



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

---

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Vliv manumycinu A na změnu genové  
exprese cytokinů v mononukleární frakci  
leukocytů pupečnickové krve**

**Effect of manumycine A on gene  
expression in mononuclear fraction of  
leukocytes in cord blood**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor bakalářské práce: Lenka Česká

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

---

Kladno 2021



## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

### I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Česká** Jméno: **Lenka** Osobní číslo: **483315**  
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**  
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**  
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

### II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

**Vliv manumycinu A na změnu genové exprese cytokinů v mononukleární frakci leukocytů pupečnickové krve**

Název bakalářské práce anglicky:

**Effect of manumycine A on gene expression of cytokines in mononuclear fraction of leukocytes in cord blood**

Pokyny pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude efekt různých koncentrací manumycinu A na změnu genové exprese cytokinů v mononukleární frakci leukocytů pupečnickové krve. Manumycin A patří mezi sekundární metabolity syntetizované Streptomycetami. V teoretické části práce budou shrnuty poznatky o různých sekundárních produktech Streptomycet např.: jejich rozdílné chemické složení závislé na produkci různými druhy Streptomycet a jejich rozdílný imunomodulační potenciál. Praktická část bude zaměřena na imunomodulační schopnost manumycinu A na mononukleární frakci pupečnickové krve. Buňky pupečnickové krve budou stimulovány různými koncentracemi manumycinu A po dobu 1 hodiny a 4 hodin. Následně bude stanovena genová exprese cytokinů pomocí kvantitativní PCR v reálném čase.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Hrdý J, Súkeníková L, Petrásková P, Novotná O, Kahoun D, Petříček M, Chroňáková A, Petříčková, Inhibition of Pro-Inflammatory Cytokines by Metabolites of Streptomycetes-A Potential Alternative to Current Anti-Inflammatory Drugs, Microorganisms, PubMed Central (NIH/NLM), číslo PMID: 32344935 , 2020, ISSN: 2076-2607
- [2] Herbrík A, Corretto E, Chroňáková A, Langhansová H, Petrásková P, Hrdý J, Čihák M, Křišťůfek V, Bobek J, Petříček M, Petříčková , A Human Lung-Associated Streptomyces sp. TR1341 Produces Various Secondary Metabolites Responsible for Virulence, Cytotoxicity and Modulation of Immune Response, Frontiers in Microbiology, PubMed Central (NIH/NLM), číslo PMID: 32010093, 2020, ISSN: 1664-302X
- [3] Chen LY, Cui HT, Su C, Bai FW, Zhao XQ, Analysis of the complete genome sequence of a marine-derived strain Streptomyces sp. S063 CGMCC 14582 reveals its biosynthetic potential to produce novel anti-complement agents and peptides, PeerJ., PubMed Central (NIH/NLM), číslo PMID: 30627488, 2019, ISSN: 2167-8359

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

**RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.**

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **21.9.2020**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2022**

  
prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.  
podpis vedoucí(ho) katedry

  
prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA  
podpis děkana(ky)

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Vliv manumycinu A na změnu genové exprese cytokinů v mononukleární frakci leukocytů pupečnickové krve 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 06.05.2021

.....  
Lenka Česká

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Jiřímu Hrdému, Ph.D. za jeho cenné rady, konstruktivní připomínky a za veškerý jeho věnovaný čas. Dále děkuji Mgr. Olze Novotné a Ing. Petře Petráskové za pomoc při zpracování praktické části bakalářské práce a za jejich trpělivost. Také děkuji Ústavu imunologie a mikrobiologie při 1. lékařské fakultě University Karlovy za umožnění realizace bakalářské práce.

## ABSTRAKT

Téma bakalářské práce pojednává o různých kmenech bakterií z rodu *Streptomyces*, jejich sekundárních metabolitech a imunomodulačních vlastnostech těchto metabolitů. Bakalářská práce se zaměřuje především na produkty, které se v klinické praxi již nyní používají, nebo jsou ve stádiu výzkumu a mají pro použití ve zdravotnictví potenciál. Dále se teoretická část práce zabývá cytokiny. Nejprve je popsána jejich obecná funkce, vlastnosti a rozdělení. Následně se specificky věnuje vybraným cytokinům, které jsou studovány v praktické části bakalářské práce. Poslední část teoretické části bakalářské práce popisuje jednotlivé typy leukocytů mononukleární frakce a jejich úlohu v imunitním systému organismu.

Praktická část bakalářské práce popisuje přesné postupy laboratorní práce, použité reagenty, materiály a přístroje nezbytné ke stanovení změny genové exprese cytokinů. Vlastní experimentální část bakalářské práce se věnuje vlivu různých koncentrací manumycinu A na změnu genové exprese cytokinů v leukocytech mononukleární frakce pupečnickové krve. Konkrétně se jedná o cytokiny *Il1b*, *Il4*, *Il6*, *Il10*, *Tnfa* a *Ifng*. Manumycin A patří mezi sekundární metabolity produkované bakteriemi rodu *Streptomyces*.

Získané výsledky ukázaly, že u většiny sledovaných cytokinů nedošlo k signifikantní změně genové exprese po přidání různých koncentrací manumycinu A na rozdíl od našeho předpokladu. Námi sledované prozánětlivé cytokiny nebyly přítomností manumycinu A ovlivněny, ovšem určité cytokiny charakteristické pro T buněčnou populaci leukocytů vykazovaly jisté efekty různých přidaných koncentrací manumycinu A. Zdá se, že manumycin A nemá až tak velké účinky na změnu genové exprese cytokinů mononukleární frakce buněk pupečnickové krve, jak jsme předpokládali na základě předchozích dat získaných z buněčných linií. Získané výsledky bude třeba ověřit na

mononukleární frakci leukocytů izolovaných z periferní krve dospělých dárců s využitím polyklonálního stimulatoru fytohematoglutininu.

### **Klíčová slova**

mononukleární frakce leukocytů; pupečnicková krev; imunomodulace; manumycin A; genová exprese; cytokiny; kvantitativní PCR v reálném čase

## ABSTRACT

The topic of the bachelor thesis deals with different strains of from the bacterial genus *Streptomyces*, their secondary metabolites, and the immunomodulatory properties of these metabolites. Bachelor thesis focuses mainly on products that are already used in clinical practice or are in the research stage and have the potential to be used in health care. Further, the theoretical section focuses on cytokines. First, general function of cytokines is described, their characteristics, and classification. Subsequently, the thesis focus specifically on selected cytokines which are studied in the practical part of the bachelor thesis. The last part of the theoretical part of the bachelor thesis describes the particular types of leukocytes of the mononuclear fraction and their role in the immune system of organism.

The practical part of the bachelor thesis describes the exact procedures of laboratory work, the reagents used, the materials and instruments necessary to determine the change in gene expression of cytokines. The own experimental part of the bachelor thesis is devoted to the effect of different concentrations of manumycin A on the alteration of gene expression of cytokines in leukocytes of the mononuclear fraction of cord blood. Specifically, *Il1b*, *Il4*, *Il6*, *Il10*, *Tnfa* and *Ifng* were investigated. Manumycin A belong to secondary metabolites produced by bacteria of genus *Streptomyces*.

The results obtained showed that gene expression of the majority of studied cytokines was not significantly changed after the addition of different concentrations of manumycin A, contrary to our assumption. The pro-inflammatory cytokines, we investigated, were unaffected by the presence of manumycin A, however certain cytokines characteristic for the T cell population of leukocytes showed some effects of different added concentrations of manumycin A. It seems, manumycin A does not have as strong effect on

altering the gene expression of cytokines in the mononuclear fraction of cells of cord blood as we thought based on previous data obtained from cell lines. Obtained results will have to be confirmed using mononuclear fraction of leukocytes isolated from peripheral blood of adult volunteers with utilization of phytohemagglutinin as a polyclonal stimulator.

### **Keywords**

mononuclear fraction of leukocytes; cord blood; immunomodulation; manumycine A; gene expression; cytokines; quantitative real-time PCR



## Obsah

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Úvod.....   | 12 |
| 2     | Cíle práce.....   | 13 |
| 3     | Přehled současného stavu.....   | 14 |
| 3.1   | <i>Streptomycety</i> .....  | 14 |
| 3.1.1 | Sekundární produkty <i>Streptomycet</i> – používané imunomodulátory.....        | 15 |
| 3.1.2 | Sekundární produkty <i>Streptomycet</i> – používaná kancerostatika..            | 16 |
| 3.1.3 | Sekundární produkty <i>Streptomycet</i> – polyketidy manumycinového typu.....   | 18 |
| 3.2   | Cytokiny.....   | 20 |
| 3.2.1 | Rozdělení cytokinů .....  | 21 |
| 3.2.2 | Prozánětlivé cytokiny: IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ..... | 22 |
| 3.2.3 | Protizánětlivé cytokiny: IL-4, IL-10 .....                                      | 25 |
| 3.3   | Lymfocyty.....  | 27 |
| 3.3.1 | Vznik a populace lymfocytů B .....  | 28 |
| 3.3.2 | Funkce lymfocytů B .....  | 28 |
| 3.3.3 | Vznik a populace lymfocytů T .....  | 29 |
| 3.3.4 | Funkce CD4 lymfocytů.....   | 30 |
| 3.3.5 | Funkce CD8 lymfocytů.....   | 32 |
| 3.4   | Monocyty.....   | 33 |
| 3.4.1 | Funkce makrofágů a dendritických buněk.....                                     | 34 |
| 4     | Metodika.....   | 36 |
| 4.1   | Odběr pupečnickové krve .....   | 36 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.2   | Izolace mononukleární frakce.....                   | 36 |
| 4.2.1 | Materiál a přístrojové vybavení .....               | 36 |
| 4.2.2 | Reagencie a biologický materiál.....                | 36 |
| 4.2.3 | Pracovní postup.....                                | 37 |
| 4.2.4 | Příprava kultivačního činidla RPMI .....            | 38 |
| 4.3   | Stanovení životnosti a počtu buněk.....             | 39 |
| 4.3.1 | Materiál a přístrojové vybavení .....               | 39 |
| 4.3.2 | Reagencie.....                                      | 40 |
| 4.3.3 | Postup stanovení životnosti buněk.....              | 40 |
| 4.3.4 | Postup stanovení počtu buněk .....                  | 40 |
| 4.4   | Stimulace buněk manumycinem A <i>in vitro</i> ..... | 41 |
| 4.4.1 | Materiál a přístrojové vybavení .....               | 41 |
| 4.4.2 | Reagencie.....                                      | 41 |
| 4.4.3 | Pracovní postup stimulace.....                      | 41 |
| 4.5   | Izolace RNA.....                                    | 42 |
| 4.5.1 | Materiál a přístrojové vybavení .....               | 42 |
| 4.5.2 | Reagencie.....                                      | 42 |
| 4.5.3 | Příprava lyzačního roztoku .....                    | 43 |
| 4.5.4 | Pracovní postup izolace RNA .....                   | 43 |
| 4.6   | Měření koncentrace RNA – Nanodrop.....              | 44 |
| 4.6.1 | Materiál a přístrojové vybavení .....               | 45 |
| 4.6.2 | Reagencie.....                                      | 45 |
| 4.6.3 | Pracovní postup.....                                | 45 |
| 4.7   | RT-PCR.....   | 47 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.7.1 | Materiál a přístrojové vybavení .....   | 47 |
| 4.7.2 | Reagencie .....   | 47 |
| 4.7.3 | Pracovní postup RT-PCR .....  | 47 |
| 4.8   | q-PCR.....  | 49 |
| 4.8.1 | Materiál a přístrojové vybavení .....   | 49 |
| 4.8.2 | Reagencie .....   | 49 |
| 4.8.3 | Pracovní postup.....  | 50 |
| 4.9   | Analýza a statistika .....  | 51 |
| 5     | Výsledky.....   | 53 |
| 5.1   | Expresse cytokinů v CBMC po jedné hodině kultivace s LPS a manumycinem A.....     | 54 |
| 5.2   | Expresse cytokinů v CBMC po čtyřech hodinách kultivace s LPS a manumycinem A..... | 60 |
| 6     | Diskuze .....   | 66 |
| 7     | Závěr .....   | 75 |
| 8     | Seznam použitých zkratk.....  | 76 |
| 9     | Seznam použité literatury .....   | 80 |
| 10    | Seznam použitých obrázků .....  | 91 |
| 11    | Seznam použitých tabulek.....   | 93 |

# 1 ÚVOD

Bakalářská práce shrnuje poznatky o různých kmenech bakterií rodu *Streptomyces* a jejich sekundárních metabolitech. Dále obecně popisuje cytokiny jako heterogenní skupinu látek s mnoha různými funkcemi. Následně pojednává o leukocytech mononukleární frakce pupečnickové krve, které jsou významnými producenty různých cytokinů.

Lidská společnost se stále potýká s velkým množstvím onemocnění imunitního systému, které se vyznačují vznikem chronického zánětu. V současné době se k léčbě chronického zánětu využívá, mimo jiné, aplikace cytokinů, monoklonálních protilátek a látek schopných inhibovat určité zánětlivé procesy. Tato léčba je v některých případech spjatá s výskytem různých nežádoucích i závažných vedlejších účinků. Sekundární metabolity *Streptomyces* představují slibnou alternativní cestu k současným protizánětlivým lékům. Výhodou těchto metabolitů je nižší cena, lze je často aplikovat orálně a stále si zachovávají svoji vysokou specifickou cíle. Některé sekundární metabolity *Streptomyces* se v klinické praxi již používají jako imunomodulátory a kancerostatika. Předmětem této práce je ověření protizánětlivého účinku dalšího sekundárního produktu *Streptomyces*, a to manumycinu A.

Víme, že manumycin A má schopnost potlačovat genovou expresi určitých cytokinů, a tím snižovat jejich produkci. Buňky mononukleární frakce leukocytů byly vystaveny různým koncentracím (5; 1; 0,25; a 0,125  $\mu\text{M}$ ) manumycinu A po dobu jedné a čtyř hodin. Předpokládáme, že nejvyšší koncentrace přidaného manumycinu A bude mít největší účinek na snížení genové exprese sledovaných cytokinů.

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce je shrnutí poznatků o různých sekundárních metabolitech produkovaných jednotlivými kmeny bakterií rodu *Streptomyces*. Tyto metabolity se vyznačují svými protizánětlivými a apoptotickými účinky. Díky nim se některé z nich už využívají v klinické praxi jako imunomodulátory a kancerostatika. Další metabolity jsou ve stádiu výzkumu. Dále je v teoretické části práce shrnuta funkce, vlastnosti a účinky cytokinů na buňky organismu. V poslední části jsou pak popsány jednotlivé leukocyty mononukleární frakce, které jsou schopny produkovat velké množství různých cytokinů.

Experimentální část práce je zaměřena na imunomodulační vlastnosti manumycinu A na mononukleární frakci leukocytů pupečnickové krve. Ke kultuře mononukleární frakce leukocytů byl, při jejich současné stimulaci lipopolysacharidem (dále LPS), přidán manumycin A o různých koncentracích. Na základě našich předchozích zkušeností jsme předpokládali, že manumycin A by měl mít schopnost potlačovat produkci prozánětlivých cytokinů a nepotlačovat produkci protizánětlivých cytokinů. Tento předpoklad byl ověřen pomocí stanovení změny genové exprese cytokinů pomocí kvantitativní PCR v reálném čase.

## 3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

### 3.1 *Streptomycety*

*Streptomycety* patří mezi vláknité gram pozitivní bakterie z třídy aktinomycet (*Actinomycetes*). V dnešní době známe, díky vědeckým poznatkům, více než 500 popsaných druhů *Streptomycet*. Většina se rozmnožuje pomocí spor a tvoří mycelium podobné houbám. Vyskytují se převážně v půdě a rozpadají se vegetaci díky jejich schopnosti štěpit chitin a celulózu. Obývají i mnoho dalších biotopů, jako jsou mořské vody, půdní substráty, a jsou schopny přežít i v extrémních podmínkách. Působí také jako symbionti s různými druhy rostlin i zvířat (od hmyzu až po obratlovce). Téměř ve všech případech *Streptomycety* produkují určité látky, které jsou účinné proti patogenním druhům hub. Až na *Streptomyces scabei*, která působí jako fytopatogen u bramborových hlíz a způsobuje tak jejich strupovitost. Nedávné studie prokázaly, že *Streptomycety* jsou součástí i lidské mikrobioty. Vyskytují se například ve zdravé kůži, gastrointestinálním traktu a dýchacím traktu [1; 2; 3].

*Streptomycety* se vyznačují poměrně velkým genomem, který představuje 8 až 10 Mbp, jedná se tak o největší známý genom bakteriální říše. Genom je tvořen pro bakterie netypickým lineárním chromozomem, který obsahuje až 70 % párů C-G bází. Syntéza sekundárních metabolitů je kódována velkým množstvím genů, což vysvětluje jejich rozsáhlé genomy [3].

*Streptomycety* mají schopnost produkovat velké množství sekundárních metabolitů, které specificky ovlivňují jednotlivé lidské buňky. Tyto metabolity představují lákavou alternativní cestu protizánětlivé léčby bez velkého množství vedlejších účinků. Některé z nich se v medicíně používají jako imunomodulátory (rapamycin, takrolimus, daptomycin) a kancerostatika (mitomycin C, aktinomycin, bleomycin a další). Téměř dvě třetiny dnes používaných antibiotik

jsou založeny na sekundárních produktech *Streptomyces*. Mořské *Streptomyces* produkují sekundární metabolity, které mají antikomplementovou aktivitu. Zmíněné metabolity jsou velkým potenciálem pro léčbu onemocnění, u kterých dochází k neadekvátní aktivaci komplementu. Mezi tato onemocnění řadíme např.: vaskulitidy nebo systémový lupus erythematosus. Dalšími metabolity *Streptomyces* jsou polyketidy manumycinového typu [2; 4; 5].

### 3.1.1 Sekundární produkty *Streptomyces* – používané imunomodulátory

Rapamycin je sekundární metabolit *Streptomyces hygroscopicus* s fungicidním účinkem. Působí jako inhibitor komplexu mTOR 1 (savčí cíl rapamycinového komplexu 1). Zmíněný komplex působí jako serin/threoninová kináza a reguluje buněčný růst, proliferaci a metabolismus. Následně byly zjištěny jeho imunosupresivní a antiproliferativní účinky v savčích buňkách. Na základě studií se dále potvrdilo, že rapamycin má schopnost oddalovat onemocnění související se stárnutím u modelových organismů, včetně myši. Bohužel u lidí se nedoporučuje užívat rapamycin dlouhodobě, jelikož způsobuje závažné vedlejší účinky. Mezi tyto vedlejší účinky patří potlačení funkce imunitního systému (imunosuprese) a intolerance glukosy [6; 7].

Daptomycin spadá do skupiny cyklických lipopeptidů, který produkuje *Streptomyces roseosporus*. Klinicky se používá zejména proti vybraným infekcím *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus spp.* Aktivita daptomycinu závisí na přítomnosti vápenatých iontů. Rezistence bakterií proti daptomycinu se objevuje jen velmi zřídka. Pravděpodobně kvůli jeho schopnosti vázat se více na membránu bakterie než na její receptor. V poslední době je používání daptomycinu legislativně omezeno [8].

Mezi další zástupce lze řadit také makrocyklický lakton takrolimus, produkovaný *Streptomyces tsukubensis*. Klinicky se používá jako imunosupresivní látka pro pacienty po orgánové transplantaci jako prevence a léčba rejekce alogenního transplantátu. Takrolimus výrazně zvyšuje šanci na přežití transplantátu v příjemci a je účinnou alternativou k cyklosporinu. Obě látky působí jako inhibitory kalcineurinu. Stejně tak mají podobné medicínské uplatnění, kdy se podávají při léčbě autoimunitních onemocnění, jako je atopická dermatitida nebo revmatoidní artritida. Vedlejšími účinky takrolimu jsou neurotoxicita a nefrotoxicita [9; 10].

### 3.1.2 Sekundární produkty *Streptomyces* – používaná kancerostatika

Aktinomyciny jsou chromopeptidové laktonové metabolity převážně mořských *Streptomyces*. Zatím z dostupných zdrojů známe asi 42 aktinomycinů, které byly pozorovány u velkého množství bakteriálních druhů. Aktinomycin D se vyznačuje svojí protinádorovou aktivitou a působí jako blokátor transkripce. Klinicky se používá k léčbě různých typů onkologických onemocnění. Aktinomycin D se však musí podávat jen v malých dávkách, a to kvůli jeho hepatotoxickým účinkům. Jeho aktivita ve spolupráci s dalšími léky je velmi specifická a podstatná pro aktivaci p53 (tumor protein 53). Tento protein funguje v buňkách jako senzor poškození DNA, který v nádorových buňkách indukuje apoptózu na základě charakteristických mutací a poškození DNA a ve zdravé tkáni reverzibilní zástavu buněčného cyklu. Vznikající nádory mají schopnost inaktivovat biochemické dráhy regulované proteinem p53 a tím podporovat svůj růst. Podstata Actinomycinu D spočívá v obnovení funkce p53 a tím následně zvýší množství nádorových buněk podlehlých apoptóze [11; 12; 13].

Dalším důležitým metabolitem je aktinomycin V, který má také protinádorovou aktivitu. Aktinomycin V snižuje životaschopnost rakovinných buněk karcinomu prsu. Vyznačuje se svojí schopností agregace, kdy shlukuje



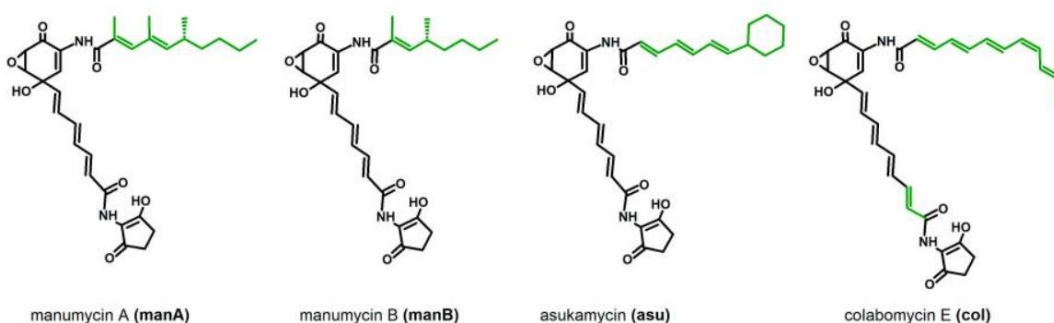
karcinogenní buňky a zároveň blokuje jejich migraci i invazi do okolních tkání za účelem tvorby nových ložisek (metastáz). Také je schopen inhibovat proces epiteliálně-mezenchymálního přechodu (EMT), což je klíčový vícefázový proces, při kterém dochází k invazi a metastázování karcinomu [14].

Bleomyciny jsou metalo-glykopeptidy produkované *Streptomyces verticillus*. Bleomycin v kombinaci s dalšími léky se klinicky používá při léčbě maligních nádorů zárodečných buněk, Hodgkinova lymfomu, karcinomu kůže a rakoviny varlat a vaječníků. Tyto látky potřebují pro svoji aktivitu ionty přechodného kovu, se kterými tvoří komplex, který je pak schopen štěpit molekulu DNA. Tímto kovem je obvykle  $Fe^{2+}$ . Přerušování vazeb dvouřetězcové i jednořetězcové DNA vede k apoptóze buněk s vyšší proliferační aktivitou [15].

Mitomycin C je metabolit produkovaný *Streptomyces caespitosus*. Tato látka má schopnost poškodit dvouvláknovou DNA, čímž brání její replikaci a znemožňuje tak mitózu. Mitomycin kromě zmíněné schopnosti také potlačuje syntézu RNA a proteosyntézu. Klinicky se mitomycin C používá jako antibakteriální léčivo a při chemoterapii. Jeho použití má velký potenciál při léčbě různých typů rakoviny, jako je karcinom mléčné žlázy, tlustého střeva, žaludku, konečníku a močového měchýře. Mitomycin se vyznačuje i svým toxickým účinkem, který indukuje apoptózu buněk a tím i produkci množství zánětlivých cytokinů, které následně poškozují danou tkáň [16; 17].

### 3.1.3 Sekundární produkty *Streptomyces* – polyketidy manumycinového typu

Krátké polyketidy manumycinového typu produkuje velké množství nejrůznějších druhů *Streptomyces*. Valná většina těchto produktů vzniká v minoritním množství jako vedlejší sloučenina jiné látky. Z důvodů takto malého množství není možné dané látky získat v čisté formě a podrobně zkoumat jejich účinky. Jen několik produktů je tvořeno v takovém množství, které je dostatečné a vhodné k výzkumným účelům. Mezi zmíněné produkty patří manumycin A, manumycin B, asukamycin a nově objevený colabomycin E. Uvedené látky se vyznačují nápadnou strukturální podobností. Liší se především v horním polyketidovém řetězci počtem uhlíků a dvojných vazeb [5; 18] viz Obrázek 1.



Obrázek 1 - Látky manumycinového typu [5]

Tyto látky mají silné protizánětlivé a apoptotické účinky. Protizánětlivý účinek spočívá na schopnosti inhibice enzymu kaspázy 1, který umožňuje přeměnu cytokinu z pro-IL-1 na aktivní formu IL-1 a z pro-IL-18 na aktivní IL-18. Apoptotické působení se zakládá na inhibici enzymu Ras-farnesyltransferázy, která se podílí na posttranslační modifikaci buněčných proteinů. Ras proteiny se stávají aktivními po navázání farnesylové skupiny, což zajišťuje právě farnesyltransferáza, a uplatňují se v buněčné signalizaci a komunikaci. Dále se také podílí na inhibici cytosolární thioredoxinové reduktázy (TrxR-1), která vede k nadprodukcí reaktivních forem kyslíku. Antibiotické vlastnosti těchto látek

jsou však velmi slabé. Díky popisovaným vlastnostem by mohly tyto látky být vhodnou alternativou makrolidů [5].

Komerčně nedostupnější a nejvíce studovanou látkou manumycinového typu je manumycin A. Jeho protinádorový účinek byl testován na různých typech nádorů. Například byl aplikován při testování anaplastického karcinomu štítné žlázy, u kterého má použití manumycinu A v kombinaci s dalšími látkami dobré výsledky na myším experimentálním modelu. Protizánětlivé vlastnosti byly však zanedbávány. Prokázalo se, že manumycin A svým účinkem inhibuje genovou expresi prozánětlivých cytokinů a snižuje tak jejich produkci. Tento proces inhibice ovlivňuje hodnota koncentrace přidaného manumycinu A, která se pohybuje v jednotkách  $\mu\text{M}$ . Příliš vysoké koncentrace manumycinu A by negativně ovlivnily životaschopnost buněk, které tyto cytokiny produkují. Při četných pokusech na myším modelu se došlo k závěru, že manumycin A inhibuje neutrální sfingomyelinázu a tím zpomaluje ukládání amyloidního proteinu v mozku, což přispívá ke zpomalení neurodegenerace. Manumycin A má také určitý terapeutický potenciál v léčbě humánní granulocytární anaplazmózy. Dalším nově komerčně dostupným polyketidem je manumycin B a asukamycin. Tyto látky také účinně snižují produkci prozánětlivých cytokinů, mezi které řadíme např.:  $\text{IL-1}\beta$  a  $\text{TNF-}\alpha$ . Mají však nižší apoptotický účinek než manumycin A [5; 18; 19].

## 3.2 Cytokiny

Cytokiny jsou proteiny produkované leukocyty a dalšími buňkami, které slouží jak ke komunikaci mezi buňkami a vzniku imunitních odpovědí tak k regulaci imunitních reakcí. Cytokiny ovlivňují hematopoézu, komunikaci mezi jednotlivými buňkami imunitního systému, odpověď na přítomnost infekčního agens a zánětlivé markery. Cytokiny působí v tzv. „sítích“ a mají schopnost ovlivnit více cílových buněk. Vzájemná interakce cytokinů může být aditivní (jejich účinek se skládá), synergický (vzájemně se podporují), antagonistický (působí proti sobě) nebo určitý cytokin indukuje tvorbu jiného cytokinu [20].

Jednotlivé buňky reagují na cytokiny prostřednictvím cytokinových receptorů, které se mohou vyskytovat na jejich membránovém povrchu nebo jsou přítomny v rozpustné formě. Rozpustná forma receptorů reguluje aktivitu cytokinů díky schopnosti podporovat účinek cytokinu a působit jako agonista reakce nebo tlumit účinek cytokinu a zároveň působit jako antagonist. Tento jev brání stavu, který se nazývá cytokinová bouře neboli hypercytokinemie, která může mít fatální následky [20; 21].

Cytokiny představují různorodou skupinu proteinů. Liší se zejména ve svých funkcích, chemickém složení i molekulových hmotnostech, které mohou být od 6 do 70 kDa. Fyziologické hodnoty cytokinů v tekutinách a tkáních u zdravých jedinců jsou v jednotkách pg/l z důvodu jejich vysoké biologické aktivity a krátkého poločasu rozpadu. Zvýšené hodnoty cytokinů mohou poukazovat přítomnost zánětlivé reakce a progresi určitých onemocnění. Cytokiny se díky této schopnosti využívají jako markery účinků léčby nebo odhadu progresu určitého onemocnění, kterou charakterizuje přítomnost specifických cytokinů. V současné době stále roste počet nově objevených cytokinů a jejich specifických funkcí [20; 21].

### 3.2.1 Rozdělení cytokinů

Cytokiny dělíme do určitých skupin podle několika vlastností. Podle mechanismu účinku, hlavní funkce a chemické struktury.

Podle mechanismu účinku rozdělujeme cytokiny dále do třech podskupin: autokrinní, endokrinní a parakrinní. V případě autokrinního účinku cytokinu dochází k ovlivnění stejné buňky, která daný cytokin produkuje. Endokrinní podskupina zahrnuje cytokiny, jež se vyplavují do krevního řečiště a působí na vzdálené tkáň. Naopak při parakrinním působení dochází k ovlivnění buněk nacházející se v těsné blízkosti buňky tvořící daný cytokin [20; 21].

Podle názvů členíme cytokiny na interleukiny, chemokiny, interferony, faktory stimulující kolonie, faktory nekrotizující nádory a růstové faktory. Interleukiny zahrnují heterogenní skupinu cytokinů, jež působí převážně na leukocyty (IL-1 až IL-42). Do skupiny chemokinů náleží cytokiny s chemotaktickou aktivitou (IL-8, MIP: chemotaktický faktor pro monocyty). Interferony jsou důležité pro mechanismy antivirové neadaptivní imunity (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ). IFN- $\gamma$  se účastní adaptivní antivirové imunity. Faktory stimulující kolonie patří mezi látky, které podporují diferenciaci krevních elementů v kostní dřeni (G-CSF: faktor stimulující granulocyty, M-CSF: faktor stimulující monocyty). Faktory nekrotizující nádory působí cytotoxicky a regulačně (TNF- $\alpha$ , $\beta$ ). Transformující růstové faktory působí na buněčné dělení (TGF- $\alpha$ , $\beta$ ) [20; 21].

Na základě hlavní funkce můžeme dělit cytokiny na prozánětlivé a protizánětlivé. První zmíněná podskupina vyvolává zánět a má chemotaktickou aktivitu (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-8). Naopak protizánětlivé cytokiny převážně zánět inhibují (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ). Dále na cytokiny s aktivitou růstových faktorů krvinečných buněk (IL-2, IL-3, G-CSF), ty které se uplatňují v buněčné imunitě (IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) a humorální imunitě (IL-4, IL-5,

IL-10, TGF- $\beta$ ). Poslední skupinou jsou cytokiny s antivirovým účinkem (IFN- $\alpha,\beta$ , IL-28, IL-29) [20; 21].

### 3.2.2 Prozánětlivé cytokiny: IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$

#### IL-1 $\beta$

Pleiotropní prozánětlivý cytokin interleukin-1 $\beta$  se uplatňuje v přirozené a také adaptivní imunitě. Hlavními producenty IL-1  $\beta$  jsou monocyty, makrofágy a neutrofilové, které produkují IL-1 $\beta$  ve formě neaktivního pro-interleukinu-1 $\beta$ . Pro-interleukin-1 $\beta$  se aktivuje pomocí enzymu kaspázy-1. IL-1 $\beta$  je jedním z nejdůležitějších cytokinů indukujících zánět. Také způsobuje vznik dalších prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$ . IL-1  $\beta$  též aktivuje IL-6, a zároveň podporuje schopnost fagocytózy leukocytů, funkci T<sub>H1</sub> lymfocytů a tím i vznik T<sub>C</sub> lymfocytů. IL-1 $\beta$  se dále uplatňuje při procesech různých nemocí, jako je degenerativní onemocnění sítnice, roztroušená skleróza a další neurodegenerativní onemocnění [22; 23; 24].

#### IL-6

Jedná se o pleiotropní, prozánětlivý cytokin uplatňující se jak v buněčné, tak protilátkové imunitě. IL-6 je produkován širokým spektrem buněk, mezi největší producenty patří kromě makrofágů, neutrofilů, T<sub>H2</sub> lymfocytů také buňky hladkých svalů cév, tukové buňky a buňky kostí. Důležitost zmiňovaného cytokinu spočívá v několika nezbytných funkcích. Indukuje tvorbu proteinů akutní fáze při setkání organismu se specifickými antigeny. Indukuje produkci CRP (C-reaktivní protein) a fibrinogenu. Působí na B-lymfocyty a podporuje jejich přeměnu ve zralé plasmatické buňky, které jsou schopné produkovat protilátky. IL-6 také stimuluje T<sub>H2</sub> lymfocyty, ovlivňuje i hematopoézu, reparaci kostní tkáně, endokrinní systém a kardiovaskulární systém. Kromě jeho

působení v různých fyziologických procesech, má IL-6 důležitou roli i v nervovém systému, kde je schopen ovlivňovat neurony a gliové buňky [25; 26].

Fyziologická hodnota cirkulujícího IL-6 u zdravých jedinců s vyšším věkem stoupá, není vždy zcela zřejmé, proč tomu tak je. Zvýšená hodnota IL-6 se vyskytuje především u kardiovaskulárních onemocnění, cukrovky a rakoviny. IL-6 se používá jako jeden z markerů progresu aterosklerózy, poruchy krvetvorby a dalších onemocnění [25; 26].

### IFN- $\gamma$

Interferon- $\gamma$  je pleiotropní prozánětlivý cytokin, uplatňující se jak v přirozené, tak adaptivní imunitě. Řadí se do skupiny interferonů II-třídy. Hlavními producenty jsou NK buňky a T<sub>H1</sub> lymfocyty. Mezi další buňky se schopností produkovat IFN- $\gamma$  patří T<sub>C</sub> lymfocyty, makrofágy a DC. Zmiňované buňky produkují IFN- $\gamma$  v reakci na přítomnost IL-12 a mikrobiálních podnětů, kterými jsou např. bakteriální lipopolysacharidy. IFN- $\gamma$  tvoří zásadní složku obrany proti téměř všem druhům patogenů. Brání organismus proti extracelulárním i intracelulárním bakteriím, virovým, houbovým i parazitárním infekcím. IFN- $\gamma$  se také uplatňuje v protinádorové imunitě indukcí tvorby TNF- $\alpha$ , se kterým společně zvyšují schopnost makrofágů fagocytovat. Podporuje proliferaci a diferenciaci T<sub>H1</sub> lymfocytů, čímž ovlivňuje i vznik T<sub>C</sub> lymfocytů a zároveň inhibuje vývoj T<sub>H2</sub> lymfocytů. Napomáhá při diferenciaci buněk prezentujících antigen (APC, antigen presenting cells) a prezentaci antigenů na jejich povrchu, čímž zvyšuje schopnost imunitního systému reagovat na antigen. V neposlední řadě má určitý vliv na vznik komplementové kaskády [27; 28].

Chemickou strukturu IFN- $\gamma$  tvoří dvě polypeptidové jednotky, které jsou na sebe antiparalelně navázány. Tato symetrie naznačuje, že jedna molekula je schopná se navázat na dva receptory zároveň, a tudíž zesílit jeho reakce [29].

IFN- $\gamma$  se klinicky používá k léčbě různých druhů malignit. Tato léčba má však smíšené výsledky a objevuje se i množství nežádoucích vedlejších účinků. Podává se i jako preventivní přípravek u pacientů s granulomatózním onemocněním a funkční nedostatečností fagocytů, ale i zde jsou přínosy omezené [28; 30].

### TNF- $\alpha$

Jedná se o dalšího zástupce pleiotropních cytokinů, který se nazývá faktor nekrotizující nádory a působí jako klíčový regulátor zánětlivé reakce. TNF- $\alpha$  patří mezi řadu cytokinů, které odpovídají za reakci akutní fáze. Dále ovlivňuje buněčný cyklus, růst a diferenciaci buněk a jejich apoptózu. Také podporuje expresi adhezivních molekul, proces fagocytózy a reguluje genovou expresi. Protinádorový účinek TNF- $\alpha$  je velmi zásadní v boji imunitního systému proti vznikajícím nádorům. Pokud není dostatek TNF- $\alpha$ , aby zničil všechny abnormální tumorové buňky, způsobuje nedostatek TNF- $\alpha$  závažné klinické příznaky spojené s nádorovým onemocněním. Hlavními producenty TNF- $\alpha$  jsou aktivované makrofágy a NK buňky. Mezi další buňky, které jsou schopny produkovat TNF- $\alpha$ , se řadí lymfocyty, neutrofilny, endotelové buňky, žírné buňky, kardiomyocyty, fibroblasty, neurony a tuková tkáň. Hladké svalové buňky také produkují TNF- $\alpha$ , a to jako odpověď na jejich poškození [31; 32].

TNF- $\alpha$  se v organismu vyskytuje v rozpustné a membránové formě. Obě tyto formy jsou biologicky aktivní a jejich specifické funkce jsou předmětem kontroverze [31].



### 3.2.3 Protizánětlivé cytokiny: IL-4, IL-10

#### IL-4

Interleukin-4 patří mezi pleiotropní protizánětlivé cytokiny a je produkován především aktivovanými T<sub>H2</sub> lymfocyty. Dalšími producenty IL-4 jsou bazofily, eosinofily a mastocyty. Molekulová hmotnost IL-4 se pohybuje v rozmezí 12 až 20 kDa, díky jeho přirozené vlastnosti glykosylace (navázání cukerné složky). IL-4 stimuluje tvorbu T<sub>H2</sub> lymfocytů, a tím také podporuje tvorbu B lymfocytů a jejich diferenciaci na plasmatické buňky produkující protilátky. Zároveň tak inhibuje vznik a vývoj T<sub>H1</sub> lymfocytů. Také potlačuje sekreci prozánětlivých chemokinů a cytokinů, jako jsou např.: TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$ . Nezbytnou funkcí IL-4 je schopnost přispívat k opravě a regeneraci buněk poškozených zánětem. Přítomnost IL-4 je nedílnou součástí při opravě bílé hmoty po mozkové mrtvici. Dále IL-4 reguluje apoptózu a expresi mnoha genů v různých typech buněk. Například působí na lymfocyty, makrofágy, fibroblasty, epiteliální a endoteliální buňky [20; 33; 34; 35].

#### IL-10

Interleukin-10 se řadí mezi pleiotropní protizánětlivé cytokiny, které jsou produkovány velkým množstvím buněk. Hlavními producenty IL-10 jsou makrofágy a dendritické buňky. Dalšími producenty IL-10 jsou T<sub>H2</sub>, T<sub>REG</sub>, T<sub>C</sub> lymfocyty, B lymfocyty a žírné buňky. IL-10 může být také produkován určitými typy maligních nádorů, které takto inhibují imunitní systém, a tím vytvářejí ideální podmínky pro svůj růst. IL-10 působí na velké množství různých buněk a reguluje jejich funkce. V makrofázích snižuje produkci zánětlivých cytokinů a inhibuje prezentaci antigenu na jejich buněčném povrchu. Podporuje proliferaci T<sub>REG</sub>, které tlumí funkci ostatních druhů T lymfocytů. Inhibuje NK buňky (natural killer cell), inhibuje diferenciaci nezralých T buněk na efektorové

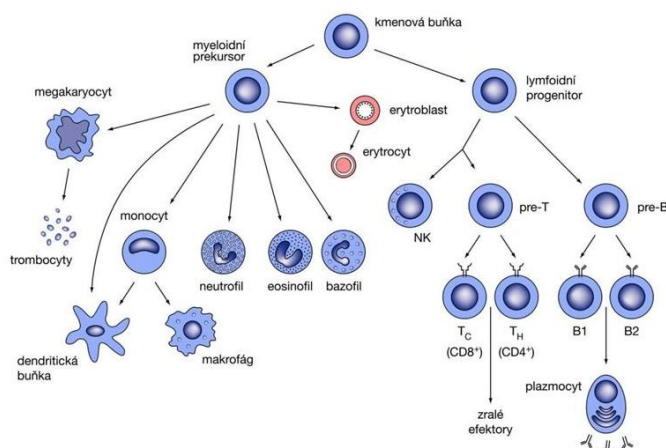
a B lymfocytům brání v apoptóze. IL-10 má význam v prevenci a omezení přehnaných imunitních reakcí, které by mohly vést k chronickým zánětům a následně k poškození organismu [36; 37].

Koncentrace IL-10 musí být za každých okolností vyvážená. Při snížených hodnotách IL-10 dochází k neadekvátním až autoimunitním reakcím. Naopak při vysokých koncentracích IL-10 není imunitní systém schopen správně a rychle reagovat na přítomnost patogenů iniciací imunitní odpovědi vedoucí k eliminaci daného infekčního agens [38].

### 3.3 Lymfocyty

Lymfocyty jsou druhem leukocytů (bílých krvinek), které představují nezbytnou část specifické části imunity. Jako všechny leukocyty vznikají lymfocyty z kmenových buněk, s charakteristickou adhezivní molekulou CD34, přítomných v kostní dřeni. Z kmenových buněk se diferencují dvě vývojové linie: myeloidní a lymfoidní. Z lymfoidní linie vznikají lymfocyty B, lymfocyty T a NK buňky (natural killer cell). Z myeloidní linie se pod vlivem cytokinů diferencují erythrocyty, trombocyty a všechny další druhy leukocytů, jako jsou neutrofilů, bazofilů, eozinofilů a monocytů [20] viz Obrázek 2.

Celkový počet leukocytů v lidské krvi je 4 až  $10 \cdot 10^9$  buněk/l, z toho lymfocyty tvoří 20 až 40 %. Toto zastoupení se v průběhu života mění. Dle dostupných zdrojů víme, že do prvních pěti dní života dítěte převažuje v jeho krvi značné zastoupení neutrofilů, které je až do pátého roku života dítěte vystřídáno zastoupením lymfocytů. V tomto pátém roce se opět vrací převaha neutrofilů. Až ve čtrnácti letech má dítě standardní počet leukocytů jako dospělý jedinec. Tento fakt může za normálních podmínek napomoci při určení věku dítěte. Populaci lymfocytů T a B lze od sebe rozlišit speciálními imunochemickými metodami. Při provedení klasického krevního nátěru nelze od sebe obě populace lymfocytů odlišit [39; 40].



Obrázek 2 - Hematopoéza [20]

### 3.3.1 Vznik a populace lymfocytů B

Lymfocyty B se vytvářejí přímo v kostní dřeni. Nezralé lymfocyty jsou následně vyplaveny do krevního řečiště a v sekundárních lymfatických orgánech, jako jsou lymfatické uzliny, Peyerovy plaky a další orgány, přicházejí do styku s určitým antigenem. Následně se diferencují na zralé plasmatické buňky, které jsou schopné produkovat protilátky. Část B lymfocytů má schopnost diferenciaci na tzv. paměťové buňky, jež zodpovídají za imunologickou paměť [20].

B lymfocyty můžeme rozlišit na dvě hlavní populace. Lymfocyty B1 s charakteristickou adhezivní molekulou CD5, které tvoří cca 5 % všech B lymfocytů a lymfocyty B2. Buňky B1 produkují protilátky, které rozpoznávají antigeny tělu vlastní a antigeny s opakujícími se epitopy, jako jsou sacharidy. Buňky B2 se nacházejí v sekundárních lymfatických orgánech a jsou považovány za mediátory adaptivní imunity. B2 lymfocyty mají schopnost diferencovat se na paměťové buňky. B1 lymfocyty se pravděpodobně na vzniku paměťových buněk nepodílí. S velkou pravděpodobností vznikají tyto populace z odlišných progenitorů [20].

### 3.3.2 Funkce lymfocytů B

Zralé plasmatické buňky mají schopnost produkovat různé druhy protilátek, které představují humorální složku specifické imunity. B lymfocyty interagují s antigenem na povrchu APC a tvoří proti těmto antigenům různé druhy protilátek. K tvorbě různých protilátek přispívají i  $T_H2$  lymfocyty produkcí určitých cytokinů, na které B lymfocyty reagují [20].

Část B lymfocytů se diferencuje na paměťové buňky, které jsou zodpovědné za imunologickou paměť. Pokud dojde k dalšímu setkání se stejným antigenem, paměťové buňky jsou rychle aktivovány a zahájí sekundární (anamnestickou) odpověď. Následná druhotná odpověď nastupuje mnohem rychleji a efektivněji

než odpověď primární. Při prvním setkání s určitým antigenem začnou plasmatické buňky produkovat protilátku izotypu IgM, která má více vazebných míst pro antigen (jedná se o pentamer), ale nedosahuje takové schopnosti interakce s ostatními složkami imunitního systému jako protilátka IgG, kterou začnou plasmatické buňky tvořit později. Paměťové buňky mají tu výhodu, že při opětovném setkání s antigenem začnou produkovat rovnou protilátku IgG [41; 42; 43].

### 3.3.3 Vznik a populace lymfocytů T

Lymfocyty T vznikají jako předchozí zmiňovaná populace v kostní dřeni a jejich maturace se u většiny T lymfocytů dokončuje v thymu (brzlíku). Tyto T lymfocyty nesou na svém povrchu TCR (receptor T lymfocytu) typu  $\alpha\beta$ . T lymfocyty s TCR typu  $\gamma\delta$  tvoří menšinovou populaci a vyvíjí se mimo thymus. Z thymu se poté uvolňují odlišné populace T buněk. Populace zahrnuje  $T_H$  lymfocyty (pomocné) s charakteristickým koreceptorem CD4 a  $T_C$  lymfocyty (cytotoxické) s charakteristickým koreceptorem CD8. T lymfocyty se diferencují na zralé lymfocyty až po setkání s antigenem na povrchu APC (antigen prezentující buňky – makrofágy a dendritické buňky) a na povrchu B buněk [20].

Lymfocyty s koreceptorem CD4 můžeme rozlišit na základní subpopulace  $T_H1$  a  $T_H2$  lymfocyty. Tyto dvě subpopulace se navzájem ovlivňují pomocí cytokinů, zároveň každá komunikuje s jinými APC a ovlivňuje další procesy v těle. Pro diferenciaci prekurzorů  $T_H$  lymfocytů na klony zralých efektorových buněk je nutný kontakt s fragmenty antigenů prezentovaných na MHC I/ MHC II na povrchu APC. MHC (major histocompatibility complex) dělí na MHC I. třídy (MHC I), který se nachází na všech jaderných buňkách a na MHC II. třídy (MHC II), který se za fyziologických podmínek nachází zejména na APC. Základní funkcí MHC komplexu je vázat bílkovinné fragmenty proteinů, které jsou produkovány vlastními buňkami organismu nebo pohlcenými cizorodými

buňkami a vystavovat je na površích buněčných membrán. Další subpopulací lymfocytů s koreceptorem CD4 jsou T<sub>H3</sub> a T<sub>REG</sub> (regulační) lymfocyty. T<sub>H3</sub> se uplatňují ve slizniční imunitě. Přítomnost koreceptorové molekuly CD8 charakterizuje zpravidla skupinu T<sub>C</sub> (cytotoxických) lymfocytů [20; 44; 45].

V epitelech sliznic se nachází zvláštní populace T lymfocytů tzv. IEL (intraepiteliální T lymfocyty) a tzv. LPL (lymfocyty v lamina propria). Většina těchto buněk neprochází vývojem v thymu. IEL T lymfocyty se především nacházejí v klcích tenkého střeva. Zatím není dostatečně známá jejich funkce, ale zřejmě lymfocyty s typem TCR  $\alpha\beta$  se účastní regulace imunitní odpovědi proti potravinovým alergenům a lymfocyty s typem TCR  $\gamma\delta$  se podílí na udržování integrity sliznic. 80 % IEL nese koreceptor CD8 a u LPL T lymfocytů převažuje přítomnost koreceptoru CD4. Celkové zastoupení slizničních lymfocytů se také liší u různých živočišných druhů [20; 44].

### 3.3.4 Funkce CD4 lymfocytů

Primární funkcí T<sub>H1</sub> lymfocytů je spolupráce s makrofágy (jedny z APC), kde se setkávají s antigenem a zároveň stimulují makrofágy k přeměně na aktivované makrofágy. Takto aktivované makrofágy mají schopnost produkovat další baktericidní produkty, které se uplatňují při destrukci pohlceného infekčního agens. Některé pohlcené bakterie mají schopnost přežít ve fagosomu makrofágů, kde se pro ně nachází ideální prostředí. Příkladem takové bakterie je *Mycobacterium tuberculosis*. Přeměna v aktivovaný makrofág je podporována přítomností cytokinu IFN- $\gamma$ . Další cytokiny produkované T<sub>H1</sub> buňkami jsou IL-2 a IL-3. IL-2 funguje jako autokrinní růstový faktor, který je nutný k množení lymfocytů s CD4 koreceptorem. T<sub>H1</sub> lymfocyty také spolupracují s T<sub>C</sub> lymfocyty. Obě skupiny se setkávají s antigenem na povrchu APC, především na makrofázích [20].

Primární funkcí  $T_H2$  lymfocytů je spolupráce s B lymfocyty, které byly předem aktivovány určitým antigenem na povrchu APC, především na dendritických buňkách. Po kontaktu stimulovaných B lymfocytů s  $T_H2$  se B buňky diferencují na zralé plasmatické buňky. Vzniklé buňky pak produkují protilátky proti danému antigenu. Kontakt  $T_H$  buňky a dendritických buněk probíhá v přítomnosti cytokinu IL-4, díky kterému dochází k opakovanému množení a diferenciaci na zralý efektorový klon  $T_H2$ . Mezi typické cytokiny produkované  $T_H2$  patří IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13. Všechny zmiňované cytokiny stimulují B lymfocyty a následnou tvorbu protilátek. IL-4 inhibuje procesy  $T_H1$  lymfocytů a makrofágů. Tedy potlačuje  $T_H1$  imunitní odpověď. Produkce protilátek je optimálním řešením při extracelulárních infekcích [20].

Aktivity  $T_H1$  a  $T_H2$  buněk jsou vzájemně regulovány, jak z vnějšku jinými buňkami, tak i vzájemně samotnými  $T_H$  buňkami. Jde o jeden z důležitých imunoregulačních mechanismů. Vývoj  $T_H1$  nebo  $T_H2$  lymfocytů z prekurzorové buňky CD4 závisí na poměru koncentrací cytokinů IL-12 a IL-4. Makrofágy a dendritické buňky produkují IL-12, který stimuluje tvorbu  $T_H1$  buněk. IL-4, který stimuluje tvorbu  $T_H2$  buněk, je produkovaný hlavně bazofily a mastocyty.  $T_H1$  lymfocyty následně produkují IFN- $\gamma$ , který dále podporuje proliferaci a diferenciaci  $T_H1$  a zároveň silně inhibuje vývoj  $T_H2$ . Také ale produkují IL-2, který působí na  $T_H2$  stimulačně.  $T_H2$  lymfocyty zase tvoří IL-4 a IL-10, které inhibují vznik a vývoj  $T_H1$ . Regulace imunitních odpovědí  $T_H1$  a  $T_H2$  je velmi důležitá, jak může být dokumentováno v případě intracelulárních mikrobiálních infekcí. Typickým příkladem bývá onemocnění způsobené *Mycobacterium leprae*. Pokud vznikají při této infekci  $T_H1$  lymfocyty, které mají schopnost aktivovat makrofágy, v jejichž fagosomech bakterie žijí, průběh infekce je mírný, projevující se několika černými puchýřky na kůži. V případě, že vznikají převážně  $T_H2$  lymfocyty, pak protilátky produkované B buňkami nemají

schopnost bakterie uvnitř makrofágů eliminovat a onemocnění se projevuje diseminovanou formou [20; 46].

### 3.3.5 Funkce CD8 lymfocytů

T<sub>C</sub> lymfocyty se vyznačují svou primární funkcí rozeznávat a ničit buňky napadené viry, bakteriemi a dalšími parazity. Také ničí jinak poškozené buňky a některé nádorové buňky. T<sub>C</sub> buňky se setkávají s antigenem přímo na povrchu dendritických buněk i makrofágů většinou v lymfatické uzlině. Proliferaci a diferenciaci T<sub>C</sub> napomáhají T<sub>H</sub>1 lymfocyty sekrecí IL-2, jenž podporuje jejich aktivitu. Cytotoxický účinek na cílovou buňku může probíhat kontaktně nebo produkcí cytokinů. T<sub>C</sub> lymfocyty obsahují granula, ve kterých jsou uloženy specializované proteiny - perforiny a proteázy - granzymy. Při kontaktu T<sub>C</sub> s poškozenou buňkou dojde k degranulaci. Perforin tvoří v membráně poškozené buňky póry, kterými do buňky proniknou granzymy a zapříčiní apoptotickou smrt buňky. Podobně funguje i Fas-ligand protein na povrchu T<sub>C</sub>, který se váže na apoptotický receptor na povrchu poškozené buňky. T<sub>C</sub> buňky syntetizují cytokin TNF- $\beta$ , který indukuje apoptózu. TNF- $\beta$  je méně specifický než předchozí dva systémy, ale není k němu potřeba tak velká populace efektorových T<sub>C</sub> přítomných ve tkáni [20].



### 3.4 Monocyty

Dalším z druhů leukocytů jsou monocyty, které tvoří nezbytnou část nespecifické imunity. Vznikají v kostní dřeni z kmenových buněk CD34 a diferencují se z myeloidní linie. Procentuální zastoupení monocytů v celkovém počtu leukocytů lidské periferní krve představuje 2 až 12 %. Stádia dozrávání monocytů jsou: monoblast, promonocyt a monocyt, z kterého dále v tkáních vznikají makrofágy nebo dendritické buňky. V současné době se prokázalo, že existují určité populace dendritických buněk, které nevznikají z monocytů ale přímo z progenitoru v kostní dřeni a nejsou závislé na aktivitě monocytů. Monocyty cirkulují v krvi několik hodin/dní a poté procesem zvaným diapedéza pronikají do tkání, kde uplatňují svoji schopnost fagocytózy. Dalšími fagocyty jsou například neutrofilů [20; 45].

Diapedéza je chemotakticky řízena látkami, které jsou uvolňovány buňkami v místě poškození. Mezi zmiňované látky patří zánětlivé cytokiny, produkty komplementu a bakteriální produkty. Pro neutrofilů je hlavní chemotaktickou látkou IL-8, pro monocyty MIP- $\alpha,\beta$  (makrofágový zánětlivý protein). Do postižených tkání se fagocyty dostávají mezi jednotlivými endoteliálními buňkami cév. Na povrchu endoteliálních buněk se nachází protein mucin, který se váže na adhezivní molekulu selektin nacházející se na povrchu fagocytu. Dochází k reverzibilnímu zachycení fagocytu v cévním řečišti. Pokud jsou přítomny např. zánětlivé cytokiny, dojde k navázání adhezivní molekuly integrinu na povrchu fagocytu na povrchový glykoprotein VCAM-1 (vaskulární adhezivní molekula) přítomný na povrchu endotelií. U neutrofilů se jedná o glykoprotein ICAM-1 (mezibuněčná adhezivní molekula). Vzniklá vazba je ireverzibilní a způsobuje vycestování fagocytu z cévního řečiště do tkání skrz štěrbinu mezi endoteliálními buňkami [20].

### 3.4.1 Funkce makrofágů a dendritických buněk

Monocyty cirkulující v krvi nemají kromě produkce určitých cytokinů velký význam na rozdíl od svých tkáňových forem. Cytokiny produkované monocyty jsou IL-19 a IL-20, které indukují produkci TNF [20].

Hlavní funkcí makrofágů je schopnost fagocytózy infikovaných nebo jinak poškozených buněk. Buňku postupně obklopují pseudopodie makrofágu, až okolo ní vznikne nová vakuola neboli fagosom. Už během tvorby fagosomu dochází ke spojení s lysosomy a vzniká tzv. fagolysosom. Lysosomy obsahují řadu baktericidních látek v prostředí s nízkým pH. Na povrchu makrofágů se nacházejí proteiny – lektiny, které interagují se sacharidovými částmi mikrobiálních glykoproteinů a polysacharidů. Nejvýznamnější lektin na povrchu fagocytů je manózoový a galaktózoový receptor. Makrofág také slouží jako APC, která se vyznačuje schopností exprimovat antigeny na svém povrchu a předkládat je lymfocytům. Makrofágy převážně komunikují s  $T_C$  a  $T_H1$  lymfocyty. Dalšími důležitými receptory na makrofázích jsou tzv. Fc receptory, které jsou schopny vázat Fc konec imunoglobulinů. Makrofágy také produkují cytokiny, které působí na řadu různých procesů (např. IL-1 stimuluje T lymfocyty k produkci TNF a IL-8, který slouží jako hlavní chemokin).

Určité makrofágy „trvale“ osidlují jisté tkáně, od nichž se odvíjí jejich specifické názvy. Makrofágy přítomné v játrech jsou označovány jako Kupfferovy buňky, v kostech osteoklasty a v mozku mikroglie [20].

Dendritické buňky (DC, dendritic cells) jsou považovány za profesionální APC, které komunikují a předkládají antigeny, exprimované na svém povrchu na MHC,  $T_H1$  i  $T_H2$  lymfocytům. Dendritické buňky se vyskytují v organismu ve zralé a nezralé formě. Nezralé formy se nacházejí především ve tkáních, kde se vyskytují na rozhraní tkáně a okolního prostředí, a to z důvodu přímého

kontaktem s antigeny. Největší počet DC se vyskytuje v kůži, a ve sliznicích dýchacího a trávicího ústrojí, kde DC vystrkují své výběžky do okolního prostředí a aktivně odebírají vzorky antigenů. Nezralé DC za normálních podmínek likvidují přirozeně odumřelé buňky tkání, pokud ale rozpoznají antigen, který by mohl ohrozit organismus, aktivují se a diferencují na zralé DC. Zralé DC migrují z tkání do lymfatických uzlin a stanou se z nich zralé APC exprimující konstimulační molekuly CD80 a CD86. DC také produkují řadu cytokinů. Například IL-23, který podporuje proliferaci paměťových T buněk a zvyšuje produkci IFN- $\gamma$  [20; 47].

## **4 METODIKA**

### **4.1 Odběr pupečnickové krve**

Přibližně 30 ml pupečnickové krve bylo odebráno do sterilních transfuzních odběrových nádob obsahujících 0,3 ml heparinu (10j/ml). Krev byla a promíchána a skladována cca 1 hodinu při 20°C. Krev byla odebrána v Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze Podolí.

### **4.2 Izolace mononukleární frakce**

Mononukleární frakce leukocytů byla separována centrifugací za využití hustotního gradientu. Tato centrifugace způsobí, že erytrocyty a zralé neutrofilů klesnou na dno a mezi vrstvou plasmy a Ficollu se vytvoří prstýnek tvořený mononukleárními leukocyty, což jsou monocyty, lymfocyty a nezralé neutrofilů viz Obrázek 3 a 4 níže. Centrifugace musí proběhnout se samovolným dojezdem, tzv.: bez brždění, aby nedošlo k promíchání jednotlivých oddělených fází.

#### **4.2.1 Materiál a přístrojové vybavení**

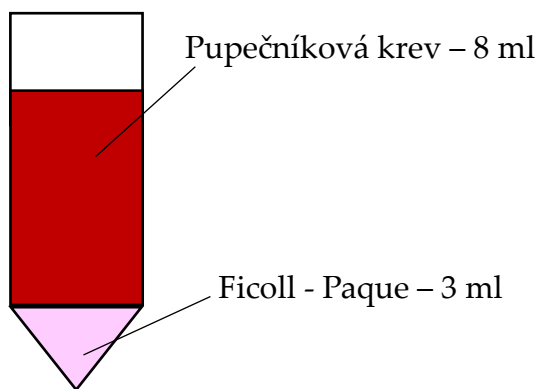
- 4 až 6 zkumavek s víčkem; 15ml;
- pipety;
- centrifuga.

#### **4.2.2 Reagencie a biologický materiál**

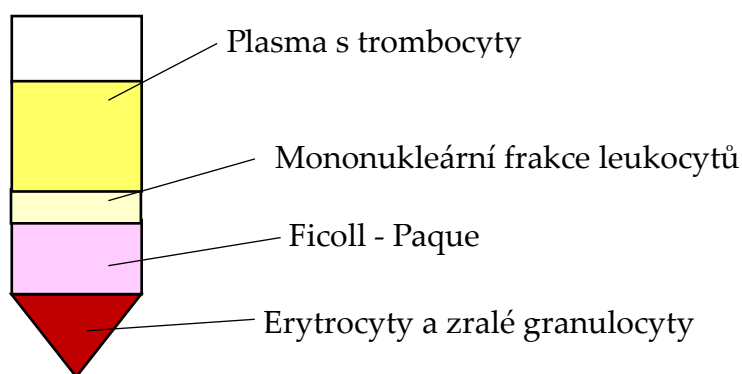
- Pupečnicková krev;
- Ficoll - Paque™ PLUS.

### 4.2.3 Pracovní postup

- 1) Převrstvení krve na Ficoll – Paque™ PLUS (GE Healthcare), do 15ml zkumavek 3 ml Ficollu a převrstvit 8 ml pupečnickové krve (na jednu krev 4-6 zkumavek).
- 2) Centrifugace: 30 min, 1 800 ot./min, (300g), 20°C, bez brždění
- 3) Odsát plasmu až k prstýnku leukocytů.
- 4) Odsát prstýnek leukocytů s minimálním objemem Ficollu sterilní pipetou, přenést do nové zkumavky a doplnit zkumavky do objemu cca 12 ml fyziologickým roztokem.
- 5) Centrifugace: 10 min, 2 500 ot./min, (1050g), 20°C
- 6) Slít supernatant, roztřepat peletu a přidat 4-8 ml fyziologického roztoku, pipetou promíchat, přenést peletu buněk ze dvou zkumavek do jedné a doplnit zkumavky do cca 12 ml fyziologickým roztokem.
- 7) Centrifugace: 10 min, 1 800 ot./min, (300g), 20°C
- 8) Slít supernatant, roztřepat peletu a přidat 4-8 ml fyziologického roztoku, pipetou promíchat, přenést peletu buněk ze dvou zkumavek do jedné a doplnit zkumavky do cca 12 ml fyziologickým roztokem.
- 9) Centrifugace: 10 min, 1 800 ot./min, (300g), 20°C
- 10) Slít supernatant, roztřepat peletu.
- 11) Z pelety odebrat 2  $\mu$ l buněčné suspenze na určení životnosti.
- 12) K peletě přidat 5-6 ml připraveného kultivačního média RPMI 1640 (Sigma Aldrich).



Obrázek 3 - Převrstvená pupečníková krev na Ficollu před centrifugací [vlastní zdroj]



Obrázek 4 - Pupečníková krev po centrifugaci [vlastní zdroj]

#### 4.2.4 Příprava kultivačního media RPMI

- Medium RPMI – 1640 Medium (Sigma-Aldrich) With L-glutamine and sodium bicarbonate, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (katalogové číslo R8758-500ML);
- Pufrovací činidlo kyseliny sulfonové, dále jako Hapes (Sigma-Aldrich H3375); přidáváno z důvodu udržení optimálního pH prostředí;
- Gentamycin (Sandoz a Novartis company) 80mg/2ml; přidáváno z důvodu možné kontaminace z okolního prostředí;

- Fetální bovinní sérum, dále jako FBS (Bio sera) FB-1101/500; přidáváno z důvodu optimalizace kultivačního media.

$$V_{\text{celkový}} = 99,3 \text{ ml}$$

$$V_{\text{RPMI}} = 89 \text{ ml}$$

$$V_{\text{HEPES}} = 200 \mu\text{l}$$

$$V_{\text{GENTAMYCIN}} = 100 \mu\text{l}$$

$$V_{\text{FBS}} = 10 \text{ ml}$$

### 4.3 Stanovení životnosti a počtu buněk

Životnost buněk se určuje kvůli zaručení dostatečného množství živých buněk ve vzorku pro následné stimulační *in vitro*. Pokud je životnost buněk menší než 75 %, tento vzorek mononukleární frakce leukocytů se do pokusu nezahrnuje.

Suspenze se pipetuje do Türkova roztoku, protože je schopen lyzovat zbylé erythrocyty ve vzorku. Počet buněk se stanovuje z důvodu zjištění zastoupení buněk obsažených v jednom ml kultivačního media, neboť při stanovení vlivů různých koncentrací manumycinu A na expresi v buňkách pupečnickové krve probíhají tyto stimulační v kultivačních destičkách, kde v každé jamce jsou 2 miliony buněk.

#### 4.3.1 Materiál a přístrojové vybavení

- Podložní sklíčka;
- krycí sklíčka;
- pipeta;
- mikroskop;
- Bürkerova komůrka;
- eppendorfova zkumavka;

- vortex;
- mikroskop Olympus bx41.

#### 4.3.2 Reagencie

- Türkův roztok;
- trypanová modř.

#### 4.3.3 Postup stanovení životnosti buněk

- 1) Z pelety odebrat 2  $\mu$ l suspence a přenést je na podložní sklíčko.
- 2) K buněčné suspenzi na sklíčku přidat 2  $\mu$ l trypanové modři, špičkou promíchat a přiložit krycí sklíčko.
- 3) Preparát vložit do mikroskopu, počítat do 100 buněk (buňky, které jsou modře obarvené jsou mrtvé).
- 4) Podle počtu mrtvých a živých buněk určíme životnost v %.

#### 4.3.4 Postup stanovení počtu buněk

- 1) Z promíchané suspenze buněk s kultivačním činidlem odebrat 50  $\mu$ l a přenést do eppendorfovy zkumavky s 950  $\mu$ l Türkova roztoku.
- 2) Nechat 10 minut stát.
- 3) Promíchat na vortexu a napipetovat do Bürkerovy komůrky.
- 4) Spočítat 2 x 50 polí, systémem L.
- 5) Průměr výsledků z obou 50ti polí = koncentrace buněk/ml x  $10^5$ .
- 6) Promíchat na vortexu a nechat 10 minut stát.



## 4.4 Stimulace buněk manumycinem A *in vitro*

V tomto pokusu byly buňky inkubovány po dobu jedné a čtyř hodin s manumycinem A o koncentraci 5; 1; 0,25; 0,0125  $\mu\text{mol/l}$ , přičemž zásobní roztok manumycinu A měl koncentraci 1000  $\mu\text{mol/l}$ . Jako stimulant byl použit lipopolysacharid, dále jako LPS, o koncentraci 1 mg/ml, objem jamky v kultivační destičce byl doplněn do celkového objemu 2 ml suplementovaným kultivačním médiem RPMI obsahujícího  $2 \times 10^6$  buněk. (výsledná koncentrace lipopolysacharidu v kultivační jamce je 1  $\mu\text{g/ml}$ ).

### 4.4.1 Materiál a přístrojové vybavení

- Kultivační destičky o objemu jedné jamky 3 ml;
- pipeta;
- termostat.

### 4.4.2 Reagencie

- Vzorky;
- kultivační médium RPMI;
- manumycin A (Sigma-Aldrich) M6418;
- lipopolysacharid, dále jako LPS (Sigma-Aldrich) z *Escherichia coli*; o26:B6.

### 4.4.3 Pracovní postup stimulace

- 1) K stimulaci do každé jamky vždy  $2 \times 10^6$  buněk.
- 2) Do každé jamky kromě Kontrol (K) přidat 2  $\mu\text{l}$  lipopolysacharidu (LPS).
- 3) Do jamek přidat určité množství roztoku manumycinu A o různé koncentraci.

- 4) Všechny jamky doplnit do celkového objemu 2 ml kultivačním roztokem RPMI.
- 5) Inkubovat v termostatu při 37°C a 5,5% CO<sub>2</sub> po dobu jedné a čtyř hodin.

## 4.5 Izolace RNA

Po uplynutí inkubační doby je zapotřebí odebrat supernatant a rozrušit buněčnou membránu pomocí lyzačního roztoku, aby z buněk mohla být izolována RNA. RNA byla izolována pomocí **RNeasy Mini Kit 250** (Qiagen, Germany)

### 4.5.1 Materiál a přístrojové vybavení

- Pipety;
- centrifuga;
- eppendorfovy zkumavky 1,5ml;
- eppendorfovy zkumavky 2ml;
- stojan na zkumavky.

### 4.5.2 Reagencie

- 75% ethanol;
- vzorky;
- merkaptoethanol (Sigma Aldrich);
- RLT lysis buffer (Qiagen, Germany) RNeasy Mini Kit 250

### 4.5.3 Příprava lyzačního roztoku

merkaptoethanol

RLT lysis buffer

$$V_{\text{roztoku na jeden vzorek}} = 350 \mu\text{l}$$

$$n_{\text{vzorků}} = 7$$

$$V_{\text{celkový}} = 2450 \mu\text{l}$$

$$V_{\text{RLT buffer}} = 2500 \mu\text{l}$$

$$V_{\text{mercaptoethanol}} = 25 \mu\text{l}$$

### 4.5.4 Pracovní postup izolace RNA

- 1) Veškerý objem přenést z jamek do eppendorfových zkumavek 2ml.
- 2) Centrifugace: 10 min, 1 800 ot./min, 20°C (300 g)
- 3) Odebrat supernatant do zvláštní zkumavky a uložit pro případné další stanovení.
- 4) Z pelety určit životnost viz 4.3
- 5) K peletám přidat 350  $\mu\text{l}$  připraveného lyzačního roztoku.
- 6) Promíchat na vortexu, nechat 5 minut stát.
- 7) Zamrazit na -80°C.
- 8) Po rozmražení vzorků přidat 350  $\mu\text{l}$  chladného 75% ethanolu, důkladně špičkou promíchat a přemístit na kolonky.

Centrifugace: 15 000 ot./min (4000 g), 15 sekund, 20° C

Odlít prošlý roztok ze spodního dílu a vrátit kolonku zpět.

- 9) Přidat 350  $\mu\text{l}$  roztoku RW1.

Centrifugace: 15 000 ot./min (4000 g), 15 sekund, 20° C

Odlít prošlý roztok ze spodního dílu a vrátit kolonku zpět.

10) Přidat 75  $\mu$ l roztoku DNázy.

Příprava roztoku DNázy na jeden vzorek ze zásobního roztoku: 10  $\mu$ l DNázy + 70  $\mu$ l RDD pufru, 10 x promíchat překlápěním.

Nechat 15 minut stát.

11) Přidat 350  $\mu$ l roztoku RW1.

Centrifugace: 15 000 ot./min (4000 g), 15 sekund, 20° C

Odlít prošlý roztok ze spodního dílu a vrátit kolonku zpět.

12) Přidat 500  $\mu$ l roztoku RPE.

Centrifugace: 15 000 ot./min (4000 g), 15 sekund, 20° C

Odlít prošlý roztok ze spodního dílu a vrátit kolonku zpět.

13) Přidat 500  $\mu$ l roztoku RPE.

Centrifugace: 15 000 ot./min (4000 g), 15 sekund, 20° C

Odlít prošlý roztok ze spodního dílu a vrátit kolonku zpět.

14) Vyměnit spodní díl.

Centrifugace: 15 000 ot./min (4000 g), 60 sekund, 20° C

15) Vyměnit spodní díl za eppendorfovu zkumavku a přidat 25  $\mu$ l RNA-free H<sub>2</sub>O.

Centrifugace: 15 000 ot./min (4000 g), 60 sekund, 20° C

16) Eppendorfovu zkumavku s izolovanou RNA zamrazit na -80°C.

## 4.6 Měření koncentrace RNA – Nanodrop

Přístroj Nanodrop-1000 je spektrofotometr, který je schopen přesně stanovit velmi malé koncentrace látek za použití minimálního objemu vzorku. U tohoto měření nejsou za potřebí kyvety nebo kapiláry, vzorek se nanáší přímo na měřící plochu, kde vytvoří kapku a pomocí přiklopení horního raménka vznikne kapalinový sloupec. Tato metoda využívá vlastností povrchového napětí kapalin. Systém využívá krátkých vlnových délek UV spektra za použití optických

vláken. Koncentrace RNA se měří při vlnové délce 260 nm, kde se nachází nejvyšší absorpance RNA/DNA. Zobrazené poměrové indexy 260/280 a 260/230 udávají čistotu stanovovaného vzorku. Index 260/280 by měl být kolem 1,8 a vyšší index 260/230 má být v rozmezí 1,8 - 2,2. Odchýlené hodnoty znamenají znečištění vzorku [48].

#### 4.6.1 Materiál a přístrojové vybavení

- Pipeta;
- spektrofotometr Nanodrop-1000 (Thermo Scientific, USA).

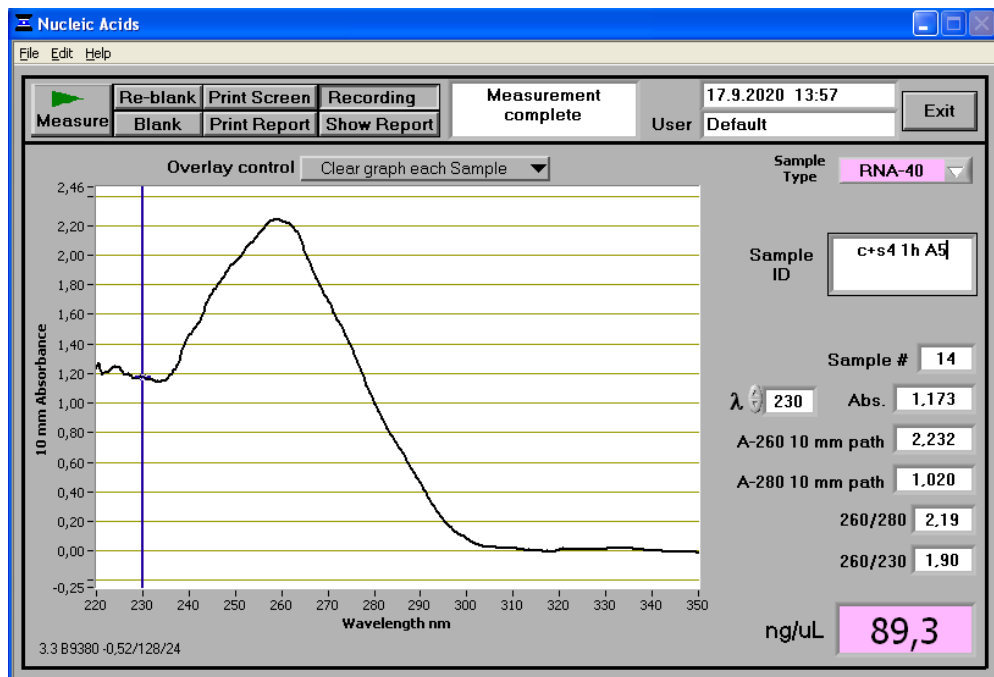
#### 4.6.2 Reagencie

- Vzorky;
- RNasy free H<sub>2</sub>O (Qiagen, Germany).

#### 4.6.3 Pracovní postup

- 1) Na monitoru počítače spustit program ND-1000 V 3.8.1 a zvolit funkci Nucleic Acid.
- 2) Odklopit raménko s optickým kabelem a ubrouskem otřít horní i dolní část plochy pro nanášení vzorku.
- 3) Na dolní plochu nanést 2  $\mu$ l RNasy free H<sub>2</sub>O a zaklopit raménko s optickým kabelem, Nestlačovat!
- 4) Po stisknutí OK proběhne inicializace přístroje.
- 5) Odklopit raménko, ubrouskem otřít horní i dolní část plochy pro nanášení vzorku.
- 6) Nanést 2  $\mu$ l RNasy free H<sub>2</sub>O, zaklopit raménko.
- 7) Stisknout Blank, proběhne vynulování přístroje a na obrazovce se zobrazí koncentrace 0,0 ng/ $\mu$ l.

- 8) Odklopit raménko, otřít horní i dolní část plochy pro nanášení vzorku.
- 9) Nanést 2  $\mu\text{l}$  vzorku, zaklopit raménko a vybrat z nabídky měření RNA.
- 10) Stisknout Measure, objeví se křivka s maximem na 260 nm, koncentrace stanovované RNA v  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , index 260/280 a index 260/230 viz Obrázek 5.
- 11) Odklopit raménko, otřít horní i dolní část plochy pro nanášení vzorku.
- 12) Nanést 2  $\mu\text{l}$  dalšího vzorku, zaklopit raménko a stisknout Measure.
- 13) Tento postup opakovat do naměření všech vzorků.
- 14) Po skončení měření nanést 4  $\mu\text{l}$  RNasy free  $\text{H}_2\text{O}$ , zavřít raménko a nechat 3 minuty stát.
- 15) Odklopit raménko, osušit a nechat zavřené.



Obrázek 5 - Graf z přístroje Nanodrop-1000 [vlastní zdroj]

## 4.7 RT-PCR

Reverzní transkripce (RT-PCR; reverse transcription polymerase chain reaction) je jednou z mnoha modifikací klasické polymerázové řetězové reakce (PCR). Tato metoda umožňuje přepis genetické informace ve formě izolované RNA na komplementární řetězec DNA (cDNA). Tento proces probíhá za použití enzymu reverzní transkriptázy [49; 50].

### 4.7.1 Materiál a přístrojové vybavení

- MJ RESEARCH - Peltier Thermal Cycler – 200;
- folie na PCR destičky (Sealing Foil; Roche);
- PCR destičky (Multiwell Plate 96, white; Roche).

### 4.7.2 Reagencie

- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems);
- vzorky RNA.

### 4.7.3 Pracovní postup RT-PCR

Reverzní transkripce proběhne v objemu 10  $\mu$ l.

- 1) Přepočítat vyrovnání koncentrací jednotlivých vzorků podle koncentrace RNA z Nanodropu.
- 2) K 5  $\mu$ l RNA přidat 5  $\mu$ l premixu viz Tabulka 1.
- 3) Přidat 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.
- 4) Promíchat pomocí vortexu.
- 5) Vložit destičku do Thermo cycleru – MJ RESARCH.

Tabulka 1 - Složení premixu [vlastní zdroj]

| složky premixu      | objem složek (μl) |
|---------------------|-------------------|
| 10x RT buffer       | 1                 |
| 25x dNTP mix        | 0,4               |
| 10x náhodné primery | 1                 |
| RT                  | 0,5               |
| RNase inhibitor     | 0,5               |
| H <sub>2</sub> O    | 1,6               |
| celkem              | <b>5 μl</b>       |

Přepočet vyrovnání koncentrací:

$$c_{RNA} = 72,04 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$V_{celkový} = 50 \mu\text{l}$$

Do reverzní transkripce je potřeba 250 ng RNA v objemu 5 μl.

$$72,04 \text{ ng} \dots\dots\dots 1 \mu\text{l}$$

$$250 \text{ ng} \dots\dots\dots x \mu\text{l}$$

---


$$x = \frac{250}{72,04} = 3,47 \mu\text{l RNA} \Rightarrow \text{do celkového objemu } 5 \mu\text{l doplnit } 1,53 \mu\text{l H}_2\text{O}$$



## 4.8 q-PCR

Kvantitativní PCR je další z mnoha modifikací klasické PCR reakce. Tato metoda umožňuje sledovat přírůstek produktu po každém cyklu v reálném čase. Využívá se fluorescence tzv.: fluorescenčních sond (též nazývaných hydrolyzační sondy), které se vážou na určitý úsek amplifikované DNA. Fluorescenční sondy jsou oligonukleotidy, které jsou na jednom konci značeny fluorescenční značkou a na druhém konci zhasěčem. Vlastní PCR probíhá obvyklým způsobem až do chvíle, kdy DNA polymeráza syntetizovaného řetězce narazí na navázanou sondu. Polymeráza tuto sondu vytěsňuje svojí exonukleázovou aktivitou, dochází k odštěpení fluorescenční značky a tím k vlastní fluorescenci, která je detekována přístrojem na konci každého cyklu. Hodnota prahové fluorescence udává hodnotu cyklu, při kterém dojde k překročení fluorescence nad zvolenou prahovou hodnotu [49; 50].

### 4.8.1 Materiál a přístrojové vybavení

- Pipeta;
- folie na PCR destičky (LightCycler 480 Sealing Foil; Roche);
- PCR destičky (LightCycler 480 Multiwell Plate 384, white; Roche);
- LightCycler 480 Real-Time PCR Instrument.

### 4.8.2 Reagencie

- Sonda *Il1b* (Hs00174097\_m1);
- sonda *Il4* (Hs00174122\_m1);
- sonda *Il6* (Hs00174131\_m1);
- sonda *Il10* (Hs00174086\_m1);
- sonda *Ifng* (Hs00174143\_m1);
- sonda *Tnfa* (Hs00174128\_m1);

- sonda *Actb* (Hs99999903\_m1);
- Luna Universal Probe qPCR Master Mix (BioLabs Inc.);
- RNase free H<sub>2</sub>O.

#### 4.8.3 Pracovní postup

Na kvantitativní PCR je potřeba 2  $\mu$ l cDNA. Objem 50  $\mu$ l z RT-PCR stačí na 25 jamek. Použité sondy obsahují kromě vlastní proby i forward a reverse primery specifické pro daný gen.

- 1) Ke 2  $\mu$ l cDNA přidat 8  $\mu$ l směsi MasterMix, RNase free H<sub>2</sub>O a Sonda viz Tabulka 2.
- 2) Vložit destičku do přístroje LightCycler 480 Real-Time PCR.

*Tabulka 2 - Složení reakční směsi [vlastní zdroj]*

| <b>složení směsi</b>        | <b>objem složek (<math>\mu</math>l)</b> |
|-----------------------------|---|
| MasterMix                   | 5                                       |
| Sonda                       | 0,5                                     |
| RNase free H <sub>2</sub> O | 2,5                                     |
| <b>celkem</b>               | <b>8 <math>\mu</math>l</b>              |

## 4.9 Analýza a statistika

Z mononukleární frakce leukocytů pupečnickové krve byla izolována RNA, která byla následně pomocí reverzní transkripce přepsána na cDNA. Dále byla pomocí PCR v reálném čase stanovena hodnota ct. Tato hodnota udává, při kterém cyklu dochází k překročení intenzity fluorescence nad zvolenou prahovou hodnotu. Hodnoty ct byly získány pro *Il1b*, *Il4*, *Il6*, *Il10*, *Tnfa*, *Ifng* a *Actb*. Kódující protein pro beta-aktin (*Actb*) byl použit jako referenční gen. ACTB patří do rodiny tzv. house-keeping genů. Hodnoty ct jednotlivých cytokinů bylo nutné zprůměrovat a přepočítat na hodnoty relativní kvantifikace (exprese) pomocí jednotlivých vzorců viz Tabulka 3 a 4.

$$\Delta ct_{Il6} = ct_{Il6} - ct_{Actb}$$

$$\Delta \Delta ct_{Il6} = \Delta ct_{Il6} - \Phi \Delta ct_{Il6 \text{ kontrol}}$$

$$exprese = 2^{-\Delta \Delta ct_{Il6}}$$

Tabulka 3 - Hodnoty ct *Actb* [vlastní zdroj]

| <i>Actb</i> 1h | ct I. | ct II. | ct    |
|----------------|-------|--------|-------|
| K1             | 18,97 | 19,06  | 19,02 |
| LPS            | 19,24 | 19,44  | 19,34 |
| A5             | 18,72 | 18,94  | 18,83 |
| A1             | 19,26 | 19,27  | 19,27 |
| A0,25          | 19,12 | 19,23  | 19,18 |
| A0,125         | 19,15 | 19,22  | 19,19 |
| K2             | 18,51 | 18,49  | 18,50 |

Tabulka 4 - Hodnoty ct a exprese Il6 [vlastní zdroj]

| <b>Il6 1h</b> | ct I. | ct II. | <b>ct</b>    | $\Delta$ ct | $\Delta\Delta$ ct | <b>exprese</b> |
|---------------|-------|--------|--------------|-------------|-------------------|----------------|
| K1            | 30,92 | 30,97  | <b>30,95</b> | 11,93       | 0,40              | <b>0,76</b>    |
| LPS           | 23,38 | 23,05  | <b>25,74</b> | 3,88        | -7,65             | <b>201,41</b>  |
| A5            | 25,96 | 25,51  | <b>23,27</b> | 6,91        | -4,62             | <b>24,66</b>   |
| A1            | 23,43 | 23,11  | <b>23,27</b> | 4,01        | -7,52             | <b>184,06</b>  |
| A0,25         | 23,39 | 23,20  | <b>23,29</b> | 4,12        | -7,41             | <b>170,54</b>  |
| A0,125        | 23,24 | 23,10  | <b>23,17</b> | 3,99        | -7,54             | <b>186,63</b>  |
| K2            | 30,78 | 30,58  | <b>30,68</b> | 12,18       | 0,65              | <b>0,64</b>    |

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| $\Phi\Delta$ ct všech kontrol Il6 | 11,53 |
|-----------------------------------|-------|

Expresie cytokinů byla stanovena ve čtyřech vzorcích mononukleární frakce leukocytů pupečnickové krve. Leukocyty byly stimulovány různými koncentracemi (5  $\mu$ mol/l; 1  $\mu$ mol/l; 0,25  $\mu$ mol/l a 0,125  $\mu$ mol/l) manumycinu A po dobu jedné a čtyř hodin. Hodnoty expresí jednotlivých cytokinů byly zprůměrovány a určena jejich střední chyba průměru. Grafy jednotlivých expresí byly analyzovány a graficky zpracovány v programu GraphPad, přičemž ke statistickému vyhodnocení bylo využito Anova testu. Hodnoty statistické významnosti jsou uvedeny takto: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

Veškeré použité metodické postupy byly zavedeny Ústavem imunologie a mikrobiologie při 1. lékařské fakultě, University Karlovy.

## 5 VÝSLEDKY

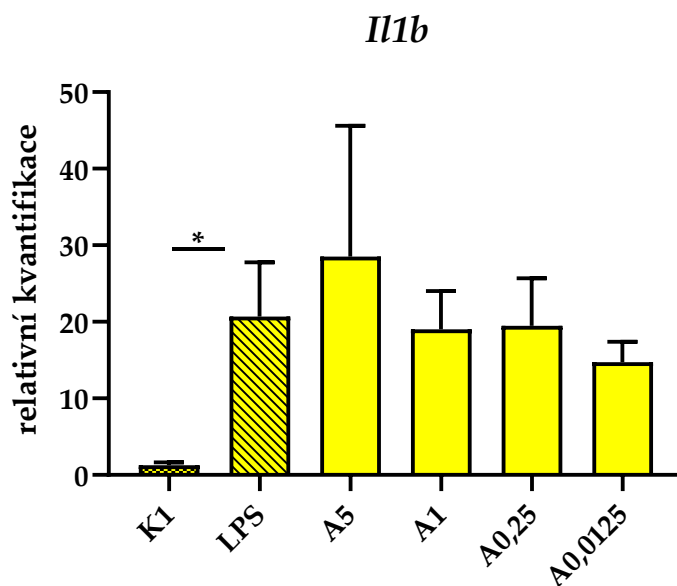
Leukocyty mononukleární frakce pupečnickové krve (CBMC; cord blood mononuclear cells) byly inkubovány po dobu jedné a čtyř hodin s manumycinem A o různých koncentracích (5; 1; 0,25; 0,0125  $\mu\text{M}$ ). Jako stimulant produkce cytokinů byl použit lipopolysacharid (LPS) o koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$ . Po jedné či čtyřech hodinách kultivace CBMC s LPS a různými koncentracemi manumycinu A byla z buněk izolovaná RNA, která byla pomocí reverzní transkripce převedena na komplementární DNA (cDNA). Hladina genové exprese cytokinů pak byla stanovena pomocí kvantitativní PCR v reálném čase. Tento pokus byl proveden u tří až čtyř vzorků pupečnickové krve. Stanovovanými cytokiny byly IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ .

Jako kontrola byly použity CBMC, které nebyly stimulovány ani LPS a ani k nim nebyl přidán manumycin A (K). Jako pozitivní kontrola byly použity CBMC stimulované pouze LPS. Předpokládali jsme, že budeme pozorovat koncentračně závislý imunopresivní vliv manumycinu A na genovou expresi sledovaných cytokinů. Tedy genová exprese v CBMC stimulovaných LPS by se měla zvyšovat s klesající koncentrací manumycinu A až na úroveň genové exprese CBMC stimulovaných LPS v případě nejnižší koncentrace manumycinu A.

Jednotlivé sloupce grafů představují průměr získaných dat z jednotlivých experimentů a chybové úsečky hodnotu střední chyby průměru. Za statisticky významně rozdílné výsledky byla považována data, kdy p hodnota byla rovna či nižší než 0,05.

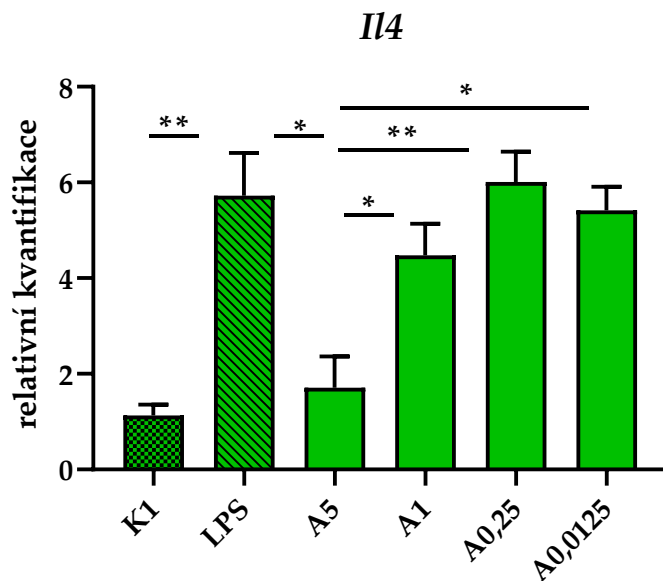
## 5.1 Exprese cytokinů v CBMC po jedné hodině kultivace s LPS a manumycinem A

Stimulace CBMC LPS vedla k signifikantnímu zvýšení genové exprese oproti nestimulované kontrole. U CBMC stimulovaných LPS a zároveň různými koncentracemi manumycinu A nedošlo k významnému poklesu genové exprese *Il1b*. Tedy genová exprese *Il1b* v CBMC stimulovaných LPS a zároveň různými koncentracemi manumycinu A je srovnatelná s genovou expresí CBMC stimulovaných pouze LPS, Obrázek 6.



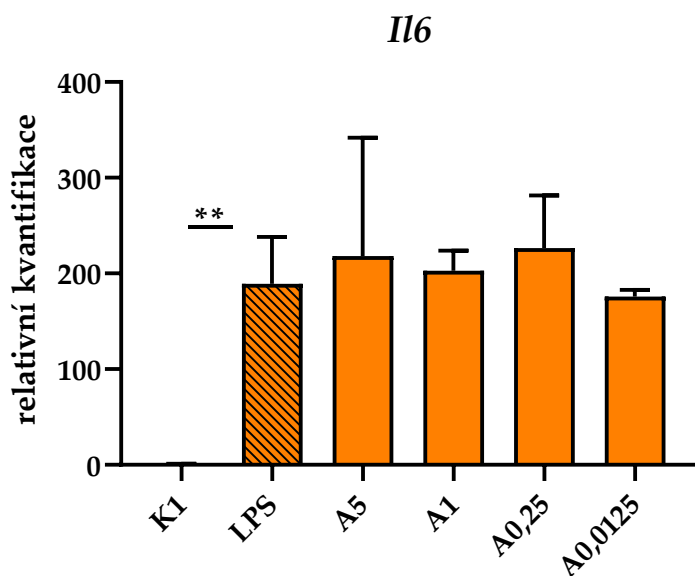
Obrázek 6 - Vliv stimulace manumycinem A na změnu genové exprese *Il1b* v buňkách mononukleární frakce leukocytů pupečnickové krve po jedno-hodinové stimulaci [vlastní zdroj] \*  $p \leq 0,05$ ; **K1** – nestimulovaná kontrola, **LPS** – lipopolysacharid, **A5** – manumycin A o koncentraci 5  $\mu\text{M}$ , **A1** – manumycin A o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , **A0,25** – manumycin A o koncentraci 0,25  $\mu\text{M}$ , **A0,0125** – manumycin A o koncentraci 0,0125  $\mu\text{M}$ .

Genová exprese *Il4* v CBMC stimulovaných LPS je signifikantně zvýšená oproti nestimulované kontrole. 5  $\mu\text{M}$  koncentrace manumycinu A významně snížila genovou expresi *Il4*. U 1  $\mu\text{M}$  koncentrace manumycinu A došlo ke statisticky významnému zvýšení genové exprese *Il4* oproti 5  $\mu\text{M}$  koncentraci manumycinu A ale tato hodnota není statisticky signifikantně nižší v porovnání s genovou expresí *Il4* v CBMC stimulovaných pouze LPS. Stejná situace nastala i při stimulaci CBMC 0,25  $\mu\text{M}$  a 0,0125  $\mu\text{M}$  koncentracemi manumycinu A, kdy došlo k signifikantnímu zvýšení genové exprese *Il4* oproti 5  $\mu\text{M}$  koncentraci manumycinu A, ale tyto hodnoty nejsou statisticky významně odlišné od hodnot genové exprese *Il4* v CBMC stimulovaných samotným LPS. Tedy genová exprese *Il4* v CBMC stimulovaných LPS a zároveň různými koncentracemi manumycinu A se liší pouze u vzorku A5, Obrázek 7.



Obrázek 7 - Změna genové exprese *Il4* po jedné hodině působení manumycinu A [vlastní zdroj] \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; **K1** – nestimulovaná kontrola, **LPS** – lipopolysacharid, **A5** – manumycin A o koncentraci 5  $\mu\text{M}$ , **A1** – manumycin A o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , **A0,25** – manumycin A o koncentraci 0,25  $\mu\text{M}$ , **A0,0125** – manumycin A o koncentraci 0,0125  $\mu\text{M}$ .

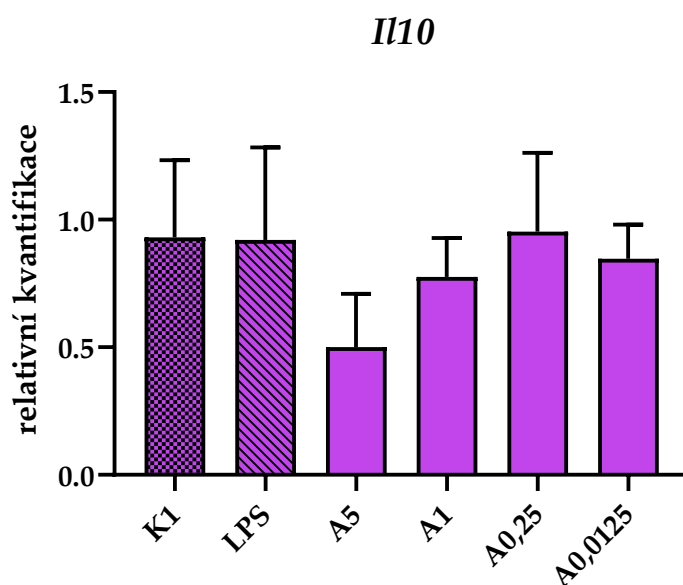
CBMC po stimulaci LPS vykazují statisticky signifikantní zvýšení genové exprese *Il6* v porovnání s nestimulovanými CBMC. Použité koncentrace manumycinu A však nemají v tomto případě žádný vliv na snížení genové exprese *Il6*, Obrázek 8.



Obrázek 8 - Vliv stimulace manumycinem A na změnu genové exprese *Il6* v buňkách mononukleární frakce leukocytů pupečnickové krve po jedno-hodinové stimulaci [vlastní zdroj] \*\*  $p \leq 0,01$ ; **K1** – nestimulovaná kontrola, **LPS** –lipopolysacharid, **A5** – manumycin A o koncentraci 5  $\mu\text{M}$ , **A1** – manumycin A o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , **A0,25** – manumycin A o koncentraci 0,25  $\mu\text{M}$ , **A0,0125** – manumycin A o koncentraci 0,0125  $\mu\text{M}$ .

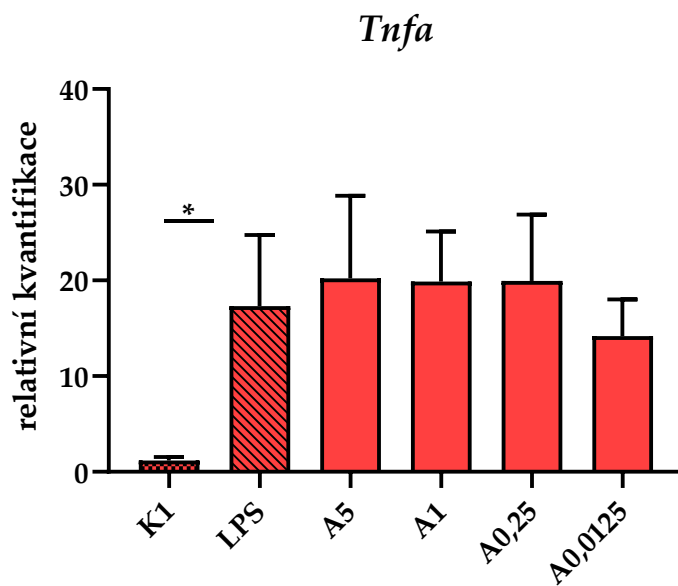


Při stanovení genové exprese *Il10* nedošlo ke zvýšení genové exprese *Il10* u CBMC stimulovaných LPS oproti nestimulované kontrole. U CBMC kultivovaných s různými koncentracemi manumycinu A nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly v genové expresi *Il10* v porovnání jak s nestimulovanými CBMC, tak CBMC stimulovanými LPS, Obrázek 9.



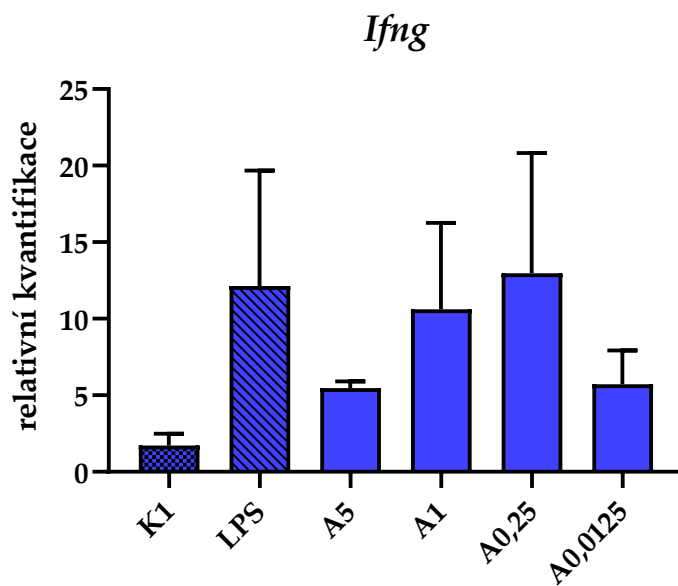
Obrázek 9 - Graf genové exprese *Il10* po jedné hodině působení manumycinu A [vlastní zdroj] **K1** – nestimulovaná kontrola, **LPS** –lipopolysacharid, **A5** – manumycin A o koncentraci 5  $\mu\text{M}$ , **A1** – manumycin A o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , **A0,25** – manumycin A o koncentraci 0,25  $\mu\text{M}$ , **A0,0125** – manumycin A o koncentraci 0,0125  $\mu\text{M}$ .

U CBMC stimulovaných LPS pozorujeme významně zvýšenou genovou expresi *Tnfa* v porovnání s nestimulovanými CBMC. Námi použité koncentrace manumycinu A nevykazují žádnou změnu genové exprese *Tnfa* v porovnání s expresí v buňkách stimulovaných LPS. Tedy genová exprese *Tnfa* v CBMC stimulovaných LPS a zároveň různými koncentracemi manumycinu A je srovnatelná s genovou expresí CBMC stimulovaných pouze LPS, Obrázek 10.



Obrázek 10 - Genová exprese *Tnfa* po jedné hodině působení manumycinu A [vlastní zdroj] \*  $p \leq 0,05$ ; **K1** – nestimulovaná kontrola, **LPS** –lipopolysacharid, **A5** – manumycin A o koncentraci 5  $\mu\text{M}$ , **A1** – manumycin A o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , **A0,25** – manumycin A o koncentraci 0,25  $\mu\text{M}$ , **A0,0125** – manumycin A o koncentraci 0,0125  $\mu\text{M}$

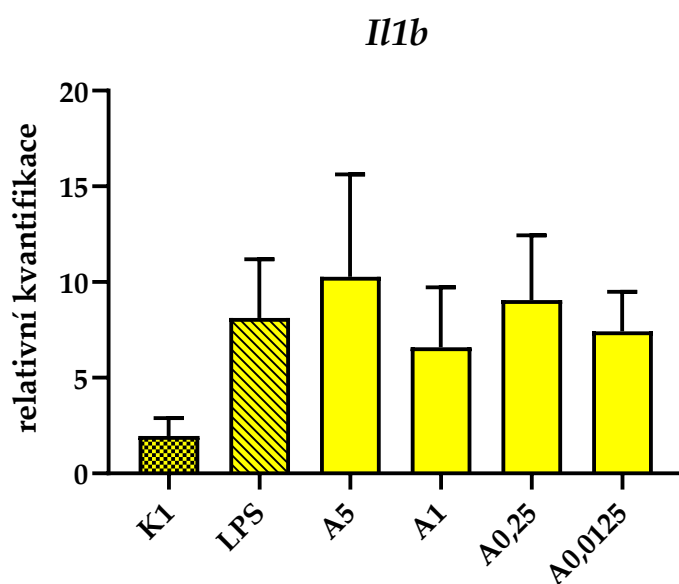
Ačkoliv můžeme pozorovat indukci genové exprese *Ifng* u CBMC stimulovaných LPS ve srovnání s nestimulovanými CBMC, tento rozdíl nedosáhl statisticky významného rozdílu. Podobně můžeme pozorovat trend ke snížení genové exprese *Ifng* při použití nejvyšší koncentrace manumycinu A, ale pozorované potlačení genové exprese nedosáhlo statisticky signifikantního rozdílu, Obrázek 11.



Obrázek 11 - Vliv stimulace manumycinem A na změnu genové exprese *Ifng* v buňkách mononukleární frakce leukocytů pupečnickové krve po jedno-hodinové stimulaci [vlastní zdroj] **K1** – nestimulovaná kontrola, **LPS** –lipopolysacharid, **A5** – manumycin A o koncentraci 5  $\mu\text{M}$ , **A1** – manumycin A o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , **A0,25** – manumycin A o koncentraci 0,25  $\mu\text{M}$ , **A0,0125** – manumycin A o koncentraci 0,0125  $\mu\text{M}$ .

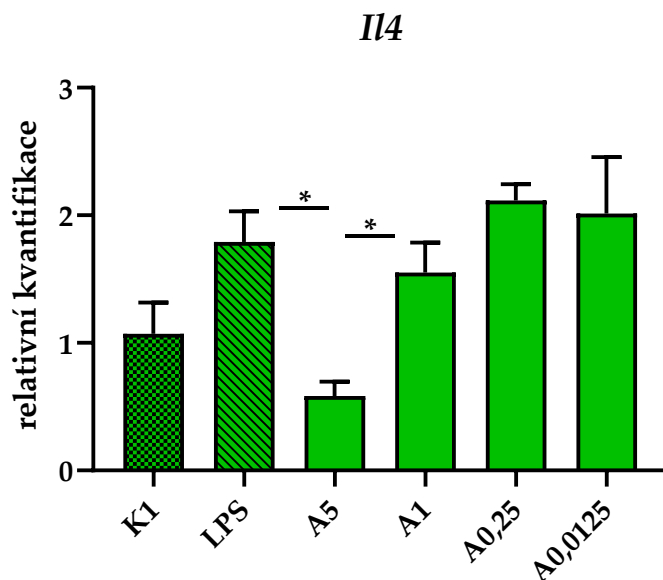
## 5.2 Exprese cytokinů v CBMC po čtyřech hodinách kultivace s LPS a manumycinem A

Při stanovení genové exprese *Il1b* po čtyřech hodinách kultivace CBMC s LPS nedošlo k signifikantnímu zvýšení genové exprese v porovnání s nestimulovanými CBMC. CBMC vystavené různým koncentracím manumycinu A nevykazují žádné změny genové exprese *Il1b* v porovnání s genovou expresí u CBMC stimulovaných pouze LPS. Genová exprese *Il1b* v CBMC stimulovaných LPS a zároveň různými koncentracemi manumycinu A je tedy srovnatelná s genovou expresí CBMC stimulovaných pouze LPS, Obrázek 12.



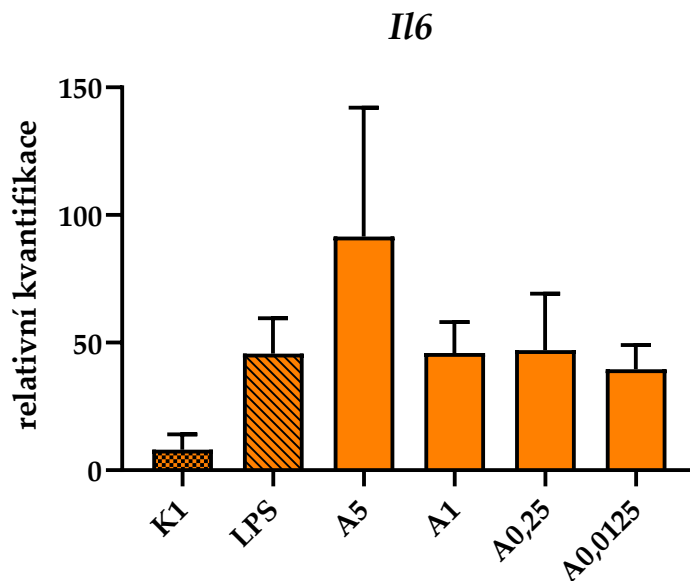
Obrázek 12 - Genová exprese *Il1b* po čtyřech hodinách působení manumycinu A [vlastní zdroj] **K1** – nestimulovaná kontrola, **LPS** – lipopolysacharid, **A5** – manumycin A o koncentraci 5  $\mu\text{M}$ , **A1** – manumycin A o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , **A0,25** – manumycin A o koncentraci 0,25  $\mu\text{M}$ , **A0,0125** – manumycin A o koncentraci 0,0125  $\mu\text{M}$ .

Stimulace CBMC LPS nevedla k významnému zvýšení genové exprese *Il4* oproti nestimulované kontrole. 5  $\mu\text{M}$  koncentrace manumycinu A významně snížila genovou expresi *Il4* v porovnání s expresí v CBMC stimulovaných LPS. U 1  $\mu\text{M}$  koncentrace manumycinu A došlo k podstatné změně genové exprese *Il4* oproti koncentraci manumycinu 5  $\mu\text{M}$ . Při nižších koncentracích manumycinu A k potlačení exprese *Il4* nedošlo. Tedy genová exprese *Il4* v CBMC stimulovaných LPS a zároveň různými koncentracemi manumycinu A se liší pouze u vzorku A5, Obrázek 13.



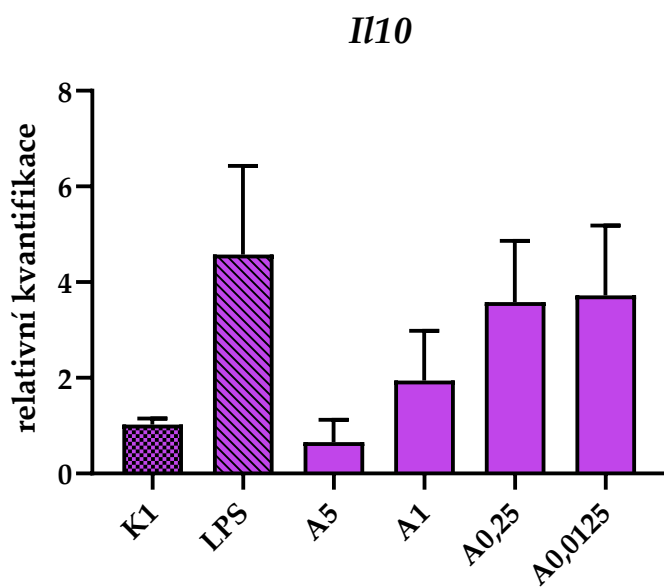
Obrázek 13 - Vliv stimulace manumycinem A na změnu genové exprese *Il4* v buňkách mononukleární frakce leukocytů pupečnickové krve po čtyř-hodinové stimulaci [vlastní zdroj] \*  $p \leq 0,05$ ; **K1** – nestimulovaná kontrola, **LPS** –lipopolysacharid, **A5** – manumycin A o koncentraci 5  $\mu\text{M}$ , **A1** – manumycin A o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , **A0,25** – manumycin A o koncentraci 0,25  $\mu\text{M}$ , **A0,0125** – manumycin A o koncentraci 0,0125  $\mu\text{M}$ .

Genová exprese *Il6* v CBMC stimulovaných LPS není signifikantně zvýšená oproti nestimulované kontrole. CBMC stimulované jak LPS a zároveň různými koncentracemi manumycinu A také nevykazovaly žádné změny v genové expresi *Il6* ve srovnání s hladinou genové exprese u CBMC stimulovaných pouze LPS, Obrázek 14.



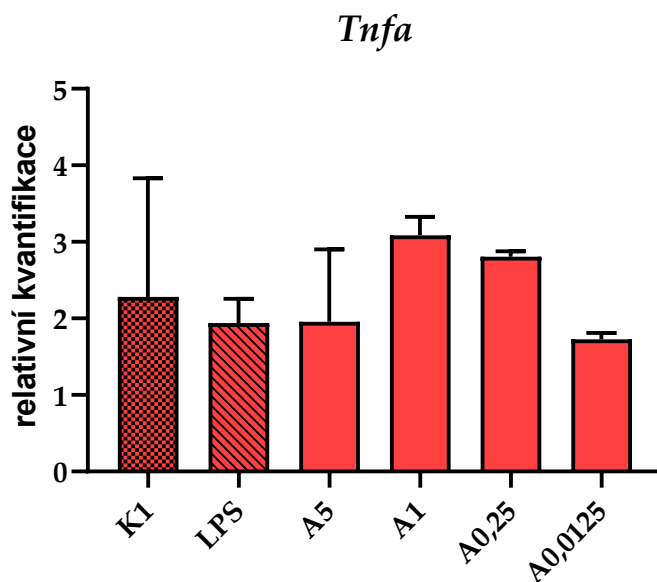
Obrázek 14 - Genové exprese *Il6* po čtyřech hodinách působení manumycinu A [vlastní zdroj] **K1** – nestimulovaná kontrola, **LPS** –lipopolysacharid, **A5** – manumycin A o koncentraci 5  $\mu\text{M}$ , **A1** – manumycin A o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , **A0,25** – manumycin A o koncentraci 0,25  $\mu\text{M}$ , **A0,0125** – manumycin A o koncentraci 0,0125  $\mu\text{M}$ .

Buňky stimulované LPS vykazují trend k vyšším hodnotám genové exprese *Il10* bez statisticky významného rozdílu. Ačkoliv můžeme pozorovat snížení exprese *Il10* v CBMC stimulovaných LPS a zároveň 5  $\mu$ M manumycinem A, nebylo dosaženo statisticky významného rozdílu. Ani další použité koncentrace manumycinu A nevedly ke změně genové exprese v porovnání s CBMC stimulovanými LPS, Obrázek 15.



Obrázek 15 - Graf genové exprese *Il10* po čtyřech hodinách působení manumycinu A [vlastní zdroj] **K1** – nestimulovaná kontrola, **LPS** –lipopolysacharid, **A5** – manumycin A o koncentraci 5  $\mu$ M, **A1** – manumycin A o koncentraci 1  $\mu$ M, **A0,25** – manumycin A o koncentraci 0,25  $\mu$ M, **A0,0125** – manumycin A o koncentraci 0,0125  $\mu$ M.

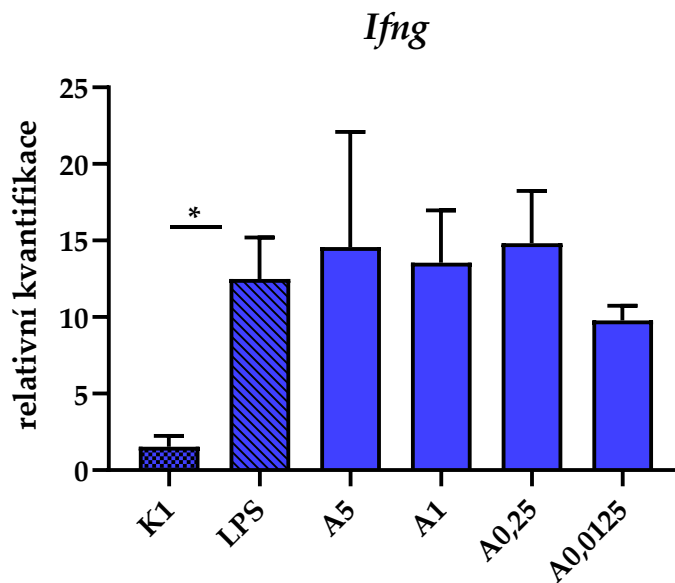
CBMC po stimulaci LPS nevykazují žádné zvýšení genové exprese *Tnfa* oproti nestimulované kontrole. Použité koncentrace manumycinu A také nemají žádný vliv na změnu genové exprese *Tnfa*. Tedy genová exprese *Tnfa* v CBMC stimulovaných LPS a zároveň různými koncentracemi manumycinu A je srovnatelná s genovou expresí CBMC stimulovaných pouze LPS či samotnými nestimulovanými CBMC, Obrázek 16.



Obrázek 16 - Vliv stimulace manumycinem A na změnu genové exprese *Tnfa* v buňkách mononukleární frakce leukocytů pupečnickové krve po čtyř-hodinové stimulaci [vlastní zdroj] **K1** – nestimulovaná kontrola, **LPS** –lipopolysacharid, **A5** – manumycin A o koncentraci 5  $\mu\text{M}$ , **A1** – manumycin A o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , **A0,25** – manumycin A o koncentraci 0,25  $\mu\text{M}$ , **A0,0125** – manumycin A o koncentraci 0,0125  $\mu\text{M}$ .



Zatímco CBMC stimulované LPS po dobu čtyř hodin mají signifikantně zvýšenou genovou expresi *Ifng*, námi použité koncentrace manumycinu A nevykazují žádný efekt na změnu genové exprese *Ifng* v CBMC stimulovaných zároveň LPS, Obrázek 17.



Obrázek 17 - Změna genové exprese *Ifng* po čtyřech hodinách působení manumycinu A [vlastní zdroj] \*  $p \leq 0,05$ ; **K1** – nestimulovaná kontrola, **LPS** –lipopolysacharid, **A5** – manumycin A o koncentraci 5  $\mu\text{M}$ , **A1** – manumycin A o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , **A0,25** – manumycin A o koncentraci 0,25  $\mu\text{M}$ , **A0,0125** – manumycin A o koncentraci 0,0125  $\mu\text{M}$ .

## 6 DISKUZE

Předmětem bakalářské práce bylo ověření protizánětlivých schopností manumycinu A, jednoho z mnoha sekundárních metabolitů bakterií rodu *Streptomyces*. Možné protizánětlivé vlastnosti manumycinu A byly studovány na buňkách pupečnickové krve jako změna genové exprese vybraných prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů metodou kvantitativní PCR v reálném čase. Konkrétně se jednalo o charakterizaci vlivu manumycinu A na změnu genové exprese cytokinů podporující zánětlivou odpověď (*Il1b*, *Il6*, *Tnfa*), typických pro T<sub>H1</sub> (*Ifng*) a T<sub>H2</sub> (*Il4*) imunitní odpověď a imunoregulačního cytokinu IL-10.

Překvapivě jsme nepozorovali statisticky signifikantní vliv manumycinu A na supresi genové exprese prozánětlivých cytokinů (*Il1b*, *Il6*, *Tnfa*) v buňkách pupečnickové krve, jak bylo popsáno v předchozích studiích charakterizující vliv manumycinu A na buňky buněčné linie THP-1. [5] Naopak v této práci došlo k ovlivnění genové exprese cytokinů charakteristických pro subpopulace T buněk (*Il4*, *Il10*, *Ifng*) v buňkách pupečnickové krve stimulovaných manumycinem A.

Manumycin A pouze nesignifikantně potlačil expresi *Ifng* v buňkách pupečnickové krve. Podobný vliv na snížení genové exprese *Ifng* má takrolimus, další produkt *Streptomyces*, a látka zvaná cyklosporin A. Obě tyto sloučeniny působí jako antagonisté kalcineurinu zejména na T lymfocyty. Jejich účinek byl zkoumán ve studii [51] s využitím mononukleárních buněk periferní krve. Další výzkum potvrdil, že takrolimus a cyklosporin A potlačují produkci IFN- $\gamma$  z T lymfocytů. Následující studie zabývající se vlivem takrolimu na genovou expresi a produkci IFN- $\gamma$  jsou studie [52] a [53]. Ve studii [52] zjišťovali vliv takrolimu na zlepšení trombocytopenie a produkce IFN- $\gamma$  u myší. Studie [53] se zaměřila na vliv takrolimu na potlačení proliferace T buněk u myší. Obě studie

také potvrdily schopnost takrolimu potlačovat produkci IFN- $\gamma$ . Zdá se, že by se metabolity *Streptomyces* mohly využívat při terapii onemocnění, kde dochází k neadekvátní imunitní odpovědi T<sub>H1</sub>. Nicméně je třeba dalších studií zejména s využitím experimentálních zvířecích modelů pro ověření schopnosti vybraných metabolitů *Streptomyces* potlačovat neadekvátní tvorbu IFN- $\gamma$ .

Pokud by se v budoucnu potvrdila schopnost manumycinu A tlumit T<sub>H1</sub> imunitní odpověď, tedy produkci IFN- $\gamma$ , mohl by být manumycin A použit při návrhu nových terapeutických protokolů snižující zánětlivou imunitní odpověď například u nespecifických střevních zánětů, kde byla popsána právě klíčová role IFN- $\gamma$  při progresi IBD (zánětlivé onemocnění střev) jak u lidí, tak u experimentálního myšičího modelu kolitidy [54].

Podle našich předpokladů se u genové exprese *Il4* potvrdilo, že nejvyšší koncentrace použitého manumycinu A, v našem případě 5  $\mu$ M, nejvíce potlačuje genovou expresi *Il4* v mononukleární frakci leukocytů získaných z pupečnickové krve. Neadekvátní imunitní odpověď na relativně neškodné antigeny vnějšího prostředí (alergeny) je podkladem imunopatologické imunitní reakce časných hypersenzitivit, kdy dochází k tvorbě specifického IgE proti konkrétnímu alergenu. Zvýšené hladiny cytokinu IL-4 jsou popisovány u pacientů s alergickým onemocněním [20; 55]. Vliv manumycinu A na snížení genové exprese by mohl být potenciálně využit ke snížení závažnosti onemocnění, jejichž podkladem je imunopatologická reakce zahrnující nepřiměřenou aktivaci T<sub>H2</sub> imunitní odpovědi (např. určitá alergická onemocnění jako je alergická rýma nebo konjunktivitida) [20].

Výsledek stanovení genové exprese *Il4* v mononukleárních buňkách pupečnickové krve nás v naší práci velmi zaujal. Změnu genové exprese *Il4* v mononukleární frakci pupečnickové krve by bylo dobré ověřit dalším

výzkumem s využitím mononukleární frakce buněk z dospělých jedinců. Studie by nám mohla ukázat, jestli je toto potlačení genové exprese *Il4* typické právě pro mononukleární leukocyty pupečnickové krve nebo by manumycin A měl podobné účinky i na zralé mononukleární buňky periferní krve dospělých jedinců. Vliv manumycinu A na změnu genové exprese *Il4* nebyl dříve studován. Nicméně autoři studie [56] se zabývali vlivem jiného metabolitu *Streptomycet* (takrolimu) na změnu genové exprese *Il4* u lymfocytů periferní krve izolovaných z příjemců transplantovaných ledvin. Jejich výzkum také ukazuje regulační účinek takrolimu a cyklosporinu A na genovou expresi *Il4* jako naše práce. Schopnost takrolimu potlačovat nežádoucí imunitní reakce byla studována u pacientů po transplantaci ledvin, kde podání takrolimu vedlo k indukci T<sub>REG</sub> a zvýšené sekreci IL-4 a IL-10 [57], což je v kontrastu s naším pozorováním, kdy manumycin A naopak snižoval expresi *Il4 in vitro*. Změnou genové exprese *Il4* vlivem takrolimu se také zabývá již zmíněná studie [52], ve které byl testován efekt takrolimu na zlepšení trombocytopenie u myší. Plasmatická hladina IL-4 u myší, kterým byl podán takrolimus, byla zvýšena, avšak v porovnání s kontrolní skupinou nebyla statisticky významná. Z této studie tedy nelze s jistotou potvrdit či vyvrátit vliv takrolimu na hladinu IL-4. Můžeme ale říci, že nedošlo k potlačení jeho produkce jako v naší práci.

Při porovnání účinků působení manumycinu A na mononukleární frakci pupečnickové krve po dobu jedné a čtyř hodin se prokázalo, že delší působení manumycinu A má celkově menší vliv na snížení genové exprese mononukleární frakce pupečnickové krve u všech pozorovaných cytokinů, kromě genové exprese *Il10*. Efekt manumycinu A na genovou expresi *Il10* v CBMC byl pozorovatelný pouze po čtyř hodinové inkubaci s manumycinem A. Stimulace CBMC manumycinem A po dobu jedné hodiny neměla na genovou expresi *Il10* žádný vliv. Důvodem pozorovaných změn v genové expresi *Il10* v pozdějším časovém intervalu je fakt, že IL-10 patří do skupiny tzv. pozdních cytokinů [20].

Proto pravděpodobně inkubace buněk po dobu jedné hodiny nebyla dostatečná k navození určité změny genové exprese tohoto cytokinu. Stimulace buněk pupečnickové krve manumycinem A po dobu čtyř hodin vedla k potlačení genové exprese *Il10*.

Další studie věnující se charakterizaci imunomodulačních vlastností metabolitů *Streptomycet* se zaměřila na využití metabolitů *Streptomycet* v transplantologii [58]. V tomto výzkumu se autoři zabývali vlivem takrolimu na buňky transplantovaného aloštěpu srdce s využitím experimentálního myšího modelu. Charakteristickými znaky pokračující rejekce aloštěpu je značná lokální infiltrace mononukleárních buněk imunitního systému a s tím i spojená produkce cytokinů, která má za následek destrukci transplantovaného aloštěpu. Autoři studie zjistili, že takrolimus výrazně potlačuje lokální genovou expresi *Il10* a také reguluje lokální infiltraci CD4+ a CD8+ buněk včetně jimi produkovaných cytokinů. Takrolimus také snižuje uvolňování cytotoxických faktorů (perforinů a granzymů). Naopak ve výše diskutované studii [57] pozorovali efekt takrolimu potlačovat nežádoucí imunitní reakce u pacientů po transplantaci ledvin. Studie ukázala, že po podání takrolimu došlo k indukci T<sub>REG</sub> a zvýšené sekreci IL-4 a IL-10. Z výsledků těchto studií můžeme usuzovat, že takrolimus působí odlišně na určité druhy organismů a také na určité druhy transplantované tkáně, což může být dáno odlišným nastavením imunitního systému v dané tkáni.

Již zmiňovaný výzkum [53] se také zajímal o vliv takrolimu na genovou expresi *Il10* tentokrát u artritidy. Výsledky studie [53] také potvrdily regulační vliv takrolimu. Takrolimus má schopnost zvyšovat produkci regulačního cytokinu IL-10, a tím inhibovat progresi artritidy u experimentálního myšího modelu. Dřívější studie [59] zkoumala vliv lipopolysacharidu, který byl v naší práci použit jako stimulátor produkce cytokinů, na produkci a genovou expresi *Il10* v monocitech a neutrofilech získaných z periferní krve novorozence.

Tento výzkum ukázal, že schopnost produkovat IL-10 mají jen mononukleární buňky novorozence, zatímco neutrofilové buňky IL-10 neprodukují, ale jsou schopny produkce IL-8. Mononukleární buňky byly schopné produkovat IL-10 až po čtyř hodinové stimulaci LPS. Tento výsledek je ve shodě s výsledkem naší práce.

V případě, že by probíhaly další studie a ověřila se schopnost manumycinu A potlačovat genovou expresi *Il10*, představoval by manumycin A další potenciální možnost léčby a prodloužení životnosti transplantovaného aloštěpu.

Ve výzkumu [60] také studovali protizánětlivé účinky manumycinu A s ohledem na jeho regulační schopnosti genové exprese cytokinů a také s ohledem na jeho cytotoxicitu. Studie probíhala na monocytech lidské periferní krve a na buňkách buněčné linie THP-1. Ve zmiňované studii byl použit jako stimulant produkce cytokinů TNF- $\alpha$  v koncentraci 20 ng/ml. Buňky byly vystaveny účinkům TNF- $\alpha$  a zároveň různým koncentracím manumycinu A po různě dlouhou dobu.

U sledovaných cytokinů, v tomto případě se jednalo o cytokiny *Il1b* a *Il6*, došlo ke snížení jejich genové exprese po inkubaci buněk s manumycinem A. Naše studie však tento pokles u těchto sledovaných cytokinů nezaznamenala. Stanovení hladiny cytokinů metodou ELISA potvrdilo výsledky genové exprese cytokinů *Il1b* a *Il6* a prokázalo schopnost manumycinu A snižovat tvorbu prozánětlivých cytokinů. Stanovení cytokinů metodou ELISA v supernatantech buněčných kultur by bylo zajímavé využít i v naší práci pro ověření, zda námi pozorovaný efekt manumycinu A na úrovni genové exprese se odrazí i ve vlastní sekreci cytokinů, zejména z důvodu, že přítomnost mRNA pro daný cytokin ještě neznamená jistotu produkce proteinu, který má vlastní biologickou funkci. Tato další data by pravděpodobně mohla zpřesnit výsledky našeho pozorování.

Výsledky naší práce mohou poukazovat na nezralost imunitního systému novorozence a tím i námi použité pupečnickové krve. Dále je nepravděpodobné, že by naše výsledky genové exprese prozánětlivých cytokinů ovlivnila nevhodně zvolená délka inkubace buněk s manumycinem A. Odlišné výsledky naší a této studie také nezpůsobilo případné použití nízké koncentrace manumycinu A. Vyšší dávky manumycinu A působí na buňky cytotoxicky. Z této zmiňované studie, na rozdíl od naší, vyplývá, že manumycin A představuje potenciální alternativní cestu k aktuálně používaným protizánětlivým léčivům. Bylo by však vhodné ověřit účinky manumycinu A na genovou expresi a produkci IL-1 $\beta$  a IL-6 na dalších buňkách či experimentálních zvířecích modelech. Další studií zabývající se genovou expresí a produkcí IL-1 $\beta$  a IL-6 je dříve zmiňovaná studie [56], která ověřuje regulační vlastnosti takrolimu a cyklosporinu A. Výsledky opět potvrzují účinky takrolimu a cyklosporinu A na snížení genové exprese prozánětlivých cytokinů *Il1b* a *Il6*.

Ve studii [5] se autoři zaměřili na studium protizánětlivých a cytotoxických vlastností čtyř sloučenin ze skupiny manumycinů. Jednalo se o známý manumycin A, méně známý manumycin B a o dvě nové látky produkované *Streptomyces* - asukamycin a kolabomycin E. K jejich výzkumu byla použita buněčná linie THP-1. Autoři se zaměřili na schopnost metabolitů manumycinového typu potlačovat genovou expresi a produkci IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ . Jako stimulant byl použit lipopolysacharid o koncentraci 1  $\mu$ g/ml. Při stanovení cytotoxicity použitých sloučenin po jedné a čtyřech hodinách, nevykazoval žádný použitý metabolit cytotoxický účinek ani při použití jeho nejvyšší koncentrace (5  $\mu$ M). Proto byla tato nejvyšší koncentrace použita i v naší práci při kultivaci buněk po dobu jedné a čtyř hodin.

Změna genové exprese *Il1b* a *Tnfa* byla pozorována po stimulaci THP-1 buněk LPS a následně jednotlivými druhy látek manumycinového typu. Manumycin A a manumycin B výrazně snížily genovou expresi *Il1b* a *Tnfa* v buňkách THP-1. Další studované metabolity tak účinné již nebyly. V případě naší práce nedošlo k potlačení genové exprese *Il1b* a *Tnfa* ani při použití nejvyšší 5  $\mu$ M koncentraci manumycinu A. Tyto odlišné výsledky mohou být opět způsobeny nezralostí buněk imunitního systému novorozence nebo malým počtem opakování experimentů charakterizujících vliv manumycinu A na CBMC. Stanovení koncentrace uvolněných cytokinů do supernatantu kultivovaných buněk metodou ELISA, potvrdilo výsledky genové exprese *Il1b* a *Tnfa* zmiňované studie. Výsledky této studie potvrdily, že manumycin A má, oproti ostatním použitým látkám manumycinového typu, největší schopnost potlačovat genovou expresi *Il1b* a *Tnfa*.

Látky schopné potlačovat genovou expresi a produkci cytokinu TNF- $\alpha$  se jeví jako potenciální nové léčivé látky v souvislosti s různým závažnými zánětlivými onemocněními jako je např. revmatoidní artritida či lupenka [61]. Vliv takrolimu na snížení genové exprese *Tnfa* u artritidy byl studován na myším modelu (b), kde byl potvrzen pozitivní vliv takrolimu na snížení genové exprese *Tnfa*. Ve výzkumu [62] také studovali inhibici růstu Triple – negativního karcinomu prsu vlivem manumycinu A. Studie naznačuje, že manumycin A je schopen způsobit v buňkách tohoto karcinomu takzvanou neapoptickou, neautofagickou cytoplazmatickou smrt a tím léčit tento obtížně léčitelný typ nádoru prsu. Tedy tato studie poukazuje na možné cytotoxické účinky manumycinu A.

Vliv na změnu genové exprese a produkce cytokinů nemají jen produkty *Streptomycet*. Dřívější studie se zabývaly účinky např. glutaminu – studie [63] nebo chlorochinu – studie [64]. Ve výzkumu [63] byl ověřen vliv glutaminu na genovou expresi *Tnfa*, *Il1b*, *Il4*, *Il6* a *Il10* v mononukleárních buňkách periferní



krve, přičemž byl jako stimulant použit opět LPS. Glutamin výrazně potlačoval genovou expresi těchto cytokinů. Studie [64] k supresi genové exprese *Tnfa*, *Il1b* a *Il6* v buňkách lidských monocytů po stimulaci LPS použila chlorochin. Závěr studie naznačuje, že chlorochin inhibuje genovou expresi těchto studovaných cytokinů.

Nově popsané sekundární produkty *Streptomycet* mají opravdu značný potenciál k širšímu využití v klinické praxi, jak dokumentují již v dnešní době běžně používané metabolity (např. takrolimus). Manumycin A by mohl být v budoucnu také studován v podobných pokusech *in vivo* pro ověření jeho schopnosti snižovat prozánětlivou imunitní reakci. Jedna z mála dřívější studií, která se zabývala efektem manumycinu A *in vivo* je studie [65]. Autoři se zde zaměřili na schopnost manumycinu A zvyšovat cytotoxický účinek paklitaxelu na anaplastické buňky karcinomu štítné žlázy. V případě takrolimu došlo k potlačení produkce jak prozánětlivých cytokinů (IL-1 $\beta$ , IL-6), tak protizánětlivých cytokinů (IL-4). V naší práci při zjišťování účinků manumycinu A na mononukleární frakci leukocytů pupečnickové krve se sice neprojevil potlačující účinek manumycinu A na prozánětlivé cytokiny, ale naopak na protizánětlivý cytokin IL-4, který je produkován hlavně T<sub>H</sub>2 lymfocyty.

Výsledky, ke kterým jsme dospěli, nebyly natolik signifikantní, aby stoprocentně potvrdily imunosupresivní vliv manumycinu A na změnu genové exprese námi studovaných cytokinů v mononukleární frakci leukocytů pupečnickové krve. Naší hypotéze odpovídal jen výsledek změny genové exprese protizánětlivého cytokinu *Il4*. Pro prokázání efektu manumycinu A na genovou expresi v CBMC by bylo vhodné zopakovat experimenty na větším počtu vzorků pupečnickových kreví. Rovněž je třeba mít na paměti všeobecnou nezralost novorozeneckého imunitního systému, proto by bylo žádoucí porovnat dosažené

výsledky s vlivem manumycinu A na mononukleární buňky leukocytů periferní krve dospělých jedinců.

Pupečnicková krev byla jako výchozí materiál použita díky její relativně snadné dostupnosti a nezralosti imunitního systému novorozence. Díky této nezralosti je možné, že mononukleární buňky budou vykazovat nižší imunitní odpověď po stimulaci LPS. U novorozenců je také větší zastoupení neutrofilů oproti lymfocytům. Většina těchto novorozeneckých neutrofilů je ve stádiu s nesegmentovaným jádrem (tzv. low density neutrophils, LDN – nízkohustotní neutrofilie), a proto dochází k separaci této subpopulace neutrofilů spolu s mononukleárními buňkami pupečnickové krve, jako jsou lymfocyty a monocyty. Neutrofilie tudíž nemusely reagovat na přítomnost manumycinu A stejně jako mononukleární leukocyty, a tím mohlo dojít ke zkreslení výsledků genové exprese. Schopností mononukleárních leukocytů a neutrofilů produkovat různé druhy cytokinů po jejich stimulaci LPS se již dříve zabývala studie [66]. Použití fytohematoglutininu jako pozitivního stimulátoru by mohlo přinést výraznější výsledky, neboť námi použité LPS stimuluje převážně monocyty, kterých je v CBMC menšina. Pupečnicková krev byla také vybrána z důvodu, že jsme chtěli zjistit, jestli účinek manumycinu A bude podobný jako v jiných studiích [5; 60].

Zdá se, že manumycin A nemá až tak významné účinky na změnu genové exprese prozánětlivých cytokinů mononukleární frakce pupečnickové krve oproti naší hypotéze, ale ovlivňuje genovou expresi cytokinů typických pro T buňky mononukleární frakce pupečnickové krve.

## 7 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo ověření protizánětlivých vlastností různých koncentrací manumycinu A na mononukleární frakci leukocytů pupečnickové krve po stimulaci lipopolysacharidem. Účinky manumycinu A na CBMC byly sledovány na úrovni genové exprese prozánětlivých (*Il1b*, *Il6*, *Tnfa* a *Ifng*) a protizánětlivých (*Il4* a *Il10*) cytokinů metodou kvantitativní PCR v reálném čase.

Předpokládali jsme, že manumycin A by měl mít schopnost potlačovat genovou expresi prozánětlivých cytokinů v mononukleární frakci leukocytů pupečnickové krve, jak bylo popsáno v předchozích studiích na jiných buněčných typech. Analýza získaných dat však tento předpoklad v naší práci nepotvrdila. K signifikantnímu snížení genové exprese námi sledovaných prozánětlivých cytokinů většinou nedošlo ani při stimulaci manumycinem A v jeho nejvyšší použité koncentraci. Naopak se ukázalo, že mononukleární buňky pupečnickové krve po stimulaci lipopolysacharidem a zároveň nejvyšší použitou koncentrací manumycinu A vykazují supresivní efekt na genovou expresi cytokinů typických pro T lymfocyty. V rámci našich experimentů jsme pozorovali zejména signifikantní snížení genové exprese *Il4*.

Pro jednoznačné závěry o vlivu manumycinu A na změnu genové exprese CBMC je třeba dalších experimentů. Zejména by bylo vhodné porovnat získaná data z CBMC s efektem manumycinu A na buňky mononukleární frakce leukocytů periferní krve dospělých jedinců. Metabolity *Streptomycet* se zdají být slibnými kandidáty pro vývoj léčiv schopných ovlivňovat imunitní systém a snižovat závažnost některých onemocnění.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|       |   |
|-------|---|
| ACTB  | gen pro beta-aktin  |
| APC   | buňka prezentující antigen<br>antigen presenting cell                     |
| CBMC  | mononukleární leukocyty pupečnickové krve<br>cord blood mononuclear cells |
| CD    | diferenční antigen<br>clusters of differentiations                        |
| cDNA  | komplementární deoxyribonukleová kyselina<br>complementary DNA            |
| CRP   | c reaktivní protein   |
| DC    | dendritické buňky<br>dendritic cells                                      |
| DNA   | deoxyribonukleová kyselina  |
| G-CSF | faktor stimulující granulocyty<br>granulocyte colony stimulating factor   |
| EMT   | epiteliálně mezenchymální přechod   |
| FBS   | fetální bovinní sérum   |
| Hepes | pufrovací činidlo kyseliny sulfonové                                      |

|                     |  |
|---------------------|--|
| ICAM-1              | mezibuněčná adhezivní molekula<br>intercellular adhesion molecule 1  |
| IEL                 | intraepiteliální lymfocyty   |
| IFN- $\gamma$       | interferon gama  |
| IgG                 | imunoglobulin G  |
| IgM                 | imunoglobulin M  |
| IL                  | interleukin  |
| LDN                 | nízkohustotní neutrofilny<br>low density neutrophils                 |
| LPL                 | lymfocyty v lamina propria   |
| LPS                 | lipopolysacharid   |
| M-CSF               | faktor stimulující monocyty<br>macrophage colony stimulating factor  |
| MCP-1               | monocytový chemoatraktorový protein                                  |
| MHC                 | hlavní histokompatibilní komplex<br>major histocompatibility complex |
| MIP- $\alpha,\beta$ | makrofágový zánětlivý protein<br>macrophage inflammatory protein     |

|                           |  |
|---------------------------|--|
| m-TOR-1                   | savčí cíl rapamycinového komplexu<br>mammalian target of rapamycin complex 1 |
| NK buňka                  | přirozený zabíječ<br>natural killer  |
| p53                       | tumorový protein 53  |
| PCR                       | polymerázová řetězová reakce<br>polymerase chain reaction                    |
| q-PCR                     | kvantitativní polymerázová řetězová reakce                                   |
| RNA                       | ribonukleová kyselina  |
| RT-PCR                    | reverzní transkripce   |
| T <sub>c</sub> lymfocyt   | cytotoxický T lymfocyt   |
| TCR                       | receptor T lymfocytů   |
| TGF                       | transformující růstový faktor<br>transforming growth factor                  |
| T <sub>H</sub> lymfocyt   | pomocný T lymfocyt   |
| THP-1                     | buněčná linie podobná monocytům  |
| TNF- $\alpha$             | faktor nekrotizující nádory alfa   |
| T <sub>REG</sub> lymfocyt | regulační T lymfocyt   |

|        |   |
|--------|---|
| TRXr-1 | cytosolární thireodoxinová reductáza<br>thioredoxin reductase     |
| VCAM-1 | vaskulární adhezivní molekula<br>vascular cell adhesion protein 1 |

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *Fems microbiology reviews* [online]. 2010, **2010**(342), 87-230 [cit. 2021-02-06]. ISSN 0168-6445. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00206.x
- [2] 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, **2020**(10), 3028 [cit. 2021-02-05]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.03028
- [3] ČIHÁK, Matouš. *Ověření produkce sekundárních metabolitů v průběhu germinace *Streptomyces coelicolor**. První. Praha: Academia, 2019. ISBN 978-80-200-2919-5.
- [4] Analysis of the complete genome sequence of a marine-derived strain *Streptomyces* sp. S063 CGMCC 14582 reveals its biosynthetic potential to produce novel anti-complement agents and peptides. *PeerJ* [online]. 2019, **2019**(7), 6122 [cit. 2021-02-05]. ISSN 2167-8359. Dostupné z: doi:10.7717/peerj.6122
- [5] Inhibition of Pro-Inflammatory Cytokines by Metabolites of *Streptomyces*-A Potential Alternative to Current Anti-Inflammatory Drugs?. *Mikroorganismy* [online]. 2020, **2020**(85), 621 [cit. 2021-02-05]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms8050621



- [6] Rapamycin: One Drug, Many Effects. *Cell Metabolism* [online]. 2014, **2014**(3), 373-379 [cit. 2021-02-05]. ISSN 1932-7420. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.001>
- [7] Alternative rapamycin treatment regimens mitigate the impact of rapamycin on glucose homeostasis and the immune system. *Aging Cell* [online]. 2015, **2016**(151), 28-38 [cit. 2021-02-05]. ISSN 1474-9726. Dostupné z: doi:[10.1111/accel.12405](https://doi.org/10.1111/accel.12405)
- [8] Daptomycin–Phosphatidylglycerol Domains in Lipid Membranes. *Langmuir* [online]. 2018, **2017**(3347), 13669-13679 [cit. 2021-02-05]. ISSN 1520-5827. Dostupné z: doi:[10.1021/acs.langmuir.7b01841](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01841)
- [9] Draft Genome Sequence of FK506-Producing *Streptomyces tsukubensis* Strain VKM Ac-2618D. *Microbiology resource announcements* [online]. 2019, **2019**(824), 00510-19 [cit. 2021-02-05]. ISSN 2576-098X. Dostupné z: doi:[10.1128/MRA.00510-19](https://doi.org/10.1128/MRA.00510-19)
- [10] PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenetics and genomics* [online]. 2014, **2013**(2310), 563-585 [cit. 2021-02-05]. ISSN 1744-6880. Dostupné z: doi:[10,1097/FPC.0b013e328364db84](https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328364db84)
- [11] Identification of the Actinomycin D Biosynthetic Pathway from Marine-Derived *Streptomyces costaricanus* SCSIO ZS0073. *Marine drugs* [online]. 2019, **2019**(174), 240 [cit. 2021-02-05]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:[10.3390/md17040240](https://doi.org/10.3390/md17040240)
- [12] Protein p53 a protinádorová terapie. *Klinická onkologie* [online]. 2002, **2002**(153), 98-101 [cit. 2021-02-05]. ISSN 1802-5307. Dostupné z:

<https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2002-06-15-3/protein-p53-a-protinadorova-terapie/>

- [13] Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D: a new route to p53 based cyclotherapy. *Cell Cycle* [online]. 2009, **2009**(17), 2810-2818 [cit. 2021-02-05]. Dostupné z: doi:10,4161 / cc.8.17.9503
- [14] Actinomycin V Inhibits Migration and Invasion via Suppressing Snail/Slug-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition Progression in Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells In Vitro. *Marine drugs* [online]. 2019, **2019**(175), 305 [cit. 2021-02-05]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md17050305
- [15] The Interaction of the Metallo-Glycopeptide Anti-Tumour Drug Bleomycin with DNA. *International journal of molecular sciences* [online]. 2018, **2018**(195), 1372 [cit. 2021-02-05]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19051372
- [16] Dose-dependent effect of mitomycin C on human vocal fold fibroblasts. *Head & neck* [online]. 2014, **2014**(363), 401-410 [cit. 2021-02-05]. ISSN 1097-0347. Dostupné z: doi:10.1002/hed.23310
- [17] Diminishing the side effect of mitomycin C by using pH-sensitive liposomes: in vitro characterization and in vivo pharmacokinetics. *Drug design, development and therapy* [online]. 2018, **2018**(12), 159-169 [cit. 2021-02-05]. ISSN 1177-8881. Dostupné z: doi:10.2147/DDDT.S150201
- [18] The prenylation inhibitor manumycin A reduces the viability of *Anaplasma phagocytophilum*. *Journal of medical microbiology* [online].

2011, **2011**(606, 744-749 [cit. 2021-02-05]. ISSN 1473-5644. Dostupné z:  
doi:10.1099/jmm.0.029231-0

- [19] Angiogenesis Inhibition in the in Vivo Antineoplastic Effect of Manumycin and Paclitaxel against Anaplastic Thyroid Carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2001, **2001**(86), 1769-1777 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1945-7197. Dostupné z:  
doi:10.1210/jcem.86.4.7374
- [20] HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTUŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie. 6., aktualizované vydání*. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.
- [21] Bioanalytical Chemistry of Cytokines-A Review. *Analytica chimica acta* [online]. 2016, **2015**(853), 95-115 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1873-4324.  
Dostupné z: doi:10.1016 / j.aca.2014.10.009
- [22] HSP60 critically regulates endogenous IL-1 $\beta$  production in activated microglia by stimulating NLRP3 inflammasome pathway. *Journal of neuroinflammation* [online]. 2018, **2018**(15), 177 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1742-2094. Dostupné z: doi:10.1186/s12974-018-1214-5
- [23] IL-1 Family Members Mediate Cell Death, Inflammation and Angiogenesis in Retinal Degenerative Diseases. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019, **2019**(10), 1618 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.01618

- [24] Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  and IL-18 processing during infection. *Trends in Immunology* [online]. 2011, **2011**(323), 110-116 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1471-4906. Dostupné z: doi:10.1016/j.it.2011.01.003
- [25] Whole Blood Gene Expression and Interleukin-6 Levels. *GENOMICS* [online]. 2015, **2014**(104), 490-495 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1089-8646. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygeno.2014.10.003
- [26] Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. *International journal of biological sciences* [online]. 2012, **2012**(89), 1254-1266 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1449-2288. Dostupné z: doi:10.7150/ijbs.4679
- [27] Interferon- $\gamma$  and Systemic Autoimmunity. *Discovery medicine* [online]. 2014, **2014**(1687), 123-131 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1944-7930. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3934799/>
- [28] Clinical implications of interferon- $\gamma$  genetic and epigenetic variants. *Immunology* [online]. 2014, **2014**(1434), 499–511 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1365-2567. Dostupné z: doi:10.1111 / imm.12362
- [29] Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Frontiers in immunology* [online]. 2018, **2018**(9), 847 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2018.00847
- [30] The Two Faces of Interferon- $\gamma$  in Cancer. *Clinical cancer research* [online]. 2011, **2011**(19) [cit. 2021-02-06]. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432
- [31] The Role of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in the Biology of Uterine Fibroids and the Related Symptoms. *International journal of molecular*

*sciences* [online]. 2018, **2018**(1912, 3869 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1422-0067.  
Dostupné z: doi:10.3390/ijms19123869

- [32] Pathogenetic and Therapeutic Applications of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in Major Depressive Disorder: A Systematic Review. *International journal of molecular sciences* [online]. 2016, **2016**(175, 733 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17050733
- [33] Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”. *Journal of leukocyte biology* [online]. 2012, **2012**(924, 753-764 [cit. 2021-02-06]. Dostupné z: doi:10.1189/jlb.0412214
- [34] Interleukin-4 and Interleukin-13 Exacerbate Neurotoxicity of Prothrombin Kringle-2 in Cortex In Vivo via Oxidative Stress. *International journal of molecular sciences* [online]. 2019, **2019**(208, 1927 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20081927
- [35] Profibrotic Role for Interleukin-4 in Cardiac Remodeling and Dysfunction. *Hypertension* [online]. 2015, **2015**(663, 582–589 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1524-4563. Dostupné z: doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05627
- [36] Pathologic patterns of interleukin 10 expression – A review. *Biochimica medica* [online]. 2015, **2015**(251, 36–48 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1846-7482. Dostupné z: doi:10.11613/BM.2015.004
- [37] Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Frontiers in*

*immunology* [online]. 2018, **2018**(9), 455 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1664-3224.  
Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2018.00455

- [38] Interleukin-10 plays a key role in the modulation of neutrophils recruitment and lung inflammation during infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Immunology* [online]. 2015, **2015**(1461), 100-112 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1365-2567. Dostupné z: doi:10.1111/imm.12486
- [39] LP F-03 Referenční rozmezí HTO Laboratorní příručka. In: . Praha: IKEM, 2020, ročník 2020, LP F-03. Dostupné také z:  
[https://www2.ikem.cz/plm\\_lp/HVEZDAADBQ.htm](https://www2.ikem.cz/plm_lp/HVEZDAADBQ.htm)
- [40] BOHONĚK, Miloš. *Leukocyty*. 1. Praha ÚVN: Praha ÚVN, 2018.
- [41] GRÍGELOVÁ, Andrea. *Raritní populace B lymfocytů na pozadí periferní B lymfopoézy u lidí*. Praha, 2017. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra antropologie a genetiky člověka. Vedoucí práce Růžičková, Šárka.
- [42] B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity* [online]. 2012, **2012**(361), 13-21 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1097-4180. Dostupné z:  
doi:10.1016/j.immuni.2011.11.017
- [43] Age-associated B cells express a diverse repertoire of VH and Vκ genes with somatic hypermutation. *The Journal of immunology* [online]. 2018, **2018**(1985), 1921-1927 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1550-6606. Dostupné z:  
doi:10.4049/jimmunol.1601106

- [44] Role T a B lymfocytů v patogenezi roztroušené sklerózy. *Neurologie v praxi* [online]. 2016, **2016**(172, 100-103 [cit. 2021-02-06]. Dostupné z: doi:10.36290/neu.2016.020
- [45] HematologyOutlines. *HematologyOutlines* [online]. 2012 [cit. 2021-02-06]. Dostupné z: <http://hematologyoutlines.com/>
- [46] The cell fate regulator NUPR1 is induced by Mycobacterium leprae via type I interferon in human leprosy. *PLoS neglected tropical diseases* [online]. 2019, **2019**(137, 7589 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0007589
- [47] Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology* [online]. 2018, **2018**(9), 3176 [cit. 2021-02-06]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2018.03176
- [48] NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of visualized experiments* [online]. 2010, **2010**(45), 2565 [cit. 2021-02-07]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/2565
- [49] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. Brno: MU, Brno-Krávická hora, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [50] Polymerázová řetězová reakce. *Biogen* [online]. [cit. 2021-02-07]. Dostupné z: <https://biogen.cz/polymerazova-retezova-reakce>
- [51] Critical involvement of IL-12 in IFN-gamma induction by calcineurin antagonists in activated human lymphocytes. *Journal of leukocyte biology*

- [online]. 2006, **2006**(801, 75-86 [cit. 2021-04-05]. ISSN 1938-3673. Dostupné z: doi:10.1189/jlb.0605328
- [52] Tacrolimus ameliorates thrombocytopenia in an ITP mouse model. *Annals of hematology* [online]. 2020, **2020**(9910, 2315-2322 [cit. 2021-04-05]. ISSN 1432-0584. Dostupné z: doi:10.1007/s00277-020-04203-2
- [53] Tolerogenic dendritic cells modified by tacrolimus suppress CD4(+) T-cell proliferation and inhibit collagen-induced arthritis in mice. *International immunopharmacology* [online]. 2014, **2014**(211, 247-254 [cit. 2021-04-05]. ISSN 1878-1705. Dostupné z: doi:10.1016/j.intimp.2014.05.004
- [54] IFN- $\gamma$  drives inflammatory bowel disease pathogenesis through VE-cadherin-directed vascular barrier disruption. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. 2019, **2019**(12911, 4691-4707 [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: doi:10.1172/JCI124884
- [55] Potential non-T cells source of interleukin-4 in food allergy. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* [online]. 2014, **2014**(253, 243-249 [cit. 2021-04-05]. ISSN 1399-3038. Dostupné z: doi:10.1111/pai.12207
- [56] Regulatory effects of cyclosporin A and tacrolimus on the immunological gene expressions in renal transplant recipients. *Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae*. [online]. 2012, **2012**(346, 563 [cit. 2021-04-05]. ISSN 1000-503X. Dostupné z: doi:10.3881/j.issn.1000-503X.2012.06.005.



- [57] Donor antigen-specific regulatory T-cell function affects outcome in kidney transplant recipients. *Kidney international* [online]. 2011, **2011**(799), 1005-12 [cit. 2021-04-05]. ISSN 1523-1755. Dostupné z: doi:10.1038/ki.2010.533
- [58] Tacrolimus and cyclosporine differ in their capacity to overcome ongoing allograft rejection as a result of their differential abilities to inhibit interleukin-10 production. *Transplantation* [online]. 2002, **2002**(7311), 1808-17 [cit. 2021-04-05]. ISSN 1534-6080. Dostupné z: doi:10.1097/00007890-200206150-00019
- [59] Interleukin-10 production after pro-inflammatory stimulation of neutrophils and monocytic cells of the newborn. Comparison to exogenous interleukin-10 and dexamethasone levels needed to inhibit chemokine release. *Neonatology* [online]. 2007, **2007**(922), 127-33 [cit. 2021-04-05]. ISSN 1661-7819. Dostupné z: doi:10.1159/000101432
- [60] Manumycin A downregulates release of proinflammatory cytokines from TNF alpha stimulated human monocytes. *Immunology letters* [online]. 2016, **2016**(169), 8-14 [cit. 2021-04-05]. ISSN 1879-0542. Dostupné z: doi:10.1016/j.imlet.2015.11.010
- [61] Anti-TNF alfa: složitá terapie, která pomáhá. *Revmatické-nemoci.cz* [online]. *Revmatické-nemoci.cz*, 2016 [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.revmaticke-nemoci.cz/novinky-revmatoidni-artritida/anti-tnf-alfa-slozita-terapie-ktera-pomaha-1271>
- [62] Manumycin A inhibits triple-negative breast cancer growth through LC3-mediated cytoplasmic vacuolation death. *Cell death & disease*

- [online]. 2013, **2013**(41, 457 [cit. 2021-04-05]. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/cddis.2012.192
- [63] Effects of glutamine on the cytokine expression of peripheral blood mononuclear cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* [online]. 2008, **2008**(887, 449-52 [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18642783/>
- [64] Chloroquine inhibits production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. *Rheumatology (Oxford)* [online]. 2006, **2006**(456, 703-10 [cit. 2021-04-05]. ISSN 1462-0332. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/kei282
- [65] Manumycin enhances the cytotoxic effect of paclitaxel on anaplastic thyroid carcinoma cells. *Cancer research* [online]. 2000, **2000**(603, 650-6 [cit. 2021-04-05]. ISSN 1538-7445. Dostupné z: doi:Published February 2000
- [66] Relative cytokine and cytokine inhibitor production by mononuclear cells and neutrophils. *Shock* [online]. 2003, **2003**(201, 10-6 [cit. 2021-04-05]. ISSN 1540-0514. Dostupné z: doi:10.1097/01.shk.0000065704.84144.a4
- [67] *Tacrolimus and cyclosporine differ in their capacity to overcome ongoing allograft rejection as a result of their differential abilities to inhibit interleukin-10 production* [online]. [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: doi:10.1097/00007890-200206150-00019

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

|   |    |
|---|----|
| Obrázek 1 - Látky manumycinového typu [5] .....   | 18 |
| Obrázek 2 - Hematopoéza [20] .....  | 27 |
| Obrázek 3 - Převrstvená pupečnicková krev na Ficollu před centrifugací<br>[vlastní zdroj] .....   | 38 |
| Obrázek 4 - Pupečnicková krev po centrifugaci [vlastní zdroj] .....   | 38 |
| Obrázek 5 - Graf z přístroje Nanodrop-1000 [vlastní zdroj] .....  | 46 |
| Obrázek 6 - Vliv stimulace manumycinem A na změnu genové exprese <i>Il1b</i><br>v buňkách mononukleární frakce leukocytů pupečnickové krve po jedno-<br>hodinové stimulaci [vlastní zdroj] .....  | 54 |
| Obrázek 7 - Změna genové exprese <i>Il4</i> po jedné hodině působení<br>manumycinu A [vlastní zdroj] .....  | 55 |
| Obrázek 8 - Vliv stimulace manumycinem A na změnu genové exprese <i>Il6</i><br>v buňkách mononukleární frakce leukocytů pupečnickové krve po jedno-<br>hodinové stimulaci [vlastní zdroj] .....   | 56 |
| Obrázek 9 - Graf genové exprese <i>Il10</i> po jedné hodině působení manumycinu<br>A [vlastní zdroj] .....  | 57 |
| Obrázek 10 - Genová exprese <i>Tnfa</i> po jedné hodině působení manumycinu A<br>[vlastní zdroj] .....  | 58 |
| Obrázek 11 - Vliv stimulace manumycinem A na změnu genové exprese <i>Ifng</i><br>v buňkách mononukleární frakce leukocytů pupečnickové krve po jedno-<br>hodinové stimulaci [vlastní zdroj] ..... | 59 |
| Obrázek 12 - Genová exprese <i>Il1b</i> po čtyřech hodinách působení<br>manumycinu A [vlastní zdroj] .....  | 60 |
| Obrázek 13 - Vliv stimulace manumycinem A na změnu genové exprese <i>Il4</i><br>v buňkách mononukleární frakce leukocytů pupečnickové krve po čtyř-<br>hodinové stimulaci [vlastní zdroj] .....   | 61 |

|  |    |
|--|----|
| Obrázek 14 - Genové exprese <i>Il6</i> po čtyřech hodinách působení manumycinu A [vlastní zdroj] .....   | 62 |
| Obrázek 15 - Graf genové exprese <i>Il10</i> po čtyřech hodinách působení manumycinu A [vlastní zdroj] .....   | 63 |
| Obrázek 16 - Vliv stimulace manumycinem A na změnu genové exprese <i>Tnfa</i> v buňkách mononukleární frakce leukocytů pupečnickové krve po čtyřhodinové stimulaci [vlastní zdroj] ..... | 64 |
| Obrázek 17 - Změna genové exprese <i>Ifng</i> po čtyřech hodinách působení manumycinu A [vlastní zdroj] .....  | 65 |

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

|  |    |
|--|----|
| Tabulka 1 - Složení premixu [vlastní zdroj] .....                  | 48 |
| Tabulka 2 - Složení reakční směsi [vlastní zdroj].....             | 50 |
| Tabulka 3 - Hodnoty $ct$ <i>Actb</i> [vlastní zdroj].....          | 51 |
| Tabulka 4 - Hodnoty $ct$ a exprese <i>Il6</i> [vlastní zdroj]..... | 52 |