

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



**Charakterizácia buniek z periférnej krvi po stimulácii
interleukínom-6 u IgA nefropatie**

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Alica Čutková
Študijný program:	B1406 Biochémia
Študijný obor:	Biochémia
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
Rok:	2021

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstva. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznamená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa 10.5.2021

.....

Pod'akovanie

Moje pod'akovanie patrí školiteľke a konzultantke Mgr. Kateřine Zachovej, Ph.D. za pomoc, odborné vedenie, cenné rady a pripomienky pri vypracovaní bakalárskej práce. Pod'akovať by som sa chcela aj Ústavu imunológie LF UP za príležitosť vypracovať bakalársku prácu na jeho pôde a rovnako aj Katedre biochémie za skvelý prístup a ochotu pomáhať študentom počas celého štúdia.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Alica Čutková
Názov práce	Charakterizácia buniek z periférnej krvi po stimulácii interleukínom-6 u IgA nefropatie
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Bakalárska práca je zameraná na popis ochorenia IgA nefropatia a jeho príčiny, na popis glykozylácie pánthovej oblasti imunoglobulínu A1 a štruktúry tohto imunoglobulínu, na vývoj B lymfocytov v ľudskom organizme a na vplyv interleukínu-6 na rozvoj IgA nefropatie. Experimentálna časť je venovaná charakterizácii buniek z periférnej krvi. Vyizolované mononukleárne bunky z periférnej krvi boli stimulované interleukínom-6 a následne bol určovaný ich fenotyp pomocou povrchového farbenia a metódy prietokovej cytometrie. Bol tak simulovaný stav zvýšenia hladiny interleukínu-6 v ľudskom organizme. Určené fenotypy boli porovnané s fenotypmi nestimulovaných buniek a bol zhodnotený vplyv interleukínu-6 na vývoj B lymfocytov a jeho vplyv na ochorenie IgA nefropatia. Pozornosť bola venovaná aj metóde prietokovej cytometrie a bolo porovnané meranie klasickej prietokovej cytometrie a meranie spektrálnej cytometrie.

Kľúčové slová	IgA nefropatia, interleukín-6, B lymfocyty, imunoglobulín A1, pánthová oblasť, prietoková cytometria, periférna krv
Počet strán	54
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Alica Čůtková
Title	Characterization of peripheral blood cells after stimulation by interleukin-6 in IgA nephropathy
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D
The year of presentation	2021

Abstract

The bachelor thesis is focused on the description of IgA nephropathy and its cause, on the description of glycosylation of the hinge region of immunoglobulin A1 and the structure of this immunoglobulin, on the development of B lymphocytes in the human body and on the influence of interleukin-6 on the development of IgA nephropathy. The experimental part is devoted to the characterization of peripheral blood cells. Isolated peripheral blood mononuclear cells were stimulated by interleukin-6 and their phenotype was determined by surface staining and flow cytometry method. The situation of interleukin-6 increased level in the human body was simulated. The determined phenotypes were compared with unstimulated cell phenotypes and the effect of interleukin-6 on B cell development and on IgA nephropathy was evaluated. Attention was also paid to the method of flow cytometry and the measurement of the classical flow cytometry and the measurement of the spectral cytometry were compared.

Keywords	IgA nephropathy, interleukin-6, B lymphocytes, immunoglobulin A1, hinge region, flow cytometry, peripheral blood
Number of pages	54
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	10
2.1	IgA nefropatia	10
2.1.1	Príčina IgA nefropatie	10
2.1.2	IgA nefropatia a genetika	11
2.1.3	Pôvod galaktozyl-deficitného IgA1	11
2.2	Imunoglobulíny	12
2.2.1	Štruktúra imunoglobulínov	12
2.2.2	Spojovací reťazec	13
2.2.3	Funkcia imunoglobulínov	14
2.3	Imunoglobulín A	14
2.3.1	Podtriedy a štruktúra IgA	15
2.3.2	Pántová oblasť IgA1	15
2.3.3	Odbúranie IgA1	16
2.4	Glykozylácia pántovej oblasti IgA1	17
2.4.1	Enzýmy O-glykozylácie pántovej oblasti IgA1	18
2.4.2	Enzýmy zodpovedné za O-glykozyláciu a IgAN pacienti	18
2.5	Vývoj B lymfocytov v ľudskom organizme	19
2.5.1	Diferenciácia a dozrievanie B buniek v kostnej dreni	19
2.5.1.1	Zárodočné centrá	21
2.5.2	B bunky v periférnej krvi	21
2.5.3	Vývoj B buniek a aberantná glykozylácia IgA1	22
2.6	Cytokíny	22
2.6.1	Interleukín-6	23
2.6.1.1	IL-6 receptorový komplex	24
2.6.1.2	Klasická a trans-aktivácia signalizácie receptora IL-6	25
2.6.2	Vrodená imunita a IL-6	26
2.6.3	Získaná imunita a IL-6	26
2.6.4	STAT3 fosforylácia	26
2.6.5	Vplyv interleukínu-6 na rozvoj IgA nefropatie	27
2.7	Prietoková cytometria	28
2.7.1	Prístrojové usporiadanie	29
2.7.2	Realizácia merania pomocou prietokovej cytometrie	29
2.7.3	Získanie dát	30
2.7.4	Kompenzácia	30
2.7.5	Rozdiel medzi klasickým a spektrálnym prietokovým cytometrom	31
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	32
3.1	Materiál	32
3.1.1	Zoznam použitého biologického materiálu	32
3.1.2	Zoznam použitých chemikálií	32
3.1.3	Zoznam použitých roztokov	32
3.1.4	Zoznam použitých pomôcok a prístrojov	33
3.1.5	Zoznam použitých vyhodnocovacích a štatistických programov	33
3.2	Metódy	33
3.2.1	Izolácia mononukleárných buniek z periférnej krvi	33
3.2.2	Počítanie buniek pod svetelným mikroskopom	34
3.2.3	Kultivácia buniek	35

3.2.4	Povrchové farbenie nekultivovaných bunkových populácií a ich meranie pomocou prietokových cytometrov	35
3.2.5	Povrchové farbenie kultivovaných bunkových populácií nestimulovaných a stimulovaných IL-6 a ich meranie pomocou prietokového cytometra	36
3.2.6	Nastavenie knižnice fluorochrómov	37
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	39
4.1	Počítanie buniek pod svetelným mikroskopom	39
4.2	Proces kompenzácie pri klasickej prietokovej cytometrii	39
4.3	Stratégia gatovania	40
4.4	Porovnanie merania prístrojov BD Canto II a SONY	43
4.5	Stanovenie B bunkových populácií v týždeň kultivovaných bunkách z periférnej krvi zdravého jedinca pomocou povrchového farbenia	43
4.6	Stimulácia mononukleárnych buniek periférnej krvi zdravého jedinca interleukínom-6	46
5	ZÁVER	50
6	LITERATÚRA	51
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	53

CIELE PRÁCE

Teoretická časť:

- popis vzniku a príčin IgA nefropatie;
- štruktúra ľudských imunoglobulínov, zameranie sa na IgA;
- glykozylácia pánthovej oblasti IgA, porovnanie normálneho a aberantného IgA u IgA nefropatie;
- vývoj B lymfocytov v ľudskom organizme;
- vplyv interleukínu-6 na vývoj IgA nefropatie.

Praktická časť:

- izolácia mononukleárných buniek z periférnej krvi;
- stanovenie bunkových populácií pomocou povrchového farbenia;
- stimulácia buniek periférnej krvi pomocou cytokínu IL-6;
- porovnanie fenotypov buniek pred a po stimulácii IL-6 pomocou spektrálnej cytometrie u pacientov s IgA nefropatiou.

1 ÚVOD

IgA nefropatia je autoimunitné ochorenie a svetovo najčastejšia primárna glomerulonefritída, pre ktorú neexistuje špecifická liečba. Ochorenie sa vyskytuje v akomkoľvek veku. Najčastejšími príznakmi sú makro a mikroskopická hematúria, infekcia horných dýchacích ciest či tráviaceho traktu, horúčky, proteinúria a rôzne štádia chronického ochorenia obličiek. Asi polovica pacientov s IgA nefropatiou prichádza do štádia, kedy im zlyhávajú obličky. Na rozvoj ochorenia vplýva genetická predispozícia či vonkajšie faktory.

Príčinou IgA nefropatie je tvorba polymérneho imunoglobulínu A1 s galaktozyl-deficitnými O-glykánmi v pánťovej oblasti. Na cirkulujúci abnormálny IgA1 sa viažu IgG či IgA autoprotilátky za vzniku cirkulujúceho imunitného komplexu.

Za normálnych okolností je IgA1 odbúrané v pečeni, avšak cirkulujúce imunitné komplexy sa zrejme nedokážu odbúrať správne. Imunitné komplexy tak zotrvávajú cirkulovať v krvi a následne sa usádzajú v glomerule, pričom sa aktivujú mezangiálne bunky a dochádza k poškodeniu obličiek. Jedným z procesov, ktoré sa spúšťajú po aktivácii mezangiálnych buniek, je produkcia cytokínov.

Interleukín-6 je cytokín, ktorý v tele človeka ovplyvňuje množstvo procesov. Má napríklad prozápalové aj protizápalové účinky a pôsobí ako rastový faktor pre zrelé B bunky a indukuje ich konečné dozrievanie na plazmatické bunky produkujúcej protilátky. Zabraňuje mnohým infekciám, ale za negatívum sa považuje jeho aktivita, ktorá je schopná udržiavať chronické zápal.

Pacienti s IgA nefropatiou majú zvýšenú hladinu IL-6 v krvnom obehú a lokálne aj v obličkách. Stimulácia buniek od IgA nefropatických pacientov interleukínom-6 ovplyvňuje aktivitu niektorých glykozyltransferáz, ktoré sa zúčastňujú O-glykozylácie pánťovej oblasti IgA1. Bunky produkujúce IgA1 od pacientov s IgA nefropatiou po stimulácii interleukínom-6 zvyšujú produkciu galaktozyl-deficitného IgA1. U zdravých jedincov k významnému ovplyvneniu glykozylácie IL-6 nedochádza.

Interleukín-6 teda vplýva na rozvoj ochorenia IgA nefropatia. Preto bola experimentálna časť bakalárskej práce zameraná na určenie a popísanie buniek produkujúcich protilátky pomocou metódy prietokovej cytometrie a preukázať tak vplyv intreleukínu-6 na vývoj B lymfocytov v periférnej krvi človeka a jeho vplyv na rozvoj ochorenia IgA nefropatia.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 IgA nefropatia

IgA nefropatia (IgAN) je svetovo najčastejšou primárnou glomerulonefritídou, pre ktorú neexistuje kauzálna terapia (Knoppova *et al.*, 2016). Vyskytuje sa v akomkoľvek veku. (Donadio a Grande, 2002). U detí sa toto ochorenie prejavuje viditeľnou hematóriou sprevádzanou horúčkami a často infekciou horných dýchacích ciest. U dospelých je viditeľná hematória menej častá a prejavmi sú mikroskopická hematória, proteinúria, hypertenzia a rôzne štádiá chronického ochorenia obličiek (Knoppova *et al.*, 2016). Môžu sa vyskytnúť aj gastrointestinálne ťažkosti (Wyatt a Julian, 2013).

Až v 50 % prípadov u pacientoch s IgAN vedie zápalová aktivácia mezangiálnych buniek k terminálnemu zlyhaniu obličiek (Raška *et al.*, 2016). IgAN sa javí ako ochorenie systémové, pretože obličky sú častokrát po transplantácii opätovne poškodené (Wyatt a Julian, 2013).

2.1.1 Príčina IgA nefropatie

Na príčine IgAN sa podieľa zvýšená tvorba polymérneho imunoglobulínu A1 (IgA1), pre ktorý je charakteristické abnormálne zloženie niektorých sacharidových reťazcov (Raška *et al.*, 2016). Cirkulujúci autoantigén IgA1 s abnormálnym zložením sa viaže na antiglykany IgG či IgA a vytvára tak cirkulujúci imunitný komplex. IgAN teda zaradujeme medzi autoimunitné ochorenia. Niektoré z cirkulujúcich imunitných komplexov sa usádzajú v glomerule, čo zapríčiní aktiváciu mezangiálnych buniek a procesov ako bunková proliferácia, nadprodukcia zložiek extracelulárnej matrix či cytokínov/chemokínov (obr.1). Tieto procesy následne spôsobujú poškodenie obličiek (Knoppova *et al.*, 2016).

V patogenéze ochorenia IgAN má kľúčovú úlohu aberantne glykozylovaný IgA1 (obr.1). Experimentami *in vitro* sa zistilo, že naviazanie imunitných komplexov, ktoré obsahujú aberantne glykozylované IgA1, na mezangiálne bunky, vyvoláva patologické zmeny charakteristické pre IgAN. (Suzuki *et al.*, 2008).

IgA1 v mezangiálnych depozitoch je galaktozyl-deficitný IgA1 (Gd-IgA1) (Knoppova *et al.*, 2016). Depozity obsahujú tiež komplement C3 a menej často aj IgG a/alebo IgM. (Tomana *et al.*, 1999).

Predpokladá sa, že IgA1 v sére zdravých jedincov, na rozdiel od pacientov s IgAN, obsahuje málo alebo neobsahuje žiadne galaktozyl-deficitné O-glykány. Pacienti s IgAN

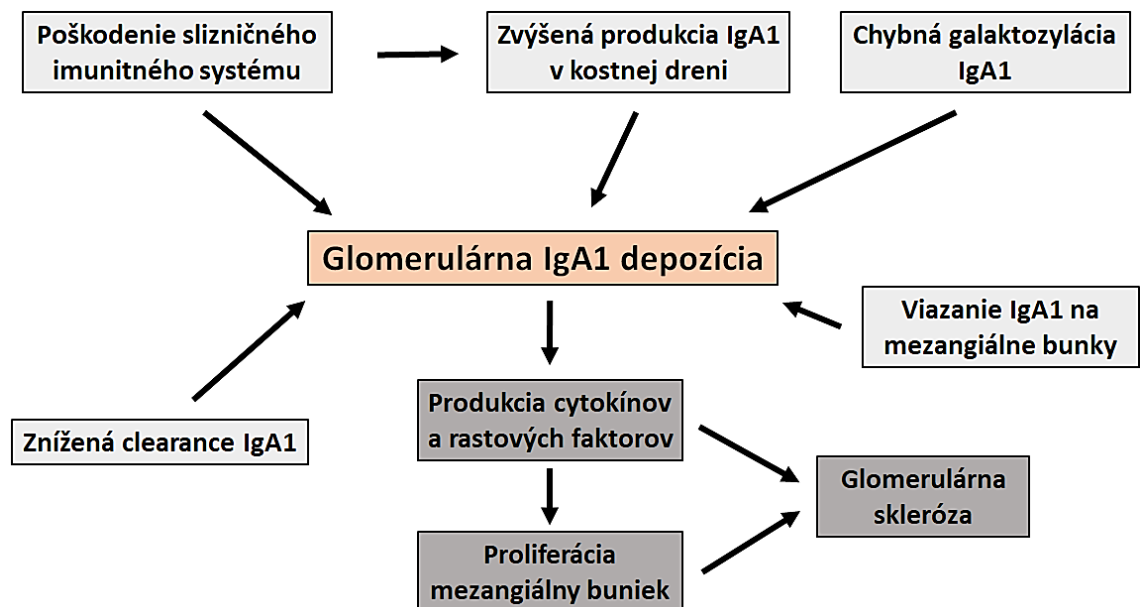
majú zvýšenú hladinu cirkulárneho Gd-IgA1 či imunitných komplexov obsahujúcich Gd-IgA1 (Yamada *et al.*, 2017).

2.1.2 IgA nefropatia a genetika

Genetické faktory ovplyvňujú patogenézu IgA nefropatie. Dedičnou vlastnosťou je zvýšená hladina Gd-IgA1 v sére. Asi 30 až 40 % príbuzných prvého stupňa má podobne vysoké hladiny tohto aberantného imunoglobulínu. Väčšina príbuzných so zvýšenou hladinou Gd-IgA1 v sére však nikdy nemala klinické prejavy ochorenia obličiek. Na prejavenie ochorenia sú potrebné ďalšie faktory (Wyatt a Julian, 2013).

2.1.3 Pôvod galaktozyl-deficitného IgA1

Značné dôkazy nasvedčujú tomu, že imunitné komplexy obsahujúce Gd-IgA1, ktoré sa nachádzajú v mezangiálnych imunitných depozitoch, pochádzajú z krvného obehu (Suzuki *et al.*, 2008). Zníženou reakciou IgA na slizničné antigény môže byť podporovaná produkcia polymérneho IgA1 v kostnej dreni, čo vedie k zvýšeniu sérových hladín IgA1 (Donadio a Grande, 2002). Galaktózový deficit O-glykánov IgA1 môže nastať kvôli zníženej galaktozylácii alebo predčasnej sialylácii, ktorá zabráni naviazaniu galaktózy. V tomto procese sa zúčastňuje aj nesprávna regulácia IL-6 (Knoppova *et al.*,



Obr. 1 Potenciálne mechanizmy vzniku glomerulárnej IgA1 depozície a progresia ochorenia IgAN (upravené podľa Donadio a Grande, 2002).

2016). Defektná galaktozylácia IgA1 môže znížiť hepatálny clearance IgA1 či podporiť väzbu IgA1 komplexov na glomerulárne mezangiálne bunky (Donadio a Grande, 2002).

Existuje aj teória možného prepojenia poškodenia obličiek a zápalu na slizniciach. V krvnom obehú sú IgA prevažne monoméne a pochádzajú z kostnej drene. Polymérne IgA sú typicky produkované na slizniciach. Gd-IgA1 v cirkulujúcich imunitných komplexoch u IgAN pacientoch sú hlavne polymérne, čo túto teóriu podporuje (Yamada *et al.*, 2017). Avšak IgA produkované slizničným tkanivom prispieva do cirkulárnej zásoby len málo (Knoppova *et al.*, 2016).

2.2 Imunoglobulíny

Imunoglobulíny (Ig), nazývané aj protilátky, sú produkované plazmatickými bunkami. Plazmatické bunky predstavujú konečné štádium diferenciácie B lymfocytov. Imunoglobulíny sa vyskytujú vo forme izotypov IgG, IgA, IgM, IgD a IgE. Izotypy určuje konštantná časť ťažkých reťazcov. IgM je prvým izotypom protilátok, ktorý sa tvorí po stretnutí s antigénom. Neskôr sa tvoria ďalšie izotypy, a to IgA, IgG a IgE. (Hořejší a Bartůňková, 2009).

2.2.1 Štruktúra imunoglobulínov

Imunoglobulín (obr. 2) je heterodimérny proteín (Schroeder a Cavacini, 2010). Skladá sa z dvoch ťažkých (H) reťazcov spojených disulfidovými mostíkmi, nazývané aj cystínové. Oblasť, kde dochádza k spojeniu týchto dvoch ťažkých reťazcov, sa nazýva pántová oblasť (HR). Ku každému H reťazcu je disulfidovým mostíkom pripojený jeden ľahký (L) reťazec. Ťažké reťazce sa skladajú zo štyroch domén, niekedy piatich, pričom každá doména je tvorená sekvenciou 110-120 aminokyselín. Domény sú spojené krátkymi spojovacími úsekmi polypeptidového reťazca. Ľahké reťazce sú zložené z dvoch imunoglobulínových domén (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Každý reťazec obsahuje jednu NH₂-koncovú variabilnú (V) doménu a jednu alebo viac COOH-koncových konštantných (C) domén. Každá doména pozostáva z dvoch sendvičovo usporiadaných β-skladaných listov spojených dohromady disulfidovým mostíkom medzi dvomi cysteínovými zvyškami (Schroeder a Cavacini, 2010). Variabilné domény na N-konci ťažkého reťazca sa označujú ako V_H a variabilné domény na N-konci ľahkého reťazca ako V_L. Konštantné domény ľahkého reťazca sa označujú ako C_L a konštantné domény ťažkého reťazca C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, poprípade C_{H4}. Čísľuje sa

väzbového miesta pre pIgR v imunoglobulínových polyméroch. Je kľúčovým proteínom v sekrečnej imunite. Polymérny IgR sprostredkúva aktívny transport naviazaného polymérneho imunoglobulínu z bazolateráliej na apikálnu stranu exokrinných epiteliálnych buniek, čím sa uvoľňujú sekrečné protilátky na slizničný povrch (Johansen *et al.*, 2000).

2.2.3 Funkcia imunoglobulínu

Funkciou imunoglobulínov je väzba na antigén (Hořejší a Bartůňková, 2009). Fc doména udeľuje protilátke biologické efektorové funkcie, ako je fagocytóza, aktivácia NK buniek a aktivácia klasickej dráhy komplementu (Lipman *et al.*, 2005). Variabilná časť určuje špecifickosť (Hořejší a Bartůňková, 2009). Špecifickosť protilátky sa týka jej schopnosti rozpoznávať špecifický epitop v prítomnosti ďalších epitopov. Väzba epitopu na jeho protilátku je reverzibilná a závisí od presného zoskupenia protilátka-antigén (Lipman *et al.*, 2005). Sérové imunoglobulíny sú polyklonálnou zmesou molekúl líšiacich sa práve vo variabilných častiach. Umelo možno pripraviť bunkové línie produkujúce monoklonálne protilátky, ktoré majú rovnaký izotyp a rovnakú špecifickosť (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Väčšina antigénov je vysoko komplexná a obsahuje množstvo epitopov, ktoré rozpoznáva množstvo lymfocytov. Každý lymfocyt sa aktivuje, aby mohol proliferovať a diferencovať sa na plazmatické bunky. Výsledná protilátková odpoveď je polyklonálna. Polyklonálne protilátky rozpoznávajú viac epitopov. Monoklonálne protilátky sú protilátky produkované jedným klonom B lymfocytov (Lipman *et al.*, 2005).

Monošpecificita monoklonálnych protilátok je užitočná pri hodnotení zmien konformácie molekúl, interakcií proteín-proteín, fosforylačných stavov a pri identifikácii jednotlivých členov proteínových rodín. Využitie monošpecifickosti monoklonálnych protilátok môže mať ale aj obmedzenia. Malé zmeny v štruktúre epitopu, napríklad v dôsledku genetického polymorfizmu, glykozylácie a denaturácie, môžu výrazne ovplyvniť funkciu monoklonálnych protilátok (Lipman *et al.*, 2005).

2.3 Imunoglobulín A

IgA sa vyskytuje vo forme slizničnej a sérovej. Molekuly IgA sú vo veľkých množstvách vylučované na povrch slizníc, kde sa zúčastňujú ochrany proti mikroorganizmom. Ich funkciou je teda ochrana slizníc a opsonizácia (Hořejší a Bartůňková, 2009). Počiatočná

IgA odpoveď na infekciu či imunizáciu je v sére aj v sekrétoch charakteristická polymérnymi IgA (Knoppova *et al.*, 2016).

Okrem prítomnosti IgA v sére a na slizničných povrchoch sa IgA nachádza aj v slzách, slinách či mlieku. Obsah IgA v sére sa pohybuje v rozsahu $0,9-3,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Približne 55 % celkového množstva cirkulujúceho IgA je sústredeného v krvi a zvyšok v tkanivovom moku (Knoppova *et al.*, 2016).

2.3.1 Podtriedy a štruktúra IgA

Ľudský IgA má dve podtriedy, a to IgA1 a IgA2 (Knoppova *et al.*, 2016). IgA2 je fylogeneticky staršia forma. IgA1 vznikol z IgA2 inzerciou DNA kódujúcej pántovú oblasť (Tomana *et al.*, 1999).

Molekula monoméneho IgA1 je zložená z dvoch $\alpha 1$ reťazcov, molekula monoméneho IgA2 z dvoch $\alpha 2$ reťazcov, pričom α reťazce sú spojené disulfidovými mostíkmi. V polymérnej forme sa IgA vyskytuje ako dimér alebo tetramér. Reťazce $\alpha 1$ alebo $\alpha 2$ sa skladajú z jednej variabilnej a troch konštantných domén. Oba typy molekúl obsahujú aj dva ľahké reťazce (Knoppova *et al.*, 2016).

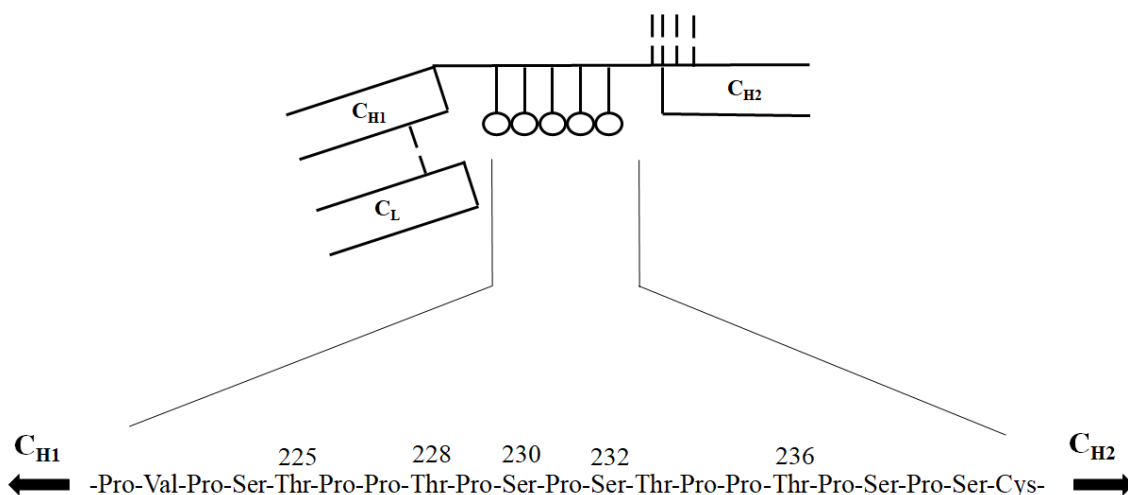
Sérové IgA je tvorené prevažne IgA1 molekulami. Z viac ako 90 % sa jedná o monoménu formu IgA, z menej ako 10 % ide o polyménu formu. Malá časť IgA je viazaná v cirkulujúcich imunokomplexoch. Celkový obsah cirkulujúceho IgA1 je $101 \pm 26 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ telesnej hmotnosti a celková zásoba IgA2 $14 \pm 4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ telesnej hmotnosti (Knoppova *et al.*, 2016).

U človeka prirodzene vyskytujúce sa protilátky IgG a IgM reagujú s Fab fragmentom IgA1, zatiaľ čo s IgA2 nereagujú (Tomana *et al.*, 1999).

2.3.2 Pántová oblasť IgA

Hlavný rozdiel medzi IgA1 a IgA2 je v pántovej oblasti. HR IgA1 obsahuje 26 aminokyselín a HR IgA2 13 (Knoppova *et al.*, 2016). IgA1 má teda oproti IgA2 predĺženú HR v dôsledku génovej inzercie, čo u IgA1 zaisťuje väčšiu flexibilitu Fab (Raška *et al.*, 2016) a uľahčuje interakciu s antigénom. (Knoppova *et al.*, 2016).

Pántová oblasť IgA1, vrátane prítomnosti O-glykánov, vykazuje sekvenčnú homológiu s mucínmi (Tomana *et al.*, 1999). V pántovej oblasti ťažkého reťazca IgA1 (obr. 3) môže byť na Ser alebo Thr naviazaných 3 až 6 O-glykánov. HR u IgA1 má celkovo 9 Ser a Thr aminokyselinových zvyškov. HR u IgA2 tieto aminokyselinové



Obr. 3 Pántová oblasť IgA1, podčiarknuté aminokyseliny predstavujú potencionálne miesta pre naviazanie O-glykánov (upravené podľa Novak *et al.*, 2008).

zvyšky neobsahuje, a teda ani naviazané O-glykány. Na HR normálneho ľudského IgA1 je najčastejšie prítomných 4 alebo 5 glykánov. Každý ťažký reťazec IgA1 obsahuje dva N-glykány, jeden na C_{H2} doméne (Asn263) a druhý na koncovom úseku (Asn459) (obr. 2) (Knoppova *et al.*, 2016).

Pántová oblasť je citlivá na proteázy niektorých bakteriálnych respiračných patogénov, ktoré sú jedinečné svojou substrátovou špecificitou výlučne k HR IgA1 (Raška *et al.*, 2016). Týmito baktériami, ktoré sú schopné produkovať IgA1 proteázy, sú napríklad *Streptococcus pneumonia*, *Haemophilus influenza* či *Neisseria meningitides* (Lechner *et al.*, 2016). Síce to svedčí o adaptácii niektorých baktérii na slizničnú imunitnú obranu, ale IgA1 proteázy môžu byť využité pri štúdiu IgA1, IgAN a predstavujú aj potencionálny terapeutický nástroj (Raška *et al.*, 2016).

2.3.3 Odbúravanie IgA1

Sérové IgA1 je rýchlo katabolizované hepatocytmi (Knoppova *et al.*, 2016), preto má relatívne krátky polčas života, približne 5–6 dní (Tomana *et al.*, 1999). Hepatocyty produkujú asialoglykoproteínový receptor (ASGP-R), ktorý viaže IgA1 a ďalšie glykoproteíny cez terminálny galaktózový alebo N-acetylgalaktózamínový (GalNAc) zvyšok (Knoppova *et al.*, 2016).

Pred dosiahnutím ASGP-R musia molekuly glykoproteínov opustiť krvný obeh a dostať sa do Disseho priestoru, ktorý obsahuje póry o veľkosti 18-25 nm. Väčšie molekuly, ako napríklad IgM a jeho komplexy, zotrávajú v obehu a môžu byť

katabolizované na inom mieste. Veľké cirkulujúce imunokomplexy kvôli svojej veľkosti neprechádzajú týmto molekulárnym sitom (Tomana *et al.*, 1999).

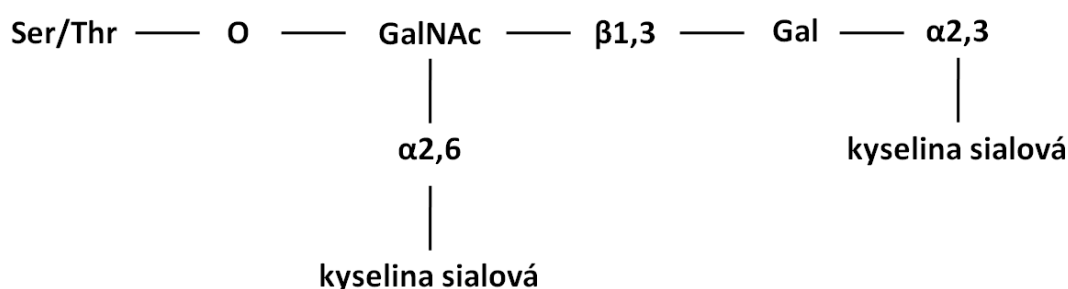
Glykoproteíny s terminálnym galaktózovým alebo GalNAc zvyškom sú ľahko odbúrateľné. Nedostatok galaktózy na O-glykánoch by nemal znižovať katabolizmus IgA1, keď je GalNAc stále prítomný. Avšak ak dôjde k naviazaniu IgG, IgA1, prípadne IgM na zvyšky GalNAc, pravdepodobne to bráni interakcii GalNAc s ASGP-R. Okrem toho zvýšená molekulová hmotnosť cirkulujúcich imunokomplexov obsahujúcich IgA a IgG môže zabráňovať prenikaniu cez póry a vedie to k odkloneniu týchto imunokomplexov od katabolickej dráhy (Tomana *et al.*, 1999).

2.4 Glykozylácia pántovej oblasti IgA

Imunoglobulíny sú glykoproteíny. Glykány asociované najmä s Fc doménou ovplyvňujú samotnú funkciu protilátky (Schroeder a Cavacini, 2010).

O-glykány pántovej oblasti normálneho IgA1 slúžia na ochranu HR pred proteázami, viažu baktérie (Schroeder a Cavacini, 2010) a pravdepodobne plnia kryciu funkciu potenciálnych antigénových miest. Avšak pri absencii zvyškov kyseliny sialovej a galaktózy v dôsledku štiepenia glykozidázami alebo deficitu špecifických glykozyltransferáz, sú odkryté GalNAc, ktoré sa chovajú ako antigénne determinanty a ktoré sú rozpoznávané odpovedajúcimi prirodzene sa vyskytujúcimi protilátkami v krvnom obehú. Dôležitosť GalNAc ako dominantného epitopu je posilnená skutočnosťou, že odstránenie GalNAc z Fab fragmentov IgA1 znižuje reaktivitu s IgG (Tomana *et al.*, 1999).

V normálnej sére sú O-glykány IgA1 zložené prevažne z disacharidu galaktóza(β 1-3)GalNAc, taktiež známeho ako T antigén, a jeho monosialyzovanou formou NeuAc(α 2-3)galaktóza(β 1-3)GalNAc či disialyzovanou formou



Obr. 4 Príklad štruktúry O-glykánú v pántovej oblasti normálneho IgA1 (upravené podľa Donadio a Grande, 2002).

NeuAc(α 2-3)galaktóza(β 1-3)(NeuAc(α 2-6))GalNAc (obr. 4), ktoré sa často označujú ako sialyl-T antigény. K O-glykozylácii dochádza v Golgiho aparáte (Knoppova *et al.*, 2016).

2.4.1 Enzýmy O-glykozylácie pántovej oblasti IgA1

O-glykozylácie HR IgA1 sa zúčastňuje viacero glykozyltransferáz, ktoré postupne pripájajú monosacharidy, a tým rastie O-glykánový reťazec. O-glykozylácia je iniciovaná pripojením GalNAc k Ser alebo Thr zvyškom pomocou UDP-GalNAc:polypeptid GalNAc-transferáz (ppGalNAc-Ts). Dominantnú úlohu počas O-glykozylácie HR IgA1 má predovšetkým GalNAc-T2, ale na iniciácii O-glykozylácie sa môžu podieľať aj GalNAc-T1 a GalNAc-T11. Po iniciačnom prídavku GalNAc k Ser alebo Thr zvyškom je galaktóza pripojená pomocou UDP-galaktóza:GalNAc- α -Ser/Thr (β 1-3)-galaktozyltransferázy (C1GalT1). Biosyntéza aktívnej C1GalT1 závisí na molekulárnom chaperone Cosmc. Štruktúry galaktóza-(β 1-3)GalNAc sú modifikované pripojením kyseliny sialovej z kyseliny CMP-N-acetylneuraminovej na galaktózové zvyšky pomocou galaktóza(β 1-2)GalNAc(α 2-3)sialyltransferázy (ST3Gal) a/alebo na GalNAc zvyšky pomocou (α 2-6)sialyltransferázy (ST6GalNAc) (Knoppova *et al.*, 2016).

2.4.2 Enzýmy zodpovedné za O-glykozyláciu a IgAN pacienti

Imunoglobulíny A1 v sére pacientov s IgAN majú oproti zdravým jedincom menej galaktóz na GalNAc. Gd-IgA1 produkujúce bunky od IgAN pacientov majú zvýšenú expresiu GalNAc-T14 a ST6GalNAc-II, a zníženú expresiu C1GalT1 a Cosmc (Knoppova *et al.*, 2016).

Štruktúra GalNAc-T14 je veľmi podobná GalNAc-T2. GalNAc-T14 môže pripájať GalNAc k HR IgA1. Jej nadexpresia IgA1 produkujúcimi bunkami u pacientoch s IgAN môže prispieť k zvýšeniu celkového množstva O-glykánov, a teda môže prispievať k aberantnej glykozylácii IgA1 (Knoppova *et al.*, 2016).

Nedostatok C1GalT1 spôsobuje skrátenie O-glykánov. Znížené hodnoty C1GalT1 boli zistené v subklonovaných Gd-IgA1 produkujúcich bunkách získaných od pacientov s IgAN. Nedostatok C1GalT1 sa taktiež prejavil pri stimulácii IgA1 produkujúcich buniek IL-6 (Knoppova *et al.*, 2016).

2.5 Vývoj B lymfocytov v ľudskom organizme

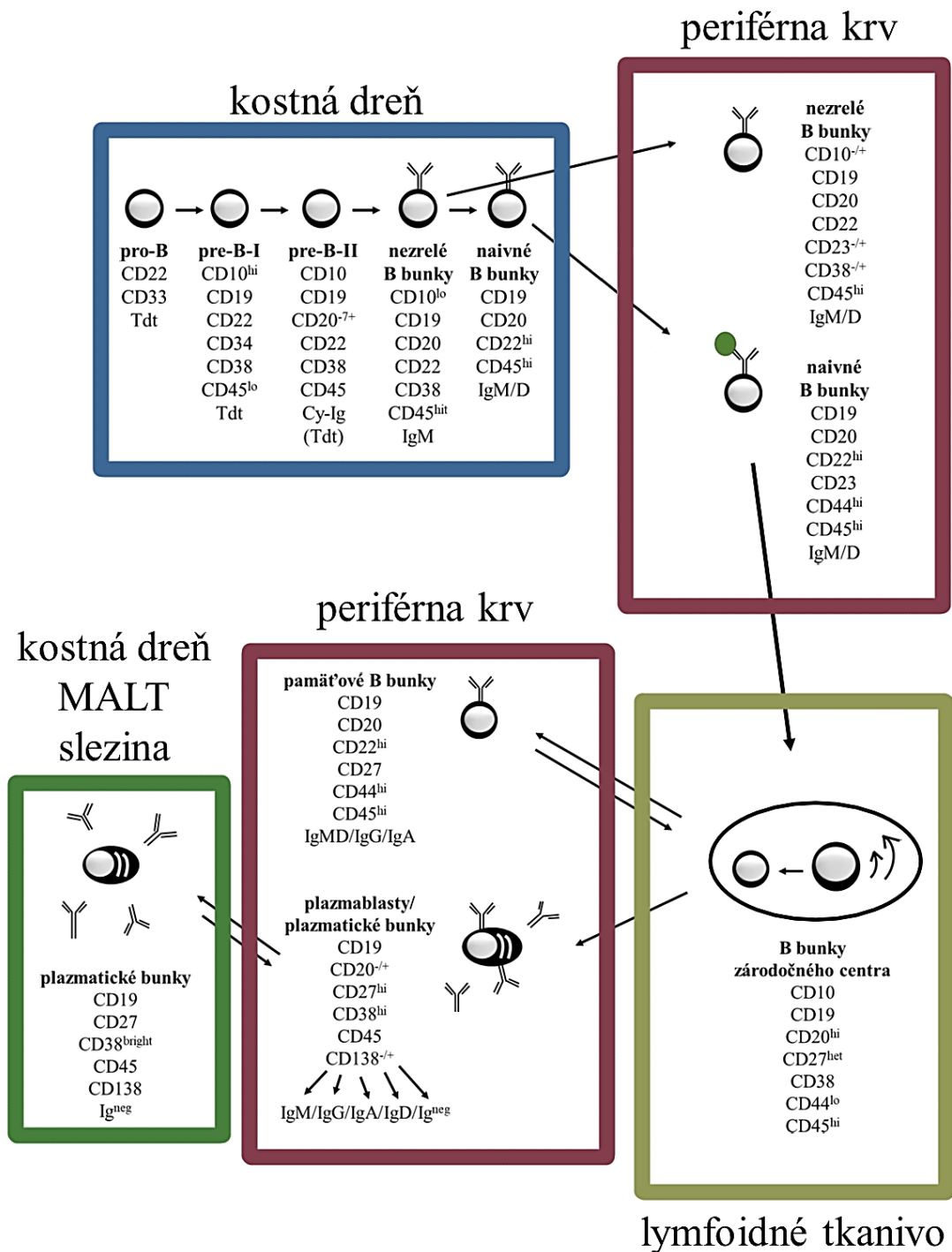
B lymfocyty sú populáciou buniek, ktoré na povrchu bunky produkujú rozmanité imunoglobulínové receptory a tie rozpoznávajú špecifické antigénne epitopy (LeBien a Tedder, 2008). Vývoj B buniek začína v kostnej dreni, kde z B bunkových prekursorov vznikajú pro- a pre-B bunky. Dozrievanie a diferenciácia B buniek prebieha v sekundárnych lymfoidných tkanivách (Morbach *et al.*, 2010) a v kostnej dreni. Medzi sekundárne lymfoidné tkanivá patrí slezina, lymfatické uzliny či slizničný imunitný systém (MALT). Transport do rôznych typov tkanív, vrátane slizníc či kostnej drene, kde dlhšie plazmatické bunky produkujú protilátky, umožňuje cirkulácia periférnej krvi. B bunky cirkulujúce v periférnej krvi možno rozdeliť do štyroch štádií, a to na nezrelé/prechodné, naivné, pamäťové B bunky a plazmatické bunky/plazmablasty (Perez-Andres *et al.*, 2010).

2.5.1 Diferenciácia a dozrievanie B buniek v kostnej dreni

Diferenciácia B buniek v kostnej dreni prebieha pomocou B bunkových prekursorov a pomocou prostriedkov podporujúcich diferenciáciu, medzi ktoré patria cytokíny, povrchové receptory stromálnych buniek či ligandy B bunkového antigénového receptora (BCR). Stromálne bunky spolu s osteoblastami, osteoklastami, T bunkami a leukocyty vytvárajú v kostnej dreni mikroprostredie potrebné pre vývoj B buniek. Dozrievanie B buniek má päť štádií a to pro-B bunky, pre-B-I, pre-B-II, nezrelé a naivné B bunky (obr. 5) (Perez-Andres *et al.*, 2010).

Nezrelé B bunky pred ukončením dozrievania prechádzajú negatívnym selektívnym procesom, v ktorom sa vyradia bunky, ktoré majú autoreaktívny BCR. Bunky, ktoré úspešne prejdú procesom, sa stanú naivnými B bunkami. Naivné B bunky so zrelými fenotypovými vlastnosťami a s plne funkčným BCR opúšťajú kostnú dreň, cievmi sa dostávajú do periférnej krvi, prostredníctvom ktorej cirkulujú medzi sekundárnymi lymfoidnými tkanivami. Ak sa nestretnú s antigénom, po pár dňoch odumierajú (Perez-Andres *et al.*, 2010).

Naivné B bunky, ktoré rozoznávajú antigény v slezine, lymfatických uzlinách alebo slizničnom imunitnom systéme sú spolu s aktiváciou CD4⁺ T buniek základom a štartom pre zárodočné reakčné centrá. Počas diferenciácie naivných B buniek na pamäťové bunky, B lymfocyty nadobúdajú vyššiu väzbovú afinitu pre antigén. Po niekoľkých proliferáciách a afinitnom dozrievaní v tmavých a bledých zónach zárodočného centra,



Obr. 5 Vývoj B buniek a jednotlivé B bunkové vývojové štádiá prítomné v kostnej dreni, periférnej krvi, lymfoidnom tkanive, slizničnom imunitnom systéme (MALT) či v slezine (upravené podľa Perez-Andres *et al.*, 2010).

bunky generujú pamäťové B bunky a preefektorové B bunky (plazmablasty). Inaktívne pamäťové B bunky zotrvávajú cirkulovať v periférnej krvi alebo migrujú do antigén odčerpávajúcich tkanív. Plazmablasty hľadajú útočisko v kostnej dreni alebo slizničnom

imunitnom systéme na dokončenie diferenciacie na bunky produkujúce protilátky (plazmatické bunky) (Perez-Andres *et al.*, 2010).

2.5.1.1 Zárodočné centrá

Zárodočné centrum obsahuje rýchlo sa množiace bunky. Je to hlavné miesto generovania plazmatických buniek a pamäťových B buniek (LeBien a Tedder, 2008).

Ak dôjde k stretnutiu naivných B buniek s príbuzným antigénom prezentovaným folikulárnymi dendritovými bunkami a ku kontaktu s aktivovanými antigénovo špecifickými T bunkami, naivné B bunky sa aktivujú a migrujú do zárodočných centier. V zárodočnom centre B bunky nepretržite prechádzajú medzi tmavou zónou-centroblastami a svetlou zónou-centrocytmi. V tmavej zóne sa bunky podrobujú procesom ako rapídna proliferácia, somatická hypermutácia IgV oblasti a izotypový prešmyk. V svetlej zóne sa bunky opätovne stretávajú s antigénmi, aby sa skontrolovala dostatočná afinita BCR k antigénu. Prežijú a ďalej proliferujú len B bunky s vysokou afinitnou BCR k antigénu (Perez-Andres *et al.*, 2010).

2.5.2 B bunky v periférnej krvi

V ľudskej krvi môžu byť rozpoznávané 4 hlavné typy B buniek. Nezrelé, naivné, pamäťové B lymfocyty a plazmatické bunky (obr.5) (Perez-Andres *et al.*, 2010).

Približne 60-70 % ľudských cirkulujúcich B buniek tvoria naivné B bunky, u ktorých nedošlo k mutácii sekvencie v IgV oblasti. U takéhoto typu B buniek dochádza ku koexpresii IgM a IgD (Perez-Andres *et al.*, 2010).

Pamäťové B bunky predstavujú asi 20-30 % ľudských cirkulujúcich B buniek. U pamäťových B buniek došlo k somatickej hypermutácii v IgV oblasti a asi polovica sa podrobila aj izotypovému prešmyku, čím sa docielilo, že približne jedna polovica produkuje povrchový IgG a IgA a druhá polovica povrchový IgM a IgD. V periférnej krvi u dospelého človeka 23 ± 10 % pamäťových B buniek produkuje povrchový IgG, 21 ± 9 % pamäťových B buniek povrchový IgA a 52 ± 15 % pamäťových B buniek produkuje povrchový IgM (Perez-Andres *et al.*, 2010).

Naivné aj pamäťové B lymfocyty cirkulujú v periférnej krvi, ale množstvo pamäťových B buniek sa zdržuje aj na miestach odtoku antigénov, ako je marginálna zóna sleziny či slizničný epitel mandlí. Väčšina naivných buniek zotrváva cirkulovať medzi rozličným lymfoidným tkanivom (Perez-Andres *et al.*, 2010).

U dospelého človeka v periférnej krvi je detekované malé množstvo plazmatických buniek. Väčšina týchto buniek odpovedá novej generácii plazmablastov migrujúcich zo sekundárnych lymfoidných tkanív do kostnej drene, MALT či chronicky zapálených tkanív. Medzi cirkulujúcimi plazmablastami a plazmatickými bunkami v porovnaní s plazmatickými bunkami v kostnej dreni je fenotypový rozdiel. Produkujú odlišné množstvá niektorých látok. (Perez-Andres *et al.*, 2010).

2-4 % zo všetkých B buniek v periférnej krvi tvoria nezrelé B bunky, ktoré opustili kostnú dreň počas procesu negatívnej selekcie. Tieto bunky majú nemutované IgH gény, majú fenotypické vlastnosti nezrelých B buniek, aj keď veľa z nich dokáže súčasne produkovať povrchový IgM a IgD. Pri autoimunitných ochoreniach či rôznych iných imunologických ochoreniach bol pozorovaný zvýšený výskyt nezrelých B lymfocytov v periférnej krvi a tento jav je spojený so znížením pamäťových B buniek. (Perez-Andres *et al.*, 2010).

2.5.3 Vývoj B buniek a aberantná glykozylácia IgA1

Je možné, že niektoré B bunkové stimulačné faktory môžu prispievať k zvýšeniu produkcie Gd-IgA1. Tieto faktory, ako napríklad B bunkový aktivačný faktor (BAFF), môžu riadiť IgA prepínanie triedy, diferenciáciu B-buniek, protilátkovú produkciu a bunkovú proliferáciu. (Knoppova *et al.*, 2016).

2.6 Cytokíny

Cytokíny sú základné regulátory imunitného systému. Sú to proteíny produkované leukocytmi a inými bunkami, ktoré prostredníctvom špecifických receptorov pôsobia na bunky imunitného systému, ale aj na bunky mimo tento systém. Existujú taktiež membránové formy niektorých cytokínov, ktoré sú na rozdiel od voľných foriem, ukotvené v cytoplazmatickej membráne. Výhodou membránových cytokínov je, že je zaistené ich výrazné lokálne pôsobenie a nedochádza k ich odplavovaniu ani zried'ovaniu difúziou. U niektorých cytokínov je podobný lokalizačný efekt dosiahnutý ich adsorpciou na povrchové proteoglykány niektorých buniek. Väčšina cytokínov je pleiotropných, čo znamená, že pôsobia na niekoľko druhov buniek. Cytokíny často pôsobia v kaskáde a do určitej miery sa môžu medzi sebou nahrádzať (Hořejší a Bartůňková, 2009).

2.6.1 Interleukín-6

Interleukín-6 (IL-6) je glykoproteín o hmotnosti od 21 do 28 kDa v závislosti od stupňa posttranslančnej modifikácie (Feghali a Wright, 1997). Je to pleiotropný cytokín s viacerými funkciami (Masuda *et al.*, 2013). Ovplyvňuje homeostatické procesy v tele človeka, vplýva na bunky imunitného systému, ale aj na bunky mimo tento systém, má prozápalové a protizápalové účinky. Stimuluje syntézu proteínov akútnej fázy v pečeni, pôsobí ako rastový faktor pre zrelé B bunky a indukuje ich konečné dozrievanie na plazmatické bunky produkujúcej protilátky. Podieľa sa na aktivácii T buniek a na ich diferenciácii. Má aj regulačné účinky zahŕňajúce inhibíciu produkcie faktoru nekrózy nádorov (TNF), čím obmedzuje reakcie akútneho zápalu (Feghali a Wright, 1997). Má podobné vlastnosti hormónom, pretože ovplyvňuje cievne ochorenia, metabolizmus lipidov, inzulínovú rezistenciu, mitochondriálnu aktivitu, neuroendokrinný systém a neuropsychologické chovanie (Hunter a Jones, 2015).

Takmer všetky stromálne bunky a bunky imunitného systému produkujú IL-6. Hlavnými aktivátormi expresie IL-6 sú IL-1 β a TNF. Syntézu IL-6 môžu podporiť napríklad aj Toll-like receptory (TLRs), prostaglandíny, adipokíny, stresové reakcie a ďalšie cytokíny. Expresia IL-6 je na úrovni transkripcie a postranskripčnej modifikácie kontrolovaná pomocou molekúl mikroRNA, RNA-viažucimi proteínmi a RNázami (Hunter a Jones, 2015).

Fyziologická hodnota IL-6 v ľudskom sére je 1-5 pg·ml⁻¹, čo je relatívne nízka hodnota, ale v chorobnom prostredí a v extrémnych situáciách sa množstvo IL-6 v sére rýchlo zvyšuje. Vtedy sa môže koncentrácia IL-6 pohybovať v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. IL-6 je na jednej strane predmetom homeostatickej bazálnej regulácie a na druhej strane predmetom rýchlej indukcie v súvislosti s infekciou, autoimunitou a rakovinou. Pri týchto stavoch je zvýšenie IL-6 častokrát lepším indikátorom ochorenia ako C-reaktívny proteín (Hunter a Jones, 2015). Neregulovaná nadexpresia IL-6 je spojená s autoimunitným zápalovým ochorením a s rastom nádorov (Masuda *et al.*, 2013).

IL-6 zabraňuje mnohým infekciám, ale za negatívum sa považuje jeho aktivita, ktorá je schopná udržiavať chronické zápaly. Nedostatok IL-6 spôsobuje narušenie vrodenej a získanej imunity voči vírusovým, parazitickým a bakteriálnym infekciám (Hunter a Jones, 2015).

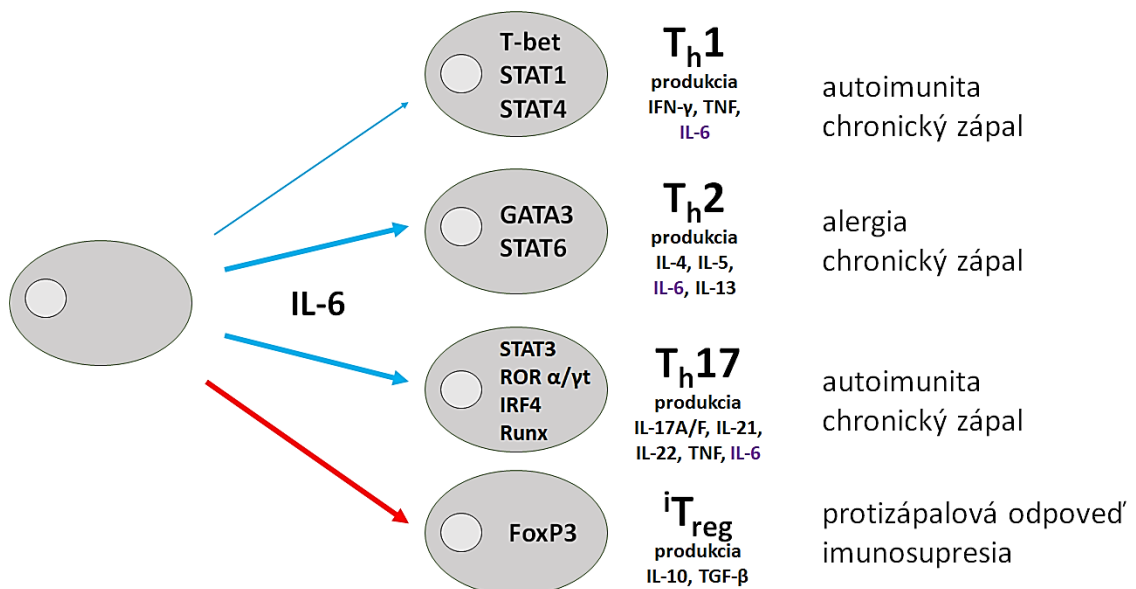
Pri liečbe chronických zápalov, autoimunity a rakoviny sa využívajú modifikátory biologickej odpovede, ktoré inhibujú zápalové cytokíny, a malé molekuly, ktoré spúšťajú kinázy asociované v cytokínovej signalizácii (Hunter a Jones, 2015).

2.6.1.1 IL-6 receptorový komplex

Na cieľových bunkách sa IL-6 viaže na 80-kilodaltonový receptor IL-6 (IL-6R). Komplex IL-6 a IL-6R sa spája s proteínom gp130, následne dochádza k dimerizácii a je iniciovaná intracelulárna signalizácia. Proteín gp130 je exprimovaný vo všetkých bunkách. IL-6R je prítomný iba v niekoľkých bunkách tela, napríklad v hepatocytoch a niektorých leukocytoch. Bunky, ktoré neexprimujú IL-6R, nemôžu na cytokín reagovať, pretože samotný gp130 nemá dostatočnú afinitu k IL-6 (Rose-John, 2012).

Okrem úlohy signalizačnej podjednotky IL-6R má gp130 funkciu aj pri hematopoéze, bunkovom vývine a pôsobí ako β -cytokínový receptor pre IL-11, IL-27, onkostatín-M, ciliárny neurotropický faktor, kardiotrofin-1, inhibičné faktory leukémie a cytokín podobný kardiotrofinu (Hunter a Jones, 2015).

Po obsadení IL-6 receptorového komplexu sa spúšťajú viaceré dráhy (obr. 6), ktoré umožňujú IL-6 sprostredkovať rozličné efekty. Takouto dráhou je napríklad dráha zahŕňajúca tyrozínkinázy rodiny JAK a transkripčné faktory rodiny STAT. Dimerizácia gp130 aktivuje kinázy rodiny JAK a podporí fosforyláciu STAT1, STAT3 a v menšom



Obr. 6 Vplyv IL-6 na transkripčné faktory a následne na diferenciaciu T buniek a efektorové funkcie. Červená šípka znázorňuje inhibíciu, modré šípky aktiváciu (upravené podľa Neurath a Finotto, 2011).

rozsahu aj STAT5. JAK-STAT signalizácia cez gp130 je kontrolovaná SOCS supresívami a látkami rodiny CIS. Tieto látky signalizáciu IL-6 inhibujú. Absencia SOCS3 spôsobuje, že IL-6 sa chová podobne ako IL-10, ktorý je silným inhibítorom makrofágov a dendritových buniek (Hunter a Jones, 2015).

2.6.1.2 Klasická a trans-aktivácia signalizácie receptora IL-6

IL-6 využíva dva mechanizmy na sprostredkovanie biologických účinkov, a to klasickú a trans-aktiváciu signalizácie receptora IL-6 (Hunter a Jones, 2015). V klasickej signalizácii interleukín-6 aktivuje rôzne typy buniek, ktoré majú na membráne viazaný IL-6 receptorový komplex. V trans-signalizácii IL-6 aktivuje IL-6R⁻ gp130⁺ bunky prostredníctvom rozpustného IL-6R (Neurath a Finotto, 2011).

Klasická signalizácia IL-6 prostredníctvom membránovo viazaného IL-6R je potrebná pre regeneračné alebo protizápalové aktivity cytokínu (Rose-John, 2012). Predpokladá sa, že cez klasickú signalizáciu IL-6 receptora sa kontrolujú centrálné homeostatické procesy a imunologické účinky ako odpoveď akútnej fázy, glukózový metabolizmus, hematopoéza a regulácia neuroendokrinného systému (Hunter a Jones, 2015).

Trans-signalizácia je proces, v ktorom rozpustná forma IL-6R (sIL-6R) viaže IL-6 s podobnou afinitou ako IL-6R viazaný na membránu. Komplex IL-6 a sIL-6R sa môže viazať na gp130 buniek, ktoré neexprimujú IL-6R a ktoré na IL-6 nereagujú. Trans-signalizácia IL-6 je prozápalová (Rose-John, 2012). Niektoré ochorenia ako kolitída, fibróza tkanív, zápalová artritída, alergia, infekcia, neurozápal, kardiovaskulárne ochorenia a rakovina vyvolaná zápalom ukazujú, že trans-signalizácia IL-6 je dôležitá pre nábor a apoptózu leukocytov, pre zachovanie funkčnosti efektora T buniek a pre zápalovú aktiváciu stromálneho tkaniva (Hunter a Jones, 2015).

Rozpustnú formu IL-6R môžeme klasifikovať ako alarmin. Po uvoľnení z neutrofilov, sIL-6R podporuje trans-signalizáciu IL-6 v lokálnom prostredí ako reakciu na ochorenie, pričom reakcia ovplyvňuje vrodené a získané imunologické účinky (Hunter a Jones, 2015).

Dôležitá je aj regulácia IL-6 receptora na CD4⁺ T bunkách. Expresia IL-6R v CD4⁺ T bunkách je obmedzená na nezrelé a centrálné pamäťové populácie. CD4⁺ T bunky, ktoré sa zotavili z miesta, kde sa bojovalo proti chorobe, majú typický nedostatok IL-6R, ale zostávajú citlivé na trans-signalizáciu IL-6 (Hunter a Jones, 2015).

2.6.2 Vrodená imunita a IL-6

IL-6 moduluje takmer každý aspekt vrodeného imunitného systému, vrátane hematopoézy a náboru neutrofilov do miesta infekcie či poškodenia. Riadi reguláciu chemokínov aktivujúcich neutrofilov a apoptózu neutrofilov. IL-6 má jasný prozápalový efekt, napríklad v reakciách akútnej fázy, avšak tento efekt závisí na situácii a IL-6 môže rovnako koordinovať aj antizápalové procesy. (Hunter a Jones, 2015).

Toll-like receptory (TLRs) sú kľúčovými molekulami vo vrodenej imunita a sú zapojené v patogenéze IgAN. Exogénne antigény pochádzajúce z patogénov aktivujú TLR9-MyD88 signalizačnú dráhu. Tento proces vedie k výraznému zvýšeniu syntézy zápalových cytokínov, teda aj IL-6 (Makita *et al.*, 2020).

2.6.3 Získaná imunita a IL-6

IL-6 indukuje dozrievanie B buniek na bunky produkujúce protilátky a taktiež podporuje životnosť plazmatických buniek. IL-6 slúži ako prepojenie medzi T a B bunkovou odpoveďou a je považovaný za kľúčový spúšťač sekrécie IL-17 CD4⁺ alebo CD8⁺ T bunkami. Hlavne aktivácia STAT3 interleukínom-6 u nezrelých CD4⁺ T buniek, v prítomnosti cytokínu TGF- β , podporuje populačnú expanziu buniek T_H17, ktoré produkujú transkripčné faktory ROR γ t a AhR a sekretujú IL-17A. Bunky T_H17 sú v mnohých ochoreniach patologické a keďže IL-6 hrá svoju úlohu pri ich vzniku, stal sa predmetom záujmu pri výskume terapií. IL-6 podporuje aj produkciu IL-10 T bunkami, ktorý redukuje množstvo zápalových procesov. (Hunter a Jones, 2015).

IL-6 môže inhibovať funkciu T_{reg} buniek (obr. 6) a zabraňovať premene T_H17 buniek na bunky T_{reg}. V miestach zápalu sú T_{reg} bunky zrejme schopné preprogramovať sa a získať vlastnosti efektora bez straty transkripčného faktora FoxP3. IL-6 podporuje generáciu FoxP3-exprimujúcich T buniek, ktoré exprimujú buď T-bet alebo ROR γ a obmedzujú expresiu transkripčného faktora Eos, ktorý je korepresorom pre FoxP3. Absencia STAT3 zhoršuje potlačujúce vlastnosti T_{reg} buniek *in vivo*, čo indikuje potenciálne spojenie medzi STAT3 a FoxP3 (Hunter a Jones, 2015).

2.6.4 STAT3 fosforylácia

STAT3 patrí do rodiny signálnych transduktorov a aktivátorov transkripcie (STAT). Bol objavený ako zložka komplexu s interleukínom-6, ktorý aktivuje faktor reakcie akútnej fázy (APRF). APRF má rozhodujúcu úlohu pri stimulácii expresie mediátorov vrodenej

imunity v pečeni. Aktiváciu STAT3 vyvoláva množstvo cytokínov a rastové faktory. STAT3 taktiež sprostredkúva dôležité kaskády signálnej transdukcie vyvolané intracelulárnymi proteínmi, ako sú aktivované onkoproteíny Ras alebo tyrozínkinázy (Hillmer *et al.*, 2016).

Primárna aminokyselinová sekvencia STAT3 pozostáva z Src homológnej (SH2) domény a C-koncového tyrozínového zvyšku (Y705), ktorý sa fosforyluje pomocou JAK kináz po stimulácii cytokínmi, po signalizácii receptora proteínovej tyrozínkinázy alebo po intracelulárnej aktivácii proteínovej tyrozínkinázy (Hillmer *et al.*, 2016).

Ako kľúčový aktivačný mechanizmus vedúci k stimulácii transkripčnej funkcie STAT3 je vznik homodimérov prostredníctvom interakcie medzi doménou SH2 a fosfotyrozínom. STAT3 podlieha taktiež fosforylácii serínu v polohe 727, čo zvyšuje transkripčnú aktivitu (Hillmer *et al.*, 2016).

STAT3 fosforylácia je klasickou signalizačnou dráhou spojenou so signalizáciou IL-6 (Yamada *et al.*, 2017).

2.6.5 Vplyv interleukínu-6 na rozvoj IgA nefropatie

Niektoré štúdie odhalili zvýšenú expresiu mRNA pre TLR9 a BAFF v mononukleárných bunkách v periférnej krvi a tiež zvýšenú hladinu BAFF proteínu v sére pacientov s IgAN. BAFF indukuje izotypový prešmyk v B bunkách a môže tak riadiť hladiny cirkulujúceho IgA1. V B a T bunkách u pacientoch s IgAN bol taktiež odhalený L-selektín. Na základe týchto dát bol u IgA nefropatických pacientoch identifikovaný prozápalový stav B buniek, podľa čoho bolo ďalej navrhnuté, že niektoré cytokíny môžu zvyšovať produkciu Gd-IgA1 (Knoppova *et al.*, 2016).

Produkcia IL-6 je typicky spojená s aktiváciou cytokín-produkujúcich T buniek. T bunky sú zdrojom cytokínov, a teda prispievajú k patogenéze IgAN (Yamada *et al.*, 2017).

Pacienti s IgAN majú okrem zvýšenej hladiny cirkulujúceho Gd-IgA1 a imunitných komplexov obsahujúcich Gd-IgA1, zvýšenú aj hladinu IL-6 v krvnom obehu a lokálne aj v obličkách (Yamada *et al.*, 2017). Zápal pri IgAN môže galaktózový deficit IgA1 ešte zvýšiť. U IgA1 produkovaného bunkovými líniami od IgAN pacientov IL-6, a v menšom rozsahu aj IL4, ešte viac zdôrazňuje galaktózový deficit. Stimulácia buniek od IgAN pacientov interleukínom-6 zvyšuje aktivitu ST6GalNAc a znižuje aktivitu C1GalT1. IL4 redukuje aktivitu C1GalT1. IgA1 produkujúce bunky od IgAN pacientov po stimulácii IL-6 zvyšujú produkciu Gd-IgA1 (Knoppova *et al.*, 2016). U zdravých jedincov

k významnému ovplyvneniu glykozylácie interleukínom-6 nedochádza (Yamada *et al.*, 2017).

IL-6 zvyšuje a predlžuje aktiváciu STAT3 u IgA1 produkujúcich buniek od pacientov s IgAN. Kanonický transkripčný faktor IL-6 a ďalšie cytokíny menia signalizáciu a transkripciu riadenú STAT3, čo môže zohrávať dôležitú rolu v produkcii Gd-IgA1 (Knoppova *et al.*, 2016).

V prípade štúdie Yamady *et al.* (2017) bola interleukínom-6 aktivovaná STAT3 fosforylácia Y705 väčšia a trvala dlhšie u IgA1 produkujúcich buniek od IgAN pacientov v porovnaní so zdravými jedincami. Zvýšená a dlhšie pretrvávajúca aktivácia STAT3 fosforylácie Y705 predstavuje patogenetický proces v IgAN, ktorý vo výsledku vplýva na nadprodukciiu Gd-IgA1, teda na kľúčovú patogénnu molekulu v IgAN (Yamada *et al.*, 2017).

2.7 Prietoková cytometria

Prietoková cytometria je metóda umožňujúca rýchlu analýzu veľkého počtu buniek, pričom je využívané meranie rozptylu svetla, meranie fluorescencie alebo absorbancie. Väčšinou ide o monitorovanie fluorescencie. Touto metódou možno stanoviť množstvo bunkových parametrov a informácie o tom, ako sú tieto parametre distribuované v bunkovej populácii. Bunkové parametre, ktoré možno pomocou prietokovej cytometrie určiť, sú napríklad veľkosť buniek, membránový potenciál a intracelulárne pH či množstvá bunkových zložiek ako je DNA, proteíny, povrchové receptory a vápnik (Rieseberg *et al.*, 2001). Prietoková cytometria sa využíva na imunofenotypizáciu, viacparametrickú analýzu DNA alebo na počítanie buniek (Picot *et al.*, 2012). Je využívaná pri bežných klinických vyšetreniach ako je komplexný krvný obraz, na sledovanie počtu T lymfocytov či na identifikáciu zápalových buniek (Jahan-Tigh *et al.*, 2012).

Veľké množstvo publikácií o prietokovej cytometrii je z lekárskej a klinickej oblasti, no táto metóda je cenným nástrojom aj v biológii, farmakológii, toxikológii, bakteriológii, virológii, vo vedách o životnom prostredí a v monitorovaní bioprocessov (Rieseberg *et al.*, 2001). Biologickým materiálom môže byť periférna krv, aspiráty kostnej drene, koža či bunkové línie tkanivových kultúr získaných biopsiou. Prietoková cytometria meria jednotlivé bunky pretekajúce cez detektorový systém (Jahan-Tigh *et al.*, 2012).

2.7.1 Prístrojové usporiadanie

Prístroj prietokovej cytometrie pozostáva z piatich hlavných častí- zdroj svetla (laser), prietoková cela, optické systémy na detekciu špecifických vlnových dĺžok v širokospektrálnom rozsahu, fotodiódy alebo fotonásobiča na citlivú detekciu signálov a prístroj na spracovanie a prácu s údajmi (Rieseberg *et al.*, 2001).

2.7.2 Realizácia merania pomocou prietokovej cytometrie

Meranie začína výberom fluorescenčne značených protilátok špecifických pre markery na bunkovom povrchu. Markery sú využívané na charakterizáciu požadovanej bunkovej populácie. Markermi bunkového povrchu sú zvyčajne glykoproteíny CD (Jahan-Tigh *et al.*, 2012).

Vzorka môže byť spracovaná enzymatickou degradáciou, centrifugáciou alebo filtráciou. Výsledkom je izolácia požadovaných buniek a táto bunková suspenzia je zafarbená pomocou fluorescenčných protilátok. Vzorka je transportovaná nosnou tekutinou do meracej cely. Dochádza k takzvanej hydrodynamickej fokusácii. Meracia cela je tak úzka, že zaistuje prietok len jednej bunky a bunky teda prechádzajú celou jedna za druhou. Každá bunka je postupne ožiarená jednotlivými lasery a emisia naviazaných fluorochrómov je detekovaná v prípade klasickej cytometrie fotodiódami, (Jahan-Tigh *et al.*, 2012) poprípade fotonásobičom (PMT) pri spektrálnej cytometrii (Futamura *et al.*, 2015).

Fluorescenčná chemická látka viazaná na protilátku, ktorá sa nazýva fluorochróm (fluorofór), je vyberaná na základe špecifickej vlnovej dĺžky prítomného lasera v prietokovom cytometri. Fluorochróm absorbuje energiu z lasera a následne ju uvoľňuje vo forme špecifickej vlnovej dĺžky svetla. Vyžarované svetlo je detekované optickým systémom, ktorý je citlivý na rôzne vlnové dĺžky. Špecializovaný softvér potom môže graficky znázorniť distribúciu označených bunkových populácií v jedno-, dvoj- alebo trojrozmernom formáte (Jahan-Tigh *et al.*, 2012).

Značené môžu byť protilátky, plazmatická membrána, DNA alebo napríklad substráty pre enzýmy. Je možné súčasne merať viac parametrov jednej bunky detekciou bunkového povrchu molekúl určujúceho línie, aktivačný stav, stav fosforylácie signálnych transdukčných molekúl, intracelulárnu produkciu cytokínov, fázu bunkového cyklu, životaschopnosť, tok vápnika a ďalšie (Jahan-Tigh *et al.*, 2012).

2.7.3 Získanie dát

Keď je bunka vystavená excitačnému zdroju, dochádza k lámaniu laserového lúča všetkými smermi. Osvetlenie bunky zdrojom excitačného svetla poskytuje predný či bočný rozptyl a fluorescenčné svetlo (Picot *et al.*, 2012).

Predný rozptyl predstavuje rozptyl svetla v malých uhloch a označuje sa ako FSC. Veľkosť svetla predného rozptylu koreluje s relatívnou veľkosťou buniek (Picot *et al.*, 2012).

Svetlo, ktoré sa vychýľuje od bunky v uhle 90°, sa nazýva bočný rozptyl a je označovaný ako SSC (Jahan-Tigh *et al.*, 2012). Na bočný rozptyl vplýva niekoľko parametrov ako napríklad zrnitosť, veľkosť či morfológia buniek (Rieseberg *et al.*, 2001). Informácie o zrnitosti buniek sú užitočné napríklad pre rozlíšenie lymfocytov a granulocytov (Jahan-Tigh *et al.*, 2012). Bočný rozptyl a fluorescenčné svetlo je filtrované pomocou dichroických zrkadiel a adekvátnych emisných filtrov v emisnom optickom systéme, ktorý smeruje svetlá s rôznymi vlnovými dĺžkami k príslušným detektorom. Úloha dichroického zrkadla je zásadná, pretože selektuje, odráža a prenáša svetelný signál smerom k špecifickým detektorom zhromažďujúcim špecifickú fluorescenciu. (Picot *et al.*, 2012).

Výsledné údaje sa analyzujú softvérom pre cytometre. Rozptylové a fluorescenčné signály je možné kombinovať rôznymi spôsobmi, ktoré umožňujú pozorovať všetky subpopulácie. Vo väčšine prípadov sa na vizualizáciu cytometrických údajov používajú grafy s dvoma parametrami, ale sú vyvinuté aj metódy viacrozmernej analýzy údajov získaných multiparametrickou analýzou (Rieseberg *et al.*, 2001).

Jednou zo základných možností na vizualizáciu údajov prietokovej cytometrie je bodový graf, pričom na osi x sa zobrazuje intenzita FSC a na osi y intenzita SSC. V bodovom grafe je rozptyl vynesovaný lineárne, zatiaľ čo vo fluorescenčných grafoch z dôvodu širokého rozsahu fluorescenčných signálov sa zvyčajne zobrazuje logaritmicky (Jahan-Tigh *et al.*, 2012).

2.7.4 Kompenzácia

K dispozícii sú rôzne fluorochrómy, ktoré vyžarujú svetlo rôznych vlnových dĺžok zatiaľ čo absorbujú svetlo rovnakej vlnovej dĺžky. Toto je základom pre polychromatickú prietokovú cytometriu, ktorá umožňuje prietok vzorky označenej rôznymi fluorochrómi. Pretože sa emisné spektrá fluorochrómov v rôznej miere prekrývajú,

jeden detektor môže vidieť fluorescenciu pochádzajúcu z viac ako jedného fluorochrómu. Toto prekryvanie musí byť odstránené pomocou matematického algoritmu, takže detektor hlási signál iba z jedného fluorochrómu. Tento proces sa nazýva „kompenzácia“ (Jahan-Tigh *et al.*, 2012).

2.7.5 Rozdiel medzi klasickým a spektrálnym prietokovým cytometrom

Klasické prietokové cytometre využívajú na delenie a filtrovanie emitovaného fluorescenčného svetla dichroické zrkadlá a pásmové filtre (Futamura *et al.*, 2015) a pracujú na princípe „jeden detektor, jedna farba“. Údaje sa typicky analyzujú kontrolou dvojrozmerných projekcií. Pre takúto analýzu dvojrozmerných údajov je nevyhnutné optimalizovať kombináciu fluorochrómov, nastavenie filtra a laserov z hľadiska minimalizácie prekryvu, zvýšenia citlivosti detekcie a zníženia signálov pozadia. Avšak takáto analýza dvojrozmerných dát je časovo náročná a v dnešnej dobe sa vedecká komunita prikláňa skôr k viacrozmernej analýze (Feher *et al.*, 2016).

Bolo uznané, že princíp „jeden detektor, jedna farba“ nie je nevyhnutný a že bunky je možné rozlíšiť „spektrálnym odtlačkom prsta“, čo je základom spektrálnej cytometrie (Feher *et al.*, 2016). Pri spektrálnej prietokovej cytometrii je emisná fluorescencia z jednotlivých buniek rozptyľovaná pomocou hranolov alebo difrakčných mriežok. Pomocou fotonásobiča alebo nábojovo viazanej súčiastky sa získava celé fluorescenčné spektrum a separuje čiastočné signály z každej fluorescenčnej sondy. Spektrálna cytometria má jedinečné optické usporiadanie a algoritmus poskytuje vysokorýchlostnú, vysoko citlivú, presnú, automatickú analýzu a v reálnom čase spektrálnu separáciu všetkých fluorescenčných signálov, a to aj pri viacfarebnej analýze spektrálne susediacich fluorescenčných proteínov a fluorochrómov. Okrem toho môže spektrálna prietoková cytometria merať a odčítavať autofluorescenciu každej bunky, čím poskytuje zvýšené pomery signál-šum a vylepšené rozlíšenie matných vzoriek (Futamura *et al.*, 2015). Spektrálny cytometer je tiež pozoruhodný tým, že má zanedbateľné spektrálne medzery medzi detektormi, čo znamená, že sa zhromažďuje takmer všetko dostupné svetlo (Feher *et al.*, 2016).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Zoznam použitého biologického materiálu

- periférna krv zdravého jedinca

3.1.2 Zoznam použitých chemikálií

- anti-CD3-APC, anti-CD4/CD8-FITC/PE, anti-IgG-PE-Cy5 (BD Biosciences, New Jersey, USA)
- anti-CD3-BV605, anti-CD4-BV570, anti-CD8-BV785, anti-CD19-PE-eFluor610 (Sony Biotechnologies, Tokio, Japonsko)
- anti-CD19-APC-eFluor780, anti-CD19-PE-eFluor610, anti-CD27-PE-Cy7, anti-CD38-BV650, anti-CD138-BV711, anti-IgD-BV510, anti-IgM-BV605 (eBioscience, San Diego, Kalifornia, USA)
- anti-IgA-FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvánia, USA)
- fetálne bovinné sérum FBS (Gibco, Bazilej, Švajčiarsko)
- Ficoll-Paque o hustote $1,077 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- guľičky AbcTM Total Antibody Compensation Bead Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- IL-6 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- trypanová modrá (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- 10x PBS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- RPMI médium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- tepelne spracované ľudské sérum (pripravené na Ústave Imunológie LF UP, Olomouc, Česká republika)

3.1.3 Zoznam použitých roztokov

- kompletne kultivačné RPMI médium- 10 % FBS (Gibco, Bazilej, Švajčiarsko), 1 % penicilín-streptomycín (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- 10 % roztok tepelne spracovaného ľudského séra- roztok pripravený z 10 μl ľudského séra a 90 μl 1x PBS

- 5 % roztok fetalného bovinného séra (FBS)- roztok pripravený z 5 µl FBS (Gibco, Bazilej, Švajčiarsko) a 95 µl PBS
- 1x PBS- 10 ml 10x PBS + 90 ml ddH₂O (v nasledujúcom texte pojem PBS predstavuje 1x PBS)

3.1.4 Zoznam použitých pomôcok a prístrojov

- 6-jamkový panel (Techno Plastic Products, Trasadingen, Švajčiarsko)
- Bürkerova komôrka (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Nemecko)
- centrifúgy (Hettich, Tuttlingen, Nemecko)
- cytometer BD Canto II (BD Biosciences, New Jersey, USA)
- cytometrické skúmavky (Falcon, New York, USA)
- falkonky (VWR, West Chester, Pennsylvánia, USA)
- laminárny flow-box Aura-VF48 (BioAir, Pero, Taliansko)
- mikroskúmavky (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Pasteurove pipety (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- pipety (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- spektrálny cytometer SONY SP6800 (Sony, Tokio, Japonsko)
- svetelný mikroskop Opton Standard 20 (Zeiss, Jena, Nemecko)
- vacuette EDTA skúmavka (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA)
- vortex (Ika, Staufen im Breisgau, Nemecko)

3.1.5 Zoznam použitých vyhodnocovacích a štatistických programov

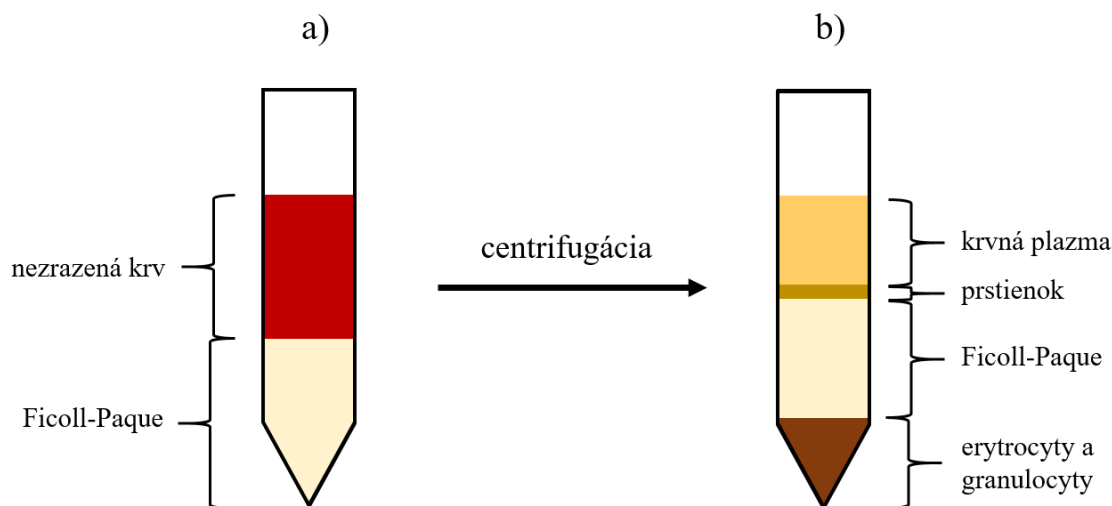
- FlowJo software v.10 (BD Biosciences, New Jersey, USA)
- GraphPad Prism v.5 software (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornia, USA)

3.2 Metódy

3.2.1 Izolácia mononukleárných buniek z periférnej krvi

Práca za sterilných podmienok, v laminárnom flow-boxe.

1. Nezrazená krv o objeme 9 ml odobratá od zdravej kontroly do odberovej EDTA skúmavky bola napipetovaná do falkonky o objeme 50 ml. Po pridaní 6 ml PBS nasledovalo premiešanie.



Obr. 7 Separácia jednotlivých zložiek krvi pomocou roztoku Ficoll-Paque, v časti obrázka a) možno pozorovať dve fázy vzniknuté po navrstvení krvi na Ficoll-Paque pred centrifugáciou, v časti obrázka b) možno pozorovať rozseparované zložky krvi po centrifugácii.

2. Boli pripravené dve falkonky o objeme 15 ml. Do každej bol pridaný Ficoll-Paque o objeme 4 ml.
3. Krv zmiešaná s PBS bola vrstvená na Ficoll-Paque za pomoci Pasteurovej pipety tak, aby v oboch falkonkách bol výsledný objem približne rovnaký. Zmes krvi a PBS bola pipetovaná pomaly po stene falkonky. Po ukončení vrstvenia boli pozorované oddelené vrstvy, čo možno pozorovať na obr. 7 a).
4. Obsah falkoniiek bol centrifugovaný 40 minút pri 400 x g a laboratórnej teplote.
5. Po centrifugácii boli pozorovateľné štyri fázy, čo možno pozorovať na obr. 7 b). Do dvoch čistých falkoniiek bol pomocou pipety rovnomerne prenesený prstienok s mononukleárnymi bunkami- prstienok tvorený lymfocytmi, monocytmi a NK bunkami. Nasledovalo premytie buniek za pomoci PBS. V oboch skúmavkách bol objem doplnený na 14,5 ml s roztokom PBS.
6. Obsah skúmaviiek bol centrifugovaný 20 minút pri 200 x g a laboratórnej teplote. Supernatant sa odsal.
7. Oba pelety boli zlúčené a resuspendované v celkovom objeme PBS 500 μ l.
8. Výsledný roztok s bunkami bol pripravený na ďalšie použitie.

3.2.2 Počítanie buniek pod svetelným mikroskopom

1. Bol pripravený roztok obsahujúci 2 μ l roztoku buniek, 18 μ l PBS a 20 μ l trypanovej modrej. Zmes bola premiešaná.

2. Bunková suspenzia bola aplikovaná do Bürkerovej komôrky a analyzovaná pod svetelným mikroskopom.
3. Živé bunky boli spočítané v prvých štyroch štvorčekoch Bürkerovej komôrky a následne bol ich celkový počet dopočítaný (viď podkapitola 4.1).

3.2.3 Kultivácia buniek

Práca za sterilných podmienok, v laminárnom flow-boxe.

1. Do dvoch jamiek v 6-jamkovom paneli bolo napipetované po 5 ml kompletného kultivačného RPMI média.
2. Do jednej jamky bol pridaný IL-6, pričom pridané množstvo IL-6 predstavovalo 10 ng IL-6 na 1 ml média.
3. Do oboch jamiek bolo napipetované 208 μ l roztoku buniek, čo predstavovalo približne 5 miliónov buniek. Všeobecne sa teda na 1 ml média aplikuje 1 milión buniek.
4. Bunky stimulované IL-6 a nestimulované boli kultivované týždeň v inkubátore pri 37°C a pri 5 % CO₂.

3.2.4 Povrchové farbenie nekultivovaných bunkových populácií a ich meranie pomocou prietokových cytometrov

1. Do dvoch mikroskúmaviek bolo napipetované približne po jednom miliónu buniek, do každej bol pridaný 1 ml PBS a následne boli obsahy mikroskúmaviek centrifugované 5 minút pri 250 x g a laboratórnej teplote. Supernatant bol odsatý.
2. Nešpecifické väzby protilátok boli blokované pomocou tepelne spracovaného ľudského séra. 50 μ l 10% roztoku ľudského séra bolo pridaných k peletu v jednej mikroskúmavke a ďalších 50 μ l k peletu v druhej mikroskúmavke. Bolo resuspendované a odstáť 10 minút.
3. Ku vzorke bol pridaný 1 ml PBS a bolo centrifugované 5 minút pri 250 x g a laboratórnej teplote. Supernatant bol odsatý.
4. K peletu bolo pridaných 100 μ l 5% roztoku FBS a bolo resuspendované. Obsah mikroskúmavky bol prepipetovaný k peletu v druhej mikroskúmavke a bolo resuspendované. Následne bol objem vzorky rozdelený do oboch mikroskúmaviek rovnako, čiže 50 μ l a 50 μ l.

Tab. 1 Typ a množstvo značených protilátok pridaných ku vzorkám na základe merania na danom cytometri.

1. mikroskúmavka (meranie na prístroji SONY)	2. mikroskúmavka (meranie na prístroji BD Canto II)
4 µl anti-CD3-BV605	4 µl anti-CD19-APC-eFluor780
4 µl anti-CD4-BV570	5 µl anti-CD3-APC
4 µl anti-CD8-BV785	20 µl anti-CD4/CD8-FITC/PE
4 µl anti-CD19-PE-eFluor610	

- Do mikroskúmaviek boli pridané značené protilátky (fluorochrómy) na základe Tab. 1. Prídavok fluorochrómov závisel od následného merania na príslušnom prístroji.
- Vzorky s pridanými značenými protilátkami boli inkubované v tme 30 minút pri laboratórnej teplote, nasledovalo pridanie 1 ml PBS a centrifugácia 5 minút pri 250 x g a laboratórnej teplote. Supernatant bol odsatý.
- K peletu bolo pridaných 350 µl PBS, bunky boli resuspendované a vzorka bola prepipetovaná do cytometrickej skúmavky.
- Meranie bolo uskutočnené na prístrojoch SONY a BD Canto II, pričom pred meraním boli vzorky zvortexované.

3.2.5 Povrchové farbenie kultivovaných bunkových populácií nestimulovaných a stimulovaných IL-6 a ich meranie pomocou prietokového cytometra

- Po týždňovej kultivácii boli bunky nestimulované a stimulované IL-6 prepipetované do dvoch falkoniiek o objeme 15 ml a objem bol doplnený doplna pomocou PBS.
- Bolo centrifugované 5 minút pri 250 x g a laboratórnej teplote. Supernatant bol odsatý.
- Nešpecifické väzby protilátok boli blokované pomocou tepelne spracovaného ľudského séra. 50 µl 10% roztoku ľudského séra bolo pridaných k peletu vzorky nestimulovanej a ďalších 50 µl k peletu vzorky stimulovanej IL-6. Bolo resuspendované, obe vzorky boli prenesené do mikroskúmaviek a boli odstáť 10 minút.

Tab. 2 Typ a množstvo značených protilátok pridaných do roztoku.

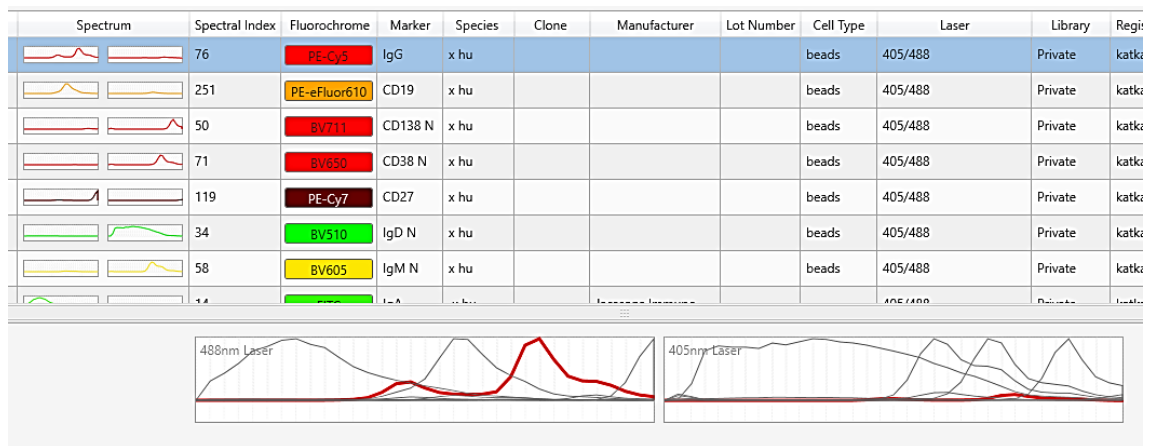
Značené protilátky	
4 µl anti-IgA-FITC	10 µl anti-CD19-PE-eFlour610
20 µl anti-IgG-PE-Cy5	10 µl anti-CD27-PE-Cy7
10 µl anti-IgD-BV510	10 µl anti-CD38-BV650
10 µl anti-IgM-BV605	10 µl anti-CD138-BV711

4. K vzorkám bol pridaný 1 ml PBS a bolo centrifugované 5 minút pri 240 x g a laboratórnej teplote. Supernatant bol odsatý.
5. Do 5 % roztoku FBS o objeme 100 µl bolo pridaných 8 značených protilátok na základe Tab. 2.
6. K peletom bolo pridaných 90 µl 5% FBS s protilátkami a bolo inkubované 30 minút v tme pri laboratórnej teplote.
7. K vzorkám bol pridaný 1 ml PBS a bolo centrifugované 5 minút pri 240 x g a laboratórnej teplote. Supernatant bol odsatý.
8. K peletom bolo pridaných 350 µl PBS, bolo resuspendované a vzorky boli prepipetované do cytometrických skúmaviek.
9. Bolo uskutočnené meranie na prístroji SONY, pričom pred meraním boli vzorky zvortexované.

3.2.6 Nastavenie knižnice fluorochrómov

Na prístroji SONY bola nastavená knižnica fluorochrómov tak, že boli premerané pozitívne a negatívne kontroly. Stanovenie knižnice fluorochrómov umožňuje komerčne dodaný kit obsahujúci dve sady polystyrénových guľičiek. Jedny guľičky na seba viažu nami zvolenú a dodanú protilátku a slúžia tak ako pozitívna kontrola. Druhý typ guľičiek protilátky neviaže a predstavuje negatívnu kontrolu. Po zmeraní oboch typov guľičiek a zadaní kriviek pozitívnej a negatívnej kontroly si software cytometru spočíta charakteristiku pre daný fluorochróm. Na obr. 8 je knižnica fluorochrómov, ktorá pripravená už bola. Knižnicu pre fluorochrómy anti-CD3-BV605, anti-CD4-BV570, anti-CD8-BV785 a anti-CD19-PE-eFluor610 bolo potrebné zostaviť.

1. Do mikroskúmavky bola pridaná kvapka guľičky, čo predstavovalo objem približne 50 µl, a boli pridané 3 µl anti-CD3-BV605.
2. Nasledovala inkubácia 15 minút v tme a pri laboratórnej teplote.



Obr. 8 Knižnica fluorochrómov.

3. Po inkubácii bol pridaný 1 ml PBS a bolo centrifugované 5 minút pri 250 x g a laboratórnej teplote. Supernatant bol odsatý.
4. K peletu guľičiek bolo pridaných 350 µl PBS, bolo resuspendované a vzorka bola prepipetovaná do cytometrickej skúmavky.
5. Bola pridaná 1 kvapka negatívnej kontroly.
6. Rovnaký postup bol zopakovaný aj pre fluorochrómy anti-CD4-BV570, anti-CD8-BV785 a anti-CD19-PE-eFluor610. Pripravili sa tak 4 roztoky, ktoré následne boli premerané na cytometri SONY a bola zostavená knižnica fluorochrómov.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Počítanie buniek pod svetelným mikroskopom

Počítanie buniek pod svetelným mikroskopom bolo uskutočnené po vyizolovaní mononukleárných buniek z periférnej krvi za účelom správneho stanovenia počtu buniek na kultiváciu a za účelom merania pomocou prietokového cytometra, aby bol roztok buniek pri meraní správne koncentrovaný.

V Bürkerovej komôrke sa spočítali nefarbené bunky v prvých štyroch štvorčekoch. Bunky sfarbené namodro predstavovali bunky mŕtve a do súčtu buniek prirátané neboli. Následne bol vypočítaný ich skutočný počet: 30 buniek v štyroch štvorčekoch Bürkerovej komôrky, to znamená, že v celej komôrke bolo približne $4 \times 30 = 120$ živých buniek. Pôvodný roztok buniek bol zriedený 10x pomocou PBS, 2x pomocou trypanovej modrej. Šírka medzi sklíčkom a Bürkerovou komôrkou bola 0,1 mm, čo v prepočte predstavuje konštantu 10, ktorá musí byť do výpočtu započítaná. Počet buniek v pôvodnej vzorke je $120 \times 10 \times 2 \times 10 = 24000$ buniek/ μl , teda 24000×10^3 buniek/ml. Objem pôvodnej vzorky bol 500 μl . Ak je teda 24 miliónov buniek v 1 ml, v 500 μl bude 12 miliónov buniek.

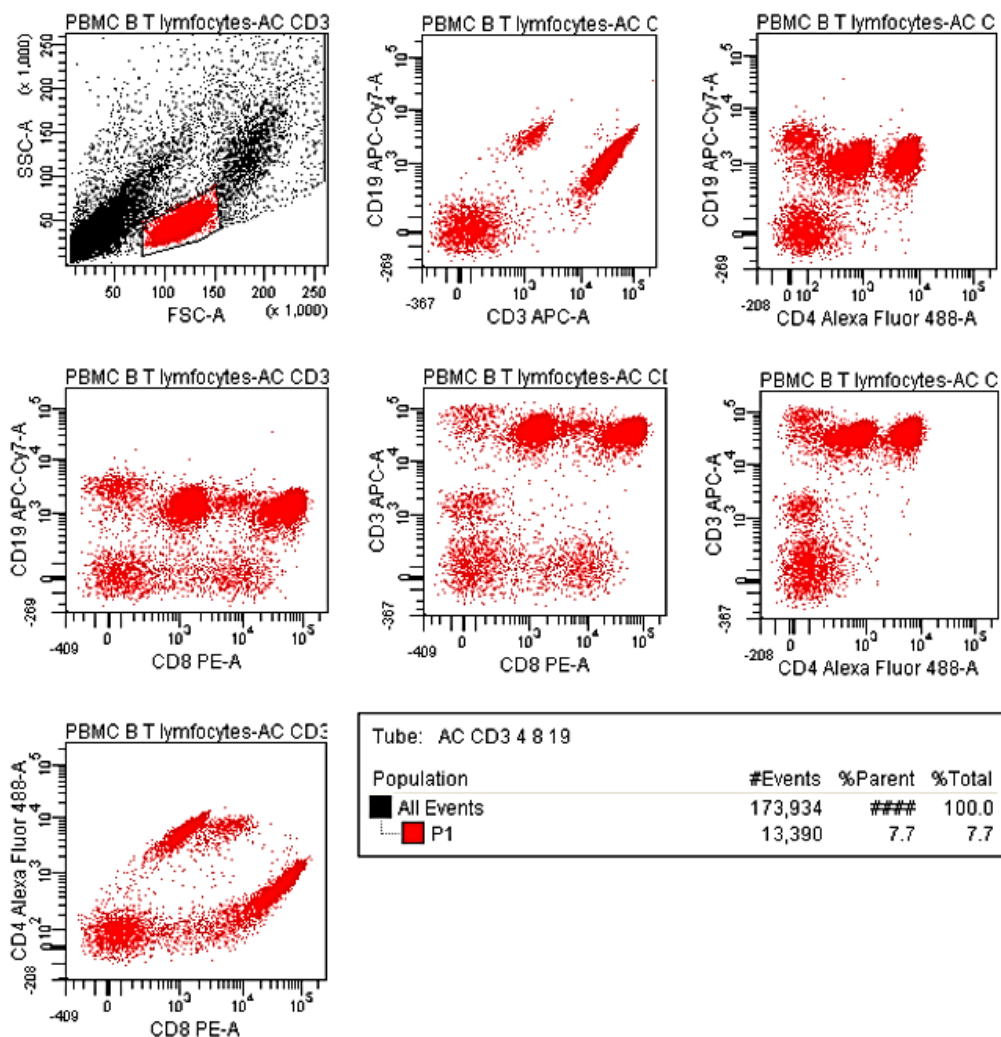
4.2 Proces kompenzácie pri klasickej prietokovej cytometrii

Klasická prietoková cytometria, ktorú predstavuje prístroj BD Canto II, vyžaduje proces úpravy, takzvanú kompenzáciu, aby nedochádzalo k priesvitu viacerých fluorochrómov. Takýto priesvit sa na zázname merania javí ako populácia buniek usporiadaná na uhlopriečke. Správne by bunky mali byť usporiadané v zhlukoch.

Boli získané záznamy merania buniek na prístroji BD Canto II (obr. 9, 10). Rozdiel medzi obr. 9 a obr. 10 je v kompenzácii. Na obidvoch záznamoch merania (obr. 9, 10) sú na grafoch hore vľavo zagatované lymfocyty.

V prípade nekompenzovaného záznamu merania (obr. 9) je možné pozorovať populácie buniek, ktoré sú rozptýlené po uhlopriečke. Najviac je to viditeľné na obr. 9 na prostrednom hornom grafe a na dolnom grafe. Takéto rozloženie bunkových populácií znamená, že dochádza k priesvitu dvoch fluorochrómov.

Pomocou manuálneho nastavenia je možné odčítať percentá fluorescencie fluorochrómu, ktorý presvitá, a tým dostať kompenzované dáta (obr. 10), kde sú už bunkové populácie rozložené typicky v zhlukoch.

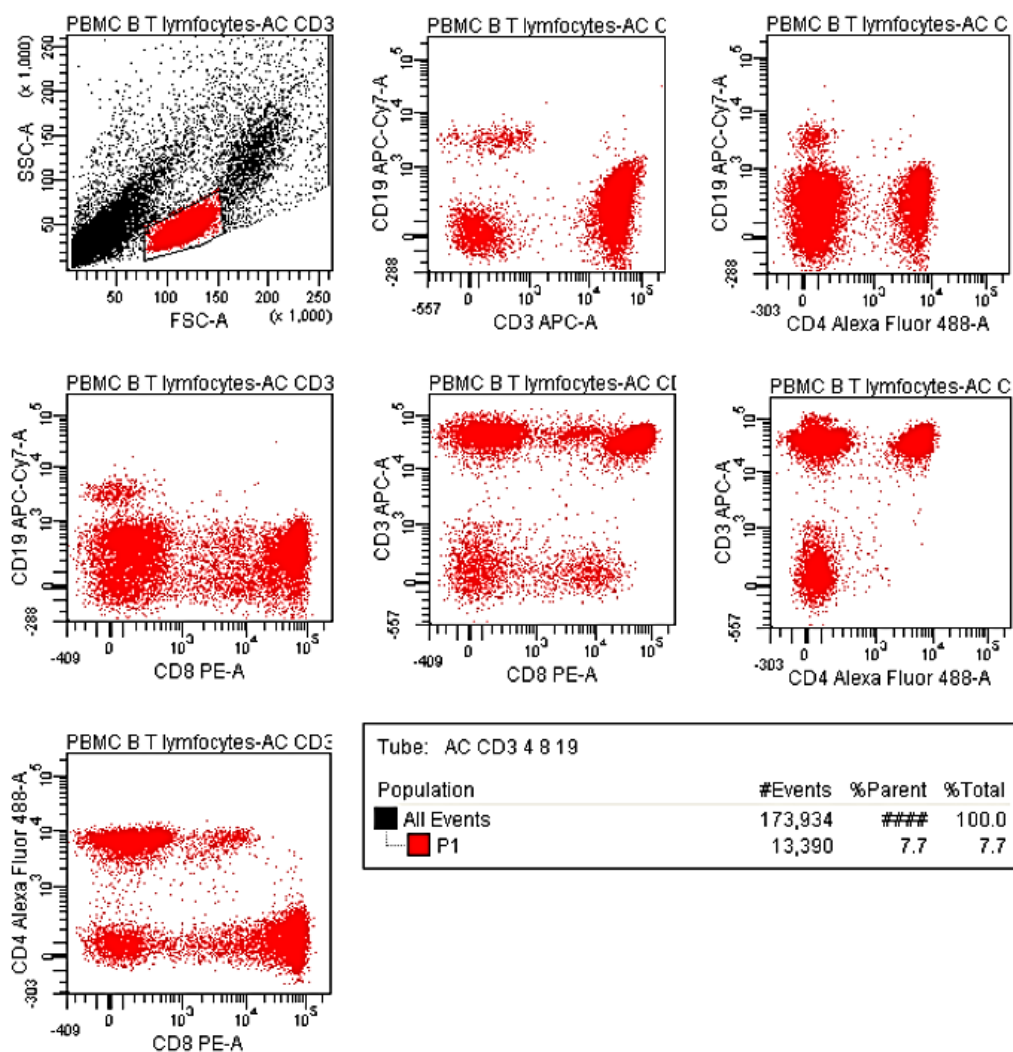


Obr. 9 Záznam merania buniek na prístroji BD Canto II, nekompensované.

4.3 Stratégia gatovania

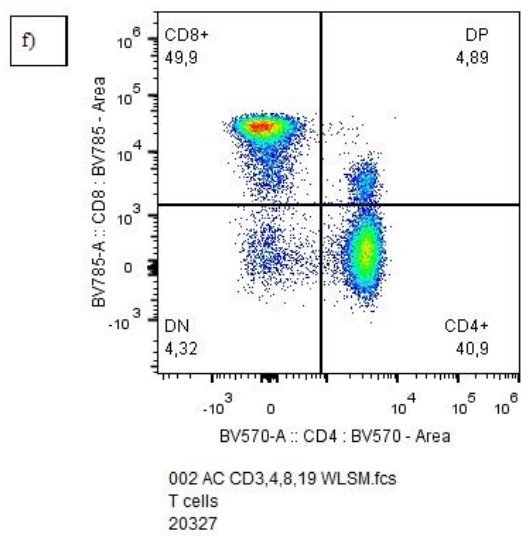
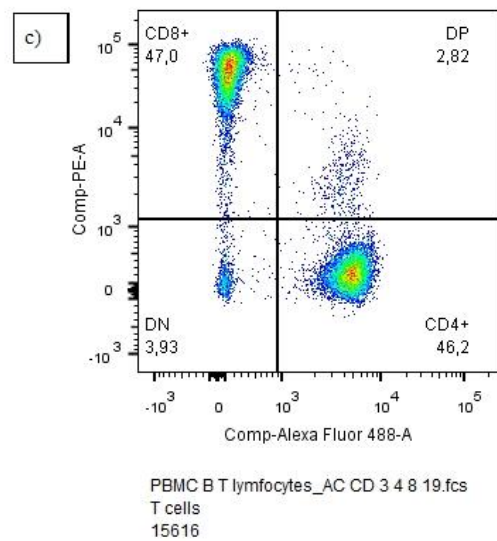
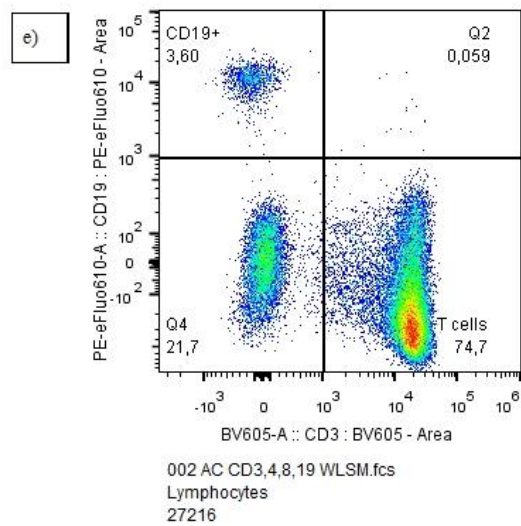
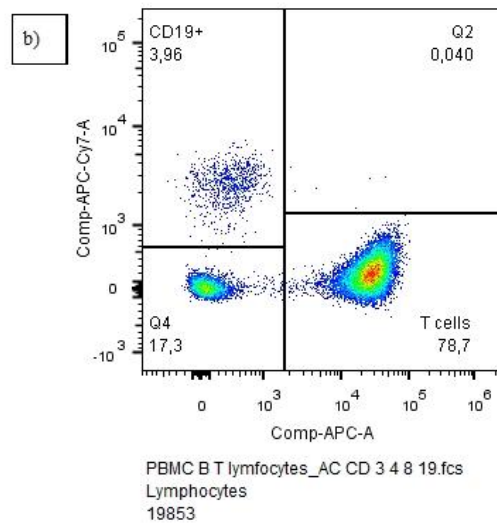
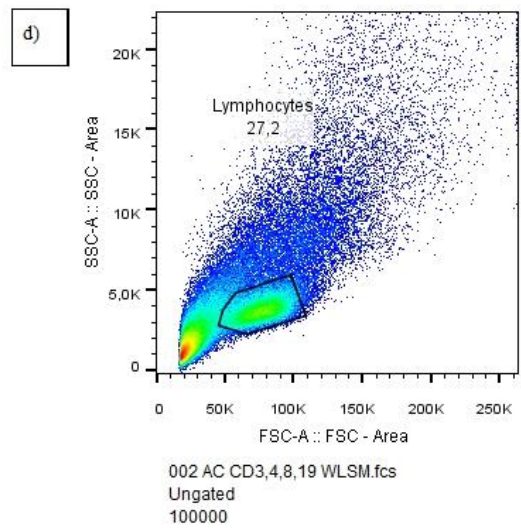
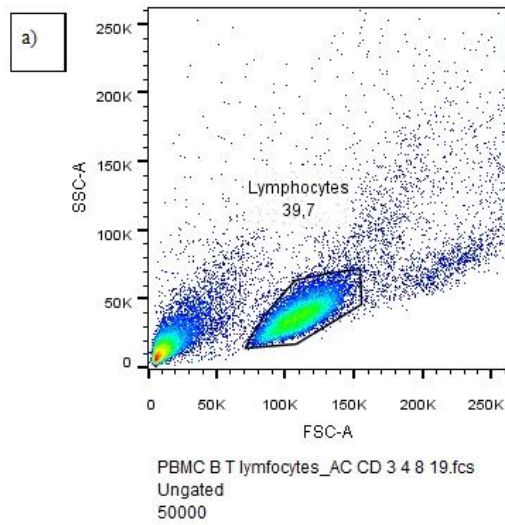
Stratégia gatovania slúži na výber bunkovej populácie, s ktorou má byť následne pracované. Pomocou stratégie gatovania bolo určené percentuálne zastúpenie B a T lymfocytov v rámci celkových lymfocytov v krvi zdravého jedinca, pričom B lymfocyty boli detekované na základe značenia bunkového povrchového markeru CD19 a T lymfocyty na základe značenia markeru CD3. Rozlíšiť cytotoxické a pomocné T lymfocyty bolo možné na základe značenia bunkových povrchových markerov CD4 a CD8. Značenie predstavuje naviazanie odpovedajúcej protilátky s fluorochrómom.

Do počítačového programu FlowJo boli vložené namerané dáta vzoriek. Nasledovalo zagatovanie lymfocytov, čo je zobrazené na obr. 11 a) a d). Populáciu lymfocytov predstavuje plocha čierneho mnohouholníka (obr. 11 a) a d)). Získalo sa tak percentuálne

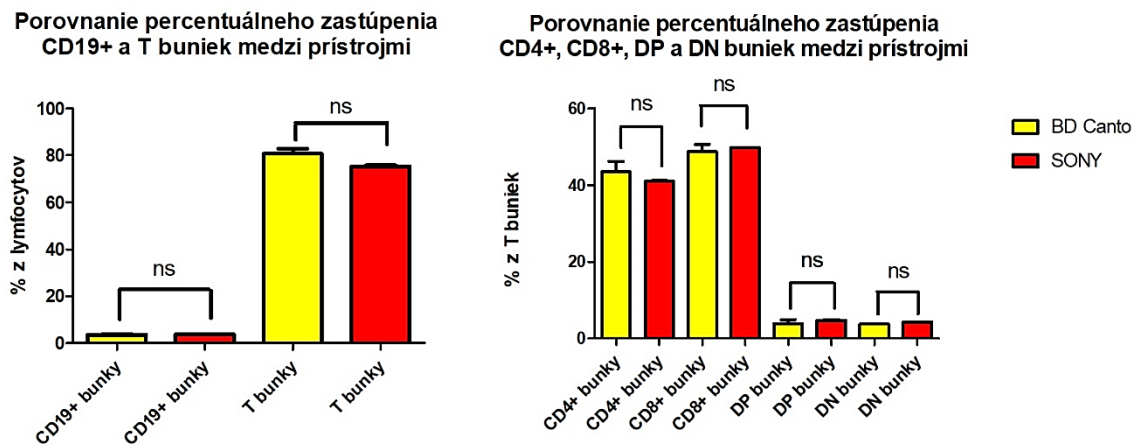


Obr. 10 Záznam merania buniek na prístroji BD Canto II, kompenzované.

zastúpenie lymfocytov zo všetkých nameraných buniek. V rámci populácie lymfocytov boli vzájomne vynesené fluorochrómy odpovedajúce bunkám CD3⁺ a CD19⁺ a bol preložený križ, čo je zobrazené na obr. 11 b) a e). Bolo tak získané percentuálne zastúpenie buniek CD19⁺, ktoré predstavujú B bunky, a CD3⁺ buniek, ktoré predstavujú T bunky, z celkového počtu lymfocytov. Percentuálne zastúpenie CD4⁺, teda pomocných T buniek, a CD8⁺, teda cytotoxických T buniek, bolo následne určované z populácie CD3⁺ buniek. Po vzájomnom vynesení fluorochrómov, odpovedajúcim bunkám CD4⁺ a CD8⁺, bol preložený križ, čo je zobrazené na obr. 11 c) a f). Bolo tak získané percentuálne zastúpenie buniek CD4⁺ a CD8⁺ z celkovej populácie T buniek.



Obr. 11 Stratégia gatovania v prípade merania vzorky na prístroji BD Canto II- a), b), c); a na prístroji SONY- d), e), f).



Obr. 12 Grafy porovnávajúce meranie dvoch prístrojov; každý stĺpik predstavuje priemernú hodnotu dvakrát zmeranej vzorky; CD19+ sú B bunky, CD4+ sú pomocné T bunky, CD8+ sú cytotoxické T bunky, DP sú dvojit pozitívne bunky a DN sú dvojit negatívne bunky.

4.4 Porovnanie merania prístrojov BD Canto II a SONY

Bolo uskutočnené porovnanie cytometrov BD Canto II a SONY za účelom zistenia, či poskytujú rovnaké výsledky. Pracovalo sa v počítačovom programe GraphPad. Na štatistické vyhodnotenie dát bol využitý nepárový t-test. Údaje, ktoré sa stali predmetom porovnávania, boli získané meraním vzorky s vyizolovanými mononukleárnymi bunkami. Na každom prístroji bola vzorka meraná dvakrát. Boli využité údaje o percentuálnom zastúpení B a T buniek z celkových lymfocytov a údaje o percentuálnom zastúpení pomocných a cytotoxických T buniek z celkových T lymfocytov.

Namerané dáta vzorky boli porovnané medzi prístrojmi BD Canto II a SONY (obr. 12). Bolo zistené, že rozdiely v meraniach sú nesignifikantné (ns), a teda prístroje merajú rovnako. Môžu merať rovnako správne alebo rovnako nesprávne. Vzhľadom k tomu, že namerané hodnoty odpovedajú klinickým referenčným hodnotám pre daný fenotyp buniek a prístroj Canto II je certifikovaný ako IVD (diagnostika in vitro), predpokladáme, že oba prístroje merajú správne.

4.5 Stanovenie B bunkových populácií v týždeň kultivovaných bunkách z periférnej krvi zdravého jedinca pomocou povrchového farbenia

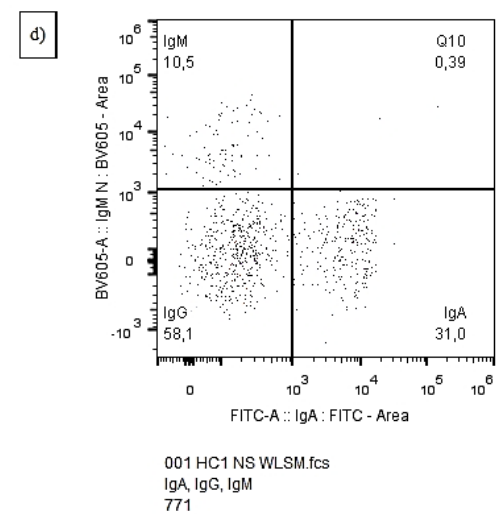
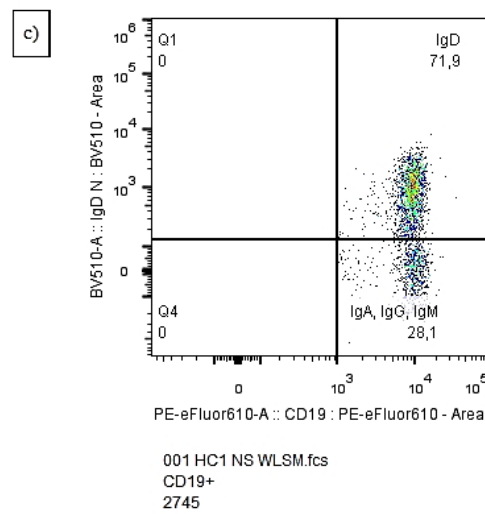
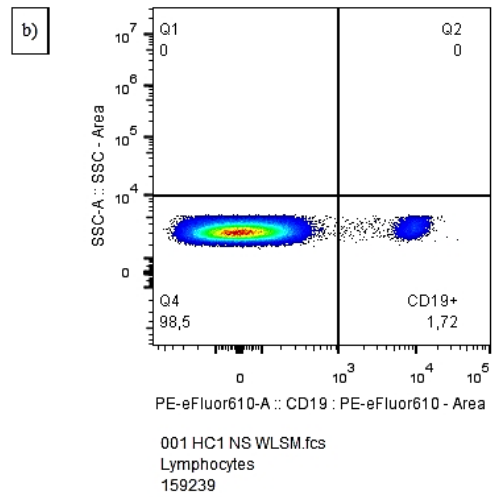
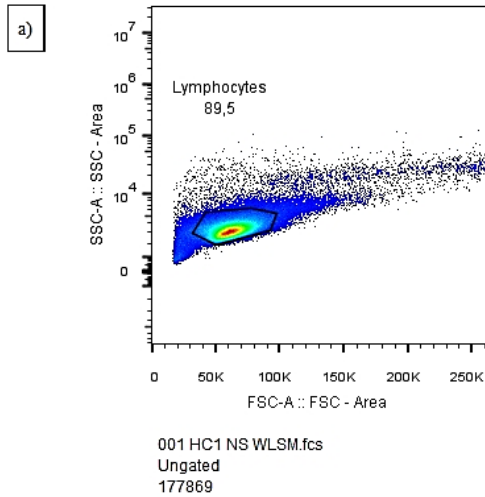
Bola uskutočnená typizácia B buniek po vyizolovaní mononukleárných buniek z periférnej krvi zdravého jedinca a po ich týždennej kultivácii. Bol určovaný fenotyp a izotyp B buniek.

Do počítačového programu FlowJo boli vložené namerané dáta vzorky. Nasledovalo zagatovanie lymfocytov, čo je zobrazené na obr. 13 graf a). V rámci populácie lymfocytov bol vyneseny na os x fluorochróm odpovedajúci CD19+ bunkám, teda B bunkám. Na os y bol vyneseny bočný rozptyl SSC a bol preložený kríž, čo je zobrazené na obr. 13 graf b). Bolo tak získané percentuálne zastúpenie buniek CD19+ z lymfocytov. Percentuálne zastúpenie B buniek predstavovalo 1,72 % z 159239 nameraných buniek.

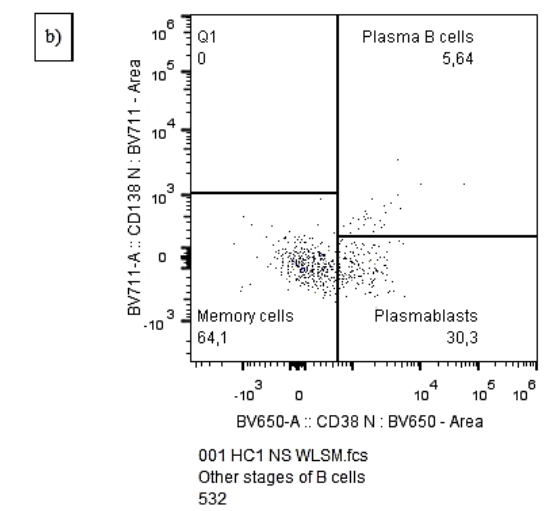
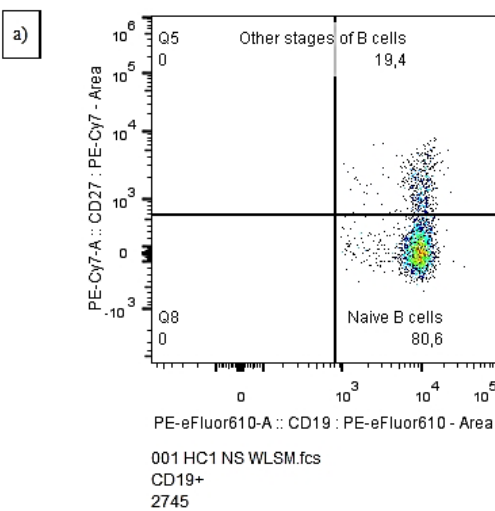
Stanovenie izotypov buniek bolo uskutočnené v rámci populácie CD19+ buniek. Na osi grafu boli vyneseny fluorochrómy pre bunkové povrchové markery CD19 a IgD, čo je zobrazené na obr. 13 graf c). Bunky, ktoré na svojom povrchu obsahujú IgD, sú bunky naivné. Ich percentuálny počet je 71,9 % z 2745 nameraných buniek. Stanovený percentuálny počet naivných buniek odpovedá ich prirodzenému zastúpeniu v krvi zdravého jedinca. Bunky, ktoré na svojom povrchu IgD nemajú, predstavujú IgA, IgG a IgM bunky, ktoré môžu byť pamäťové bunky, plazmablasty či plazmatické bunky. Po otvorení tejto populácie a následnom vnesení fluorochrómov pre bunky obsahujúce na svojom povrchu IgA a IgM, bolo možné určiť percentuálne zastúpenie izotypov, čo je zobrazené na obr. 13 graf d). Bunky s IgA na povrchu tvorili 31,0 %, bunky s IgG na povrchu 58,1 % a bunky s IgM na povrchu 10,5 % z 771 nameraných buniek.

IgG+ bunky boli stanovené pomocou vnesenia fluorochrómov pre bunky obsahujúce povrchové IgA a IgM. IgG+ bunky tvorili tak bunky negatívne na IgA a zároveň na IgM. Ďalšou možnosťou, ako mohli byť IgG+ bunky stanovené, bolo vnesenie fluorochrómov pre bunky obsahujúce povrchové IgA a IgG, avšak značená protilátka anti-IgG-PE-Cy5 zrejme degradovala v oblasti PE, a teda populácia IgG+ buniek nebola pri takomto vnesení fluorochrómov na grafe viditeľná.

Fenotypizácia bola uskutočnená z populácie CD19+ buniek a boli vyneseny fluorochrómy pre bunkové povrchové markery CD19 a CD27, čo je zobrazené na obr. 14 graf a). Naivné bunky na svojom povrchu nemajú CD27, ale CD19 áno. Túto populáciu tak tvorilo 80,6 % buniek z 2745 nameraných buniek. Bunky majúce na povrchu CD27 môžu byť pamäťové bunky, plazmablasty alebo plazmatické bunky. Pamäťové bunky majú na svojom povrchu len CD27, plazmablasty majú CD27 súčasne s CD38 a plazmatické bunky majú CD27, CD38 a CD138. Preto po otvorení populácie pozitívnej na CD27 a vnesení fluorochrómov pre CD38 a CD138 bolo možné určiť percentuálne zastúpenie jednotlivých fenotypov, čo je zobrazené na obr. 14 graf b). Pamäťové bunky predstavovali 64,1 %, plazmablasty 30,3 % a plazmatické bunky 5,6 % z 532 nameraných buniek.



Obr. 13 Stanovenie izotypov B buniek v periférnej krvi.



Obr. 14 Fenotypizácia B buniek v periférnej krvi.

4.6 Stimulácia mononukleárných buniek periférnej krvi zdravého jedinca interleukínom-6

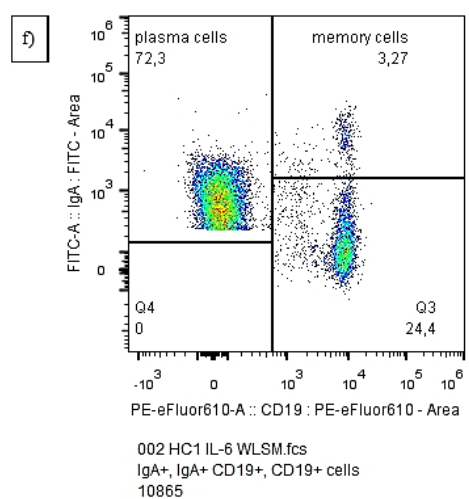
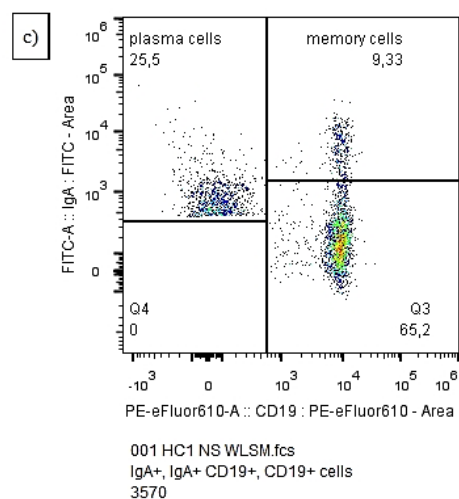
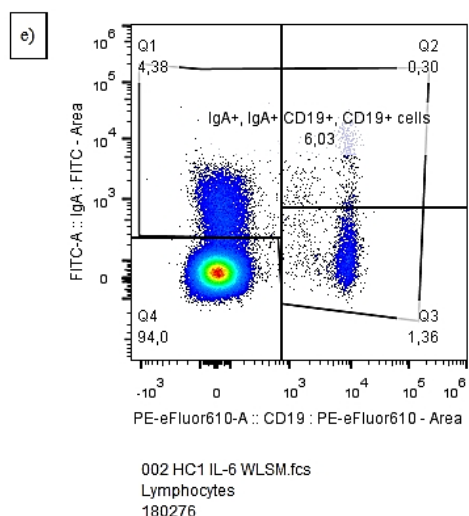
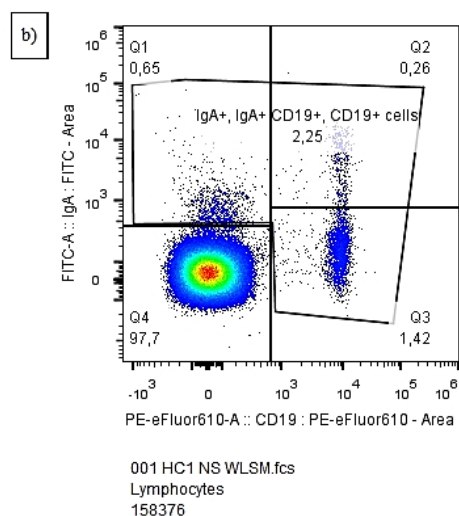
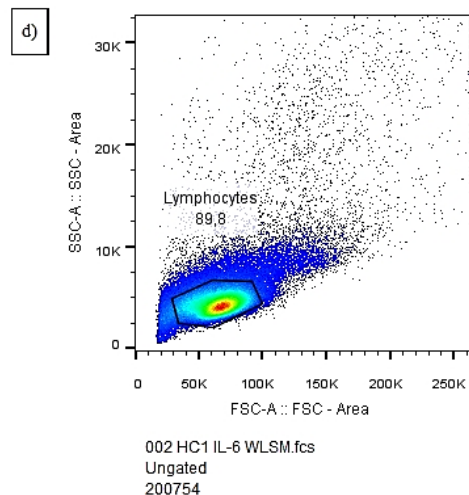
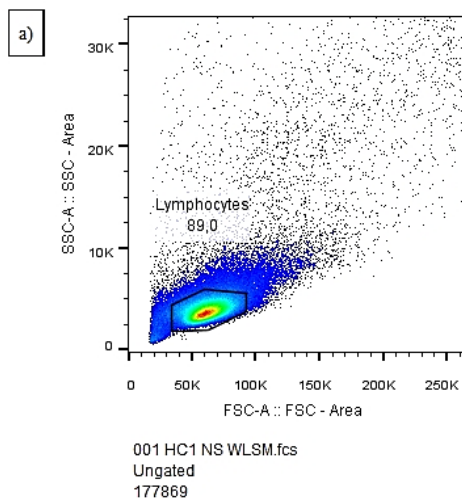
Po týždňovej kultivácii boli porovnávané fenotypy B buniek z mononukleárných buniek periférnej krvi zdravého jedinca nestimulovaných a stimulovaných pomocou IL-6. Namerané dáta boli spracované v počítačovom programe FlowJo.

Vplyv IL-6 na dozrievanie B buniek a produkciu imunoglobulínu A je znázornený na obr. 15. Boli zagatované lymfocyty, čo je zobrazené na obr. 15 graf a) a d). Následne boli vynesené fluorochrómy pre bunkové povrchové markery CD19 a IgA, čo je zobrazené na obr. 15 graf b) a e). Bunky nachádzajúce sa v kvadráte Q4 na obr. 15 graf b) a e) neboli potrebné pre vyhodnotenie vplyvu IL-6 na dozrievanie IgA⁺ buniek, takže boli zagatované zvyšné kvadráty Q1, Q2 a Q3. To znázorňujú mnohouholníky na obr. 15 graf b) a e). V rámci tejto populácie bolo vyhodnocované percentuálne zastúpenie rôznych vývojových štádií buniek.

Boli vynesené fluorochrómy pre CD19 a povrchové IgA. Graf c) na obr. 15 predstavuje bunky nestimulované. V kvadráte Q3 grafu c) (obr.15) sú obsiahnuté predovšetkým naivné bunky a v malej miere aj pamäťové IgG⁺ a IgM⁺ bunky. Percentuálne zastúpenie týchto buniek je 65,2 % z 3570 nameraných buniek. Na grafe c) (obr. 15) je možné vyčítať aj percentuálne zastúpenie pamäťových IgA⁺ buniek, čo činilo 9,33 %, a percentuálne zastúpenie plazmatických IgA⁺ buniek, čo činilo 25,5 %. Zatiaľ čo pamäťové IgA⁺ bunky produkujú na svojom povrchu CD19 a súčasne IgA, plazmatické IgA⁺ bunky významne redukujú povrchovú expresiu CD19. V podmienkach *in vivo* dokonca postupne strácajú schopnosť produkovať IgA na svojom povrchu. Imunoglobulín produkujú v oveľa menšom množstve na povrchu, začínajú ho viac produkovať vo svojom vnútri a uvoľňujú ho do okolia. Tento jav znázorňuje tendencia populácie posúvať sa do kvadrátu Q4, čo je zobrazené na obr. 15 graf b), c), e) a f).

U stimulovaných buniek pomocou IL-6 bolo rovnakým postupom stanovené percentuálne zastúpenie jednotlivých populácií. Kvadrát Q3 na obr. 15 graf f), čo teda predstavuje naivné bunky a pamäťové IgG⁺ a IgM⁺ bunky, vyjadruje percentuálne zastúpenie tejto populácie, a to je 24,4 % z 10865 nameraných buniek. Pamäťové IgA⁺ bunky na tomto grafe predstavujú 3,27 % a plazmatické IgA⁺ bunky 72,3 %.

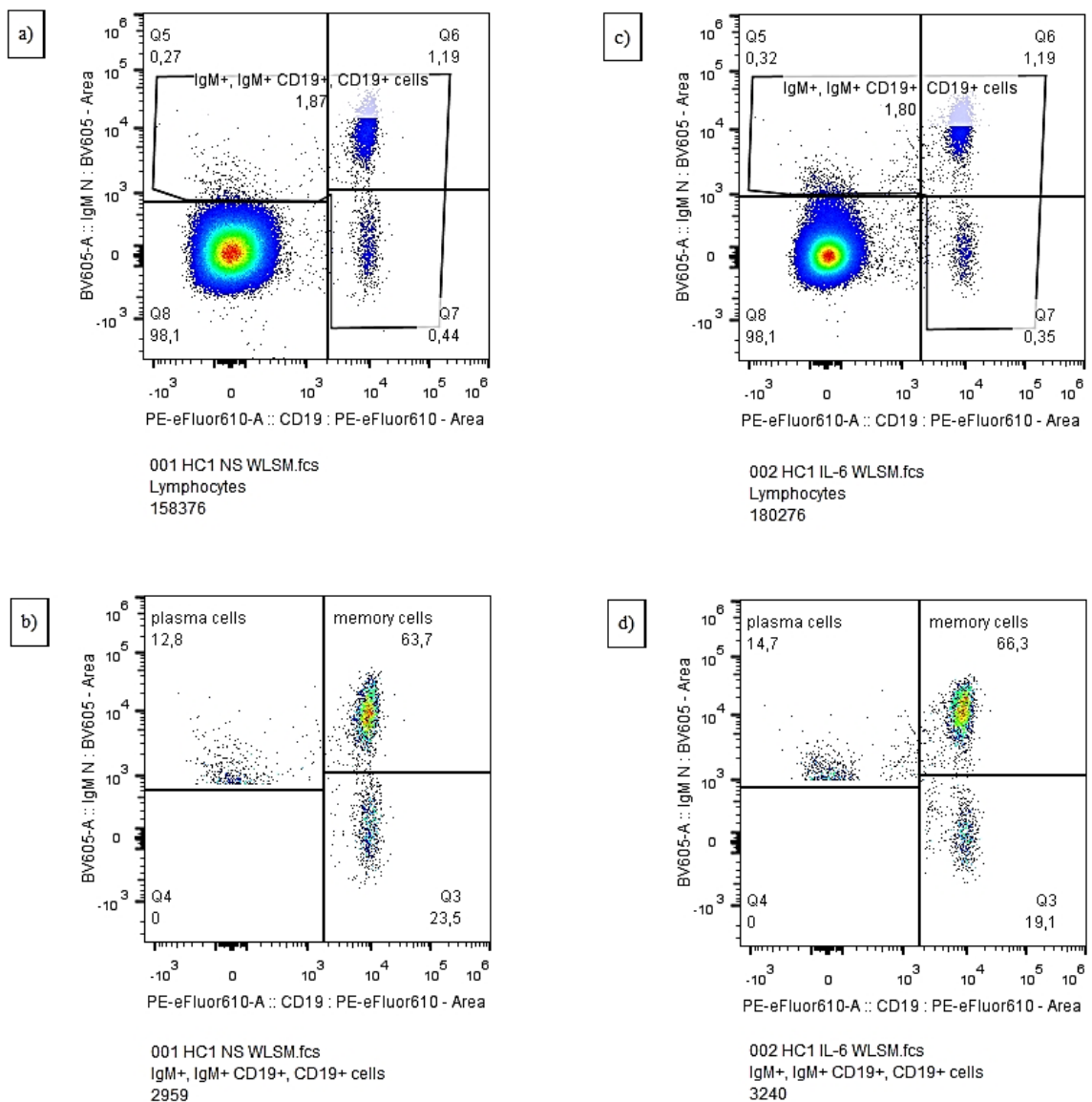
Vplyv IL-6 na dozrievanie B buniek, konkrétne na IgA⁺ bunky, možno vidieť porovnaním nestimulovaných a interleukínom-6 stimulovaných buniek. Prídavkom IL-6 k bunkám klesá percentuálne zastúpenie naivných B buniek, teda buniek, ktoré nie sú



Obr. 15 Stimulácia IL-6 a IgA+ bunky; grafy a), b), c) predstavujú vzorku nestimulovanú, grafy d), e), f) predstavujú vzorku stimulovanú IL-6.

plno vyvinuté. Dokonca sa znížilo aj percentuálne zastúpenie pamäťových IgA+ buniek. Naopak percentuálne zastúpenie plazmatických IgA+ buniek sa zvýšilo a to z 25,5 %

na 72,3 %. Hunter a Jones (2015) uvádzajú, že IL-6 indukuje konečné dozrievanie B buniek na plazmatické bunky produkujúcej protilátky, čo bolo potvrdené aj v nami uskutočnenom experimente. Prídavkom IL-6 sa zvýšilo percento populácie IgA+ buniek, ktoré sú zodpovedné za produkciu IgA. Táto skutočnosť má zásadný vplyv pri IgA nefropatii. Pre toto ochorenie je zvýšená produkcia IgA nepriaznivá. Podľa Yamady *et al.* (2017) bola detekovaná v sére aj v obličkových depozitoch IgAN pacientov zvýšená hladina IL-6 a podľa Knoppovej *et al.* (2016) u IgAN pacientoch interleukín-6 nielenže zvyšuje hladinu IgA, ale pôsobí aj na aktivitu niektorých glykozyltransferáz podieľajúcich sa na správnej O-glykozylácii imunoglobulínu A1, vzniká viac nesprávne



Obr. 16 Stimulácia IL-6 a IgM+ bunky; grafy a), b), c) predstavujú vzorku nestimulovanú, grafy d), e), f) predstavujú vzorku stimulovanú IL-6.

O-glykozylovaných IgA1, ktoré následne vytvárajú cirkulujúce komplexy a tie sa usádzajú v obličkách a poškodzujú ich. IL-6 tak urýchľuje rozvoj IgA nefropatie.

Pri dozrievaní IgM+ buniek interleukín-6 nemal taký veľký vplyv, ako tomu bolo v prípade IgA+ buniek, ale aj tu nastali rozdiely (obr. 16). Opäť sa prídavkom IL-6 znížilo percentuálne zastúpenie naivných B buniek z 23,5 % na 19,1 % a zvýšilo sa percentuálne zastúpenie plazmatických IgM+ buniek z 12,8 % na 14,7 %, čo je znázornené na obr. 16 graf b) a d). U percentuálneho zastúpenia pamäťových IgM+ buniek došlo po prídavku IL-6, na rozdiel od pamäťových IgA+ buniek, k zvýšeniu. Zvýšilo sa z 63,7 % na 66,3 %.

V bakalárskej práci mali byť interleukínom-6 stimulované mononukleárne bunky od viacerých IgAN pacientov a zdravých jedincov. Namerané výsledky mali byť vzájomne porovnané. Boli by tak popísané odlišnosti vplyvu IL-6 na dozrievanie B buniek u IgAN pacientov a zdravých jedincov. Pre pandemickú situáciu bolo možné popísať vplyv IL-6 na dozrievanie B buniek len u jedného zdravého jedinca.

5 ZÁVER

Pomocou metódy prietokovej cytometrie boli charakterizované bunky v periférnej krvi zdravého jedinca. Konkrétne sa jednalo o charakterizáciu T buniek a rôznych štádií B buniek. Bolo určené percentuálne zastúpenie jednotlivých fenotypov a izotypov B buniek.

Údaje o percentuálnom zastúpení B lymfocytov a cytotoxických či pomocných T lymfocytov boli použité na porovnanie dvoch prietokových cytometrov, ktoré využívajú dva rôzne princípy merania. Zatiaľ čo BD Canto II je klasický cytometer detekujúci emitované svetlo pomocou filtrov a detektorov, SONY SP6800 je cytometer spektrálny, ktorý detekuje emitované svetlo pomocou sady hranolov a fotonásobiča. Výsledkom porovnania prietokového cytometra BD Canto II a spektrálneho cytometra SONY bolo, že oba prístroje merali rovnako a poskytovali rovnaké výsledky.

Taktiež boli porovnané bunky nestimulované a stimulované interleukínom-6 a bol preukázaný vplyv tohto cytokínu na urýchlenie dozrievania B lymfocytov. Sledoval sa najmä vplyv IL-6 na vývoj IgA+ buniek. Bolo overené, že zvýšená hladina IL-6 urýchľuje dozrievanie buniek zodpovedných za produkciu IgA. IgAN pacienti majú v tele zvýšenú hladinu IL-6, tvorí sa im teda zvýšené množstvo IgA, čo je pre ochorenie IgA nefropatia nepriaznivé.

Jeden z cieľov bakalárskej práce nebol naplnený vzhľadom na pandemickú situáciu. Neboli porovnané fenotypy buniek pred a po stimulácii IL-6 pomocou spektrálnej cytometrie u pacientov s IgA nefropatiou a ich porovnanie so zdravými jedincami. Toto porovnanie ostáva predmetom ďalšej štúdie.

6 LITERATÚRA

- Donadio, J. V., & Grande, J. P. (2002): IgA nephropathy. *New England Journal of Medicine* **347**, 738-748.
- Feghali, C. A., & Wright, T. M. (1997): Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* **2**, d12-d26.
- Feher, K., von Volkman, K., Kirsch, J., Radbruch, A., Popien, J., & Kaiser, T. (2016): Multispectral flow cytometry: The consequences of increased light collection. *Cytometry Part A*, **89**, 681-689.
- Futamura, K., Sekino, M., Hata, A., Ikebuchi, R., Nakanishi, Y., Egawa, G., Kabashima K., Watanabe T., Furuki M. and Tomura M. (2015): Novel full-spectral flow cytometry with multiple spectrally-adjacent fluorescent proteins and fluorochromes and visualization of in vivo cellular movement. *Cytometry Part A*, **87**, 830-842.
- Hillmer, E. J., Zhang, H., Li, H. S., & Watowich, S. S. (2016): STAT3 signaling in immunity. *Cytokine & growth factor reviews* **31**, 1-15.
- Hořejší, V. and Bartůňková, M. (2009): *Základy imunologie*. 4. vydání, Triton, Praha, 316 stran.
- Hunter, C.A. and Jones, S.A. (2015): IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature immunology* **16**, 448-457.
- Jahan-Tigh, R. R., Ryan, C., Obermoser, G., & Schwarzenberger, K. (2012): Flow cytometry. *The Journal of investigative dermatology* **132**, e1.
- Johansen, F. E., Braathen, R., & Brandtzaeg, P. (2000): Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. *Scandinavian journal of immunology* **52**, 240-248.
- Knoppova, B., Reily, C., Maillard, N., Rizk, D.V., Moldoveanu, Z., Mestecky, J., Raska, M., Renfrow, M.B., Julian, B.A. and Novak, J. (2016): The origin and activities of IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy. *Frontiers in immunology* **7**, 117.
- LeBien, T. W., & Tedder, T. F. (2008): B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**, 1570-1580.
- Lechner, S.M., Abbad, L., Boedec, E., Papista, C., Le Stang, M.B., Moal, C., Maillard, J., Jamin, A., Bex-Coudrat, J., Wang, Y. and Li, A. (2016): IgA1 protease treatment reverses mesangial deposits and hematuria in a model of IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* **27**, 2622-2629.
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005): Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal* **46**, 258-268.
- Makita, Y., Suzuki, H., Kano, T., Takahata, A., Julian, B. A., Novak, J., & Suzuki, Y. (2020): TLR9 activation induces aberrant IgA glycosylation via APRIL-and IL-6-mediated pathways in IgA nephropathy. *Kidney International* **97**, 340-349.
- Masuda, K., Ripley, B., Nishimura, R., Mino, T., Takeuchi, O., Shioi, G., ... & Kishimoto, T. (2013): Arid5a controls IL-6 mRNA stability, which contributes to elevation of IL-6 level in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 9409-9414.
- Morbach, H., Eichhorn, E. M., Liese, J. G., & Girschick, H. J. (2010): Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clinical & Experimental Immunology* **162**, 271-279.
- Neurath, M. F., & Finotto, S. (2011): IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine & growth factor reviews* **22**, 83-89.
- Novak, J., Julian, B. A., Tomana, M., & Mestecky, J. (2008): IgA glycosylation and IgA immune complexes in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Seminars in nephrology* **28**, 78-87.

- Perez-Andres, M., Paiva, B., Nieto, W. G., Caraux, A., Schmitz, A., Almeida, J., ... & Van Dongen, J. J. M. (2010): Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* **78**, S47-S60.
- Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C., & Boulanger, C. M. (2012): Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* **64**, 109-130.
- Raška, M., Zdražil, J., Stuchlová Horynová, M., Rašková Kafková, L., Vráblíková, A., Matoušovic, K., Novák, J. and Městecký, J. (2016): IgA nefropatie-otázky, které nastolil výzkum. *Vnitřní lékařství* **62**, 67-77.
- Rieseberg, M., Kasper, C., Reardon, K. F., & Scheper, T. (2001): Flow cytometry in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology* **56**, 350-360.
- Rose-John, S. (2012): IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International journal of biological sciences*, **8**, 1237.
- Schroeder Jr, H. W., & Cavacini, L. (2010): Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, S41-S52.
- Suzuki, H., Moldoveanu, Z., Hall, S., Brown, R., Vu, H.L., Novak, L., Julian, B.A., Tomana, M., Wyatt, R.J., Edberg, J.C. and Alarcón, G.S. (2008): IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *The Journal of clinical investigation* **118**, 629-639.
- Tomana, M., Novak, J., Julian, B. A., Matoušovic, 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.
- Wyatt, R. J., & Julian, B. A. (2013): IgA nephropathy. *New England Journal of Medicine* **368**, 2402-2414.
- Yamada, K., Huang, Z.Q., Raska, M., Reily, C., Anderson, J.C., Suzuki, H., Ueda, H., Moldoveanu, Z., Kiryluk, K., Suzuki, Y. and Wyatt, R.J. (2017): Inhibition of STAT3 signaling reduces IgA1 autoantigen production in IgA nephropathy. *Kidney international reports* **2**, 1194-1207.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AhR	arylový uhl'ovodíkový receptor
APRF	faktor reakcie akútnej fázy
ASGP-R	asialoglykoproteínový receptor
Asn	asparagín
BAFF	B bunkový aktivačný faktor
BCR	B bunkový antigénový receptor
C doména	konštantná doména
C1GalT1	enzým UDP-galaktóza:GalNAc- α -Ser/Thr (β 1-3)-galaktozyltransferáza
CD	diferenciačný znak
CIS	cytokínom indukovateľný proteín obsahujúci SH2
ddH ₂ O	dvojnásobne destilovaná voda
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
Eos	transkripčný faktor
Fab	fragment viažuci antigén
FBS	fetálne bovinné sérum
Fc	fragmentová kryštalizovateľná oblasť
FOXP3	vidlicový box P3 transkripčného faktora
FSC	predný rozptyl
Fv	variabilný fragment
GalNAc	N-acetylgalaktozamín
GATA3	transkripčný faktor
Gd-IgA1	galaktozyl-deficitný IgA1
gp130	glykoproteín 130
H reťazec	t'azký reťazec
HR	pántová oblasť
Ig	imunoglobulín
IgAN	IgA nefropatia
IL	interleukín
IL-6R	receptor interleukínu-6
IFN	interferón
IRF	regulačný faktor interferónu
IVD	diagnostika in vitro
J reťazec	spojovací reťazec

JAK	Janusove kinázy
L reťazec	ľahký reťazec
MALT	slizničný imunitný systém
MyD88	faktor myeloidnej diferenciácie
NK bunky	prirodzené zabíjačské bunky
PBS	fosforečnanom pufrovaný fyziologický roztok
pIgR	polymérny imunoglobulínový receptor
PMT	fotonásobič
ppGalNAc-T	UDP-GalNAc:polypeptid GalNAc-transferáza
ROR	sirotové receptory
RUNX	transkripčný faktor
Ser	serín
SH2 doména	Src homológna doména 2
sIL-6R	rozpustná forma receptora interleukínu-6
SOCS	supresor cytokínovej signalizácie
SSC	bočný rozptyl
ST3Gal	galaktóza(β 1-2)GalNAc(α 2-3)sialyltransferáza
ST6GalNAc	(α 2-6)sialyltransferáza
STAT	signálny transduktor a aktivátor transkripcie
T-bet	transkripčný faktor
TGF- β	transformujúci rastový faktor β
Thr	treonín
TLR	Toll-like receptor
TNF	faktor nekrózy nádorov
V doména	variabilná doména
Y705	tyrozín v polohe 705