabriela HRČKOVÁ, et al. Antitumor effect of the combination of manumycin A and Immodin is associated with antiplatelet activity and increased granulocyte tumor infiltration in a 4T1 breast tumor model. *Oncology Reports* [online]. 2017, 37(1), 368-378 [cit. 2022-03-08]. ISSN 1021-335X. Dostupné z: doi:10.3892/or.2016.5265
- [68] HOŘEJŠÍ, Václav. Makrofágy jako pomocníci nádorů. *Vesmír* [online]. 2015, 2015(6), 1 [cit. 2022-03-08]. Dostupné z: https://www.img.cas.cz/files/2015/03/65_Makrofagy_6_2015.pdf
- [69] PETANIDIS, Savvas, Doxakis ANESTAKIS, Maria ARGYRAKI, Margarita HADZOPOULOU-CLADARAS, Athanasios SALIFOLOU a Xin-Yuan GUAN. Differential Expression of IL-17, 22 and 23 in the Progression of Colorectal Cancer in Patients with K-ras Mutation: Ras Signal Inhibition and Crosstalk with GM-CSF and IFN- γ . *PLoS ONE* [online]. 2013, 8(9), 1-11 [cit. 2022-03-08]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0073616

- [70] JORGOVANOVIC, Dragica, Mengjia SONG, Liping WANG a Yi ZHANG. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomarker Research* [online]. 2020, 8(1), 1-16 [cit. 2022-03-08]. ISSN 2050-7771. Dostupné z: doi:10.1186/s40364-020-00228-x
- [71] GADOTTI, Ana Carolina, Marina DE CASTRO DEUS, Joao Paulo TELLES, et al. IFN- γ is an independent risk factor associated with mortality in patients with moderate and severe COVID-19 infection. *Virus Research* [online]. 2020, 289, 1-8 [cit. 2022-03-08]. ISSN 01681702. Dostupné z: doi:10.1016/j.virusres.2020.198171
- [72] ROSS, Sarah H. a Doreen A. CANTRELL. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annual Review of Immunology* [online]. 2018, 36(1), 411-433 [cit. 2022-03-08]. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053352
- [73] ROTH AUG, Michelle, Christoph BECKER-PAULY a Stefan ROSE-JOHN. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. 2016, 1863(6), 1218-1227 [cit. 2022-03-08]. ISSN 01674889. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2016.03.018
- [74] LIRAVI, Bahar, David PIEDRAFITA, Gary NGUYEN a Robert J. BISCHOF. Dynamics of IL-4 and IL-13 expression in the airways of sheep following allergen challenge. *BMC Pulmonary Medicine* [online]. 2015, 15(1), 1-11 [cit. 2022-03-08]. ISSN 1471-2466. Dostupné z: doi:10.1186/s12890-015-0097-9
- [75] NG, T. H. Sky, Graham J. BRITTON, Elaine V. HILL, Johan VERHAGEN, Bronwen R. BURTON a David C. WRAITH. Regulation of Adaptive Immunity; The Role of Interleukin-10. *Frontiers in Immunology* [online].

2013, 4, 1-13 [cit. 2022-03-08]. ISSN 1664-3224. Dostupné z:
doi:10.3389/fimmu.2013.00129

[76] EYERICH, Kilian, Valentina DIMARTINO a Andrea CAVANI. IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology. *European Journal of Immunology* [online]. 2017, 47(4), 607-614 [cit. 2022-03-08]. ISSN 00142980. Dostupné z: doi:10.1002/eji.201646723

[77] VALERI, Maria, Manuela RAFFATELLU a Brooke NAPIER. Cytokines IL-17 and IL-22 in the host response to infection. *Pathogens and Disease* [online]. 2016, 74(9), 1-15 [cit. 2022-03-08]. ISSN 2049-632X. Dostupné z: doi:10.1093/femspd/ftw111

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Sekundární metabolity streptomycet manumycinového typu ..	27
Obrázek 2 – Genová exprese <i>IFN-γ</i> po jednohodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	53
Obrázek 3 – Genová exprese <i>IL-2</i> po jednohodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	54
Obrázek 4 – Genová exprese <i>IL-4</i> po jednohodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	55
Obrázek 5 – Genová exprese <i>IL-6</i> po jednohodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	56
Obrázek 6 – Genová exprese <i>IL-10</i> po jednohodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	57
Obrázek 7 – Genová exprese <i>IL-13</i> po jednohodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	58
Obrázek 8 – Genová exprese <i>IL-17</i> po jednohodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	59
Obrázek 9 – Genová exprese <i>IL-22</i> po jednohodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	60

Obrázek 10 – Genová exprese <i>IFN-γ</i> po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	61
Obrázek 11 – Genová exprese <i>IL-2</i> po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	62
Obrázek 12 – Genová exprese <i>IL-4</i> po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	63
Obrázek 13 – Genová exprese <i>IL-6</i> po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	64
Obrázek 14 – Genová exprese <i>IL-10</i> po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	65
Obrázek 15 – Genová exprese <i>IL-13</i> po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	66
Obrázek 16 – Genová exprese <i>IL-17</i> po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	67
Obrázek 17 – Genová exprese <i>IL-22</i> po čtyřhodinové stimulaci různými koncentracemi manumycinu A za současné stimulace PHA (fytohemaglutininem)	68

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 – Vybraná klinicky významná antibiotika a antimykotika.....	26
Tabulka 2 – Th lymfocyty	35
Tabulka 3 – Stimulace buněk manumycinem A (A), LPS a PHA	44
Tabulka 4 – Složení premixu RT-PCR	48
Tabulka 5 – Složení premixu qPCR	50