

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

**Protizánětlivé účinky hovězího kolostra na *in vitro*
modelu prasečích makrofágů derivovaných z monocytů
po stimulaci lipopolysacharidem**

Hana Faldynová

Brno 2016

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor číslo 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

PROTIZÁNĚTLIVÉ ÚČINKY HOVĚZÍHO KOLOSTRA

na *in vitro* modelu prasečích makrofágů derivovaných
z monocytů po stimulaci lipopolysacharidem

Anti-inflammatory effects of bovine colostrum on *in vitro* model of porcine
monocyte-derived macrophages after stimulation by lipopolysaccharide

Autor: Hana Faldynová

Škola: Gymnázium Brno-Řečkovice, p. o.

Terezy Novákové 936/2, Brno

Externí konzultanti: Ing. Lenka Levá

MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.

Mgr. Monika Vícenová

Interní konzultant: RNDr. Kateřina Cibulková

Brno 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci „Protizánětlivé účinky hovězího kolostra na *in vitro* modelu prasečích makrofágů derivovaných z monocytů po stimulaci lipopolysacharidem“ vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne:

.....

podpis

Experimentální práce byly provedeny na oddělení imunologie Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i., Brno.

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří se podíleli na vzniku této práce a svou radou nebo jinou pomocí přispěli k jejímu zdárnému vytvoření.

Mé díky patří především vedoucímu středoškolské odborné činnosti MVDr. Martinu Faldynovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky, dále Ing. Lence Levé a Mgr. Monice Vícenové za velkou pomoc především v experimentální části. V neposlední řadě musím poděkovat také RNDr. Kateřině Cibulkové za její podnětné připomínky, které mi během práce poskytovala.

Práce byla realizována díky projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QJ1510219 „Komplexní řízení mlezivové výživy telat a její zlepšování jako přirozený nástroj k podpoře zdraví telat, tlumení nákaz a snížení potřeby antibiotik“ a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy LO1218 „Zdravé zvíře jako zdroj zdravé potravin“.

ANOTACE

Kolostrum, jako první produkt mléčné žlázy po porodu, je zdrojem nejen živin, ale také řady imunologicky relevantních molekul – imunoglobulinů, cytokinů, růstových faktorů. Jejich role je přinést novorozenci pasivní ochranu, ale také podílet se na kontrole zánětlivé odpovědi ve střevě po jeho kolonizaci přirozenou mikroflórou. Obsah těchto molekul se s pokračující laktací liší. Stejně tak se vyvíjí biologická hodnota kolostra, které se postupně mění v mléko. Cílem předkládané práce je v *in vitro* podmínkách otestovat dynamiku změn protizánětlivých účinků hovězího kolostra, vzhledem k jeho koncentraci a odlišných termínech po nástupu laktace, na makrofázích modifikovaných z monocytů (MDMF) selat. Výsledkem bylo pozorování míry exprese mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA) pro prozánětlivý interleukin-1 (IL-1) a protizánětlivý interleukin-10 (IL-10), vzhledem k referenčnímu genu hypoxanthin - guanin fosforibosyltransféza (HPRT). V práci byly MDMF kultivovány v médiu obohaceném o různou koncentraci kolostra získaného v různé fázi laktace. Následně byly MDMF stimulovány lipopolysacharidem (LPS) jako významným stimulem zánětlivé reakce. Výsledky získané v předkládané práci ukazují, že kolostrum bylo schopno statisticky významně tlumit zánětlivou odpověď MDMF na stimulaci LPS. Snížení této schopnosti u kolostra získaného v další fázi laktace nebylo statisticky významné.

Klíčová slova:

kolostrum, makrofágy, lipopolysacharid, polymerázová řetězová reakce

ANNOTATION

Colostrum, as the first product of the mammary gland after delivery, is not only a source of nutrients, but also a battery of immunologically relevant molecules - immunoglobulins, cytokines and growth factors. Their role is to provide passive protection of newborn, but also participate in the control of inflammatory responses in the intestine after the colonization with the comensal microflora. The content of these molecules differs as lactation continues. Likewise, biological value of colostrum develops as it gradually turns into milk. The aim of the submitted work is to assess dynamics of changes in anti-inflammatory effects of bovine colostrum in the *in vitro* conditions on monocyte-derived macrophages (MDMF) of piglets. As result, a level of expression of mRNA for proinflammatory interleukin-1 (IL-1) and anti-inflammatory interleukin-10 (IL-10), relative to the reference gene, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase was analysed (HPRT). In the work, MDMF were cultured in medium supplemented with varying concentrations of colostrum obtained in different stages of lactation. Subsequently MDMF were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) as a relevant stimulator of the inflammatory response. The results obtained in the work indicate that colostrum was able to significantly decrease the inflammatory response of MDMF to stimulation with LPS. Reduction of this ability in the colostrum obtained in the following stages of lactation was not statistically significant.

Key words:

colostrum, macrophages, lipopolysaccharide, polymerase chain reaction

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1. ÚVOD	10
1.1. Zánět	10
1.2. Popis kolostra.....	11
1.2.1. Kolostrum a jeho historie	11
1.2.2. Složení.....	12
1.2.3. Význam kolostra	15
1.3. Lidské a kravské kolostrum	17
1.3.1. Lidské kolostrum.....	17
1.3.2. Vzájemná rozdílnost	17
1.4. Prase jako modelové zvíře	17
2. CÍLE PRÁCE.....	19
3. MATERIÁL A METODY	20
3.1. Kolostrum.....	20
3.2. Derivace monocytů na makrofágy.....	20
3.2.1. Izolace monocytů.....	20
3.3. Kultivace makrofágů derivovaných z monocytů.....	26
3.3.1. Kultivace a transformace	26

3.3.2. Stimulace pomocí LPS	27
3.3.3. Měření životnosti buněk.....	28
3.4. Molekulární biologie	29
3.4.1. Izolace nukleové kyseliny.....	29
3.4.2. NanoDrop.....	29
3.4.3. Přepis do cDNA	30
3.4.4. Real – Time polymerázová řetězová reakce	30
3.5. Statistická analýza	32
4. VÝSLEDKY.....	33
4.1. Výsledky měření životnosti buněk	33
4.2. Výsledky polymerázové řetězové reakce.....	36
5. DISKUZE	38
6. ZÁVĚR.....	42
7. POUŽITÁ LITERATURA	43
8. SEZNAM OBRÁZKŮ	47
9. SEZNAM TABULEK	48
10. SEZNAM PŘÍLOH.....	49

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CT	Cycle Treshold
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor)
FGF	fibroblastický růstový faktor
HPRT	hypoxanthin –guanin fosforibosyltransféza
Ig	imunoglobulin
IGF	inzulin podobný růstový faktor 1 (Insuline–like Growth Factor 1)
IL	interleukin
LPS	lipopolysacharid
LTF	laktoferin
MDMF	makrofágy derivované z monocytů
mRNA	mediátorová ribonukleová kyseliny
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
TBP	TATA –binding protein
TGF	transformující růstový faktor (Transforming Growth Factor)
TLR	Toll-like receptory

1. ÚVOD

Kolostrum je první produkt mléčné žlázy, sloužící jako potrava pro novorozence. Obsahuje, kromě živin, velké množství biologicky aktivních látek, kam patří především protilátky a růstové faktory. Je vědecky prokázáno, že v průběhu laktace se vlastnosti kolostra mění. Existuje ale pouze malé množství informací o jeho protizánětlivých vlastnostech a jejich změnách v průběhu času.

1.1. Zánět

Zánět je rychlá komplexní nespecifická reakce organismu na proniknutí patogenu nebo na mechanické poškození. Zánětlivá odpověď probíhá lokálně a následně systémovou odpovědí.

Základní lokální projevy zánětu jsou zčervenání, zteplání, otok a bolest. První tři příznaky jsou důsledkem lokální vazodilatace, neboli roztažení cév. Vazodilatace je způsobena uvolněním látek aktivujících buňky endotelu neboli výstelky cév. Mezi tyto látky patří například histamin, serotonin, komplement a IL-1. Zatímco komplement je skupina plazmatických proteinů, histamin a serotonin jsou vylučovány žírnými buňkami a IL-1 makrofágy. Biologickým důsledkem vazodilatace je například lepší prostupnost neutrofilních granulocytů do místa zánětu, kde jejich hlavní role spočívá zejména ve fagocytóze.

Nejvýznamnější systémové příznaky zánětu jsou horečka, leukocytóza a produkce tzv. proteinů akutní fáze zánětu. Horečka je způsobena stimulací termoregulačního centra nacházejícího se v předním hypotalamu. Tuto stimulaci vyvolávají pyrogeny endogenní, jako například IL-1, a exogenní, jako například LPS. Leukocytóza je zvýšení počtu leukocytů v krvi, které je způsobené zejména aktivací hemopoézy v kostní dřeni.

Proteiny akutní fáze zánětu jsou bílkoviny produkované jaterními buňkami pod vlivem prozánětlivých cytokinů, například IL-1. Mezi tyto proteiny patří například CRP (C-reaktivní protein), jehož biologický význam je ve shlukování bakterií. Zvýšení jeho koncentrace se využívá také v laboratorní diagnostice zánětu bakteriálního původu.

Jednou z nejdůležitějších buněk imunitního systému, které se podílí na zánětlivé reakci, jsou makrofágy, vznikající vcestováním monocytů z kostní dřeně do tkání. Aby mohlo dojít k přeměně monocytu na makrofág, musí dojít ke zvětšení velikosti buňky, zvýšení počtu lyzozomů a receptorů pro imunoglobulin IgG a zvýšení schopnosti fagocytózy. Vzniklé makrofágy jsou následně profesionálními fagocyty, tvořící součást nespecifické imunity. Makrofágy fagocytují buňky zahynulé apoptózou či nekrózou, intracelulární a extracelulární bakterie. Mezi další funkce patří prezentace antigenů T-lymfocytům, řízení hemostázy a hemopoézy a regulace zánětu. Pro svoji činnost makrofágy využívají řadu povrchových receptorů, které jim umožňují rozpoznat struktury typické pro bakterie, viry nebo plísňe. Mezi nejdůležitější receptory patří např. tzv. Toll-like receptory (TLR) nebo receptory CD14, který rozpoznává LPS – základní složku stěny gramnegativních bakterií. Při interakcích konkrétních receptorů s danými ligandy dochází k aktivaci vnitrobuněčné signalizace, která způsobí přenos informace do jádra a následně produkci cytokinů, například prozánětlivého IL-1 a protizánětlivého IL-10.

1.2. Popis kolostra

1.2.1. Kolostrum a jeho historie

Kolostrum neboli mlezivo, bývá definováno jako prvotní mléko vylučované v době porodu a pár dní po něm (Godhia a Patel, 2013). Představuje bohatý zdroj mnoha látek stimulujících obranyschopnost organismu v koncentrované podobě (Godhia a Patel, 2013).

Vzhled kolostra a mléka zralého se od sebe značně liší. Zatímco mléko je ve své podstatě řídká, čistě bílá tekutina, mlezivo je husté a smetanově žluté.

Kolostrum se již tisíce let používá v Indii na léčbu různých nemocí. Ajurvédští lékaři v Indii používají kolostrum pro léčivé a duchovní účely od doby, kdy byl hovězí dobytek poprvé domestikován. Koncem 18. století se začala o kolostrum zajímat západní medicína a to především pro jeho potenciální zdravotní výhody. Zajímavé je, že až do vývoje penicilinu a jiných syntetických antibiotik ve 20. století, se kolostrum běžně používalo v boji s bakteriální infekcí. Na počátku 20. století bylo zaznamenáno, že hladina protilátek v prvním vyprodukovaném mléce po narození byla mnohem vyšší, než hladina v mléce, které bylo vyprodukováno o 72 hodin později.

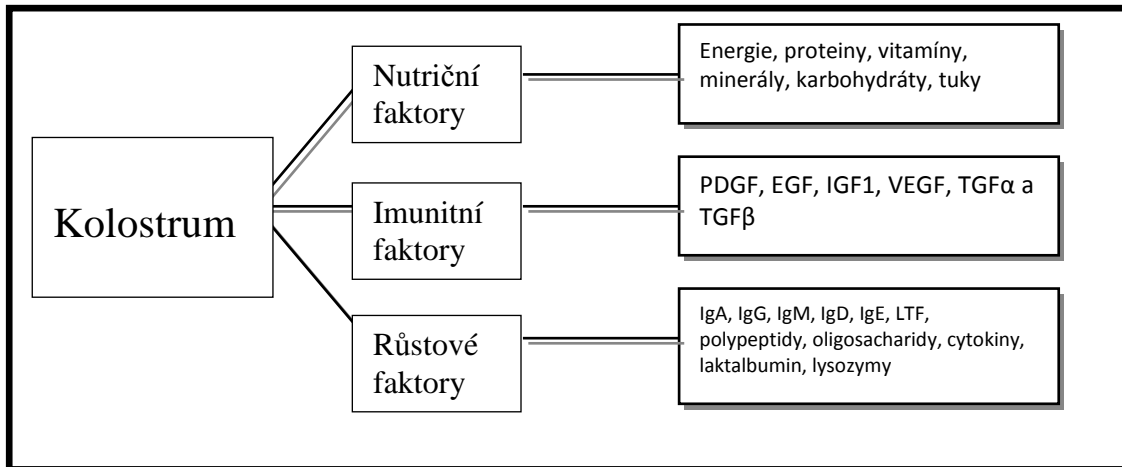
V současné době existuje přibližně 2 000 publikovaných vědeckých článků, dokumentujících bezpečnost a účinnost používání kolostra (Godhia a Patel, 2013).

1.2.2. Složení

Kolostrum se od mléka později secernovaného liší nejen vizuální stránkou, ale i složením. Mlezivo obsahuje více mléčného albuminu (laktalbuminu) a mléčného proteinu (laktoproteinu), také je bohatší o protilátky, navozující novorozencům pasivní imunitu (Godhia a Patel, 2013).

Jak lidské tak i kravské mlezivo obsahuje, kromě živin, velké množství proteinů, vitamínů, esenciálních mastných kyselin a tuků. Dále koenzymy, oligosacharidy, doplňkové faktory, leukocyty a polypeptidy bohaté na prolin – speciální regulační polypeptid (uvolňuje imunitní systém, když je nadměrně činný a povzbuzuje, když je činný nedostatečně). Obsahuje také velké množství inhibitorů proteáz

a imunoglobulinů (Ig), také interferon a taurin pro rozvoj mozku, dále bioaktivní glykoprotein, laktoferin (LTF) a růstové faktory (Obr. 1). Kolostrum samozřejmě obsahuje i protilátky, které mají přímé účinky proti bakteriím, virům a plísním (Godhia a Patel, 2013).



Obr. 1: Složení kolostra (upraveno a přeloženo dle Godhia a Patel, 2013)

Ig obsažené v kolostru byly úspěšně použity v léčbě nedostatku krevních destiček, anémie, nedostatku leukocytů, svalových slabostí, zánětlivých onemocnění nervových kořenů, roztroušené mozkomíšní sklerózy a řady dalších onemocnění (Zou a kol., 2015).

LTF je přírodní imunostimulátor, pomáhající novorozenci v přežití dnů, kdy se ocitá v prostředí plném neznámých bakterií a virů. Jedním z hlavních příznivých účinků LTF je jeho schopnost redukovat záněty prostřednictvím regulace zánětlivých cytokinů, jako jsou například IL – 1, IL – 6 a faktor nekrózy tumorů (Zou a kol., 2015).

Kolostrum obsahuje také růstové faktory: transformující růstový faktor (Transforming Growth Factor – zn. TGF) α i β , Insuline–like Growth Factor 1 i 2 (IGF1, IGF2),

gonadotropin, somatotropin a další, které usnadňují hojení chronických ran po operacích a úrazech – stimulují růst kostí, svalů a regeneraci poškozených nervů, pomáhají při spalování tuků, napomáhají při stavbě oslabeného svalstva, zabezpečují syntézu deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a ribonukleové kyseliny (RNA), regulují hladinu cukru v krvi a spolu s dalšími složkami působí rovněž na leukocyty. TGFβ obsažený v mlezivu má tlumivé efekty na některé typy kostní rakoviny (například osteosarkom).

Co se vitamínů týče, kolostrum je bohatým zdrojem vitamínů A, E, C, B1, B3, B5, B6, B12, cholinu, kyseliny listové, také obsahuje dostatečné množství vitamínu D, provitamínu A a beta karotenu.

Minerály a stopové prvky jsou obsaženy tak, aby byly pro novorozence lehce vstřebatelné. Nejlépe vstřebatelné je pro kojence železo (Zou a kol., 2015).

1.2.2.1. Protizánětlivé účinky

Kolostrum, jakožto první potrava, je velmi důležitá pro zdravý vývoj, růst a přirozený rozvoj imunitního systému u novorozenců. Díky němu je organismus podporován ve dvou hlavních směrech. Za prvé, mlezivo má několik imunitních faktorů poskytujících silnou podporu pro imunitní systém. Za druhé, spousta jeho růstových faktorů nabízí spektrum podpory organismu na povzbuzení optimálního zdraví a léčby. Protilátky a růstové faktory hrají roli v prevenci infekce, která je v pasivní imunitě. Životně důležité živiny pomáhají při vývoji tkání, růstu a zisku energie. Tyto růstové faktory přítomné v kolostru poskytují možnost nové léčby při žaludečních a střevních potížích (Godhia a Patel, 2013).

1.2.3. Význam kolostra

Jak již bylo zmíněno, všechny látky obsažené v kolostru pomáhají novorozenci přežít dny, kdy se ocitá v novém prostředí, včetně zajištění poporodní přirozené pasivní imunity, tedy příjem hotových protilátek od matky, které novorozence chrání v prvních týdnech života před infekcemi ze zevního prostředí, když ještě nejsou schopna vlastní imunitní reakce a produkce protilátek. Zejména u přežvýkavců, u nichž v děloze nedochází k žádné výměně imunitních faktorů, kolostrum (a v menší míře mléko) poskytuje ochranu prostřednictvím vysokého množství Ig, bez kterého by mládě přežvýkavce nepřežilo.

Mlezivo se vzhledem k jeho výjimečnému složení začalo uplatňovat ve farmaceutickém průmyslu. Primární oblastí použití kolostra je stimulace lidského imunitního systému a mírnění projevů alergií. Pro tyto účely se používá kolostrum bovinní (kravské), protože je ve svých parametrech velmi blízké kolostru lidskému. Profily Ig jsou si velmi podobné a dokážou bez ztráty své účinnosti projít částí lidského traktu až do střev, kde pomáhají stimulovat imunitu.

Ig obsažené v kolostru byly úspěšně použity v léčbě trombocytopenie, anémie, neutropenie, myasthenia gravis, syndromu Guillan Barré, roztroušené mozkomíšní sklerózy, systémového lupu erythematodes, revmatoidní artritidy, chronického únavového syndromu a řady dalších onemocnění. S úspěchem bývá kolostrum používáno při potlačování úporných dětských průjmů, způsobených viry a baktériemi rodu *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* apod. Velmi významná je rovněž schopnost kolostra podporovat růst bifidobaktérií. Jeho užívání je žádoucí po léčbě antibiotiky pro obnovu porušené střevní mikroflóry.

V lékařské vědě se kolostrum také používá pro ochranu střevního traktu před vedlejšími účinky nesteroidních protizánětlivých léků. Při podávání kolostra se nesnižuje léčebný efekt, ale je chráněna střevní sliznice a eliminují se tak zažívací potíže. Tento účinek se ukazuje jako velmi pozitivní hlavně u nespecifických zánětů střeva jako je Crohnova nemoc nebo ulcerózní kolitida.

Studium hovězího kolostra je důležité nejen z pohledu humánní medicíny, ale i z čistě veterinárního a zemědělského hlediska. Nejčastěji uváděným příkladem takového použití je v kontextu s paratuberkulózou hovězího dobytka. Jedná se o onemocnění způsobené napadením organismu velmi odolnou bakterií *Mycobacterium avium paratuberculosis*, která je schopná v prostředí přežít až 120 týdnů a jejíž diagnostiku je možno provést až laboratorním vyšetřením. Původce u dobytka (nejedná se pouze o dobytek hovězí, ale také ovce a jiná zvířata, včetně některých šelem) vyvolává neléčitelné střevní onemocnění, na jehož konci zvíře hyne na vyčerpání, dehydrataci a vyhublost. Jelikož nákaza je perorální, zvíře se infikuje krmivem, znečištěným vodním zdrojem a znečištěným stelivem. Základním prvkem přenosu je infekce z krávy na tele prostřednictvím kolostra a mléka, a kontaktem telete s nakaženými krávami v silně infekčním prostředí (Stabel a kol., 2014). Pravděpodobnost nakažení plodu intrauterinně je závislá od stupně infekce u matky. U kolostrální infekce je to prostší – v případě silně probíhající infekce u matky je pravděpodobnost nakažení novorozeného telete prakticky 100%. U okamžitého oddělení telete od matky se procentuálně dostáváme téměř na nulu. Samotná separace mláďat by ale byla zbytečná - musí být nahrazeno i kolostrum. A právě toto mlezivo musí projít komplikovanou kontrolou, která by bez jeho předchozího zkoumání nebyla možná (Godden a kol., 2015). Kolostrum určené pro takovýto odchov telat ale musí být správně odebrané, ošetřené a skladované, aby se nesnížily jeho biologické vlastnosti.

1.3. Lidské a kravské kolostrum

1.3.1. Lidské kolostrum

Stejně jako každý savec, i člověk patří mezi producenty kolostra. Lidské kolostrum je obzvláště bohaté na Ig, antimikrobiální peptidy (LTF a laktoperoxidáza) a jiné biologicky aktivní molekuly, včetně růstových faktorů, důležité pro výživu, růst, vývoj a pasivní imunitu novorozenců.

1.3.2. Vzájemná rozdílnost

Je vědecky prokázáno, že kolostrum kravské obsahuje asi 30 až 40krát více imunitních faktorů, než kolostrum lidské. Protože lidský novorozenec, na rozdíl od telete, může tyto faktory přijímat prostřednictvím placenty, nemusí být lidské mlezivo tak bohaté na růstové a obranné protilátky nebo některé nutriční faktory (Tab. 1).

Nutriční faktory	Lidské kolostrum	Kravské kolostrum
Energie (kcal)	58	130
Proteiny (g)	3,7	14,9
Laktóza (g)	5,3	2,6
Tuk (g)	2,9	6,7
na 100 ml kolostra		

Tab. 1: Nutriční složení lidského a kravského kolostra (upraveno a přeloženo dle Godhia a Patel, 2013)

1.4. Prase jako modelové zvíře

Prase patří mezi nejvíce zkoumané druhy ve veterinární imunologii. Jistě k tomu přispívá i fakt, že se prasečího modelu využívá v humánní medicíně, což je dáno hned několika aspekty: podobnou velikostí, složením potravy, fyziologií a anatomií srdce, plic a ledvin, strukturou kůže a samozřejmě podobným imunitním systémem. Navíc počet

selat v jednom vrhu se většinou pohybuje okolo deseti a díky struktuře placenty nedochází prakticky k žádnému přenosu Ig z matky na plod (Pastoret a kol., 1998).

Období gravidity prasnic je 115 dní a výskyt různých linií T a B lymfocytů v krvi a orgánů prasečího embrya a plodu je dobře zdokumentován (Rothkötter, 2002). A jelikož existují mnohá finanční a etická omezení, jak správně analyzovat rozvíjející se imunitní systém u lidí, je zapotřebí velké množství experimentálních zvířat. S různými kmeny standardních a miniaturních prasat k dispozici, a na rychle rostoucím množství imunologických činidel, prase představuje důležitý experimentální model pro nákladově efektivní studia na vývojové imunologii (Sachs, 1994).

2. CÍLE PRÁCE

Cílem projektu, jehož součástí je i má středoškolská odborná činnost, je v *in vitro* podmínkách otestovat dynamiku změn protizánětlivých účinků hovězího kolostra, vzhledem k jeho koncentraci a odlišných termínech po nástupu laktace, na makrofázích modifikovaných z monocytů selat. Výsledkem by mělo být pozorování míry exprese mRNA pro prozánětlivý IL-1 a protizánětlivý IL-10, vzhledem ke dvěma referenčním genům – hypoxanthin–guanin fosforibosyltransféza (HPRT) a TATA–binding protein (TBP).

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Kolostrum

Pro experiment bylo použito kolostrum ve specifikovaných termínech po začátku laktace. Kolostrum bylo získáno ze 3 krav (kříženci černostrakatého plemene) z komerčního chovu na 4 laktace. Vzorky byly odebrány v čase porodu a dále 24 a 72 hodin po porodu.

3.2. Derivace monocytů na makrofágy

Jak již bylo zmíněno, protizánětlivé účinky mleziva byly testovány na makrofázích získaných derivací monocytů selat.

3.2.1. Izolace monocytů

3.2.1.1. Odběr krve

Krev byla odebrána punkcí *veny jugularis* v objemu 10 ml a následně byla smíchána s antikoagulační látkou Heparin (50 UI/ml, Zentiva). V první části práce, založené na sledování dynamiky změn vzhledem ke koncentraci kolostra, proběhl odběr u pěti prasat, jejichž charakteristika je definována v následující tabulce (Tab. 2).

sele	Su 1	Su 12	Su 19	Su 37	Su 49
stáří	3 měsíce	3 měsíce	3 měsíce	5 měsíců	5 měsíců
hmotnost	48 kg	50 kg	47 kg	80 kg	83 kg

Tab. 2: Základní údaje o prasatech použitých v první části práce

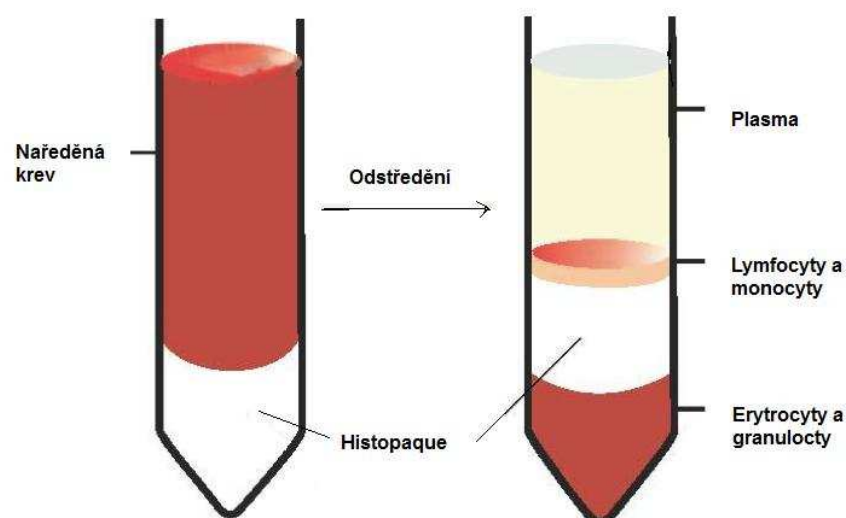
V druhé části výzkumu, spočívající na pozorování dynamiky změn vzhledem ke stáří kolostra, odběr proběhl u pěti prasat, jejichž charakteristika je definována v následující tabulce (Tab. 3).

sele	Su 22	Su 24	Su 25	Su 30	Su 32
stáří	3 měsíce	3 měsíce	3 měsíce	3 měsíce	3 měsíce
hmotnost	49 kg	51 kg	50 kg	52 kg	49 kg

Tab. 3: Základní údaje o prasatech použitých v druhé části práce

3.2.1.2. Gradientní odstředování

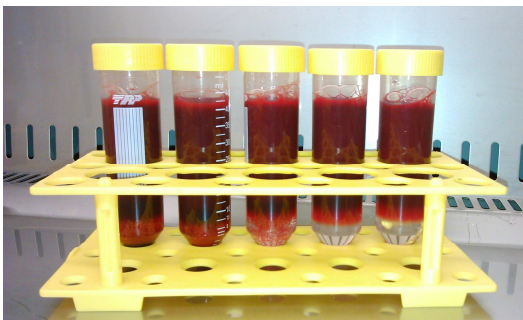
Gradientní odstředování, neboli izopyknická sedimentace, je velmi častý způsob centrifugace. V mé práci byla použita izolace pomocí tzv. nespojitých gradientů. Jde o jednoduchý způsob separace různých látek na základě jejich rozdílné hustoty. Jedná se o prosté navrstvení roztoků, přičemž po centrifugaci se buňky rozdělí mezi jednotlivá rozhraní roztoků takovým způsobem, že každý typ buňky zůstane izolován mezi roztokem s vyšší a nižší hustotou, než je hustota dané buňky (Obr. 2).



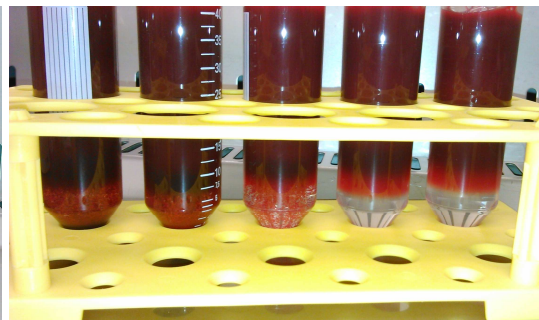
Obr. 2: Nákres izopyknické sedimentace (převzato a upraveno z www.bio-protocol.org)

Metoda gradientního odstředování byla použita pro oddělení neutrofilních granulocytů od tzv. mononukleárních buněk (tj. lymfocytů a monocytů). Důvodem je fakt, že pro izolaci monocytů byla v následném kroku použita metoda imunomagnetického sortingu založená na přítomnosti molekuly CD14 na povrchu monocytů. Tato molekula je přítomna ale také na neutrofilních granulocytech.

Ke vzorkům krve bylo přidáno DPBS (Thermo Fisher Scientific, USA) v poměru 1:2. Směs byla pomalu navrstvena na Histopaque 1.077 (Sigma-Aldrich, USA) (Obr. 3). Vzorky byly centrifugovány (450 g, 40 minut, nebrzděno). Výsledkem bylo oddělení monocytů a lymfocytů pár centimetrů nad dnem zkumavky na rozhraní mezi Histopaque a plasmou. U některých vzorků docházelo k samovolnému propouštění vzorku do Histopaque i bez centrifugace (Obr. 4).



Obr. 3: Krev byla nejdříve smíchána s DPBS a následně vrstvena na Histopaque 1.077

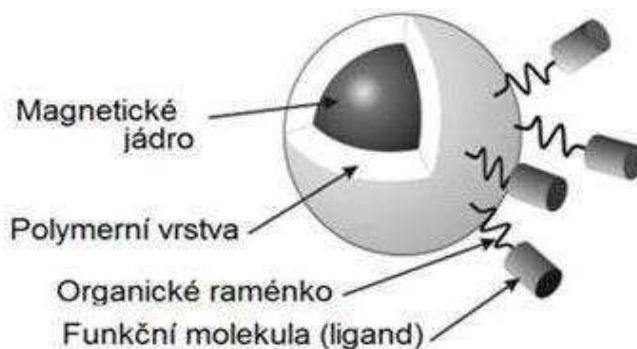


Obr. 4: Viditelnost samovolného propouštění vzorku do Histopaque 1.077

3.2.1.3. Imunomagnetický sorting

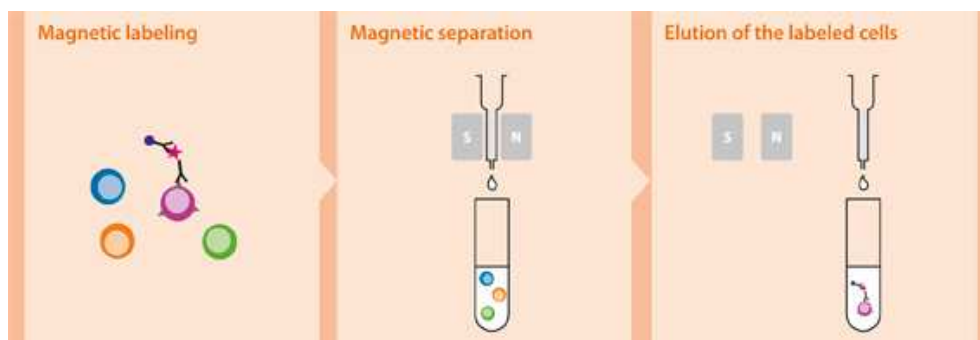
Imunomagnetický sorting, neboli imunomagnetická separace, je založený na vazbě tzv. selekčních protilátek na antigen, přičemž na tuto protilátku je navázána magnetická částice (Obr. 5). Tento způsob separace je často využíván v biotechnologických aplikacích, jako například izolace buněk, purifikace nukleové kyseliny nebo enzymů. Separace buněk, popřípadě biomolekul, za pomoci

magnetických částic má výhodu především v krátké době trvání separace a snížené potřebě využití chemických činidel (Vaňásek, 2015).



Obr. 5: Složení magnetické částice (Vaňásek, 2015)

Imunomagnetický sorting se používá ve dvou základních uspořádáních – pozitivním a negativním. Pozitivní separace je založena na výběru buněk s určitou povrchovou molekulou. Negativní naopak na odstranění všech buněk, které danou molekulu nenesou. Na buňku je nejprve navázána protilátka, na kterou je následně navázána protilátka druhá, obsahující magnetické částice. Celá suspenze následně protéká separační kolonou. Ta je umístěna v magnetickém poli, které je schopno zachytit magnetické částice s navázanými buňkami, přičemž většina zbývajících buněk (často dochází k zachycení i malého množství buněk, které nemají navázanou magnetickou kuličku a obráceně, proto následně dochází k ověření čistoty suspenze pomocí průtokové cytometrie) kolonou projde. Pokud se jedná o separaci pozitivní, jde nám o frakci buněk, která zůstala zachycena v magnetickém poli (Obr. 6). V opačném případě se nám jedná o frakci, co kolonou prošla, tedy o buňky bez dané povrchové molekuly, na kterou by se magnetická částice s protilátkou navázala (Vaňásek, 2015).



Obr. 6: Nákres imunomagnetického sortingu (<http://www.miltenyibiotec.com>)

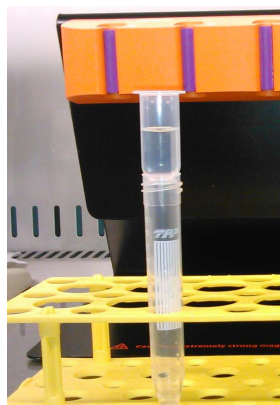
Pomocí přístroje Coulter counter byl změřen počet buněk v suspenzi (Obr. 7 a 8). Na základě hustoty periferních krevních mononukleárních buněk ve vzorku (mezi 150 až 300×10^6 buněk) byla přidána monoklonální protilátka Mouse anti pig CD14 (klon MIL2, AbD Serotec, Oxford, UK, $10 \mu\text{l}$ na 10^8 buněk). Po 13 minutách kultivace v prostředí s teplotou 4°C , byly buňky propláchnuty DPBS a byla přidána protilátka Anti-Mouse IgG MicroBeads ($35 \mu\text{l}$ na 10^8 buněk). Po 20 minutách kultivace v prostředí s teplotou 4°C , byly buňky opětovně propláchnuty DPBS. Imunomagnetický sorting probíhal v přístroji Multi Stand (Miltenyi Biotec, Německo). Kolony musely být nejprve propláchnuty 7 ml DPBS (Obr. 9). Část roztoku byla napipetována do kolony a doředěna DPBS. Pro co nejlepší čistotu, prošly všechny vzorky kolonou pětkrát. Jednalo se o pozitivní separaci (Obr. 10).



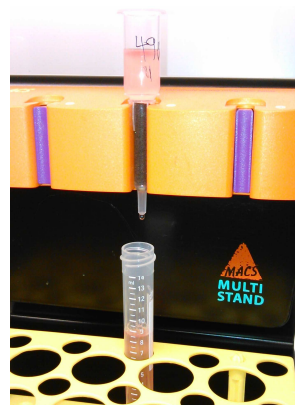
Obr. 7: Přístroj Coulter counter se vlastně skládá ze dvou navzájem komunikujících přístrojů



Obr. 8: Coulter counter nejdříve nasál vzorek, vypustil ho nařaděný a druhá část přístroje tuto suspenzi opětovně nasála a zjistila, kolik se v ní nachází červených a bílých krvinek



Obr. 9: Kolony byly nejdříve propláchnuty DPBS



Obr. 10: Jelikož se jednalo o pozitivní separaci, požadované buňky se zachytávaly v magnetickém poli kolony

3.2.1.4. Průtoková cytometrie

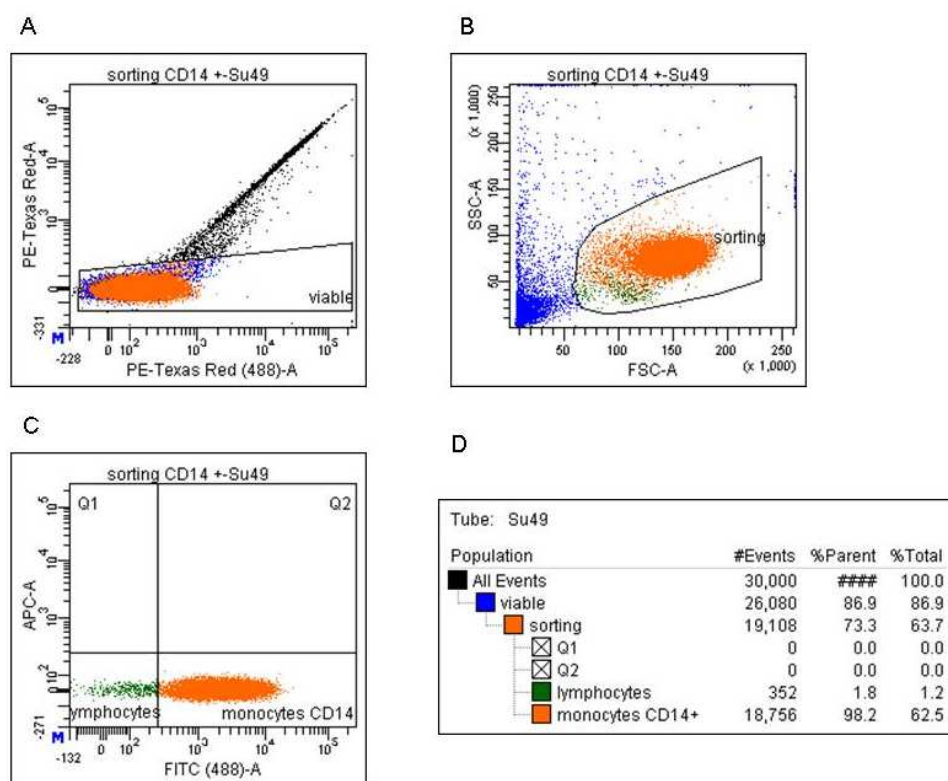
Průtoková cytometrie je laboratorní metoda, která umožňuje v nejširším slova smyslu analýzu buněk v pohybu. Mezi základní parametry patří fyzikální a chemické vlastnosti buněk, identifikace buněčných typů a stanovení procentuálního zastoupení hledaných buněk na základě detekce daných povrchových molekul pomocí protilátky proti nim. Tato metoda je velice přesná, rychlá a navíc umožňuje současně měřit několik parametrů a to až rychlostí 100 000 buněk za jednu sekundu. Technika je založená na průchodu jednotlivých buněk laserovým paprskem, který umožňuje analýzy díky detekci rozptylu paprsku nebo díky aktivaci na buňku vázaných tzv. fluorochromů (Eckschlager a kol., 1999).

V práci byla průtoková cytometrie použita ke stanovení čistoty imunomagnetického sortingu.

Ke vzorkům buněk získaných pomocí imunomagnetického sortingu byla přidána sekundární protilátka Goat Anti – Mouse IgG2b FITC¹, která se naváže na monoklonální protilátku proti molekule CD14, a následně propidium jodid² za účelem vyznačení mrtvých buněk. Vzorky byly centrifugovány (450 g, 20 minut) a analyzovány v přístroji BD LSRFortessa (BD Biosciences, Austrálie) pomocí softwaru Diva. Způsob počítačové analýzy je naznačen v následujícím obrázku (Obr. 11). Ve všech případech bylo dosaženo čistoty vyšší než 97 %.

¹FITC, neboli fluorescein izothiokyanát je nejčastější fluorochrom pro průtokovou cytometrii emitující při 530 nm.

² Propidium jodid je interkalární fluorescenční barvivo, používané k označení nukleové kyseliny (vaznost: 4-5 bází na 1 molekulu barviva) a díky větším rozměrům je schopno vstoupit pouze do buněk s narušenou membránou.



Obr. 11: Způsob počítačové analýzy průtokovou cytometrií

V prvním kroku byly vybrány buňky negativní na propidium jodid (A). Následně byly mononukleární buňky identifikovány na základě jejich velikostních parametrů: FSC = velikost a SSC = granularita buněk (B). V dalším kroku byly kvantifikovány buňky nesoucí znak CD14 (C) včetně statistické analýzy (D).

3.3. Kultivace makrofágů derivovaných z monocytů

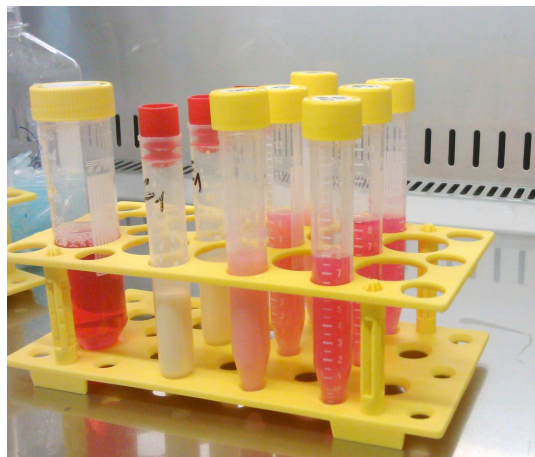
3.3.1. Kultivace a transformace

Monocyty byly nasazeny do 24 jamkových destiček od firmy TPP (Techno Plastic Products AG, Švýcarsko) v množství $0,2 \times 10^6$ buněk na jamku. Kultivace proběhla v médiu složeném z D-MEM od firmy Lonza (Švýcarsko) a prasečího séra od firmy Gibco (USA) v poměru 4:1, s přidanými antibiotiky *Penicillin streptomycin* od firmy Sigma (USA). Takto byly buňky kultivovány pět dnů v prostředí 37 °C v inkubátoru s atmosférou obohacenou o 5 % oxid uhličitý.

Po pěti dnech bylo médium vyměněno. K buňkám, které byly použity v první části práce bylo na 48 hodin k patřičným vzorkům (Obr. 12) přidáno kolostrum o daných koncentracích – 10%, 1% a 0.1% (Obr. 13). Buňky, použité v druhé části práce byly kultivovány s kolostry, které byly odebrány v odlišných termínech po nástupu laktace (bezprostředně, 24 a 72 hodin po porodu) v 1% koncentraci.



Obr. 12: Kultivace vzorků (zleva doprava): kontrola, kultivace s 10%, 1% a 0.1% kolostrem E a 10% a 1% kolostrem G



Obr. 13: Médium a kolostra o různých koncentracích

3.3.2. Stimulace pomocí LPS

Po 48 hodinách bylo médium opětovně vyměněno a příslušné suspenze makrofágů byly stimulovány LPS z bakterie *Salmonella enterica* (Sigma, USA, 1 μ g/1 ml, 4 hodiny).

LPS je hlavní složka buněčných membrán gramnegativních bakterií. Jedná se o toxin, uvolňovaný bakteriemi po zániku její buněčné stěny. Pro bakterii samotnou je velmi důležitý – přispívá k její strukturní stabilitě a zároveň slouží jako ochrana membrány. LPS se skládá ze tří částí – lipid A, který je zodpovědný za toxicitu gramnegativních bakterií, dále oligosacharidové jádro spojující lipid A s poslední částí, O-antigenem, určujícím antigenní specifickou baktérii. Mezi nejznámější biologické účinky tohoto

toxinu patří stimulace mononukleárních fagocytů k produkci endogenních pyrogenů (např. IL-1), stimulace imunitního systému (aktivace makrofágů, lymfocytů B), způsobuje poruchy srážlivosti krve a může vyvolat i toxický šok.

Po 4 hodinách byly vzorky centrifugovány (450 g, 4 minuty) a supernatant byl následně přepipetován do ependorfeček. K sedimentům bylo přidáno 175 μ l RLT Bufferu na jamku, za účelem lyze buněk makrofágů.

3.3.3. Měření životnosti buněk

Existuje více způsobů na detekci viability buněk, které jsou založeny na různých metodách. Jednou z těchto metod je měření laktát dehydrogenázy (LDH) jako stabilního cytoplazmatického enzymu, který je z buňky uvolňován po její lýze. Množství uvolněného LDH je měřeno po 30 minutové enzymatické reakci, při které dochází ke konverzi tetrazoliových solí na červený formazan. Intenzita změny barvy je přímo úměrná množství uvolněného LDH (Vicenova a kol., 2014).

Do 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 50 μ l Assay Buffer (CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, USA). Následně bylo přidáno 50 μ l příslušných supernatantů. Po 30 minutové kultivaci při pokojové teplotě v temnu byla výsledná absorbance analyzována na přístroji Synergy Hybrid Reader (BioTek, USA).

3.4. Molekulární biologie

3.4.1. Izolace nukleové kyseliny

Následující postup je dodržován podle návodu z RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Německo).

K fixované DNA byl přidán 70% ethanol v poměru 1:1. Vzorky byly v centrifugačních RNA vazebných kolonkách s membránou centrifugovány (9 500 g, 15 sekund). Ethanol byl odstraněn. Do každé vazebné kolonky bylo přidáno 700 µl Bufferu RW1 a vše bylo následně centrifugováno (9 500 g, 15 sekund). Buffer byl odstraněn. Poté bylo do každé kolonky přidáno 500 µl Bufferu RPE a opět bylo vše centrifugováno (9 500 g, 15 sekund). Buffer byl odstraněn. 500 µl RPE Bufferu bylo přidáno podruhé a znovu došlo k centrifugaci (9 500 g, 2 minuty). Po odstranění Bufferu byly kolonky s membránou umístěny do nových sběrných částí a centrifugovány (9 500 g, 1 minuta). Kolonky s membránou byly vloženy do ependorfeek a do každé bylo přidáno 15 µl RNase-free water a vše bylo centrifugováno (9 500 g, 1 minuta). RNA se díky RNase-free water uvolnila z membrán do ependorfeek.

3.4.2. NanoDrop

NanoDrop je velmi přesný typ širokospektrálního spektrofometru, používaný k měření vzorků o objemu 0.5 – 2 µl. Přístroj je určený převážně k měření koncentrace a čistoty nukleových kyselin, k fluorescenčnímu značení DNA a RNA čipů, k měření koncentrace bílkovin a k fluorescenčnímu značení bílkovin, konjugátů a metaloproteinů. V našem případě byl použit k měření čistoty RNA.

Měření probíhalo v přístroji NanoDrop 2 000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) při poměru absorbancí 260/280. Při této absorbanci je za čistou RNA považován poměr 2.0. U nižších hodnot je považována za znečištěnou.

Jelikož se poměr v našich vzorcích pohyboval mezi čísly 2.02 až 2.14, můžeme izolovanou RNA považovat za čistou.

3.4.3. Přepis do cDNA

Jelikož v PCR reakci nemůže RNA sloužit jako templát, musí nejprve být RNA převedena do tzv. komplementární DNA³ (cDNA), pomocí retrovirové zpětné transkriptázy. Na každou reverzní transkripci bylo použito 12 µl RNA extrakčního produktu a 8.5 µl RT PreMix. RT PreMix se skládá z 1 µl nespecifických oligo(dT) primerů, 1 µl PCR dNTP mixu⁴ (Top – Bio, Česká republika), 4 µl pěti pufferů (Invitrogen, USA), 1 µl DTT dithiothreitolu (Invitrogen, USA), 0.5 µl inhibitoru ribonukleasy prasečích jater o 5 000 jednotkách (Takara, Japonsko) a 1 µl MLV reverzní transkriptázy – 40 000 U (Invitrogen, USA). Reverzní transkripce byla prováděna při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny.

3.4.4. Real – Time polymerázová řetězová reakce

Real – Time polymerázová řetězová reakce (qPCR) je metoda pro enzymatickou syntézu sekvence DNA v *in vitro* podmínkách. Tato kvantifikační metoda je založena na detekci fluorescence, uvolňující se v přímé úměře s množstvím amplifikované DNA. Fluorescence vzniká díky barvivu interkalujícímu se do DNA. K nejpoužívanějšímu barvivu patří SYBR Green. K emisi záření dochází ve chvíli, kdy se barvivo naváže do dvoušroubovice DNA. Množství produktu je tedy přímo úměrné množství DNA.

Pro reakce jsou využity dva oligonukleotidové primery. Pro kvantifikaci je zásadní hodnota tzv. Cycle Treshold (CT), udávající cyklus, ve kterém dochází k překročení

³ cDNA je DNA syntetizovaná podle RNA

⁴ koncentrace: 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM GTP a 10 mM dTTP

prahu detekce. Hodnota CT genu hledaného je následně normalizována k hodnotě CT genu referenčního.

V real-time PCR analýze, byla exprese RNA kvantifikována v triplicátech s celkovým objemem 3 µl, umístěných v 384 jamkových destičkách. Vlastní měření proběhlo na přístroji LightCycler 480 (Roche Applied Science). K manipulaci s roztoky bylo použito zařízení NanoDrop II Liquid Dispencer (Innovadyne technologies, Kanada). Vlastní reakční směs sestávala z cDNA jednotlivých vzorků, QuantiTect SYBR Green PCR master mix (Qiagen, Německo) a 10 pmol párů primerů pro příslušné geny (Generi BioTech, Česká republika). Sekvence jednotlivých primerů jsou sumarizovány v tabulce (Tab 4). Reakce proběhla za následujících podmínek: denaturace (95 °C, 15 minut) a 45 amplifikačních cyklů (95 °C, 15 sekund; 58 °C, 30 sekund; 72 °C, 30 sekund). Ze dvou kandidátních referenčních genů byl na základě následné analýzy jako více stabilní vybrán gen HPRT-1. Ze získaných dat byla spočítána relativní exprese 2 genů našeho zájmu (GOI) podle následujícího vzorce: $[1/(2^{\text{GOI CT}})] / [1/(2^{\text{referenční gen CT}})]$ (Nygard a kol., 2007).

Gen	Sekvence primerů	Charakteristika genu
HPRT-1 (Zelnickova a kol., 2008)	F: GAGCTACTGTAATGACCAGTCAACG R: CCAGTGTC AATTATATCTTCAACAATCAA	referenční gen
TBP-1 (Nygard a kol., 2007)	F: AACAGTTCAGTAGTTATGAGCCAGA R: AGATGTTCTCAAACGCTTCG	referenční gen
IL-1 β (Pavlova a kol., 2011)	F: GGGACTTGAAGAGAGAAGTGG R: CTTCCCTTGATCCCTAAGGT	prozánětlivý gen
IL-10 (Kyrova a kol., 2012)	F: TGAAGAGTGCCTTTAGCAAGCTC R: CTCATCTTCATCGTCATGTAGGC	protizánětlivý gen

Tab. 4: Sekvence jednotlivých primerů

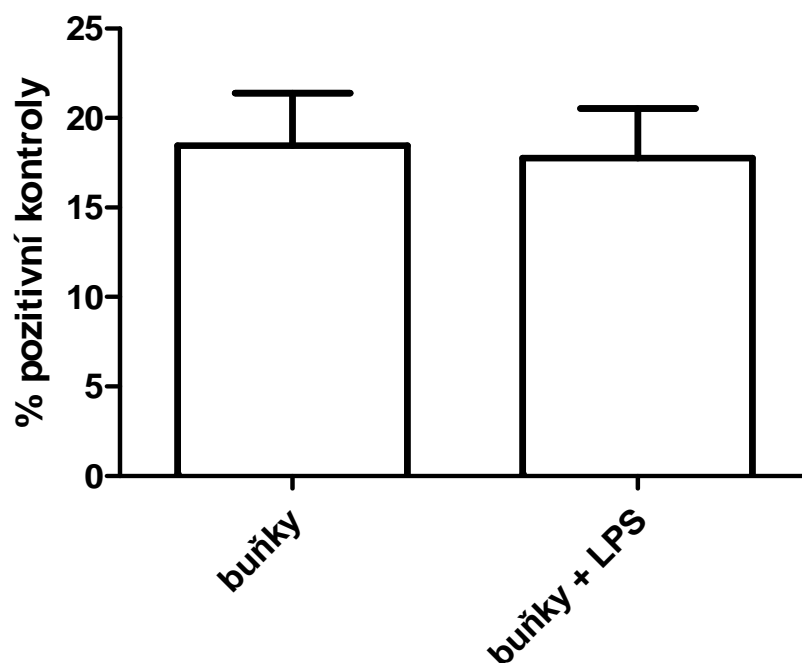
3.5. Statistická analýza

Pro srovnání statistické významnosti nalezených změn bylo použito párové neparametrické srovnání dle Wilcoxonova. Za statisticky významnou byla považována hodnota $p \leq 0,05$. Pro analýzu a pro tvorbu grafů byl použit počítačový program Prism 5 for Windows (GraphPad Software, Inc., USA).

4. VÝSLEDKY

4.1. Výsledky měření životnosti buněk

Pomocí detekce LDH byla analyzována životnost buněk. Prvním sledovaným parametrem bylo zjistit, zda stimulace buněk pomocí LPS má vliv na životnost buněk. Jak je patrné z obrázku (Obr. 14), u obou sledovaných skupin dosahovala aktivita LDH cca 20 % pozitivní kontroly. Statistická analýza (párové neparametrické srovnání dle Wilcoxon) neprokázala statisticky významný rozdíl ($p=0.0625$).



Obr. 14: Vliv stimulace MDMF pomocí LPS na jejich životnost

Absorbance v testu Cytotoxicity Assay u kultury MDMF po 4 hodinách kultivace s LPS (pravý sloupec) a bez LPS (levý sloupec). Hodnoty byly vztaženy k absorpci pozitivní kontroly v testu. Výsledky jsou ukázány jako průměr \pm SD ($n=5$).

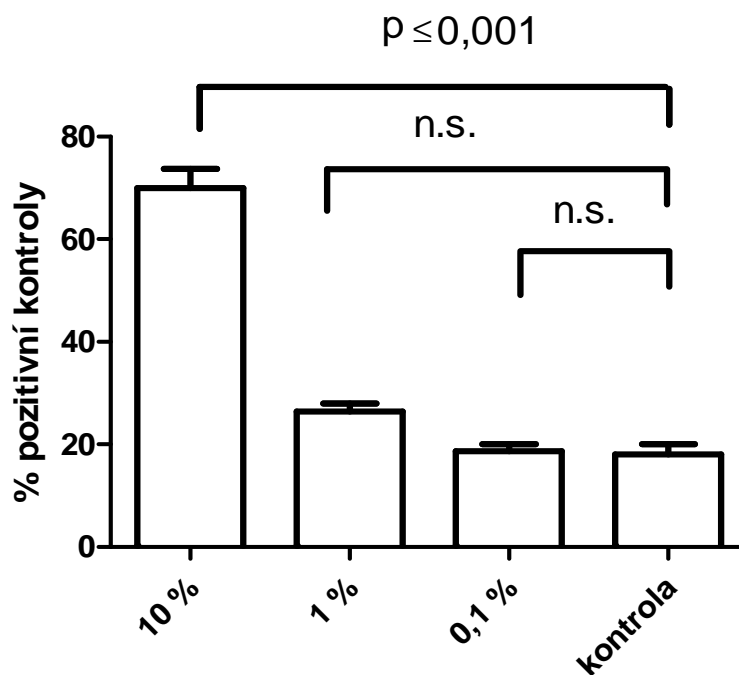
Srovnáním jednotlivých hodnot lze vyzorovat trend k mírně nižší hodnotě LDH (tj. vyšší životnosti buněk) po stimulaci LPS (Tab. 5).

LDH buněk bez stimulace	LDH buněk se stimulací
23,114750	22,322400
26,604480	25,373130
18,417550	17,712770
11,279760	11,160710
12,901790	12,247020

Tab. 5: Vliv stimulace MDMF pomocí LPS na jejich životnost

Absorbance v testu Cytotoxicity Assay u kultury MDMF po 4 hodinách kultivace s LPS (pravý sloupec) a bez LPS (levý sloupec). Hodnoty byly vztaženy k absorbaci pozitivní kontroly v testu. Výsledky jsou ukázány jako individuální hodnoty.

Dalším sledovaným parametrem byl vliv kultivace buněk v médiu obohaceném o různé koncentrace kolostra. Z grafu (Obr. 15) je patrné, že koncentrace 0.1 % a 1 % neměly statisticky významný vliv na aktivitu LDH. Naopak, koncentrace 10 % byla již natolik vysoká, že životnost buněk poklesla statisticky velmi významně. Tento fakt vedl k tomu, že tato skupina byla z dalších analýz vyloučena.

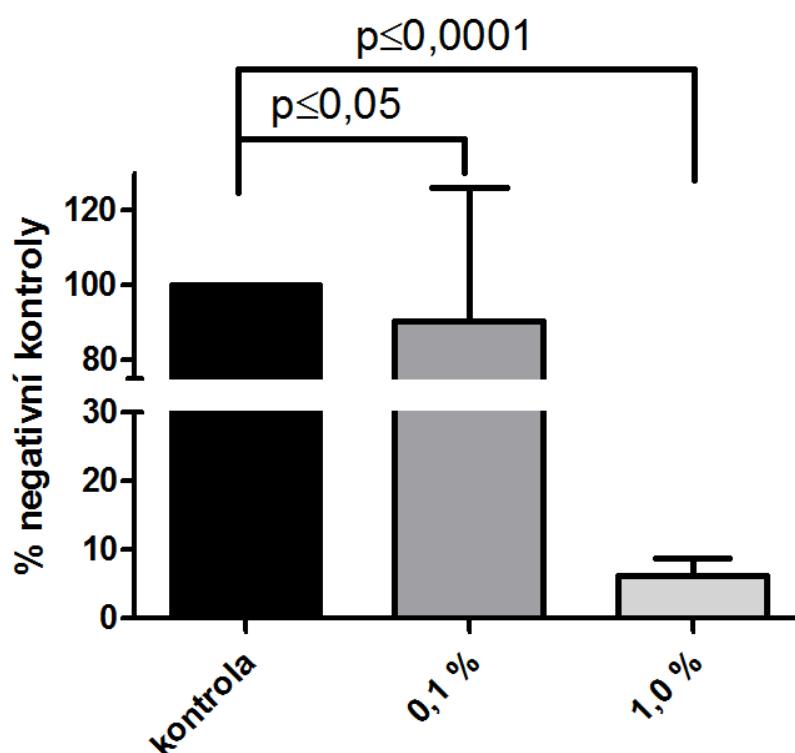


Obr. 15: Vliv přítomnosti kolostra v kultivačním médiu na životnost MDMF

Absorbance v testu Cytotoxicity Assay u kultury MDMF po 48 hodinách kultivace s různou koncentrací kolostru. Hodnoty byly vztaženy k absorbaci pozitivní kontroly v testu. Výsledky jsou ukázány jako průměr \pm SD (n=15, u kontroly n=5).

4.2. Výsledky polymerázové řetězové reakce

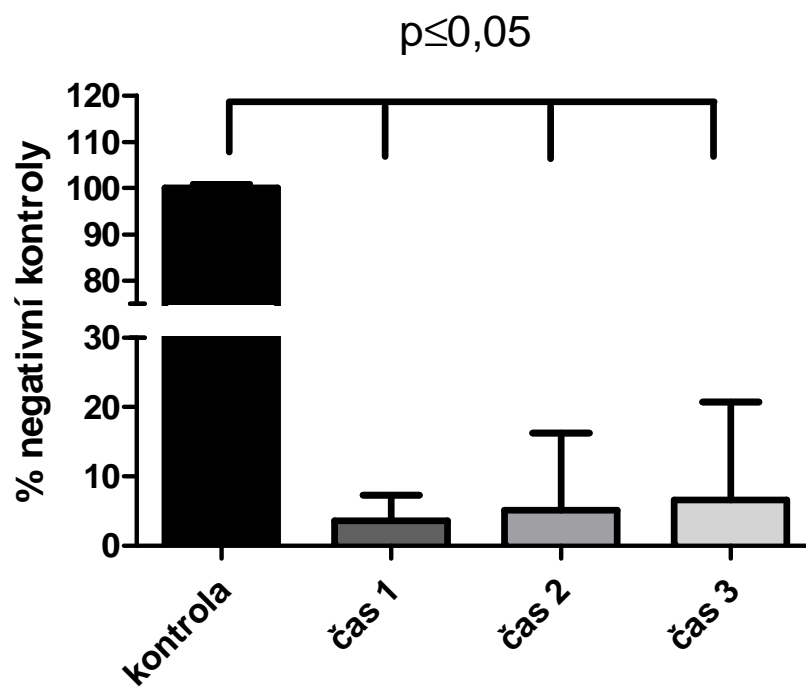
Měřena byla exprese IL-1 β a IL-10, z jejichž vzájemného poměru vznikl tzv. zánětlivý index, který byl relativizován na kontrolu neovlivněnou kolostrem. Jak je patrné z grafu (Obr. 16), vzhledem ke kolostrem neovlivněné kontrole došlo ke statisticky významnému poklesu jak u kolostra 1%, tak u kolostra 0.1%. Ze směrodatných odchylek, především u koncentrace 0.1%, lze vypočítat jistou variabilitu částečně způsobenou individuální variabilitou zvířat a také různorodostí koloster.



Obr. 16: Vliv koncentrace kolostra na jeho protizánětlivé účinky

Expresie mRNA pro IL-1 / IL-10 v kulturách MDMF po 48 hodinách kultivace s různou koncentrací koloster a 4 hodinách stimulace s LPS. Hodnoty jsou vyjádřeny jako poměry mezi expresí IL-1 a IL-10. Následně byly hodnoty vztaženy k hodnotám u negativní kontroly, tj. kultuře MDMF, která nebyla ovlivněna kolostrem. Výsledky jsou ukázány jako průměr \pm SD (n=5).

Posledním sledovaným parametrem byl vliv kultivace buněk v médiu obohaceném o kolostra s různým časem odběru po začátku laktace. Statistická analýza prokázala statisticky významný rozdíl ($p \leq 0.05$) mezi kontrolou a použitými kolostry (Obr. 17). Jak lze dále z grafu vypočítat, průměrné protizánětlivé účinky koloster úměrně klesaly s časem odběru po začátku laktace. Tento trend ale nebyl statisticky významný.



Obr. 17: Vliv doby odběru kolostra na jeho protizánětlivé účinky

Expresí mRNA pro IL-1 / IL-10 v kulturách MDMF po 48 hodinách kultivace s kolostry odebranými v různé době po porodu (čas 1 – bezprostředně, čas 2 – 24 hodin a čas 3 – 72 hodin po porodu) a 4 hodinách stimulace s LPS. Hodnoty jsou vyjádřeny jako poměry mezi expresí IL-1 a IL-10. Následně byly hodnoty vztaženy k hodnotám u negativní kontroly, tj. kultuře MDMF, která nebyla ovlivněna kolostrem. Výsledky jsou ukázány jako průměr \pm SD (n=5).

5. DISKUZE

Kolostrum je první produkt mléčné žlázy, sloužící jako potrava pro novorozence. Jak lidské tak i kravské mlezivo obsahuje, kromě živin, množství různých bílkovin, tuků, vitamínů, esenciálních mastných kyselin, ale také koenzymy, oligosacharidy nebo doplňkové faktory. Jakožto první potrava, je velmi důležité pro zdravý vývoj a růst novorozenců.

Významná je také role kolostra v přenosu specifické imunity – a to hlavně u živočišných druhů, u kterých histologická struktura placenty neumožňuje přestup velkých molekul, včetně protilátek, z krve matky do krve plodu ještě v děloze. Jedná se zejména o koně, prasata a skot. U těchto živočišných druhů jsou novorozená mláďata životně závislá na příjmu kolostra (PrabhuDas a kol., 2015). Kromě protilátek jsou z tohoto pohledu významné také v kolostru přítomné buňky imunitního systému (Reber a kol., 2008).

Neméně důležitá je ale také role kolostra v nastartování a nastavení přirozené imunitní odpovědi u mláďat a to zejména při kontrole průběhu zánětlivé odpovědi střeva na mikrobiální kolonizaci (Chatterton a kol., 2013). Tento aspekt je zásadní nejenom pro novorozená mláďata, ale také v použití kolostra jako potravinového doplňku pro pacienty trpící zánětlivými onemocněními střeva.

Cílem mé práce bylo přispět právě do oblasti studií protizánětlivých účinků kolostra. Prvním úkolem bylo adaptovat *in vitro* model prasečích MDMF pro účely dalších studií - kromě vlastní identifikace těchto účinků, také při testování dynamiky změn protizánětlivých účinků hovězího kolostra, vzhledem k jeho koncentraci a odlišným termínům po nástupu laktace.

Model prasečích MDMF byl již dříve použit například při srovnávání odpovědí MDMF a dendritických buněk na bakterii *Salmonella Typhimurium* a LPS (Kýrová a kol., 2014) nebo v práci, která byla zaměřena na náhodnou pohyblivost a produkci superoxidů polymorfonukleárních leukocytů, monocytů a MDMF po kultivaci s LTF (Gahr a kol., 1991). Velmi podobný model byl využit také při *in vitro* studiu protizánětlivých účinků fosfolipidů (Vicenova a kol., 2014). Biologickou výhodou, ale laboratorní nevýhodou tohoto modelu je fakt, že pro opakování experimentu je nutné získat buňky znova a to často od jiného zvířete. To na jednu stranu zvyšuje variabilitu výsledků při opakování zejména kvůli odlišnostem jednotlivých zvířat. Na druhou stranu individuální variabilita je vlastně součástí reálného světa.

Výsledkem předkládané práce je zjištění, že kultivace MDMF v médiu obohaceném o kolostra má významný vliv na následnou prozánětlivou odpověď těchto buněk po stimulaci LPS. Za těmito protizánětlivými účinky kolostra stojí pravděpodobně přítomnost LTF, IGF, fibroblastický růstový faktor (FGF), epidermální růstový faktor (EGF) a IL-10. Ve všech případech se jedná o proteiny, které byly v kolostru nalezeny.

LTF je glykoprotein, poprvé izolovaný z kravského mléka již v roce 1939 (Sorensen a Sorensen, 1939) a jeho první popsany biologický účinek je vyvazování iontů železa (Groves, 1960), což má antibakteriální účinek, protože bakterie potřebují železité ionty ke svému buněčnému dýchání. Další rolí LTF je vyvazování LPS a tím snižování zánětlivé odpovědi (Legrand a kol., 2005). I přes to, že LTF nemá žádný prokazatelný vliv na životnost makrofágů, významně ovlivňuje produkci například kyslíkových radikálů MDMF, podporuje jejich fagocytární aktivitu a expresi TLR, které jsou důležité k rozpoznávání patogenů (Annand, 2015).

EGF a IGF-I jsou dva z hlavních, mlékem produkovaných peptidových růstových faktorů. Mlezivo obsahuje vyšší hladiny těchto růstových faktorů, než mléko zralé a tyto faktory

jsou relativně odolné vůči proteolýze a jsou také stabilní ve střevním traktu. IGF je protein, který prokazatelně zvyšuje metabolickou aktivitu a proliferaci buněk (Oguchi a kol., 1997; Giromini, 2012). Také EGF kontroluje velké množství buněčných procesů – jako například již zmíněnou proliferaci (stimulace buněčného dělení). Z literatury vyplívá, že průměrná koncentrace tohoto cytokinu se v průběhu transformace lidského kolostra na mléko nemění (Kverka a kol., 2007).

Mezi nejdůležitější protizánětlivé cytokiny patří IL-10, produkovaný aktivovanými monocyty a T-lymfocyty. IL-10 je neodmyslitelnou součástí regulace zánětlivých odpovědí a imunitních reakcí. Jeho nejdůležitější funkce je nejlépe popsitelná, jako tlumič imunitní odpovědi. IL-10 silně inhibuje produkci IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 aktivací monocytů a makrofágů (Berkman a kol., 1995). Existuje práce ukazující, že hladina IL-10 v lidském kolostru se v průběhu jeho transformace na mléko snižuje (Yilmaz, 2007).

Zajímavým zjištěním v mé práci bylo také to, že kolostrum přidané do kultivačního média mělo různý vliv v závislosti na koncentraci. Přítomnost 10% kolostra snižovala velmi výrazně životnost MDMF. V našem případě stoupla hladina LDH z 20-25 % v případě MDMF kultivovaných bez kolostra nebo v přítomnosti 0.1 nebo 1% kolostra, na cca 70 % v případě MDMF kultivovaných v médiu obohaceném o 10% kolostrum. Důvodem k tomuto jevu mohly být změny v dostupnosti živin nebo kyslíku pro kultivované buňky, změny osmotických poměrů nebo pH kultivačního média. Žádný z těchto parametrů ale nebyl v práci analyzován.

Během rozboru dat získaných v mé práci bylo možno vypořádat ještě jeden fenomén týkající se životnosti buněk. Tím byla vyšší viabilita MDMF v případě stimulace LPS. Ačkoliv tento děj nebyl statisticky významný ($p=0.0625$ při použití párového neparametrického srovnání dle Wilcoxonova) dal se snadno vypořádat. Biologický

význam tohoto jevu spočívá ve zvýšeném přežívání buněk nespecifické imunity v místě zánětu, aby mohly po delší dobu vykonávat své funkce v čteně fagocytózy nebo produkce cytokinů. V současné době je známo, že vyšší přežívání makrofágů je dáno tím, že LPS má schopnost tlumit apoptózu jako programovanou buněčnou smrt (Conte a kol., 2006).

Jak bylo již zmíněno, přítomnost 0.1 a 1% kolostra neměla vliv na životnost buněk. Z pohledu měřených protizánětlivých účinků, přítomnost obou koncentrací koloster byla dostatečná, ale v případě koncentrace 1% byly tyto účinky výraznější. Proto byla tato koncentrace použita i ve studii dynamiky změn sledovaných parametrů v případě použití koloster odebraných v různé fázi po zahájení laktace.

Na základě literárních údajů, které naznačují klesající koncentraci potenciálních protizánětlivých faktorů při transformaci kolostra na mléko, se dal očekávat pokles protizánětlivého efektu při srovnání kolostra získaného bezprostředně po porodu a kolostra pokračujícího a časného mléka. Výsledky této části mé práce sice takovýto trend naznačují, ten ale nebyl statisticky významný.

6. ZÁVĚR

V praktické části jsem pozorovala protizánětlivé účinky hovězích koloster na *in vitro* modelu MDMF po stimulaci LPS, přičemž tyto účinky byly sledovány nejen vzhledem ke koncentraci, ale také k době odběru použitých koloster od zahájení laktace.

Měření LDH se mi podařilo prokázat výrazné snížení životnosti makrofágů po kultivaci v médiu s 10% kolostry. Kultivace v médiu s kolostry 0.1 a 1% neměly statisticky významný vliv na viabilitu použitých makrofágů.

Prokázala jsem, že v experimentu použitý LPS výrazně neovlivňoval životnost makrofágů.

Z kvantitativní polymerázové řetězové reakce vyplynulo, že odpověď na LPS makrofágů ovlivněných 0.1 a 1% kolostry statisticky významně poklesla vzhledem ke kontrole kolostrem neovlivněné. Stejně tomu bylo i při kultivaci v médiu s kolostry 1%, které byly odebrány hned po porodu, 24 a 72 hodin od začátku laktace.

Vy pozorovala jsem také jistý, statisticky nevýznamný, trend ke snižování průměrných protizánětlivých účinků koloster, které bylo úměrné s rostoucím časem odběru po začátku laktace.

Výsledky této práce jsou v současné době zpracovávány do formy manuskriptu, který bude zaslán do redakce mezinárodního vědeckého časopisu, zabývajícího se danou problematikou k posouzení (Veterinary Immunology and Immunopathology, Veterinary Journal, Journal of Dairy Science). Zároveň budou data prezentována na Středoevropském Buiatrickém Kongrese. Metody této práce budou také dále využívány při řešení projektu financovaného z Ministerstva zemědělství České republiky.

7. POUŽITÁ LITERATURA

ANAND N., Kanwar R. K., Dubey M. L., Vahishta R. K., Sehgal R., Verma A. K., Kanwar J. R.: Effect of lactoferrin protein on red blood cells and macrophages: mechanism of parasite-host interaction. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015, 27(9):3821-3835.

BAGWE S., Tharappel L. J., Kaur G., Buttar H. S.: Bovine colostrum: an emerging nutraceutical. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 2015, 12(3):175-185.

BERKMAN N., John M., Roesems G., Jose P. J., Barnes P. J., Chung K. F.: Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. *Journal of Immunology*, 1995, 155(9):4412-4418.

BLUM J. W., Baumrucker C. R.: Insulin-like growth factors (IGFs), IGF binding proteins, and other endocrine factors in milk: role in the newborn. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, 606:397-422.

CONTE D., Holcik M., Lefebvre C. A., Lacasse E., Picketts D. J., Wright K. E., Korneluk R. G.: Inhibitor of apoptosis protein cIAP2 is essential for lipopolysaccharide - induced macrophage survival. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26(2):699-708.

ECKSCHLAGER, T., Bartůňková J., Vybíralová H.: *Průtoková cytometrie v klinické praxi*. Grada Publishing, 1999, ISBN 80-7169-279-4.

GAHR M., Speer C. P., Damerau B., Sawatzki G.: Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 1991, 49(5):427-433.

GIROMINI C., Baldi A., Fusi E., Rebucci R., Purup S.: Effect of growth factors, estradiol 17- β , and short chain fatty acids on the intestinal HT29-MTX cells: Growth factors and SCFAs effects on intestinal E12 cells. *Cell Biology and Toxicology*, 2015, 31(4-5):199-209.

GODDEN S. M., Wells S., Donahue M., Stabel J., Oakes J. M., Sreevatsan S., Fetrow J.: Effect of feeding heat-treated colostrum on risk for infection with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, milk production, and longevity in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(8):5630-5641.

GODHIA M. L., Patel N.: Colostrum - its Composition, Benefits as a Nutraceutical - A Review. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 2013, 1(1):37-47.

GROVES M. L.: The isolation of a red protein from milk. *Journal of the American Chemical Society*, 1960, 82(13):3345–3350.

CHATTERTON D. E. W., Nguyen D. N., Bering S. B., Sangild P. T.: Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2013, 45(8):1730–1747.

KVERKA M., Burianová J., Lodinová-Zadníková R., Kocourková I., Cínová J., Tučková L., Tláskalová-Hogenová H.: Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array. *Clinical Chemistry*, 2007, 53(5):955-62

KÝROVA K., Štěpánová H., Rychlík I., Faldyna M., Volf J.: SPI-1 encoded genes of *Salmonella* Typhimurium influence differential polarization of porcine alveolar macrophages in vitro. *BMC Veterinary Research*, 2012, 8:115.

LEGRAND D., Ellass E., Carpentier M., Mazurier J.: Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62(22):2549-2559.

NYGARD A. B., Jorgensen C. B., Cirera S., Fredholm M.: Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Molecular Biology*, 2007, 8:67.

OGUCHI S., Shinohara K., Yamashiro Y., Walker W. A., Sanderson I. R.: Growth factors in breast milk and their effect on gastrointestinal development. *Zhonghua MinGuo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi*. 1997, 38(5):332-337.

PASTORET P. P., Griebel P., Bazin H., Govaerts A.: Handbook of vertebrate immunology. Academic Press, 1998, ISBN 0-12-546401-0

PAVLOVÁ B., Volf J., Ondráčková P., Matiašovic J., Štěpánová H., Crhánová M., Karasová D., Faldyna M., Rychlík I.: SPI-1-encoded type III secretion system of *Salmonella enterica* is required for the suppression of porcine alveolar macrophage cytokine expression. *Veterinary Research*, 2011, 42:16.

PRABHUDAS M., Bonney E., Caron K., Dey S., Erlebacher A., Fazleabas A., Fisher S., Golos T., Matzuk M., McCune J. M., Mor G., Schulz L., Soares M., Spencer T., Strominger J., Way S. S., Yoshinaga K.: Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. *Nature Immunol.*, 2015, 16(4):328-334.

REBER A. J., Donovan D. C., Gabbard J., Galland K., Aceves-Avila M., Holbert K. A., Marshall L., Hurley D. J.: Transfer of maternal colostrum leukocytes promotes development of the neonatal immune system Part II. Effects on neonatal lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 123(3-4): 305-313.

ROTHKÖTTER H. J., Sowa E., Pabst R.: The pig as a model of developmental immunology. *Human Experimental Toxicology*, 2002, 21(9-10):533-536.

SACHS D. H.: The pig as a potential xenograft donor. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1994, 43(1-3):185-191.

SORENSEN M., Sorensen S. P. L.: The proteins in whey. *Comptes-rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg*, 1939, 23(7):55–99.

STABEL J. R., Bradner L., Robbe-Austerman S., Beitz D. C.: Clinical disease and stage of lactation influence shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into milk and colostrum of naturally infected dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(10):6296-6304.

VAŇÁSEK J.: Imunomagnetická separace buněk bakterií mléčného kvašení pomocí magnetických nosičů funkcionalizovaných protilátkou. Diplomová práce, Vysoké učení technické, Brno, 2015.

VÍCENOVÁ M., Nechvátalová K., Chlebová K., Kučerová Z., Levá L., Štěpánová H., Faldyna M.: Evaluation of in vitro and in vivo anti-inflammatory activity of biologically active phospholipids with anti-neoplastic potential in porcine model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014; 14:339.

YILMAZ H. L., Saygili-Yilmaz E.S., Gunesacar R.: Interleukin-10 and -12 in human milk at 3 stages of lactation: a longitudinal study. *Advanced Therapy* 2007; 24(3):603-610.

ZELNÍČKOVÁ P., Matiašovic J., Pavlová B., Kudláčková H., Kovarů F., Faldyna M.: Quantitative nitric oxide production by rat, bovine and porcine macrophages. *Nitric Oxide*, 2008, 19:36–41.

ZOU X., Guo Z., Jin Q., Huang J., Cheong L., Xu X., Wang X.: Composition and microstructure of colostrum and mature bovine milk fat globule membrane. *Food Chemistry*, 2015, 185:362-370.

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Složení kolostra

Obr. 2: Nákres izopyknické sedimentace

Obr. 3: Krev byla nejdříve smíchána s DPBS a následně vrstvena na Histopaque

Obr. 4: Viditelnost samovolného propouštění vzorku do Histopaque

Obr. 5: Složení magnetické částice

Obr. 6: Nákres imunomagnetického sortingu

Obr. 7: Coulter counter

Obr. 8: Měření pomocí přístroje Coulter counter

Obr. 9: Kolony byly nejdříve propláchnuty DPBS

Obr. 10: Pozitivní separace

Obr. 11: Způsob počítačové analýzy průtokovou cytometrií

Obr. 12: Kultivace vzorků

Obr. 13: Médium a kolostra o různých koncentracích

Obr. 14: Vliv stimulace MDMF pomocí LPS na jejich životnost

Obr. 15: Vliv přítomnosti kolostra v kultivačním médiu na životnost MDMF

Obr. 16: Vliv koncentrace kolostra na jeho protizánětlivé účinky

Obr. 17: Vliv doby odběru kolostra na jeho protizánětlivé účinky

9. SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Nutriční složení lidského a kravského kolostra

Tab. 2: Základní údaje o prasatech použitých v první části práce

Tab. 3: Základní údaje o prasatech použitých v druhé části práce

Tab. 4: Sekvence jednotlivých primerů

Tab. 5: Vliv stimulace MDMF pomocí LPS na jejich životnost

10. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Fotografie pracoviště

Příloha č. 2: Laminární box

Příloha č. 3: Centrifugy

Příloha č. 4: Průtokový cytometr BD LSRFortessa

Příloha č. 5: Příklady výsledků průtokové cytometrie

Příloha č. 6: Příklad Synergy Hybrid Reader

Příloha č. 7: LightCycler 480

PŘÍLOHA Č. 1: FOTOGRAFIE PRACOVIŠTĚ

Specializované laboratorní pracoviště pro přípravu vzorků.



PŘÍLOHA Č. 2: LAMINÁRNÍ BOX

Laminární box určený pro sterilní práci s tkáňovými kulturami a pro přípravu médií nebo naopak pro manipulaci s patogenním materiálem, ale také k izolaci RNA.



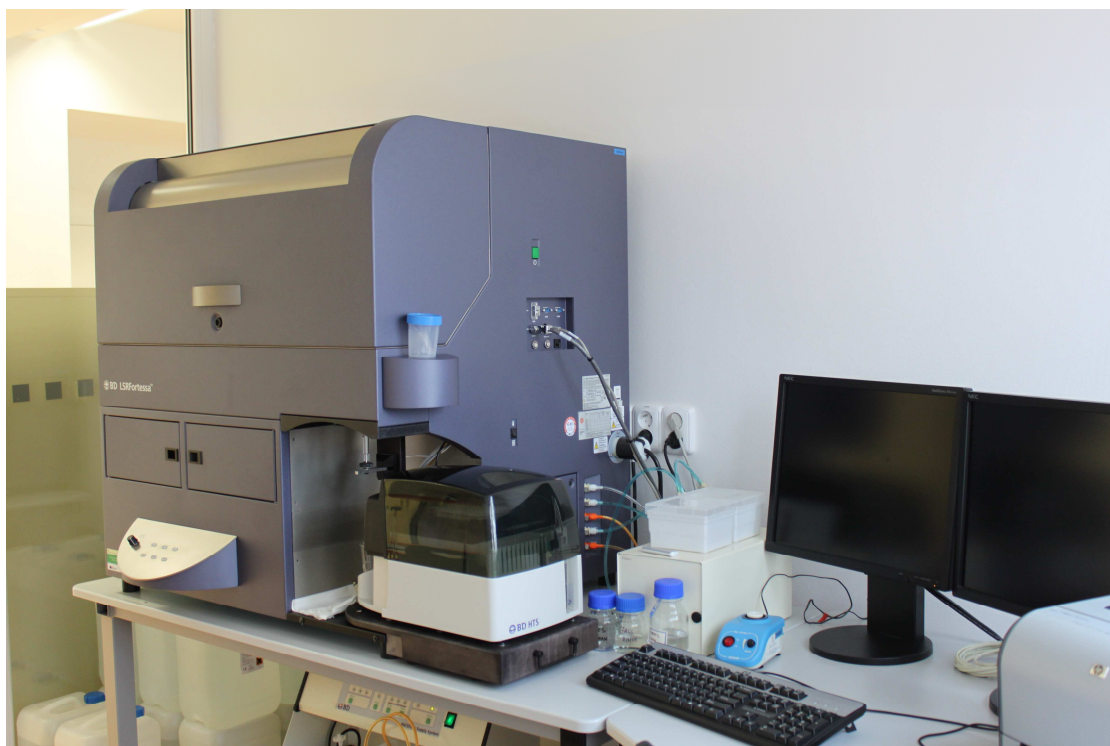
PŘÍLOHA Č. 3: CENTRIFUGY

Laboratorní centrifugy určené k odstřeďování vzorků.



PŘÍLOHA Č. 4: PRŮTOKOVÝ CYTOMETR BD LSR FORTESSA

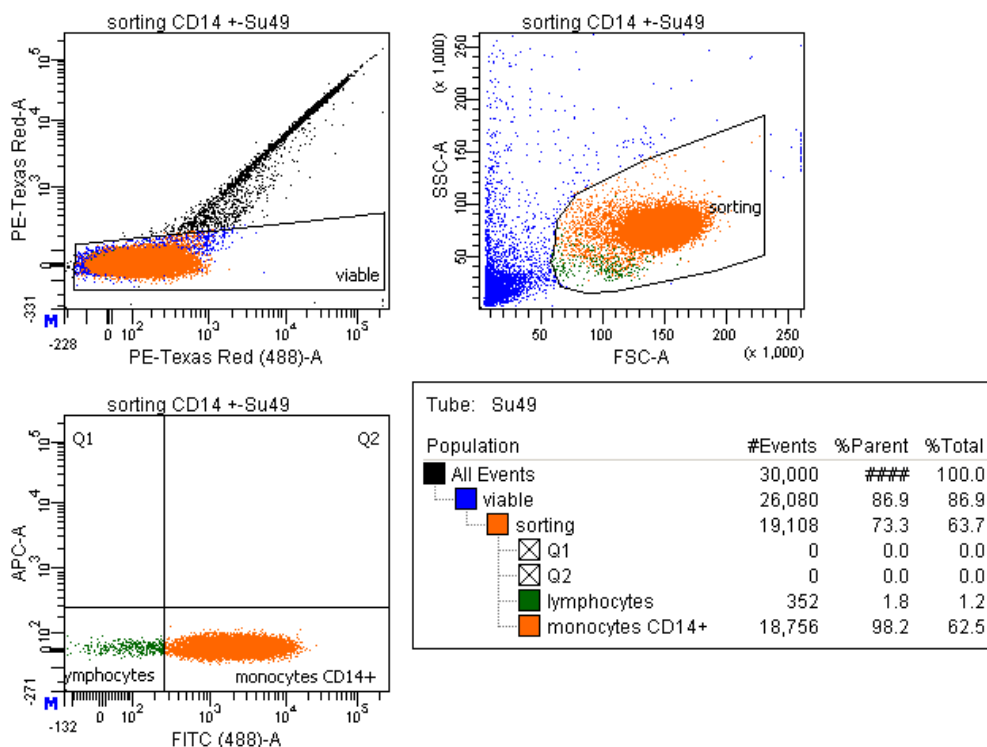
Průtokový cytometr určený k identifikaci různých vlastností buněčných populací, v mém případě použitý ke stanovení „čistoty“ monocytů získaných pomocí imunomagnetického sortingu.



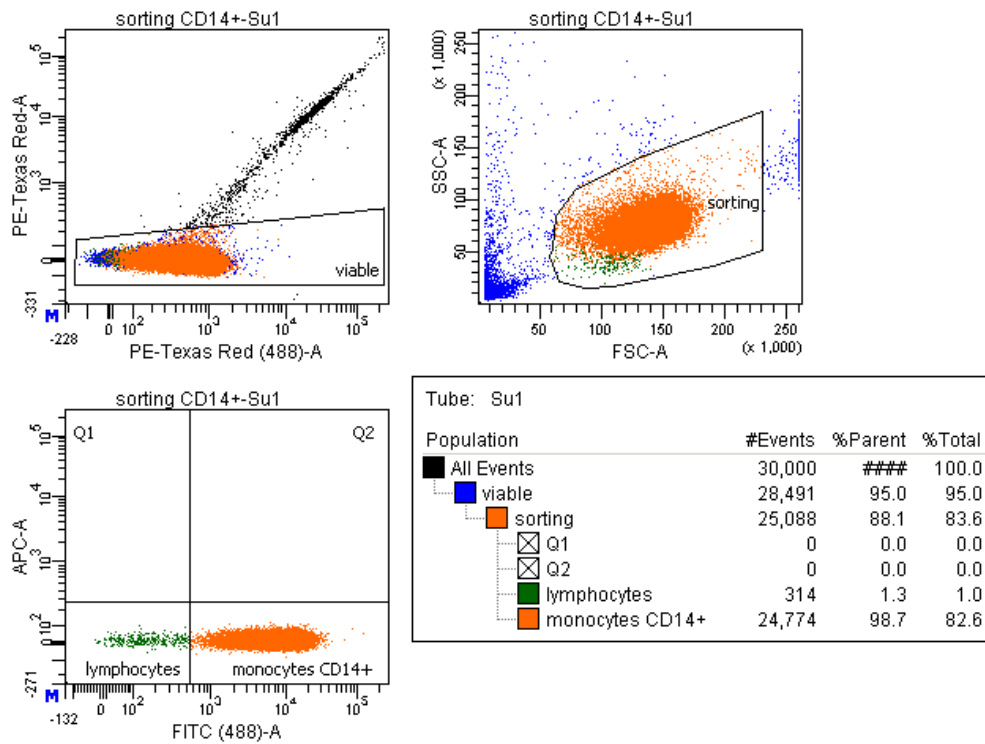
PŘÍLOHA Č. 5: PŘÍKLADY VÝSLEDKŮ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

Výsledky průtokové cytometrie, které byly vyhodnoceny pomocí softwaru Diva, dosahovaly průměrně 98% čistoty (aby suspenze mohla být považována za čistou, musí čistota požadovaných buněk dosahovat minimálně 95 %). Jelikož vyhodnocování výsledků z průtokové cytometrie je ve všech případech naprosto totožné, v této příloze jsou zobrazeny výsledky průtokových cytometrií pouze některých vzorků krví prasat.

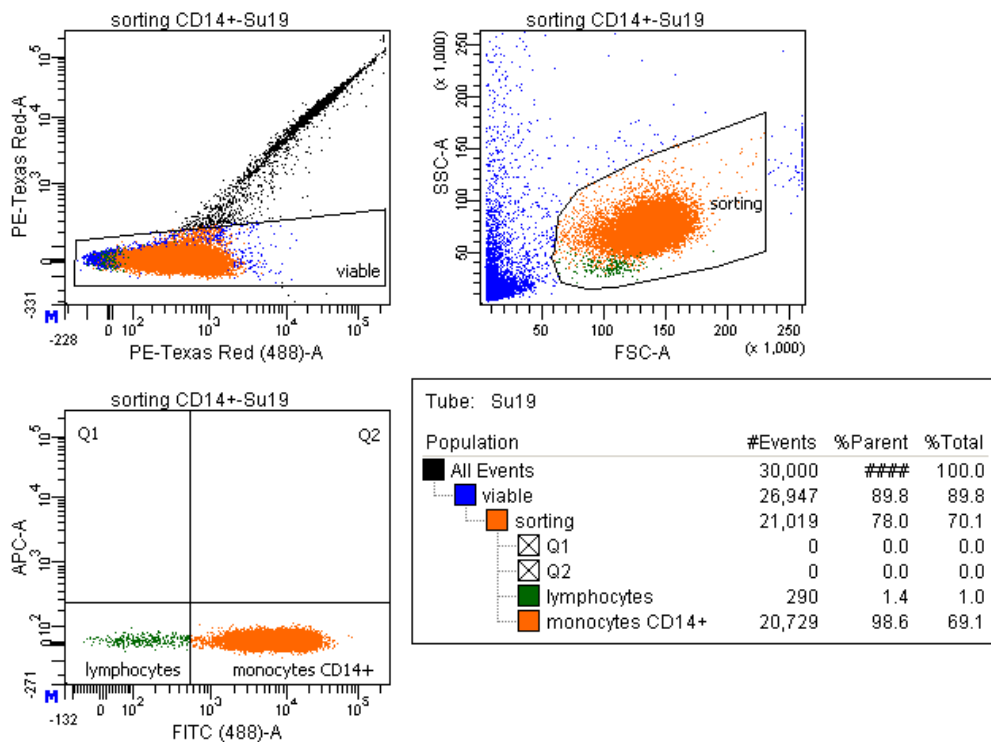
Su 49:



Su 1:



Su 19:



PŘÍLOHA Č. 6: PŘÍSTROJ SYNERGY HYBRID READER

Mikrodestičkový multidetekční reader umožňující široké spektrum analýz, v mém případě použitý k analýze výsledků testu životnosti.



PŘÍLOHA Č. 7: LIGHT CYCLER 480

Místnost se třemi zařízeními Light Cycler 480, ve kterých probíhá měření intenzity fluorescence barviv, které se interkalují do DNA v průběhu Real-Time PCR.

