



# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

## Toll-like receptory v toxicitě vodního květu

AUTOR            Martin Flora  
ŠKOLA            Gymnázium Brno, třída kpt. Jaroše  
KRAJ              Jihomoravský  
OBOR              8. Ochrana a tvorba životního prostředí

Toll-like receptory v toxicitě vodního květu

TOLL-LIKE RECEPTORS IN TOXICITY OF WATERBLOOM

AUTOR	Martin Flora
ŠKOLA	Gymnázium Brno, třída kpt. Jaroše
KRAJ	Jihomoravský
ŠKOLITEL	RNDr. Lenka Švihálková Šindlerová, Ph.D.
OBOR	8. Ochrana a tvorba životního prostředí

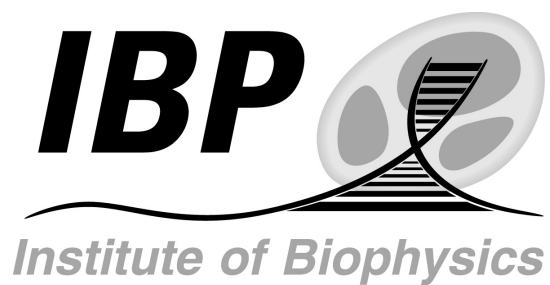
## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svou práci na téma Toll-like receptory v toxicitě vodního květu jsem vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Lenky Švihákové Šindlerové, Ph.D. a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Dále prohlašuji, že tištěná i elektronická verze práce SOČ jsou shodné a nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne 17. 2. 2017

Podpis:



Chtěl bych na tomto místě vyjádřit velký dík RNDr. Lence Švihálkové Šindlerové Ph.D. za její trpělivé vedení mé práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Hance Vereščákové, Ph.D., Mgr. Báře Ambrůzové a Mirně Velki, Ph.D. za jejich ochotné provedení jednotlivými metodami.

Tato práce byla provedena za finanční podpory Jihomoravského kraje.

## **Anotace**

Kontaminace pitné vody sinicovým vodním květem, stejně jako jeho výskyt na vodních plochách sloužících k rekreačním účelům je významným problémem nejen v České republice, ale po celém světě. Expozice osob kontaminované vodě u nich vyvolává různé, i velmi závažné zdravotní problémy. Jedním z nich je rozvoj střevních zánětů. Tato práce se věnuje studiu mechanismu, který za tímto efektem stojí. Vzhledem k tomu, že sinice obsahují v buněčné stěně endotoxin LPS podobně jako patogenní bakterie (např. *E. coli*), máme za to, že tato molekula může být ligandem Toll-like receptoru 4 (TLR4) a spouštět signální dráhu související s tímto receptorem. Proto jsme studovali na epiteliálních střevních buňkách Caco-2 potenciál LPS z vodního květu získaného z environmentálního vzorku aktivovat prozánětlivé procesy. Získané výsledky naznačují, že potenciál LPS vodního květu získaného z nádrže Nové Mlýny aktivovat buňky k produkci zánětlivého markeru IL-8 je srovnatelný nebo vyšší než u známých patogenních bakterií. Zároveň se ukazuje, že mechanismus účinku souvisí s aktivací TLR4. Další bližší studium mechanismu působení sinicového LPS pomůže k přesnějšímu hodnocení rizik spojených s expozicí.

## **Klíčová slova**

Sinice; LPS; střevní zánět; Toll-like receptor; interleukin 8

## **Annotation**

Cyanobacterial water bloom contamination of drinking water as well as its presence in recreational water bodies is a big problem not only in the Czech Republic but worldwide. Contaminated water exposure results in different, sometimes severe, health problems in humans. Intestinal inflammation is one of the frequent but not studied ones. This work is aimed to study mechanism of this effect. It is known that cyanobacteria have endotoxin LPS in their cell wall similarly to pathogenic bacteria (e.g. *E. coli*). Therefore we hypothesise that this molecule can be ligand of Toll-like receptor 4 (TLR4) similarly to LPS of *E. coli* and that activation of the signalling pathway of this receptor is the mechanism we are looking for. Caco-2 intestinal epithelial cells were used to study potential of Nové Mlýny water bloom LPS to activate them and make them release pro-inflammatory cytokine IL-8. Our results show that this environmentally relevant sample of water bloom LPS is able to activate Caco-2 cells in the same or higher level as LPS from pathogenic bacteria. Simultaneously, the mechanism seems to be connected with activation of TLR4. Further studies will shed light on health risks connected with water bloom exposure.

## **Keywords**

Cyanobacteria; LPS; intestinal inflammation; Toll-like receptor; interleukin 8

# Obsah

<b>ÚVOD.....</b>	<b>6</b>
<b>1. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>7</b>
1.1 VODNÍ KVĚT.....	7
1.1.1. Charakteristika.....	7
1.1.2. Výskyt.....	7
1.1.3. Důvody vzniku.....	7
1.1.4. Metody odstranění.....	7
1.1.5. Riziko pro ekosystém a člověka.....	8
1.2. TOLL-LIKE RECEPTORY.....	8
1.2.1. Uvedení.....	8
1.2.2. Charakteristika.....	8
1.2.3. Signalizace.....	9
1.2.4. TLR 4 a TLR 2.....	10
<b>2. METODY.....</b>	<b>11</b>
2.1. WESTERN BLOTTING.....	11
2.1.1. Příprava vzorků.....	11
2.1.2. Příprava gelů.....	11
2.1.3. SDS-PAGE Elektroforéza.....	11
2.1.4. Blotting.....	11
2.1.5. Blokování.....	12
2.1.6. Vyhodnocení.....	12
2.2. ELISA.....	12
2.2.1. Postup.....	12
2.2.2. Vyhodnocení.....	13
2.3. ATP.....	13
2.4. LDH.....	13
<b>3. VÝSLEDKY.....</b>	<b>14</b>
<b>4. DISKUZE.....</b>	<b>18</b>
<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>20</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>21</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>22</b>

# Úvod

Jedním z rozšířených problémů životního prostředí je kontaminace povrchových vod vodním květem. Expozice vodnímu květu může vést ke zdravotním potížím exponovaných osob. Znamé jsou např. kožní reakce, ale velmi častým negativním efektem je rozvoj střevního zánětu. Mechanismus, kterým je spouštěn, však není dosud popsán.

Hlavní složkou vodního květu jsou sinice. Tyto autotrofní gramnegativní bakterie produkují toxické látky a zároveň je součástí jejich buněčné stěny endotoxin lipopolysacharid (LPS). Tato látka se vyskytuje u všech gramnegativních bakterií včetně patogenních. Je známo, že LPS některých patogenních kmenů bakterií je ligandem Toll-like receptoru (TLR) 4 a spouští zánětlivou reakci, která může vést až k sepsi.

Na základě těchto informací se domníváme, že interakce sinicového LPS s TLR se může podílet na rozvoji zánětu střevních buněk po expozici vodnímu květu.

Cílem této práce je zavést *in vitro* model střevních buněk, který umožní studovat prozánětlivé efekty sinicového LPS a na tomto modelu ověřit účinek LPS vzorku získaného ze životního prostředí.

K tomuto účelu poslouží buněčná linie Caco-2 odvozená od adenomu tlustého střeva. Jako marker prozánětlivých procesů bude sledována produkce interleukinu (IL) 8, cytokinu, který je produkován střevními buňkami v odpovědi na patogenní činitele. Vhodnou metodou detekce změny koncentrace IL-8 je ELISA. Zároveň bude sledována změna exprese TLR pomocí western blottingu, jelikož po aktivaci receptoru dochází k navýšení jeho hladiny v buňce.

Tato práce bude sloužit jako podklad pro další studium vlivu vodního květu na rozvoj střevního zánětu na pracovišti BFÚ AV ČR.

# 1. Teoretická část

## 1.1 Vodní květ

### 1.1.1. Charakteristika

Vodním květem nazýváme zelený povlak vodních ploch. Je způsoben přemnožením mikroorganismů, především sinic. V ČR se jedná o častý problém, jsou však i problémem celosvětovým.

Největší rozvoj vodního květu můžeme pozorovat v letním období. Přes zimu se sinice udržují na dně nádrže, na jaře vystupují a jsou postupně rozneseny po celé vodní ploše (Adámek, 2010).

### 1.1.2. Výskyt

Sinice se nacházejí ve všech biotopech na Zemi (Závodská, 2006). Na dně některých antarktických jezer tvoří až 90cm povlaky (Kalina, Váňa 2005). Byly také nalezeny v hloubkách oceánu (75 – 125 m), kde tvoří tzv. pikoplankton. Jedná se o kokální sinice rodu *Synechococcus*, *Prochlorococcus* a některé eukaryontní řasy (Kalina, Váňa 2005).

### 1.1.3. Důvody vzniku

Hlavní příčinou vzniku vodních květů je eutrofizace vody (nadměrné množství živin ve vodě). Hlavní roli zde má fosfor a dusík. Jsou součástí rybního krmiva přidávaného do vody. Jsou také součástí nedostatečně pročištěných splaškových vod a zemědělských hnojiv, které se mohou vlivem deště či povodní spláchnout do vodstva. To bývá podpořeno nedostatečnou retencí půdy nebo její erozí (Adámek, 2010).

### 1.1.4. Metody odstranění

Nejúčinnější je v tomto ohledu prevence znečištění vody živinami z externích zdrojů. Tomu lze zabránit např. zvýšením retence vody okolní krajinou, nastavením mechanických zábran nebo výběrem krmiva.

Jestliže je již vodní plocha kontaminována, lze přistoupit k redukci živin pro sinice zásadních, například fosforu.

Další metodou je tzn. destratifikace nádrže. Sinice mají konkurenční výhodu oproti jiným organismům tím, že mohou měnit svou polohu v různé výšce ve vodním sloupci pomocí aerotopů, plynových měchýřků. Díky nim se mohou přesouvat do pro ně výhodné vrstvy vodního sloupce. Díky promíchávání vodního sloupce tuto výhodu sinice ztrácí, a dostávají tak prostor zelené řasy (Adámek, 2010). Dále lze vodní plochu ošetřit ultrazvukem, který ničí aerotopy sinic.

Lze také využít látek pro sinice toxických, cyanocidů. Tyto dělíme na algicidy a cyanostatika.

Cyanostatika udržují množství sinic v nádrži. Nehodí se pro odstranění již rozvinutého květu, ale slouží jako prevence vzniku vodního květu.



Algicidy na rozdíl od cyanostatik sinice přímo usmrcují. Jejich užití je ovšem problematické. Obsah usmrčené buňky spolu s cyanotoxiny se uvolní do okolí a vlivem mikrobiálních rozkladů se u dna tvoří anoxické zóny (Adámek, 2010). Také je třeba upravit dávku konkrétního přípravku tak, aby nebyl toxický pro jiné organismy.

Nejefektivnější zásah proti vodnímu květu je na jeho počátku. Sinice více přijímají okolní látky a po zimě jsou zesláblé.

### **1.1.5. Riziko pro ekosystém a člověka**

Vodní květy představují významné zdravotní riziko, ať už pro rekreanty, či pro celý ekosystém. Již minimální vystavení rekreantů kanadských jezer kontaminované vodě vyvolalo gastrointestinální problémy (Levesque et al., 2014). Také v Austrálii studie s 852 účastníky ukázala zvýšenou frekvenci kožních vyrážek, horeček, průjmů, zvracení a syndromů chřipky během 2 – 7 dnů po expozici kontaminovanou vodou (Pilotto et al., 1997). Intenzita a četnost symptomů se přitom významně zvyšovala v souvislosti s délkou koupání a vystavení vodnímu květu. Byly nalezeny sinice rodu *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* a *Nodularia*. Mimo potíží s rekreací byl zaznamenán případ přímého kontaktu s vodním květem, kdy mladík nešťastnou náhodou spadl do jezera kontaminovaného sinicemi rodu *Microcystis*. Po 4 hodinách od expozice nastala nevolnost a horečka. Po 3 dnech nastaly respirační potíže, dyspnoe a atypická pneumonie, byly také zjištěny markery poškození jater. Kompletní rekonvalescence mladíka trvala 20 dní (Gianuzzi et al., 2011). Toxiny sinic mohou mít také negativní vliv na raná vývojová stadia ryb. Zvyšují mortalitu rybích a larválních plůdků a množství malformovaných jedinců. Snižují také velikost plůdků a svou toxicitou snižují biodiverzitu ve vodním tělese (Palíková et al., 2009).

Člověka jako konzumenta ryb neohrožují (Palíková et al., 2009), nicméně zůstává rizikovým přímý kontakt – provozování vodních sportů či plavání, kdy může jedinec omylem polknout kontaminovanou vodu.

U některých jedinců se vyskytne jen vyrážka, mohou však nastat vážné zdravotní komplikace ohrožující život jedince. (Teixeira et al., 1993)

## **1.2. Toll-like receptory**

### **1.2.1. Uvedení**

Stavbou a funkcí se podobají již dříve známému receptoru toll, který ovlivňuje vývoj plodu u octomilky (*Drosophila melanogaster*) a zároveň zastává funkci v jejím imunitním systému. Objev tohoto receptoru vyvolal diskuzi o možnosti výskytu podobných receptorů i u savců, což se nakonec potvrdilo a ocenilo Nobelovou cenou v roce 2011 (Hořejší, 2004).

### **1.2.2. Charakteristika**

Toll-like receptory jsou vysoce konzervované struktury mající důležitou úlohu v imunitní odpovědi organismu. Rozeznávají jak patogeny a jejich stavební prvky (bičík, buněčná stěna,...), tak i tělu vlastní látky spojené s nebezpečím. Jejich aktivací se spouštějí prozánětlivé procesy, všechny aktivují nukleární faktor NF- $\kappa$ B, který reguluje expresi genů ovládajících průběh zánětu.

Vyskytují se především na endoteliálních buňkách, epiteliálních buňkách a leukocytech. U člověka rozeznáváme 10 funkčních typů – TLR 1-10. Gen pro TLR 11 u člověka kóduje nefunkční protein.

TLR jsou v rámci buňky umístěny buď na plazmatické membráně (TLR 1,2,4,5,6,10) nebo na membráně vnitrobuněčných vezikulů (TLR 3,7,8,9). Aktivované receptory většinou vytvářejí homodimery, TLR2 však tvoří heterodimery s TLR1 nebo TLR6.

### 1.2.3. Signalizace

TLR receptory využívají 2 signálních drah. Tou hlavní, kanonickou, s rychlejší aktivací je dráha zahrnující adaptérový protein MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88). Tato dráha je spouštěna aktivací všech TLR kromě TLR3. Její zapnutí vede k aktivaci NF- $\kappa$ B a/nebo kináz z rodiny MAPK (mitogen-activated protein kinase) a následné změně genové exprese vedoucí k produkci prozánětlivých molekul (např. IL-8, IL-6, TNF $\alpha$  a dalších).

Nekanonickou dráhu nezávislou na proteinu MyD88 využívá TLR3 a TLR4, který je jediným z rodiny TLR schopným aktivovat oba typy drah. Součástí této dráhy je aktivace IRF (interferon regulatory factor) 3 nebo 7 a následně ke změně genové exprese proteinů typu interferon.

Aktivace TLR tedy vede k rozvoji zánětu. Agonisty neboli ligandy receptorů jsou různé látky, výčet těch nejznámějších je v Tab. 1.

TLR	ligandy
TLR1/TLR2	triacylované lipopeptidy
TLR2	HMGB1 LPS
TLR3	dsRNA
TLR4	LPS
TLR5	flagelin
TLR6/TLR2	diacylované lipopeptidy
TLR7	ssRNA
TLR8	ssRNA
TLR9	CpG-DNA
TLR10	neznámý

Tab. 1 : Toll-like receptory a jejich hlavní agonisté. Upraveno podle: (Aken 2013)

#### **1.2.4. TLR 4 a TLR 2**

TLR4 s navázaným MD2 (TLR4/MD2 komplex) je receptor schopný spustit imunitní reakci vůči LPS. Monomer LPS se váže na molekulu LBP (LPS-binding protein), je donesen k CD14 a následně transportován ke komplexu MD2-TLR4. Váže se k MD-2, čímž dochází k aktivaci receptoru a jeho následné homodimerizaci s dalším komplexem LPS-MD2-TLR4 a spuštění signální dráhy.

TLR2 ve formě homodimeru je taktéž schopen rozeznat LPS a spustit vůči němu imunitní reakci. Narozdíl od TLR4 je ovšem schopen spustit pouze kanonickou dráhu zahrnující MyD88.

## 2. Metody

### 2.1. Western blotting

#### 2.1.1. Příprava vzorků

Buňky kultivujeme ve 24 jamkových deskách. Před lýzou buňky opláchneme roztokem PBS (1ml na jamku), roztok PBS pečlivě odsajeme a buňky zamrazíme „na sucho“ na -80°C na několik hodin. Ihned po vytažení desky z mrazáku k buňkám přidáme SDS lyzační roztok. Zlyzované buňky setřeme z každé jamky škrabkou a přeneseme automatickou pipetou do eppendorfových zkumavek. Vzorky vaříme 15 min. při 100°C. Po povaření vzorky krátce spinujeme a přidáme Leammliho roztok (na 100μl vzorku 25μl Leammlí pufu).

#### 2.1.2. Příprava gelů

Připravíme si potřeby na nalévání gelů. 2 gely připravíme podle následující tabulky:

Látka	Rozdělovací gel	Hřebínkový gel
Destilovaná voda (ml)	6	5
TRIS 1.5 M pH 8.8 (ml)	3,8	x
TRIS 0.5 M pH 6.8 (ml)	x	2,1
Akrylamid-bis 30% (ml)	5	1,5
SDS 10% (ml)	0,9	0,7
TEMED (μl)	45	45
APS (μl)	100	100

Tab. 2 : Příprava gelů.

#### 2.1.3. SDS-PAGE Elektroforéza

Gely umístíme do aparatury a zalejeme je runnig buffrem po rysku vyznačenou na nádobě. Prostor mezi gely taktéž zalejeme. Do jednotlivých jamek v hřebínkovém gelu aplikujeme vzorky včetně standardu. Nasadíme vrchní kryt se zapojenými elektrodami a zapneme přístroj na 180V na 1 hodinu. Poté čekáme, až se proteiny rozdělí.

#### 2.1.4. Blotting

Nyní je třeba přenést proteiny z gelu na membránu. Zařízení otevřeme. Funguje na principu dvou velkých elektrod. Nejprve umístíme spodní filtrační papíry namočené v transfer pufu. Na ně položíme membrány, které jsme předtím aktivovali v methanolu. Válečkem odstraníme veškeré vzniklé bubliny. Na membrány dáme opatrně gely, opět odstraníme bubliny. Nakonec zakryjeme horními filtračními papíry a připevníme horní díl zařízení. Celý díl zasuneme do stojanu a zvolíme standardní hodinový program.

### **2.1.5. Blokování**

Po ukončení blotování vysuneme díl a zkontrolujeme, zda se vzorky úspěšně přeblotovaly na membránu (podle přítomnosti standardu na membráně). Membrány vložíme do 5% odtučněného mléka (mléko je použito jako blokovací roztok nespecifických vazebných míst membrány) a necháme za stálého míchání 1 hodinu blokovat.

Po blokování vložíme membrány do roztoku primární protilátky – je shodný s blokovacím, ale má přídavek azidu. Ten zajišťuje delší životnost protilátky svými pro mikroorganismy toxickými vlastnostmi.

Mléko zablokovalo veškerá prázdná vazebná místa membrány, tudíž se protilátka může navázat pouze na specifický protein. Necháme membrány inkubovat přes noc při 4°C.

Po noční inkubaci membrány 3krát na 15 minut opláchneme v TBS-T.

Po přemytí vložíme membrány do sekundární protilátky a inkubujeme je 1 hodinu. Posléze znovu membrány 3krát na 15 minut opláchneme v TBS-T. Tímto zajistíme, že na membráně je přítomna pouze taková sekundární protilátka, která je vázána na primární protilátku. V opačném případě by při chemiluminiscenčním vyvolání svítla celá membrána.

### **2.1.6. Vyhodnocení**

Vyhodnocení probíhá v temné komoře. Membránu inkubujeme se substrátem, který v reakci s křenuvou peroxidázou navázanou na sekundární protilátku produkuje chemiluminiscenci. Tu zachytíme na fotografický film, který následně vyvoláme standardním postupem vložením do vývojky a následně do ustalovače. Intenzita signálu je následně hodnocena pomocí programu ImageJ jako optická denzita a následně vynesena do grafu a hodnocena statistickými metodami.

## **2.2. ELISA**

ELISA (anglicky enzyme-linked immuno sorbent assay) je metoda umožňující kvantitativně změřit přítomnost specifické látky. V práci byla využita sendvičová ELISA.

Sendvičová se nazývá proto, že látka je navázána mezi 2 protilátky jako sendvič. Pro promývání desky byla použita promývačka.

### **2.2.1. Postup**

Na 96ti jamkovou desku aplikujeme primární protilátku a necháme přes noc inkubovat při 4°C. Po inkubaci desku necháme 3krát promýt Wash Bufferem. Blokujeme nespecifická vazebná místa po 1 hodinu. Připravíme si roztok standardu. Do 1. jamky pipetujeme 100 µl standardu. Do 2. až 7. jamky vyředíme standard ve dvojkové koncentrační řadě tak, že objem v jamkách je 100 µl. Poslední jamka slouží jako kontrola pozadí, tzv. Blank, a je v ní diluční roztok, kterým je standard naředěný. Do ostatních jamek v desce napipetujeme vzorek ve stejném objemu jako standard. Necháme 2 hodiny inkubovat, veškerý přítomný antigen se naváže na primární protilátku. Jamky 3krát promyjeme a aplikujeme sekundární protilátku, která se naváže na antigen. Necháme 3krát promýt. Přidáme protilátku s křenuvou peroxidázou, která se naváže na sekundární protilátku. Necháme 3krát promýt.

### **2.2.2. Vyhodnocení**

Přidáme reagent a pozorujeme, jak se vyvíjí modré zbarvení. Necháme desku cca. 15 minut inkubovat. Poté reakci zastavíme přidáním 50 ul 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tím vznikne žluté zbarvení. Desku vložíme do spektrofotometru a měříme při vlnové délce 570 nm.

### **2.3. ATP**

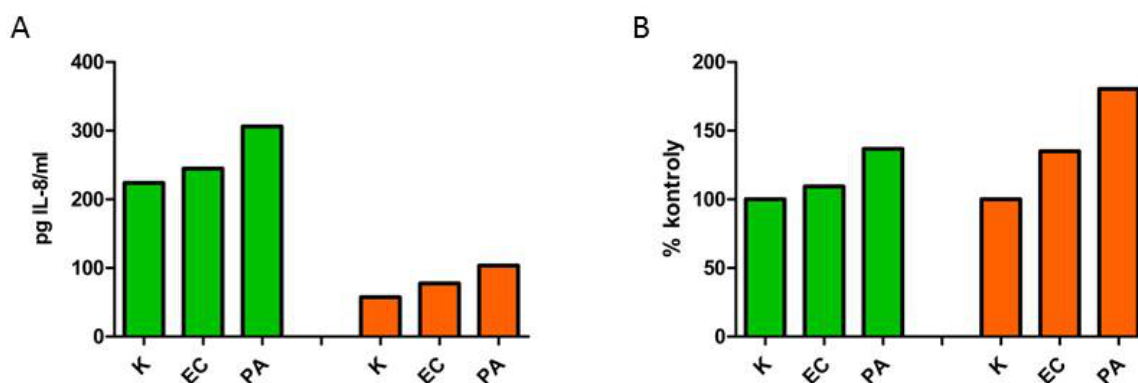
Molekula ATP (zkr. adenosintrifosfát) slouží jako zdroj energie pro buněčné procesy. Metoda ATP umožňuje zjistit životaschopnost buněk pomocí stanovení množství ATP přidáním enzymu luciferázy k buňkám, který díky energii z ATP začne produkovat světlo. Produkované světlo se dále měří pomocí luminometru.

### **2.4. LDH**

LDH je enzym, který se uvolňuje do okolí v případě buněčné smrti. Test je založen na detekci enzymatické reakce, kdy uvolněná LDH katalyzuje konverzi substrátu laktátu na pyruvát. Během této reakce dochází k redukci NAD<sup>+</sup> na NADH<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Ten se následně podílí na reakci, kdy se tetrazoliová sůl INT mění na barevný formazan. Jeho koncentrace v médiu je pak měřena pomocí spektrofotometru při vlnové délce 490 nm.

### 3. Výsledky

Nejprve byl zaveden model epiteliálních střevních buněk Caco-2. Buňky byly vysety v hustotě 20 tis. buněk/cm<sup>2</sup> a ponechány 24 hod. v inkubátoru. Poté bylo části buněk vyměněno médium a části ponecháno původní. Dále byly buňky exponovány modelovým LPS původem z *Escherichia coli* (EC) a *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Tato LPS aktivují TLR4 a výsledkem je produkce cytokinu IL-8 do média. Po 24 hod. expozice bylo médium odebráno a byla v něm pomocí ELISA zjištěna koncentrace IL-8. Jak je vidět na Obr. 1, v případě výměny média byla celková koncentrace IL-8 v médiu výrazně nižší a při přepočtu na % kontroly byla metoda citlivější. Pro další experimenty bylo tedy médium před treatmentem vyměněno.

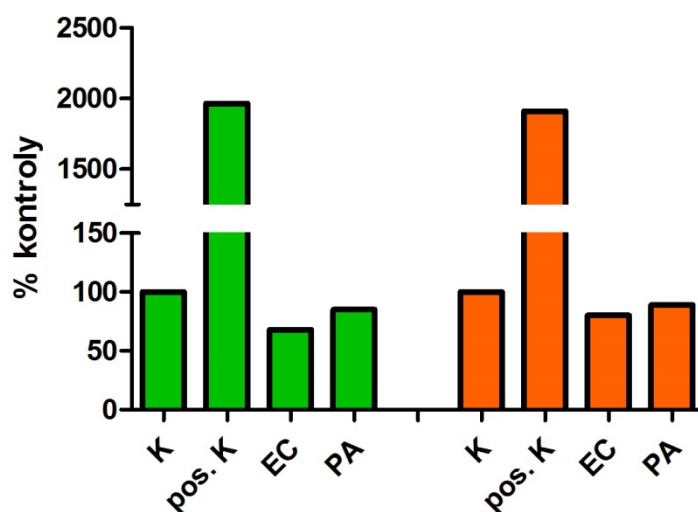


Obr. 1 Koncentrace IL-8 v médiu po expozici LPS *E. coli* a *P. aeruginosa* s výměnou (oranžové sloupečky) a bez výměny (zelené sloupečky) média.

A/ Celková koncentrace IL-8 v médiu.

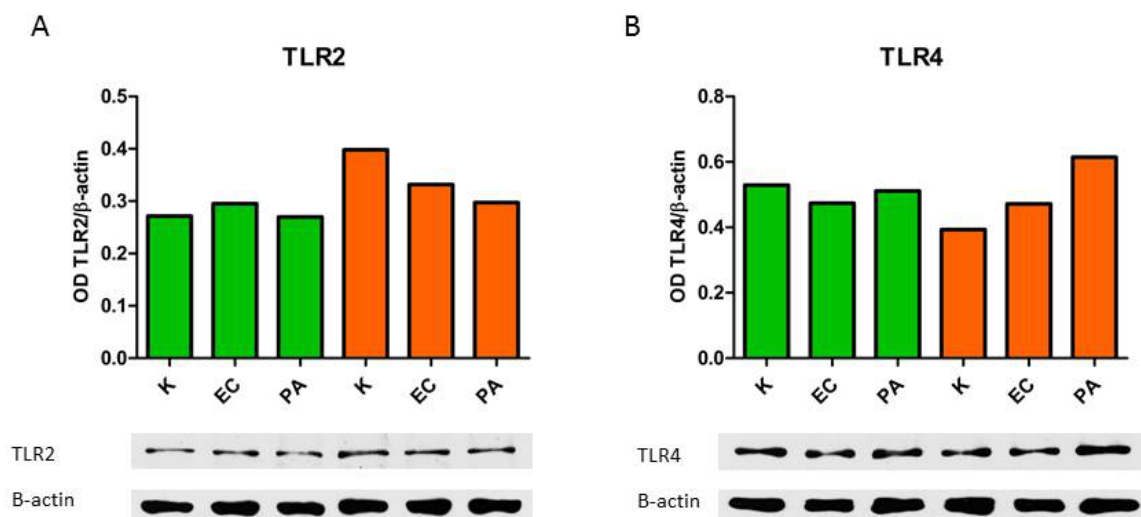
B/ Přepočet na kontrolu - v % kontroly.

Pomocí LDH testu byla zhodnocena toxicita používaných koncentrací modelových LPS. Jak je vidět z Obr. 2, použité koncentrace LPS nebyly toxické ani v jednom z použitých designů experimentu.



Obr. 2 LDH test toxicity po expozici buněk LPS *E. coli* a *P. aeruginosa* s výměnou (oranžové sloupečky) a bez výměny (zelené sloupečky) média. Pozitivní kontrola (pos. K) jsou buňky zlyzované pomocí lyzačního roztoku dodávaného s kitem a demonstrující maximální množství laktátu uvolněného do média při použitém množství buněk.

Dále byly u buněk detekovány proteiny TLR2 a TLR4 pomocí western blottingu. Buňky v našem systému exprimují receptory, které nás zajímají, a model je tedy vhodný pro studium, pro které byl vybrán (Obr. 3).

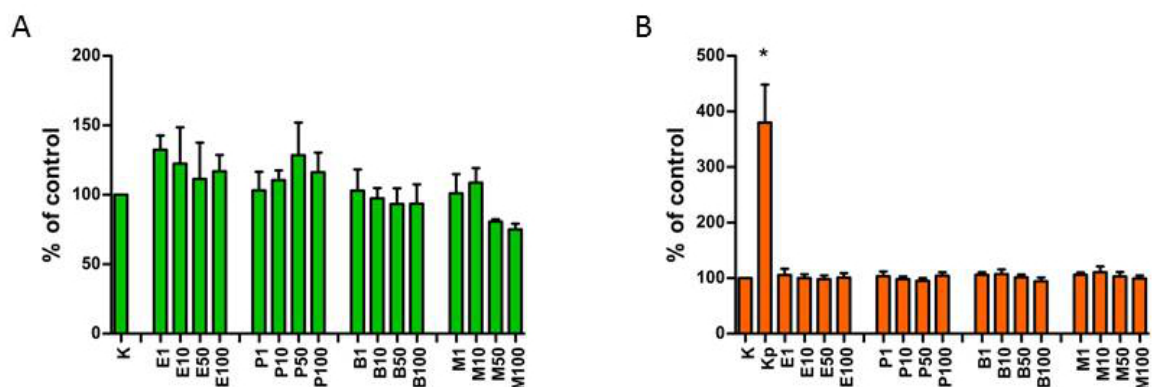


Obr. 3 Expresa proteinu TLR2 a TLR4 pod vlivem expozice LPS *E. coli* (EC) a *P. aeruginosa* (PA) pomocí western blottingu. Míra exprese je vyjádřena jako poměr optické density pro jednotlivé proteiny a housekeepingový protein β-actin.



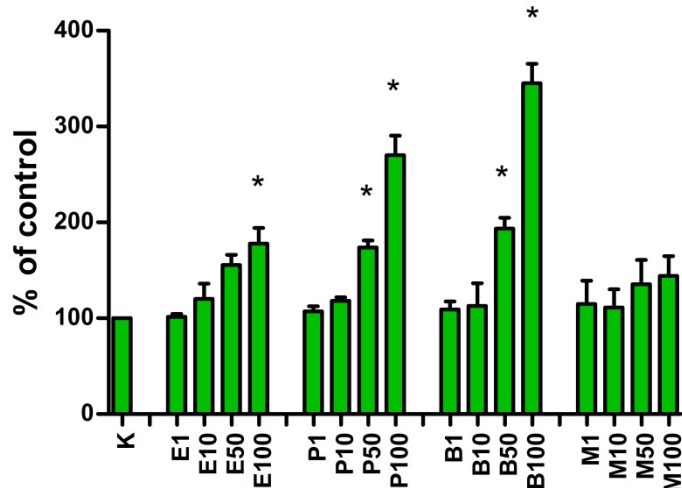
Zavedený model byl použit pro další studium. Studováno bylo LPS získané z vodního květu (WB) z nádrže Nové Mlýny. Tento vodní květ je bohatý na druh sinice *Microcystis aeruginosa*. Dále bylo použito LPS z laboratorní kultury této sinice. Jako modelové ligandy TLR byla použita LPS *E.coli* a *P. aeruginosa* jako při zavádění modelu. Pro zpracování výsledků byla použita statistická metoda ANOVA.

Nejprve byla vyhodnocena toxicita koncentrací jednotlivých LPS pomocí LDH a ATP testu. Jak je vidět na Obr. 4, žádná z použitých koncentrací ani látek nebyla pro buňky toxická.



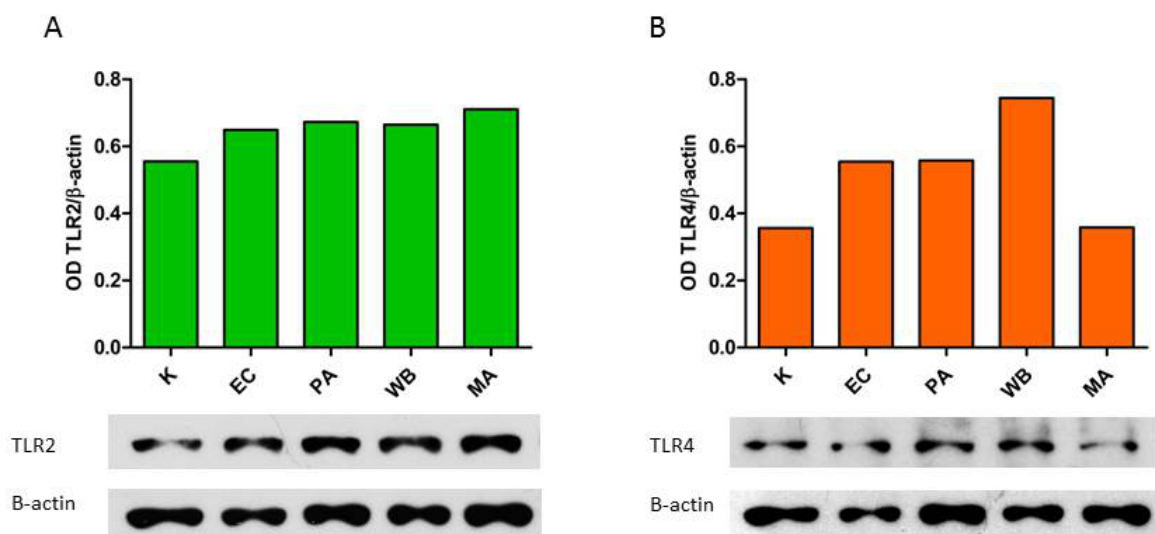
Obr. 4 Cytotoxicita použitých LPS *E. coli* (E), *P. aeruginosa* (P), vodního květu (B) a laboratorní kultury (M). A/ ATP test, B/ LDH test. Počet opakování – 3. \* označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole.

Prozánětlivé efekty LPS byly sledovány pomocí detekce koncentrace IL-8 v kultivačním médiu. Jak je možné vidět na obr. 5, LPS vodního květu aktivovalo v buňkách prozánětlivé procesy projevující se zvýšením koncentrace IL-8 v médiu, a to na úrovni pozitivního modelového ligandu. Na druhou stranu, LPS z laboratorní kultury nemělo statisticky významný vliv na produkci IL-8.



Obr. 5 Koncentrace IL-8 v médiu po expozici LPS *E. coli* (E), *P. aeruginosa* (P), vodního květu (B) a laboratorní kultury (M). Počet opakování – 3. \* označuje statisticky významný rozdíl proti kontrole.

Dále byla ověřena změna exprese TLR pomocí western blottingu. Na Obr. 6 je vidět, že expozice LPS *E. coli*, *P. aeruginosa* a vodního květu zvyšovala expresi TLR4, ale ne TLR2. LPS laboratorní kultury *M. aeruginosa* nemělo žádný vliv na sledované TLR.



Obr. 6 Exprese proteinu TLR2 a TLR4 pod vlivem expozice LPS *E. coli* (EC), *P. aeruginosa* (PA), vodního květu (WB) a laboratorní kultury *M. aeruginosa* (MA) pomocí western blottingu. Míra exprese je vyjádřena jako poměr optické density pro jednotlivé proteiny a housekeepingový protein  $\beta$ -actin.

## 4. Diskuze

Pro schopnost vodního květu vyvolávat sepsi a gastroenteritidy jsme se rozhodli zkoumat mechanismus působení sinicového LPS. V první části práce byl zaváděn model střevních buněk vhodný pro studium rozvoje zánětu. Vybrány byly buňky Caco-2. Nejprve jsme připravili design experimentu tak, abychom byli schopni sledovat vybraný marker (IL-8) s co největší citlivostí. Ukázalo se, že výměna média po 24 hodinách, tedy přímo před ovlivněním buněk studovanými látkami, výrazně zvyšuje citlivost detekce IL-8. Touto výměnou dochází k odstranění IL-8 uvolněného na základě nespecifického stresu způsobeného výsevem buněk (jejich uvolněním z podkladu, pipetováním atd.). Výrazné snížení pozadové koncentrace hledané látky zvyšuje citlivost detekce (Obr. 1). Pro další experimenty tedy bylo médium vždy před treatmentem vyměněno.

Abychom si byli jisti, že produkce IL-8 není způsobena toxicitou použitých koncentrací modelových LPS, použili jsme zároveň test uvolňování laktát dehydrogenázy do média, což je známkou umírání buněk. Použité koncentrace LPS nejsou pro použitý buněčný model toxické a proto je možno považovat pozorované prozánětlivé efekty za specifické (Obr. 2).

Dále jsme pomocí western blottingu sledovali, zda námi zvolené buňky exprimují TLR, kterými se chceme zabývat, konkrétně TLR4 a TLR2, pro které je LPS ligand.

Jak je vidět na obrázku 3, oba receptory jsou v buňkách přítomny. Na základě těchto výsledků můžeme považovat model za zavedený a připravený pro další studium.

Pro studium vlivu vodního květu na rozvoj střevního zánětu jsme vybrali vzorek LPS získaný z vodního květu v nádrži Nové Mlýny. Tento vzorek byl získán z pracoviště RECETOX na MU v Brně. Vodní květ byl z Nových Mlýnů odebrán 14. 8. 2012. Sinice zde tvoří 99,8% fytoplanktonu. Dominantním druhem sinice v tomto vzorku je *Microcystis aeruginosa* (Bláhová et al. 2013). Dalším vzorkem bylo LPS získané z biomasy laboratorní kultury *Microcystis aeruginosa* PCC7806 běžně používané ke studiu v laboratořích. Sinicové LPS bylo z biomasy získáno pomocí extrakce horkým fenolem, jejíž postup je publikován v článku Bláhová et al. 2013. Jako modelový ligand TLR4 bylo použito LPS z *Escherichia coli* a dále LPS *Pseudomonas aeruginosa*, patogenní bakterie, která může být přítomna i ve vodním květu. Tato LPS jsou komerčně dostupná u Sigma-Aldrich.

Nejprve jsme ověřili, zda námi zvolené koncentrace nejsou toxické. Pro tyto účely jsme použili testy ATP a LDH. Tyto testy ukazují na životaschopnost buněk, podle výsledků žádná použitá koncentrace neovlivňovala viabilitu buněk (Obr. 4).

Prozánětlivé účinky vzorků jsme sledovali pomocí detekce koncentrace IL-8 v médiu. Modelové LPS *E. coli* podle předpokladů aktivovalo produkci IL-8 v koncentrační závislosti. Zároveň se ukázalo, že LPS *Pseudomonas aeruginosa* má vyšší účinnost než LPS *E. coli*. Mimořádně zajímavé je, že LPS vodního květu má v našem systému účinek srovnatelný s patogenní *Pseudomonas aeruginosa* a vyšší než modelové LPS *E. coli*. Tento konkrétní vodní květ má tedy velmi výrazný potenciál spouštět zánětlivé procesy. LPS laboratorní kultury *Microcystis* nezpůsobuje signifikantní produkci IL-8 (Obr. 5). Tuto skutečnost potvrzuje i výsledek detekce hladiny proteinů TLR4 a TLR2, kdy po aktivaci LPS *E.coli* a *P. aeruginosa* dochází k navýšení exprese TLR4 ve srovnání s kontrolou a LPS vodního květu má ještě větší

efekt, na druhou stranu laboratorní kultura *M. aeruginosa* nezpůsobuje změnu exprese tohoto receptoru.

Expresí TLR2 není ovlivněna žádným použitým LPS (Obr. 6). Zdá se tedy, že LPS vodního květu, podobně jako LPS *E. coli* a *P. aeruginosa* aktivuje TLR4 a ne TLR2.

Nízká aktivita LPS *M. aeruginosa* z laboratorní kultury nepotvrzuje náš předpoklad. Ve vzorku z životního prostředí sice dominuje stejný druh sinice, neznáme však konkrétní kmeny, které se v něm vyskytují (zároveň je velmi nepravděpodobné, že by se jednalo o uniformní populaci jednoho sérotypu daného druhu). Je tedy možné, že struktura LPS se mezi jednotlivými kmeny druhu *Microcystis aeruginosa* liší natolik, že některé sérotypy jsou schopny aktivovat TLR a některé ne.

# Závěr

LPS sinic z vodního květu má schopnost spouštět prozánětlivé reakce v použitém buněčném modelu.

Zdá se, že mechanismus působení námi zvolených vzorků LPS a vodního květu spočívá v aktivaci TLR4. Samotné LPS *Microcystis aeruginosa* nevykazovalo prozánětlivé účinky, přestože ve vzorku prozánětlivého vodního květu má majoritní zastoupení. To může být vysvětleno rozdílnými kmeny sinic *M. aeruginosa* ve vodním květu a sinic laboratorní kultury. Výsledky naznačují potenciál vodního květu způsobovat záněty střev a ukazují na důležitost dalšího výzkumu tohoto jevu. Jeho bližší pochopení nám může pomoci ke zmírnění příznaků spojených s expozicí vodnímu květu.

# Seznam použité literatury

ADÁMEK, Z. 2010. Aplikovaná hydrobiologie. 2., rozš. upr. vyd. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. str. 151, 272, 273. ISBN 9788087437094.

AKEN, H. van a Dietmar VESTWEBER. 2013. Sepsis - a translational approach: Leopoldina symposium, Münster, November 25, 2011. Halle (Salle): Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina - Nationale Akademie der Wissenschaften, 2013(395). Nova acta Leopoldina : Abhandlungen der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina. Neue Folge. str. 40. ISBN 9783804732407.

BLÁHOVÁ L. et al. 2013. The isolation and characterization of lipopolysaccharides from *Microcystis aeruginosa*, a prominent toxic water bloom forming cyanobacteria. *Toxicon*, 76, str. 187-196.

GIANUZZI L., D. SEDAN, R. ECHENIQUE a D. ANDRINOLO. 2011. An Acute Case of Intoxication with Cyanobacteria and Cyanotoxins in Recreational Water in Salto Grande Dam, Argentina. *Mar Drugs* , 2164-2175.

HOŘEJŠÍ, Václav, 2004. Receptory TLR - klíčové molekuly imunitního systému. *Vesmír* [online]. 83(134) [cit. 2017-02-17]. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/receptory-tlr-klicove-molekuly-imunitniho-systemu>

KALINA, T. a J. VÁŇA. 2005. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Praha: Karolinum. str.71,70. ISBN 80-246-1036-1.

LÉVESQUE B. et al. 2014. Prospective study of acute health effects in relation to exposure to cyanobacteria. *Science of The Total Environment* str. 466-467, 397-403.

PALÍKOVÁ, M. et al. 2009. Cyanobakterie a ryby. In: 60 let výuky rybářské specializace na Mendelově zemědělské a lesnické univerzitě v Brně. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, s. 153-157 . str. 155, 157. ISBN 9788073753580.

PILOTTO L. S. et al., 1997. Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Aust N. Z. J. Public Health* 21, 562-566.

TEIXEIRA, M.G.L.C. et al. 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bull. Pan Am. Health Org.* 27, 244–253

ZÁVODSKÁ, R. 2006. Biologie buněk: základy cytologie, bakteriologie, virologie. Praha: Scientia. Biologie pro gymnázia, s.122. ISBN 80-869-6015-3.

# Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát
BFÚ	Biofyzikální ústav Akademie Věd
CpG DNA	nemethylovaný úsek DNA tvořený nukleotidy cytosinem a guaninem
ČR	Česká republika
dsRNA	double stranded RNA
E.coli	Escherichia coli
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
HMBG1	High mobility group box 1 protein
IL	interleukin
IRF	interferon regulatory factor
LBP	LPS-binding protein
LDH	laktátdehydrogenáza
LPS	lipopolysacharid
M. aeruginosa	Microcystis aeruginosa
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NF-κB	nukleární faktor κB
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PBS	phosphate-buffered saline
SDS	sodium dodecylsulfát

SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
ssDNA	single stranded DNA
TIR	Toll/interleukin-1 receptor homology domain
TLR	toll-like receptor
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
WB	water bloom