

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2016

Ondřej Janča

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Testování imunoreaktivního potenciálu nových
materiálů vyvíjených pro použití v ortopedii**

Bakalářská práce

Ondřej Janča

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: Dr. Ing. Eva Kriegová

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Dr. Ing. Evy Kriegové a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci 31. 7. 2016

.....

Ondřej Janča

Souhrn

Vzhledem k vzrůstající potřebě výzkumu a vývoje nových biomateriálů používaných k výrobě kloubních náhrad nejen v ortopedii byla tato práce zacílena na sledování vývoje metod pro testování imunoreaktivních vlastností těchto biokompatibilních materiálů. Cílem práce bylo posoudit využitelnost buněčné linie MUTZ-3 pro testování imunoreaktivity nově vyvíjených biomateriálů jako vhodnou alternativu k dosud používaným postupům testování na zvířecích modelech.

Teoretická část se zaměřuje na dosavadní postupy testování biokompatibility protetických materiálů se zvláštním zaměřením na testování imunoreaktivity. Shrnuje dříve užívané metody testování imunoreaktivity látek, současný vývoj etického hlediska experimentů na zvířecích modelech a poznatky o buněčné linii MUTZ-3 v tomto kontextu. Dále se teoretická část zabývá popisem imunologických principů, jež se účastní alergických reakcí na biokompatibilní materiály. Pozornost je věnována úloze dendritických buněk a chemokinů, které jsou klíčové pro navození imunitní reakce.

Praktická část shrnuje principy použitých metod, seznam použitého materiálu a vlastní postupy práce. Dále obsahuje samotné výsledky měření a diskuzi, která shrnuje závěry a poznatky dosažené v této práci.

Summary

Due to the increasing demand for research and development of new biomaterials used in the manufacture of joint replacements not only in orthopedics, this thesis was aimed at monitoring the development of methods for testing the immuno-reactive properties of these biocompatible materials. The aim was to assess the applicability of cell line MUTZ-3 for immunoreactivity testing of newly developed biomaterials as a suitable alternative to the currently used animal testing procedures.

The theoretical part focuses on existing procedures to test the biocompatibility of prosthetic materials with a special focus on testing immunoreactivity. It summarizes previously used methods for testing the immunoreactivity of substances, the current development of ethical aspects of animal testing and the knowledge of the cell line MUTZ-3 in this context. The theoretical part also describes immunological principles that are involved in allergic reactions to biocompatible materials. A special attention is paid to the role of dendritic cells and chemokines, which are crucial for inducing immune responses.

The practical part summarizes the principles of the methods used in this thesis, a list of used materials and the workflow itself. It also contains the actual measurement results and a discussion that summarizes the conclusions and findings obtained in this work.

Tímto děkuji především Dr. Ing. Evě Kriegové za odborné vedení, dále všemu personálu Laboratoře molekulární imunologie Ústavu imunologie LF UP se zvláštním poděkováním Ing. Regině Fillerové, Mgr. Anně Petráčkové a Mgr. Tereze Dýškové, Ph.D. za neocenitelné rady a pomoc, dále Mgr. Veronice Pivodové, Ph.D. za spolupráci a v neposlední řadě také mé rodině a Evě Křížkové za bezmeznou podporu.

Práce byla podpořena grantem IGA_LF UP_2016_011 a byla vypracována v Laboratoři molekulární imunologie Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Obsah

1. Úvod	1
2. Biomateriály v ortopedii	2
2.1. Protetické materiály	2
2.2. Testování nových biomateriálů	3
2.3. Testování cytotoxicity	3
2.4. Testování antimikrobních vlastností	3
2.5. Testování imunoreaktivity	5
2.5.1. Právní regulace testování na zvířatech	5
2.5.2. Maximalizační test na morčatech (GPMT)	5
2.5.3. Test lokálních lymfatických uzlin (LLNA)	6
2.5.4. Testování imunoreaktivity s využitím buněčných linií	7
2.6. Alergické reakce spojené s ortopedickými implantáty	8
2.6.1. Imunitní reakce IV. typu	8
2.6.2. Dendritické buňky	9
2.6.3. Toll-like receptory	10
2.6.4. Chemokiny	12
2.7. Studium genové exprese	14
3. Principy použitých metod	17
3.1. Kultivace	17
3.2. Izolace celkové RNA	18
3.3. Reverzní transkripce	19
3.4. Kvantitativní PCR	20
4. Cíle	21
5. Materiál a metodika	22
5.1. Použitý materiál	22
5.1.1. Biologický materiál	22
5.1.1. Testovaný materiál	22
5.1.2. Kultivace	23
5.1.3. Izolace celkové RNA	23
5.1.4. Reverzní transkripce	24
5.1.5. Kvantitativní PCR	25
5.2. Postup práce	25

5.3.	Kultivace	26
5.3.1.	Kultivace buněčné linie 5637	26
5.3.2.	Kultivace buněčné linie MUTZ-3	27
5.3.3.	Příprava zásobních roztoků stimulačních látek a extraktů	28
5.3.4.	Kultivace buněčné linie MUTZ-3 s testovaným materiálem.....	29
5.4.	Izolace celkové RNA	30
5.5.	Reverzní transkripce	31
5.6.	Kvantitativní PCR.....	33
6.	Výsledky.....	34
6.1.	Doba kultivace	34
6.2.	Stimulační látka	34
6.3.	Výběr formy zkoumaného materiálu	37
6.4.	Zkoumané geny.....	40
7.	Diskuze	43
8.	Závěr.....	45
9.	Přehled použité literatury.....	46
10.	Seznam použitých zkratk	49

1. Úvod

Ve světle dnešních pokročilých molekulárně-biologických metod probíhá hledání plnohodnotných alternativ k testování na zvířatech. Zvláště testy imunoreaktivity látek byly dlouhou dobu výlučně doménou testování na zvířatech, jelikož neexistovala metoda, která by dokázala dostatečně věrně napodobit či zastoupit podmínky *in vivo*. Původně používaný Guinea Pig Maximisation Test byl prováděn ryze na zvířecím modelu. Local Lymph Node Assay byl prováděn částečně pomocí molekulárně-biologických metod, avšak stále vyžadoval usmrcení použitých zvířat. V současnosti došlo k rozvoji testovacích metod na buněčných kulturách, které mají potenciál zcela nahradit zvířecí modely v laboratořích. Pro testování imunoreaktivity se jeví jako nejslibnější buněčná linie MUTZ-3, která je využita i v této práci.

Testování imunoreaktivity je klíčové nejen při výrobě chemikálií, kosmetických přípravků a vůbec všech látek, s nimiž přichází lidské tělo do kontaktu, ale především při vývoji nových biomateriálů, zvláště v ortopedii.

Imunoreaktivní biomateriál vyvolává v organismu imunitní reakci IV. typu, jíž se účastní mimo jiné také dendritické buňky. Tyto buňky rozpoznávají antigen a zprostředkovávají jej ostatním buňkám účastnícím se imunitní reakce. Vzhledem k tomu, že jsou dendritické buňky na začátku celé imunitní kaskády a bez jejich správné reakce na antigen nebude imunitní odpověď navozena, jsou nejvhodnějším modelem celé reakce.

Metoda testování pomocí buněčné linie MUTZ-3 je založena na zkoumání expresního profilu genů kódujících proteiny, které se účastní imunitní reakce. Těmito proteiny mohou být například Toll-like receptory, které zprostředkovávají rozpoznání antigenu, chemokiny, buněčné hormony zodpovědné za chemotaxi imunitních buněk a podobně.

Tato práce se zabývá zavedením metody testování imunoreaktivity pomocí buněčné linie MUTZ-3 a její optimalizací. Bylo použito několik různých forem testovaného materiálu, různé stimulační látky a různé doby kultivace. Byla zkoumána exprese čtyř chemokinů: CCL3, CCL3L1, CCL4 a CXCL8. Cílem práce bylo vybrat nejvhodnější formu materiálu, stimulační látku a dobu kultivace a vybrat geny, u kterých došlo k signifikantní změně v expresi po použití testované látky. V rámci zavedení metody bylo otestováno několik biomateriálů.

2. Biomateriály v ortopedii

2.1. Protetické materiály

V průběhu vývoje moderní ortopedie byly pro výrobu kloubních a kostních náhrad užívány různé materiály. Historicky první zdokumentované použití kloubní náhrady – v tomto případě kyčle – bylo provedeno v roce 1891 týmem německého profesora Themistocla Glücka. Lékaři použili k nahrazení femorálních hlavic pacienta, zničených tuberkulózou, slonovinu (Learmonth a další, 2007). První kloubní náhrada z anorganického materiálu byla použita v roce 1925 americkým chirurgem Mariem Smith-Petersenem a byla vyrobena ze skla. Operace byla sice úspěšná, jelikož sklo je biokompatibilní materiál, ale v důsledku jeho přílišné křehkosti nedokázalo odolat silám, které na něj působily, a roztrhlo se (Hernigou, 2014). Od roku 1953 začal být běžně využíván britským chirurgem Georgem McKee model protézy kov-kov ze slitiny chromu a kobaltu. U pacientů s úplnou náhradou kyčle nebo kolene jsou však často pozorovány komplikace přijetí implantátu a následného zotavení, způsobené alergickými reakcemi na použité protetické materiály, obzvláště na mikročástice z nich uvolňované.

V běžném organickém kloubu je mezi dvěma kostmi chrupavka, která je pohybem kloubu obrušována, ale díky své regenerativní schopnosti dokáže toto poškození opravovat a mrtvé buňky jsou rozeznány imunitním systémem a bez obtíží odbourány. U kovové náhrady však žádná chrupavka v místě ohybu není, a ačkoliv je protéza navržena tak, aby bylo tření minimální, nevyhnutelně dochází k obrušování materiálu. Uvolněné částice nabývají iontové povahy a vyvolávají pak imunopatologickou reakci IV. typu, projevující se jako otoky, kopřivka, ekzém a osteomyelitida, vedoucí k uvolnění implantátu z kosti a nutné reoperaci (Hunt, 2016).

Nejčastějšími kovovými alergeny jsou nikl, kobalt a chrom (Thomas a další, 2015), z nichž právě dva poslední zmíněné tvoří slitinu kovové náhrady. U pacientů s celokovovou chrom-kobaltovou kloubní náhradou koncentrace kovových iontů v okolní tkáni dosahují až padesátinásobku (kobalt) a stonásobku (chrom) povolených fyziologických limitů (Lhotka a další, 2003). Vývoj nových materiálů, které by představovaly menší zátěž pro organismus, je proto velmi aktuální.

V dnešní době se vedle kovové náhrady používá také polyethylenová a keramická, ale obě náhrady jsou minoritně zastoupeny – první, přestože velmi levná, je neoblíbená v důsledku nepříjemných následků reakce imunitního systému na silně imunogenní částice, uvolňované při odírání materiálu, druhá z důvodu vysoké ceny.

V současné době se vývoj zaměřuje, spíše než na zdokonalení konstrukčního materiálu samotného, na zlepšení vlastností materiálů aplikací povrchových úprav, využívající např. nanotrubičky či stříbro.

2.2. Testování nových biomateriálů

Nové biomateriály musí splňovat přísná kritéria, aby bylo možné je využít při konstrukci ortopedických náhrad. V první řadě musí mít dostatečnou mechanickou odolnost, tedy pevnost a křehkost. Z těchto důvodů není vhodným materiálem sklo, ačkoliv z hlediska biokompatibility je vhodné, jak zjistil již na počátku 20. století Marius Smith-Petersen (Hernigou, 2014). Mechanická odolnost je také velmi významná u povrchových úprav materiálů, jelikož při operaci snadno dochází k poškození úpravy. Zároveň však úprava nesmí bránit integraci implantátu do kosti a spojení cementem. Splňuje-li materiál či povrchová úprava tento základní předpoklad, přistupuje se k testování cytotoxicity, antimikrobních vlastností a imunoreaktivity. Vzhledem k oblíbenosti a rozsahu využití již zavedených materiálů pro výrobu ortopedických náhrad se současný vývoj zaměřuje spíše na povrchové úpravy těchto materiálů.

2.3. Testování cytotoxicity

Test cytotoxicity je zpravidla prováděn jako první, jelikož je rychlý, levný a citlivý. Teprve poté, co je biomateriál klasifikován jako netoxický, přistupuje se k dalším testům. Test cytotoxicity je standardizován normou ISO 10993 a memorandem FDA #G95-1. Je prováděn na buněčné linii myších fibroblastů a spočívá ve vystavení buněk biomateriálu přímým kontaktem a v podobě extraktu. Buňky jsou velmi citlivé a cytotoxické účinky jsou pozorovány v podobě morfologických změn, vakuolizace a odloučení od povrchu. Při testování povrchových úprav na bázi nanočástic stříbra se ukázala jako velmi vhodná buněčná linie BALB/c 3T3, která je řádově 1 000x citlivější než živočišné modely *in vivo* (Zou a další, 2014).

2.4. Testování antimikrobních vlastností

Bakterie mají tendenci růst spíše než volně v roztoku na pevném povrchu v podobě biofilmu. To jim také umožňuje uniknout pozornosti imunitního systému a účinnému působení antibiotik. Adhese bakterií na povrch probíhá ve dvou fázích, kdy první je charakteristická náhodným přichycením bakterie na povrchu v důsledku Brownova pohybu,

van der Waalsových sil a elektrostatických interakcí. Ve druhé fázi se již přichycená bakterie pevně spojuje s materiálem pomocí molekulárních interakcí glykokalix a fimbrií (Campoccia a další, 2012). Vzhledem k povaze spojení ve druhé fázi je vhodnějším přístupem snaha zamezit adhezi bakterie v první fázi použitím anti-adhezivních polymerů či některých proteinů, např. albuminu, který navázáním na povrch materiálu dokáže změnit jeho hydrofobní vlastnosti (Hogt a další, 1985). Ve vodném roztoku nesou bakterie zpravidla negativní náboj, navození stejného náboje na povrchu materiálu tedy způsobí elektrostatické odpuzování.

Povrchová úprava může mít také přímé baktericidní účinky. K tomuto se často užívají nanočástice stříbra. Stříbrné kationty v roztoku biochemicky interferují s buněčnou stěnou bakterií a ovlivňují její permeabilitu, buněčný metabolismus a vyvolávají tvorbu reaktivních forem kyslíku (Chernousova a další, 2013). Dosud však nebyly zcela zodpovězeny otázky ohledně cytotoxicity stříbrných iontů pro lidské tělo. Dlouhodobá absorpce stříbra ve zvýšených koncentracích vede k viditelným změnám, způsobeným ukládáním selenidu stříbrného v pokožce a sulfidu stříbrného v očích. Zasažená místa vykazují modrošedé zbarvení, ale tyto změny nejsou životu nebezpečné a nezpůsobují poškození tkání (Drake a další, 2005). Vzácně může stříbro vyvolávat alergické reakce u jedinců s vrozenými dispozicemi (Lansdown, 2010).

V současné době neexistuje standardizovaná metoda testování antimikrobních účinků materiálu, která by dosahovala kýžené přesnosti a reprodukovatelnosti. Hlavním předmětem kritiky je rozpor mezi statickým prostředím *in vitro* testování a dynamickým, fluidním a nestálým prostředím *in vivo* (Stoodley a další, 2013).

2.5. Testování imunoreaktivity

2.5.1. Právní regulace testování na zvířatech

Podle nařízení parlamentu Evropské Unie a Evropské rady o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek musejí být veškeré chemikálie dovážené do Evropské unie nebo v ní produkované otestovány, zda nenesou rizika pro zdraví člověka (Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1907/2006). Stejně testování, jaké se užívá pro tyto chemikálie, je nezbytné také při výrobě biokompatibilních materiálů, především v ortopedické protetice.

Až do nedávna se pro testování používaly klasické živočišné laboratorní modely *in vivo*, převážně laboratorní myši (*Mus musculus domesticus*), laboratorní potkani (*Rattus norvegicus*), laboratorní králíci (*Oryctolagus cuniculus*) a laboratorní morčata (*Cavia aperea*). V roce 2009 však vešlo v platnost nařízení parlamentu Evropské Unie a Evropské rady o kosmetických přípravcích (Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1223/2009), jež zakazuje mimo jiné nejen jakékoli užívání zvířat pro testování kosmetických přípravků, látek v nich užitých a jejich směsí, a to i v případě, že pro jejich testování není známa alternativa, ale také import jakéhokoli přípravku, látky či směsi, při jejíž výrobě či testování byly testy na zvířatech využity.

Tímto nařízením došlo k zásadnímu omezení možností testování na zvířatech na pouze výjimečné případy, převážně z oblasti medicíny. To vedlo k obrácení větší pozornosti k alternativním způsobům testování. K tomuto výzkumu se tak dostaly nejen finance ze zdravotnictví, ale také ze soukromého sektoru kosmetických firem, což vede k rozvoji tohoto odvětví vědy. Odpovědí na otázku, jak nahradit dosud používané živočišné modely *in vivo*, je v současné době využití buněčných linií.

2.5.2. Maximalizační test na morčatech (GPMT)

Maximalizační test na morčatech (Guinea Pig Maximization Test, GPMT) býval nejpoužívanější metodou pro testování dráždivosti látek, dokud nebyl roku 1992 nahrazen testem Local Lymph Node Assay (LLNA). Testovacím organismem je laboratorní morče (*Cavia aperea*). Používají se dospělá morčata obou pohlaví v počtu minimálně 10 testovacích a 10 kontrolních zvířat.

Test probíhá po dobu tří týdnů ve dvou fázích. V první fázi, tzv. indukci, jsou zvířeti podávány dvě sady intradermálních injekcí po třech (jedna sada na každé straně zad) v objemu 100 µl, a to: Freundovo kompletní adjuvans (FCA), alergen ve vhodném vehikulu a směs alergenu ve vhodném vehikulu s FCA. O týden později se místo injekcí zbaví srsti a obvazem

se zde připevní filtrační papír napuštěný alergenem v adjuvans. Po dalších dvou týdnech jsou boky zvířete zbaveny srsti a provede se druhá fáze, tzv. provokace (challenge). Na jeden bok je nanesena testovaná látka v plátku či komůrce, na druhý vehikulum a obojí je přichyceno pomocí obvazu po dobu 24 hodin a poté je odstraněno. Po 21 hodinách po odstranění látky je místo provokace očištěno a po dalších 3 hodinách (tedy celkem po 48 hodinách) je poprvé vyhodnocena kožní reakce pomocí Stupnice Magnussona/Kligmana (Tabulka 1) pro hodnocení vyvolaných patologických reakcí. O 24 hodin později je provedeno druhé hodnocení (tedy po 72 hodinách). V případě nejasného výsledku reakce se provádí histologický rozbor tkáně.

Test je považován za pozitivní, pokud alespoň 30% testovaných zvířat vykazuje pozorovatelný projev alergické reakce. Po ukončení testování jsou zúčastněná zvířata utracena (OECD Test Guideline No. 406).

Tabulka 1 – Stupnice Magnussona/Kligmana pro hodnocení vyvolaných patologických reakcí

Hodnota intenzity reakce	Projev
0	Bez pozorovatelné změny
1	Slabé zarudnutí kůže ve skvrnách
2	Výrazné jednolitě zarudnutí kůže
3	Intenzivní zarudnutí a zduření kůže

2.5.3. Test lokálních lymfatických uzlin (LLNA)

Test lokálních lymfatických uzlin (Local Lymph Node Assay, LLNA) popsany v roce 1992 je druhým z používaných způsobů testování imunoreaktivity materiálů pomocí živočišných modelů *in vivo*. Metoda spočívá ve vystavení těla alergenu, vyvolání buněčné imunitní reakce a následného hodnocení zmnožení T-lymfocytů v lymfatických uzlinách.

Testovacím organismem je zde laboratorní myš (*Mus musculus domesticus*), používají se samice 8–12 týdnů staré. Testují se vždy alespoň 3 koncentrace testované látky, dále pozitivní a negativní kontrola. Pozitivní kontrolou bývá dinitrochlorbenzen či 2-benzylidenoktanal, negativní kontrolou je pak olivový olej či aceton. Každá kontrola a látková koncentrace je testována na alespoň 4 zvířatech.

V první fázi je myším na dorzální stranu obou uší aplikováno 25 μ l testované látky ve vhodném vehikulu nebo příslušné kontrolní látky. Toto se opakuje celkem třikrát po 24 hodinách. Po dalších 72 hodinách je myším ocasní žílou aplikováno do krve předepsané množství radionuklidu ve fyziologickém roztoku či fosfátovém pufru. Používanými radionuklidy jsou [3 H]thymidin nebo [125 I]deoxyuridin. O pět hodin později jsou myši

usmrceny a jsou vyjmuty jejich aurikulární lymfatické uzliny. Z těchto jsou připraveny buněčné suspenze a je stanovena buněčná proliferace podle inkorporované radioaktivity.

Výsledkem je index stimulace (stimulation index, SI) jako podíl průměrné inkorporované radioaktivity zkoumané skupiny a průměrné inkorporované radioaktivity negativní kontroly. Za pozitivní je považována hodnota SI 3 a vyšší (OECD Test Guideline No. 429).

2.5.4. Testování imunoreaktivity s využitím buněčných linií

Oba používané testy na zvířatech tedy nejen způsobují zvířeti nepříjemné alergické reakce, ale nakonec vždy končí jeho utrácením. To v posledních letech vedlo k hledání alternativy v testování na buněčných kulturách. Nejvhodnější buněčnou kulturou pro tyto testy se zdá být buněčná kultura MUTZ-3, odvozená od buněk lidské akutní myelomonocytické leukémie.

Tato buněčná kultura je citlivá na cytokiny, vyvolávající diferenciaci na nezralé dendritické buňky, jako například interleukin IL-4 či GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, Faktor stimulující granulocyt-makrofágové kolonie). Takto vzniklé nezralé dendritické buňky pak po aktivaci zánětlivými cytokiny, jako například interleukin IL-1 β či TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha, Faktor nádorové nekrózy alfa), dozrávají ve zralé dendritické buňky.

Schopnost diferencovat na dendritické buňky má více buněčných linií odvozených od buněk lidské myeloidní leukémie, ale na rozdíl od buněčné linie MUTZ-3 vykazují slabší odezvu na cytokinové koktejly, které mají diferenciaci vyvolat. Pro vyvolání diferenciace také často vyžadují další nitrobuněčné signální mechanismy.

Následující kapitoly obsahují krátké shrnutí imunitních principů, které vedly ke zvolení dendritických buněk jako *in vitro* modelu pro kompletní imunitní odezvu (Nelissen a další, 2009).

2.6. Alergické reakce spojené s ortopedickými implantáty

2.6.1. Imunitní reakce IV. typu

Konkrétním projevem imunitní reakce na kovové ionty, uvolňované z kloubní náhrady, je kontaktní alergická dermatitida (allergic contact dermatitis, ACD). Navzdory nejnovějším poznatkům o účasti eozinofilů (Teixeira a další, 2001), které jsou charakteristické spíše pro reakci I. typu, hrají v reakci IV. typu klíčovou roli makrofágy, T_{H1} -lymfocyty, T_C -lymfocyty a především dendritické buňky.

ACD je typickým projevem imunoreaktivity materiálů, přicházejících do kontaktu s tkání, především s kůží. Je způsobena imunitní reakcí IV. typu, tzv. opožděnou imunitní reakcí (delayed time hypersensitivity, DTH), což je odvozeno od faktu, že projevy alergické reakce jsou patrné až po 12–48 hodinách. Reakce je zpravidla lokální, ačkoliv může dojít k jejímu rozšíření oběhovým systémem.

Oddálení projevu DTH je způsobeno především množstvím jednotlivých komponentů imunitního systému na ní se podílejících a také nezbytnou migrací T_H -lymfocytů ($CD4^+$) a dendritických buněk. Při první expozici dochází k infiltraci tkáně hapténem, který se navazuje na tkáňový protein, a tak utváří kompletní imunogen. Tento imunogen je pohlčen antigen prezentující buňkou a uvnitř ní navázán na hlavní histokompatibilní komplex třídy II (major histocompatibility complex class II, MHC II) (Janeway, 2001), pomocí něhož je pak prezentován na povrchu buňky T_{H1} -lymfocytům. Tyto lymfocyty rozeznávají MHC II pomocí T-buňkových receptorů (T-cell receptors, TCR), dochází k jejich aktivaci a proliferaci. Při další expozici přichází do kontaktu s imunogenem na MHC II antigen prezentující buňky již zralé T_{H1} -lymfocyty a po aktivaci produkují cytokiny především interleukin-2 (IL-2) a interferon- γ (IFN- γ), které vyvolají migraci makrofágů a T-lymfocytů do místa infekce a vyvolají vlastní zánět.

Zároveň s tím antigen prezentující buňky aktivují také T_C -lymfocyty, které jsou pak ve snaze odstranit buňky, prezentující se cizím antigenem, odpovědné za poškození tkáně.

Charakteristickým příkladem DTH je tuberkulinová reakce, dále například roztroušená skleróza nebo výše zmíněná kontaktní alergická dermatitida.

2.6.2. Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC) jsou nepostradatelným prvkem imunitního systému a v imunopatologické reakci IV. typu hrají klíčovou roli jako jedny z antigen prezentujících buněk a producenti cytokinů a jiných mediátorů alergické reakce. Běžně se vyskytují ve veškeré tkáni těla s výjimkou mozku, rohovky a varlat, především se však nacházejí v epitelech (poprvé byly pozorovány Paulem Langerhansem v pokožce, odtud název Langerhansovy buňky), lymfatických uzlinách a brzlíku. Jejich všudypřítomnost je nezbytná pro vykonávání jejich funkce, jíž je prezentace antigenů T-lymfocytům a jejich regulace a indukce a udržování imunitní tolerance a imunitní paměti.

DC se ve tkáních vyskytují zpravidla v nezralém stádiu. Nezralé DC zabezpečují imunitní toleranci – fagocytózou pohlcují odumřelé tělní buňky a molekuly volně se vyskytující v mezibuněčné tekutině, rozeznávají je a pomocí MHC I je prezentují okolním T-lymfocytům. Ty je rozeznávají jako tělu vlastní a buď na daný antigen nereagují, anebo se dokonce mění na regulační T-lymfocyty (T_{r} -lymfocyty), které aktivně tlumí imunitní odpověď vůči danému antigenu, což brání patologickým autoimunitním reakcím. Nezralé DC také migrují do brzlíku, kde endogenní antigeny prezentují maturujícím T-lymfocytům, které jsou pak v závislosti na své reakci na tyto antigeny selektovány.

Nezralé DC pohlcují nejen endogenní antigeny, ale všechny antigeny ve svém okolí. K rozpoznání exogenních antigenů slouží TLR (Toll-like receptory), jimž je věnována následující kapitola.

Zralá DC následně migruje do lymfatických uzlin, kde se setkává s naivními T-lymfocyty. T_{h} -lymfocyty jsou aktivovány antigenem prezentovaným na MHC II, T_{c} -lymfocyty jsou aktivovány prezentací antigenu na MHC I. Proces označovaný jako cross-priming umožňuje DC navázat na MHC I antigen exogenního původu. Nestandardní typ prezentace antigenu probíhá pomocí molekuly CD1, což je zároveň povrchový marker DC (Šedivá a další, 2002).

2.6.3. Toll-like receptory

Toll-like receptory (TLR) jsou kritickou součástí vrozené imunity, hrajíce klíčovou roli v rozpoznání endogenních i exogenních antigenů. Jejich název vychází z funkční podobnosti s Toll proteinem *Drosophily*, jehož funkcí je rozpoznávání infekce.

Exogenními ligandy TLR jsou evolučně velmi konzervativní strukturní motivy zvané PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns, Molekulární vzory spojené s patogeny), zahrnující lipopolysacharidy, peptidoglykany, lipopeptidy, flagelin, bakteriální DNA a virovou ssRNA. Endogenními ligandy TLR jsou DAMPs (Damage-associated Molecular Patterns, Molekulární vzory spojené s poškozením), což jsou molekuly, uvolňované nekrotizujícími a umírajícími buňkami. Zahrnují heat-shock proteiny (HSP 60, HSP 70, Gp96), amphoterin (HMGB1) a proteinové fragmenty z extracelulární matrix (např. fragmenty kyseliny hyaluronové).

TLR po navázání ligandu spouští signální dráhy, vedoucí k produkci zánětlivých hormonů, a to po dvou drahách. První dráha je závislá na MyD88 (Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88) a vyvolává produkci zánětlivých cytokinů, druhá dráha je MyD88 independentní a vede k stimulaci IFN- β a dozrávání dendritických buněk.

Následující tabulka shrnuje TLR receptory (Tabulka 2), jejich ligandy a původce těchto ligandů a stimulovaný produkt (Invivogen, 2012).

Tabulka 2 – Přehled lidských TLR receptorů, ligandů, jejich původců a produktů stimulace
(upraveno podle <http://www.invivogen.com/review-trl>)

TLR	PAMP	Původce PAMP	DAMP	Produkce
TLR1	lipoproteiny	bakterie	heatshock proteiny, HMGB1, proteoglykany	CK
TLR2	lipoproteiny	bakterie	stejně jako TLR1	CK
TLR3	dsRNA	viry	mRNA, tRNA	CK, IFN-1
TLR4	lipopolysacharidy	gram-negativní bakterie	heatshock proteiny, HMGB1, proteoglykany, fragmenty kyseliny hyaluronové, fibronektin	CK, IFN-1
TLR5	flagelin	gram-negativní bakterie	žádné	CK
TLR6	lipoproteiny	mykobakterie	stejně jako TLR1	CK
TLR7	ssRNA	viry	ssRNA	CK, IFN-1
TLR8	ssRNA	Viry	ssRNA	CK, IFN-1
TLR9	nemetylované CpG motivy DNA	Bakterie, viry	Komplex chromatin-IgG	CK, IFN-1
TLR10	neznámé	neznámé	neznámé	CK

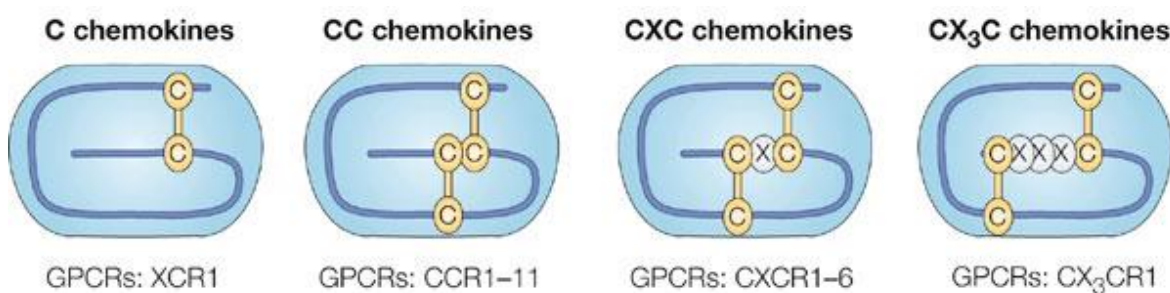
* IFN-1 – interferon 1; CK – zánětlivé cytokiny

2.6.4. Chemokiny

Po rozpoznání cizího antigenu antigen-prezentující buňkou dochází mimo jiných součástí imunitní reakce také k expresi cytokinů, jež signalizují ostatním buňkám imunitního systému přítomnost cizího antigenu. Jednou ze skupin cytokinů jsou chemokiny. Jsou to proteiny o molekulové hmotnosti 8–15 kDa, které mají schopnost chemotakticky působit na buňky imunitního systému, tedy stimulují buňky k migraci do jiných částí tkáně či těla. Chemokiny jsou sekretovány nejen buňkami imunitního systému, ale i buňkami různých tkání, a mohou působit jak autokrinně (na buňku, která je sekretuje), tak i parakrinně (na okolní buňky) a endokrinně (díky transportu cévním systémem působí na jiné tkáně těla).

V současnosti známe přes 40 chemokinů. Rozděluje je do 4 tříd podle počtu a pozice cysteinových zbytků na N-konci molekuly. Tyto cysteinové zbytky pak vytvářejí disulfidické vazby s dalšími cysteiny v molekule, čímž určují terciární strukturu celého proteinu. Chemokinové třídy jsou následující: CXC chemokiny (α -chemokiny), CC chemokiny (β -chemokiny), C chemokiny (γ -chemokiny) a CX₃C chemokiny (δ -chemokiny).

Chemokiny jednotlivých tříd preferují vazbu na jednu ze čtyř tříd chemokinových receptorů (Obrázek 1). Chemokinové receptory jsou skupinou receptorů, asociovanou s trimerními G-proteiny. Jsou podobné receptorům pro PAF (platelet activating factor) a některým neurotransmitterovým receptorům (Murphy, 1996). Chemokinové receptory jsou nejvíce exprimovány leukocyty, ale byly objeveny také u epitelových a endotelových buněk, a také u buněk svalových (Savinov a další, 2003).



Obrázek 1 – Třídy chemokinů a odpovídající preferované třídy chemokinových receptorů (upraveno z <http://www.nature.com/nrm/journal/v5/n12/images/nrm1529-i3.jpg>)

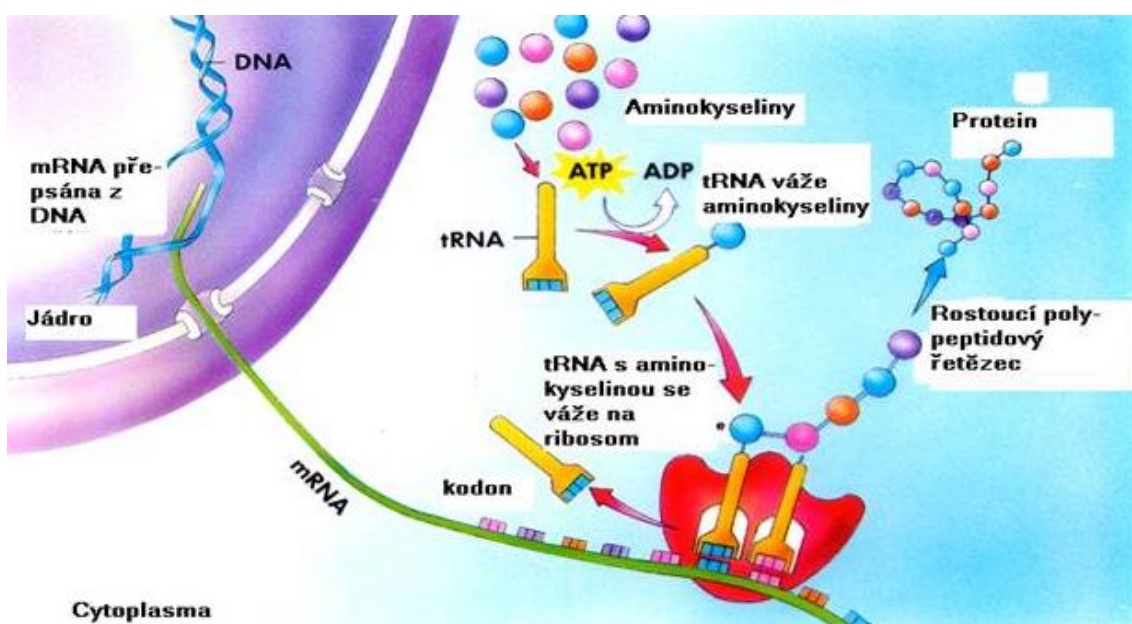
Praktická část této práce se zaměřuje na 4 chemokiny: ze skupiny α -chemokinů je to chemokin CXCL8 (interleukin-8; IL-8) a ze skupiny β -chemokinů jsou to chemokiny CCL3 (macrophage inflammatory protein α ; MIP-1 α), CCL3L1 a CCL4 (prekurzory macrophage inflammatory protein β).

Interleukin 8 (IL-8) může být produkován všemi buňkami, které exprimují TLR. Monomer IL-8 je 72 aminokyselin dlouhý protein tvořený flexibilním N-koncem, který je disulfidickými můstky ukotvený na hlavní doménu proteinu, složenou ze tří β -skládaných listů a jedné α -helix. Rentgenová krystalografie ukazuje, že se tyto monomery spojují v dimery. IL-8 je vázán více receptory, nejsilnější vazbu však vykazují CXCR1 a CXCR2. IL-8 působí jako atraktor neutrofilů – po jeho sekreci do tkáně dochází k mohutné chemotaxi neutrofilů a jejich hromadění v místě sekrece. Nepůsobí však na lymfocyty, bazofily, eozinofily ani monocyty (Baggiolini a další, 1992).

Macrophage inflammatory proteins (MIP) je skupina malých proteinů (8–10 kDa), které vykazují velkou podobnost ve struktuře stejně jako sekreci a funkci. MIP-1 α a MIP-1 β jsou dokonce syntetizovány jako společný prekurzor, který je až odštěpením signálních hydrofobních peptidů pomocí proteáz upraven do podoby jedné ze dvou zralých variant (α nebo β). Ostatní MIP, mezi nimi také CCL3L1, nebyly dosud charakterizovány po strukturní stránce. MIP jsou produkovány takřka všemi buňkami podílejícími se na imunitní odpovědi, mezi nimi však především makrofágy a dendritickými buňkami. MIP jsou klíčové pro chemotaxi T-lymfocytů do místa zánětu, a také hrají důležitou roli v migraci dendritických buněk, monocytů a NK (natural killer) buněk. Chemotaktické účinky na neutrofilů a eozinofily jsou výrazně menší, omezující se pouze na určité subpopulace. Mimo chemotaxi se MIP podílejí i na modulaci diferenciaci T_H-lymfocytů, a proto jsou významné při vývoji zánětlivých onemocnění, astmatu, roztroušené sklerózy i hojení ran (Mauer a další, 2004).

2.7. Studium genové exprese

Genová exprese je proces, v průběhu kterého je genetická informace uložená v genu (DNA) převedena do struktury proteinu nebo do jiné funkční molekuly, jako např. rRNA (Obrázek 2). Proces sestává z transkripce, post-transkripčních úprav, translace a posttranslačních úprav vzniklého proteinu. V praxi využíváme studium genové exprese k určení aktivních (právě transkribovaných) genů, na základě čehož můžeme vyvozovat závěry o aktivitách uvnitř buňky.



Obrázek 2 – Schéma průběhu genové exprese

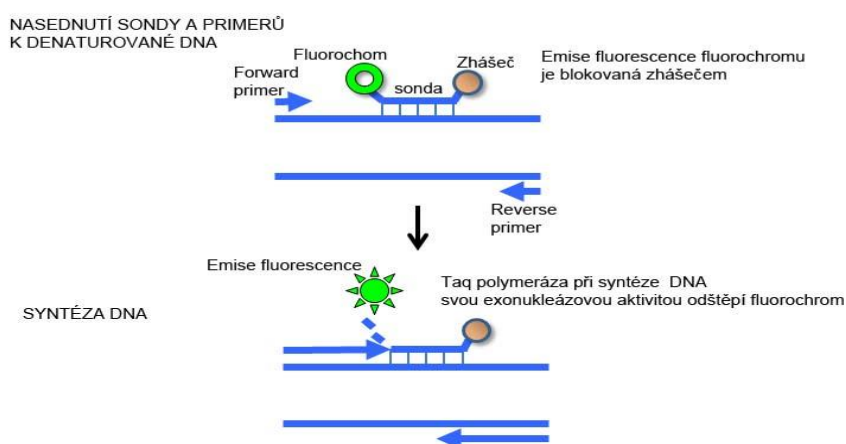
(převzato z <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200620/hypertext/GOAAA.htm>)

Metody studia genové exprese spočívají v detekci a kvantifikaci mRNA, transkribované z cílových genů. Nejčastěji používanými metodami jsou hybridizace a PCR. Hybridizační metody využívají spojování zkoumané mRNA se specifickými sondami na základě komplementarity bází. Sondy jsou značeny radionuklidem (např. izotopy fosforu či síry) nebo fluorescenčně. Příkladem hybridizační metody je Southern blotting. Tato metoda spočívá v přenosu a navázání mRNA na celulózovou či nylonovou membránu a následně hybridizaci se specifickými sondami. Úspěšnost hybridizace je poté hodnocena v závislosti na značení sondy radiometricky či fluorometricky.

PCR metody slouží ke zmnožení určitých úseků DNA, vymezených vhodně zvolenými primery, za pomoci DNA polymerázy ve vhodném reakčním prostředí za cyklického střídání teplot. Nejběžnější PCR metodou, využívanou ke studiu genové exprese, je RT-qPCR (PCR v reálném čase spojená s reverzní transkripcí). Technologií RT-PCR je možné v reálném čase sledovat množství vznikajícího produktu pomocí detekce fluorescenčního signálu s využitím specifických oligonukleotidových sond nebo interkalačního činidla.

V prvním kroku je mRNA pomocí reverzní transkripce přepsána do cDNA, která je poté ve druhém kroku kvantifikována s využitím vhodně zvolených hybridizačních sond či interkalačního barviva při qPCR. Tato metoda dokáže rychle a efektivně určit míru genové exprese, zpravidla vztaženou vůči míře exprese určitého genu, u něhož můžeme předpokládat danou míru exprese nezávislou na vnějších podmínkách, tzv. house-keeping gen (Vandesompele a další, 2002).

Hybridizační sondy jsou uměle vytvořené oligonukleotidy o specifické sekvenci, která umožňuje hybridizaci výhradně do zvoleného úseku DNA, tedy zpravidla do oblasti určitého genu. Sondy jsou značeny několika různými způsoby, z nichž asi nejčastěji užívané jsou TaqMan sondy. Tyto sondy jsou označeny dvěma molekulami: na 5' konec oligonukleotidu je kovalentně navázán fluorofor a na 3' konec je navázán zhášec (quencher). Pokud je sonda intaktní, dojde při excitaci fluoroforu k pohlcení emitovaného světla zhášečem a není detekován žádný signál. Pokud se však sonda naváže na templátové vlákno během hybridizační fáze PCR, dojde pak při polymerizační fázi k rozbití sondy na jednotlivé nukleotidy, jelikož Taq polymeráza má 5'→3' exonukleázovou aktivitu. Po rozbití sondy se fluorofor uvolní z dosahu působení zhášeče a při excitaci je emitované světlo možné detekovat (Obrázek 3).

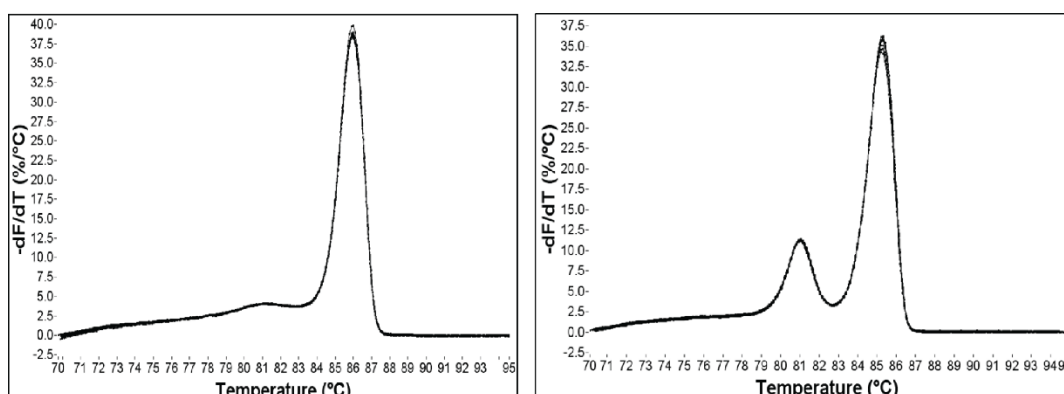


Obrázek 3 – Schéma principu funkce hybridizačních sond při qPCR

(upraveno podle <http://labguide.cz/sybergreen/>)

Kromě hybridizačních sond lze také využít tzv. interkalační barvivo, např. barvivo SYBR Green. Pokud v roztoku není žádná DNA nebo jsou přítomné pouze jednořetězcové molekuly DNA, nedochází k excitaci barviva. Excitace je možná až po vmezezení barviva do dvouvláknové DNA a v případě její denaturace je barvivo opět uvolněno. Během qPCR s využitím barviva SYBR Green tak můžeme pozorovat cyklický nárůst a pokles fluorescenčního signálu s rostoucí intenzitou (pokud dochází úspěšně k množení DNA). Interkalační barvivo nasedá nespecificky na jakoukoli dvouřetězcovou molekulu DNA, proto musí být vhodně zvoleny primery, aby nedocházelo ke vzniku nespecifických produktů.

Jestli dochází ke vzniku nespecifických produktů lze zjistit pomocí analýzy křivky tání. Metoda využívá skutečnosti, že specifický produkt denaturuje při charakteristické teplotě. Při teplotě T_m je denaturováno 50% dvouřetězcových molekul daného produktu). Postup analýzy křivky tání spočívá v ochlazení vzorku na teplotu nižší, než je předpokládaná T_m , a poté postupném ohřívání po malých krocích (zpravidla 1 °C), mezi nimiž vždy probíhá měření fluorescence, až na teplotu vyšší než je předpokládaná T_m , obvykle až na teplotu blízkou 100 °C. S rostoucí teplotou, denurací rostoucího množství DNA a tedy se zmenšujícím se množstvím dvojřetězcových molekul s interkalovaným barvivem klesá intenzita fluorescence. Výsledkem měření je tedy křivka závislosti intenzity fluorescence na teplotě, která v určité oblasti prudce klesá. Druhou derivací křivky získáme křivku s vrcholem, který odpovídá teplotě T_m daného produktu. Pokud však vznikají nespecifické produkty, budou součástí křivky i jejich T_m a vznikne tedy více vrcholů křivky (Obrázek 4).



Obrázek 4 – Specifický (vlevo) a nespecifický (vpravo) produkt qPCR

(převzato z <https://www.idtdna.com/pages/images/default-source/decoded/art9-melt-curves-fig1.png?sfvrsn=0>)

3. Principy použitých metod

3.1. Kultivace

Kultivace spočívá ve vytvoření a udržování specifických podmínek, vhodných pro růst a množení mikroorganismů či buněčných kultur.

V této práci byla nejprve kultivována buněčná linie 5637, což je kultura lidského karcinomu močového měchýře. Buňky této kultury produkují růstové faktory, potřebné pro kultivaci buněk linie MUTZ-3. Buněčná linie 5637 je kultivována v médiu RPMI. Toto médium využívá hydrogenuhličitanový pufrovací systém a obsahuje specifická množství 20 základních aminokyselin v L-formách, 11 vitamínů a další látky jako například D-glukózu (Thermo Fisher Scientific, 2015). Dále byly součástí kultivačního média fetální bovinní sérum, které iniciuje dělení buněk, a směs penicilinu a streptomycinu pro případ bakteriální kontaminace. Během kultivace bylo nutné udržovat specifické podmínky (teplota 37 °C, 5% CO₂, statické uložení kultivační lahve).

Po namnožení buněk do požadované koncentrace bylo provedeno tzv. pasážování, tedy sesbírání buněk, centrifugace, promytí odumřelých buněk, výměna média za nové a následně opětovné vysetí buněk do nové kultivační lahve. Při pasážování bylo odebráno použité médium, do nějž buňky linie 5637 uvolnily růstové faktory (GM-CSF, TNF- α a IL-6).

Kultura buněk MUTZ-3 byla kultivována v médiu α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle, alpha modification), které obsahovalo pufrovací systém solí (síran hořečnatý, hydrogenuhličitan sodný, chlorid draselný a další), 21 aminokyselin, 11 vitamínů, ribonukleosidy, deoxyribonukleosidy a další komponenty jako např. glukózu a fenolovou červeň. Kultivační médium obsahovalo dále fetální bovinní sérum, směs penicilinu a streptomycinu, a také sterilní přefiltrované médium z kultivace linie 5637, jehož součástí byly růstové faktory nezbytné pro diferenciaci fenotypu dendritických buněk.

3.2. Izolace celkové RNA

Prvním krokem studia genové exprese je izolace a purifikace celkové RNA ze zkoumaných buněk. V této práci byl použit kit Direct-Zol™ RNA MiniPrep od firmy Zymo Research Corp. (Irvine, CA, USA), který využívá metodu izolace nukleové kyseliny na silikátové membráně.

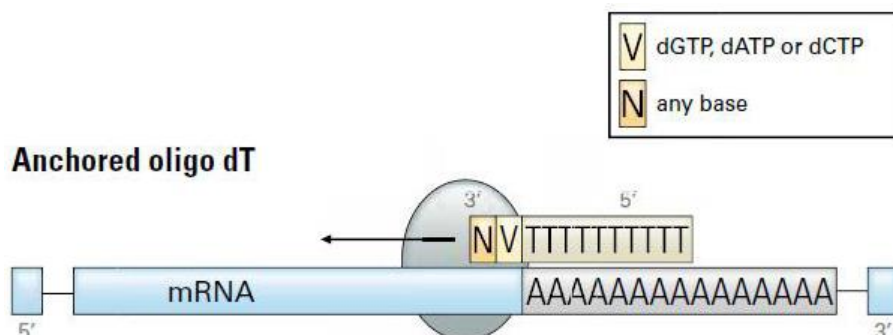
Během postupu dochází ke smíchání vzorku a pufru na bázi ethanolu a poté přenesení na membránu centrifugační kolony. Po vystavení nukleových kyselin ethanolu za optimálního pH a koncentrace solí, zajištěných pufrům, dojde k navázání nukleových kyselin na membránu centrifugační kolony. Poté jsou druhým, tzv. promývacím pufrům, vymyty ostatní biomolekuly. Následně je aplikována deoxyribonukleáza, která zajistí degradaci DNA a volné deoxyribonukleotidy jsou poté vymyty. Nakonec je pomocí deionizované vody přehřáté na 95 °C eluována RNA.

Vzhledem k velké nestabilitě RNA a všudypřítomnosti ribonukleáz je nutné pracovat sterilně ve flowboxu a dbát na čistotu práce. Pro zvýšení stability izolované RNA je využit inhibitor ribonukleáz Protector RNase Inhibitor (součást kitu Direct-Zol™ RNA MiniPrep od firmy Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA).

3.3. Reverzní transkripce

Práce s RNA je velmi obtížná vzhledem k její nestabilitě, proto je před další prací přepsána do DNA. Takto vytvořená DNA neobsahuje žádné introny, je tedy označována jako kódující (cDNA).

Reverzní transkripce je enzymatická reakce, při níž dochází k přepisu genetické informace z molekuly mRNA do cDNA, což se děje pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Pro transkripci *in vitro* bylo v této práci využito anchored-oligo(dT) primerů. Tyto primery nasedají na poly(A) konec mRNA molekuly, čímž se zajistí, že reverzní transkripce začne od 5' konce mRNA. Anchored-oligo(dT) primery jsou tvořeny 20 deoxythymidiny (dT), po nichž následuje VN kotva. Ta je tvořena dvěma nukleotidy V a N, kde V je jakýkoli jiný nukleotid než dT a N je jakýkoli nukleotid včetně dT (Obrázek 5). Anchored-oligo(dT) primer je pak tvořen směsí všech dvanácti možných kombinací nukleotidů ve VN kotvě. Kotva pomáhá zamezit tzv. DNA slippage, tedy sklouznutí oligo(dT) řetězce po poly(A)konci mRNA a upevňuje jej v místě prvního kodonu, čímž je zajištěna účinnější a přesnější syntéza cDNA. cDNA, připravená reverzní transkripcí, je poté použita jako templát pro qPCR.



Obrázek 5 – Schéma anchored-oligo(dT) primeru
(převzato a upraveno z <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/gallery/high/Anchored-Oligo-dT.jpg>)

3.4. Kvantitativní PCR

K určení genové exprese byla využita metoda kvantitativní PCR. Tato metoda spočívá ve spojení klasické PCR s fluorimetrií. Jako při běžné PCR dochází k cyklickým změnám teploty, které způsobují denaturaci DNA, nasednutí primerů a syntézu komplementárního vlákna DNA polymerázou. Navíc však dochází k hybridizaci TaqMan sond do zvolených specifických oblastí. TaqMan sondy mají na jednom konci navázaný fluorofor a na druhém zhášec. Dokud je sonda intaktní, nedochází k fluorescenci.

Specifické primery jsou zvoleny tak, že dochází k amplifikaci pouze určitých úseků cDNA, odpovídajících zkoumaným či referenčním genům. Dovnitř zmnožených úseků nasedají sondy a při polymerační fázi jsou pak díky exonukleázové aktivitě Taq polymerázy rozbity, čímž dojde k uvolnění fluoroforu od zhášeče a když je pak zkumavka prosvícena excitačním světlem, dojde k emisi záření. Intenzita emisního záření je přímo úměrná množství zmnožené cDNA ve zkumavce.

Aby bylo možné porovnat jednotlivé vzorky mezi sebou, je nutné použít referenční gen. Referenční gen, neboli house-keeping gen, je volen tak, aby jeho aktivita nebyla závislá na vnějších podmínkách. Referenční geny mohou být např. geny, kódující enzymy, účastníci se buněčného dýchání, glykolýzy a jiných dějů, nezbytných pro přežití buňky. V této práci byl jako referenční gen pro měření genové exprese zvolen gen PSMB2, kódující beta-4 podjednotku 20S proteazomu.

4. Cíle

Cílem této bakalářské práce bylo v teoretické části shrnout dosavadní způsoby testování imunoreaktivity biokompatibilních materiálů a shrnout poznatky o možnosti využití buněčné linie MUTZ-3 k testování imunoreaktivního potenciálu biokompatibilních materiálů, v kontextu využití těchto principů při testování imunoreaktivity a o roli dendritických buněk a chemokinů v imunitní reakci.

Cílem praktické části byla analýza genové exprese vybraných chemokinů (CXCL8, CCL3, CCL3L1, CCL4) u buněčné linie dendritických buněk MUTZ-3, kultivovaných za vystavení potenciálně imunoreaktivnímu materiálu, a to pomocí metod izolace celkové RNA, reverzní transkripce a kvantitativní PCR. Dále bylo cílem zvolit nejvhodnější podmínky kultivace (dobu kultivace, formu testovaného materiálu, stimulační látku) a posoudit vhodnost zvoleného panelu genů pro hodnocení imunoreaktivity biomateriálů.

5. Materiál a metodika

5.1. Použitý materiál

5.1.1. Biologický materiál

Buněčná linie 5637 ACC-35 od firmy DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Jednalo se o buněčnou kulturu lidského karcinomu močového měchýře, získanou z karcinomu 67-letého muže při diagnóze v roce 1974.

Buněčná linie MUTZ-3 ACC-295 (LOT 20; 14/8/2014) od firmy DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Jednalo se o buněčnou kulturu lidské akutní myelomonocytické leukémie získanou z periferní krve 29-letého muže, trpícího akutní myelomonocytickou leukémií (AML FAB M4) při diagnóze v roce 1993.

5.1.1. Testovaný materiál

Materiál pro testování byl ve formě kulatých plíšků o průměru 15 mm, což byly nejvhodnější rozměry pro použití při kultivaci buněk ve 24-jamkové kultivační desce.

5.1.2. Kultivace

Pomůcky:

15ml centrifugační zkumavka (Gama)
50ml centrifugační zkumavka (Gama)
75cm² kultivační lahev (BioTech)
Automatické pipety (Eppendorf)
Bürkerova komůrka (Brand)
Krycí skla (P-Lab)
Sterilní filtry (Thermo Fisher Scientific)
Sterilní špičky s filtrem na automatické pipety (Eppendorf)
24-jamková kultivační deska (Biotech)
Inkubátor CO2 FORMA (Merci)
Mikroskop laboratorní MC 500 B PC/∞ (Verkon)

Chemikálie:

DMSO (Sigma-Aldrich)
Médium RPMI 1640 500 ml (Life Technologies)
FBS – Fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich)
P/S – Penicilin/Streptomycin (Sigma-Aldrich)
Sterilní PBS (fosfátový pufr) (ExBio Olomouc)
Trypsin 2,5% (Thermo Fisher Scientific)

5.1.3. Izolace celkové RNA

Pomůcky:

1,5ml mikrozukavky (Eppendorf)
1,5ml mikrozukavky LowBind (Eppendorf)
Automatické pipety (Eppendorf)
Časomíra (Eppendorf)
Flowbox (Thermo Fisher Scientific)
Sterilní špičky s filtrem na automatické pipety (Eppendorf)
Stojan na mikrozukavky (Merci)
Stolní centrifuga (Sigma Laborzentrifugen)
Stolní minicentrifuga (BioTech)
Termoblok (Eppendorf)

Chemikálie:

TRIzol® (Thermo Fisher Scientific)

99,8% ethanol (Sigma-Aldrich)

dezinfekce s inhibítorem RNáz RNase Away (Sigma-Aldrich)

Kit Direct-Zol™ RNA MiniPrep od firmy Zymo Research Corp. (Irvine, CA, USA)

- zahrnuje: wash pufr
- pre-wash pufr
- DNáza I (lyofilizovaný enzym)
- reakční pufr pro DNázu I (10x)
- destilovaná voda (DNase/RNase-free water)
- Protector RNase Inhibitor

5.1.4. Reverzní transkripce**Pomůcky:**

Flowbox (Thermo Fisher Scientific)

1,5ml mikroskopavky LowBind (Eppendorf)

stojan na mikroskopavky (Merci)

Chlazený stojan na 0,2ml mikroskopavky (Verkon)

0,2ml mikroskopavky (Eppendorf)

Automatické pipety (Eppendorf)

Sterilní špičky s filtrem na automatické pipety (Eppendorf)

Stolní minicentrifuga (BioTech)

Termocykler (Eppendorf)

Chemikálie:

Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Germany)

5.1.5. Kvantitativní PCR

Pomůcky:

Flowbox (Thermo Fisher Scientific)

96-jamková mikrotitrační deska (Biotech)

384-jamková mikrotitrační deska (Biotech)

multikanálová pipeta (Eppendorf)

Automatické pipety (Eppendorf)

Sterilní špičky s filtrem na automatické pipety (Eppendorf)

Stolní minicentrifuga (BioTech)

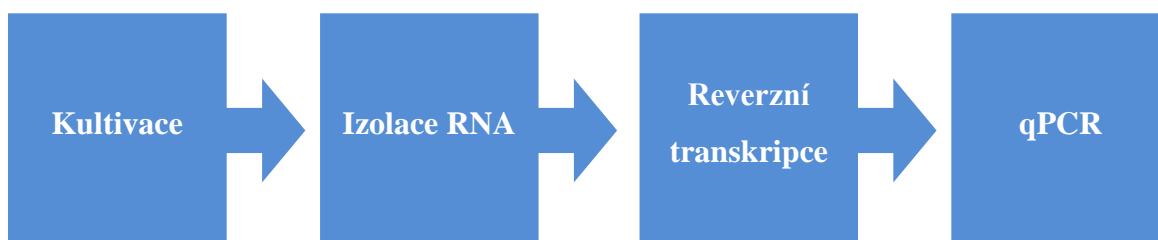
termocykler pro qPCR Rotor-Gene Q (Qiagen)

Chemikálie:

PrimeTime qPCR Assay pro lidské geny CCL3, CCL3L1, CCL4 a CXCL8 (IDT, USA)

destilovaná voda (Thermo Fisher Scientific)

5.2. Postup práce



Obrázek 6 – Schéma postupu práce

5.3. Kultivace

5.3.1. Kultivace buněčné linie 5637

Pro kultivaci buněčné linie MUTZ-3 jsou nezbytné růstové faktory, které byly získány kultivací buněčné linie 5637.

Příprava kultivačního média

Nejprve bylo připraveno kultivační médium: 500 ml RPMI média s 10% FBS a 1% P/S vzniklo doplněním 50 ml FBS a 5 ml P/S médiem RPMI do 500 ml. Připravené médium bylo přefiltrováno přes sterilní filtr.

Rozmražení buněk

Dále bylo třeba rozmrazit dodané buňky linie 5637. V kryozkumavce bylo $2,5 \times 10^6$ buněk. Buňky byly přeneseny do 50ml centrifugační zkumavky s 10 ml kultivačního média, resuspendovány a centrifugovány (5 minut, 200 RCF a 25 °C). Po odstranění supernatantu bylo k peletu přidáno 5 ml kultivačního média. Pelet byl resuspendován a celý objem byl přenesen do 75cm² kultivační lahve a doplněn do 20 ml přidáním 15 ml kultivačního média.

Kultivace a pasážování

Buňkám bylo každý den vyměňováno médium až po dosažení konfluence. Poté bylo médium odstraněno (případně odebráno pro kultivaci buněk linie MUTZ-3), buňky byly 2x promyty sterilním PBS a byl k nim přidán 1 ml trypsinu po dobu 7 minut, čímž byly buňky uvolněny ze stěn kultivační lahve. Poté byly buňky pomocí 5 ml kultivačního média přeneseny do 50ml centrifugační zkumavky. Buňky byly spočítány a byla provedena centrifugace (5 minut, 200 RCF a 25 °C). Po odstranění supernatantu byly buňky resuspendovány v čerstvém médiu a přeneseny do nové kultivační lahve v koncentraci $2,5 \times 10^6$ buněk/75cm² v objemu 20 ml.

Odebrání média pro přípravu kondiciovaného média pro buňky linie MUTZ-3

Po dosažení požadované koncentrace buněk ($2,5 \times 10^6$ buněk/75 cm² v celkovém objemu 20 ml) byly buňky kultivovány 3 dny bez výměny média. Třetí den po vyšetí bylo médium odebráno do 50ml centrifugační zkumavky a zcentrifugováno (10 minut, 200 RCF a 25 °C), aby byly odstraněny odumřelé buňky. Po centrifugaci byl supernatant přefiltrován přes sterilní filtr, přenesen do čisté 50ml centrifugační zkumavky a uskladněn při -20 °C.

Zamražení buněk linie 5637

Jakmile bylo médium pro přípravu kondiciovaného média pro buňky linie MUTZ-3 připraveno, byly buňky linie 5637 opětovně zamrazeny. Buňky byly pasážovány podle postupu výše a spočítány. Poté byly centrifugovány (5 minut, 200 RCF a 25 °C). Po odstranění supernatantu bylo k peletu přidáno 700 µl kultivačního média a celý objem byl přesunut do kryozkumavky. Po resuspendování byla přidána směs 200 µl FBS a 100 µl DMSO. Kryozkumavka byla uskladněna po dobu 2 hodin v -20 °C, poté do druhého dne v -80 °C a dále v tekutém dusíku.

5.3.2. Kultivace buněčné linie MUTZ-3

Kultivaci předcházela příprava kondiciovaného kultivačního média. Bylo připraveno 500 ml kultivačního média následujícího složení: 60% médium α -MEM, 20% FBS, 20% médium z kultury buněk linie 5637 a 1% P/S.

Rozmražení buněk

Kryozkumavka, obsahující 6×10^6 buněk/ml, byla opatrně zahřáta v dlani. Po rozmražení byl obsah přenesen do 15ml centrifugační zkumavky a bylo přidáno 5 ml kultivačního média. Buňky byly jemně resuspendovány a poté byla zkumavka centrifugována po dobu 5 minut při 200 RCF a 25 °C. Po odstranění supernatantu bylo k peletu přidáno 6 ml kultivačního média. Pelet byl resuspendován a po 1 ml rozdělen do 6 prostředních jamek 24-jamkové kultivační desky. Do zbývajících jamek bylo napipetováno po 1 ml čistého α -MEM. Pod mikroskopem bylo zkontrolováno, že jsou buňky rovnoměrně rozprostřeny po celém dně jamky, v případě potřeby byly rozprostřeny pomocí automatické pipety.

Kultivace a pasážování buněk

Buňky byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C a koncentraci CO₂ 5 % po dobu 4 dní, během čehož došlo ke zdvojnásobení počtu buněk v jamkách.

Buňky byly vysety prvního dne.

Druhého den bylo k 1 ml buněčné suspenze v jamkách přidáno po 1 ml čerstvého kultivačního média a buňky byly důkladně resuspendovány po celých jamkách.

Čtvrtého dne byl z jamek postupně opatrně po 100 µl odebrán 1 ml kultivačního média, aby nedocházelo k odpipetování buněk, a byl přidán 1 ml čerstvého kultivačního média a buněčné suspenze byly resuspendovány.

Pátého dne bylo provedeno pasážování buněk. Buňky byly resuspendovány a přeneseny do 50ml centrifugační zkumavky. Pomocí dalších 500 µl kultivačního média byly promyty jamky, obsahující buňky a toto médium bylo přidáno do centrifugační zkumavky. Buňky byly spočítány, aby se ověřila úspěšnost zdvojnásobení počtu buněk. Buňky byly centrifugovány po dobu 5 minut při 200 RCF a 25 °C. Poté byl odstraněn supernatant a bylo přidáno tolik čerstvého kultivačního média, aby byla zachována koncentrace 1×10^6 buněk/jamku.

Poté byly buňky znovu vysety na čistou 24-jamkovou kultivační desku tak, aby byly pouze ve vnitřních jamkách v koncentraci 1×10^6 buněk/jamku v 1 ml kultivačního média a do okolních bylo opět napipetováno po 1 ml čistého α -MEM média.

5.3.3. Příprava zásobních roztoků stimulačních látek a extraktů

Stimulační látky byly přidávány ke kultivovaným buňkám v podobě roztoku. Roztok lektinu byl připraven rozpuštěním práškového lektinu v kultivačním médiu za vzniku roztoku o koncentraci 10 µg/ml. Roztok niklu byl připraven rozpuštěním práškového bezvodého hexahydrátu síranu nikelnatého v kultivačním médiu za vzniku roztoku o koncentraci 100 µM.

Extrakt testovaného materiálu byl připraven vložением tří terčíků do 4,47 ml kultivačního média v 50ml kultivační zkumavce. Zkumavka byla poté ponechána přes noc na třepačce při teplotě 37 °C.

5.3.4. Kultivace buněčné linie MUTZ-3 s testovaným materiálem

Postup kultivace buněčné linie MUTZ-3 s testovaným materiálem byl shodný s kultivací této linie, uvedené v bodě 5.3.2. výše s následujícími úpravami:

1. Každý test probíhal v biologickém duplikátu.
2. Při testování extraktu byly buňky po provedení pasážování resuspendovány namísto v čistém kultivačním médiu v 500 μ l připraveného extraktu o požadované koncentraci. Poté byly buňky vysety do jamky kultivační desky a bylo přidáno 10 μ l stimulační látky.

Po uplynutí požadované doby kultivace byly vzorky v jamkách v celkovém objemu 2 ml přeneseny do 2ml mikrokumavek a následně byla provedena izolace celkové RNA.

5.4. Izolace celkové RNA

Izolace celkové RNA byla provedena pomocí kitu Direct-Zol™ RNA MiniPrep od firmy Zymo Research Corp. (Irvine, CA, USA).

Před prvním použitím kitu bylo třeba připravit reakční pufrы a deoxyribonukleázový mix (DNázový mix). Nejprve bylo ke 48 ml koncentrátu wash pufru přidáno 192 ml 99,8% ethanolu. Ke 160 ml koncentrátu pre-wash pufru bylo přidáno 40 ml 99,8% ethanolu. Oba pufrы byly důkladně promíchány. DNáza I byla dodána v lyofilizované podobě, proto bylo třeba ji před použitím rekonstituovat přidáním 275 μ l destilované vody (DNase/RNase-free water). Poté byl připraven DNázový mix (Tabulka 3).

Tabulka 3 – Příprava DNázového mixu pro izolaci celkové RNA

Reagencie	Objem na 1 reakci [μ l]
rekonstituovaná DNáza I	5
10x DNase I Reaction Buffer	8
DNase/RNase-free water	3
Wash Buffer	80
Celkem	96

Kultivované buňky ve 2ml mikrozkušavkách byly zcentrifugovány (4000 RPM, 10 min, 4 °C) a supernatant odstraněn. K peletu bylo přidáno 200 μ l lyzačního činidla TRIzol, následovala 5minutová inkubace při pokojové teplotě a poté byla zkumavka zvortexována. Po další centrifugaci (12 000 RCF, 1 min) byl supernatant přenesen do čisté 1,5ml mikrozkušavky s 200 μ l 99,8% ethanolu.

Vzorek byl přenesen na centrifugační kolonu Zymo-Spin Column, vloženou do eluční zkumavky. Po centrifugaci (12 000 RCF, 1 min) byla eluční zkumavka vyhozena a nahrazena novou. Na kolonu bylo nanášeno 400 μ l wash pufru a byla provedena centrifugace (12 000 RCF, 1 min). Poté bylo na kolonu nanášeno 80 μ l DNázového mixu a následovala 15minutová inkubace při pokojové teplotě. Po uplynutí inkubační doby proběhla centrifugace (12 000 RCF, 1 min) a bylo dvakrát provedeno předmytí pomocí 400 μ l pre-wash pufru. Dále proběhla centrifugace (12 000 RCF, 1 min) a odstranění eluátu. Po předmytí bylo na kolonu nanášeno 700 μ l wash pufru, byla provedena centrifugace (12 000 RCF, 1 min) a eluát byl odstraněn. Aby byly z kolony odstraněny všechny nežádoucí látky, byla provedena

ještě jedna centrifugace po dobu 2 minut při 12 000 RCF. Poté byla kolona přenesena na čistou Low-Bind zkumavku a bylo na ni nanášeno 50 μ l destilované vody (DNase/RNase-free water) předeřtáté na 95 $^{\circ}$ C. Následovala centrifugace při 24 000 RCF po dobu 1 minuty, během níž se izolovaná RNA eluovala do Low-Bind zkumavky. Pro stabilizaci RNA byl přidán 1 μ l Protector RNase Inhibitor a RNA byla uskladněna při teplotě -80 $^{\circ}$ C.

5.5. Reverzní transkripce

Izolovaná celková RNA byla reverzně transkribována do cDNA pomocí kitu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) podle příslušného protokolu s využitím anchored oligo(dT) primerů, které byly součástí kitu. Vzhledem k nestabilitě mRNA bylo nutné pracovat celou dobu na chladícím podstavci.

Každá reakce probíhala v celkovém objemu 20 μ l. Z důvodu kompenzace případné chyby pipetování byly mixy připravovány pro všechny reakce dohromady a poté rozpipetovány do jednotlivých zkumavek a všechny vzorky byly transkribovány v triplikátu. Celkem bylo transkribováno 5 vzorků najednou, včetně negativní kontroly tedy probíhalo současně 16 reakcí.

V první fázi práce byl připraven Template-primer mix smícháním směsi primerů a destilované vody pro PCR (Tabulka 4). Do každé 0,2ml PCR mikrozukavky bylo napipetováno 8 μ l tohoto mixu.

Do každé zkumavky byl poté přidán vzorek mRNA v objemu 5 μ l. Do jedné zkumavky bylo místo vzorku přidáno 5 μ l destilované vody a tato zkumavka poté sloužila jako negativní kontrola. Všechny zkumavky byly zcentrifugovány a vloženy do termocykleru, kde byly po dobu 10 minut zahřívány na teplotu 65 $^{\circ}$ C. Poté byly přesunuty na 5 minut na chladící podstavec.

V další fázi byl připraven RT-mix smícháním reakčního pufru pro reverzní transkripci, inhibitoru ribonukleáz, směsi deoxyribonukleotidů a reverzní transkriptázy (Tabulka 5) a do každé zkumavky bylo napipetováno 7 μ l tohoto mixu. Všechny zkumavky byly opět zcentrifugovány a vloženy do termocykleru, kde byly po dobu 60 minut zahřívány na teplotu 60 $^{\circ}$ C. Poté byla na 10 minut teplota zvýšena na 85 $^{\circ}$ C, čímž došlo k inaktivaci reverzní transkriptázy. Ihned poté byly zkumavky přesunuty na chladící podstavec.

Jednotlivé triplikáty byly spojeny do jedné 1,5ml mikrozukavky a původní 0,2ml mikrozukavky byly ještě propláchnuty 20 μ l destilované vody, která byla poté přidána

do 1,5ml mikrozkušavky. Každý transkribovaný vzorek tedy byl uložen v 1,5ml mikrozkušavce v objemu 80 μ l při teplotě -20 °C.

Tabulka 4 – Příprava Template primer mixu pro reverzní transkripci

Template primer mix		
Reagencie	Objem na 1 reakci [μ l]	Celkový objem [μ l]
směs anchored-oligo(dT) primerů	1	16
Destilovaná voda	7	112

Tabulka 5 – Příprava RT mixu pro reverzní transkripci

RT mix		
Reagencie	Objem na 1 reakci [μ l]	Celkový objem [μ l]
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (5x konc.)	4	64
Protector RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0,5	8
Deoxynucleotide Mix (10 mM každý)	2	32
Transcriptor Reverse Transkriptase (20 U/ μ l)	0,5	8

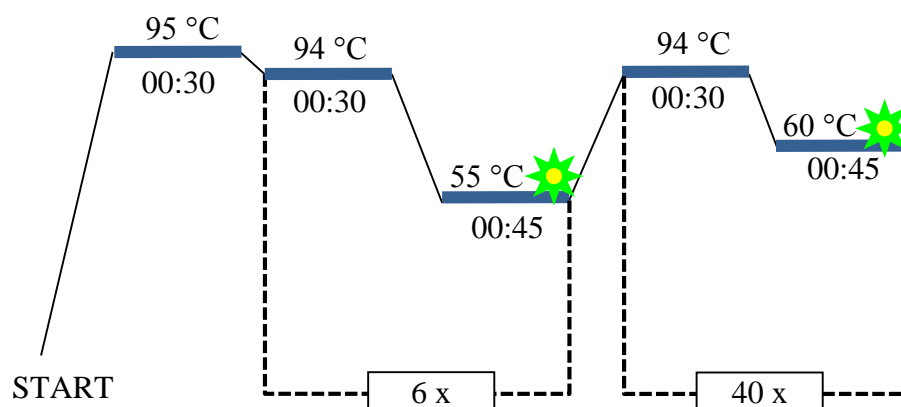
5.6. Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR transkribované cDNA byla provedena na přístroji Rotor-Gene Q (Qiagen) podle protokolu pro assays od firmy IDT, využívajících TaqMan sondy. Jako referenční (house-keeping) gen byl použit gen PSMB2, který kóduje beta-4 podjednotku 20S proteazomu.

Reakce probíhala v 0,2ml mikrozkuvkách pro PCR. Nejprve byly všechny reagenty rozmrazeny, opatrně promíchány poklepáním a stočeny na minicentrifuze. Do jednotlivých 0,2ml mikrozkuvek byly postupně přidány příslušné reagenty (Tabulka 6) a 5 μ l cDNA. Stripy 0,2ml zkuvek byly stočeny a vloženy do termocyklu, kde proběhla qPCR podle teplotního profilu na Obrázku 7 níže.

Tabulka 6 – Soupis reagentů pro přípravu qPCR

Příprava qPCR	
Reagent	Objem na 1 reakci [μ l]
destilovaná voda	11,55
Master Mix	7,0
IDT assay	1,25
Taq polymeráza	0,2
Celkem	20



Obrázek 7 – Schéma teplotního profilu qPCR. Žlutozelené značky označují místa měření fluorescence.

6. Výsledky

6.1. Doba kultivace

Vhodná doba kultivace buněk s testovaným materiálem byla vybírána ze tří různých, a to 6 hodin, 12 hodin a 24 hodin. Největší rozdíly mezi kontrolou a stimulačními látkami byly patrné u vzorků, kultivovaných po dobu 6 hodin. U vzorků kultivovaných déle pak rozdíly nebyly patrné (data nejsou ukázána).

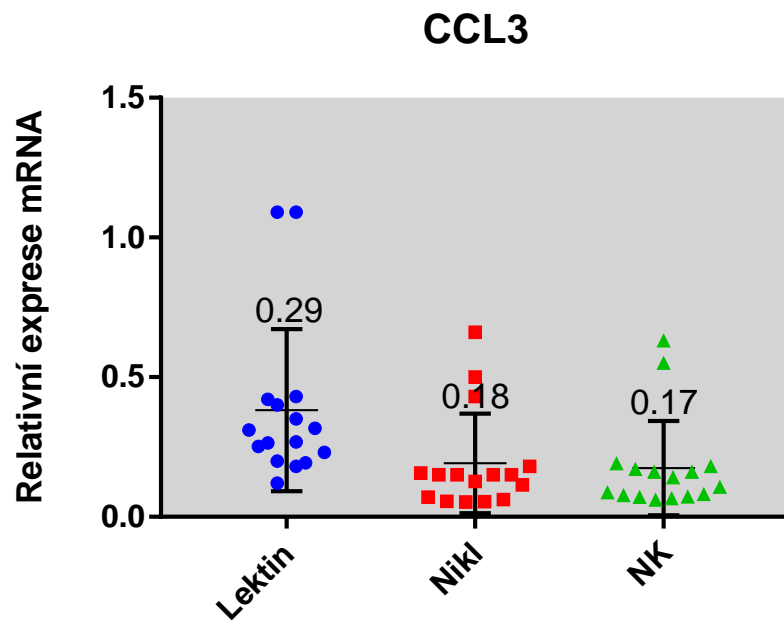
Vzhledem k tomu, že ideální doba kultivace byla určena jako 6 hodin, byly pro další závěry zvoleny pouze výsledky vzorků, kultivovaných po tuto dobu.

6.2. Stimulační látka

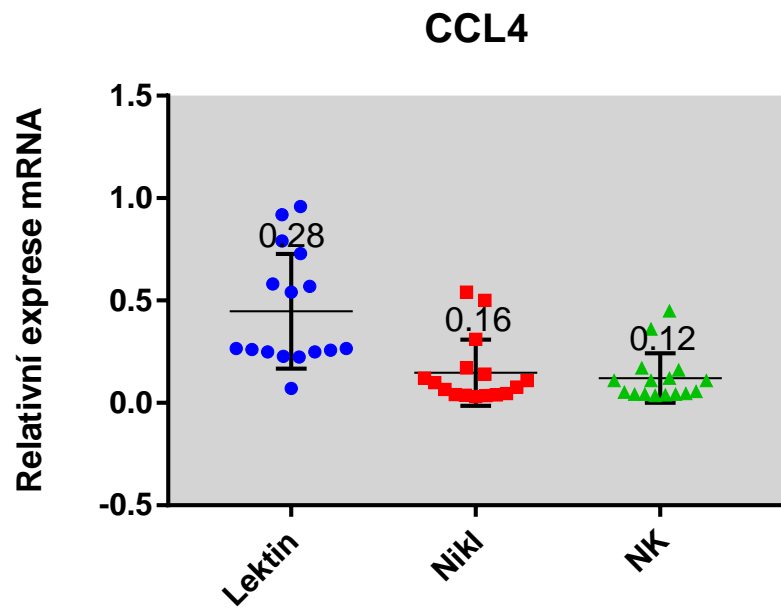
Při kultivaci byly k navození imunitní reakce použity dvě látky: lektin a nikl. Obě látky byly ke kultivovaným buňkám přidávány v podobě roztoku, připraveného rozpuštěním práškového lektinu, respektive práškového síranu nikelnatého, v kultivačním médiu. Pro srovnání účinnosti těchto dvou látek co do schopnosti navodit imunitní reakci byly porovnány všechny vzorky, inkubované po dobu 6 hodin, která se ukázala jako nejvhodnější, jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole.

Lektin má prokázané alergenní účinky (Ip a další, 2009) a měl největší vliv na expresi vybraných genů. Relativní genová exprese buněk, stimulovaných lektinem, byla znatelně vyšší než relativní genová exprese negativních kontrol, tedy buněk bez stimulační látky (Obrázky 8–11). To stejné však nelze říci o buňkách, stimulovaných niklem, u nichž byly rozdíly oproti negativním kontrolám velmi malé (Obrázky 8–11).

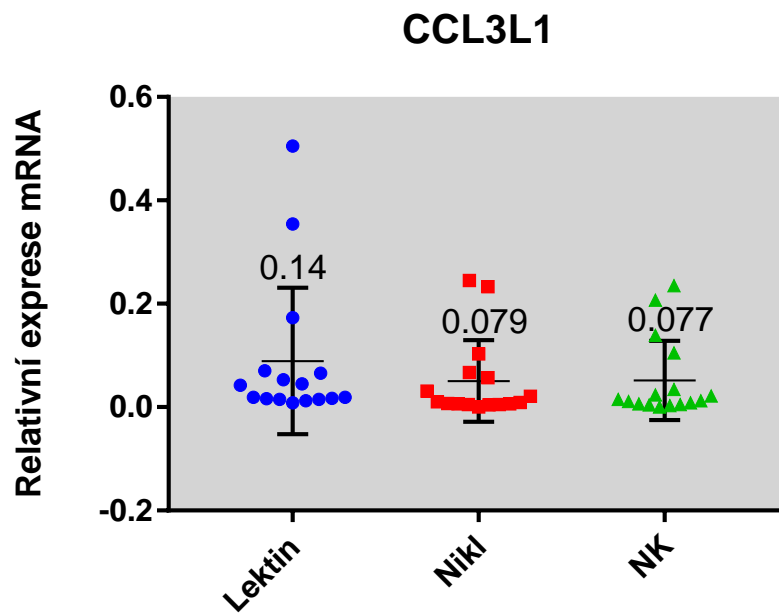
Rozdíly byly dobře patrné u genů CCL3 (Obrázek 8), CCL4 (Obrázek 9) i CXCL8 (Obrázek 11). U genu CCL3L1 nebyl nijak výrazný nárůst relativní genové exprese ani u buněk stimulovaných lektinem, ani u buněk stimulovaných niklem (Obrázek 10).



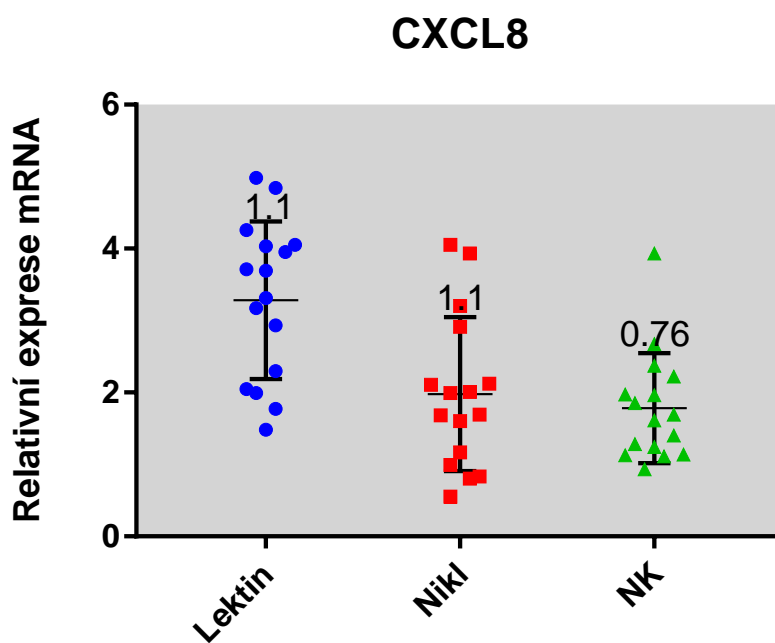
Obrázek 8 – Výsledky mRNA exprese CCL3 u vzorků stimulovaných lektinem, niklem a u negativních kontrol



Obrázek 9 – Výsledky mRNA exprese CCL4 u vzorků stimulovaných lektinem, niklem a u negativních kontrol



Obrázek 10 – Výsledky exprese CCL3L1 u vzorků stimulovaných lektinem, niklem a u negativních kontrol



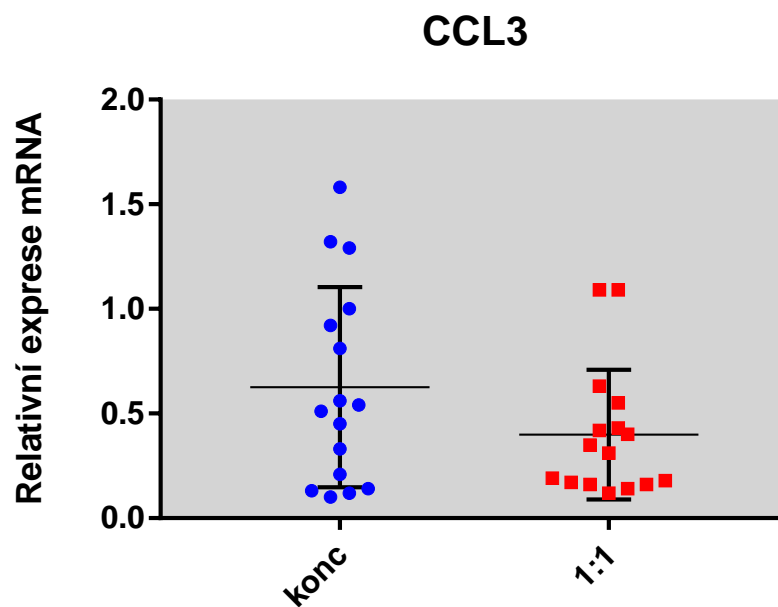
Obrázek 11 – Výsledky exprese CXCL8 u vzorků stimulovaných lektinem, niklem a u negativních kontrol

6.3. Výběr formy zkoumaného materiálu

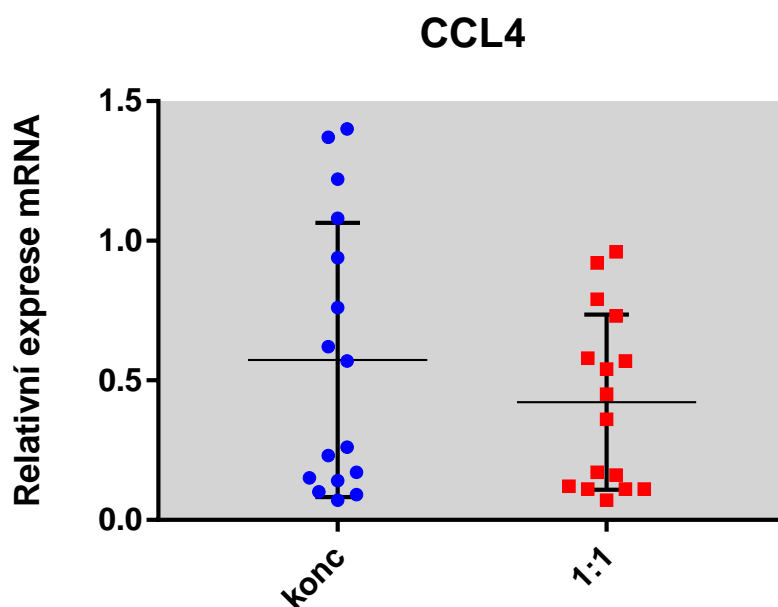
Zkoumaný materiál byl testován v podobě extraktu ve dvou koncentracích: koncentrovaný a zředěný 1:1 kultivačním médiem. Pro srovnání vlivu podoby zkoumaného materiálu na výslednou relativní expresi mRNA byly zvoleny vzorky, kultivované po dobu 6 hodin.

U genů CCL3 (Obrázek 12), CCL4 (Obrázek 13) a CXCL8 (Obrázek 15) je relativní genová exprese mRNA vyšší u vzorků s koncentrovaným extraktem než u vzorků s ředěným extraktem. U genu CCL3L1 (Obrázek 14) není pozorován rozdíl mezi oběma koncentracemi extraktu.

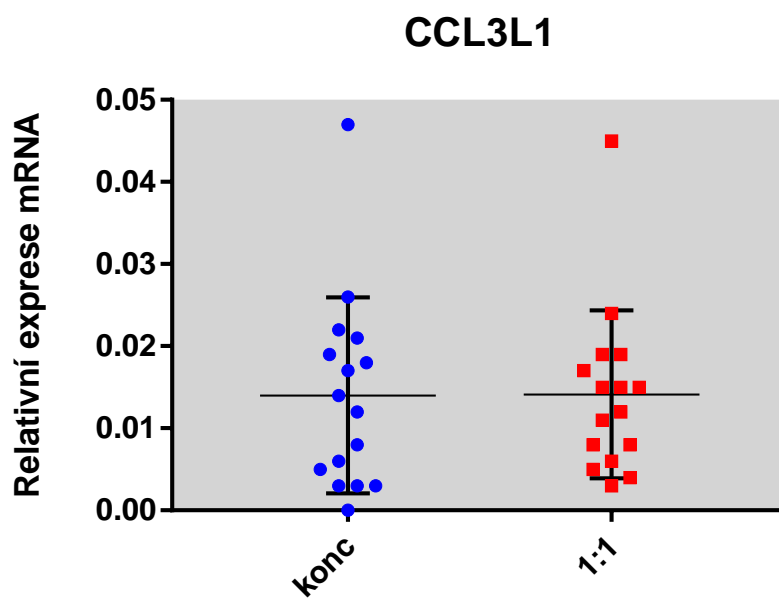
Na základě těchto výsledků byl koncentrovaný extrakt zvolen jako vhodnější forma zkoumaného materiálu.



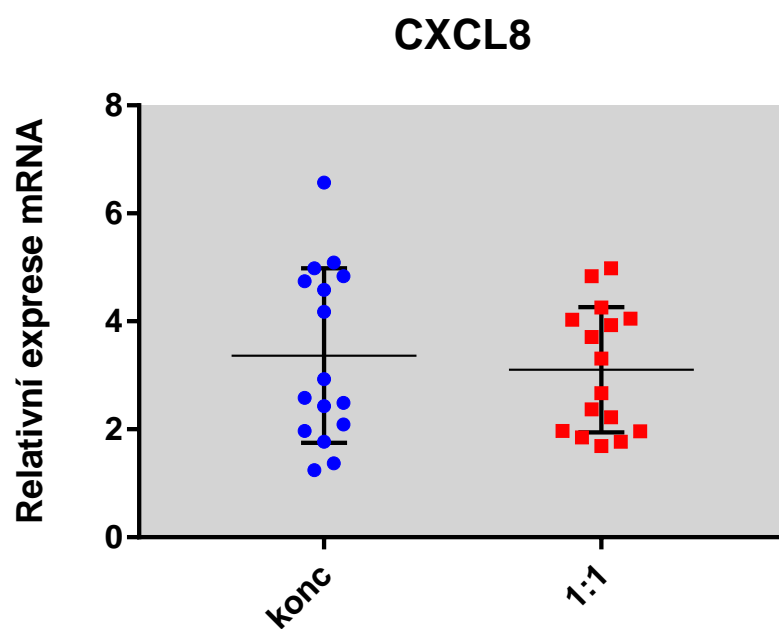
Obrázek 12 – Výsledky exprese CCL3 u vzorků s koncentrovaným extraktem a s ředěným extraktem



Obrázek 13 – Výsledky exprese CCL4 u vzorků s koncentrovaným extraktem a s ředěným extraktem



Obrázek 14 – Výsledky exprese CCL3L1 u vzorků s koncentrovaným extraktem a s ředěným extraktem



Obrázek 15 – Výsledky exprese CXCL8 u vzorků s koncentrovaným extraktem a s ředěným extraktem

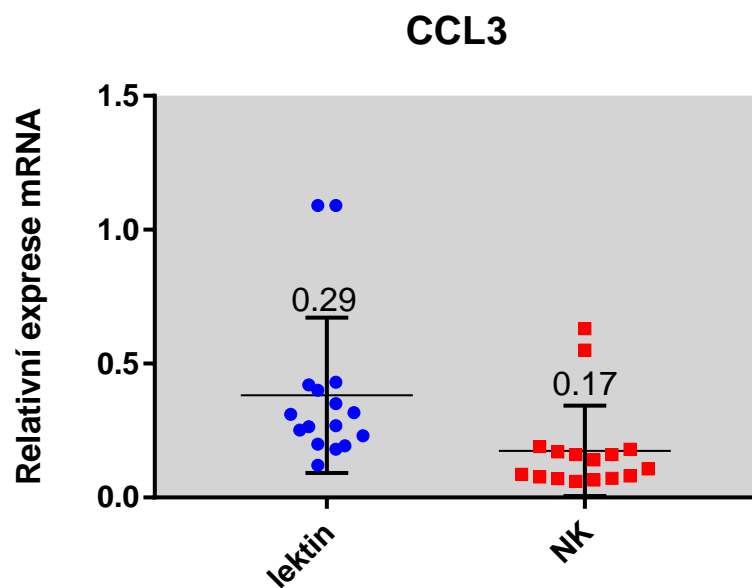
6.4. Zkoumané geny

Byly zkoumány 4 geny, kódující chemokiny: CCL3, CCL4, CCL3L1 a CXCL8.

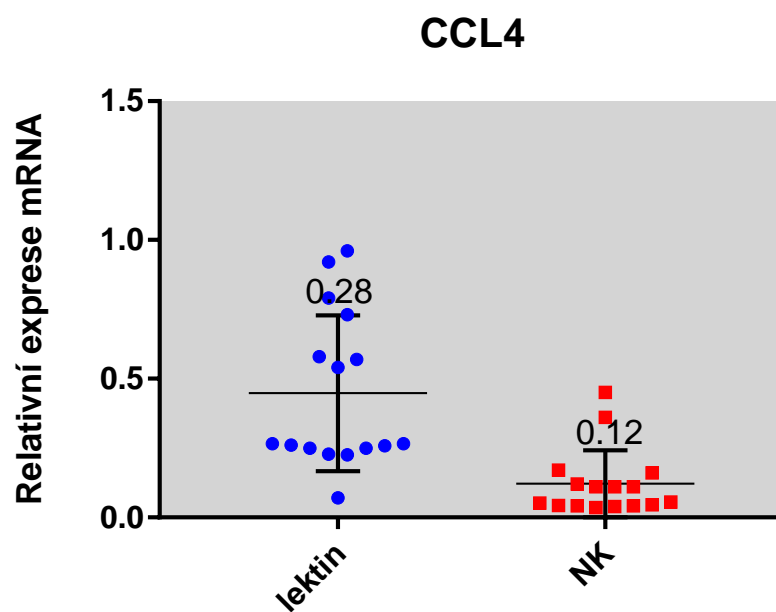
Gen CCL3L1 vykazoval pouze minimální rozdíl v relativní expresi mRNA mezi stimulovanými vzorky a negativními kontrolami (Obrázek 18), a proto se nejeví jako vhodný pro sledování.

Geny CCL3 (Obrázek 16), CCL4 (Obrázek 17) a CXCL8 (Obrázek 19) všechny vykazovaly rozdíl v genové expresi mezi stimulovanými a nestimulovanými vzorky. Největší rozdíl byl u genu CXCL8 (Obrázek 19), ale u tohoto genu byla vysoká standardní odchylka. U genů CCL3 a CCL4 byl sice rozdíl menší, avšak standardní odchylka byla malá (Obrázky 16 a 17).

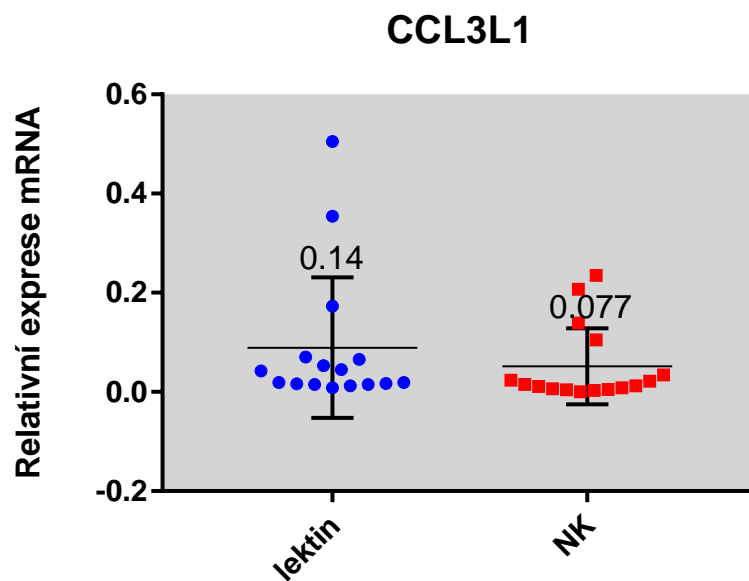
Na základě srovnání rozdílů v relativní expresi mRNA jednotlivých genů byly vybrány pro sledování tři geny, a to CCL3, CCL4 a CXCL8.



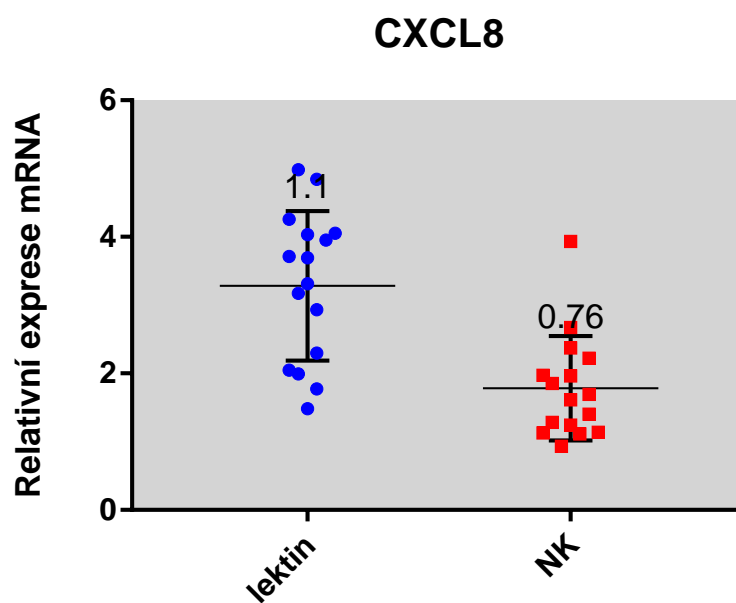
Obrázek 16 – Výsledky exprese CCL3 u vzorků kultivovaných 6 hodin, stimulovaných lektinem a vystavených koncentrovanému extraktu



Obrázek 17 – Výsledky exprese CCL4 u vzorků kultivovaných 6 hodin, stimulovaných lektinem a vystavených koncentrovanému extraktu



Obrázek 18 – Výsledky exprese CCL3L1 u vzorků kultivovaných 6 hodin, stimulovaných lektinem a vystavených koncentrovanému extraktu



Obrázek 19 – Výsledky exprese CXCL8 u vzorků kultivovaných 6 hodin, stimulovaných lektinem a vystavených koncentrovanému extraktu

7. Diskuze

Pro testování imunoreaktivity materiálů, donedávna prováděného *in vivo* na zvířecích modelech, se hledá alternativní model, který by umožňoval testování *in vitro*. Jako slibná se v tomto směru jeví buněčná linie dendritických buněk MUTZ-3.

Předmětem této práce bylo zkoumání využitelnosti buněčné linie dendritických buněk MUTZ-3 k testování imunoreaktivního potenciálu nových materiálů pro použití v ortopedii. Pro studium byly na základě literatury vybrány geny kódující chemokiny IL-8, CCL3, CCL3L1 a CCL4 (Schoeters a další, 2006). Byla sledována mRNA exprese vybraných genů u buněk buněčné linie MUTZ-3, které byly kultivovány za různých podmínek a v přítomnosti různých stimulatorů a biomateriálů. Cílem bylo vybrat nejvhodnější podmínky kultivace (dobu, formu testovaného materiálu a stimulační látku) a provést pilotní testování imunoreaktivního materiálu.

Nejprve byla zjišťována nejvhodnější doba kultivace. Bylo voleno mezi dobou 6 hodin, 12 hodin a 24 hodin. Rozdíly mezi negativními kontrolami a stimulovanými vzorky byly nejvíce patrné po kultivaci po dobu 6 hodin, jak je vidět na obrázcích v kapitole 6.1. Při delší kultivaci (12 hodin a 24 hodin) rozdíly nebyly zaznamenány, a proto jsme v dalších pokusech používali dobu kultivace 6h. Kultivace po dobu 6 hodin byla použita také v dřívějších pracích (Nelissen a další, 2009).

Pro každé testování biomateriálů je nutné ověřit funkčnost biologického systému pomocí stimulačních látek (tzv. pozitivní kontrola). Při výběru stimulační látky byly zvažovány dvě látky: síran nikelnatý a lektin. Již dříve byl prokázán jak účinek síranu nikelnatého na stimulaci imunitního systému (Nelissen a další, 2009), tak imunoreaktivní potenciál lektinu (IP a další, 2009). Lektin se ukázal jako vhodnější stimulant. Protože však očekáváme menší změny v genovém profilu u testovaných materiálů s imunoreaktivním účinkem, bude vhodné vždy používat obě pozitivní kontroly – nikl i lektin.

Při volbě formy testovaného materiálu byly hodnoceny dvě podoby extraktu: koncentrovaný extrakt a extrakt ředěný kultivačním médiem v poměru 1:1. Koncentrovaný extrakt vykazoval větší zvýšení genové exprese studovaných genů než ředěný extrakt. Zředěný extrakt nejspíše neobsahuje dostatek volných částic, které by aktivovaly Toll-like receptory dendritických buněk, a menší aktivace těchto receptorů pak také vede k menší expresi chemokinů. Také testování cytotoxicity biomateriálů se provádí přímým kontaktem buněčných linií s biomateriálem nebo se k buněčné linii přidává extraktem biomateriálu v kultivačním médiu (Ciapetti a další, 1998). Naše výsledky naznačují, že pro testování imunoreaktivního

potenciálu je vhodnější použít extrakt materiálu, a to nejlépe v koncentrované formě. Důvodem je očekávaná nízká imunoreaktivita nových biomateriálů (Johansson a další, 2011).

Prvním ze zkoumaných genů byl gen pro chemokin CCL3, kódující MIP-1 α . mRNA exprese CCL3 byla zvýšená v přítomnosti stimulačních látek.

Také u druhého zkoumaného chemokinového genu CCL4, kódujícího MIP-1 β , byly prokázány změny v mRNA expresi. I tento gen se jeví jako vhodný kandidátní gen využitelný k testování imunoreaktivity materiálů.

Třetím zkoumaným genem byl gen kódující chemokin CCL3L1. Relativní genová exprese tohoto genu nebyla stimulací zvýšena. Tento gen se tedy nejeví jako vhodný ke sledování imunoreaktivity materiálu při testování touto metodou.

Posledním ze čtyř zkoumaných genů byl gen pro CXCL8, kódující chemokin IL-8. CXCL8 vykazoval největší změnu exprese u stimulovaných vzorků ve srovnání s negativními kontrolami. Naše výsledky prokázaly, že tento gen je vhodné zařadit do panelu genů pro posouzení imunoreaktivity nových materiálů.

V rámci této práce se podařilo úspěšně určit nejvhodnější podmínky pro kultivaci buněčné linie MUTZ-3 pro testování imunoreaktivity materiálu. Podmínky kultivace pro zavedenou metodu byly zvoleny následující: kultivační doba 6 hodin, jako pozitivní kontrola stimulace lektinem a niklem a testovaný materiál ve formě koncentrovaného extraktu.

Naše pilotní výsledky naznačují využitelnost buněčné linie dendritických buněk pro testování imunoreaktivity nových biomateriálů. Ukazuje se, že nebude stačit studovat expresi malého počtu genů, ale bude nutné využít širšího panelu genů k průkazu imunoreaktivního potenciálu materiálů. V současnosti dokončujeme expresní profilování TLR receptorů a dalších genů vrozené imunitní odpovědi, které se jeví jako vhodné k doplnění studovaného panelu genů pro potřeby testování imunoreaktivity materiálů.

Současné práce i naše pilotní výsledky ukazují, že zavedení *in vitro* testů imunoreaktivity nabízí vhodnou alternativu k testům na zvířecích modelech. Bude však třeba další optimalizace postupů a identifikace genů vhodných pro tyto testy.

8. Závěr

V teoretické části se tato práce zabývala biomateriály používanými v ortopedii, metodami testování imunoreaktivity a imunologickými principy, souvisejícími s imunitní reakcí na biokompatibilní materiály.

Náplní praktické části práce byla optimalizace metody testování imunoreaktivity materiálů s využitím buněčné linie dendritických buněk MUTZ-3. V rámci naší studie byly určeny nejvhodnější podmínky pro kultivaci této buněčné linie pro testování imunoreaktivity materiálu, a to kultivační doba 6 hodin, stimulace lektinem a niklem jako pozitivní kontrola a aplikace testovaného materiálu ve formě koncentrovaného extraktu.

Ze studovaných genů byly na základě změn v expresi mRNA v přítomnosti stimulačních látek určeny jako vhodné pro testování imunoreaktivity materiálů geny kódující chemokiny CCL3, CCL4 a CXCL8.

Naše pilotní výsledky naznačují využitelnost buněčné linie dendritických buněk pro testování imunoreaktivity nových biomateriálů. Testování imunoreaktivity na této linii (*in vitro*) je tedy vhodnou alternativou k testům na zvířecích modelech. Další optimalizace postupů a identifikace genů vhodných pro tyto testy bude předmětem dalšího studia.

9. Přehled použité literatury

1. Learmonth ID, Young C, Rorabeck C. The operation of the century: total hip replacement. *Lancet*. 2007 Oct 27;370(9597):1508-19.
2. Hernigou P. Smith–Petersen and early development of hip arthroplasty. *Int Orthop*. 2014 Jan; 38(1): 193–198. Published online 2013 Sep 6. doi: 10.1007/s00264-013-2080-5.
3. Hunt, Richard. Hypersensitivity reactions. *Microbiology and Immunology Online*. [online]. 02.4.2016 [cit. 2016-07-20]. Dostupné z: <http://www.microbiologybook.org/ghaffar/hyper00.htm>.
4. Thomas P, Summer B. Diagnosis and management of patients with allergy to metal implants. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015 Apr;11(4):501-9. doi: 10.1586/1744666X.2015.1016501. Epub 2015 Feb 19.
5. Lhotka C, Szekeres T, Steffan I, Zhuber K, Zweymüller K. Four-year study of cobalt and chromium blood levels in patients managed with two different metal-on-metal total hip replacements. *J Orthop Res*. 2003 Mar;21(2):189-95.
6. Zou J, Feng H, Mannerström M, Heinonen T, Pyykkö I. Toxicity of silver nanoparticle in rat ear and BALB/c 3T3 cell line. *J Nanobiotechnology*. 2014 Dec 3;12:52. doi: 10.1186/s12951-014-0052-6.
7. Campoccia D, Cangini I, Selan L, Vercellino M, Montanaro L, Visai L, Arciola CR. An overview of the methodological approach to the in vitro study of anti-infective biomaterials. *Int J Artif Organs*. 2012 Oct;35(10):800-16. doi: 10.5301/ijao.5000140.
8. Hogt AH, Dankert J, Feijen J. Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial. *J Gen Microbiol*. 1985 Sep;131(9):2485-91.
9. Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013 Feb 4;52(6):1636-53. doi: 10.1002/anie.201205923. Epub 2012 Dec 17.
10. Drake PL, Hazelwood KJ. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. *Ann Occup Hyg*. 2005 Oct;49(7):575-85. Epub 2005 Jun 17.
11. Lansdown AB. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. *Adv Pharmacol Sci*. 2010;2010:910686. doi: 10.1155/2010/910686. Epub 2010 Aug 24.

12. Stoodley P, Hall-Stoodley L, Costerton B. Biofilms, biomaterials, and device-related infections. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*. Academic Press 2013.
13. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES.
14. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích.
15. OECD Test Guideline No. 406. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS: Skin Sensitisation. Adopted by the Council on 17th July 1992.
16. OECD Test Guideline No. 429. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. Adopted by the Council on 24th April 2002.
17. Nelissen I, Selderslaghs I, Heuvel RV, Witters H, Verheyen GR, Schoeters G. MUTZ-3-derived dendritic cells as an in vitro alternative model to CD34+ progenitor-derived dendritic cells for testing of chemical sensitizers. *Toxicol In Vitro*. 2009 Dec;23(8):1477-81. doi: 10.1016/j.tiv.2009.08.022. Epub 2009 Sep 2.
18. Teixeira MM, Talvani A, Tafuri WL, Lukacs NW, Hellewell PG. Eosinophil recruitment into sites of delayed-type hypersensitivity reactions in mice. *J Leukoc Biol*. 2001 Mar;69(3):353-60.
19. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. The major histocompatibility complex and its functions. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27156/>
20. ŠEDIVÁ, Darina a Ilja STRÍŽ. Dendritické buňky a jejich úloha v imunitních reakcích. *Alergie* [online]. Tigris, 2002, 2002(2) [cit. 2016-07-20]. ISSN 1212-687X. Dostupné z: <http://www.tigris.cz/images/stories/Alergie/2002/02/06sediva.pdf>
21. Review on Toll-like Receptors (TLR) and TLR Pathways. *Invivogen* [online]. Invivogen, 2012 [cit. 2016-07-20]. Dostupné z: <http://www.invivogen.com/review-tlr>
22. Murphy PM. Chemokine receptors: structure, function and the role in microbial pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rec*. 1996;7:47-64.

23. Savinov AY, Wong FS. Presentation of antigen by endothelial cells and chemoattraction are required for homing of insulin-specific CD8+ T cells. *J Exp Med*. 2003;197:643-656.
24. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.
25. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett*. 1992 Jul 27;307(1):97-101.
26. Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Oct;36(10):1882-6.
27. 51875 - RPMI 1640. *Thermo Fisher Scientific* [online]. Thermo Fisher Scientific, 2015 [cit. 2016-07-20]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/technical-resources/media-formulation.187.html>
28. Ip WK, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev*. 2009 Jul;230(1):9-21. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00789.x.
29. Schoeters, E., Nuijten, J.-M., Van Den Heuvel, R.L., Nelissen, I., Witters, H., Schoeters, G.E.R., Van Tendeloo, V.F.I., Berneman, Z.N., Verheyen, G.R. Gene expression signatures in CD34+-progenitor derived dendritic cells exposed to the chemical contact allergen nickel sulfate. *Toxicol Appl Pharm* (2006) 216, 131-149.
30. Nelissen I, Selderslaghs I, Van Den Heuvel R, Witters H, Verheyen GR, Schoeters G. MUTZ-3-derived dendritic cells as an in vitro alternative model to CD34+ progenitor-derived dendritic cells for testing of chemical sensitizers. *Toxicology in Vitro* 23 (2009) 1477–1481.
31. Ciapetti G, Granchi D, Stea S, Savarino L, Verri E, Gori A, Savioli F, Montanaro L. Cytotoxicity testing of materials with limited in vivo exposure is affected by the duration of cell-material contact. *J Biomed Mater Res*. 1998 Dec 15;42(4):485-90.
32. Henrik Johansson, Malin Lindstedt*, Ann-Sofie Albrekt and Carl AK Borrebaeck. A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. *BMC Genomics* 2011, 12:399.

10. Seznam použitých zkratek

GPMT – Guinea Pig Maximization Test

LLNA – Local Lymph Node Assay

FCA – Freund's complete adjuvant

IL-4 – interleukin 4

IL-6 – interleukin 6

GM-CSF – granulocyte-macrophage colony stimulating factor

TNF- α – tumor necrosis factor alpha

ACD – allergic contact dermatitis

DTH – delayed time hypersensitivity

MHC – major histocompatibility complex

DC – dendritic cell

TLR – toll-like receptor

PAMP – pathogen-associated molecular patterns

DAMP – damage-associated molecular patterns

IFN- β – interferon β

IL-8 – interleukin 8

MIP – macrophage inflammatory protein

RT-qPCR – kvantitativní PCR spojená s reverzní transkripcí

qPCR – kvantitativní PCR

dT – deoxythymidin

PSMB2 – gen, kódující beta-4 podjednotku 20S proteazomu

FBS – fetální bovinní sérum

P/S – směs antibiotik penicilin a streptomycin

PBS – fosfátový pufr

DMSO – dimethylsulfoxid

α -MEM – Eagle's Minimal Medium, alpha modification

DNáza / DNase – deoxyribonukleáza

RNáza / RNase – ribonukleáza