

Jihočeská univerzita v Českých budějovicích

Přírodovědecká fakulta

# **Interakce streptomycet izolovaných z lidských tkání s buňkami savčího imunitního systému.**

Diplomová práce

**Bc. Petr Pospíchal**

Školitel: Mgr. Kateřina Petříčková, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.

České Budějovice 2017

Pospíchal, P., 2017: Interakce streptomycet izolovaných z lidských tkání s buňkami savčího imunitního systému. [Interactions of *Streptomyces* isolated from humans tissues with cells of the mammalian immune system. Mgr. Thesis, in Czech.] – 52p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The main aim of the Thesis is to characterize the interaction between *Streptomyces* and human immune cells. The Thesis is focused on the effect of *Streptomyces* on the production of cytokines by monocytic cells and the influence of bacteria on the phagocytosis ability of macrophages.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne .....

.....

Petr Pospíchal

### Poděkování:

Chtěl bych poděkovat všem lidem, kteří se různým způsobem spolupodíleli na vytvoření této diplomové práce. Hlavní poděkování patří školitelce Mgr. Kateřině Petříčkové, Ph.D. a školitelce specialiste RNDr. Heleně Hanghansové, Ph.D za pomoc, trpělivost a cenné rady, bez kterých by tato práce nevznikla. Velké poděkování patří rovněž Bc. Evě Výletové a Ing. Miroslavu Petříčkovi, CSc., jejichž vstřícnost a ochota mi velmi usnadnila práci v laboratoři.

## Obsah

1. Úvod .....	1
2. Cíle práce .....	3
3. Přehled literatury .....	4
3.1. Bakterie rodu <i>Streptomyces</i> .....	4
3.1.1 Životní cyklus streptomycet .....	4
3.1.2. Sekundární metabolity streptomycet .....	5
3.1.3. Vztahy streptomycet s mnohobuněčnými organismy .....	6
3.1.4. Lidské patogenní druhy streptomycet .....	7
3.2. Makrofágy .....	9
3.2.1. Imunitní odpověď hostitele na bakteriální infekci .....	9
3.2.2. Zánět .....	9
3.2.3. Makrofágy .....	9
3.2.4. Úloha makrofágů během infekce .....	9
3.2.5. Fagocytóza .....	10
3.2.6. Tumor necrosis factor $\alpha$ a interleukin $1\beta$ .....	11
4. Materiál a metody .....	12
4.1. Materiál .....	12
4.1.1. Buněčná linie .....	12
4.1.2. Bakteriální kmeny .....	12
4.1.3. Kultivační média pro bakteriální kmeny .....	13
4.1.4. Pufry .....	14
4.1.5. Komerční kity a barviva .....	15
4.2. Metody .....	15
4.2.1. VLIV BAKTERIÍ RODU <i>STREPTOMYCES</i> NA FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITU A PŘEŽÍVÁNÍ BUNĚK LINIE THP-1 .....	15
4.2.1.1. Příprava bakteriálních spor .....	16
4.2.1.2. Příprava buněk linie THP-1 .....	16
4.2.1.3 FagoFlowEx <sup>®</sup> kit .....	16
4.2.2. VLIV EXTRAKTU METABOLITŮ Z BAKTERIÍ RODU <i>STREPTOMYCES</i> NA PRODUKCI TNF A IL- $1\beta$ BUŇKAMI LINIE THP-1 .....	17
4.2.2.1. Příprava extraktu metabolitů ze streptomycet .....	17
4.2.2.2 Test toxicity extraktů ze streptomycet pro buňky z linie THP-1 .....	19
4.2.2.3. Příprava vzorků na ELISA pro detekci TNF a IL- $1\beta$ .....	19
4.2.2.4. ELISA pro detekci TNF a IL- $1\beta$ .....	20

4.2.3. VLIV VYBRANÝCH EXTRAKTŮ Z BAKTERIÍ RODU <i>STREPTOMYCES</i> NA FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITU BUNĚK THP-1.....	20
4.2.4. BOLOGICKÝ TEST PŘÍTOMNOSTI ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK V EXTRAKTECH Z BAKTERIÍ RODU <i>STREPTOMYCES</i> .....	21
4.2.4.1. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) .....	21
4.2.4.2. Biologický test přítomnosti antimikrobiálních látek .....	21
4.2.5. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	22
5. Výsledky.....	23
5.1. VLIV BAKTERIÍ RODU <i>STREPTOMYCES</i> NA FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITU A PŘEŽÍVÁNÍ BUNĚK THP-1 .....	23
5.2. VLIV EXTRAKTŮ METABOLITŮ Z BAKTERIÍ RODU <i>STREPTOMYCES</i> NA PRODUKCI TNF A IL-1 $\beta$ BUŇKAMI LINIE THP-1 .....	27
5.3. VLIV VYBRANÝCH EXTRAKTŮ Z BAKTERIÍ RODU <i>STREPTOMYCES</i> NA FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITU BUNĚK THP-1.....	35
5.4. BIOLOGICKÝ TEST PŘÍTOMNOSTI ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK V EXTRAKTECH Z BAKTERIÍ RODU <i>STREPTOMYCES</i> .....	36
6. Diskuze .....	39
6.1. Vliv bakterií rodu <i>Streptomyces</i> na fagocytární aktivitu a přežívání buněk z line THP-1.....	39
6.2. Vliv extraktů sekundárních metabolitů z bakterií rodu <i>Streptomyces</i> na produkci TNF a IL-1 $\beta$ buňkami THP-1 .....	40
6.3. Vliv vybraných extraktů z bakterií rodu <i>Streptomyces</i> na fagocytární aktivitu buněk THP-1..	44
6.4. Biologický test přítomnosti antimikrobiálních látek v extraktech z bakterií rodu <i>Streptomyces</i> .....	45
7. Závěr .....	47
8. Seznam zkratk .....	48
9. Literatura:.....	49

# 1. Úvod

Bakterie patří mezi nejběžnější skupiny organismů na zemi. Dokáží přežít ve velice různorodém prostředí včetně extrémních podmínek, jako jsou například horké prameny. Dokáží to především pomocí schopnosti adaptovat se na změny v prostředí. Jejich přizpůsobivost je dána schopností bakterií produkovat širokou škálu sekundárních metabolitů – látek, které nezajišťují základní životní funkce, ale které jim poskytují výhody v extrémních podmínkách, konkurenčním boji nebo například zvyšují virulenci u patogenních bakterií. Významnými producenty sekundárních metabolitů mezi bakteriemi jsou bakterie rodu *Streptomyces*.

Bakterie rodu *Streptomyces* se řadí do čeledi *Streptomycetaceae*, řádu *Actinomycetales*. Jsou to grampozitivní obligátně aerobní půdní bakterie s vláknitým tvarem. Vyskytují se převážně v provzdušněné půdě, ale lze je nalézt i na dalších místech jako je voda, vzduch nebo povrch těla živočichů, rostlin i člověka. Dříve bylo známo pouze několik druhů streptomycet (*S. somaliensis*, později *S. sudanensis*), které byly schopny kolonizovat člověka a vyvolat u něj onemocnění – aktinomykózu (Renton et al. 1981; Quintana et al. 2008). Streptomycety jsou pomalu rostoucí mikroorganismy, jejichž diagnostika u lidských vzorků je při užití běžných laboratorních metod obtížná. S nástupem moderních diagnostických metod založených na hmotnostní spektrometrii a metagenomice se začaly objevovat další důkazy o kolonizaci lidského těla streptomycetami. Streptomycety mohou osidlovat například kůži (Renton et al. 1981), respirační trakt (Manteca et al. 2008) a u imunokompromitovaných lidí i například kardiovaskulární systém (Joseph et al. 2010).

V nedávné době vznikla unikátní sbírka izolátů streptomycet získaných z lidských tkání, která v současnosti obsahuje přibližně 50 kmenů streptomycet. Vzorky pocházejí především z Národní referenční laboratoře pro patogenní aktinomycety v Trutnově a ze Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě. Jedná se především o vzorky ze sputa - dolní části respiračního traktu, ale i například z dělohy po císařském řezu.

Častým společným znakem pacientů, ze kterých izoláty pocházejí, je vystavení půdnímu prachu v dolech, případně přebývání v oblastech s vysokou koncentrací poléťavého prachu ve vzduchu. Tito pacienti byli vyšetřováni pro dlouhodobé respirační potíže, chronické pneumonie a bronchitidy, chronickou obstrukční plicní nemoc, silikózu nebo tuberkulózu.

Izoláty streptomycet byly většinou získány po dekontaminaci sputa plic od rychle rostoucí flory pro kultivaci mykobakterií, kterou streptomycety také do jisté míry přežívají.

Motivem pro napsání této práce byl zájem o důsledky kolonizace respiračního traktu streptomycetami pro pacienta, zdali se nějakým způsobem mohly podílet na rozvoji chronických onemocnění plic, ale především zda streptomycety ovlivňují imunitní reakci člověka. Tato práce je v tomto směru pilotní studií.

## 2. Cíle práce

- 1) Charakterizovat interakce mezi lidskými izoláty bakterií rodu *Streptomyces* a buňkami lidského imunitního systému se zaměřením na fagocytární aktivitu a přežívání buněk.
- 2) Stanovit vliv extraktů nízkomolekulárních metabolitů z těchto streptomycet na produkci TNF a IL-1 $\beta$  imunitními buňkami.
- 3) Otestovat přítomnost antimikrobiálních látek v extraktech streptomycet.



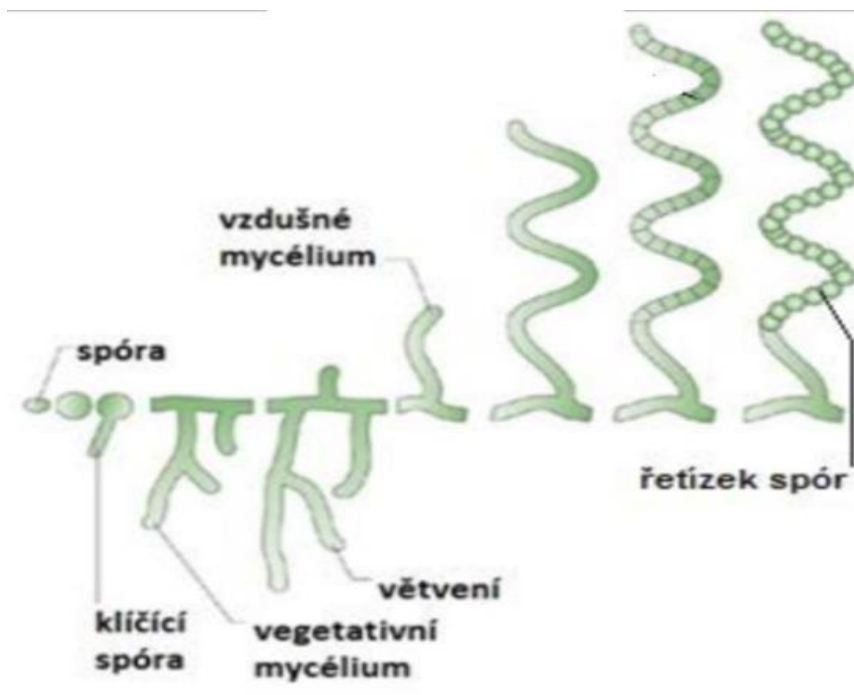
## 3. Přehled literatury

### 3.1. Bakterie rodu *Streptomyces*

Bakterie rodu *Streptomyces* se řadí do čeledi *Streptomycetaceae*, řádu *Actinomycetales*. Název *Streptomyces* se dá přeložit z řečtiny jako řetízkové houby. Jedná se o grampozitivní obligátně aerobní půdní bakterie s vláknitým tvarem. Nalézají své uplatnění v mnoha oblastech lidské činnosti, jako je potravinářský a farmaceutický průmysl nebo ochrana životního prostředí. Vyskytuje se mezi nimi ale i několik patogenních kmenů, například *S. somaliensis*.

#### 3.1.1 Životní cyklus streptomycet

Streptomycety jsou bakterie s komplexně rozvinutým životním cyklem (obr.1). Jejich životní cyklus začíná germinací spor a vznikem rozvětvených vláken substrátového vegetativního mycelia. Po ukončení vegetativního růstu dochází k produkci vzdušných hyf. Tento proces bývá indukován stresem z nedostatku živin v okolí, jenž se stává signálem pro morfologické změny (Demain 1999). Růst vzdušných mycelií jde na úkor substrátových mycelií, u kterých dochází k řízené buněčné smrti a vzniklá biomasa slouží jako živiny. Z několika málo miligramů substrátového mycelia může tímto způsobem vzniknout několik milionů spor (Chater et al. 2010). Během této fáze je kolonie zranitelnější vůči přerůstání jinými druhy bakterií. Zřejmě proto dochází k výraznější produkci sekundárních metabolitů, jako jsou antibiotika, právě v tomto období. (Chater et al. 2010). Vzdušné hyfy se následně mění ve spirálovitě stočené řetízky spor.



Obr.1: Životní cyklus *Streptomyces* species (upraveno podle Flärdh a Buttner 2009).

### 3.1.2. Sekundární metabolity streptomycet

Bakterie rodu *Streptomyces* produkují až tisíce různých metabolitů, které se liší svými vlastnostmi i funkcí. V genomu streptomycet lze nalézt mnoho genových shluků kódujících sekundární metabolity. Ty sice nezajišťují jejich základní životní funkce jako je růst a reprodukce, ale dodávají svým producentům celkově unikátní vlastnosti, které jim pomáhají lépe přežít a přizpůsobovat se prostředí, včetně konkurenčního boje s dalšími bakteriemi. Typicky jsou tyto látky produkovány během vstupu producenta do reprodukční fáze (Demain 1998).

Příkladem běžného metabolitu může být i těkavý geosmin, který dodává bakteriím typický zemitý zápach (Gerber et Lechavelier 1965). Mnoho druhů streptomycet produkuje další látky, jako jsou například pigmenty a extracelulární hydrolytické enzymy – proteázy, dextrázy, lipázy.

V medicíně a farmaceutickém průmyslu hrají sekundární metabolity významnou roli. V široké škále sekundárních metabolitů významných v medicíně můžeme nalézt antibiotika (streptothricin, daptomycin, chloramfenikol, neomycin, puromycin, streptomycin, tetracyklin, chlortetracyklin, erytromycin), látky s protiplísňovou aktivitou (natamycin, amfotericin B),

kancerostatika (migrastatin, bleomycin (Hecht 2000)) a antihelmintika (avarmektin). Streptomycety jsou největšími producenty antibiotik mezi všemi mikroorganismy, produkují přibližně 70 % všech známých antibiotik.

Z hlediska biologické aktivity je možné rozdělit sekundární metabolity produkované streptomycetami do 4 skupin podle jejich využití (Tarrka a Hampp 2008).

1. látky antagonistické – antibiotika, antivirotika, antimykotika a antiprotozoální látky
2. látky farmakologické – protinádorové látky, imunosupresiva, inhibitory enzymů
3. biologicky aktivní látky využívané v rostlinné produkci – insekticidy, pesticidy a herbicidy
4. látky s regulačními vlastnostmi – růstové faktory

Vznik takto širokého spektra biologicky aktivních látek může být dán tím, že streptomycety žijí ve velice variabilním prostředí a interagují s celou řadou mikro i makro organismů. Právě proto jsou streptomycety stále v centru pozornosti mnoha výzkumných prací, které doufají v objevení nových farmaceuticky využitelných látek.

### **3.1.3. Vztahy streptomycet s mnohobuněčnými organismy**

Rozmanitost látek, které produkují streptomycety, naznačuje, že jejich sekundární metabolity nejsou určeny pouze k „destrukci“ okolních organismů, ale že mohou sloužit jako signální molekuly, které mohou ovlivnit translaci a transkripci genů v cílovém organismu (Yin et al. 2007). Streptomycety tedy mohou mít jak patogenní, tak i mutualistický vztah k dalším organismům. V posledních letech se objevují studie, které to potvrzují. U některých bezobratlých živočichů je dobře popsána adaptace streptomycet pro život v symbióze s těmito organismy. Například u květolibů, rodu samotářských vos, rostou streptomycety ve speciální žláze samiček, ze kterých jsou poté sekretovány spolu s vajíčky do mateřské komůrky, kde chrání pomocí antibiotik larvy vos proti houbovým infekcím (Kaltenpoth, et al. 2005).

Dále jsou u bezobratlých popsány symbiotické vztahy mezi aktinomycetami a některými druhy kůrovců a mravenců. Jedná se především o vztahy, kdy jsou symbiotické aktinomycety využívány pro ochranu hub, které slouží jako potrava nebo úkryt pro bezobratlé. Výměnou za to jsou streptomycety uchovávány ve speciálních žlázách těchto živočichů (Seipke 2012).

Významnou skupinou organismů, se kterými streptomycety interagují, jsou rostliny. Zde se může jednat jak o epifytický, tak i o parazitický vztah. U parazitických vztahů jsou tyto bakterie schopny kolonizovat kořeny rostlin a pronikat přímo do buněk, kde způsobují vznik patogenních fenotypů. Mezi známé patogeny rostlin patří *S. turgidiscabies* a *S. scabies*, které způsobují nekrotizující léze na ekonomicky důležitých rostlinách, jako jsou například brambory. Patogeneze je způsobena schopností streptomycet ovlivňovat produkci metabolitů rostlinami ve svůj prospěch (Seipke 2012). V některých případech ale nedochází po infekci streptomycetami u rostlin k projevu patogenních znaků, ale naopak bakterie dlouhodobě perzistují v buňkách a svým zasahováním do metabolismu rostlin zvyšují vitalitu hostitelů – mohou podporovat růst rostlin a chránit hostitele proti patogenům (Seipke 2012). Principiálně se ale neliší endofytické druhy od těch patogenních.

#### **3.1.4. Lidské patogenní druhy streptomycet**

Ačkoliv jsou bakterie rodu *Streptomyces* především známy jako významní producenti biologicky aktivních látek, také mezi nimi existují i kmeny, které mohou u lidí vyvolat závažná onemocnění.

Velice dobře je popsána patogenita druhů *S. somaliensis* a *S. sudanensis*. Oba jsou původci závažného chronického onemocnění aktinomycetom, které je známé také jako „Madura foot“. Aktinomycetom je endemické kožní onemocnění v tropických a subtropických oblastech, které postihuje převážně dolní končetiny. Bakterie napadá kůži, podkožní tkáň a v některých případech může pronikat i do kostí. Kromě *S. somaliensis* a *S. sudanensis* patří mezi jeho původce také *Actinmadura madurae*, *A. pelletieri*, *Nocardia brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum* a *N. transvalensis* (Quintana et al. 2008; Develoux et al. 2003, Renton et al. 1981).

Pouze v několika případech byly vědecky doloženy i jiné infekce způsobené streptomycetami, než je mycetom. Jsou zdokumentovány případy, kdy byly streptomycety prokázány jako původci onemocnění plic. Jako původci infekce plic byly identifikovány kmeny (pomocí sekvenace 16S ribosomální DNA) *S. maritimus*, *S. albus*, *S. pelletieri*, *S. griseus* (Kapadia et al. 2007,). *S. cinereoruber* - při koinfekci s *Haemophilus influenzae* (Manceta et al. 2007). Kromě těchto konkrétních kmenů, byly popsány infekce plicního traktu způsobené *Streptomyces sp.*. Společné pro většinu těchto případů bylo to, že pacienti byli nakaženi virem HIV. U streptomycet izolovaných v Národní referenční laboratoři pro

patogenní aktinomycety v Trutnově a ze Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě byl jako společný faktor popisován pobyt a práce v prašném prostředí. Tato data ale nejsou prozatím ve vědecké literatuře popsána. V této sbírce se nacházejí například kmeny molekulární taxonomií zařazené ke druhům *S. albidoflavus*, *S. somaliensis*, *S. costaricanus*.

Dále jsou popsány případy infekce kardiovaskulárního systému během zavedeného centrálního žilního katetru u pacientů s karcinomem. Jako původci onemocnění zde byly identifikovány kmeny *S. nobilis*, *S. parvulus*, *S. humidus*, *S. pilolus*, *S. herbaricolor* (Kapadia et al. 2007), *S. bikiniensis* (Moss et al., 2003) a dalšími *Streptomyces* sp. (Carey et al. 2001). Mezi další kmeny, které způsobily infekci krevního řečiště, patří například *S. thermovulgaris* (Ekkelenkamp et al. 2004).

Existuje i několik ojedinělých případů infekcí dalších tkání člověka. Ve dvou případech jsou zdokumentovány záněty pobřišnice. V prvním případě se jednalo o primární infekci kmenem *S. somaliensis* (Gruet et al. 1970). U druhého pacienta s chronickým onemocněním jater se vyskytla sekundární infekce pobřišnice způsobená *S. viridis* (Datta et al. 2012). V roce 1964 se vyskytl případ abscesu mozku vyvolaným kmenem *S. griseus* při poranění hlavy (Clarke et al. 1964). *Streptomyces thermocaboxydus* (Kawakami et al. 2014) a *S. roseus* (Bardelli 1963) způsobily ve dvou zdokumentovaných případech bakteriální keratitidu. V případě sbírky streptomycet z Národní referenční laboratoře pro patogenní aktinomycety v Trutnově a ze Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě byl izolován *S. albidoflavus* z dělohy po císařském řezu.

Infekce vyvolané bakteriemi rodu *Streptomyces* tedy nejsou vázané na jeden druh nebo skupinu druhů. Často se vyskytují u imunokompromitovaných pacientů. V obecné rovině bychom mohli streptomycety považovat za fakultativní patogeny.

Mohly by mít pro lidi nebezpečný potenciál i z toho hlediska, že z nich pochází velká část používaných antibiotik. Bakterie rodu *Streptomyces* jsou rezistentní vůči vlastním antibiotikům (v opačném případě by je jejich produkt zlikvidoval) a je zde nebezpečí, že v důsledku evolučního tlaku dojde pomocí horizontálního rozšíření těchto genů mezi ostatními půdními bakteriemi a patogeny (Aminow et Mackie 2007). Streptomycety jsou také rezistentní vůči NO, který je důležitou součástí imunitní reakce člověka (Tucker et al. 2010).

## **3.2. Makrofágy**

### **3.2.1. Imunitní odpověď hostitele na bakteriální infekci**

V případě bakteriální infekce probíhá v organismu hostitele mnoho změn jak na systémové, tak i na buněčné úrovni. Bakteriální infekce indukuje systémovou odpověď zahrnující specifickou i nespecifickou imunitu. U nespecifické imunity se setkáváme s likvidací bakterií fagocytujícími buňkami, produkcí interferonu, komplementem a zánětem. Specifická odpověď zahrnuje T a B lymfocyty a protilátky.

### **3.2.2. Zánět**

Zánět je významnou součástí vrozené imunity živočichů. Fyziologicky se jedná o obranný mechanismus, ale může během něho také dojít k poškození vlastní tkáně. Jeho hlavní úlohou je mobilizace efektorových buněk a jejich přesun do místa poškození. Mezi hlavní buňky zánětu patří granulocyty, monocyty, endotelové buňky a trombocyty. Může být vyvolán infekčními mikroorganismy, chemickými a fyzikálními jevy. Mezi jeho projevy patří zarudnutí, zduření, zvýšená teplota, bolest a snížená funkce postiženého orgánu. Cílem zánětlivé odpovědi je izolování poškozené tkáně, eliminace patogenů a reparace tkáně (Abbas et al. 2015).

### **3.2.3. Makrofágy**

Makrofágy jsou buňkami imunitního systému a představují jednu ze základních složek přirozené imunity. Patří mezi leukocyty. Nacházejí uplatnění jako profesionální fagocyty a antigen prezentující buňky, které jsou zodpovědné za rozpoznání a následnou likvidaci patogenů a mrtvých buněk. Makrofágy mohou vznikat dvěma různými způsoby. V prvním způsobu dochází ke vzniku přímo v kostní dřeni spolu s monocyty z hemopoetických buněk. V druhém případě jsou monocyty uvolňovány do krevního řečiště, ze kterého se po několikadenní cirkulaci přesouvají do tkání, kde dochází k jejich přeměně na různé druhy tkáňových makrofágů (Gordon et Martinez 2010).

### **3.2.4. Úloha makrofágů během infekce**

Makrofágy jsou jedny z prvních buněk imunitního systému rozpoznávající mikroorganismus, který překonal epiteliální bariéru a začal se množit v hostitelské tkáni. Reakcí makrofágů na přítomnost patogenu dochází k rozvoji zánětlivé odpovědi, při které dochází k hromadění leukocytů a plazmatických proteinů v tkáních za účelem zničení mikroba. Aktivované makrofágy produkují cytokiny a chemokiny (například prozánětlivé

TNF a IL-1 $\beta$ , TNF kulminuje přibližně po 4 hodinách, IL-1 $\beta$  dosahuje maximální koncentrace přibližně po 24-48 hodinách), které působí na endoteliální buňky cév, způsobují dilataci těchto cév a podporují tak migraci dalších leukocytů do místa poškození. V důsledku těchto dějů dochází k typickým projevům zánětu, bolesti, začervenání, otoku a zvýšení teploty (Aderem 2003).

Kromě své hlavní úlohy v imunitní odpovědi, pohlcení a usmrcení patogenu, mohou makrofágy sloužit také jako antigen prezentující buňky, pohlcený antigen vystaví na svém povrchu a aktivují tak T-lymfocyty. Makrofágy se také podílejí na obnově poškozené tkáně, pohlcují odumřelé buňky vlastního organismu, buňky podléhající apoptóze a neutrofilů, které splnily svoji funkci a po infekci se hromadí ve tkáních (Abbas et al. 2015).

### **3.2.5. Fagocytóza**

Zahajujícím krokem fagocytózy je rozpoznání cizorodého agens (typicky konzervované struktury na povrchu mikroorganismů, které nejsou u vyšší eukaryot). Fagocyty jsou schopny tyto struktury rozpoznat pomocí membránových receptorů. Mezi nejvýznamnější receptory patří Toll-like receptory rozpoznávající bakteriální lipopolysacharid (LPS), tento receptor je typický pro monocyty a makrofágy. Dále to je scavengerový receptor pro negativně nabitě ligandy, manosový receptor a CD14 receptor. Po rozpoznání a navázání antigenu dochází k aktivaci signálních drah, které vedou k vychlípění cytoplazmatické membrány a pohlcení patogenu, který je uzavřen ve fagozomu. Ten následně fúzuje s lyzozomy a vzniká fagolyzozom, ve kterém dochází k likvidaci cizorodého agens (Abbas et al. 2015).

K likvidaci patogenu ve fagolyzozomu používá makrofág velké množství různorodých látek. K významným metabolitům k tomu určených patří například NO, ROS (reaktivní forma kyslíku) a lytické enzymy. ROS je silně reaktivní oxidační činidlo se schopností zlikvidovat nejen patogen, ale i poškodit okolní tkáně. Vznik ROS je nazýván respiračním (oxidačním) vzplanutím. V buňkách je molekulární kyslík redukován na membráně oxidázou na superoxidový radikál a následně je enzymatickou cestou přeměněn na peroxid vodíku (Bylund et al 2010).

### **3.2.6. Tumor necrosis factor $\alpha$ a interleukin $1\beta$**

Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF) je prozánětlivý cytokin z rodiny TNF, kam je řazeno dalších 18 proteinů a 29 receptorů (Haider et al. 2009). Tento protein je produkován různými typy buněk, převážně ale makrofágy v reakci na stimulaci LPS (lipopolysacharidem). TNF se podílí na regulaci imunitní reakce, indukuje zánět, apoptózu buněk a inhibuje tvorbu nádorů a virovou replikaci. Receptory pro TNF zprostředkující imunitní reakci jsou exprimovány na většině typů buněk a jsou aktivovány vazbou TNF. Tyto receptory zprostředkující imunitní reakci jsou zásadní v patogenezi a kontrole různých infekcí způsobených bakteriemi, viry, prvoky a houbami (Schluter et Decker 2000).

Interleukin  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) je prozánětlivý cytokin produkován převážně makrofágy. Má zásadní roli při mitogenní aktivaci lymfocytů a nastartování buněčné imunitní odpovědi. Jeho nedostatek by se projevil sníženým počtem lymfocytů při imunitní odpovědi. (Watzke et al. 2007).



## 4. Materiál a metody

### 4.1. Materiál

#### 4.1.1. Buněčná linie

V pokusech byla použita buněčná monocytová linie THP-1. Linie THP-1 byla získána z peritoneální krve ročního chlapce trpícího akutní monocytární leukémií (Tsuchiya et al. 1980). Buňky byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Biowest) s 10 % BOFES (bovine fetal serum, Sigma-Aldrich), 1% roztokem antibiotik (výsledné koncentrace: Penicilin G 100 j/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Biowest), 1% L-glutaminem (výsledná koncentrace 2,92 µg/ml, Biowest) a s 0,1 % 2-Merkaptoetanolu (výsledná koncentrace 50µM, Sigma) při 37 °C. Při kultivaci buněk z linie THP-1 s bakteriemi rodu *Streptomyces* bylo použito stejné médium bez přídavku antibiotik.

#### 4.1.2. Bakteriální kmeny

Bakteriální kmeny rodu *Streptomyces* použité pro tuto diplomovou práci byly izolovány z lidských tkání. Vzorky pocházely z dekontaminovaného sputa (sputum zbavené rychle rostoucích bakterií pro standardní kultivaci mykobakterií) a z dělohy po císařském řezu. Izoláty pocházejí ze sbírky aktinomycet Ústavu půdní biologie Biologického centra AVČR a jsou uvedeny v tabulce (Tab. I). Kmeny byly identifikovány pomocí sekvenace 16S rRNA (Yoon 2017). Suspenze exospor byly krátkodobě uchovávány ve 4 °C v MOPS sporovém pufru (viz bod 4.14).

Izolát	Identifikace	Shoda s databází (%)	Tkáň původu
TR1	<i>Streptomyces somaliensis</i> NBRC 12916(T)	100	Dekontaminované sputum
TR20	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455(T)	99,71	Dekontaminované sputum
TR24	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455(T)	99,64	Dekontaminované sputum
TR38	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455(T)	99,7	Děloha po císařském řezu
TR42	<i>Streptomyces costaricanus</i> NBRC 12916(T)	100	Dekontaminované sputum

Tab. I.: Identifikace izolátů streptomycet

*Bacillus subtilis subsp. Spizizenii* ATCC 6633 (Difco™, BD)

Kultivační podmínky: Kmen byl kultivován za aerobních podmínek v TSB tekutém médiu při 37 °C na orbitální třepačce při 200 rpm. Po 24 hodinách vzniká suspenze endospor, ta byla dlouhodobě uchovávána ve 4 °C. Pro účely monitorování antibiotických aktivit extraktů byl kmen kultivován na živném agaru při 37 °C.

**4.1.3. Kultivační média pro bakteriální kmeny**

Při kultivaci bakterií bylo použito tekuté kultivační médium (GYM), kultivační média s agarem (MS agar, živný agar) a médium RPMI bez antibiotik (viz bod 3.1.1.).

Není-li uvedeno jinak:

- procentní koncentrace jsou uvedeny jako poměr hmotnosti a objemu (w/v)
- pro přípravu kultivačních médií byla použita destilovaná voda
- pro úpravu pH byly použity 1M vodné roztoky HCl a NaOH
- kultivační média byla sterilována v autoklávu (30 minut, 121 °C)

GYM médium

0,4 %	glukóza
0,4 %	kvasničný extrakt (Yeast extract, OXOID)
1 %	sladový extrakt (Malt extract, OXOID)
0,1 %	NZ amin A (Wako)
0,2 %	NaCl
0,3 %	OB soli
pH 7,3	

#### OB soli

0,166 %	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O
0,25 %	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
0,12 %	MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O
0,5 %	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O
0,3 %	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O

#### MS (Manitol Soya flour) agar

2 %	agar
2 %	manitol
2 %	sójová mouka

Médium bylo připraveno s vodovodní vodou.

#### Živný (nutrient) agar

2,8 %	živný agar (Nutrient agar, OXOID)
-------	-----------------------------------

#### TSB médium

3 %	Trypton-sojový bujón (Tryptone Soya Broth, Oxoid)
-----	---

#### **4.1.4. Pufry**

##### Pufr pro metodu pHrodo

HEPES (Sigma) 10mM

PBS

## MOPS

MOPS (Sigma) 10mM

NaCl 0,1M

pH 7,1

destilovaná voda

### **4.1.5. Komerční kity a barviva**

Při některých pokusech byly používány komerční kity ELISA detekující množství TNF a IL-1 $\beta$ . Pro detekci TNF byl použit kit Human TNF alpha ELISA Ready-SET-GO!<sup>®</sup> (eBioscience<sup>™</sup>). Pro detekci IL-1 $\beta$  byl použit kit Human IL-1 beta ELISA Ready-SET-GO!<sup>®</sup> (eBioscience<sup>™</sup>).

Pro detekci fagocytární aktivity buněk line THP-1 byly použity 2 metody. Při prvním měření byl použit komerční kit FagoFlowEx<sup>®</sup> kit (ExBio). Při dalších pokusech byl použit pHrodo<sup>™</sup> *E. coli* BioParticles<sup>™</sup> conjugate for phagocytosis (Invitrogen).

Pro detekci přežívání buněk z line THP-1 bylo použito barvivo AlamarBlue<sup>™</sup> Cell Viability Reagent (Thermo Fisher).

## **4.2. Metody**

### **4.2.1. VLIV BAKTERIÍ RODU *STREPTOMYCES* NA FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITU A PŘEŽÍVÁNÍ BUNĚK LINIE THP-1**

Pro tyto pokusy bylo použito všech pět kmenů streptomycet a buňky line THP-1. Spory bakterií byly spolu s monocyty kultivovány 30 a 90 minut, kde docházelo k fagocytóze spor bakterií buňkami THP-1. Princip metody spočíval v měření oxidačního vzplanutí THP-1 na průtokovém cytometru pomocí komerčního kitu FagoFlowEx<sup>®</sup>. Přežívání monocytů bylo měřeno s využitím propidium iodidu (PI) (viz bod 4.2.1.3).

#### **4.2.1.1. Příprava bakteriálních spor**

Bakteriální kmeny byly vysety na misky s MS agarem a kultivovány 96 hodin při 28 °C. Z plně narostlé misky byly spory streptomycet přeneseny do sporového pufru MOPS. Následně byla určena koncentrace živých spor na ml suspenze (spor/ml): Suspenze byla ředěna stovkovou ředící řadou až do ředění  $10^{-8}$  a po 72-hodinové kultivaci 100  $\mu$ l na MS agaru při 28 °C byl určen počet kolonií na misce se vhodným ředěním a z ředícího faktoru spočítána koncentrace sporové suspenze. Zásobní suspenze byla naředěna tak, aby obsahovala  $10^8$  spor/ml a byla skladována při 4 °C.

#### **4.2.1.2. Příprava buněk linie THP-1**

Buňky byly kultivovány v médiu RPMI s antibiotiky při 37 °C. Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce a potřebné množství buněk bylo centrifugováno při 110 g, 4 °C po dobu 5 minut. Po odstranění supernatantu byla kultura naředěna v PBS s 1 % BOFES na koncentraci  $1 \times 10^6$  buněk/ml.

#### **4.2.1.3 FagoFlowEx<sup>®</sup> kit**

Vzorky byly připravovány v triplicátech. Do zkumavek určených pro měření na průtokovém cytometru bylo napipetováno 10  $\mu$ l suspenze spor ( $10^6$  spor). Jako negativní kontrola bylo použito 10  $\mu$ l PBS s 1 % BOFES, jako pozitivní kontrola bylo použito 10  $\mu$ l PMA (forbol-myristyl-acetát) z kitu. Do zkumavek bylo přidáno 100  $\mu$ l suspenze THP-1 buněk ( $10^5$  buněk). Následně bylo do zkumavek napipetováno 10  $\mu$ l roztoku DHR123 (dihydrorhodamin 123) z kitu. Inkubace probíhala 30 a 90 minut v termostatu při 37 °C. Po inkubaci byl přidán 1 ml PBS s 1 % BOFES a proběhla centrifugace při 110g, 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet byl rozsuspendován ve 150  $\mu$ l PBS s 1 % BOFES. Těsně před měřením na průtokovém cytometru byl přidán 1  $\mu$ l PI o koncentraci 50  $\mu$ g/ml. Fluorescence rhodaminu 123, vzniklého oxidací DHR123 byla detekována v kanále pro FITC(525 nm) na přístroji BD FACS Canto II a výsledky analyzovány pomocí BD FACS Diva software. Stanovováno bylo procento buněk, ve kterých proběhla oxidace DHR123. U propidium jodidu, který proniká do mrtvých buněk, bylo měřeno procento PI pozitivních buněk (Syh-Jae 2004).

#### **4.2.2. VLIV EXTRAKTU METABOLITŮ Z BAKTERIÍ RODU *STREPTOMYCES* NA PRODUKCI TNF A IL-1 $\beta$ BUŇKAMI LINIE THP-1**

Monocyty byly kultivovány 4 a 24 hodin společně s extrakty metabolitů ze streptomycet a následně bylo detekováno množství TNF a IL-1 $\beta$  komerčními ELISA kity (viz bod 4.1.5).

##### **4.2.2.1. Příprava extraktu metabolitů ze streptomycet**

Celkově byly provedeny 3 různé způsoby kultivace bakterií rodu *Streptomyces*. Následně byly provedeny extrakce metabolitů ze streptomycet.

##### Kultivace streptomycet v médiu GYM

Do mikrozkušavek bylo přeneseno 0,5 ml spor v pufru MOPS (viz 4.2.1.1.) a v termobloku byla indukována geminace spor provedením teplotního šoku 10 minut při 55 °C. Spory byly zaočkovány do prolamované Erlenmeyerovy baňky s 30 ml média GYM následovala kultivovány 24 hodin při 28 °C na orbitálním inkubátoru při 200 rpm. Z narostlé kultury bylo odebráno 15 ml suspenze a zaočkováno do 150 ml média GYM. Vzorokly byly kultivovány stejným způsobem dalších 48 hodin.

##### Kultivace streptomycet v médiu GYM a RPMI bez antibiotik

Stejně jako v předchozí kultivaci byl proveden u spor teplotní šok a následně byly zaočkovány do Erlenmeyerovy baňky s 30 ml RPMI bez antibiotik a kultivovány 6 hodin při 28 °C na třepačce. Po uplynutí kultivační doby bylo přidáno dalších 50 ml RPMI bez antibiotik a vzorky byly kultivovány dalších 24 hodin při 28 °C na třepačce. Z kultury bylo odebráno 15 ml suspenze, které byly centrifugovány 10 minut při 4 °C a 6380 g. Supernatant byl odstraněn a buňky byly zaočkovány do Erlenmeyerovy baňky se 150 ml média GYM. Kultivace proběhla dalších 48 hodin při 28 °C na třepačce.

##### Kultivace streptomycet s buňkami z linie THP-1 v médiu GYM a RPMI bez antibiotik

Kultivace měla stejný postup jako kultivace streptomycet v médiu GYM a RPMI bez antibiotik. V tomto případě ale 50 ml RPMI bez antibiotik obsahovalo buňky z linie THP-1 o koncentraci 10<sup>5</sup> buněk na ml.

Jako kontrolní vzorek byla použita buněčná suspenze, která byla kultivována podle kultivace streptomycet s buňkami z linie THP-1 v médiu GYM a RPMI bez antibiotik, ale neobsahovala žádný kmen streptomycet.

## Příprava extraktů

Z připravených buněčných kultur byly extrahovány metabolity streptomycet. Byly provedeny 2 metody extrakce (aceton-ethylacetátová pro nepolární látky a methanолоvá pro polární látky).

Pro extrakci aceton-ethylacetátem bylo nutné buněčné suspenze centrifugovat 10 minut při 4 °C a 6380 g. Dále se pracovalo zvláště se supernatantem a peletem.

V supernatantu byl rozpuštěn NaCl do výsledné 5M koncentrace. Vzorek byl převeden do dělicí nálevky a k němu přidána 1/3 objemu ethylacetátu. Emulze byla třepána na třepáče 30 minut v chladové místnosti ve tmě. Po uplynutí doby byla emulze převedena do centrifugační zkumavky a centrifugována 10 minut při pokojové teplotě a 6380 g. Vrchní ethylacetátová fáze byla pomocí pipety převedena do odpařovací baňky a odpařena do sucha na rotační vakuové odparce (Laborota 4003) při teplotě vodní lázně 37 °C a pod tlakem 150 mbar.

Pelet byl resuspendován v 75 ml acetonu (polovina celkového objemu kultury) a převeden do dělicí nálevky. Suspenze byla třepána na třepáče 30 minut v chladové místnosti ve tmě. Po uplynutí třepací doby byla suspenze převedena do centrifugační zkumavky a centrifugována 10 minut při pokojové teplotě a 6380 g. Supernatant byl převeden do odpařovací baňky a odpařován na rotační vakuové odparce při teplotě vodní lázně 37 °C a podtlaku 150 mbar, dokud v baňce nezůstalo pouze malé množství vodné fáze. Ke vzorku byl přidán ethylacetát o 2-3 násobném objemu vodné fáze v baňce. Emulze byla převedena od dělicí nálevky a třepána 30 minut ve tmě v chladové místnosti. Pak byla emulze převedena do centrifugační zkumavky a centrifugována 10 minut při pokojové teplotě a 6380 g. Horní ethylacetátová fáze byla převedena do odpařovací baňky a odpařena do sucha na vakuové rotační odparce při teplotě vodní lázně 37 °C a podtlaku 150 mbar. Extrakty z mycelia a média byly následně spojeny dohromady.

Při extrakci methanolem byla buněčná kultura převedena do odpařovací baňky a zmrazena na -80 °C. Vzorky byly lyofilizovány při -47 °C, dokud nebyly zcela suché. Vysušené vzorky byly extrahovány 25 ml methanolu v dělicí nálevce na třepáče 30 minut ve tmě v chladové místnosti. Suspenze byla centrifugována 10 minut při pokojové teplotě a 6380 g. Supernatant byl přelit do odpařovací baňky a odpařen do sucha na rotační vakuové odparce při teplotě vodní lázně 37 °C a podtlaku 150 mbar.

Po všech extrakcích bylo k vysušenému vzorku přidáno 100 µl chloroformu. Extrakty byly poté přeneseny do vialky z tmavého skla a skladovány při -80 °C pro další pokusy.

#### **4.2.2.2 Test toxicity extraktů ze streptomycet pro buňky z linie THP-1**

20 µl extraktů v chloroformu bylo převedeno do 20 µl DMSO. Do jamek 96-jamkové kultivační destičky (TPP) bylo napipetováno 100 µl média RPMI. Do první jamky byly přidány 2 µl extraktu ze streptomycet v DMSO a 98 µl média RPMI. Jako kontrola bylo použito DMSO (8 µl/jamku). Následně bylo provedeno ředění dvojkovou řadou.) Do takto připravených jamek byly nasazeny buňky z linie THP-1 (100 µl při koncentraci  $2 \times 10^6$  buněk/ml). Kultivační destičky byly inkubovány v termostatu při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 24 hodin. Po uplynutí doby inkubace bylo přidáno do každé jamky 20 µl AlamarBlue™ Cell Viability Reagent. Následovala další kultivace v termostatu při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 4 hodin. Po uplynutí inkubační doby byla změřena fluorescence vzorků na spektrofotometru (Synergy H1 microplate reader) a výsledky analyzovány pomocí Gen5 2.05. AlamarBlue™ Cell Viability Reagent je roztok, který obsahuje modré, slabě fluorescenční barvivo, které je v metabolických drahách aktivních buněk redukováno na silně fluorescenční resazurin.

Pro další pokusy byly vybrány nejvyšší možné koncentrace jednotlivých extraktů, které nebyly pro buňky THP-1 toxické.

#### **4.2.2.3. Příprava vzorků na ELISA pro detekci TNF a IL-1β**

Všechny následující pokusy byly prováděny v triplicátech. Buňky kultivované v RPMI byly spočítány v Bürkerově komůrce a potřebné množství buněk bylo centrifugováno při 110 g po dobu 5 minut. Vzniklý pelet byl rozsuspendován RPMI tak, aby výsledná koncentrace buněk byla  $1.10^6$  buněk/ml. Buňky byly následně nasazeny na 96-jamkový kultivační panel (TPP) po 200 µl/jamku. Do každé jamky bylo přidáno dalších 50 µl RPMI. Do jamek byly poté přidány extrakty ze streptomycet v objemu viz tabulka (tab. I v 4.2.). Kultivační panel byl inkubován v termostatu při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. V časech 4 a 24 hodin po přidání extraktů ze streptomycet byly z jamek odebrány vzorky supernatantů (100 µl), které byly zmrazeny a uskladněny v -20 °C pro následující pokusy.

Kromě této skupiny vzorků, byla vytvořena další sada vzorků, kde byly THP-1 monocyty aktivovány pomocí bakteriálního lipopolysacharidu (LPS), Postup pro získání



těchto vzorků byl stejný jako u předcházejícího pokusu, ale navíc bylo po přidání extraktu ze streptomycet přidáno do všech jamek LPS o výsledné koncentraci 1 µg/ml.

#### **4.2.2.4. ELISA pro detekci TNF a IL-1β**

Pro stanovení množství TNF byly použity vzorky odebrané po 4 hodinách (viz 4.2.2.3.) a komerčně vyráběný kit Human TNF alpha ELISA Ready-SET-GO!<sup>®</sup> (eBioscience<sup>™</sup>). Pro stanovení byl dodržen pracovní postup doporučený výrobcem. Absorbance byla poté změřena na spektrofotometru (Synergy H1) při vlnové délce 450 nm. Jako kontrolní vzorek byl zvolen extrakt, který neobsahoval žádný metabolit streptomycet (viz 4.2.2.1.).

Pro stanovení množství IL-1β byly použity vzorky odebrané po 24 hodinách (viz 4.2.2.3.) a komerčně vyráběný kit Human IL-1 beta ELISA Ready-SET-GO!<sup>®</sup> (eBioscience<sup>™</sup>). Pro stanovení byl dodržen pracovní postup doporučený výrobcem. Absorbance poté byla změřena na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm. Jako kontrolní vzorek byl zvolen extrakt, který neobsahoval žádný metabolit streptomycet (viz 4.2.2.1.).

#### **4.2.3. VLIV VYBRANÝCH EXTRAKTŮ Z BAKTERIÍ RODU *STREPTOMYCES* NA FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITU BUNĚK THP-1**

Všechny následující pokusy byly prováděny v triplicátech. Buňky kultivované v RPMI byly spočítány v Bürkerově komůrce a potřebné množství buněk bylo centrifugováno při 110g po dobu 5 minut. Vzniklý pelet byl rozsuspendován v RPMI tak, aby výsledná koncentrace buněk byla 2.10<sup>6</sup> buněk/ml. Do 96-jamkového panelu byly nasazeny monocyty z linie THP-1 (100 µl na jamku). Následně byly monocyty diferenciovány na makrofágy pomocí PMA tak, že do každé jamky bylo napipetováno 100 µl RPMI s PMA o celkové koncentraci 20 ng/ml. Panel byl umístěn do termostatu a inkubován 48 hodin při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

Po uplynutí inkubační doby byly jamky dvakrát promyty médiem RPMI (odmytí neadherovaných buněk). Následně bylo do každé jamky napipetováno 100 µl média RPMI s extraktem ze streptomycet v příslušném ředění (viz tabulka č. I v 4.2.) Jako kontrolní vzorek byly zvoleny buňky s DMSO (o výsledné koncentraci 1 µl na 100 µl média). Panel byl umístěn do termostatu, kde probíhala preinkubace buněk 2 hodiny při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Po konci inkubace byly vzorky promyty čistým PBS. Do každé jamky bylo přidáno 100 µl roztoku pHrodo (pHrodo<sup>™</sup> *E. coli* BioParticles<sup>™</sup> conjugate for phagocytosis) (o výsledné koncentraci 0,1mg pHrodo). Následovala inkubace 30 minut při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> v termostatu. Po uplynutí

inkubační doby bylo médium odsáno pipetou a vzorky promyty 100  $\mu$ l PBS. K buňkám bylo přidáno 50  $\mu$ l versentrypsinu (0,02 % trypsin, 0,02 % EDTA v PBS) a inkubováno 5 minut při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub> v termostatu. Probíhající trypsinizace byla zastavena přidáním 200  $\mu$ l PBS s 1 % BOFES. Buňky byly sfoukány pipetou a přeneseny do FACS zkumavek. Vzorky byly stočeny v centrifuze 5 minut při 4 °C a 110g. Pelet byl rozsuspendován v 150  $\mu$ l PBS s 1 % BOFES. Fluorescence fagocytovaných pHrodo partikulí byla změřena na průtokovém cytometru .

#### **4.2.4. BOLOGICKÝ TEST PŘÍTOMNOSTI ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK V EXTRAKTECH Z BAKTERIÍ RODU *STREPTOMYCES***

##### **4.2.4.1. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)**

Tenkovrstvá chromatografie probíhala na silikagelovém nosiči s fluorescenčním indikátorem na hliníkové folii (TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck). Vzorky byly na TLC desku nanášeny na startovní linii tak, aby byly minimálně 1,5 cm od okrajů a 1,5 cm od ostatních vzorků. Pomocí mikrostříkačky Hamilton byly nanášeny 10  $\mu$ l vzorků. Jako kontrolní vzorek byly použity extrakty z média bez streptomycet (viz 3.2.2.1.). Po zaschnutí byla TLC folie přenesena do vyvíjecí kolony se směsí benzen:aceton v poměru 3:2 (v:v). Separace probíhala, dokud nebyla mobilní fáze přibližně 1 cm od horního okraje. Fólie byla použita pro biologický test přítomnosti antimikrobiálních látek a následně vyfocena pod UV světlem (254 nm).

##### **4.2.4.2. Biologický test přítomnosti antimikrobiálních látek**

Do čtvercové Petriho misky byla nalita vrstva živného agaru. Po zatuhnutí byla vrstva přelita 30 ml živného agaru, který obsahoval 300  $\mu$ l suspenze endospor *B. subtilis*. Po zatuhnutí byla přiložena čerstvě vyvinutá TLC destička. Po přiložení bylo nutné odstranit případné bubliny, které by bránily difuzi látek. Po 10 minutách byla TLC destička odebrána a miska byla kultivována přes noc při 37 °C. Pokud byly ve vzorku přítomny antimikrobiální látky, následující den bylo možné na miskách pozorovat inhibiční zóny růstu *B. subtilis* v místech, kde tyto látky difundovaly z TLC desky do média.

#### **4.2.5. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Všechny grafy ve výsledcích zobrazují aritmetické průměry ze stanovených hodnot triplikátů a chybové úsečky v grafech představují směrodatnou odchylku. U většiny výsledků byla provedena statistická analýza pomocí jednocestné anovy. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou v grafech označeny hvězdičkami (jedna hvězdička pro  $p < 0,05$ , dvě pro  $p < 0,01$ , tři hvězdičky pro  $p < 0,001$ ). Pouze u pokusu 4.2.1. byla použita dvoucestná anova s Boferroniho testem.

## 5. Výsledky

### 5.1. VLIV BAKTERIÍ RODU *STREPTOMYCES* NA FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITU A PŘEŽÍVÁNÍ BUNĚK THP-1

Cílem tohoto pokusu bylo charakterizovat působení spor pěti různých kmenů streptomycet na fagocytární aktivitu (oxidační vzplanutí) buněk THP-1 a jejich přežívání v přítomnosti spor. Tyto měřené hodnoty byly sledovány v časech 30 a 90 minut od začátku koinkubace.

Při měření fagocytární aktivity bylo stanovováno procento rhodamin123 (rh123)-pozitivních buněk (3.2.1) Ve vzorcích odebraných po 30 minutách došlo k signifikantnímu snížení oproti kontrolnímu vzorku s PBS u buněk koinkubovaných se sporami kmenů TR20 (obr. 2A), TR38 (obr. 3A) a TR24 (obr.4A), TR1 (Obr. 6A). K nejvýznamnějšímu snížení došlo u buněk kultivovaných s TR1. U kmene TR42 (obr. 5A) nedošlo v prvních 30 minutách k signifikantnímu snížení oxidačního vzplanutí. Data jsou shrnuta v tabulce (Tab. II).

Po 90 minutách koinkubace spor streptomycet s buňkami THP-1 byl pozorován další pokles oproti 30 minutám pouze u vzorků s kmeny TR20 a TR42. U ostatních kmenů již nedocházelo k dalšímu snížení fagocytární aktivity. Data jsou shrnuta v tabulce (Tab. II).

Izolát streptomycet	Pokles rh123 pozitivních buněk po 30 minutách (%)	Pokles rh123 pozitivních buněk po 90 minutách (%)
TR1	83,4	82,74
TR20	21,1	48,7
TR24	71,3	72,4
TR38	72,2	75,1
TR42	1,6	16,5

Tab. II.: Pokles množství aktivovaných buněk THP-1 produkujících ROS (rh123 pozitivní) 30 a 90 minut po začátku inkubace se sporami izolátů streptomycet v porovnání se vzorky s PBS.

Pro měření životnosti buněk THP-1 byl použit propidium jodid (PI). Měřené hodnoty vyjadřují procento PI-pozitivních buněk. Ve vzorcích odebraných po 30 minutách došlo k signifikantnímu zvýšení PI-pozitivních buněk u buněk kultivovaných s TR 24 (obr. 4B), TR 38 (obr. 3B) a s TR 1 (obr. 6B) oproti kontrolnímu vzorku s PBS. U kmenů TR 20 (obr. 2B) a

TR 42 (obr. 5B) nebyla naměřena statisticky významná změna oproti kontrole s PBS. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulce (Tab.III).

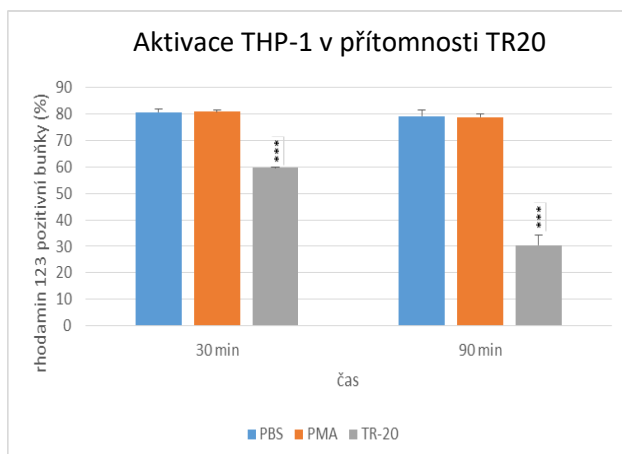
Při měření po 90 minutách koinkubace došlo u všech kmenů k signifikantnímu zvýšení počtu PI-pozitivních buněk u všech vzorků se streptomycetami oproti kontrole s PBS. U kmene TR 20 došlo ke zvýšení (obr. 2B), u TR38 (obr. 3B), u TR24 (obr. 4B), u TR42 (obr. 5B) a u TR1 (obr. 6B). Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulce (Tab.III).

Izolát streptomycet	Zvýšení PI pozitivních buněk po 30 minutách (%)	Zvýšení PI pozitivních buněk po 90 minutách (%)
TR1	77,4	85,4
TR20	0,6	23,5
TR24	41,4	60,4
TR38	18,3	32,7
TR42	1,7	48,1

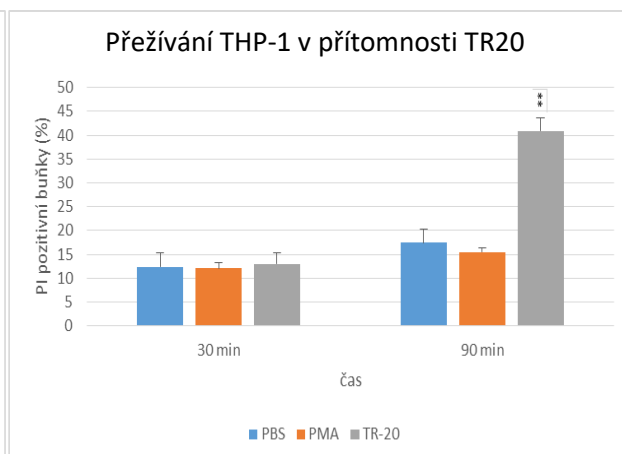
Tab. III.: Zvýšení podílu mrtvých (PI pozitivních) buněk 30 a 90 minut po začátku inkubace se sporami izolátů streptomycet v porovnání se vzorky s PBS.

Cytotoxický efekt některých kmenů (TR1, TR24, TR38) se projevil již po 30 minutách a v čase přibývalo procento PI pozitivních buněk. Kmeny TR20 a TR42 nebyly po 30 minutách pro buňky THP-1 toxické, ale po 90 minutách inkubace se u nich již cytotoxický efekt na makrofágy projevil.

A

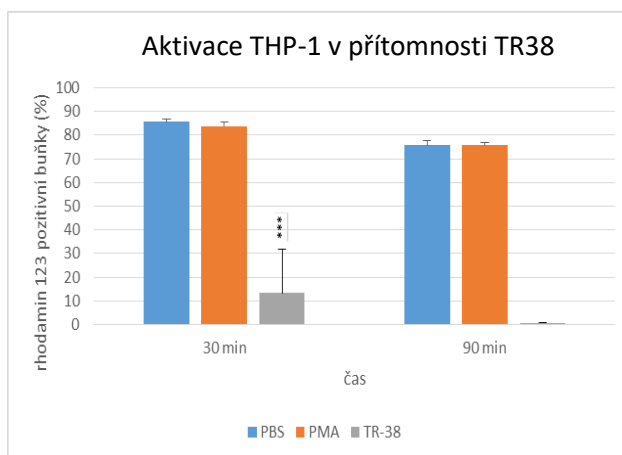


B

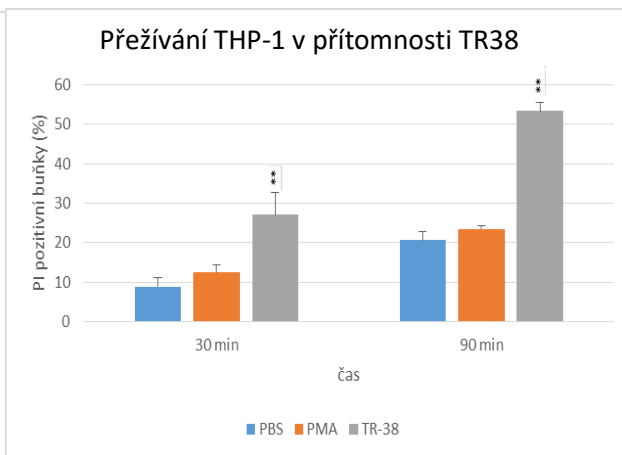


Obr. 2: Procento aktivovaných (rhodamin123-pozitivních) (A) a mrtvých (PI-pozitivních) (B) buněk z linie THP-1 v časových intervalech 30 a 90 minut při kultivaci s kmenem TR20 a k tomu odpovídající kontroly PBS a PMA.

A



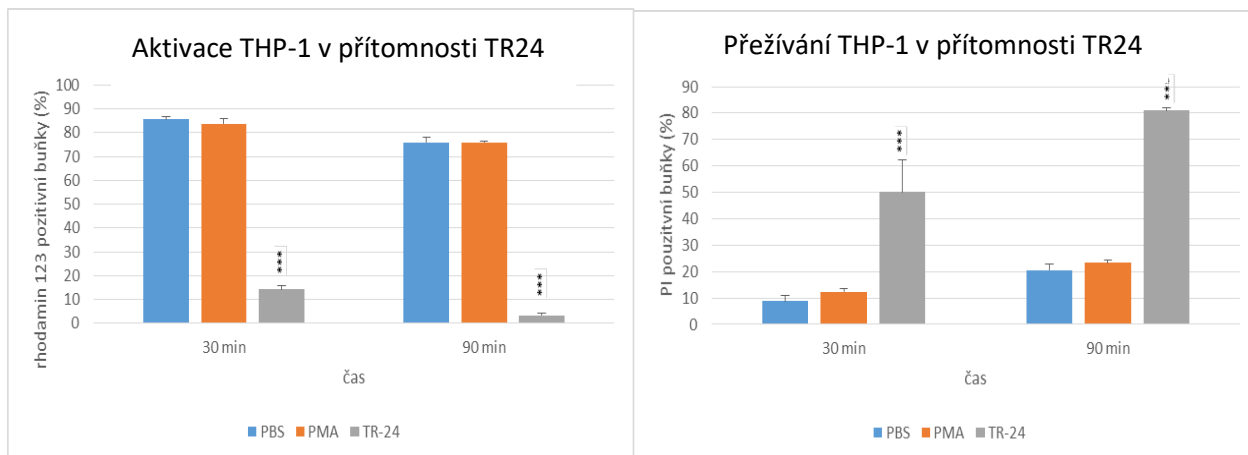
B



Obr. 3: Procento aktivovaných (rhodamin123-pozitivních) (A) a mrtvých (PI-pozitivních) (B) buněk z linie THP-1 v časových intervalech 30 a 90 minut při kultivaci s kmenem TR38 a k tomu odpovídající kontroly PBS a PMA.

A

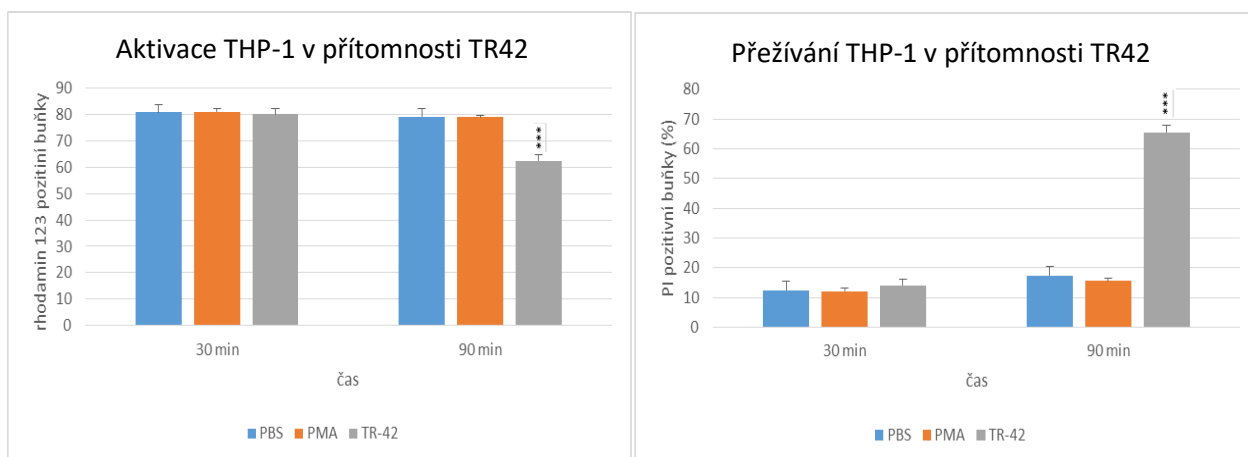
B



Obr. 4: Procento aktivovaných (rhodamin123-pozitivních) (A) a mrtvých (PI-pozitivních) (B) buněk z linie THP-1 v časových intervalech 30 a 90 minut při kultivaci s kmenem TR24 a k tomu odpovídající kontroly PBS a PMA.

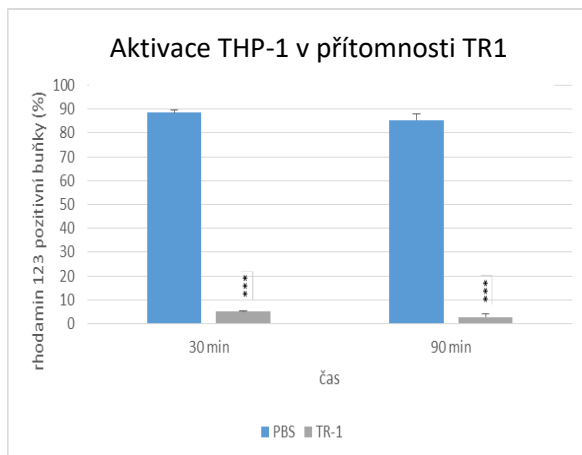
A

B

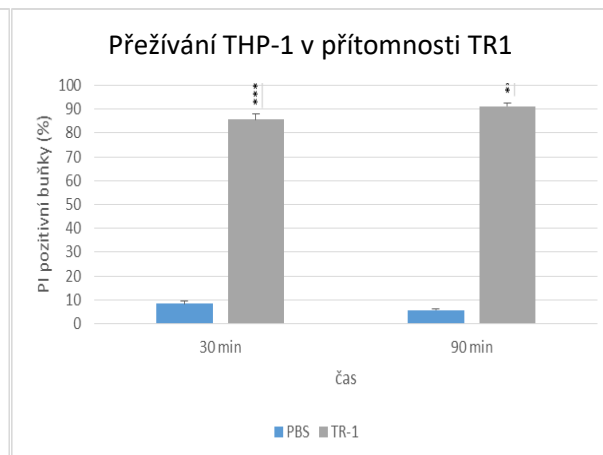


Obr. 5: Procento aktivovaných (rhodamin123-pozitivních) (A) a mrtvých (PI-pozitivních) (B) buněk z linie THP-1 v časových intervalech 30 a 90 minut při kultivaci s kmenem TR42 a k tomu odpovídající kontroly PBS a PMA.

A



B



Obr. 6: Procento aktivovaných (rhodamin123-pozitivních) (A) a mrtvých (PI-pozitivních) (B) buněk z linie THP-1 v časových intervalech 30 a 90 minut při kultivaci s kmenem TR20 a k tomu odpovídající kontrola PBS.

## 5.2. VLIV EXTRAKTŮ METABOLITŮ Z BAKTERIÍ RODU *STREPTOMYCES* NA PRODUKCI TNF A IL-1 $\beta$ BUŇKAMI LINIE THP-1

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zdali stacionární mycelia vybraných kmenů produkují látky, které ovlivňují produkci TNF a IL-1 $\beta$  buňkami THP-1. TNF a IL-1 $\beta$  jsou oba významnými prozánětlivými faktory, které jsou produkovány převážně makrofágy. TNF dosahuje nejvyšších koncentrací přibližně 4 hodiny po infikování makrofágů, zatímco IL-1 $\beta$  přibližně po 24-48 hodinách.

V této sérii pokusů byly použity pouze 3 kmeny streptomycet: TR1 - jeho spory vykazovaly při kokultivačních experimentech vůči THP-1 nejvyšší cytotoxicitu, TR 24 s nejnižší cytotoxicitou spor a TR 38 jako jediný „neplicní“ izolát (děloha po císařském řezu).

V návaznosti na tento pokus bylo extrahováno 20 extraktů sekundárních metabolitů ze streptomycet kultivovaných za různých kultivačních podmínek. U těchto extraktů jsme nejprve zjišťovali jejich maximální možné koncentrace bez cytotoxického efektu na THP-1 buňky. U každého kmeny byly provedeny 2 druhy extrakce, kterými jsme získali polární (M) a napolární látky (Et-Ac) (viz bod 4.2.2.1). Pro každý kmen byly provedeny 3 různé kultivace. První kultivace v GYMu – látky, které kmen produkuje při standardní kultivaci (GYM). Při



druhé kultivaci byly streptomycety vystaveny interakci s THP-1, sledovali jsme vliv kokultivace s THP-1 v RPMI médiu na produkci imunomodulačních látek streptomycetou v následné fermentaci (GYM+RPMI+THP1). Třetí kultivace byla kontrolní pro stanovení vlivu samotného RPMI média na metabolický profil streptomycety (GYM+RPMI).

S využitím fluorescenčního barviva AlamarBlue™ Cell Viability Reagent byly stanoveny nejvyšší netoxické koncentrace extraktů (tab. IV) (viz bod 4.2.2.3).

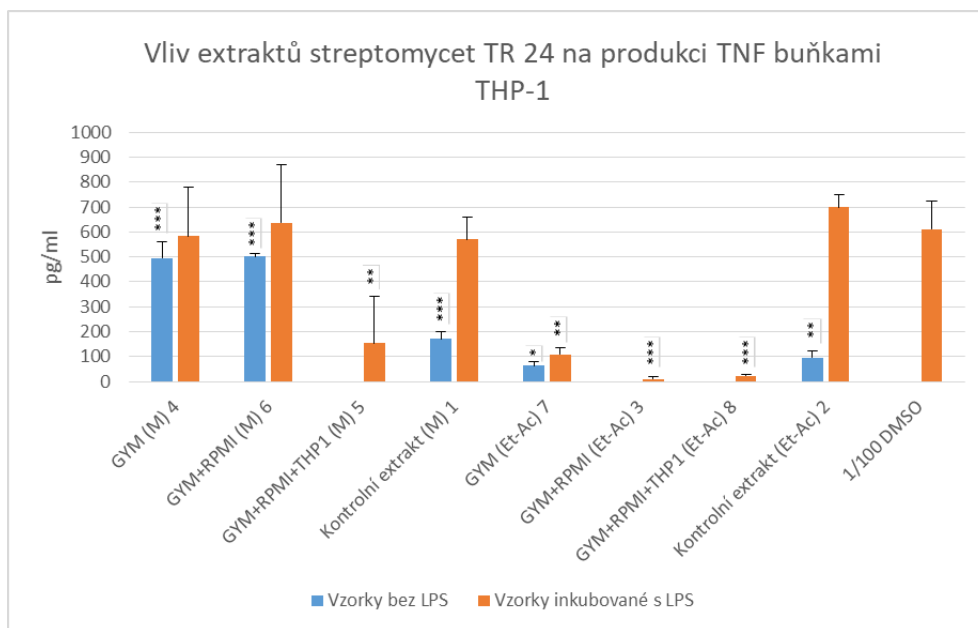
Kmen	Extrakt	číslo vzorku	Netoxická koncentrace (%)
TR24	GYM (M)	4	1
TR24	GYM+RPMI (M)	6	0,5
TR24	GYM+RPMI+THP1 (M)	5	0,5
TR24	GYM (Et- Ac)	7	1
TR24	GYM+RPMI (Et- Ac)	3	1
TR24	GYM+RPMI+THP1 (Et- Ac)	8	1
TR1	GYM (M)	10	0,5
TR1	GYM+RPMI (M)	13	1
TR1	GYM+RPMI+THP1 (M)	14	1
TR1	GYM (Et- Ac)	9	0,5
TR1	GYM+RPMI (Et- Ac)	12	1
TR1	GYM+RPMI+THP1 (Et- Ac)	11	1
TR38	GYM (M)	17	1
TR38	GYM+RPMI (M)	19	1
TR38	GYM+RPMI+THP1 (M)	16	1
TR38	GYM (Et- Ac)	20	1
TR38	GYM+RPMI (Et- Ac)	18	0,5
TR38	GYM+RPMI+THP1 (Et- Ac)	15	0,5
	1/100 DMSO	-	1
	Kontrolní extrakt (M)	1	1
	Kontrolní extrakt (Et-ac)	2	1

Tab. IV: Nejvyšší koncentrace extraktů bez pozorovaného cytotoxického efektu na buňky THP-1.

Produkce TNF byla sledována 4 hodiny po přidání extraktů. U neaktivovaných buněk – tj. vzorky, které obsahovaly pouze DMSO, nebyla detekována žádná produkce TNF. Aktivované buňky – tj. buňky s DMSO a LPS, produkovaly TNF. Kontrolní extrakty bez streptomycet způsobovaly u vzorků bez LPS signifikantní zvýšení produkce TNF buňkami THP-1 (viz bod 4.2.2.3). Kontrolní extrakt (M) 1 i kontrolní extrakt (Et-Ac) 2 z média

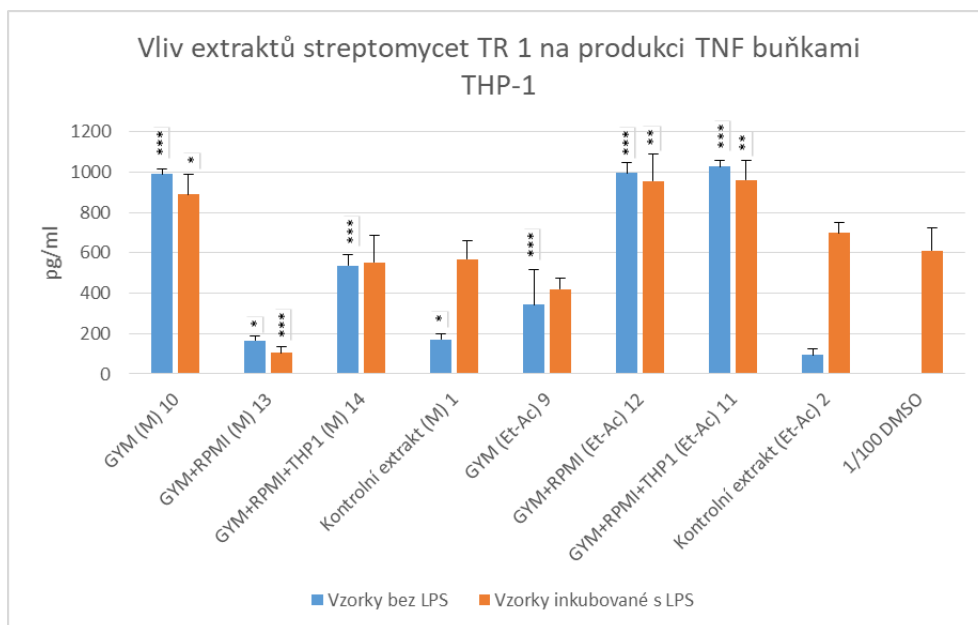
způsoboval mírné zvýšení koncentrace TNF (obr. 7, obr. 8, obr. 9). Tyto dva extrakty však nezpůsobovaly signifikantní změnu hladiny TNF u buněk aktivovaných LPS.

Extrakty z kmene TR24 měly odlišný vliv na neaktivované a aktivované THP-1 buňky. U neaktivovaných buněk docházelo k signifikantnímu zvýšení hladiny TNF oproti vzorku s DMSO u extraktů GYM (M) 4, GYM + RPMI (M) 6 a GYM (Et-Ac) 3 (obr. 7). U aktivovaných buněk jsme sledovali silný protizánětlivý efekt – hladina TNF se oproti vzorku s DMSO snižovala u všech extraktů nepolárních látek (GYM (Et-Ac) 7, GYM + RPMI (Et-Ac) 3, GYM + RPMI + THP1 (Et-Ac) 8), u polárních pouze po kokultivaci (GYM + RPMI + THP1 (M) 5) (obr. 7).



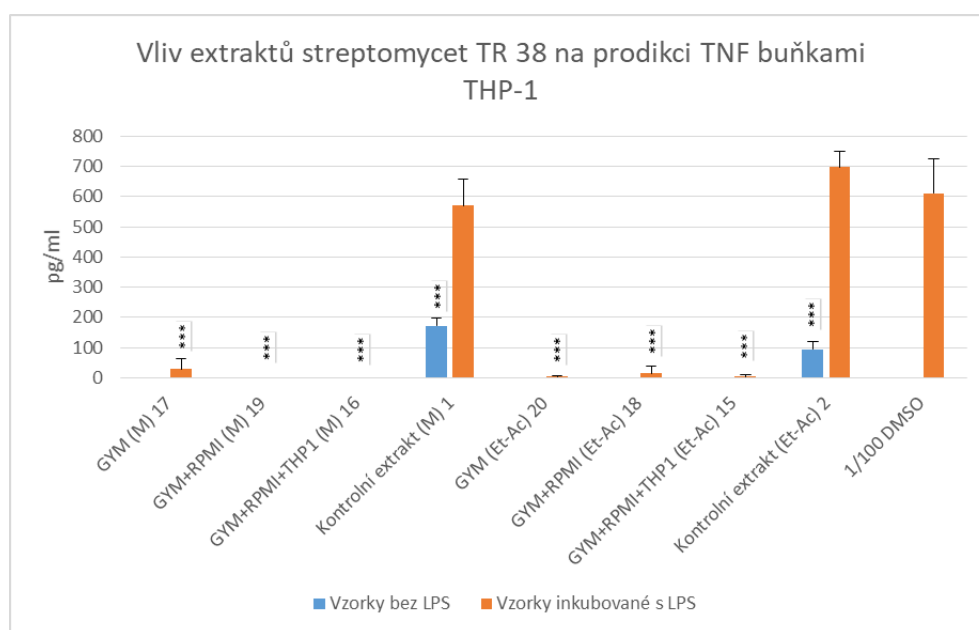
Obr. 7: Vliv extraktů streptomycet z kmene TR 24 na produkci TNF buňkami THP-1 po 4 hodinách inkubace.

Všechny extrakty z kmene TR 1 měly na produkci TNF buňkami THP-1 podobný vliv. U neaktivovaných buněk docházelo k signifikantnímu zvýšení hladiny TNF u všech vzorků oproti vzorku s DMSO. K nejvyššímu zvýšení hladiny TNF došlo u vzorků GYM (M) 10, GYM +RPMI (Et-Ac) 12 a GYM + RPMI + THP1 (Et-Ac) 11 (obr. 8). U aktivovaných buněk došlo pouze u vzorku GYM + RPMI (M) 14 k signifikantnímu snížení hladiny TNF oproti kontrole s DMSO (obr. 8).



Obr. 8: Vliv extraktů streptomycet z kmene TR1 na produkci TNF buňkami THP-1 po 4 hodinách inkubace.

Polární i nepolární extrakty ze streptomycetového kmene TR38 měly podobný vliv na produkci TNF buňkami THP-1. U neaktivovaných buněk docházelo k produkci TNF pouze u kontrolních extraktů. U vzorků inkubovaných s LPS docházelo u všech vzorků s extrakty streptomycet k signifikantnímu poklesu hladiny TNF oproti vzorku s DMSO. U všech vzorků s extrakty toho kmene docházelo k naprosto minimální až žádné produkci TNF oproti kontrolnímu vzorku s DMSO, extrakty tedy obsahovaly látky silně tlumící zánětlivou reakci makrofágů. (obr. 9).

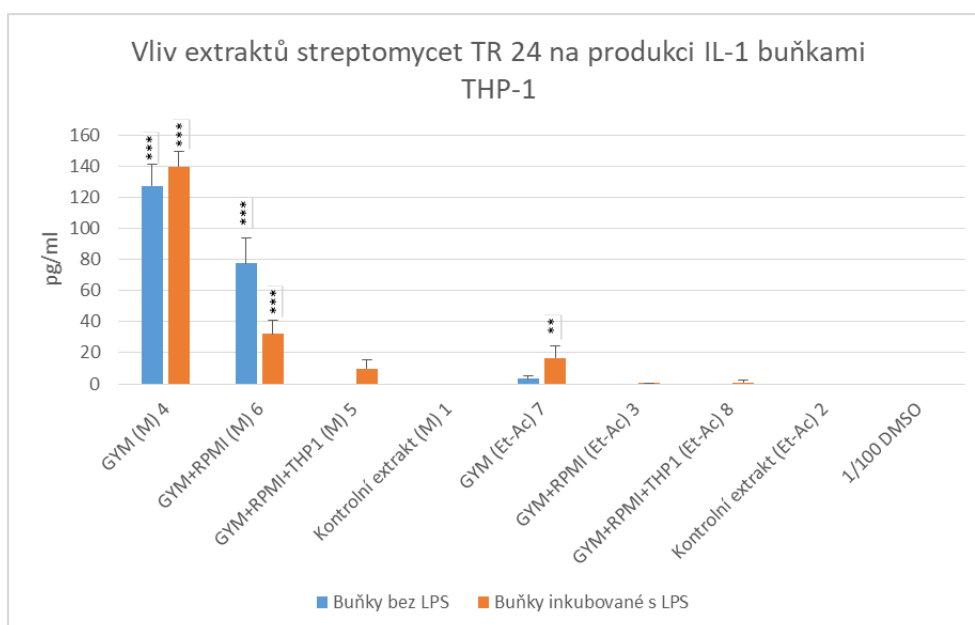


Obr. 9: Vliv extraktů streptomycet z kmene TR 38 na produkci TNF buňkami THP-1 po 4 hodinách inkubace.

Dále byl charakterizován vliv extraktů ze streptomycet na produkci IL-1 $\beta$ . Produkce IL-1 $\beta$  byla sledována 24 hodin po přidání extraktů. Obecně extrakty ovlivňovaly produkci IL-1 $\beta$  výrazně méně než TNF. U vzorku s DMSO, kontrolního extraktu (M) 1 a kontrolního extraktu (Et-Ac) 2 nebyla detekována žádná hladina IL-1 $\beta$ , a to ani v případě aktivace buněk THP-1 pomocí LPS. U tohoto pokusu bylo sledováno, zda extrakty streptomycet dokáží ovlivňovat produkci IL-1 $\beta$  u neaktivovaných, nebo alespoň u aktivovaných buněk.

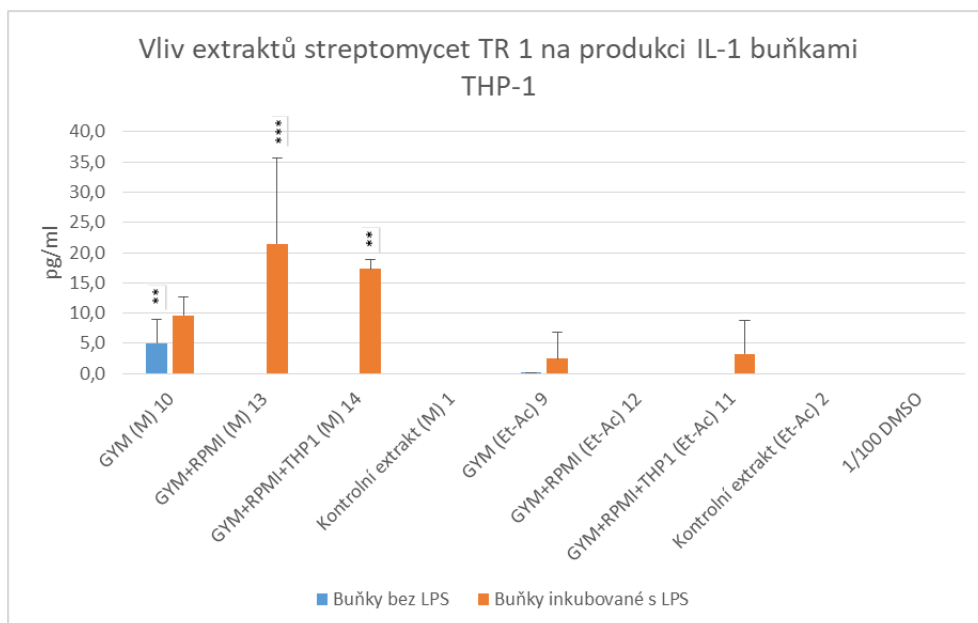
K nejsilnější indukci produkce IL-1 $\beta$  docházelo u extraktů z kmene TR 24. Celkem 3 extrakty signifikantně indukovaly produkci IL-1 $\beta$  i u neaktivovaných buněk. Nejvyšší detekovaná koncentrace byla u vzorku GYM (M) 4, následované GYM + RPMI (M) 6, GYM (Et-Ac) 7 indukoval produkci IL-1 $\beta$  v porovnání s předchozími metabolity málo, ale oproti kontrolám stále signifikantně. U ostatních vzorků nebylo detekováno zvýšení hladiny IL-1 $\beta$  (obr. 10).

U vzorků inkubovaných s LPS byla detekováno signifikantní zvýšení produkce IL-1 $\beta$  celkem u 3 extraktů. Opět nejvýrazněji u vzorku s extraktem GYM (M) 4 GYM + RPMI (M) 6 a GYM (Et-Ac) 7. U aktivovaných buněk docházelo u extraktu GYM+RPMI+THP1 (M) 5 k indukci produkce IL-1 $\beta$ , ale zvýšení oproti kontrolnímu vzorku s DMSO nebylo statisticky signifikantní.



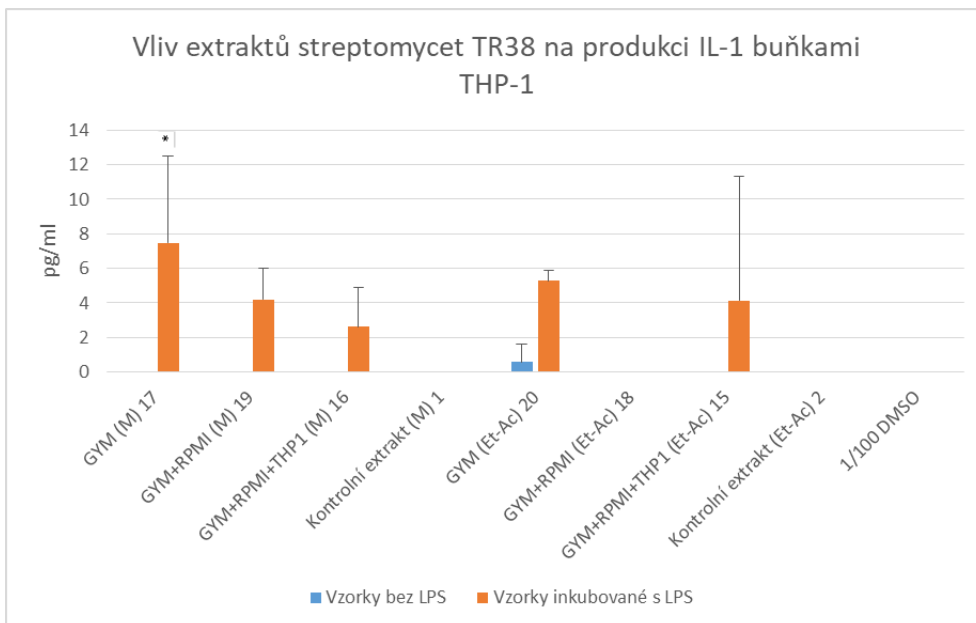
Obr. 10: Vliv extraktů streptomycet z kmene TR 24 (přidaných v poměrech viz tab. I) na produkci IL-1 $\beta$  buňkami THP-1 po 24 hodinách inkubace.

U kmene TR 1 jsme spíše žádné signifikantní změny nesledovali oproti kontrolám, pouze u vzorku GYM (M) 10 došlo k produkci IL-1 $\beta$ . U ostatních neaktivovaných nebyla naměřena statisticky významná změna (obr. 11). U vzorků s LPS došlo k mírnému zvýšení celkem u dvou vzorků, a to GYM + RPMI (M) 13 a GYM + RPMI + THP1 (M) 14. Ke zvýšení hladiny IL-1 $\beta$  došlo i u dalších vzorků s extrakty, ale to již nebylo statisticky významné oproti kontrolním vzorkům (obr. 11).



Obr. 11: Vliv extraktů streptomycet z kmene TR 1 na produkci IL-1  $\beta$  buňkami THP-1 po 24 hodinách inkubace.

Vzorky kultivované s kmenem TR38 podobně jako v případě detekce TNF obsahovaly menší množství IL-1 $\beta$  oproti vzorků s jinými kmeny streptomycet (řádově i 10x nižší než TR 24). Pouze jediný vzorek s extraktem GYM (Et-Ac) 20 obsahoval menší množství IL-1 $\beta$ , ale toto množství nebylo statisticky významné (obr. 12). V kombinaci extraktů s LPS byla detekována nižší koncentrace IL-1 $\beta$  u většiny vzorků, ale pouze u GYM (M) 17 byla naměřená mírně zvýšená hodnota oproti kontrolám (obr. 12)



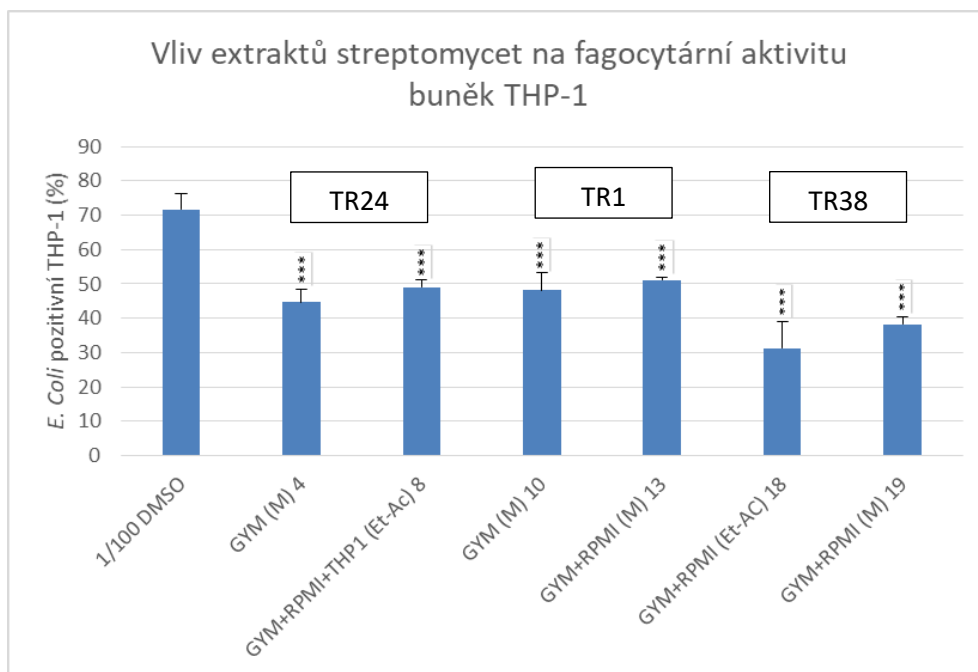
Obr. 12: Vliv extraktů streptomycet z kmene TR 38 na produkci IL-1 $\beta$  buňkami THP-1 po 24 hodinách inkubace.

### **5.3. VLIV VYBRANÝCH EXTRAKTŮ Z BAKTERIÍ RODU *STREPTOMYCES* NA FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITU BUNĚK THP-1**

Po provedení předcházejících pokusů bylo vybráno celkem 6 extraktů streptomycet, které dle předchozích výsledků zásadně měnily produkci prozánětlivých markerů makrofágy THP-1 – po dvou od každého ze 3 kmenů streptomycet (GYM (M) 4, GYM+RPMI+THP1 (Et-Ac) 8, GYM (M) 10, GYM+RPMI (M) 13, GYM+RPMI (Et-Ac) 18, GYM+RPMI (M)19). Buňky THP-1 byly navíc preaktivovány pomocí PMA 48 hodin před přidáním extraktů tak, aby došlo k jejich diferenciaci na makrofágy. Makrofágy byly následně 2 hodiny preinkubovány s extrakty ze streptomycet. Fagocytární aktivita byla měřena pomocí metody s pHrodo (viz. bod 4.2.3) v čase 30 minut od přidání *E. coli* značené pH-senzitivní molekulou pHrodo. Cílem pokusu bylo zjistit vliv extraktů streptomycet na fagocytární aktivitu THP-1.

S využitím fluorescenčního značení *E. coli* bylo zjištěno, že všechny extrakty významně snižovaly množství fagocytujících THP-1 při porovnání s kontrolním vzorkem obsahujícím pouze DMSO (obr. 13). K nejvyššímu snížení fagocytární aktivity THP-1 došlo v přítomnosti extraktu kmene TR 38 - GYM+RPMI (Et-Ac) 18 (o 39,8 %) a GYM + RPMI (M) 19 (o 33,4 %), naopak k nejnižšímu snížení došlo u extraktů kmene TR 1 - GYM + RPMI (M) 13 (20,6 %). U ostatních vzorků také došlo k signifikantnímu poklesu fagocytární aktivity THP-1 (obr. 13). Tento pokus byl dvakrát opakován s obdobnými výsledky.

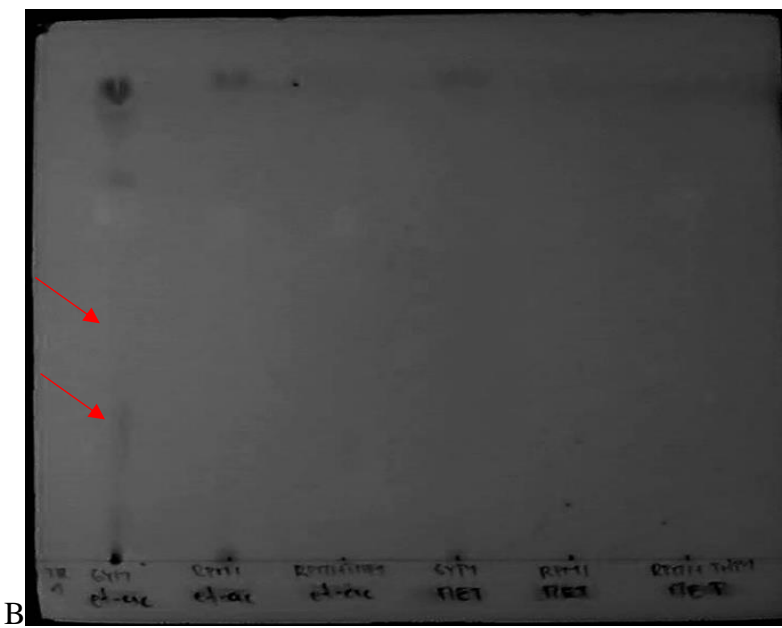
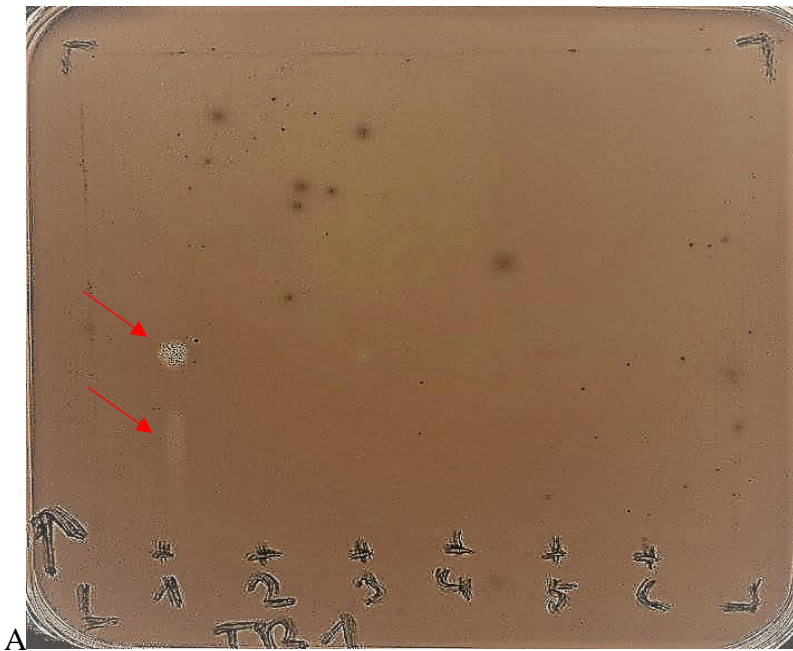




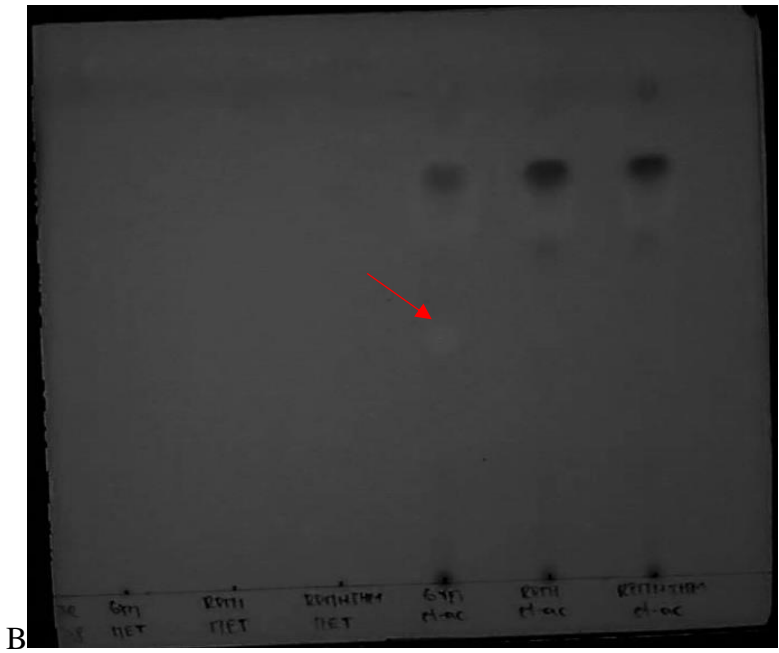
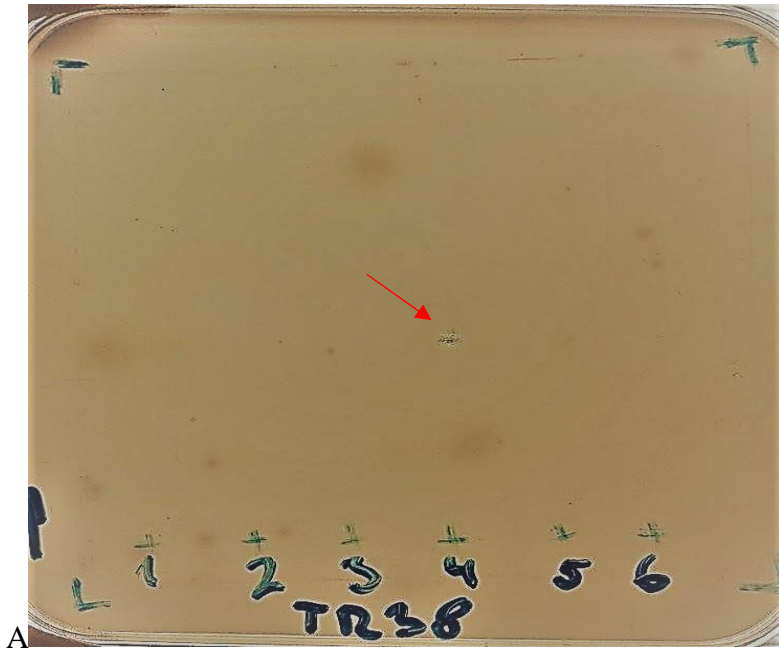
Obr. 13: Fagocytární aktivita makrofágů THP-1 v přítomnosti extraktů ze streptomycet v čase 30 minut po přidání *E. coli*.

#### 5.4. BIOLOGICKÝ TEST PŘÍTOMNOSTI ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK V EXTRAKTECH Z BAKTERIÍ RODU *STREPTOMYCES*

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda se v extraktech metabolitů streptomycet nacházejí i látky s antimikrobiálním účinkem. Použité metody (viz. kapt.4.2.4). Testovaným mikroorganismem byl *Bacillus subtilis subsp. Spizizenii* ATCC 6633, který je obecně citlivý na látky s mikrobiálním účinkem. Přítomnost látek s antimikrobiálními účinky jsme pozorovali pouze u 2 extraktů, a to u extraktů nepolárních látek z kmenů TR1 a TR38 (obr. 14A, obr. 15A). Spolu s nimi byly vyfoceny TLC destičky s příslušnými extrakty (obr. 14B, obr. 15B). U ostatních extraktů nebyla antimikrobiální aktivita detekována.



Obr. 12: Antimikrobiální aktivita extraktů ze streptomycet kmene TR 1 proti *B. subtilis* (A) a TLC destičky po eluci extraktů při osvětlení UV (B).



Obr. 13: Antimikrobiální aktivita extraktů ze streptomycet kmene TR 38 proti *B. subtilis* (A) a TLC destičky po eluci extraktů při osvětlení UV (B).

## 6. Diskuze

Bakterie rodu *Streptomyces* nejsou prozatím považovány za závažné patogeny člověka. Vědecky je podloženo pouze několik druhů streptomycet, které mohou vyvolat nebo se podílet na vzniku infekce. Do první obranné linie člověka při infekčních bakteriálních onemocněních patří makrofágy, které jsou účinnou ochranou proti patogenům.

Hlavním cílem mé práce bylo charakterizovat vztah mezi bakteriemi rodu *Streptomyces*, které byly izolovány z lidských tkání a lidských monocytárních buněk z linie THP-1, se zaměřením na fagocytární aktivitu THP-1 a produkci vybraných prozánětlivých látek.

### 6.1. Vliv bakterií rodu *Streptomyces* na fagocytární aktivitu a přežívání buněk z linie THP-1

Pro charakteristiku fagocytární aktivity buněk THP-1 bylo použito 5 odlišných kmenů streptomycet izolovaných z lidských tkání (TR1, TR20, TR24, TR38 a TR42). V prvním pokusu byly použity exospory těchto streptomycetových kmenů. Jednak je to pravděpodobně forma, která vstupuje do lidského organismu první – např. vdechnutím do plic - a první tak přichází do kontaktu s buňkami imunitního systému. Hustotu sporové suspenze je navíc možné snadno kvantifikovat a celou metodiku standardizovat, abychom mohli porovnat efekt jednotlivých kmenů. U mycelií je kvantifikace podstatně složitější. Metoda se zakládala na principu měření rh123 vzniklého oxidací z DHR123 během oxidativního vzplanutí THP-1 buněk po interakci se sporami streptomycet. Ve všech případech interakce THP-1 se sporami způsobila pokles oxidativního vzplanutí. Pokles produkce ROS byl ale částečně způsoben i sníženou životností buněk THP-1 během pokusu, která byla u některých vzorků signifikantně nižší.

Při vyhodnocování toho pokusu se nedalo určit, jak velký byl dopad na sníženou oxidaci DHR123 způsobený cytotoxicitou streptomycet. Zároveň s tím jsme ani nebyli schopni určit, zda snížené množství rh123 pozitivních buněk nemohlo být způsobené například antioxidantním potenciálem sekundárních metabolitů streptomycet – mohlo tedy docházet k fagocytóze u většího množství buněk, ale sekundární metabolit mohl zabránit oxidaci fluorescenčního barviva. Příkladem takové látky může být například MUSC 164<sup>T</sup>, která je významná pro svůj antioxidantní potenciál (Hooi-leng et al. 2016). Spory streptomycet mohly také obsahovat další látky, které interagovaly s rh123/DHR123, a tím ovlivnily

výsledek pokusu. V již publikovaných pracích byly popsány extrakty streptomycet (konkrétně kmenů *Streptomyces sp.* MUSC 137 a MUM 256), které měly antioxidační a zároveň cytotoxické účinky (Ser et al. 2017). Tyto trendy se sice shodují s našimi výsledky, ale je potřeba si uvědomit, že spory streptomycet při germinaci neprodukuje příliš mnoho sekundárních metabolitů, naše výsledky mohou být způsobeny například některou ze složek buněčné stěny streptomycet. Horší přežívání THP-1 může být též způsobeno intenzivní metabolickou aktivitou streptomycet při germinaci exospor a počátku vláknitého růstu. Odpadní produkty bakteriálního metabolismu mohou chování a životnost THP-1 též ovlivňovat.

Z výsledků prvního pokusu můžeme usuzovat, že streptomycety mají cytotoxický vliv na buňky THP-1 a u některých kmenů byl pozorovaný imunomodulační účinek způsoben jen vysokým cytotoxickým efektem spor (např. kmen TR1).

Situace je odlišná u kmene TR20, kde po 30 minutách sledujeme signifikantní snížení množství rh123 pozitivních buněk, ale přitom nedochází k významnému snížení přežívání THP-1. Dá se tedy konstatovat, že pozorované imunomodulační účinky nejsou způsobeny pouze cytotoxickým efektem spor, ale i dalšími interakcemi mezi spory TR20 a THP-1.

## **6.2. Vliv extraktů sekundárních metabolitů z bakterií rodu *Streptomyces* na produkci TNF a IL-1 $\beta$ buňkami THP-1**

Dalším cílem práce bylo extrahovat metabolity ze stacionárních kultur streptomycet. Můžeme předpokládat, že při kolonizaci hostitelské tkáně vyrůstá z exospor mikrokolonie, která interaguje s imunitním systémem jak na úrovni přímých interakcí buněk, tak prostřednictvím produkce biologicky aktivních sekundárních metabolitů. Modelovým stádiem vývoje pro tyto interakce je tedy stacionární kultura, pro níž je produkce sekundárních metabolitů s adaptivní funkcí typická. Pro stanovení imunomodulačních aktivit extraktů sekundárních metabolitů vybraných kmenů bylo důležité nejprve určit jejich maximální netoxické koncentrace. Celkem byly extrahovány metabolity z 3 různých inkubací streptomycet. První sada vzorků byla extrahována z běžné kultivace streptomycet – v tekutém médiu GYM, tak jak se obvykle v laboratoři produkce sekundárních metabolitů sleduje. Zajímalo nás také, zda v přítomnosti buněk THP-1 nemění streptomycety svůj metabolický profil a to především produkci imunomodulačních látek. Abychom vyloučili případný vliv změněného metabolismu kultury při kultivaci inokula v nutričně bohatém tkáňovém médiu

RPMI, zahrnuli jsme též, jako negativní kontrolu, přípravu inokula v samotném RPMI bez přídavku THP-1.

Po stanovení bezpečné koncentrace metabolitů, jsme se zaměřili na další cíl této práce, a to vliv extraktů streptomycet na produkci TNF. Streptomycety produkují celou řadu látek, které ovlivňují imunitní systém, jako je například dnes celkem běžně používané imonosupresivum takrolimus FK506 (Martinez-Castro et al. 2001). Vliv purifikovaných metabolitů pocházejících z bakterií streptomycet na produkci prozánětlivých cytokinů makrofágy, již byl dříve sledován např. u *SUC1* (Taechowican et al. 2008) nebo u Manumycinu A (Cecrdlova et al 2016). U *SUC1* byl popsán negativní dopad na produkci prozánětlivých faktorů jako je TNF a IL-1 $\beta$ . Podobných výsledků bylo dosaženo i v mé práci, kde vlivem některých extraktů došlo z signifikantnímu poklesu produkce TNF buňkami THP-1, ačkoliv je zde i skupina extraktů s opačným účinkem. Zatím bohužel nevíme, jestli tyto schopnosti produkční kmeny využívají při kolonizaci tkání živočichů.

V této práci byl ovšem negativní dopad extraktů na produkci TNF prokázán pouze u některých extraktů. Tyto výsledky mohou mít několik příčin. Extrakt je směs mnoha různých metabolitů, které mohou mít jak prozánětlivé tak protizánětlivé účinky, ale nemusí také obsahovat žádné imunomodulační látky. Na výsledném vlivu extraktů na produkci cytokinů se tedy může podílet hned několik látek, které mohou působit synergicky i antagonisticky. Extrakcí methanolem a ethyl-acetátem byly metabolity rozděleny do dvou základních frakcí dle polarity. Na výsledném chování extraktů se podílely i látky pocházející z kultivačních médií. Kontrolní extrakty bez metabolitů streptomycet prokázaly, že i extrakty ze samotných médií obsahovaly látky, které posilovaly produkci TNF.

Zvýšení produkce TNF u neaktivovaných buněk bylo způsobeno částečně látkami z kultivačních médií a částečně látkami produkovanými streptomycetami. Případné snížení hladiny TNF u preaktivovaných buněk bylo pravděpodobně způsobeno metabolity ze streptomycet.

U kmene TR 24 došlo k signifikantnímu zvýšení TNF u vzorků GYM (M) 4 a GYM+RPMI (M) 6, tyto extrakty tedy obsahovaly látky, které dokázaly samy o sobě pozitivně ovlivnit produkci TNF. Zajímavým zjištěním bylo, že extrakt GYM+RPMI+THP1 (M) 5 na rozdíl od zbylých dvou vzorků obsahující polární látky nezpůsobil produkci TNF, ale naopak zabránit jeho produkci i v případě aktivovaných buněk. Tyto hodnoty mohly být způsobeny právě změnou metabolomu v přítomnosti THP-1. Můžeme spekulovat, že kmen po

kontaktu s makrofágy vypíná produkci látek zvyšujících jejich aktivitu, aby se sám chránil před jejich atakem. Pro potvrzení této hypotézy by bylo ale potřeba dalšího výzkumu. Nepolární extrakty měly velmi podobný efekt, kdy nejenže samy o sobě neindukovaly produkci TNF, ale zabránily i produkci TNF aktivovanými makrofágy. U kmenu TR 1 bylo zjištěno, že všechny nepolární a většina jeho polárních extraktů má pozitivní efekt na produkci TNF buňkami THP-1 jak u aktivovaných, tak i neaktivovaných buněk. Mají tedy silně prozánětlivý efekt. Jen extrakt získaný po kultivaci inokula v „prázdném“ RPMI (GYM+RPMI (M) 14) dokázal signifikantně snížit produkci TNF u aktivovaných buněk.

Naopak všechny extrakty z kmene TR38 působily podobně a téměř eliminovaly produkci TNF a to i u aktivovaných buněk. Vzhledem k poklesu produkce TNF v obou způsobech extrakce metabolomu streptomycet by tento kmen mohl produkovat více různých protizánětlivých látek, jako jsou například lainsai A-D izolované ze *Streptomyces sp. SUC1* a cyklický peptid SEK-1005 izolovaný ze *Streptomyces nobilis* (Taechowican et al 2008; Kuriyama et al. 2000), případně produkovat jednu protizánětlivou látku, která se objevuje v obou typech extraktů. Kmen TR38 tedy vykazuje nejsilnější protizánětlivé schopnosti, a to bez ohledu na předchozí kokultivaci s THP-1. Jedná se o jediný izolát z lidské dělohy. Nedávno byla publikována kontroverzní práce, která zpochybňuje sterilitu dělohy (Callado et al. 2016). Vědcům se podařilo v plodové vodě skupiny náhodně vybraných těhotných žen identifikovat přítomnost celé řady bakterií, zejména druhu *Propionibacterium*, ale též *Staphylococcus* a *Streptomyces*. Spekuluji o možné primární kolonizaci plodu již v děloze a o vlivu tohoto iniciálního mikrobiomu na kontrolu dalšího osidlování trávicího traktu novorozence symbiotickými bakteriemi. Pokud se výsledky této práce dále potvrdí, je možné, že izolovaný kmen TR38 může patřit do přirozené mikrobiální flory dělohy. Produkce protizánětlivých látek by pak mohla být benefitem nejen pro jeho pobyt v lidském těle, ale i pro rozvíjející se lidský plod.

Kromě stanovení vlivu extraktů streptomycet na množství TNF v supernatantech odebraných po 4 hodinách jsme sledovali též vliv extraktů streptomycet na produkci IL-1 $\beta$  buňkami THP-1. V dosud publikovaných pracích (Yang et al. 2008, Taechowisan et al. 2016) byly indukovány signifikantní hladiny IL-1 $\beta$  pomocí LPS (o koncentraci 1 $\mu$ g/ml a kultivaci 24 hodin při 37°C). V mé práci se ale bohužel nepodařilo u kontrolních vzorků dosáhnout signifikantní produkce IL-1 $\beta$  pomocí LPS aktivace makrofágů. Na druhou stranu u

aktivovaných buněk dokázaly extrakty v některých případech indukovat produkci IL-1 $\beta$ , ačkoliv nebyla detekována signifikantní hladina IL-1 $\beta$  u vzorku s extraktem bez LPS. V těchto případech pravděpodobně došlo k synergickému působení extraktů a LPS na produkci IL-1 $\beta$ . Celkově ale byl význam vlivu extraktů na produkci IL-1 $\beta$  nižší než na TNF.

Vzhledem k nulovému množství IL-1 $\beta$ , v supernatantech preaktivovaných kontrolních vzorcích, bohužel nebylo možné ověřit, zda nemají některé extrakty protizánětlivý účinek a zda negativně ovlivňují produkci IL-1 $\beta$ . Snížené hladiny IL-1 $\beta$  u buněk inkubovaných s LPS a sekundárními metabolity streptomycet v porovnání se vzorky pouze s LPS bylo popsáno například u monocyklického terpenu izolovaného ze *Streptomyces sp.* (Ali et al 2012) či u lansainu C (Taechowisan et al. 2008).

Výsledky produkce IL-1 $\beta$  buňkami THP-1 v přítomnosti streptomycet byly u izolátu TR24 velmi podobné výsledkům produkce TNF. U extraktů GYM (M) 4 a GYM+RPMI (M) 6 došlo k indukci signifikantní produkce IL-1 $\beta$  jak u aktivovaných tak i neaktivovaných buněk. U vzorku GYM (Et-Ac) 7 nedocházelo u neaktivovaných buněk k významné produkci IL-1 $\beta$ , ale u aktivovaných buněk došlo k zesílení produkce na signifikantní koncentraci. Ostatní extrakty neindukovaly produkci IL-1.

U extraktu izolátu TR1 došlo pouze u vzorku s GYM (M) 10 k statisticky významné produkci IL-1 $\beta$  neaktivovanými buňkami. U aktivovaných buněk byla IL-1 $\beta$  signifikantně produkována ve vzorcích s extrakty GYM+RPMI (M) 13 a GYM+RPMI+THP-1 (M) 14. Ostatní extrakty nezpůsobovaly indukci produkce IL-1 $\beta$ .

Kmen streptomycet TR38 měl obdobné výsledky jako v případě TNF, maximální koncentrace IL-1 $\beta$  v supernatantech byla výrazně (10-15x) nižší než u zbylých dvou kmenů. Tyto výsledky společně s výsledky ostatních pokusů naznačují protizánětlivou povahu extraktů metabolitů kmene TR38.

Celkově nám získaná data poukazují na odlišné biologické aktivity obsažené v extraktech z jednotlivých kmenů streptomycet a jejich různorodý vliv extraktů na produkci prozánětlivých látek TNF a IL-1 $\beta$ . V extraktech se nacházejí jak prozánětlivé, tak i protizánětlivé látky, tyto výsledky se shodují s výsledky mnoha dalších prací, které popisují imunomodulační vliv látek získaných ze streptomycet na zánětlivou reakci. Různorodé chování extraktů je v první řadě determinováno geneticky. Genom streptomycet je vysoce



plastický, jen třetina genů kóduje esenciální životní funkce. Zbytek genů je adaptivní a podléhá čilému horizontálnímu genovému přenosu. I blízce příbuzné kmeny (dle 16S rRNA taxonomie) mohou kódovat a produkovat diametrálně odlišné spektrum bioaktivních látek. Dalším fenoménem je to, že běžně je exprimována jen malá část genetické informace pro sekundární metabolity. Kmeny běžně kódují až 50-100 chemických struktur, ale aktivně produkují jen několik z nich. I drobná změna metabolismu, způsobená změnou kultivačních podmínek (GYM vs. RPMI) může diametrálně změnit expresi genů pro sekundární metabolity. V některých případech se též asi podařilo diferenciatní extrakcí polárních a nepolárních látek od sebe oddělit látky prozánětlivé a protizánětlivé. Potvrdili jsme též vliv interakce některých kmenů s THP-1, který způsobil potlačení produkce prozánětlivých látek tímto kmenem. V případě změny exprese určitých genů může docházet k produkci nového metabolitu, k potlačení produkce některého stávajícího metabolitu nebo pouze ke změně produkce jednotlivých metabolitů. Všechny tyto děje mohou mít zcela zásadní efekt na celkové chování bezbuněčného extraktu metabolitů.

### **6.3. Vliv vybraných extraktů z bakterií rodu *Streptomyces* na fagocytární aktivitu buněk THP-1**

Tento pokus byl určitou obdobou pokusu s FagoFlowEx<sup>®</sup> kit kde byla měřena fagocytární aktivita pomocí oxidativního vzplanutí buněk. V předchozím pokusu bylo sice pozorováno signifikantní snížení rh123 pozitivních buněk po přidání spor streptomycet, ale zároveň s tím bylo pozorováno i signifikantní zvýšení podílu mrtvých buněk ve vzorcích. To zabraňovalo řádnému vyhodnocení dopadu streptomycet na fagocytární aktivitu buněk. Rozhodli jsme se tedy testovat vliv metabolických extraktů v necytotoxických koncentracích na jejich fagocytární aktivitu. Tato data jsou obzvláště důležitá, protože ve vědecké literatuře není popsán vliv streptomycet ani jimi produkováných látek přímo na fagocytární aktivitu makrofágů. Doposud publikované články se zaměřují spíše na interakci mezi sekundárními metabolity streptomycet a pro/proti zánětlivými faktory produkovány makrofágy. Tento pokus byl tedy dvakrát opakován a to s obdobnými výsledky.

Všech šest vybraných extraktů dokázalo signifikantně snížit množství fagocytujících preaktivovaných makrofágů THP-1 (aktivované pomocí PMA). Extrakty z plicních kmenů TR24 a TR1 snižovaly fagocytózu v průměru o 25 %, extrakty TR 38, kmene z dělohy, až o 40 %. I tato data naznačují silnější protizánětlivý efekt u kmene pocházejícího z dělohy, ve srovnání s plicními kmeny streptomycet. Na základě získaných výsledků lze uvést, že izoláty

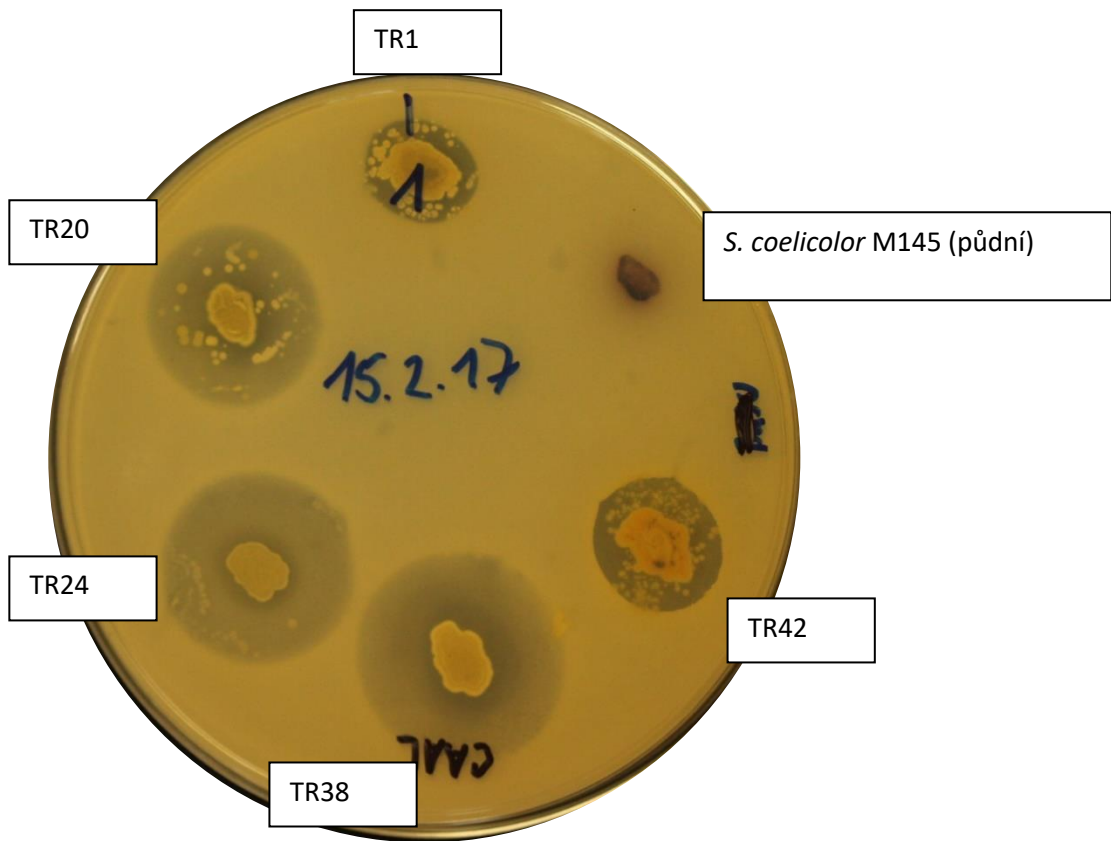
streptomycet získaných z lidských tkání, by skutečně mohly být při vhodných podmínkách potenciálními patogeny člověka. Pouze kmen TR-1 byl systematicky určen do blízkosti patogenního kmene *S. somaliensis*, ale ten je spojován spíše s aktinomykozou (Joseph et al. 2010), než s pneumoniemi. Tento kmen byl diganostikován například i při zánětu pobříšnice (Gruet et al. 1970).

Izoláty TR20 a TR38 byly zařazeny oba do blízkosti nepatogenního kmene *S. albidoflavus*, ale každý pochází z jiné tkáně. Nález toho kmene ve více různých tkání jenom potvrzuje jeho schopnost kolonizovat lidské tělo.

#### **6.4. Biologický test přítomnosti antimikrobiálních látek v extraktech z bakterií rodu *Streptomyces***

Posledním bodem v mé práci bylo zjistit, zda získané extrakty streptomycet obsahují sekundární metabolity s antimikrobiální aktivitou. Rod *Streptomyces* je obecně považován za významného producenta celé řady antibiotik (Procópio et al 2012). Navzdory tomu, přítomnost antibakteriálních látek jsme identifikovali pouze u dvou nepolárních vzorků, které byly kultivovány v běžném médiu pro streptomycety GYM – TR38 GYM (Et-ac) a TR1 GYM (Et-ac). Nepřítomnost antimikrobiálních látek v dalších nepolárních extraktech těchto kmenů indikuje, že mohlo dojít vlivem změny média (RPMI) ke změně exprese genových shluků pro tyto látky streptomycet, a tím i k inaktivaci jejich produkce. Absence látek s antibiotickými účinky v metabolitech získaných extrakcí methanolem naznačuje nepolární povahu tohoto sekundárního metabolitu. U extraktů kmene TR 24 nebyla v biologickém testu detekována žádná inhibiční zóna.

Jeví se jako pravděpodobné, že kmeny streptomycet v laboratorních podmínkách nevyužívají svůj celý antibiotický potenciál. V analýze antibiotických aktivit těchto kmenů na miskách s krevním agarem nebyly prokázány antimikrobiální látky proti testovaným respiračním patogenům, ale všechny kmeny vykazovaly silnou antifugální aktivitu proti druhům *Aspergillus*, *Rhizomucor* a *Candida* (Žlábková 2017), inhibiční zóny v nárustu *Candida albicans* jsou zobrazeny na obrázku (obr. 14). Slečna Žlábková také prokázala silnou  $\beta$ -hemolytickou aktivitu lidských izolátů streptomycet. Hemolytická aktivita může být považována za adaptaci na prostředí lidského těla, půdní streptomycety ji v takové míře nemají.



Obr. 14: Antifugální aktivita streptomycet proti *Candida albicans* (převzato Žlábková 2017).

## 7. Závěr

- Izoláty streptomycet z lidských klinických vzorků TR1, TR20, TR24, TR38 a TR42 ve stádiu spor mají cytotoxický účinek na makrofágy z linie THP-1.
- Extrakty metabolomu streptomycet mají imunomodulační účinky. Extrakty indukují i inhibují produkci TNF a IL-1 $\beta$ .
- Extrakty metabolomu streptomycet (kmeny TR1, TR20 a TR38) významně snižují fagocytární aktivitu buněk THP-1.
- Některé extrakty streptomycet obsahují sekundární metabolity s antimikrobiálním účinkem.

Na základě získaných dat lze konstatovat, že lidské kmeny streptomycet dokáží ovlivňovat buňky svého hostitele. Často se to děje pomocí nízkomolekulárních sekundárních metabolitů, nemůžeme ale vyloučit i přímou interakci povrchových struktur obou partnerů. Je-li jejich celkový efekt pro hostitelský organismus pozitivní, nebo přispívají k patogenezi chronických onemocnění, není stále zcela objasněno.

## 8. Seznam zkratek

BOFES	bovinní fetální sérum
DHR	dihydrorhodamin
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	z anglického enzyme-linked immunosorbent assay
HEPES	4-(2 hydroxyetyl)-1-piperazinetanesulfonová kyselina
IL-1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$
LPS	lipopolysacharid
MOPS	3-(N-morfolino)-propansulfonová kyselina
NO	oxid dusnatý
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PI	propidium jodid
PMA	forbol-12-myristyl-13-acetát
rh123	rhodamin 123
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní forma kyslíku
RPM	počet otáček za minutu
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TNF	faktor nádorové nekrózy

## 9. Literatura:

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2015). Cellular and molecular biology. 8, 13-35; 265-289.
- Adarem, A. (2003). Phagocytosis and the inflammatory response. *J. Infect. Dis.* 187, 340-345.
- Ali, A., Khajuria, A., Sidiq, T., Kumar, A., Thakur, N.L., Naik, D., Vishwakarma, R.A. (2012). Modulation of LPS induced inflammatory response by Lawsonyl monocyclic terpene from the marine derived *Streptomyces* sp. *Immunol Lett* 150, 79–86.
- Aminov, R.I., Mackie, R.I. (2007). Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 271, 147-161.
- Bardelli, A.M. (1963). *Streptomyces roseus* keratomycosis: rare etiology in the ophthalmologic field. *Minerva Oftamol* 54, 172-176.
- Bylund, J., Brown, K.L., Movitz, C., Dahlgren, C., Karlsson, A. (2010). Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for? *Free Radical Biol. Med.* 49, 1834-1845.
- Carey, J., Motyl, M., Perlman, D.C. (2001). Catheter-related bacteraemia due to *Streptomyces* in a patient receiving holistic infusions. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 1043-1045.
- Clarke, P.R.P., Warnock, G.B.R., Blowers, R., Wilkinson, M. (1964). Brain abscess due to *Streptomyces griseus*. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 27, 553–555.
- Collado, M.C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., Salminen, S. (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci. rep.* 6, 23129.
- Datta, P., Arora, S., Jain, R., Jagdish, Ch., van den Sande, W. (2012). Secondary peritonitis caused by *Streptomyces viridis*. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1813-1814.
- Demain, A. L. (1998). Induction of microbial secondary metabolism. *Int. Microbiol.* 1, 259-264.
- Demain, A. L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *App. Micro. Bio.* 52, 455-463.

- Durairaj, H., Steury, M.D., Parameswaran, N. (2015). Paroxetine differentially modulates LPS-induced TNF alpha and IL-6 production in mouse macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 25, 485-492.
- Flårdh, K. a Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 36-49.
- Gruet, M., Maydat, L., Ferro, R. (1970). Peritonitis caused by *Streptomyces somaliensis*. *Bull. Soc. Med. Afr. Noire.* 1, 609-610.
- Haider, S., Knofler, M. (2009). Human Tumour Necrosis Factor: Physiological and Pathobiological Roles in Placenta and Endometrium. *Placenta.* 30, 111-123.
- Hecht, S.M. (2000). Bleomycin: New perspectives on the mechanism of action. *J. Nat. Prod.* 63, 158-168.
- Joseph, N.M., Harish, B.N., Sistla, S., Thappa, D.M., Parija, S.C. (2010) *Streptomyces* bacteremia in a patient with actinomycotic mycetoma. *J. Infect. Dev. Ctries.* 4, 249–252.
- Kaltenpoth, M., Goßtler, W., Herzner, G., Strohm, E. (2005). Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Curr. Biol.* 15, 475–479.
- Kawakami, H., Inuzuka, H., Mochizuki, K., Muto, T., Ohkusu, T., Yaguchi, T., Yamagishi, Y., Mikamo, H. (2014). Case of keratitis caused by *Streptomyces thermocarboxydus*. *J. Infect. Chemother.* 20, 57-60.
- Kuriyama, K., Fujiware, A., Inagaki, K., Abe, Y. (2000). Anti-inflammatory action of a novel peptire, SEK-1005, isolated from a *Streptomyces*. *Eur. J. Pharmacol.* 390, 223-228.
- Martinez-Castro, M., Barreiro, C., Romero, F., Fernandez-Chimeno, R.I., Martin, J.F. (2011) *Streptomyces tacrolimicus* sp. nov., a low producer of the immunosuppressant tacrolimus (FK506), *Int. Sys. Evol. Microniol.* 61, 1084-1088.
- Procópio, R.E.L., Reis da Silva, I., Martins, M.K., de Azevedo, J.L., de Araújo, M.K. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz. J. Infect. Dis.* 16, 466-471.
- Renton, P., Hay, R.J., Hall, A.P. (1981). Mycetoma due to *Streptomyces somaliensis* (Madura skull). *Skeletal rad.* 6, 225-227.
- Schluter, D., Deckert, M. (2000). The divergent role of tumor necrosis factor receptors in infectious diseases. *Microbes Infect.* 2, 1285-1292.

- Seipke, R.F., Kaltenpoth, M., Hutchings, M.I. (2012). Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme?. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 862-876.
- Ser, H.L., Tan, L.T., Palanisamy, U.D., Abd Malek, S.N., Chang, K.G., Goh, B.H. Lee, L.H. (2016). Streptomyces antioxidants sp. nov. A novel Mangrove Soil actinobacterium with Antioxidative and neuroprotective Potentials. *Front. Microbiol.* 7, 899.
- Ser, H.L., Tan, L.T., Law, J.W.F., Chang, K.G., Duangjai, A., Saokaew, S., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.S., Khan, T.M., Goh, B.H., Lee, L.H. (2017). Cytotoxic and Antioxidant Potentials of Mangrove-Derived Streptomyces. *Front. Microbiol.* 8, 2065.
- Syh-Jae, L., Po-Jen, Ch., Yen-Ju, H., Ming-Ling, K. (2004). Evaluation of cytotoxic function and apoptosis in interleukin (IL)-12/IL-15-treated umbilical cord or adult peripheral blood natural killer cells by a propidium-iodide based flow cytometry. *Pediatr. Allergy. Immunol.* 15, 79-85.
- Taechowisan, T., Wanbanjob, A., Tuntiwachwuttikul, P., Liu, J. (2008). Anti-inflammatory activity of lansais from endophytic Streptomyces sp. SUC1 in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Food Agric. Immunol.* 20, 67-77.
- Tarkka, M. a Hampp, R. (2008). Secondary Metabolites of Soil Streptomyces in Biotic Interactions., Secondary metabolites in soil ecology, Secondary metabolites in Soil Ecology. 14, 107-126.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y. (1980). Establishment and characterization of a Human acutemonocytic leukaemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer.* 26, 171–176.
- Watzke, J., Schirmer, K., Scholz, S. (2007) Bacterial lipopolysaccharides induce genes involved in the innate immune response in embryos of the zebrafish (Danio rerio). *Fish Shellfish Immunol.* 23, 901-905.
- Yang, L., Guo, H., Li, Y., Meng, X., Yan, L., Zhang, D., Wu, S., Zhou, H., Lu, P., Xie, Q., Jin, X. (2016). Oleylethanolamide exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced THP-1 cells by enhancing PPAR $\alpha$  signaling and inhibiting the NF- $\kappa$ B and ERK1/2/AP-1/STAT3 pathways. *Sci. Rep.* 6. 34611.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 1613-1617.



Žlábková, Z. (2017), Rozpracovaná bakalářská práce. Faculty of Health and Social Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.