

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium proliferační odpovědi buněk
po stimulaci imunitními komplexy**

Diplomová práce

Bc. Adéla Motyčková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně během navazujícího magisterského studia pod vedením doc. MUDr. Mgr. Milana Rašky, Ph.D. a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje.“

.....
Bc. Adéla Motyčková

V Olomouci, dne 29. 4. 2016

SOUHRN

IgA nefropatie je nejčastější primární glomerulonefritida. Do její etiopatogeneze jsou zapojeny mezangiální depa imunitních komplexů, v nichž se jako antigen uplatňuje abnormálně glykosylované polymerní IgA1. Makromolekulární imunitní komplexy nejsou efektivně odstraňovány játry a jejich depozice v mezangiu ledvin stimuluje proliferaci mezangiálních buněk a zvýšenou tvorbu proteinů extracelulární matrix, což v konečném důsledku vede ke snížení až ztrátě renálních funkcí. Až třetina pacientů s IgA nefropatií dospěje v průběhu 20 let od diagnózy k nezvratnému selhání ledvin. Teoretická část diplomové práce shrnuje současné poznatky o molekulárních mechanismech vzniku IgA nefropatie, tvorbě a biologické aktivitě cirkulujících imunitních komplexů, genetických faktorech a současných možnostech léčby tohoto onemocnění. Experimentální část práce se zabývá stanovením proliferační odpovědi tkáňové kultury mezangiálních buněk po stimulaci séry pacientů s IgA nefropatií a kontrolními séry. Pomocí metod inkorporace ³H-thymidinu a intracelulárního barvení fluorochromem CFSE byla stanovena schopnost sér pacientů s IgA nefropatií a kontrol stimulovat proliferaci mezangiálních buněk *in vitro*. Nebyl pozorován signifikantní rozdíl v proliferační aktivitě sér pacientů s IgA nefropatií a kontrolní skupinou. Metodou ELISA byla stanovena vyšší koncentrace celkového IgA i množství cirkulujících imunokomplexů u pacientů s IgA nefropatií. Byla stanovena proliferační aktivita séra pacienta s IgA nefropatií po frakcionaci, která ukázala přítomnost stimulačních a inhibičních imunitních komplexů.

Klíčová slova: Cirkulující imunitní komplexy, imunoglobulin A, IgA nefropatie, mezangium, proliferace mezangiálních buněk

SUMMARY

IgA nephropathy is the most common primary glomerulonephritis. In its etiopathogenesis is caused by mesangial deposition of immune complexes containing aberrantly glycosylated polymeric IgA1. Macromolecular immune complexes are not effectively eliminated by the liver and its deposition in the renal mesangium stimulates proliferation of mesangial cells and extracellular matrix proteins expansion leading to a decrease or eventually loss of kidney function. Within 20 years from diagnosis up to a one third of patients with IgA nephropathy develops irreversible end stage renal failure. The theoretical part of diploma thesis summarizes the current knowledge about the molecular mechanisms involved in IgA nephropathy, formation and biological activity of circulating immune complexes, genetic factors and current treatment options for this disease. The experimental part deals with the determination of proliferative responses of cultured mesangial cells after stimulation with sera from patients with IgA nephropathy and control sera. The ability of sera from patients with IgA nephropathy and controls to stimulate proliferation of mesangial cells *in vitro* was determined by ³H-thymidine incorporation assay and by CFSE intracellular staining. There was no significant difference in the proliferative activity of serum from IgA nephropathy patients and controls. Using ELISA approach, a higher concentration of total IgA and circulating immune complexes was determined in patients with IgA nephropathy. Further, it was determined proliferative activity of molecular size-fractionated serum from a patient with IgA nephropathy, which showed the presence of stimulatory and inhibitory immune complexes.

Keywords: Circulating immune complexes, immunoglobuline A, IgA nephropathy, mesangium, mesangial cells proliferation

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce doc. Mgr. MUDr. Milanu Raškovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, za poskytnutí literatury a času, který mi věnoval v průběhu vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu Ústavu Imunologie LF UP v Olomouci, především Mgr. Petru Kosztyu, Ph.D. za odborné vedení experimentální práce a všestrannou pomoc v laboratoři. Práce byla vypracována za podpory vnitřního grantu UP IGA_LF_2015_009.

Velké poděkování patří mé rodině za podporu v průběhu studia.

OBSAH

1	Úvod	- 8 -
2	IgA nefropatie.....	- 9 -
2.1	Imunoglobulin A.....	- 13 -
2.1.1	IgA1 imunoglobulin	- 14 -
2.1.2	Mechanismus <i>O</i> -glykosylace IgA1	- 16 -
2.2	Molekulární podstata IgA nefropatie.....	- 18 -
2.2.1	Dědičné zvýšení v galaktóze-deficientních IgA1	- 18 -
2.2.2	Syntéza protilátek proti v galaktóze-deficientnímu IgA1	- 19 -
2.2.3	Vznik cirkulujících imunokomplexů a jejich biologická aktivita	- 20 -
2.2.4	Aktivace mezangiálních buněk a glomerulární poškození	- 22 -
2.3	Genetika IgA nefropatie.....	- 24 -
2.4	Léčba IgA nefropatie	- 25 -
2.4.1	Výhledy kauzální léčby	- 26 -
2.5	Proliferační testy	- 27 -
2.5.1	Metoda inkorporace ³ H-thymidinu	- 27 -
2.5.2	Metoda intracelulárního barvení fluorochromem CFSE	- 28 -
3	Cíl práce.....	- 29 -
4	Materiál.....	- 30 -
4.1	Krevní séra pacientů	- 30 -
4.2	Mezangiální buňky	- 30 -
4.3	Použité chemikálie.....	- 31 -
4.4	Použité protilátky.....	- 31 -
4.5	Použité roztoky	- 31 -
4.6	Ostatní materiál.....	- 32 -

4.7	Přístrojové vybavení	- 32 -
5	Metodika.....	- 33 -
5.1	Proliferační testy	- 33 -
5.1.1	Test inkorporace ³ H-thymidinu	- 33 -
5.1.2	Test intracelulárního barvení CFSE	- 33 -
5.2	Frakcionace sér potencionálně obsahujících CIK.....	- 34 -
5.3	ELISA	- 35 -
5.3.1	Stanovení koncentrace celkového IgA	- 35 -
5.3.2	Stanovení cirkulujících imunokomplexů.....	- 36 -
6	Výsledky.....	- 37 -
6.1	Vyhodnocení proliferační odpovědi metodou inkorporace ³ H-thymidinu	- 37 -
6.2	Vyhodnocení proliferační odpovědi metodou intracelulárního barvení CFSE.....	- 41 -
6.3	Frakcionace patientských sér a vyhodnocení proliferačního potenciálu jednotlivých frakcí	- 45 -
6.4	Charakterizace jednotlivých vzorků	- 47 -
6.4.1	Stanovení koncentrace celkového IgA	- 47 -
6.4.2	Stanovení cirkulujících imunokomplexů.....	- 48 -
7	Diskuze	- 49 -
8	Závěr.....	- 53 -
9	Literatura	- 54 -
10	Seznam použitých zkratk a symbolů	- 59 -

1 ÚVOD

Imunoglobulin A nefropatie (IgAN) patří mezi jedno z nejčastějších zánětlivých onemocnění ledvinných glomerulů. Glomeruly jsou mikroskopické základní filtrační jednotky ledvinné tkáně a jejich záněty odborně označujeme jako glomerulonefritidy. Glomerulonefritidy jsou záněty neinfekční, jsou způsobeny abnormálními funkcemi našeho imunitního systému (Teplan, 2006).

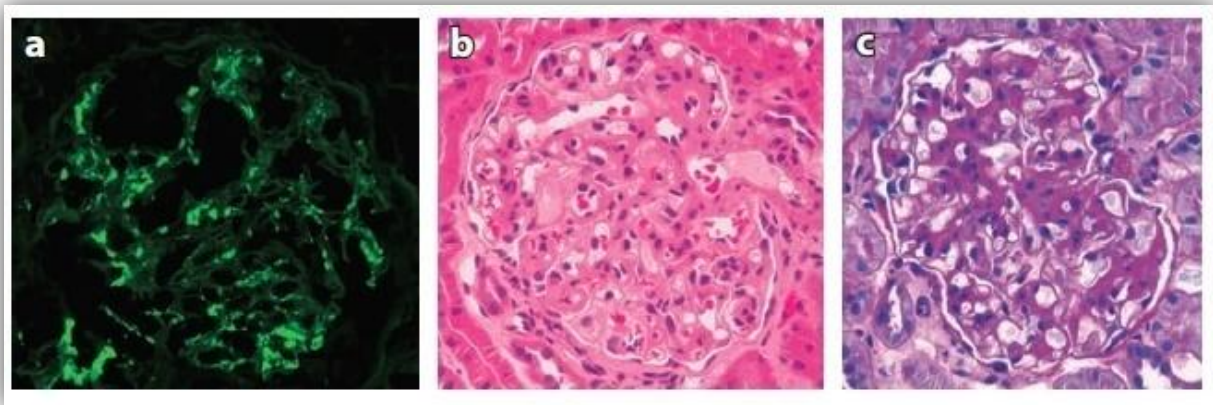
Patogeneze IgAN není zcela objasněná, zřejmě se zde uplatňuje porucha v imunitním systému a některé genetické faktory. Stále přibývá novějších důkazů o tom, že odchylná skladba postranních cukerných řetězců, připojených v rámci posttranslační modifikace těžkého řetězce imunoglobulinu A1 je antigenní determinantou pro vazbu protilátek, a tedy tvorbu cirkulujících imunokomplexů. Ty se následně ukládají v mezangiu ledvin, kde vzniká zánětlivá reakce, která iniciuje buňky mezangia k proliferaci a aktivaci dalších patologických procesů (Suzuki *et al.*, 2011). IgA nefropatie je nejčastější primární glomerulonefritidou všude na světě a mezi primárními glomerulonefritidami nejčastější příčinou chronického selhání ledvin. Až třetina nemocných dospěje v průběhu 20 let k nezvratnému selhání ledvin (Tomana *et al.*, 1999). Onemocnění tak představuje závažný medicínský, sociální i ekonomický problém vyplývající z dialyzačně-transplantační léčby.

Nové poznatky v pochopení genetické dispozice k IgA nefropatii a patogenezi tohoto onemocnění, především objasnění struktury imunitních komplexů a jejich biologické aktivity by tak brzy mohly přinést i významný pokrok v léčbě tohoto závažného, pomalu progredujícího onemocnění se stále špatnou dlouhodobou prognózou (Mestecky *et al.*, 2013).

2 IgA NEFROPATIE

Imunoglobulin A nefropatie, označována také jako Bergerova choroba či mezangioproliferativní nefropatie byla poprvé klasifikována v roce 1968 francouzskými lékaři Jeanem Bergerem a Nicolasem Hinglaisem jako nefropatie charakterizovaná epizodickou hematurií asociovanou s difúzními depozity IgA v mezangiu glomerulů. Onemocnění bylo definováno na základě imunofluorescenčního nálezu dominujících depozit imunoglobulinu A (IgA) a imunoglobulinu G (IgG) v glomerulárním mezangiu, často doprovázených C3 složkou komplementu a vzácně imunoglobulinem M (IgM) (Berger *et Hinglais*, 1968). IgAN je v současné době nejvíce studovanou glomerulonefritidou. U 1/3 pacientů se onemocnění klinicky vyhojí, u 1/3 močový nález perzistuje, aniž by klesala funkce ledvin, a u 1/3 onemocnění přechází do progredující formy s pomalým nástupem chronického selhání ledvin vyžadující dialýzu až transplantaci ledvin. Přibližně 25 až 30 % nemocných s IgAN progreduje během 20–25 let trvání onemocnění do stádia terminálního selhání ledvin (Hraskova *et al.*, 2006).

Jedná se o chronické imunokomplexotvorné onemocnění (hypersenzitivní reakce III. typu) s dosud ne zcela objasněným mechanismem vzniku. Onemocnění je charakterizováno nadprodukcí atypických IgA, které jsou rozlišovány autoprotilátkami nebo v důsledku abnormalit v molekulární struktuře samy precipitují do formy imunokomplexů a to zřejmě převážně v cirkulaci. Tyto cirkulující imunokomplexy (CIK) se ukládají v mezangiu glomerulů, kde aktivují zánětlivou odpověď. Ta se projevuje proliferací mezangiálních buněk, zmnožením mezangiální matrix s různým stupněm sklerotizace a dalších aktivních změn, viz **Obrázek č. 1** (Mestecky *et al.*, 2013). Pro diagnózu IgAN je až do současnosti jediným rozhodujícím vyšetřením imunofluorescenční průkaz interkapilárních depozit IgA v bioptickém materiálu z ledviny. Přítomnost mezangiálních depozit IgA je též náhodným nálezem u řady pitvaných osob, které za svého života neměly žádné klinické příznaky IgAN (Suzuki *et al.*, 2003). Opakovaný nález glomerulárních ložisek IgA je často nalézán také u pacientů v klinické remisi IgAN, kteří mají normální koncentraci sérového kreatinu a fyziologický močový nález (Yoshikawa *et al.*, 1990).



Obrázek č. 1: Imunofluorescenční a světelná mikroskopie biopsií ledvin pacientů s IgA nefropatií. (a) Obraz z fluorescenčního konfokálního mikroskopu; glomerulus barvený na IgA (anti-IgA protilátka značená fluorescein isothiokyanátem) ukazuje granurální mezangiální imunodepozita (svítí zeleně); (b, c) Obrazy světelné mikroskopie prokazující rozpínající se mezangiální matrix. Vzorky jsou barveny hematoxylinem a eosinem (b) nebo kyselinou jodistou a Schiffovým reagens (PAS) (c) (převzato a upraveno dle Mestecky *et al.*, 2013).

Klinický průběh tohoto onemocnění je velmi variabilní, z čistě klinického hlediska často němý, a pokud hovoříme o symptomech, máme na mysli převážně známky laboratorní. Obvykle je IgAN charakterizována opakujícími se epizodami makroskopické hematurie, mírnou proteinurií a glomerulárními změnami spojenými s progresí, či bez progresse, k chronické renální insuficienci. Onemocnění je často diagnostikováno náhodně, průkazem erytrocyturie při preventivních prohlídkách nebo při náhle vzniklé nebolestivé makroskopické hematurii (Mestecky *et al.*, 2013). Ataka hematurie se může objevit jak jednorázově, tak i vícekrát v průběhu onemocnění, intervaly jsou však nepravidelné. Až polovina nemocných má makroskopickou hematurii alespoň 1 krát kdykoliv v průběhu nemoci. V mezidobí může přetrvávat asymptomatická mikroskopická hematurie nebo je nález v moči zcela normální (Monhart, 2001). Charakteristickým rysem IgAN je výskyt nebo zvýraznění hematurie v těsné časové závislosti na vzniku akutního zánětlivého onemocnění horních dýchacích cest (Valderrábano *et al.*, 1996). Na přítomnost onemocnění mohou nemocného dále upozornit otoky při nefrotickém syndromu či příznaky arteriální hypertenze, například bolesti hlavy (Mestecky *et al.*, 2013). Mnoho let je nejspolehlivějším ukazatelem aktivity IgAN výše proteinurie. Při proteinurii kolem 1 g za 24 hodin bývá erytrocyturie 10 mil./24 hodin, při těžších formách s proteinurií kolem 3g za 24 hodin bývá erytrocyturie kolem 30 mil./den. Prognóza je tím závažnější, čím větší je nález v moči. Za přijatelnou hodnotu proteinurie se u dospělého jedince považuje hodnota 0,5 g/24 hodin. Sérový kreatin a hladina komplementu

jsou obvykle normální, ale koncentrace IgA je zpravidla zvýšená (Teplan, 2006). Extrarenální projevy IgAN jsou jen subklinické (např. depozita IgA1 v cévách kůže), pokud je přítomna kožní purpura, gastrointestinální symptomatika či bolesti kloubů, klasifikujeme onemocnění jako purpuru Henoch-Schönleinovu. Ta je velmi obtížně odlišitelná od IgAN, neboť obě onemocnění mají shodnou patogenezi a také stejný imunofluorescenční nález v biopsii ledviny (Donadio *et Grande*, 2002). U IgAN je tedy diagnóza bioptická. Ve světelné mikroskopii nacházíme jen nespecifické, zpočátku mírné proliferativní změny, které mohou postihovat pouze části některých glomerulů. Diagnózu stanoví teprve imunofluorescenční mikroskopie, která odhalí jasně svítící depozita IgA, často doprovázená uloženinami C3 složky komplementu a IgG a nebo IgM. V elektronové mikroskopii jsou tato depozita lokalizována v mezangiu glomerulů. Řada dosud používaných patologických klasifikací IgAN byla založena na patologických mikroskopických nálezech a nebyla provedena korelace s laboratorními výsledky a klinickým obrazem a značně tím byla limitována možnost odhadu prognózy onemocnění. Nejvíce používaná je klasifikace dle Haase (Haas, 1997), která ovšem zohledňuje pouze morfologické změny glomerulů. Proto byla skupinou významných nefrologů a patologů formována nová Oxfordská klasifikace zahrnující důležité patologické a klinické rysy IgAN. Tato novější klasifikace uvedená v **Tabulce č. 1** hodnotí také tubulointersticiální regresivní změny či změny na cévách, prokázala významný vztah mezi stupněm atrofie tubulů a intersticiální sklerózou a závažností IgAN (Cattran *et al.*, 2009).

Tabulka č. 1: Oxfordská klasifikace bioptického nálezu u IgA nefropatie.

Typ poškození	Definice	Skóre
Mezangiální hypercelularita	< 4 MC/ oblast mezangia = 0	M0 ≤ 0,5
	4–5 MC/ oblast mezangia = 1	M1 > 0,5
	6–7 MC/ oblast mezangia = 2	
	> 8 MC/ oblast mezangia = 3	
Segmentální glomeruloskleróza	Jakýkoli počet glomerulů poškozených	S0 – nepřítomna
	segmentální sklerotizací či přítomnost adheze	S1 – přítomna
Endokapilární hypercelularita	Zvýšený počet buněk v glomerulárním	E0 – nepřítomna
	kapilárním lumen způsobující jeho zúžení	E1 – přítomna
Tubulární atrofie/ intersticiální fibróza	% kůry postižené tubulární atrofií nebo	T0 – 0–25 %
	intersticiální fibrózou	T1 – 26–50 %
		T2 – > 50 %

(MC – mezangiální buňky; hodnoty mezangiální hypercelularity jsou průměrem pozorovaným na všech glomerulech, kde pojem “oblast mezangia“ je definován jako oblast separovaná zúženinami majícími méně jak dvě MC jádra, převzato a upraveno podle Cattran *et al.*, 2009)

IgA nefropatie postihuje všechny věkové skupiny, ovšem nejčastější výskyt je u dětí a mladých jedinců do třiceti let (D'Amico, 1987). Většina onemocnění je sporadických, ale rodinný výskyt byl opakovaně popsán (Julian *et al.*, 1985). Jedná se o onemocnění s rozdílnou geografickou a rasovou prevalencí. Patogeneze onemocnění a příčina rasových rozdílů a rozdílů ve věku v době nástupu onemocnění není zcela jasná, předpokládá se významný vliv genetických faktorů. Incidence IgAN udávaná jako mikroskopický průkaz IgAN v nativních biopsiích ledvin prováděným v dané oblasti či skupině v rámci nefrologické diagnostiky, představuje kolem 5-10 % v USA, mezi 10-20 % Evropě a Austrálii a 30-40 % v Asii. Jen výjimečně postihuje populaci afrických černochů (Monhart, 2001). IgAN postihuje mnohem častěji muže než ženy, ale i zde jsou rozdíly v jednotlivých kontinentech. S nepříznivou prognózou onemocnění jsou spojené mužské pohlaví, vyšší věk, přítomnost hypertenze, významná přetrvávající proteinurie, závažnější mezangiální a extrakapilární proliferace (D'Amico, 1987). V České republice představuje IgAN 34 % všech primárních glomerulonefritid a k 1. lednu 2015 byl monitorován výskyt tohoto onemocnění zhruba na 14 nových případů za rok na 1 milion obyvatel (Český registr biopsií nativních ledvin 1994–2015; cit. 10. 1. 2016).

Specifická léčba dosud není známa, základní význam má blokáda dráhy renin-angiotenzin a u pacientů s vyšší proteinurií (nad 1g/24 h) glukokortikoidy. Příznivý vliv na průběh IgAN může mít i rybí olej. O způsobu léčby rozhoduje míra hypertenze, velikost proteinurie, úroveň ledvinové funkce a histologický nále. Přítomná ledvinová nedostatečnost se léčí podle stupně závažnosti konzervativním způsobem nebo náhradou funkce ledvin dialýzou či transplantací (Matoušovic *et al.*, 2015).

2.1 Imunoglobulin A

Imunoglobulin A je jedna z pěti hlavních tříd lidských protilátek (imunoglobulinů) vyskytujících se u člověka. IgA je nejvýznamnější protilátkou specifické humorální slizniční imunity. Jedná se o glykoprotein produkovaný plazmatickými buňkami a plazmablasty v lymfatických tkáních. Molekulová hmotnost IgA je 150 kDa. Hlavním fyziologickým úkolem slizničních imunoglobulinů je bránit mikroorganismům v adhezi na slizniční povrch. IgA se prostřednictvím svých cukerných řetězců (zahrnující oligosacharidy J-řetězce a sekreční komponenty) váže na lektiny bakterií (Royle *et al.*, 2003). Tato vazba zabrání kontaktu mikroorganismu s cukernými řetězci na epitelích sliznic, adhezi k nim, zánětlivé aktivaci slizničních epitelů a v konečném důsledku rozvoji zánětu. Sérový IgA, na rozdíl od IgG, neaktivuje klasickou cestou komplement, a proto jeho interakce s mikroorganismy nevyvolává agresivní zánět (Russell *et al.*, 1997). IgA může ovšem aktivovat komplement prostřednictvím proteinu vážícího manózu (*angl.* mannose-binding protein; MBP). U ledvinových onemocnění byla tato cesta aktivace komplementu popsána jen v několika málo publikacích (Roos *et al.*, 2001).

IgA je jako sekreční imunoglobulin přítomen ve slinách, slzách, mateřském mléce, moči a v sekretech ženského i mužského pohlavního traktu, kde zabraňuje kolonizaci mikroorganismů a rozvoji infekce (Bartůňková *et Paulík*, 2011). IgA je glykoprotein, který se pouze u člověka a některých primátů vyskytuje ve dvou podtřídách: IgA1 a IgA2. Oba typy se mohou vyskytovat v monomerní (mIgA), ale i v polymerní (pIgA) formě. Cirkulující IgA je tvořen především podtřídou monomerního IgA1 (asi 85 %). Naopak sekreční IgA na sliznicích je převážně v polymerní formě s IgA1 jako dominantní podtřídou v dýchacím a horním gastrointestinálním traktu. V tlustém střevě a ženském pohlavním traktu je v mírné převaze IgA2. IgA2 má navíc dva alotypy, označované jako A2m(1) a A2m(2), jejichž zastoupení vykazuje rasovou závislost (Garred *et al.*, 2005). Polymerní IgA produkovaný ve slizničních tkáních je po vazbě na transmembránový receptor, nazývaný polymerní imunoglobulinový receptor (pIgR), selektivně transportován na slizniční povrchy spolu s částí receptoru nazývanou sekreční komponenta. Jedná se o glykoprotein, připojený k sekrečnímu IgA, čímž zvyšuje odolnost protilátky vůči proteolytickým enzymům, zvláště v gastrointestinálním traktu (Woof *et Mestecky*, 2005).

Molekula IgA se skládá ze dvou lehkých a ze dvou těžkých řetězců, vzájemně spojených kovalentní vazbou disulfidickými můstky. Dva vrcholy molekuly označujeme jako F(ab')₂, bazální část jako Fc. Vazebné centrum pro antigeny je na dvou vrcholech molekuly

a je součástí $F(ab')_2$. Aminokyselinová skladba vazebného centra $F(ab')_2$ je variabilní (značí se V), a proto je schopna vázat pro ni specifický antigen. Monomer IgA má 2 vazebná místa pro tentýž antigen sestávající z hypervariabilních segmentů lehkých a těžkých řetězců na vrcholu každého $F(ab')_2$. Ostatní části mají neměnné pořadí aminokyselin stejné u všech molekul téže třídy IgA, a tvoří konstantní část molekuly sestávající ze tří domén, označovaných jako $C\alpha 1$, $C\alpha 2$ a $C\alpha 3$ (Mestecky *et al.*, 2013). Na Fc segment se váží různé receptory, které jsou přítomny hlavně na buňkách bílé krevní řady. Uprostřed molekuly, mezi C1 a C2 doménou těžkého řetězce, je 19 aminokyselin dlouhá pantová oblast (*angl.* hinge region). Zcela na bázi molekuly IgA se nachází C-koncová část těžkého řetězce (*angl.* tail) obsahující 18 aminokyselin dlouhý polypeptid, díky kterému se mohou molekuly IgA snadno vzájemně spojovat za asistence J-řetězce a tvořit dimer až tetramer. Úměrně tomu přibývá specifických vazebných míst pro antigen (Novak *et al.*, 2001).

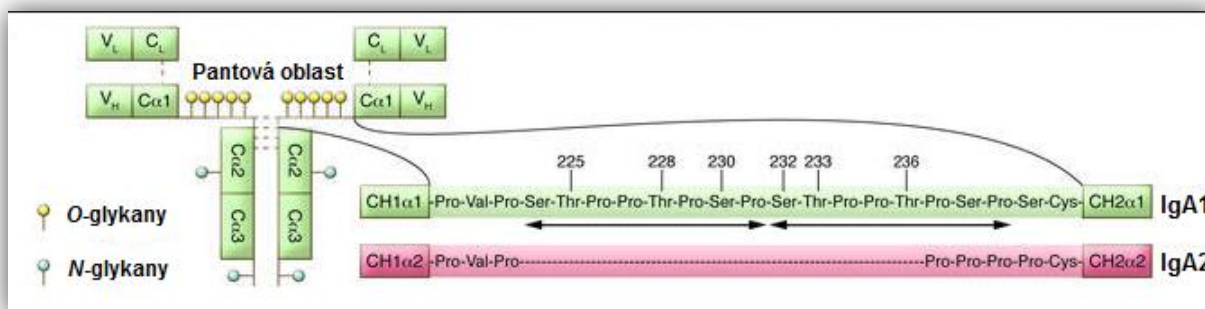
Denní produkce IgA u člověka (~ 50 mg/kg) daleko převyšuje produkci všech ostatních izotypů imunoglobulinů dohromady, ale protože se rychle katabolizuje v játrech, je jeho plazmatická hladina nižší než IgG (Mestecky *et al.*, 2005). Koncentrace IgA v séru je 0,9 až 3,5 mg/ml a poločas rozpadu 5 až 6 dní (Bartůňková *et Paulík*, 2011). Nemocní s IgAN mají zvýšené sérové koncentrace IgA, polymerního IgA, IgA revmatoidního faktoru a imunitních komplexů obsahujících IgA. Vzestup sérového IgA se nachází u poloviny pacientů IgAN (Monhart, 2001). Imunoglobulin A je v souvislosti s ledvinovými chorobami vnímán obvykle jen v patogenetickém vztahu k IgA nefropatii. Uplatňuje se však i u řady dalších primárních glomerulonefritid. Glomerulární uloženiny IgA jsou častým nálezem u alkoholické cirhózy a chronických jaterních onemocnění, u nespecifických střevních zánětů a u řady dalších chorob (Bartůňková *et Paulík*, 2011).

2.1.1 IgA1 imunoglobulin

Imunoglobulin A se u člověka a některých primátů vyskytuje ve dvou podtřídách IgA1 a IgA2. Oba izotypy mají vysoký stupeň homologie, jedná se o glykoproteiny lišící se typem glykosylace. Oba mají běžně se vyskytující *N*-glykosidický řetězec, ale IgA1 patří mezi vzácně se vyskytující cirkulující glykoproteiny s navázanými *O*-glykany (Woof *et Mestecky*, 2005). Protože se při IgA nefropatii ukládá v glomerulech výhradně IgA1, je výzkum její patogeneze zaměřen na odchylky v jeho struktuře, především ve struktuře *O*-glykosidicky vázaných cukrů.

Fylogeneticky mladší IgA1 má oproti IgA2 delší spojovací oblast mezi první a druhou konstantní doménou těžkého řetězce, takzvanou pantovou oblast a to o 13 aminokyselin. Evoluční význam vzniku a fixace pantové oblasti IgA1 není dosud zcela objasněn. Přítomnost pantové oblasti IgA1 si však vybírá i svou daň, a to mimo jiné v možnosti vzniku IgAN. Unikátní aminokyselinová sekvence pantové oblasti IgA1, obsahuje dvě oktapeptidové opakování: Pro-Val-Pro-**Ser-Thr**²²⁵Pro-Pro-**Thr**²²⁸Pro-**Ser**²³⁰Pro**Ser**²³²**Thr**²³³-Pro-Pro-**Thr**²³⁶-Pro-**Ser-Pro-Ser**-Cys. Tato část molekuly činí IgA1 výjimečnou mezi cirkulujícími glykoproteiny, protože na hydroxylové skupiny serinu a threoninu se váží cukerné řetězce (*O*-glykany). Z devíti potencionálně možných glykosylačních míst (POGSs, označeny tučně) může být 3 až 6 *O*-glykosylováno. V pantové oblasti IgA2 není zastoupen serin ani threonin, viz **Obrázek č. 2** (Kiryluk *et Novak*, 2014).

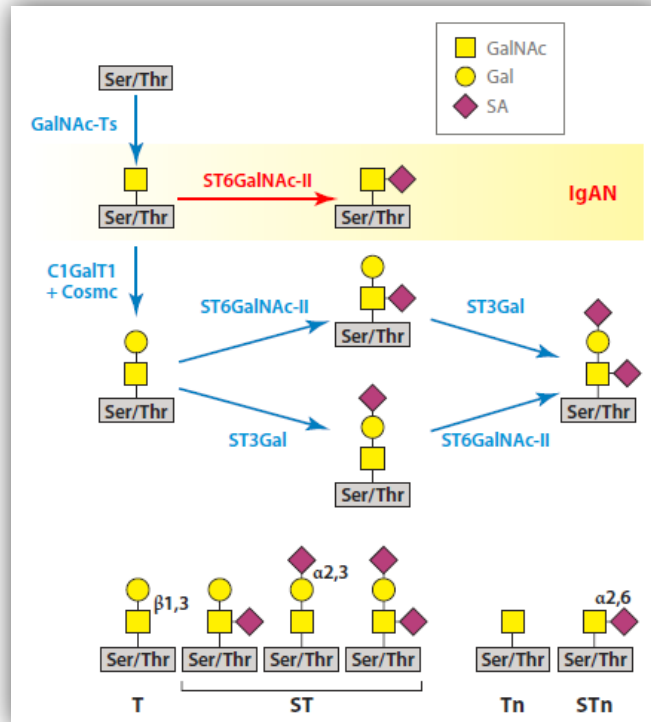
Hlavní funkcí IgA1 je aglutinace a neutralizace slizničních patogenů a toxinů a představuje tak první linii nezánné obrany organismu. Prodloužená pantová oblast IgA1 člověka je místem senzitivním na různé bakteriální IgA1-specifické proteázy, produkované patogeny jako je *Gonococcus*, *Haemophilus*, *Meningococcus* a *Pneumococcus*, které IgA štěpí na F(ab')₂ a Fc fragment. Fab fragment IgA1 protilátky poskytuje bakteriím hydrofilní plášť, který je nezbytný k adhezi na epiteliální povrch a současně chrání bakterie před dalšími imunitními mechanismy (Royle *et al.*, 2003).



Obrázek č. 2: Molekulová struktura mIgA1 a jeho pantové oblasti v porovnání s izotypem IgA2. Pantová oblast IgA1 je složena z krátkých aminokyselinových sekvencí mezi C1 a C2 v $\alpha 1$ těžkém řetězci. Na rozdíl od molekuly IgA2, obsahuje pantová oblast IgA1 dvě oktapeptidové repetice složené z aminokyselinových zbytků serinu (Ser), threoninu (Thr) a prolinu (Pro). Na devíti potencionálních *O*-glykosylačních místech (POGSs) v pantové oblasti IgA1, bývá obvykle vázáno 3 až 6 glykanů (označeny pozičním číslem) přes kyslík na aminokyseliny serin a threonin (převzato a upraveno podle Kiryluk *et Novak*, 2014)

2.1.2 Mechanismus *O*-glykosylace IgA1

Glykosylace se řadí mezi posttranslační modifikace bílkovin, které jsou stále častěji zkoumány ve spojitosti s etiologií mnoha onemocnění. Jedná se o postupný proces syntézy cukerného řetězce, katalyzovaný enzymy ze třídy glykosyltransferáz, které se nacházejí na endoplazmatickém retikulu a v Golgiho aparátu. Podle typu vazby, kterou jsou sacharidy na proteiny navázány, se dělí glykoproteiny na *N*-glykoproteiny a *O*-glykoproteiny (Alberts *et al.*, 2002). Na **Obrázku č. 3** je prezentován proces postupného prodlužování *O*-glykosidického řetězce navázaného na serin či threonin v peptidové páteři pantové oblasti IgA1 a jeho možné varianty. Za normálních okolností začíná syntéza řetězce v Golgiho aparátu lymfoblastů a plazmatických buněk připojením monosacharidu *N*-acetylgalaktosaminu (GalNAc) na hydroxylovou skupinu serinu nebo threoninu, reakce je katalyzována enzymy z rodiny UDP-GalNAc transferáz (GalNAc-Ts) (Suzuki *et al.*, 2011). Bylo prokázáno, že galaktosyltransferáza 2 (GalNAc-T2) iniciuje syntézu všech *O*-vázaných glykanů v pantové oblasti IgA1 a je dominantní v rozvoji IgAN (Stuchlova Horynova *et al.*, 2014). Dalším krokem je vazba galaktózy (Gal), katalyzovaná β 1,3-galaktosyltransferázou (C1GalT1) za účasti molekulárního chaperonu Cosmc, který přispívá ke správnému skládání a stabilizaci C1GalT1. Vzniká tak T antigen (Gal β 1,3GalNAc). Syntéza pokračuje připojením kyseliny sialové (SA) ke galaktóze, za katalýzy enzymem α 2,3-sialyltransferázou (ST3Gal). Výstavba řetězce může pokračovat připojením další SA ke GalNAc katalyzovaným α 2,6-sialyltransferázou (ST6GalNAc-II). Sialylované formy T antigenu (ST antigeny) mohou obsahovat jeden nebo dva zbytky kyseliny sialové (Stuchlova Horynova *et al.*, 2013). V případě IgAN může být tvorba *O*-glykanů zastavena již ve fázi připojeného GalNAc, předčasnou sialylací GalNAc za katalýzy enzymem ST6GalNAc-II (Stuchlova Horynova *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2014). V galaktóze-deficientní *O*-glykany obsahují pouze terminální GalNAc (Tn antigen) nebo sialylovaný GalNAc (STn antigen), jež se podílejí na vzniku IgAN. Bylo zjištěno, že pouze ST6GalNAc-II je exprimován v B-lymfocytech produkujících lidský IgA1, a že transkripce genu kódujícího tento enzym je vyšší u pacientů s IgAN než u zdravých kontrol (Raska *et al.*, 2007). Imunitní komplexy vyvolávající IgA nefropatii vznikají jen v případě nedokončené *O*-glykosylace (Takahashi *et al.*, 2014). Vzhledem k tomu, že pouze malá, ač klinicky významná populace IgA1 u IgAN pacientů je abnormálně glykosylovaná, je studium mechanismů zodpovědných za uvedené abnormality poměrně komplikované. Jako dosud nejlepší model slouží klony B-lymfocytů izolované od IgAN pacientů immortalizované virem Epstein-Barrové (Suzuki *et al.*, 2008).



Obrázek č. 3: Biosyntéza pantové oblasti O-glykanů lidského cirkulujícího IgA1.

Na obrázku jsou znázorněny enzymy z rodiny UPD-GalNAc transferáz (GalNAc-Ts) katalyzující jednotlivé kroky v této dráze. Galaktosyltransferáza 2 (GalNAc-T2) připojuje N-acetylgalaktosamin (GalNAc) na serin nebo threonin pantové oblasti IgA1. V dalším kroku se připojuje galaktóza (Gal), katalyzovaná β 1,3-galaktosyltransferázou (C1GalT1) za účasti molekulárního chaperonu Cosmc za vzniku T antigenu. Syntéza O-glykanů je ukončena připojením sialové kyseliny (SA) ke Gal pomocí α 2,3-sialyltransferázou (ST3Gal) nebo připojením další SA pomocí α 2,6-sialyltransferázy (ST6GalNAc-II). Sialylované formy T antigenu (ST antigeny) zahrnují N-acetylgalaktosamin (GalNAc) s galaktózou, který může obsahovat až dva zbytky SA. V galaktóze-deficientní O-glykany podílející se na vzniku IgAN obsahují pouze terminální GalNAc (Tn antigen) nebo sialylovaný GalNAc (STn antigen) (upraveno podle Mestecky *et al.*, 2013)

Snížené zastoupení Gal v glykanech pantové oblasti IgA1 nemůže být vysvětleno pouhými změnami v hladinách klíčových enzymů zapojených do mechanismu O-glykosylace. Mezi další faktory, které ovlivňují celý proces, se řadí nejen abnormální struktura zapojených enzymů, ale zřejmě i jejich lokalizace v Golgiho komplexu, ve kterém proces O-glykosylace probíhá (Horynová *et al.*, 2012). Suzuki *et al.* zjistili, že na aberantní O-glykosylaci se mohou také podílet cytokiny. Z osmi testovaných pouze interleukin 6 (IL-6) a v menší míře, IL-4 výrazně zvyšují hladiny v galaktóze-deficientních IgA1 (Suzuki *et al.*, 2014).

2.2 Molekulární podstata IgA nefropatie

Studie molekulárních a buněčných interakcí podílejících se na patogenezi IgAN odhalily autoimunitní povahu této nejčastější primární glomerulonefritidy. Současné údaje ukazují, že na vzniku onemocnění se podílí systémový proces, při kterém jsou ledviny poškozeny vlivem imunitních komplexů (IK) složených z abnormálně glykosylovaného IgA1 a IgG autoprotilátky proti IgA1. Deponované imunokomplexy mohou vyvolat proliferaci mezangiálních buněk, zvýšenou produkci proteinů extracelulární matrix, tvorbu cytokinů a v konečném důsledku selhání ledvin.

Ke klinické manifestaci IgAN je tedy potřeba několika společně probíhajících procesů, které vedou k poškození ledvin:

1. Přítomnost pIgA1 s abnormálně glykosylovanou pantovou oblastí;
2. Syntéza autoprotilátek (IgG, IgA) specificky rozlišující v galaktóze-deficientní pIgA1;
3. Vazba v galaktóze-deficientních IgA1 (Gd-IgA1) s antiglykanovými příp. glykopeptidovými protilátkami, za tvorby cirkulujících imunitních komplexů (CIK);
4. Akumulace těchto CIK v glomerulárním mezangiu, aktivace mezangiálních buněk, iniciace a rozvoj poškození ledvin (Mestecky *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2011).

2.2.1 Dědičné zvýšení v galaktóze-deficientních IgA1

Stejně jako v případě jiných imunoglobulinů je IgA1 glykosylovaný. Změna v jeho původní glykosylaci byla uznána jako potencionálně patogenní abnormalita u IgAN po téměř 20 letech od klasifikace IgAN (Coppo *et al.*, 2010). Hypotéza o účasti odchylné glykosylace IgA1 v patogenezi IgAN je v současnosti jistotou. Hlavním rysem je nedostatek galaktózy v pantové oblasti IgA1 těžkých řetězců. Pacienti s IgAN mají zvýšené hodnoty cirkulujících IgA1 se zkrácenými řetězci glykanů složených z *N*-acetylgalaktosaminu s nebo bez navázané kyseliny sialové, které postrádají galaktózu. *Helix aspersa agglutinin* (HAA) je specifický lektin rozpoznávající epitopy obsahující GalNAc, který se velmi často používá v ELISA testech pro měření množství Gd-IgA1, po úpravě molekuly IgA1 neuraminidázou je odstraněna terminální SA (Moldoveanu *et al.*, 2007). Poslední studie s využitím hmotnostní spektrometrie ukazují významnou heterogenitu ve složení a počtu připojovacích míst těchto glykanů. Stanovení přesné strukturální abnormality u IgAN pacientů komplikují rozličné *O*-glykosylace a kombinatorní možnosti glykanových variant. Nicméně vyšetření buněk

produkcí IgA1 ukazuje, že aberantní *O*-glykosylace u IgAN je urychlována kombinováním abnormalit v míře exprese nebo aktivitách glykosyltransferáz zapojených v *O*-glykosylaci IgA1 (Suzuki *et al.*, 2009). Cirkulující IgA1 je produkován především v kostní dřeni, zatímco aberantně glykosylované formy IgA1 mohou být syntetizovány v souvislosti s infekcemi sliznic. Tím mohou být abnormality ve slizniční imunitní odpovědi zapojeny do produkce Gd-IgA1. Například krevní hladiny Gd-IgA1 namířených proti slizničním patogenům, jsou značně zvýšeny u pacientů s IgAN ve srovnání se zdravými kontrolami (Gharavi *et al.*, 2008). Tento proces může zahrnovat například dysregulaci vrozené imunitní odpovědi přes *Toll-like* receptory (Suzuki *et al.*, 2008). Sérové koncentrace Gd-IgA1 jsou nad 90 percentil pro zdravé kontroly a u 70 až 80 % z IgAN pacientů. Navíc 40 až 50 % blízkých příbuzných pacientů s IgAN mají zvýšené hladiny srovnatelné s pacienty, což dokazuje signifikantní dědičnost predispozic k IgAN a rovněž již zmíněný fakt, že sama galaktózová deficeience IgA1 není dostatečným spouštěčem IgAN. Dědičnost Gd-IgA1 je pozorována u různých rasových skupin a nejsou vysvětleny rozdíly v sérových IgA, což naznačuje, že různé genetické mechanismy ovlivňují IgA1 glykosylaci a syntézu. Nedávné studie také ukazují, že aberantní IgA1 glykosylace patrně předchází klinicky zjevnému onemocnění a představuje tak dědičný rizikový faktor pro rozvoj IgAN. Navíc většina osob se zvýšenými hladinami Gd-IgA1 nevykazuje klinické poškození ledvin, proto je nutné spojovat další patogenetické faktory do souvislosti s IgAN (Gharavi *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2011).

2.2.2 Syntéza protilátek proti v galaktóze-deficientnímu IgA1

V krvi pacientů s IgAN se v odpovědi na aberantně glykosylované IgA1 syntetizují autoprottilátky proti IgA1, nejčastěji třídy IgG. Bylo dokázáno, že tyto IgG autoprottilátky rozpoznávají terminální (negalaktosylované) GalNAc v pantové oblasti IgA1, což představuje autoimunitní složku pro IgAN (Tomana *et al.*, 1999). Jak bylo demonstrováno zejména v rámci rozsáhlých studií souvisejících s popisem mechanismů přirozené imunitní odpovědi proti rozvoji nejrůznějších forem adenokarcinomů (Stuchlova Horynova *et al.*, 2013), přirozené cukerně specifické prottilátky se vyskytují u každého jedince. Jejich hladina a zřejmě i afinita však není optimální pro tvorbu IK u IgAN. Nedávná studie struktury prottilátek vázících se na abnormálně galaktosylované (deficientní v Gal) IgA1, provedená pomocí immortalizovaných B-lymfocytů z periferní krve pacientů s IgAN, ukázala, že tyto buňky produkují IgG prottilátky s unikátní strukturou hypervariabilní oblasti 3 (CDR3), spočívající v přítomnosti substituce alaninu za serin, přičemž tyto prottilátky vytvářejí IK

s abnormálně galaktosylovaným IgA1 (Huang *et al.*, 2016). U skupiny paralelně připravených klonů B-lymfocytů od zdravých kontrol tato substituce nebyla prokázána (Suzuki *et al.*, 2009). Lze předpokládat, že tyto protilátky jsou produkovány v reakci na glykokonjugáty GalNAc, které produkují bakterie a viry na svém buněčném povrchu a potom zkříženě reagují s galaktóza-deficientními *O*-glykany na molekule IgA1 (Tomana *et al.*, 1999). Převládající IgA1 autoprotiilátková odpověď namířená proti Gd-IgA1 může vysvětlit, proč někteří IgAN pacienti mají IgA1 jako jediný imunoglobulinový izotyp v glomerulech. Je třeba poznamenat, že přítomnost IgG v renálních biopsiích také koreluje s mezangiální a endokapilární buněčností (Suzuki *et al.*, 2011).

Za iniciální mechanismus vzniku Gd-IgA1 je většinou považována virová či bakteriální infekce a cytokinová dysregulace. Předpokládá se, že tento proces zahrnuje dysregulaci vrozené imunitní reakce přes *Toll-like* receptory (Smith *et al.*, 2006). V literatuře je infekční etiologie IgAN nejčastěji spojována s nukleárním antigenem viru Epstein-Barrové, *H. parainfluenzae* a Gram pozitivními bakteriemi rodu *Streptococcus*. Řada těchto agens byla prokázána v mezangiu ledvin nemocných s IgAN a dříve byly antigeny považovány za cíl specifické reakce Gd-IgA1 s následnou tvorbou imunitních komplexů, ale výsledky různých studií byly nekonzistentní a současný převažující názor vysvětluje tvorbu imunitních komplexů jako důsledek vazby Gd-IgA1 a autoprotiilátky IgG případně IgA (Suzuki *et al.*, 2011; Tomana *et al.*, 1999).

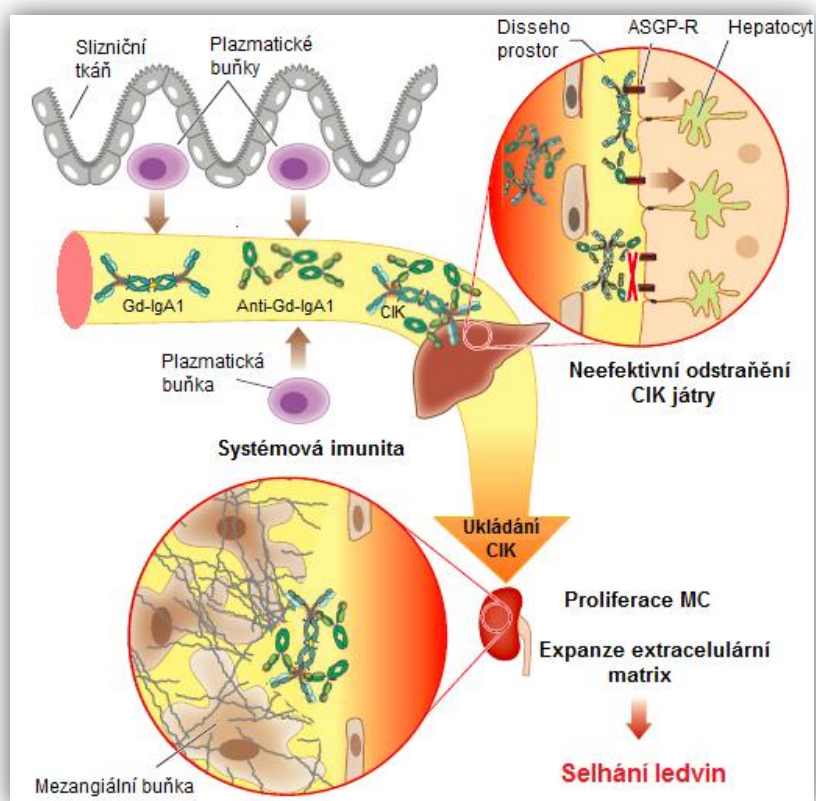
2.2.3 Vznik cirkulujících imunokomplexů a jejich biologická aktivita

Cirkulující imunokomplexy se skládají z polymerního IgA1, který hraje roli antigenu, a IgG (nebo dalšího IgA1), který se uplatňuje jako autoprotiilátka specificky rozlišující IgA1. Příčinou IgA nefropatie je nadměrná tvorba velkých cirkulujících imunitních komplexů (> 800 kDa), obsahujících IgA1 a IgG. Bylo prokázáno, že až 44 % pacientů s IgAN má zvýšené hladiny CIK (Czerkinski *et al.*, 1986). Jestliže *O*-glykosylovaný řetězec IgA1 není dostavěn a vznikají CIK, nemůže se IgA1 v nich obsažené katabolizovat běžným způsobem v játrech tj. procházet endoteliálními fenestacemi jaterních sinusů do Disseho prostoru a vázat se na asialoglykoproteinový receptor (ASGPR) hepatocytů. Perzistuje tudíž v krevním oběhu a vzhledem k vysokému ultrafiltračnímu tlaku a jedinečné struktuře glomerulárního mezangia se komplexy ukládají právě zde, viz **Obrázek č. 4** (Tomana *et al.*, 1999).

Přítomnost CIK není jedinečná pouze pro pacienty s IgAN. Tyto komplexy mohou být detekovány také u osob bez zjevného onemocnění ledvin, včetně zdravých jedinců a pacientů

s Henoch-Schönleinovou purpurou bez nefritidy. Analogicky s jinými lidskými onemocněními způsobenými imunitními komplexy, je pravděpodobné, že u IgAN určuje velikost vytvořených IK molární poměr antigenů tj. Gd-IgA1 a autoprotilátek IgG nebo IgA (Suzuki *et al.*, 2011).

Biologická aktivita velkých imunitních komplexů tvořených Gd-IgA1 je zvýšená u pacientů s IgAN během případů makroskopické hematurie (Novak *et al.*, 2005). Nicméně není známo, zda toto zvýšení aktivity je způsobeno v důsledku vyšší produkce Gd-IgA1, antiglykanových protilátek nebo jiných nedefinovaných faktorů ovlivňující tvorbu těchto komplexů nebo jejich složení (Novak *et al.*, 2011). Objasnění strukturální podstaty imunokomplexů a jejich biologické aktivity může poskytnout racionální základ pro efektivní, imunologicky zprostředkovanou inhibici jejich nefrotoxicity jako specifický terapeutický přístup (Raska *et al.*, 2011).



Obrázek č. 4: Předpokládaná patofyziologie IgA nefropatie.

Gd-IgA1 je produkován slizničními plazmatickými buňkami jako reakce na místní infekci. Protilátky Anti-Gd-IgA1 jsou produkovány plazmatickými buňkami v systémovém nebo slizničním kompartmentu. V periferním krevním oběhu tak vznikají velké (>800 kDa) CIK obsahují Gd-IgA1, které je v nekomplexované podobě eliminováno játry (hnědé šipky) zdravých jedinců i pacientů s IgAN prostřednictvím vazby na asialoglykoproteinový receptor (ASGP-R). Velké CIK nejsou efektivně inaktivovány játry, kvůli omezené průchodnosti skrze endoteliální fenestrace do Disseho prostoru

a interakci s ASGP-R. CIK migrují krevním oběhem do glomerulárních kapilár ledvin, kde interagují s MC a navozují jejich proliferaci, tvorbu proteinů extracelulární matrix a prozánětlivých cytokinů. V důsledku těchto procesů dojde u 20 až 40 % pacientů s IgAN k selhání ledvin (převzato a upraveno dle Mestecky *et al.*, 2013)

2.2.4 Aktivace mezangiálních buněk a glomerulární poškození

Z etiopatologického pohledu je zřejmé, že u IgAN vede přítomnost IK v mezangiu glomerulů ke stimulaci mezangiální proliferace a posléze k rozvoji sklerotizace mezangia a atrofie tubulů. Patogenní význam CIK byl prokázán v *in vitro* studiích. Komplexy Gd-IgA1 aktivují kultivované lidské mezangiální buňky k proliferaci, sekreci složek extracelulární matrix a uvolňování humorálních faktorů imunity jako TNF- α , TNF- β , IL-6. Tyto faktory mohou měnit genovou expresi v podocytech a glomerulární permeabilitu (Lai *et al.*, 2008). Imunitní komplexy pacientů s IgAN se váží k mezangiálním buňkám mnohem efektivněji než samotný nekomplexovaný IgA1 nebo IK od zdravých kontrol. Studium závislosti proliferační odpovědi mezangiálních buněk na molekulové hmotnosti CIK ukázalo, že ne všechny CIK stimulují proliferaci mezangiálních buněk stejně. Experimentálně bylo prokázáno, že jako nejefektivnější stimulatory působí CIK o molekulové hmotnosti 800–900 kDa, kdežto menší CIK (700–800 kDa) mají opačnou biologickou aktivitu a proliferaci tlumí (Novak *et al.*, 2005).

Buněčné receptory na mezangiálních buňkách zapojené do vazby s IgA1 zatím nejsou dobře známy. CIK vykazují vysokou afinitu ke složkám extracelulární matrix, fibronektinu a kolagenu typu IV v mezangiu, přednostně se váží a současně aktivují mezangiální buňky (Suzuki *et al.*, 2011). Ve snaze o identifikaci zodpovědného receptoru na mezangiálních buňkách byla studována exprese dosud známých IgA receptorů (CD89, polymerní Ig receptor, ASGP-R) a doplňkových receptorů pro složky komplementu (CR1-3), ovšem bez úspěchu (Novak *et al.*, 2002). Nicméně v roce 2001 Moura *et al.* identifikovali transferrinový receptor (CD71), exprimovaný na povrchu proliferujících lidských mezangiálních buněk, jakožto receptor pro polymerní formu IgA1. Navíc, CD71 na lidských mezangiálních buňkách účinně váže IK obsahující Gd-IgA1. Tato vazba vede zpětnovazebně k jeho zvýšené expresi. Zdá se však, že mimo CD71 musí být do indukce proliferace zapojen ještě jiný receptor nebo CD71 musí být ve zvláštní stérické konformaci, neboť se váže zejména s pIgA1, který však ve volné formě mezangiální proliferaci nenavozuje (Moura *et al.*, 2001; Novak *et al.*, 2002). Patogeneze IgAN se dále účastní Fc α RI receptor (CD89) exprimovaný na povrchu

myeloidních buněk. U pacientů s IgAN jsou měřeny vysoké hladiny rozpustného CD89 (sCD89). V krevním oběhu byl sCD89 detekován jako součást CIK. Dále byl také sCD89 prokázán v mezangiálních depozitech biopsií ledvin IgAN pacientů (Grossetête *et al.*, 1998). Gd-IgA1 indukuje uvolňování sCD89, který se podílí na tvorbě CIK. Tyto komplexy jsou zachyceny CD71, který je nadměrně exprimován v mezangiálních buňkách u pacientů IgAN a umožňuje tvorbu nefritogenních komplexů *in situ* a aktivaci mezangia (Launay *et al.*, 2000).

Rozsah a intenzita glomerulárního poškození jsou mimořádně proměnlivé a faktory ovlivňující ukládání imunokomplexů nemusí nutně podmiňovat rozsah odpovědi mezangia. Také růstové faktory jsou považovány za klíčové pro přestavbu mezangia u pacientů s IgAN. Bylo zjištěno, že destičkový růstový faktor (*angl.* platelet-derived growth factor; PDGF), produkovaný mezangiálními buňkami, může přispívat k mezangiální skleróze, zatímco TGF- β (*angl.* transforming growth factor β) produkovaný podocyty je odpovědný za tvorbu struktur fokálně-segmentární glomerulosklerózy u IgA nefropatie (Kim *et al.*, 2002). Dále místní aktivace komplementu potencuje poškození glomerulů u IgAN pacientů. Aberantní glykosylace IgA1 a molekulová hmotnost CIK jsou důležitými faktory schopnosti pIgA1 aktivovat komplement alternativní cestou. Renální biopsie proto mohou mít obvykle zjiznitelnou C3 složku, zatímco složky klasické cesty, jako například C1q, obvykle chybí. Poměrně častá depozice C4 složky komplementu nasvědčuje pro účast lektinové cesty aktivace komplementu (Suzuki *et al.*, 2011). Tyto mechanismy mají důležitou roli v klinické a terapeutické oblasti, protože subklinické nálezy jsou v souladu s IgAN a jsou běžné v obecné populaci. Pro hodnocení významu bioptického nálezu mezangiálních IgA depozit u jedinců bez klinických známek onemocnění je nutné zdůraznit, že při IgAN hrají patologickou roli pouze velké IK obsahující pIgA1, nikoli samostatné IgA, neboť průkaz mezangiálních depozit IgA je v populaci mnohem čtenější než výskyt IgAN (Waldherr *et al.*, 1989).

2.3 Genetika IgA nefropatie

IgAN není vysloveně familiární chorobou, přestože rodinný výskyt byl opakovaně popsán. Existuje však řada dokladů o významu genetických faktorů v její patogenezi (Julian *et al.*, 1985). V nedávné celogenomové asociační studii jednonukleotidových polymorfismů (GWAS SNP) bylo identifikováno na populaci IgAN pacientů a kontrol čítající přes 20 000 jedinců nejrůznějších ras 15 lokusů s významnou asociací SNP a IgAN. Analýza prokázala asociaci rizika vývoje IgAN s polymorfismy hlavního histokompatibilního systému (HLA-DQB1, TAP1-PSMB8 a HLA-DP) na chromozomu 6p21 (Kiryluk *et al.*, 2014). Alela DQB1*0602 snížila pravděpodobnost vzniku IgAN o více než 50 % na kopii (Suzuki *et al.*, 2011). Dále byly identifikovány čtyři významné lokusy mimo HLA oblast, které hrají roli v riziku vývoje IgAN – úsek na chromozomu 1q32 s delecí genu pro protein příbuzný s faktorem H-komplementu (CFHR3-CFHR1); úsek chromozomu 8p23 obsahující shluk genů DEFA pro α -defenziny významné pro přirozenou obranu včetně sliznic gastrointestinálního traktu; úsek chromozomu 17p13 včetně genu pro TNFSF13 kódujícím APRIL molekulu zapojenou mimo jiné do izotypového přesmyku imunoglobulinu směrem k IgA1; úsek chromozomu 22q12 zahrnující gen kódující protein HORMAD2, jenž je zapojen do signalizačních drah pro rozvoj zánětlivé odpovědi, produkci a glykosylaci IgA1 a několik dalších lokusů (Kiryluk *et Novak*, 2014).

Lokusy, pro které byla v těchto studiích prokázána asociace s IgAN, ukazují na souvislost tohoto onemocnění s udržováním intestinální střevní bariéry, aktivací slizniční produkce IgA, obranou proti intracelulárním patogenům a aktivací komplementu. Celkově těchto 15 nezávislých rizikových alel významně ovlivňuje věk manifestace onemocnění. Geny predisponující pacienty k IgAN se navíc významně překrývají s lokusy pro jiná autoimunitní a zánětlivá onemocnění, což zařazuje IgAN do tohoto spektra (Mestecky *et al.*, 2013). Značné rozdíly ve výskytu rizikových alel mezi různými populacemi mohou také vysvětlit některé geografické rozdíly v rozšíření choroby. Nejvýznamnější asociace byla prokázána mezi genetickým skóre IgAN a lokální diverzitou patogenů, zejména střevních červů (Kiryluk *et al.*, 2014). Objasnění patogeneze IgAN a možnosti terapeutického ovlivnění je proto významnou oblastí zájmu současné nefrologie.

2.4 Léčba IgA nefropatie

IgAN je nejčastější příčinou selhání ledvin mezi primárními glomerulonefritidami. Zásadním problémem je její obtížná diagnostika zejména v raných stádiích onemocnění. Navzdory zřetelnému pokroku v objasnění patogeneze IgAN není dosud známa její specifická léčba, ovšem úbytek ledvinové funkce lze terapeuticky zpomalit. Mezi léčebné zásahy patří snížený příjem bílkovin úměrně snížené funkci ledvin, normalizace krevního tlaku za použití inhibitorů enzymu konvertujícího angiotenzin (ACE) či blokátorů receptoru pro angiotenzin II (sartany) v dráze renin-angiotenzin-aldosteron (Hraskova *et al.*, 2006). V současnosti nejvíce respektovaný doporučený postup léčby glomerulonefritid, KDIGO (*angl.* Kidney Improving Global Outcome), klade důraz na kombinaci ACE a sartanů jako základní přístup léčby IgAN. Není nutné jimi léčit pacienty s optimálním krevním tlakem, normální glomerulární filtrací a proteinurií pod 0,3 g/24 hodin. Nesníží-li se proteinurie pod 0,5 g/24 hodin v průběhu několika týdnů či měsíců, přistupuje se k imunosupresivní léčbě (Pozzi, 2015).

V léčbě IgAN se používá řada imunosupresiv (např. Prednison) se závažnými nežádoucími účinky, které mohou některé pacienty spíše poškodit než jim pomoci. Vnímavost a reakce na imunosupresivní léčbu s dobou trvání a počtem relapsů klesá, proto při léčbě relapsů aplikujeme nejprve ty léky, na něž onemocnění v minulosti příznivě reagovalo. Doba podávání imunosupresivní léčby silně závisí na výskytu vedlejších příznaků, vždy je snaha přivést nemoc až do úplné remise, tj. zejména k vymizení proteinurie (Matousovic *et al.*, 2008). Pacienti s normální renální funkcí a proteinurií 1,0–3,5 g/24 hodin by měli být léčeni šestiměsíčním cyklem kortikosteroidů. U pacientů s progresí do chronické renální insuficience je indikována léčba kombinací prednisonu s cytostatiky (cyklofosfamid, azathioprin) (Pozzi, 2015).

Tonzilektomie patří po léta mezi diskutovaná témata v léčbě IgAN. Řada experimentálních studií přináší doklady o možné úloze tonzil a tonzilárních lymfocytů a monocytů v patogenezi IgAN. Přesto není dosud jasné, kdy u IgAN tonzilektomii indikovat. Japonští autoři popsali příznivý vliv tonzilektomie v kombinaci s glukokortikoidy na výskyt makroskopické hematurie i dlouhodobou prognózu, bohužel však jen v retrospektivních studiích (Hotta *et al.*, 2001). Zatím však stále platí, že u pacientů s IgAN je indikována tonzilektomie jen při recidivujících tonzilitidách. Význam tohoto výkonu obecně nebyl dostatečně prokázán a dle KDIGO není doporučován IgAN pacientům z jiné než otorinolaringologické indikace (Matousovic *et al.*, 2008). Dle současných Japonských studií je ovšem tonzilektomie opět doporučována (Liu *et al.*, 2015).

Některé studie ukazují, že také rybí olej může být prospěšný v léčbě IgA nefropatie. Dle studie provedené v Mayo Clinic je rybí olej doporučován ve vysokých dávkách (12 g/den) pacientům s proteinurií nad 1 g/24 hodin, u nichž proteinurie nepoklesla po předchozí léčbě inhibitory ACE či sartany (Donadio *et al.*, 2001). V praxi je toto doporučení jen obtížně realizovatelné vzhledem k finanční náročnosti při nutnosti vysokých dávek rybího oleje (Matousovic *et al.*, 2008).

Pokud dochází k postupnému zhoršování funkce ledvin, bývá zahájena dialyzační léčba. Transplantace ledvin je sice možná, ale při trvajícím onemocnění mohou být i nově transplantované ledviny poškozované hromadícím se IgA (Hraskova *et al.*, 2006).

2.4.1 Výhledy kauzální léčby

Kauzální léčba IgAN dosud není známa, ovšem nové poznatky o patogenezí choroby nabízejí možnosti zásahu v časně fázi patogenetického řetězce. Hlavním smyslem kauzální léčby je tedy potlačení tvorby velkých nefritogenních IK, které poškozují glomerulární mezangium. Změnou molární koncentrace antigenu (aberantně glykosylovaný IgA1), anebo autoprotilátky (IgG či IgA1) by se mohlo podařit posunout interakci mezi antigenem a protilátkou směrem ke stavu, kdy se tvoří CIK o nízké molekulové hmotnosti, které mají vysokou plazmatickou clearance a nepoškozovaly by ledviny.

Teoretických možností léčby je několik a jsou založeny na zablokování vazebného místa pro autoprotilátku, například pomocí glykopeptidů nesoucích nedostavěné *O*-glykosidické řetězce nebo na snížení sérové koncentrace volné IgA1 protilátky s abnormálními *O*-glykany (Raska *et al.*, 2011). Pro terapeutické účely se jako možné jeví rovněž využití různých variant lehké isoformy (30 kDa) solubilního vysokoafinitního receptoru pro pIgA1 (sCD89), u něž se předpokládá schopnost bránit vazbě *O*-glykanových specifických IgG a tím tvorbě velkých nefritogenních IK (Monteiro *et al.*, 2003). U myšího modelu (α 1KI-CD89Tg) IgAN je sCD89 používán k indukci poškození ledvin. *In vivo* testování rekombinantní IgA1 proteázy u tohoto modelu, prokázalo výrazný pokles IgA1-sCD89 komplexů (Lechner *et al.*, 2016). Další možností je příprava monovaletních fragmentů autoprotilátek (Fab nebo Fv polypeptidy), které by vzhledem k přítomnosti pouze jednoho vazebného místa pro antigen nemohly spojovat molekuly IgA1. Oba přístupy jsou již nyní studovány *in vitro*, v budoucnosti ovšem musí být ověřeny v experimentálním modelu IgA nefropatie *in vivo*. IgA1 se však nachází jen u člověka a některých primátů, což komplikuje testování na běžných laboratorních zvířatech (Matousovic *et al.*, 2015).

2.5 Proliferační testy

Proliferační testy patří mezi *in vitro* vyšetřovací metody v imunologii, zaměřené na hodnocení specifické buněčné imunity u pacientů s imunodeficiencemi, autoimunitními, infekčními a nádorovými onemocněními. Tyto testy sledují parametry pro určení rychlosti buněčné proliferace, rychlosti syntézy deoxyribonukleové kyseliny, metabolickou aktivitu buněk a antigeny spojené s buněčnou proliferací (Yadav *et al.*, 2014).

S rozvojem nových proliferačních testů byl kladen důraz zejména na nahrazení potencionálně nebezpečných radioaktivních metod. Tyto proliferační testy proto využívají kolorimetrické, chemiluminiscenční nebo fluorescenční značky. Neradioaktivní variantou thymidinové metody je BrdU test (bromo-2'-deoxyuridin), hodnocen metodou ELISA. Denaturovaná DNA je inkubována s BrdU, který je inkorporován do DNA dělících se buněk. Pomocí anti-bromo-2'-deoxyuridin monoklonálních protilátek je začleněný BrdU detekován. Vzniklý komplex je vizualizován protilátkou vázanou s křenovou peroxidázou, která katalyzuje konverzi chromogenního substrátu z bezbarvého roztoku na barevný produkt. Intenzita zbarvení je úměrná množství zabudovaného BrdU v DNA buněk. Barevný reakční produkt je kvantifikován spektrometricky (Messele *et al.*, 2000). Mezi další proliferační metody patří intracelulární barvení fluorochromem CFSE (karboxyfluorescein sukcinimidyl ester). Fluorescenční signál je měřen pomocí průtokové cytometrie, jejíž hlavní výhodou je sledování proliferační odpovědi jednotlivých buněčných subpopulací a životnosti buněk v čase (Lyons *et Parish*, 1994).

2.5.1 Metoda inkorporace ³H-thymidinu

Na trhu existuje celá řada metod využívaných ke studiu buněčné proliferace, ovšem nejspolehlivější proliferační testy se vyznačují přímým měřením syntézy DNA. Metoda inkorporace ³H-thymidinu je považována již několik desítek let za standard mezi proliferačními testy. Zejména pro svou vysokou citlivost nebyla dosud thymidinová metoda překonána ani jinými neradioaktivními metodami. Tato metoda využívá schopnosti buněk zabudovat radioaktivní nukleosid do nově vznikajících řetězců chromozomální DNA v průběhu mitotického dělení. V klasickém provedení se měří inkorporace radioaktivního ³H-thymidinu do DNA proliferujících buněk po předchozí stimulaci. Množství inkorporovaného ³H-thymidinu je kvantifikováno scintilačním analyzátozem pro detekci β-záření. Radioaktivně značená DNA je obvykle zachycena sběračem buněk na filtry ze skleněných vláken, které jsou po přidání scintilační kapaliny vyhodnoceny v kapalinovém

scintilačním β -counteru, v němž je měřena luminiscence, která vzniká převodem radiační energie na světelný signál. Výsledky jsou vyjádřeny jako počet světelných impulzů za minutu (cpm). Proliferační schopnost dělicích se buněk je v přímé úměře naměřeným světelným impulzům (Bartůňková *et* Paulík, 2011).

2.5.2 Metoda intracelulárního barvení fluorochromem CFSE

Barvení karboxyfluorescein sukcinimidyl esterem je metoda široce používaná pro sledování buněčné proliferace. Jedná se o univerzální nástroj pro fluorescenční intracelulární značení živých buněk. Obarvené buňky mohou být analyzovány pomocí průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. Principem této metody je barvení buněk karboxyfluorescein diacetát sukcinimidyl esterem (CFDA-SE), který díky acetátovým skupinám mnohem lépe proniká do buněčného cytosolu. Po deacetylaci intracelulárními esterázami je molekula převedena na CFSE, čímž získá fluorescenční vlastnosti. Díky pevné kovalentní vazbě k volným aminoskupinám na makromolekulách v cytoplazmě může být CFSE vázáno v buňkách velmi dlouhou dobu (Lyons *et* Parish, 1994). U proliferujících buněk lze sledovat snižování intenzity fluorescence z důvodu postupného rozdělování barviva zachyceného buňkou mateřskou mezi buňky dceřiné (Parish, 1999). Úbytek fluorescence je měřitelný pomocí průtokové cytometrie a odpovídá proliferační aktivitě buněčné suspenze. Jediným omezením je, že CFSE ve vysokých koncentracích může být pro buňky toxické. Nicméně, je-li značení CFSE prováděno optimálně, lze rozlišit přibližně 7–8 buněčných dělení, přičemž po 7. buněčném dělení se fluorescenční signál téměř vyrovnává přirozené autofluorescenci pozadí (Quah *et* Parish, 2012).

3 CÍL PRÁCE

Cílem experimentální části diplomové práce bylo porovnání proliferační aktivity sér pacientů s IgAN a kontrolní skupiny pacientů bez IgAN, stanovení celkového IgA a množství imunokomplexů.

Dále frakcionace patientských sér a vyhodnocení proliferačního potenciálu jednotlivých frakcí. Bližší charakterizace jednotlivých vzorků, stanovení celkového IgA a množství imunokomplexů.

4 MATERIÁL

4.1 Krevní séra pacientů

Krevní vzorky pacientů byly poskytnuty Oddělením nefrologie III. interní kliniky FN Olomouc a II. interní klinikou FN Motol. Zdravotnický personál odebral 6 ml srážlivé krve do zkumavky se separačním gelem. Krev byla dále zpracována na ústavu imunologie, nechala se srážet po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Následovala centrifugace při 2500 otáčkách, 10 min, 4°C. Supernatant byl odpipetován do čisté zkumavky a před dalšími experimenty bylo sérum uchováno při -80°C.

Jednotlivá patientská séra jsou na ústavu imunologie standardně abecedně značena podle časového intervalu jednotlivých odběrů v konkrétní fázi onemocnění a rozdělena do skupin. V experimentech diplomové práce byla použita séra pacientů s IgAN, porovnávaná s kontrolní skupinou pacientů bez IgAN, soubor analyzovaných vzorků se standardním značením je uveden v **Tabulce č. 2**.

Tabulka č. 2: Charakterizace souboru analyzovaných vzorků.

Značení	Počet	Diagnóza	Specifikace
A	15	IgAN	<i>Před zahájením</i> kortikosteroidní terapie u pacientů s IgAN
B	4	IgAN	<i>1 týden po zahájení</i> kortikosteroidní terapie u pacientů s IgAN
C	1	IgAN	<i>1 měsíc po zahájení</i> kortikosteroidní terapie u pacientů s IgAN
D	11	IgAN	<i>Klidová fáze</i> IgAN
E	–	IgAN	<i>Akutní respirační infekce</i> u pacientů s IgAN
F	20	Kontrola	<i>Kontrolní skupina</i> biopťovaných pacientů s jinou glomerulopatií

4.2 Mezangiální buňky

V experimentech diplomové práce byly použity lidské mezangiální buňky (NHMC, kat. č. 2559, Lonza, Basilej, Švýcarsko), pozitivní pro expresi cytokeratinu 18, 19 a fibronektinu. Buňky 4–5. pasáže byly kultivovány v RPMI 1640 médiu s 20% fetálním hovězím sérem (FBS) a antibiotiky (penicilin – 100 U/ml, streptomycin – 100 µg/ml). Kultivace probíhala v 5% CO₂ atmosféře při teplotě 37°C.

4.3 Použité chemikálie

V experimentech byly použity následující chemikálie: Azid sodný – 10% roztok (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma Aldrich, St. Louis, USA), fetální hovězí sérum (Biochrom, Berlín, Německo), fosfátový pufr s chloridem sodným (PBS; Biochrom, Berlin, Německo), ^3H -thymidin (1 μCi ; PerkinElmer, Wellesley, USA), hovězí sérový albumin (BSA; Sigma Aldrich, St. Louis, USA), karboxyfluorescein sukcinimidyl ester (CFSE; Sigma Aldrich, St. Louis, USA), KCl (Lach-Ner, Mělník), KH_2PO_4 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), kyselina citronová (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), NaCl (Penta, Praha), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), destičkový růstový faktor (PDGF; 10 ng/ml R&D Systém, Minneapolis, USA), *o*-fenylendiamin dihydrochlorid (OPD; 10 mg/tabletu; Sigma Aldrich, St. Louis, USA), Penicillin-Streptomycin Solution 100X (Biosera, Boussens, Francie), Peroxid vodíku – 30% roztok (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), RPMI 1640 (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific, Inc., USA), Scintilační kapalina (Ultima Gold[™]; PerkinElmer, Wellesley, USA), Trypsin-EDTA v PBS (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), Tween-20 (SERVA, Heidelberg, Německo)

4.4 Použité protilátky

V experimentální části diplomové práce byly použity specifické protilátky: AffiniPure F (ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG, Fc_γ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA), AffiniPure F (ab')₂ Fragment Goat Anti-Human Serum IgA, α -Chain Specific (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA), Biotin-SP-Conjugated AffiniPure F (ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgA, α -Chain Specific (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA), ExtraAvidine Peroxidase (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), ChromPure Human IgA Serum (4,5 mg/ml; Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA)

4.5 Použité roztoky

V experimentech byly použity následující roztoky připravované v laboratoři:

Zásobní roztok 10x PBS: 240 g NaCl + 6g KCl + 40 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ + 6 g KH_2PO_4 , rozpustit ve 3 l deionizované vody; pH 7,4

Pracovní roztok 1x PBS: 900 ml deionizované vody + 100 ml zásobního roztoku 10x PBS

PBS s Tweenem-20 (PBST): do 1 l pracovního roztoku 1x PBS se přidá 0,5 ml Tweenu-20

1% BSA/PBST: do 500 ml PBST pufru se přidá 5 g BSA

OPD pufr: 18,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ + 5,1 g kyselina citronová, rozpustit v 1 l deionizované vody; pH 5,0

4.6 Ostatní materiál

Dávkovací mikropipety + sterilní špičky (2–20 μl , 20–200 μl , 100–1000 μl), filtrační papír ze skleněných vláken (Glass Fiber Filters; Packard BioScience company, Arvada, USA), chromatografická kolona o rozměrech 750 × 15 mm (Bio-Rad, Hercules, USA), mikrozkuřavky Eppendorf, mikrotitrační deska 96 jamková (Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko), mikrotitrační deska MaxiSorbTM (Thermo Scientific, Waltham, USA), náplň pro gelovou permeační chromatografii Superosa 6 (GE HealthCare, Little Chalfont, UK), Omnifilter deska (Packard BioScience company, Arvada, USA), Syringe filtr PES (0,2 μm , 26 mm, Baria, Psáry)

4.7 Přístrojové vybavení

V experimentální části diplomové práce bylo použito následující přístrojové vybavení: Analytické váhy AE 240 (Mettler, Brno), β -counter Top Count NXTTM (Packard BioScience company, Arvada, USA), biologický termostat (Sanyo, Osaka, Japonsko), centrifuga stolní chlazená Mikro 22 R (Hettich, Beverly, USA), ELISA reader spektrofotometr Epoch (BioTek, Winooski, USA), gradientová pumpa Beta 10 (ECOM, Praha), laboratorní váhy 440-33N (KERN, Praha), laminární box Jouan (Trigon-plus, Říčany u Prahy), promývačka 96ti jamkových panelů ELx405 Microplate Washer (BioTek, Winooski, USA), průtokový cytometr BD FACSCanto II (BD Bioscience, San Jose, USA), sběrač buněk FilterMate Harvestor (Packard BioScience company, Arvada, USA), světelný mikroskop (Nikon, Tokio, Japonsko)

5 METODIKA

5.1 Proliferační testy

5.1.1 Test inkorporace ³H-thymidinu

Pro stanovení proliferační odpovědi buněk byla použita metoda vyvinutá Novákem a spolupracovníky (Novak *et al.*, 2005), která byla modifikována níže popsaným způsobem. Proliferační experimenty byly provedeny v 96 jamkové mikrotitrační desce. Před experimentem byly mezangiální buňky při 80% konfluenci hladověny v RPMI 1640 mediu obsahujícím 0,5% FBS a antibiotika (penicilin – 100 U/ml, streptomycin – 100 µg/ml) po dobu 24 hodin. Pro stanovení proliferační aktivity plných sér byla séra pacientů s IgAN nebo kontrolní séra (pacienti s jinou glomerulopatií) naředěna v poměru 1 : 20 RPMI 1640 médiem s 0,5% FBS. V případě frakcionace séra byly jednotlivé frakce ředěny v poměru 1 : 5 RPMI 1640 médiem s 0,5% FBS a přidány k MC. RPMI 1640 médium bez nebo s přidavkem destičkového růstového faktoru (PDGF) bylo použito jako negativní a pozitivní kontrola. Po 4 hodinové inkubaci bylo přidáno do každé jamky 0,3 µl ³H-thymidinu ředěného v 20 µl RPMI 1640 média s 0,5% FBS. Buňky byly dále inkubovány po dobu 20 hodin.

Zpracování buněk proběhlo níže popsaným způsobem. Kultivační médium bylo odsáto z mikrotitrační desky a jednotlivé jamky promyty 50µl PBS. Buňky byly trypsinizovány po dobu 10 minut při laboratorní teplotě, poté bylo přidáno RPMI 1640 médium s 20% FBS. Buňky byly následně sklizeny pomocí sběrače buněk. Suspenze MC z mikrotitrační destičky byla pod tlakem nasáta do filtračního papíru ze skleněných vláken a deska byla promyta 150 µl PBS. Po proschnutí filtračního papíru bylo přidáno 20 µl scintilační kapaliny. Filtrační papír byl umístěn v Omnifilter desce a radioaktivita změřena přístrojem Top Count NXT™.

5.1.2 Test intracelulárního barvení CFSE

Pro stanovení proliferační odpovědi buněk metodou intracelulárního barvení CFSE byla použita metoda vyvinutá Quahem a Parishem (Quah *et Parish*, 2012), která byla modifikována pro práci s mezangiálními buňkami níže popsaným způsobem. Experimenty byly provedeny v 24 jamkové mikrotitrační desce. Mezangiální buňky byly při 80% konfluenci hladověny v RPMI 1640 médiu obsahujícím 0,5% FBS po dobu 24 hodin. Byl připraven zásobní roztok 10 mmol/l CFSE v DMSO. Práce probíhala v neosvětleném laminárním boxu.

Mezangiální buňky byly inkubovány v 0,5 ml růstového média po dobu 30 minut při 37°C s 10 µmol/l CFSE. Po uplynutí času inkubace byly jednotlivé jamky 2krát promyty RPMI 1640 médiem s 10% FBS. Kultivační médium bez nebo s přidavkem PDGF bylo použito jako negativní a pozitivní kontrola. Pro stanovení proliferační aktivity plných sér byla séra pacientů s IgAN nebo kontrolní séra (pacienti s jinou glomerulopatií) naředěna v poměru 1 : 20 RPMI 1640 médiem s 0,5% FBS a přidána k buňkám (0,75 ml/jamku). Buňky byly dále inkubovány po dobu 20 hodin.

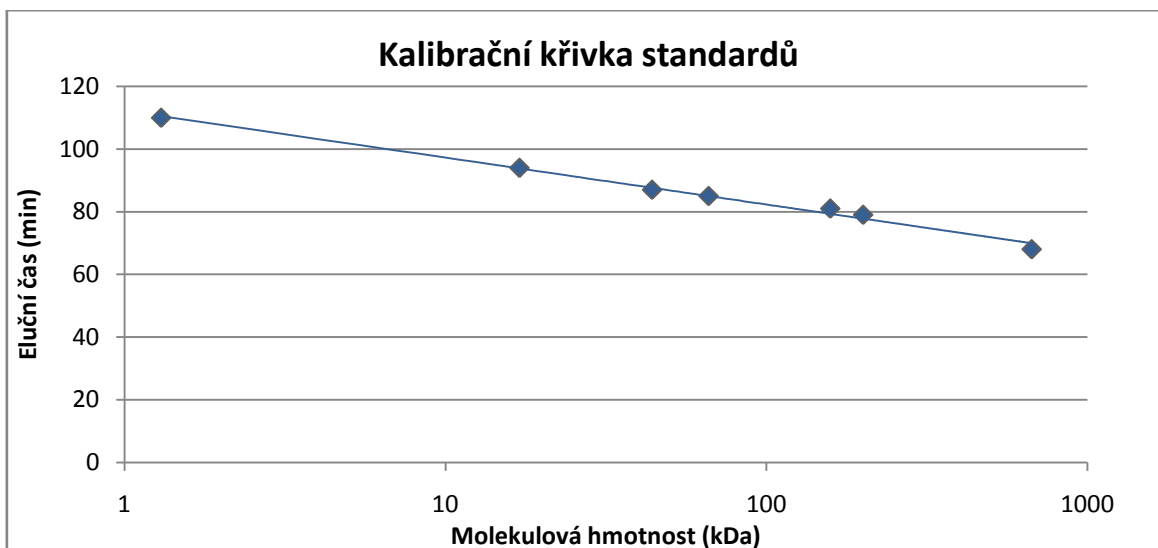
Zpracování buněk proběhlo následujícím způsobem. Médium bylo odsáto z mikrotitrační desky a jednotlivé jamky promyty 0,5 ml PBS. Buňky byly trypsinizovány po dobu 10 minut při laboratorní teplotě a ve tmě, poté bylo přidáno RPMI 1640 médium s 20% FBS. Buňky byly sklizeny do zkumavek a centrifugovány po dobu 5 minut při 800 rpm. Médium bylo odsáto a supernatant resuspendován v 0,5 ml PBS. Analýza proliferační odpovědi MC byla provedena na průtokovém cytometru BD FACSCanto II změněním fluorescence (podmínky: λ_{ex} 492 nm; λ_{em} 517 nm) a výsledky byly vyhodnoceny softwarovým programem BD FACSDiva Software.

5.2 Frakcionace sér potencionálně obsahujících CIK

Séra od pacientů s IgAN a zdravých kontrol byla frakcionalizována gelovou permeační chromatografií na kalibrované Superose 6 koloně. Kalibraci kolony provedl Mgr. Michal Křupka, Ph.D. Složení kalibrační směsi je uvedeno v **Tabulce č. 3**. Dle kalibrační křivky bylo v 45 minutě určeno čelo. Elučním puforem byl PBS. Průtok kolony byl 1 ml za minutu. Po nanesení 800 µl vzorku byly eluáty odebírány od 45 minuty a frakce sbírány do zkumavek po 2 ml. Je možné odhadnout, že hledané CIK (800–900 kDa) by se měly nacházet v prvních odebraných frakcích. Bylo nasbíráno prvních 18 frakcí, u kterých byla na MC stanovena proliferační aktivita a koncentrace celkového IgA a množství imunokomplexů.

Tabulka č. 3: Složení kalibrační směsi.

Molekulová hmotnost <i>kDa</i>	Eluční čas <i>min</i>	Zdroj
670	68	Thyroglobulin
200	79	Beta amyláza
158	81	Gama globulin
66	85	Hovězí sérový albumin
44	87	Ovalbumin
17	94	Myoglobin
1,3	110	Kobalamin



5.3 ELISA

5.3.1 Stanovení koncentrace celkového IgA

Každá z jamek mikrotitrační destičky MaxiSorb™ byla potažena 100 μ l protilátky AffiniPure F (ab')₂ Fragment Goat Anti-Human Serum IgA, α -Chain Specific, o cílové koncentraci 1 μ g/ml, ředěné v PBS s 0,05% azidem, inkubace probíhala přes noc při 4°C. Po inkubaci následovalo 5 krát promytí PBS. Deska byla blokována 1% hovězím sérovým albuminem v PBS s 0,05% Tweenem-20 (1% BSA/PBST) (300 μ l/jamku) po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě. Destička byla 5 krát promyta PBS. V dubletu pod sebou byl ředěn standard ChromPure Human IgA Serum o cílové koncentraci 72 ng/ml, geometrickou řadou v rozmezí 1:62 500 až 1: 32 000 000 v blokovacím pufru. Jednotlivé vzorky byly vhodně naředěny. Inkubace probíhala přes noc při 4°C. Destička byla 5x promyta PBST a 5x čistým PBS. Po promytí bylo do každé jamky napipetováno 100 μ l primární protilátky Biotin-SP-Conjugated AffiniPure F (ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgA, α -Chain Specific, ředěné 1 : 20 000 v blokovacím pufru. Inkubace probíhala 3 hodiny při pokojové teplotě. Po inkubaci byla destička promyta 5x PBST a 5x čistým PBS. Dále bylo nanášeno 100 μ l extravidinu značeného křenovou peroxidázou ředěného 1 : 2000 v blokovacím pufru. Inkubace probíhala 1 hodinu při 37°C. Nakonec byla destička 8x promyta PBS. Reakce byla vyvolána přidáním 100 μ l chromogenního substrátu *o*-fenylenendiaminu (OPD) v OPD pufru s peroxidem vodíku. Barevná reakce byla zastavena 1 M kyselinou sírovou. Absorbance byla měřena při 492 nm na ELISA readeru a koncentrace celkového IgA vyhodnocena softwarovým programem Gen5 Data Analysis.

- Plná patientská/kontrolní séra byla ředěna v triplikátech v rozmezí 1 : 150 000 až 1 : 1 200 000 v blokovacím pufru.
- Jednotlivé frakce byly ředěny v dubletech. Prvních pět odebraných frakcí bylo ředěno v rozmezí 1 : 50 až 1 : 200. Zbylé frakce ředěny v rozmezí 1 : 250 až 1 : 1000 v blokovacím pufru.

5.3.2 Stanovení cirkulujících imunokomplexů

Každá z jamek mikrotitrační destičky MaxiSorb™ byla potažena 100 µl protilátky AffiniPure F (ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG, Fc_γ Fragment Specific, o cílové koncentraci 1 µg/ml, ředěné v PBS s 0,05% azidem, inkubace probíhala přes noc při 4°C. Po inkubaci následovalo 5 krát promytí PBS. Deska byla blokována 1% hovězím sérovým albuminem v PBS s 0,05% Tweenem-20 (1% BSA/PBST) (300 µl/jamku) po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě. Destička byla 5 krát promyta PBS. Jednotlivé vzorky byly vhodně naředěny. Jako pozitivní kontrola sloužilo patientské sérum 6D ředěno v dubletu v rozmezí 1 : 2000 až 1 : 1 024 000 v blokovacím pufru. Inkubace probíhala přes noc při 4°C. Destička byla 5x promyta PBST a 5x čistým PBS. Po promytí bylo do každé jamky napipetováno 100 µl primární protilátky Biotin-SP-Conjugated AffiniPure F (ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgA, α-Chain Specific, ředěné 1 : 20 000 v blokovacím pufru. Inkubace probíhala 3 hodiny při pokojové teplotě. Po inkubaci byla destička promyta 5x PBST a 5x čistým PBS. Dále bylo nanášeno 100 µl extravidinu značeného křenuvou peroxidázou ředěného 1 : 2000 v blokovacím pufru. Inkubace probíhala 1 hodinu při 37°C. Nakonec byla destička 8x promyta PBS. Reakce byla vyvolána přidáním 100 µl chromogeního substrátu *o*-fenylenediaminu (OPD) v OPD pufru s peroxidem vodíku. Barevná reakce byla zastavena 1 M kyselinou sírovou. Absorbance byla měřena při 490 nm na ELISA readeru a množství imunokomplexů vyhodnoceno softwarovým programem Gen5 Data Analysis.

- Plná patientská/kontrolní séra byla ředěna v dubletech v rozmezí 1 : 2000 až 1 : 1 024 000 v blokovacím pufru.
- Jednotlivé frakce byly ředěny v poměru 1 : 10 v blokovacím pufru.

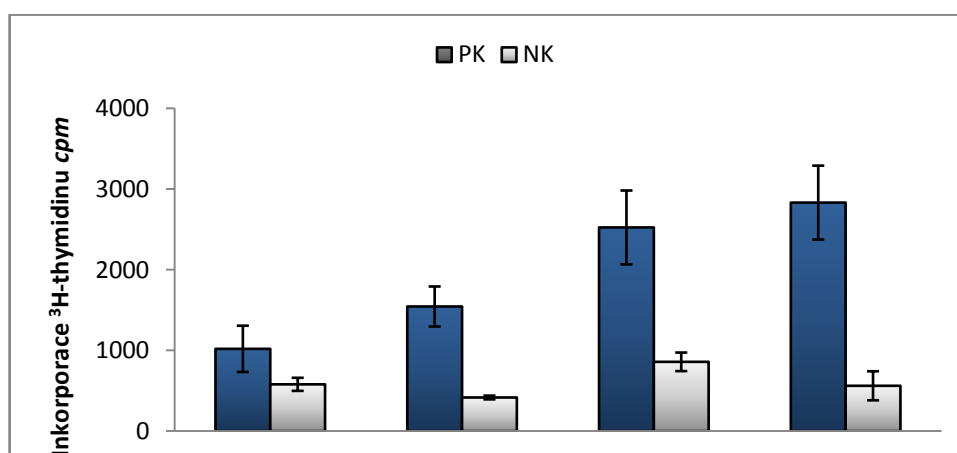
6 VÝSLEDKY

6.1 Vyhodnocení proliferační odpovědi metodou inkorporace ^3H -thymidinu

A. Optimalizace metody

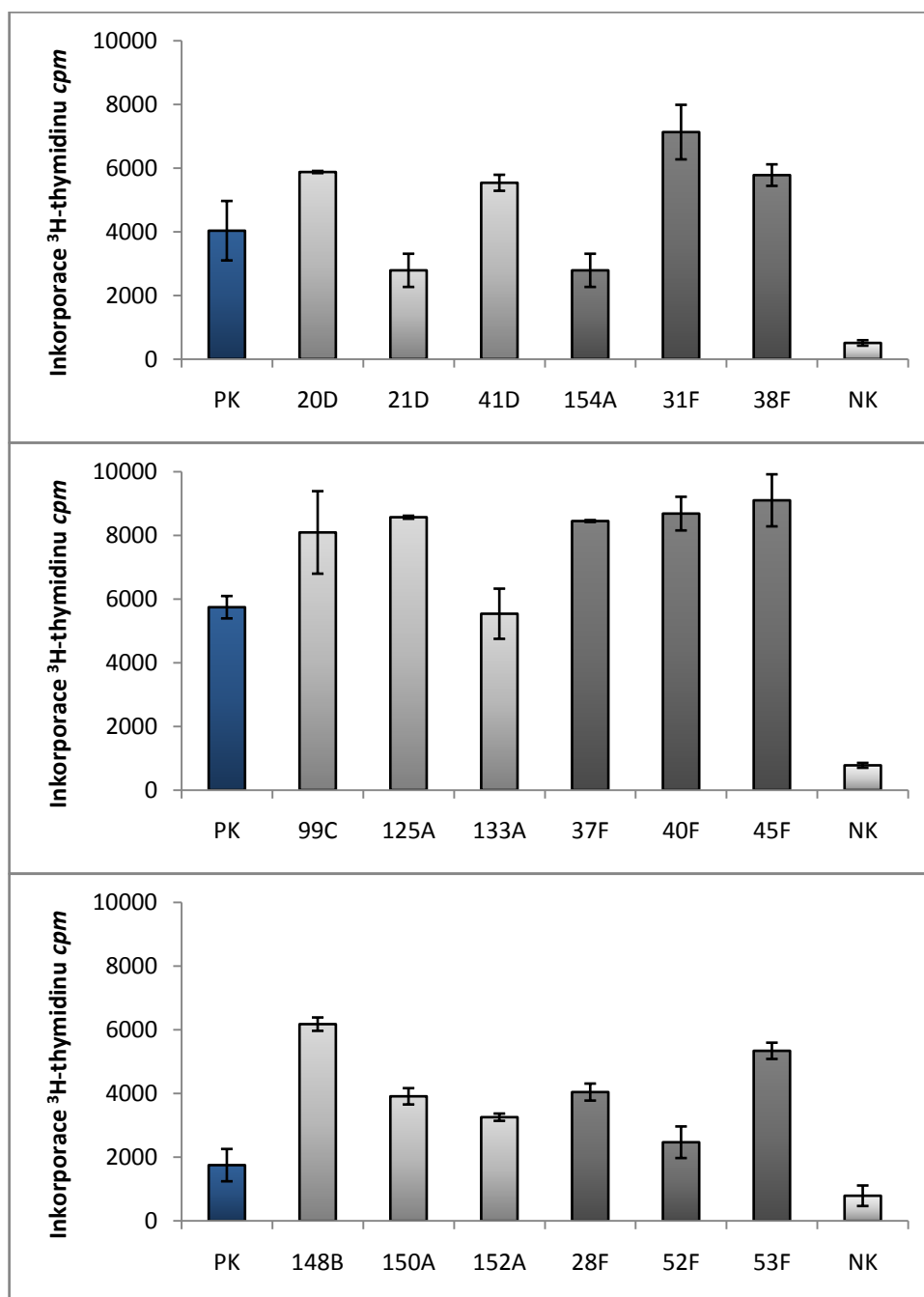
Prvním krokem této práce bylo optimalizovat metodu inkorporace ^3H -thymidinu v naší laboratoři a přizpůsobit pracovní postup přístrojovému vybavení. Původní experimenty byly provedeny na základě metodiky vyvinuté Novákem a spolupracovníky (Novak *et al.*, 2005) ve formátu 24 jamkové desky. Nejdříve byly provedeny kontrolní experimenty, kdy byly buňky inkubovány s použitím PDGF v RPMI médiu s 0,5% FBS (pozitivní kontrola) nebo pouze s RPMI 1640 médiem s 0,5% FBS jako (negativní kontrola), viz **Obrázek č. 5**. Bylo zjištěno, že v závislosti na čísle pasáže MC byla proliferace 2 až 5krát vyšší u pozitivní kontroly (PDGF) v porovnání s negativní kontrolou.

Po optimalizaci metody bylo přistoupeno ke stimulaci MC (4. pasáž) plnými séry pacientů s IgAN a kontrolní skupinou ve formátu 24 jamkové desky. Výsledky proliferačních odpovědí MC jsou uvedeny na obrázku **Obrázku č. 6**. Prezentovaná data představují průměr ze tří měřených hodnot se směrodatnou odchylkou. Bylo zjištěno, že inkorporace ^3H -thymidinu po stimulaci sér jak pacientů s IgAN, tak i kontrol byla 3 až 10krát vyšší v porovnání s negativní kontrolou. Vzhledem k velké spotřebě patientského séra na jamku a analyzování jen omezeného počtu vzorků v rámci 24 jamkové desky byl pracovní postup dále modifikován a další experimenty prováděny ve formátu 96 jamkové desky.



Obrázek č. 5: Proliferace lidských mezangiálních buněk stimulovaných PDGF a negativní kontrolou. MC byly inkubovány s použitím PDGF (pozitivní kontrola) v RPMI 1640 médiu s 0,5% FBS a antibiotiky (penicilin – 100 U/ml, streptomycin – 100 µg/ml). Jako negativní kontrola (NK) bylo

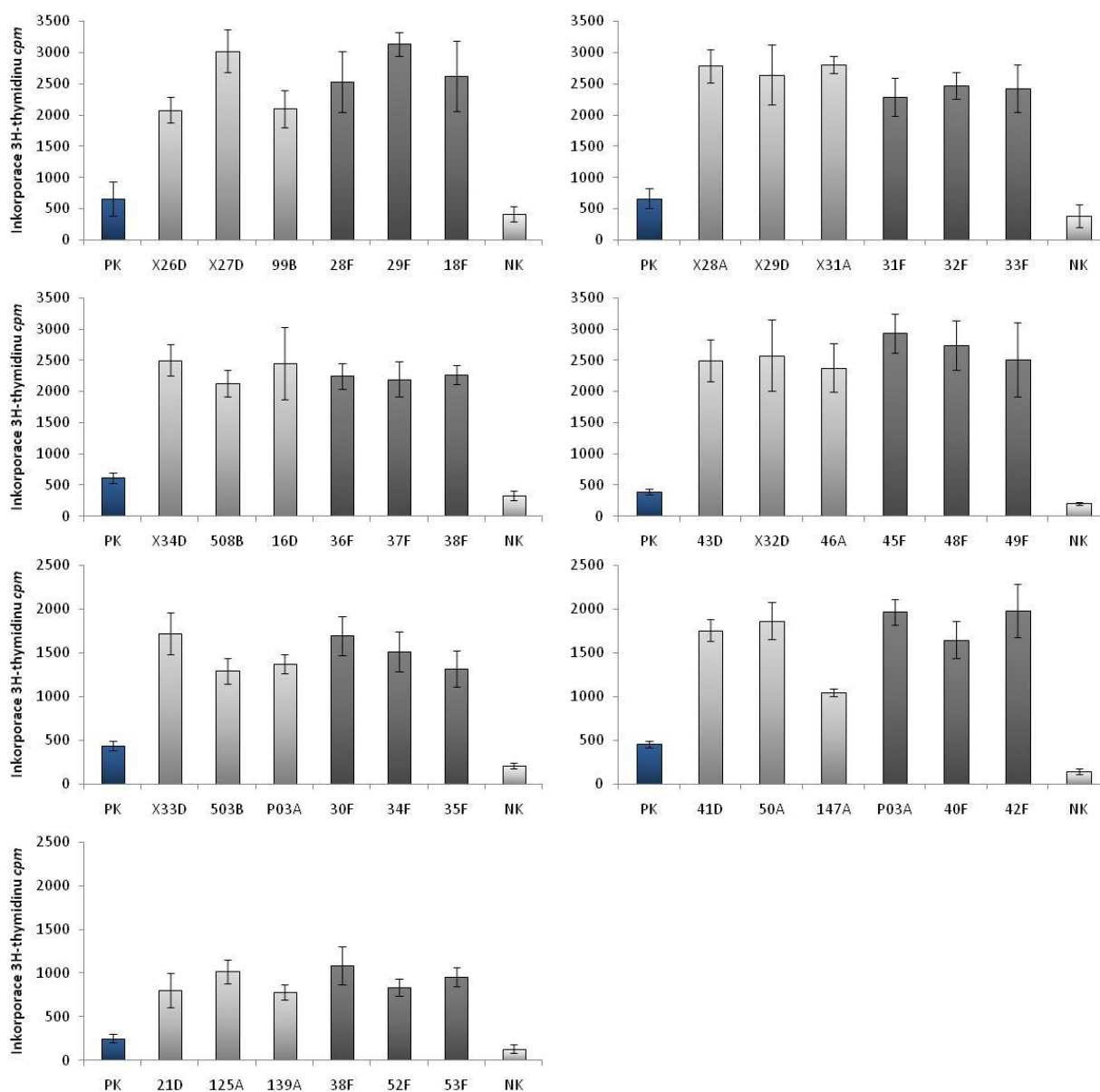
použito RPMI 1640 médium s 0,5% FBS a antibiotiky. Prezentovaná data uvádějí průměr ze tří měřených hodnot se směrodatnou odchylkou.



Obrázek č. 6: Proliferace lidských mezangiálních buněk stimulovaných 5% sérem pacientů s IgAN a kontrolní skupinou. *Negativní kontrola (NK): RPMI 1640 médium s 0,5% FBS a antibiotika (penicilin – 100 U/ml, streptomycin – 100 µg/ml).* Prezentovaná data představují průměr ze tří měřených hodnot se směrodatnou odchylkou.

B. Porovnání proliferační odpovědi sér pacientů s IgAN a kontrolní skupiny pacientů bez IgAN

Byla stanovena schopnost sér pacientů s IgAN a kontrol stimulovat proliferaci MC (5. pasáž). Celkem bylo takto provedeno sedm proliferačních experimentů, ve kterých byla měřena proliferační aktivita 22 sér pacientů s IgAN a 20 sér pacientů s jinou glomerulopatií, jejichž výsledky uvádí **Obrázek č. 7**. Vzorky analyzovaných sér byly vybrány náhodně. V rámci každé 96 jamkové desky byla aplikována séra pacientů s IgAN a kontrolní séra pacientů s jinou glomerulopatií. Prezentovaná data představují průměr ze čtyř měřených hodnot se směrodatnou odchylkou.



Obrázek č. 7: Proliferační lidských mezangiálních buněk stimulovaných 5% sérem pacientů s IgAN a kontrolní skupinou sér. MC byly inkubovány s použitím PDGF (pozitivní kontrola) v RPMI 1640 médiu s 0,5% FBS a antibiotiky (penicilin – 100 U/ml, streptomycin – 100 µg/ml). Jako negativní

kontrola (NK) bylo použito RPMI 1640 médium s 0,5% FBS a antibiotiky. Prezentovaná data uvádějí průměr ze čtyř měřených hodnot se směrodatnou odchylkou.

Bylo zjištěno, že kontrolní séra se ve své proliferační aktivitě neliší statisticky významně od sér pacientů s IgAN, viz **Tabulka č. 4**. Většina analyzovaných pacientů se nacházela v klidovém stádiu onemocnění bez ataky makroskopické hematurie. Můžeme se tudíž domnívat, že CIK nejsou v séru přítomny ve velkém množství. Také vzhledem k tomu, že kontrolní skupinu analyzovaných vzorků tvoří séra zdravých jedinců, ale skupina pacientů s jinými glomerulopatiemi, u kterých může docházet ke stimulaci MC jinými molekulami imunitního systému, například růstovými faktory či proteiny komplementové kaskády (Novak *et al.*, 2005).

Tabulka č. 4: Proliferace lidských mezangiálních buněk stimulovaných 5% sérem 22 pacientů s IgAN a 20 kontrolními vzorky.

Vzorek	Inkorporace ³ H-thyminu ^a cpm	Násobek NK ^b
Negativní kontrola	261 ± 73	1,00
PDGF	497 ± 102	2,04
IgAN séra	1997 ± 237	8,18
Kontrolní séra	2059 ± 311	8,52

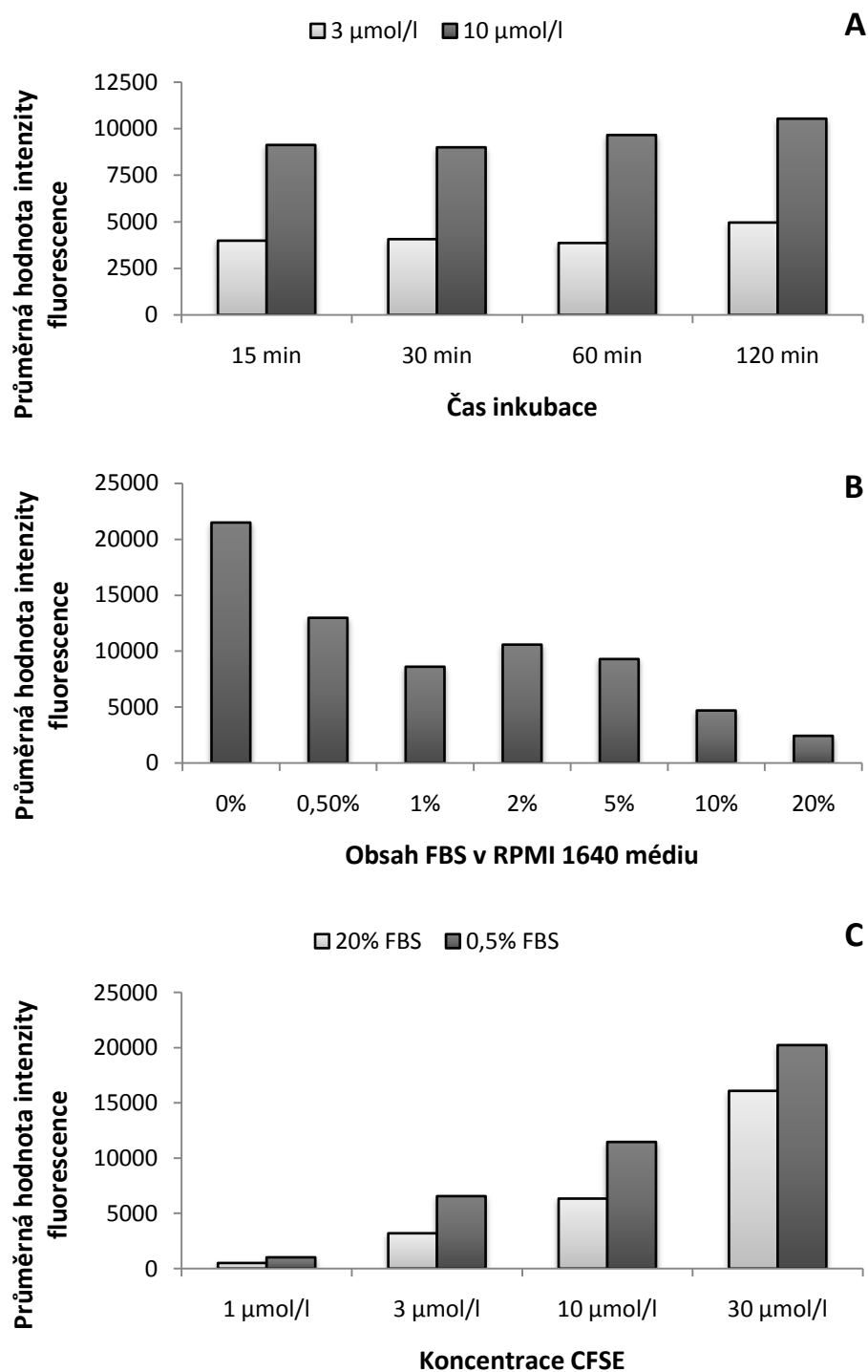
^a Průměr ± SD

^b Negativní kontrola: RPMI 1640 médium s 0,5% FBS a antibiotika (penicilin – 100 U/ml, streptomycin – 100 µg/ml)

6.2 Vyhodnocení proliferační odpovědi metodou intracelulárního barvení CFSE

A. *Optimalizace metody*

Před zahájením proliferačních experimentů bylo nutné optimalizovat pracovní postup intracelulárního barvení CFSE pro mezangiální buňky. Nejdříve bylo stanoveno, jak je hodnota intenzity fluorescence ovlivněna různými koncentracemi CFSE, doby inkubace buněk s CFSE a obsahu FBS v médiu, ve kterém byl CFSE s buňkami inkubován. Byla měřena fluorescence CFSE nedělících se MC v různých koncentracích kultivačního média a času preinkubace s fluorochromem CFSE, viz **Obrázek č. 8**. Bylo zjištěno, že se vzrůstající koncentrací CFSE, které bylo inkubováno s MC, vzrostla průměrná hodnota intenzity fluorescence. Doba inkubace buněk s CFSE měla na měřenou hodnotu intenzity fluorescence jen malý vliv. Se vzrůstajícím obsahem FBS v kultivačním médiu, ve kterém byl CFSE inkubován, průměrná hodnota intenzity fluorescence klesala. Během optimalizace metody byl testován vliv proliferační odpovědi MC na akumulaci fluorescenčního barviva CFSE. Byl naměřen rozdíl mezi průměrnou hodnotou intenzity fluorescence MC inkubovaných v RPMI 1640 médiu s 20% FBS (proliferující buňky) a v RPMI 1640 médiu s 0,5% FBS (neproliferující buňky). Průměrná hodnota fluorescence byla u proliferujících MC až o polovinu nižší v porovnání s neproliferujícími buňkami. Následně bylo rozhodnuto, že v dalších proliferačních experimentech budou MC inkubovány s 10 $\mu\text{mol/l}$ CFSE po dobu 30 minut v RPMI 1640 médiu s 0,5% FBS.

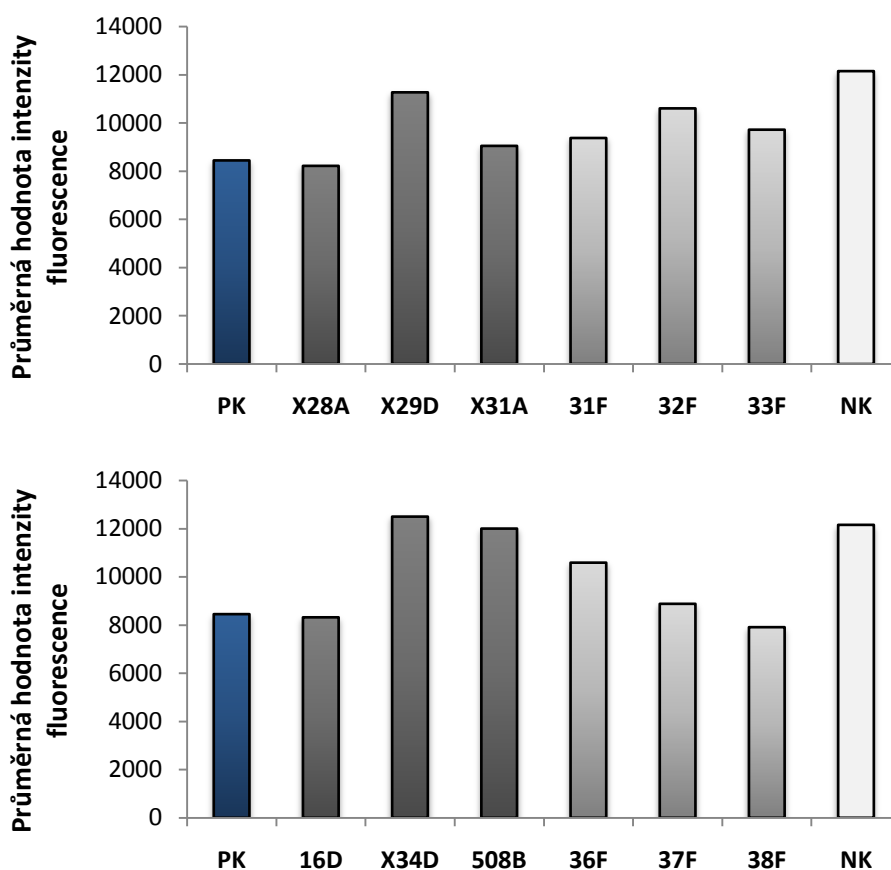


Obrázek č. 8: Časová a koncentrační závislost intenzity intracelulárního barvení CFSE.

(A) Časová závislost intracelulárního barvení 3 $\mu\text{mol/l}$ a 10 $\mu\text{mol/l}$ CFSE. (B) Koncentrační závislost obsahu FBS v RPMI 1640 médiu s 10 $\mu\text{mol/l}$ CFSE, doba inkubace 30 minut. (C) Rozdíl mezi intenzitou fluorescence MC inkubovaných v RPMI 1640 médiu s 20% FBS (proliferující buňky) a v RPMI 1640 médiu s 0,5% FBS (neproliferující buňky). Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu intenzity fluorescence.

B. Cytometrická analýza proliferační odpovědi sér pacientů s IgAN a kontrolní skupiny pacientů bez IgAN

MC byly stimulovány séry pacientů s IgAN a kontrolní skupinou sér. Analýza proliferačních odpovědí MC byla vyhodnocena pomocí průtokového cytometru a výsledky měření jsou zobrazeny na **Obrázku č. 9**. Byly naměřeny pouze malé rozdíly mezi intracelulárním barvením CFSE mezangiálních buněk po stimulaci sér jak pacientů s IgAN, tak i kontrol v porovnání s negativní kontrolou, ovšem tyto rozdíly nebyly tak vysoké jako u metody inkorporace ^3H -thymidinu, viz **Tabulka č. 5**. Bylo zjištěno, že metoda intracelulárního barvení CFSE má oproti metodě inkorporace ^3H -thymidinu nižší citlivost. Proto bylo pokračováno v dalších proliferačních experimentech pouze s metodou inkorporace ^3H -thymidinu.



Obrázek č. 9: Cytometrická analýza lidských mezangiálních buněk po stimulaci 5% sérem pacientů s IgAN a kontrolní skupinou sér. Intracelulární barvení 10 $\mu\text{mol/l}$ CFSE v RPMI 1640 médiu s 0,5% FBS, čas inkubace 30 min. Jako negativní kontrola (NK) bylo použito RPMI 1640 médium s 0,5% FBS a antibiotika (penicilin – 100 U/ml, streptomycin – 100 $\mu\text{g/ml}$). Prezentovaná data představují průměrnou hodnotu intenzity fluorescence.

Tabulka č. 5: Cytometrická analýza lidských mezangiálních buněk po stimulaci 5% sérem pacientů s IgAN a kontrolní skupinou sér.

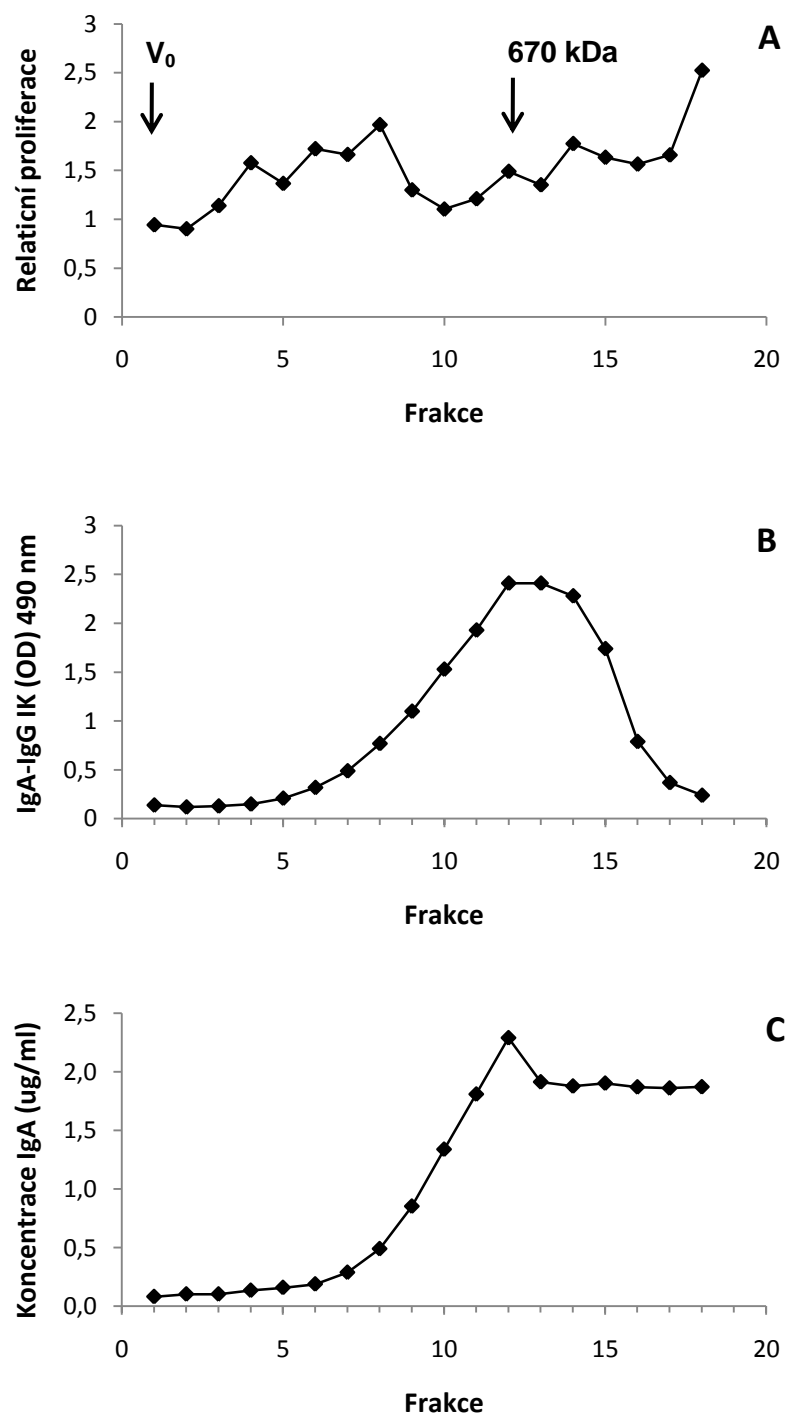
Vzorek	Násobek NK^a	Vzorek	Násobek NK
PDGF	0,70	PDGF	0,70
X28A	0,68	16D	0,68
X29D	0,93	X34D	1,03
X31A	0,74	508B	0,99
31F	0,77	36F	0,87
32F	0,87	37F	0,73
33F	0,80	38F	0,65
NK	1,00	NK	1,00

^a Negativní kontrola: RPMI 1640 médium s 0,5% FBS a antibiotika (penicilin – 100 U/ml, streptomycin – 100 µg/ml)

6.3 Frakcionace patientských sér a vyhodnocení proliferačního potenciálu jednotlivých frakcí

Studium závislosti proliferační odpovědi mezangiálních buněk na molekulové hmotnosti CIK ukázalo, že ne všechny CIK stimulují proliferaci mezangiálních buněk. Novák a spolupracovníci prokázali, že jako nejefektivnější stimulatory působí CIK o molekulové hmotnosti 800–900 kDa, kdežto menší CIK (700–800 kDa) mají opačnou biologickou aktivitu a proliferaci tlumí (Novak *et al.*, 2005). Proto pro určení velikosti CIK, které indukují proliferaci mezangiálních buněk, byla patientská séra frakcionována gelovou permeační chromatografií na kalibrované Superose 6 koloně a získané frakce přidány k MC. Proliferace MC byla hodnocena pomocí inkorporace ³H-thymidinu po 20 hodinách inkubace. Na **Obrázku č. 10 A** je uvedena proliferační aktivita séra pacienta s IgAN, která potvrdila přítomnost stimulačních a inhibičních IK. Sérum X15A obsahovalo stimulační CIK, převážně ve velkých molekulárních hmotnostních > 800 kDa, což odpovídá 4. až 8. frakci děleného séra. Naopak CIK o nižších molekulových hmotnostech < 800 kDa (frakce 9 až 12) inhibovali proliferaci MC.

Vedle měření proliferační aktivity jednotlivých frakcí byl dále stanoven i obsah IK a koncentrace celkového IgA metodou ELISA (**Obrázek č. 10 B, C**). Bylo zjištěno, že v oblasti vysokomolekulárních frakcí (800 kDa), které stimulují proliferaci MC, dochází k postupnému zvýšení obsahu IK i celkového IgA.



Obrázek č. 10: Proliferace lidských mezangiálních buněk stimulovaných frakcemi patientského séra X15A. Sérum bylo frakcionováno na kalibrované Superose 6 koloně a získané frakce přidány k MC. Buněčná proliferace po stimulaci jednotlivými frakcemi byla vyhodnocena metodou inkorporace ³H-thymidinu pomocí kapalinového scintilačního analyzátoru. (A) Relativní proliferace MC po stimulaci jednotlivými frakcemi (cpm frakce/ cpm NK). (B) Množství CIK v jednotlivých frakcích. (C) Koncentrace celkového IgA v jednotlivých frakcích. V₀ značí prázdný objem. Prezentovaná data znázorňují průměr ze tří hodnot.

6.4 Charakterizace jednotlivých vzorků

6.4.1 Stanovení koncentrace celkového IgA

Koncentrace celkového IgA u vzorků sér pacientů s IgAN a kontrolní skupiny sér byla stanovena ELISA metodou, výsledky uvádí **Tabulka č. 6**. Každá hodnota představuje průměr ze tří hodnot se směrodatnou odchylkou. Jako standard byl zvolen komerční IgA. Referenční koncentrace IgA v séru je 0,9 až 3,5 mg/ml (Bartůňková *et al.*, 2011). Coppo *et al.* uvádí, že nemocní s IgAN mají zvýšené sérové koncentrace pIgA a vzestup sérového IgA se nachází u poloviny pacientů IgAN (Coppo *et al.*, 1982; Monhart, 2001). Námi analyzovaná patientská a kontrolní séra mají ve většině případů koncentraci IgA ve fyziologickém rozmezí. Porovnáním koncentrací celkového IgA v sérech pacientů a kontrolních sér byla pozorována zvýšená koncentrace celkového IgA ve vzorcích sér pacientů s IgAN, viz **Tabulka č. 7**.

Tabulka č. 6: Koncentrace celkového IgA v patientských sérech.

Vzorek	Koncentrace ^a mg/ml	Vzorek	Koncentrace mg/ml	Vzorek	Koncentrace mg/ml
16D	0,80 ± 0,12	X27D	1,87 ± 0,06	32F	2,37 ± 0,59
21D	3,94 ± 0,83	X28A	2,36 ± 0,50	33F	0,57 ± 0,10
41D	2,37 ± 0,19	X29D	4,67 ± 0,26	34F	6,20 ± 0,55
43D	4,07 ± 0,27	X31A	1,35 ± 0,16	35F	0,83 ± 0,25
46A	2,40 ± 0,18	X32D	2,15 ± 0,15	36F	1,24 ± 0,05
50A	2,89 ± 0,20	X33D	2,11 ± 0,30	37F	0,98 ± 0,11
99B	3,43 ± 0,17	X34D	1,47 ± 0,15	38F	1,77 ± 0,21
125A	2,21 ± 1,11			40F	2,22 ± 0,11
139A	2,18 ± 0,43			42F	3,25 ± 0,20
147A	3,55 ± 0,11	18F	0,51 ± 0,06	45F	2,27 ± 0,18
503B	2,01 ± 0,48	28F	3,42 ± 0,19	48F	2,48 ± 0,18
508B	4,69 ± 0,49	29F	1,13 ± 0,79	49F	2,61 ± 0,22
P03A	1,47 ± 0,43	30F	1,69 ± 0,35	52F	1,87 ± 0,43
X26D	2,65 ± 0,14	31F	1,92 ± 0,14	53F	1,08 ± 0,15

^a Průměr ± SD

Tabulka č. 7: Porovnání koncentrace celkového IgA v sérech pacientů s IgAN a kontrolních sérech.

Vzorek	Koncentrace ^a mg/ml
IgAN séra	2,54 ± 0,32
Kontrolní séra	2,09 ± 0,26

^a Průměr ± SD

6.4.2 Stanovení cirkulujících imunokomplexů

Stanovení množství CIK obsahujících IgA vázané s IgG bylo měřeno ELISA metodou, viz **Tabulka č. 8**. Jako pozitivní kontrola bylo použito patientské sérum 6D, u kterého byla potvrzena přítomnost CIK. Plná séra pacientů s IgAN a kontrolní séra pacientů s jinou glomerulopatií byla ředěna v dubletech v rozmezí 1 : 2000 až 1 : 1 024 000 v blokovacím pufru. Prezentovaná data uvádějí množství CIK vztažené k obsahu CIK v pozitivní kontrole v rámci jednotlivých měření a jsou vyjádřena jako procenta pozitivní kontroly. Porovnáním množství CIK v sérech pacientů a kontrolních sér byl pozorován zvýšený obsah CIK ve vzorcích sér pacientů s IgAN, viz **Tabulka č. 9**.

Tabulka č. 8: Množství cirkulujících imunokomplexů v patientských sérech.

Vzorek	CIK ^a %	Vzorek	CIK %	Vzorek	CIK %
16D	85,8	X27D	38,5	32F	65,2
21D	65,5	X28A	73,2	33F	55,4
41D	76,8	X29D	102,0	34F	132,7
43D	50,0	X31A	58,7	35F	38,8
46A	54,0	X32D	41,3	36F	37,1
50A	52,9	X33D	52,1	37F	43,5
99B	64,7	X34D	46,2	38F	41,5
125A	52,8			40F	93,1
139A	53,4			42F	46,1
147A	95,6	18F	42,7	45F	65,9
503B	77,5	28F	96,1	48F	60,6
508B	230,3	29F	63,0	49F	69,3
P03A	93,0	30F	35,4	52F	41,7
X26D	64,2	31F	52,0	53F	39,6

^a Procento pozitivní kontroly (sérum 6D)

Tabulka č. 9: Porovnání množství cirkulujících imunokomplexů v sérech pacientů s IgAN a kontrolních sérech.

Vzorek	CIK ^a %
IgAN séra	70,8
Kontrolní séra	58,7

^a Procento pozitivní kontroly (sérum 6D)

7 DISKUZE

IgA nefropatie je nejčastější primární glomerulonefritidou na světě a nejčastější příčinou chronického selhání ledvin. Její patogeneze není zcela objasněná, ale přibývá důkazů o tom, že aberantní glykosylace IgA1 je antigenní determinantou pro vazbu protilátek IgG proti těmto molekulám a následkem toho formování CIK. Ty se následně ukládají v ledvinách (Mestecky *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2011; Tomana *et al.*, 1999). Patogenní význam CIK byl prokázán v *in vitro* studiích. Depozice CIK v mezangiu glomerulů vyvolávají aktivaci mezangiálních receptorů pro IgA nebo komplement a především poškození mezangiálních buněk, které v odpovědi na aktivaci CIK proliferují (Lai *et al.*, 2008). Mechanismus molekulární patogeneze vzniku CIK je v současné době intenzivně zkoumán. Kultivované lidské mezangiální buňky představují vhodný model studia proliferačních odpovědí buněk po stimulaci IK.

V rámci experimentální části diplomové práce byla optimalizována metoda inkorporace ³H-thymidinu podle metodiky vyvinuté Novákem a spolupracovníky (Novak *et al.*, 2005). Na základě prvotních výsledků inkorporace ³H-thymidinu bylo zjištěno, že s rostoucím počtem pasáží klesala proliferační odpověď MC po stimulaci PDGF, proto byly pro experimenty použitelné jen iniciální pasáže. Dále bylo zjištěno, že inkorporace ³H-thymidinu po stimulaci sér jak pacientů s IgAN, tak i kontrol byla 3 až 10krát vyšší v porovnání s negativní kontrolou. Jelikož hlavním cílem experimentů bylo porovnání proliferační odpovědi u sér pacientů s IgAN a kontrolní skupiny sér, byla zvolena koncentrace patientských vzorků (5%) a koncentrace negativní kontroly (0,5% FBS v RPMI médiu) podle publikovaných prací (Novak *et al.*, 2005, 2011; Yanagihara *et al.*, 2012). Na počátku proliferačních experimentů bylo patientské sérum ředěno v různých koncentracích a sledována proliferační odpověď MC po stimulaci různými ředěními. V porovnání s negativní kontrolou byla u patientského 0,5% séra pozorována dvakrát vyšší proliferační aktivita MC. Vyšší proliferační aktivita séra může být způsobena přítomností CIK a růstových faktorů dalších faktorů humorální imunity (Schonermark *et al.*, 1991). Porovnáním proliferační aktivity sér pacientů s IgAN a kontrolní skupinou pacientů bez IgAN byla testována schopnost sér stimulovat proliferaci MC. Rozdíl mezi proliferační odpovědí kontrolních sér a sér pacientů s IgAN nebyl signifikantní.

Novák *et al.* zjistili, že biologická aktivita velkých CIK obsahující Gd-IgA1 je zvýšená u pacientů s IgAN během případů makroskopické hematurie, tyto IK stimulovali buněčnou

proliferaci více než CIK shromážděné v průběhu pozdějších klidových fází onemocnění (Novak *et al.*, 2005). Většina námi analyzovaných pacientů se však nacházela v klidovém stádiu onemocnění, můžeme tedy uzavřít, že CIK, které by stimulovaly proliferační aktivitu MC, se v séru nenachází ve velkém množství nebo jejich proliferační aktivita je oslabena převahou CIK s nižší molekulovou hmotností, které vykazují schopnost proliferaci tlumit. Také kontrolní skupinu analyzovaných vzorků netvoří séra zdravých jedinců, ale skupina pacientů s jinými glomerulopatiemi, u kterých může docházet ke stimulaci proliferační odpovědi MC jinými faktory humorální imunity, jako jsou růstové faktory (TNF- α , IL-6, TNF- β) či proteiny komplementové kaskády (C5–9) (Schonermark *et al.*, 1991; Novak *et al.*, 2005). Novák *et al.* ve svých experimentech zkoušeli inaktivovat komplement a testovali proliferační odpovědi MC po stimulaci tepelně upraveného séra. Za těchto podmínek získali až o 28 % vyšší proliferační odpovědi MC ve srovnání s proliferační aktivitou po stimulaci MC tepelně neošetřenými séry. Proteiny komplementové kaskády se tedy nepodílí na stimulaci proliferační odpovědi MC, ale ke stimulaci proliferace MC může docházet vlivem agregace imunoglobulinů (Novak *et al.*, 2005).

Byl navržen protokol intracelulárního barvení CFSE pro mezangiální buňky. Během optimalizace metody bylo zjištěno, že u nedělicích se buněk má obsah lidského séra vliv na akumulaci CFSE. Se zvyšující se koncentrací lidského séra inkubovaného s MC trend efektivitativity barvení CFSE klesá. U metody intracelulárního barvení byly zachovány koncentrace patientských sér (5%) a negativní kontroly (0,5% FBS v RPMI médiu) jako u metody inkorporace ^3H -thymidinu i přes rozdílnou účinnost barvení CFSE, která se pohybuje kolem 25 %. Cytometrickou analýzou byly zjištěny rozdíly mezi intracelulárním barvením CFSE mezangiálních buněk po stimulaci sér jak pacientů s IgAN, tak i kontrol v porovnání s negativní kontrolou, ovšem tyto rozdíly nedosahovaly rozdílů získaných metodou inkorporace ^3H -thymidinu. Metoda intracelulárního barvení CFSE má v porovnání s metodou inkorporace ^3H -thymidinu výrazně nižší citlivost. Proto byla v proliferačních experimentech použita pouze metoda inkorporace ^3H -thymidinu.

Studium závislosti proliferační odpovědi mezangiálních buněk na molekulové hmotnosti CIK *in vitro* ukázalo, že ne všechny CIK stimulují proliferaci mezangiálních buněk. Experimentálně bylo prokázáno, že jako nejefektivnější stimulatory působí CIK o molekulové hmotnosti 800–900 kDa, kdežto menší CIK (700–800 kDa) mají opačnou biologickou aktivitu a proliferaci tlumí (Tomana *et al.*, 1999; Novak *et al.*, 2005; Yanagihara *et al.*, 2012). Experimenty prováděné s plnými séry pacientů s IgAN nelze proto jednoznačně interpretovat bez předešlé frakcionace CIC podle jejich molekulových hmotností.

V experimentální části diplomové práce byla séra pacientů s IgAN frakcionována na kalibrované Superose 6 koloně. U jednotlivých frakcí byla stanovena proliferační aktivita, která potvrdila přítomnost stimulačních a inhibičních CIK. Dále bylo metodou ELISA stanoveno množství CIK a koncentrace celkového IgA v jednotlivých frakcích. Bylo zjištěno, že v oblasti vysokomolekulárních frakcí (800 kDa), které stimulují proliferaci MC, dochází k postupnému nárůstu množství CIK i celkového IgA.

Moura *et al.* frakcionovali krevní séra pacientů s IgAN a kontrolní séra zdravých jedinců pomocí HPLC systému na S-300 Sephacryl koloně. Křivka závislosti absorbancí na čísle frakce ukazovala rozdíly ve vysokomolekulárních proteinech (>850 kDa) mezi kontrolními séry a séry pacientů s IgAN. U kontrolních sér se vysokomolekulární CIK nevyskytovaly. Rozdíly v koncentracích celkového IgA mezi frakcemi pacientů s IgAN a kontrolní skupinou byly stanoveny ELISA testem. Koncentrace makromolekulárního IgA ve frakcích pacientů s IgAN v porovnání s kontrolními frakcemi byla výrazně zvýšená (Moura *et al.*, 2004).

V rámci proliferační experimentů byl soubor analyzovaných vzorků souběžně charakterizován stanovením celkového IgA a množství CIK metodou ELISA. U IgAN byla popsána řada imunologických abnormalit. Polovina pacientů má zvýšenou hladinu sérového IgA (Coppo *et al.*, 1982; Monhart, 2001). Moldoveanu *et al.* v nedávné studii prokázali pomocí testu ELISA s využitím lektinu z *Helix aspersa*, který reaguje s Gd-IgA1, že 76 % pacientů s IgAN má významně zvýšené koncentrace Gd-IgA. Koncentrace Gd-IgA1, ale nikoli koncentrace celkového IgA, segregovaly v rodinách s rizikem IgAN. Rozdíly v koncentracích celkového IgA mezi pacienty s familiární IgAN, jejich příbuznými a zdravými kontrolami nebyly statisticky významné. Koncentrace Gd-IgA1 mají pro diagnózu IgA nefropatie při srovnatelné specificitě (90 %) podstatně větší senzitivitu (76 % vs. 33 %) než koncentrace celkového IgA (Moldoveanu *et al.*, 2007). Námi analyzovaná séra pacientů s IgAN a kontrolní séra měla ve většině případů koncentraci celkového IgA ve fyziologickém rozmezí. Porovnáním koncentrací celkového IgA v sérech pacientů a kontrolních sér byla pozorována zvýšená koncentrace celkového IgA ve vzorcích sér pacientů s IgAN.

Czekinsky *et al.* potvrdili přítomnost CIK vázajících IgA1 nebo IgG u 44 % pacientů s IgAN (Czekinsky *et al.*, 1986). Coppo *et al.* identifikovali IgA-CIK u 65 % pacientů s IgAN (Coppo *et al.*, 1982). Schena *et al.* uváděli přítomnost IgA1-IgG CIK u 68 % pacientů s IgAN (Schena *et al.*, 1989). Ovšem ne všichni IgAN pacienti mají v séru prokazatelné vysokomolekulární CIK (800–900 kDa). Hladina CIK koreluje s klinickou aktivitou onemocnění, velikostí mikroskopické hematurie nebo s atakou makroskopické hematurie.

V experimentální části diplomové práce bylo stanoveno množství IgA-IgG CIK obsažených v plných patientských a kontrolních sérech. Množství CIK je vyjádřeno jako procenta pozitivní kontroly, kterou bylo IgAN sérum dříve otestované jako pozitivní na přítomnost IK. Porovnáním množství CIK v sérech pacientů a kontrolních sér byl pozorován zvýšený obsah CIK ve vzorcích sér pacientů s IgAN.

Ukazuje se, že IgA nefropatie bude velmi pravděpodobně představovat klinicko-laboratorní syndrom rozpadající se do několika etiopatogenetických skupin, které mohou mít i odlišný klinický průběh včetně prognózy a odpovědi na terapii (Mestecky *et al.*, 2013).

8 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala problematikou proliferační odpovědi mezangiálních buněk po stimulaci imunitními komplexy přítomných v sérech pacientů s IgAN. Cílem experimentální části diplomové práce bylo porovnání proliferační aktivity sér pacientů s IgAN a kontrolní skupiny pacientů bez IgAN, charakterizace jednotlivých vzorků stanovením celkového IgA a množství imunokomplexů. Frakcionace patientských sér a vyhodnocení proliferačního potenciálu jednotlivých frakcí.

Metodou inkorporace ^3H -thymidinu byla stanovována schopnost sér pacientů s IgAN a kontrol stimulovat proliferaci kultivovaných mezangiálních buněk. Nebyl pozorován signifikantní rozdíl v proliferační odpovědi sér pacientů s IgAN v porovnání s kontrolní skupinou pacientů s jinou glomerulopatií.

V rámci charakterizace souboru analyzovaných vzorků metodou ELISA byla stanovena koncentrace celkového IgA a množství IgA-IgG IK. U pacientů s IgAN byla naměřena vyšší koncentrace celkového IgA a také zvýšený obsah CIK ve vzorcích sér.

Byla optimalizována metoda intracelulárního barvení fluorochromem CFSE. Cytometrickou analýzou proliferační aktivity sér pacientů s IgAN a kontrolní skupiny pacientů se nepodařilo dosáhnout takových rozdílů v proliferačních aktivitách jako s metodou ^3H -thymidinu. Metoda intracelulárního barvení CFSE vykazovala podstatně nižší citlivost.

Byla stanovena proliferační aktivita séra pacienta s IgAN po frakcionaci gelovou permeační chromatografií na kalibrované, která potvrdila přítomnost stimulačních a inhibičních CIK. Metodou ELISA bylo stanoveno množství CIK a koncentrace celkového IgA v jednotlivých frakcích. Bylo zjištěno, že u frakcí, které obsahují stimulační CIK, dochází k nárůstu množství těchto CIK i celkového IgA.

9 LITERATURA

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4. ed. New York, USA: Garland Science, 2002. 702–735 pages. ISBN 0815340729.
2. Bartůňková J, Paulík M. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. vyd. Praha: Grada, 2011, 164 str. ISBN 978-802-4735-337.
3. Berger J, Hinglais N. 1968. Les depots intercapillaires d'IgA-IgD. *J Urol Nephrol* **74**: 694–695.
4. Cattran C D, Coppo R, Cook H T, Feehally J, Roberts I S D, Troyanov S, Charles, Alpers E, Amore A, Barratt J, Berthoux F, Bonsib S, Bruijn J A, D'Agati V, D'Amico G, Emancipator S, Emma F, Ferrario F, Fervenza F C, Florquin S, Fogo A and Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society. 2009. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlation, and classification. *Kidney Int* **76**: 534–545.
5. Coppo R, Basolo B, Martina G, Rollino C, De Marchi M, Giacchino F. 1982. Circulating immune complexes containing IgA, IgG and IgM in patients with primary IgA nephropathy and with Henoch–Schonlein nephritis. Correlation with clinical and histologic signs of activity. *Clin Nephrol* **18**: 230–239.
6. Coppo R, Feehally J, Glassock R J. 2010. IgA nephropathy at two score and one. *Kidney Int* **77**: 181–186.
7. Czerkinski C, Koopmann W J, Jackson S, Collins J, Crago S S, Schrohenloher R E, Julian B A, Galla J H, Mestecky J. 1986. Circulating immune complexes and immunoglobulin A rheumatoid factor in patients with mesangial immunoglobulin A nephropathies. *J Clin Invest* **77**: 1931–1938.
8. D'Amico G. 1987 The commonest glomerulonephritis in the world: IgA nephropathy. *Q J Med* **64**: 709–727.
9. Donadio J V, Grande J P. 2002. IgA nephropathy. *New England Journal of Medicine* **347**: 738–748.
10. Donadio J V, Grande J P, Bergstralh E J, Dart R A, Larson T S, Spencer D C. 2001. The long-term outcome of patients with IgA nephropathy treatment with fish oil in a controlled trial. Mayo Nephrology Collaborative Group. *J Am Soc Nephrol* **12**: 791–799.
11. Feriozzi S et Polci R. 2016. The role of tonsillectomy in IgA nephropathy. *J Nephrol* **29**: 13-19.
12. Gharavi A G, Moldoveanu Z, Wyatt R J, Barker C V, Woodford S Y, Lifton R P, Mestecky J, Novak J, Julian B A. 2008. Aberrant IgA1 glycosylation is inherited in familial and sporadic IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **19**: 1008–1014.
13. Grossetête B, Launay P, Lehuen A, Jungers P, Bach J F, Monteiro R C. 1998. Down-regulation of Fc alpha receptors on blood cells of IgA nephropathy patients: evidence for a negative regulatory role of serum IgA. *Kidney Int* **53**:1321-35.
14. Haas M. 1997. Histologic subclassification of IgA nephropathy: a clinicopathologic study of 244 cases. *Am J Kidney Dis* **29**: 829–842.
15. Horynova M, Takahashi K, Hall S, Renfrow MB, Novak J, Raska M. 2012. Production of N-acetylgalactosaminyl-transferase 2 (GalNAc-T2) fused with secretory signal Iggamma in insect cells. *Protein expression and purification* **81**: 175–180.
16. Hotta O, Miyazaki M, Furuta T, Tomioka S, Chiba S, Horigome I, Abe K, Taguma Y. 2001. Tonsillectomy and steroid pulse therapy significantly impact on clinical remission in patients with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* **38**:736–743.

17. Hraskova M, Michelova Z, Pafcugova J, Horackova M, Kvapil M, Matousovic K. 2006. IgA nefropatie, nejčastější primární glomerulonefritida. *Prakt Lek* **86**: 80-82.
18. Huang Z Q, Raska M, Stewart T J, Reily C, King R G, Crossman D K, Crowley M R, Hargett A, Zhang Z, Suzuki H, Hall S, Wyatt R J, Julian B A, Renfrow M B, Gharavi A G, Novak J. 2016. Somatic Mutations Modulate Autoantibodies against Galactose-Deficient IgA1 in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* Mar 10. ASN.2014101044. [Epub ahead of print]
19. Julian B A, Quiggins P A, Thompson J S, Woodford S Y, Gleason K, Wyatt R J. 1985. Familial IgA nephropathy. Evidence of an inherited mechanism of disease. *N Engl J Med* **312**: 202–208.
20. Kim H W, Moon K C, Park S Y, Hong H K, Lee H S. 2002. Differential expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor- β (TGF β) in relation to progression of IgA nephropathy. *Nephrol* **7**: 131–139.
21. Kiryluk K, Li Y, Scolari F, *et. al.* 2014. Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nat Genet* **25**: 1357–1366.
22. Kiryluk K, Novak J. 2014. The genetics and immunobiology of IgA nephropathy. *J Clin Invest* **124**: 2325–2332.
23. Lai K N, Leung J C, Chan L Y, Saleem M A, Mathieson P W, Lai F M, Tang S C. 2008. Activation of podocytes by mesangial-derived TNF- α : Glomerulo-podocytic communication in IgA nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* **294**: 945–955.
24. Launay P, Grossetête B, Arcos-Fajardo M, Gaudin E, Torres S P, Beaudoin L, Patey-Mariaud de Serre N, Lehuen A, Monteiro R C. 2000. Fc α 1 receptor (CD89) mediates the development of immunoglobulin A (IgA) nephropathy (Berger's disease). Evidence for pathogenic soluble receptor-IgA complexes in patients and CD89 transgenic mice. *J Exp Med* **191**:1999–2009.
25. Lechner S M, Abbad L, Boedec E, Papista C, Le Stang M B, Moal C, Maillard J, Jamin A, Bex-Coudrat J, Wang Y, Li A, Martini P G, Monteiro R C, Berthelot L. 2016. IgA1 Protease Treatment Reverses Mesangial Deposits and Hematuria in a Model of IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* ASN.2015080856 [Epub ahead of print]
26. Liu Lin-lin, Li-ning Wang, Yi Jiang, Li Yao, Li-ping Dong, Zi-long Li, Xiao-li Li, MD. 2015. Tonsillectomy for IgA Nephropathy: A Meta-analysis. *Am J Kidney Dis* **65**: 80–87
27. Lyons A B, Parish Ch R. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* **171**: 131–137.
28. Matousovic K, Mestecky J, Vondrak K, Dusek J, Chvatalova E, Hacek J, Horynova M, Kasperova A, Rossman P, Sterzl I, Raska M. 2015. IgA nefropatie – jistoty, pochybnosti a výhledy kauzální léčby. *Čas Lék čes* **154**: 168–173.
29. Matousovic K, Mestecky M, Tomana J, Novak J. 2008. Léčba IgA nefropatie. *Vnitr Lek* **54**: 239–244.
30. Messele T, Roos M T, Hamann D, Roos M T, Hamann D, Koot M, Fontanet A L, Miedema F, Schellekens P T, Rinke de Wit T F. 2000. Nonradioactive techniques for measurement of in vitro T-cell proliferation: alternatives to the 3H-thymidine incorporation assay. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**: 687–692.
31. Mestecky J, Bienenstock J, Lamm M E, Strober W, McGhee J R, Mayer L, *et al.* *Mucosal Immunology*. 3. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 2064 pages. ISBN: 978-0-08-045426-9.

32. Mestecky J, Raska M, Julian B A, Gharavi A G, Renfrow M B, Moldoveanu Z, Novak L, Matousovic K, Novak J. 2013. IgA Nephropathy: Molecular mechanisms of the disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* **8**: 217–240.
33. Moldoveanu Z, Wyatt R J, Lee J Y, Tomana M, Julian B A, Mestecky J, Huang W Q, Anreddy S R, Hall S, Hastings M C, Lau K K, Cook W J, Novak J. 2007. Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. *Kidney International* **71**: 1148–1154.
34. Monhart V. 2001. IgA nefropatie. *Interní Med* **11**: 512–516.
35. Monteiro R C, Van De Winkel J G. 2003. IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol* **21**: 177–204.
36. Moura I C, Centelles M N, Arcos-Fajardo M, Manheiros D M, Collawn J F, Cooper M D, Monteiro R C. 2001. Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med* **194**:417–425.
37. Moura I.C., Arcos-Fajardo M., Sadaka C., Leroy V., Benhamou M., Novak J. 2004. Glycosylation and size of IgA1 are essential for interaction with mesangial transferrinreceptor in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **15**:622–634.
38. Novak J, Julian B A, Tomana M, Mesteck J. 2001. Progress in molecular and genetic studies of IgA nephropathy. *J Clin Immunol* **21**: 310–327.
39. Novak J, Tomana M, Matousovic K, Brown R, Hall S, Novak L, Julian B A, Wyatt R J, Mestecky J. 2005. IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells. *Kidney international* **67**: 504–513.
40. Novak J, Vu H L, Novak L, Julian B A, Mestecky J, Tomana M. 2002. Interactions of human mesangial cells with IgA and IgAcontaining immune complexes. *Kidney international* **62**: 465–475.
41. Novak J, Raskova Kafkova L, Suzuki H, Tomana M, Matousovic K, Brown R, Hall S, Sanders J T, Eison T M, Moldoveanu Z, Novak L, Novak Z, Mayne R, Julian B A, Mestecky J, Wyatt R J. 2011. IgA1 immune complexes from pediatric patients with IgA nephropathy activate cultured human mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* **26**: 3451–3457.
42. Parish C R. 1999. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology and Cell Biology* **77**: 499–508.
43. Pozzi C. 2016. Treatment of IgA nephropathy. *J Nephrol* **29**: 21-25.
44. Quah B J, Parish C R. 2012. New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes. *J Immunol Methods* **379**: 1–14.
45. Raska M, Moldoveanu Z, Suzuki H, Brown R, Kulhavy R, Andrasi J, Hall S, Vu H L, Carlsson F, Lindahl G, Tomana M, Julian B A, Wyatt R J, Mestecky J, Novak J.2007. Identification and characterization of CMPNeuAc: GalNAc-IgA1 alpha2,6-sialyltransferase in IgA1-producing cells. *Journal of molecular biology* **369**: 69–78.
46. Raska M, Matousovic K, Kasperova A, Novák J, Sterzl I, Mestecky J. 2011. Současný pohled na etiopatogenezi IgA nefropatie a výhledy kauzální terapie. *Alergie* **4**: 268–274.
47. Roos A, Bouwman L H, Van Gijlswijk-Jansen H, Faber-Krol M C, Stahl G L, Daha M R. 2001. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J Immunol* **1**: 2861–2868.

48. Royle L, Roos A, Harvey D J, Wormald M R, van Gijlswijk-Janssen D, Redwan el-R M, Wilson I A, Daha M R, Dwek R A, Rudd PM. 2003. Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems. *J Biol Chem* **278**: 20140–20153.
49. Russell M W, Sibley D A, Nikolova E B, Tomana M, Mestecky J. 1997. IgA antibody as a non-inflammatory regulator of immunity. *Biochem Soc Trans* **25**: 466–470.
50. Schena F P, Pastore A, Ludovico N, Sinico R A, Benuzzi S, Montinaro V. 1989. Increased serum levels of IgA1-IgG immune complexes and anti-F(ab')₂ antibodies in patients with primary IgA nephropathy. *Clinical and Experimental Immunology* **77**: 15–20.
51. Schonermark M, Deppisch R, Riedasch G. 1991. Induction of mediator release from human glomerular mesangial cells by the terminal complement components C5b-9. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **96**:331–337.
52. Stuchlova Horynova M, Raska M, Clausen H, Novak J. 2013. Aberrant O-glycosylation and anti-glycan antibodies in an autoimmune disease IgA nephropathy and breast adenocarcinoma. *Cellular and molecular life sciences* **70**: 829–839.
53. Stuchlova Horynova M, Vrablikova A, Stewart T J, Takahashi K, Czernekova L, Yamada K, Suzuki H, Julian B A, Renfrow M B, Novak J, Raska M. 2014. N-Acetylgalactosaminide alpha2,6-sialyltransferase II is a candidate enzyme for sialylation of galactose-deficient IgA1, the key autoantigen in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* **30**: 234-238.
54. Suzuki H, Honda K, Tanabe K, Toma H, Nihei H, Yamaguchi Y. 2003. Incidence of latent mesangial IgA deposition in renal allograft donors in Japan. *Kidney Int* **63**: 2286–2294.
55. Suzuki H, Suzuki Y, Narita I, Aizawa M, Kihara M, Yamanaka T, Kanou T, Tsukaguchi H, Novak J, Horikoshi S, Tomino Y. 2008. Toll-like receptor 9 affects severity of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **19**: 2384–2395.
56. Suzuki H, Fun R, Zhang Z, Brown R, Hall S, Julian B A, Chatham W W, Suzuki Y, Wyatt R J, Moldoveanu Z, Lee J Y, Robinson J, Tomana M, Tomino Y, Mestecky J, Novak J. 2009. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *J Clin Invest* **119**: 1668–1677.
57. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr A B, Renfrow M B, Wyatt R J, Scolari F, Mestecky J, Gharavi A G, Julian B A. 2011. The Pathophysiology of IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **22**: 1795–1803.
58. Suzuki H, Raska M, Yamada K, Moldoveanu Z, Julian B A, Wyatt R J, Tomino Y, Gharavi A G, Novak J. 2014. Cytokines after IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes. *The Journal of biological chemistry* **289**: 5330–5339.
59. Takahashi K, Raska M, Stuchlova Horynova M, Hall S D, Poulsen K, Kilian M, Hiki Y, Yuzawa Y, Moldoveanu Z, Julian B A, Renfrow M B, Novak J. 2014. Enzymatic sialylation of IgA1 Oglycans: implications for studies of IgA nephropathy. *PloS one* **9**.
60. Teplan Vladimír. *Praktická nefrologie*. 2., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2006, 496 s., ISBN 80-247-1122-2.

61. Tomana M, Novak J, Julian BA, Matousovic K, Konecny K, Mestecky J. 1999. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *The Journal of clinical investigation* **104**: 73–81.
62. Valderrábano F, Berthoux F C, Jones E H, Mehls O. 1996. Report on management of renal failure in Europe, XXV, 1994 End stage renal disealysis report. IgA nefropathy as primary renal disease. *Nephrol Dial transplant* **11**: 5–9.
63. Waldherr R, Rambousek M, Duncker W D, Ritz E. 1989. Frequency of mesangial IgA deposits in non-selected autopsy series. *Nephrol Dial Transplant* **4**: 943–946.
64. Woof J M, Mestecky J. 2005. Mucosal immunoglobulins. *Immunol Rev* **206**: 64–82.
65. Yadav K, Singhal N, Rishi V, Yadav H. 2014. Cell Proliferation Assays. Published online.
66. Yanagihara T, Browna R, Halla S, Moldoveanu Z, Goepfertc A, Tomana M, Juliana B A, Mestecky J, Novak J. 2012. In vitro-generated immune complexes containing galactose-deficient IgA1 stimulate proliferation of mesangial cells. *Results in Immunology* **2**: 1–212.
67. Zhao N, Hou P, Lv J, Moldoveanu Z, Li Y, Kiryluk K, Gharavi A G, Novak J, Zhang H. 2012. The level of galactose-deficient IgA1 in the sera of patients with IgA nephropathy is associated with disease progression. *Kidney international* **82**: 790–796.
68. Yoshikawa N, Iijima K, Matsuyama S, Suzuki J, Kameda A, Okada S, Nakamura H. 1990. Repeat renal biopsy in children with IgA nephropathy. *Clinical Nephrology* **33**: 160–167.

Webové stránky

Česká nefrologická společnost. <http://www.nefrol.cz/odbornici/registry/cesky-registr-biopsii>. [online]. 10.1.2016 [cit. 2016-01-10]. Dostupné z: <http://www.nefrol.cz/odbornici/registry/cesky-registr-biopsii>

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ACE	angiotenzin konvertující enzym
ASGPR	asialoglykoproteinový receptor
BrdU	bromo-2'-deoxyuridin
BSA	hovězí sérový albumin
C	konstantní doména Ig
C1GalT1	β 1,3-galaktosyltransferáza
CFSE	karboxyfluorescein sukcinimidyl ester
CIK	cirkulující imunokomplexy
Cosmc	β 3-Gal-T specific molecular chaperone
cpm	<i>counts per minute</i>
CR	komplementový receptor
DMSO	dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FBS	fetální bovinní sérum
Gal	galaktóza
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalaktozamin
GalNAcT2	galaktosyltransferáza 2
Gd-IgA1	v galaktóze-deficientní IgA1
HAA	<i>Helix aspersa agglutinin</i>
HLA	hlavní histokompatibilní komplex
Ig	imunoglobulin
IgA	imunoglobulin A
IgAN	imunoglobulin A nefropatie
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IK	imunokomplex
IL	interleukin
MBP	protein vázající manózu
MC	mezangiální buňky
mIgA	monomerní IgA
OPD	<i>o</i> -fenylendiamin dihydrochlorid

PBS	fosfátový pufr s chloridem sodným
PDGF	růstový faktor z destiček
pIgA	polymerní IgA
POGSs	potencionální <i>O</i> -glykosylační místa
polyIg R	polymerní Ig receptor
SA	kyselina sialová
ST3Gal	α 2,3-sialyltransferáza
ST6GalNAc-II	α 2,6-sialyltransferáza
TGF- β	transformující růstový faktor beta
TNF	faktor nádorové nekrózy
GalNAc-Ts	galaktosyltransferáza
V	variabilní doména Ig