

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**Zavedení metodik k hodnocení aktivity  
peritoneálních makrofágů**

**Bc. Alena Moravcová**

**Diplomová práce**

**2011**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**

**Establishing a methodology to assess the activity of  
peritoneal macrophages**

**Bc. Alena Moravcová**

**Thesis**  
**2011**

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Alena MORAVCOVÁ**  
Osobní číslo: **C09845**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**  
Název tématu: **Hodnocení aktivity peritoneálních makrofágů**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Zpracování obecného přehledu o mechanismech imunitní odpovědi v organismu se zaměřením na úlohu makrofágů. Podání literárního přehledu o imunitní reakci vyvolané chirurgickým zákrokem v abdominální dutině s ohledem na typ operačního přístupu (laparotomický nebo laparoskopický).
- 2) Popis základního principu ELISA metod, zavedení ELISA metod ke stanovení cytokinů TNF alfa, IL1 a IL6 produkovaných peritoneálními makrofágy potkana neovlivněnými operačním výkonem.
- 3) Ověření dávky vhodné ke stimulaci kultivovaných peritoneálních makrofágů potkana a hodnocení následné produkce cytokinů TNF alfa, IL1 a IL6.
- 4) Stanovení produkce cytokinů peritoneálními makrofágy potkana izolovanými 24 hod. po chirurgickém zákroku a kultivovanými bez nebo se stimulací lipopolysacharidem. Porovnání získaných hodnot mezi laparoskopickým a laparotomickým přístupem.
- 5) Stanovení produkce cytokinů peritoneálními makrofágy potkana izolovanými 72 hod. po chirurgickém zákroku a kultivovanými bez nebo se stimulací lipopolysacharidem. Porovnání získaných hodnot mezi laparoskopickým a laparotomickým přístupem.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. MUDr. Halka Lotková, Ph.D.**

Lékařská fakulta UK Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce: **1. října 2010**

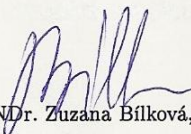
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2011**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla po § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Alena Moravcová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především vedoucí své diplomové práce doc. MUDr. Halce Lotkové, Ph.D. a Mgr. Monice Pospíšilové za odborné vedení a rady, které mi po celou dobu práce ochotně poskytovaly. Dále patří mé díky rovněž členům Ústavu fyziologie pod vedením Prof. MUDr. Zuzany Červinkové, CSc. a MUDr. Lukáši Sákrovi, Ph.D. (Chirurgická klinika, Pardubická krajská nemocnice) - řešiteli grantového projektu, v rámci něhož práce vznikla - IGA MZ ČR NS 9649-4/2008.

Poděkování patří také mým nejbližším za všestrannou podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu studia.

# OBSAH

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

## SOUHRN

## SUMMARY

1. ÚVOD.....	14
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	15
2.1 Organizace imunitního systému.....	15
2.1.1 Nеспецифická imunita.....	17
2.1.1.1 Fagocyty.....	18
2.1.1.1.1 Makrofágy.....	20
2.1.1.1.2 Dendritické buňky.....	23
2.1.1.2 NK buňky.....	24
2.1.1.3 Komplement.....	24
2.1.1.4 Ostatní.....	25
2.1.2 Specifická imunita.....	26
2.1.2.1 Specifická buněčná imunita.....	26
2.1.2.1.1 T lymfocyty.....	26
2.1.2.1.2 B lymfocyty.....	29
2.1.2.2 Specifická humorální imunita.....	30
2.1.2.2.1 Protilátky.....	30
2.1.3 Cytokiny.....	31
2.2 Změny navozené chirurgickým zákrokem v abdominální oblasti.....	37
2.2.1 Rozdílný dopad laparotomického a laparoskopického přístupu na imunitní odpověď.....	38
2.2.1.1 Vliv chirurgického výkonu na systémovou imunitní odpověď.....	38
2.2.1.2 Vliv chirurgického výkonu na systémovou buněčně zprostředkovanou imunitní odpověď.....	40
2.2.1.3 Vliv chirurgického výkonu na lokální imunitní odpověď.....	41
2.2.1.4 Vliv oxidu uhličitého používaného při laparoskopii na lokální změny v peritoneu.....	44
2.2.1.5 Faktory ovlivňující výskyt pooperačních srůstů.....	46
2.2.1.6 Shrnutí.....	47

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	49
3.1 Zvířata.....	49
3.2 Pracovní postup.....	49
3.2.1 Izolace makrofágů.....	49
3.2.2 Kultivace.....	50
3.2.3 Stanovení koncentrace cytokinů metodou ELISA.....	51
3.2.3.1 EIA.....	51
3.2.3.2 ELISA.....	54
3.2.3.3 Stanovení TNF $\alpha$ .....	59
3.2.3.4 Stanovení IL-1 $\beta$ .....	61
3.2.3.5 Stanovení IL-6.....	63
3.2.4 Stanovení proteinů.....	65
3.2.5 Stanovení fagocytosy.....	67
3.2.6 Stanovení WST.....	68
3.2.7 Vyjádření výsledků.....	70
3.2.8 Cíl práce.....	70
4. VÝSLEDKY.....	72
4.1 Zjištění optimální koncentrace LPS.....	72
4.2 Bazální produkce cytokinů 24 hodin po operaci.....	75
4.3 Stimulovaná produkce cytokinů 24 hodin po operaci.....	77
4.4 Bazální produkce cytokinů 72 hodin po operaci.....	82
4.5 Stimulovaná produkce cytokinů 72 hodin po operaci.....	84
4.6 Bazální fagocytární aktivita peritoneálních makrofágů 72 hodin po operaci.....	88
4.7 Fagocytární aktivita LPS stimulovaných peritoneálních makrofágů 72 hodin po operaci.....	89
5. DISKUSE.....	90
6. ZÁVĚR.....	96

## POUŽITÁ LITERATURA



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

<b>Ab</b>	<b>Antibody</b> (protilátka)
<b>ACTH</b>	<b>Adrenocorticotropic Hormone</b> (adrenokortikotropní hormon, adrenokortikotropin, kortikotropin)
<b>ADCC</b>	<b>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</b> (cytotoxická reakce závislá na protilátkách)
<b>Ag</b>	<b>Antigen</b> (antigen)
<b>AIDS</b>	<b>Acquired Immunodeficiency Syndrome</b> (syndrom získaného selhání imunity)
<b>ANOVA</b>	<b>Analysis of Variance</b> (analýza rozptylu)
<b>APC</b>	<b>Antigen-Presenting Cell</b> (antigen prezentující buňka)
<b>ATB</b>	antibiotika
<b>BcR</b>	<b>B-Cell Receptor</b> (receptor lymfocytů B pro antigen)
<b>BSA</b>	<b>Bovine Serum Albumin</b> (bovinní sérový albumin)
<b>C3b</b>	fragment komplementového proteinu C3
<b>C5b</b>	fragment komplementového proteinu C5
<b>CD</b>	<b>Cluster of Differentiation</b> (diferenciační povrchový antigen)
<b>CD 40L</b>	Ligand vázající se na receptor CD 40
<b>CRP</b>	<b>C-reactive protein</b> (C-reaktivní protein)
<b>CSF</b>	<b>Colony-Stimulating Factor</b> (faktor stimulující růst kolonií)
<b>DC</b>	<b>Dendritic Cell</b> (dendritická buňka)
<b>DMEM</b>	<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium</b> (typ kultivačního média)
<b>DNA</b>	<b>Deoxyribonucleic Acid</b> (deoxyribonukleová kyselina)
<b>DTH</b>	<b>Delayed Type Hypersensitivity</b> (přecitlivělost oddáleného typu)
<b>EIA</b>	<b>Enzyme Immunoassay</b> (enzymoimunoanalýza)
<b>ELISA</b>	<b>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</b> (enzymová imunoanalýza na pevné fázi, heterogenní enzymoimunoanalýza)

<b>EMIT</b>	<b>E</b> nzyme <b>M</b> ultiplied <b>I</b> mmunoassay <b>T</b> echnique (homogenní enzymoimunoanalýza)
<b>Fab</b>	Fab část na molekule imunoglobulinu
<b>FasL</b>	Ligand pro receptor Fas indukující apoptosu
<b>Fc</b>	Fc část na molekule imunoglobulinu
<b>FcR</b>	receptor vázající Fc část imunoglobulinu
<b>FIA</b>	<b>F</b> luoro <b>I</b> mmunoassay (fluoroimunoanalýza)
<b>G-</b>	Gram negativní, skupina mikroorganismů vytříděná podle diagnostického Gramova barvení
<b>G-CSF</b>	<b>G</b> ranulocyte <b>C</b> olony- <b>S</b> timulating <b>F</b> actor (faktor stimulující kolonie granulocytů)
<b>GM-CSF</b>	<b>G</b> ranulocyte- <b>M</b> onocyte <b>C</b> olony- <b>S</b> timulating <b>F</b> actor (faktor stimulující kolonie granulocytů, monocytů a makrofágů)
<b>gp.</b>	glykoprotein
<b>HBSS</b>	<b>H</b> anks' <b>B</b> alanced <b>S</b> alt <b>S</b> olution (Hankův solný roztok)
<b>HLA</b>	<b>H</b> uman <b>L</b> eukocyte <b>A</b> ntigen (lidský leukocytární histokompatibilní antigen)
<b>HLA-DR</b>	izotyp HLA
<b>HRP</b>	<b>H</b> orseradish <b>P</b> eroxidase (enzym křenová peroxidasa)
<b>IAP</b>	<b>I</b> mmunosuppressive <b>A</b> cidic <b>P</b> rotein (imunosupresivní kyselý protein)
<b>ICAM</b>	<b>I</b> ntercellular <b>A</b> dhesive <b>M</b> olecule (mezibuněčná adhezivní molekula)
<b>Ig</b>	imunoglobulin
<b>IL</b>	interleukin
<b>INF</b>	interferon
<b>iNOS</b>	<b>I</b> nducible <b>N</b> itric <b>O</b> xide <b>S</b> ynthase (indukovatelná synthasa oxidu

	dusnatého)
<b>LBP</b>	<b>L</b> ipopolysaccharide <b>B</b> inding <b>P</b> rotein (protein vázající lipopolysacharid)
<b>LPS</b>	<b>L</b> ipopolysaccharide (lipopolysacharid)
<b>LT</b>	<b>L</b> ymphotoxin (lymfotoxin; TNF $\beta$ )
<b>MAC</b>	<b>M</b> embrane <b>A</b> ttack <b>C</b> omplex (komplex (komplementový) atakující membránu)
<b>MBL</b>	<b>M</b> annose- <b>B</b> inding <b>L</b> ectin (lektin vázající manosu)
<b>M-CSF</b>	<b>M</b> onocyte <b>C</b> olony- <b>S</b> timulating <b>F</b> actor (faktor stimulující kolonie monocytů a makrofágů)
<b>MHC</b>	<b>M</b> ajor <b>H</b> istocompatibility <b>C</b> omplex (hlavní histokompatibilní komplex)
<b>mRNA</b>	<b>M</b> essenger <b>R</b> ibonucleic <b>A</b> cid (informační ribonukleová kyselina)
<b>NADP<sup>+</sup></b>	<b>N</b> icotinamide <b>A</b> denine <b>D</b> inucleotide <b>P</b> hosphate (nikotinamidadenindinukleotid fosfát)
<b>NADPH</b>	<b>N</b> icotinamide <b>A</b> denine <b>D</b> inucleotide <b>P</b> hosphate (nikotinamidadenindinukleotid fosfát – redukována forma)
<b>NK</b>	<b>N</b> atural <b>K</b> iller (přirozený zabíječ)
<b>NOS</b>	<b>N</b> itric <b>O</b> xide <b>S</b> ynthase (synthasa oxidu dusnatého)
<b>OPD</b>	ortho – fenylendiamin
<b>PAI</b>	<b>P</b> lasminogen <b>A</b> ctivator <b>I</b> nhibitor (inhibitor aktivátorů plasminogenu)
<b>PAMP</b>	<b>P</b> athogen- <b>A</b> sociated <b>M</b> olecular <b>P</b> attern (struktury asociované s patogeny)
<b>PBS</b>	<b>P</b> hosphate <b>B</b> uffered <b>S</b> aline (fosfátový pufr s chloridem sodným)
<b>pH</b>	<b>P</b> ower of <b>H</b> ydrogen (vodíkový potenciál)
<b>PPR</b>	<b>P</b> athogen <b>P</b> attern <b>R</b> eceptor (receptor rozpoznávající PAMP struktury patogenů)

<b>PRR</b>	<b>P</b> attern <b>R</b> ecognition <b>R</b> eceptor (receptor rozpoznávající PAMP struktury patogenů)
<b>RIA</b>	<b>R</b> adioimmunoassay (radioimunoanalýza)
<b>ROI</b>	<b>R</b> eactive <b>O</b> xygen <b>I</b> ntermediates (reaktivní kyslíkové intermediáty)
<b>RPMI</b>	<b>R</b> oswell <b>P</b> ark <b>M</b> emorial <b>I</b> nstitute (typ kultivačního média pojmenovaného po RPMI)
<b>T<sub>C</sub></b>	Cytotoxic T cell (cytotoxický T lymfocyt)
<b>TcR</b>	<b>T</b> Cell <b>R</b> eceptor (receptor T lymfocytů pro antigen)
<b>TGF</b>	<b>T</b> ransforming <b>G</b> rowth <b>F</b> actor (transformující růstový faktor)
<b>T<sub>H</sub></b>	Helper T Cell (pomocný T lymfocyt)
<b>TMB</b>	tetramethylbenzidin
<b>TNF</b>	<b>T</b> umor <b>N</b> ecrosis <b>F</b> actor (faktor nekrotizující nádory)
<b>tPA</b>	<b>T</b> issue <b>P</b> lasminogen <b>A</b> ctivator (tkáňový aktivátor plasminogenu)
<b>T<sub>REG</sub></b>	Regulatory T Cell (regulační T lymfocyt)
<b>uPA</b>	<b>U</b> rokinase <b>P</b> lasminogen <b>A</b> ctivator (urokinasový aktivátor plasminogenu)
<b>VCAM</b>	<b>V</b> ascular <b>C</b> ell <b>A</b> dhesion <b>M</b> olecule (cévní adhesivní molekula)

# **SOUHRN**

Tato diplomová práce se zabývá stanovením tří cytokinů produkovaných peritoneálními makrofágy potkana - TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6 ve vztahu k rozdílnému přístupu operačního výkonu – laparotomickému či laparoskopickému. Byla měřena bazální produkce uvedených cytokinů a jejich produkce po stimulaci makrofágů bakteriálním lipopolysacharidem (LPS). Izolace buněk z peritonea probíhala ve dvou intervalech - 24 nebo 72 hodin po operaci. Vlastní analýze předcházela vždy 24 hodinová kultivace s, resp. bez LPS. Optimální koncentrace LPS vhodné pro stimulaci peritoneálních makrofágů bylo nutno experimentálně docílit. Zjištěná optimální koncentrace LPS byla 0,1  $\mu$ g/ml. Hladina cytokinů byla stanovena pomocí sendvičové ELISA metody.

V teoretické části je popsána organizace imunitního systému a funkce jeho jednotlivých složek v imunitní odpovědi s důrazem na úlohu makrofágů. Významná část je věnována roli cytokinů v modulaci imunitní odpovědi. Dále je podána literární rešerše o dějích v peritoneální oblasti ve vztahu k laparotomickému či laparoskopickému zásahu do abdominální krajiny a zhodnocení systémové a lokální imunitní odpovědi, která tyto chirurgické zákroky doprovází.

Experimentální část je věnována popisu principu EIA metod se zaměřením na ELISA metody a její variace. Dále je v této části uveden optimalizovaný postup izolace a kultivace peritoneálních makrofágů a vlastního stanovení jimi produkovaných cytokinů metodou ELISA.

Výsledková část obsahuje postup optimalizace koncentrace LPS vhodného pro stimulaci peritoneálních makrofágů. Dále zahrnuje grafickou a slovní dokumentaci bazální i stimulované produkce jednotlivých cytokinů makrofágy izolovanými 24, resp. 72 hodin po zákroku. Bazální produkce cytokinů byla signifikantně vyšší u laparoskopované skupiny, nejvyšší produkci cytokinů stimulovanými makrofágy vykazovala naopak skupina po laparotomii. Zhodnocení získaných výsledků je rozebíráno v diskusi.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

**PERITONEÁLNÍ MAKROFÁGY**

**CYTOKINY**

**ELISA**

**LPS**

## **SUMMARY**

This thesis deals with the determination of the three cytokines produced by rat peritoneal macrophages - TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in relation to the different approach of surgery - laparoscopic or laparotomic. Was measured basal production of cytokines and those of their production after stimulation of macrophages by bacterial lipopolysaccharide (LPS). Isolation of peritoneal cells was performed in two intervals - 24 or 72 hours after surgery. The actual analysis is always preceded by 24 hours of cultivation with, respectively without LPS. The optimal concentration of LPS suitable for stimulation of peritoneal macrophages was necessary to achieve experimentally. The observed optimal concentration of LPS was 0,1  $\mu$ g/ml. The level of cytokines was determined using a sandwich ELISA method.

The theoretical part describes the organization of the immune system and functions of its individual components in the immune response with emphasis on the role of macrophages. A significant part is devoted to the role of cytokines in the modulation of immune responses. In addition, is given a literature review about actions in the peritoneal area in relation to laparotomic or laparoscopic intervention into the abdominal landscape and assess systemic and local immune response that accompanies the surgery.

The experimental section is devoted to describing the principle of EIA methods, focusing on the ELISA method and its variations. Additionally, the optimized process isolation and cultivation of peritoneal macrophages and optimized determination of cytokines measured by ELISA is described there.

Results contain the process of optimization of an appropriate concentration of LPS suitable for stimulation of peritoneal macrophages. It also includes a graphical and verbal documentation of basal and stimulated production of cytokines by macrophages isolated 24, resp. 72 hours after surgery. Basal cytokine production was significantly higher in laparoscopic group, the highest cytokine production by stimulated macrophages showed a group after laparotomy. Evaluation of obtained results is discussed in the discussion.

## **KEYWORDS**

PERITONEAL MACROPHAGES

CYTOKINES

ELISA

LPS

# 1. ÚVOD

Cílem této práce je zavedení metodiky stanovení produkce cytokinů peritoneálními makrofágy potkana a sledovat změny produkce po operačním zákroku v abdominální dutině s ohledem na typ chirurgického přístupu. V teoretické části má práce podat literární přehled o mechanismech imunitní odpovědi v obecné rovině, popsat děje provázející imunitní reakci po chirurgickém zákroku v abdominální dutině a poukázat na úlohu peritoneálních makrofágů v těchto dějích. V experimentální části je popsán princip ELISA metod, metodický postup a jeho optimalizace pro stanovení cytokinů TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6 produkovaných peritoneálními makrofágy potkana. Výsledková část je věnována stanovení produkce cytokinů peritoneálními makrofágy potkana. Makrofágy byly izolovány 24 a 72 hodin po laparotomické a laparoskopické operaci a následně kultivovány bez či se stimulací lipopolysacharidem. Získané hodnoty produkce cytokinů byly vzájemně statisticky porovnány včetně kontrolní neoperované kontroly. Dosažené výsledky by měly přispět k objasnění, zda stále používanější laparoskopické operace mohou vést k alteraci lokální imunitní odpovědi, což má význam pro lepší prognózu pooperačních komplikací.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Organizace imunitního systému

Imunitní systém má za úkol vyhledávat a případně ničit potencionálně nebezpečné infekční agens, nejčastěji mikroorganismy, prvoky, parazity a jejich toxiny. Lze jej dělit na dvě základní složky, rozlišované podle evolučního vývoje a lišící se také funkcí, a to na specifickou (adaptivní) a nespecifickou (přirozenou, neadaptivní) imunitu. První ze zmiňovaných má možnost se přizpůsobovat, během života jedince se měnit a je z evolučního hlediska mladší. Její plná odezva je nastolena až po aktivaci, jež se děje až po setkání s daným antigenem, s nímž složky adaptivní imunity specificky reagují – tj. vážou se na dané vazebné místo antigenu podle principu zámek vs. klíč. K plnohodnotné odezvě imunitního systému je potom třeba několik dní až týdnů. Charakteristickým rysem specifických reakcí je tzv. imunologická paměť, která umožňuje rychlou reakci proti reinfekci antigenem, s nímž se již organismus v minulosti setkal. Naproti tomu nespecifická imunita je totožná jak u novorozence, tak u dospělého člověka a její složky reagují s nebezpečnými vzory ihned bez nutnosti předchozí aktivace. Je evolučně starší a stálá.

V mechanismech přirozené imunity se uplatňují buňky s fagocytární schopností, buňky přirozeně cytotoxické (NK – *natural killers*), komplement, interferony, lektiny a další sérové proteiny. Do specificky reagujících potom patří T lymfocyty, B lymfocyty, z nichž aktivací vznikají plazmatické buňky tvořící protilátky, jež jsou humorální složkou adaptivní imunity. Pro přehlednost je rozdělení uvedeno níže v tabulce č. 1.



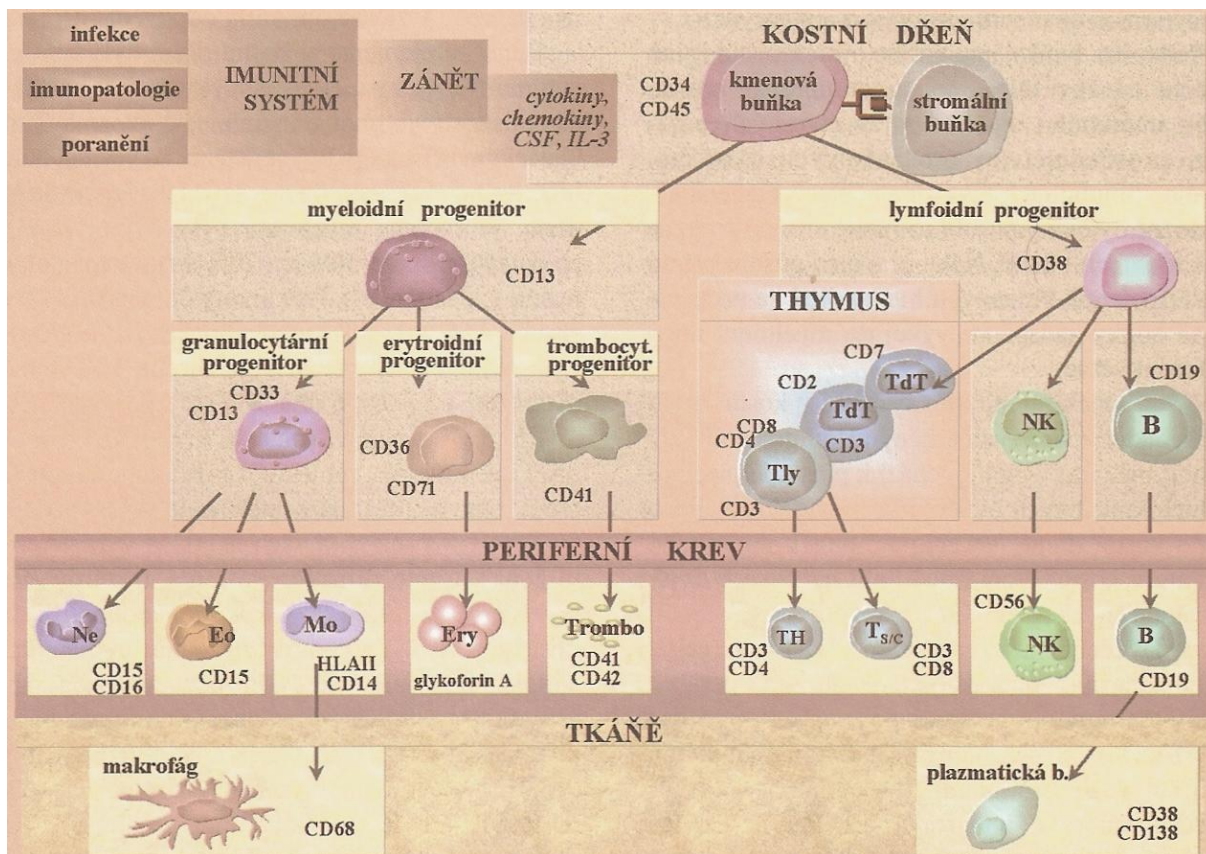
Tabulka č. 1

<b><u>Organizace imunitního systému</u></b>			
<u>Specifická imunita</u>	<u>Buněčná</u>	T lymfocyty	
		B lymfocyty	
		Plazmatické buňky	
	<u>Humorální</u>	Protilátky	
<u>Nespecifická imunita</u>	<u>Buněčná</u>	Granulocyty	Eosinofily
			Basofily
			Neutrofilly
		Monocyty + makrofágy	
		Dendritické buňky	
		NK – Natural killers	
	<u>Humorální</u>	Komplement	
		Interferony	
		Lektiny	
		Sérové proteiny	

Všechny imunokompetentní buňky zahajují svůj vývoj v kostní dřeni. Z pluripotentní kmenové buňky, což je buňka schopná diferenciaci na jakoukoliv jinou buňku, zde vznikají dvě linie – lymfoidní a myeloidní. Z myeloidní se dále vyvíjejí granulocyty, dendritické (Langerhansovy a intersticiální) buňky a monocyty, z nichž přechodem do tkáně vznikají makrofágy. Všechny výše uvedené konečné produkty myeloidní linie spadají do nespecifické buněčné imunity a většinou mají schopnost fagocytosy. Vedle imunokompetentních buněk vznikají z této linie i erytrocyty a trombocyty. Naopak z lymfoidní linie vznikají především buňky tvořící základ specifické imunity, jejíž buňky reagují na cizorodé struktury pomocí svých vysoce specifických receptorů. Z lymfoidní linie se vyvíjejí T a B lymfocyty, lymfoidní dendritické buňky a NK buňky. NK buňky jsou sice morfologicky velmi podobné lymfocytům, ovšem reagují pomocí nespecifických mechanismů a jsou tedy zástupci přirozené imunity. Další výjimkou jsou dendritické buňky, jež patří rovněž pod imunitu neadaptivní, ovšem v závislosti na druhu se vyvíjejí z obou linií. Po složitých dějích nastartovaných specifickým kontaktem s antigenem vznikají z B lymfocytů další diferenciací tzv. plazmatické buňky, které produkují imunoglobuliny, humorální součást specifické

imunity (1). Obě vývojové linie a jejich konečné diferenační produkty jsou uvedeny na obrázku č. 1.

Obrázek č. 1



Převzato z: Klinická imunologie – Jan Krejsek, Otakar Kopecký; str. 94

## 2.1.1 Nespecifická imunita

Prvotní obrannou funkci organismu proti vniku patogenů zastávají fyziologické bariéry, které nemají ještě imunologickou povahu. Jsou určeny histologickými parametry tkání a anatomickým uložením orgánů. Povrchové vrstvy těla jako kůže a sliznice průnik řadě patogenů do organismu když ne přímo znemožňují, pak přinejmenším znesnadňují. Epitelie jsou povrchem rychle se měnícím a nedopřávají tak choroboplodné částici dostatečný čas na průnik do organismu. Často je epitel vybaven dalšími mechanismy, které tento dopad ještě násobí – řasinky, hlen či osídlení přirozenou mikroflórou. Důležitou úlohu na sliznicích hrají i sekreční protilátky. Fyziologické bariéry jsou svými pokryvy v podstatě největším imunologickým orgánem a významně ovlivňují imunologickou reaktivitu organismu (1).

Nespecifická imunita, jak bylo naznačeno výše, reaguje nespecificky proti strukturám, které se vyskytují na patogenech a jsou jim společné. Těmito strukturami jsou tzv. PAMP (*pathogen associated molecular patterns*), jež se vyskytují na choroboplodných částicích, ale ne na strukturách organismu vlastních nebo pro něj neškodných. Imunokompetentní buňky spadající pod nespecifický subset imunity mají na svém povrchu receptory, jimiž jsou schopny tyto PAMP struktury rozpoznat a vzápětí tj. bez předchozí stimulace na ně reagovat a vykonávat tak svou efektorovou funkci. Jsou tedy v organismu připraveny k okamžité reakci a jsou ontogeneticky stálé.

Buněčnou složkou nespecifické imunity jsou především níže podrobněji probírané fagocyty, kam spadají jak jejich zástupci v periferní krvi (neutrofilní a eosinofilní granulocyty a monocyty), tak ve tkáni (makrofágy). Další důležitou součástí jsou buňky dendritické, jejichž hlavním úkolem je účinná prezentace pohlceného antigenu buňkám specifického imunitního systému. Tvoří tak významnou spojnici mezi kooperujícími složkami nespecifického a specifického imunitního systému. Posledním buněčným zástupcem jsou lymfocytům morfologicky podobné NK buňky, které se vyznačují schopností přímé cytotoxické aktivity (2).

### **2.1.1.1 Fagocyty:**

Buňky, jež nazýváme profesionálními fagocyty, se vyznačují, jak lze již odvodit podle názvu, tím, že jsou schopny pohlcovat choroboplodné částice a uvnitř sebe je pak ve speciálních vakuolách následně usmrcovat. Jelikož se tak děje na základě rozpoznání struktur, jež jsou společné všem infekčním a cizorodým částicím, nikoliv na podnět specifické reakce proti danému epitopu jistého antigenu, jsou řazeny pod nespecifickou imunitu. Do rodiny fagocytů patří granulocyty – eosinofilní a neutrofilní, dendritické buňky a tkáňová forma monocytů – makrofágy (2).

#### Fagocytosa

Fagocytosa je děj probíhající převážně ve tkáni, proto musejí buňky s fagocytární aktivitou nejprve projít přes cévní stěnu. Tento děj se nazývá *diapedesa* a je zprostředkován adhezivními molekulami endotelií *selektiny*, které se vážou na sacharidové struktury na povrchu fagocytu. Po tomto nepřilíš silném spojení zvaném *rolling*, jež má za úkol fagocyt v místě potřeby především zpomalit, následuje již spojení pevnější a ireverzibilní. Toto je

v případě makrofágů realizováno adhezivní molekulou  *$\beta$ 1-integrinem* na fagocytech a tzv. molekulou *VCAM-1* přítomnou na endoteliích. U neutrofilů se jedná o leukocytární integriny na fagocytech, které adherují na molekulu *ICAM* na endoteliích (2). Afinitu integrinů k endotelu výrazně zvyšují prozánětlivé cytokiny, kdy se změní konformační struktura integrinu, a tím je vazba umožněna. Poté může fagocyt proniknout přes cévní stěnu z krve do tkáně.

Aby mohl ve tkáni fagocyt svou funkci splnit, musí být nejprve k místu potřeby nasměrován. Tento děj se nazývá *chemotaxe* a látky, vykonávající tuto funkci *chemotaktiny*. Do této skupiny patří řada látek rozmanité povahy, pro které mají fagocyty na svém povrchu příslušné receptory, jejichž stimulace vede k chemotaxi a k aktivaci fagocytosy i následných dějů. Fagocyty se ve tkáni aktivně pohybují k místu zánětu pomocí hydrolytických enzymů, jimiž štěpí složky mezibuněčné hmoty a posunují se díky reverzibilním adhezivním interakcím svých povrchových adhezivních molekul a molekul mezibuněčné hmoty (2).

Dalším předpokladem pro fagocytosu je určité zviditelnění či zvýraznění částice určené k pohlcení. Tento děj je označován *opsonizace* a látky mající tuto aktivitu *opsoniny*. Jsou to substance, jež se na částici odsouzenou k pohlcení vážou a fungují jako jakési výstražné světlo, které na sebe chemotaxí přilákané fagocyty upozorní. Jako opsoniny funguje celá řada látek, z nichž nejdůležitější jsou protilátky, složky komplementu (C3b, C5b) a sérové proteiny, které jsou pod vlivem prozánětlivých cytokinů syntetizovány játry. Specifické protilátky navázané na příslušnou částici či mikroorganismus jsou rozeznávány Fc-receptory fagocytů, což jsou receptory, které se, jak již název napovídá, vážou na Fc část protilátek a tím také spouští děj samotné fagocytosy. Obdobně složky aktivovaného komplementu na povrchu mikroorganismů jsou rozeznávány komplementovými receptory fagocytů (2).

Poté jsou již fagocyt a cizorodá částice v bezprostředním kontaktu, fagocyt obchvacuje částici pseudopodiemi a ta se tak uzavírá do nově vzniklé vakuoly nazývané *fagosom*. Po vytvoření fagosomu (ale i již během tvorby) dochází k jeho fúzi s lysosomy (u granulocytů zvané též azurofilní granula), které obsahují řadu látek baktericidní povahy (defensiny) a hydrolytické enzymy (katepsiny, lysozym) v tekutině o kyselém pH (4-5). Fc-receptory a komplementové receptory na povrchu fagocytu reagují s příslušným opsoninem na cizorodé částici a tím aktivují membránový enzym NADPH-oxidasu. Její aktivace zahajuje řadu dějů provázených rapidní spotřebou kyslíku a jsou proto nazývány oxidačním (respiračním) vzplanutím. NADPH-oxidasa katalyzuje proces, při němž reakcí kyslíku a NADPH

(redukována forma  $\text{NADP}^+$ ) vzniká  $\text{NADP}^+$  (nikotinamidadenin dinukleotidfosfát) a superoxidový radikál  $\text{O}_2^-$  (molekula kyslíku s připojeným jedním elektronem). Z něj potom dále vznikají další látky nazývané souhrnně reaktivními kyslíkovými intermediáty (ROI), které mají povahu velmi agresivních oxidačních činidel, jež poškozují bakteriální DNA, narušují strukturu mikrobiálních biopolymerů a ničí aktivitu jejich enzymů. Těmito látkami jsou především singletový kyslík, hydroxylový radikál a peroxid vodíku, který je za katalýzy enzymem myeloperoxidase schopen reagovat s chloridovým aniontem za vzniku chlornanových aniontů ( $\text{ClO}^-$ ) majících rovněž baktericidní aktivitu (2). Všechny tyto látky působí nejen uvnitř fagosomu, ale fagocyty je sekretují i do okolního prostředí, kde často poškozují spolu s terčovými buňkami i okolní tkáň a tělní struktury (1).

Řada bakterií však žije intracelulárně a obsahuje enzym katalasu, který je schopen rozložit peroxid vodíku na kyslík a vodu, a tím zabránit nejen vlastní baktericidní aktivitě peroxidu, ale i vzniku výše zmiňovaného chlornanového aniontu. Intracelulární patogeny jsou ničeny dalším mikrobicidním prostředkem fagocytů - oxidem dusnatým produkovaným enzymovým komplexem inducibilní iNO-synthasou. Tento enzym se především uplatňuje v makrofázích. V likvidaci intracelulárních bakterií tedy hrají roli zejména aktivované makrofágy, jež jsou na rozdíl od ostatních fagocytů schopny NO v dostatečné míře tvořit. Proti extracelulárním patogenům postačí produkty aktivace NADPH-oxidasy a jako buňky se v tomto boji uplatňují především neutrofilní granulocyty (2).

### 2.1.1.1.1. MAKROFÁGY

Makrofágy představují tkáňovou formu monocytů a společně reprezentují mononukleární fagocytární systém. Monocyty se vyskytují v periferní krvi v poměrném zastoupení 5-10% ze všech leukocytů. Zastoupení ostatních druhů leukocytů je uvedeno v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2

<i><b>Poměrné zastoupení jednotlivých druhů leukocytů v periferní krvi dospělého člověka</b></i>	
<i><b>Druh buněk</b></i>	<i><b>Poměrné zastoupení [%]</b></i>
Neutrofilní granulocyty	60-70
Eosinofilní granulocyty	1-3
Basofilní granulocyty	0-2
Monocyty	5-10
Lymfocyty	20-40

Makrofágy se vyskytují prakticky ve všech orgánech a tkáních v organismu. Díky tomuto hojnému zastoupení konají funkci „předsunutých hlídek“, se kterými se infekční agens dříve či později setká. Ve své membráně mají zakotvenu řadu membránových receptorů spadajících do skupiny tzv. PPR, PRR (*pathogen pattern receptor, pattern recognition receptors*), kterými jsou schopny rozpoznávat struktury asociované s patogenem (PAMP – *pathogen associated molecular patterns*) (2). Tyto struktury se nacházejí na povrchu mikroorganismů, ale nikoliv již na nepoškozených buňkách organismu vlastních a mohou být představovány například endotoxiny (LPS), peptidoglykany, glukany, mannany atd.

Přestože je většina charakteristik společná všem buňkám spadajících do rodiny profesionálních fagocytů (neutrofilů, eosinofilů, monocytů a makrofágů a zvláštní druh fagocytujících buněk - buňky dendritické), jsou zde samozřejmě i určité rozdíly. Především makrofágy na rozdíl od neutrofilů exprimují na svém povrchu MHC gp. II. třídy (u lidí jsou nazývány HLA II. třídy) a jsou tedy buňkami prezentujícími antigen, které zajišťují přímý kontakt s imunitou specifickou a tím i prvotní specifickou odpověď. Z dalších povrchových znaků nesou molekulu CD 14, která rozpoznává LPS a je tedy zodpovědná za citlivost makrofágů na stimulaci touto noxou. Dále se, jak již bylo zmíněno výše, podílejí na fagocytose a likvidaci především intracelulárních mikroorganismů a také vlastních apoptických buněk. Další rozdíl je v tom, že granulocyty jsou schopny vykonávat své efektorové funkce ihned, zatímco makrofágy vyžadují ke své plné funkci aktivační signály poskytované T-lymfocyty ve formě cytokinů  $INF\gamma$  a  $TNF\alpha$ , takže v podstatě jsou závislé na kooperaci se specifickými mechanismy (3). Rozdíl pramení i z odlišné životnosti. Neutrofilní granulocyty mají v krvi poločas pouhých 6-12 hodin, po splnění své funkce hynou a jsou odstraňovány právě makrofágy, které oproti nim žijí relativně dlouho a jsou schopny se transformovat do různých aktivačních stádií a proces fagocytosy několikrát opakovat (1).

Vedle fagocytární funkce mají makrofágy ještě neméně důležitou funkci regulační. Intracelulární infekce vyžadují aktivaci makrofágů závislou na  $T_H1$  buňkách, které následně navozují buněčně zprostředkovanou specifickou imunitní odpověď. K aktivaci makrofágu je třeba jeho kontakt s diferencovanými  $T_H1$  buňkami a pro pomnožení a diferenciaci  $T_H$  buněk do podtřídy  $T_H1$  je nezbytná účast makrofágů. Makrofág jakožto APC na svém povrchu v komplexu s MHC gp. II. třídy vystavuje peptidy pocházející z mikroba, které je příslušný klon  $T_H$  lymfocytů schopen svým receptorem (TcR) rozpoznat. Mezi buňkami vzniká pevný kontakt díky vazbě adhezivních (ICAM-1) a kostimulačních molekul (CD86) makrofágů s příslušnými receptory na povrchu  $T_H$ . Makrofágy produkují IL-12, který má za úkol

diferencovat pomocné T<sub>H</sub> lymfocyty do subsetu T<sub>H</sub>1. Samotný kontakt IL-12 a receptoru pro IL-12 na T<sub>H</sub>-lymfocytech ale k diferenciaci nestačí, uplatňují se i signály přes TcR, CD 28 a další molekuly, které nashutují děje vedoucí k pomnožení klonu T-buněk dané specifity a k diferenciaci na efektorové T<sub>H</sub>1. T<sub>H</sub>1 lymfocyty produkují INF $\gamma$ , který aktivuje makrofágy (2). Takto aktivovaný makrofág je jednak schopen tvořit NO, dále pak celou řadu cytokinů, jejichž přehled je uveden v tabulce č. 3. Pomocí některých cytokinů produkovaných aktivovanými makrofágy se spouští i celá kaskáda reakcí, které mají souhrnně prozánětlivý účinek (3).

Tabulka č. 3

<b><i>Přehled cytokinů produkovaných makrofágy a jejich funkce</i></b>		
<i>Cytokin</i>	<i>Jiné zdroje</i>	<i>Funkce</i>
<b>IL-1<math>\alpha,\beta</math></b>	neutrofilly	Kostimulace T, indukce TNF a IL-8, pyrogen, prozánětlivý
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	monocyty, NK	Indukce místního zánětu, aktivace endotelií
<b>IL-6</b>	T <sub>H</sub> 2, neutrofilly	Stimulace T, B, sekrece Ig, indukce syntézy proteinů akutní fáze, pyrogen, prozánětlivý
<b>IL-8</b>	různé buňky	Chemotaxe a aktivace granulocytů, amplifikace zánětlivé reakce
<b>IL-10</b>	T <sub>H</sub> 2, neutrofilly	Inhibice T <sub>H</sub> 1 a makrofágů, indukce diferenciac na plazmocyty
<b>IL-12</b>	Neutrofilly, NK buňky, B-lymfocyty	Stimulace T <sub>H</sub> 1 a NK
<b>IL-18</b>	Kupferovy buňky	Indukce INF $\gamma$
<b>IL-27</b>	monocyty, dendritické buňky	Indukce IL-12R na T-lymfocytech
<b>IL-28</b>	buňky infikované virem	Protivirové působení (jako INF)
<b>IL-29</b>	buňky infikované virem	Protivirové působení (jako INF)
<b>INF-<math>\alpha</math></b>	Lymfocyty, monocyty	Protivirové působení (inhibice replikace)
<b>G-CSF</b>	stroma dřene, fibroblasty	Stimulace diferenciac granulocytů
<b>GM-CSF</b>	endotelie, T-lymfo., fibroblasty	Stimulace diferenciac myeloidních buněk, regulace hematopoesy
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	T-lymfocyty, trombocyty	Inhib. mitosy, izotypový přesmyk na IgA, protizánětlivý

Z výčtu funkcí cytokinů produkovaných makrofágy je patrné, že imunitní systém neovlivňuje jen jedním směrem, ale působí na celou řadu cílových struktur a různými účinky, které jsou často i protichůdné (např. prozánětlivé působení IL-1 a IL-6 versus protizánětlivé IL-10 a TGF- $\beta$ ).

### **2.1.1.1.2. Dendritické buňky**

Dendritické buňky (DC – *Dendritic cells*) jsou nejučinnější antigen prezentující buňky (APC) a na svém povrchu exprimují MHC gp. I. i II. třídy. Jsou strategicky rozmístěny v celém organismu, kde se setkávají s možnými strukturami, které pohlcují a v komplexu s MHC gp. II. třídy vystavují na povrchu štěpy pocházející z pohlceného materiálu. Pokud v organismu není přítomna infekce, nezralé dendritické buňky pohlcují a zpracovávají struktury tělu vlastní, např. odumřelé buňky (1). Specifické T lymfocyty, které organismu vlastní antigen rozpoznají, jsou buď utlumeny, nebo se diferencují na T<sub>REG</sub> lymfocyty, které aktivně potlačují autoimunitní reakci proti vlastním antigenům. Dendritické buňky se tak významně podílí na toleranci vlastních struktur (2). Pokud se ovšem setkají s patogenem, aktivují se a diferencují se na zralé dendritické buňky. Ty migrují do sekundárních lymfatických orgánů, kde předkládají antigenní štěp lymfocytům a tak je aktivují. Zralé DC ztrácejí schopnost pohlcovat částice z okolí a mění se na účinné APC. Zvyšují expresi MHC glykoproteinů, kostimulačních a adhezivních molekul a produkci cytokinů, které jsou využívány T lymfocyty a stimulují jejich diferenciaci. Naivní lymfocyty, tj. ty, které se ještě nesetkaly s antigenem, mohou být aktivovány pouze zralými dendritickými buňkami. Jakmile dendritické buňky dosáhnou zralosti, je tento proces ireverzibilní a po splnění úkolu hynou apoptosou. DC rovněž hrají roli v imunitní odpovědi na napadení virem. Jsou virem často infikovány a v komplexu s MHC gp. I. třídy poté exprimují vlastní, virem abnormálně změněné proteinové štěpy, které jsou rozpoznávány antigenně specifickými T<sub>C</sub>. Podílejí se tak jak na buněčně zprostředkované cytotoxické odpovědi, tak na odpovědi založené na T<sub>H</sub> lymfocytech, potažmo na protilátkách (1). Dendritických buněk je několik typů, které se liší vývojovým původem, převažujícím výskytem v daných tkáních a expresí určitých povrchových CD znaků. Folikulární DC prezentují antigen B lymfocytům a hrají úlohu v procesu imunologické paměti B lymfocytů (2).



### **2.1.1.2 NK buňky**

NK buňky jsou označovány jako přirození zabíječi. Vznikají, rovněž jako T i B-lymfocyty, z lymfoidního progenitoru. Jsou morfologicky velice podobné T lymfocytům, ale jelikož nemají na svém povrchu antigenně specifické receptory, jsou řazeny do imunity nespecifické. Jejich úloha v organismu je vyhledávat a bez předchozí stimulace či proliferace okamžitě ničit především buňky nádorové a infikované virem. Další analogie s T lymfocyty je ve způsobu a mechanismu likvidace patogenů. Obsahují, stejně jako cytotoxické T-lymfocyty, cytotoxická granula s perforinem (jež zprostředkuje průchod do terčové buňky) a granzymy (enzymy, které terčovou buňku zlikvidují) (2).

Tyto buňky mají na povrchu v zásadě dva druhy receptorů – pozitivní (stimulační) a negativní (inhibiční) a podle převahy dané skupiny se buď cytotoxické mechanismy stimulují či inhibují. Do skupiny navozující cytotoxickou aktivitu patří především Fc-receptor (FcR, CD16), který váže Fc části protilátek opsonizujících částici. Tento děj se nazývá cytotoxická reakce závislá na protilátkách – ADCC. Do skupiny s inhibičním účinkem na cytotoxickou aktivitu patří především receptory rozeznávající MHC gp. I. třídy. Buňky s dostatečnou expresí MHC gp. I. třídy tedy nejsou odstraňovány NK buňkami. Některé nádorově změněné a virem napadené buňky se odvrhováním MHC gp. I. třídy maskují proti cytotoxickému účinku T-lymfocytů. NK buňky tedy ničí ty struktury, které mají na svém povrchu MHC gp. I. abnormálně málo (2).

Další funkcí NK buněk, je funkce regulační, kterou mají vlastně všechny složky imunitního systému. Produkují například cytokin  $\text{INF}\gamma$  aktivující makrofágy, látky ovlivňující diferenciaci  $T_H$  buněk či hematopoesu (IL-3, M-CSF) (1).

### **2.1.1.3 Komplement:**

Komplement je soustava několika proteinů, které mají po vzájemné spolupráci za úkol infekční částici opsonizovat, chemotakticky „nalákat“ další složky imunitního systému a způsobit osmotickou lýzu a tím buňku zničit. Do tohoto systému je zahrnováno přibližně 30 proteinů, přičemž nejdůležitější úlohu zde hraje 9 sérových bílkovin (C1-C9), jež se různými podněty kaskádovitě aktivují a nakonec tvoří tzv. MAC komplex (*membrane attack complex*), jež perforuje membránu mikroorganismů a lyzuje je. K dosažení tohoto komplexu vedou

v zásadě tři cesty, které se liší způsobem primární aktivace komplementu a více či méně také průběhem.

První cesta je nazývána klasická a je zahájena na částicích opsonizovaných protilátkami. Druhou cestou je dráha alternativní, která je iniciována na tzv. vhodných povrchích vyskytujících se převážně na choroboplodných či cizorodých částicích. Mezi takové struktury patří LPS G- bakterií, různé endotoxiny, buněčné stěny kvasinek nebo buňky nádorově zvrhlé. Posledním způsobem aktivace je cesta lektinová. Je iniciována lektinem vázajícím manosu (MBL, *mannose-binding lectin*), který se váže na sacharidové struktury přítomnými na mikroorganismech.

Všechny cesty aktivace komplementu způsobují kaskádovité štěpení proteinových komponent C2-C5 za vzniku jejich štěpných produktů, které mají chemotaktickou či opsonizační aktivitu. Všechny dráhy komplementu vyúsťují ve vznik štěpného produktu C5b a zde je již mechanismus pro všechny dráhy společný. C5b spolu s bílkovinami C6, C7 a C8 vytvoří komplex, jež se zanoří do membrány terčové buňky a na něj kruhově nasedne 13 – 18 molekul proteinu C9 a vytvoří tak pór. Tímto otvorem v membráně následně unikají cytoplazmatické komponenty, je narušena osmóza a buňka podléhá lýze. Ovšem účinnost na mikroorganismy obdařené buněčnou stěnou je nulová a tak komplement má svoji nezastupitelnou úlohu především v účinné chemotaktické a opsonizační aktivitě svých meziproductů (2).

#### **2.1.1.4 Ostatní:**

Dalšími neméně důležitými složkami neadaptivní imunity jsou proteiny akutní fáze. Jsou to různorodé bílkoviny obsažené v séru a jejich koncentrace se v závislosti na řadě podnětů mění. Takovým stěžejním stimulem pro jejich syntézu v játrech je působení prozánětlivých cytokinů, které jsou v reakci na zánět produkovány imunokompetentními buňkami. Nespecifickou obranu proti virovým infekcím zastávají interferony, jež patří do obsáhlé rodiny cytokinů. Důležitou úlohu sehrávají i lektiny či erytrocyty a trombocyty (1).

## **2.1.2 Specifická imunita**

Specifická imunita se vyznačuje tím, že příslušné buňky či protilátky reagují proti konkrétnímu specifickému epitopu daného antigenu a pouze na tuto strukturu se váží jako zámek vs. klíč. Jejich plná odezva a funkce nastává až po setkání s příslušným antigenem a po přijetí kostimulačních signálů poskytovaných dalšími imunokompetentními buňkami se teprve plně aktivují. Vykazují jev zvaný „imunologická paměť“, kdy část lymfocytů po splnění své funkce apopticky nezahyne, nýbrž se přemění na tzv. paměťové buňky, které v případě sekundární infekce daným patogenem zajistí rychlý rozvoj protektivní obranné reakce. Tento úkaz dokládá, že specifická imunita na rozdíl od té nespecifické není ontogeneticky jednotná, tj. v průběhu vývoje daného jedince se mění.

### **2.1.2.1 Specifická buněčná imunita**

Zástupci buněčné specifické imunity jsou B a T lymfocyty a buňky, které vznikají jejich další diferenciací, tj. buňky plazmatické či paměťové.

#### **2.1.2.1.1 T-lymfocyty:**

T lymfocyty pocházejí z hematopoetických kmenových buněk, odkud migrují do thymu. V thymu se přes několik diferenciačních stádií mění na zralé lymfocyty, které jsou vyplavovány do periferní krve a sekundárních lymfatických orgánů, kde čekají na kontakt s antigenem. Dále v thymu probíhá proces selekce, který je součástí tzv. indukce tolerance vlastního. Přežijí jen lymfocyty, jež jsou schopny s dostatečnou afinitou rozeznat antigenní štěpy v komplexu s MHC gp. na povrchu APC (pozitivní selekce) a jsou ničeny ty, které reagují s vlastními strukturami (negativní selekce). Tyto TcR receptory zralých lymfocytů jsou strukturně velice podobné imunoglobulinům. TcR, podílející se na rozeznávání antigenů, je asociován s komplexem CD3, který je významný pro přenosu signálu (1).

T lymfocyty se dělí podle koreceptoru pomáhajícího vázat MHC gp. na CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> lymfocyty. Koreceptor CD 4 se podílí na vazbě MHC gp. II. třídy a CD 8 na vazbě MHC gp. I. třídy. MHC gp. I. třídy se vyskytují na všech jaderných buňkách a v komplexu s nimi jsou vystavovány peptidové štěpy z proteinů pocházejících z dané buňky (buňky napadené virem,

nádorové buňky). Oproti tomu MHC gp. II. třídy se vyskytují pouze na profesionálních APC a vážou peptidy pocházející z materiálu buňkou pohlceného. Cílem CD 4<sup>+</sup> T lymfocytů nazývaných T<sub>H</sub> (*helper, pomocné*) je převážně regulace a sekrece cytokinů působících buď na tvorbu protilátek či na aktivaci makrofágů a obecně napomáhat ostatním strukturám imunity ve funkci. Můžeme jej dále v závislosti na produkovaných cytokinech dělit na podtyp T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H0</sub> a zvláštní skupinu T<sub>REG</sub>. Typ T<sub>H1</sub>, produkující převážně IL-2 a INF $\gamma$ , napomáhá svými působky ve funkci makrofágům, typ T<sub>H2</sub> podporuje protilátkovou odpověď a produkuje převážně interleukiny IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10. Podtyp T<sub>H0</sub> se vyznačuje produkcí směsi cytokinů první i druhé skupiny. Podskupina T<sub>REG</sub> má velmi důležitou úlohu při udržování tolerance k vlastním tkáním (2).

V krvi se vyskytují prekurzorové T<sub>H</sub> lymfocyty a směr, jakým se budou dále vyvíjet, závisí na cytokinovém prostředí, ve kterém se vyskytují. Určující je poměr IL-4 (produkovaný basofily, mastocyty i samotnými T<sub>H2</sub>) a IL-12, jež je tvořen převážně infikovanými makrofágy. IL-12 působí jako diferenciační faktor pro T<sub>H1</sub>, IL-4 podporuje vznik T<sub>H2</sub>. Cílem podskupiny T<sub>H1</sub> je účinná pomoc makrofágům a jejich přeměna na aktivovanou formu. Takovýto makrofág s pohlceným mikroorganismem vystavuje jeho štěpy na svém povrchu v komplexu s MHC gp. II. třídy a ty jsou rozpoznávány TcR receptory T<sub>H</sub> lymfocytů. Dále sekretuje IL-12 a pod vlivem dalších adhezivních spojení a kostimulačních signálů (vazbou proteinu makrofágů CD 86 na receptor lymfocytů CD 28) se začne dále tvořit a diferencovat podskupina T<sub>H1</sub>. Takto aktivované T<sub>H1</sub> klony jsou zdrojem IL-2, jež je všeobecným růstovým faktorem a INF $\gamma$ , který spolu s TNF $\alpha$  aktivuje makrofágy, jež jsou poté schopny tvořit enzym NO-synthasu, následně baktericidní oxid dusnatý a účinně tak likvidovat i intracelulární mikroorganismy k jiným baktericidním prostředkům fagocytů odolné (1).

T<sub>H1</sub> subset je rovněž zodpovědný za tzv. imunopatologické reakce oddáleného typu (DTH; *delayed type hypersensitivity*). Při tomto procesu se v experimentální praxi zvíře intradermálně imunizuje antigenem, což vede ke vzniku antigeně specifických T<sub>H1</sub> buněk. Po několika týdnech se aplikace antigenu ve vhodném adjuvans opakuje a v tu chvíli začnou k místu reakce migrovat T<sub>H1</sub> lymfocyty i makrofágy a vzájemně se stimulovat. Po 24-72 hodinách se v místě vpichu objeví charakteristická lokální reakce způsobená buněčnou infiltrací. Na tomto principu funguje tzv. tuberkulinová zkouška (2).

Pokud jsou v procesu zapojeny basofily či žírné buňky, produkují v hojné míře IL-4, který určuje diferenciaci v klon T<sub>H2</sub>, jehož úkolem je přeměna B lymfocytů na plazmatické buňky a produkce protilátek. Setkání T<sub>H</sub> lymfocytu v cytokinovém prostředí bohatém na IL-4

s APC, nejlépe dendritickou buňkou, navodí diferenciaci na klon zralých  $T_H2$  buněk. Kontaktem TcR na  $T_H2$  s komplexem MHC gp. II. třídy a antigenního štěpu na povrchu B lymfocytu, vlivem kostimulačních signálů (navozených vazbou ligandu  $T_H2$  lymfocytů - CD 40L na receptor CD 40 na povrchu B lymfocytu) dochází k přeměně B buněk na plazmatické buňky a k tvorbě protilátek (2).

CD  $8^+$  lymfocyty, nazývané  $T_C$  (cytotoxické) lymfocyty se podílejí převážně na ničení buněk napadených virem a buněk nádorově zvrhlých, které vystavují peptidové fragmenty v komplexu s MHC gp. I. třídy na povrchu postižené buňky. Tyto štěpy jsou následně rozeznávány daným klonem lymfocytů a posléze, pokud jsou přítomny kostimulační signály, dojde k nastartování cytotoxických dějů vedoucích k lýze terčové buňky. Buňky, jež obsahují potřebné kostimulační molekuly, jsou především aktivované dendritické buňky a makrofágy. Pokud by  $T_C$  lymfocyt dostal signál pouze přes jeho TcR bez signálů zprostředkovaných kostimulačními molekulami, byl by utlumen. Pokud ovšem dojde ke kontaktu s APC, která na svém povrchu exprimuje MHC gp. I třídy se štěpy abnormálních proteinů, patřičné adhezivní a kostimulační molekuly,  $T_C$  klon začne proliferovat a diferencovat se na zralé efektorové  $T_C$ .

K proliferaci  $T_C$  buněk je zapotřebí mimo jiné IL-2 produkovaný subsetem  $T_H1$ , které tak cytotoxickou reakci založenou na  $T_C$  lymfocytech podporují. Důležitá role  $T_H$  lymfocytů v tomto procesu spočívá rovněž v aktivaci dendritických buněk, jelikož pouze  $T_H$  lymfocyt stimulovaná dendritická buňka je schopna účinně navodit proliferaci  $T_C$ . Jakmile  $T_C$  lymfocyt dosáhne zralosti, postačí k jeho plné cytotoxické aktivitě pouze signál zprostředkovaný přes TcR (kostimulační signály již nejsou nutné). Efektorové  $T_C$  lymfocyty jsou roznášeny krví do tkání, kde mohou uplatnit své cytotoxické mechanismy. Ve své cytoplazmě obsahují granula s proteinem perforinem, který perforuje membránu patogenní buňky a může způsobit i její lýzu. Častěji ovšem vytvořený otvor slouží jako vstupní brána pro účinné proteasy  $T_C$  lymfocytů - granzymy. Ty následně štěpí enzymatické komponenty patogenu a nastartují tak kaskádu reakcí vedoucí k apoptické smrti dané buňky. Dále  $T_C$  lymfocyty na svém povrchu exprimují protein Fas ligand (FasL), který po kontaktu s Fas receptorem na povrchu řady buněk včetně patogenních, navozuje apoptickou smrt buňky. Zajímavé je, že  $T_C$  buňky na svém povrchu exprimují rovněž Fas receptor a mohou tedy způsobit programovanou smrt rovněž sami sobě. Tímto mechanismem se časově omezuje agresivní cytotoxická reakce založená na  $T_C$  lymfocytech. Vedle těchto mechanismů, které vyžadují specifický bezprostřední kontakt s terčovou strukturou, sekretují  $T_C$  lymfocyty do svého okolí cytokin

lymfotoxin (LT, TNF $\beta$ ), jehož účinky navozují rovněž indukci apoptosy. Masivní aktivací agresivních T<sub>C</sub> lymfocytů tak může dojít k poškození okolních vlastních tkání (2).

T<sub>C</sub> lymfocyty hrají roli při tzv. imunopatologických reakcích buněčných cytotoxických, jejichž průběh je podobný s výše zmiňovanou DTH reakcí a často se vyskytují v kombinaci. T<sub>H</sub>1 lymfocyty při ní vedle makrofágů aktivují i CD 8<sup>+</sup> lymfocyty, které své efektorové funkce míří proti buňkám napadených virem či nádorovým bujením (2).

### **2.1.2.1.2 B lymfocyty:**

Hlavní úlohou B lymfocytů je jejich přeměna na plazmatické buňky a následná tvorba protilátek. Na svém povrchu exprimují receptor BcR, což je membránově vázaný monomerní imunoglobulin IgM nebo IgD. Na rozdíl od receptoru T lymfocytů - TcR, BcR je schopen vázat antigen v nativní, tedy nezměněné formě a nikoliv v komplexu s MHC gp. MHC gp. II. třídy jsou však na povrchu B lymfocytů exprimovány a umožňují B lymfocytům fungovat i jako APC.

Proces, při němž vzniká z B lymfocytu plazmatická buňka, je složitý a vyžaduje pomoc T<sub>H</sub>2 lymfocytů uváděných výše. Nejprve B buňka rozezná antigen, naváže ho na svůj BcR a na povrchu takové buňky se budou v komplexu s MHC gp. II. třídy vyskytovat štěpy z tohoto antigenu. T<sub>H</sub>2 buňky se setkají s antigenem stimulovanými B lymfocyty, svými specifickými TcR navážou komplex MHC gp. II. třídy s peptidy pocházejícími z antigenu a pomocí interakcí dalších adhezivních molekul a kostimulačních molekul (CD 40 na B lymfocytech interaguje s ligandem CD 40L na aktivovaných T<sub>H</sub>2) stimulují B lymfocyty k proliferaci a diferenciaci na plazmatické buňky. Ty poté tvoří velké množství protilátek (1).

Vedle klasické stimulace B lymfocytů, ke které je nutná pomoc T lymfocytů, existuje několik látek schopných vyvolat jejich proliferaci a diferenciaci bez přičinění T buněk. Mezi struktury takto působící patří například bakteriální lipopolysacharid (LPS), pro který mají B lymfocyty příslušný receptor. Výsledkem takové reakce je převážně tvorba nízkoafinních protilátek třídy IgM. Dalšími látkami působícími jako polyklonální mitogeny B lymfocytů jsou mikrobiální polysacharidy či polymerní proteiny. Tyto velké molekuly složené z opakujících se totožných sekvencí reagují s velkým množstvím BcR, B buňky tak shlukují a vyvolají diferenciaci a proliferaci. Ačkoli stimulace k dělení a diferenciaci na plazmatické buňky a následná produkce protilátek tedy může vzniknout bez vlivu T lymfocytů,

plnohodnotná reakce je závislá na cytokinech jimi tvořenými, tudíž nezávislost na T buňkách není úplná (2).

## **2.1.2.2 Specifická humorální imunita**

### **2.1.2.2.1 Protilátky:**

Humorální složkou specifické imunity jsou protilátky, jež jsou produktem plazmatických buněk diferencovaných z B lymfocytů. Každá molekula imunoglobulinu je tvořena dvěma těžkými řetězci ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  a  $\epsilon$ ) a dvěma lehkými ( $\kappa$  a  $\lambda$ ), které jsou vzájemně připojeny disulfidickými můstky. Základní jednotkou je tzv. doména tvořící základní strukturu a obsahuje přibližně 110-120 sekvencí aminokyselin. Těžké řetězce imunoglobulinů se skládají ze čtyř takových domén (některé třídy dokonce z pěti), lehké potom ze dvou. Celá molekula imunoglobulinu schematicky připomíná písmeno Y. Domény na N konci obou řetězců jsou variabilní, to znamená, že jsou u produktu každého klonu plazmatických buněk odlišné, váže se na ně antigen a jsou tedy místem specifické reakce mezi protilátkou a antigenem. Ostatní domény nazýváme konstantní a jsou vždy u stejné třídy protilátek totožné. Tyto konstantní domény prochází změnou při procesu izotypového přesmyku, kterým se tvoří protilátky jiných tříd, tj. z prvních tvořených protilátek IgM se tvoří další izotypy IgD, IgG (s podtypy IgG1-IgG4), IgA (mající dvě varianty IgA1 a IgA2) a IgE. Dále lze části imunoglobulinu rozlišovat na fragmenty vznikající po naštěpení enzymem papainem na dva stejné Fab štěpy, kdy každý má jedno monovalentní vazebné místo pro antigen a fragment Fc. Za tuto část protilátky je imunoglobulin vázán na Fc receptory různých imunokompetentních buněk, například fagocytů, NK buněk a na toto místo se váže i komplementový protein C1. Z tohoto faktu vyplývá jedna z nejdůležitějších úloh protilátek a to proces zvaný opsonizace (2).

Protilátkou označené antigeny jsou imunitním systémem likvidovány a často zde probíhá tzv. ADCC, na protilátkách závislá cytotoxická aktivita, kdy se na Fc část navázaného imunoglobulinu naváže Fc receptor např. NK buněk a podnítlí je tak k přímé cytotoxické aktivitě. Započíná u nich i klasická cesta aktivace komplementu, ovšem ne každý izotyp má obě tyto vlastnosti – tj. například protilátky třídy IgM aktivují komplement, ovšem fagocyty již ne, IgA přesně naopak. Významnou roli mají protilátky i ve slizniční imunitě.

Imunoglobulin (nejčastěji IgA) se svou sekreční komponentou, což je zbytek transportního Fc-receptoru zajišťující protilátce odolnost vůči proteasám, neutralizují antigeny na površích sliznic a tak napomáhají obraně proti průniku patogenů do organismu (2).

### **2.1.3 Cytokiny:**

Na tyto látky proteinové struktury můžeme pohlížet jako na tzv. tkáňové hormony, jež jsou vysoce biologicky aktivní, tj. jejich účinky jsou znatelné už při velmi nízkých koncentracích, řádově pg/ml. Jsou produkovány především buňkami imunitního systému, posléze sekretovány do okolního prostředí a po vazbě na pro ně specifický receptor na cílové buňce na ni působí. Vedle tohoto mechanismu máme ještě membránově vázané cytokiny, které vyžadují přímý kontakt buňka-cílová buňka a samostatně ve tkáni či tělní tekutinou unášeny nejsou.

V zásadě tedy máme tři způsoby působení, jež jsou totožné jako u klasických hormonů, a to autokrinní, kdy cytokin je sekretován tou samou buňkou, která nese i specifický receptor, parakrinní, kdy působí na buňky v blízkém okolí zdrojové buňky a endokrinní, kdy je cytokin sekretován do cévy, kterou je unášen na vzdálené místo působení. Nejčastější jsou v rámci imunitního systému první dva uváděné mechanismy. Podobnost s hormony je zřejmá i proto, že některé hormony se mohou za určitých podmínek chovat jako cytokiny a buňky imunitního systému pro ně mají příslušné receptory a naopak. Hranice mezi klasickými hormony a cytokiny není ostrá (2).

Další charakteristikou tzv. cytokinové sítě je to, že často působí na několik druhů buněk zároveň (pleiotropní účinek), jeden cytokin podněcuje tvorbu dalšího (kaskádovité působení) a často mají do jisté míry synergistické (účinku se dosáhne pouze v jejich kombinaci) či antagonistické (jeden cytokin inhibuje či oslabuje účinky druhého) působení. Spousta těchto látek má podobné účinky, tudíž zde funguje jistá míra zastupitelnosti, kdy například v případě poškození tvorby daného cytokinu může být jeho úloha převzata jiným. Tomuto jevu se říká redundance. Stejně tak, jako může jeden cytokin působit na řadu cílových buněk, může jeden druh imunokompetentních buněk tvořit řadu cytokinů s různými účinky. Z tohoto faktu vyplývá, že jsou produkovány jak buňkami spadajícími pod specifickou, tak nespecifickou imunitu a ovlivňují řadu struktur adaptivní i neadaptivní imunity a často jejich působení dokonce přesahuje hranice imunitního systému. Jeden daný cytokin tak může být produkován či může působit na řadu struktur najednou, a to i v případě, že jejich efektorové



funkce jsou protichůdné. Hrají tak v podstatě úlohu jakési „spojnice“ mezi těmito jednotlivými systémy, ať už pouze mezi specifickou a nespecifickou částí v rámci imunitního systému, tak například mezi systémem imunitním a endokrinním či nervovým (2).

Rozmanité působení a fakt, že hranice mezi nimi a hormony není jasně definovaná, naznačuje, že půjde o velice obsáhlou skupinu látek. Je tedy několik aspektů, podle něž je možno cytokiny dělit. Lze je klasifikovat například podle funkce na ty s prozánětlivým, protizánětlivým a antivirovým účinkem, na ty s aktivitou růstových faktorů a na ty uplatňující se v buněčně či humorálně zprostředkované imunitě. Dalším hlediskem pro jejich zařazení může být struktura, kdy ovšem i cytokiny s podobným účinkem mohou mít značně rozdílnou chemickou strukturu a naopak. Další možností je dělení do skupin, jejichž názvy vyjadřují spíše historický vývoj jejich objevování než výlučně funkční či strukturní spjatosti. Dle této zažité terminologie jsou cytokiny členěny na interleukiny, chemokiny, interferony, transformující růstové faktory, faktory stimulující kolonie, faktory nekrotizující nádory a jiné růstové faktory. Přehled nejdůležitějších cytokinů je uveden v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4

<u>Cytokin</u>	<u>Zdroje</u>	<u>Funkce</u>
<b>Interleukiny</b>		
<b>IL-1 <math>\alpha, \beta</math></b>	MF, N	Kostimulace T, indukce TNF a IL-8, pyrogen
<b>IL-2</b>	T <sub>H1</sub>	Růstový faktor T, NK, B
<b>IL-3</b>	T <sub>H1</sub>	Stimulace hematopoetických prekurzorů
<b>IL-4</b>	T <sub>H2</sub> , BAS	Stim. B, indukce T <sub>H2</sub> , indukce izotypového přesmyku na IgE a IgG4, inhibice T <sub>H1</sub> a MF
<b>IL-5</b>	T <sub>H2</sub> , EOS	Stim. B, růstový faktor EOS
<b>IL-6</b>	T <sub>H2</sub> , MF, N	Stim. T, B, sekrece Ig, syntéza prot. akut. fáze, pyrogen
<b>IL-7</b>	Stroma, kostní dřeň	Stimulace lymfoidních prekurzorů
<b>IL-9</b>	T <sub>H2</sub>	Stimulace T
<b>IL-10</b>	T <sub>H2</sub> , MF, N	Inhibice T <sub>H1</sub> a MF, indukce diferenciaci na plazmocytů
<b>IL-11</b>	Fibroblasty	Podobné IL-6, růstový faktor prekurzorů megakaryocytů
<b>IL-12</b>	MF, N, NK, B	Stimulace T <sub>H1</sub> a NK
<b>IL-13</b>	T <sub>H2</sub>	Podobné IL-4
<b>IL-14</b>	T, folikul. DC	Stimulace B, udržování paměťových B

<b>IL-15</b>	Epitelie, M	Podobné IL-2
<b>IL-16</b>	CD8+ T	Chemotaxe CD4+ T
<b>IL-17</b>	CD4+ T	Stim. endot., epit. a fibroblastů k produkci IL-6, IL-8 a G-CSF
<b>IL-18</b>	Aktiv. MF	Indukce INF- $\gamma$
<b>IL-19</b>	Aktiv. M	Indukce IL-6 a TNF v M
<b>IL-20</b>	M	Proliferace keratinocyty a produkce TNF
<b>IL-21</b>	Aktiv. T, ŽB	Proliferace T, B, NK
<b>IL-22</b>	Aktiv. T, NK	Inhibice T <sub>H2</sub> , podpora zánětu, tvorba proteinů akutní fáze v játrech
<b>IL-23</b>	Aktiv. DC	Proliferace paměťových T, zvýšení produkce INF $\gamma$
<b>IL-24</b>	M, aktiv. T	Inhibice nádorů
<b>IL-25</b>	ŽB, T <sub>H2</sub>	Podpora tvorby T <sub>H2</sub> cytokinů
<b>IL-26</b>	T <sub>H1</sub> , NK	
<b>IL-27</b>	M, MF, DC	Indukce IL-2R na T
<b>IL-28 A, B (INF-<math>\gamma</math>2, 3)</b>	Virově infikované buňky, MF	Protivirové působení
<b>IL-29 (INF-<math>\gamma</math> 1)</b>	Virově infikované buňky, MF	Protivirové působení
<b>IL-31</b>	T <sub>H2</sub>	Regulace kožních reakcí, atopie
<b>IL-32</b>	L, epitelie	Indukce IL-8, TNF
<b>Interferony</b>		
<b>INF<math>\alpha</math></b>	L, M, MF	Protivirová obrana (inhibice replikace)
<b>INF<math>\beta</math></b>	Fibroblasty, epitelie	Protivirová obrana (inhibice replikace)
<b>INF<math>\gamma</math></b>	T <sub>H1</sub> , NK	Aktivace MF, stimulace exprese MHC gp.
<b>Faktory stimulující kolonie</b>		
<b>M-CSF</b>	L, endotelie, M, fibroblasty	Stimulace diferenciacie monocytů
<b>G-CSF</b>	Stroma dřene, fibroblasty, MF	Stimulace diferenciacie granulocytů
<b>GM-CSF</b>	T, endotelie,	Stimulace diferenciacie myeloidních buněk

	MF, fibroblasty	
<b>Transformující růstové faktory</b>		
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	Různé	Diferenciace hematopoetických dřevných buněk
<b>TGF<math>\beta</math></b>	T, MF, TRO	Inhib. mitosy, izotyp. přesmyk na IgA, protizánětlivý
<b>Skupina TNF</b>		
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	M, MF, NK	Indukce místního zánětu, aktivace endotelií, i membr. forma
<b>TNF<math>\beta</math></b>	T <sub>C</sub>	Cytolýza, aktivace endotelií
<b>CD 30L</b>	T, M	Aktivace L přes CD 30, membr. forma
<b>CD 40L</b>	T <sub>H</sub>	Aktivace B, indukce somat. mutací, paměti a izotyp. přesmyku v B
<b>FasL</b>	T <sub>C</sub>	Indukce apoptosy přes Fas
<b>TRAIL</b>	T, M	Apoptosa aktivovaných T a nádorových buněk
<b>APRIL</b>	MF, L	Proliferace B
<b>LIGHT</b>	Aktiv. T, M, DC	Aktivace DC
<b>TWEAK</b>	M	Angiogeneze
<b>BlyS</b>	T, DC, M, MF	Proliferace B
<b>Chemokiny</b>		
<b>IL-8</b>	Různé	Chemotaxe, aktivace granulocytů
<b><math>\beta</math>trombo- globulin</b>	Granulocyty	Chemotaxe a aktivace granulocytů a fibroblastů
<b>MCP-1</b>	Různé	Chemotaxe a aktivace M a BAS
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	M, T, BAS	Chemotaxe a aktivace M, granulocytů a T
<b>RANTES</b>	T, TRO	Chemotaxe a aktivace M, T
<b>Jiné</b>		
<b>SCF</b>	Různé	Diferenciace hematopoetických dřevných buněk
<b>EPO</b>	Hepatocyty, ledviny	Stimulace diferenciace erytroidních buněk
<b>MIF</b>	Aktivované T	Aktivace MF, inhibice migrace
<b>PDGF</b>	TRO, různé	Hojení ran, stimulace mitosy
<b>LIF</b>	Různé	Stimulace různých buněk

Použité zkratky: BAS: basofily; EOS: eosinofily; N: neutrofil; M: monocyty; MF: makrofágy; NK: Natural killer; L: lymfocyty; B: B lymfocyty; T: T lymfocyty; ŽB: žírné buňky; DC: dendritické buňky; TRO: trombocyty

Do rodiny cytokinů spadají rovněž interferony, které jsou pro svoje působení často řazeny k nespecifické části imunitního systému. Interferonový systém zahrnuje vesměs 4 odlišné druhy interferonů, a to  $INF\alpha$ ,  $INF\beta$  a  $INF\omega$ , jež jsou pro svou podobnost často nazývány interferony I. typu a strukturně i funkčně zcela odlišný  $INF\gamma$ . Interferony I. typu jsou cytokiny tvořené převážně buňkou infikovanou virem a v nich i v buňkách dosud nenapadených jsou schopny navozovat tzv. antivirový stav tím, že spustí syntézu enzymů potlačujících replikaci virů. Mají antiproliferativní účinek obecného charakteru, proto jsou využívány například při terapii nádorových onemocnění. Oproti nim je  $INF\gamma$  produkován hlavně antigenně specifickými T lymfocyty spadajícími pod  $T_{H1}$  subset a spolu s  $TNF\alpha$  aktivuje makrofágy, čímž se vedle své imunomodulační a antitumorové aktivity podílí na eliminaci intracelulárních bakterií (1).

V diplomové práci jsou stanovovány následující prozánětlivé cytokiny:

## **IL-1 $\beta$**

IL-1 $\beta$  patří, stejně jako IL-1 $\alpha$  a IL-6, do skupiny interleukinů s pluripotentně prozánětlivým účinkem. Název interleukiny původně znamenal, že pomocí těchto látek je zprostředkována komunikace mezi leukocyty, ovšem později se zjistilo, že jejich pole působnosti je značně širší. IL-1 je produkován v různé míře všemi jadernými buňkami, nejvíce ale monocyty či aktivovanými makrofágy. Jeho účinky se dají souhrnně nazvat jako prozánětlivé – vedle pyrogenní aktivity působí jako aktivátor T lymfocytů a značně moduluje výskyt adhezivních molekul jak na leukocytech, tak na endoteliích. IL-1 působí také jako regulátor exprese řady významných genů (1).

## **IL-6**

IL-6 je řazen, rovněž jako výše uvedený IL-1, do skupiny pluripotentních prozánětlivých interleukinů a řada biologických účinků je mu tudíž podobná. Největší produkci IL-6 mají na svědomí především T a B lymfocyty, ale opět ho mohou tvořit i ostatní jaderné buňky. Mezi jeho nejhodnotnější funkce patří, vedle pyrogenní aktivity, regulace diferenciací a proliferací B lymfocytů a produkce protilátek. Dále jsou proteiny akutní fáze jadernými buňkami syntetizovány po přijetí signálu poskytovaným IL-6 (1).

## **TNF $\alpha$**

TNF $\alpha$  patří do tzv. rodiny tumor nekrotizujících faktorů, mezi jejíž zástupce patří TNF $\alpha$  a TNF $\beta$ , které jsou si velmi podobné jak strukturou, tak účinky. TNF $\alpha$  je tvořen celou řadou buněk od T či B lymfocytů, přes NK buňky a neutrofile, až po keratinocyty a endotelie. Jeho nejvýznamnější produkci ovšem zastávají buňky náležící do monocyto-makrofágové linie. Jeho dopad na organismus je nezastupitelný a rozmanitý a je možno ho označit za nejdůležitější cytokin nespecifické imunity, a to pouze s lehkou nadsázkou. Je nejvýznamnějším cytokinem produkovaným subsetem T<sub>H</sub>1 a podílí se na fyziologické cytotoxické aktivitě tímto subsetem zprostředkované (1).

Díky jeho účinkům je často řazen, stejně jako IL-6 a IL-1, do skupiny pluripotentních prozánětlivých cytokinů. Je schopen způsobit zvýšení tělesné teploty vlivem na hypothalamus. Vedle pyrogenní aktivity má, stejně jako IL-6, vliv na tvorbu bílkovin akutní fáze v játrech a stejně jako IL-1 podněcuje expresi adhezivních molekul na leukocytech a endotelových buňkách. Jeho zvýšená tvorba stimuluje osteoklasty podílející se na resorpci kostní tkáně, zvyšuje koagulační aktivitu endotelií a má všeobecně katabolické účinky. Z tohoto důvodu lidé dlouhodobě nemocní, například AIDS či rakovinou, ztrácejí na váze (1).

Důležitou informací je, že jedním z nejvýznamnějších podnětů tvorby TNF $\alpha$  v makrofázích je lipopolysacharid (LPS) obsažený v buněčných stěnách především G- bakterií. S tímto faktem je spojen mechanismus vzniku tzv. septického šoku, kdy pokud se do krevního oběhu dostane velké množství G- bakterií, LPS se váže na sérový protein LBP (*lipopolysaccharide binding protein*) a tento komplex interaguje s membránovým receptorem CD 14 na makrofázích a monocytech. Jeho stimulací je nastolena velká produkce TNF $\alpha$  těmito buňkami. Přehnaná aktivita na podnět, jenž přetrvává i poté, co byl mikroorganismus usmrcen, přerůstá v rapidní systémovou zánětlivou odpověď se všemi důsledky a nezřídka vyúsťuje až v multiorgánové selhání (1).

## **2.2. Změny navozené chirurgickým zákrokem v abdominální oblasti**

Chirurgickým zákrokem v břišní oblasti dochází k poškození kontinuity peritonea. Peritoneum je serosní blána vystýlající abdominální dutinu. Skládá se z jedné vrstvy mesothelu na basální membráně a podkladové vrstvy pojivové tkáně. Peritoneum je bohatě prokrvené a jako orgán se významně podílí na řadě procesů, například na regulaci zánětlivé odpovědi, fibrinolýze, angiogenezi či na procesu hojení a obnovy tkáně (4; 5; 6; 7). Tím, že umožňuje výměnu molekul, udržuje homeostasu a tvorbou peritoneální tekutiny poskytuje orgánům dutiny břišní vhodné prostředí pro jejich správnou funkci. Jelikož jím vedou lymfatické cévy je i místem rychlých imunologických reakcí a při poškození, například chirurgickým výkonem, je navozena imunologická odpověď.

V důsledku aktivace zánětlivého procesu se degranulací peritoneálních žírných buněk zvýší cévní permeabilita a pod vlivem chemotakticky aktivních látek migrují do místa potřeby imunokompetentní buňky, především polymorfonukleární leukocyty. Ty pak spolu s peritoneálními makrofágy, významnou buněčnou populací v peritoneální oblasti, osídlují postiženou oblast a hrají roli v dalším rozvoji zánětlivé reakce. Tyto buňky produkují řadu cytokinů včetně těch s prozánětlivým účinkem, které působí jak místně, tak systémově a celý proces tak modulují. Zvýšená prostupnost kapilár pro proteiny a další látky má za následek tzv. extravazaci plazmy, kdy do tkáně vedle nich přestupuje i tekutina. Vzniká tak výpotek, jehož složení se v závislosti na závažnosti zánětlivé reakce mění. Mezi faktory ovlivňující endotel cév směrem k větší propustnosti patří například bakteriální LPS, některé metabolity kyseliny arachidonové, produkty krevně-koagulačního systému a zmíněné prozánětlivé cytokiny (1).

Změny navozené chirurgickým zákrokem mohou vyústit až v pooperační komplikace. Vedle morfologických změn je třeba brát v úvahu i metabolické změny, které se mohou v peritoneální dutině vyvíjet, což je nejvíce zaznamenáno v souvislosti s laparoskopickým přístupem spojeným s insuflací CO<sub>2</sub> do peritoneální dutiny (kapnoperitoneum).

## **2.2.1. Rozdílný dopad laparotomického a laparoskopického výkonu na imunitní odpověď**

Frekvence použití laparoskopického přístupu u chirurgických zákroků se neustále zvyšuje. Nespornými benefity laparoskopické metody jsou vedle kosmetických důvodů především redukce pooperační bolesti, rychlejší rekonvalescence pacientů a kratší doba hospitalizace. Tyto výhody byly potvrzeny celou řadou klinických studií (8; 9; 10; 11; 12). Vlivem chirurgického zákroku dochází obecně k navození imunitní reakce, jejíž charakter může mít dopad na vývoj pooperačních komplikací. K častým patří srůsty, infekce, u operací malignit je obávanou komplikací i lokální diseminace nádoru (13). V současné době jsou dostupné výsledky prací, které se věnují hodnocení systémové imunitní odpovědi na chirurgický zákrok a porovnávají změny spojené s laparoskopickým a laparotomickým přístupem. Problém však zůstává u lokální imunitní odpovědi. Malé množství doposud především experimentálních prací zatím nedokáže jednoznačně odpovědět, zda je laparoskopie spojena s mírnější alterací lokální imunitní odpovědi a může tak být vhodným přístupem nejen pro benigní příčiny operací, ale i pro malignity, kdy by byla lokální imunosuprese nežádoucí pro zvýšení rizika diseminace nádoru v časném pooperačním období.

### **2.2.1.1. Vliv chirurgického výkonu na systémovou imunitní odpověď**

Bylo prokázáno, že rozsáhlé trauma způsobené chirurgickým výkonem způsobuje ranou zánětlivou odpověď. Ta je charakterizována zvýšenou produkcí prozánětlivých cytokinů (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6), expresí adhezivních molekul na imunokompetentních buňkách a endoteliích a aktivací polymorfonukleárů a makrofágů v postižené oblasti. Přetrvávající silná produkce IL-6 má za následek mimo jiné i tvorbu působků s protizánětlivým účinkem (14). Jimi jsou prostaglandin E2, IL-10, TGF $\beta$  či imunosupresivní kyselý protein (IAP; *immunosuppressive acidic protein*) a jejich působení pak paradoxně přispívá k chirurgickým výkonem navozené imunosupresi (15). Na způsobený stres reaguje spolu s imunitním systémem i neuroendokrinní systém (15), jejichž působení je v organismu jako celku provázané. Trauma je registrováno autonomními nervovými zakončeními a působí na osu hypothalamus-hypofýza-nadledviny, kdy nejprve podmíní uvolňování hormonu kortikoliberinu hypothalamem. Ten se krevní cestou dostává do adenohipofýzy, kde stimuluje

produkci adrenokortikotropního hormonu (ACTH), jenž stimuluje sekreci glukokortikoidů kůrou nadledvin. Nejvýznamnějším glukokortikoidem je kortizol, který má silné imunopresivní účinky, působí antiedematózně a podporuje imunitní odpověď zprostředkovanou subsetem  $T_H2$  (16).

V souvislosti s tímto oslabením imunitního systému je pozorována neschopnost monocytů v dostatečné míře tvořit  $TNF\alpha$  jako odpověď na stimulaci LPS či narušení zmiňovaného poměru  $T_H1/T_H2$  subsetu ve prospěch  $T_H2$  (14). Ten, jak již bylo řečeno, stimuluje protilátkovou imunitní odpověď na úkor té buněčně zprostředkované, která je výrazně oslabená.

Jak již bylo zmíněno, jedním z ukazatelů zánětlivého stavu, který je obrazem míry tkáňového poškození, jsou prozánětlivé cytokiny (IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF). Ty se při rozsáhlém poškození tkáně dostávají rovněž do periferní krve, potažmo jater, kde stimuluji syntézu proteinů akutní fáze, které se dále rovněž podílejí na modulaci zánětlivého procesu. Nejspecifičtější vzestup hladin, coby odraz imunitní reakce na trauma, vykazují prozánětlivý cytokin IL-6 a také CRP (C reaktivní protein), jenž patří do výše zmiňované rodiny proteinů akutní fáze. Řada studií potvrzuje významné zvýšení jejich systémových hladin po otevřeném chirurgickém zákroku (17; 18; 19; 20; 21; 22; 23), které mělo ale ve většině případů pouze krátkodobé trvání, kdy byl jejich vzestup detekován 1 - 6 hodin po operaci (20; 19). Některé studie se ovšem s těmito výsledky rozcházejí a významný rozdíl mezi systémovou produkcí prozánětlivých cytokinů a CRP po laparoskopické a otevřené chirurgii jimi nebyl prokázán (24; 25). Na tyto výsledky může mít vliv především nehomogenost testovaných skupin v klinické studii, kdy imunitní reakce mohla být ovlivněna již primárním onemocněním. Dále se na výsledcích podepisuje vedle velikosti a agresivity daných tumorů například i počet prodělaných krevních transfuzí či v neposlední řadě samozřejmě jednotlivé postupy inkriminovaných chirurgických zákroků. Trvání operace, délka řezu u otevřených operací, ale také tlak či teplota a vlhkost plynu při laparoskopii se u každého jedince více či méně liší a všechny tyto aspekty by mohly způsobit nesourodost výsledků (26).

Hodnocení systémové imunitní odpovědi po laparoskopických a otevřených operacích na základě produkce cytokinů se tak jeví jako diskutabilní, mohou být sice nalézány prokazatelné rozdíly, ty jsou však přechodné. Navíc zvýšená produkce cytokinů a proteinů akutní fáze sice bývá provázána vyšším výskytem infekčních komplikací a zvyšuje celkovou morbiditu pacientů, avšak nevypovídá obecně o stavu a připravenosti imunitního systému.



Proto je v současné době pro hodnocení celkové imunitní reakce po chirurgickém zákroku pozornost spíše upřena na změny v buněčně zprostředkované imunitní odpovědi.

#### **2.2.1.2. Vliv chirurgického výkonu na systémovou buněčně zprostředkovanou imunitní odpověď**

Systémově je v souvislosti s jakýmkoliv chirurgickým zákrokem možno pozorovat vzestup leukocytů, stoupá populace neutrofilních granulocytů. Oproti tomu bylo možno zaznamenat snížení celkového počtu lymfocytů a všeobecně sníženou aktivitu buněčné imunity. Byly nalezeny snížené hodnoty v řadách  $T_C$ ,  $T_H$  i NK buňkách a naopak zvýšená populace supresorových T lymfocytů (15; 27). Tyto změny přetrvávaly minimálně 14 dní po operaci. Zároveň byl pozorován vzestup imunosupresivního kyselého proteinu a kortizolu (15), jenž, jak již bylo zmíněno výše, vede narušením poměru  $T_{H1}/T_{H2}$  k útlumu buněčně zprostředkované odpovědi.

Buňky, které jsou podporovány subsetem  $T_{H1}$ , jsou vedle makrofágů i cytotoxické  $T_C$  lymfocyty, jejichž úkolem je mimo jiné ničit nádorově zvrhlé buňky. Pokles celkového počtu lymfocytů je připisován narušené bilanci mezi  $T_H$  subsety (15). Výzkumy svědčí pro to, že laparoskopie částečně eliminuje toto nežádoucí ovlivnění poměru  $T_{H1}/T_{H2}$  a na rozdíl od laparotomie nebyla inhibice subsetu  $T_{H1}$  v tak velké míře pozorována (28; 29).

Subset  $T_{H1}$  se také podílí na tzv. imunopatologické reakci oddáleného typu (DTH) zmiňované dříve. Ta, vedle buněčné cytotoxické imunopatologické reakce, s kterou je často propojena, odráží aktivitu buněčné odpovědi, jež se významně podílí i na ničení tumorových a virem infikovaných buněk. Útlum buněčné imunity je tedy při terapii tumorů značně nežádoucí a mohl by přispět k větší pravděpodobnosti relapsu onemocnění či výskytu metastáz. V některých studiích bylo zjištěno, že laparoskopický přístup zachovává buněčnou imunitu oddáleného typu lépe než otevřený laparotomický přístup (30; 31). Jiná studie upozorňuje, že důležitým faktorem je rovněž výběr plynu při laparoskopii. Při použití  $CO_2$  zůstala DTH reakce neporušená, ovšem ve skupině s heliem coby insuflačním plynem a skupině podstupující otevřenou operaci klesala (32).

Pro účinnou prezentaci antigenu T lymfocytům jsou nezbytné profesionální APC disponující MHC gp. II. třídy. Expresi těchto molekul zaujímá tedy v adekvátní imunitní odpovědi důležitý post. Řada klinických studií porovnávala expresi HLA-DR na  $CD 14^+$

monocytech a došla k závěru, že po otevřených operacích je exprese HLA-DR nižší než po jejich laparoskopických alternativách (22; 17), přičemž tento pokles měl u otevřených technik i delšího trvání (17). Tento náleznaznačuje, že prezentace antigenu nezbytná k navození dostatečné imunitní odpovědi je u laparoskopických operací ve srovnání s laparotomií lépe zachována. Klinický výzkum prováděný na pacientech podstupujících minilaparotomickou a laparoskopickou cholecystektomií potvrdil, že laparoskopický přístup v zachování exprese HLA molekul předčí i laparotomické metody provedené s minimální invazí (33). Nicméně některé klinické studie na pacientech s kolorektálním karcinomem nenalezly v expresi HLA antigenů mezi oběma způsoby signifikantní rozdíl (27; 26).

Několik studií hodnotilo u pacientů schopnost T lymfocytů proliferovat jako odpověď na stimulaci mitogenem. Proliferační aktivita byla oslabena u obou skupin, ačkoli u laparoskopické méně než u laparotomické (34; 35). 15 dní po operaci nabyly T lymfocyty plnou proliferační aktivitu pouze ve skupině po laparoskopii (36). Stejně tak byla u obou typů zákroků porovnávána cytotoxická aktivita NK buněk, které mají velmi důležitou funkci především v boji proti buňkám napadených virem či nádorově zvrhlých. Suprese NK buněk byla u otevřené operace déletrvající a výraznější (37). Je však třeba vzít v úvahu, že práci zabývajících se hodnocením aktivity NK buněk není mnoho a podle dosavadních výsledků některých z nich nelze příznivý dopad laparoskopie na cytotoxicitu či počet NK buněk potvrdit (34; 26; 27).

Nicméně výše uvedené nálezy svědčí pro to, že laparoskopické operace navozují menší systémovou reakci organismu a nevykazují takový tlumivý efekt na imunitní odpověď jako otevřený chirurgický přístup (17; 18). To by mohlo být výhodou pro pooperační průběh a prevenci pooperačních komplikací.

### **2.2.1.3. Vliv chirurgického výkonu na lokální imunitní odpověď**

Zatímco systémová odpověď na chirurgický zákrok je poměrně dobře zdokumentovaná, problematika lokální imunitní odpovědi zůstává stále nedořešená. Vliv na lokální peritoneální imunitu může být zprostředkován nejen samotným chirurgickým zákrokem, ale i použitým plynem při laparoskopii. Jeho chemická podstata, případně jeho tlak, teplota či vlhkost může mít na lokální imunitu daleko markantnější dopad než na systémovou odezvu. Aspektů, které je třeba při studiu lokální imunity po operačním zákroku sledovat, je tedy celá řada.

Jak již bylo zmíněno, první imunitní reakci zajišťují v abdominální oblasti peritoneální makrofágy a posléze neutrofilny, které z oběhu migrují do místa potřeby. Přesun neutrofilních granulocytů z periferní krve do peritonea je přisuzován vlivu chemokinů tvořených právě peritoneálními makrofágy (38). Makrofágy tedy hrají v imunitní reakci v peritoneální oblasti významnou úlohu. Jejich aktivita může sloužit jako ukazatel míry stimulace lokální imunitní odpovědi a lze ji posuzovat podle řady faktorů. Určitou informaci mohou přinášet změny v počtu buněk v peritoneu, exprese MHC gp I. a II. třídy na makrofázích či jejich efektorové funkce reprezentované schopností fagocytosy a produkcí cytokinů. Aktivita makrofágů je v experimentech hodnocena po izolaci buněk, které nejsou následně stimulovány, tj. za bazálních podmínek, nebo po stimulaci makrofágů, velmi často lipopolysacharidem (LPS). Lze tak do jisté míry v *in vitro* podmínkách posuzovat reakci makrofágů na imunitní podnět, o čemž bazální aktivita nemusí tolik vypovídat.

Ojedinelé experimentální práce přinášejí různorodé výsledky, které mohou být i kontroverzní. Jak při otevřené, tak při laparoskopické chirurgii byl zaznamenán nárůst populace polymorfonukleárů i makrofágů v peritoneální laváži (39). Dále bylo zjištěno, že již 4 hodiny po otevřené operaci ve srovnání s méně invazivními metodami viabilita makrofágů významně klesá (40; 41), ačkoliv ne všechny studie našly v životnosti buněk signifikantní rozdíl (42).

Jedním z nejdůležitějších mechanismů, jímž makrofágy likvidují patogeny, je fagocytosa. Studie provedená na zvířecím modelu dokumentuje vyšší bakteriální clearance zprostředkovanou peritoneálním makrofágy u skupiny podrobené laparoskopickému zákroku (43). Výsledky této práce naznačují, že po laparoskopii by makrofágy mohly mít lepší schopnost pohlcovat minimálně extracelulární bakterie. Během složitého procesu fagocytosy vzniká mimo jiné  $H_2O_2$ , jenž má jednak sám baktericidní povahu a jednak z něj dále vznikají další pro mikroorganismy toxické látky. Některé experimenty sledovaly jeho produkci coby odraz aktivity fagocytujících buněk. Bylo zjištěno, že po stimulaci produkují makrofágy izolované po laparotomii méně  $H_2O_2$  než kontroly i buňky odebrané po laparoskopii (44). Mezi hodnotami u kontrol a po laparoskopii nebyl zjištěn signifikantní rozdíl. Dalším kritériem, které odráží fagocytární schopnost, je tvorba superoxidu  $O_2^-$ , z kterého již zmiňovaný peroxid vodíku vzniká a podílí se tak na schopnosti likvidovat pohlcený materiál. Vyšší hodnoty superoxidu a  $TNF\alpha$  produkovaných peritoneálními makrofágy byly nalezeny ve skupině, která byla podrobena laparotomii a laparoskopii prováděné se vzduchem coby inuflačním plynem (45). Aktivované makrofágy jsou ze všech fagocytů schopny největší

produkce NO, jenž je významným mikrobicidním prostředkem schopným hubit i intracelulárně žijící mikroorganismy, potažmo viry a nádorové buňky (46). Studie na potkanech pozorovala nejvyšší nárůst NO po laparotomii, méně po laparoskopickém i minilaparotomickém přístupu oproti kontrole (39; 40). V kontrastu s tím je experimentální práce na potkanech, ve které je bazální produkce NO signifikantně vyšší po laparoskopickém zákroku v porovnání jak s laparotomií, tak kontrolou. Ovšem po stimulaci bakteriálním LPS již na rozdíl od otevřené operace nebyl u makrofágů izolovaných ze skupiny po laparoskopii pozorován tak výrazný nárůst aktivity NOS (41). Ta byla posuzována podle množství produkovaného NO, tak i stanovením exprese mRNA NO synthasy a oba způsoby vedly k stejnému závěru (41).

Další funkcí reflektující aktivitu peritoneálních makrofágů je produkce cytokinů. Některé experimentální práce naznačují, že vyšší produkci prozánětlivých cytokinů vykazují makrofágy po otevřeném chirurgickém výkonu. Produkce TNF $\alpha$  se vyvíjí v závislosti na délce intervalu od provedení zákroku. 1 hodinu po výkonu byla jeho tvorba signifikantně zvýšená u laparotomického přístupu, po stimulaci LPS došlo ke zvýšení produkce u skupiny s laparoskopií (47). V dalších intervalech - 4, 12 a 24 hod. po výkonu byla produkce TNF $\alpha$  stimulovanými makrofágy u laparoskopie nižší ve srovnání s laparotomickým přístupem (44; 48).

Expresí povrchových antigenů MHC gp. II. třídy makrofágy má významnou úlohu v aktivaci T-lymfocytů a v podpoře především buněčně zprostředkované imunitní reakce založené hlavně na aktivovaných makrofázích schopných tvořit NO. Experimentem na potkanech bylo zjištěno, že výskyt MHC gp. II. třídy na peritoneálních makrofázích se díky chirurgickým výkonům snižuje. Tato redukce provázela otevřenou chirurgii, u laparoskopické však zaznamenána nebyla (44). Studie na prasatech toto ovšem popírá. Makrofágy izolované ze skupiny, jež prodělala laparoskopickou operaci, sice vykazovaly vyšší bakteriální clearance, ovšem MHC gp. II. třídy byly více exprimovány na peritoneálních makrofázích i krevních monocytech ze zvířat podrobených otevřenému zákroku (43).

#### **2.2.1.4. Vliv oxidu uhličitého použitého při laparoskopii na lokální změny v peritoneu**

Chirurgický zákrok v peritoneální oblasti vyvolává vedle morfologických změn i řadu změn metabolických. Laparotomickým zákrokem se do peritoneální oblasti dostává vzduch, laparoskopickým zase oxid uhličitý či jiné používané plyny jako například helium, čímž vzniká nepřírozený stav nazývaný pneumoperitoneum. Tím je narušeno přirozené prostředí peritonea a jsou detekovány změny v hladinách kyslíku, které mohou vést například k hypoxii a metabolickým rozvratům vyústujícím až v acidosu.

Několik studií se shodlo, že rozhodujícím faktorem pro imunitní reakci při laparoskopii je použitý insuflační plyn. Podle těchto prací v klinické praxi nejčastěji vyžívaný oxid uhličitý může mít negativní dopad na peritoneální imunitu (49). Vztah CO<sub>2</sub> k produkci cytokinů peritoneálními makrofágy byl již zmíněn. Studie na izolovaných peritoneálních makrofázích stimulovaných LPS zkoumala vliv oxidu uhličitého, helia a vzduchu na produkci IL-1 $\beta$  a TNF $\alpha$ . Vystavení peritonea CO<sub>2</sub> na rozdíl od helia i vzduchu způsobovalo dočasný pokles produkce zmiňovaných cytokinů (42). Hladina IL-1 $\beta$  klesala již po patnáctiminutové expozici CO<sub>2</sub>, zatímco pokles TNF $\alpha$  byl patrný po třiceti minutách (42). 24 hod. po expozici plynům však již rozdíly nebyly patrné. Již bylo ale zmíněno, že pokud byla CO<sub>2</sub> vystavena zvířata během experimentální laparoskopie, produkce TNF $\alpha$  stimulovanými makrofágy zůstávala po 24 hod. na nižší úrovni. Existují tedy důkazy, že makrofágy vystavené CO<sub>2</sub> mohou snižovat produkci některých cytokinů (50; 42; 51; 45).

S operačním zákrokem může dojít i ke snížení intenzity fagocytosy (47), úlohu ve snížené fagocytární aktivitě může hrát vysoká koncentrace CO<sub>2</sub> (52; 50; 42; 53). Z tohoto důvodu se zrodila myšlenka používání jiného plynu, například helia, vzduchu či oxidu dusného. CO<sub>2</sub> je ovšem na rozdíl od všech uvedených alternativních plynů v krvi vysoce rozpustný, a proto eliminuje hrozící riziko plynové embolie. Existují však i informace, že acidifikace prostředí, která se může vlivem přítomnosti CO<sub>2</sub> rozvinout, může fagocytární aktivitu zvyšovat (54).

Dalším sledovaným faktorem byla intraabdominální teplota během zákroku. CO<sub>2</sub> snižuje teplotu v intraperitoneální oblasti až na 27,7°C a má vliv i na teplotu tělesnou (55; 56). Tak výrazná lokální hypotermie může ovlivňovat funkci imunokompetentních buněk a pokles tělesné teploty může být pro pacienta nebezpečný. Vlhký a na 37°C ohřátý CO<sub>2</sub> celkovou

tělesnou teplotu, na rozdíl od nevlhčeného CO<sub>2</sub> pokojové teploty, neovlivňoval (57). Na druhou stranu ovšem použití teplejšího plynu bylo provázeno poklesem produkce cytokinů TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6 peritoneálními makrofágy (58).

Vzhledem k tomu, že laparoskopie se používá i při operacích malignit, řada prací se snaží zohlednit schopnost šíření metastáz a nádorových buněk v závislosti na způsobu daného operačního výkonu či insuflačního plynu. Studie na myších se zabývala vlivem CO<sub>2</sub> na morfologii peritonea a dále vztahu tohoto poškození k vyšší pravděpodobnosti úchytu lokálně aplikovaných tumorových buněk. Ty byly injekčně vpraveny do peritoneální oblasti myším po laparoskopické operaci s použitím CO<sub>2</sub> i zvířatům bez operace, které sloužily jako kontrola. Již 2 hodiny po vystavení peritonea oxidu uhličitému byly patrné výrazné morfologické změny, kdy se odhalila bazální membrána. Na tu nasedaly maligní buňky a do 96 hodin byl rozsev tumorových buněk pozorován po celém peritoneu. Kontrolní skupina zůstala beze změn (59). Efekt oxidu uhličitého na šíření nádorového rozsevu potvrdily i jiné studie na zvířecích modelech, kdy výskyt nádorů byl u laparoskopie realizované s CO<sub>2</sub> vyšší jak v porovnání s laparotomií, tak s laparoskopií se vzduchem (60; 51).

Bylo prokázáno, že při použití CO<sub>2</sub> výrazně klesá peritoneální pH, jehož hodnota se po skončení zákroku samovolně rychle plně upraví (61; 62). Mírná změna acidobazické rovnováhy byla, pravděpodobně díky transperitoneální absorpci, detekovatelná rovněž systémově (61; 63). Heliové pneumoperitoneum lokální pH neovlivňovalo (62; 64) či jen velmi lehce zvýšilo (61).

Peritoneální acidosa může ovlivňovat imunitní odpověď jak v této oblasti, tak systémově. Byly pozorovány zvýšené systémové hladiny protizánětlivého IL-10 a snížené koncentrace TNF $\alpha$  po aplikaci bakteriálního LPS a tyto hladiny korelovaly s peritoneálním pH. Zajímavé je, že nezáleželo, zda poklesu peritoneálního pH bylo docíleno pomocí insuflace CO<sub>2</sub> či pufovanou kyselou laváží. Experimentální změny navozené aplikací CO<sub>2</sub> do peritoneální dutiny nebo inkubací izolovaných makrofágů s CO<sub>2</sub> mohou mít příčinu v acidifikaci prostředí. Peritoneální acidosa může vést k oslabení systémové imunitní reakce na systémově do oběhu podaný LPS (65). Rovněž bylo prokázáno, že toto ovlivnění celkové imunitní odpovědi je nezávislé na systémovém pH (62; 63). Objevují se i spekulace, že lehce snížené pH by mohlo mít i své výhody. Jelikož septický šok je provázen významnou produkcí TNF $\alpha$  v reakci na bakteriální LPS, mohlo by CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum poskytovat lepší ochranu před touto závažnou komplikací, jež může ohrožovat především pacienty

podstupující zákroky v gastrointestinálním traktu, kde je riziko kontaminace abdominální dutiny střevními mikroorganismy (66; 67).

Některé studie připisují acidobazickým změnám v peritoneu rovněž vliv na incidenci níže zmiňovaných srůstů (68; 69). Jejich výskyt stoupal přímo úměrně s tlakem a dobou expozice plynu a naopak klesal, byla-li do směsi CO<sub>2</sub> přidána 2-3% kyslíku. Jeho vyšší podíl však již působil škodlivě (68).

#### **2.2.1.5. Faktory ovlivňující výskyt pooperačních srůstů**

Velice častou pooperační komplikací je výskyt tzv. srůstů, které vznikají jako reakce na chirurgické trauma zejména v abdominální oblasti. Ve více než 75 % se vyskytují u pacientů podstupujících laparotomické chirurgické výkony (70). Jejich tvorba je závislá na celé škále faktorů, ovšem jedním z nejvýznamnějších je rovnováha mezi degradací a tvorbou mezibuněčné hmoty (71). Oba tyto procesy jsou ve správné míře nutnou součástí různých fází zánětlivé reakce, avšak jejich ovlivnění by mohlo přispět k eliminaci výskytu této časté komplikace. Samozřejmě ovšem musí být v dostatečné míře zachována fyziologická úloha daných látek v zánětlivé odpovědi (71).

Narušení buněčné hmoty zajišťují látky s proteolytickou aktivitou. Fyziologicky tak umožňují postup imunokompetentních buněk mezibuněčnou hmotou k místu potřeby ve tkáni. Vysoká aktivita proteolytických látek vede k přehnanému sebepoškození organismu a žádoucí již není.

Mezi nejvýznamnější proteolytické látky hrající úlohu v peritoneální zánětlivé reakci je tkáňový a urokinasový aktivátor plasminogenu (tPA a uPA). Jejich působením se plasminogen mění na plasmin, jenž je velice účinnou serinovou proteasou a hraje stěžejní roli při fibrinolýze a odbourávání mezibuněčné hmoty. Bylo zjištěno, že hladiny a aktivity výše zmíněných působků mají význam ve výskytu pooperačních srůstů. Studie dokazují, že klasická otevřená chirurgie způsobuje pokles fibrinolytické aktivity jednak díky snížení tvorby aktivátorů plasminogenu (72; 73) a jednak zvýšením koncentrace jejich inhibitorů PAI (73), což vede k vyššímu výskytu pooperačních srůstů. Jiné výzkumy dokládají, že pravděpodobně díky rozsáhlejšímu poranění tkáně je laparotomický přístup spojen s rychlým a výrazným, leč krátkodobým, uvolňováním tPA mesotheliálními buňkami (74; 75). Výzkumy, zabývající se laparoskopickou chirurgií ve vztahu k fibrinolýze nejsou ve svých

výsledcích jednotné. Některé dokládají zvýšení aktivátorů plasminogenu a zároveň snížení specifických inhibitorů PAI (76), což vedlo k vyšší fibrinolytické aktivitě a tedy možné redukci pooperačních komplikací. Jiné poukazují na podobnost mezi oběma přístupy, kdy laparoskopická operace vedla stejně jako laparotomická k snížené aktivitě tkáňového aktivátoru plasminogenu (77). Významnou roli hrál často také tlak plynu (78), jeho teplota (79) a délka zákroku (80).

Součástí komplexního procesu zánětu je v jeho pozdní fázi tvorba mezibuněčné hmoty a obnova tkáňové integrity. Na tomto úkolu se podílí celá řada látek, z nichž nejvýznamnější je regulace zprostředkovaná TGF $\beta$ . Tento cytokin stimuluje fibroblasty k produkci kolagenu, fibronektinu a dalších proteinů uplatňujících se při výstavbě mezibuněčné hmoty a tkání. Zároveň také snižuje produkci enzymů, které extracelulární matrix degradují. Tvorba pooperačních srůstů je tedy připisována mimo jiné i TGF $\beta$  (81) a v celém procesu pak, jak již bylo zmíněno, hraje roli rovnováha mezi tvorbou a degradací mezibuněčné hmoty (71). Tyto srůsty mají negativní dopad na funkci dané tkáně či orgánu a je tedy žádoucí jejich eliminace. Nesmí ovšem být narušen klíčový a nezbytný průběh hojení.

Celý proces tvorby těchto abnormálních spojů závisí na produkci TGF $\beta$  a poměru tPA/PAI (82) i na samotném povrchu peritonea, jehož poškozením se rozvíjí série již zmíněných změn podporujících tento proces. Použití CO<sub>2</sub> může poškozovat strukturu peritonea více než expozice vzduchem (83; 84).

### **2.2.1.6. Shrnutí**

Systémová imunitní odezva na laparoskopický zákrok je ve srovnání s laparotomickým spojována s nižší inhibicí buněčně zprostředkované imunitní odpovědi a nižším stupněm imunosuprese. Tento nálezní podporuje použití laparoskopie s cílem snižovat pooperační komplikace. Výzkumy systémové imunitní odezvy jsou ve svých závěrech poměrně jednotné. Laparoskopie se jeví jako přístup, který nevyvolává tak výraznou systémovou imunosupresi jako přístup otevřený - laparotomie. Tento aspekt rozšiřuje spektrum výhod této metodiky. U lokální imunitní odpovědi je ovšem situace stále nejednoznačná.

V předchozím textu je poukázáno na to, že není možné stanovit jednotný závěr, zda laparoskopie vede k útlumu lokální imunitní reakce, který by mohl mít význam pro rozvoj



pooperačních komplikací a případnou diseminaci nádoru. Opakují se názory, že by laparoskopie mohla vykazovat tlumivý účinek na metabolickou aktivitu makrofágů či produkci prozánětlivých cytokinů stimulovanými makrofágy. Nesourodost těchto výsledků může plynout z faktu, probíhalo-li stanovení aktivity makrofágů bazálně či až po jejich stimulaci. Cytokiny mají nepopíratelně výraznou úlohu pro modulaci imunitní odpovědi, kdy významnou úlohu sehrává TNF $\alpha$  mimo jiné v aktivaci T-lymfocytů a působením jimi produkovaného INF $\gamma$  v následné přeměně makrofágů na aktivovanou formu schopnou tvořit NO. Dopad změny intenzity produkce cytokinů po laparoskopii na skutečnou imunitní odezvu může být pouze spekulativní, protože nežádoucí oslabení procesu fagocytosy nebylo jednoznačně potvrzeno. Není také jasné, zda se případný útlum produkce prozánětlivých cytokinů může promítnout do výsledné schopnosti vypořádat se s pooperačními infekčními komplikacemi či eliminace nádorových buněk. Nelze vyloučit, že zmírnění produkce prozánětlivých cytokinů po laparoskopii je pro kompetentní imunitní odpověď postačující a že naopak jejich vysoká produkce může být projevem intenzivního zánětlivého procesu, který může vést až k poškození organismu (66; 67).

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Zvířata

Celá studie se skládá z několika na sebe navazujících úkonů, jejichž organizační a časové skloubení je poměrně náročné. K pokusům byli použiti samci potkana kmene Wistar (*BioTest Konárovice*) o hmotnosti 220-250g. Potkani byli umístěni v místnosti o teplotě  $23 \pm 1$  °C, relativní vlhkosti  $55 \pm 10\%$ , s výměnou vzduchu 12-14x za hodinu a střídáním světla a tmy po 12 hodinách (6-18). Potkani měli volný přístup ke standardní laboratorní dietě (*DOS Poté 2B, Velaz, Praha*) a vodě. S pokusnými zvířaty bylo zacházeno v souladu s platnými zákony a všechny pokusy byly předem schváleny Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání při Univerzitě Karlově v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové. Potkani byli rozděleni do 3 skupin označených LT (laparotomie); LS (laparoskopie) a K (kontrolní). U laparotomovaných potkanů byl proveden 3 cm řez ve střední abdominální čáře a následovala ligace céka. Dutina byla otevřena po dobu 20 minut. Při laparoskopickém přístupu bylo na 20 minut zavedeno kapnoperitoneum (3 mm Hg), Vereshova jehla byla zavedena do levého hypogastria vpravo. Cécum bylo předsunuto před stěnu břišní a byla provedena ligace céka. Kontrolní potkani podstoupili pouze inhalační éterovou celkovou anestezii.

#### 3.2. Pracovní postup

##### 3.2.1. IZOLACE MAKROFÁGŮ

Po provedení chirurgického zákroku v abdominální dutině jsou makrofágy z oblasti peritonea izolovány. K adekvátní výtěžnosti počtu buněk při izolaci je nutné suspenzi sbírat ze dvou až čtyř zvířat. Proto k získání alespoň šesti výsledků v jedné skupině je obvykle třeba 18 zvířat. Izolace makrofágů se provádí po operacích s laparotomickým a laparoskopickým přístupem a u kontrol (tj. bez operace) a to vždy 24 či 72 hodin po zákroku. Pro tento účel se používá metoda laváže peritoneální dutiny, kdy se v éterové anestezii usmrčenému zvířeti injekčně aplikuje 20 ml lavážního roztoku (zde se v zájmu zachování viability buněk osvědčilo chladné (-4°C) kultivační médium RPMI 1640 (*Gibco*) do pravého dolního kvadrantu dutiny břišní). Poté se 2 minuty provádí jemná masáž, aby se makrofágy odloučily do roztoku. Masáž musí být prováděna opatrně, jelikož častou pooperační komplikací je

krvácení. Lýza erytrocytů, která je nutná při jejich velké příměsi, bohužel snižuje viabilitu získaných makrofágů, proto je nezbytné krvácení co nejvíce zabránit. Krvácení do břišní dutiny je podstatně omezeno, pokud je izolace prováděna na již usmrceném zvířeti. Po dvouminutové masáži se provede rozstřížení břišní stěny ve střední čáře a odsaje se veškerý roztok. Z jednoho zvířete získáme objem cca 20 ml rozdělený do 2 zkumavek, které jsou okamžitě uloženy do ledové drti k udržení viability buněk.

### **3.2.2. KULTIVACE**

Bezprostředně po izolaci se získaná suspenze zcentrifuguje při teplotě 4 °C, 7 minut, 1200 ot/min a supernatant se odlije. Sediment je resuspendován a do každé zkumavky je přidán 1 ml kompletního DMEM (*Gibco*) média obohaceného o antibiotika (penicilin 10000 IU/ml, streptomycin 10000 µg/ml; *Invitrogen*), antimykotika (amphotericin B 25 µg/ml; *Invitrogen*) a fetální bovinní sérum (10%; *Gibco*). Obsah se slije dohromady ze 2-4 vzorků reprezentujících jednu skupinu. Pro každou skupinu se za pomoci Bürkerovy komůrky stanoví počet buněk v 1 ml a za použití trypanové modři (*Sigma-Aldrich*) se určí viabilita. Toto stanovení životnosti je založeno na faktu, že mrtvé buňky akumulují v jádrech barvivo. Provádí se tak, že se na podložní skličku smíchá 10 µl vzorku a 10 µl trypanové modři a po 1 minutě se pod mikroskopem v 50 zorných polích počítají buňky mrtvé a živé. Viabilita je vyjádřena jako poměr počtu živých buněk k celkovému počtu buněk. Podle aktuálního počtu buněk se suspenze naředí výše uvedeným kultivačním médiem se suplementací na koncentraci 1 milion buněk na 1 ml. Buňky jsou ponechány k přichycení na Petriho misky (6 mm) v počtu 2 miliony buněk/Petriho misku po dobu 2 hodin při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Po uplynutí této doby se médium odsaje, provede se výplach 1 ml RPMI 1640 média a nahradí se čerstvým kompletním DMEM médiem. Po 24 hodinové kultivaci se médium odsaje, zamrazí na -80°C a po rozmrazení je připraveno k okamžitému stanovení koncentrace cytokinů.

Další součástí pokusu bylo, že jsme se snažili simulovat aktivaci makrofágů tím, že jsme ke kultivovaným makrofágům přidávali lipopolysacharid (LPS), jenž je nespecifickým aktivátorem nejen makrofágů. Při výměně média se pro 24 hodinovou kultivaci použilo kompletní DMEM médium se suplementací obohacené navíc o LPS (*Escherichia coli O11:B4*, *Sigma Aldrich*) ve výsledné koncentraci 0,1 µg/ml. Po 24 hodinách kultivace se médium opět odsaje a zamrazí k pozdějšímu stanovení koncentrace cytokinů. Způsob optimalizace použité koncentrace LPS je uveden ve výsledkové části.

### **3.2.3. STANOVENÍ KONCENTRACE CYTOKINŮ METODOU ELISA**

#### **3.2.3.1. EIA**

EIA (*enzyme immunoassay*) jsou imunochemické analytické metody založené na specifické reakci antigenu a příslušné protilátky. Jelikož vzniklý komplex Ag-Ab není viditelný ani pomocí jiné veličiny měřitelný, využívá se značení jednoho z reaktantů. V případě EIA je příslušnou značkou enzym, může se ale použít například radioaktivní izotop (RIA – *radioimmunoassay*), kdy poté měříme radioaktivitu, či fluorescenční látka, kdy se měří intenzita fluorescence (FIA – *fluoro immunoassay*) popřípadě jiné látky schopné po vazbě komplex jakkoliv zviditelnit.

Enzym je při metodách EIA na protilátku (převážně) nebo na antigen navázán kovalentně a po přidání vhodného substrátu katalyzuje reakci, jež dává vzniknout barevnému produktu, který se následovně spektrofotometricky stanovuje. Daný enzym musí splňovat několik kritérií, aby se dal prohlásit pro tuto metodu jako vhodný. Je nutné, aby měl nízkou molekulovou hmotnost, vysokou stabilitu a enzymovou aktivitu, musí být schopen vazby na protilátku či různé skupiny antigenů, jeho reakční produkt musí být barevný nebo jinak snadno detekovatelný a v neposlední řadě hraje roli jeho dostupnost a cena. Z výše uvedených důvodů se proto nejčastěji využívá alkalická fosfatasa (za stěv telat), galaktosidasa (z bakterie *Escherichia coli*), glukosooxidasa (z kvasinky *Aspergillus niger*) a peroxidasa (z kořene křenu), přičemž poslední ze zmiňovaných je v praxi nejčastěji využívanou. Substrátem pro křenovou peroxidasu je peroxid vodíku, z něhož za enzymatické katalýzy vzniká voda a kyslík. Uvolňovaný O<sub>2</sub> oxiduje chromogen, jehož redukovaná forma je bezbarvá, na barevný produkt. Jako chromogeny pro křenovou peroxidasu funguje řada látek, například kyselina aminosalicyllová, tetramethylbenzidin (TMB) či ortho-fenylendiamin (OPD). OPD, jehož vzniklý reakční produkt je žlutý až červený s maximem absorpce při 492 nm, je nejhojněji využíván. Nejpoužívanějším substrátem pro alkalickou fosfatasu je p-nitrofenylfosfát (85).

Metody EIA jsou rozsáhlou skupinou technik, které spojuje fakt, že komplex antigen-protilátka je vizualizován pomocí enzymu. EIA metody slouží k průkazu a kvantitativnímu stanovení haptenu, antigenů a protilátek. EIA techniky mají řadu variací, z nichž každá má vlastní spektrum použití.

Dle uspořádání dané techniky lze dělit tyto metody na kompetitivní (soutěživé) versus nekompetitivní (nesoutěživé) a homogenní versus heterogenní (85).

Kompetitivní EIA: Vazebný reagent je v reakci v limitovaném množství a o vazebná místa soutěží neznačený (analyt) a značený ligand, který je přidáván ve známém množství. Vazebná místa na protilátce jsou plně saturována těmito ligandy a jejich vazebný poměr je stejný jako jejich poměr ve vzorku. Měřená veličina (absorbance) má potom s koncentrací analytu nepřímou úměrnou závislost, protože čím více je ve vzorku stanovované látky, tím méně se na protilátku váže enzymem značený ligand a tím se také přemění méně substrátu na barevný produkt (85).

Nekompetitivní EIA: Vazebný reaktant je zde v přebytku, tudíž se na něj naváže tolik ligandu, kolik ho ve vzorku je, proto je závislost mezi měřenou absorbancí a koncentrací analytu přímo úměrná. Nejvíce se využívá tzv. sendvičové metody, kdy se komplex Ag-Ab detekuje pomocí druhé protilátky, jež je značená a vytváří s oním komplexem útvar schematicky připomínající jakýsi „sendvič“. Někdy se využívá detekce přes systém avidin-biotin (85).

Homogenní EIA: Není třeba oddělovat zreagovaný a nezreagovaný podíl a reakce probíhá pouze v jedné, a to kapalně, fázi. Jde povětšinou o uspořádání kompetitivní a nejčastější homogenní metodou je variace nazývaná EMIT (*Enzyme multiplied immunoassay technique*). Používá se především pro stanovení haptenu – hormonů, léčiv a jiných nízkomolekulárních látek. O omezený počet vazebných míst na protilátce soutěží haptenu ze vzorku a známé množství značeného haptenu. Na protilátku se haptenu navážou v poměru, v jakém jsou zastoupeny ve směsi. Enzym, jenž je použit v konjugátu s přidáním haptenu o známém množství, se při vazbě na protilátku deaktivuje a v konečné fázi je tedy stanoven pouze produkt enzymatické aktivity volného značeného haptenu. Měřená absorbance má s koncentrací analytu závislost přímo úměrnou, protože čím víc je ve vzorku stanovované látky, tím méně se na protilátku váže značený haptenu a tím je více volného značeného haptenu poskytujícího reakci (85).

Heterogenní EIA: Vyžaduje separaci volné a vázané frakce a jeden z reaktantů je přitom vázán na pevnou fázi, kterou může být stěna jamky, SEPHADEX, skleněné kuličky, polyakrylamid atd. (v praxi se osvědčila zejména vazba na stěnu jamky mikrotitrační destičky). Po každém kroku je tedy nutné pevnou fázi promývat, aby se odstranily nezreagované frakce. Nejčastějším zástupcem heterogenních EIA metod je ELISA (85).

Přehled základních používaných EIA metod je uveden níže v tabulce č. 5.

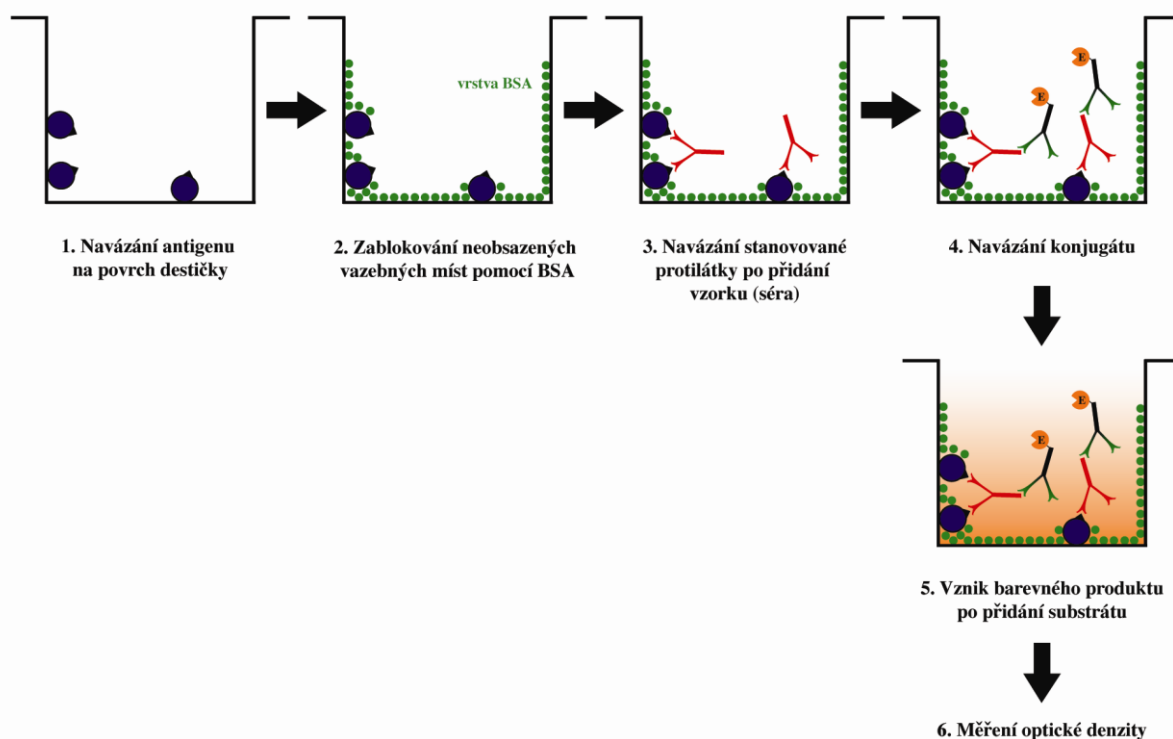
Tabulka č. 5

<u>metoda</u>		<u>analyt</u>	<u>čínidlo</u>	<u>komplexy</u>	<u>provedení</u>	<u>využití</u>
<u>EMIT</u>	Kompetitivní homogenní,	Ag (hapten)	Ag*, Ab	Ag-Ab / Ag*-Ab	Stanovujeme produkt reakce volného Ag*, v komplexu Ag*-Ab je aktivita enzymu inhibována	Stanovení haptenu (hormony, léčiva...)
<u>ELISA</u>	Kompetitivní, heterogenní	Ag	Ag*, Ab <sub>I</sub>	Ag-Ab <sub>I</sub> / Ag*-Ab <sub>I</sub>	Imobilizovaná Ab <sub>I</sub> , komplex není vymyt	Stanovení Ag o vyšší Mr
		Ab	Ab*, Ag <sub>I</sub>	Ag <sub>I</sub> -Ab / Ag <sub>I</sub> -Ab*	Ag <sub>I</sub> vázán na pevný nosič	V praxi sporadicky
	Kompetitivní, heterogenní, blokovácí (vytěšňovací)	Ab	Ag <sub>I</sub> , Ab*	Ab-Ag <sub>I</sub> / Ab*-Ag <sub>I</sub>	Na imobilizovaný Ag <sub>I</sub> se váže Ab ze vzorku, přidaná Ab* vytěšňuje Ab z vazby	
	Kompetitivní, heterogenní, nepřímá	Ag	Ag <sub>I</sub> , Ab, aAbAb*	Ag <sub>I</sub> -Ab- aAbAb* / Ag-Ab	Ag ze vzorku vyváže některá vaz. místa na Ab, jež by se vázala na Ag <sub>I</sub>	
	Nekompetitivní, heterogenní (sendvičová)	Ag	Ab <sub>I</sub> , Ab*	Ab <sub>I</sub> -Ag-Ab*	Imobilizovaná Ab <sub>I</sub> se váže na Ag ze vzorku a na ten poté Ab*	Detekce virů, bakterií, proteinů a peptidů
Ab		Ag <sub>I</sub> , aAbAb*	Ag <sub>I</sub> -Ab- aAbAb*	Imobilizovaný Ag <sub>I</sub> , na něj se váže Ab ze vzorku, poté se přidá aAbAb*	Detekce protilátek ze séra	
Ab		aAbAb <sub>I</sub> , Ag, Ab*	aAbAb <sub>I</sub> -Ab-Ag-Ab*	Na imobilizovanou aAbAb <sub>I</sub> se váže Ab ze vzorku, na tu se váže specifický Ag a na něj pak Ab* proti Ag	Plus různé další modifikace	
<u>Vysvětlivky</u>	Indexy: <b>I</b> (reagent je zakotven na pevné fázi), <b>aAb</b> (proti protilátce), * (značeno enzymem)					

### 3.2.3.2. ELISA

Metoda ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) spadá pod výše popisované enzymoimunoanalýzy, které využívají tvorby imunokomplexu mezi specifickou protilátkou a antigenem a kdy se daná reakce vizualizuje pomocí přeměny substrátu enzymem. Tato metoda má rozmanité spektrum variací a obměn a lze s její pomocí ze vzorku stanovit jak antigen, tak protilátku. Jeden z reaktantů je ovšem vždy zakotven na stěně mikrotitrační jamky, jež slouží jako pevný nosič a tudíž reakce neprobíhá jen v jedné fázi. Nezareagovaný podíl je nutno mezi jednotlivými kroky promýváním odstranit a jedná se tedy o metodu heterogenní. Po vazbě jednoho z reaktantů na stěnu mikrotitrační jamky je nutné zablokovat volná místa na povrchu jamky, která by mohla způsobovat nespecifickou vazbu různých látek včetně analytů a zkreslovat tak výsledky analýz. K tomuto účelu se používá BSA (bovinní sérový albumin) (85). Schéma sendvičové ELISA metody sloužící ke kvantifikaci protilátek včetně zablokování volných vazebných míst na stěně jamky je zobrazeno níže na obrázku č. 2.

Obrázek č. 2

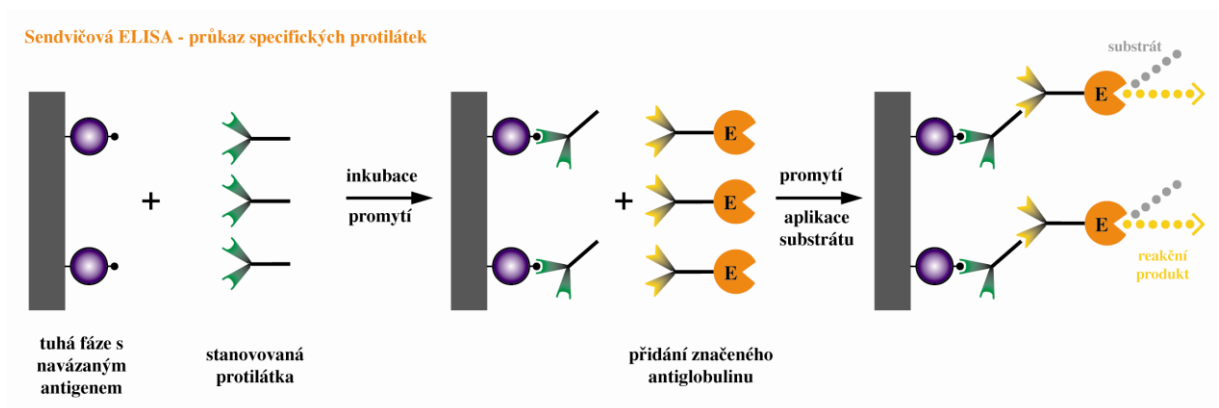


Převzato z: přednášky z imunochemie; doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

## Nekompetitivní ELISA

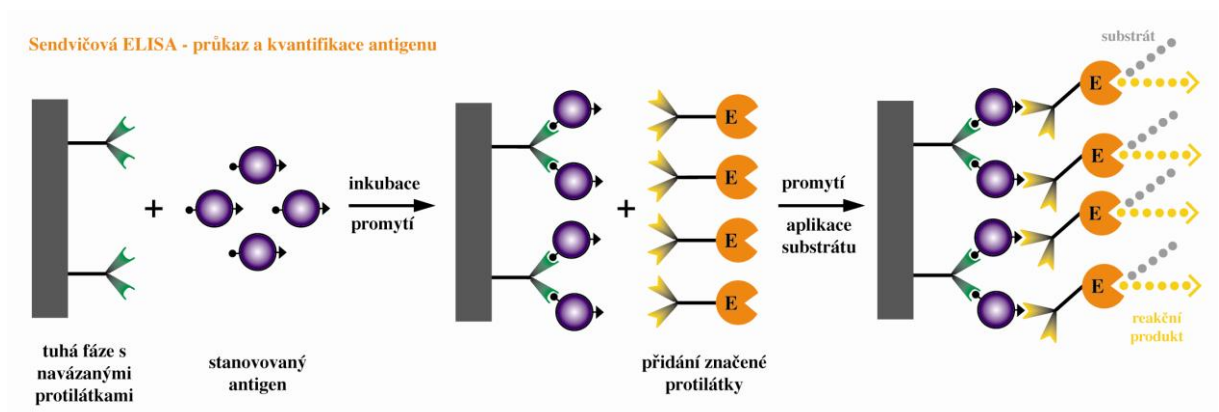
Ve valné většině se využívá nekompetitivní sendvičové metody detekce, kdy se analyt detekuje pomocí další protilátky, která je buď sama již konjugovaná s enzymem (obrázek č. 3 a 4) nebo se postupuje přes další mezikrok. K tomuto účelu se slouží další specifická protilátka, která je namířena proti Fc části imunoglobulinu z předchozího kroku a až tato nese enzym. Velice často se také využívá vazebné afinity avidinu k biotinu, která dává vzniknout pevné ireverzibilní vazbě. Avidin (protein vaječného bílku) je schopen vázat až 4 molekuly biotinu (vitamin H). Jeden z této dvojice se potom tedy konjuguje s protilátkou proti analytu a druhý s enzymem. Oproti tomu se naopak používá i zjednodušená varianta této metody, kdy jsou všechny potřebné reaktanty přidány v jediném kroku (obrázek č. 5). Ať již je ale uspořádání nekompetitivních metod a počet kroků analýzy jakékoliv, platí, že po přidavku substrátu a zastavení reakce je vždy intenzita absorbance přímo úměrná koncentraci analyzované látky ve vzorku (85).

Obrázek č. 3



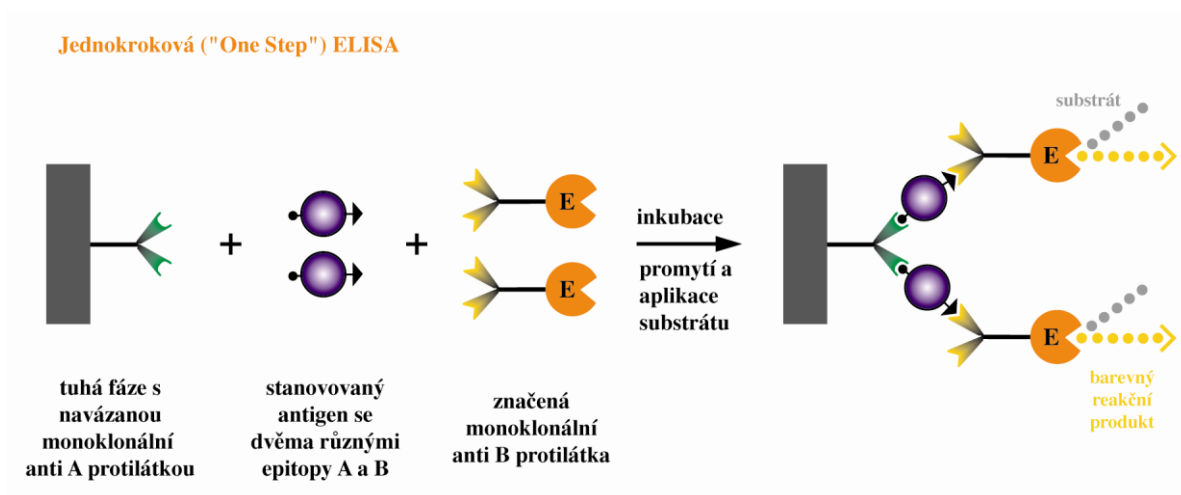
Převzato z: přednášky z imunochemie; doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

Obrázek č. 4





Obrázek č. 3

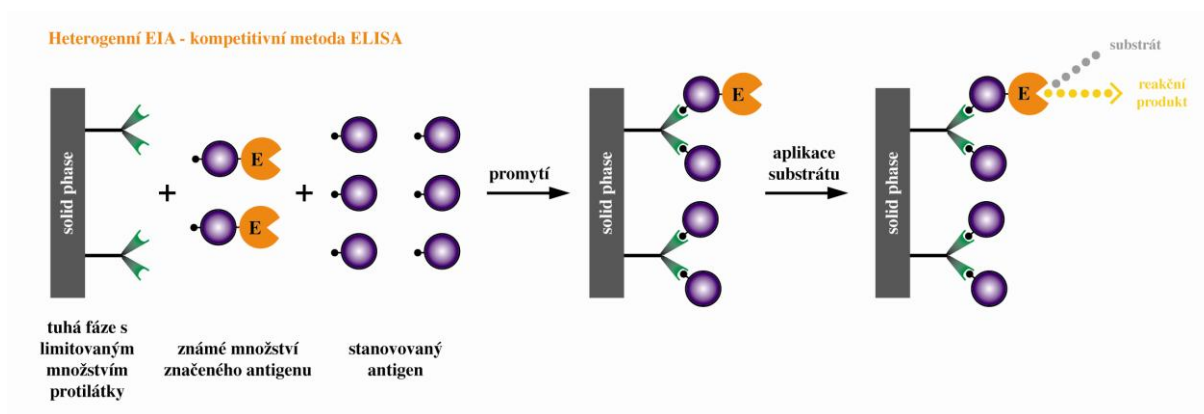


Převzato z: přednášky z imunochemie; doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

## Kompetitivní ELISA

Jsou ovšem využívány i kompetitivní způsoby této metody, při níž tedy analyt o limitované vazebné místo soutěží se značeným analytem o známém množství. Vedle situace vyobrazené na obrázku č. 6, kdy se ke stanovovanému antigenu přidá známé množství značeného antigenu, jenž spolu posléze kompetují o omezená vazebná místa na imobilizované protilátce, je využívána ještě tzv. nepřímá kompetitivní ELISA. Při ní je stejný antigen, který má být stanovován, imobilizován na stěnu jamek a po přidání známého omezeného množství protilátky a analytu se na imobilizovaný antigen naváže jen tolik imunoglobulinu, který nezreagoval se stanovovaným antigenem. Po promytí a přidavku značeného antiglobulinu je enzymatickou přeměnou substrátu iniciována barevná změna. Další variantou je tzv. vytěšňovací ELISA, kdy stanovovanou protilátku ze vzorku vytěšňuje z vazby přidaná značená protilátka. Intenzita signálu je poté u kompetitivních ELISA metod vždy nepřímo úměrná množství stanovované látky ve vzorku (85).

Obrázek č. 4

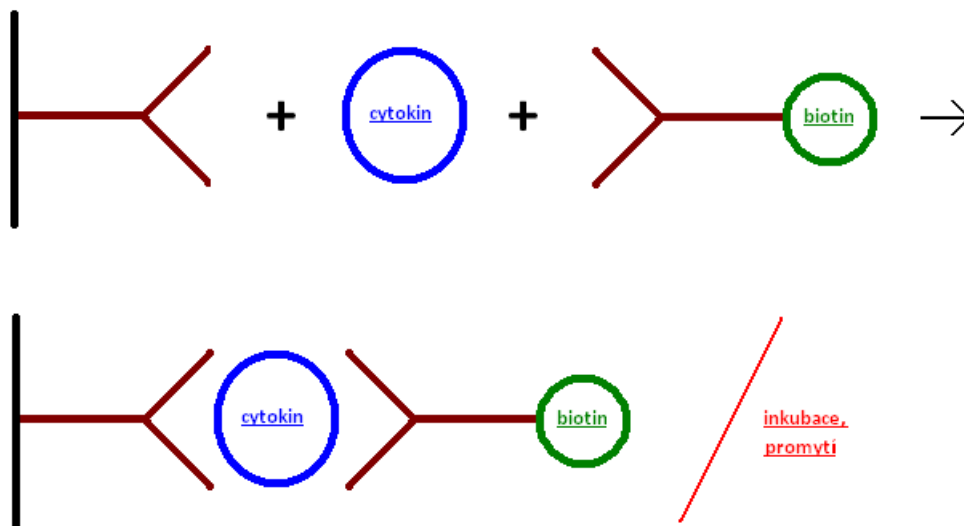


Převzato z: přednášky z imunochemie; doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

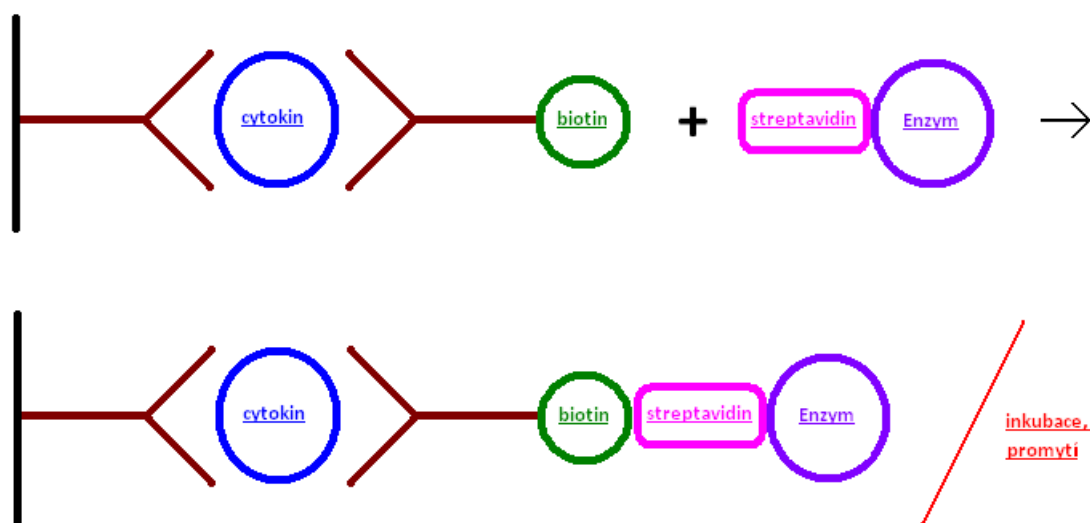
Ke stanovení cytokinů produkovaných peritoneálními makrofágy jsme využívali metodu ELISA, jež již byla detailněji popsána výše. Komerčně dodávaný set je založen na principu sendvičové enzymoimunoanalýzy, kdy se na specifickou protilátku proti danému analytu navázané na stěně jamky váže daný cytokin ze vzorku. Bezprostředně poté se přidá druhá specifická protilátka proti cytokinu konjugovaná s biotinem. Po inkubaci a promytí mikrotitrační destičky se do reakce přidá streptavidin konjugovaný s enzymem. Během další inkubace se na biotin zachycený v komplexu na stěně jamky naváže streptavidin nesoucí enzym a utvoří tzv. sendvič. Po promytí se do jamek přidá substrát ( $H_2O_2$ ), který bude za katalýzy zmiňovaným enzymem, jímž je křenová peroxidasa, rozložen na vodu a kyslík. Uvolňující se  $O_2$  následovně oxiduje chromogen (TMB) a celou reakci tak vizualizuje. Po nějaké době je reakce 1M kyselinou fosforečnou zastavena a výsledný produkt je následně při odpovídající vlnové délce (450 nm) fotometricky detekován. Míra absorbance je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku. Stanovili jsme 3 solubilní cytokiny produkované makrofágy do kultivačního média sloužícího jako vzorek, a to IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF $\alpha$ .

Schéma použité ELISY:

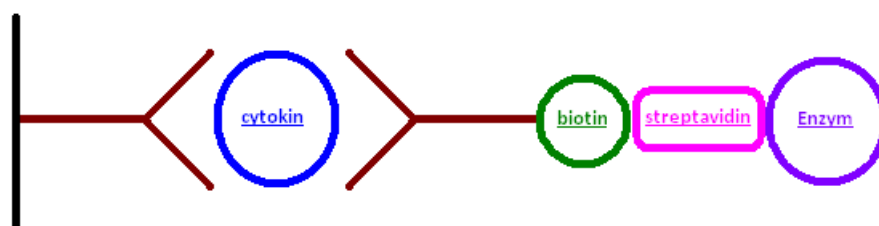
**Krok 1:**

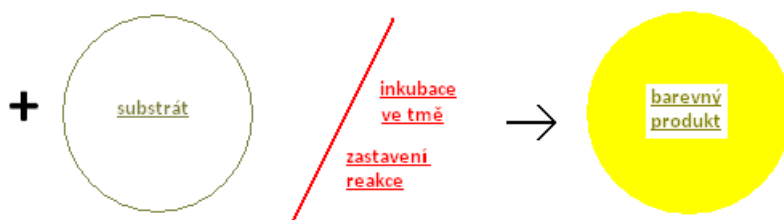


**Krok 2:**



**Krok 3:**





### 3.2.3.3. Stanovení TNF $\alpha$

Provádí se komerční soupravou *Bender MedSystems* a metodou sendvičové ELISY

1) Součástí dodávané soupravy jsou:

- a. Mikrotitrační destička s navázanými monoklonálními protilátkami proti potkanímu TNF $\alpha$
- b. Roztoky a reagenty:

<u>Reagencie</u>	<u>Popis</u>	<u>Objem [ml]</u>
<i>Biotin conjugate</i>	Monoklonální protilátky anti-rat TNF $\alpha$	0,1
<i>Streptavidin HRP</i>		0,15
<i>Standard rat TNF-<math>\alpha</math></i>	Lyofilizovaný, 4000 pg/ml	-
<i>Wash buffer</i>	PBS + 1% Tween 20	50
<i>Assay buffer</i>	PBS + 1% Tween 20 + 10% BSA	5
<i>Sample diluent</i>	Pro ředění vzorků a standardů	12
<i>Substrate solution</i>	Roztok TMB	15
<i>Stop solution</i>	1M kyselina fosforečná	12
<i>Blue-dye</i>		0,4
<i>Green-dye</i>		0,4
<i>Red-dye</i>		0,4

2) Příprava roztoků:

- a. Wash buffer: Pokud byly v roztoku přítomny krystalky, byly zahřátím rozpuštěny a roztok byl promíchán. Obsah lahvičky byl přelit do odměrného válce, doplněn destilovanou vodou do 1000 ml, opatrně promíchán a uložen při 4°C.
- b. Assay buffer: Obsah lahvičky byl promíchán a v odměrné baňce doplněn destilovanou vodou do celkového objemu 100 ml, promíchán a uložen při 4°C

- c. Biotin-conjugate: Tento roztok se připravuje vždy těsně před použitím, a to smícháním *Biotin-conjugate* s roztokem *Assay buffer* v poměru 1 : 100 (0,06 ml *Biotin-conjugate* + 5,94 ml *Assay buffer*)
- d. Standard rat - TNF $\alpha$ : *Standard rat – TNF $\alpha$*  byl připraven rozpuštěním v daném množství destilované vody (dle pokynů na štítku lahvičky)
- e. Streptavidin HRP: Tento roztok byl připraven těsně před použitím naředěním *Streptavidin HRP* roztokem *Assay buffer* v poměru 1 : 100 (0,12 ml *Streptavidin HRP* + 12 ml *Assay buffer*)

### 3) Postup analýzy:

- a. Příprava kalibrační řady: Do sedmi plastových zkumavek Eppendorf bylo napipetováno 250  $\mu$ l *Sample diluent*, do zkumavky označené jako ST 1 bylo přidáno 250  $\mu$ l roztoku standardu a dvojkovým ředěním byla získána řada sedmi kalibračních roztoků.
- b. Vzorky pro analýzu stimulovaných makrofágů byly ředěny destilovanou vodou v poměru 1:100.
- c. Všechny jamky mikrotitrační destičky byly 2x promyty 300  $\mu$ l roztoku *Wash buffer*. Po každém promytí byl roztok odstraněn vyklepnutím a po posledním promytí byla destička jemně osušena buničinou.
- d. Do jamek pro standard bylo pod sebe v dubletu napipetováno 100  $\mu$ l standardů, předem připravených dle bodu a. (tj. A1, B1 – ST1; C1, D1 – ST2...)
- e. Do jamek pro blank bylo napipetováno 100  $\mu$ l *Sample diluent*.
- f. Do jamek pro vzorky bylo napipetováno 50  $\mu$ l *Sample diluent*.
- g. Do jamek pro vzorky bylo napipetováno 50  $\mu$ l vzorků (v dubletu pod sebe).
- h. Byl připraven roztok *Biotin-conjugate* (viz. příprava roztoků).
- i. Do všech jamek bylo přidáno 50  $\mu$ l roztoku *Biotin-conjugate*.
- j. Destička byla přikryta víčkem a 2 hodiny inkubována při laboratorní teplotě na rotátoru při 200 rpm.
- k. Po inkubaci byly jamky 4x promyty podle bodu c.
- l. Byl připraven roztok Streptavidin HRP (viz. příprava roztoků).
- m. Do všech jamek bylo napipetováno 100  $\mu$ l roztoku Streptavidin HRP.
- n. Destička byla přikryta víčkem a 1 hodinu inkubována při laboratorní teplotě na rotátoru při 200 rpm.
- o. Po inkubaci byly jamky 4x promyty podle bodu c.

- p. Do všech jamek bylo napipetováno 100 µl *Substrate solution*.
- q. Přikrytá destička byla 10 minut inkubována při laboratorní teplotě ve tmě.
- r. Po inkubaci byla enzymová reakce zastavena napipetováním 100 µl *Stop solution* do všech jamek.
- s. Po zastavení reakce byla změřena absorbance při 450 nm.

### 3.2.3.4. Stanovení IL-1β

Provádí se komerční soupravou *Bender MedSystems* a metodou sendvičové ELISY

1) Součástí dodávané soupravy jsou:

- a. Mikrotitrační destička s navázanými monoklonálními protilátkami proti potkanímu IL-1β
- b. Roztoky a reagenty:

<u>Reagencie</u>	<u>Popis</u>	<u>Objem [ml]</u>
<i>Biotin conjugate</i>	Monoklonální protilátky anti-rat IL-1	0,1
<i>Streptavidin HRP</i>		0,15
<i>Standard rat IL-1β</i>	Lyofilizovaný, 4000 pg/ml	-
<i>Wash buffer</i>	PBS + 1% Tween 20	50
<i>Assay buffer</i>	PBS + 1% Tween 20 + 10% BSA	5
<i>Sample diluent</i>	Pro ředění vzorků a standardů	12
<i>Substrate solution</i>	Roztok TMB	15
<i>Stop solution</i>	1M kyselina fosforečná	12
<i>Blue-dye</i>		0,4
<i>Green-dye</i>		0,4
<i>Red-dye</i>		0,4

2) Příprava roztoků:

- a. Wash buffer: Pokud byly v roztoku přítomny krystalky, byly zahřátím rozpuštěny a roztok byl promíchán. Obsah lahvičky byl přelit do odměrného válce, doplněn destilovanou vodou do 1000 ml, opatrně promíchán a uložen při 4°C.
- b. Assay buffer: Obsah lahvičky byl promíchán a v odměrné baňce doplněn destilovanou vodou do celkového objemu 100 ml, promíchán a uložen při 4°C

- c. Biotin-conjugate: Tento roztok se připravuje vždy těsně před použitím, a to smícháním *Biotin-conjugate* s roztokem *Assay buffer* v poměru 1 : 100 (0,06 ml *Biotin-conjugate* + 5,94 ml *Assay buffer*)
- d. Standard rat - IL-1β: *Standard rat – IL-1β* byl připraven rozpuštěním v daném množství destilované vody (dle pokynů na štítku lahvičky)
- e. Streptavidin HRP: Tento roztok byl připraven těsně před použitím naředěním *Streptavidin HRP* roztokem *Assay buffer* v poměru 1 : 200 (60 μl *Streptavidin HRP* + 11,94 ml *Assay buffer*)

### 3) Postup analýzy:

- a. Příprava kalibrační řady: Do sedmi plastových zkumavek Eppendorf bylo napipetováno 250 μl *Sample diluent*, do zkumavky označené jako ST 1 bylo přidáno 250 μl roztoku standardu a dvojkovým ředěním byla získána řada sedmi kalibračních roztoků.
- b. Všechny jamky mikrotitrační destičky byly 2x promyty 300 μl roztoku *Wash buffer*. Po každém promytí byl roztok odstraněn vyklepnutím a po posledním promytí byla destička jemně osušena buničinou.
- c. Do jamek pro standard bylo pod sebe v dubletu napipetováno 100 μl standardů, předem připravených dle bodu a. (tj. A1, B1 – ST1; C1, D1 – ST2...)
- d. Do jamek pro blank bylo napipetováno 100 μl *Sample diluent*.
- e. Do jamek pro vzorky bylo napipetováno 50 μl *Sample diluent*.
- f. Do jamek pro vzorky bylo napipetováno 50 μl vzorků (v dubletu pod sebe).
- g. Byl připraven roztok *Biotin-conjugate* (viz. příprava roztoků).
- h. Do všech jamek bylo přidáno 50 μl roztoku *Biotin-conjugate*.
- i. Destička byla přikryta víčkem a 2 hodiny inkubována při laboratorní teplotě na rotátoru při 200 rpm.
- j. Po inkubaci byly jamky 3x promyty podle bodu b.
- k. Byl připraven roztok *Streptavidin HRP* (viz. příprava roztoků).
- l. Do všech jamek bylo napipetováno 100 μl roztoku *Streptavidin HRP*.
- m. Destička byla přikryta víčkem a 1 hodinu inkubována při laboratorní teplotě na rotátoru při 200 rpm.
- n. Po inkubaci byly jamky 3x promyty podle bodu b.
- o. Do všech jamek bylo napipetováno 100 μl *Substrate solution*.
- p. Přikrytá destička byla 10 minut inkubována při laboratorní teplotě ve tmě.

- q. Po inkubaci byla enzymová reakce zastavena napipetováním 100  $\mu$ l *Stop solution* do všech jamek.
- r. Po zastavení reakce byla změřena absorbance při 450 nm.

### 3.2.3.5. Stanovení IL-6

Provádí se komerční soupravou *Bender MedSystems* a metodou sendvičové ELISY

1) Součástí dodávané soupravy jsou:

- a. Mikrotitrační destička s navázanými monoklonálními protilátkami proti potkanímu IL-6
- b. Roztoky a reagenty:

<u>Reagencie</u>	<u>Popis</u>	<u>Objem [ml]</u>
<i>Biotin conjugate</i>	Monoklonální protilátky anti-rat IL-6	0,1
<i>Streptavidin HRP</i>		0,15
<i>Standard rat IL-6</i>	Lyofilizovaný, 4000 pg/ml	-
<i>Wash buffer</i>	PBS + 1% Tween 20	50
<i>Assay buffer</i>	PBS + 1% Tween 20 + 10% BSA	5
<i>Substrate solution</i>	Roztok TMB	15
<i>Stop solution</i>	1M kyselina fosforečná	12
<i>Blue-dye</i>		0,4
<i>Green-dye</i>		0,4
<i>Red-dye</i>		0,4

2) Příprava roztoků:

- a. Wash buffer: Pokud byly v roztoku přítomny krystalky, byly zahřátím rozpuštěny a roztok byl promíchán. Obsah lahvičky byl přelit do odměrného válce, doplněn destilovanou vodou do 1000 ml, opatrně promíchán a uložen při 4°C.
- b. Assay buffer: Obsah lahvičky byl promíchán a v odměrné baňce doplněn destilovanou vodou do celkového objemu 100 ml, promíchán a uložen při 4°C
- c. Biotin-conjugate: Tento roztok se připravuje vždy těsně před použitím, a to smícháním *Biotin-conjugate* s roztokem *Assay buffer* v poměru 1 : 100 (0,06 ml *Biotin-conjugate* + 5,94 ml *Assay buffer*)



- d. Standard rat - IL-6: *Standard rat – IL-6* byl připraven rozpuštěním v daném množství destilované vody (dle pokynů na štítku lahvičky)
- e. Streptavidin HRP: Tento roztok byl připraven naředěním *Streptavidin HRP* roztokem *Assay buffer* v poměru 1 : 100 (0,12 ml *Streptavidin HRP* + 12 ml *Assay buffer*)

3) Postup analýzy:

- a. Příprava kalibrační řady: Do sedmi plastových zkumavek Eppendorf bylo napipetováno 250 µl *Assay buffer*, do zkumavky označené jako ST 1 bylo přidáno 250 µl roztoku standardu a dvojkovým ředěním byla získána řada sedmi kalibračních roztoků.
- b. Všechny jamky mikrotitrační destičky byly 2x promyty 300 µl roztoku *Wash buffer*. Po každém promytí byl roztok odstraněn vyklepnutím a po posledním promytí byla destička jemně osušena buničinou.
- c. Do jamek pro standard bylo pod sebe v dubletu napipetováno 100 µl standardů, předem připravených dle bodu a. (tj. A1, B1 – ST1; C1, D1 – ST2...)
- d. Do jamek pro blank bylo napipetováno 100 µl *Assay buffer*.
- e. Do jamek pro vzorky bylo napipetováno 50 µl *Assay buffer*.
- f. Do jamek pro vzorky bylo napipetováno 50 µl vzorků (v dubletu pod sebe).
- g. Byl připraven roztok *Biotin-conjugate* (viz. příprava roztoků).
- h. Do všech jamek bylo přidáno 50 µl roztoku *Biotin-conjugate*.
- i. Destička byla přikryta víčkem a 2 hodiny inkubována při laboratorní teplotě na rotátoru při 200 rpm.
- j. Po inkubaci byly jamky 3x promyty podle bodu b.
- k. Byl připraven roztok *Streptavidin HRP* (viz. příprava roztoků).
- l. Do všech jamek bylo napipetováno 100 µl roztoku *Streptavidin HRP*.
- m. Destička byla přikryta víčkem a 1 hodinu inkubována při laboratorní teplotě na rotátoru při 200 rpm.
- n. Po inkubaci byly jamky 3x promyty podle bodu b.
- o. Do všech jamek bylo napipetováno 100 µl *Substrate solution*.
- p. Přikrytá destička byla 10 minut inkubována při laboratorní teplotě ve tmě.
- q. Po inkubaci byla enzymová reakce zastavena napipetováním 100 µl *Stop solution* do všech jamek.
- r. Po zastavení reakce byla změřena absorbance při 450 nm.

Pořadí jednotlivých standardů a vzorků na mikrotitrační destičce je u stanovení všech cytokinů totožné a znázorňuje ho následující tabulka.

Pipetovací protokol:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST 1	ST 5	V 1/1	V 5/1	V 9/1	V 13/1	V 17/1	V 21/1	V 25/1	V 29/1	V 33/1	V 37/1
B	ST 1	ST 5	V 1/2	V 5/2	V 9/2	V 13/2	V 17/2	V 21/2	V 25/2	V 29/2	V 33/2	V 37/2
C	ST 2	ST 6	V 2/1	V 6/1	V 10/1	V 14/1	V 18/1	V 22/1	V 26/1	V 30/1	V 34/1	V 38/1
D	ST 2	ST 6	V 2/2	V 6/2	V 10/2	V 14/2	V 18/2	V 22/2	V 26/2	V 30/2	V 34/2	V 38/2
E	ST 3	ST 7	V 3/1	V 7/1	V 11/1	V 15/1	V 19/1	V 23/1	V 27/1	V 31/1	V 35/1	V 39/1
F	ST 3	ST 7	V 3/2	V 7/2	V 11/2	V 15/2	V 19/2	V 23/2	V 27/2	V 31/2	V 35/2	V 39/2
G	ST 4	BL	V 4/1	V 8/1	V 12/1	V 16/1	V 20/1	V 24/1	V 28/1	V 32/1	V 36/1	V 40/1
H	ST 4	BL	V 4/2	V 8/2	V 12/2	V 16/2	V 20/2	V 24/2	V 28/2	V 32/2	V 36/2	V 40/2

Použité zkratky: ST:standard; BL: blank; V: vzorek

### **3.2.4. STANOVENÍ PROTEINŮ**

K vyjádření produkce cytokinů kultivovanými buňkami je třeba vzít v úvahu aktuální počet buněk na kultivační misce. V praxi se osvědčilo vztahování naměřených koncentrací cytokinů na koncentraci proteinů pocházejících ze stejné Petriho misky. Vzorek na jejich analýzu se získá následovně: poté, co bylo odsáto médium na stanovení koncentrace cytokinů, a byl proveden výplach 1 ml destilované vody, přidá se na Petriho misku opět 1 ml destilované vody a ze dna se důkladně odloučí buňky. Tato suspenze je primárním vzorkem, který se analyzuje metodou využívající Bradfordův roztok.

**Bradford assay:**

Příprava Bradford roztoku (na 500 ml):

- 1) 50 mg Brilliant blue G-250 + 25 ml 95% ethanolu + 50 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%)
- 2) Doplnit destilovanou vodou do 500 ml, přefiltrovat
- 3) Skladovat v chladu při 4 °C

Příprava série standardů BSA (bovinní sérový albumin) dle tabulky:

		<b>Příprava:</b>	<b>Koncentrace:</b>
1)	Zásobní roztok 1 (ZR1)	10 mg BSA / 1 ml destilované vody (DV)	10 mg / ml
2)	Zásobní roztok 2 (ZR2)	100 µl ZR1 + 900 µl DV	1 mg / ml
3)		Ředěním ZR2 (1 mg / ml) se připraví:	
		150 µl ZR2 + 50 µl DV	<u>750 µl / ml</u>
		100 µl ZR2 + 100 µl DV	<u>500 µl / ml</u>
		80 µl ZR2 + 120 µl DV	<u>400 µl / ml</u>
		60 µl ZR2 + 140 µl DV	<u>300 µl / ml</u>
		40 µl ZR2 + 160 µl DV	<u>200 µl / ml</u>
	Zásobní roztok 3 (ZR3)	100 µl ZR2 + 900 µl DV (20 µl ZR2 + 180 µl DV)	<u>100 µl / ml</u>
4)		Ředěním ZR3 (100 µl / ml) se připraví:	
		250 µl ZR3 + 250 µl DV (10 µl ZR2 + 190 µl DV)	<u>50 µl / ml</u>
		200 µl DV	<u>BLANK</u>

Postup:

- 1) Do každé jamky (v dubletu podle níže uvedeného schématu) se napipetuje 10 µl vzorku / standardu + 300 µl Bradfordova roztoku.

Schéma pipetování do jednotlivých jamek:

A	blank	blank	1	1	9	9	17	17
B	st50	st50	2	2	10	10	18	18
C	st100	st100	3	3	11	11	19	19
D	st200	st200	4	4	12	12	20	20
E	st300	st300	5	5	13	13	21	21
F	st400	st400	6	6	14	14	22	22
G	st500	st500	7	7	15	15	23	23
H	st750	st750	8	8	16	16	24	24

- 2) Destička se umístí na rotátor (200 rpm) a 10 minut se při laboratorní teplotě inkubuje.
- 3) Detekce při 595 nm.
- 4) Z kalibrační křivky se vypočítají příslušné koncentrace pro vzorky.

### **3.2.5. STANOVENÍ FAGOCYTOSY**

Fagocytární aktivita byla stanovena pomocí komerčně dodávaného kitu *Vybrant<sup>TM</sup> Phagocytosis Assay Kit (V-6694)* od společnosti *Molecular Probes*. Princip stanovení spočívá v měření intracelulárního záření emitovaného fluorescenční barvou, která je konjugována s biopartikulemi *E. coli*, jež buňky pohlcují. Zároveň je okolní extracelulární fluorescence, která by interferovala se stanovením, zhasena trypanovou modří.

Peritoneální makrofágy byly analogicky izolovány 72 hodin po laparotomii, laparoskopii a éterové anestezii (bez operace) a 24 hodin kultivovány s nebo bez LPS. Skupiny LT baz; LT stim; LS baz; LS stim a K stim sloužily jako vzorky. Skupina K baz poté představovala pozitivní kontrolu.

#### Kit obsahuje:

- a) Fluoresceinem značená *Escherichia coli (K-12 BioParticles)*; 5 lahviček po 5 mg.
- b) 10x koncentrovaný Hankův solný roztok HBSS (*Hanks' balanced salt solution*); 5 lahviček po 0,5 ml.
- c) 5x koncentrovaná trypanová modř – 1,25 mg/ml v citrátovém solném roztoku; pH=4,4; 5 lahviček po 1 ml.

#### Další použité reagensie:

- a) DMEM médium
- b) RPMI 1640

#### Postup analýzy:

- a) Makrofágy byly izolovány 72 hodin po operaci a následně 24 hodin kultivovány v kompletním DMEM médiu s nebo bez LPS (0,1 µg/ml) na destičkách s 96 jamkami (200 000 buněk/jamku).
- b) Následně veškerá použitá média byla předeřhřátá na inkubační teplotu 37°C. Po skončení kultivace bylo staženo médium a proveden 2x výplach čerstvým RPMI 1640.
- c) Těsně před použitím byla připravena suspenze fluoresceinem značených partikulí. Obsah jedné lahvičky HBSS (0,5 ml) byl přepipetován do lahvičky obsahující biopartikule (5 mg) a

následovalo krátké rozrušení partikulí ultrazvukem. Poté byl celý obsah přepraven do čisté zkumavky se 4,5 ml DMEM bez suplementace.

- d) Do mikrotitrační destičky bez buněk bylo napipetováno 100  $\mu$ l DMEM média bez suplementace jako negativní kontrola (16 jamek). Do mikrotitrační destičky s buňkami kultivovanými po izolaci z intaktních zvířat bylo napipetováno 100  $\mu$ l DMEM média bez suplementace jako pozitivní kontrola (40 jamek).
- e) Do jamek mikrotitrační destičky pro vzorky (intaktní buňky stimulované LPS, buňky izolované po laparotomii bez a se stimulací LPS, buňky izolované po laparoskopii bez a se stimulací LPS) bylo pro každý vzorek napipetováno 100  $\mu$ l DMEM média bez suplementace (40 jamek).
- f) Mikrotitrační destička byla přikryta víčkem a inkubována 2 hodiny při 37°C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>.
- g) Destička byla 2x vypláchnuta RPMI 1640.
- h) Byl připraven roztok trypanové modři. Celý obsah lahvičky trypanové modři (1 ml) byl rozdrcen ultrazvukem a zředěn ve 4,0 ml DMEM bez suplementace.
- i) Do všech jamek bylo ihned přidáno 100  $\mu$ l suspenze trypanové modři z předchozího kroku.
- j) Mikrotitrační destička byla 1 minutu inkubována při pokojové teplotě.
- k) Z mikrotitrační destičky byl odsátý veškerý obsah, 2x vypláchnuta RPMI 1640 a fluorescence byla změřena na spektrofotometru Tecan při excitační vlnové délce 480 nm a emisní vlnové délce 520 nm.

### **3.2.6. STANOVENÍ WST**

K vyjádření fagocytární aktivity kultivovanými buňkami je třeba vzít v úvahu aktuální počet buněk v mikrotitrační jamce, resp. jejich viabilitu a metabolickou aktivitu. V praxi je možné vyjádřit naměřené hodnoty fluorescence k hodnotám WST-1 testu pocházejících ze stejné jamky.

WST bylo stanoveno s použitím komerčně dodávaného kitu *Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche Diagnostics)*. Je to test na stanovení proliferace, viability a cytotoxicity buněk založený na principu štěpení tetrazoliových solí buněčnými enzymy na barevný formazan. Vyšší počet živých buněk vede ke zvýšení celkové aktivity mitochondriálních dehydrogenas ve vzorku. Toto zvýšení enzymové aktivity následně způsobí zbarvení směsi vlivem formazanu, které je přímo úměrné počtu metabolicky aktivních buněk. Míra zbarvení se stanovuje spektrofotometricky.

Kit zahrnuje:

- a) WST-1 – použitý substrát (disodná sůl 4-[3-(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonové kyseliny); roztok připravený k použití
- b) Elektron transportní činidlo ve fosfátovém pufru

Postup analýzy:

- a) Po stanovení fluorescence na mikrotitrační jamce bylo do jamek přidáno 100  $\mu$ l naředěného WST v DMEM bez suplementace (1:11). Před inkubací byla změřena absorbance v čase 0.
- b) Destička byla přikryta víčkem a 90 min. inkubována při 37°C v atmosféře s obsahem 5% CO<sub>2</sub>.
- c) Poté byla na přístroji Tecan měřena absorbance při vlnové délce 440 nm.

### **3.2.7. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ**

#### **STANOVENÍ CYTOKINŮ**

Z jednotlivých absorbancí jsme pomocí rovnice přímky získané z kalibrační křivky vypočítali výsledné koncentrace cytokinů pro dané vzorky. Jejich nominální hodnoty jsme následovně vztáhli k analogickým způsobem vypočteným koncentracím proteinů z odpovídajících Petriho misek.

#### **STANOVENÍ FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITY**

Hodnoty fagocytární aktivity byly určovány jako poměr naměřené fluorescence a adekvátní WST hodnoty. Aritmetický průměr získaný z hodnot u intaktních kontrol bez stimulace LPS byl vyjádřen jako 100 %. Hodnoty v ostatních skupinách byly vyjadřovány jako

% fagocytární aktivity = aktivita vzorku / aktivita kontroly x 100

#### **STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT**

Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit program GraphPAD Instant 3.06 for Windows (GraphPad Software, USA). Hodnocení statistické významnosti bylo provedeno jednofaktorovým ANOVA testem. K vícečetnému porovnávání mezi skupinami sloužil Tukey-Kramerův post hoc test. V případě nenormálního rozložení hodnot byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test s Dunnovým post hoc testem. Všechny výsledky jsou vyjadřovány jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka průměru. Statistická významnost je vyjádřena jako \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

### **3.2.8. CÍL PRÁCE**

Cílem této práce je na experimentálním modelu laparoskopie a laparotomie co nejvíce blízkém klinické praxi:

- 1) porovnat změny produkce prozánětlivých cytokinů:
  - a) izolovanými nestimulovanými makrofágy 24 hod. po operaci.
  - b) izolovanými makrofágy po stimulaci lipopolysacharidem 24 hodin po operaci.
  - c) izolovanými nestimulovanými makrofágy 72 hodin po operaci.
  - d) izolovanými makrofágy po stimulaci lipopolysacharidem 72 hod. po operaci

2) hodnotit fagocytární aktivitu:

- a) izolovaných nestimulovaných makrofágů 72 hod. po operaci
- b) izolovaných makrofágů po stimulaci lipopolysacharidem 72 hod. po operaci



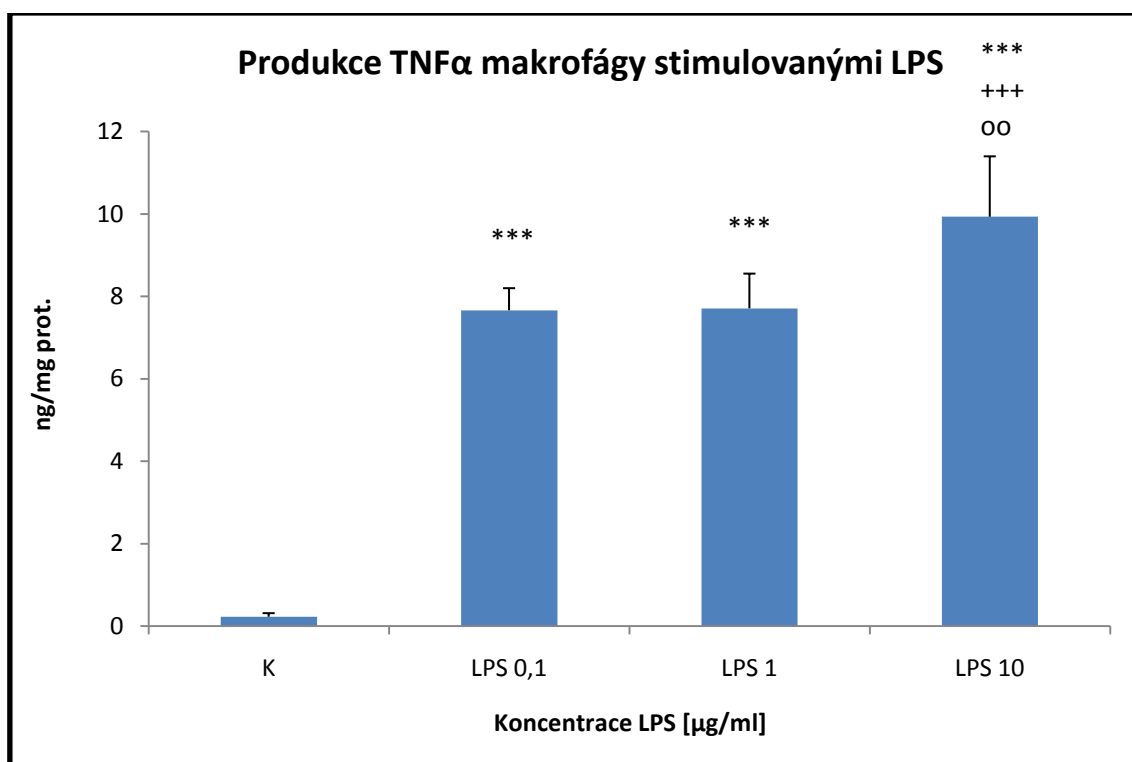
## 4. VÝSLEDKY:

### 4.1. Zjištění optimální koncentrace LPS

S ohledem na mezidruhové rozdíly v citlivosti makrofágů na bakteriální lipopolysacharid (LPS) bylo třeba stanovit optimální koncentraci, která by byla schopna dostatečně výrazně stimulovat sekreci cytokinu TNF $\alpha$ . Zároveň jsme požadovali, aby daná dávka LPS dostatečně stimulovala produkci i ostatních stanovovaných cytokinů, tj. IL-1 $\beta$  a IL-6.

Zmiňovanou optimální dávku LPS jsme zjišťovali porovnáváním produkce cytokinů makrofágy izolovanými z intaktních zvířat a kultivovanými v DMEM médiu bez LPS a po přidavku tří různých koncentrací LPS do média. Po 24 hodinové kultivaci následovalo stanovení cytokinů.

Graf č. 1

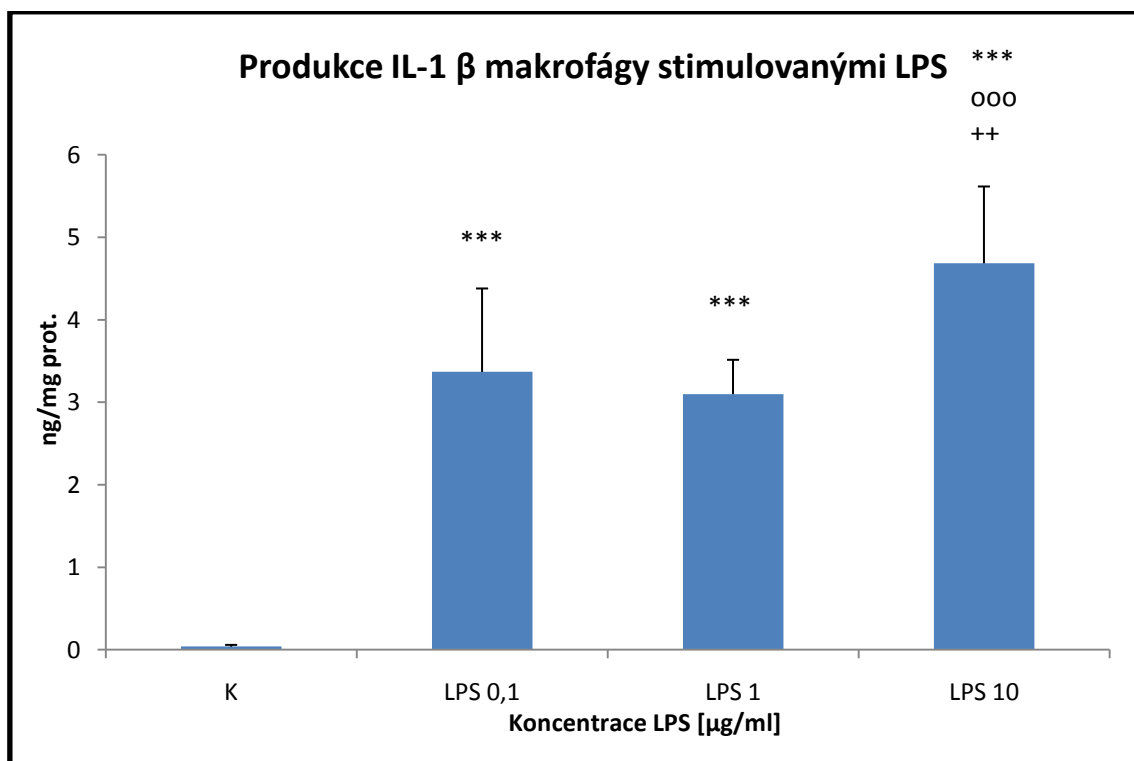


Použité zkratky a značky:

K: kontrolní skupina - makrofágy izolovány z intaktního zvířete a kultivovány 24 hod. (kompletní DMEM médium s ATB, antimykotiky); LPS 0,1; 1; 10 - makrofágy izolovány z intaktního zvířete a kultivovány 24 hod. s LPS (kompletní DMEM médium s ATB, antimykotiky a uvedenou výslednou koncentrací lipopolysacharidu v  $\mu$ g/ml).

\*\*\*: versus K ( $p < 0,001$ ); +++: versus LPS 0,1 ( $p < 0,001$ ); oo: versus LPS 1 ( $p < 0,01$ )

Graf č. 2

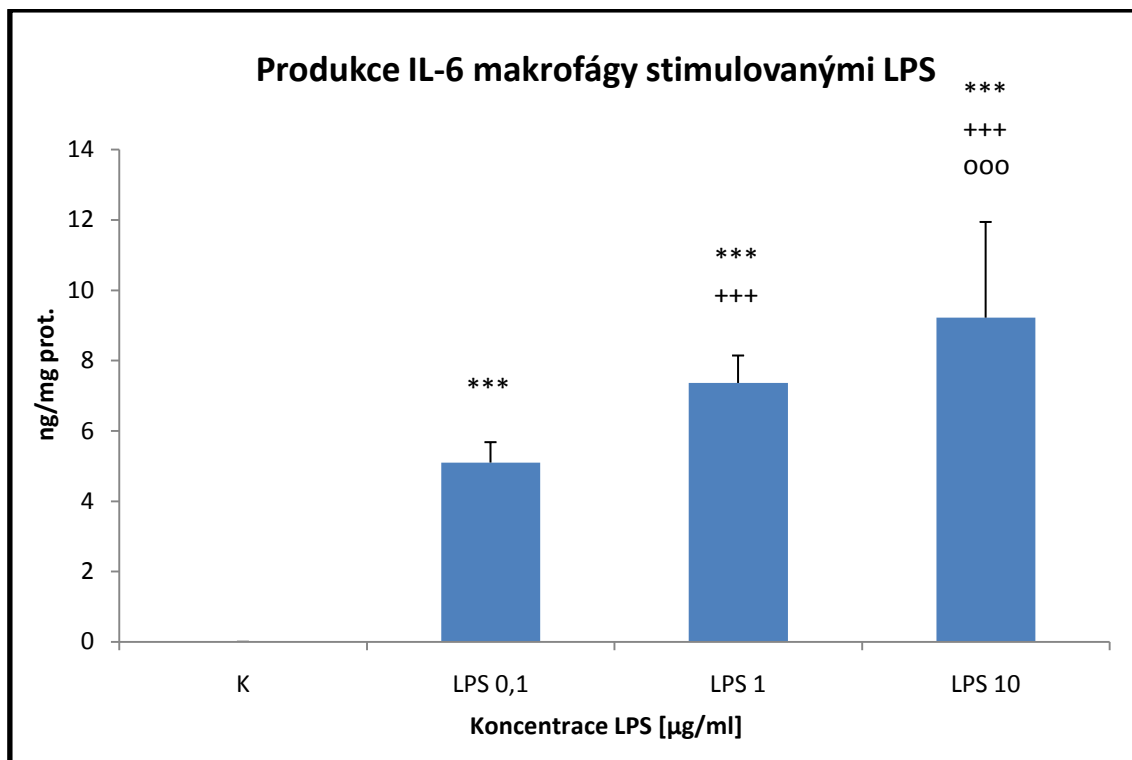


Použité zkratky a značky:

K: kontrolní skupina - makrofágy izolovány z intaktního zvířete a kultivovány 24 hod. (kompletní DMEM médium s ATB, antimykotiky); LPS 0,1; 1; 10 - makrofágy izolovány z intaktního zvířete a kultivovány 24 hod. s LPS (kompletní DMEM médium s ATB, antimykotiky a uvedenou výslednou koncentrací lipopolysacharidu v  $\mu\text{g/ml}$ ).

\*\*\*: versus K ( $p < 0,001$ ); ++: versus LPS 0,1 ( $p < 0,01$ ); ooo: versus LPS 1 ( $p < 0,001$ )

Graf č. 3



Použité zkratky a značky:

K: kontrolní skupina - makrofágy izolovány z intaktního zvířete a kultivovány 24 hod. (kompletní DMEM médium s ATB, antimykotiky); LPS 0,1; 1; 10 - makrofágy izolovány z intaktního zvířete a kultivovány 24 hod. s LPS (kompletní DMEM médium s ATB, antimykotiky a uvedenou výslednou koncentrací lipopolysacharidu v  $\mu\text{g/ml}$ ).

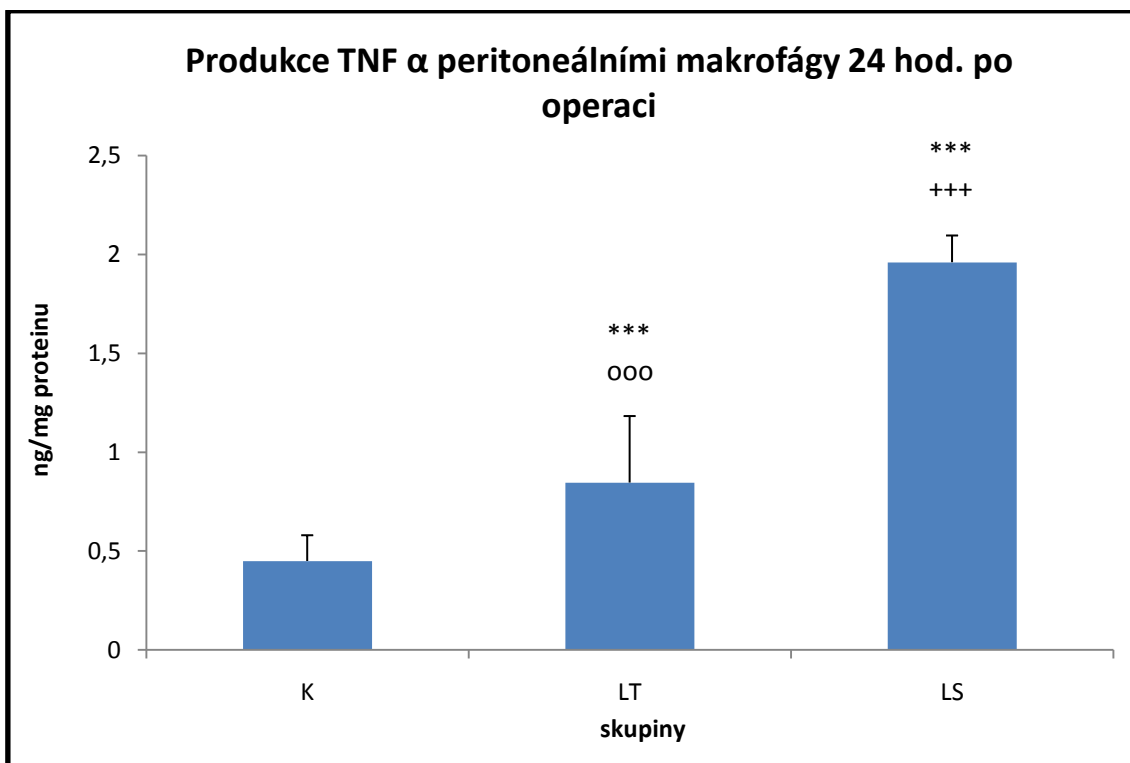
\*\*\*: versus K ( $p < 0,001$ ); +++: versus LPS 0,1 ( $p < 0,001$ ); ooo: versus LPS 1 ( $p < 0,001$ )

Signifikantní nárůst hladin všech tří stanovovaných cytokinů jsme registrovali již u nejnižší námi použité koncentrace LPS 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . Koncentrace 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS tedy splňuje námi stanovený cíl - stimulace izolovaných peritoneálních makrofágů se signifikantním zvýšením produkce cytokinů  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6.

#### **4.2. Bazální produkce cytokinů 24 hodin po operaci**

Grafy vyjadřují bazální produkci cytokinů v závislosti na způsobu operačního přístupu. Makrofágy byly izolovány 24 hodin po operaci a poté 24 hodin kultivovány, jak je uvedeno v metodickém postupu.

Graf č. 4



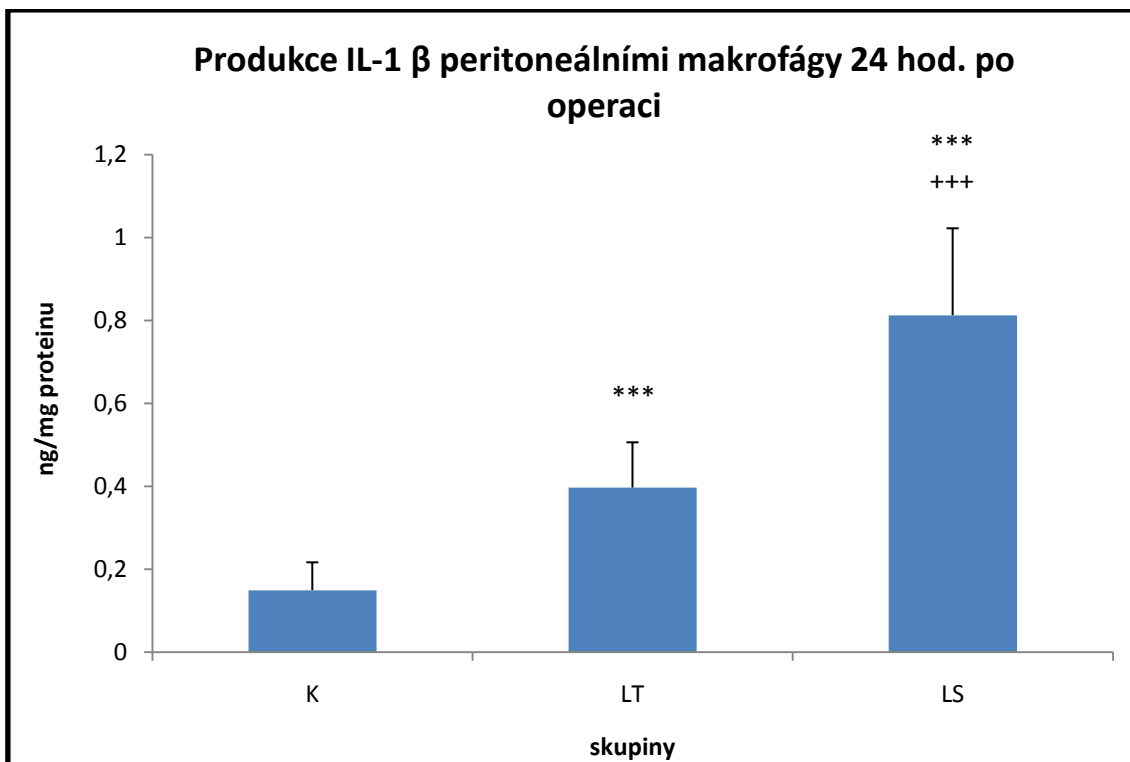
Použité zkratky a značky:

K: kontrolní skupina (pouze s éterovou anestezií); LT: laparotomický přístup; LS: laparoskopický přístup.

\*\*\*: versus K ( $p < 0,001$ ); +++: versus LT ( $p < 0,001$ );ooo: versus LS ( $p < 0,001$ )

Produkcce TNF $\alpha$  peritoneálními makrofágy izolovanými 24 hodin po operaci byla nejvyšší ve skupině, která podstoupila laparoskopický zákrok, a to oproti kontrole ( $p < 0,001$ ) i laparotomované skupině ( $p < 0,001$ ). Produkce tohoto cytokinu v porovnání s kontrolou signifikantně vzrostla rovněž po laparotomii ( $p < 0,001$ ).

Graf č. 5



Použité zkratky a značky:

K: kontrolní skupina (pouze s éterovou anestezií); LT: laparotomický přístup; LS: laparoskopický přístup.

\*\*\*: versus K ( $p < 0,001$ ); +++: versus LT ( $p < 0,001$ )

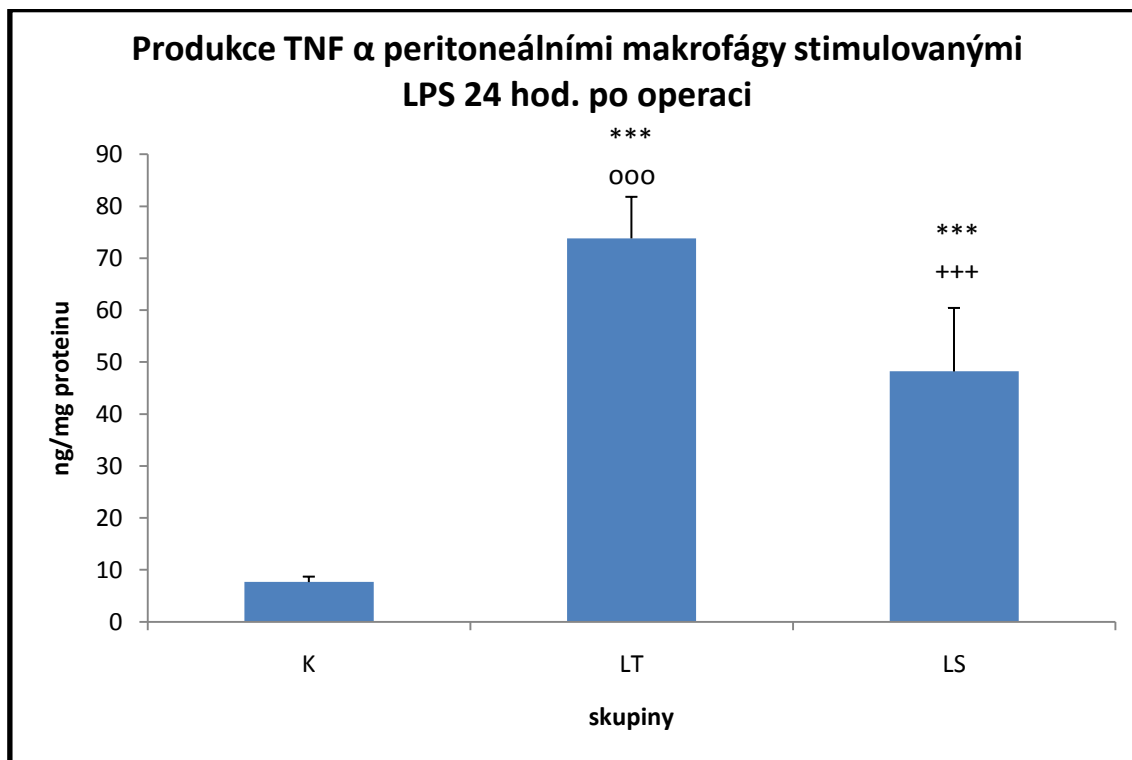
Produkce IL-1 $\beta$  peritoneálními makrofágy izolovanými 24 hodin po zákroku byla signifikantně nejvyšší u laparoskopicky operované skupiny, a to jak oproti kontrole ( $p < 0,001$ ), tak oproti laparotomickému přístupu ( $p < 0,001$ ). Zvýšení produkce IL-1 $\beta$  vykazovala oproti kontrole i laparotomovaná skupina ( $p < 0,001$ ).

Produkce IL-6 peritoneálními makrofágy izolovanými 24 hodin po operaci byla ve všech případech pod mezí detekce.

#### 4.3. Stimulovaná produkce cytokinů 24 hodin po operaci.

Grafy vyjadřují produkci cytokinů po stimulaci LPS v závislosti na způsobu operačního přístupu. Makrofágy byly izolovány 24 hodin po operaci a poté 24 hodin kultivovány s LPS o koncentraci 0,1 µg/ml.

Graf č. 6



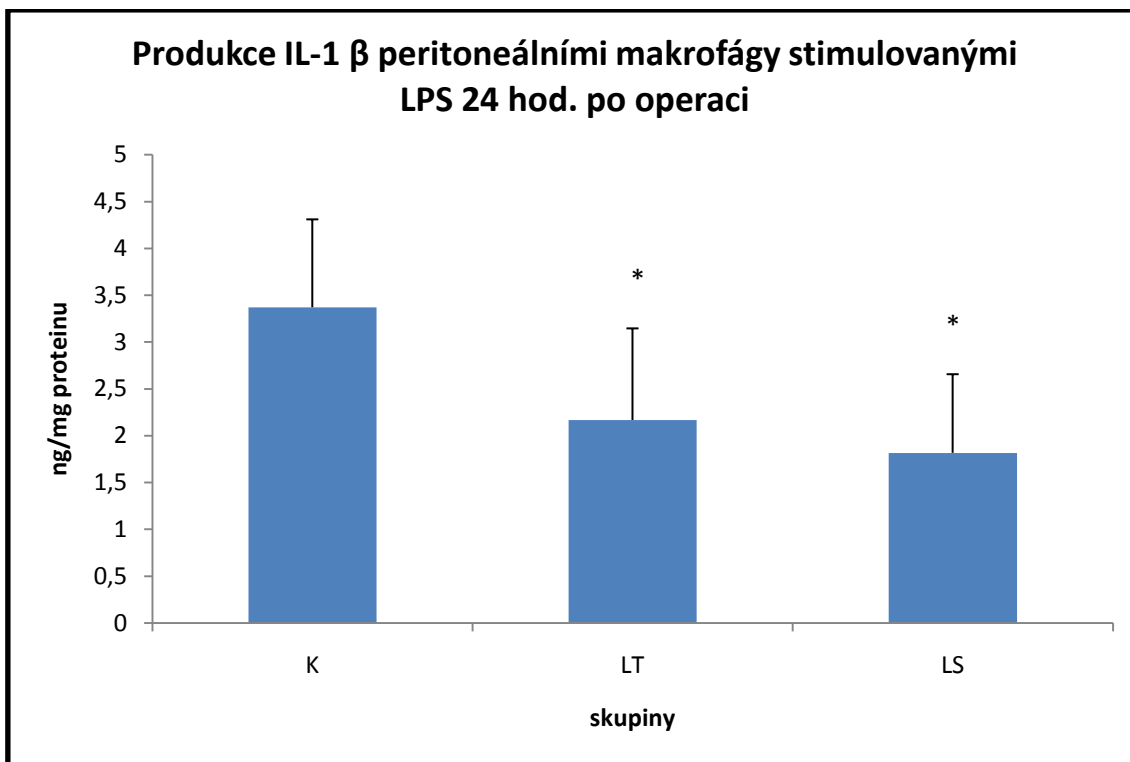
Použité zkratky a značky:

K: kontrolní skupina (pouze s éterovou anestezií); LT: laparotomický přístup; LS: laparoskopický přístup.

\*\*\*: versus K ( $p < 0,001$ ); +++: versus LT ( $p < 0,001$ ); ooo: versus LS ( $p < 0,001$ )

Produkcce TNF $\alpha$  stimulovanými makrofágy izolovanými 24 hodin po zákroku byla signifikantně vyšší u skupiny zvířat, která byla podrobena laparotomickému přístupu, a to v porovnání jak se stimulovanou kontrolou ( $p < 0,001$ ), tak s laparoskopicky provedeným zákrokem ( $p < 0,001$ ). Skupina, jež podstoupila laparoskopický zákrok, vykazovala v porovnání s uvedenou kontrolou ( $p < 0,001$ ) rovněž zvýšenou produkci TNF $\alpha$ .

Graf č. 7



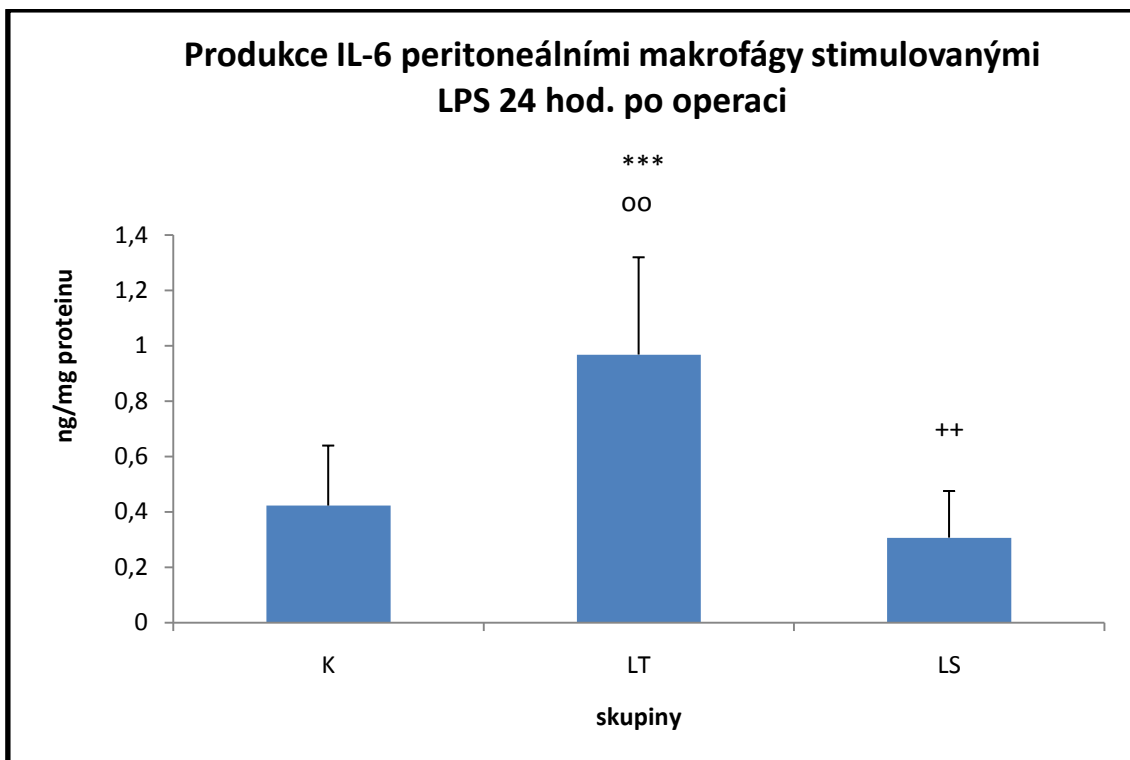
Použité zkratky a značky:

K: kontrolní skupina (pouze s éterovou anestezií); LT: laparotomický přístup; LS: laparoskopický přístup.

\*: versus K ( $p < 0,05$ )

Produkce IL-1 $\beta$  stimulovanými peritoneálními makrofágy izolovanými 24 hodin po zákroku oproti stimulované kontrole byla u obou typů operací snížena ( $p < 0,05$ ) a mezi laparoskopickým a laparotomickým přístupem jsme nezaznamenali signifikantní rozdíl.

Graf č. 8



Použité zkratky a značky:

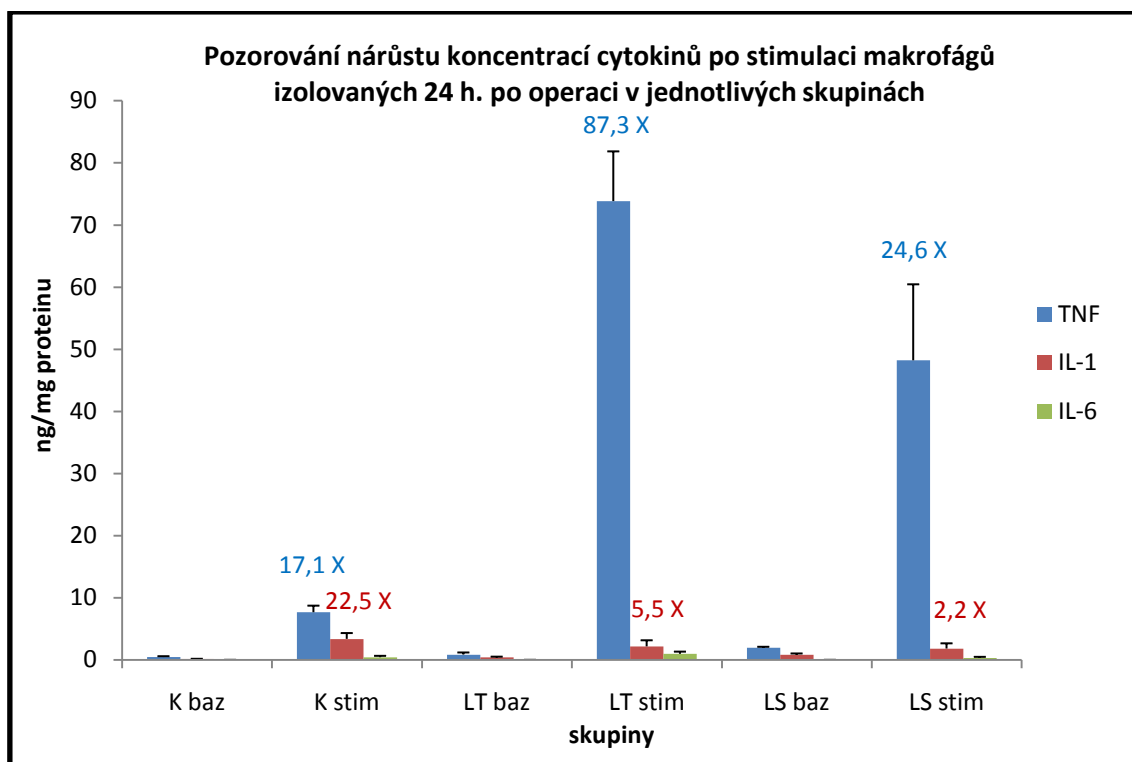
K: kontrolní skupina (pouze s éterovou anestézií); LT: laparotomický přístup; LS: laparoskopický přístup.

\*\*\*: versus K ( $p < 0,001$ ); ++: versus LT ( $p < 0,01$ ); oo: versus LS ( $p < 0,01$ )

Nejvyšší produkce IL-6 stimulovanými peritoneálními makrofágy izolovanými 24 hodin po zákroku byla zaznamenána u laparotomické skupiny, a to jak oproti stimulované kontrole ( $p < 0,001$ ), tak oproti laparoskopii ( $p < 0,01$ ). Ačkoliv se hladina IL-6 zdá po laparoskopii oproti stimulované kontrole dokonce lehce snížena, signifikantní rozdíl nebyl zjištěn.



Graf č. 9

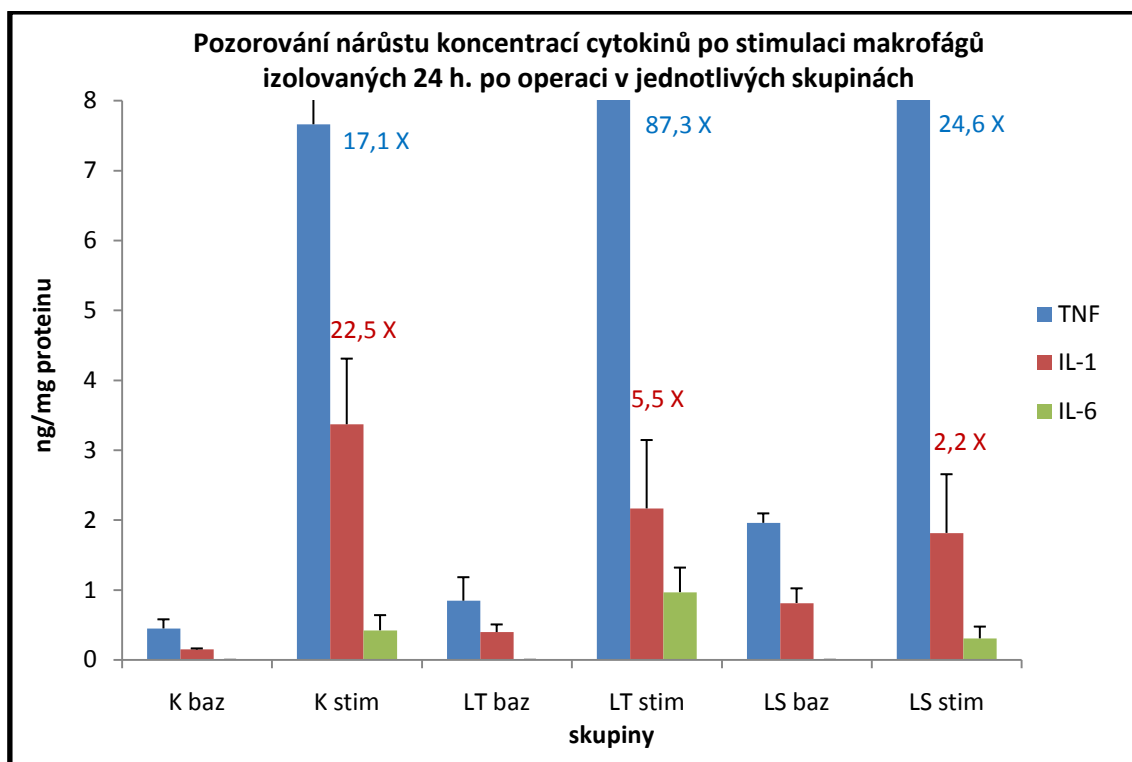


Použité zkratky a značky:

K baz: kontrola (pouze s éterovou anestezií), bazální; K stim: kontrola (pouze s éterovou anestezií), stimulovaná LPS; LT baz: laparotomický přístup, bazální; LT stim: laparotomický přístup, stimulováno LPS; LS baz: laparoskopický přístup, bazální; LS stim: laparoskopický přístup, stimulováno LPS

Jelikož graf č. 9 má díky vysokým hodnotám TNF $\alpha$  produkovaným stimulovanými makrofágy nízkou výpovědní hodnotu o ostatních cytokinech, byla snížena horní hodnota y-ové osy tak, aby se dosáhlo detailnějšího náhledu. Znázorněno v grafu č. 10.

Graf č. 10



Použité zkratky a značky:

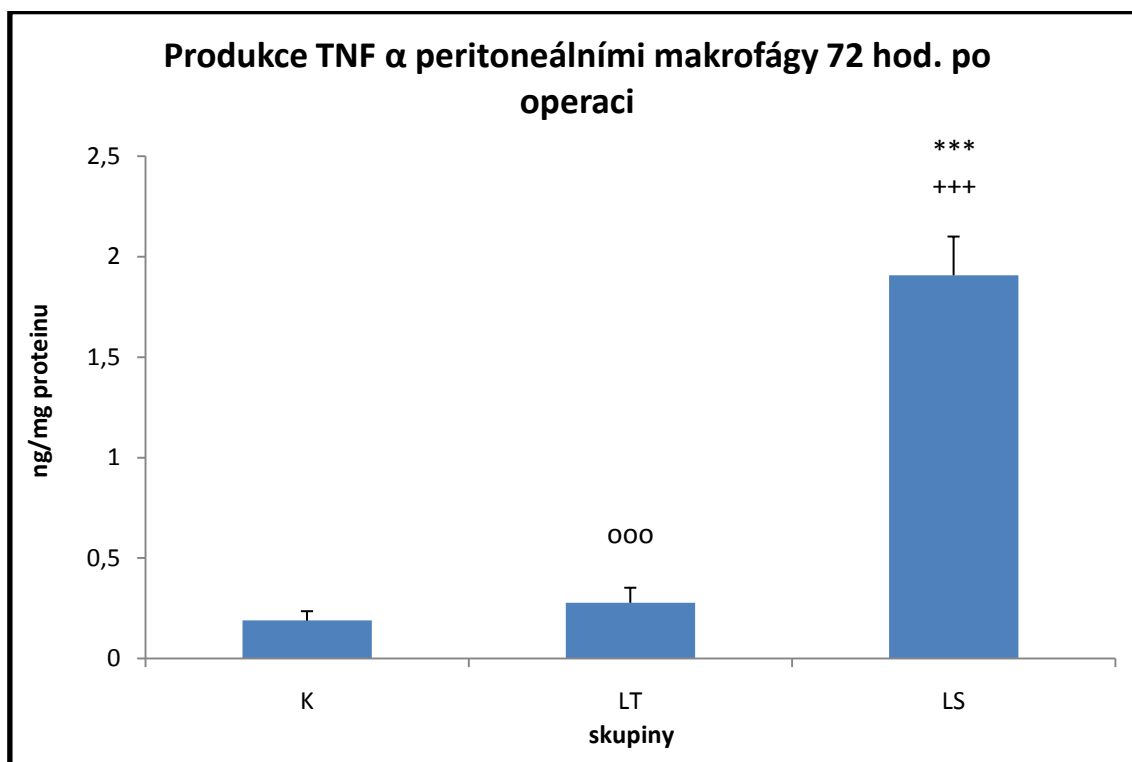
K baz: kontrola (pouze s éterovou anestézií), bazální; K stim: kontrola (pouze s éterovou anestézií), stimulovaná LPS; LT baz: laparotomický přístup, bazální; LT stim: laparotomický přístup, stimulováno LPS; LS baz: laparoskopický přístup, bazální; LS stim: laparoskopický přístup, stimulováno LPS

Z grafů č. 9 a 10 vyplývá, že na stimulaci lipopolysacharidem reagovaly peritoneální makrofágy odebírané po operacích nejvíce produkcí TNF $\alpha$ , jehož koncentrace se zvedla řádově až cca devadesátkrát (v laparotomické skupině). Kontrolní skupina na stimulaci nejvíce reagovala nárůstem produkce IL-1 $\beta$ , kdy jeho hladina vzrostla přibližně dvacetkrát. Vliv stimulace na produkci IL-6 je nepopíratelný, ovšem vzhledem k tomu, že bazální hodnoty byly nedetekovatelné, přesnější míru vlivu lipopolysacharidu na tvorbu IL-6 není možné odhadnout.

#### 4.4. Bazální produkce cytokinů 72 hodin po operaci.

Grafy vyjadřují bazální produkci cytokinů v závislosti na způsobu operačního přístupu. Makrofágy byly izolovány 72 hodin po operaci a poté 24 hodin kultivovány jak je uvedeno v metodickém postupu.

Graf č. 11



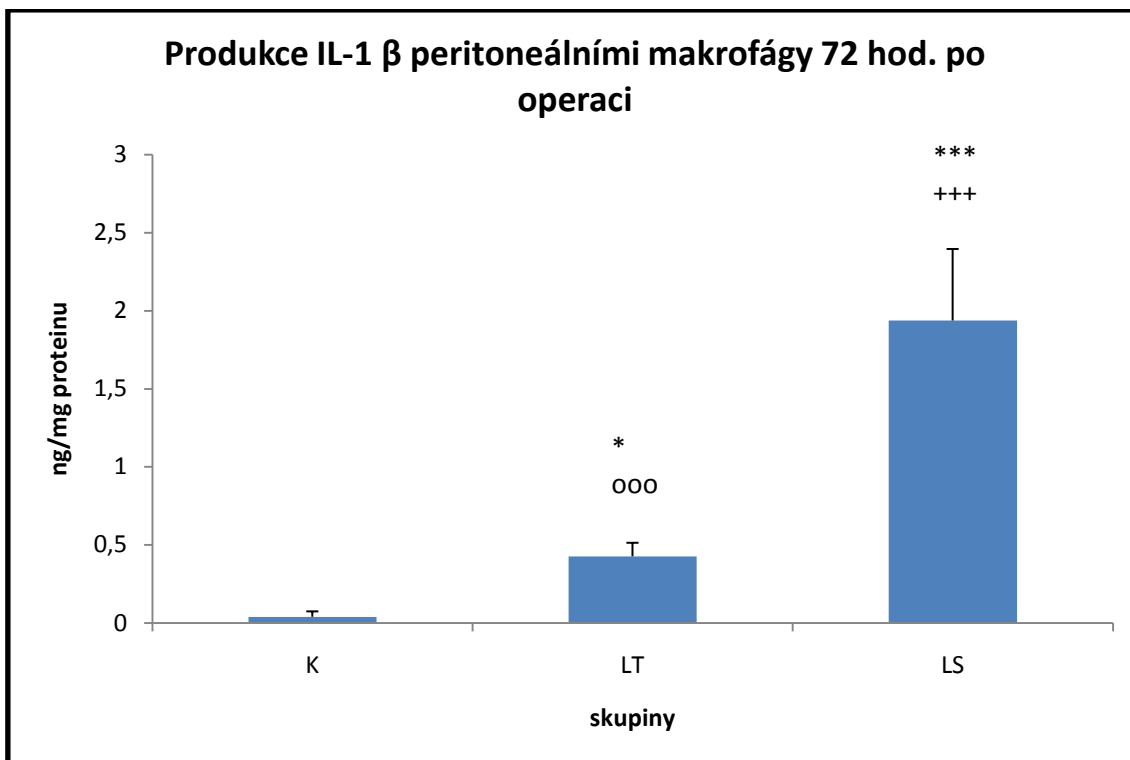
Použité zkratky a značky:

K: kontrolní skupina (pouze s éterovou anestezií); LT: laparotomický přístup; LS: laparoskopický přístup.

\*\*\*: versus K ( $p < 0,001$ ); +++: versus LT ( $p < 0,001$ ); ooo: versus LS ( $p < 0,001$ )

Produkcce TNF $\alpha$  peritoneálními makrofágy izolovanými 72 hodin po operaci byla nejvyšší u zvířat, které podstoupily laparoskopické podvázání céka, a to jak oproti kontrolám ( $p < 0,001$ ), tak oproti laparotomickému přístupu ( $p < 0,001$ ). Mezi produkcí TNF $\alpha$  u laparotomovaných zvířat a kontrolní skupinou jsme nenalezli signifikantní rozdíl.

Graf č. 12



Použité zkratky a značky:

K: kontrolní skupina (pouze s éterovou anestézií); LT: laparotomický přístup; LS: laparoskopický přístup.

\*\*\*: versus K ( $p < 0,001$ ); \*: versus K ( $p < 0,05$ ); +++: versus LT ( $p < 0,001$ ); ooo: versus LS ( $p < 0,001$ )

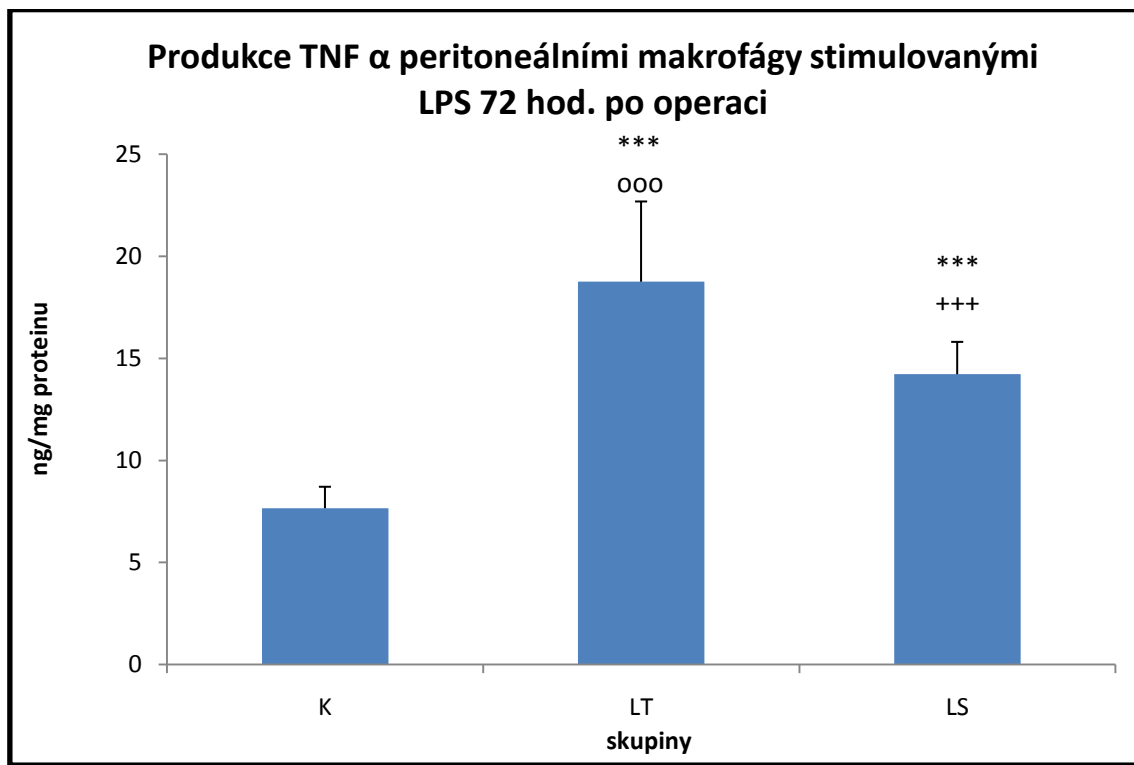
Produkce IL-1 $\beta$  peritoneálními makrofágy izolovanými 72 hodin po operaci byla nejvyšší u zvířat, které podstoupily laparoskopický zákrok, a to jak oproti kontrolám ( $p < 0,001$ ), tak oproti laparotomickému přístupu ( $p < 0,001$ ). Zvýšená sekrece IL-1 $\beta$  oproti kontrole ( $p < 0,05$ ) byla zaznamenána i u laparotomického přístupu.

Produkce IL-6 peritoneálními makrofágy izolovanými 72 hodin po zákroku byla ve všech případech pod mezí detekce.

#### 4.5. Stimulovaná produkce cytokinů 72 hodin po operaci.

Grafy vyjadřují produkci cytokinů po stimulaci LPS v závislosti na způsobu operačního přístupu. Makrofágy byly izolovány 72 hodin po operaci a poté 24 hodin kultivovány s LPS o koncentraci 0,1 µg/ml.

Graf č. 13



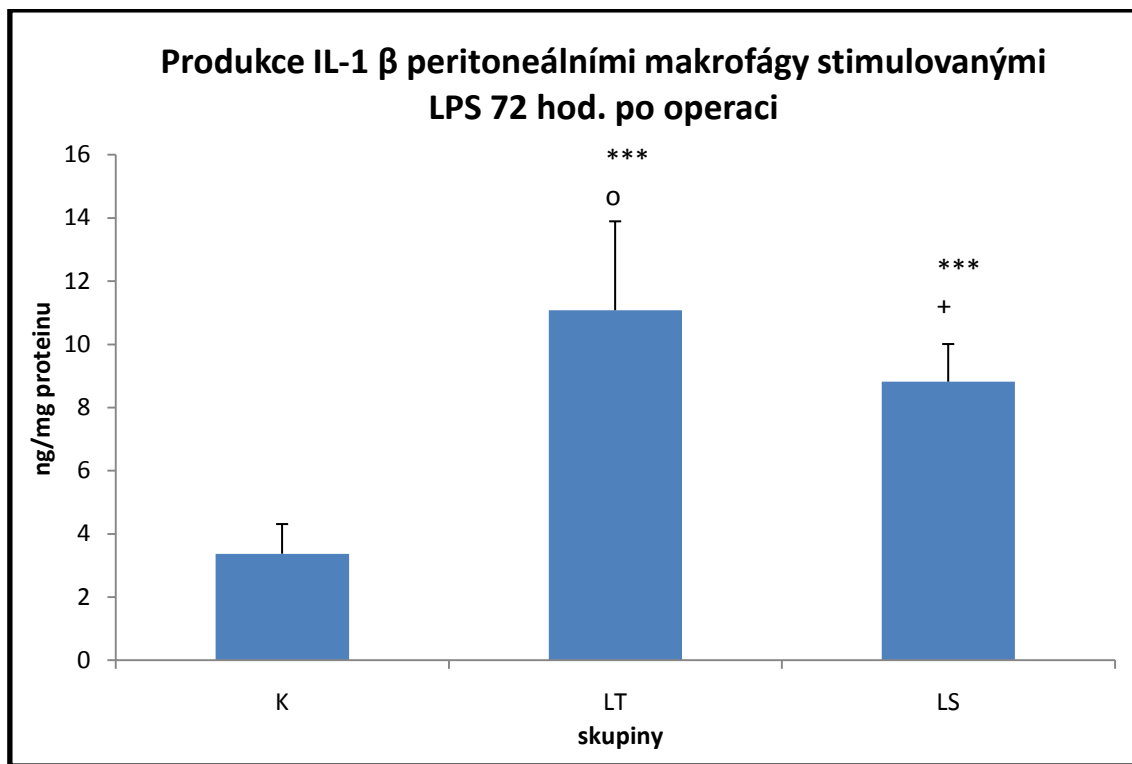
Použité zkratky a značky:

K: kontrolní skupina (pouze s éterovou anestezií); LT: laparotomický přístup; LS: laparoskopický přístup.

\*\*\*: versus K ( $p < 0,001$ ); +++: versus LT ( $p < 0,001$ ); ooo: versus LS ( $p < 0,001$ )

Produkce TNF $\alpha$  stimulovanými peritoneálními makrofágy izolovanými 72 hodin po operaci po laparoskopii i laparotomii oproti stimulované kontrole signifikantně vzrostla ( $p < 0,001$ ). Makrofágy laparotomované skupiny vykazovaly signifikantně vyšší produkci TNF $\alpha$  než po laparoskopii ( $p < 0,001$ ).

Graf č. 14



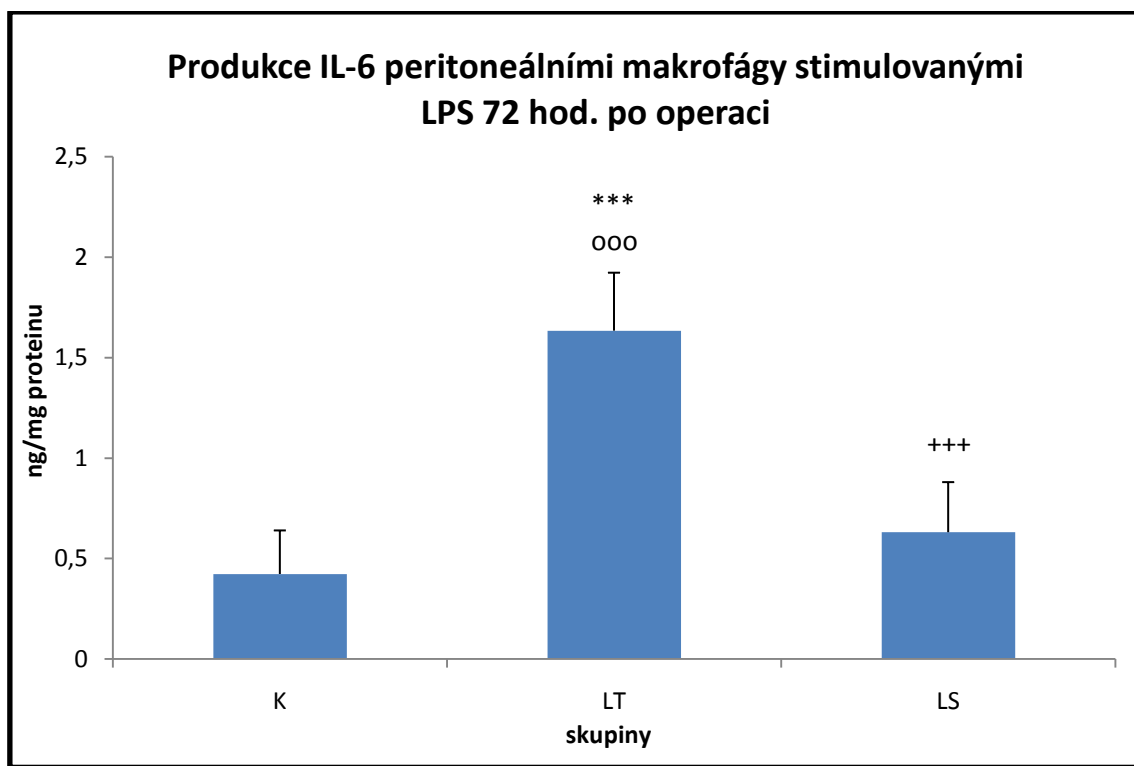
Použité zkratky a značky:

K: kontrolní skupina (pouze s éterovou anestezií); LT: laparotomický přístup; LS: laparoskopický přístup.

\*\*\*: versus K ( $p < 0,001$ ); +: versus LT ( $p < 0,05$ ); o: versus LS ( $p < 0,05$ )

Produkce IL-1 $\beta$  stimulovanými peritoneálními makrofágy izolovanými 72 hodin po operaci po laparoskopii i laparotomii oproti stimulované kontrole signifikantně vzrostla ( $p < 0,001$ ). Makrofágy laparotomované skupiny vykazovaly signifikantně vyšší produkci IL-1 $\beta$  než po laparoskopii ( $p < 0,05$ ).

Graf č. 15



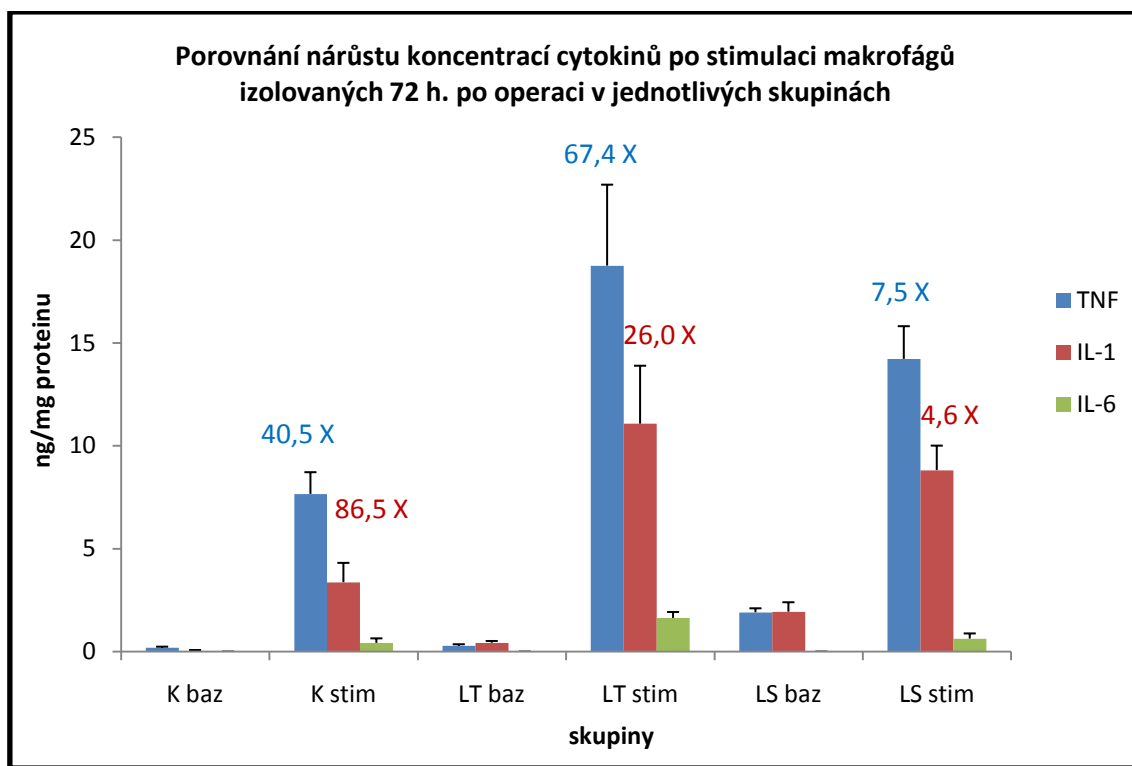
Použité zkratky a značky:

K: kontrolní skupina (pouze s éterovou anestezií); LT: laparotomický přístup; LS: laparoskopický přístup.

\*\*\*: versus K ( $p < 0,001$ ); +++: versus LT ( $p < 0,001$ ); ooo: versus LS ( $p < 0,001$ )

Produkcce IL-6 stimulovanými peritoneálními makrofágy izolovanými 72 hodin po operaci byla signifikantně nejvyšší ve skupině podrobené laparotomii (oproti stimulované kontrole i laparoskopii:  $p < 0,001$ ). Mezi laparoskopickým zákrokem a stimulovanou kontrolou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl.

Graf č. 16



Použité zkratky a značky:

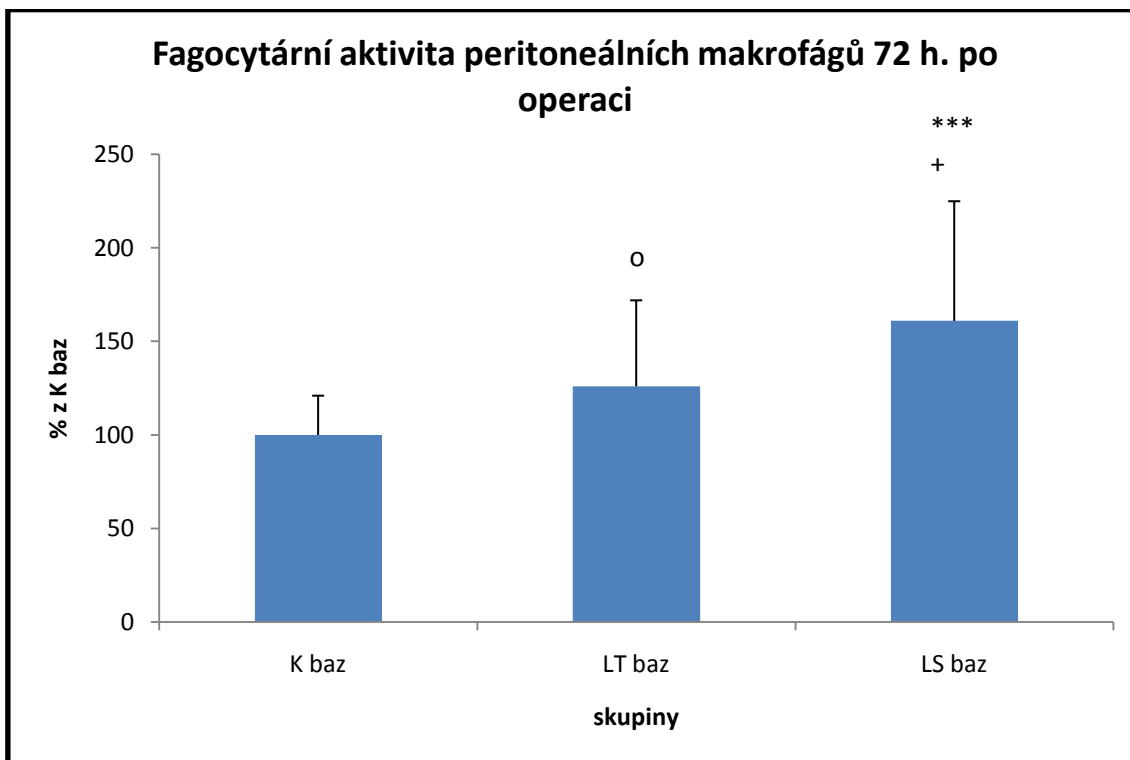
K baz: kontrola (pouze s éterovou anestezií), bazální; K stim: kontrola (pouze s éterovou anestezií), stimulovaná LPS; LT baz: laparotomický přístup, bazální; LT stim: laparotomický přístup, stimulováno LPS; LS baz: laparoskopický přístup, bazální; LS stim: laparoskopický přístup, stimulováno LPS

Z grafu č. 16 vyplývá, že na stimulaci lipopolysacharidem reagovaly kontrolní peritoneální makrofágy nejvíce produkcí IL-1 $\beta$ . Jeho koncentrace se zvedala řádově cca devadesátkrát. V makrofázích izolovaných 72 hodin po obou operacích stoupala po stimulaci nejvíce produkce TNF $\alpha$ . Vliv stimulace na produkci IL-6 je opět nepopiratelný, ovšem vzhledem k tomu, že bazální hodnoty byly znovu nedetekovatelné, přesnější míru vlivu lipopolysacharidu na tvorbu IL-6 není možné odhadnout.



#### 4.6. Bazální fagocytární aktivita peritoneálních makrofágů 72 hodin po operaci

Graf č. 17



Použité zkratky a značky:

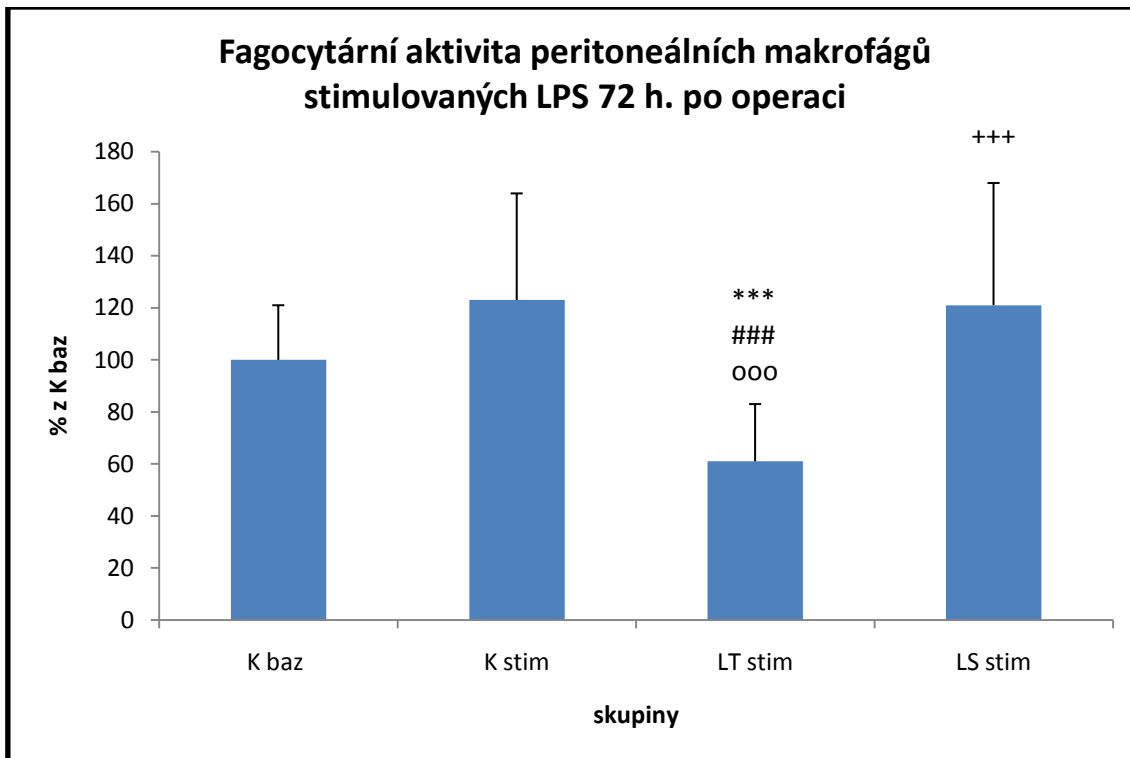
K baz: kontrolní skupina (pouze s éterovou anestezií); LT baz: laparotomický přístup; LS baz: laparoskopický přístup.

\*\*\*: versus K ( $p < 0,001$ ); +: versus LT ( $p < 0,05$ ); o: versus LS ( $p < 0,05$ )

Schopnost fagocytosy nestimulovaných peritoneálních makrofágů izolovaných 72 hodin po operaci byla u laparoskopované skupiny zvířat signifikantně vyšší, a to jak oproti kontrole ( $p < 0,001$ ), tak oproti makrofágům izolovaným z laparotomovaných potkanů ( $p < 0,05$ ). Mezi skupinou po laparotomii a kontrolou jsme ve schopnosti fagocytovat nezjistili signifikantní rozdíl.

#### 4.7. Fagocytární aktivita LPS stimulovaných peritoneálních makrofágů 72 hodin po operaci

Graf č. 18



Použité zkratky a značky:

K baz: kontrolní skupina (pouze s éterovou anestezií); K stim: kontrolní skupina (éterová anestezie) stimulovaná LPS; LT stim: laparotomický přístup + stimulace LPS; LS stim: laparoskopický přístup + stimulace LPS.

\*\*\*: versus K baz ( $p < 0,001$ ); ###: versus K stim ( $p < 0,001$ ); +++: versus LT stim ( $p < 0,001$ ); ooo: versus LS stim ( $p < 0,001$ )

Signifikantně nižší fagocytární aktivitu LPS stimulovaných peritoneálních makrofágů izolovaných 72 hodin po operaci jsme pozorovali u laparotomovaných potkanů jak oproti nestimulované kontrole, stimulované kontrole i laparoskopii (vše:  $p < 0,001$ ). Mezi bazální kontrolou, stimulovanou kontrolou a laparoskopií jsme nezjistili signifikantní rozdíl.

## 5. DISKUSE

Laparoskopie je ve vztahu k systémové imunitní odpovědi považována za výhodnější než otevřené zákroky. Vyvolává mírnější zánětlivou odpověď a tím na rozdíl od laparotomie nezpůsobuje sekundární imunosupresi organismu (86). Rovněž byl prokázán její pozitivní vliv na zachování buněčně zprostředkované imunitní reakce, která je u otevřených výkonů inhibována (29; 30; 31). Některé klinické výzkumy ovšem její výhodnější dopad na systémovou odezvu potvrdit nemohou (25; 24). Jedná se především o studie na pacientech s kolorektálními karcinomy. Na tyto rozdílné výsledky mohla mít vliv především nehomogenost testovaných skupin v klinické studii. Imunitní reakce mohla být ovlivněna již primárním onemocněním a na výsledcích se mohl podepsat vedle velikosti a agresivity daných tumorů například i počet prodělaných krevních transfuzí či v neposlední řadě samozřejmě jednotlivé postupy inkriminovaných chirurgických zákroků. Trvání operace, délka řezu u otevřených operací i tlak či teplota a vlhkost plynu při laparoskopii se u každého jedince více či méně liší a všechny tyto aspekty mohly způsobit nesourodost výsledků (26). Ačkoliv je systémová imunitní odpověď po laparoskopii stále předmětem výzkumů a zdaleka nejsou objasněny všechny zákonitosti, je již oproti lokální reakci poměrně dobře zdokumentovaná.

Studii, jež se zabývaly lokální imunitní odpovědí, nebylo zatím mnoho a jejich výsledky si nezdá se i odporují. Ze všech dosavadních poznatků lze o významu dosažených znalostí pouze spekulovat a je jisté, že k pochopení imunitních dějů a dopadů je třeba podrobnějšího průzkumu. Výsledky těchto studií pocházejí převážně z experimentálních prací na zvířeti a soustřeďují se především na prvních 24 hodin po výkonu. Makrofágy hrají významnou roli v lokální imunitní odpovědi mechanismem fagocytosy, prezentací antigenu a produkují řadu cytokinů a metabolitů. V experimentech jsou velmi často z abdominální dutiny izolovány ke stanovení aktivity. Peritoneální imunitní odpověď, potažmo aktivitu peritoneálních makrofágů, které se na peritoneální imunitní odpovědi podílejí nejvíce, lze hodnotit podle řady kritérií. Nejčastěji stanovované metabolity či povrchové znaky makrofágů jsou jen kusou informací, která sice poskytuje určitý obraz o probíhajících dějích, ovšem bez znalosti celého kontextu nelze vyvozovat jasnější závěry. Některé studie se zabývaly hodnocením fagocytosy podle metabolitů při ní vznikajících, jiné určovaly tento proces podle samotné schopnosti buněk pohlcovat infekční materiál. Už v tomto přístupu vznikají rozpory v interpretaci, jelikož schopnost a účinnost tak komplexního děje, jakým je fagocytosa, se nedá s jistotou podle tak částečných informací určit. Důležitým dějem je rovněž účinná

prezentace antigenu, proto se řada výzkumů zaměřila na měření exprese MHC gp. II. třídy na makrofázích a ani zde nedospěli k jednotným výsledkům. Zatímco studie na potkanech našla pokles exprese MHC gp. II. třídy na makrofázích izolovaných po laparotomii, po laparoskopii se jejich exprese vůči kontrole nezměnila (44), jiný výzkum na prasatech dokumentoval vyšší expresi MHC gp. II. třídy na makrofázích z laparotomované skupiny (43).

Již zmiňovanou možností hodnocení aktivity makrofágů je i produkce cytokinů. Makrofágy tvoří celou škálu cytokinů s rozmanitými účinky. Tvorba daného cytokinu je mimo jiné závislá na fázi zánětu a jejich účinky poté modulují jeho průběh. V časně fázi lze pozorovat vzestup produkce především prozánětlivých cytokinů a z tohoto důvodu jsme se v naší studii zaměřili na jejich stanovení. Zvolili jsme 3 nejčastěji hodnocené cytokiny TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6. Na rozdíl od hodnocení produkce TNF $\alpha$  peritoneálními makrofágy se produkcí IL-1 $\beta$  a IL-6 doposud studie zabývaly podstatně méně. Samozřejmě tyto výsledky mohou poskytovat pouze částečné zhodnocení aktivity makrofágů a k ucelenějšímu názoru by bylo třeba stanovit i jiné cytokiny. Jedním z důležitých cytokinů je například IL-12, který se významně podílí na přeměně T<sub>H</sub> lymfocytů na subset T<sub>H</sub>1 a jeho prostřednictvím poté na přeměně makrofágů na aktivovanou formu schopnou tvořit NO. Makrofágy produkují samozřejmě celou paletu dalších cytokinů, jejichž účinky jsou v kontextu celé zánětlivé odpovědi provázané a tedy neméně důležité. Prvotní nástin situace a míry imunitní odezvy námi stanovované prozánětlivé cytokiny ovšem reflektují.

Produkce zmiňovaných prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6 byla porovnávána v podmínkách co nejvíce se přibližujících klinické praxi. V experimentech na potkanech byl prováděn operační zákrok (ligace céka) s laparotomickým nebo laparoskopickým přístupem. 24, resp. 72 hodin po výkonu byly izolovány makrofágy z peritoneální oblasti a následně 24 hodiny kultivovány. V médiu byly stanovovány koncentrace produkovaných cytokinů. K lepší možnosti interpretace změn produkce cytokinů byla hodnocena i fagocytární aktivita. Z technických důvodů byla prozatím provedena pouze v intervalu 72 hodin po operaci. Ve shodě s literárními údaji jsme potvrdili, že k lepšímu zhodnocení schopnosti imunitní odpovědi makrofágů na aktuální podnět je třeba produkci cytokinů určovat nejen za bazálních podmínek, ale také po stimulaci makrofágů (velmi často se používá lipopolysacharid - LPS). V případě našeho hodnocení bazální produkce cytokinů makrofágy izolovanými z peritoneální dutiny - skupiny podrobené operačnímu výkonu reagují zvýšenou produkcí TNF $\alpha$  a IL-1 $\beta$ . Hladiny IL-6 nebyly detekovatelné. Signifikantně

výraznější bylo zvýšení produkce po laparoskopickém zákroku. Obdobné nálezy byly zjištěny za 24 i 72 hodiny po operaci. Po stimulaci makrofágů izolovaných z peritonea je patrné, že laparoskopický přístup je provázen mírnějším vzestupem produkce prozánětlivých cytokinů v obou sledovaných intervalech.

Co se týče produkce TNF $\alpha$ , trend byl ve skupině makrofágů izolovaných 24 i 72 hodin po operaci stejný. Zjistili jsme, že skupina podrobená laparoskopii vykazovala signifikantně vyšší nárůst bazální hladiny TNF $\alpha$  než laparotomovaní potkani i kontrolní skupina. Pokud jsme ovšem makrofágy stimulovali LPS, signifikantně nejvyšší produkci TNF $\alpha$  jsme zaznamenali u otevřených operací. Několik studií hodnotilo produkci TNF $\alpha$  před a po stimulaci LPS a bylo zjištěno, že produkce TNF $\alpha$  se vyvíjí v závislosti na délce intervalu od provedeného zákroku. 1 hodinu po výkonu byla jeho tvorba signifikantně zvýšená u laparotomického přístupu, po stimulaci LPS došlo ke zvýšení produkce u skupiny s laparoskopií (47). V dalších intervalech - 4, 12 a 24 hod. po výkonu byla produkce TNF $\alpha$  stimulovanými makrofágy u laparoskopie nižší ve srovnání s laparotomickým přístupem (44; 48). K analogickým výsledkům jsme tedy dospěli rovněž my a naše studie naznačuje, že rovněž po 72 hodinách od operačního výkonu je produkce TNF $\alpha$  u laparoskopované skupiny ve srovnání s laparotomovanou nižší.

24 hodin po operaci jsme pozorovali signifikantní zvýšení bazální produkce IL-1 $\beta$ , laparoskopie byla provázena výraznějším vzestupem. Pokud však došlo ke stimulaci makrofágů, po obou operačních výkonech produkce IL-1 $\beta$  klesla pod úroveň stimulovaných kontrol. Obdobně jako v případě TNF $\alpha$  může být pokles produkce IL-1 $\beta$  makrofágy stimulovanými LPS dán do souvislosti s působením CO $_2$  při laparoskopii (42). Příčina poklesu produkce po laparotomii však není jasná. 72 hodin po operaci byl u nestimulovaných makrofágů pozorován vzestup produkce IL-1 $\beta$ , výrazněji po laparoskopii. Stimulací makrofágů došlo ke zvýšení produkce IL-1 $\beta$ , avšak po laparoskopii nebylo tak vysoké jako po laparotomii. Stimulace makrofágů 24 i 72 hod. po operaci vedla ke zvýšení produkce cytokinů, obdobně laparoskopie nebyla provázena tak prudkým vzestupem produkce. Souhrnně lze říci, že pokud byly makrofágy stimulovány, nárůst produkce cytokinů byl po laparoskopii mírnější než u laparotomované skupiny, ovšem zpravidla ne nižší než u kontrolní skupiny.

Lze také pozorovat časový vývoj produkce cytokinů. U bazální produkce dosahuje TNF $\alpha$  a IL-1 maxima již za 24 hod po operaci (výrazněji po laparoskopii) a po té je možné pozorovat mírný pokles. Po stimulaci makrofágů TNF $\alpha$  prudce narůstá za 24 hod. po operaci,

(výrazněji po laparotomii) a poté vykazuje pokles. IL-6 narůstá za 24 hod. pouze po laparotomii a drží se na zvýšené hladině. Po laparoskopii se produkce IL-6 stimulovanými makrofágy drží po celou dobu na úrovni kontrol. Produkce TNF $\alpha$  a IL-6 tedy dosahují maxima již během 24 hod. Obdobně je tomu u bazální produkce IL-1, po stimulaci makrofágů dochází k nárůstu produkce až za 72 hod. po operaci.

Zajímavé může být i zhodnocení míry stimulace jednotlivých cytokinů použitím LPS v koncentraci 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . Na stimulaci LPS reagovaly makrofágy kontrolních skupin (bez ohledu na absolutní hladiny) nejvíce produkcí IL-1 $\beta$ , jehož koncentrace stoupla ve 24 hodinovém intervalu cca 23x a v 72 hodinovém přibližně 87x. Po operacích stimulací makrofágů naopak nejprudčeji narůstá produkce TNF $\alpha$  24 i 72 hod. po operaci. Produkce IL-6 rovněž prokazatelně stoupla, ovšem z důvodu nedetekovatelných bazálních hladin nebylo možno určit, kolikrát jeho koncentrace vzrostly. Tento náleznaznačuje, že při chirurgickém zákroku makrofágy na stimulaci noxou reagují nejen navýšením produkce všech cytokinů, ale oproti organismu, do kterého operativně zasahováno nebylo, je změněn i poměr, v jakém se cytokiny tvoří.

Vysoká produkce prozánětlivých cytokinů může vyjadřovat vyšší intenzitu zánětlivé reakce vedoucí i k poškození organismu. Uvažovali jsme proto, že vysoká produkce cytokinů po stimulaci LPS pozorovaná u laparotomie může být ve výsledku spojena s oslabením jiných efektorových funkcí makrofágů. Součástí naší studie bylo hodnocení fagocytosy a naše výsledky tuto domněnku podporují. Zjistili jsme, že zvýšení bazální produkce TNF $\alpha$  a IL-1 72 hod. po laparoskopii bylo provázeno zvýšeným pohlcováním partikulí jak oproti kontrole, tak oproti otevřenému zákroku. Stimulace produkce prozánětlivých cytokinů může facilitovat obranu proti infekčnímu agens. Bylo prokázáno, že zvýšená koncentrace TNF $\alpha$  byla spojena se zvýšenou úrovní fagocytární aktivity (87). Pokud byly makrofágy v naší studii stimulovány LPS, produkce cytokinů se výrazně zvýšila u otevřeného zákroku a schopnost fagocytosy signifikantně klesla. U laparoskopického zákroku nedošlo k tak výraznému zvýšení produkce cytokinů a úroveň fagocytosy byla zachována bez poklesu. Tyto výsledky nás vedou ke spekulaci, že míra produkce prozánětlivých cytokinů makrofágy by mohla souviset s intenzitou fagocytosy. Pokud by tak došlo k příliš vysoké produkci těchto cytokinů, mohlo by to vést i k útlumu fagocytosy.

Hodnocením aktivity peritoneálních makrofágů podle fagocytosy se mnoho studií rovněž prozatím nezaobíralo. Experimentální studie na prasatech hodnotila bakteriální clearance a dospěla ke stejnému závěru jako náš výzkum - že vyšší schopnost pohlcovat

infekční materiál mají oproti laparotomované skupině makrofágy izolované po laparoskopii (43). Během fagocytosy vzniká řada metabolických produktů. Některé studie zkoumaly produkci superoxidového radikálu  $O_2^-$  a došly k závěru, že u makrofágů izolovaných po laparoskopii byla jeho produkce oproti otevřeným zákrokům nižší (45). Superoxid je pouze přestupným metabolitem, z něž se nadále tvoří jiné účinné látky s mikrobicidní aktivitou, jako například peroxid vodíku. Jeho produkce stimulovanými makrofágy klesala pouze u skupiny po otevřeném zákroku (44). Ani  $H_2O_2$  ovšem v procesu likvidace pohlceného materiálu nemusí být konečným produktem. Souhrnně mají tyto kyslíkové sloučeniny právě pro svou vysokou reaktivitu mimo buňku velice krátké trvání, a proto nám jejich hladina sice může leccos naznačit, ovšem vyvozovat definitivní závěry nelze. Jiné tři studie se zabývaly analýzou oxidu dusnatého produkovaným peritoneálními makrofágy. První dvě došly k závěru, že nejvyšší nárůst produkce NO 24 hodin po operaci byl pozorován po laparotomii. Po laparoskopii byl zaznamenán oproti kontrolám buď jen lehký nárůst hladin NO (39), nebo nebyl zjištěn signifikantní rozdíl (40). Hladina NO přitom korelovala s koncentrací  $TNF\alpha$  produkovaného peritoneálními makrofágy (40). Třetí zkoumala vliv stimulace makrofágů izolovaných 24 hodin po zákroku na produkci NO. Zatímco bazální hodnoty byly vyšší u skupiny po laparoskopii, po stimulaci již nebyl pozorován tak velký vzestup produkce NO jako u laparotomovaných zvířat (41). Změny produkce  $TNF\alpha$  v literatuře (44) i v naší studii mají obdobný vývoj jako změny produkce NO z poslední zmiňované práce (38).  $TNF\alpha$  je nezbytný pro složitý proces aktivace makrofágů a s tím spojenou tvorbu NO (1), pro což by svědčily i výše popsané změny. Z literárních výsledků nelze jednoznačně konstatovat, jaký je vztah laparoskopie a schopnosti fagocytosy, ovšem negativní vliv laparoskopie na fagocytosu prokázán nebyl. Naše studie naopak naznačuje vyšší schopnost pohltnout infekční materiál po laparoskopii. Schopnost danou částici pohltnout ještě ovšem nemusí znamenat její účinnou likvidaci a naopak. Na adekvátní likvidaci pohlceného materiálu se podílí mimo jiné výše zmiňované produkty NADPH oxidasového komplexu a NO. Z předchozích výzkumů lze spekulovat, že fagocytární aktivita reprezentovaná produkty NADPH oxidasového komplexu se zdá být po laparoskopii zachovaná více než po otevřených zákrocích. U produktu NO synthasy, který je na rozdíl od výše uváděného schopen ničit i intracelulární bakterie a je důležitý i pro likvidaci nádorových buněk, se zdají mít větší produkci makrofágy po otevřeném zákroku. Ovšem ani zde schopnost produkce NO oproti kontrolám po laparoskopii výrazně neklesala. Baktericidní aktivita těchto na kyslíku závislých produktů je ovšem spojená s nevyhnutelným poškozením vlastních tkání a u přílišné aktivity iNOS bylo

prokázáno proaterogenní působení, kdy by její účinek v periferní krvi mohl mít vliv na rozvoj aterosklerosy (1). Proto vysoká produkce těchto látek do okolního prostředí není vhodná. Laparoskopie se i v tomto tedy zdá příhodnější, jelikož se jeví, že zachovává dostatečnou aktivitu částice pohlcovat, ničit je, jak produkty NADPH oxidasy, tak iNOS a přitom co nejméně poškozovat vlastní struktury.

Souhrnně se tedy dá ve srovnání s laparotomií o laparoskopii spekulovat jako pro peritoneální imunitní odpověď přínosnější metodě. Nižší hladiny cytokinů produkované lipopolysacharidem stimulovanými makrofágy by se daly chápat jako projev určité tolerance k patogenům, díky níž se předchází nadměrné aktivaci makrofágů. Imunitní odpověď reprezentovaná produkcí prozánětlivých cytokinů po laparoskopii zpravidla neklesala pod úroveň kontrol, proto se dá usuzovat, že makrofágy po laparoskopii jsou schopny adekvátní imunitní odpovědi bez nežádoucí přehnané aktivace zánětlivé reakce. Ta by mohla vést i k sekundární imunosupresi, která se může projevit útlumem jiných efektorových funkcí, například fagocytosy. Tuto hypotézu naše studie podporuje, jelikož fagocytární aktivita potřebná k účinné likvidaci patogenů po laparoskopii na rozdíl od laparotomie neklesala.

V každém případě je nutné provést další výzkumy. K pochopení celé imunitní reakce je nutné znát i produkci jiných metabolitů a v rozmanitějších časových intervalech od operace. Rovněž, ačkoliv jsou makrofágy nejvíce zastoupenou buněčnou populací v peritoneální oblasti, nejsou jedinou, a proto by bylo vhodné věnovat se i výzkumu dalších přítomných buněk, například neutrofilních granulocytů. Rovněž je pro aktivaci dalších buněk imunitního systému, které se nadále podílí na rozvoji zánětlivé reakce, stěžejní účinná prezentace antigenu a posléze i jejich vlastní aktivita vedoucí k plnohodnotné odpovědi. Důležitou součástí imunitní odezvy je rovněž výskyt adhezivních molekul na buňkách i endoteliích a různých kostimulačních molekul na imunokompetentních buňkách. Všechny tyto aspekty pouze spolu dohromady adekvátně modulují zánětlivý proces a nelze stavět význam jednoho nad druhý. Dalším faktem je, že všechny dosud provedené studie probíhaly na zvířecích modelech a reakce v lidském organismu se může více či méně lišit. Nicméně z našich výsledků a z výsledků některých jiných studií lze laparoskopii považovat za vhodnou alternativu otevřeného chirurgického výkonu, která na úplné objasnění či potvrzení svých výhodných dopadů na lokální imunitní odezvu stále zatím čeká.



## 6. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala stanovením tří prozánětlivých cytokinů ( $\text{TNF}\alpha$ , IL- $1\beta$ , IL-6) produkovaných peritoneálními makrofágy potkana a hodnocením jejich hladin v závislosti na rozdílném přístupu operačního zákroku do abdominální oblasti – laparoskopického versus laparotomického.

Populace makrofágů byla z peritonea izolována 24, respektive 72 hodin po zákroku a následně 24 hodin kultivována v DMEM médiu se suplementací (ATB, antimykotika, fetální bovinní sérum). Toto médium sloužilo jako primární vzorek. Vedle stanovení bazálních hladin cytokinů jsme zároveň simulovali stimulaci peritoneálních makrofágů přidavkem LPS do zmiňovaného kultivačního média. Optimální koncentrace, vhodná pro dostatečnou stimulaci produkce všech uvedených cytokinů, byla docílena experimentálně a bylo zjištěno, že koncentrace 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS tento účel splňuje. Jednotlivé cytokiny byly stanovovány komerčně dodávanými kity založenými na principu sendvičové ELISA metody. Pro lepší zhodnocení výsledků byly hladiny jednotlivých cytokinů vztaženy ke koncentraci proteinů pocházejících ze stejné kultivační misky. Dalším předmětem výzkumu bylo hodnocení fagocytární aktivity peritoneálních makrofágů. Schopnost pohlcovat infekční materiál byla stanovována komerčně dodávaným kitem na principu intracelulární fluorescence pohlcených značených partikulí. Pro lepší zhodnocení výsledků byly hodnoty fluorescence vztaženy k hodnotám WST, jež byly zjištěny z totožné jamky mikrotitrační destičky. Stanovení WST probíhalo opět komerčně dodávaným kitem a slouží k určení viability resp. metabolické aktivity buněk.

Zjištěné výsledky závisely na tom, byla-li měřena bazální či stimulovaná produkce cytokinů. Bazální hladiny cytokinů 24 i 72 hodin po operaci byly zpravidla signifikantně vyšší u skupiny, jež prodělala zákrok s laparoskopickým přístupem, a to oproti kontrole i laparotomickému přístupu. Bazální hladiny IL-6 byly ve všech případech pod mezí detekce. Po stimulaci peritoneálních makrofágů LPS narůstala produkce cytokinů u laparotomované skupiny v obou časových intervalech od operace signifikantně více než u laparoskopické skupiny či u stimulovaných kontrol. Produkce cytokinů stimulovanými makrofágy z laparoskopované skupiny však nebyla nižší než u stimulovaných kontrolních skupin. Fagocytární aktivita byla z technických důvodů hodnocena pouze v intervalu 72 hodin od zákroku. Bazální fagocytární aktivita byla u laparoskopického přístupu signifikantně vyšší oproti kontrole i laparotomii. Po stimulaci byl pozorován pokles schopnosti pohlcovat

infekční materiál pouze u laparotomované skupiny. Stimulovaná laparoskopická skupina a stimulovaná i nestimulovaná kontrola nevykazovaly signifikantní rozdíl.

Z těchto poznatků lze spekulovat, že laparoskopie by mohla zachovávat oproti laparotomii lépe nejen systémovou imunitní odpověď, ale rovněž lokální reakci. Lokální zánětlivá reakce po stimulaci škodlivou noxou reflektovaná produkcí prozánětlivých cytokinů byla ve srovnání s laparotomickým přístupem po laparoskopii mírnější, avšak vždy přinejmenším srovnatelná se stimulovanými kontrolami a tudíž rozhodně ne oslabená. Dále stimulované makrofágy izolované po laparoskopickém zákroku vykazovaly na rozdíl od laparotomie neporušenou schopnost fagocytovat. Tento nálezn lze hodnotit jako určitou rozumnou toleranci vůči patogenům, která zabraňuje nežádoucí nadměrné aktivaci zánětlivého procesu, zatímco si peritoneální makrofágy plně zachovávaly důležité efektorové funkce (fagocytosa).

Celá problematika laparoskopie ve vztahu k peritoneální imunitní odpovědi vyžaduje nepochybně hlubší průzkum. Dosavadní studie byly realizovány pouze na zvířecích modelech a navíc nezřídka s kontroverzními výsledky. Je nutné stanovení v rozmanitějších intervalech od operace a hodnocení i jiných aspektů, které hrají v imunitní odezvě roli. Peritoneální makrofágy produkují řadu jiných cytokinů, které v adekvátní regulační kaskádě imunitní odpovědi zastupují neméně důležitou úlohu. Celá adekvátní reakce vyžaduje aktivitu a spolupráci jak specifických, tak nespecifických, buněčných i humorálních mechanismů a účinnou komunikaci mezi nimi. Ta je zprostředkována jednak cytokiny, jednak prostřednictvím kontaktu povrchových adhezivních a kostimulačních molekul, jejichž hodnocení by bylo rovněž vhodné. Také je třeba zhodnotit aktivitu i jiných buněk, které se v peritoneální oblasti vyskytují, například neutrofilních granulocytů. Nicméně naše práce podporuje domněnku, že výhody laparoskopie mohou spočívat nejen v lepší pooperační rekonvalescenci pacientů, menší invazivitě zákroku, nižší pooperační bolestivosti a v lepším zachování systémové imunitní odpovědi, ale mohou být příznivé rovněž její dopady na lokální (peritoneální) imunitní odezvu. Laparoskopie se zdá být vhodnou alternativou otevřené chirurgie a metodou, jejíž možný příznivý vliv na lokální imunitní odpověď na své potvrzení stále zatím čeká.

## POUŽITÁ LITERATURA:

1. **Jan Krejsek, Otakar Kopecký.** *Klinická imunologie.* Pardubice : NUCLEUS HK, 2004. ISBN 80-86225-50-X.
2. **Václav Hořejší, Jiřina Bartůňková.** *Základy imunologie.* Praha : TRITON s.r.o., 2005. ISBN 80-7254-686-4.
3. **Daniel P. Stites, Abba I. Terr.** *Základní a klinická imunologie.* Praha : VICTORIA PUBLISHING, a.s., 1994. ISBN 80-85605-37-6.
4. **Nachtsheim R, Dudley B, McNeil PL, Howdieshell TR.** The peritoneal cavity is a distinct compartment of angiogenic molecular mediators. *J Surg Res.* 2006, 134: 28-35.
5. **N, Chegini.** Peritoneal molecular environment, adhesion formation and clinical implication. *Front Biosci.* 2002, Apr 1; 7:e91-115.
6. **Yung S, Chan TM.** Mesothelial cells. *Perit Dial Int.* 2007 Jun, 27 Suppl 2: 110-5.
7. **GS, DiZerega.** Biochemical events in peritoneal tissue repair. *Eur J Surg Suppl.* 1997, 577: 10-6.
8. **Holzer A, Jirecek ST, Illievich UM, Huber J, Wenzl RJ.** Laparoscopic versus open myomectomy: a double-blind study to evaluate postoperative pain. *Anesth Analg.* 2006 May, 102(5): 1480-4.
9. **Huang MT, Wei PL, Wu CC, Lai IR, Chen RJ, Lee WJ.** Needleoscopic, laparoscopic, and open appendectomy: a comparative study. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2001 Oct, 11(5): 306-12.
10. **Hansen JB, Smithers BM, Schache D, Wall DR, Miller BJ, Menzies BL.** Laparoscopic versus open appendectomy: prospective randomized trial. *World J Surg.* 1996 Jan, 20(1): 17-21.
11. **Tiberio GA, Baiocchi GL, Arru L, Agabiti Rosei C, De Ponti S, Matheis A, Rizzoni D, Giulini SM.** Prospective randomized comparison of laparoscopic versus open adrenalectomy for sporadic pheochromocytoma. *Surg Endosc.* 2008 Jun, 22(6): 1435-9.
12. **Wei HB, Huang JL, Zheng ZH, Wei B, Zheng F, Qiu WS, Guo WP, Chen TF, Wang TB.** Laparoscopic versus open appendectomy: a prospective randomized comparison. *Surg Endosc.* 2010 Feb, 24(2): 266-9.
13. **Ost MC, Patel KP, Rastinehad AR, Chu PY, Anderson AE, Smith AD, Lee BR.** Pneumoperitoneum with carbon dioxide inhibits macrophage tumor necrosis factor-alpha secretion: source of transitional-cell carcinoma port-site metastasis, with prophylactic irrigation strategies to decrease laparoscopic oncologic risk. *J Endourol.* 2008 Jan, 22(1): 105-12.
14. **Menger MD, Vollmar B.** Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? *Langenbecks Arch Surg.* 2004 Nov, 389(6): 475-84.

15. **Ogawa K, Hirai M, Katsube T, Murayama M, Hamaguchi K, Shimakawa T, Naritake Y, Hosokawa T, Kajiwara T.** Suppression of cellular immunity by surgical stress. *Surgery*. 2000 Mar, 127(3): 329-36.
16. **kol., Racek Jaroslav a.** *Klinická biochemie*.
17. **Sietses C, Wiezer MJ, Eijsbouts QA, Beelen RH, van Leeuwen PA, von Blomberg BM, Meijer S, Cuesta MA.** A prospective randomized study of the systemic immune response after laparoscopic and conventional Nissen fundoplication. *Surgery*. 1999 Jul, 126(1): 5-9.
18. **Leung KL, Lai PB, Ho RL, Meng WC, Yiu RY, Lee JF, Lau WY.** Systemic cytokine response after laparoscopic-assisted resection of rectosigmoid carcinoma: A prospective randomized trial. *Ann Surg*. 2000 Apr, 231(4): 506-11.
19. **Schietroma M, Giuliani A, Agnifili A, Lely L, Carlei F, Pescosolido A, Amicucci G.** [Changes in blood coagulation, fibrinolysis and cytokine profile during laparoscopic and open cholecystectomy]. *Chir Ital*. 2008 Mar-Apr, 60(2): 179-88.
20. **Schietroma M, Carlei F, Franchi L, Mazzotta C, Sozio A, Lygidakis NJ, Amicucci G.** A comparison of serum interleukin-6 concentrations in patients treated by cholecystectomy via laparotomy or laparoscopy. *Hepatogastroenterology*. 2004 Nov-Dec, 51(60): 1595-9.
21. **Scheepers JJ, Sietses C, Bos DG, Boelens PG, Teunissen CM, Ligthart-Melis GC, Cuesta MA, van Leeuwen PA.** Immunological consequences of laparoscopic versus open transhiatal resection for malignancies of the distal esophagus and gastroesophageal junction. *Dig Surg*. 2008, 25(2): 140-7.
22. **Ordemann J, Jacobi CA, Schwenk W, Stösslein R, Müller JM.** Cellular and humoral inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections. *Surg Endosc*. 2001 Jun, 15(6): 600-8.
23. **Parry-Billings M, Baigrie RJ, Lamont PM, Morris PJ, Newsholme EA.** Effects of major and minor surgery on plasma glutamine and cytokine levels. *Arch Surg*. 1992 Oct, 127(10): 1237-40.
24. **Tang CL, Eu KW, Tai BC, Soh JG, MacHin D, Seow-Choen F.** Randomized clinical trial of the effect of open versus laparoscopically assisted colectomy on systemic immunity in patients with colorectal cancer. *Br J Surg*. 2001 Jun, 88(6): 801-7.
25. **Mehigan BJ, Hartley JE, Drew PJ, Saleh A, Dore PC, Lee PW, Monson JR.** Changes in T cell subsets, interleukin-6 and C-reactive protein after laparoscopic and open colorectal resection for malignancy. *Surg Endosc*. 2001 Nov, 15(11): 1289-93.
26. **Sylla P, Kirman I, Whelan RL.** Immunological advantages of advanced laparoscopy. *Surg Clin North Am*. 2005 Feb, Sv. VII, 85(1): 1-18.
27. **Hewitt PM, Ip SM, Kwok SP, Somers SS, Li K, Leung KL, Lau WY, Li AK.** Laparoscopic-assisted vs. open surgery for colorectal cancer: comparative study of immune effects. *Dis Colon Rectum*. 1998 Jul, 41(7): 901-9.
28. **Decker D, Schondorf M, Bidlingmaier F, Hirner A, von Ruecker AA.** Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 T-helper cell balance, suggesting down-regulation of cell-mediated and up-

regulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma. *Surgery*. 1996 Mar, 119(3): 316-25.

29. **Brune IB, Wilke W, Hensler T, Holzmann B, Siewert JR.** Downregulation of T helper type 1 immune response and altered pro-inflammatory and anti-inflammatory T cell cytokine balance following conventional but not laparoscopic surgery. *Am J Surg*. 1999 Jan, 177(1): 55-60.

30. **Gitzelmann CA, Mendoza-Sagaon M, Talamini MA, Ahmad SA, Pegoli W Jr, Paidas CN.** Cell-mediated immune response is better preserved by laparoscopy than laparotomy. *Surgery*. 2000 Jan, 127(1): 65-71.

31. **Whelan RL, Franklin M, Holubar SD, Donahue J, Fowler R, Munger C, Doorman J, Balli JE, Glass J, Gonzalez JJ, Bessler M, Xie H, Treat M.** Postoperative cell mediated immune response is better preserved after laparoscopic vs open colorectal resection in humans. *Surg Endosc*. 2003 Jun, 17(6): 972-8.

32. **Mendoza-Sagaon M, Kutka MF, Talamini MA, Poulouse BK, Herreman-Suquet K, de Maio A, Paidas CN.** Laparoscopic Nissen fundoplication with carbon dioxide pneumoperitoneum preserves cell-mediated immunity in an immature animal model. *J Pediatr Surg*. 2001 Oct, 36(10): 1564-8.

33. **Walker CB, Bruce DM, Heys SD, Gough DB, Binnie NR, Eremin O.** Minimal modulation of lymphocyte and natural killer cell subsets following minimal access surgery. *Am J Surg*. 1999 Jan, 177(1): 48-54.

34. **Leung KL, Tsang KS, Ng MH, Leung KJ, Lai PB, Lee JF, Lau WY.** Lymphocyte subsets and natural killer cell cytotoxicity after laparoscopically assisted resection of rectosigmoid carcinoma. *Surg Endosc*. 2003 Aug, 17(8): 1305-10.

35. **Griffith JP, Everitt NJ, Lancaster F, Boylston A, Richards SJ, Scott CS, Benson EA, Sue-Ling HM, McMahon MJ.** Influence of laparoscopic and conventional cholecystectomy upon cell-mediated immunity. *Br J Surg*. 1995 May, 82(5): 677-80.

36. **Braga M, Vignali A, Gianotti L, Zuliani W, Radaelli G, Gruarin P, Dellabona P, Di Carlo V.** Laparoscopic versus open colorectal surgery: a randomized trial on short-term outcome. *Ann Surg*. 2002 Dec, 236(6): 759-767.

37. **Da Costa ML, Redmond P, Bouchier-Hayes DJ.** The effect of laparotomy and laparoscopy on the establishment of spontaneous tumor metastases. *Surgery*. 1998 Sep, 124(3): 516-25.

38. **Cailhier JF, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Ko K, Watson S, Savill J, Hughes J, Lang RA.** Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *J Immunol*. 2005 Feb 15, 174(4): 2336-42.

39. **Jesch NK, Kuebler JF, Nguyen H, Nave H, Bottlaender M, Teichmann B, Braun A, Vieten G, Ure BM.** Laparoscopy vs minilaparotomy and full laparotomy preserves circulatory but not peritoneal and pulmonary immune responses. *J Pediatr Surg*. 2006 Jun, 41(6): 1085-92.

40. **Iwanaka T, Arkovitz MS, Arya G, Ziegler MM.** Evaluation of operative stress and peritoneal macrophage function in minimally invasive operations. *J Am Coll Surg*. 1997 Apr, 184(4): 357-63.

41. **Romeo C, Impellizzeri P, Antonuccio P, Turiaco N, Cifalá S, Gentile C, Passaniti M, Marini H, Squadrito F, Altavilla D.** Peritoneal macrophage activity after laparoscopy or laparotomy. *J Pediatr Surg.* 2003 Jan, 38(1): 97-101.
42. **West MA, Baker J, Bellingham J.** Kinetics of decreased LPS-stimulated cytokine release by macrophages exposed to CO<sub>2</sub>. *J Surg Res.* 1996, 63: 269-274.
43. **Collet D, Vitale GC, Reynolds M, Klar E, Cheadle WG.** Peritoneal host defenses are less impaired by laparoscopy than by open operation. *Surg Endosc.* 1995 Oct, 9(10): 1059-64.
44. **Lee SW, Feingold DL, Carter JJ, Zhai C, Stapleton G, Gleason N, Whelan RL.** Peritoneal macrophage and blood monocyte functions after open and laparoscopic-assisted cecectomy in rats. *Surg Endosc.* 2003 Dec, 17(12): 1996-2002.
45. **Watson RW, Redmond HP, McCarthy J, Burke PE, Bouchier-Hayes D.** Exposure of the peritoneal cavity to air regulates early inflammatory responses to surgery in a murine model. *Br J Surg.* 1995 Aug, 82(8): 1060-5.
46. **Drysdale BE, Agarwal S, Shin HS.** Macrophage-mediated tumoricidal activity: mechanism of activation and cytotoxicity. *Prog Allergy.* 1988, 40: 111-61.
47. **Moehrlen U, Schwoebel F, Reichmann E, Stauffer U, Gitzelmann CA, Hamacher J.** Early peritoneal macrophage function after laparoscopic surgery compared with laparotomy in a mouse model. *Surg Endosc.* 2005 Jul, 19(7): 958-63.
48. **Novitsky YW, Litwin DE, Callery MP.** The net immunologic advantage of laparoscopic surgery. *Surg Endosc.* 10 2004 Oct, 18(10): 1411-9.
49. **Kuntz C, Wunsch A, Bödeker C, Bay F, Rosch R, Windeler J, Herfarth C.** Effect of pressure and gas type on intraabdominal, subcutaneous, and blood pH in laparoscopy. *Surg Endosc.* 2000 Apr, 14(4): 367-71.
50. **Hajri A, Mutter D, Wack S, Bastien C, Gury JF, Marescaux J, Aprahamian M.** Dual effect of laparoscopy on cell-mediated immunity. *Eur Surg Res.* 2000, 32(5): 261-266.
51. **Neuhaus SJ, Watson DI, Ellis T, Rofe AM, Mathew G, Jamieson GG.** Influence of gasis on intraperitoneal immunity during laparoscopy in tumor-bearing rats. *World J Surg.* 2000 Oct, 24(10): 1227-31.
52. **Jackson PG, Evans SR.** Intraperitoneal macrophages and tumor immunity: a review. *J Surg Oncol.* 2000 Oct, 75(2): 146-54.
53. **Wang N, Gates KL, Trejo H, Favoreto S Jr, Schleimer RP, Sznajder JI, Beitel GJ, Sporn PH.** Elevated CO<sub>2</sub> selectively inhibits interleukin-6 and tumor necrosis factor expression and decreases phagocytosis in the macrophage. *FASEB J.* 2010 Jul, 24(7): 2178-90.
54. **Grabowski JE, Vega VL, Talamini MA, De Maio A.** Acidification enhances peritoneal macrophage fagocytosis activity. *J Surg Res.* 2008, č. 15, str: 206-211.
55. **Jacobs VR, Morrison JE Jr, Mundhenke C, Golombeck K, Jonat W.** Intraoperative evaluation of laparoscopic insufflation technique for quality control in the OR. *JSLs.* 2000 Jul-Sep, 4(3): 189-95.

56. **Jacobs VR, Morrison JE Jr, Mettler L, Mundhenke C, Jonat W.** Measurement of CO<sub>2</sub> hypothermia during laparoscopy and pelviscopy: how cold it gets and how to prevent it. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 1999 Aug, 6(3): 289-95.
57. **Bessell JR, Ludbrook G, Millard SH, Baxter PS, Ubhi SS, Maddern GJ.** Humidified gas prevents hypothermia induced by laparoscopic insufflation: a randomized controlled study in a pig model. *Surg Endosc.* 1999 Feb, 13(2): 101-5.
58. **Puttick MI, Scott-Coombes DM, Dye J, Nduka CC, Menzies-Gow NM, Mansfield AO, Darzi A.** Comparison of immunologic and physiologic effects of CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum at room and body temperatures. *Surg Endosc.* 1999 Jun, 13(6): 572-5.
59. **Volz J, Köster S, Spacek Z, Paweletz N.** The influence of pneumoperitoneum used in laparoscopic surgery on an intraabdominal tumor growth. *Cancer.* 1999 Sep 1, 86(5): 770-4.
60. **Mathew G, Watson DI, Ellis TS, Jamieson GG, Rofe AM.** The role of peritoneal immunity and the tumour-bearing state on the development of wound and peritoneal metastases after laparoscopy. *Aust N Z J Surg.* 1999 Ja, 69(1): 14-8.
61. **Bergström M, Falk P, Park PO, Holmdahl L.** Peritoneal and systemic pH during pneumoperitoneum with CO<sub>2</sub> and helium in a pig model. *Surg Endosc.* 2008 Feb, 22(2): 359-64.
62. **Hanly EJ, Aurora AR, Fuentes JM, Shih SP, Marohn MR, De Maio A, Talamini MA.** Abdominal insufflation with CO<sub>2</sub> causes peritoneal acidosis independent of systemic pH. *J Gastrointest Surg.* 2005 Dec, 9(9):1245-52.
63. **Hanly EJ, Bachman SL, Marohn MR, Boden JH, Herring AE, De Maio A, Talamini MA.** Carbon dioxide pneumoperitoneum-mediated attenuation of the inflammatory response is independent of systemic acidosis. *Surgery.* 2005 May, 137(5): 559-66.
64. **Wong YT, Shah PC, Birkett DH, Brams DM.** Peritoneal pH during laparoscopy is dependent on ambient gas environment: helium and nitrous oxide do not cause peritoneal acidosis. *Surg Endosc.* 2005 Jan, 19(1): 60-4.
65. **Hanly EJ, Aurora AA, Shih SP, Fuentes JM, Marohn MR, De Maio A, Talamini MA.** Peritoneal acidosis mediates immunoprotection in laparoscopic surgery. *Surgery.* 2007 Sep, 142(3): 357-64.
66. **Hanly EJ, Fuentes JM, Aurora AR, Bachman SL, De Maio A, Marohn MR, Talamini MA.** Carbon dioxide pneumoperitoneum prevents mortality from sepsis. *Surg Endosc.* 2006 Sep, 20(9): 1482-7.
67. **Fuentes JM, Hanly EJ, Aurora AR, De Maio A, Shih SP, Marohn MR, Talamini MA.** CO<sub>2</sub> abdominal insufflation pretreatment increases survival after a lipopolysaccharide-contaminated laparotomy. *J Gastrointest Surg.* 2006 Jan, 10(1): 32-8.
68. **Elkelani OA, Binda MM, Molinas CR, Koninckx PR.** Effect of adding more than 3% oxygen to carbon dioxide pneumoperitoneum on adhesion formation in a laparoscopic mouse model. *Fertil Steril.* 2004 Dec, 82(6): 1616-22.

69. **Molinas CR, Koninckx PR.** Hypoxaemia induced by CO(2) or helium pneumoperitoneum is a co-factor in adhesion formation in rabbits. *Hum Reprod.* 2000 Aug; 15(8): 1758-63.
70. **Senthilkumar MP, Dreyer JS.** Peritoneal adhesions: pathogenesis, assessment and effects. *Trop Gastroenterol.* 2006 Jan-Mar; 27(1): 11-8.
71. **Reed KL, Stucchi AF, Becker JM.** Pharmacologic inhibition of adhesion formation and peritoneal tissue-type plasminogen activator activity. *Semin Reprod Med.* 2008 Jul; 26(4): 331-40.
72. **Scott-Coombes DM, Whawell SA, Thompson JN.** The operative peritoneal fibrinolytic response to abdominal operation. *Eur J Surg.* 1995 Jun; 161(6): 395-9.
73. **Scott-Coombes D, Whawell S, Vipond MN, Thompson J.** Human intraperitoneal fibrinolytic response to elective surgery. *Br J Surg.* 1995 Mar; 82(3): 414-7.
74. **Ivarsson ML, Falk P, Holmdahl L.** Response of visceral peritoneum to abdominal surgery. *Br J Surg.* 2001 Jan; 88(1): 148-51.
75. **Tarhan OR, Barut I, Akdeniz Y, Sutcu R, Cerci C, Bulbul M.** Fibrinolytic responses of human peritoneal fluid in laparoscopic cholecystectomy: a prospective clinical study. *Surg Endosc.* 2008 Apr; 22(4): 1008-13.
76. **Ziprin P, Ridgway PF, Peck DH, Darzi AW.** Laparoscopic-type environment enhances mesothelial cell fibrinolytic activity in vitro via a down-regulation of plasminogen activator inhibitor-1 activity. *Surgery.* 2003 Nov; 134(5): 758-65.
77. **Nagelschmidt M, Gerbecks D, Minor T.** The impact of gas laparoscopy on abdominal plasminogen activator activity. *Surg Endosc.* 2001 Jun; 15(6): 585-8.
78. **Bergström M, Falk P, Holmdahl L.** CO2 promotes plasminogen activator inhibitor type 1 expression in human mesothelial cells. *Surg Endosc.* 2003 Nov; 17(11): 1818-22.
79. **Brokelman WJ, Holmdahl L, Bergström M, Falk P, Klinkenbijn JH, Reijnen MM.** Heating of carbon dioxide during insufflation alters the peritoneal fibrinolytic response to laparoscopic surgery : A clinical trial. *Surg Endosc.* 2008 May; 22(5): 1232-6.
80. **Brokelman WJ, Holmdahl L, Janssen IM, Falk P, Bergström M, Klinkenbijn JH, Reijnen MM.** Decreased peritoneal tissue plasminogen activator during prolonged laparoscopic surgery. *J Surg Res.* 2009 Jan; 151(1): 89-93.
81. **Holmdahl L, Kotseos K, Bergström M, Falk P, Ivarsson ML, Chegini N.** Overproduction of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) is associated with adhesion formation and peritoneal fibrinolytic impairment. *Surgery.* 2001 May; 129(5): 626-32.
82. **Wal JB, Jeekel J.** Biology of the peritoneum in normal homeostasis and after surgical trauma. *Colorectal Dis.* 2007 Oct; 9(2): 9-13.
83. **Suematsu T, Hirabayashi Y, Shiraishi N, Adachi Y, Kitamura H, Kitano S.** Morphology of the murine peritoneum after pneumoperitoneum vs laparotomy. *Surg Endosc.* 2001 Sep; 15(9): 954-8.



84. **Rosário MT, Ribeiro U Jr, Corbett CE, Ozaki AC, Bresciani CC, Zilberstein B, Gama-Rodrigues JJ.** Does CO2 pneumoperitoneum alter the ultra-structure of the mesothelium? *J Surg Res.* 2006 Jun 15, 133(2): 84-8.

85. **Doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.** Přednáškové materiály z předmětu Imunochemie.

86. **Jakeways MS, Mitchell V, Hashim IA, et al.** Metabolic and inflammatory responses after open or laparoscopic cholecystectomy. *Br J Surg* . 1994, 81(1): 121-31.

87. **Hess DJ, Henry-Stanley MJ, Bendel CM, Zhang B, Johnson MA, Wells CL.** Escherichia coli and TNF-alpha modulate macrophage phagocytosis of Candida glabrata. *J Surg Res.* 2009 Aug; 155(2): 217-24.