

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



**VSTUP BAKTÉRIE**  
***MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG**  
**DO B LYMFOCYTOV**

**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

**Marianna Šamajová**

**Vedúci diplomovej práce: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.**

**Konzultant: plk. gšt. doc. RNDr. Zuzana Kročová, Ph.D.**

**Hradec Králové, 2018**

## **Pod'akovanie**

Touto cestou by som sa chcela pod'akovať plk. gšt. doc. RNDr. Zuzane Kročovej, Ph.D. za možnosť vypracovávanía diplomovej práce pod jej vedením. Taktiež ďakujem RNDr. Kláre Konečnej, Ph.D. za garantovanie mojej diplomovej práce a konštruktívne usmernenia v rámci písania práce. V neposlednom rade by som sa chcela úprimne pod'akovať Mgr. Lenke Plzákovej za pomoc a trpezlivosť pri prevedení experimentálneho výskumu, ako aj za rady a pripomienky pri písaní celej práce.

## **Čestné prehlásenie**

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Literatúra a všetky ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové

.....

Marianna Šamajová

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>2. ZADANIE – CIEĽ PRÁCE</b> .....	<b>12</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČASŤ</b> .....	<b>13</b>
3.1 Rod <i>Mycobacterium</i> .....	13
3.1.1 Charakterizácia mykobaktérií .....	13
3.1.2 <i>Mycobacterium</i> a imunitná odpoveď .....	16
3.1.3 Tuberkulóza .....	18
3.1.3.1 Priebeh a diagnostika tuberkulózy .....	18
3.1.3.2 Liečba tuberkulózy .....	20
3.1.4 <i>Mycobacterium bovis</i> Bacillus Calmette-Guérin .....	20
3.1.4.1 Vývoj vakcíny .....	21
3.1.4.2 Aplikácia vakcíny.....	22
3.2 B lymfocyty.....	23
3.2.1 Úloha B lymfocytov po infekcii intracelulárnym patogénom .....	24
3.2.2 Úloha B lymfocytov po infekcii intracelulárnou baktériou <i>Mycobacterium bovis</i> Bacillus Calmette-Guérin.....	26
3.2.3 Receptory B lymfocytov .....	27
3.3 Prietoková cytometria .....	30
3.3.1 Fluidný systém.....	31
3.3.2 Optický systém .....	31
3.3.3 Elektronický systém.....	32
3.3.4 Flurescencia .....	32
3.3.5 Grafické zobrazenie a analýza .....	35
3.3.6 Využitie prietokovej cytometrie .....	37
<b>4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b> .....	<b>38</b>
4.1 Použitý materiál .....	38
4.1.1 Baktérie, zvieratá a bunky .....	38
4.1.2 Prístroje, laboratórne pomôcky a softvér .....	38

4.1.3	Chemikálie .....	39
4.1.4	Protilátky.....	40
4.1.5	Príprava roztokov a médií.....	40
4.2	Metodika práce.....	42
4.2.1	Práca s bakteriálnou kultúrou .....	42
4.2.1.1	Príprava a kryoprezervácia bakteriálnych štokov .....	42
4.2.1.2	Príprava bakteriálnej suspenzie na infekciu .....	42
4.2.1.3	Opsonizácia komplementom a protilátkami.....	43
4.2.1.4	Výsev a výpočet jednotiek tvoriach kolónie .....	44
4.2.2	Práca s bunkovou kultúrou .....	45
4.2.2.1	Príprava bunkovej suspenzie.....	45
4.2.2.2	Určenie koncentrácie a životnosti buniek .....	45
4.2.2.3	Blokovanie receptorov na B lymfocytoch.....	46
4.2.2.4	Infekcia buniek.....	47
4.2.3	Príprava vzoriek pre prietokovú cytometriu .....	49
4.2.3.1	Značenie buniek .....	49
4.2.3.2	Meranie a analýza dát získaných pomocou prietokovej cytometrie ....	49
4.3	Výsledky .....	50
4.3.1	Príklad spracovávania dát získaných prietokovou cytometriou .....	50
4.3.2	Vyhodnotenie vstupu intracelulárnej baktérie <i>Mycobacterium bovis</i> Bacillus Calmette-Guérin do B lymfocytov .....	57
<b>5.</b>	<b>DISKUSIA .....</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>ZÁVER .....</b>	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKOV, GRAFOV A TABULIEK .....</b>	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....</b>	<b>73</b>

# ABSTRAKT

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Študijný odbor:** Farmácia

**Autor:** Marianna Šamajová

**Školiteľ:** RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

**Konzultant:** plk. gšt. doc. RNDr. Zuzana Kročová, Ph.D.

**Názov diplomovej práce:** Vstup baktérie *Mycobacterium bovis* BCG do B lymfocytov

**Cieľ práce:** Cieľom práce bolo zhodnotiť vstup baktérie *Mycobacterium bovis* BCG do B lymfocytov a úlohu vybraných receptorov v tomto procese.

**Metódy:** Peritoneálne bunkové suspenzie s neblokovanými a/alebo zablokovanými receptormi na B lymfocytoch z myši BALB/c sme infikovali baktériou *M. bovis* BCG-GFP neopsonizovanou a/alebo opsonizovanou čerstvým sérom („komplement“) alebo imúnnym sérom („protilátky“). Pomocou prietokovej cytometrie sme hodnotili vstup baktérie *M. bovis* BCG-GFP do B lymfocytov a ich subpopulácií B1a, B1b a B2.

**Výsledky:** *M. bovis* BCG-GFP aktívne vstupuje do B lymfocytov. V závislosti na subpopulácii najviac infikuje B1a, menej B1b a najmenej B2 lymfocyty. Na opsonizáciu komplementom významne reaguje len subpopulácia B2. Opsonizácia protilátkami nemala výrazný vplyv na infekciu. Vstup do CD19<sup>+</sup> buniek je sprostredkovaný cez BCR receptor a to hlavne u subpopulácií B1a a B1b. Za opsonizovaných podmienok sa uplatňuje komplementový receptor CR1/2 a u subpopulácií B1a a B1b tiež CR3.

**Záver:** Z našich výsledkov vyplýva, že samotný BCR receptor postačuje pre rozpoznanie a vstup *M. bovis* BCG-GFP do subpopulácií B1a a B1b. V prípade opsonizácie komplementom sa uplatnia aj komplementové receptory CR1/2 a CR3. Zaujímavým výsledkom tejto práce je výrazná reakcia subpopulácie B2 lymfocytov na infekciu baktériou opsonizovanou komplementom, sprostredkovaná pravdepodobne hlavne cez komplementový receptor CR1/2, v spolupráci s BCR receptorom.

**Kľúčové slová:** *Mycobacterium bovis* BCG, B lymfocyty, prietoková cytometria

# ABSTRACT

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Study program:** Pharmacy

**Author:** Marianna Šamajová

**Supervisor:** RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

**Consultant:** plk. gšt. doc. RNDr. Zuzana Kročová, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** Entry of bacteria *Mycobacterium bovis* BCG into B lymphocytes

**Background:** The objective of this work was to evaluate the entry of bacterium *Mycobacterium bovis* BCG into B lymphocytes and the role of selected receptors in this process.

**Methods:** Peritoneal cell suspensions with unblocked and/or blocked receptors on BALB/c mouse B lymphocytes we infected by bacterium *M. bovis* BCG-GFP unopsonized and/or opsonized by fresh murine serum („complement“) or immune serum („antibodies“). Using flow cytometry we evaluated the entry of bacterium *M. bovis* BCG-GFP into B lymphocytes and their subpopulations B1a, B1b and B2.

**Results:** *M. bovis* BCG-GFP actively enters into B lymphocytes. Depending on the subpopulation, it most infects B1a, less B1b and at least B2 lymphocytes. Only the subpopulation B2 responds significantly to the opsonization by complement. Opsonization by antibodies had no significant effect on the infection. Entry into CD19+ cells is mediated through the BCR receptor, especially in subpopulations B1a and B1b. Under the opsonized conditions, the CR1/2 complement receptor is applied, and CR3 in the subpopulations B1a and B1b too.

**Conclusion:** Our results indicate that the BCR receptor alone is sufficient for the recognition and entry of *M. bovis* BCG-GFP into subpopulations B1a and B1b. In the case of opsonization by complement, the complement receptors CR1/2 and CR3 are also used. An interesting result of this work is the marked reaction of the B2 lymphocyte subpopulation to infection by bacterium opsonized by complement, mediated probably mainly via the CR1/2 complement receptor in cooperation with the BCR receptor.

**Key words:** *Mycobacterium bovis* BCG, B lymphocytes, flow cytometry

## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

Skratka	Anglický význam	Slovenský význam
× g	relative centrifugal force	relatívna centrifugačná sila
Ab	Antibody	protilátka
ADC	Albumin-Dextrose-Catalase	albumín-dextróza-kataláza
Ag85 A, B	AntiGen 85 complex A, B	komplex antigénov 85 A, B
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome	syndróm získanej imunitnej nedostatočnosti
APC	AlloPhycoCyanin	alofykokyanín
APC-Cy7	AlloPhycoCyanin-Cyanin 7	alofykokyanín-kyanín 7
Ara	Arabinose	arabínóza
BCG	Bacillus Calmette-Guérin	bacil Calmettov a Guérinov
BCR	B Cell Receptor	receptor B lymfocytov
Be	effector B cells	efektorové B lymfocyty
Breg	regulatory B cells	regulačné B lymfocyty
C	Complement	komplement
C1q, C3, C3bi, C3b, iC3b, C4b	degradation fragments of complement	degradačné fragmenty zložiek komplementu
CD	Cluster of Designation, Cluster of Differentiation	označenie bunkovej povrchovej molekuly
CFP-10	Culture Filtrate Protein 10 kDa	filtrátový proteín s hmotnosťou 10 kilodaltonov
CFU	Colony Forming Unit	jednotka tvoriaca kolóniu
CO <sub>2</sub>	Carbon dioxide	oxid uhličitý
CR	Complement Receptor	komplementový receptor
CR1g	Complement Receptor of the Immunoglobulin superfamily	komplementový receptor imunoglobulínovej nadrodiny
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole	4',6-diamidino-2-fenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Dulbeccom modifikované Eagleovo médium
DNA	DeoxyriboNucleic Acid	deoxyribonukleová kyselina
DTH	Delayed Type Hypersensitivity	precitlivosť oneskoreného typu
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	typ enzýmovo značenej imunoanalýzy
ESAT-6	Early Secreted Antigenic Target of 6 kDa protein	sekrečný antigén s hmotnosťou 6 kilodaltonov
EtBr	Ethidium Bromide	etidiumbromid
<i>F.</i>	<i>Francisella</i>	francisela



<b>Skratka</b>	<b>Anglický význam</b>	<b>Slovenský význam</b>
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter	fluorescenčne aktivovaný bunkový triedič
FBS	Fetal Bovine Serum	fetálne bovinné sérum
FC	Flow Cytometry	prietoková cytometria
FcR	Fc Receptor	receptor pre Fc oblasť protilátok
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate	fluoresceínizotiokyanát
FL	FiLter	filter
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer	prenos fluorescenčnej rezonančnej energie
FS	Forward Scatter	priamy rozptyl svetla
Gal <sub>f</sub>	Galactofuranose	galaktofuranóza
GFP	Green Fluorescent Protein	zelený fluorescenčný proteín
GlcNac	N-Acetylglucosamine	N-acetylglukozamín
Ig	ImmunoGlobulin	imunoglobulín
IL	InterLeukin	interleukín
INF	INterFeron gamma	interferón gama
ITAMs	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs	imunoreceptorové aktivačné motívy založené na tyrozíne
ITIMs	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs	imunoreceptorové inhibičné motívy založené na tyrozíne
LVS	Live Vaccine Strain	živý vakcinačný kmeň
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>	mykobaktérium
Man	Mannose	manóza
MBL	Mannose Binding Lectin	manózu viažuci lektín
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1	monocytárny chemoatraktantný proteín 1
MHC	Major Histocompatibility Complex	hlavný histokompatibilný komplex
MOI	Multiplicity Of Infection	multiplícita infekcie
MurNAc/Gc	N-Acetyl-/N-GlycosylMuramic acid	N-acetylovaná/N-glykozylovaná murámová kyselina
NK	Natural Killer	prirodzený zabíjač
OADC	Oleic acid-Albumin-Dextrose-Catalase	kyselina olejová-albumín-dextróza-kataláza
OD	Optical Density	optická denzita
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns	molekulové vzory patogénov
PBS	Phosphate-Buffered Saline	pufrovaný fyziologický roztok
PE	PhycoErythrin	fykoerytrín

<b>Skratka</b>	<b>Anglický význam</b>	<b>Slovenský význam</b>
PE-Cy5	<b>PhycoErythrin-Cyanine 5</b>	fykoerytrín-kyanín 5
PerCP	<b>Peridinin-Chlorophyll Protein</b>	peridinín-chlorofyl proteín
PI	<b>Propidium Iodide</b>	propídiumjodid
PPD	<b>Purified Protein Derivative</b>	purifikovaný proteínový derivát
PRRs	<b>Pattern Recognition Receptors</b>	receptory rozpoznávajúce vzory patogénov
RD1	<b>Region of Difference 1</b>	rozdielna oblasť 1
rpm	<b>Revolutions Per Minute</b>	otáčky za minútu
rRNA	<b>ribosomal RiboNucleic Acid</b>	ribozomálna ribonukleová kyselina
SS	<b>Side Scatter</b>	bočný rozptyl svetla
TACO	<b>Tryptophan-Aspartate COntaining coat protein</b>	plášť proteínu obsahujúceho tryptofán a aspartát
TBC	<b>TuBerCulosis</b>	tuberkulóza
TGFβ-1	<b>Transforming Growth Factor beta 1</b>	transformujúci rastový faktor beta 1
Th	<b>T helper cell</b>	pomocné T lymfocyty
TLR	<b>Toll-Like Receptor</b>	receptor podobný Toll
TNF-α	<b>Tumor Necrosis Factor alfa</b>	faktor nádorovej nekrózy alfa
TST	<b>Tuberculin Skin Test</b>	tuberkulínový kožný test
Xpert MTB/RIF	<b>Xpert <i>Mycobacterium tuberculosis</i>/rifampicin assay</b>	test pre identifikáciu <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a rezistenciu na rifampicín

# 1. ÚVOD

Baktérie sú mikroorganizmy, ktoré tvoria neoddeliteľnú súčasť nášho okolia a aj nás. Jedno z kritérií triedenia baktérií sa odvíja od ich nárokov na to, aké prostredie pre svoje prežitie a rozmnožovanie vyžadujú. Na základe toho je možné baktérie rozlíšiť na extracelulárne, intracelulárne a fakultatívne intracelulárne. Úvodná časť práce je venovaná práve intracelulárnym baktériám rodu *Mycobacterium*, ktorého charakteristickým zástupcom je *Mycobacterium tuberculosis*, pôvodca tuberkulózy. Hlavným predmetom štúdia tejto práce je však vakcinačný kmeň *Mycobacterium bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin). Napriek dostupnosti vakcíny je tuberkulóza, žiaľ, aj v súčasnosti veľkou hrozbou pre spoločnosť. Z tohto dôvodu prebiehajú stále rôzne výskumy s cieľom vyvinúť účinnejšiu a bezpečnejšiu vakcínu.

V ďalšej časti práce sa zameriavame na B lymfocyty. Týmto imunitným bunkám je pripisovaná hlavná funkcia v adaptívnej fáze humorálnej imunitnej odpovede. Myslelo sa, že ich spektrum účinku sa vzťahuje prevažne na extracelulárne baktérie. Postupne sa však hromadia dôkazy z rôznych štúdií, ktoré informujú o nezanedbateľnej úlohe B lymfocytov aj v obrane voči intracelulárnym patogénom. Vedcov zaujímajú konkrétne podmienky vyžadujúce iniciáciu imunitnej odpovede voči týmto patogénom, vrátane vstupu intracelulárných baktérií do B lymfocytov.

Táto práca nadviazala na dlhodobý výskum, ktorý vedie Katedra molekulárnej patológie a biológie, Fakulty vojenského zdravotníctví v Hradci Králové, týkajúci sa priebehu interakcie B lymfocytov s intracelulárnou baktériou *Francisella tularensis*. Naším cieľom bolo pomocou prietokovej cytometrie, ktorej je venovaná posledná teoretická časť diplomovej práce, vyhodnotiť interakciu intracelulárnej baktérie *Mycobacterium bovis* BCG a B lymfocytov, vrátane ich subpopulácií B1a, B1b a B2.

## 2. ZADANIE – CIEĽ PRÁCE

**Teoretická časť:** Práca s relevantnými a recentnými informačnými zdrojmi.

**Experimentálna časť:**

- Uvedenie metodiky, laboratórnych pomôcok, chemikálií, inštrumentácie a pracovných postupov.
- Príprava B bunkovej suspenzie z myší BALB/c.
- Príprava bakteriálnej suspenzie *Mycobacterium bovis* BCG.
- Príprava vzoriek pre prietokovú cytometriu.
- Analýza dát z prietokovej cytometrie.

## 3. TEORETICKÁ ČASŤ

### 3.1 Rod *Mycobacterium*

Baktérie rodu *Mycobacterium* predstavujú zároveň jediný rod čeľade *Mycobacteriaceae*, rád *Actinomycetales*. Pomenovanie rodu „*Mycobacterium*“ vzniklo v roku 1896 vďaka podobnosti a pomalému rastu kolónií s plesňami [1, 2, 3].

Tento rod zahŕňa široké spektrum obligátne, oportúnne patogénnych a nepatogénnych baktérií, ktoré sa líšia vo svojom fenotype, biochemických vlastnostiach a tiež vo spektre hostiteľov. Do skupiny obligátnych patogénov patria baktérie s blízkou genetickou podobnosťou (až 99,9 % genómu) a rovnakými sekvenciami rRNA (ribosomal ribonucleic acid, ribozomálna ribonukleová kyselina) ako *Mycobacterium tuberculosis*. Tieto patogény sú pôvodcami vážneho pľúcneho ochorenia nazvaného tuberkulóza. Z tohto dôvodu sa zaraďujú do spoločnej skupiny *Mycobacterium tuberculosis complex*. Uvedený komplex zahŕňa nasledujúce bakteriálne druhy: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti* a *Mycobacterium bovis*. Z virulentného kmeňa *Mycobacterium bovis* bol jeho atenuáciou získaný vakcinačný kmeň *Mycobacterium bovis* BCG (*M. bovis* BCG). *M. tuberculosis*, *M. canetti* a *M. africanum* sú hlavne patogénne pre človeka. *M. microti* spôsobuje tuberkulózu hlodavcov a *M. bovis* zahŕňa širšie spektrum hostiteľov vrátane hovädzieho dobytku a človeka. Ďalším obligátne patogénnym druhom je *M. leprae*, pôvodca lepry [4, 5, 6].

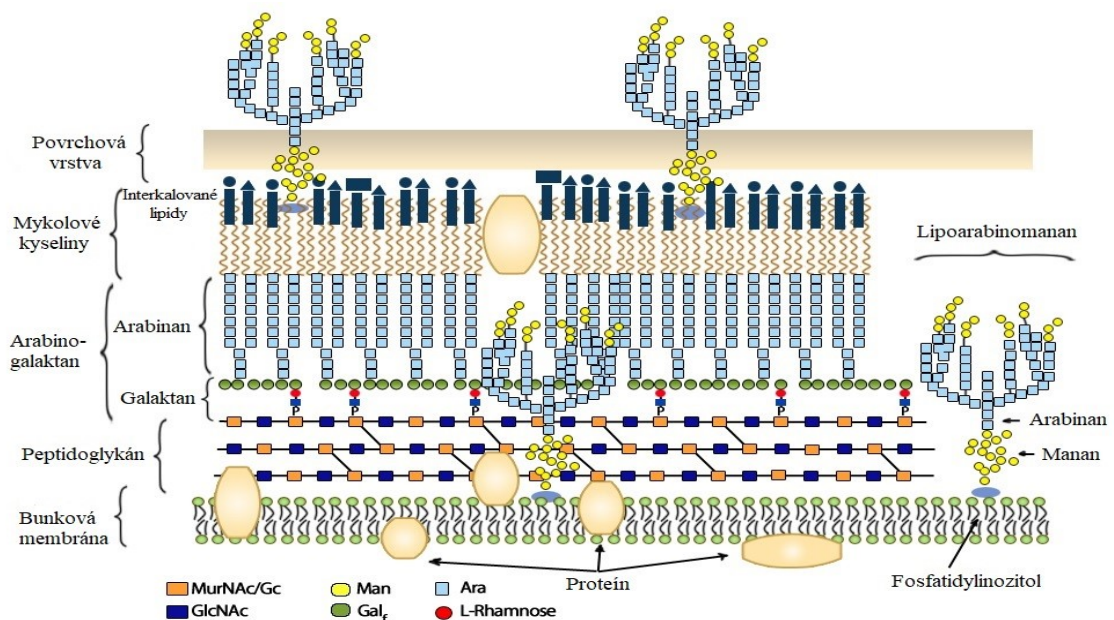
Ako environmentálne oportúnne, prípadne netuberkulózne mykobaktérie sa označujú mykobaktérie, ktoré nepatria do *M. tuberculosis complex* a ani *M. leprae* nezaraďujeme do tejto skupiny. Nachádzajú sa voľne vo vode, v pôde alebo vo vzduchu a tvoria súčasť biotopov ako symbioty, saprofyty alebo aj ako komenzály. Jedná sa o oportúnne patogény, ktoré môžu spôsobiť rozvoj mykobakteriálnej infekcie zvierat a tiež ľudí – hlavne imunokompromitovaných. Patria tu bakteriálne druhy ako napr. *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi* alebo *M. fortuitum* [4, 6, 7].

#### 3.1.1 Charakterizácia mykobaktérií

Mykobaktérie sú nepohyblivé baktérie štíhleho tyčinkovitého tvaru, ktoré netvorí spóry. Jedná sa o aeróbne organizmy, avšak vo vnútri tuberkulózneho granulómu dokážu prežívať tiež za anaeróbných podmienok rôzne dlhú dobu.

Tím Watanabe *et al.* (2011) dospel k záveru, že na udržiavani metabolických funkcií *M. tuberculosis* bez prísunu kyslíka sa podieľa produkcia fumarát reduktázy, ktorá bola v takýchto podmienkach zvýšená [3, 8].

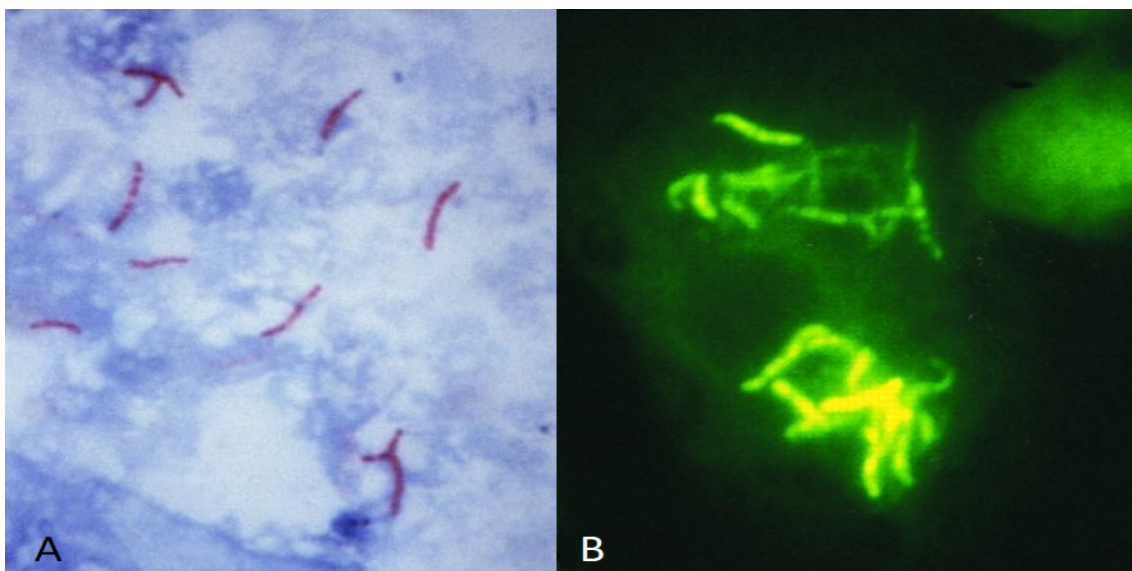
Stena mykobaktérií sa skladá z dvoch segmentov – horného a dolného. Štruktúra dolného segmentu je tvorená peptidoglykánom, ktorý je naviazaný na bunkovú membránu tvorenú dvojitou vrstvou fosfolipidov. Peptidoglykán je kovalentne spojený s arabinogalaktánom. Arabinogalaktán ďalej viaže zvyšky mykolových kyselín s dlhými a krátkymi reťazcami. Mykolová kyselina môže byť na arabinogalaktán viazaná buď kovalentne alebo nekovalentne (prostredníctvom dimykolátu trehalózy). Mykobaktérie sú charakteristické výraznou hydrofobicitou, za ktorú je zodpovedná predovšetkým vrstva mykovej kyseliny. Tieto tri uvedené zložky (peptidoglykán, arabinogalaktán a mykolové kyseliny) predstavujú tzv. mykolyl-arabinogalaktán-peptidoglykanový komplex. Horný segment bunkovej steny je tvorený okrem voľných lipidov ďalej proteínmi, fosfatidylinozitolmanozidmi, ftioceroldimykokocerozátom, lipomananom, lipoarabinomananom. Lipoarabinomanan môže byť zakončený manózou a vytvárať manozyl-lipoarabinomanan. Tieto lipidy, proteíny, lipoglykány sú signálne efektorové molekuly zodpovedné za virulenciu mykobaktérií (Obrázok č. 1) [6, 9, 10].



**Obrázok č. 1:** Schéma bunkovej steny mykobaktérií. Prevzaté z [11] a upravené.

**Vysvetlivky:** **MurNAc/Gc:** *N*-acetyl-/*N*-glycosylmuramic acid, *N*-acetylovaná/*N*-glykozylovaná murámová kyselina. **Man:** mannose, manóza. **Ara:** arabinose, arabinóza. **GlcNAc:** *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylglukozamín. **Gal<sub>f</sub>:** galactofuranose, galaktofuranóza. **L-Rhamnose:** L-ramnóza.

Mykobaktérie sa na základe vysokého podielu lipidov v bunkovej stene vyznačujú acidorezistenciou. Pre mikroskopickú diagnostiku acidorezistentných baktérií sa bežne používajú dva spôsoby farbenia. Prvým spôsobom je metóda podľa Ziehl-Neelsena a druhým je fluorescenčné farbenie (Obrázok č. 2). Podľa metódy Ziehl-Neelsena sa vzorka najskôr zafarbí karbolfuchsinom za tepla. Následne sa pridá kyslý alkohol a vzorka sa dofarbí metylénovou modrou. Mykobaktérie sa kvôli ich acidorezistencii neodfarbia ani po pridaní kyslého alkoholu a ostanú červené, pričom pozadie sa zafarbí metylénovou modrou. Pri fluorescenčnej metóde sa vzorka zafarbí auramínom O alebo auramín/rodamínom (prípadne akridínovou oranžou). Po odfarbení kyslým alkoholom sa pridá manganistan draselný. Mykobaktérie vykazujú farebnú fluorescenciu na tmavom pozadí [3, 12].

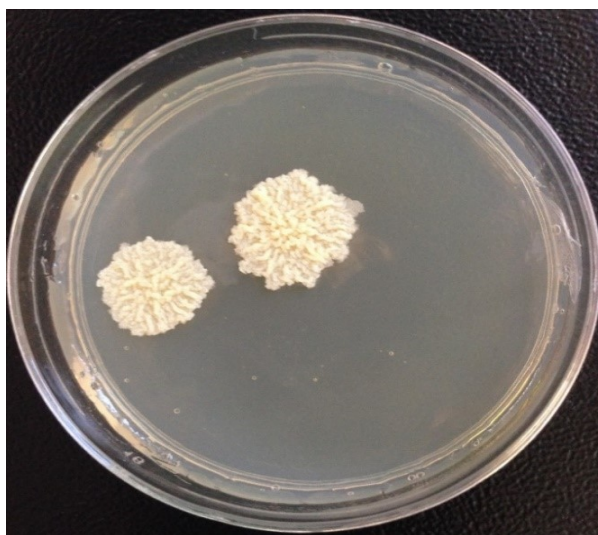


**Obrázok č. 2:** Snímky preparátov zo svetelnej (A) a fluorescenčnej (B) mikroskopie. Prevzaté z [13] a upravené.

**Vysvetlivky:** A: *M. tuberculosis* farbenie Ziehl Neelsen, zv. 1000 ×. B: *M. tuberculosis* H37Rv farbenie auramín-rodamínom, zv. 1000 ×.

Obligátne patogénne druhy sa vyznačujú dlhou generačnou dobou a viditeľným rastom až po niekoľkých týždňoch od inokulácie. Kultivačné média pre mykobaktérie sa môžu rozdeliť na tri hlavné skupiny – vaječné média (napr. Lowenstein-Jensenové), ďalej agarové média (napr. Middlebrook 7H10, 7H11) a tekuté média (napr. Middlebrook 7H9). *M. tuberculosis* rastie na Lowenstein-Jensenovej pôde obsahujúcej glycerol pri optimálnej teplote 37 °C charakteristickým eugonickým (hrudkovitým) rastom. Typickým znakom *M. tuberculosis* je pomalý rast s generačnou

dobou 20 až 30 hodín, pričom nárast kolónií je viditeľný po 2 – 6 týždňoch. Pri kultivácii *M. bovis* je však glycerol nahradený pyruvátom sodným, pretože v Lowenstein-Jensenovom médiu pôsobí na *M. bovis* inhibične. Viditeľný rast *M. bovis* je pozorovateľný minimálne po 4 – 5 týždňoch od inokulácie. Tieto kolónie sú ploché, drobné, hladké, našedlej farby a tzv. dysgonického rastu. *M. bovis* BCG sa morfológiou podobá *M. tuberculosis*. Rastie pri teplote 37 °C a kolónie majú eugonický tvar (Obrázok č. 3). Avšak podľa biochemických vlastností zodpovedá *M. bovis*, z ktorého bol tento kmeň odvodený. V laboratórnych podmienkach sa na odlišenie *M. bovis* od iných druhov komplexu *M. tuberculosis* používa napr. test citlivosti na pyrazínamid, voči ktorému je *M. bovis* aj *M. bovis* BCG rezistentný, alebo test na nitratázovú aktivitu. [4, 14, 15].



**Obrázok č. 3:** *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) exprimujúce GFP (green fluorescent protein, zelený fluorescenčný proteín) na Middlebrook 7H10 agare.

Autor: Marianna Šamajová

### 3.1.2 *Mycobacterium* a imunitná odpoveď

Ochranná funkcia voči mykobakteriálnej infekcii je prisudzovaná hlavne špecializovaným T lymfocytom a aktivovaným makrofágom prostredníctvom produkcie cytokínov a lymfokínov. Predovšetkým produkcia INF- $\gamma$  (interferon gamma, interferón gama) je považovaná za kľúčový faktor v antimykobakteriálnej obrane [16, 17].

Vzdušnou cestou sa mykobaktérie dostávajú do pľúc, kde prvú obrannú líniu tvoria alveolárne makrofágy, ktoré ďalej prispievajú k rozvoji adaptívnej imunity. Bunky imunitného systému rozpoznávajú tzv. PAMPs (pathogen associated molecular



patterns, molekulové vzory patogénov) pomocou PRRs (pattern recognition receptors, receptory schopné rozpoznať molekulové vzory patogénov). Existuje množstvo PRRs, ktoré viažu mykobakteriálne antigény, napr. surfaktantový proteín A a D, MBL (mannose binding lectin, manózu viažuci lektín), manózový receptor, TLR (Toll-like receptor, receptor podobný Toll) a ďalšie. Najlepšie charakterizovaný je MBL a manózový receptor. MBL patrí do rodiny rozpustných C-lektínov, tzv. kolektínov. Po infekcii MBL rozpozná manozyl-lipoarabinomanany a fosfatidylinositolmanozidy mykobaktérií a nasleduje fagocytóza a aktivácia signálnych ciest. *M. tuberculosis* si však vyvinulo množstvo stratégií ako ovplyvniť a predchádzať obranným mechanizmom a zabezpečiť svoje prežitie a rozmnožovanie [17, 18].

Na vstup mykobaktérií do makrofágov zohráva dôležitú úlohu cholesterol, ktorý sa kumuluje v mieste vstupu mykobaktérií cez cytoplazmatickú membránu. Podľa Gatfield *et al.* (2000) makrofágy z myši ochudobnené o cholesterol majú zníženú fagocytárnu aktivitu. Na rozdiel od mykobaktérií, iné baktérie ako napr. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a *Yersinia pseudotuberculosis* vstupujú aj do makrofágov ochudobnených o cholesterol [19].

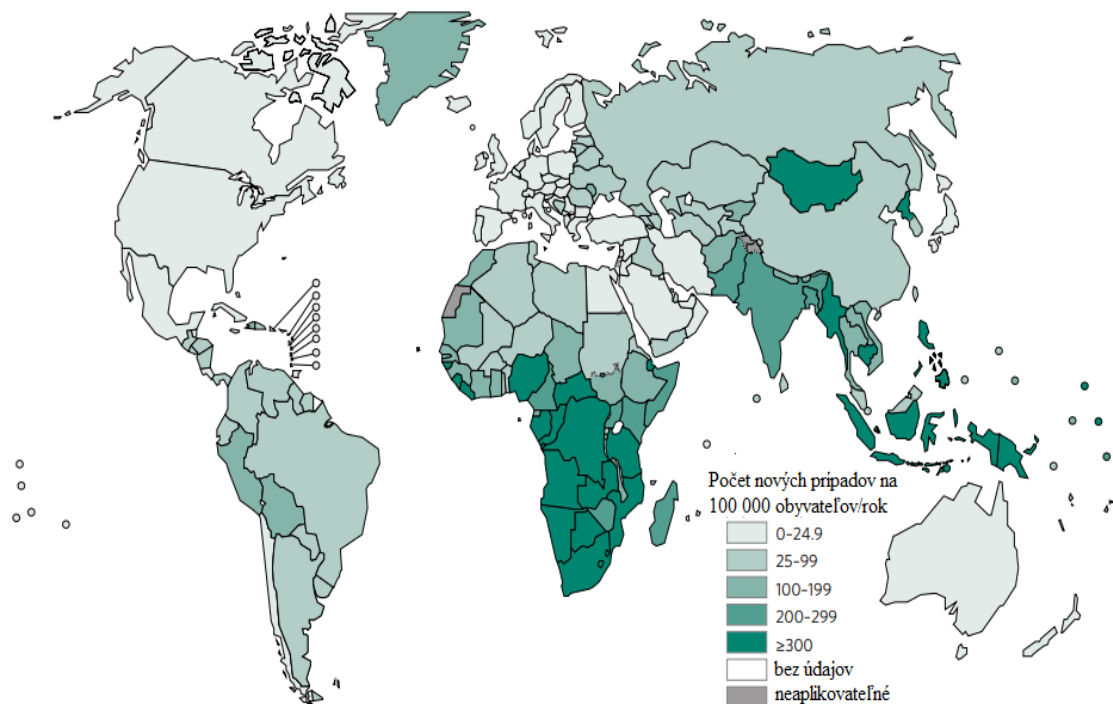
Po fagocytóze antigén prezentujúce bunky exprimujú mykobakteriálne antigény pomocou molekúl MHC (major histocompatibility complex, hlavný histokompatibilný systému) triedy II Th lymfocytom (T helper, pomocný T lymfocyt), ktoré nesú molekulu CD (cluster of designation, cluster of differentiation, bunková povrchová molekula)4 a v menšej miere prostredníctvom MHC-I T lymfocytom nesúcim molekulu CD8. Aktivované T lymfocyty potom iniciujú makrofágy k produkcii INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alfa, faktoru nádorovej nekrózy alfa), IL (interleukín, interleukínu)-1, IL-6, IL-12 a ďalších. Týmto spôsobom regulujú replikáciu mykobaktérií. Pomocou cytokínov sú privolané ďalšie bunky imunitného systému a to neutrofily, NK bunky (natural killer, prirodzený zabíjač), CD4+ a CD8+ T lymfocyty. To vedie k vzniku nekrotickej masy buniek, tzv. tuberkulózneho granulómu [20].

Fagocytujúce makrofágy rozpoznané baktérie internalizujú do membránových organel nazvaných fagozomy. Tieto úspešné patogény sa dokážu vyhnúť fúzii s lyzozómom a prežívať intracelulárne. Pred splynutím fagozómu s lyzozómom a následnou degradáciou spôsobenou lyzozomálnymi enzýmami chráni mykobaktérie tzv. TACO (tryptophan-aspartate containing coat protein, plášť proteínu obsahujúceho tryptofán a aspartát), ktorým je fagozóm obalený. Jeho väzba je sprostredkovaná cez cholesterol obsiahnutý vo fagozómálnej membráne [19].

### 3.1.3 Tuberkulóza

TBC (tuberculosis, tuberkulóza) je stále závažné infekčné ochorenie, ktoré sprevádza ľudstvo už od nepamäti. Predpokladá sa, že rod *Mycobacterium* vznikol pred viac ako 150 miliónmi rokov. Pôvodcu infekcie – *M. tuberculosis* ako prvý identifikoval a opísal v roku 1882 Róbert Koch a preto sa často označuje ako Kochov bacil [21, 22].

Podľa údajov Svetovej zdravotníckej organizácie v roku 2015 zomrelo na TBC približne 1,4 milióna ľudí a pribudlo asi 10,4 miliónov nových prípadov (Obrázok č. 4). Jedná sa hlavne o ochorenie pľúc (pulmonálna TBC) avšak *M. tuberculosis* môže napadnúť aj iné orgány (extrapulmonálna TBC). Infekcia sa najčastejšie šíri od infikovaných ľudí s pulmonálnou TBC a to vzdušnou cestou a v prípade *M. bovis* konzumáciou kontaminovaných a nepasterizovaných mliečnych produktov [23].



**Obrázok č. 4:** Incidencia tuberkulózy, 2015. Prevzaté z [23] a upravené

#### 3.1.3.1 Priebeh a diagnostika tuberkulózy

Po infekcii dôjde len u približne 5 – 10 % nakazených ľudí k rozvoju primárnej aktívnej pulmonálnej TBC, ktorá sa prejaví do 1 – 2 rokov od prvotného stretu s patogénom. U viac ako 90 % osôb infikovaných *M. tuberculosis* prebieha ochorenie v asymptomatickej latentnej fáze. Latentná fáza môže trvať celé roky, kedy imunitný systém dokáže kontrolovať patogén, ale nie je schopný jeho eliminácie. Odhaduje sa, že

asi 2 miliardy ľudí sa nachádzajú v latentnej fáze infekcie. Reaktivácia môže nastať u približne 5 – 10 % infikovaných poklesom obranných mechanizmov imunitného systému a následne vznikom postprimárnej aktívnej TBC. Rizikové skupiny pre rozvoj postprimárnej TBC sú predovšetkým imunokompromitované osoby, t. j. osoby trpiace AIDS (acquired immune deficiency syndrome, syndróm získanej imunitnej nedostatočnosti), pacienti užívajúci imunosupresíva, starí ľudia, alkoholici, osoby zo zlých sociálnych pomerov, ľudia z oblastí s výraznejším výskytom tejto choroby a ďalší [6, 24, 25].

Aktívna pľúcna TBC sa prejavuje hlavne chronickým kašľom s produkciou spúta (môže sa vyskytnúť až hemoptýza), anorexiou, horúčkou, stratou váhy, či nočným potením. Mimopľúcna TBC môže napadnúť rôzne orgány tela, najčastejšie lymfatické uzliny, peritoneum, genitourinálny trakt, žalúdok, slezinu, muskuloskeletárny systém, ileocekálnu oblasť alebo centrálny nervový systém [24, 26].

Medzi štandardné metódy pre diagnostiku aktívnej TBC sa využíva mikroskopická analýza spúta, po ktorom nasleduje kultivácia a testovanie citlivosti voči antituberkulotikám. Ďalej je to amplifikácia nukleových kyselín, röntgen hrudníka alebo histopatologické vyšetrenie biopsie. Novou možnosťou je diagnostika pomocou Xpert MTB/RIF testu (molekulárna diagnostická metóda), ktorý s vysokou citlivosťou a rýchlosťou (do 2 hodín) detekuje *M. tuberculosis* a súčasne informuje o rezistencii na rifampicín [23, 24].

Pre diagnostiku latentnej formy sa používa tzv. Mantoux test alebo tiež TST (tuberculin skin test, tuberkulínový kožný test). Objaviteľom tuberkulínu bol v roku 1890 Róbert Koch, ale techniku transdermálneho podania popísal v roku 1912 Charles Mantoux. Tuberkulín sa získava ako PPD (purified protein derivative, purifikovaný proteínový derivát) z *M. tuberculosis*. Jeho podaním dochádza k vzniku DTH (delayed type hypersensitivity, precitlivosť oneskoreného typu). Senzitizované T lymfocyty produkujú na miesto infekcie lymfokíny a dochádza k lokálnej vazodilatácii a hromadeniu ďalších buniek zápalového procesu. Veľkosť kožnej reakcie sa hodnotí po 48 – 72 hodinách od vpichu PPD. Tento test informuje o miere hypersenzitivity na tuberkulín. Veľkosť erytrému sa meria podľa 3 stupňov – 5 mm, 10 mm, 15 mm [22, 24, 25, 27].

Problémom TST testu je falošne negatívny výsledok u pacientov trpiacich AIDS, ak interval od infekcie je kratší ako 4 – 6 týždňov, čo je doba kým dôjde k rozvoju DTH, alebo v prípade nesprávnej administrácie a ďalšie. Falošne pozitívny výsledok sa

môže vyskytnúť ako odpoveď na BCG vakcínu alebo po expozícii netuberkulózných mykobaktérií. Presnejšie stanovenie poskytuje test pre INF- $\gamma$ , ktorý sa stanovuje vo vzorke krvi. Analýza genómu *M. tuberculosis* viedla k objaveniu úseku tzv. RD1 oblasti (region of difference 1, rozdielna oblasť 1), ktorá u *M. bovis* BCG chýba. RD1 oblasť kóduje gény pre antigény ESAT-6 (early secreted antigenic target of 6 kDa, sekrečný antigén s hmotnosťou 6 kilodaltonov) a CFP-10 (culture filtrate protein-10, filtrátový proteín s hmotnosťou 10 kilodaltonov). Uvedené antigény stimulujú produkciu INF- $\gamma$  T lymfocytmi. Táto imunodiagnostická metóda TBC detekuje uvoľňovanie INF- $\gamma$  a eliminuje falošne pozitívnu reakciu na BCG vakcínu. Tento test však nie je schopný rozlíšiť, či ide o latentnú fázu, aktívnu fázu alebo reinfekciu [25, 27, 28].

### 3.1.3.2 Liečba tuberkulózy

Liečba TBC je zdĺhavý proces a vyžaduje kombináciu viacerých antituberkulotík. Štandardná liečba aktívnej TBC trvá 6 mesiacov. Základom je štvorkombinácia liečiv: izoniazid, rifampicín, pyrazínamid a etambutol. Túto kombináciu liečiv užíva pacient dva mesiace a potom pokračuje štyri mesiace s dvojkombináciou izoniazid a rifampicín. Ako prevenciu neuropatií pri liečbe izoniazidom sa odporúča pacientom užívať pyridoxín. Uvedené látky patria do tzv. prvej línie antituberkulotík. Problémom v terapii TBC je však častá rezistencia na základnú liečbu izoniazidom a rifampicínom, ktorá sa označuje ako multiliekovo-rezistentná TBC. Podľa citlivosti sa podávajú ďalšie antibiotiká z druhej línie ako etionamid, protionamid alebo fluorochinolóny. Za extenzívne rezistentnú TBC sa považuje rezistencia na izoniazid a rifampicín, pričom mykobaktérie sú navyše rezistentné na minimálne jeden fluorochinolón a jedno injekčne podané liečivo z druhej línie antituberkulotík. V terapii latentnej TBC sa uplatňuje predovšetkým monoterapia 1  $\times$  denne izoniazidom po dobu 6 alebo 9 mesiacov [23, 24].

### 3.1.4 *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin

Živá kultúra tzv. bacil Calmettov a Guérinov sa používa ako lyofilizovaný prípravok na výrobu vakcíny proti TBC. Imunostimulačné účinky BCG vakcíny sa tiež využívajú aj v terapii karcinómu močového mechúra a kožného melanómu. BCG vakcína sa vo svete používa už skoro 100 rokov, avšak s rôznymi výsledkami v ochrane proti TBC. Najväčšiu účinnosť poskytuje intradermálne podaná BCG vakcína v detstve

a v ochrane pred diseminovanou TBC, ale u dospeljej populácie je jej obranný účinok voči pľúcnej TBC často variabilný. Variabilná účinnosť BCG vakcíny je spôsobená viacerými faktormi. Jednak genetickou a fenotypovou odlišnosťou jednotlivých očkovacích kmeňov BCG vakcíny, genetickou rôznorodosťou v populáciách a tiež expozíciou rôznych environmentálnych mykobaktérií. Ďalšou príčinou neúspešnosti vakcíny môže byť zvýšená aktivácia produkcie IL-10 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulačnými T lymfocytmi, ktoré inhibujú účinok INF- $\gamma$ . Preto jednou z možných stratégií vylepšenia BCG vakcíny môže byť ovplyvnenie regulačných T lymfocytov [29, 30, 31, 32].

#### 3.1.4.1 Vývoj vakcíny

Vývoj vakcinačného kmeňa proti TBC predstavoval významný medzník v histórii. Na začiatku 20. storočia ako prvý izoloval Nocard z kravy trpiacej tuberkulóznou mastitídou kmeň *M. bovis*. Albert Calmette a Camille Guérin, ktorí pracovali na Pasteurovom inštitúte v Lille, sa zaoberali kultiváciou tohto kmeňa. Od roku 1908 pasážovali kmeň *M. bovis* izolovaný Nocardom pravidelne v 3-týždňových intervaloch na pôdach s glycerínom, zemiakmi a hovädzou žľou. Ich cieľom bolo opakovaným pasážovaním znížiť jeho virulentnosť a takto vyvinúť vakcínu proti TBC. To sa im nakoniec podarilo v roku 1919 po 230. pasážach. Nová vakcína bola pomenovaná podľa svojich objaviteľov „BCG“. Po prvý krát bola podaná človeku v roku 1921 perorálnou cestou a odvtedy bolo BCG vakcínou imunizovaných viac ako 3 miliardy ľudí v najmenej 180 krajinách [33, 34, 35].

Dnes je k dispozícii viacero kmeňov BCG vakcíny, napr. Pasteur, Japan, Glaxo, Moreau, Danish a ďalšie. Jednotlivé používané subkmene sa líšia imunologicky, morfológicky a aj biochemicky, v závislosti na rôznych laboratóriách, kde boli produkované. Počas atenuácie virulentného kmeňa *M. bovis* dochádzalo k rôznym genetickým zmenám, napr. inzercii, k delécii, tandemovej duplikácii rôznych oblastí genómu zodpovedných za virulenciu tuberkulózneho bacila. Jednou z hlavných príčin straty virulencie *M. bovis* je delécia RD1 oblasti genómu, ktorá je spoločná pre všetky dcérske subkmene BCG. Ďalšou odlišnosťou jednotlivých BCG subkmeňov je rezistencia na antituberkulotiká. Jedným z príkladov je bodová mutácia *mma3* génu, ktorá je zodpovedná za rezistenciu na izoniazid [35].

### 3.1.4.2 Aplikácia vakcíny

Aplikácia BCG vakcíny vedie k aktivácii antigén prezentujúcich buniek, ktoré rozpoznali PAMPs prostredníctvom PRRs, ako napr. TLR-2, TLR-4. Tie potom aktivujú signálnu kaskádu a privolajú ďalšie imunokompetentné bunky na miesto infekcie. Aktivácia tejto signálnej kaskády vedie k expresii adhézných molekúl, kostimulačných molekúl a tiež MHC-II. MHC-II molekuly interagujú s receptorom CD4+ T lymfocytov. Tieto udalosti vedú k produkcii rôznych chemokínov a cytokínov regulujúcich rozvoj imunitnej odpovede. Hlavnými cytokínmi stimulovanými BCG vakcínou sú INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a IL-2 produkovaných CD4+ T lymfocytmi. Väčšina INF- $\gamma$  produkujúcich T lymfocytov má fenotyp centrálnych pamäťových buniek [30, 36].

Rôzna miera protekcie BCG vakcíny sa líši aj podľa spôsobu aplikácie. Pôvodná cesta podania BCG bola perorálna. Neskôr sa prešlo na kutánnu formu aplikácie pre rýchlejší nástup DTH, ktorý je podstatou diagnostického TST testu na tuberkulín [32].

Vakcína sa v súčasnosti aplikuje v požadovanej dávke intradermálne do ľavej paže. Normálnou reakciou v mieste vpichu je tvorba malej ulcerácie, alebo abscesu do 10 mm 6 – 8 týždňov po očkovaní. Môže sa tiež vyskytnúť mierne zväčšenie lymfatických uzlín v okolí podania vakcíny (napr. v axile, na krku). Žiaľ, v niektorých prípadoch, zvlášť u detí s poruchami imunity, môže dôjsť k vážnym nežiaducim účinkom (napr. k tvorbe granulómov, keloidných jaziev, BCG meningitídy a dokonca aj k diseminovanej infekcii). Preto nesmie byť podaná pacientom s AIDS [24, 37].

Dnes sa dostáva do popredia možnosť intranazálnej cesty podania, ktorá predstavuje perspektívu lepšej protekcie voči TBC. Princíp lepšieho účinku spočíva vo vyššej tvorbe CD4+ a CD8+ T lymfocytov v pľúcnom parenchýme. Nevýhodou je vznik imunopatologického nežiaduceho účinku v pľúcach. Tento problém by sa však mohol v budúcnosti vyriešiť elimináciou niektorých ďalších faktorov virulencie mykobakteriálnej bunkovej steny, ktoré sa podieľajú na zápalovom procese [32, 38].

Celošné povinné očkovanie novorodencov proti TBC sa v Československu zahájilo v roku 1953. S výnimkou v rokoch 1986 – 1993, kedy bolo povinné očkovanie v troch krajoch v Českej republike dočasne prerušené, sa očkovalo až do roku 2010. Z dôvodu znižujúcej sa incidencie TBC bolo nakoniec v Českej republike povinné očkovanie novorodencov vyhláškou č. 299/2010 Sb. zrušené od 1.11.2010. Na Slovensku bolo plošné očkovanie proti TBC zrušené podľa vyhlášky č. 544/2011 Z. z. od 1.1.2012. Odvtedy sa očkujú len rizikové skupiny novorodencov [37, 39, 40].

## 3.2 B lymfocyty

B lymfocyty sú bunky imunitného systému, ktoré predstavujú zložku adaptívnej humorálnej imunity. Ich pomenovanie „B“ je odvodené od Fabriciovej burzy, lymfatického orgánu u vtákov, v ktorom boli pôvodne objavené. Ľudské a myšie B lymfocyty vznikajú primárne v kostnej dreni a fetálnej pečeni, kde zároveň dochádza aj k preskupovaniu génových segmentov pre ľahký a ťažký reťazec povrchového imunoglobulínu pre BCR (B cell receptor, B bunkový receptor) za vzniku pro-a pre-B lymfocytu. B lymfocyty, ktoré úspešne dokončili rekombináciu génových segmentov opúšťajú kostnú dreň a definitívne dozrievajú v sekundárnych lymfatických orgánoch. Následne môžu byť aktivované rozpoznaním antigénu pomocou svojho BCR receptoru. Počas procesu dozrievania sú odstránené tie B lymfocyty, ktorých BCR receptor je autoreaktívny. Žiaľ, narušenie rovnováhy medzi aktivačnými a inhibičnými signálmi, ktoré regulujú B lymfocyty, môže viesť k autoimunitám [41, 42, 43].

Ich funkcia bola oddávna prisudzovaná produkcii špecifických protilátok plazmatickými bunkami a tvorbe pamäťových buniek voči špecifickým antigénom. Dnes sa ukazuje, že schopnosťou prezentovať antigén a následnou aktiváciou T lymfocytov, produkciou cytokínov a kostimulačných molekúl, ovplyvňovaním mikrobiálnych infekcií a zápalových reakcií a tiež regulačnou funkciou cez IL-10 sa uplatňujú v humorálnej a aj bunkami sprostredkovanej imunite [41, 44].

B lymfocyty predstavujú rozmanitú skupinu. Subpopulácie sa líšia vo svojom vývojovom štádiu, fenotype, lokalizácii a aj funkcii. Podľa produkcie cytokínov ich možno rozdeliť na Be (effector B cells, efektorové B lymfocyty) a Breg (regulatory B cells, regulačné B lymfocyty). Breg sa vyznačujú produkciou IL-10, TGFβ-1 (transforming growth factor beta 1, transformujúci rastový faktor beta 1). Be je možno rozlíšiť na subpopulácie Be1 a Be2. Be1 po stimulácii Th1 lymfocytmi produkujú INF-γ, IL-12 a TNF-α. Naopak Be2 reagujú na stimuláciu Th2 lymfocytmi produkciou IL-2, IL-4, TNF-α a IL-6. B lymfocyty však môžu aj negatívne regulovať obranné mechanizmy, vzhľadom k nadmernej produkcii IL-10 alebo IL-35 [41, 45, 46].

U myši boli charakterizované tri hlavné populácie B2, B1 a B lymfocyty marginálnej zóny. B2 alebo tiež známe ako konvenčné, či folikulárne lymfocyty sa nachádzajú hlavne v slezine a lymfatických uzlinách. Pre svoju aktiváciu vyžadujú kooperáciu s T lymfocytmi a následne produkujú vysoko afinitné protilátky, prevažne Ig (immunoglobulín, imunoglobulín) triedy G. Sú zodpovedné za tvorbu adaptívnej

imunity. B2 lymfocyty sa tvoria z prekursorových buniek priebežne počas života [41, 44, 47].

Na rozdiel od konvenčných B2 sa B1 lymfocyty sa vyznačujú samoobnovovacou funkciou. Nachádzajú sa v pleurálnych a peritoneálnych dutinách. B lymfocyty marginálnej zóny u myší vznikli z rovnakej prekursorovej bunky ako konvenčné B2 lymfocyty. Nachádzajú sa hlavne v slezine a spolu s B1 lymfocytmi tvoria tzv. prirodzené protilátky najčastejšie triedy IgM nezávisle na T lymfocytoch. Aj vďaka týmto regulačným funkciám sa B1 a B lymfocyty marginálnej zóny uplatňujú aj vo vrodenej imunitnej odpovedi [41, 43, 47].

Na B lymfocytoch sa nachádzajú rôzne povrchové molekuly. Charakteristická je expresia napr. CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD40, CD72, či CD79 $\alpha$  a  $\beta$ . Podľa fenotypu môžeme B1 lymfocyty rozlíšiť na základe povrchovej molekuly CD5 a to na B1a (CD5+) alebo B1b (CD5-). B2 lymfocyty môžeme od B1 na základe expresie viacerých povrchových molekúl vrátane CD5 a CD11b. B1a lymfocyty sú pozitívne na oba menované znaky (CD19+CD5+CD11b+). B1b lymfocyty zdieľajú fenotyp s B1a až na molekulu CD5 (CD19+CD5-CD11b+) a B2 sú negatívne ako na molekulu CD5, tak aj na CD11b (CD19+CD5-CD11b-) [41, 48, 49].

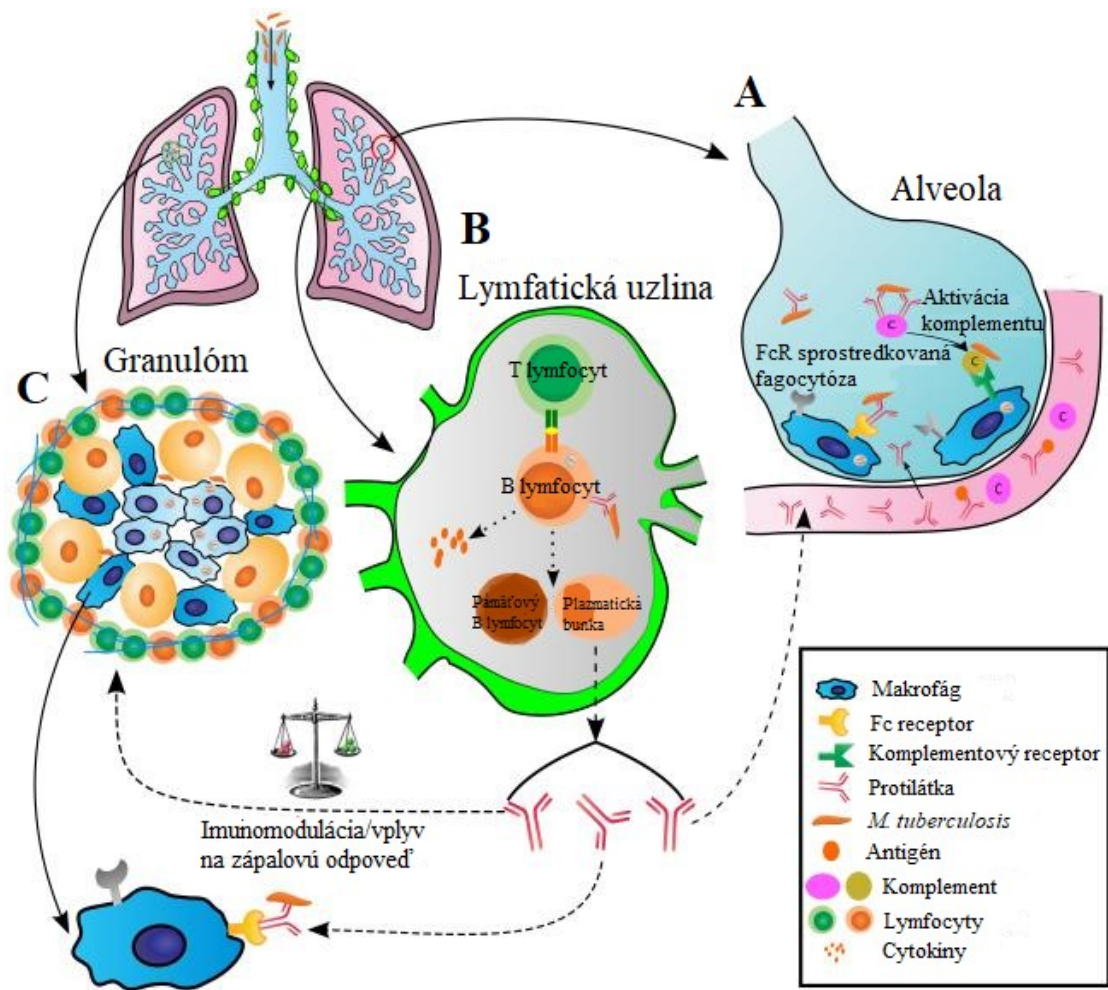
### **3.2.1 Úloha B lymfocytov po infekcii intracelulárnym patogénom**

Hlavná úloha v obrane voči intracelulárnym baktériám bola pripisovaná najmä makrofágom, ktoré prostredníctvom IL-12 stimulovali Th1 lymfocyty produkujúce cytokíny INF- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ . Pribúdajúce výskumy však dokazujú, že aj B lymfocyty sa zúčastňujú regulácie imunitnej odpovede voči intracelulárnym patogénom ako napr. *Francisella tularensis*, *Brucella abortus* alebo *Salmonella sp.* [50, 51, 52, 53].

B lymfocyty sa uplatňujú jednak produkciou protilátok, ktoré sú v priamej interkcii s baktériou. Následne prostredníctvom ich väzby cez Fc receptor hostiteľskej bunky podporia moduláciu imunitných procesov a tak navodia tvorbu dlhotrvajúcej imunity. Druhý spôsob je protilátkovo nezávislá cesta založená buď na priamom kontakte bunka-bunka a to prostredníctvom expresie povrchových receptorov alebo na produkcii cytokínov. B lymfocyty sú schopné prostredníctvom svojho BCR receptoru rozpoznať a naviazať patogén, ktorý následne môžu prezentovať CD4+ ako aj CD8+ T lymfocytom. Taktiež sú schopné ovplyvniť rozvoj pamäťových T lymfocytov. Navyše B1 a B lymfocyty marginálnej zóny sa uplatňujú tiež vo vrodenej imunitnej



odpovedi a tak tvoria akýsi mostík medzi adaptívnou a vrodenu imunitou (Obrázok č. 5) [54].



**Obrázok č. 5:** Schéma patogenézy tuberkulózy a ochranný vplyv B lymfocytov. Prevzaté z [55] a upravené.

**Vysvetlivky:** **A:** Pľúcna alveola – Úloha Ab (antibodies, protílátky) v infekcii *M. tuberculosis* prostredníctvom opsonizácie, aktivácie komplementu a FcR sprostredkovaná fagocytóza. Ab môžu ovplyvniť obranný proces v počiatočných fázach infekcie, kedy je v dôsledku zápalu zvýšená permeabilita séra a možný presun Ab a komplementu. **B:** B lymfocyty sa nachádzajú v germinálnom centre lymfatických orgánov a svoje funkcie uplatňujú prostredníctvom prezentácie antigénu T lymfocytom, produkciou cytokínov, ktoré môžu ovplyvniť imunitnú odpoveď, produkciou Ab, ktoré môžu modulovať adaptívnu aj vrodenu imunitu. **C:** Vplyv B lymfocytov a Ab na zápalový proces, FcR sprostredkovaná fagocytóza a usmrtenie *M. tuberculosis*. Ab môžu ovplyvniť formovanie granulómu prostredníctvom pre- a pro-zápalových efektov. V prítomnosti Ab môže byť znížená diseminácia a lepšia lokálna kontrola infekcie.

### 3.2.2 Úloha B lymfocytov po infekcii intracelulárnou baktériou *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin

*M. bovis* BCG je kmeň odvodený od virulentného kmeňa *M. bovis*, ktorý sa v súčasnosti používa ako jediná dostupná vakcína proti TBC. Na základe doterajších poznatkov bola imunitná odpoveď voči mykobakteriálnym antigénom sprostredkovaná predovšetkým prostredníctvom T lymfocytov a aktivovaných makrofágov. O funkcii B lymfocytov a tvorbe protilátok sa myslelo, že zohráva minoritnú úlohu. Dnes sa hromadia informácie, že BCG imunizácia vyvoláva nielen bunkovú odpoveď, ale aj humorálnu imunitnú odpoveď [16, 34, 56, 57].

V štúdií Kozakiewicz *et al.* (2013) sa zaujímali o spôsob akým B lymfocyty regulujú imunitnú odpoveď po infekcii baktériou *M. tuberculosis* a po BCG vakcinácii. U infikovaných myší, ktoré mali deficit B lymfocytov bola značne zvýšená zápalová reakcia s výraznou infiltráciou neutrofilov, ktoré sa medzi prvými bunkami uplatňujú v tvorbe granulómu. Dospeli k záveru, že B lymfocyty sú schopné prostredníctvom IL-17 ovplyvňovať neutrofile a obranu voči infekcii *M. tuberculosis* a tiež po BCG vakcinácii. Zvýšené množstvo neutrofilov viedlo k nežiaducim účinkom BCG vakcíny spôsobenými nadmernou stimuláciou Th1 cesty imunitnej odpovede. Reguláciou neutrofilov prostredníctvom IL-17 môžu B lymfocyty pozitívne ovplyvňovať vznik imunity po BCG vakcinácii [58].

Brown *et al.* (2003) vo svojej štúdií prezentovali, že mykobakteriálny fragment lipoarabinoman výrazne stimuluje protilátkovú odpoveď indukovanú BCG vakcínou, nakoľko špecifické protilátky proti lipoarabinomanu boli výrazne zvýšené po BCG vakcinácii. Tím da Silva *et al.* (2013) sledovali imunitnú odpoveď po opakovanej imunizácii myší s *M. bovis* BCG. Vo svojej štúdií zaznamenali signifikantný nárast humorálnej odpovede. *M. bovis* BCG opsonizovaná špecifickými protilátkami sa viaže na Fc receptor efektorových buniek, ktoré ho internalizujú. Ukázalo sa, že opsonizácia BCG protilátkami výrazne uľahčuje a urýchľuje fagocytózu a následnú lýzu bunky. Takisto produkcia oxidu dusnatého, ktorý sa uplatňuje v eliminácii patogénov, bola zvýšená u protilátkami opsonizovaných mykobaktérií. Tieto výsledky dokazujú, že BCG imunizácia vedie nielen k bunkovej imunite, ale aj k tvorbe humorálnej odpovede prostredníctvom produkcie širokého spektra protilátok [57, 59].

Sebina *et al.* (2012) vo svojej štúdií sledovali vznik a frekvenciu mykobakteriálne špecifických pamäťových B lymfocytov voči rôznym antigénom (napr. PPD, Ag85A, Ag85B, ESAT-6 a CFP-10) u zdravých ľudí očkovaných BCG

vakcínou a u neočkovaných ľudí. Zistili, že frekvencia špecifických pamäťových B lymfocytov voči PPD bola signifikantne vyššia u očkovaných ako u neočkovaných. Tieto výsledky naznačujú, že B lymfocyty sa uplatňujú v imunitnej odpovedi voči BCG vakcinácii indukciou dlhotrvajúcej odpovede sprostredkovanvej týmito špecifickými pamäťovými bunkami [60].

Russo *et al.* (2010) sa zaoberali konkrétnym subtypom lymfocytov B1. B1 lymfocyty sa odlišujú od konvenčných lymfocytov nielen ontogeneticky, fenotypicky, morfológicky, ale aj funkčne. Preukázalo sa, že B1 lymfocyty sa uplatňujú v obrannej reakcii voči *M. bovis* BCG viac ako sa myslelo. B1 lymfocyty sa dokážu presunúť z oblasti peritonea do pľúc, kde tvoria histopatologické znaky granulómu indukovaného *M. bovis* BCG u myši. Taktiež sú schopné regulovať počet makrofágov a Th lymfocytov a inhibovať produkciu MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1, monocytárny chemoatraktantný proteín 1) v pľúcach infikovaných BCG [61].

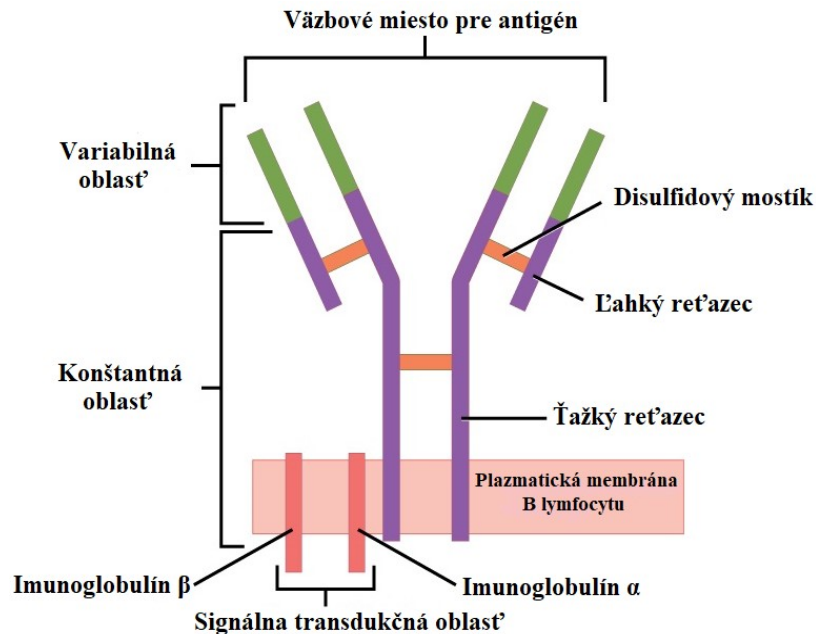
### 3.2.3 Receptory B lymfocytov

Na povrchu B lymfocytov sa nachádza veľké množstvo receptorových molekúl, ktoré sa odlišujú štruktúrne a funkčne, napr. BCR receptor, FcR (receptor pre Fc oblasť protilátok), CR (complement receptor, komplementový receptory) a ďalšie [50].

- **BCR receptor**

Kľúčovú úlohu pri aktivácii B lymfocytu zohráva väzba špecifického antigénu na jeho BCR receptor, po ktorej nasleduje iniciácia signalizačnej kaskády vedúcej k spracovávaniu antigénu a jeho následnej prezentácii T lymfocytom. Zrelý B lymfocyt môže exprimovať BCR receptor väčšinou dvoch izotypov – IgM alebo IgD. Štruktúra membránového imunoglobulínu je tvorená z dvoch ťažkých a dvoch ľahkých reťazcov. V prípade IgM je ťažký reťazec zložený z piatich imunoglobulínových domén a v prípade IgD obsahuje ťažký reťazec štyri imunoglobulínové domény. V oboch prípadoch je ťažký reťazec zakončený krátkou intracelulárnou doménou zloženou z troch aminokyselín – arginín, lyzín a valín. Membránový imunoglobulín sa nevyznačuje signalizačnou funkciou, ale je nekovalentne spojený s heterodimérom  $Ig\alpha/Ig\beta$ . Oba reťazce heterodiméru sú spojené disulfidickou väzbou a skladajú sa z 3 domén: extracelulárnej, transmembránovej a cytoplazmatickej (Obrázok č. 6). Cytoplazmatická časť obsahuje tzv. ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation

motifs, imunoreceptorové aktivačné motívy založené na tyrozíne) a je dôležitá pre rozvoj signálnej kaskády v bunke [62, 63].



**Obrázok č. 6:** Schéma BCR receptoru. Prevzaté z [64] a upravené.

- **FcR receptor**

FcR sú povrchové molekuly, ktoré sa nachádzajú na rôznych bunkách imunitného systému vrátane B lymfocytov a makrofágov. Ich úlohou je špecifická väzba rôznych izotypov protilátok prostredníctvom Fc oblasti daného imunoglobulínu. Týmto spôsobom uľahčujú fagocytózu a endocytózu opsonizovaných častíc, uplatňujú sa v protilátkovo závislej bunkovej cytotoxicite a tiež v aktivácii degranulácie mastocytov. Protilátky sa vyskytujú v piatich rôznych triedach (IgA, IgD, IgE, IgG a IgM), ktoré sa líšia v štruktúre, lokalizácii a funkcii. Najviac charakterizované sú FcR receptory pre protilátky IgG, IgA, a IgE. Každý sa skladá z jedinečného  $\alpha$ -reťazca, prostredníctvom ktorého viaže ligand. Cez transmembránovú oblasť je  $\alpha$ -reťazec často spojený s dimérom  $\gamma$ -reťazca, ktorý má signálnu funkciu. Aktivačné a inhibičné funkcie FcR receptorov sú regulované prostredníctvom ITAMs a ITIMs (imunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs, imunoreceptorové inhibičné motívy založené na tyrozíne). Tieto štruktúry sa nachádzajú na cytoplazmatickej oblasti  $\gamma$ -reťazca, prípadne  $\alpha$ -reťazca [50, 65, 66].

Pre IgG boli popísané štyri hlavné typy receptorov: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII a Fc $\gamma$ RIV, ktoré sa líšia v afinite k štyrom izotypom IgG. Pre IgE je charakterizovaný

vysokoafinitný receptor FcεRI, pre IgA je to FcαR1, IgM sa viaže na FcμR a nakoniec je popísaný spoločný receptor pre IgM a IgA a to FcαμR [66].

- **Komplementové receptory**

Úlohou komplementových receptorov je väzba štiepných fragmentov komplementu. V závislosti od konkrétneho typu receptoru plnia viacero funkcií (napr. uľahčujú fagocytózu opsonizovaných častíc, pomáhajú eliminovať imunokomplexy, patogény a ďalšie). Podľa fragmentu C3 a jeho degradačných produktov ich môžeme rozdeliť na 5 skupín [50, 67].

CR1 (CD35) je receptor s afinitou k C3b, iC3b, C4b a tiež C1q. Nachádza sa na erytrocytoch, polymorfonukleárných bunkách, T lymfocytoch a tiež na B lymfocytoch. Na B lymfocytoch uľahčuje pripojenie opsonizovaného antigénu k CR2 (CD21) prostredníctvom premeny C3b na iC3b [67].

Komplementový receptor CR2 (CD21) sa uplatňuje v aktivácii B lymfocytov prostredníctvom väzby antigénu opsonizovaného fragmentom C3. Okrem B lymfocytov sa nachádza na folikulárnych dendritických bunkách [50, 67].

CR3 (CD11b/CD18) a CR4 (CD11c/CD18) receptory patria medzi β2 integríny, ktoré sa vyznačujú podobnou štruktúrou. Tá je tvorená z dvoch reťazcov – jedinečného α-reťazca a spoločného β-reťazca. Viažu degradačný fragment iC3b. Ich funkcia spočíva najmä vo fagocytóze opsonizovaných častíc a podpore adhézie [50, 67].

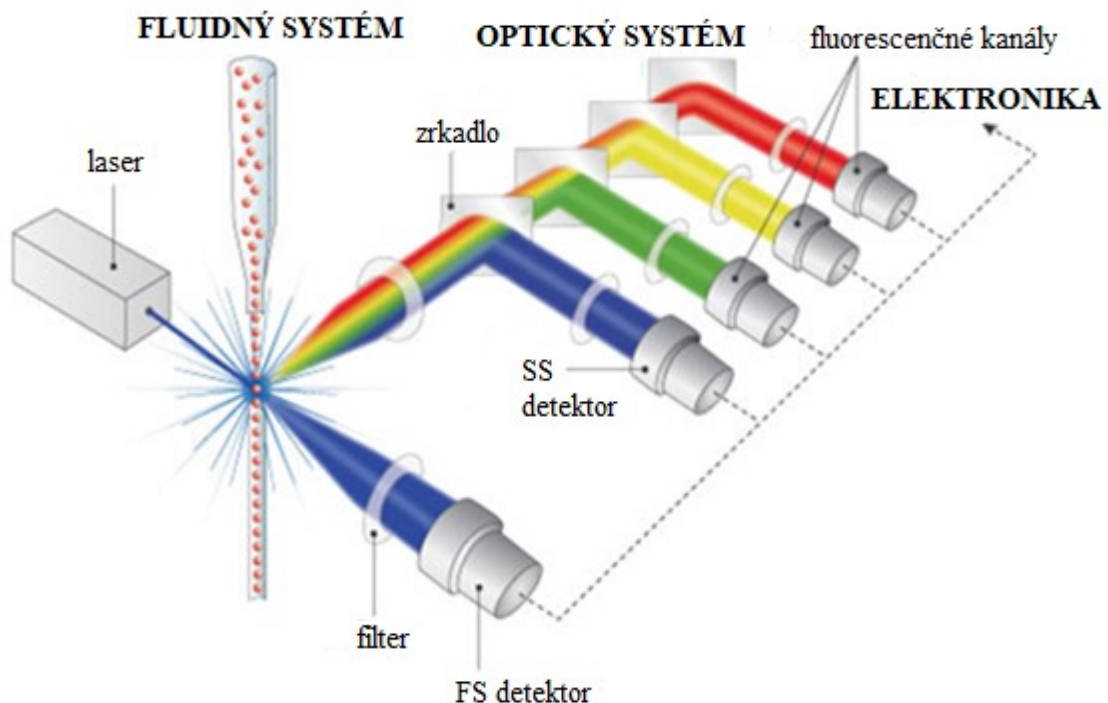
Piatym typom receptoru pre aktivačné C3 fragmenty je CR1g (complement receptor of the immunoglobulin superfamily, komplementový receptor pre imunoglobulínovú nadrodinu), ktorý sa však nachádza len na Kupfferových bunkách [68].

### 3.3 Prietoková cytometria

FC (flow cytometry, prietoková cytometria) je moderná a rýchlo sa rozvíjajúca metóda používaná v klinickej aj výskumnej oblasti. Slúži ako na kvalitatívnu tak aj na kvantitatívnu analýzu častíc (v našom prípade buniek) v suspenzii. Meranie prebieha v prúde kvapaliny, ktorým prechádza laserový lúč. Zo sledovanej populácie získavame parametre zahrňujúce informácie o veľkosti, granularite a fluorescencii jednotlivých buniek. Výhodou FC je analýza veľkého množstva buniek (tisíce až milióny) v heterogénnej populácii za veľmi krátky čas, pričom dokáže detekovať viacero parametrov na jednotlivých bunkách súčasne. Niektoré typy prietokových cytometrov dokážu tiež na základe získaných parametrov triediť bunky. Jedná sa o FACS (fluorescence-activated cell sorter, fluorescenčne aktivovaný bunkový triedič), ktorý oddeľuje jednotlivé fluorescenčne označené bunky [69, 70, 71, 72].

Prietokový cytometer sa skladá z 3 hlavných systémov (Obrázok č. 7):

- fluidný systém,
- optický systém,
- elektronika [72].



**Obrázok č. 7:** Schéma prietokového cytometra. Prevzaté z [73] a upravené.

**Vysvetlivky:** FS: forward scatter, priamy rozptyl svetla, SS: side scatter, bočný rozptyl svetla.

### 3.3.1 Fluidný systém

Fluidika zabezpečuje transport buniek zo suspenzie k zdroju svetla. Po vstriknutí vzorky do prietokovej kyvety sú bunky náhodne rozptýlené v priestore. Aby sme mohli analyzovať každú bunku samostatne, je potrebné, aby bunky prechádzali laserovým lúčom v jednom rade za sebou. Princíp spočíva v rozdieloch tlakov pôsobiacich na vstriknutú suspenziu a nosnú tekutinu („sheath fluid“) v kyvete. Na skúmanú suspenziu pôsobí iný tlak ako na tekutinu v plášti a tvorí tzv. centrálné jadro tohto koaxiálneho toku. Laminárny tok nosnej tekutiny zároveň zabezpečí prechod práve jednej bunky cez svetelný lúč a tak minimalizuje zhlukovanie buniek. Tento dej sa nazýva hydrodynamická fokusácia [70, 71, 72].

### 3.3.2 Optický systém

Optický systém zahŕňa excitačnú a zbernú optiku. Excitačná optika pozostáva zo zdroja svetla a šošoviek, ktoré usmerňujú smer lúča. Interakcia svetelného lúča s bunkou vedie k odrazu a k rozptýleniu žiarenia, ktoré závisí na vlastnostiach bunky. Výsledkom sú dva optické parametre – SS (side scatter, bočný rozptyl svetla) a FS (forward scatter, priamy rozptyl svetla). FS je rozptyl svetla v smere dopadajúceho lúča, ktorý poskytuje informácie o veľkosti buniek a SS je rozptyl kolmý, t. j.  $90^\circ$  a sprostredkuje informácie o vnútornej štruktúre (granularite). V prípade ak častica nesie fluorescenčnú značku dochádza súčasne k emisii fluorescenčného žiarenia s určitou vlnovou dĺžkou, ktoré sa detekuje v rovnakom uhle ako SS [74, 75].

Ako zdroj svetla sa väčšinou používa laser, ktorý zabezpečí úzky lúč intenzívneho svetla. Voľba vhodného laseru závisí na type použitého fluorochrómu. Dnes je najčastejším zdrojom monochromatického žiarenia argónový laser, ktorý zvyčajne emituje svetlo s vlnovou dĺžkou 488 nm. Ďalej sa používajú hélium-neónové lasery (633 nm), alebo pevné lasery, napr. červený diódový laser (635 nm) [70, 72, 76].

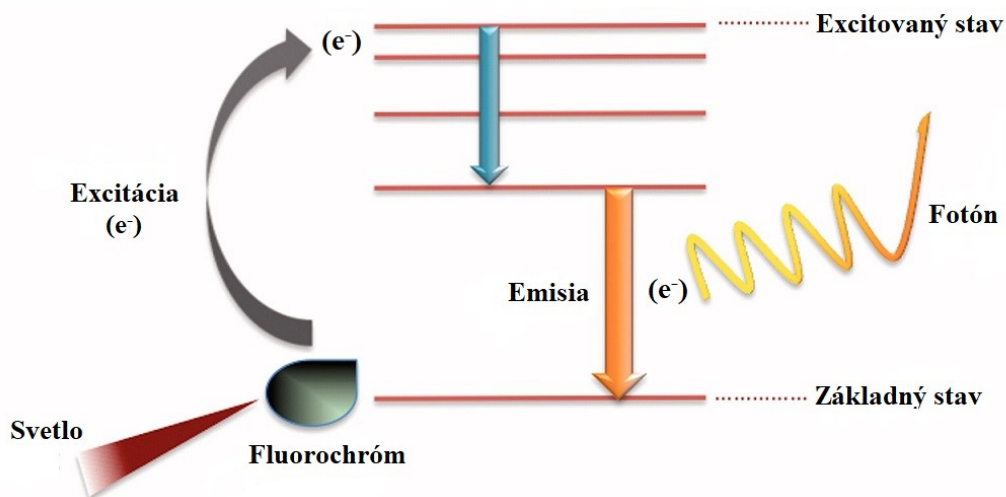
Vzniknuté fluorescenčné a odrazené žiarenia sú spracovávané zbernou optikou zloženou zo šošoviek, zrkadiel a filtrov. Šošovky zbierajú a usmerňujú emitované svetlo vzniknuté interakciou laser-bunka. Systém zrkadiel a filtrov ďalej triedi svetlo podľa príslušnej vlnovej dĺžky na jednotlivé detektory [75].

### 3.3.3 Elektronický systém

Posledným komponentom prietokového cytometra je elektronika. Svetelné signály dopadajúce na fotodetektory sú prevedené pomocou fotodiód alebo fotonásobičov z fotónov najskôr na elektrické impulzy a potom na napätie. Fotodiódy sa z dôvodu nižšej citlivosti používajú na detekciu silnejšieho signálu FS a fotonásobiče detekujú menej intenzívne signály SS a fluorescencie. Následne je analógový signál prevedený pomocou analógovo-digitálneho prevodníka na digitálny, ktorý umožní grafické zobrazenie pomocou počítačového softvéru [75, 77].

### 3.3.4 Fluorescencia

Tento jav predstavuje proces absorpcie svetla určitej vlnovej dĺžky, ktorá spôsobí prechod elektrónu do excitovaného stavu. Excitovaný elektrón okamžite prechádza naspäť do základného stavu za súčasnej emisie svetla s inou vlnovou dĺžkou (obvykle dlhšou) (Obrázok č. 8) [78, 79].



**Obrázok č. 8:** Schéma princípu fluorescencie. Prevzaté z [80] a upravené.

Len malá časť bunkových štruktúr je schopná autofluorescencie (napr. nukleotidy bohaté na pyridín a flavín). Z tohto dôvodu sa využíva značenie pomocou tzv. fluorochrómu, ktorý po absorpcii svetelnej energie dokáže emitovať fluorescenčné žiarenie. Fluorochrómy majú v praxi široké uplatnenie. Umožňujú identifikáciu rôznych pôvodne „neviditeľných“ buniek, receptorov, antigénov a tiež meranie membránového potenciálu, pH, meranie apoptózy, enzýmovej aktivity obsahu nukleových kyselín a ďalšie [72, 79].



Základnými charakteristikami každého fluorochrómu je jeho absorpčné a emisné spektrum. Rozdiel vlnových dĺžok maxím absorpčného a emisného spektra sa nazýva Stokesov posun, ktorý určuje kvalitu fluorochrómu. Čím je Stokesov posun vyšší, tým jednoduchšia je separácia excitovaného a emitovaného žiarenia. Výhodou prietokovej cytometrie je možnosť súčasne použiť a detekovať viacero fluorochrómov. Limitáciou však je, že pokiaľ majú dva fluorochrómy rovnaké emisné spektrum môže dôjsť k ich prekryvu a tak k znemožneniu analýzy. Na odstránenie prekryvu sa používa metóda kompenzácie. Pri tomto zložitom matematickom procese sa zo signálu fluorochrómu odpočíta percento tvoriace presvit iného fluorochrómu [71, 78, 79].

Fluorochrómy používané vo FC môžeme rozdeliť do viacerých skupín:

- **Fluorochrómy viazané kovalentne**

Fluorochrómy sa kovalentnou väzbou najčastejšie viažu na protilátky, ale môžu sa viazať aj na iné štruktúry, napr. hormóny, avidín, či streptavidín. Rozlišujeme priame a nepriame farbenie. Výhodou priameho farbenia je rýchlosť a jednoduchosť, avšak nie všetky primárne protilátky sú dostupné už priamo s naviazaným fluorochrómom. Pri nepriamom farbení sa na primárnu neoznačenú protilátku viaže sekundárna protilátka označená. Do tejto skupiny patrí aj označenie primárnej biotinylovanej protilátky streptavidínom [78, 79, 81].

Medzi najpoužívanejšie fluorochrómy patria – FITC (fluorescein isothiocyanate, fluoresceínizotiokyanát), PE (phycoerythrin, fykoerytrín) a APC (allophycocyanin, alofykokyanín). FITC je veľmi vhodný na samostatné značenie, avšak z dôvodu emisie žiarenia pri vyšších vlnových dĺžkach nie je vhodný na multi-farbenie. Jeho emisné spektrum sa prekrýva s PE. Nevýhodou je tiež jeho citlivosť na pH a svetlo. APC a PE patria medzi fotosyntetické farbivá nazvané fykobiliproteíny s dobrou absorpciou svetla a vysokou intenzitou fluorescencie. Medzi ich hlavné nevýhody patrí vyššia molekulová hmotnosť, ktorá spôsobuje stereometrické zmeny po konjugácii s protilátkami. Pre excitáciu FITC a PE je možné použiť argónový laser. APC vyžaduje z dôvodu vyššieho absorpčného maxima hélium-neónový laser [72, 79, 82].

Veľmi využívané sú tandemové fluorochrómy zložené z dvoch naviazaných fluorochrómov. Aktivácia primárneho fluorochrómu vedie k excitácii sekundárneho. Tento proces sa označuje ako FRET (fluorescence resonance energy transfer, prenos fluorescenčnej rezonančnej energie). Použitie tandemových fluorochrómov umožňuje aplikáciu väčšieho množstva farieb súčasne. Najčastejšie sa ako tandemový

fluorochróm používa PE a APC s rôznymi kyanínovými farbami, napr. PE-Cy5 (phycoerythrin-cyanine 5, fykoerytrín-kyanín 5) a APC-Cy7 (allophycocyanin-cyanin 7, alofykokyanín-kyanín 7). Umožňujú zvýšiť Stokesov posun a tak poskytnú možnosť použitia viacerých fluorochrómov [71, 83, 84].

- **Fluorochrómy viazané na bunkové štruktúry**

Medzi fluorochrómy, ktoré sa viažu na bunkové štruktúry patria napr. PI (propidium iodide, propídium jodid), EtBr (ethidium bromide, etídium bromid) a DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-diamidino-2-fenylindol). Používajú sa na farbenie nukleových kyselín. Mechanizmus PI a EtBr spočíva v interkalácii medzi bázy nukleových kyselín. DAPI sa viaže na DNA (deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina) v oblasti adenín-tymín. PI sa tiež využíva ako indikátor mŕtvych buniek pri meraní životnosti prietokovou cytometriou. Mŕtve bunky sú permeabilné pre PI, ktorý sa následne naviaže na nukleové kyseliny, pričom membrána živých buniek pre PI permeabilná nie je. PI emituje červené svetlo, EtBr žltó-oranžové a DAPI modré svetlo [79, 85, 86, 87].

- **Fluorescenčné proteíny**

Fluorescenčné proteíny sú špeciálne geneticky zakódované značky, ktoré umožňujú vizualizáciu procesov a štruktúr v živých bunkách a organizmoch. Táto skupina zahŕňa široké spektrum zástupcov. Hlavným predstaviteľom je GFP (green fluorescent protein, zelený fluorescenčný proteín). Pôvodne bol GFP objavený pri štúdiu bioluminiscenčných vlastností medúzy *Aequorea victoria* a emitoval zelené svetlo. Dnes je k dispozícii množstvo modifikácií GFP, ktoré sú schopné fluoreskovať širokou paletou farieb od modrej až po červenú. Pomocou metód genetického inžinierstva je tiež možné vložiť gén pre GFP do genómu *M. bovis* BCG, ktorý ho následne exprimuje [88, 89, 90].

- **Fluorochrómy aktivované chemickou reakciou**

Príkladom tohto typu fluorochrómu je rodamín 123. Ide o špecifickú kationickú fluorescenčnú značku pre mitochondrie v živých bunkách. Jeho akumulácia v mitochondrii je závislá od vysokého transmembránového potenciálu, ktorý je u funkčnej mitochondrie vo vnútri negatívny. Zmeny v transmembránovom potenciále sa odrážajú v koncentračne závislej zmene fluorescencie [91, 92].

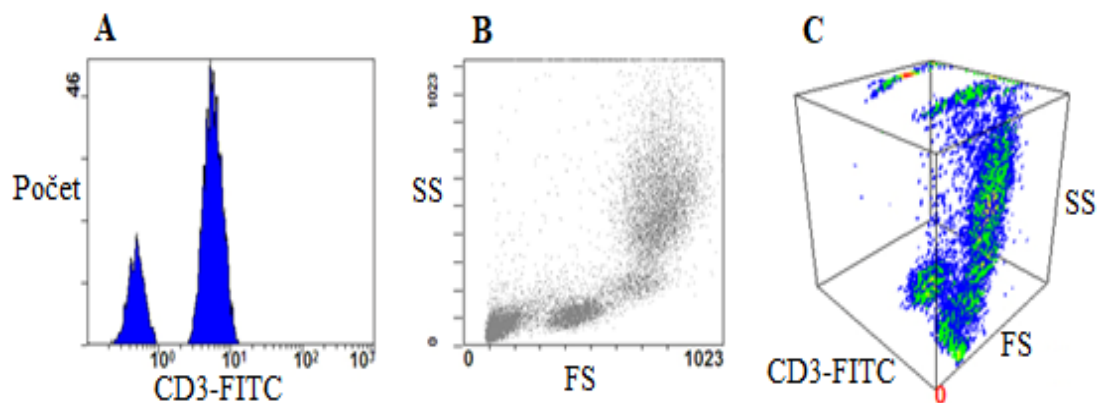
### 3.3.5 Grafické zobrazenie a analýza

Prietoková cytometria je metóda umožňujúca rýchlu analýzu veľkého počtu buniek meraním rôznych parametrov súčasne. Dáta o veľkosti, granularite a fluorescencii získané prietokovou cytometriou sa ukladajú ako súbor v „LIST MODE FILE“. Tieto údaje je následne potrebné spracovať pomocou počítača. Existuje viacero počítačových softvérov bežne používaných pre FC (napr. FlowJo, CellQuest/DIVA, FCS Express, Summit a ďalšie) [76, 93, 94].

Pre relevantnú analýzu je potrebné, aby suspenzia obsahovala minimálne  $5 \times 10^5$  až  $5 \times 10^6$  buniek/ml. Vyhodnotené môžu byť len tie častice, ktorých signál je intenzívnejší ako prahová hodnota („threshold“). Pri použití viacerých fluorochrómov môže dôjsť k prekryvu ich emisných spektier a je potrebné tento presvit kompenzovať [71, 74, 76].

Analýza vlastností buniek je založená na porovnaní parametrov odrazeného a emitovaného žiarenia. Pri spracovávaní sú využívané rôzne štatistické metódy, ktorými zisťujeme napr. priemernú intenzitu fluorescencie, percentuálne zastúpenie, geometrický priemer, smerodajné odchýlky a ďalšie [95, 96].

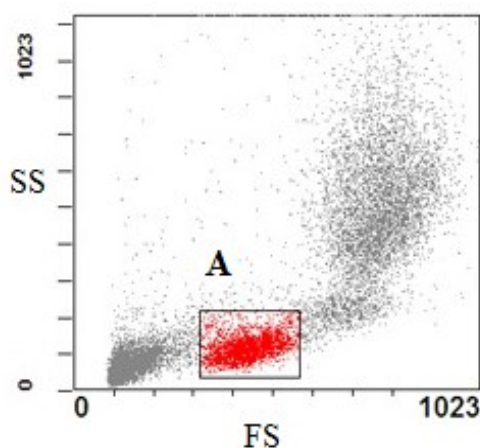
Dáta je možné spracovávať v rôznych typoch jedno-, dvoj- alebo trojparametrových grafov (Obrázok č. 9). Najjednoduchším zobrazením je jednoparametrový histogram, kde na osi x je sledovaný signál a na osi y je jeho numerické vyjadrenie. Signály s rovnakou intenzitou sú zobrazené na jednom mieste. Najčastejšie používané sú záznamy pre dva parametre, pričom každá os pripadá jednému sledovanému znaku. Jedná sa o dot-plot záznam, v ktorom je každá častica je znázornená bodkou, prípadne sa množstvo buniek môže vyjadriť pomocou tzv. contour-plotu alebo density-plotu, ktoré vyjadrujú množstvo buniek ako hustotu čiar alebo rozdielnosť farebných línií. Grafy môžu byť v 2-D alebo 3-D zobrazení [72, 80, 96].



**Obrázok č. 9:** Príklady grafického zobrazenia dátových výstupov z prietokového cytometra. Prevzaté z [97] a upravené.

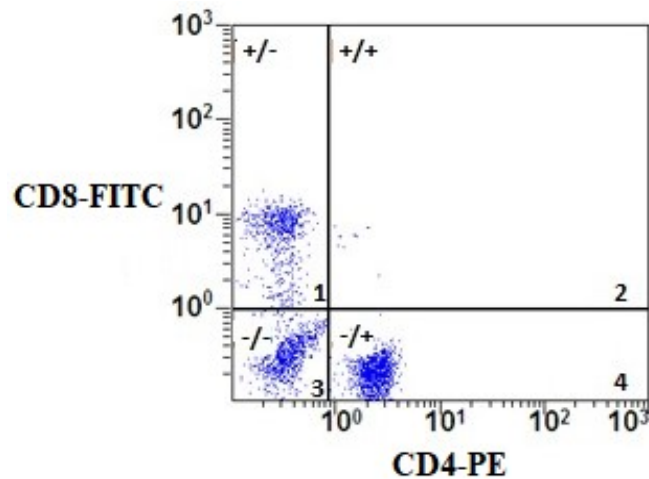
**Vysvetlivky:** **A:** Jednparametrový histogram v 2-D. Na ose x je intenzita signálu pre znak CD3 označeného konjugátom špecifickej protilátky s FITC (fluorescein isothiocyanate, fluoresceínizotiokyanát) a na ose y je počet buniek. **B:** Dvojparametrový histogram v 2-D. Závislosť FS (forward scatter, priamy rozptyl svetla) a SS (side scatter, bočný rozptyl svetla). **C:** Trojparametrový histogram v 3-D. Závislosť FS, SS a znaku CD3-FITC.

Pre spracovávanie viacerých parametrov súčasne sa používa stratégia tzv. gatovania. „Gate“ je vybraná ohraničená populácia buniek, ktorú môžeme ďalej samostatne analyzovať (Obrázok č. 10). Týmto spôsobom je umožnené analyzovať v heterogénnej suspenzii rôzne subpopulácie [76, 96].



**Obrázok č. 10:** Príklad gatovania. Závislosť FS (forward scatter, priamy rozptyl svetla) a SS (side scatter, bočný rozptyl svetla). V „gate“ A je ohraničená populácia lymfocytov vo vzorke krvi. Prevzaté z [97] a upravené.

Populáciu prenesenú do dvojparametrového dot-plot záznamu je možné rozdeliť na kvadranty. Vzhľadom na zvolené parametry získame štyri možné kombinácie +/-, +/+, -/+ a -/- (Obrázok č. 11). V každom kvadrante môžeme určiť percentuálny podiel buniek [93, 96].



**Obrázok č. 11:** Príklad vyhodnotenia histogramu. Závislosť znaku CD4 označeného konjugátom špecifickej protilátky a PE (phycoerythrin, fykoerytrín) a CD8 označeného konjugátom špecifickej protilátky s FITC (fluorescein isothiocyanate, fluoresceínizotiokyanát) vo vzorke lymfocytov. V kvadrante 1 je populácia buniek nenesúca znak CD4 a zároveň nesúca znak CD8 (CD4-CD8+). V kvadrante 2 je populácia buniek nesúca znak CD4 a zároveň nenesúca znak CD8 (CD4+CD8+). V kvadrante 3 je populácia buniek nenesúca znak CD4 ani znak CD8 (CD4-D8-). V kvadrante 4 je populácia buniek nesúca znak CD4 a nenesúca znak CD8 (CD4+CD8-). Prevzaté z [97] a upravené.

### 3.3.6 Využitie prietokovej cytometrie

Prietoková cytometria má v praxi široké využitie. Uplatňuje sa už od polovice 70-tych rokov 20. storočia. Využíva sa jednak v oblasti biologického a klinického výskumu, ale aj ako diagnostická metóda v medicíne. Bežne sa používa ako diagnostická metóda v onkológii, imunológii, hematológii a imunoematológii a tiež pri stanovovaní genetických porúch. Pomocou fluorochrómov môžeme označiť a súčasne detekovať rôzne bunky [69, 74, 98].

FC sa najčastejšie sa zameriava na analýzu expresie povrchových antigénov, fyziológie bunky (koncentrácia Ca<sup>2+</sup>, pH, oxidačné vzplanutie a ďalšie), meranie markerov apoptózy (annexín V, membránový potenciál mitochondrií a ďalšie), produkcie cytokínov, stanovenie obsahu nukleových kyselín [69].

## 4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Použitý materiál

#### 4.1.1 Baktérie, zvieratá a bunky

V rámci vypracovávania diplomovej práce sme v pokusoch používali živé baktérie vakcinačného kmeňa *M. bovis* BCG-GFP (*M. bovis* BCG exprimujúce GFP). Baktériami *M. bovis* BCG-GFP sme *in vitro* infikovali B lymfocyty izolované z inbredných BALB/c myší. Išlo o samičky vo veku 6 – 8 týždňov pochádzajúce od firmy Velaz (Praha, Česko).

#### 4.1.2 Prístroje, laboratórne pomôcky a softvér

- Automatické pipety 2,5 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Bakteriálne hokejky (Biologix Research Company, Lenexa, Kansas, USA)
- Bakteriálne kľučky (Biologix Research Company, Lenexa, Kansas, USA)
- Bürkrová komôrka (Meopta, Přerov, Česko)
- Centrifúga Jouan BR4i (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Centrifúga Jouan CR312 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts USA)
- CO<sub>2</sub> inkubátor Binder (Binder, Tuttlingen, Germany)
- CO<sub>2</sub> inkubátor SHEL LAB (Sheldon Manufacturing, Cornelius, Oregon, USA)
- Dávkovač krokový Handy Step (Brand, Wertheim, Nemecko)
- Denzitometer WPA CO 8000 Biowave (Biochrom, Cambridge, UK)
- Injekčné ihly 18 G (Terumo, Leuven, Belgicko)
- Injekčné ihly 20 G, 21 G Medoject (Chirana T. Injecta, Stará Turá, Slovensko)
- Injekčné ihly 22 G, 25 G (Medilab, České Meziříčí, Česko)
- Injekčné striekačky BD Discardit II 5 ml (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- Kadičky
- Kryoskúmavky 2 ml Costar (Corning, New York, USA)
- Laboratórne váhy EK-200 g (A&D, Tokio, Japonsko)
- Laminárny box (Telstar, Terrassa, Španielsko)
- Mikrocentrifúga (Fisher Scientific, Pardubice, Česko)
- Mikroskúmavky s viečkom 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Panel 12 a 24-jamkový Costar (Corning, New York, USA)

- Parafilm M (Bemis, Neenah, Wisconsin, USA)
- Petriho misky Ø 6 cm (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgicko)
- Pipetovací nadstavec FastPette (Labnet, Edison, New Jersey, USA)
- Pipetovacie špičky (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Pipety 5 ml (TPP, Trasadingen, Švajčiarsko)
- Pipety 10 ml, 25 ml Costar (Corning, New York, USA)
- Prietokový cytometer Cyan<sub>ADP</sub> (Dako, Glostrup, Dánsko)
- Rukavice nitrilové Nitricare (S.A.B. Impex, Brno, Česko)
- Skúmavky centrifugačné 15 ml a 50 ml (TPP, Trasadingen, Švajčiarsko)
- Skúmavky pre prietokovú cytometriu Falcon 5 ml (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- Skúmavky sterilné polystyrénové 15 ml (Gama group, České Budějovice, Česko)
- Stojan na mikroskúmavky a skúmavky
- Summit Software 4.3 (Dako, Glostrup, Dánsko)
- Svetelný mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Nemecko)
- Trepačka MS2 Minishaker (IKA, Staufen, Nemecko)
- Vodný kúpeľ TW 8 (Julabo, Seelbach, Nemecko)

#### 4.1.3 Chemikálie

- Azid sodný 10 % (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Nemecko)
- Deionizovaná voda (KMPB, FVZ UO, Hradec Králové, Česko)
- Dimetylsulfoxid (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Nemecko)
- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) HyClone (GE Health Care Life Sciences, Logan, Utah, USA)
- FBS (fetálne bovinné sérum inaktivované) (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Nemecko)
- Glycerín (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Nemecko)
- Kanamycín zásaditý roztok 50 mg/ml (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Nemecko)
- Middlebrook ADC (albumín-dextróza-kataláza) (BD, New Jersey, USA)
- Middlebrook OADC (kyselina olejová-albumín-dextróza-kataláza) (BD, New Jersey, USA)
- Middlebrook práškový bujónový základ 7H10 (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA)

- Middlebrook práškový bujónový základ 7H9 (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- PBS (Pufrovaný fyziologický roztok) (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Nemecko)
- PI (propídium jodid) (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Nemecko)
- Trypanová modrá (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Nemecko)
- Želatína (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Nemecko)

#### 4.1.4 Protilátky

##### **Blokovacie protilátky**

- PE/Cy7 Rat Anti-Mouse IgM (BioLegend, San Diego, Kalifornia, USA)
- Purified NA/LE Rat Anti-Mouse CD16/32 (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- Purified Rat Anti-Mouse CD 21/35 (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- Purified Rat Anti-Mouse CD11b (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- Purified Rat Anti-Mouse CD11c (BioLegend, San Diego, Kalifornia, USA)

##### **Protilátky pre prietokovú cytometriu**

- Alexa Fluor 647 Rat Anti-Mouse (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- PE Rat Anti-Mouse CD 11b (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- PerCP Rat Anti-Mouse CD5 (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA)

#### 4.1.5 Príprava roztokov a médií

##### • **Premývací roztok pre bunky**

Pre prípravu 5 l premývacieho roztoku („cell wash“), vhodného pre analýzu buniek na prietokovom cytometri, sme potrebovali 500 ml PBS (phosphate-buffered saline, pufrovaný fyziologický roztok), ktorý sme nariedili 10 × deionizovanou vodou. Z roztoku sme pomocou pipety odobrali 75 ml do sterilnej sklenenej fľaše so závitom. Následne sme s novou pipetou pridali 50 ml 10 % roztoku azidu sodného a premiešali. Nakoniec sme opäť s čistou pipetou pridali 25 ml želatíny. Zmes sme miešali do úplného rozpustenia. Pripravený roztok sme používali k premývaniu buniek v pokusoch a pri meraní na prietokovom cytometri.

##### • **Kultivačné médium pre bunky**

Kultivačné médium pre bunky je zložené z DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Dulbeccom modifikované Eagleovo médium) s prídavkom 10 % FBS (fetal bovine serum, fetálneho bovinného séra). Pripravovali sme ho v laminárnom



boxe, kde sme z 500 ml čistého DMEM média odpipetovali 50 ml do sterilnej fľaše so závitom. K zvyšným 450 ml sme pomocou novej pipety pridali 50 ml FBS. Roztok sme dobre premiešali a používali v pokusoch ako médium pre bunky.

- **Kultivačné médium pre mykobaktérie tekuté (bujón)**

Do sterilnej sklenenej fľaše sme navážili 4,7 g Middlebrook 7H9 práškového bujónového základu a spolu s 2 ml glycerínu sme rozpustili v 750 ml deionizovanej vody. Roztok sme následne nechali sterilizovať v autokláve 15 minút pri 121 °C. Po ochladnutí na teplotu 45 °C sme v laminárnom boxe pridali 100 ml Middlebrook ADC (albumin-dextrose-catalase, albumín-dextróza-kataláza) a doplnili sterilnou deionizovanou vodou na objem 1 l. V takto pripravenom médiu sme kultivovali baktérie *M. bovis* BCG-GFP po rozmrazení.

- **Kultivačné médium pre mykobaktérie pevné (agar)**

Navážili sme 19,0 g Middlebrook 7H10 práškového bujónového základu a spolu s 5 ml glycerínu sme ho rozpúšťali za dôkladného miešania a zohrievania v 900 ml deionizovanej vody. Zmes sme priviedli k varu na 1 minútu, kým sa prášok úplne rozpustil. Následne sme roztok sterilizovali v autokláve 15 minút pri 121 °C. Po ochladnutí na teplotu 50 – 55 °C sme v laminárnom boxe pridali k roztoku 100 ml Middlebrook OADC (oleic acid-albumin-dextrose-catalase, kyselina olejová-albumín-dextróza-kataláza). Roztok sme dobre premiešali a hneď sme za aseptických podmienok plnili Petriho misky. Po stuhnutí sme misky obalili do alobalu a uložili do chladničky. Na 1 l média sme použili 400 µl zásaditého roztoku kanamycínu s koncentráciou 50 mg/ml. Výsledná koncentrácia antibiotika bola 20 µl/ml. Na takto pripravenom médiu sme naočkovali baktérie *M. bovis* BCG-GFP pre prípravu štokov a pre výsev a odpočítanie CFU (colony forming unit, jednotka tvoriaca kolóniu).

- **Médium pre kryoprezerváciu**

Médium pre kryoprezerváciu mykobaktérií je tvorené kultivačným médiom DMEM s prídavkom 10 % FBS a 10 % dimetylsulfoxidu. V laminárnom boxe sme si pripravili sterilnú sklenenú fľašu so závitom, do ktorej sme pomocou pipety preniesli 40 ml DMEM média. K médiu sme pomocou čistej pipety pridali 5 ml PBS a premiešali. Ďalej sme pomocou novej pipety pridali 5 ml dimetylsulfoxidu a zmes sme opäť premiešali. Týmto postupom pripravené médium na základe skúseností z Katedry molekulárnej patológie a biológie, Fakulty vojenského zdravotníctví v Hradci Králové sme použili na kryoprezerváciu baktérií *M. bovis* BCG-GFP.

## 4.2 Metodika práce

### 4.2.1 Práca s bakteriálnou kultúrou

#### 4.2.1.1 Príprava a kryoprezervácia bakteriálnych štokov

Na Petriho miskú s Middlebrook 7H10 agarom obohateným o kanamycín (20 µg/ml) sme za aseptických podmienok masívne naočkovali živú kultúru *M. bovis* BCG-GFP. Na jednu platňu sme napipetovali 50 µl bakteriálnej suspenzie a pomocou bakteriálnej hokejky sme suspenziu rovnomerne rozťierali po celej platni. Platne sme obalili pomocou parafilmu, vložili do termostatu a inkubovali minimálne 3 – 4 týždne, počas ktorých sme rast baktérií priebežne kontrolovali. Inkubácia prebiehala pri teplote 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

Po uplynutí inkubačnej doby sme si v laminárnom boxe pripravili dve skúmavky s médiom pre kryoprezerváciu. Prvá skúmavka bola určená na prípravu bakteriálnej suspenzie a druhá slúžila ako porovnávací roztok pre meranie OD (optical density, optická denzita).

Pomocou bakteriálnej kľučky sme odobrali bakteriálnu kultúru *M. bovis* BCG-GFP zo 4 platní s pevným agarom Middlebrook 7H10. Kľučkou sme odobrali čo najviac bakteriálnej suspenzie, ktorú sme pomaly otierali o stenu skúmavky do 10 ml roztoku média pre kryoprezerváciu. Suspenziu sme sa snažili zhomogenizovať resuspendovaním pomocou injekčných ihliel. Skúmavku so suspenziou sme dôkladne vortexovali a nechali 20 minút sedimentovať. Následne sme odobrali supernatant a zmerali hodnotu OD voči porovnávej skúmavke. Tento postup sme opakovali kým sa hodnota OD nerovnála 1,0. Pripravenú bakteriálnu suspenziu sme rozpipetovali po 1 ml do kryotúb, ktoré sme zamrazili na -150 °C. Zároveň sme odobrali 50 µl suspenzie pre výsev a odpočítanie CFU (Kapitola 4.2.1.4). Takto pripravené bakteriálne suspenzie sme používali v ďalších experimentoch.

#### 4.2.1.2 Príprava bakteriálnej suspenzie na infekciu

Vopred pripravenú bakteriálnu suspenziu v kryotube s OD 1,0 (Kapitola 4.2.1.1) sme rozmrazili, kvantitatívne preniesli do mikroskúmavky a nechali centrifugovať 15 minút pri 5 000 × g (Jouan BR4i multifunction, AB 1.14 rotor) a teplote 24 °C. Následne sme v laminárnom boxe supernatant odpipetovali do denzinfekcie. Peletu baktérií sme resuspendovali pridaním 1 ml Middlebrook 7H9 bujónu. Mikroskúmavku sme vložili do termostatu a kultivovali 24 hodín pri 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

Na druhý deň sme mikroskúmavku s baktériami opäť centrifugovali 15 minút pri  $5\,000 \times g$  (Jouan BR4i multifunction, AB 1.14 rotor) a teplote  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Supernatant sme odsali do dezinfekcie a peletu baktérií sme dôkladne resuspendovali v 1 ml PBS. Bakteriálnu suspenziu sme znovu nechali centrifugovať za rovnakých podmienok. Po odstránení supernatantu sme peletu resuspendovali v 1 ml DMEM média. Pre kontrolu koncentrácie sme zo suspenzie odobrali  $50\ \mu\text{l}$  pre výsev CFU (Kapitola 4.2.1.4). Takto pripravenou bakteriálnou suspenziou sme *in vitro* infikovali peritoneálne bunky z myši BALB/c (Kapitola 4.2.2.4).

#### 4.2.1.3 Oponizácia komplementom a protilátkami

Bakteriálnu suspenziu sme pripravili vyššie uvedeným postupom (Kapitola 4.2.1.2). Namiesto premývania v PBS sme však k pelete baktérií pridali buď deň vopred pripravené čerstvé sérum z kontrolnej myši BALB/c („komplement“) alebo vopred pripravené imúnne myšie sérum („protilátky“). Suspenziu sme dôkladne zvortexovali a mikroskúmavky sme inkubovali 1 hodinu v termostate pri teplote  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $5\%$   $\text{CO}_2$ . Po skončení inkubácie sme baktérie premyli pomocou 1 ml PBS a centrifugovali 15 minút pri  $5\,000 \times g$  (Jouan BR4i multifunction, AB 1.14 rotor) a teplote  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Supernatant sme odpipetovali do dezinfekcie a znova sme baktérie premyli rovnakým spôsobom. Po druhom premytí sme k pelete opsonizovaných baktérií pridali 1 ml kultivačného média DMEM a dôkladne resuspendovali. Takto pripravené opsonizované baktérie sme použili na *in vitro* infekciu peritoneálnych buniek izolovaných z myši BALB/c.

- **Príprava myšieho séra z BALB/c myši („komplement“)**

Z laboratórnej myši BALB/c sme odobrali do mikroskúmavky krv z krčnej tepny. Mikroskúmavku sme vložili na 20 minút do chladničky. Po uplynutí intervalu sme mikroskúmavku centrifugovali 25 minút pri  $3\,000\ \text{rpm}$  (Jouan BR4i multifunction, AB 1.14 rotor) a teplote  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následne sme sérum odpipetovali do druhej čistej skúmavky a nechali cez noc v chladničke. Takto pripravené čerstvé sérum („komplement“) sme používali na opsonizáciu baktérií *M. bovis* BCG-GFP.

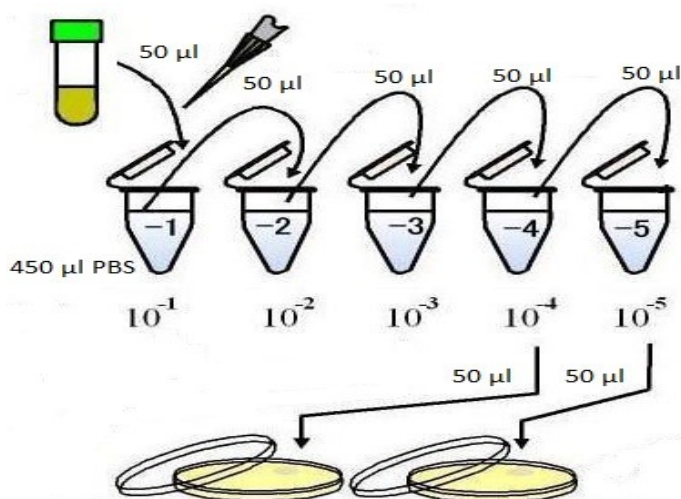
- **Príprava imúnneho myšieho séra z myši BALB/c po infekcii („protilátky“)**

Príprava séra s protilátkami voči *M. bovis* BCG-GFP bola vopred prevedená na Katedre molekulárnej patológie a biológie, Fakulty vojenského zdravotníctví v Hradci Králové a v texte je popísaná na všeobecnej úrovni.

Myšiam bolo subkutánne aplikované 200  $\mu\text{l}$  bakteriálnej suspenzie *M. bovis* BCG-GFP a za 21 dní sa infekcia zopakovala. Po 14 dňoch od druhej imunizácie bolo myšiam odobrané sérum. Detekcia protilátok bola uskutočnená pomocou metódy ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, typ enzýmovo značenej imunoanalýzy). Najvhodnejší titer bol 1:80. Týmto spôsobom pripravené sérum s protilátkami voči *M. bovis* BCG-GFP („protilátky“) sme používali na opsonizáciu baktérií *M. bovis* BCG-GFP v pokusoch.

#### 4.2.1.4 Výsev a výpočet jednotiek tvoriach kolónie

V laminárnom boxe sme pripravili do stojana 5 mikroskúmaviek s objemom 1,5 ml. Označili sme ich od -1 (riedenie  $10^{-1}$ ) až po -5 (riedenie  $10^{-5}$ ). Do každej sme automatickou pipetou napipetovali 450  $\mu\text{l}$  PBS. Z bakteriálnej suspenzie s OD 1,0 sme odpipetovali 50  $\mu\text{l}$  a preniesli do prvej mikroskúmavky (-1). Suspenziu sme resuspendovali už s novou špičkou a opäť sme z nej preniesli 50  $\mu\text{l}$  do ďalšej skúmavky v poradí (-2). Takýmto spôsobom sme pokračovali až k skúmavke s označením -5. Z posledných dvoch riedení ( $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ ) sme odobrali po 50  $\mu\text{l}$  a napipetovali ich na Petriho misky s Middlebrook 7H10 agarom obohateným o kanamycín (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Suspenziu sme rozotierali pomocou sterilnej bakteriálnej hokejky, kým sa nevsiakla do agaru. Z oboch riedení sme vysiali po dve platne (Obrázok č. 12). Pripravené a vopred označené platne sme obalili parafilmom, ktorý bráni vysychaniu a inkubovali sme ich v termostate pri teplote 37  $^{\circ}\text{C}$  a 5 %  $\text{CO}_2$  minimálne 3 – 4 týždne.



**Obrázok č. 12:** Schéma desiatkového riedenia bakteriálnej suspenzie a následného výsevu za účelom určenia počtu jednotiek tvoriacich kolónie. Prevzaté z [99] a upravené.

- **Výpočet jednotiek tvoriacich kolónie**

Po náraste kolónií sme všetky spočítali a určili koncentráciu kolónií v 1 ml bakteriálnej suspenzie podľa vzorca:

$$CFU = \text{priemerný počet kolónií} \times \text{riedenie 1} \times \text{riedenie 2}$$

*Riedenie 1:* prevrátená hodnota koncentrácie

$$\text{Riedenie 2: } \frac{1000 \mu\text{l}}{50 \mu\text{l}} = 20$$

Príklad:

$$10^{-4} = 120$$

$$10^{-5} = 18 \rightarrow 180$$

$$CFU = \frac{180 + 120}{2} \times 10^4 \times 20 = 3 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$$

## 4.2.2 Práca s bunkovou kultúrou

### 4.2.2.1 Príprava bunkovej suspenzie

Suspenziu peritoneálnych buniek sme získali výplachom peritonea myši BALB/c. Pomocou injekčnej striekačky s ihlou 25 G sme aplikovali 3 ml chladného PBS do peritoneálnej dutiny myši BALB/c. Brušnú dutinu sme opatrne premasírovali a následne odobrali minimálne 2 ml bunkovej suspenzie. Odobranú suspenziu sme preniesli do 15 ml skúmavky. Následne sme k bunkovej suspenzii v laminárnom boxe pridali 2 ml PBS a centrifugovali 7 minút pri 1 200 rpm (Jouan BR4i multifunction, S40 rotor) a teplote 24 °C. Po uplynutí intervalu sme supernatant odstránili do odpadu s dezinfekciou a peletu sme resuspendovali v 2 ml PBS. Suspenzia bola takto premytá za rovnakých podmienok dvakrát. Nakoniec sme po odstránení supernatantu pridali 2 ml kultivačného média pre bunky a opäť sme peletu buniek resuspendovali. Ďalej sme spočítali bunky a nariedili na koncentráciu  $1 \times 10^6$  buniek/ml (Kapitola 4.2.2.2). Pripravené bunkové suspenzie sme infikovali *M. bovis* BCG-GFP.

### 4.2.2.2 Určenie koncentrácie a životnosti buniek

Koncentráciu a životnosť peritoneálnych buniek sme určovali pomocou Bürkerovej komôrky a svetelného mikroskopu. Najskôr sme v laminárnom boxe preniesli na okraj Bürkerovej komôrky 10  $\mu\text{l}$  trypanovej modrej. Z bunkovej suspenzie (Kapitola 4.2.2.1) sme odobrali 10  $\mu\text{l}$  a zmiešali s trypanovou modrou. Z tejto suspenzie sme napipetovali 10  $\mu\text{l}$  pod krycie sklíčko Bürkerovej komôrky, ktorú sme následne

vložili pod svetelný mikroskop. Pri zväčšení  $400\times$  sme počítali živé aj mŕtve bunky. Mŕtve bunky boli na rozdiel od živých zafarbené do modro-fialova. Počítali sme všetky bunky vo vnútri 25 štvorcov a zároveň tie, ktoré sa dotýkali vždy dvoch strán štvorca.

- **Určenie koncentrácie buniek**

Koncentráciu buniek v 1 ml sme určili podľa vzorca:

***Živé bunky  $\times$  riedenie trypanovej modrej  $\times$  koeficient Bürkrovej komôrky***

*Riedenie trypanovej modrej: 2 (1:1)*

*Koeficient Bürkrovej komôrky:  $10^4$*

*Príklad:*

*Počet buniek = 220*

$$\text{Výpočet} = 220 \times 2 \times 10^4 = 4,4 \times 10^6 \text{ buniek/ml}$$

- **Určenie životnosti buniek**

Životnosť buniek sme vypočítali ako podiel počtu živých buniek k počtu všetkých buniek (súčet živých a mŕtvych). Pre percentuálne vyjadrenie životnosti sme výsledok vynásobili číslom 100.

*Príklad:*

*Počet živých buniek = 220*

*Počet mŕtvych buniek = 3*

$$\text{Výpočet} = \frac{220}{220 + 3} \times 100 = 98,66 \%$$

#### **4.2.2.3 Blokovanie receptorov na B lymfocytoch**

Zo suspenzie peritoneálnych buniek z myší BALB/c s koncentráciou  $1 \times 10^6$  buniek/ml (Kapitola 4.2.2.1) sme v laminárnom boxe odobrali 2 ml do označenej skúmavky. Skúmavku so suspenziou sme centrifugovali 7 minút pri 1 200 rpm (Jouan BR4i multifunction, S40 rotor) a teplote  $4^\circ\text{C}$ . Supernatant sme po centrifugácii zliali do dezinfekcie a pelety buniek sme resuspendovali v 3 ml premývacieho roztoku. Suspenziu sme opäť centrifugovali za rovnakých podmienok. Po druhej centrifugácii sme odstránili supernatant do dezinfekcie a v skúmavke zostalo približne 100  $\mu\text{l}$  premývacieho roztoku pre bunky.

K resuspendovanej pelete sme pridali 5  $\mu\text{l}$  purifikovanej protilátky – Rat Anti-Mouse CD21/35 pre blokáciu CR1/2, Rat Anti-Mouse CD11b pre CR3, Rat Anti-

Mouse CD11c pre CR4, Rat Anti-Mouse CD16/32 pre Fc $\gamma$ R a pre BCR receptor bola použitá protilátka Rat Anti-Mouse IgM (Tabuľka č. 1). Bunky sme inkubovali 30 minút pri laboratórnej teplote v tme. Po uplynutí intervalu sme do skúmavky pridali 2 ml PBS a nechali centrifugovať 7 minút pri 1 200 rpm (Jouan BR4i multifunction, S40 rotor) a teplote 4 °C. Po centrifugácii sme odstránili supernatant a bunky sme rovnakým spôsobom premývali ešte dvakrát. Po poslednom premytí sme do skúmavky pridali 2 ml kultivačného média pre bunky, v ktorom sme peletu dôkladne resuspendovali. Takto pripravené bunkové suspenzie sme *in vitro* infikovali baktériou *M. bovis* BCG-GFP.

**Tabuľka č. 1:** Protilátky, ktoré sa viažu na vybrané štruktúry na B lymfocytoch.

Povrchová štruktúra	Protilátka
CR1/2	anti-CD21/35 purified
CR3	anti-CD11b purified
CR4	anti-CD11c purified
IgM	anti-IgM-PE/Cy7
Fc $\gamma$ R	anti-Fc $\gamma$ III/II purified

**Vysvetlivky:** **CR:** complement receptor, komplemetnový receptor. **IgM:** immunoglobulin M, imunoglobulín M. **Fc $\gamma$ R:** Fc gamma receptor, receptor viažuci Fc oblasť imunoglobulínu G.

#### 4.2.2.4 Infekcia buniek

- **Stanovenie multiplicity infekcie**

Do 24-jamkového panelu sme napipetovali po 0,25 ml nariadených bunkových suspenzií ( $2 \times 10^5$  buniek/jamku). Každé vzorky boli určené 4 jamky. Prvé 4 kontrolné jamky sme neinfikovali. K ďalším jamkám sme postupne pridávali rôzne objemy (Tabuľka č. 2) bakteriálnej suspenzie *M. bovis* BCG-GFP s OD 1,0 ( $1 \times 10^8$  BCG/ml), za účelom určenia najvhodnejšej MOI (multiplicity of infection, multiplicita infekcie).

**Tabuľka č. 2:** Schéma infikovania pre zistenie optimálnej hodnoty MOI.

Označenie vzorky	Množstvo bakteriálnej suspenzie ( $\mu$ l)
MOI 10	10
MOI 50	50
MOI 100	100
MOI 500	500

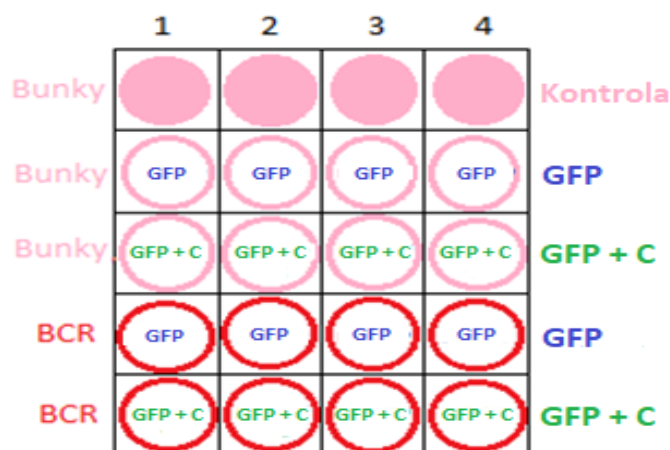
**Vysvetlivky:** **MOI:** multiplicity of infection, multiplicita infekcie.

- **Infekcia peritoneálnych B lymfocytov z myší BALB/c**

Do vopred označených 12-jamkových panelov v laminárnom boxe sme napipetovali po 0,5 ml pripravených bunkových suspenzií so zablokovanými a/alebo neblokovanými receptormi na B lymfocytoch z peritonea myší BALB/c nariedených na koncentráciu  $1 \times 10^6$  buniek/ml.

Pre každý typ vzorky boli určené štyri jamky. Prvé štyri jamky sme vždy označili ako kontrolné a neinfikovali sme ich. K ďalším bunkovým suspenziám sme pridávali po 100  $\mu$ l opsonizovanej a/alebo neopsonizovanej bakteriálnej suspenzie *M. bovis* BCG-GFP (Obrázok č. 13).

Panely sme nechali centrifugovať 3 minúty pri 1 500 rpm (Jouan CR312, názov rotoru sa žiaľ nedal dohľadať – podobný typ je rotor M20, Heraeus Megafuge 162, Thermo Scientific) a teplote 24 °C. Potom sme ich vložili do termostatu a inkubovali 3 hodiny pri teplote 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Po uplynutí intervalu sme suspenzie za aseptických podmienok preniesli do skúmaviek pre prietokovú cytometriu. Do každej skúmavky sme pridali 1 ml premývacieho roztoku pre bunky a suspenzie sme nechali centrifugovať 7 minút pri 1 200 rpm (Jouan BR4i multifunction, S40 rotor) a teplote 4 °C. Po centrifugácii sme supernatant zliali do dezinfekcie a bunky sme rovnakým spôsobom premývali ešte dvakrát. Po poslednom premytí sme odstránili supernatant, pričom v skúmavke zostalo približne 100  $\mu$ l suspenzie.



**Obrázok č. 13:** Pracovná schéma 24-jamkového panelu pre infekciu buniek.

**Vysvetlivky:** **Bunky:** peritoneálne B lymfocyty. **BCR:** peritoneálne B lymfocyty so zablokovaným BCR receptorom. **Kontrola:** peritoneálne B lymfocyty bez infekcie. **GFP:** infekcia *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) exprimujúce GFP (green fluorescent protein, zelený fluorescenčný proteín). **GFP+C:** infekcia baktériou *M. bovis* BCG-GFP opsonizovanou komplementom. Autor: Marianna Šamajová.



## 4.2.3 Príprava vzoriek pre prietokovú cytometriu

### 4.2.3.1 Značenie buniek

K infikovaným bunkovým suspenziám v skúmavkách určených pre prietokovú cytometriu o objeme približne 100 µl (Kapitola 4.2.2.4) sme pridali po 1 µl neriedených protilátok konjugovaných s fluorochrómami – Rat Anti-Mouse CD19-Alexa 647, Rat Anti-Mouse CD5-PerCP a Rat Anti-Mouse CD11b-PE. Prvá jamka z každého typu vzorky bola vždy nefarbená kontrola. Každú suspenziu sme dôkladne zvortexovali a nechali inkubovať 30 minút pri teplote 4 °C v tme. Potom sme do každej skúmavky pridali 1 ml roztoku premývacieho roztoku pre bunky a centrifugovali 7 minút pri 1 200 rpm (Jouan BR4i multifunction, S40 rotor) a teplote 4 °C. Následne sme odstránili supernatant do dezinfekcie a bunky sme premyli rovnakým spôsobom celkom trikrát. Po poslednom premytí sme pridali do každej skúmavky 500 µl premývacieho roztoku. Množstvo infikovaných buniek baktériou *M. bovis* BCG-GFP v pripravených suspenziách buniek sme zmerali na prietokovom cytometri Cyan<sub>ADP</sub>.

### 4.2.3.2 Meranie a analýza dát získaných pomocou prietokovej cytometrie

Pripravené a označené suspenzie peritoneálnych buniek z myší BALB/c v 0,5 ml premývacieho roztoku sme merali pomocou prietokového cytometra Cyan<sub>ADP</sub> a analyzovali v programe Summit Software 4.3. Bunkové suspenzie sme pre kontrolu životnosti merali najskôr bez PI a následne s prídavkom 2 µl PI. Minimálny počet buniek pre analýzu bol 10 000.

Na základe fluorescenčných signálov fluorochrómov konjugovaných s protilátkami na povrchových znakoch CD19, CD5 a CD11b sme identifikovali B lymfocyty ich subpopulácie B1a, B1b a B2. Sledovali sme množstvo buniek infikovaných baktériou *M. bovis* BCG-GFP. Fluorescenciu sme detekovali prostredníctvom filtrov (FL) pre jednotlivé fluorochrómy. Fluorescencia GFP bola meraná na FL1. Fluorochróm Alexa Fluor 647 naviazaný na molekule CD19 bol detekovaný na FL8, znak CD5 s naviazaným fluorochrómom PerCP (peridinin-chlorophyll protein, peridinin-chlorofyl proteín) bol meraný na FL4 a nakoniec PE konjugovaný s CD11b sme detekovali na FL2.

Získané hodnoty sme spracovávali pomocou programu Microsoft Excel do grafov. Vypočítali sme smerodajnú odchýlku a pomocou Studentovho T-testu sme hodnotili signifikancie. Výsledok s P hodnotou < 0,05 bol označený \*, P hodnota < 0,01 bola označená \*\* a pomocou \*\*\* bola označená P hodnota < 0,001.

## 4.3 Výsledky

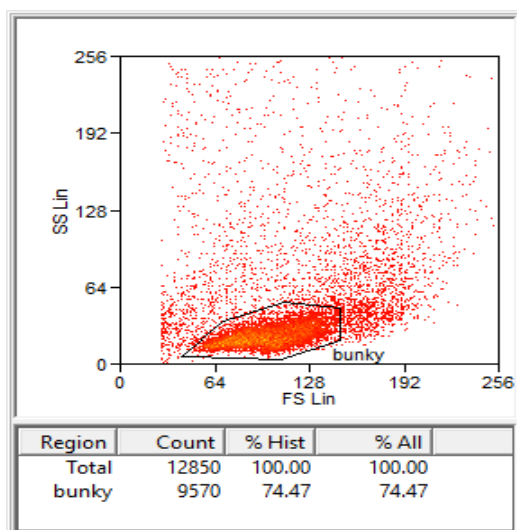
*M. bovis* BCG-GFP vstupuje do B lymfocytov. S použitím blokovacích protilátok proti receptorom BCR, Fc $\gamma$ R, CR1/2, CR3 a CR4, sme sledovali akú úlohu v tomto procese zohrávajú jednotlivé receptory. Bunkové suspenzie ( $1 \times 10^6$  buniek/ml) sme *in vitro* infikovali baktériou *M. bovis* BCG-GFP (v pokusoch označenie: GFP) s MOI 100. Ďalej sme pozorovali vplyv opsonizácie na infekciu. Baktérie sme inkubovali 1 hodinu buď s čerstvým myším sérom (v pokusoch označenie: GFP+C) alebo imúnnym myším sérom (v pokusoch označenie: GFP+Ab). Infikované bunky sme inkubovali 3 hodiny pri teplote 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

Celkové množstvo infikovaných B lymfocytov (CD19+) a ich subpopulácií B1a (CD19+CD5+CD11b+), B1b (CD19+CD5-CD11b+) a B2 (CD19+CD5-CD11b-) sme merali pomocou prietokovej cytometrie. Každý typ vzorky v pokusoch bol pripravený ako biologický triplikát porovnaný s neinfikovanou kontrolou, ktorú sme však pre prehľadnosť neuvádzali do grafov. Všetky signifikancie boli vypočítané pomocou Studentovho T-testu. Najskôr sme hodnotili GFP vzhľadom k neinfikovaným kontrolným bunkám. Ostatné vzorky sme hodnotili vzhľadom k GFP, prípadne k GFP+C. Výsledky sú uvedené vždy na základe minimálne 3 nezávislých pokusov, z ktorých sme uviedli a popísali vždy jeden vybraný graf.

### 4.3.1 Príklad spracovania dát získaných prietokovou cytometriou

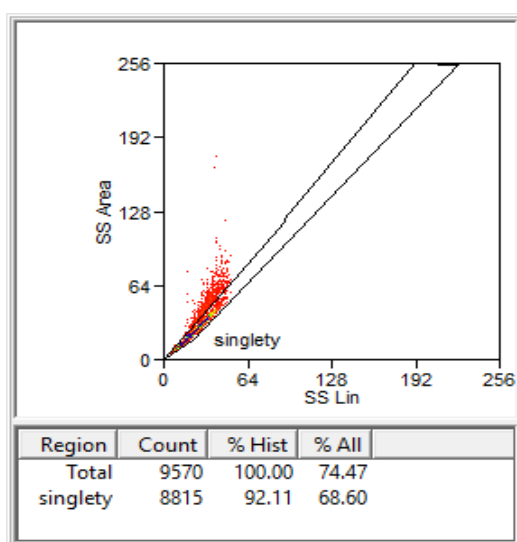
Ako príklad názorného postupu spracovania dát nameraných prietokovým cytometrom Cyan<sub>ADP</sub> a pomocou programu Summit Software 4.3. sme použili vzorku buniek z peritoneálnych buniek myší BALB/c, ktoré boli *in vitro* infikované *M. bovis* BCG-GFP bez použitia opsonizácie.

Z diagramu závislosti rozdelenia buniek podľa veľkosti a granularity sme vybrali ohraničenú populáciu buniek pod označením „bunky“, ktorú sme ďalej analyzovali (Obrázok č. 14).



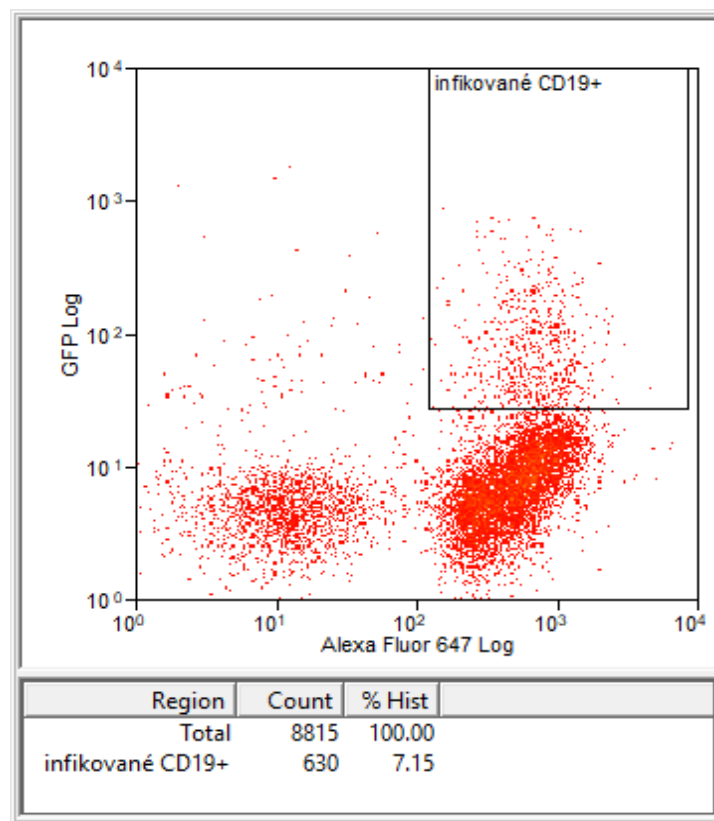
**Obrázok č. 14:** Diagram „bunky“. V diagrame závislosti FS (forward scatter, priamy rozptyl svetla) a SS (side scatter, bočný rozptyl svetla) sa nachádza ohraničená oblasť „bunky“, ktorá predstavuje populáciu peritoneálnych lymfocytov z myší BALB/c

Vybranú populáciu „bunky“ sme preniesli do ďalšieho diagramu pre odstránenie dubletov, aby sme analyzovali vždy práve jednu bunku a eliminovali falošne pozitívny signál. V diagrame je ohraničená populácia, v ktorej sa nachádzali už len singlety. Populácia „singlety“ predstavovala 92,11 % z populácie „bunky“ (Obrázok č. 15).



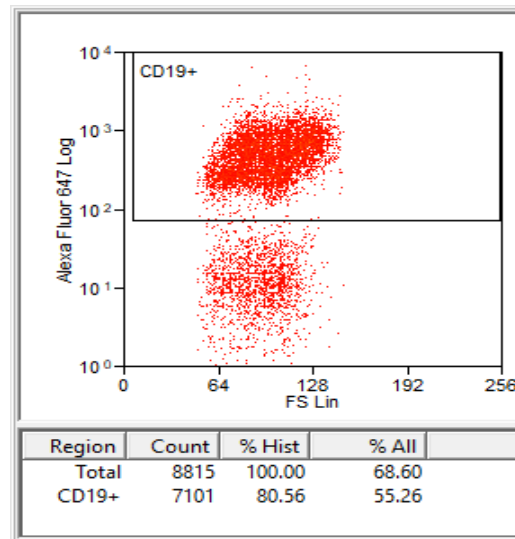
**Obrázok č. 15:** Diagram „singlety“. Závislosť FS (forward scatter, priamy rozptyl svetla) a SS (side scatter, bočný rozptyl svetla). V ohraničenej oblasti sa nachádzajú singlety buniek zo suspenzia peritoneálnych lymfocytov z myší BALB/c.

Následne sme populáciu „singlety“ preniesli do diagramu závislosti fluorescence fluorochrómu Alexa Fluor 647 a GFP. Sledovali sme percentuálne zastúpenie infikovaných B lymfocytov (CD19+) baktériou *M. bovis* BCG-GFP. Na povrchovú molekulu CD19 bola naviazaná protilátka konjugovaná s fluorochrómom Alexa Fluor 647, ktorého fluorescenciu sme detekovali pomocou FL8 a fluorescenčný signál GFP sme detekovali na FL1. V ohraničenej populácii „infikované CD19+“ sa nachádzali bunky CD19+GFP+. Množstvo B lymfocytov infikovaných baktériou *M. bovis* BCG-GFP bolo 7,15 % (Obrázok č. 16).



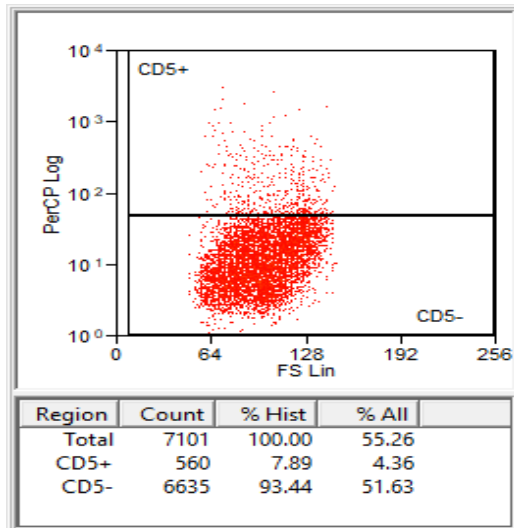
**Obrázok č. 16:** Diagram „infikované CD19+“. Závislosť fluorochrómu Alexa Fluor 647 konjugovanom s protilátkou naviazanou na znaku CD19 a signálu fluorescence GFP (green fluorescent protein, zelený fluorescenčný proteín) exprimovanom na *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin). V ohraničenej oblasti sa nachádzajú peritoneálne B lymfocyty (CD19+) infikované baktériou *M. bovis* BCG-GFP.

Ďalej sme rozlíšili jednotlivé subpopulácie B1a, B1b a B2. Najskôr sme preniesli singlety do diagramu závislosti FS a signálu fluorescence fluorochrómu Alexa Fluor 647 detekovanom na FL8. Populácia „CD19+“ predstavovala 80,56 % B lymfocytov (Obrázok č. 17).



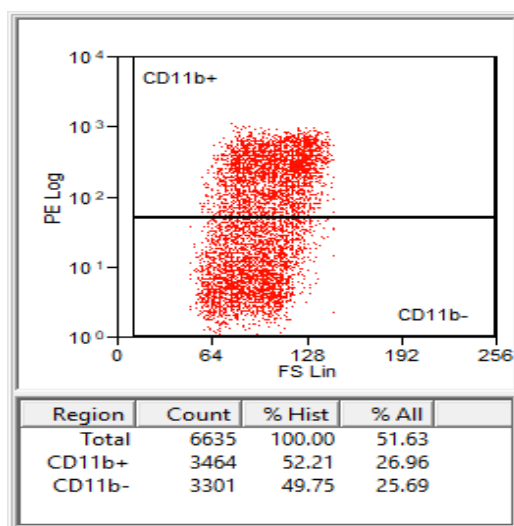
**Obrázok č. 17:** Diagram „CD19+“. Závislosť FS (forward scatter, priamy rozptyl svetla) a fluorochrómu Alexa Fluor 647 konjugovanom s protilátkou naviazanou na CD19. V ohraničenej oblasti sa nachádzajú peritoneálne B lymfocyty (CD19+) z myši BALB/c.

Na základe fluorescence fluorochrómu PerCP, ktorý bol konjugovaný s monoklonálnou protilátkou naviazanou na molekule CD5 sme CD19+ bunky z populácie „CD19+“ rozlíšili na CD5+ a CD5-. Fluorescenčný signál PerCP bol zaznamenaný na FL4. Percentuálne zastúpenie CD5+ buniek bolo 7,89 % a CD5- 93,44 %. CD5+ bunky predstavovali subpopuláciu B1a, ktorá je charakterizovaná ako CD19+CD11+CD5+ (Obrázok č. 18).



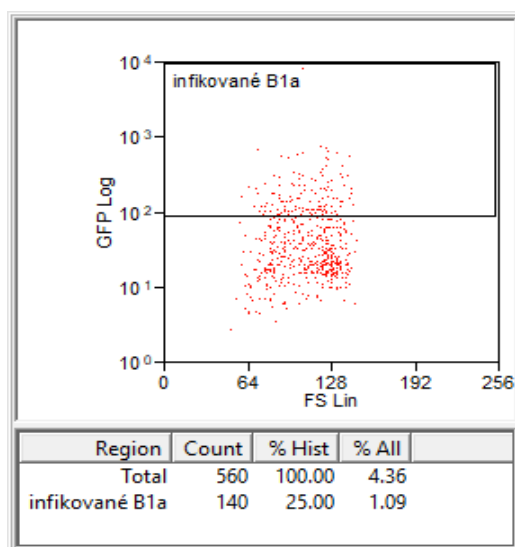
**Obrázok č. 18:** Diagram „CD5+/CD5-“. Závislosť FS (forward scatter, priamy rozptyl svetla) a fluoróchromu PerCP (peridinin-chlorophyll protein, peridínin-chlorofyl proteín) konjugovanom s protilátkou naviazanou na CD5. Populácia peritoneálnych B lymfocytov je rozdelená na oblasť, ktorá nesie znak CD5 („CD5+“) a oblasť, ktorá CD5 nenesie („CD5-“).

V ďalšom kroku sme CD5- bunky z diagramu rozlíšili pomocou znaku CD11b, na ktorú bol naviazaný fluorochróm PE detekovaný na FL2. Populácia CD19+CD11b+CD5- predstavovala subpopuláciu B1b a populácia, ktorá bola CD19+CD11b-CD5- tvorila subpopuláciu B2 (Obrázok č. 19).

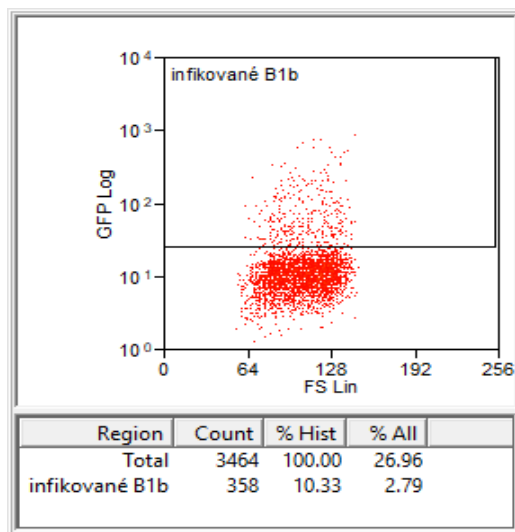


**Obrázok č. 19:** Diagram „CD11b+/CD11b-“. Závislosť FS (forward scatter, priamy rozptyl svetla) a fluorescencie fluorochrómu PE (phycoerythrin, fykoerytrín). Populácia peritoneálnych CD19+ CD5- B lymfocytov je rozdelená na oblasť ktorá nesie znak CD11b („CD11b+) a oblasť, ktorá CD11b nenesie („CD11b-“).

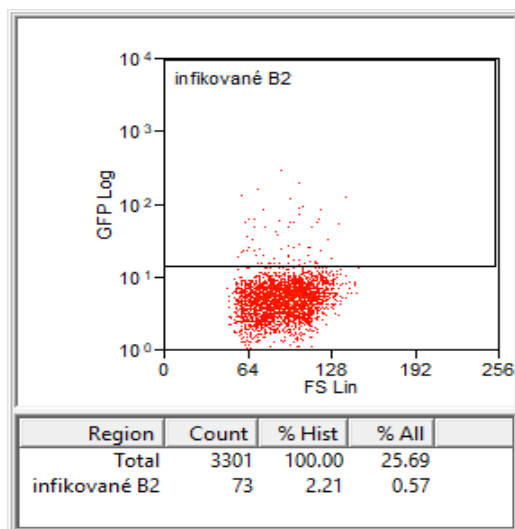
Nakoniec sme sledovali mieru infekcie baktériou *M. bovis* BCG-GFP u subpopulácií B1a, B1b a B2, ktoré sme každú zvlášť preniesli do diagramov závislosti FS a fluorescencie GFP. Množstvo infikovaných B1a B lymfocytov prenesených z „CD5+“ je 25,00 % (Obrázok č. 20), množstvo infikovaných B1b B lymfocytov prenesených z „CD11b+“ predstavuje 10,33 % (Obrázok č. 21) a nakoniec množstvo infikovaných B2 lymfocytov z populácie „CD11b-“ tvorí 2,21 %. (Obrázok č. 22).



**Obrázok č. 20:** Diagram „infikované B1a“. Závislosť FS (forward scatter, priamy rozptyl svetla) a fluorescencie GFP (green fluorescent protein, zelený fluorescenčný proteín) exprimovanom na *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin). V ohraničenej oblasti sa nachádza populácia peritoneálnych B1a lymfocytov z myši BALB/c infikovaných *M. bovis* BCG-GFP.



**Obrázok č. 21:** Diagram „infikované B1b“. Závislosť FS (forward scatter, priamy rozptyl svetla) a fluorescencie GFP (green fluorescent protein, zelený fluorescenčný proteín) exprimovanom na *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin). V ohraničenej oblasti sa nachádza populácia peritoneálnych B1b lymfocytov z myši BALB/c infikovaných *M. bovis* BCG-GFP.



**Obrázok č. 22:** Diagram „infikované B2“. Závislosti Závislosť FS (forward scatter, priamy rozptyl svetla) a fluorescencie GFP (green fluorescent protein, zelený fluorescenčný proteín) exprimovanom na *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin). V ohraničenej oblasti sa nachádza populácia peritoneálnych B2 lymfocytov z myši BALB/c infikovaných *M. bovis* BCG-GFP.

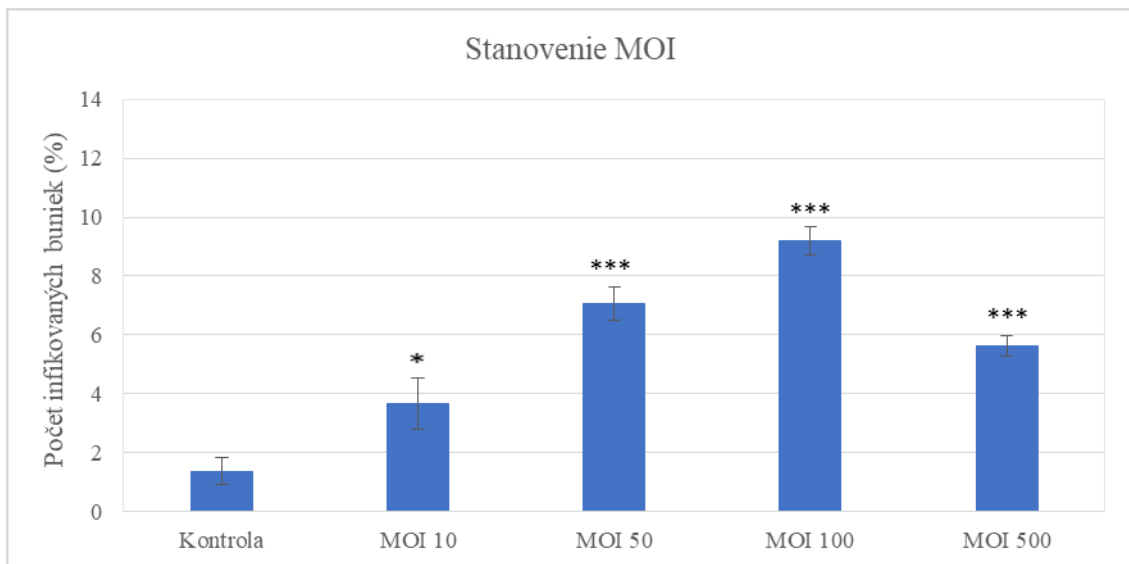


### 4.3.2 Vyhodnotenie vstupu intracelulárnej baktérie *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin do B lymfocytov

- **Infikovateľnosť peritoneálnych B lymfocytov**

Najskôr sme stanovili optimálnu hodnotu MOI, ktorú sme ďalej používali v pokusoch. Pripravené suspenzie peritoneálnych CD19<sup>+</sup> buniek z myší BALB/c sme infikovali postupne rôznou multiplicitou a sledovali sme vplyv na infekciu CD19<sup>+</sup> buniek baktériou *M. bovis* BCG-GFP.

Graf č. 1 znázorňuje *in vitro* infikovateľnosť peritoneálnych CD19<sup>+</sup> buniek infikovaných baktériou *M. bovis* BCG-GFP v závislosti na použitej MOI. Najvyššia infikovateľnosť bola po infekcii s MOI 100, ktorá predstavovala  $9,2 \pm 0,5$  % infikovaných B lymfocytov (Graf č. 1). Z tohto dôvodu bola v ďalších pokusoch používaná MOI 100.



**Graf č. 1:** Infikovateľnosť peritoneálnych B lymfocytov z myší BALB/c. B lymfocyty infikované baktériou *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) exprimujúcou GFP (green fluorescent protein, zelený fluorescenčný proteín) s rôznou MOI (multiplicity of infection, multiplicita infekcie). \*\*\*  $P < 0,001$ , \*  $P < 0,05$ .

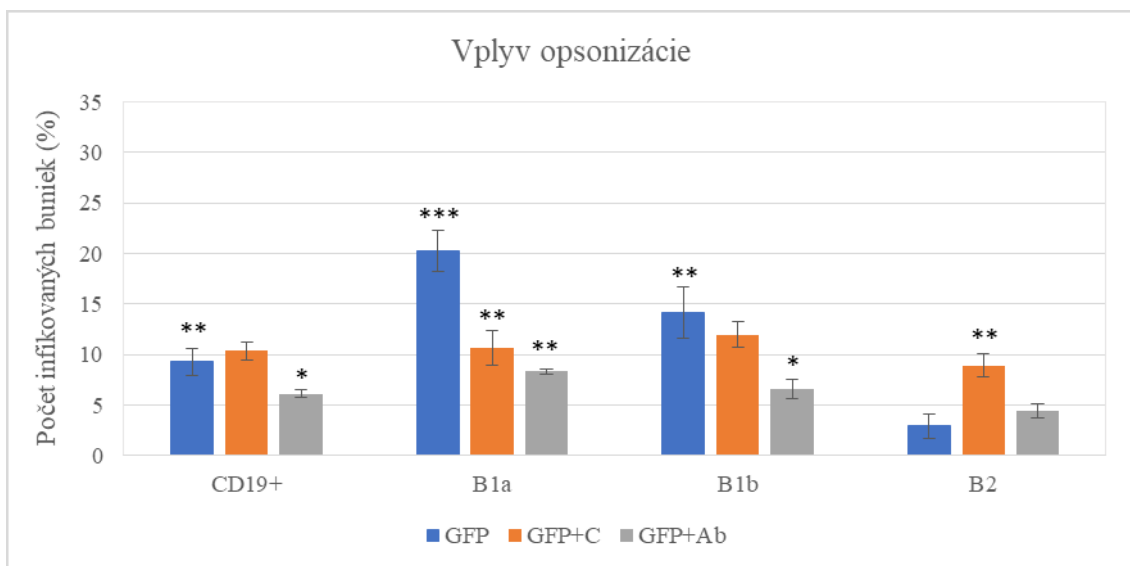
- **Vplyv opsonizácie komplementom a protilátkami**

Ďalej sme hodnotili vplyv opsonizácie na infekciu baktériou *M. bovis* BCG-GFP. neopsonizovanou a/alebo opsonizovanou čerstvým sérom („komplement“) alebo imúnnym sérom („protilátky“). Označenie CD19<sup>+</sup> predstavuje množstvo infikovaných peritoneálnych B lymfocytov, ktoré sa vzťahuje na celkový

počet peritoneálnych buniek. Percentuálny podiel jednotlivých subpopulácií B1a, B1b a B2 je prepočítaný z celkového počtu infikovaných CD19+.

Po infekcii baktériou opsonizovanou komplementom sme zaznamenali vyšší počet infikovaných CD19+ buniek, ktorý predstavoval  $10,37 \pm 0,89$  % oproti infekcii baktériou neopsonizovanou komplementom, ktorá infikovala  $9,33 \pm 1,34$  % CD19+ buniek. Naopak, po infikovaní baktériou opsonizovanou protilátkami bol počet infikovaných CD19+ buniek znížený a tvoril  $6,15 \pm 0,35$  %.

V rámci jednotlivých subpopulácií CD19+ buniek neopsonizovaná baktéria *M. bovis* BCG infikuje najviac B1a lymfocyty, menej B1b a najmenej B2 lymfocyty. Výrazný vplyv opsonizácie komplementom na infekciu sme zaznamenali len u subpopulácie B2, kedy počet infikovaných buniek vzrástol takmer trojnásobne z  $2,94 \pm 1,25$  % na  $8,93 \pm 1,17$  %. Opsonizácia komplementom a podobne opsonizácia protilátkami viedla u subpopulácií B1a a B1b k zníženiu infekcie (Graf č. 2).

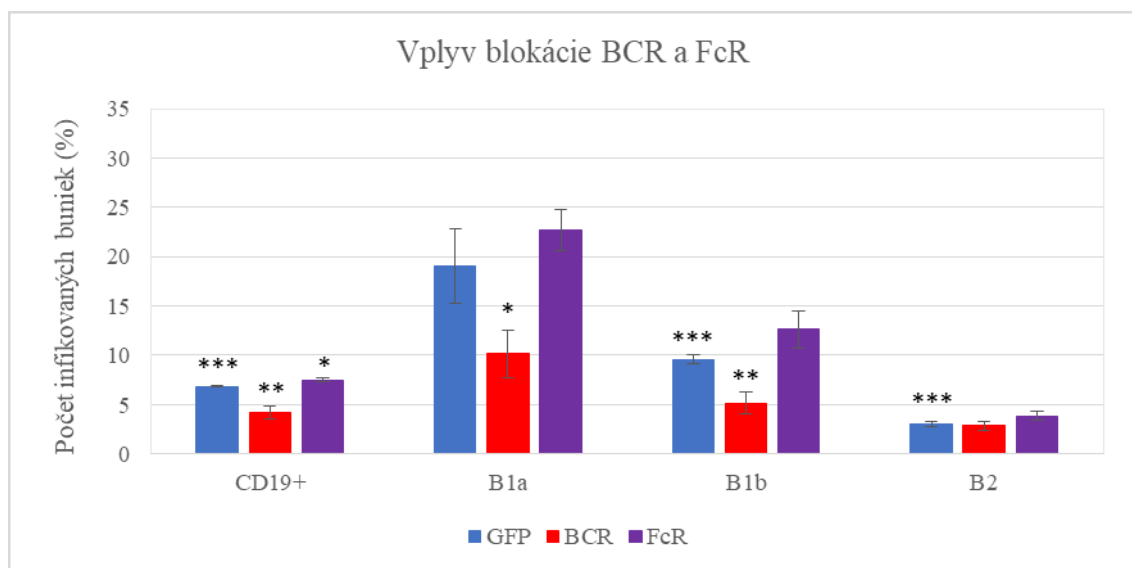


**Graf č. 2:** Vplyv opsonizácie. Infekcia peritoneálnych B lymfocytov z myší BALB/c baktériou *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) exprimujúcou GFP (green fluorescent protein, zelený fluorescenčný proteín). B lymfocyty infikované neopsonizovanou baktériou (GFP). B lymfocyty infikované baktériou opsonizovanou komplementom (GFP+C). B lymfocyty infikované baktériou opsonizovanou protilátkami (GFP+Ab). \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$ .

- **Vplyv blokácie BCR a Fcγ receptoru**

Graf č. 3 znázorňuje vplyv BCR a Fcγ receptu na vstup baktérie *M. bovis* BCG-GFP do B lymfocytov. Po zablokovaní BCR došlo k signifikantnému poklesu infikovaných CD19+ buniek. Infekcia sa znížila takmer o polovicu. Podobne tomu tak bolo aj u subpopulácií B1a a B1b. Na subpopuláciu B2 nemala blokácia BCR výrazný efekt.

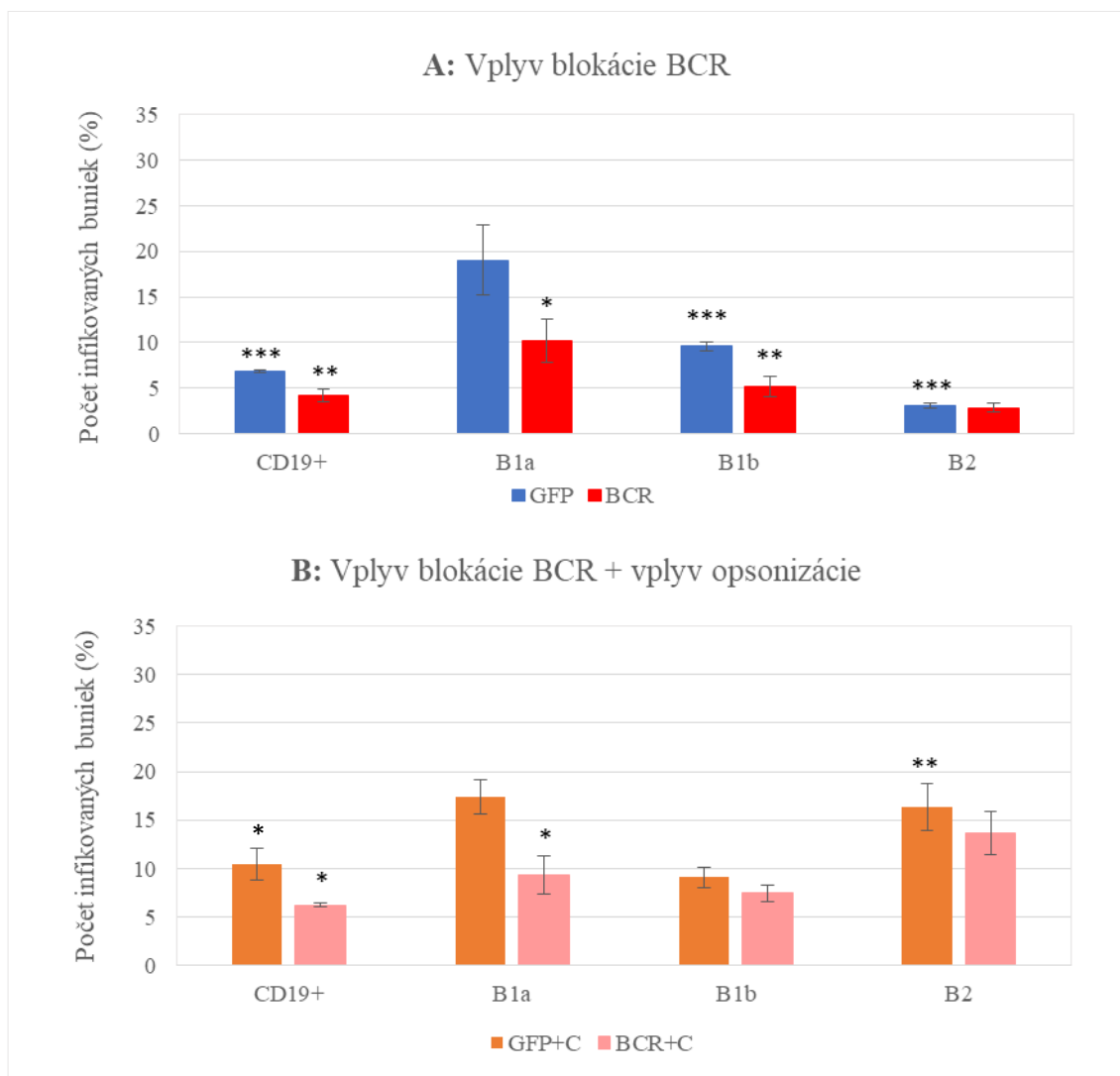
Blokácia Fcγ receptoru viedla k nepatrnému nárastu infikovaných CD19+ buniek baktériou *M. bovis* BCG-GFP. U všetkých troch subpopulácií B1a, B1b a B2 došlo k miernemu zvýšeniu infekcie po blokácii Fcγ receptoru (Graf č. 3).



**Graf č. 3:** Vplyv blokácie BCR a Fcγ receptoru. Infekcia peritoneálnych B lymfocytov z myši BALB/c baktériou *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) exprimujúcou GFP (green fluorescent protein, zelený fluorescenčný proteín). B lymfocyty infikované neopsonizovanou baktériou (**GFP**). B lymfocyty so zablokovaným BCR receptorom infikované neopsonizovanou baktériou (**BCR**). B lymfocyty so zablokovaným Fcγ receptorom infikované neopsonizovanou baktériou (**FcR**).

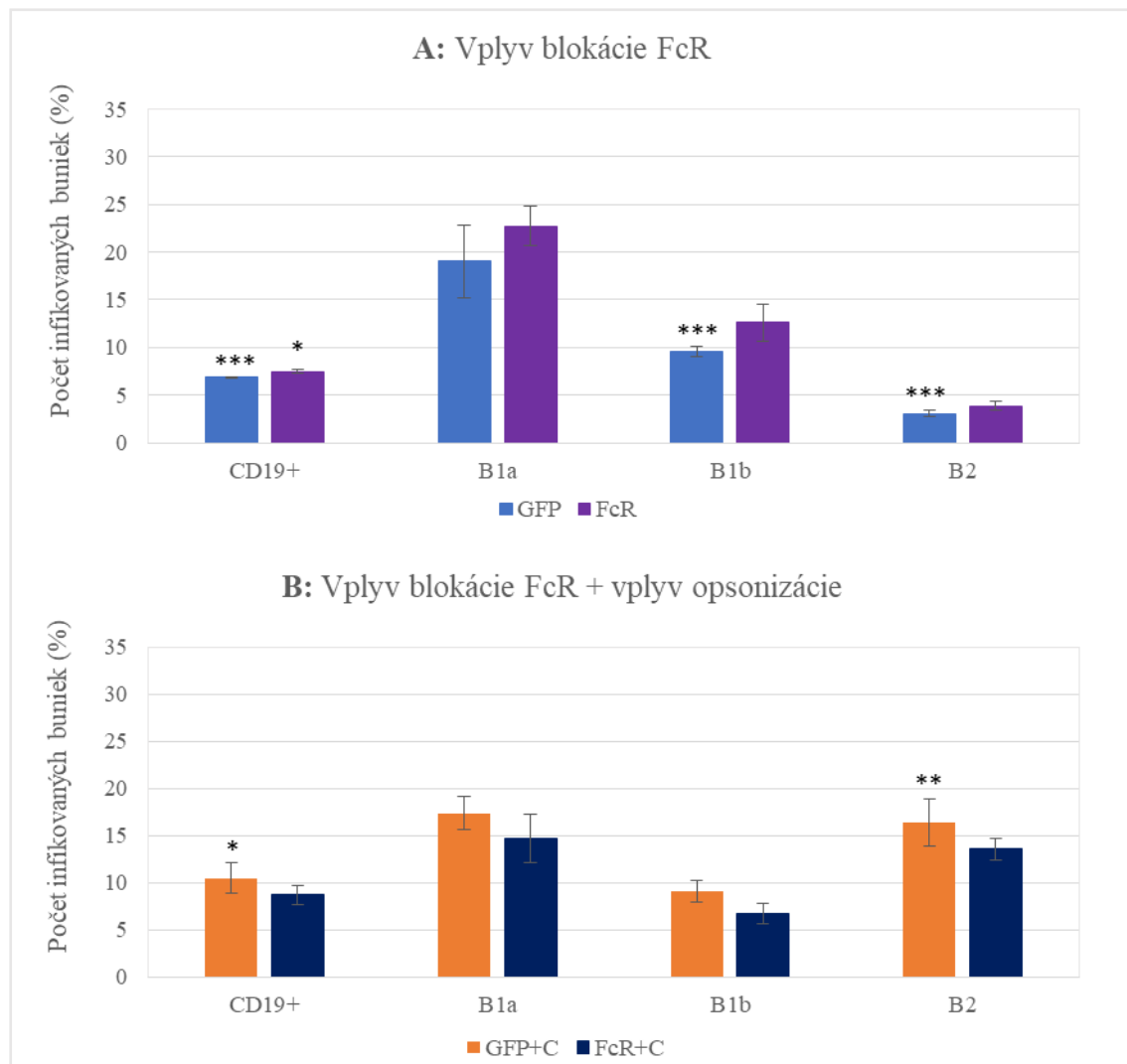
\*\*\* P < 0,001, \*\* P < 0,01, \* P < 0,05.

Ďalej sme sledovali efekt blokácie BCR receptoru po infikovaní baktériou *M. bovis* BCG-GFP opsonizovanou komplementom. Po infekcii CD19+ buniek opsonizovanou baktériou došlo k signifikantnému poklesu infekcie o takmer 50 % a podobne aj u ich subpopulácie B1a. Na subpopuláciu B1b mala opsonizácia komplementom mierny efekt a u podobne aj u subpopulácie B2 došlo k miernemu zníženiu infekcie (Graf č. 4).



**Graf č. 4:** Vplyv blokácie BCR receptoru a vplyv opsonizácie. Infekcia peritoneálnych B lymfocytov z myší BALB/c (A) neopsonizovanou a/alebo (B) komplementom opsonizovanou baktériou *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) exprimujúcou GFP (green fluorescent protein, zelený fluorescenčný proteín). B lymfocyty infikované neopsonizovanou baktériou (GFP). B lymfocyty infikované opsonizovanou baktériou (GFP+C). B lymfocyty so zablockovaným BCR receptorom infikované neopsonizovanou baktériou (BCR). B lymfocyty so zablockovaným BCR receptorom infikované opsonizovanou baktériou (BCR+C). \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$ .

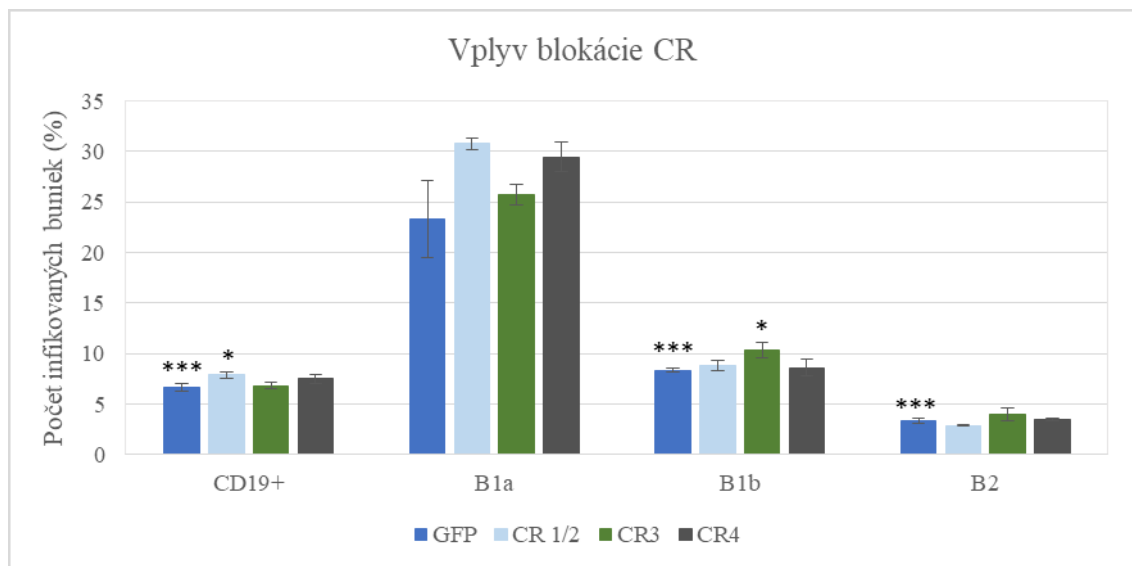
Takisto sme porovnali úlohu Fc $\gamma$  receptoru na vstup komplementom opsonizovanej baktérie *M. bovis* BCG-GFP do B lymfocytov. Zaznamenali sme mierne znížený počet infikovaných CD19<sup>+</sup> buniek a podobne aj u subpopulácií B1a, B1b a B2 došlo k miernemu poklesu počtu infikovaných buniek u všetkých sledovaných populácií po blokácii Fc $\gamma$  receptoru a následnej infekcii baktériou *M. bovis* BCG-GFP opsonizovanou komplementom (Graf č. 5).



**Graf č. 5:** Vplyv blokácie Fc $\gamma$  receptoru a vplyv opsonizácie. Infekcia peritoneálnych B lymfocytov z myší BALB/c (A) neopsonizovanou a/alebo (B) komplementom opsonizovanou baktériou *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) exprimujúcou GFP (green fluorescent protein, zelený fluorescenčný proteín). B lymfocyty infikované neopsonizovanou baktériou (GFP). B lymfocyty infikované opsonizovanou baktériou (GFP+C). B lymfocyty so zablokovaným FcR receptorom infikované neopsonizovanou baktériou (FcR). B lymfocyty so zablokovaným FcR receptorom infikované opsonizovanou baktériou (FcR+C). \*\*\* P < 0,001, \*\* P < 0,01, \* P < 0,05.

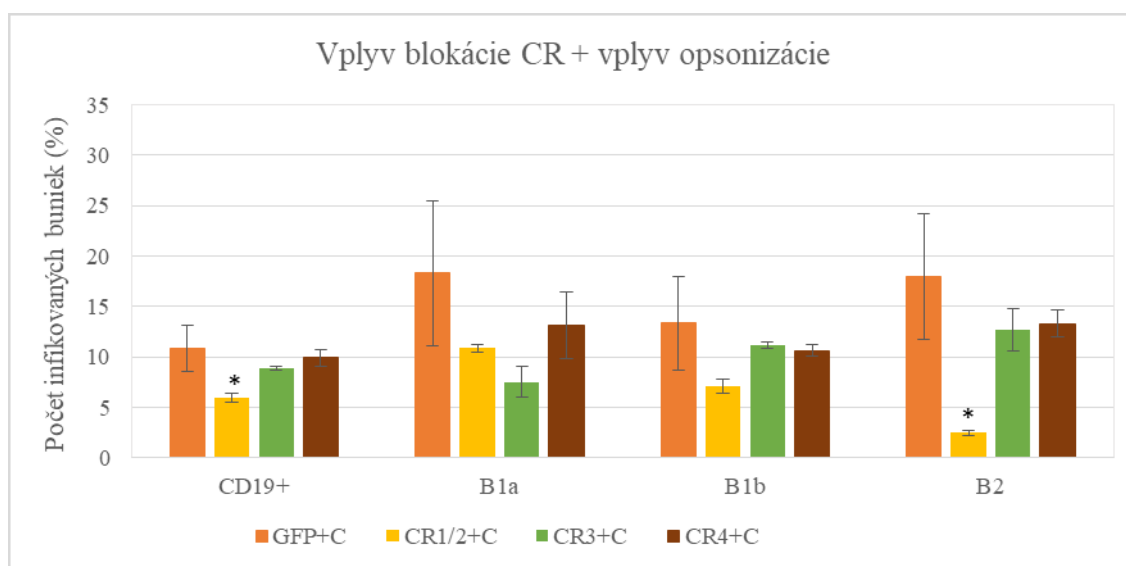
- **Vplyv blokácie komplementových receptorov CR1/2, CR3 a CR4**

Po zablokovaní komplementových receptorov a následnej infekcii neopsonizovanou baktériou *M. bovis* BCG-GFP sme zaznamenali mierny nárast počtu infikovaných buniek – u subpopulácie B1a po zablokovaní CR1/2 a tiež po blokácii CR4. Infekcia mierne stúpila aj u subpopulácie B1b po blokácii CR3. Celkovo však blokácia komplementových receptorov nemala výrazný vplyv na vstup neopsonizovanej baktérie *M. bovis* BCG-GFP do B lymfocytov (Graf č. 6).



**Graf č. 6:** Vplyv blokácie komplementových receptorov. Infekcia peritoneálnych B lymfocytov z myší BALB/c neopsonizovanou baktériou *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) exprimujúcou GFP (green fluorescent protein, zelený fluorescenčný proteín). B lymfocyty infikované neopsonizovanou baktériou (GFP). B lymfocyty so zablokovanými jednotlivými komplementovými receptormi (CR1/2, CR3, CR4) infikované neopsonizovanou baktériou. \*\*\* P < 0,001, \* P < 0,05.

Nakoniec sme sledovali akú úlohu zohrávajú komplementové receptory po infekcii baktériou *M. bovis* BCG-GFP opsonizovanou komplementom (Graf č. 7). Signifikantný vplyv na vstup *M. bovis* BCG-GFP do CD19+ lymfocytov zohrala blokácia receptoru CR1/2, kedy infekcia poklesla z  $10,85 \pm 2,23$  % na  $5,99 \pm 0,42$  %. Podobne aj u subpopulácie B1a došlo k zníženiu infekcie po zablockovaní CR1/2 a ešte výraznejšie poklesol počet infikovaných buniek po blokácii CR3 a následnej infekcii *M. bovis* BCG-GFP opsonizovanou komplementom. Blokácia CR4 mala menej výrazný vplyv. U subpopulácie B1b sa uplatnil predovšetkým CR1/2 receptor a v menšej miere aj CR3. Na vstup baktérie *M. bovis* BCG-GFP opsonizovanej komplementom u subpopulácie B2 zohral signifikantnú úlohu receptor CR1/2.



**Graf č. 7:** Vplyv blokácie komplementových receptorov a vplyv opsonizácie. Infekcia peritoneálnych B lymfocytov z myší BALB/c komplementom opsonizovanou baktériou *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) exprimujúcou GFP (green fluorescent protein, zelený fluorescenčný proteín). B lymfocyty infikované opsonizovanou baktériou (**GFP+C**). B lymfocyty so zablockovanými jednotlivými komplementovými receptormi infikované opsonizovanou baktériou (**CR1/2+C**, **CR3+C**, **CR4+C**).

\*  $P < 0,05$ .

## 5. DISKUSIA

B lymfocytom, predstaviteľom humorálnej zložky imunitného systému, bola oddávna pripisovaná obranná funkcia hlavne voči extracelulárnym patogénom. Obrana pred intracelulárnymi baktériami bola spájaná predovšetkým s rozvojom bunkovej imunity založenej na Th1 lymfocytoch. S narastajúcim počtom dôkazov o úlohe B lymfocytov aj v modulácii bunkovej imunitnej odpovede sa zdá byť pôvodná predstava mylná. Schopnosťou fagocytózy a následnej prezentácie antigénu CD4+ ako aj CD8+ T lymfocytom, produkciou protilátok a širokého spektra zápalových cytokínov a tiež regulačnou funkciou prostredníctvom Breg, majú potenciál byť adekvátnym partnerom T lymfocytov, dendritických buniek a makrofágov v obrannej reakcii proti intracelulárnym patogénom [44, 50, 54].

Výsledky rôznych experimentálnych modelov dokazujú, že intracelulárne baktérie ako napr. *Salmonella* [53], *Brucella* [52], *Francisella* [51] a *Mycobacterium* [100] dokážu aktívne vstupovať do B lymfocytov. Presný mechanizmus internalizácie intercelulárných baktérií do B lymfocytov momentálne známy nie je. Vstup baktérie *Salmonella typhimurium* do B lymfocytov bol spojený s rozpoznaním prostredníctvom BCR receptoru. Vo vnútri B lymfocytu prežíva v tzv. salmonelu-obsahujúcej vakuole a aktivuje B lymfocyty k tvorbe špecifických protilátok [53]. *Brucella abortus* opsonizovaná komplementom a IgM aktívne infikuje B lymfocyty a jej vstup je sprostredkovaný prostredníctvom funkčných mikrofilamentov. Následne prežíva v neskorom endozomálnom/lyzozomálnom kompartmente a iniciuje hostiteľskú bunku k produkcii regulačného cytokínu TGF- $\beta$ 1 [52]. Intracelulárna baktéria *Francisella tularensis* (*F. tularensis*) taktiež aktívne vstupuje do B lymfocytov a navyše je schopná vyvolať ich apoptózu [51]. Jej vstup je tiež asociovaný s rozpoznaním cez špecifický BCR receptor a v závislosti na subpopulácii B lymfocytu vyžaduje spoluprácu s komplementovým receptorom CR1/2 [101]. Cieľom tejto práce bolo sledovať *in vitro* vstup ďalšej intracelulárnej baktérie *M. bovis* BCG-GFP do peritoneálnych B lymfocytov izolovaných z myši BALB/c. V našich experimentoch sme potvrdili, že mykobaktérium, intracelulárny patogén, aktívne vstupuje do B lymfocytov a to rôznou mierou v závislosti od subpopulácie a podmienok.

Podľa našich výsledkov infikuje *M. bovis* BCG *in vitro* po 3 hodinách inkubácie  $9,33 \pm 1,34$  % peritoneálnych CD19+ lymfocytov. V rámci jednotlivých subpopulácií



B1a (CD19+CD5+CD11b+), B1b (CD19+CD5-CD11b+) a B2 (CD19+CD5-CD11b-) sa počty infikovaných B lymfocytov značne líšili. Najviac boli infikované B1a lymfocyty ( $20,23 \pm 2,02$  %), menej B1b lymfocyty ( $14,15 \pm 2,51$  %) a najmenej bolo infikovaných B2 lymfocytov ( $2,94 \pm 1,25$  %). K podobnému výsledku viedla práca od Plzáková *et al.* (2014), kde vedci pozorovali zmeny v zastúpení imunitných buniek v peritoneu a v slezine po *in vivo* intraperitoneálnej infekcii myši BALB/c baktériou *F. tularensis* LVS (live vaccine strain, živý vakcinačný kmeň). Vedci prezentovali, že *F. tularensis* LVS infikuje peritoneálne B lymfocyty, pričom v prevažnej väčšine išlo v tomto prípade o subpopuláciu B1a. Následne *F. tularensis* LVS iniciuje peritonálne a tiež CD19+ bunky sleziny k expresii aktivačných znakov (MHC-II, CD25, CD54, CD69) a kostimulačných molekúl (CD80, CD86), ako aj k produkcii cytokínov (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 a ďalšie) [102]. Charakter B1 lymfocytov ako medzníka vrodenej a adaptívnej imunitnej odpovede schopného produkovať prirodzené protilátky nezávisle na T lymfocytoch [44, 54] môže byť spojený dôvodom prečo hlavným aktérom v interakcii s intracelulárnou baktériou je subpopulácia B1a.

Úlohe B lymfocytov vo vrodenej imunitě voči intracelulárnym baktériám sa venovali aj v štúdií vedenej Garcia-Perez *et al.* (2012). Prezentovali, že živé mykobaktérie a salmonely vstupujú do B lymfocytov (lína Raji) prostredníctvom aktívneho procesu makropinocytózy. Vstup intracelulárných baktérií *M. tuberculosis*, *M. spegmatis* a *Salmonella typhimurium* bol spojený so zmenami v štruktúre bunkovej membrány, ktorá viedla k tvorbe filopódií a lamelipódií [103]. Zhu *et al.* (2016) ďalej sledovali, či mŕtve *M. tuberculosis* dokáže vyvolať makropinocytózu. Dospeli k záveru, že naopak bunková línia Raji dokáže fagocytovať *M. tuberculosis* nezávisle na životnosti baktérií. Fagocytované mykobaktérie ďalej stimujú produkciu IgM a expresiu kostimulačných molekúl CD80 a CD86 [100].

Prekonaním dlhotrvajúcej domnienky, že B lymfocyty nie sú schopné fagocytózy, sa začala sledovať ich fagocytárna a baktericídna aktivita. Štúdiom fagocytárnej funkcie B lymfocytov sa zaoberal aj tím Parra *et al.* (2012), ktorý preukázal schopnosť myších peritoneálnych B1a a B1b lymfocytov fagocytovať inertné častice a baktérie. Množstvo fagocytujúcich B lymfocytov izolovaných z kostnej drene, sleziny, či krvi predstavovalo minimálny podiel oproti B lymfocytom izolovaných z peritonea. V rámci detailnejšieho štúdia B1 lymfocytov, ktoré predstavujú 30 – 40 % z celkového množstva peritoneálnych leukocytov u myši, bolo percento fagocytujúcich B1a lymfocytov značne vyššie v porovnaní s B1b lymfocytmi. Množstvo

fagocytujúcich peritoneálnych B2 lymfocytov bolo minimálne [104]. V našich pokusoch s *M. bovis* BCG-GFP sme takisto zaznamenali z celkového počtu B lymfocytov najviac infikovaných B1a lymfocytov a minimum infikovaných B2. Zaujímavým výsledkom našej práce bola však práve nečakaná reakcia subpopulácie B2 na mykobaktérium opsonizované komplementom, kedy došlo k výraznému nárastu ich aktivity vedúcej k mnohonásobne zvýšenému počtu infikovaných B2 lymfocytov z  $2,94 \pm 1,25$  % až na  $8,93 \pm 1,17$  %. Na subpopulácie B1a a B1b nemala opsonizácia komplementom takýto efekt a dokonca došlo k zníženiu infekcie. V porovnaní s reakciou B2 lymfocytov infikovaných baktériou *Fransicella tularensis* LVS, kde opsonizácia komplementom viedla síce k miernemu zvýšeniu infekcie, ale nie tak razantnému ako po infekcii *M. bovis* BCG-GFP [101]. B2 lymfocytom, tiež známym ako konvenčným lymfocytom, je prikladaná hlavná úloha v adaptívnej humorálnej imunite [44]. V doterajších štúdiách nebola popisovaná ich významnejšia funkcia vo fagocytóze intracelulárnych baktérií. Z tohto dôvodu je výsledok našich experimentov o reakcii B2 lymfocytov na komplementom opsonizované mykobaktérium neočakávaný a jedinečný, pričom komplement významne ovplyvnil vstup *M. bovis* BCG-GFP do B2 lymfocytov.

Komplement predstavuje jednu z hlavných zložiek nešpecifickej humorálnej imunity, ktorá môže byť aktivovaná tromi cestami: alternatívnou, lektínovou a klasickou. Jednou z jeho úloh je opsonizácia častíc, pomocou ktorej môže byť uľahčená ich fagocytóza [50]. *M. tuberculosis*, ktoré zdieľa s baktériami komplexu *M. tuberculosis* až 99,9 % genómu, aktivuje komplement a tým uľahčuje svoj vstup do makrofágov [6, 105]. Podľa Zhu *et al.* (2016) opsonizácia *M. tuberculosis* čerstvým ľudským sérom vedie tiež k zvýšenej fagocytóze mykobaktérií do B lymfocytov (lúnia Raji) a to cez komplementový receptor CR1 [100]. Carrol *et al.* (2009) dospeli k záveru, že *M. bovis* BCG prostredníctvom fragmentu C1q aktivuje klasickú cestu a to protilátkovo závisle aj nezávisle, ďalej alternatívnu cestu, ktorá je protilátkovo nezávislá a tiež lektínovú cestu prostredníctvom MBL a L-fikolínu [106]. Po vyhodnotení našich pokusov o vplyve komplementu na infekciu peritoneálnych B lymfocytov baktériou *M. bovis* BCG-GFP sme však zaznamenali len mierne zvýšený počet infikovaných CD19+ buniek, pričom výnimočne reagovala už spomínaná subpopulácia B2. Naopak u B1a a B1b subpopulácie došlo k poklesu infekcie a teda u týchto subpopulácií nie je rozhodujúci pre vstup *M. bovis* BCG-GFP. Podľa Plzáková *et al.* (2015) však po opsonizácii komplementom intracelulárnej baktérie *F. tularensis* LVS dochádza ako

u CD19<sup>+</sup> buniek, tak aj u všetkých troch vybraných subpopulácií B1a, B1b a B2 k zvýšeniu infekcie. Efekt opsonizácie sa v závislosti na subpopulácii prejavil najviac u B1a a najmenej u B2 lymfocytov [101]. Z uvedeného vyplýva, že vplyv komplementu na vstup baktérií do B lymfocytov je pravdepodobne závislý aj od subpopulácie B lymfocytu a aj od typu baktérie. Podobne ďalej v štúdií Plzáková *et al.* (2015) sledovali vplyv opsonizácie baktérií *F. tularensis* LVS imunnými sérom („protilátky“) na *in vitro* infekciu peritoneálnych buniek izolovaných z myší BALB/c. V tomto prípade nemala opsonizácia protilátkami výraznejší efekt. [101] V našom prípade sme, ale po infekcii baktériami *M. bovis* BCG-GFP opsonizovanými protilátkami detekovali znížené množstvo infikovaných CD19<sup>+</sup> buniek a tiež v rámci subpopulácií B1a B1b. Na subpopuláciu B2 mala opsonizácia mykobaktérií protilátkami nepatrný vplyv.

Vstup *M. tuberculosis* do hostiteľskej bunky môže byť sprostredkovaný pomocou rôznych receptorov v závislosti na podmienkach tohto procesu. Za neopsonizovaných podmienok prevláda internalizácia mykobaktérií do zrelých makrofágov sprostredkovaná manózoovým receptorom. Pri opsonizácii mykobaktérií imunným sérom s protilátkami voči mykobaktériám sa uplatňuje Fc $\gamma$  receptor. V prípade, že sú baktérie opsonizované sérom so zložkami komplementu C3b, C4b a C3bi prebieha fagocytóza pomocou komplementových receptorov CR1, CR3 a CR4 [105]. Podľa našich experimentov sa na vstupe *M. bovis* BCG-GFP do CD19<sup>+</sup> buniek uplatňuje BCR receptor a za prítomnosti komplementu tiež CR1/2. V rámci ďalších subpopulácií B1a a B1b sa uplatňuje okrem CR1/2 aj CR3, ale v menšej miere. V porovnaní s *M. tuberculosis* sa podľa Zhu *et al.* (2016) na vstupe do B lymfocytov (lína Raji) za opsonizovaných podmienok uplatňuje komplementový receptor CR1 [100]. V prípade *Francisella tularensis* LVS prebieha ich vstup do B lymfocytov prostredníctvom BCR receptoru a to v závislosti na subpopulácii. Samotný BCR sa uplatňuje len u subpopulácie B1a. U ďalších dvoch subpopulácií vyžaduje kooperáciu s komplementovým receptorom CR1/2 [101].

Úlohu vybraných receptorov na povrchu B lymfocytov sme skúmali po ich zablokovaní. Tým sme eliminovali ich účasť na vstupe baktérie *M. bovis* BCG-GFP. Prvým sledovaným receptorom bol antigénne špecifický BCR receptor, ktorý sa uplatňuje na vstupe francisel aj salmonel [53, 101]. Taktiež aj v našich pokusoch jeho blokácia viedla k významnému zníženiu infikovaných peritoneálnych CD19<sup>+</sup> buniek. Za neopsonizovaných podmienok v rámci subpopulácie B1a a B1b došlo k zníženiu infekcie takmer o polovicu a teda sa domnievame, že samotný BCR postačuje

na rozpoznanie a internalizáciu *M. bovis* BCG-GFP do uvedených subpopulácií. U subpopulácie B2 po blokácii BCR receptora nedošlo k významným zmenám. Po opsonizácii komplementom u subpopulácie B2 sme rovnako ako v predchádzajúcich pokusoch zaznamenali jej zvýšenú aktivitu, ale zároveň pri súčasnej blokácii BCR došlo k miernemu poklesu infekcie. Preto sa domnievame, že *M. bovis* BCG-GFP pre vstup vyžaduje spoluprácu BCR receptora a CR1/2, ktorého blokácia mala významný vplyv na infekciu. Podľa Plzánková *et al.* (2015) pri štúdiu vstupu *F. tularensis* LVS do B lymfocytov mal samotný BCR receptor v rámci sledovaných subpopulácií výrazný vplyv len na vstup do B1a lymfocytov. U subpopulácií B1b a B2 blokácia BCR receptora nemala na vplyv na vstup *F. tularensis* LVS do B lymfocytov a to ani za opsonizovaných podmienok [101].

Po zablokovaní Fc $\gamma$  receptora na B lymfocytoch a následnej infekcii *M. bovis* BCG sme nezaznamenali výrazné zmeny v počte infikovaných buniek. Opsonizácia komplementom spôsobila mierne zníženie vstupu *M. bovis* BCG-GFP do všetkých troch sledovaných subpopulácií a teda podľa našich doterajších výsledkov Fc $\gamma$  receptor zohral nepatrnú úlohu na vstupe *M. bovis* BCG-GFP do B lymfocytov. Dôležité je podotknúť, že i v tomto experimente sme po opsonizácii mykobaktérií komplementom zaznamenali výraznú reakciu subpopulácie B2. Podľa Plzánková *et al.* (2015) sa úloha Fc $\gamma$  receptora vyznačila až pri infekcii *F. tularensis* LVS súčasne opsonizovaných ako aj komplementom, tak aj protilátkami, kedy došlo k zníženiu celkového počtu CD19<sup>+</sup> buniek. V rámci subpopulácií mala blokácia Fc $\gamma$  receptora vplyv len na B1a lymfocyty za uvedených podmienok [101].

Nakoniec sme sa zaoberali komplementovými receptormi CR1/2, CR3 a CR4. Ich samotná blokácia nevedla k výraznej zmene v počte infikovaných celkového počtu CD19<sup>+</sup> buniek baktériou *M. bovis* BCG, ani jednotlivých subpopulácií B1a, B1b a B2. Ďalej pri použití baktérií opsonizovaných komplementom sme pozorovali významný vplyv na infekciu v rámci celej populácie CD19<sup>+</sup> len po blokácii komplementového receptora CR1/2. V štúdiu Plzánková *et al.* (2015) pri infekcii CD19<sup>+</sup> peritoneálnych B lymfocytov baktériou *F. tularensis* LVS opsonizovanou komplementom vedci taktiež zaznamenali významnú úlohu len CR1/2 receptora, kde zhodnotili, že pre vstup *F. tularensis* do B1b a B2 subpopulácie vyžaduje kooperáciu BCR s CR1/2 [101]. O funkcii CR1 receptora vo vstupe mykobaktérií do B lymfocytov línie Raji píše aj v štúdiu vedenej Zhu *et al.* (2016), kde použili protilátku proti CR1 (CD35). Vedci podporili tvrdenie, že pri použití opsonizácie pomocou normálneho ľudského séra sa

komplementový receptor CR1 uplatňuje na fagocytóze baktérie *M. tuberculosis* B lymfocytmi [100].

V rámci subpopulácií sme zaznamenali rôznu mieru vplyvu komplementových receptorov na infekciu. U subpopulácie B1a má výrazný vplyv na vstup baktérie *M. bovis* BCG-GFP opsonizovanej komplementom do B lymfocytov receptor CR3, menej výrazne u CR1/2. U subpopulácie B1b sa uplatnil tiež CR1/2 a v menšej miere aj CR3. Na vstup *M. bovis* BCG-GFP do B2 lymfocytov zohral významnú úlohu CR1/2 receptor. Podľa našich výsledkov komplement výrazne podporuje internalizáciu *M. bovis* BCG-GFP do subpopulácie B2, pričom tento proces je spojený pravdepodobne s rozpoznaním cez komplementový receptor CR1/2.

Skutočnosť, že peritoneálne B1 lymfocyty dokážu fagocytovať častice a baktérie posilňuje domnienku o ich dôležitej funkcii aj v tvorbe vrodenej imunitnej odpovede [104]. Navyše, určité malé percento peritoneálnych B2 lymfocytov dokáže tiež internalizovať intracelulárnu baktériu *F. tularensis* LVS [101] a *M. bovis* BCG-GFP. Podľa našich výsledkov sa množstvo infikovaných B2 lymfocytov intracelulárnou baktériou *M. bovis* BCG-GFP jednoznačne zvyšuje po opsonizácii komplementom, kedy počet infikovaných B2 lymfocytov vzrástol niekoľkonásobne v každom experimente. Tento zaujímavý výsledok prikladáme doposiaľ nepoznaným vlastnostiam mykobaktérií a tiež B2 lymfocytom. Podobne ako u *F. tularensis* LVS je vstup do peritoneálnych CD19<sup>+</sup> buniek asociovaný s rozpoznaním cez BCR receptor a tiež cez CR1/2, čo podporuje model duálneho rozpoznania antigénu B lymfocytom. [101, 107]

Z našich experimentov vyplynulo, že *M. bovis* BCG-GFP v podmienkach *in vitro* aktívne vstupuje do B lymfocytov izolovaných z peritonea myší BALB/c. Miera infekcie sa líši od subpopulácie a prítomnosti komplementu. Bez použitia opsonizácie bolo najviac infikovaných buniek zo subpopulácie B1a a najmenej z B2. Vstup *M. bovis* BCG-GFP do subpopulácií B1a a B1b bol sprostredkovaný cez BCR receptor. Po opsonizácii komplementom sa u B1a a B1b lymfocytov pravdepodobne uplatňuje rôznou mierou aj CR3 a CR1/2. Na vstupe *M. bovis* BCG-GFP do B2 lymfocytov sa významným spôsobom podieľa prostredníctvom väzby baktérie opsonizovanej komplementom CR1/2, ktorý pravdepodobne spolupracuje s BCR receptorom.

## 6. ZÁVER

- Pomocou prietokovej cytometrie sme hodnotili vstup živej intracelulárnej baktérie *M. bovis* BCG-GFP do peritoneálnych B lymfocytov izolovaných z myši BALB/c.
- *M. bovis* BCG-GFP aktívne vstupuje do B lymfocytov, pričom v rámci celkového počtu CD19+ buniek sme za neopsonizovaných podmienok zaznamenali najviac infikovaných B1a, menej B1b a najmenej B2 lymfocytov.
- Oponizácia komplementom ani protilátkami nemala výraznejší vplyv na infekciu CD19+ buniek, naopak, u subpopulácií B1a a B1b došlo k poklesu infekcie.
- Prekvapivo, na opsonizáciu komplementom veľmi výrazne reagovala subpopulácia B2, kedy sa infekcia zvýšila takmer trojnásobne.
- Úlohu vybraných receptorov sme sledovali po ich zablokovaní.
- Za neopsonizovaných podmienok sa na vstupe do CD19+ buniek uplatnil samotný BCR receptor a za opsonizácie sa uplatnil aj komplementový receptor CR1/2.
- Pre subpopuláciu B1a je pre vstup *M. bovis* BCG-GFP dôležitý BCR receptor a za účasti komplementu sa uplatňuje aj komplementový receptor CR3 a CR1/2.
- Pre subpopuláciu B1b na vstup *M. bovis* BCG-GFP taktiež postačuje rozpoznanie cez BCR receptor a za opsonizovaných podmienok sa uplatní aj CR1/2 a čiastočne aj CR3.
- Za účasti komplementu veľmi aktívne vstupuje *M. bovis* BCG-GFP do subpopulácie B2 lymfocytov a to pravdepodobne hlavne vďaka kooperácii komplementového receptoru CR1/2 s BCR receptorom.

## 7. ZOZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKOV, GRAFOV A TABULIEK

- **Zoznam obrázkov:**

<b>Obrázok č. 1:</b> Schéma bunkovej steny mykobaktérii.....	14
<b>Obrázok č. 2:</b> Snímky preparátov zo svetelnej (A) a fluorescenčnej (B) mikroskopie.	15
<b>Obrázok č. 3:</b> <i>M. bovis</i> BCG (Bacillus Calmette-Guérin) exprimujúce GFP (green fluorescent protein, zelený fluorescenčný proteín) na Middlebrook 7H10 agare.....	16
<b>Obrázok č. 4:</b> Incidencia tuberkulózy, 2015 .....	18
<b>Obrázok č. 5:</b> Schéma patogenézy tuberkulózy a ochranný vplyv B lymfocytov .....	25
<b>Obrázok č. 6:</b> Schéma BCR receptoru. ....	28
<b>Obrázok č. 7:</b> Schéma prietokového cytometra. ....	30
<b>Obrázok č. 8:</b> Schéma princípu fluorescencie. ....	32
<b>Obrázok č. 9:</b> Príklady grafického zobrazenia dátových výstupov z prietokového cytometra. ....	36
<b>Obrázok č. 10:</b> Príklad gatovania .....	36
<b>Obrázok č. 11:</b> Príklad vyhodnotenia histogramu. ....	37
<b>Obrázok č. 12:</b> Schéma desiatkového riedenia bakteriálnej suspenzie a následného výsevu za účelom určenia počtu jednotiek tvoriacich kolónie. ....	44
<b>Obrázok č. 13:</b> Pracovná schéma 24-jamkového panelu pre infekciu buniek. ....	48
<b>Obrázok č. 14:</b> Diagram „bunky“ .....	51
<b>Obrázok č. 15:</b> Diagram „singlety“ .....	51
<b>Obrázok č. 16:</b> Diagram „infikované CD19+“ .....	52
<b>Obrázok č. 17:</b> Diagram „CD19+“ .....	53
<b>Obrázok č. 18:</b> Diagram „CD5+/CD5“ .....	54
<b>Obrázok č. 19:</b> Diagram „CD11b+/CD11b-“ .....	54
<b>Obrázok č. 20:</b> Diagram „infikované B1a“ .....	55
<b>Obrázok č. 21:</b> Diagram „infikované B1b“ .....	56
<b>Obrázok č. 22:</b> Diagram „infikované B2“ .....	56

- **Zoznam grafov:**

<b>Graf č. 1:</b> Infikovateľnosť peritoneálnych B lymfocytov z myší BALB/c.....	57
<b>Graf č. 2:</b> Vplyv opsonizácie .....	58
<b>Graf č. 3:</b> Vplyv blokácie BCR a Fc $\gamma$ receptoru .....	59
<b>Graf č. 4:</b> Vplyv blokácie BCR receptoru a vplyv opsonizácie.....	60
<b>Graf č. 5:</b> Vplyv blokácie Fc $\gamma$ receptoru a vplyv opsonizácie.....	61
<b>Graf č. 6:</b> Vplyv blokácie komplementových receptorov.....	62
<b>Graf č. 7:</b> Vplyv blokácie komplementových receptorov a vplyv opsonizácie.....	63

- **Zoznam tabuliek:**

<b>Tabuľka č. 1:</b> Protilátky, ktoré sa viažu na vybrané štruktúry na B lymfocytoch .....	47
<b>Tabuľka č. 2:</b> Schéma infikovania pre zistenie optimálnej hodnoty MOI.....	47



## 8. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] Stackebrandt, E., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L.: Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 1997, 47(2), 479-491.
- [2] Lehmann, K. B., Neumann, R.: *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik.* 1. Aufl. München: Lehmann, 1896, 1-448.
- [3] Votava, M., Černohorská, L., Heroldová, M., *et al.*: *Lékařská mikrobiologie speciální.* 1. vyd. Brno: NEPTUN, 2003, 159-160, ISBN 80-902896-6-5.
- [4] Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., *et al.*: *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie.* 1. vyd. Praha: Marvil, 1996, 305-308.
- [5] Rastogi, N., Legrand, E., Sola, C.: The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech.*, 2001, 20(1), 21-54.
- [6] Macela, A., Stulík, J., Trebichavský, I., *et al.*: *Infekční choroby a intracelulární parazitizmus bakterií.* 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 155-157, ISBN 80-247-0664-4.
- [7] Primm, T. P., Lucero, C. A., Falkinham, J. O.: Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Mikrobiol Rev.*, 2004, 17(1), 98-106.
- [8] Watanabe, S., Zimmermann, M., Goodwin, M. B., *et al.*: Fumarate reductase activity maintains an energized membrane in anaerobic *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.*, 2011, 7(10), e1002287.
- [9] Brennan, P. J.: Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 2003, 83(1-3), 91-97.
- [10] Krejsek, J., Kopecký, O.: *Klinická imunologie.* 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus, 2004, 512-513. ISBN 80-86225-50-X.
- [11] International Genetically Engineered Machine competition [online]. [cit. 2018-04-07]. Dostupné na: <http://2009.igem.org/wiki/images/1/17/MbMyco.png>
- [12] Global laboratory initiative: *Mycobacteriology laboratory manual* [online]. 1st ed. Geneva: Global laboratory initiative, 2014 [cit. 2017-07-11]. Dostupné na: [http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/gli\\_mycobacteriology\\_lab\\_manual\\_web.pdf](http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/gli_mycobacteriology_lab_manual_web.pdf)
- [13] A: Public Health image library [online]. [cit. 2017-03-28]. Dostupné na: <https://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=5789>

- B:** Zhang, M., Gong, J., Lin, Y., Barnes, P.F.: Growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain in human macrophages. *Infect Immun.*, 1998, 66(2), 794-799.
- [14] Grange, J. M., Yates, M. D., de Kantor, I. N.: *Guidelines for speciation within the Mycobacterium tuberculosis complex* [online]. 2nd ed. Geneva: World Health Organisation, 1996. [cit. 2017-03-15]. Dostupné na: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/65508/WHO\\_EMZ\\_ZOO\\_96.4.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/65508/WHO_EMZ_ZOO_96.4.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- [15] Saito, H.: Laboratory media for the cultivation of the tubercle bacillus. *Kekkaku*, 1998, 73(5), 329-337. Abstrakt databázy Medline.
- [16] Orme, I. M.: Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.*, 1988, 140(10), 3589-3593.
- [17] Sia, J. K., Georgieva, M., Rengarajan, J.: Innate immune defenses in human tuberculosis: an overview of the interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and innate immune cells. *J Immunol Res.*, 2015, 2015, 747543.
- [18] Mogensen, T. H.: Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.*, 2009, 22(2), 240-273.
- [19] Gatfield, J., Pieters, J.: Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*, 2000, 288(5471), 1647-1650.
- [20] Korb, V. C., Chuturgoon, A. A., Moodley, D.: *Mycobacterium tuberculosis*: manipulator of protective immunity. *Int J Mol Sci.*, 2016, 17(3), 131.
- [21] Barberis, I., Bragazzi, N. L., Galluzzo, L., *et al.*: The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg.*, 2017, 58(1), E9-E12.
- [22] Grandmann, C.: Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin. *Med Hist.*, 2001, 45(1), 1-32.
- [23] World Health Organisation: *Global tuberculosis report 2016* [online]. Geneva: World Health Organisation, 2016. [cit. 2017-03-25]. Dostupné na: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23098en/s23098en.pdf>
- [24] Zumla, A., Raviglione, M., Hafner, R., *et al.*: Tuberculosis. *N Eng J Med.*, 2013, 368(8), 745-755.
- [25] Gideon, H. P., Flynn, J. L.: Latent tuberculosis: what the host "sees"? *Immunol Res.*, 2011, 50(2-3), 202-212.

- [26] Gambhir, S., Ravina, M., Rangan, K., *et al.*: Imaging in extrapulmonary tuberculosis. *Int J Infect Dis.*, 2017, 56, 237-247.
- [27] Nayak, S., Acharjya, B.: Mantoux test and his interpretation. *Indian Dermatol Online J.*, 2012, 3(1), 2-6.
- [28] Fogel, N.: Tuberculosis: a disease without boundaries. *Tuberculosis*, 2015, 95(5), 527-531.
- [29] Ministerstvo zdravotnictví ČR: *Český lékopis 2009, 1.díl*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. 835-836. ISBN 978-80-247-2994-7.
- [30] Iqbal, N. T., Hussain, R.: Non-specific immunity of BCG vaccine: a perspective of BCG immunotherapy. *Trials Vaccinol.*, 2014, 3, 143-149.
- [31] Behr, M. A., Small, P. M.: A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine*, 1999, 17(7-8), 915-922.
- [32] Moliva, J. I., Turner, J., Torrelles, J. B.: Prospects in *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette et Guérin (BCG) vaccine diversity and delivery: Why does BCG fail to protect against tuberculosis?. *Vaccine*, 2015, 33(39), 5035-5041.
- [33] Oettinger, T., Jørgensen, M., Ladefoged, A., *et al.*: Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tuber Lung Dis.*, 1999, 79(4), 243-250.
- [34] Luca, S., Mihasescu, T.: History of BCG Vaccine. *Maedica*, 2013, 8(1), 53-58.
- [35] Abdallah, A. M., Hill-Cawthorne, G. A., Otto, T. D., *et al.*: Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci Rep.*, 2015, 5, 15443.
- [36] Li, L., Qiao, D., Zhang, X., *et al.*: The immune responses of central and effector memory BCG-specific CD4<sup>+</sup> T cells in BCG-vaccinated PPD<sup>+</sup> donors were modulated by Treg cells. *Immunobiology*, 2011, 216(4), 477-484.
- [37] Svobodová, J.: Vakcinační kmen *Mycobacterium bovis* BCG a očkováno proti tuberkulóze. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 2014, 23(5), 182-182.
- [38] Perdomo, C., Zedler, U., Köhl, A. A., Lozza, L., Saikali, P., *et al.*: Mucosal BCG vaccination induces protective lung-resident memory T cell populations against tuberculosis. *MBio*, 2016, 7(6), e01686-16.
- [39] Vyhláška č. 299/2010 Sb. Ministerstva zdravotnictví ČR ze dne 25.10.2010, kterou se mění vyhláška č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem, ve znění pozdějších předpisů [online]. [cit. 2018-04-21]. Dostupné na: [https://www.mzcr.cz/obsah/vyhlaska-c299/2010-sb-\\_2464\\_5.html](https://www.mzcr.cz/obsah/vyhlaska-c299/2010-sb-_2464_5.html)

- [40] Vyhláška č. 544/2011 Z. z. Ministerstva zdravotníctva SR zo dňa 28.12.2011, ktorou sa mení a dopĺňa vyhláška Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky č. 585/2008 Z. z., ktorou sa ustanovujú podrobnosti o prevencii a kontrole prenosných ochorení v znení vyhlášky č. 273/2010 Z. z. [online]. [cit. 2018-04-21]. Dostupné na:  
<https://www.slov-lex.sk/pravne-predpisy/SK/ZZ/2011/544/20120101>
- [41] LeBien, T. W., Tedder, T. F.: B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 2008, 112(5), 1570-1580.
- [42] Cooper, M. D.: The early history of B cells. *Nat Rev Immunol.*, 2015, 15(3), 191-197.
- [43] Bemark, M.: Translating transitions - how to decipher peripheral human B cell development. *J Biomed Res.*, 2015, 29(4), 264-284.
- [44] Hoffman, W., Lakkis, F. G., Chalasani, G.: B cells, antibodies, and more. *Clin J Am Soc Nephrol.*, 2016, 11(1), 137-154.
- [45] Lund, F. E.: Cytokine-producing B lymphocytes – key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol.*, 2008, 20(3), 332-338.
- [46] Fillatreau, S.: Regulatory roles of B cells in infectious diseases. *Clin Exp Rheumatol.*, 2016, 34(4 Suppl 98), 1-5.
- [47] Zhang, X.: Regulatory functions of innate-like B cells. *Cell Mol Immunol.*, 2013, 10(2), 113-121.
- [48] Berland, R., Wortis, H. H.: Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol.*, 2002, 20, 253-300.
- [49] Shen, P., Fillatreau, S.: Antibody-independent functions of B cells: A focus on cytokines. *Nat Rev Immunol.*, 2015, 15(7), 441-451.
- [50] Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy Imunologie*. 3.vyd. Praha: Triton, 2005, 45-49, 82-85, 167-169. ISBN 80-7254-686-4.
- [51] Kročová, Z., Härtlová, A., Součková, D., *et al.*: Interaction of B cells with intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Microb Pathog.*, 2008, 45(2), 79-85.
- [52] Goenka, R., Guirnalda, P. D., Black, S. J., *et al.*: B lymphocytes provide an infection niche for intracellular bacterium *Brucella abortus*. *J Infect Dis.*, 2006, 206(1), 91-98.

- [53] Souwer, Y., Griekspoor, A., Jorritsma, T., *et al.*: B cell receptor-mediated internalization of *Salmonella*: a novel pathway for autonomous B cell activation and antibody production. *J Immunol.*, 2009, 182(12), 7473-7481.
- [54] Kubelková, K., Kročová, Z., Plzáková, L., *et al.*: The role of B cells in intracellular bacterial pathogen infection. In: Montes, R. L., Reyes, L. (eds.): *B cells: molecular biology, developmental origin and impact on the immune system*. Hauppauge (N. Y.): Nova Science Publishers, 2013, 1-44. ISBN 978-1-62808-541-9.
- [55] Achkar, J. M., Chan, J., Casadevall, A.: B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Rev.*, 2015, 264(1), 167-181.
- [56] Zuniga, J., Torres-Garcia, D., Santos-Mendoza, T., *et al.*: Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clin Dev Immunol.*, 2012, 2012, 193923.
- [57] da Silva, M. C., Lasunskaja, E. B., da Silva, W. D.: Repeated inoculations of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) are needed to induce a strong humoral immune response against antigens expressed by the bacteria. *Open J Immunol*, 2013, 3(3), 71-81.
- [58] Kozakiewicz, L., Chen, Y., Xu, J., *et al.*: B Cells regulate neutrophilia during *Mycobacterium tuberculosis* infection and BCG vaccination by modulating the interleukin-17 response. *PLoS Pathog.*, 2013, 9(7), e1003472.
- [59] Brown, R. M., Cruz, O., Brennan, M., *et al.*: Lipoarabinomannan-reactive human secretory immunoglobulin A responses induced by mucosal Bacille Calmette-Guérin vaccination. *J Infect Dis.*, 2003, 187(3), 513-517.
- [60] Sebina, I., Cliff, J. M., Smith, S. G., *et al.*: Long-lived memory B-cell responses following BCG vaccination. *PLoS One*, 2012, 7(12), e51381.
- [61] Russo, R. T., Mariano, M.: B-1 cell protective role in murine primary *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin infection. *Immunobiology*, 2010, 215(12), 1005-1014.
- [62] Treanor, B.: B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology*, 2012, 136(1), 21-27.
- [63] Pike, K. A., Ratcliffe, M. J. H.: Cell surface immunoglobulin receptors in B cell development. *Semin Immunol.*, 2002, 14(5), 351-358.

- [64] Adaptive Immune Response [online]. [cit. 2018-01-27]. Dostupné na: <https://courses.lumenlearning.com/boundless-biology/chapter/adaptive-immune-response/>
- [65] Woof, J. M., Burton, D. R.: Human antibody – Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat Rev Immunol.*, 2004, 4(2), 89-99.
- [66] Akula, S., Mohammadamin, S., Hellman L.: Fc receptors for immunoglobulins and heir appearance during vertebrate evolution. *PLoS One*, 2014, 9(5), e96903.
- [67] Holers, V. M.: Complement and its receptors: new insights into human disease. *Annu Rev Immunol.*, 2014, 32, 433-459.
- [68] Helmy, K. Y., Katschke, K. J., Gorgani, N. N., *et al.*: CRiG: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell*, 2006, 124(5), 915-927.
- [69] Mittag, A., Tárnok, A.: Basics of standardization and calibration in cytometry – a review. *J Biophotoics*, 2009, 2(8-9), 470-481.
- [70] Wilkerson, M. J.: Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, 2012, 42(1), 53-71.
- [71] Marinov, I.: *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Praha: Triton, 2008, 21-29. ISBN 978-80-7387-143-7.
- [72] Macey, M. G.: Principles of flow cytometry. In: Macey, M. G. (ed.): *Flow cytometry: principles and applications*. Totowa (N.Y.): Humana Press, 2007, 1-15. ISBN 978-1-58829-691-7.
- [73] Filters for flow cytometry [online]. [cit. 2017-03-28]. Pevzaté z: <https://www.semrock.com/flow-cytometry.aspx>
- [74] Raveche, E., Abbasi, F., Youan, Y., *et al.*: Introduction to flow cytometry. In: Litwin, V., Marder, P. (eds.): *Flow cytometry in drug discovery and development*. Hoboken (N. J.): Wiley, 2011, 3-11. ISBN 978-0-470-43356-0.
- [75] Reggeti, F., Bienzle, D.: Flow cytometry in veterinary oncology. *Vet Pathol.*, 2011, 48(1), 223-235.
- [76] Givan, A. L.: Flow cytometry: an introduction. In: Hawley, T. S., Hawley, R. G. (eds.): *Flow cytometry protocols*, 2nd ed. Methods Mol Biol., 263. Totowa (N. J.): Humana Press, 2004, 1-32, ISBN 1-58829-234-7.
- [77] Snow, Ch.: Flow cytometer electronics. *Cytometry A*, 2004, 57(2), 63-69.

- [78] Ormerod, M. G.: *Flow cytometry – a basic introduction*. Chapter 3: Fluorescence & fluorochromes [online]. [cit. 2018-02-18]. Dostupné na: <http://flowbook.denovosoftware.com/chapter-3-fluorescence-fluorochromes>
- [79] McCarthy, D. A.: Fluorochromes and fluorescence. In: Macey, M. G. (ed.): *Flow cytometry: principles and applications*. Totowa (N. J.): Humana Press, 2007, 59-112, ISBN 978-1-58829-691-7.
- [80] Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., *et al.*: Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol.*, 2017, 37(2), 163-176.
- [81] McCarthy, D. A.: Cell preparation. In: Macey, M. G. (ed.): *Flow cytometry: principles and applications*. Totowa (N. J.): Humana Press, 2007, 49-50, ISBN 978-1-58829-691-7.
- [82] Telford, W. G.: Near infrared lases in flow cytometry. *Methods*, 2015, 82, 12-20.
- [83] Hulspas, R., Dombkowski, D., Preffer, F., *et al.*: Flow cytometry and the stability of phycoerythrin-tandem dye conjugates. *Cytometry A*, 2009, 75(11), 966-972.
- [84] Leavesley, S. J., Britain, A. L., Cichon, L. K., *et al.*: Assessing FRET using spectral techniques. *Cytometry A*, 2013, 83(10), 898-912.
- [85] Shi, L., Günther, S., Hübschmann, T., *et al.*: Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry A*, 2007, 71(8), 592-598.
- [86] DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole) [online]. [cit. 2017-12-30]. Dostupné na: <http://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/dapi-stain.html>
- [87] Ethidium bromide staining [online]. [cit. 2017-12-30]. Dostupné na: <https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/ethidium-bromide-staining>
- [88] Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S., *et al.*: Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev.*, 2010, 90(3), 1103-1163.
- [89] Luo, Y., Szilvasi, A., Chen, X., *et al.*: A novel method for monitoring *Mycobacterium bovis* BCG trafficking with recombinant BCG expressing green fluorescent protein. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 1996, 3(6), 761-768.
- [90] Kremers, G., Gilbert, S. G., Cranfill, P. J., *et al.*: Fluorescent proteins at a glance. *J Cell Sci.*, 2011, 124, 157-160.

- [91] Johnson, L. V., Walsh, M. L, Chen, L. B.: Localisation of mitochondria in living cells with rhodamin 123. *Proc Natl Acad Sci.*, 1980, 77 (2), 990-994.
- [92] Johnson, L. V., Walsh, M. L, Bockus, B. J., *et al.*: Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J Cell Biol.*, 1981, 88(3), 526-535.
- [93] Stewart, C. C., Stewart, S. J.: Multiparameter data acquisition and analysis of leukocytes. In: Hawley, T. S., Hawley, R. G. (eds.): *Flow cytometry protocols*, 2nd ed. Methods Mol Biol., 263. Totowa (N. J.): Humana Press, 2004, 45-66, ISBN 1-58829-234-7.
- [94] Haron, J.: Flow cytometry and cell sorting: a practical guide [online]. *Mater Metods*, 2013, 3, 165. [cit. 2017-04-23]. Dostupné na: <https://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-and-Cell-Sorting-A-Practical-Guide.html>
- [95] Hrušák, O.: Průtoková cytometrie. In: Bartůňková, J., Paulík, M., Holzelová, E., *et al.*: *Vyšetřovací metody v imunologii*. 1.vyd. Praha: GRADA, 2005, 69, ISBN 80-247-0691-1.
- [96] Roubalová, L.: Průtoková cytometrie. *Bulletin FONS*, 2012, 22(2), 5-9.
- [97] Flow cytometry [online]. [cit. 2017-07-24]. Dostupné na: [http://www.appliedcytometry.com/flow\\_cytometry.php](http://www.appliedcytometry.com/flow_cytometry.php)
- [98] Brown, M., Wittwer, C.: Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem.*, 2000, 46(8 Pt 2), 1221-1229.
- [99] Colony Forming Units Assay [online]. [cit. 2017-04-13]. Dostupné na: <http://www.openwetware.org/wiki/IGEM:IMPERIAL/2009/M3/Assays/ColonyFormingUnits>
- [100] Zhu, Q., Zhang, M., Shi, M., *et al.*: Human B cells have an active phagocytic capability and undergo immune activation upon phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiology*, 2016, 221(4), 558-567.
- [101] Plzáková, L., Kročová, Z., Kubelková, K., *et al.*: Entry of *Francisella tularensis* into murine B cells: the role of B cell receptors and complement receptors. *PLoS One*, 2015, 10(7), e0132571.
- [102] Plzáková, L., Kubelková, K., Kročová, Z., *et al.*: B cell subsets are activated and produce cytokines during early phases of *Francisella tularensis* LVS infection. *Microb Pathog.*, 2014, 75, 49-58.



- [103] García-Pérez, B. E., de la Cruz-López, J. J., Castañeda-Sánchez, J. I., *et al.*: Macropinocytosis is responsible for the uptake of pathogenic and non-pathogenic mycobacteria by B lymphocytes (Raji cells). *BMC Microbiol.*, 2012, 12, 246.
- [104] Parra, D., Rieger, A. M., Li, J., *et al.*: Pivotal Advance: peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4<sup>+</sup> T cells. *J Leukoc Biol.*, 2012, 91(4), 525-536.
- [105] Ernst, J. D.: Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.*, 1998, 66(4), 1277-1281.
- [106] Carroll, M. V., Lack, N., Sim, E., *et al.*: Multiple routes of complement activation by *Mycobacterium bovis* BCG. *Mol Immunol.*, 2009, 46(16), 3367-3378.
- [107] van Noesel, C. J. M., Lankester, A. C., van Lier, R. A. W.: Dual antigen recognition by B cell. *Immunol Today*, 1993, 14(1), 8-11.