

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2024

Tereza Dostálová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv zánětlivých faktorů na expresi bariérových genů ve
střevní buněčné linii Caco-2**

Tereza Dostálová

Diplomová práce

Študijný program: Biologie

Študijný odbor: Molekulární a buněková biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedúca práce: Mgr. Aneta Grycová, Ph. D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza DOSTÁLOVÁ**
Osobní číslo: **R220578**
Studijní program: **N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Vliv zánětlivých faktorů na expresi bariérových genů ve střevní buněčné linii Caco-2**
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Zpracování literární rešerše na téma idiopatické střevní záněty.
2. Nastavení podmínek pro vyvolání zánětu ve střevní linii Caco-2 s použitím zánětlivých faktorů.
3. Stanovení exprese bariérových genů na úrovni RNA po působení zánětlivých stimulů.
4. Stanovení exprese bariérových genů na úrovni proteinu po působení zánětlivých stimulů.
5. Osvobození práce s buněčnými kulturami ve sterilních podmínkách.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tiskárenská**

Jazyk zpracování: **Slovenština**

Seznam doporučené literatury:

Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. (2013) Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR4 and CD14. *Am J Pathol.* 2013 Feb;182(2):375-87.

Kämpfer AAM, Urbán P, Gioria S, Kanase N, Stone V, Kinsner-Ovaskainen A. (2017) Development of an in vitro co-culture model to mimic the human intestine in healthy and diseased state. *Toxicol In Vitro.* 2017 Dec;45(Pt 1):31-43.

Chen M, Liu Y, Xiong S, Wu M, Li B, Ruan Z, Hu X. (2019) Dietary l-tryptophan alleviated LPS-induced intestinal barrier injury by regulating tight junctions in a Caco-2 cell monolayer model. *Food Funct.* 2019 May 22;10(5):2390-2398.

Grosheva I, Zheng D, Levy M, Polansky O, Lichtenstein A, Golani O, Dori-Bachash M, Moresi C, Shapiro H, Del Mare-Roumani S, Valdes-Mas R, He Y, Karbi H, Chen M, Hamelin A, Strausman R, Yissachar N, Elinav E, Geiger B. (2020) High-Throughput Screen Identifies Host and Microbiota Regulators of Intestinal Barrier Function. *Gastroenterology.* 2020 Nov;159(5):1807-1823.

Toutounji M, Wanek D, El-Harakeh M, El-Sabban M, Rizk S, Naim HY. (2020) Dextran Sodium Sulfate-Induced Impairment of Protein Trafficking and Alterations in Membrane Composition in Intestinal Caco-2 Cell Line. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 15;21(8):2726.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Aneta Grycová, Ph.D.**
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání diplomové práce: 21. listopadu 2022
Termín odevzdání diplomové práce: 31. května 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje

Meno a priezvisko autora: Tereza Dostálová

Názov práce: Vliv zánětlivých faktorů na expresi bariérových genů ve střevní buněčné linii Caco-2

Typ práce: Diplomová

Pracoviško: Katedra buněčné biologie a genetiky

Vedúca práce: Mgr. Aneta Grycová, Ph. D.

Rok obhajoby práce: 2024

Abstrakt: Diplomová práca je zameraná na sledovanie expresie bariérových génov v črevnej bunkovej línii Caco-2 po navodení zápalu inflamačnými faktormi lipopolysacharidom, tumor nekrotizujúcim faktorom α a interleukínom 1β . V teoretickej časti bola popísaná problematika fungovania intestinálnej bariéry a idiopatických črevných ochorení. V experimentalnej časti bol pomocou metódy kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie v reálnom čase sledovaný vplyv zápalových faktorov a ich zmesi na expresiu bariérových génov tight junction proteínu 1, okcludínu a cadherínu 1.

Kľúčové slová: Bariérové gény, zápalové faktory, idiopatické črevné ochorenia, tesné spoje, Caco-2

Počet strán: 49

Jazyk: Slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Tereza Dostálová

Title: Effect of inflammatory factors on the expression of barrier genes in colon cell line Caco-2

Type of thesis: Master

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: Mgr. Aneta Grycová, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Abstract: This thesis focuses on the expression of barrier genes in the intestinal cell line Caco-2 after induction of inflammation by the inflammatory factors lipopolysaccharide, tumour necrosis factor α and interleukin 1β . In the theoretical part, the functioning of the intestinal barrier and idiopathic intestinal diseases were described. In the experimental part, the effect of inflammatory factors and their mixture on the expression of barrier genes tight junction protein 1, occludin, and cadherin 1 was observed using a real-time quantitative polymerase chain reaction method.

Keywords: Barrier genes, inflammatory factors, idiopathic intestinal diseases, tight junctions, Caco-2

Number of pages: 49

Language: Slovak

Prehlásenie

Prehlasujem, že som diplomovú prácu na tému Vliv zánětlivých faktorů na expresi bariérových genů ve střevní buněčné linii Caco-2, spracovala samostatne s použitím uvedených literárných zdrojov a pod vedením Mgr. Anety Grycovej, Ph.D.

V Olomouci dňa:

.....

Dostálová Tereza

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som chcela poďakovať vedúcej práce Anete Grycovej, Ph.D, za jej odborné vedenie, vecné rady, ochotu, trpezlivosť a v neposlednej rade za ľudský prístup. Ďalej by som sa chcela poďakovať ostatným pracovníkom katedry bunkovej biológie a genetiky, ktorí boli v prípade potreby ochotní pomôcť, poradiť a vytvárali príjemné pracovné prostredie.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CIEĽ PRÁCE	2
3	LITERÁRNY PREHĽAD	3
3.1	Hrubé črevo	3
3.1.1	Intestinálna bariéra	5
3.1.2	Medzibunkové spojenia	6
3.1.3	Intestinálna bariéra a zápal	7
3.2	Idiopatické črevné zápaly	8
3.2.1	Ulcerózna kolitída	8
3.2.2	Crohnova choroba	9
3.2.3	Incidencia IBD	10
3.2.4	IBD genetika a signalizácia	10
3.2.5	IBD a environmentálne faktory	12
3.2.6	IBD a imunobiológia	13
3.2.7	IBD a terapia	14
4	MATERIÁL A METÓDY	15
4.1	Biologický materiál	15
4.2	Použité chemikálie	15
4.3	Použité laboratórne pomôcky	16
4.4	Použité prístroje	17
4.5	Experimentálne metódy	18
4.5.1	Príprava kultivačného média	18
4.5.2	Rozmrazenie bunkovej línie	18
4.5.3	Pasážovanie buniek	18
4.5.4	Stanovenie koncentrácie buniek v bunkovej suspenzii	19
4.5.5	Vysievanie buniek do 12jamkovej dosky	19
4.5.6	Príprava a aplikácia roztokov testovaných zápalových faktorov	19
4.5.7	Izolácia RNA pomocou TRI Reagent	20
4.5.8	Reverzná transkripcia	21
4.5.9	qRT-PCR	21
5	VÝSLEDKY	24
6	DISKUSIA	37
7	ZÁVER	39
8	LITERATÚRA	40

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

ACTB	Aktín beta
AJs	Adherentné spoje
AMP	Antimikrobiálne proteíny
APCs	Antigén prezentujúce bunky
ASA	Aminosalicyláty
CARD	Doména náboru kaspázy
CD	Crohnova choroba
CDH1	Cadherin-1
cDNA	Komplementárna deoxyribonukleová kyselina
FBS	Fetálne bovinné sérum
HLA	Histokompatibilný komplex
IBD	Idiopatické črevné choroby
IEC	Črevné epitelové bunky
IFN- γ	Interferón gama
IL	interleukíny
IRAK	Kináza asociovaná s receptorom interleukínu
JAM	Spojovacie adhezívne molekuly
KS	kortikosteroidy
LPS	Lipopolysacharid
MDP	Muramyl dipeptid
MLCK	Kináza ľahkých reťazcov miozínu
MUC2	Mucín 2
MyD88	Gén myeloidnej diferenciácie
NF- κ B	Nukleárny faktor kappa B
NOD	Nukleotidová väzobná oligomeračná doména
OCLN	Okludín
PAMPs	Molekulárne vzory spojené s patogénom
PBS	Fosfátový pufer
RNA	ribonukleová kyselina
sIgA	Sekrečné imunoglobulíny A
TJP1	Protín tesných spojov
TJs	Tesné spoje

TLR	Toll-like receptory
TNF- α	Tumor nekrotizujúci faktor alfa
UC	Ulcerózna kolitída
ZOs	Zonulíny

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Anatómia hrubého čreva.....	4
Obrázok 2: Anatómia intestinálnej bariéry.....	7
Obrázok 3: Apikálne spoje v zdravom a zapálenom črevnom epitely.....	8

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu pre jednu vzorku.....	21
Tabuľka 2: Zloženie RT-qPCR reakčnej zmesi na jednu jamku pri použití KiCqStart Probe Assays.....	22
Tabuľka 3: Zloženie RT-qPCR reakčnej zmesi na jednu jamku pri použití TaqMan™ Gene Expression Assay.....	22
Tabuľka 4: Teplotný a časový profil priebehu qRT-PCR.....	22

ZOZNAM GRAFOV

Graf 1: Expresia génu TJP1 po pôsobení LPS na bunkovú líniu Caco-2	24
Graf 2: Expresia génu TJP1 po pôsobení TNF- α na bunkovú líniu Caco-2	25
Graf 3: Expresia génu TJP1 po pôsobení IL-1 β na bunkovú líniu Caco-2	26
Graf 4: Expresia génu TJP1 po pôsobení MIXU na diferencované bunky línie Caco-2	27
Graf 5: Expresia génu TJP1 po pôsobení MIXU na nediferencované bunky línie Caco-2	27
Graf 6: Expresia génu OCLN po pôsobení LPS na bunky línie Caco-2	28
Graf 7: Expresia génu OCLN po pôsobení TNF- α na bunky línie Caco-2	29
Graf 8: Expresia génu OCLN po pôsobení IL-1 β na bunky línie Caco-2	30
Graf 9: Expresia génu OCLN po pôsobení MIXU na diferencované bunky línie Caco-2	31
Graf 10: Expresia génu OCLN po pôsobení MIXU na nediferencované bunky línie Caco-2	31
Graf 11: Expresia génu CDH1 po pôsobení LPS na bunky línie Caco-2	32
Graf 12: Expresia génu CDH1 po pôsobení TNF- α na bunky línie Caco-2	33
Graf 13: Expresia génu CDH1 po pôsobení IL-1 β na bunky línie Caco-2	33
Graf 14: Expresia génu CDH1 po pôsobení MIXU na diferencované bunky línie Caco-2	34
Graf 15: Expresia génu CDH1 po pôsobení MIXU na nediferencované bunky línie Caco-2	34
Graf 16: Expresia génu IL8 po pôsobení zápalových faktorov na bunky línie Caco-2	35

1 ÚVOD

Intestinálna bariéra je štruktúra, ktorá plní funkciu ochrannej a imunologickej bariéry. Pre jej správne fungovanie sú nevyhnutné medzibunkové spoje, ktoré zabezpečujú jej integritu a zamedzujú vstupu patogénov. Narušenie obranných mechanizmov vedie k nadmernému vystaveniu lumenálnej mikroflóry, čo spúšťa imunitnú odpoveď a dôjde k uvoľneniu zápalových mediátorov do črevnej sliznice. Medzi zápalové mediátory patria cytokíny tumor nekrotizujúci faktor α , interleukíny IL-1 β , IL-6 a IL-8, interferóny IFN- γ , histamíny a prostaglandíny a iné. Tieto zápalové mediátory pôsobia na epitelové bunky bariéry a spôsobujú rozpad medzibunkových spojov čím urýchľujú zápal sliznice. Práve pôsobenie zápalových faktorov na epitel črevnej sliznice môže byť jednou z príčin idiopatických črevných zápalov, ktoré sa stávajú celosvetovým problémom. Štúdium vplyvu zápalových faktorov na expresiu génov kódujúcich medzibunkové spoje, by mohlo viesť k pochopeniu procesu spustenia týchto ochorení a k vývoju účinnejších terapeutických metód.

2 CIEĽ PRÁCE

1. Spracovanie literárnej rešerše na tému idiopatické črevné zápaly.
2. Nastavenie podmienok pre vyvolanie zápalu v črevnej línii Caco-2 s použitím zápalových faktorov.
3. Stanovenie expresie bariérových génov na úrovni RNA po pôsobení zápalových faktorov.
4. Stanovenie expresie bariérových génov na úrovni proteínu po pôsobení zápalových faktorov.
5. Osvojenie práce s bunkovými kultúrami v sterilných podmienkach.

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 Hrubé črevo

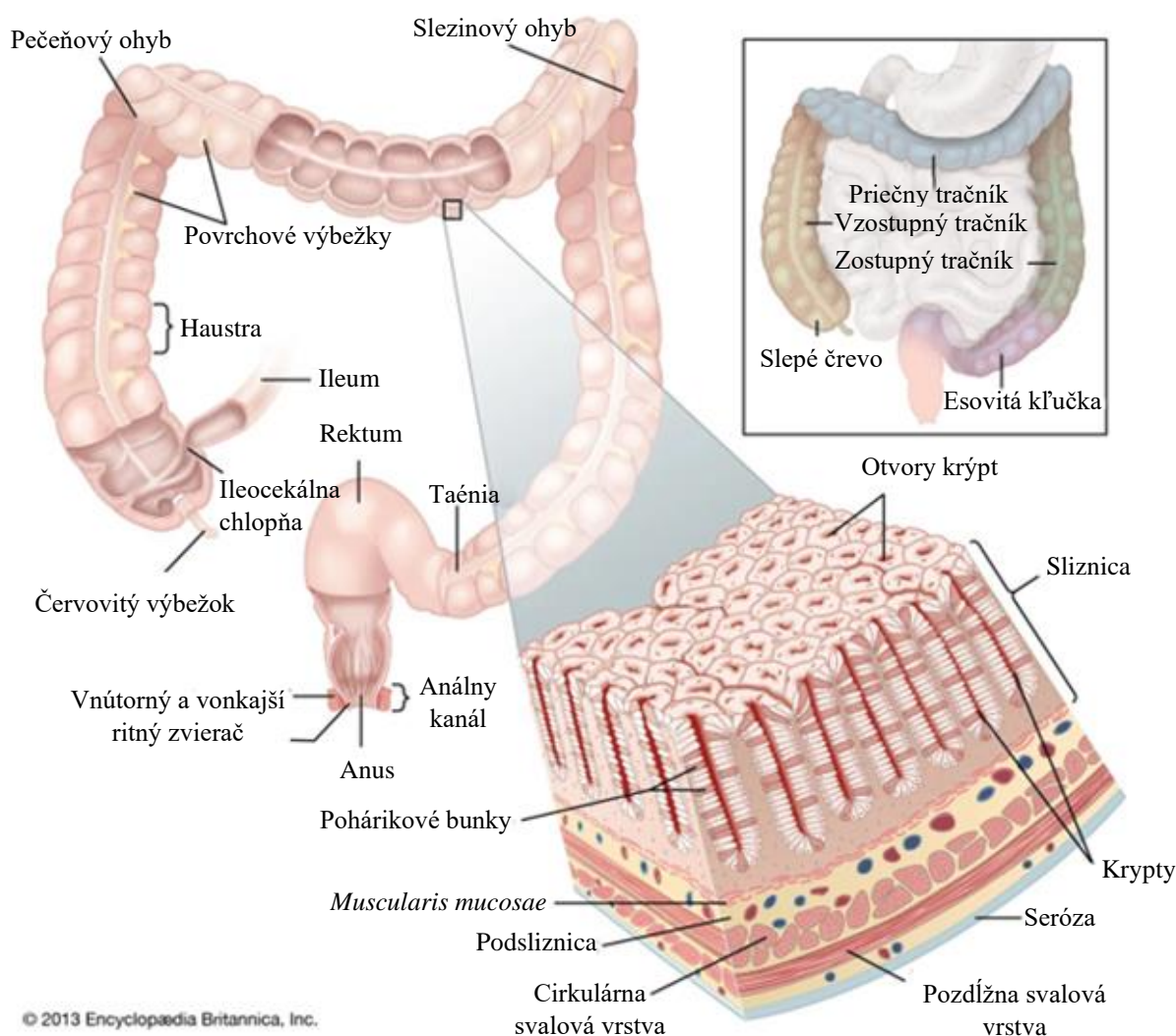
Hrubé črevo je poslednou časťou tráviaceho traktu, ktorá má dĺžku približne 1,5 m. Pozostáva z niekoľkých častí, ktorými sú slepé črevo, červovitý prívesok, vzostupný tračník, priečny tračník, zostupný tračník, esovitá kľučka a konečník (Obrázok 1) (Azzouz a Sharma, 2023).

Slepé črevo je proximálny slepý vak vzostupného tračníku, ktorý leží na úrovni ileocekálného spojenia. Červovitý prívesok tzv. appendix je valcovitý orgán so slepým pripojením k slepému črevu. Slepé črevo priamo prechádza vo vzostupný tračník, ktorý je vedený v pravej časti brucha od pravej bedrovej kĺbovej jamky po pravý lalok pečene, kde sa stáča do ľava. Priečny tračník je tretou, najpohyblivejšou a najdlhšou časťou hrubého čreva. Nachádza sa medzi pravým pečňovým ohybom a ľavým slezinovým ohybom. Priečny tračník pokračuje ako zostupný tračník. Zostupný tračník je retroperitoneálny orgán vyúsťujúci do esovitej kľučky. Esovitá kľučka spája zostupný tračník s konečníkom (Kahai, a kol., 2023).

Črevná stena sa skladá z niekoľkých vrstiev. Luminálne je to seróza, svalová vrstva, podsliznica a sliznica (Obrázok 1). Seróza je peritoneálny povlak tvorený 2 vrstvami medzi ktorými sa nachádza malé množstvo seróznej tekutiny (Čihák, 1988). Svalová vrstva hrubého čreva sa skladá z vnútornej cirkulárnej vrstvy a vonkajšej pozdĺžnej vrstvy hladkej svaloviny. Pod svalovou vrstvou je fibroadipózne tkanivo, krvné cievy, lymfatické cievy a nervy podsliznice. Sliznica hrubého čreva sa skladá z jednobunkovej vrstvy epitelu, ktorá pokrýva lúmen a vystiela krypty, podpornej lamina propria a malého pruhu hladkej svaloviny nazývaného *muscularis mucosae* (Petras a Frankel, 2009). Sliznica hrubého čreva oproti sliznici tenkého čreva nie je pokrytá vilóznymi výbežkami, ale obsahuje hlboké tubulárne jamky, ktoré sa smerom ku konečníku zväčšujú a siahajú až po *muscularis mucosa*. Medzi epitelové bunky sliznice patria absorpčné bunky, pohárikové hlienové bunky, nediferencované stĺpcovité kryptové bunky, kaveolizované bunky, Panethove bunky a M-bunky (Rao a Wang 2010). Lamina propria obsahuje malé množstvo rôznych zápalových buniek vrátane plazmatických buniek, lymfocytov, eozinofilov, mastocytov a makrofágov (Petras a Frankel, 2009). Zápalové bunky sú zdrojom cytokínov a rastových faktorov, ktoré môžu interagovať

s endotelovými bunkami a prispieť k vzniku štrukturálnych a funkčných abnormalít (Roisin a Barbera, 2009).

Medzi funkcie hrubého čreva patrí absorpcia vody a elektrolytov, produkcia a absorpcia vitamínov a tvorba a posun výkalov smerom ku konečníku na vylúčenie. Absorbpcia vody sa deje prostredníctvom osmózy. Voda difunduje v smere osmotického gradientu, ktorý je tvorený absorpciou elektrolytov. Sodík sa v hrubom čreve aktívne absorbuje prostredníctvom sodíkových kanálov, čo vytvára elektrochemický gradient, ktorý umožňuje absorpciu alebo vylúčenie draslíka na základe jeho koncentrácie v lúmene. V hrubom čreve sú miliardy baktérií, ktoré prostredníctvom fermentácie produkujú vitamín K a vitamíny skupiny B vrátane biotínu, tieto vitamíny sa potom vstrebávajú do krvi (Azzouz a Sharma, 2023).



Obrázok 1: Anatómia hrubého čreva (upravené, Encyclopedia Britannica, 2013)

3.1.1 Intestinálna bariéra

Intestinálna bariéra je semipermeabilná štruktúra, ktorá umožňuje príjem základných živín a zároveň obmedzuje prístup patogénnych molekúl a baktérii. Skladá sa z viacerých prvkov, ktoré jej umožňujú plniť funkciu fyzickej a imunologickej ochrannej bariéry. Patria k nim vonkajšia vrstva hlienu s vrstvou komenzálnej črevnej mikroflóry, antimikrobiálne proteíny (AMP) a sekrečné molekuly imunoglobulíny A (sIgA), centrálna jednobunková vrstva so špecializovanými epitelovými bunkami a vnútorná lamina propria, kde sa nachádzajú bunky vrodenej a adaptívnej imunity, ako sú T-bunky, B-bunky, makrofágy a dendritické bunky (Obrázok 2) (Turner, 2009, Muniz, a kol. 2012).

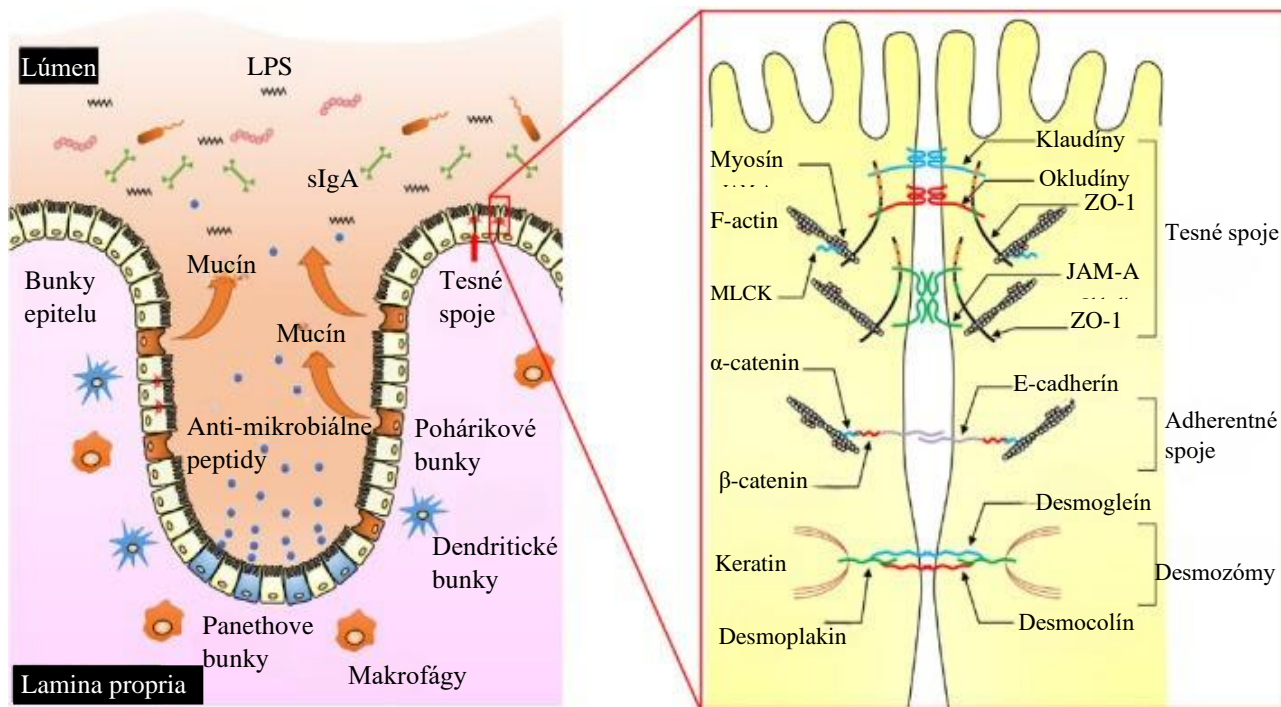
Vrstva hlienu zabraňuje priamemu kontaktu baktérii s epitelovými bunkami (Turner, 2009). Hlavnými stavebnými prvkami vrstvy hlienu sú vysoko glykozylované mucínové proteíny, ktoré vytvárajú gélovú štruktúru pokrývajúcu črevný epitel (Pelaseyed, a kol. 2014). Najviac zastúpeným hlienovým proteínom v hrubom čreve je mucín 2 (MUC2), ktorý je vylučovaný pohárikovými bunkami. Expresia tohto proteínu je kľúčová na ochranu pred ochoreniami (Van der Sluis, a kol. 2006). Oproti tenkému črevu má hrubé črevo dve vrstvy hlienového gélu, vonkajšiu a vnútornú. Vonkajšia, voľná vrstva umožňuje dlhodobú kolonizáciu komenzálnymi baktériami, vo vnútornej vrstve sa baktérie nenachádzajú. Pod vrstvou hlienu sú epitelové bunky (IEC), ktoré vznikajú z rezervoárov pluripotentných kmeňových buniek uložených v kryptách. Rozlišujeme päť druhov takto vznikajúcich epitelových buniek a to sú absorpčné enterocyty, pohárikové bunky, enteroendokrinné bunky, Panethové bunky a mikroskopické bunky (Salim a Söderholm, 2011). Tieto bunky spolu tvoria súvislú polarizovanú monovstrtvu, ktorá oddeľuje lúmen od lamina propria. Prechod hydrofilných rozpustných látok cez IEC je veľmi obmedzený bez prítomnosti špecifických transportérov (Turner, 2009). Reguláciu prechodu takýchto látok sprostredkovávajú medzibunkové spojenia. Rozoznávame tri najdôležitejšie komplexy medzibunkových spojení, tesné spoje (TJs), adherentné spoje (AJs) a desmozómy (Groschwitz a Hogan, 2009). IEC sú špecializované na rozpoznávanie molekúl pochádzajúcich z baktérii pomocou Toll-like receptorov (TLR) na povrchu buniek a receptorov podobných nukleotidovej väzobnej oligomeračnej domény (NOD) v cytoplazme, ktoré aktivujú obranné mechanizmy vylučovaním antimikrobiálnych peptidov (Artis, 2008). Ďalšou funkciou IEC je udržiavanie obojsmernej komunikácie so základnými imunitnými bunkami, aby regulovali zápalovú odpoveď proti bakteriálnym toxínom (Rescigno, 2011).

3.1.2 Medzibunkové spojenia

Celistvosť intestinálnej bariéry, ako už bolo vyššie zmienené, sprostredkovávajú medzibunkové spojenia. TJs sú apikálne adhézne komplexy, ktoré sa skladajú z viacerých transmembránových a cytozolových proteínov vrátane okludínu, klaudínov, zonula okludínov (ZOs), trichelulínu, cingulínu a spojovacích adhéznych molekúl (JAM), ktoré interagujú navzájom ale aj s cytoskeletom a vytvárajú tak komplexnú štruktúru (Obrázok 2) (Gunzel a Yu, 2013).

Cingulín a ZOs sú cytoskeletárne spojovacie proteíny, ktoré zasahujú do medzibunkových priestorov a interagujú s cytoplazmatickými periférnymi membránovými proteínmi, okludínom, klaudínom a JAM, aby vytvorili silné krížové väzby a interagovali s membránovým cytoskeletom zloženým z F-aktínu a myozínu (Carejido, a kol., 2007). Okludín zabezpečuje štrukturálnu intergritu tesného spojenia (Feldman, a kol., 2005). Klaudíny sú zodpovedné za reguláciu medzibunkového priestoru (Gunzel a Yu, 2013, Mrsny, a kol., 2008, Tsukita, a Furuse, 1999). Klaudíny majú niekoľko izoform, z ktorých každá má potenciálne odlišné úlohy a k správne fungovaniu bariéry je potrebná jemná rovnováha medzi nimi (Furuse, a kol., 2001, Tsukita a Furuse, 1998). Všetky proteíny TJs sú prísne regulované, mechanizmus regulácie týchto proteínov je komplikovaný a stále trochu nejasný. Do ich regulácie sa pri mnohých patologických stavoch zapájajú cytokíny ako TNF- α , interferón- γ (IFN- γ) a interleukíny (Capaldo a Nusrat, 2009). TNF- α taktiež spúšťa regulačný mechanizmus stimuláciou signálnej transdukčnej dráhy NF- κ B. Ďalším významným regulátorom TJs je kináza ľahkých reťazcov myozínu (MLCK) (Capaldo a Nusrat, 2009, Graham, a kol. 2006, Su, a kol., 2013), ktorá narúša interakciu medzi proteínmi tesných spojov a aktín-myozínovým cytoskeletom, čím následne poškodzuje kostru TJs, ktorá je kľúčová pre zachovanie integrity bariéry. V neposlednom rade je významným mechanizmom regulácie TJs aj posttranslačná fosforylácia, ktorá výrazne ovplyvňuje ich distribúciu (Farshori a Kachan, 1999).

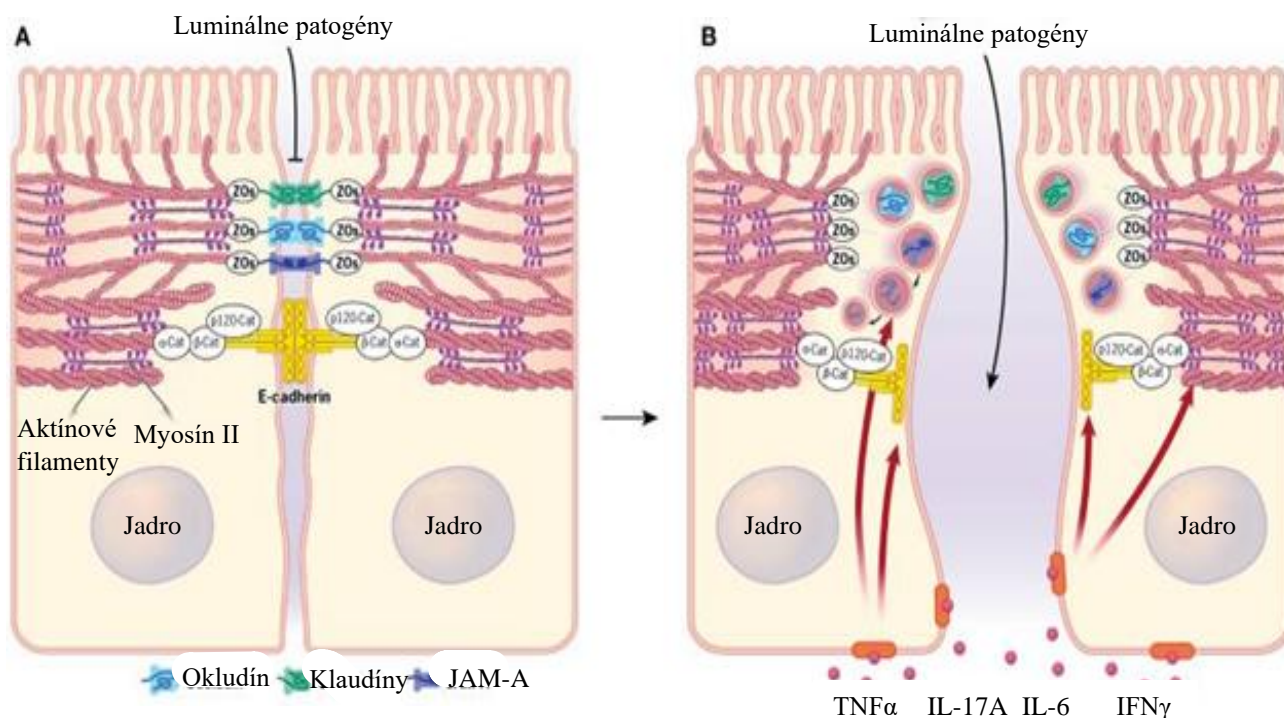
Pod TJs sa nachádzajú adherentné spoje, ktoré sú potrebné pre zostavenie tesných spojov. Spolu s desmozómami poskytujú AJs silné adhézne väzby, ktoré zabezpečujú celistvosť epitelu. TJs a AJs sú prepojené spojovacím prstencom aktínu a myozínu, ktorý umožňuje reguláciu spojov prostredníctvom cytoskeletu (Turner, 2009, Groschwitz 2009).



Obrázok 2: Anatomia intestinálnej bariéry (upravené, Anim, 2020)

3.1.3 Intestinálna bariéra a zápal

Zápal je fyziologický proces, ktorý zohráva kľúčovú úlohu pri obrane organizmu (Hancock, a kol., 2016). Je spúšťaný exogénnymi faktormi, ako je infekcia alebo vystavením konzervovanej časti mikroorganizmu známej aj ako molekulárne vzory spojené s patogénom (PAMPs), dráždivými chemickými látkami a inými cudzorodými molekulami. Môže byť taktiež vyvolaný endogénnymi faktormi syntetizovanými bunkami v dôsledku poškodenia tkaniva, úmrtia buniek, nekrózy alebo poruchy bunkového metabolizmu (Carlberg, a kol., 2016). Kombinované narušenie bunkových a sekrečných obranných mechanizmov má za následok nadmerné vystavenie luminálnej mikroflóre, čo vedie k aktivácii imunitnej odpovede a uvoľneniu rôznych zápalových mediátorov v črevnej sliznici (Laukoetter, a kol., 2006, Fasano 2020, Sugita, a kol., 2020, Abraham, a kol., 2022). Medzi zápalové mediátory patria cytokíny TNF- α , interleukíny IL-1 β a IL6, interferóny IFN- γ , histamíny a prostaglandíny. Tieto látky vedú k vazodilatácii, nábore rôznych leukocytov a fagocytujúcich buniek, ako sú neutrofily a monocyty (Murphy a Weaver, 2016). Zápalové faktory pôsobia na IEC a spôsobujú rozpad TJs a AJs, čím zvyšujú priepustnosť membrány a urýchľujú zápal sliznice (Obrázok 3) (Abraham, a kol., 2022, Andrews, a kol., 2018, Capaldo a Nusrat 2009, Kaminsky, a kol., 2021, Ruder, a kol., 2019).



Obrázok 3: Apikálne spoje v zdravom a zapálenom črevnom epitely. (upravené, Fuller, G. 2023)

3.2 Idiopatické črevné zápaly

Idiopatické črevné zápalové choroby (IBD) sú skupinou ochorení, ktorých príčiny nie sú úplne pochopené. S najväčšou pravdepodobnosťou hrajú pri týchto ochoreniach hlavnú úlohu faktory genetiky, imunitného systému a faktory environmentálneho prostredia. Dve hlavné formy IBD sú ulcerózna kolitída a Crohnova choroba. Medzi ďalšie, vzácnejšie, formy IBD patria nedeterminovaná kolitída, mikroskopická kolitída, eosinofilná kolitída, segmentálna kolitída a Bahcetova choroba.

3.2.1 Ulcerózna kolitída

Ulcerózna kolitída (UC) je typ chronického ochorenia čriev postihujúci časti hrubého čreva a konečníku, vedie k zápalom a vzniku vredov v týchto oblastiach gastrointestinálneho traktu (NIDDK, 2014). Ide o autoimunitné ochorenie charakterizované infiltráciou T-buniek do hrubého čreva (Ko, a kol. 2010). U pacientov trpiacich UC sa vyskytujú príznaky ako hnačka zmiešaná s krvou s postupným nástupom, ktorá pretrváva aj niekoľko týždňov (Ungaro, a kol. 2017). U 90 % pacientov sa vyskytuje krvácanie z konečníka rôznej intenzity, vodnatá alebo riedka stolica a pocit nutkania na časté vyprázdňovanie (Gros a Kaplan, 2023). Medzi ďalšie príznaky môže patriť inkontinencia stolice, hlienovitý výtok z konečníka a nočné defekácie (Ungaro, a kol.,

2017). Príznaky sa často objavujú pomaly a zvyčajne sa vyskytujú prerušovane s obdobiami bez príznakov medzi vzplanutiami (NIDKK, 2014).

Prvotná diagnostika UC pozostáva z kompletnej anamnézy a fyzického vyšetrenia, posúdenia príznakov a symptómov, laboratórnych testov a endoskopie. Pri závažnej forme UC sa môže vyskytnúť vysoká sedimentácia erytrocytov, znížená hladina albumínu a rôzne zmeny elektrolytov. Pacienti trpiaci UC často vykazujú aj zvýšenú hladinu alkalickej fosfatázy. Zápal v čreve taktiež môže spôsobiť aj vyššie hladiny fekálneho kalprotektínu alebo laktoferínu (Nikolaus a Schreiber, 2007). V roku 1998 bol vytvorený jednoduchý klinický index aktivity kolitídy, ktorý sa používa na posúdenie závažnosti príznakov a aktivity UC. Zahŕňa parametre a kritéria pre hodnotenie pacientov trpiacich UC, medzi tieto parametre patrí frekvencia stolice, krvácanie, bolestivé pocity, celkový stav pacienta, laboratórne testy a endoskopické vyšetrenie (Walmsley, a kol., 1998).

3.2.2 Crohnova choroba

Crohnova choroba (CD) je typ zápalového ochorenia čriev, ktoré môže postihnúť ktorýkoľvek segment GIT (NIDDK, 2019). Príznakmi sú bolesti brucha, hnačka, horúčka, nafúknutie brucha a úbytok hmotnosti. Okrem príznakov týkajúcich sa GIT sa ochorenie môže prejavovať aj anémiou, kožnými vyrážkami a artritídou (Baugmart a Sandborn, 2012). Pacienti s týmto ochorením majú príznaky často roky pred stanovením samotnej diagnózy (Pimentel, a kol. 2000). Zvyčajne sa ochorenie začne prejavovať v detskom a adolescentnom veku, ale môže sa prejaviť kedykoľvek. Hĺbka poškodenia tkaniva môže byť nerovnomerná na rôznych miestach GIT, a preto môžu byť počiatočné príznaky nenápadnejšie ako pri ulceróznej kolitíde. Avšak podobne ako pri UC aj pacienti trpiaci CD zažívajú chronicky sa opakujúce obdobia vzplanutí a remisií (NRC, 2003). CD je možné deliť na základe oblasti traktu, ktorú postihuje. Jednou z foriem je gastroduodenálna Crohnova choroba, ktorá spôsobuje zápal žalúdka a prvej časti tenkého čreva nazývanej dvanásnik a ďalšou formou je jejunoiletída, ktorá spôsobuje bodové škvrny zápalu v hornej polovici tenkého čreva, nazývanej jejunum (Tan a Allan, 1993).

Diagnostika CD je náročná a je často potrebné vykonať niekoľko testov ako je napríklad vyšetrenie krvného obrazu, CRP, pečeňové testy a kultivácia stolice. Pri CD je potrebné rozlišovať aktivitu a ťaž ochorenia. Aktivita je hodnotená pomocou Bestovho indexu, ktorý síce kvantifikuje symptómy, ale nezahŕňa skúsenosti s ochorením. Do aktivity patria klinické príznaky ako hnačka, horúčka, tachykardia a kožné prejavy,

laboratórne ako sedimentácia erytrocytov, anémia, C-reaktívny proteín, endoskopické a histologické. Tiaž predstavuje príznaky, ktoré obmedzujú pracovné schopnosti, rodinný a spoločenský život (Gabralec, 2009).

3.2.3 Incidencia IBD

IBD boli v 20. storočí považované za problém západných krajín ako je Severná Amerika, Európa a Oceánia (Molodecky, a kol., 2012). Avšak na prelome 21. storočia sa stali IBD globálnym ochorením, ktoré ma stále väčší výskyt v novo industrializovaných krajinách Ázie, Južnej Ameriky a Afriky (Kaplan, 2015, Kaplan a Ng, 2017). Prevalencia zápalových ochorení čriev v týchto krajinách je nízka, ale očakáva sa, že porastie (Kaplan, 2015). Od roku 1990 sa výskyt IBD v západnom svete stabilizoval, ale prevalencia ostala vysoká. V novo industrializovaných krajinách je rastúca incidencia analogická k trendom, ktoré boli v západnom svete v druhej polovici 20. storočia (Ng, a kol., 2017). GBD 2017 Inflammatory Bowel Disease Collaborators (2020) uviedli celosvetový počet prípadov na 6,8 milióna v roku 2017 a nárast prevalencie od roku 1990 z 79,5/100 000 obyvateľov na 84,3/100 000 obyvateľov.

V Českej republike (ČR) sa nárast prevalencie týka najmä pediatrických pacientov. Posledné predpoklady boli, že incidencia v roku 2022 dosiahne 18,9/100 000 za rok s tým, že sa budú zvyšovať počty prípadov CD, zatiaľ čo prípady UC a menej častých IBD ostanú konštantné (Jabandziev, a kol., 2020). Výskyt IBD v ČR teda stúpa, najmä v detskej populácii, ale celkový výskyt je stále relatívne nízky v porovnaní s inými európskymi krajinami.

3.2.4 IBD genetika a signalizácia

Zvýšený výskyt IBD medzi rodinnými príslušníkmi bol prvýkrát zaznamenaný už v 30. rokoch 20. storočia (Russel a Satsangi, 2004). Výskyt v rodine je stále jedným z najväčších nezávislých rizikových faktorov. Najpresvedčivejšie dôkazy o genetických faktoroch prispievajúcich k rozvoju IBD poskytujú štúdie dvojčiek, ktoré dokázali konkordáciu u jednovaječných dvojčiat 37,3 % pre CD a 10 % pre UC. U dvojvaječných dvojčiat je konkordácia pre CD 7 % a pre UC 3 % (Tysk, a kol., 1988, Thompson, a kol., 1996, Orholm, a kol., 2000).

Ulcerózna kolitída aj Crohnova choroba sú polygénne ochorenia. Bolo vykonaných niekoľko celogénových vyšetrení, ktoré identifikovali oblasti náchylnosti na dvanástich

chromozómoch. Nakoľko sú zápalové črevné ochorenia geneticky heterogénne, nebol zaznamenaný žiaden lokus, ktorý by sa konzistentne vyskytoval vo všetkých genómových skenoch (Gaya, a kol., 2006). V niektorých prípadoch boli identifikované gény, ktoré sa vyskytujú v rôznych chromozómoch a sú spájané s IBD. Jedným z týchto génov je *CARD15* (*NOD2*), ktorý je na chromozóme 16 a bolo identifikovaných jeho 30 nekonzervatívnych polymorfizmov. Ďalší gén, ktorý je spojený s IBD vo všetkých populáciách, je podľa dvoch veľkých meta-analýz lokalizovaný na chromozóme 6 tzv. IBD3. Tento gén kóduje hlavný histokompatibilný komplex (Duerr, a kol., 2000, van Heel, a kol., 1957, Williams, a kol., 2002). Niektoré mutácie v týchto lokusoch sú spájané s fenotypmi alebo s rôznym priebehom ochorenia. *CARD15/NOD2*, napríklad je asociovaný s formou CD, pri ktorej dôjde k zúženiu tenkého čreva. HLA haplotyp *DRB*0103* bol zase spojený s agresívnou formou UC, ktorá vedie až k operácii (Gaya, a kol., 2006, Cummings, a kol. 2005).

V rámci odpovede hostiteľa na mikróby v črevnom trakte rozoznávame dva druhy PRR. Ide o toll-like receptory (TLR) a NOD proteíny, kam patrí NOD1 a vyššie spomínaný NOD2, ktoré sú súčasťou NLR proteínovej rodiny (Martinon a Tschopp, 2005, Inohara a Nunez 2003). Proteíny tejto rodiny pozostávajú z troch domén, a to z LLR opakujúcej sa domény, ktorá sa podieľa na rozoznávaní ligandov, z centrálnej NOD domény, ktorá zabezpečuje samo-oligomerizáciu a má ATPázovú aktivitu a z CARD domény, ktorá interaguje s adaptérovými molekulami, čo vedie k aktivácii NF- κ B a/alebo kaspáz, ktoré sa podieľajú na apoptóze. NOD1 a NOD2 sa odlišujú počtom CARD domén. Práve LLR opakovania zabezpečujú, že NOD1 a NOD2 dokážu rozpoznať zložky bunkovej steny baktérii, ako sú peptidy peptidoglykán, γ -D-glutamylmesodiaminopimelická kyselina a muramyl dipeptid (Girardin, a kol., 2003, Chamaillard, a kol. 2003). TLR sú membránové receptory, ktoré sa vyskytujú ako monoméry, homodiméry alebo heterodiméry, kedy sa TLR2 kombinuje s TLR1 alebo s TLR6. Oproti NOD proteínom, TLR využívajú pre ďalšiu signalizáciu TIR doménu. (Akira a Takeda, 2004) Peptidoglykán potencionalne aktivuje TLR2 aj NOD2 prostredníctvom muramyl dipeptidu (MDP) (Strober, a kol. 2006). Stimulácia TLR2 vyvoláva spojenie s adaptorovým proteínom MyD88 a náborom IRAK proteínov. Súčasná aktivácia NOD2 MDP vedie k aktivácii RICK a k negatívnej alebo pozitívnej regulácii TLR2 signalizačnej dráhy. V závislosti od zapojenia TLR, trvania a sily signalizácie, výsledku signalizačných interakcií medzi TLR a NOD a typom bunky, v ktorej sa tieto

deje odohrávajú sa cytokíny a faktory produkované ako výsledok aktivácie PRR môžu podieľať na iniciácii alebo udržaní reakcii hostiteľa, ktoré sú protizápalové, alebo prozápalové (Hugot, a kol. 1996).

3.2.5 IBD a environmentálne faktory

Ako už bolo vyššie uvedené incidencia IBD narastá v novo industrializovaných krajinách, nesúvisí to však s geografickými faktormi, ale s environmentálnymi, kam patria industrializácia, sanitácia, hygiena a rozdiel prístupu k špecializovanej zdravotnej starostlivosti (Baumgat a Sandborn, 2007).

Nižšie riziko vzniku zápalových črevným ochorení, najmä CD, bolo zaznamenané pri absencii vody z vodovodu, absencií teplej vody, vo veľkých alebo chudobných rodinách s viacerými deťmi, stiesnených životných podmienkach alebo pri konzumácii kontaminovaných potravín (Hampe, a kol., 2003, Gent, a kol. 1994, McCormick a Manning, 2001). Nadmerná hygiena môže obmedziť expozíciu environmentálnym antigénom a narušiť tak funkčne dozrievanie slizničného imunitného systému, čo vedie k nepriamym imunitným reakciám pri opätovnej expozícií týmto antigénom v neskoršom veku. Nepriamo sa uvádza, že aj psychický stres zvyšuje aktivitu zápalového ochorenia čriev, z čoho vyplýva, že nepriaznivé životné udalosti, chronický stres a depresia môžu zvýšiť pravdepodobnosť relapsu u pacientov s pokojným priebehom ochorenia (Mawdsley a Rampton, 2005).

Zaujímavé výsledky boli zaznamenané pri pozorovaní vplyvu fajčenia na priebeh IBD. Fajčenie cigariet bolo spojené s menej častými vzplanutiami ulceróznej kolitídy. Naopak, priebeh Crohnovej choroby sa zhoršil a fajčenie spôsobilo tvorbu fistúl a striktúr, zvýšený počet vzplanutí a potrebu chirurgického zákroku po navodenej remisii (Cosnes, 2004). Odvykanie od fajčenia je účinnou terapeutickou intervenciou pri CD, ale snaha nahradiť fajčenie cigariet nikotínovými náplastami alebo klystírmi nepreukázala účinnosť pri liečbe UC (McGrath, a kol., 2004, Ingram, a kol., 2005). Priaznivé účinky nikotínu pri priebehu UC sú pravdepodobne spôsobené zvýšenou produkciou hlienu, zníženou produkciou proinflamačných cytokínov a oxidu dusnatého a zlepšením funkcie črevnej bariéry, zatiaľ čo škodlivé účinky nikotínu pri CD asi súvisia so zvýšeným tokom neutrofilov do črevnej sliznice (Cosnes, 2004).

Čo sa týka vplyvov výživy alebo diétnych intervencií, tak nie je možné vyvodiť žiadne konečné výsledky. Neexistujú ani jednoznačné dôkazy o tom, že by incidencia IBD

spôsovoval nejaký konkrétny mikrób. Taktiež sa nepotvrdilo, že by zápalové ochorenia čriev boli spôsobené vakcínou proti osýpkam alebo iným kombinovaným očkovaním (Baumgart a Sandborn, 2007, Robertson a Sandler, 2001, Davis, a kol., 2001).

3.2.6 IBD a imunobiológia

Hoci nie je známa presná príčina vzniku IBD, tak sa vo všeobecnosti uznáva, že zápalové ochorenia čriev sú výsledkom neprimeranej reakcie poškodeného slizničného imunitného systému na pôvodnú mikroflóru a iné lumenálne antigény. Klinický nástup IBD má niekoľko imunologických príčin (Baumgart a Sandborn, 2007).

Medzi primárne príčiny vzniku IBD patrí zvýšený vznik defektov priepustnosti epitelu, čo vedie k zníženiu odolnosti črevnej bariéry, (Soderholm, a kol., 2002) narušenie vrodených imunitných mechanizmov epitelovej vrstvy, čo vedie k zmene vzoru expisie TLR. Zdravé epitelové bunky čreva exprimujú TLR3 a TLR5 bazolaterálne, TLR2 a TLR4, exprimované apikálne, sú ledva detekovateľné. Expesia TLR3 je pri CD signifikantne znížená, čo neplatí pre UC, avšak expresia TLR4 je pri oboch ochoreniach silne zvýšená. V epitelových bunkách sa zvyšuje aj expresia NOD2, expresia sa môže ešte zvyšovať spätnou väzbou, keď je aktivovaná NF- κ B kaskáda, čo môže ovplyvniť schopnosť organizmu eliminovať invazívne a patogénne mikróby, čo vedie k chronickému zápalu (Rosentiel, a kol., 2003, Berrebi, a kol., 2003). Jednou z príčin je, že u pacientov s IBD je narušené rozpoznávanie a spracovanie antigénov APCs, ktoré nerozoznajú komenzálne baktérie a vyvolajú proinflamačné imunitné reakcie, ktoré majú byť za normálnych podmienok zamerané na patogény, čo môže byť spôsobené nefunkčnými alebo prehnanými reakciami TLR receptorov (Franchimont, a kol., 2004). Ďalšími príčinami klinického nástupu IBD sú, APCs sa stanú silnými aktivátormi efektorových T-buniek, narušenie centrálnej a periférnej tolerancie, čo bráni T-bunkám v apoptóze, nerovnováha medzi efektorovými a regulačnými T-bunkami a psychický stres, ktorý môže spúšťať alebo zvyšovať zápalovú kaskádu prostredníctvom neuroimunologickej interakcie (van de Wal, a kol., 2003, Ina, a kol., 1999, Van den Brande, a kol., 2003, Martin, a kol., 2004, Wang, a kol., 2003).

Primárne príčiny vedú ku spoločným sekundárnym príčinám, medzi ktoré patria rozpoznanie antigénu profesionálnymi a neprofesionálnymi antigén-prezentujúcimi bunkami, čo má za následok ich migráciu zo systémovej cirkulácie do črevnej sliznice, zároveň proinflamačné cytokíny zvyšujú expresiu ligandov adhezívnych molekúl

na endoteli slizničných ciev, ktoré podporujú adhéziu leukocytov a ich extravazáciu do tkaniva (Charo a Ransohoff, 2006, Goebel, a kol., 2006). Ďalej sa v sliznici hromadí množstvo škodlivých metabolitov a mediátorov, čo vedie k poškodeniu tkaniva. Oxid dusnatý, kyslíkové radikály, prostaglandíny, histamín a proteázy podporujú rast fibroblastov so sekréciou kolagénu a tvorbu striktúr (Keshavarzian, a kol., 2003, Leeb, a kol., 2003, Theiss, a kol., 2005, Kirkegaard, a kol., 2004).

3.2.7 IBD a terapia

Prístup k liečbe a terapii IBD sa vzťahuje k individuálnemu priebehu ochorenia, rozsahu postihnutia a komplikáciám. Základným cieľom liečby je odstránenie symptómov a udržanie remisie (Peyrin-Biroulet a Lémann, 2011, Prantera a Scribano, 2008).

Aminosalicyláty (ASA) sú väčšinou prvým liekom, ktorý sa pacientom podáva, ich výhoda je v tom, že sú minimálne toxické, bezpečné a majú nízky výskyt vedľajších účinkov. Ak sú ASA bez účinku, prechádza sa v rámci liečby na kortikosteroidy (KS) (Engel a Neurath, 2010). Kortikosteroidy výrazne zmenia priebeh ochorenia a rýchlo navodia remisiu. Nevýhodou je, že nie sú vhodné pre udržovaciu liečbu a ich dlhodobé užívanie môže mať vedľajšie účinky (Etchevers, a kol., 2007). Ku KS je potrebné aj zavčas nasadiť imunosupresíva, pretože približne po 12 mesiacoch vzniká kortikodependencia (Wolters, a kol., 2006). Pre pacientov, ktorí neodpovedajú na liečnu KS a imunosupresívami, sú v súčasnosti kľúčovým liekom anti-TNF α , pretože zasahujú do proinflamačnej kaskády (Etchevers, a kol., 2007). Liečba anti-TNF- α vedie k hojeniu sliznice, uzatváraniu fistúl, zníženiu potreby hospitalizácie a k udržaniu remisie, čo vedie k zlepšeniu kvality života pacientov (Peyrin-Biroulet, 2010).

Nové poznatky o imunológii IBD a v bioinžinierstve vedú stále k novým terapeutickým konceptom, ktoré sa zameriavajú na takmer všetky aspekty inflamačného procesu, okrem snahy vytvárať ďalšie anti-TNF stratégie, prebiehajú aj pokusy o moduláciu ďalších kľúčových cytokínov, blokádu T-buniek či blokádu migrácie a adhézie zápalových buniek (Baumgat a Sandborn, 2007).

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologický materiál

Adherentná bunková línia Caco-2 odvodená od ľudského kolorektálneho adenokarcinómu (ECACC, 86010202)

4.2 Použité chemikálie

- Deionizovaná voda bez nukleáz
- Deoxynukleosidtrifosfáty: dATP (TaKaRa, 4026)
- Deoxynukleosidtrifosfáty: dGTP (TaKaRa, 4027)
- Deoxynukleosidtrifosfáty: dCTP (TaKaRa, 4028)
- Deoxynukleosidtrifosfáty: dTTP (TaKaRa, 4029)
- Duplecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (Sigma Aldrich, D6546)
- Duplecco's PBS (BioConcept, 3-05F29-I)
- Ethanol (Sigma Aldrich, 459844)
- Fetálne bovinné sérum (Sigma Aldrich, F6178)
- Chloroform (Sigma Aldrich, C2432)
- Interleukin-1 β (Sigma Aldrich, H6291)
- Interleukin-8, CXCL8 GE Assay (ThermoFisher Scientific, 4331182)
- Isopropanol (Lachner, 20037-AT0)
- KiCqStart Probe qPCR ReadyMix (Sigma Aldrich)
- L-glutamin (Serana, RGL-001)
- Lipopolysacharid (Sigma Aldrich, L7895)
- MEM roztok neesenciálnych aminokyselín (100x) (Sigma Aldrich, M7145)
- M-MuLV reverzná transkriptáza (New England BioLabs, M0253L)
- Tumor nekrotizujúci faktor- α (Sigma Aldrich, T6674)
- Primery ACTB (Sigma Aldrich)
Forward: 5' - CAAGATGAGATTGGCATGGC - 3' (SY230219387-093)
Reverse: 5' - CACATTGTGAACTTTGGGGG - 3' (SY230219387-094)
- Primery TJP1 (Sigma Aldrich)
Forward: 5' - GACCTATGAACCCCAACTCC - 3' (SY210626287-047)
Reverse: 5' - CTGGTCCGTATAGCTTGAGG - 3' (SY210626287-023)

- Primery OCLN (Sigma Aldrich)
Forward: 5' - TGGCAAAGTGAATGACAAGC - 3' (SY210626287-043)
Reverse: 5' - CAGGCGAAGTTAATGGAAGC - 3' (SY210626287-044)
- Primery CDH1 (Sigma Aldrich)
Forward: 5' - CTGCTCTTGCTGTTTCTTCG - 3' (SY210626287-041)
Reverse: 5' - TCAAGTCAAAGTCCTGGTCC - 3' (SY210626287-042)
- Próba ACTB (Sigma Aldrich, HA17151510-002)
5' - [6FAM]TGACAGCAGTCGGTTGGAGCGAGCA[OQA] - 3'
- Próba TJP1 (Sigma Aldrich, HA17444162-006)
5' - [6FAM]AGCAGAGACCTCGAGCAGCCCACAT[OQA] - 3'
- Próba OCLN (Sigma Aldrich, HA17444165-002)
5' - [6FAM]TCCACGCCGGTTCCTGAAGTGGTT[OQA] - 3'
- Próba CDH1 (Sigma Aldrich, HA17444159-006)
5' - [6FAM]AGGAGAGCGGTGGTCAAAGAGCCCT[OQA] - 3'
- Random Primers 6 (New England BioLabs, S1230S)
- Reakčný pufer M-MuLV 10x (New England BioLabs, B0253S)
- RNase Inhibitor, Human Placenta (Nex England BioLabs, M0307L)
- TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc., TR 118)
- Trypanová modrá: 0,4% roztok v PBS (Sigma Aldrich, T6146)
- Trypsín: 0,25% roztok v EDTA (Sigma Aldrich, T4049)

4.3 Použité laboratórne pomôcky

- 12jamkové kultivačné dosky (TPP)
- Automatické pipety 100 – 1000 μ l, 20 – 200 μ l, 2 – 20 μ l, 0,5 – 10 μ l, 0,1 – 2,5 μ l (Eppendorf)
- Buničina (Tork)
- Bürkerova komôrka (Assistent)
- Dávkovacia automatická pipeta Xstream (Eppendorf)
- Jednorázové sérologické sterilné pipety: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (TPP)
- Krycie sklíčka (Menzel Gläser)
- Kultivačné fľaše: 25 cm² , 75 cm² , 150 cm² (TPP)
- Liehový kahan
- Nitrilové rukavice (Mercator Medical)

- PCR 96jamková doštička (Roche)
- PCR fólia (Roche)
- Pipetor Fastpette plus (Labnet)
- Plastové mikroskúmavky: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml (BIOplastics)
- Plastové špičky k automatickým pipetám: 0,1 – 10 μ l, 10 – 200 μ l, 100 – 1000 μ l (Eppendorf)
- Plastové sterilné skúmavky: 15 ml, 50 ml (TPP)
- Sterilná škrabka na bunkové kultúry (TPP)
- Stojan na mikroskúmavky (TPP)
- Špičky na dávkovaciú pipetu 0,2 ml (Eppendorf)

4.4 Použité prístroje

- Centrifúga 5415 R (Eppendorf)
- Centrifúga 5810 R; rotory F-34-6-38, A-4-61 (Eppendorf)
- Hlbokomraziaci box MDF-U53V (Sanyo)
- Chladnička s mrazničkou (Whirlpool)
- Inkubátor Co2 NB-203XL (N-Biotec)
- Laminárny box Labculture Class II Type A2 (ESCO)
- Mikrocentrifúga (Spectrafuge)
- Mikroskop NIB-100 (Novel Optics)
- Odsávačka Flask-Trap 1 (Biosan)
- qPCR termocykler LightCycler 480 II (Roche) s programom LightCycler 480 SW 1.5
- Spektrofotometer NanoDrop Lite (Thermo Fisher)
- Termoblok Genius Dry Bath Incubator Md-02n (Major Science)
- Vodná lázeň LCB11D (Daihan LabTech)
- Vortex Reax top (Heidolph)
- Výrobník ľadu F100 Compact (Icematic)

4.5 Experimentálne metódy

4.5.1 Príprava kultivačného média

Bunková línia Caco-2 bola kultivovaná v médiu DMEM. Do 0,5 l média bolo pridaných 50 ml 10% fetálneho bovinného séra (FBS), 5 ml neesenciálnych aminokyselín, 5 ml L-glutamínu a antibiotiká penicilín - streptomycín. Príprava média prebehla v laminárnom boxe.

4.5.2 Rozmrazenie bunkovej línie

Bunková línia Caco-2 bola uchovávaná v kryoskúmavkách v mraziacom boxe (-80 °C) v zmesi FBS a DMSO, ktoré slúži ako kryoprotektívum. V laminárnom boxe bolo do kultivačnej fľaše 25 cm² pridaných 5 ml DMEM. Kryoskúmavka s bunkovou líniou bola prenesená do vodnej lázne vyhriatej na 37 °C na dobu 3 min. V boxe bol k suspenzii pridaný 1 ml média, obsah bol prepipetovaný a prenesený do kultivačnej fľaše, ktorá bola vložená do inkubátoru, v ktorom bola udržiavaná teplota 37 °C a 5% atmosféra CO₂. Na druhý deň bolo vo fľaši vymenené médium, aby sa odstránili zvyšky DMSO a nepriľahnuté bunky.

4.5.3 Pasážovanie buniek

Pri pasážovaní buniek dochádza k redukcii buniek v kultivačnej fľaši, je tým taktiež zaistené, že bunky ostávajú v jednej vrstve, netvorí sa zhluky a neuvolňujú sa do média. Bunky boli pasážované, každý tretí alebo štvrtý deň, kedy dosahovali takmer úplnú konfluenciu. Bunky boli po celý čas uchovávané v inkubátore.

Prvým krokom bolo zahriatie média DMEM a PBS na 37 °C vo vodnej lázni, aby mali roztoky rovnakú teplotu ako je nastavená v inkubátore a nedošlo tak k teplotnému šoku buniek. Pri izbovej teplote bola rozmrazená alikvóta roztoku trypsínu. Všetky látky boli prenesené do luminárneho boxu, kde došlo k opáleniu hrdiel fliaš, aby sa zaistila sterilita. Do boxu bola prenesená aj kultivačná fľaša s pasážovanou líniou a pomocou sérologickej pipety pripojenej na odsávačku bolo z fľaše odstránené médium. Pre kultivačnú fľašu s veľkosťou 75 cm² bol ďalší postup nasledovný. K bunkám bolo pridaných 5 ml PBS na premytie buniek a odstránenie zvyšku média, ktoré obsahuje látky zabraňujúce pôsobeniu trypsínu. PBS bolo potom opäť pomocou odsávačky odstránené. Do kultivačnej fľaše bol pridaný 1 ml roztoku trypsínu a kultivačná fľaša bola premiestnená do inkubátoru približne na 5 min, počas tejto doby došlo k uvoľneniu buniek

od dna fľaše. Po krátkej inkubácii bola fľaša opäť prenesená do boxu a k suspenzii buniek s trypsínom bolo pridaných 9 ml DMEM, v ktorom boli bunky resuspendované do podoby homogénneho roztoku a prenesené do 15ml skúmavky. Podľa koncentrácie buniek bola zo skúmavky vrátená suspenzia buniek do kultivačnej fľaše a doplnená médiom na celkový objem 20 ml. Fľaša bola umiestnená do inkubátora. V jednej kultivačnej fľaši bola línia uchovávaná 3 pasáže, pri štvrtej bola fľaša vymenená za novú.

4.5.4 Stanovenie koncentrácie buniek v bunkovej suspenzii

Aby nedochádzalo k ovplyvňovaniu výsledkov nerovnomerným obsahom buniek vo vzorke, bol mikroskopicky stanovovaný obsah buniek pomocou Bürkerovej komôrky. Z resuspendovanej zmesi zpasážovaných buniek (postup vid' kapitola 4.5.3) bolo do plastovej mikroskúmavky odobraných 10 μ l. K tomuto objemu bolo následne mimo laminárny box pridaných 90 μ l roztoku trypanovej modrej a celá zmes bola prepipetovaním zhomogenizovaná. Na Bürkerovú komôrkku bolo položené krycie sklíčko a pod neho bola napipetovaná ofarbená bunková suspenzia. Pomocou mikroskopu pri zväčšení 100x boli spočítané bunky v 10 štvorcoch komôrky. Z týchto hodnôt bol vypočítaný aritmetický priemer, ktorý bol násobený faktorom riedenia = 10 a 10^4 (táto hodnota predstavuje prepočet z obsahu jedného štvorca komôrky). Výsledkom bola koncentrácia buniek v suspenzii, ktorá sa udáva v jednotkách milión buniek na 1 ml.

4.5.5 Vysievanie buniek do 12jamkovej dosky

Do potrebného množstva jamiek bol napipetovaný 1 ml nariadenej bunkovej suspenzie. Bunková suspenzia bola nariadená tak aby v 1 ml bolo približne 0,5 milióna buniek. Toto platilo pre všetky experimenty, okrem prípravy diferencovaných buniek Caco-2 potrebných pre testovanie zmesi zápalových faktorov, kde bola koncentrácia 0,1 milióna na 1 ml. Po rozpipetovaní suspenzie do jamiek bola doska vložená do inkubátora, kde bola ponechaná do druhého dňa.

4.5.6 Príprava a aplikácia roztokov testovaných zápalových faktorov

Po 24 hodinovej inkubácii bunkovej suspenzie v 12jamkových doskách boli pripravené roztoky testovaných zápalových faktorov. Testovanými faktormi boli LPS, TNF- α , IL-1 β a mix týchto troch. Všetky experimenty boli urobené v troch opakovaníach na rôznych pasážach. Zo zásobného roztoku LPS s koncentráciou 5 mg/ml boli pripravené roztoky na testovanie s koncentraciami 100 ng/ml, 10 ng/ml a 1 ng/ml. Zo zásobného

roztoku TNF- α s koncentráciou 20 $\mu\text{g/ml}$ boli pripravené roztoky s koncentraciami 50 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml a 1 ng/ml. Zo zásobného roztoku IL-1 β s koncentráciou 100 $\mu\text{g/ml}$ boli pripravené roztoky s koncentraciou 50 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml a 1 ng/ml. Mix bol pripravený tak, aby v ňom bola koncentrácia LPS 100 ng/ml, TNF- α 50 ng/ml a IL-1 β 50 ng/ml. Všetky testované roztoky boli pripravované do DMEM a ich príprava prebiehala v laminárnom boxe. Z 12jamkovej dosky bolo odsaté médium a do príslušných jamiek bol napipetovaný 1 ml testovaných roztokov. Dosky boli vložené do inkubátoru a boli vystavené pôsobeniu roztokov po dobu 48 alebo 72 hodín.

4.5.7 Izolácia RNA pomocou TRI Reagent

Samotnej izolácii predchádzalo ukončenie inkubácie buniek v roztokoch zápalových faktorov, a to tak že z jamiek bolo vyklepnuté médium a do každej jamky bol napipetovaný 1 ml PBS na premytie, ktoré bolo následne tiež vyklepnuté. Do premytých jamiek bolo následne napipetovaných 0,5 ml TRI Reagent a dosky boli do zahájenia izolácie RNA uložené pri teplote $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Vzorky s TRI Reagent sa nechali rozmraziť pri izbovej teplote. Pomocou škrabky boli bunky uvoľnené od dna jamiek do suspenzie, ktorá bola prepipetovaním homogenizovaná a prenesená do 1,5ml mikroskúmavky. Vzorky boli 10 min inkubované pri izbovej teplote. Do každej vzorky bolo pridaných 0,1 ml vychladeného chloroformu. Vzorky boli uzavreté a minútu pretrepávané medzi dvoma stojanmi na skúmavky. Opäť boli vzorky inkubované 10 minút pri izbovej teplote. Nasledovala centrifugácia pri 13 000 rpm, teplote $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 min. Po centrifugácii bola vrchná vodná fáza prenesená do novej mikroskúmavky a bolo k nej pridaných 0,25 ml izopropanolu. Obsah mikroskúmaviek bol ľahko premiešaný pomocou vortexu. Vzorky boli 10 min inkubované pri izbovej teplote a potom opäť prebehla centrifugácia pri 13 000 rpm, teplote $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 min. Supernatant bol vyliaty a pelet premytý 0,5 ml vychladeného 75% ethanolu a centrifugovaný 8 minút. Premytie ethanolom a následná centrifugácia bola vždy robená 2krát. Potom bol pelet vysušený na stole a bolo k nemu pridaných 50 μl deionizovanej vody bez nukleáz. Vzorky boli presunuté do termobloku a boli inkubované pri teplote $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, po 5 minútach boli ihneď presunuté do ľadovej triešte. Bola zmeraná koncentrácia jednotlivých vzoriek. Zo spektrofotometru NanoDrop bola odčítaná nie len koncentrácia vyizolovanej RNA, ale aj pomer absorbancii pri vlnovej dĺžke 260 a 280 nm, ktorý odráža čistotu vyizolovanej nukleovej kyseliny. Roztoky RNA boli uchovávané pri teplote $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5.8 Reverzná transkripcia

Aby mohlo prebiehať meranie expsie génov prostredníctvom PCR bolo potreba vyizolovanú RNA prepísať do DNA označovanej ako cDNA prostredníctvom reverznej transkripcie.

Najprv bolo potreba nariediť vzorky RNA vodou tak, aby bolo získaných 5 μ l roztoku s obsahom RNA 1000 ng. Objemy RNA a deionizovanej vody potrebné k takémuto nariadeniu boli vypočítané z koncentrácie roztokov, ktorá bola nameraná po ukončení izolácie, vid' kapitola 4.5.7. K nariadeným vzorkám RNA bol pridaný 1 μ l roztoku random primerov a boli prenesené do termobloku, kde boli inkubované 5 min pri teplote 65 °C. Počas inkubácie bola pripravená reakčná zmes, ktorej zloženie je uvedené v tabuľke 1. Po inkubácii boli vzorky preložené do ľadovej triede a následne boli krátko zcentrifugované. Ku vzorkám bolo pridaných 6 μ l reakčnej zmesi, boli opäť krátko zcentrifugované a umiestnené do termobloku na 1 h pri teplote 42 °C. Po hodine boli vzorky premiestnené ešte na 10 min do termobloku s teplotou 65 °C. Po uplynutí času boli vzorky s novo syntetizovanou cDNA prenesené do ľadu na približne 2 min a boli 5x nariadené pridaním 48 μ l deionizovanej vody. Takto pripravená cDNA bola uchovávaná pri teplote -20 °C.

Roztok dNTPs, ktorý je súčasťou reakčnej zmesi bol pripravený z 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztokov jednotlivých dNTPs. Výsledný roztok dNTPs je pripravený z 100 μ l roztokov dTTP, dATP, dGTP, dCTP a doplnený 600 μ l deionizovanej vody na objem 1 ml.

Tabuľka 1: Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu na jednu vzorku

Zložka reakčnej zmesi	Koncentrácia	Objem (μ l)
M-MuLV – reverzná transkriptáza	200 000 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,6
Inhibitor RNáz	40 000 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,3
Zmes dNTPs	10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,6
Reakčný pufer	10x	1,2
Deionizovaná voda	-	3,3

4.5.9 qRT-PCR

Bola sledovaná expresia génov TJP1, OCLN, CDH1, okrem nich bol sledovaný aj gén ACTB, ktorý slúžil ako housekeeping gén. Od housekeeping génu sa očakáva, že bude vo všetkých bunkách exprimovaný v rovnakej miere nezávisle na pôsobení testovaných

látok, cez mieru expresie takéhoto génu je možné objektívne porovnávať rozdiely v expresii sledovaných génov. Taktiež bola sledovaná expresia génu IL8, ale len zo vzoriek, ktoré vznikli z bunkovej suspenzie, na ktorú vybrané zápalové faktory pôsobili v najvyšších pripravených koncentráciách po dobu 72h.

Všetky gény okrem IL8 boli detekované pomocou KiCqStart Probe Assays mixu. Gén IL8 bol detekovaný pomocou TaqMan™ Gene Expression Assay mixu. Okrem IL8 boli pre všetky gény pripravené zásobné roztoky primerov, v ktorých mal F aj R primer koncentráciu $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Podľa počtu vzoriek boli pripravené reakčné zmesi pre jednotlivé gény, ktorých zloženie je uvedené v tabuľke 2 a 3.

Samotná PCR prebiehala v 96 jamkovej doštičke. Do jednej jamky bolo pipetovaných 8 μl reakčnej zmesi a 2 μl roztoku cDNA danej vzorky. Pre každú vzorku bola PCR robená v triplikáte. V priebehu prípravy PCR boli všetky reakčné zmesi aj samotná doštička uchovávané na ľadovej triešti, aby nedochádzalo k aktivácii enzýmov.

Tabuľka 2: Zloženie RT-qPCR reakčnej zmesi na jednu jamku pri použití KiCqStart Probe Assays

Zložka reakčnej zmesi	koncentrácie	Objem (μl)
KiCqStart ReadyMix™	-	5,0
Forward a reverse primery	$10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,3
Próba	$10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,2
voda	-	2,5

Tabuľka 3: Zloženie RT-qPCR reakčnej zmesi na jednu jamku pri použití TaqMan™ Gene Expression Assay

Zložka reakčnej zmesi	koncentrácie	Objem (μl)
Master mix	-	5,0
TaqMan™ Gene Expression Assay	-	0,5
Voda	-	3,5

Po napipetovaní celej doštičky bola jej vrchná časť prekrytá PCR fóliou. Nasledovala centrifugácia pri 1 500 rpm, 4 °C, po dobu 3 min. Doštička bola potom prenesená do qPCR termocyklu, v programe LightCycler480 SW 1.5 bol nastavený profil priebehu PCR reakcie, vid' tabuľka 4.

Tabuľka 4: Teplotný a časový profil priebehu qRT-PCR

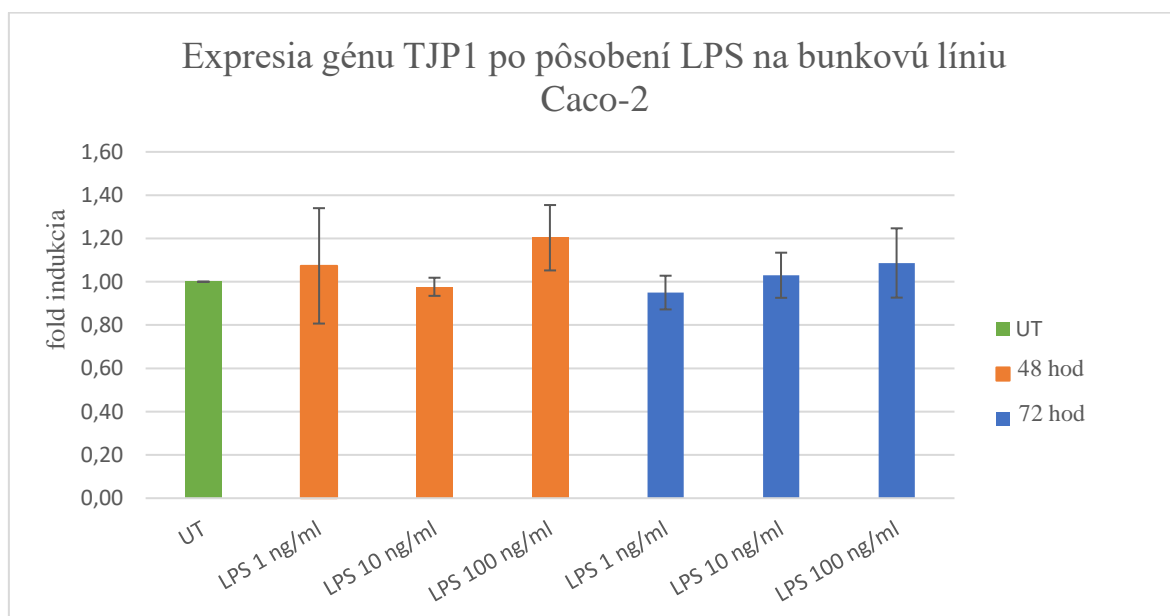
	Teplota (°C)	čas	Počet cyklusov
Preinkubácia	95	10 min	1
Amplifikácia	95	10 s	45
	60	30 s	
chladenie	40	30 s	1

Po ukončení PCR bola v software LightCycler 480 SW 1.5 urobená analýza nameraných dát. Analýzou boli získané číselné vyjadrenia Ct hodnôt pre jednotlivé jamky, a teda tri hodnoty Ct pre jeden gén každej vzorky, ktorých priemer bol potom vyhodnotený pomocou delta-delta Ct metódy. Ide o relatívnu kvantifikáciu qPCR, kedy boli cez priemery Ct hodnôt housekeeping génu (ACTB) porovnané priemery Ct hodnôt sledovaných génov (TJP1, OCLN, CDH1 a IL-8) pre konkrétnu vzorku a negatívnu kontrolu (UT). Výsledkom tak bola číselná hodnota vyjadrujúca koľkokrát bola vo vzorke zvýšená či znížená expresia študovaného génu v porovnaní s expresiou v negatívnej kontrole. Signifikancia týchto rozdielov medzi experimentami bola následne overená pomocou T-testu s parametrami – obojstranné rozdelenie, výbery s rôznym rozptylom a hladina významnosti 5 %.

5 VÝSLEDKY

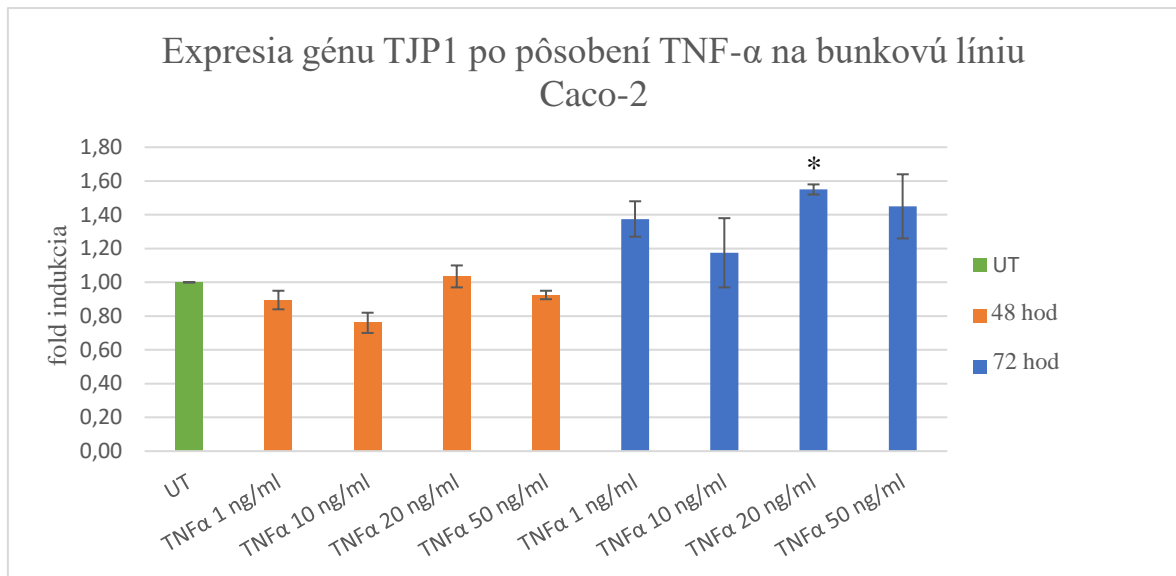
Prostredníctvom analýzy Ct hodnôt jednotlivých bariérových génov (TJP1, OCLN, CDH1), génu IL-8 a houskeeping génu (ACTB), bola vyhodnotená ich expresia po pôsobení zápalových faktorov (LPS, TNF- α , IL-1 β a mix) vo vybraných koncentráciách po dobu 48 a 72 hod.

Po pôsobení lipopolysacharidu dochádzalo k zvýšeniu expresie TJP1 génu pričom najväčší vplyv na expresiu bol zaznamenaný po pôsobení LPS s koncentráciou 100 ng/ml počas 48 hodín. Ku zníženiu expresie došlo pri pôsobení LPS s koncentráciou 10 ng/ml po dobu 48 h a koncentráciou 1 ng/ml počas 72 h. Po štatistickej analýze prostredníctvom T-testu bolo zistené, že zmeny v expresii génu TJP1 vyvolané pôsobením LPS po 48 a 72 hodinách nie sú štatisticky významné (graf 1).



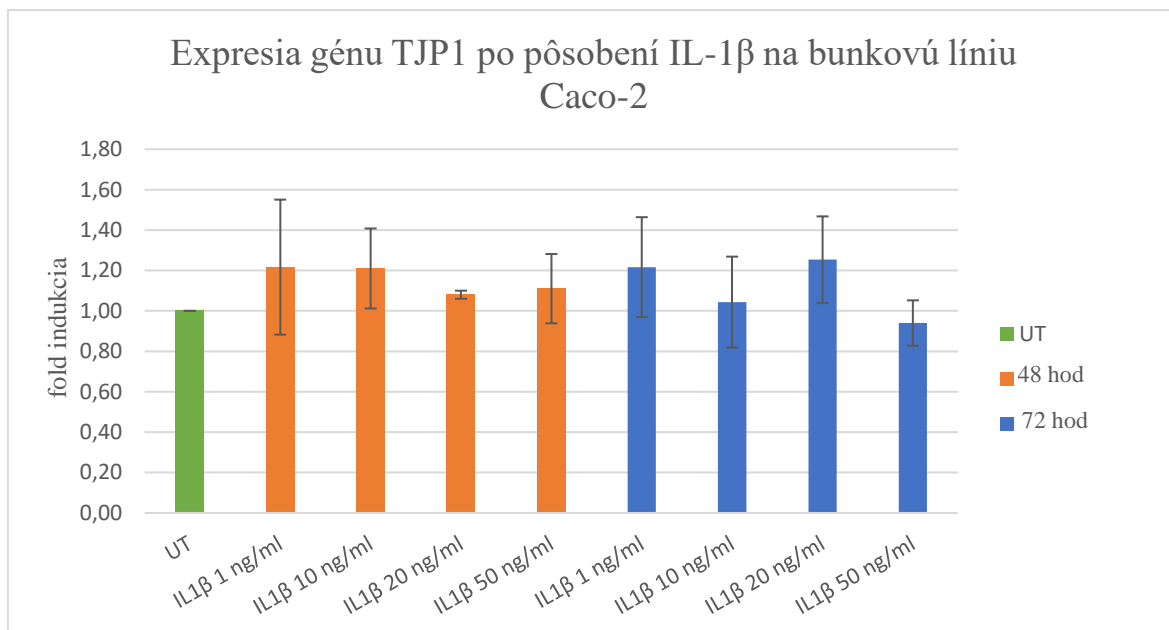
Graf 1: Expresia génu TJP1 po pôsobení LPS na bunkovú líniu Caco-2 po 48 a 72 h. Graf vyjadruje expresiu génu TJP1 po pôsobení LPS. Bunky boli vysiate v koncentrácii 500 000 buniek na jamku a inkubované s rastúcou koncentráciou LPS (1 ng/ml – 100 ng/ml) po dobu 48 a 72 hod. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT). * = Štatisticky významná zmena, hladina významnosti $p = 0,05$.

Po pôsobení tumor nekrotizujúceho faktoru alfa v rámci 48 hodín došlo k zníženiu expresie TJP1 génu, okrem pôsobenia s koncentráciou 20 ng/ml, kedy došlo k miernemu zvýšeniu expresie. K štatisticky významnej zmene nedošlo. 72 hodinová doba pôsobenia spôsobila vo všetkých testovaných koncentráciách výrazný nárast expresie génu TJP1, štatisticky významný bol v prípade pôsobenia s koncentráciou 20 ng/ml (graf 2).



Graf 2: Expresia génu TJP1 po pôsobení TNF- α na bunkovú líniu Caco-2 po 48 a 72 h. Graf vyjadruje expresiu génu TJP1 po pôsobení TNF- α . Bunky boli vysiate v koncentrácii 500 000 buniek na jamku a inkubované s rastúcou koncentráciou TNF- α (1 ng/ml – 50 ng/ml) po dobu 48 a 72 hod. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT). * = Štatisticky významná zmena, hladina významnosti $p = 0,05$.

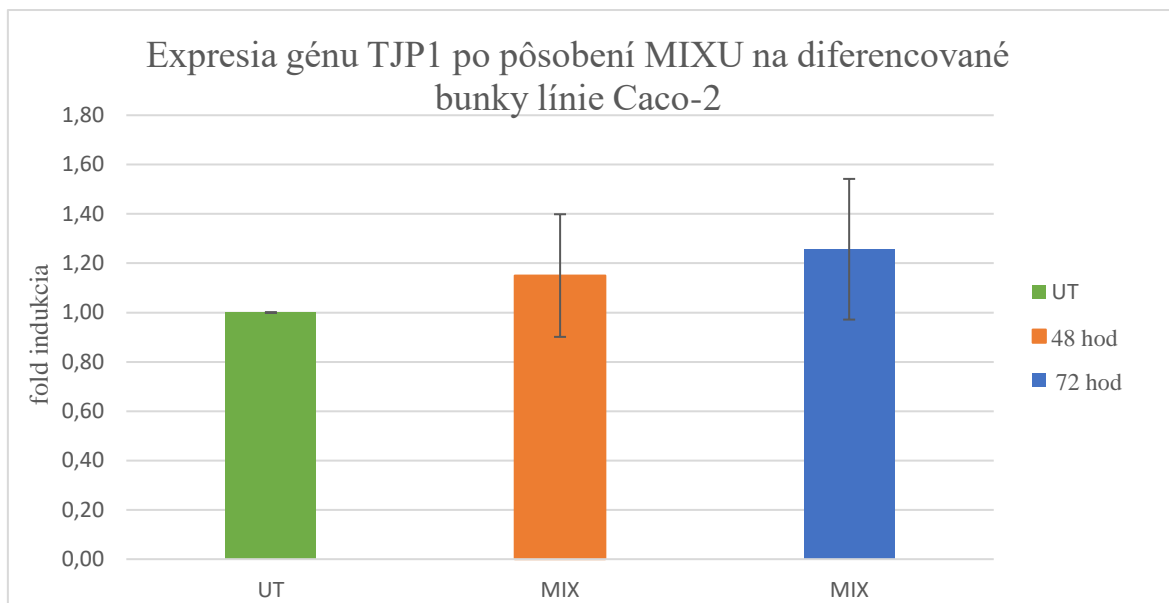
Po pôsobení interleukínu-1 β počas 48 hodín došlo k zvýšeniu expresie pri všetkých testovaných koncentráciách. 72 hodinové pôsobenie taktiež vyvolalo zvýšenie expresie, okrem koncentrácie 50 ng/ml, pri ktorej oproti 48 h pôsobeniu došlo k miernemu poklesu expresie oproti negatívnej kontrole (Graf 3). Štatisticky významnú zmenu nevyvolala žiadna z testovaných koncentrácií.



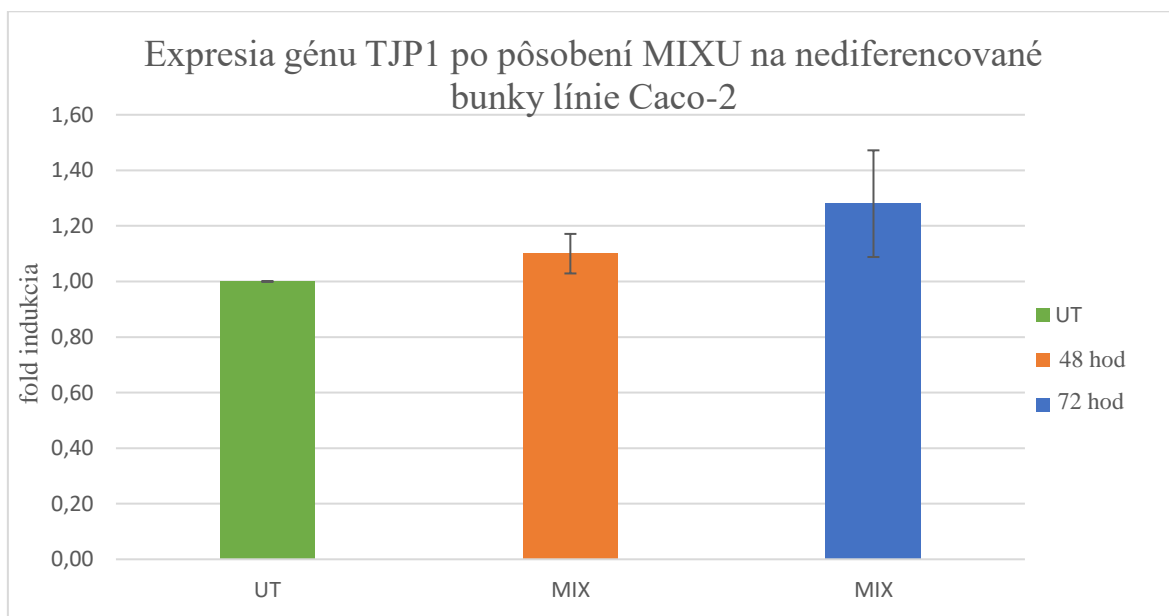
Graf 3: Expressia génu TJP1 po pôsobení IL-1β na bunkovú líniu Caco-2 po 48 a 72 h. Graf vyjadruje expresiu génu TJP1 po pôsobení IL-1β. Bunky boli vysiate v koncentrácii 500 000 buniek na jamku a inkubované s rastúcou koncentráciou IL-1β (1 ng/ml – 50 ng/ml) po dobu 48 a 72 hod. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT). * = Štatisticky signifikantná zmena, hladina významnosti $p = 0,05$.

Ďalej bola pozorovaná expresia génov v diferencovaných a nediferencovaných bunkách línie Caco-2, na ktoré bolo pôsobené zmesou zápalových faktorov LPS, TNF- α a IL-1β. Diferenciácia buniek prebiehala po dobu 21 dní v inkubátore (pri teplote 37 °C a atmosfére 5% CO₂) s výmenou média každé 3 až 4 dni, diferencované bunky boli využité iba pre testovanie vplyvu zmesi zápalových faktorov na expresiu jednotlivých génov. Po 21 dňoch boli na diferencované bunky aplikované testované látky.

Expressia génu TJP1 v diferencovaných a nediferencovaných bunkách po pôsobení zmesi zápalových faktorov vo vybraných koncentráciách, LPS 100 ng/ml, TNF- α 50 ng/ml, IL-1β 50 ng/ml, a dobách pôsobenia 48 a 72 h, bola takmer rovnaká (graf 4 a 5). V oboch prípadoch dochádzalo so zvyšujúcou sa dobou pôsobenia k zvýšeniu expresie TJP1 génu. Štatisticky však toto zvýšenie ani v jednom prípade nebolo signifikantné.

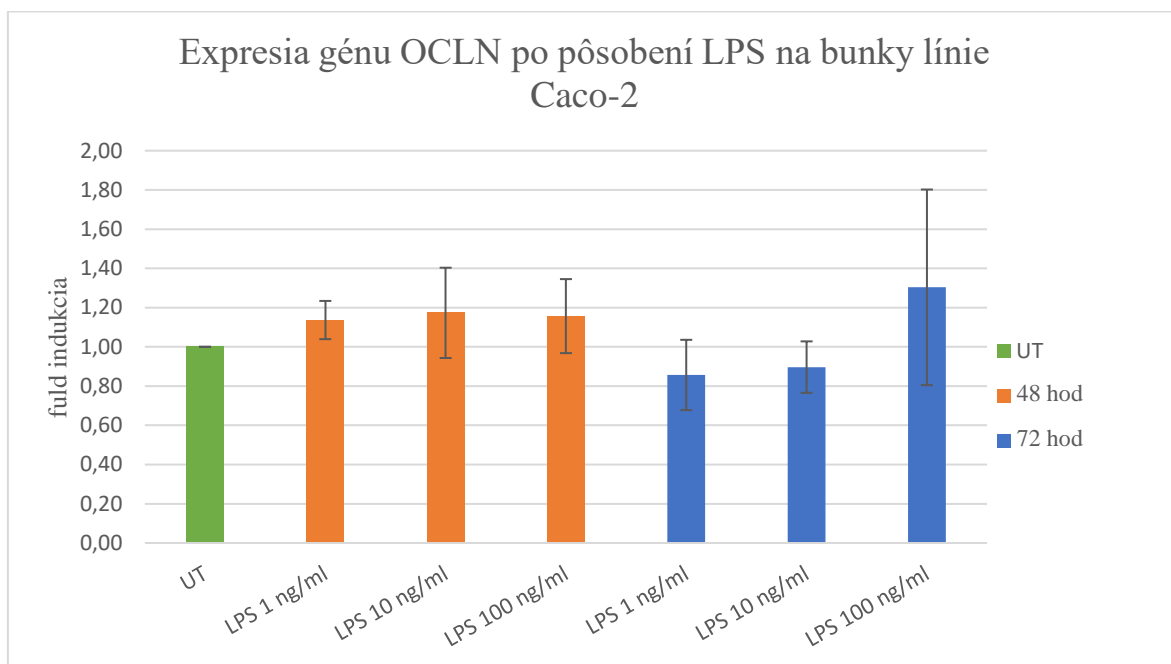


Graf 4: Expressia génu TJP1 po pôsobení MIXU na diferencované bunky línie Caco-2 po 48 a 72 h. Zloženie MIXU - LPS 100 ng/ml, TNF- α 50 ng/ml a IL-1 β 50 ng/ml. Graf vyjadruje expresiu génu TJP1 po pôsobení MIXU. Bunky boli vysiate v koncentrácii 100 000 buniek na jamku a inkubované po dobu 48 a 72 hod. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT). * = Štatisticky významná zmena, hladina významnosti $p = 0,05$.



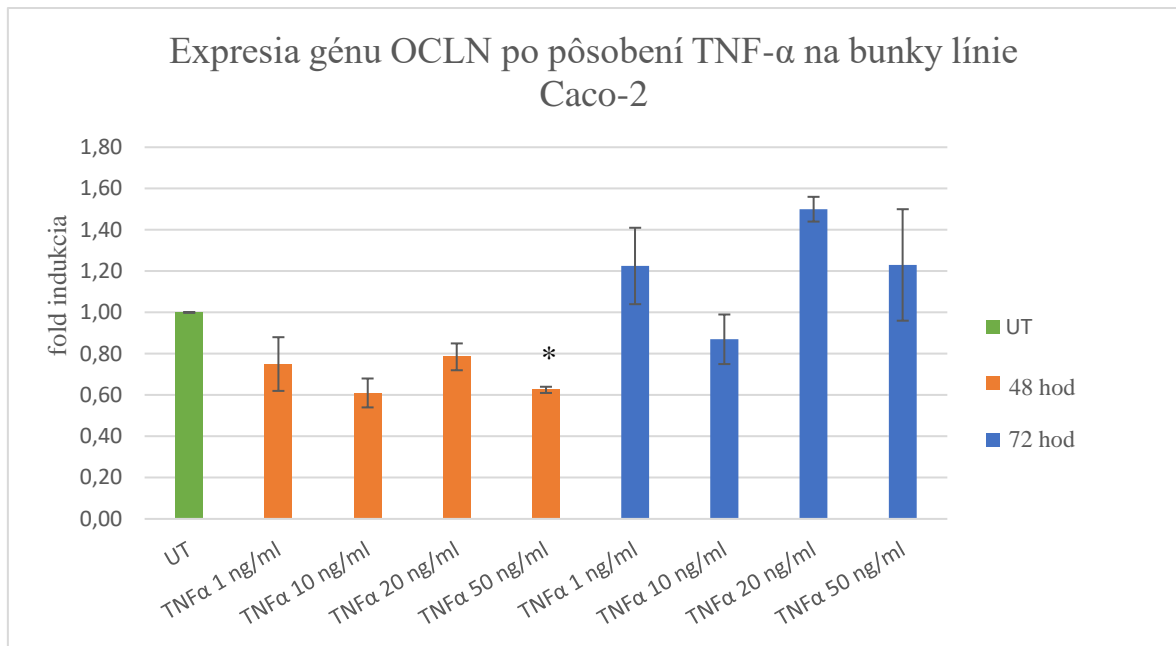
Graf 5: Expressia génu TJP1 po pôsobení MIXU na nediferencované bunky línie Caco-2 po 48 a 72 h. Zloženie MIXU - LPS 100 ng/ml, TNF- α 50 ng/ml a IL-1 β 50 ng/ml. Graf vyjadruje expresiu génu TJP1 po pôsobení MIXU. Bunky boli vysiate v koncentrácii 100 000 buniek na jamku a inkubované po dobu 48 a 72 hod. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT). * = Štatisticky významná zmena, hladina významnosti $p = 0,05$.

Po pôsobení LPS, v expresii OCLN po 48 hodinách došlo k približne rovnakému zvýšeniu expresie pri všetkých testovaných koncentráciach. Toto zvýšenie nebolo štatisticky signifikantné. Po 72 hodinách došlo k nesignifikantnému zníženiu expresie po pôsobení LPS s koncentráciou 1 a 10 ng/ml. Koncentrácia 100 ng/ml zase spôsobila štatisticky nesignifikantné zvýšenie expresie (graf 6).



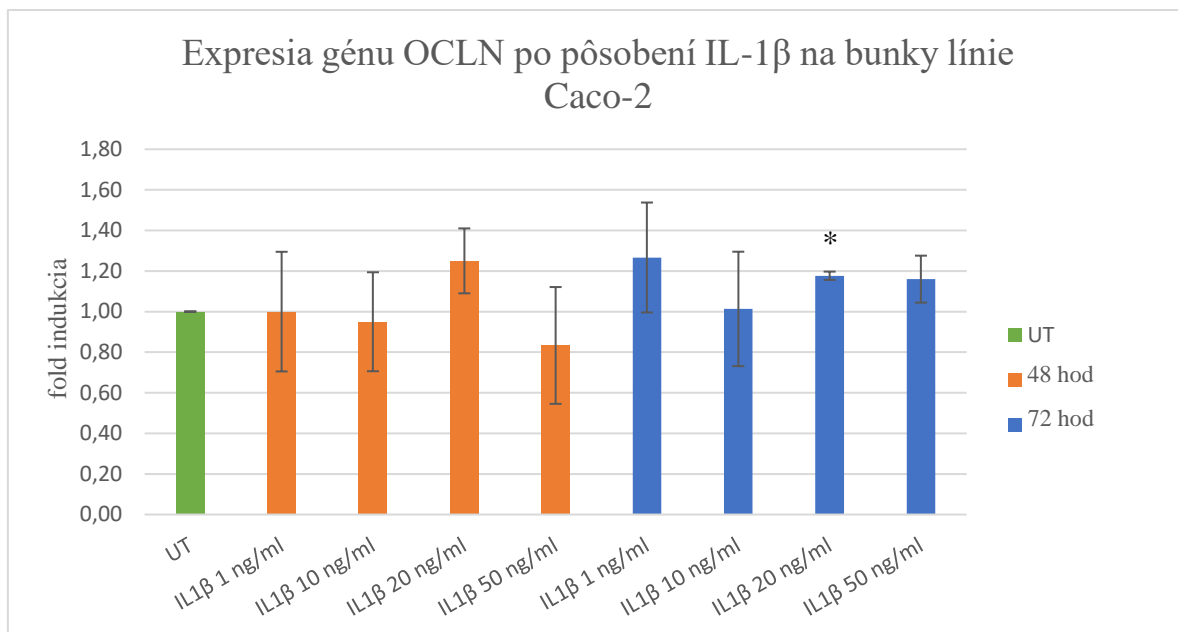
Graf 6: Expresia génu OCLN po pôsobení LPS na bunkovú líniu Caco-2 po 48 a 72 h. Graf vyjadruje expresiu génu OCLN po pôsobení LPS. Bunky boli vysiate v koncentrácii 500 000 buniek na jamku a inkubované s rastúcou koncentráciou LPS (1 ng/ml – 100 ng/ml) po dobu 48 a 72 hod. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT). * = Štatisticky signifikantná zmena, hladina významnosti $p = 0,05$.

Pôsobenie TNF- α , v expresii génu OCLN, po 48 hodinách vo všetkých testovaných koncentráciach, vyvolalo štatisticky nesignifikantné zníženie expresie génu OCLN, okrem koncentrácie 50 ng/ml, pri ktorej došlo k štatisticky významnej zmene. Po 72 hodinách došlo oproti 48 h k zvýšeniu expresie a to aj voči negatívnej kontrole, jedine koncentrácia 10 ng/ml nevyvolala zvýšenie až nad hodnotu negatívnej kontroly. Štatisticky signifikantnú zmenu nenavodila po 72 hodinách žiadna z testovaných koncentrácií (graf 7).



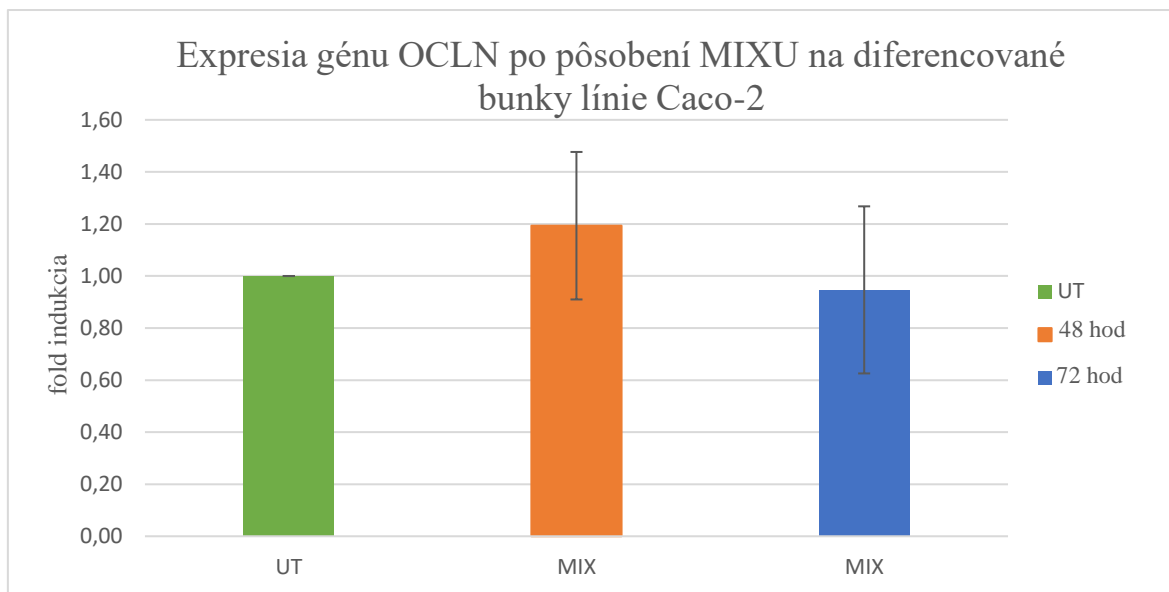
Graf 7: Expresia génu OCLN po pôsobení TNF- α na bunkovú líniu Caco-2 po 48 a 72 h. Graf vyjadruje expresiu génu OCLN po pôsobení TNF- α . Bunky boli vysiate v koncentrácii 500 000 buniek na jamku a inkubované s rastúcou koncentráciou TNF- α (1 ng/ml – 50 ng/ml) po dobu 48 a 72 hod. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT). * = Štatisticky významná zmena, hladina významnosti $p = 0,05$.

Po pôsobení zápalového faktoru IL-1 β po 48 h najväčšie zvýšenie vyvolala koncentrácia 20 ng/ml, no žiadna zmena v expresii génu OCLN navodená IL-1 β nebola štatisticky významná. Po 72 hodinách došlo k zvýšeniu expresie oproti negatívnej kontrole po pôsobení všetkých testovaných koncentrácií. Štatisticky významné zvýšenie navodila len koncentrácia 20 ng/ml (graf 8).

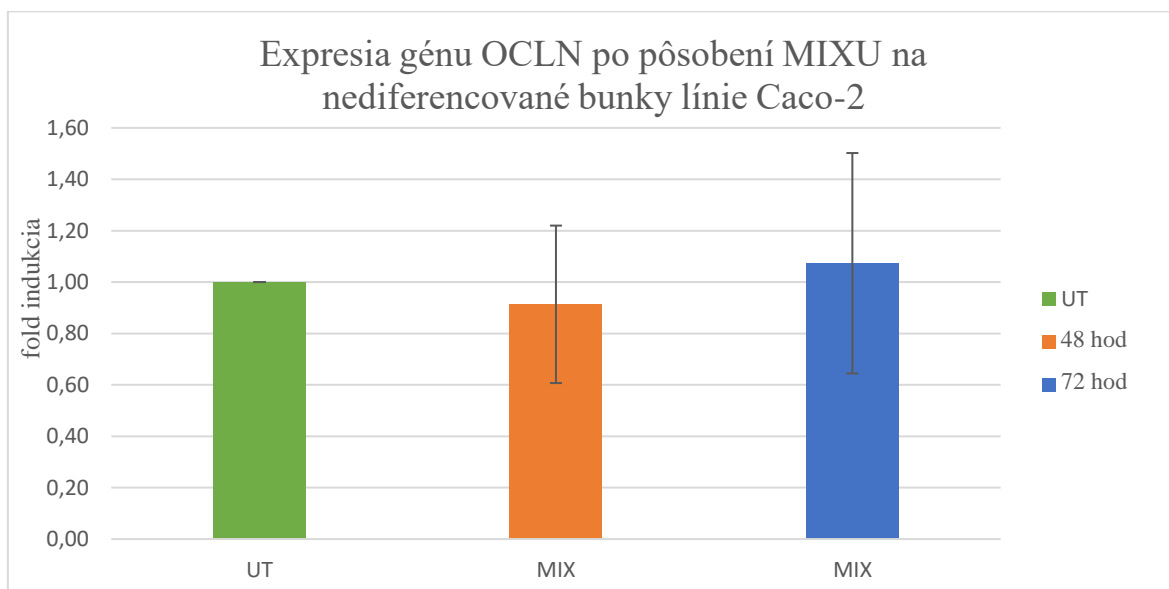


Graf 8: Expresia génu OCLN po pôsobení IL-1 β na bunkovú líniu Caco-2 po 48 a 72 h. Graf vyjadruje expresiu génu OCLN po pôsobení IL-1 β . Bunky boli vysiate v koncentrácii 500 000 buniek na jamku a inkubované s rastúcou koncentráciou IL-1 β (1 ng/ml – 50 ng/ml) po dobu 48 a 72 hod. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT). * = Štatisticky významná zmena, hladina významnosti $p = 0,05$.

Expresia génu OCLN v diferencovaných a nediferencovaných bunkách po pôsobení zmesi zápalových faktorov nebola štatisticky významne zmenená. V diferencovaných bunkách navodila zmes po 48 hodinách pôsobenia zvýšenie expresie OCLN génu a po 72 hodinách došlo k zníženiu oproti negatívnej kontrole. V nediferencovaných bunkách po 48 h došlo k zníženiu a po 72 h zase k zvýšeniu expresie oproti negatívnej kontrole (graf 9 a 10).

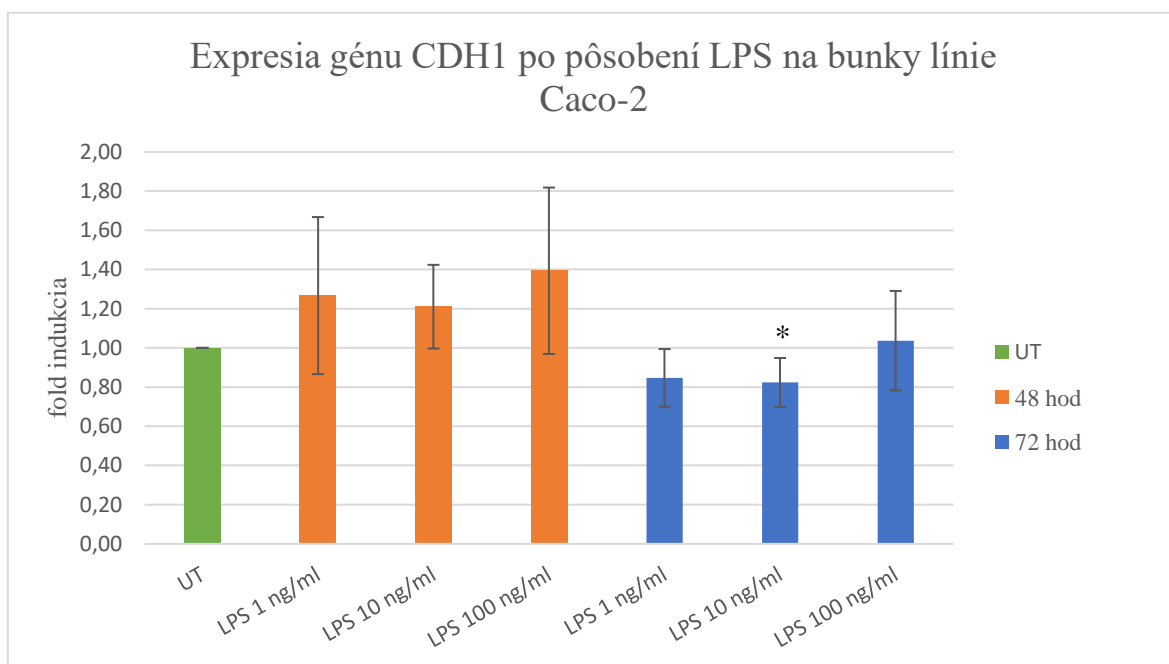


Graf 9: Expressia génu OCLN po pôsobení MIXU na diferencované bunky línie Caco-2 po 48 a 72 h. Zloženie MIXU - LPS 100 ng/ml, TNF- α 50 ng/ml a IL-1 β 50 ng/ml. Graf vyjadruje expresiu génu OCLN po pôsobení MIXU. Bunky boli vysiate v koncentrácii 100 000 buniek na jamku a inkubované po dobu 48 a 72 hod. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT). * = Štatisticky významná zmena, hladina významnosti $p = 0,05$.



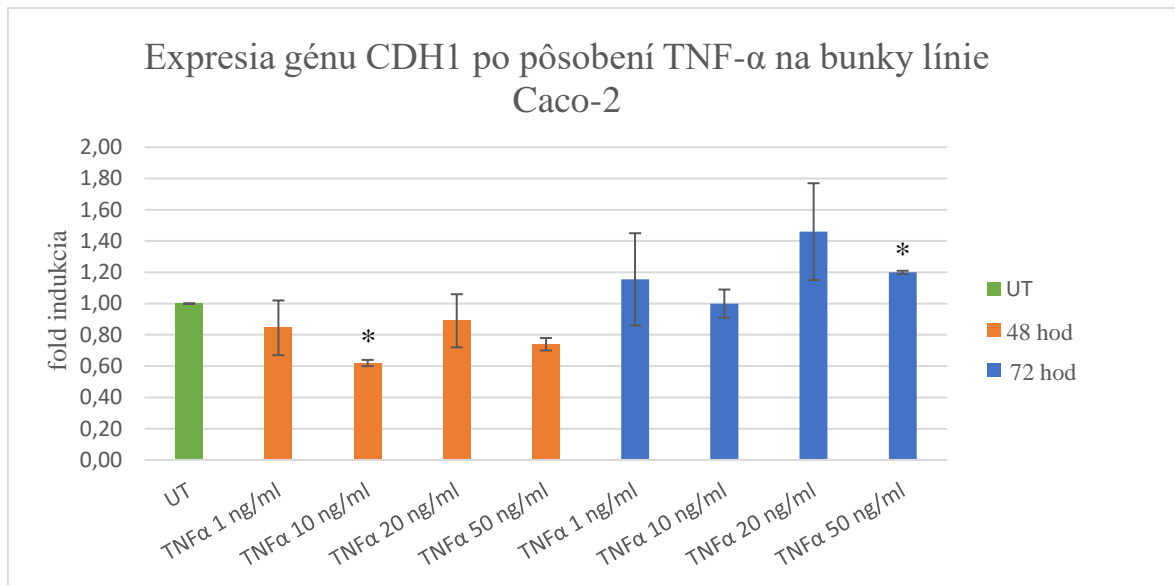
Graf 10: Expressia génu OCLN po pôsobení MIXU na nediferencované bunky línie Caco-2 po 48 a 72 h. Zloženie MIXU - LPS 100 ng/ml, TNF- α 50 ng/ml a IL-1 β 50 ng/ml. Graf vyjadruje expresiu génu OCLN po pôsobení MIXU. Bunky boli vysiate v koncentrácii 100 000 buniek na jamku a inkubované po dobu 48 a 72 hod. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT). * = Štatisticky významná zmena, hladina významnosti $p = 0,05$.

Expresia génu CDH1 po pôsobení LPS po dobu 48 hodín bola výrazne zvýšená, štatisticky bolo toto zvýšenie nesignifikantné pre všetky testované koncentrácie. Pôsobenie koncentracii 1 ng/ml a 10 ng/ml po 72 hodinách vyvolalo zníženie expresie CDH1 génu oproti negatívnej kontrole. Pôsobenie LPS s koncentráciou 100 ng/ml počas 72 h spôsobilo mierne zvýšenie expresie oproti negatívnej kontrole, štatisticky signifikantné zníženie, o 18 %, vyvolala koncentrácia 10 ng/ml. (graf 11).



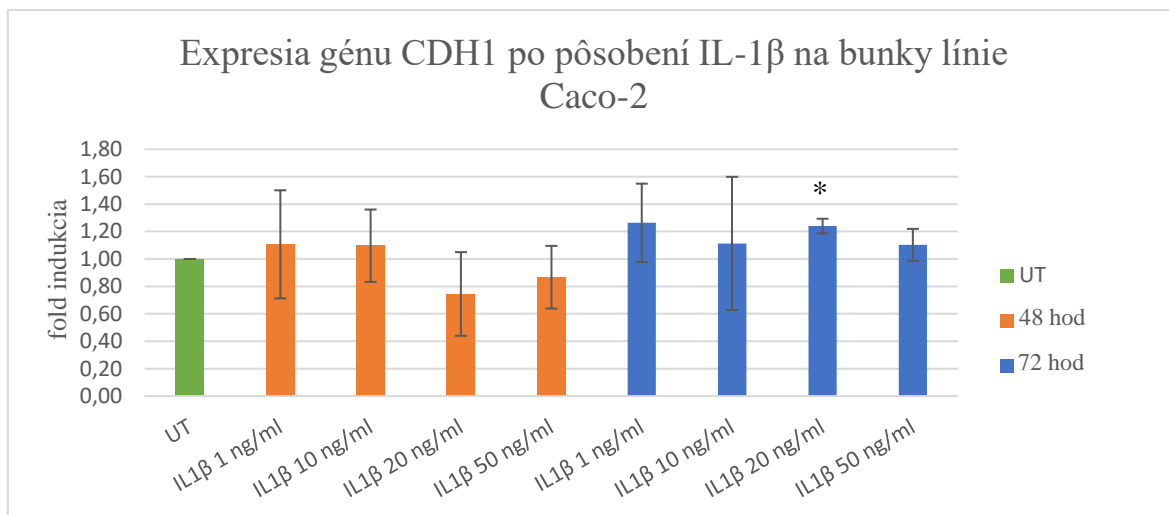
Graf 11: Expressia génu CDH1 po pôsobení LPS na bunkovú líniu Caco-2 po 48 a 72 h. Graf vyjadruje expresiu génu CDH1 po pôsobení LPS. Bunky boli vysiate v koncentrácii 500 000 buniek na jamku a inkubované s rastúcou koncentráciou LPS (1 ng/ml – 100 ng/ml) po dobu 48 a 72 hod. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT). * = Štatisticky signifikantná zmena, hladina významnosti $p = 0,05$.

Pôsobenie TNF- α po 48 hodinách vyvolalo vo všetkých testovaných koncentráciách zníženie expresie génu CDH1, k štatisticky signifikantnému zníženiu, o 38 %, došlo po pôsobení koncentrácie 10 ng/ml. Po 72 h došlo oproti negatívnej kontrole k zvýšeniu expresie CDH1, štatisticky signifikantnú zmenu vyvolala koncentrácia 50 ng/ml (graf 12).



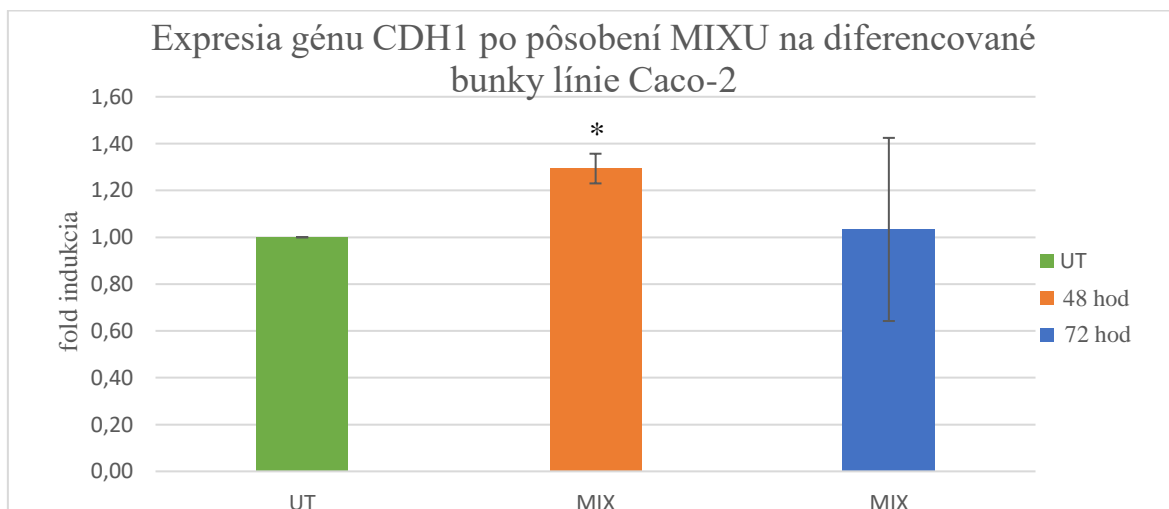
Graf 12: Expresia génu CDH1 po pôsobení TNF- α na bunkovú líniu Caco-2 po 48 a 72 h. Graf vyjadruje expresiu génu CDH1 po pôsobení TNF- α . Bunky boli vysiate v koncentrácii 500 000 buniek na jamku a inkubované s rastúcou koncentráciou TNF- α (1 ng/ml – 50 ng/ml) po dobu 48 a 72 hod. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT). * = Štatisticky signifikantná zmena, hladina významnosti $p = 0,05$.

Po pôsobení IL-1 β , s koncentráciami 20 a 50 ng/ml, na expresiu CDH1, došlo k štatisticky nesignifikantnému zníženiu expresie po 48 h. Všetky koncentrácie počas 72 hodinového pôsobenia a koncentrácie 1 a 10 ng/ml počas 48 hodinového pôsobenia vyvolali zvýšenie expresie oproti negatívnej kontrole, z čoho signifikantné zvýšenie vyvolalo pôsobenie IL-1 β s koncentráciou 20 ng/ml po 72 h.

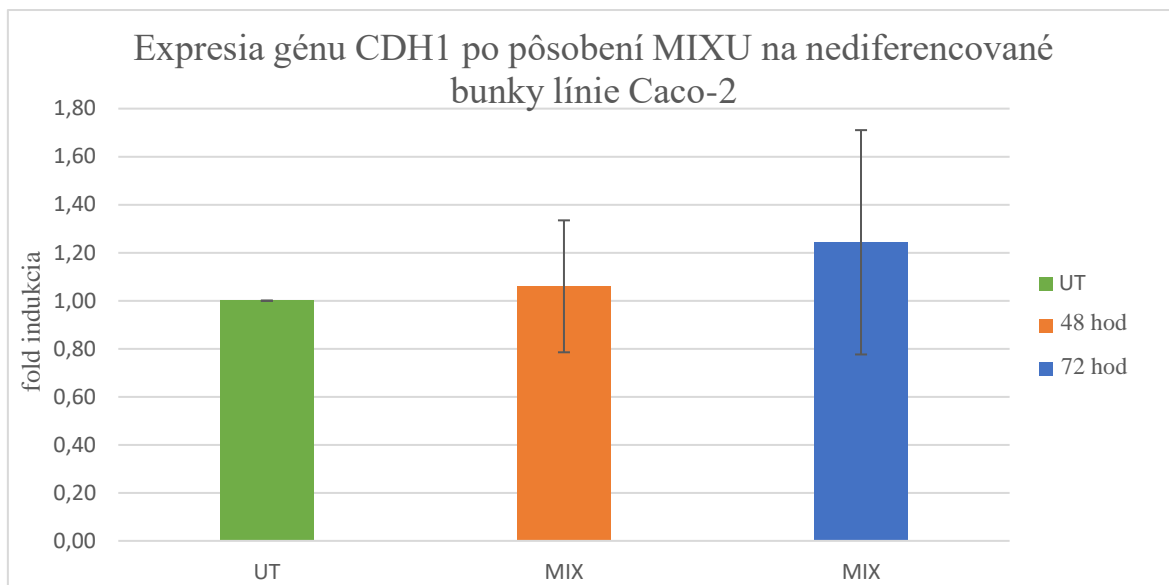


Graf 13: Expressia génu CDH1 po pôsobení IL-1β na bunkovú líniu Caco-2 po 48 a 72 h. Graf vyjadruje expresiu génu CDH1 po pôsobení IL-1β. Bunky boli vysiate v koncentrácii 500 000 buniek na jamku a inkubované s rastúcou koncentráciou IL-1β (1 ng/ml – 50 ng/ml) po dobu 48 a 72 hod. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT). * = Štatisticky významná zmena, hladina významnosti $p = 0,05$.

V diferencovaných bunkách došlo po 48 h pôsobenia zmesi zápalových faktorov k štatisticky významnému zvýšeniu expresie génu CDH1. Nesignifikantné zvýšenie expresie navodila zmes zápalových faktorov v diferencovaných bunkách po 72 hodinovom pôsobení a taktiež v nediferencovaných bunkách v oboch dobách pôsobenia (Graf 14 a 15).

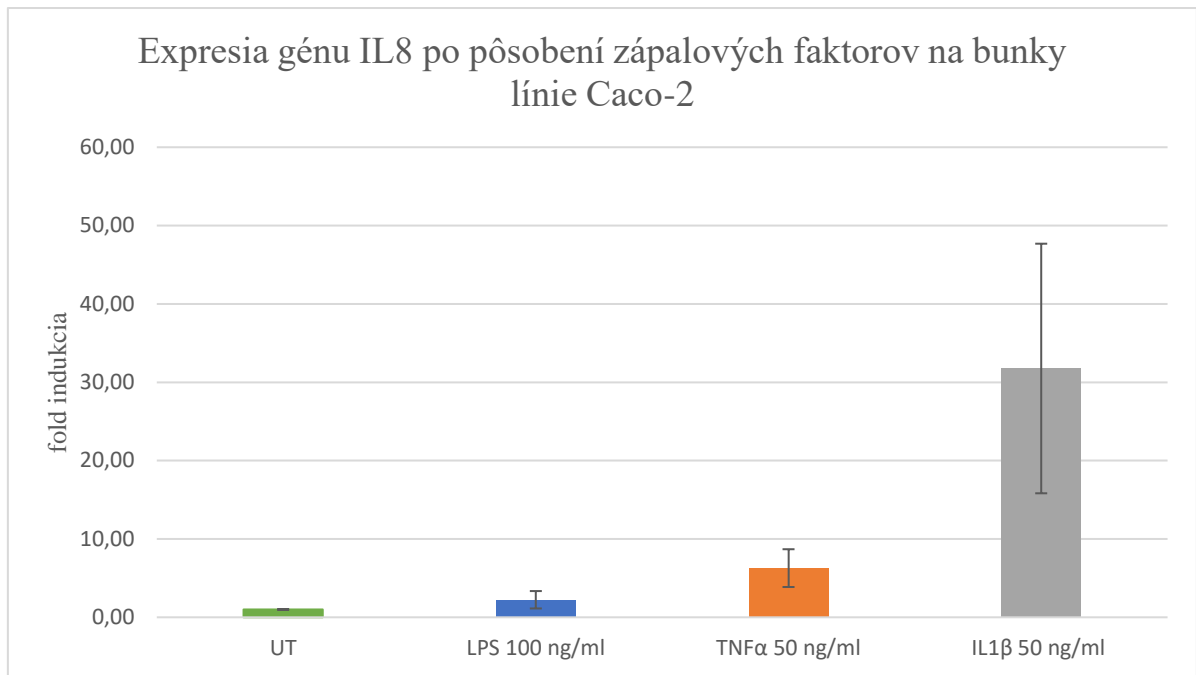


Graf 14: Expressia génu CDH1 po pôsobení MIXU na diferencované bunky línie Caco-2 po 48 a 72 h. Zloženie MIXU - LPS 100 ng/ml, TNF- α 50 ng/ml a IL-1β 50 ng/ml. Graf vyjadruje expresiu génu CDH1 po pôsobení MIXU. Bunky boli vysiate v koncentrácii 100 000 buniek na jamku a inkubované po dobu 48 a 72 hod. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT). * = Štatisticky významná zmena, hladina významnosti $p = 0,05$.



Graf 15: Expresia génu CDH1 po pôsobení MIXU na nediferencované bunky línie Caco-2 po 48 a 72 h. Zloženie MIXU - LPS 100 ng/ml, TNF- α 50 ng/ml a IL-1 β 50 ng/ml. Graf vyjadruje expresiu génu CDH1 po pôsobení MIXU. Bunky boli vysiate v koncentrácii 100 000 buniek na jamku a inkubované po dobu 48 a 72 hod. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT). * = Štatisticky významná zmena, hladina významnosti $p = 0,05$.

Pre overenie, že sa skutočne podarilo navodiť v bunkách Caco-2 pôsobením zápalových faktorov zápal, bola meraná expresia génu IL-8. Pre toto meranie boli použité vzorky vytvorené z buniek, z troch nezávislých experimentov, na ktoré bolo pôsobené zápalovými faktormi po dobu 72 h v najvyšších pripravených koncentráciách (LPS 100 ng/ml, TNF- α 50 ng/ml, IL-1 β 50 ng/ml). Expresia génu IL-8 bola zvýšená pre pôsobenie všetkými zápalovými faktormi, z čoho vyplýva, že v bunkách bol navodený zápal, pričom IL-1 β zvýšila expresiu IL-8 najvýraznejšie (graf 16).



Graf 16: Expresia génu IL-8 po pôsobení zápalových faktorov (LPS 100 ng/ml, TNF- α 50 ng/ml, IL-1 β 50 ng/ml) na bunky Caco-2 po dobu 72 h. Výsledky sú priemerom hodnôt relatívnej indukcie expresie troch nezávislých experimentov voči negatívnej kontrole (untreated, UT).

6 DISKUSIA

V rámci tejto diplomovej práce bola sledovaná expresia bariérových génov TJP1, OCLN a CDH1, v bunkách adherentnej bunkovej línie Caco-2 odvodenej od ľudského kolorektálneho adenokarcinómu, na ktoré bolo pôsobené zápalovými faktormi v rôznych koncentráciách a dobách pôsobenia 48 a 72 h.

Pri testovaní vplyvu zápalového faktoru LPS, ktorý je súčasťou vonkajšej membrány gram-negatívnych baktérii, v koncentráciách 1 ng/ml, 10 ng/ml a 100 ng/ml, bol predpoklad, že dôjde k zníženiu expresie bariérových génov. Tento predpoklad sa ani u jedného zo sledovaných génov nepotvrdil, v sledovaných koncentráciách a časoch pôsobenia došlo k zvýšeniu expresie oproti negatívnej kontrole. Štatisticky významnú zmenu pôsobenie LPS nevyvolalo. V práci Huang a kol. (2020) bol meraný vplyv LPS na expresiu génov TJP1 a OCLN, kde došlo k významnému poklesu v expresii týchto génov po 24 h, v práci však nebolo uvedené aká koncentrácia roztoku LPS bola použitá. V štúdiu Gori a kol., (2020) boli bunky vystavené pôsobeniu LPS s koncentráciou 0,001 ng/ml po dobu 24 h, v práci bola sledovaná expresia génov TJP1 a CDH1, pre gén CDH1 došlo k zvýšeniu expresie, avšak táto zmena nebola významná, expresia génu TJP1 nebola ovplyvnená.

Predpoklad zníženia expresie pozorovaných génov bol aj pri testovaní zápalového faktoru TNF- α , cytokín zapojený do regulácie zápalu, v koncentráciách 1 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml a 50 ng/ml. Po 48 hodinách došlo pri všetkých testovaných koncentráciách k zníženiu expresie pozorovaných génov. Po 72 hodinách došlo vo všetkých prípadoch k zvýšeniu expresie oproti 48 hodinovému pôsobeniu a vo väčšine prípadov došlo k zvýšeniu expresie aj voči negatívnej kontrole. V práci Cui a kol., (2010) bola pomocou qRT-PCR meraná expresia OCLN génu po vystavení TNF- α v koncentráciách 10 a 100 ng/ml po dobu 4, 8, 16 a 24 h a výsledkom bolo, že TNF- α nemal na expresiu okludínu vplyv. V práci Yi a kol., (2009) bolo zistené pomocou metódy western blot, že koncentrácia TNF- α 10 ng/ml, spôsobuje zníženie expresie génu CDH1.

Pôsobenie IL-1 β , pro-zápalový cytokín, taktiež nepotvrdilo očakávané zníženie expresie sledovaných génov. Vo väčšine prípadov opäť došlo k zvýšeniu expresie oproti negatívnej kontrole, alebo ostala nezmenená. Zmeny expresie vyvolané týmto zápalovým faktorom boli vo väčšine prípadov nesignifikantné, V práci Zhai a kol., (2019)

merali expresiu génov TJP1 a OCLN po aplikácii IL-1 β s koncentráciou 10 ng/ml na 36 h a výsledky ukázali, že nedošlo k signifikantnej zmene.

Využitie zmesi zápalových faktorov nevyvolalo žiadne signifikantné zmeny expresie pozorovaných génov ani v prípade diferencovaných ani v prípade nediferencovaných buniek, okrem 48 hodinového pôsobenia zmesi na diferencované bunky v rámci génu CDH1, u ktorého došlo k štatisticky signifikantnému zvýšeniu expresie. V tejto diplomovej práci bola použitá zmes zápalových faktorov LPS, TNF- α a IL-1 β . Väčšina štúdií bola zameraná na vplyv kombinácie cytokínov TNF- α a IFN- γ na expresiu bariérových génov (Lechunga, a kol., 2023). V práci Xu a kol., 2021 bola testovaná kombinácia zápalových faktorov IFN- γ , TNF- α , a IL-1 β s koncentráciou 20 ng/ml pre každý z nich, a bol zaznamenaný pokles expresie CDH1 génu, toto meranie však prebehlo na črevných organoidoch (CD 3-D colonoids), a preto nie je možné s určitosťou potvrdiť, že by došlo k rovnakému efektu aj v tradičných bunkových líniiach.

Vzhľadom na to, že spomínané štúdie merali expresiu génov zväčša po 24 hodinách od vystavenia zápalovému faktoru, nie je možné objektívne porovnať aký efekt majú zápalové faktory na expresiu sledovaných génov po 48 a 72 hodinách. Nenaplnil sa ani predpoklad zníženia expresie génov po pôsobení jednotlivých zápalových faktorov. To, prečo nedochádzalo k zníženiu, ale naopak zvýšeniu, hoci väčšinou nesignifikantnému, zostalo neobjasnené. Dôvodov môže byť niekoľko, a preto aby bolo možné objektívne posúdiť vplyv zápalových faktorov na expresiu bariérových génov, by bol vhodný ďalší experiment s upravenými parametrami, podľa vyššie spomínaných štúdií. Vhodnými úpravami by mohlo byť, pre prípravu rôznych koncentrácií zápalových faktorov použiť neobohatené DMEM médium (Zhai, a kol, 2019), meranie expresie bariérových génov aj po 24 h, opakovanie experimentu aj na inej bunkovej línii, napr. T84 (Lechunga, a kol., 2023), do zmesi zápalových faktorov namiesto LPS použiť IFN- γ a v neposlednej rade otestovať pôsobenie jednotlivých zápalových faktorov na diferencovaných bunkách, ktoré sú pre štúdium expresie génov využívanéjšie.

7 ZÁVER

Cieľom diplomovej práce bolo zistiť vplyv zápalových faktorov na expresiu bariérových génov v črevnej bunkovej línii Caco-2. Hlavnou detekčnou metódou bola qRT-PCR, v rámci ktorej, bola okrem expresie génov TJP1, OCLN a CDH1 sledovaná aj expresia génu ACTB, ktorý slúžil ako housekeeping gén. Využívanými zápalovými faktormi boli LPS, TNF-a a IL-1B v rôznych koncentráciách, z ktorých väčšina nevyvolala signifikantnú zmenu. Štatisticky signifikantné zvýšenie expresie všetkých sledovaných génov bolo navodené iba po pôsobení zápalovými faktormi TNF-a s koncentráciou 20 ng/ml počas 48 h a IL-1B s koncentráciou 10 ng/ml počas 72 h. Preto nedochádzalo k signifikantným zmenám v expresii bariérových génov po navodení zápalu ostalo neobjasnené a malo by byť predmetom ďalšieho štúdia.

8 LITERATÚRA

Abraham, C., Abreu, M. T., a Turner, J. R. (2022). Pattern Recognition Receptor Signaling and Cytokine Networks in Microbial Defenses and Regulation of Intestinal Barriers: Implications for Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 162(6), 1602–1616.e6.

Andrews, C., McLean, M. H., a Durum, S. K. (2018). Cytokine Tuning of Intestinal Epithelial Function. *Frontiers in immunology*, 9, 1270.

Anim, S. J. (2020) Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*, 91(1), e13357.

Akira, S., Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 4: 499–511.

Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature reviews. Immunology*, 8(6), 411–420.

Azzouz, L. L., Sharma, S. (2023). *Physiology, Large Intestine*. StatPearls Publishing [online] [navštívené 15.3. 2024]

Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507857/>

Baumgart, D. C., a Sandborn, W. J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet*, 369(9573), 1641–1657.

Baumgart, D. C., a Sandborn W. J. (2012). Crohn's disease. *Lancet.* 380 (9853): 1590–605.

Berrebi, D., Maudinas, R., Hugot, J. P. (2003). Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut.* 52, 840–46.

Capaldo, C. T., a Nusrat, A. (2009). Cytokine regulation of tight junctions. *Biochimica et biophysica acta*, 1788(4), 864–871.

Carejido, M., Contreras, R. G., Flores-Benítez, D., Flores-Maldonado, C., Larre, I., Ruiz, A., Shoshani, L. (2007). New Diseases Derived or Associated with the Tight Junction. *Archives of Medical Research.* 38(5), 465-478. ISSN 0188-4409

Carlberg, C., Ulven, S. M., a Molnár, F. (2016). *Nutrigenomics*. Berlin, Germany: Springer.

- Cosnes, J. (2004). Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 18, 481–96.
- Cui, W., Li, L. X., Sun, C. M., Wen, Y., Zhou, Y., Dong, Y. L., a Liu, P. (2010). Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 43(4), 330–337.
- Cummings, J. R., Jewell, D. P. (2005). Clinical implications of infl ammatory bowel disease genetics on phenotype. *Infl amm Bowel Dis.* 11, 56–61.
- Čihák, R., (1988). *Anatomie 2.* 1. vydanie. Praha: Avicenum. ISBN 80-060-88.
- Davis, R.L., Kramarz, P., Bohlke, K., (2001). Measles-mumps-rubella and other measles-containing vaccines do not increase the risk for infl ammatory bowel disease: a case-control study from the Vaccine Safety Datalink project. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 155, 354–59.
- Duerr, R. H., Taylor, K. D., Brant, S. R., Rioux, J.D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., Steinhart, A. H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T., Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L. W., Kistner, E. O., Schumm, L. P., Lee, A. T., Gregersen, P. K., Barmada, M. M., Cho, J. H. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science.* 314(5804), 1461–1463.
- Encyclopedia Britannica. (2013). Structure of the human large intestine, rectum, and anus. [online] [navštívené 15.3. 2024] Dostupné z <https://www.britannica.com/science/large-intestine/images-videos>
- Engel, M. A., Neurath, M. F. (2010). New pathophysiological insights and modern treatment of IBD. *J. Gastroenterol.* 2010; 45: 571–583.
- Etchevers, M. J., Ordás, I., Ricart, E. (2010). Optimizing the us of tumour necrosis factor inhibitors in Crohn’s disease: a practical approach. *Drugs.* 70(2), 109–120.
- Farshori, P. a Kachar, B. (1999). Redistribution and phosphorylation of occludin during opening and resealing of tight junctions in cultured epithelial cells. *The Journal of membrane biology*, 170(2), 147–156.

- Fasano A. (2020). All disease begins in the (leaky) gut: role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases, *F1000Research*, 9.
- Feldman, G. J., Mullin, J. M., a Ryan, M. P. (2005). Occludin: structure, function and regulation. *Advanced drug delivery reviews*, 57(6), 883–917.
- Franchimont, D., Vermeire, S., El, H. H. (2004). Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*. 53, 987–92.
- Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., a Tsukita, S. (2001). Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *The Journal of cell biology*, 153(2), 263–272.
- Gabralec, L. (2009). Crohnova nemoc – klasifikace, diagnostika, léčba a kvalita života. *Interní medicína pro praxi*. 11(1), 16-20.
- Gaya, D. R., Russell, R. K., Nimmo, E. R., Satsangi, J. (2006). New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet*. 367, 1271–84.
- GBD 2017 Inflammatory Bowel Disease Collaborators (2020). The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: asystematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*, 5(1), 17–30.
- Gent, A. E., Hellier, M. D., Grace, R. H., Swarbrick, E. T., Coggon, D. (1994). Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet*. 343, 766–67.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A. (2003) Nod1 detects a unique muropeptide from gram negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 300, 1584–87.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J. (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 278, 8869–72.
- Goebel, S., Huang, M., Davis, W. C. (2006). VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 290, G648–54.

Gori, M., Altomare, A., Cocca, S., Solida, E., Ribolsi, M., Carotti, S., Rainer, A., Francesconi, M., Morini, S., Cicala, M., a Guarino, M. P. L. (2020). Palmitic Acid Affects Intestinal Epithelial Barrier Integrity and Permeability In Vitro. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 9(5), 417.

Graham, W. V., Wang, F., Clayburgh, D. R., Cheng, J. X., Yoon, B., Wang, Y., Lin, A., a Turner, J. R. (2006). Tumor necrosis factor-induced long myosin light chain kinase transcription is regulated by differentiation-dependent signaling events. Characterization of the human long myosin light chain kinase promoter. *The Journal of biological chemistry*, 281(36), 26205–26215.

Gros, B., Kaplan, G.G. (2023). Ulcerative colitis in Adults: A Review. *JAMA* 330 (10), 951-965.

Groschwitz, K. R., a Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 124(1), 3–22.

Günzel, D., a Yu, A. S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological reviews*, 93(2), 525–569.

Hampe, J., Heymann, K., Krawczak, M., a Schreiber S. (2003) Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure. *Int J Colorectal Dis*;;18, 413–17.

Hancock, R. E., Haney, E. F., Gill, E. E. (2016). The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nature reviews. Immunology*, 16(5), 321–334.

Huang, L., Cui, K., Mao, W., Du, Y., Yao, N., Li, Z., Zhao, H., a Ma, W. (2020). *Weissella cibaria* Attenuated LPS-Induced Dysfunction of Intestinal Epithelial Barrier in a Caco-2 Cell Monolayer Model. *Frontiers in microbiology*, 11, 2039.

Hugot, J. P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C. (1996). Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*. 379, 821–23.

Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol*. 4, 702-07.

- Charo, I. F, Ransohoff, R. M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 354, 610–21.
- Ina, K., Itoh, J., Fukushima, K., (1999). Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol.* 163, 1081–90.
- Ingram, J.R., Thomas, G.A., Rhodes, J. (2005). A randomized trial of nicotine enemas for active ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 3, 1107–14.
- Inohara, N., Nunez, G. (2003). NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol.* 3, 371–82.
- Jabandziev, P., Pinkasova, T., Kunovsky, L., Papez, J., Jouza, M., Karlinova, B., Novackova, M., Urik, M., Aulicka, S., Slaby, O., Bohosova, J., Bajero,va, K., Bajer, M., & Goel, A. (2020). Regional Incidence of Inflammatory Bowel Disease in a Czech Pediatric Population: 16 Years of Experience (2002-2017). *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 70(5), 586–592.
- Kahai, P., Mandiga, P., Wehrle, C. J. a spol. *Anatomy, Abdomen and Pelvis: Large Intestine.* StatPearls Publishing [online] [navštívené 15.3. 2024] Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470577/>
- Kaminsky, L. W., Al-Sadi, R., a Ma, T. Y. (2021). IL-1 β and the Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier. *Frontiers in immunology*, 12, 767456.
- Kaplan G. G. (2015). The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 12(12), 720–727.
- Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2017). Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 152(2), 313–321.
- Keshavarzian, A., Banan, A., Farhadi, A. (2003). Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 52, 720–28.

Kirkegaard, T., Hansen, A., Bruun, E., Brynskov, J. (2004). Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut*. 53, 701–09.

Ko, I. K., Kim, B. G., Awadallah, A., Mikulan, J., Lin, P., Letterio, J. J., & Dennis, J. E. (2010). Targeting improves MSC treatment of inflammatory bowel disease. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(7), 1365–1372.

Laukoetter, M. G., Bruewer, M., & Nusrat, A. (2006). Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Current opinion in gastroenterology*, 22(2), 85–89.

Leeb, S. N., Vogl, D., Gunckel, M. (2003). Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase. *Gastroenterology*. 125, 1341–54.

Lechuga, S., Braga-Neto, M. B., Naydenov, N. G., Rieder, F., & Ivanov, A. I. (2023). Understanding disruption of the gut barrier during inflammation: Should we abandon traditional epithelial cell lines and switch to intestinal organoids?. *Frontiers in immunology*, 14, 1108289.

Martin, B., Banz, A., Bienvenu, B. (2004). Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo. *J Immunol*. 172, 3391–98.

Martinon, F., Tschopp, J. (2005) NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol*. 26, 447–54.

Mawdsley, J. E., Rampton, D. S. (2005). Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*. 54, 1481–91.

McCormick, P., Manning, D. (2001). Chronic inflammatory bowel disease and the 'over-clean' environment: rarity in the Irish 'traveller' community. *Ir Med J*. 94, 203–04

McGrath, J., McDonald, J. W., Macdonald, J. K. (2004). Transdermal nicotine for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 4, CD004722.

Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., Kaplan, G.G. (2012).

Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142(1), 46–e30.

Mrsny, R. J., Brown, G. T., Gerner-Smidt, K., Buret, A. G., Meddings, J. B., Quan, C., Koval, M., a Nusrat, A. (2008). A key claudin extracellular loop domain is critical for epithelial barrier integrity. *The American journal of pathology*, 172(4), 905–915.

Muniz, L. R., Knops, C., a Yeretssian, G. (2012). Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Frontiers in immunology*, 3, 310.

Murphy, K. a Weaver, C. (2016). *Janeway's immunobiology*. Garland Science. 9, 1-924.

National Research Council, (2003). *Diagnosis and Control of Johne's Disease*. National Academies Press 6.

Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 390(10114), 2769–2778.

NIDDK, 2014 [online] [navštívené 28.1. 2024] Dostupné z <https://www.niddk.nih.gov/healthinformation/digestive-diseases/ulcerative-colitis>

NIDDK, 2019 [online] [navštívené 31.1. 2024] Dostupné z <https://www.niddk.nih.gov/health-information/digestive-diseases/crohns-disease/all-content>

Nikolaus, S., Schreiber, S. (2007). Diagnostics od inflammatory bowel disease. *Gastroenerology* 133 (5), 1670-1689.

Orholm, M., Binder V., Sorensen, T. I., Rasmussen, L. P., Kyvik, K. O. (2000). Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins: results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol*. 35, 1075–81.

Pelaseyed, T., Bergström, J. H., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Birchenough, G.M., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Nyström, E. E., Wising, C., Johansson, M. E., a Hansson, G. C. (2014). The mucus and mucins of the

goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological reviews*, 260(1), 8–20.

Pimentel, M., Chang, M., Chow, E. J., Tabibzadeh, S., Kirit-Kiriak, V., Targan, S. R., Lin, H. C. (2000). Identification of a prodromal period in Crohn's disease but not ulcerative colitis. *The American Journal of Gastroenterology*. 95 (12), 3458–62.

Petras, R. E., a Frankel, W. L. (2009). Large Intestine (Colon). *Modern Surgical Pathology*, 755-836.

Peyrin-Biroulet, L., Lémann, M. (2011). Review article: remission rates achievable by current therapies for infl ammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 33(8), 870–879.ñ

Prantera, C., Scribano, M. L. (2008). Which type of treatment is advisable in the prevention of recurrence after surgery in Crohn's disease? *Infl amm Bowel Dis*. S277–278.

Rao, J. N., Wang, J. Y. (2010). Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth. Morgan & Claypool Life Sciences. [online] [navštívené 15.3. 2024] Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54098/>

Rescigno M. (2011). The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends in immunology*, 32(6), 256–264.

Robertson, D. J., Sandler, R. S. (2001). Measles virus and Crohn's disease: a critical appraisal of the current literature. *Infl amm Bowel Dis*. 7, 51–57.

Roisin, R. R., Barbera, A. J. (2009). *Asthma and COPD*, 2. vydanie, Academic Press. s. 249-256, ISBN 9780123740014.

Rosenstiel, P., Fantini, M., Brautigam, K. (2003). TNF-alpha and IFNgamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124, 1001–09.

Ruder, B., Atreya, R., a Becker, C. (2019). Tumour Necrosis Factor Alpha in Intestinal Homeostasis and Gut Related Diseases. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1887.

- Russell, R. K., Satsangi, J. (2004). IBD: a family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18, 525–39.
- Salim, S. Y., & Söderholm, J. D. (2011). Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 17(1), 362–381.
- Soderholm, J. D., Olaison, G., Peterson, K. H. (2002). Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the noninflamed ileum of Crohn's disease. *Gut*. 50, 307–13.
- Strober, W., Murray, P. J., Kitani, A., Watanabe, F. (2006) Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*. 6, 9–19.
- Su, L., Nalle, S. C., Shen, L., Turner, E. S., Singh, G., Breskin, L. A., Khramtsova, E. A., Khramstova, G., Tsai, P., Fu, Y., Abraham, C., Turner, J. R. 2013. TNFR2 Activates MLCK-Dependent Tight Junction Dysregulation to Cause Apoptosis-Mediated Barrier Loss and Experimental Colitis. *Gastroenterology*. 145(2), 407-415. ISSN 0016-5085.
- Sugita, K., & Kabashima, K. (2020). Tight junctions in the development of asthma, chronic rhinosinusitis, atopic dermatitis, eosinophilic esophagitis, and inflammatory bowel diseases. *Journal of leukocyte biology*, 107(5), 749–762.
- Tan, W. C., Allan, R. N. (1993). Diffuse jejunoileitis of Crohn's disease. *Gut*. 34 (10), 1374–8.
- Theiss, A. L., Simmons, J. G., Jobin, C., Lund, P. K. (2005). Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J Biol Chem*. 280, 36 099–109.
- Thompson, N. P., Driscoll, R., Pounder, R. E., Wakefield, A. J. (1996). Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ*. 312, 95–96.
- Tsukita, S., & Furuse, M. (1998). Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 3(9), 569–573.

- Tsukita, S., & Furuse, M. (1999). Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players?. *Trends in cell biology*, 9(7), 268–273.
- Tysk, C., Lindberg, E., Järnerot, G., Floderus-Myrhed, B. (1988). Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut*. 29, 990–996.
- Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews. Immunology*. 9 (11), 799-809.
- Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L., Colombel, J. F. (2017). Ulcerative colitis. *Lancet* 38, 1756–1770.
- van de Wal, Y., Corazza, N., Allez, M., Mayer, L. F., Iijima, H., Ryan, M., Cornwall, S., Kaiserlian, D., Hershberg, R., Koezuka, Y., Colgan, S. P., & Blumberg, R. S. (2003). Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 124(5), 1420–1431.
- Van den Brande, J. M., Braat, H., van den Brink, G. R. (2003). Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 124, 1774–85.
- van der Sluis, M., De Koning, B. A., De Bruijn, A. C., Velcich, A., Meijerink, J. P., Van Goudoever, J. B., Büller, H. A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I. B., & Einerhand, A. W. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, 131(1), 117–129.
- van Heel, D. A., Fisher, S. A., Kirby, A., Daly, M. J., Rioux, J. D., Lewis, C. M. (2004). Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet*. 13, 763–70.
- Walmsley, R. S., Ayres, R. C., Pounder, R. E., Allan, R. N. (1998). A simple clinical colitis activity index. *Gut*. 43 (1), 29–32.
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 421, 384–88.

Williams, C. N., Kocher, K., Lander, E. S., Daly, M. J., Rioux, J. D. (2002). Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify a novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. *Inflamm Bowel Dis.* 8: 375–81.

Wolters, F. L., Russel, M. G. (2006). Sijbrandij J, et al. Phenotype at diagnosis predicts recurrence rates in Crohn's disease. *Gut.* 55, 1124–1130.

Xu, P., Elizalde, M., Masclee, A., Pierik, M., and Jonkers, D. (2021). Corticosteroid enhances epithelial barrier function in intestinal organoids derived from patients with Crohn's disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 99(6), 805–815.

Yi, J. Y., Jung, Y. J., Choi, S. S., and Chung, E. (2009). TNF- α downregulates E-cadherin and sensitizes response to γ -irradiation in Caco-2 cells. *Cancer research and treatment*, 41(3), 164–170.

Zhai, Z., Wang, J., Huang, B., and Yin, S. (2019). Low-fat yogurt alleviates the pro-inflammatory cytokine IL-1 β -induced intestinal epithelial barrier dysfunction. *Journal of dairy science*, 102(2), 976–984.