

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ANTROPOLOGIE A GENETIKY ČLOVĚKA



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**VÝZNAM PERIFERNÍHO PROLAKTINU A VROZENÉ
IMUNITNÍ REAKCE V TĚŽKÝCH IMUNOPATOLOGICKÝCH
STAVECH**

*The significance of extrapituitary prolactin and innate immune reaction
in severe immunopathological conditions*

Bc. VĚRA CHROMÁ

ŠKOLITEL: RNDr. PAVLÍNA ČEJKOVÁ, Ph.D.

Práce byla vypracována v letech 2010 - 2012 v rámci projektu IGA MZ NS9970-4/2008

Úloha prolaktinu v imunitní reakci při bakteriální infekci

Spolupráce: Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

- Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny 1. lékařské fakulty
- Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze
- Metabolická jednotka Všeobecné fakultní nemocnice v Praze
- Transfúzní oddělení Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci „Význam periferního prolaktinu a vrozené imunitní reakce v těžkých imunopatologických stavech“, vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Pavlína Čejkové, Ph.D., s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou v práci citovány a uvedeny v seznamu použité literatury na konci práce.

V Praze dne 27. 8.2012

Věra Chromá

Velice ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Pavlíně Čejkové PhD. za cenné rady, odborné vedení a pomoc při psaní mé diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat Bc. Ivě Němečkové a Bc. Lence Baierové za pomoc při sběru dat. Můj dík patří i celému kolektivu Ústavu obecné biologie a genetiky na 3. lékařské fakultě a také mým blízkým.

Obsah

1. Literární úvod	12
1.1. Interakce mezi neuroendokrinním a imunitním systémem	12
1.2. Prolaktin	15
1.2.1. Mimoshypofyzární prolaktin	16
1.2.2. Receptory pro prolaktin	18
1.3. Imunomodulační funkce prolaktinu	19
1.3.1. Vliv prolaktinu na buňky imunitního systému	19
1.3.2. Prolaktin a autoimunitní onemocnění	21
1.3.3. Úloha prolaktinu v onkogenezi a nákaze parazity	24
1.4. Vrozená imunita	25
1.4.1. Vrozená imunitní reakce	25
1.4.2. Monocyty	26
1.4.3. Toll-like receptory	27
1.5. Vliv prolaktinu, TLR2 a TLR4 na sepsi	29
1.5.1. Sepse	29
1.5.2. Sepse a Toll-like receptory	31
1.5.3. Sepse a prolaktin	33
2. Hypotézy a cíle diplomové práce	35
2.1. Hypotézy	35
2.2. Cíle	35
3. Materiál a metody	36
3.1. Materiál	36
3.2. Metody	37
3.2.1. Studium genové exprese mRNA pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase	37
3.2.2. Studium jednonukleotidového polymorfismu -1149 G/T v promotoru genu pro prolaktin	42
4. Výsledky	48
4.1. Statistické zpracování	48
4.2. Výstupy ze statistických hodnocení	49
5. Diskuze	61
6. Závěr	65
7. Seznam použitých zdrojů	66
8. Přílohy	77

Abstrakt:

Úvod: Komunikace mezi neuroendokrinním a imunitním systémem je mimo jiné zprostředkována hormony a cytokiny a to jak endokrinní, tak i parakrinní a autokrinní cestou. Jedním z těchto činitelů je i prolaktin, adenohipofyzární hormon, ale i imunitní cytokin.

Sepse je systémová reakce na zánět, zprostředkovaná Th1 imunitní odpovědí, která je podporovaná i prolaktinem. Prvotní ochranu při sepsi zprostředkovává vrozená imunita. Toll-like receptory rozpoznávají molekuly, které jsou spojeny s patogeny a po tomto rozpoznání příslušného patogenu zahajují imunitní reakce s cílem ho zneškodnit a obnovit rovnováhu organismu. Předpokládá se, že v organismu těžce napadeném patogenem se zvyšuje genová exprese PRL, TLR2 a TLR4. Tyto hodnoty jsme sledovali u septických pacientů. Hodnotili jsme také vliv jednonukleotidového polymorfismu *PRL* -1149 G/T jednak na fyziologickou expresi PRL mRNA, a jednak na míru exprese v průběhu sepse.

Materiál a metody: Pro tuto studii byly jako materiál použity vzorky krve 43 septických pacientů a 40 zdravých kontrol. Krev septických pacientů byla odebrána celkem třikrát s určitým časovým rozestupem, krev kontrol pouze jednou. Pro určení exprese mRNA PRL, TLR2 a TLR4 byla použita polymerázová řetězová reakce v reálném čase s fosfoglycerát-kinázou 1 jako endogenní kontrolou. Metodou PCR-RFLP jsme provedli genotypizaci SNP -1149 G/T v genu pro prolaktin.

Výsledky: Hladiny exprese mRNA PRL, TLR2 a TLR4 se u septických pacientů mezi jednotlivými odběry statisticky významně nelišily, ale oproti kontrolám jsme detekovali slabý nárůst exprese mRNA PRL v odběru A a zejména v odběru B s následným poklesem v odběru C. Překvapivě nejnižší produkce mRNA PRL byla zaznamenána u pacientů, kteří následně na sepsi zemřeli (5,4x nižší než v odběru B přeživších pacientů, $P = NS$). Hladiny exprese mRNA TLR2 a TLR4 tří odběrů přeživších pacientů i pacientů zemřelých jsou statisticky významně zvýšeny oproti kontrolám. U septických pacientů jsou rovněž statisticky významně zvýšeny hladiny leukocytů u transplantovaných pacientů. SNP *PRL* -1149 G/T nemá vliv na hladiny mRNA PRL v průběhu sepse, statisticky významný rozdíl nebyl prokázán ani u fyziologických hodnot, ale jedinci s genotypem GG vykazovali trend zvýšených hladin exprese mRNA PRL oproti kontrolám s genotypem GT a TT.

Závěr: Nedostatečná produkce prolaktinu monocyty při sepsi zřejmě neumožní aktivovat imunitní systém a postižení jedinci z důvodu septické příhody umírají. Sepse u pacientů, kteří ji překonali, vyvolá aktivaci produkce PRL a ta s odezněním klinických příznaků sepse klesá. V odpovědi na stresové podmínky jsou aktivovány i TLR2 a TLR4. SNP PRL -1149 G/T možná ovlivňuje fyziologickou produkci prolaktinu, ale nejspíš nemá vliv na jeho produkci během sepse.

Klíčová slova: Prolaktin, toll-like receptor, seps, imunita

Abstract:

Introduction: Communication between neuroendocrine and immune system is arranged by hormones and cytokines in endocrine, paracrine and autocrine manner. One of the factors involved is also prolactin, a pituitary hormone and an immune cytokine. Sepsis is a system reaction to inflammation mediated by Th1 immune response, which is supported by prolactin as well. Primary protection against sepsis is mediated by innate immunity. Toll-like receptors distinguish molecules, which are connected with pathogens. Afterwards this identification of a specific pathogen toll-like receptors trigger immune reaction with the main goal of destroying this pathogen and also with the goal of renewing the balance of the organism. It is supposed that in the organism that is hardly attacked by a pathogen, the PRL, TLR2 and TLR4 gene expression is on the increase. We studied the levels of PRL, TLR2 and TLR4 mRNA production in circulating monocytes derived from septic patients. Simultaneously, the effect of *PRL* -1149 G/T SNP on physiological levels of PRL mRNA and its expression in the course of sepsis was evaluated.

Materials and methods: As a source of monocytes, blood specimens from 43 septic patients and 40 healthy controls were used. The blood of septic patients was taken three times with some time difference and blood from controls was taken just once. For determination of PRL, TLR2 and TLR4 mRNA expression QPCR was used with phosphoglycerate kinase 1 as an endogenous control. The *PRL* -1149 G/T SNP genotyping was performed by PCR-RFLP method.

Results: There was no statistically significant change in levels of PRL, TLR2 and TLR4 mRNA expression among the three consecutive blood drawings in survived septic patients, however, compared to controls, we observed a weak increase in PRL mRNA expression in the sample A and especially in the sample B, with a subsequent decrease in the sample C ($P = NS$). Surprisingly, the lowest PRL mRNA production in monocytes was detected in non-survived patients (5,4x less than in the highest PRL mRNA expression in blood drawing B of survivors, $P = NS$). The TLR2 and TLR4 mRNA expression levels in both, three consecutive samples of survivors and one sample of dead patients are statistically significantly increased in the comparison to controls. In septic patients who underwent transplantation we observed significantly increased leukocyte numbers. The *PRL* -1149 G/T SNP does not have any influence on the course of sepsis and level of mRNA. In case of physiological values, the individuals with the GG genotype showed a

trend to increased levels of PRL mRNA expression compared to the controls with GT and TT genotypes, nevertheless, the difference did not reach statistical significance.

Conclusion: Lack of prolactin production by monocytes during sepsis apparently does not allow the immune system to get activated and the affected individuals die due to septic episode. Sepsis in patients who have overcome it, causes the activation of PRL mRNA production, and this production along with the subsidence of clinical signs of sepsis decreases. Next to that, TLR2 and TLR4 mRNA expression is activated in response to stress conditions during sepsis. The *PRL* -1149 G/T SNP may affect the physiological production of prolactin however, it seems to have no effect on its production during sepsis.

Key words: Prolactin, toll-like receptor, sepsis, immunity

Seznam zkratek

ACTH	- adrenokortikotropní hormon
AJ	- arbitrární jednotka
Bax	- aktivátor apoptózy
Bcl	- supresor apoptózy
BCR	- B buněčný receptor
C/EBP	- CAAT/ enhancer vázající protein
cAMP	- cyklický adenosinmonofosfát
CD	- shluky rozpoznávání
cDNA	- komplementární deoxyribonukleová kyselina
CRP	- C- reaktivní protein
Ct	- PCR cyklus, v němž fluorescence amplifikovaného templátu překročí prahovou fluorescenci
Da	- dalton
DAMP	- s nebezpečím spojené molekulární vzory
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
dNTP	- deoxyribonukleotidtrifosfát
DUSP	- duálně-specifická fosfatáza
EDTA	- kyselina ethylendiamintetraoctová
ERK	- extracelulární signál-regulující protein kináza
G	- guanin
GABA	- kyselina γ - aminomáselná
GM- CSF	-faktor stimulující kolonie makrofágů a granulocytů
HPA	- hypotalamo- hypofyzárně- nadledvinová osa
Ig	- imunoglobulin
IL	- interleukin
IFN	- interferon
IRF	- interferon regulační faktor
JAK	- Janusova kináza
LAF	- lymfocyty- aktivující faktor
LPS	-lipopolysacharid
JNK	- c-Jun NH ₂ -terminální kináza

KAR	- Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny
M	- marker
MAL	- MyD88 adaptoru podobný protein
MAPK	- mitogenem aktivovaná proteinkináza
MHC	- hlavní histokompatibilní komplex
MJ	- metabolická jednotka
MKP	- mitogenem aktivovaná proteinkináza fosfatáza
mRNA	- informační ribonukleová kyselina
NF- κ B	- jaderný faktor kappa B
P	- pozitivní kontrola
PAMP	- s patogenem spojené molekulární vzory
PBS	- phosphat-buffered saline (fosfátový pufr)
PCR	- polymerázová řetězová reakce
PGK1	- fosfoglycerát kináza 1
PMBC	- mononukleární buňky periferní krve
PRL	- prolaktin
PRLR	- receptor pro prolaktin
PRR	- receptor rozpoznávající molekulární vzory
QPCR	- polymerázová řetězová reakce v reálném čase
r	- Spearmanův koeficient
RA	- revmatoidní artritida
RFLP	- polymorfismus délky restričních fragmentů
RNA	- ribonukleová kyselina
RT PCR	- reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce
SARM	- sterile α - and armadillo-motif-containing protein (sterilní α a pásovcový motiv- obsahující protein)
SD	- směrodatná odchylka
SLE	- systémový lupus erythematodus
SNP	- jednonukleotidový polymorfismus
SOCS	- supresory cytokinové signalizace
sPRL	- sérový prolaktin
STAT	- signální transduktor a aktivátor transkripce
T	- tymin

T3	-trijódyronin
T4	-tyroxin
Th	- pomocný T lymfocyt
TIR	- Toll/IL1 receptoru podobná doména
TLR	- toll-like receptor
TNF	- faktor nekrotizující nádory
TRAM	- TRIF-related adaptor molecule (s TRIF- spojená adaptorová molekula)
TRH	- tyreotropní hormon
TRIF	- TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β (TIR-doménu obsahující adaptér vyvolávající interferon- β)
ÚHKT	-Ústav hematologie a krevní transfuze
UV	- ultrafialové záření
VEGF	- růstový faktor cévního endotelu
VIP	- vazoaktivní intestinální peptid

1. Literární úvod

1.1. Interakce mezi neuroendokrinním a imunitním systémem

Interakce mezi neuroendokrinním a imunitním systémem je nezbytná pro navození a udržení rovnováhy organismu (viz Obr. 1). Je tvořena pomocí hormonů, neurotransmiterů, cytokinů a samozřejmě jejich receptorů, které se nacházejí jednak v hypotalamo-hypofyzárně-adrenální ose (HPA), ale také na buňkách imunitního systému (Weigent et al. 1990). Vzájemná interakce je zprostředkována endokrinně, parakrinně i autokrinně (Dostal 2005).

Některé neuroendokrinní hormony, jako je například růstový hormon, prolaktin a adrenokortikotropní hormon mohou být tvořeny v buňkách imunitního systému a fungují jako lymfokiny, a naopak některé lymfokiny mají vliv na modifikaci neuroendokrinní odpovědi (Weigent et al. 1990).

Při stresové reakci se stává tato komunikace nepostradatelnou pro znovunabytí rovnováhy a účinné obranné reakci proti stresoru a jeho důsledkům. Neuroendokrinní systém přímo, ale i nepřímo přes vypouštění různých chemických signálů ovlivňuje vývoj i funkční aktivitu imunitního systému, zatímco imunitní systém může prostřednictvím cytokinů ovlivňovat aktivitu endokrinního systému (Jara et al. 2006). Všechny fyziologické systémy v těle jsou však pod kontrolou mozkové činnosti (Besedovsky and del Rey 2011). Spojení těchto systémů se děje pomocí hormonů, neurotransmiterů, neuropeptidů, cytokinů a jejich receptorů.

Hlavním nadřazeným systémem pro regulaci imunitní odpovědi je společná reakce **hormonálního** systému, kam můžeme zařadit osu hypotalamo-hypofyzárně-adrenální, hypotalamo-hypofyzárně-gonadální a hypotalamo-hypofyzárně-thyroidní a autonomního nervového systému (Eskandari et al. 2003; Jara et al. 2006; Roggero et al. 2011). Imunitní systém je tak regulován na systémové, regionální a lokální úrovni (Eskandari et al. 2003). Mezi hormony tlumící imunitní reakce patří estrogény (Straub 2007), androgeny a glukokortikoidy (Mavoungou et al. 2005), které obecně mají vliv na indukci apoptózy, potlačení maturace a produkce cytokinů u některých imunitních buněk; naopak, mezi hormony stimuluující proliferaci imunitních buněk a produkci cytokinů patří prolaktin,

růstový hormon, inzulín a tyroideální hormony (Kelley et al. 2007; Mavoungou et al. 2005; Medzhitov and Janeway 2000; Straub 2007).

Z hypotalamu je uvolňován kortikotropin-uvolňující hormon do hypofyzárního portálního systému, kde stimuluje produkci adrenokortikotropního hormonu (ACTH). Ten následně aktivuje uvolňování protizánětlivých glukokortikoidů, stimuluje sympatický nervový systém a ovlivňuje fyziologické a behaviorální změny během stresové reakce (Sternberg et al. 1992). Glukokortikoidy mají zpětnovazebný efekt na ACTH, kdy tlumí jeho uvolňování z hypofýzy, a dále ovlivňují redukci počtu cirkulujících lymfocytů, monocytů a eosinofilů, brání shromažďování imunitních buněk v místě zánětu (Sternberg et al. 1992) a způsobují posun od Th1 k Th2 imunitní odpovědi (Eskandari et al. 2003).

Ženy mají díky produkci estrogenu vyšší reaktivitu protilátkové i buněčně zprostředkované imunitní odpovědi. Estrogen na rozdíl od androgenů a testosteronu působí imunomodulačně na T i B lymfocyty a má vliv na jejich vývoj v lymfatických tkáních (Eskandari et al. 2003; Jara et al. 2006). Ovšem při imunitním stresu, jako je například sepe, je produkce gonadálních hormonů utlumena (Eskandari et al. 2003).

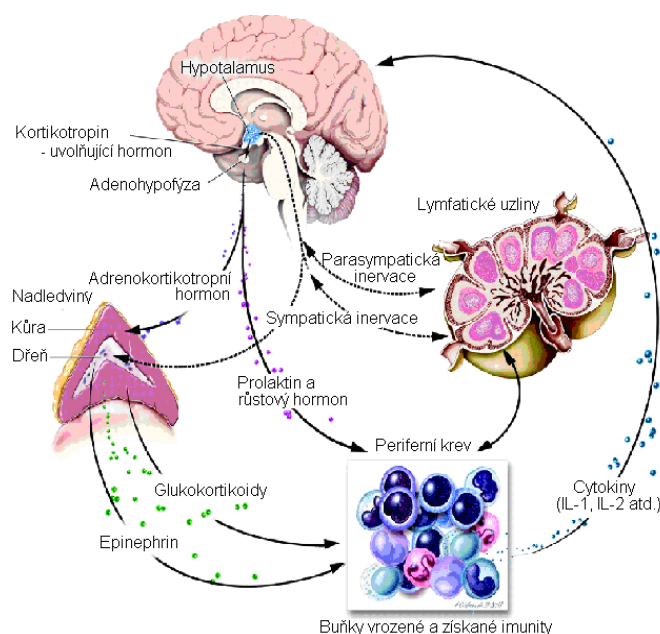
Tyroidní hormon syntetizovaný hypofýzou působí na uvolňování trijódtyroninu (T3) a tyroxinu (T4), hormonů štítné žlázy podílejících se na modulaci imunitní reakce tím, že mají stejně jako růstový hormon ochranný vliv před imunosupresivními účinky glukokortikoidů (Dorshkind and Horseman 2001; Eskandari et al. 2003).

Neurotransmitery zprostředkovávají vzájemnou komunikaci mezi jednotlivými synapsemi v autonomním nervovém systému, zahrnujícím parasympatické a sympatické nervy. Patří sem malomolekulové neurotransmitery, jako jsou aminokyseliny a biogenní aminy a velkomolekulové neuropeptidy. Mezi aminokyseliny řadíme glutamát, kyselinu γ -aminomáselnou (GABA), glycin. Acetylcholin a katecholaminy (adrenalin, noradrenalin a dopamin) patří do skupiny biogenních aminů. Jako přenašeče se uplatňují například i somatostatin, tyreoliberin, deriváty proopiomelanokortinu, opioidy, vazointestinální polypeptid (VIP) ze skupiny neuropeptidů (Mravec et al. 2007).

Primární i sekundární lymfoidní orgány, mezi které patří brzlík, kostní dřeň, slezina a lymfatické uzliny, jsou inervované sympatickými vlákny. V těchto orgánech cílové buňky exprimují adrenoreceptory, které stimulací lokálně uvolňovaného noradrenalinu nebo cirkulujících katecholaminů upravují komunikaci, cirkulaci, proliferaci a funkční aktivitu lymfoidních buněk a také produkci cytokinů (Elenkov et al. 2000). Bylo zjištěno, že noradrenalin a adrenalin pomocí dráhy β 2-adrenoreceptor-cAMP-protein kináza A

snižují v antigen-prezentujících buňkách a Th1 lymfocytech výrobu prozánětlivých cytokinů: interleukinu 12 (IL-12), tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α), a interferonu γ (IFN- γ) a naopak stimulují produkci protizánětlivých působců, například IL-10, čímž se můžou podílet na přesmyku z Th1 buněčně zprostředkované imunity na Th2 imunitu humorální (Elenkov et al. 2000). Opioidy působí na imunitní systém přímo potlačováním produkce protilátek a přecitlivělosti oddáleného typu díky znečitlivění chemokinových receptorů na imunocytech, ale také nepřímo přes zvyšování koncentrace cirkulujících katecholaminů (Eskandari et al. 2003). Některé neuropeptidy (např. VIP, substance P a somatostatin) mají vliv na produkci protilátek a cytokinů, degranulaci žírných buněk a aktivitu NK buněk (Weigent et al. 1990). Cholinergní inervaci přes bloudivý nerv je inhibována produkce prozánětlivých cytokinů (Bernik et al. 2002; Eskandari et al. 2003).

Cytokiny jsou pleiotropní signální molekuly, které se významně podílejí na modulaci imunitní odpovědi. V neuroendokrinním systému působí přes své receptory jak centrálně, tak periferně (Eskandari et al. 2003). Mezi cytokiny řadíme lymfokiny, interleukiny, monokiny, interferony, tumor nekrotizující faktory a růstové faktory. Mohou působit autokrinně, parakrinně i endokrinně. Cytokiny mohou mít různé účinky na buňky, záleží na prostředí, ve kterém se v daném čase nacházejí. Toto prostředí je dáno koncentrací dalších hormonů a cytokinů, které v souhře spouštějí určitou reakci (Whicher and Evans 1990).



Obrázek 1: Interakce neuroendokrinního a imunitního systému (upraveno dle Lane et al. 2009).

1.2.Prolaktin

Prolaktin je peptidový hormon, který byl poprvé nalezen v hypofýze a dlouhou dobu byl považován za výlučně hypofyzární hormon (Sinha 1995). Nyní je známo, že syntéza a sekrece prolaktinu se neomezuje pouze na adenohipofýzu, ale že je tvořen i dalšími orgány (Freeman et al. 2000). Pro své mnohostranné působení je nazýván pleiotropním hormonem.

Díky svým vlastnostem je prolaktin řazen do společné rodiny spolu s placentárním laktogenem a růstovým hormonem. Jejich geny se vyvinuly ze společného ancestrálního genu pomocí genové duplikace (Freeman et al. 2000) nejméně 500 miliónů let před naším letopočtem (Sinha 1995) a mají zhruba 40% homologii. (Ben-Jonathan et al. 1996). Molekula volného prolaktinu je tvořena jednoduchým polypeptidovým řetězcem skládajícím se ze 198 aminokyselin s molekulovou hmotností 23000 Da (Chikanza 1999). Molekula prolaktinu podléhá postranlačním modifikacím, jako je například glykosylace, fosforylace, dimerizace, polymerizace nebo navázání molekuly na vazebné proteiny a jednotlivé varianty mají odlišné biologické funkce (Sinha 1995). Díky tomu je v cirkulaci charakteristický molekulární polymorfismus, kdy se prolaktin vyskytuje v různých strukturálních variantách, jako již zmíněný monomer, dále dimer a makroprolaktin, přičemž největší zastoupení v krvi má prolaktin monomerní (Chikanza 1999; Orbach and Shoenfeld 2007).

Exprese hypofyzárního prolaktinu je závislá na transkripčním faktoru Pit-1, který se váže jak v proximálním promotoru, tak v distálním enhanceru genu (Ben-Jonathan et al. 1996; Berwaer et al. 1994).

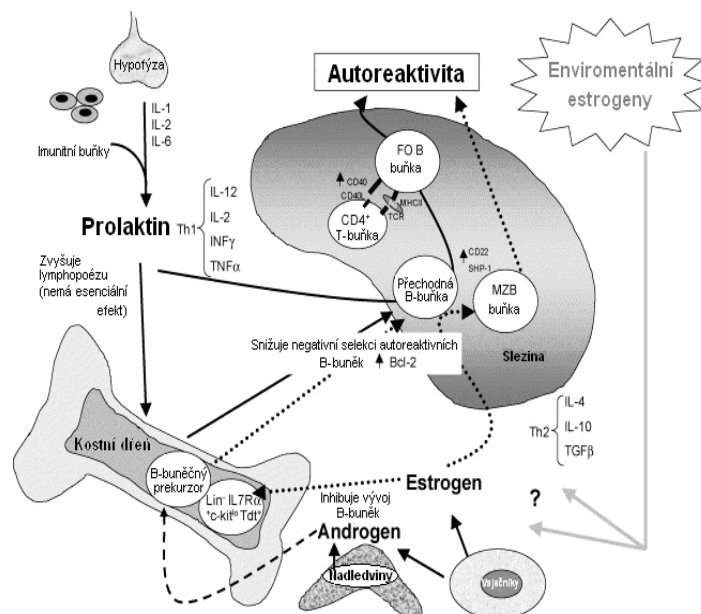
Hlavní funkcí hypofyzárního prolaktinu je růst a vývoj mléčných žláz, navození a stimulace laktace a také hraje důležitou roli v reprodukčních dějích, kde díky inhibiční funkci gonadotropních hormonů snižuje dozrávání gamet v gonádách. Pomocí klíčových enzymů také působí jako metabolický hormon, kdy ovlivňuje rozličné orgány, jako je například slinivka a tuková tkáň, a může se podílet na vzniku a rozvoji obezity nebo autoimunitních chorob (Ben-Jonathan et al. 2006). Hladiny prolaktinu jsou vyšší u žen než u mužů a tyto hodnoty se dále zvyšují během těhotenství a laktace. Prolaktin je vylučován nejvíce ve spánku okolo 2. hodiny ranní (Orbach and Shoenfeld 2007), při kojení, stresu a horečce.

Prolaktin je v neuroendokrinních buňkách uložen v podobě sekrečních granulí a v případě potřeby je z těchto buněk rychle uvolňován pomocí vápenatých iontů (Dannies 2002).

Hlavním negativním regulátorem uvolňování prolaktinu z adenohipofýzy je hypothalamus a jím secernovaný dopamin, ale mezi další inhibitory patří i IFN- γ a endotelin 3 (Freeman et al. 2000). Naopak výraznými stimulanty sekrece prolaktinu jsou cytokiny IL-1, IL-2, IL-6 a tyreotropní hormon (TRH), serotonin, estrogeny a oxytocin (Chikanza 1999). Prolaktin je peptidový hormon, který byl poprvé nalezen v hypofýze a dlouhou dobu byl považován za výlučně hypofyzární hormon (Sinha 1995). Nyní je známo, že syntéza a sekrece prolaktinu se neomezuje pouze na adenohipofýzu, ale že je tvořen i dalšími orgány (Freeman et al. 2000). Pro své mnohostranné působení je nazýván pleiotropním hormonem.

1.2.1. Mimohypofyzární prolaktin

Prolaktin působí nejen jako hormon, ale na periferiích i jako cytokin, jehož imunostimulační účinky jsou využívány ve vrozené i získané imunitě a jeho působení probíhá jak parakrinní, tak i autokrinní cestou (viz Obr. 2). Je produkován celou řadou buněk, jako jsou lymfocyty, monocyt/makrofágová řada, neurony, buňky endometria a prostaty (Bandúrová 2010; Berwaer et al. 1994). Buňky uvolňující mimohypofyzární prolaktin nemají sekreční granula pro jeho skladování, takže je uvolňován okamžitě po svém nasyntetizování (Ben-Jonathan et al. 2008).



Obrázek 2: Vliv prolaktinu na imunitní systém (myší model) (upraveno dle Peeva and Zouali 2005)

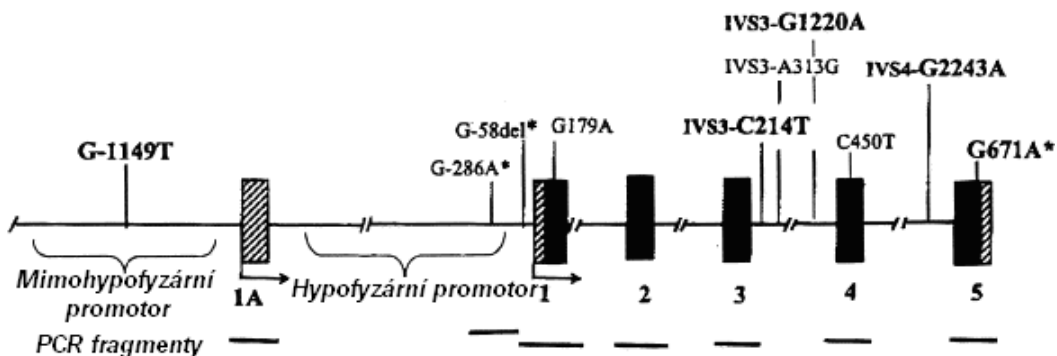
Struktura genu pro mimohypofyzární prolaktin

Strukturálně patří prolaktin do cytokino/hemopoetické rodiny spolu s růstovým hormonem, erythropoetinem, faktorem stimulujícím kolonie makrofágů a granulocytů (GM-CSF) a některými interleukiny (Chavez-Rueda et al. 2005).

Jeho gen se v jedné kopii nachází na krátkém raménku 6. chromozómu v blízkosti genů, kterými je kódován hlavní histokompatibilní komplex (Ben-Jonathan et al. 1996). Obsahuje celkem 5 exonů a čtyři dlouhé introny. Mimohypofyzární prolaktin je řízen z odlišného promotoru než prolaktin hypofyzární (viz Obr. 3). Tento promotor se nachází 5.8 kb před počátečním místem transkripce hypofyzárního prolaktinu a díky tomu se ve výsledném transkriptu nachází navíc ještě exon 1a (150 nukleotidů), který je však nekódující, takže jsou výsledné proteiny shodné (Berwaer et al. 1994; Gerlo et al. 2006; Hiraoka et al. 1991). Promotorová aktivita prolaktinového genu v lymfocytech a deciduálních buňkách je řízena cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP), kdy schopnost reakce na něj je zprostředkována pomocí cAMP- responsivním elementem a také pomocí dvou CAAT/ enhancer vázajících proteinů (C/EBP) (Gerlo et al. 2006). Specifický enhancer v lymfoidních buňkách obsahuje vazebná místa pro proteiny odvozené z lymfoidních buněk. Pokud jsou tyto oblasti zkráceny nebo úplně vyřazeny, sníží se promotorová aktivita přibližně o 50 % (Berwaer et al. 1994). Exprese mimohypofyzárního prolaktinu je nezávislá na faktoru Pit-1, hlavním aktivátoru transkripce hypofyzárního prolaktinu (Ben-Jonathan et al. 1996; Berwaer et al. 1994). Exprese prolaktinu může být v mononukleárních buňkách periferní krve stimulována např. konkavalinem A, prostaglandiny nebo phytohemaglutininem, a naopak inhibována IL-2 a IL-4 (Gerlo et al. 2006; Gerlo et al. 2004).

Stevens a kol. objevili v genu pro mimohypofyzární prolaktin funkční polymorfismus -1149 G/T, který mění navazování GATA-příbuzného transkripčního faktoru. Alela G v tomto polymorfismu je spojena s vyšší promotorovou aktivitou genu. Bylo prokázáno, že alela G je spjata i s některými autoimunitními onemocněními (Stevens et al. 2001). Lee a kol. se zabývali studiem prolaktinového polymorfismu v závislosti na projevu revmatoidní artritidy. Zjistili, že alela T má mírný protektivní vliv na riziko onemocnění revmatoidní artritidou (Lee et al. 2009). Ke stejnému závěru dospěla i Fojtíková a kol. u systémové sklerodermie (Fojtikova et al. 2010)

PRL (6p22.2-p21.3)



Obrázek 3: Struktura genu pro mimohypofyzární prolaktin a jednotlivé SNP (upraveno dle Mellai et al. 2003)

1.2.2. Receptory pro prolaktin

Receptor pro prolaktin (PRLR) patří do velké heterogenní rodiny cytokino-hematopoetických receptorů a je exprimován na různých typech tkání včetně buněk imunitního systému. Bylo popsáno několik izoform na základě rozdílů v sekvenci aminokyselin a ve velikosti cytoplazmatické domény (De Bellis et al. 2005; Radhakrishnan et al. 2012). Receptory pro prolaktin jsou složeny ze 3 oblastí zahrnujících extracelulární doménu, kde residua aminokyselin váží příslušný ligand, hydrofobní transmembránovou doménu a intracelulární doménu, která obsahuje prolin bohatý motiv (Clevenger and Kline 2001; Liu et al. 2011). Lidé exprimují různé izoformy, které mají shodné extracelulární a transmembránové domény a liší se pouze složením domény intracelulární (Kelley et al. 2007). Mezi nejčastější izoformy patří velká, střední a 2 krátké S1a a S1b. Tyto varianty vznikly alternativním sestřihem mRNA nebo posttranslační modifikací a mají odlišnou strukturu i funkce (Clevenger and Kline 2001).

Homodimerizace PRLR přes dvě odlišná místa na PRL vede k aktivaci asociovaných kináz, které fosforylují následné cíle. Nejvíce pozornosti bylo upřeno na JAK-STAT signální dráhu, která je využívána všemi cytokino-hematopoetickými receptory. Vazba PRL na receptor vyvolá aktivaci nejčastěji JAK-2, která vede k následné aktivaci převážně STAT-5, v menší míře i STAT-1 a 3 (Kelley et al. 2007). Aktivované STAT-proteiny jsou translokovány do jádra, kde se vážou na gama-interferonem

aktivovanou sekvenci a tímto způsobem mění expresi cílových genů (Dostal 2005). Další dráhy zahrnují mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) a Src kinázy, z nichž každá spouští specifické kaskády pro cílovou modifikaci (Goffin et al. 2005).

Exprese prolaktinového receptoru je závislá na stavu organismu. Corbacho a kol. studovali expresi prolaktinového receptoru v různých myších tkáních během odpovědi akutní fáze zprostředkované lipopolysacharidy (LPS) z *E. Coli*. Zjistili, že v játrech, prostatě, srdci, ledvinách a semenných vácích se exprese prolaktinového receptoru statisticky významně snížila, zatímco v brzlíku, jedné z imunitních tkání, naopak exprese prolaktinového receptoru vzrostla, což by potvrdovalo antiapoptotický účinek prolaktinu na tymocyty (Corbacho et al. 2004).

Prolaktin stimuluje ubikvitinaci a degradaci svého receptoru přes katalytickou funkci JAK-2. Tento mechanismus zajišťuje rovnováhu mezi spouštěním exprese cílových genů navázáním prolaktinu na jeho receptor, ale na druhou stranu degradaci receptoru je omezena jeho dostupnost a tím schopnost buňky vázat příslušný ligand. Katalytická aktivace JAK-2 reguluje prolaktinem indukovanou fosforylaci dlouhého prolaktinového receptoru na Ser349, což je potřebné k usnadnění ubikvitinace, urychlení endocytózy a degradace PRLR (Swaminathan et al. 2008).

1.3. Imunomodulační funkce prolaktinu

1.3.1. Vliv prolaktinu na buňky imunitního systému

Mimohypofyzární prolaktin je kromě dalších tkání tvořen a uvolňován z buněk imunitního systému, jako jsou tymocyty, lymfocyty, monocyty, makrofágy a přirození zabíječi (NK buňky), kde hraje významnou roli jako cytokin a imunomodulátor, který může ovlivňovat maturaci, proliferaci a aktivaci lymfocytů a produkci cytokinů (Brand et al. 2004). Jeho imunoregulační funkce však byly uznány relativně nedávno, protože jeho produkce imunitními buňkami je velice nízká (Ben-Jonathan et al. 1996). Také některé změněné lidské lymfoidní buněčné linie produkují PRL, např. Jurkat leukemické T-lymfocyty (Ben-Jonathan et al. 1996). Aktivita prolaktinu v mononukleárních buňkách periferní krve (PMBCs) spočívá ve zvýšení vazebné aktivity transkripčního faktoru NFκB

a IRF-1, který podporuje sekreci prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-12 (Brand et al. 2004).

Extravazace je schopnost mononukleárních buněk nahromadit se v místě poškození a zánětu průnikem přes cévní stěnu až k cílové tkáni a tam zahájit obranné mechanismy. Pro tento děj je jednou z důležitých schopností adheze leukocytu na endoteliální buňky. Prolaktin zvyšuje integrinem zprostředkovanou adhezi PMBCs k endoteliálním buňkám pomocí tyrosinové fosforylace JAK/STAT signální dráhy a chemokinových receptorů CXCR3 (Montes de Oca et al. 2005).

Ošetření lidských makrofágů prolaktinem zvyšuje genovou expresi hem-oxigenázy 1 a zvyšuje produkci růstového faktoru cévního endotelu (VEGF) a ovlivňuje tak angiogenezi (Malaguarnera et al. 2004).

Účinky prolaktinu na přirozené zabíječe (NK) spočívají ve zvýšení exprese povrchových molekul NKp30 a NKp46, které zajišťují NK buňkám jejich cytotoxickou a lytickou aktivitu (Mavoungou et al., 2005) namířenou například proti virům a nádorům, a také ve zvýšení jimi uvolňovaného IFN- γ (Matera et al. 1999).

Prolaktin reguluje zrání CD4- a CD8- tymocytů na CD4+ a CD8+ T lymfocyty prostřednictvím exprese IL-2 receptoru (Carreno et al. 2005). Také vede k proliferaci pro-B buněčné generace. Prolaktin je v lymphopoéze sice významný, není však pro vývoj imunitních buněk stěžejní (Orbach and Shoenfeld 2007). Tento závěr je podložen například studií Horsemana a kol. kteří potvrdili, že myši, jež jsou deficientní pro prolaktinový gen, mají normální imunitní systém stejně jako jejich sourozenci s fungujícím prolaktinovým genem (Horseman et al. 1997). Imunoregulace pomocí autokrinního působení prolaktinu byla prokázána na Jurkat buňkách, ve kterých byl díky inzerci lentiviru umlčen gen pro expresi prolaktinového receptoru. Ukázalo se, že po aktivaci proliferace Jurkat buněk fytohemaglutininem byla tato proliferace drasticky snížena oproti kontrolním buňkám, protože na umlčených buňkách byl nedostatek prolaktinového receptoru. U těchto buněk se snížila exprese povrchových kostimulačních molekul CD137 a CD154, ale ne exprese CD28, která tedy není spojena s aktivací lymfocytů prostřednictvím autokrinního prolaktinu. U mutovaných buněk byla také podstatně snížena fytohemaglutininem indukovaná produkce IL-2 a IL-4, což ukazuje, že autokrinní regulace prolaktinu aktivuje jak Th1, tak Th2 imunitní odpověď a má vliv na růst a aktivaci T lymfocytů a na expresi některých kostimulačních molekul a cytokinů (Xu et al. 2010). Význam autokrinního působení prolaktinu na T lymfocyty objevila i skupina Chavez-Rueda a kol., která naopak

blokovala autokrinní prolaktin specifickými protilátkami (Chavez-Rueda et al. 2005). Na zvířecích i lidských modelech byl prokázán antiapoptotický účinek prolaktinu, kdy prolaktin indukuje snížení apoptózy přechodných B buněk prostřednictvím anti IgM a může být důležitý v selhání rozpoznávací schopnosti B buněk vůči buňkám vlastního těla a tím mít značný vliv na rozvoj autoimunity (De Bellis et al. 2005). Trvale zvýšené hladiny prolaktinu snižují BCR zprostředkovanou apoptózu B buněk. Také zvyšuje expresi mRNA účinné antiapoptotické molekuly IFN γ R2 a zároveň snižuje expresi proapoptotické molekuly Trp63 (Saha et al. 2009). Antiapoptotický efekt byl prokázán i skupinou Ploszaj a kol., která se zabývala tímto efektem na myších epiteliálních buňkách mléčné žlázy. Zjistili, že prolaktin má vliv na upregulaci exprese Bcl-2 proteinu a zároveň brzdí expresi Bax proteinu. Bcl-2 je membránový protein, který působí jako inhibitor apoptózy, zatímco Bax protein apoptózu stimuluje (Ploszaj et al. 1998). Prolaktin má dále schopnost participovat na prezentaci antigenu tím, že ve vysokých koncentracích vyvolává zranění dendritických buněk za pomoci faktoru stimulujícího kolonie makrofágů a granulocytů (GM-CSF) a jejich vývoj z prekurzorů ke zralým antigen prezentujícím buňkám vyjadřujícím jak MHC II. Třídy, tak kostimulační molekuly CD40, CD80 a CD86 (Peeva and Zouali 2005). Také stimuluje uvolňování IL-2, TNF- α a IFN- γ jakožto faktorů účastnících se Th1 imunitní odpovědi, ale zároveň se podílí na produkci cytokinů imunitní odpovědi Th2. Prolaktin však přednostně podporuje Th1 imunitní reakci (Vera-Lastra et al. 2002). Th1 imunitní odpověď přes CD4+ lymfocyty může být prolaktinem modulována díky receptory zprostředkovaným změnám v expresi T-bet. T-bet je transkripční faktor, který řídí Th1 zánětlivou odpověď a který je v CD4+ buňkách ovlivňován působením prolaktinu. Ten v nízkých dávkách stimuluje prozánětlivou odpověď a vyvolává produkci T-bet přes JAK-2 a STAT-5 signální dráhu. Při vysokých dávkách prolaktinu jsou aktivovány supresory cytokinové signalizace (SOCS) 1 a 3. Jeho vliv na Th1 nebo Th2 imunitní odpověď závisí na velikosti jeho dávky (Tomio et al. 2008).

1.3.2. Prolaktin a autoimunitní onemocnění

Autoimunitní choroby jsou zapříčiněny nedostatkem tolerance imunitních buněk proti buňkám vlastního organismu, které jsou tak poškozovány. Tyto choroby jsou způsobeny genetickými faktory, ale jako spouštěč je důležitý faktor zevního prostředí. Tím

může být další např. infekční onemocnění nebo třeba určitá složka potravy, jako je tomu u celiakie. Tyto choroby mají své charakteristické znaky, což je hlavně jejich spojení s MHC alelami, podíl genetických i negenetických faktorů a chronický průběh (Matera et al. 2000). Rozvoj autoimunitních chorob souvisí s posuny rovnováhy mezi cytokinovou produkcí CD4+ buněčných linií. První fenotyp pomocných T buněk, Th1 se podílí na zánětlivé reakci a je spojen s produkcí prozánětlivých cytokinů IL-2 a IFN- γ . Další fenotyp Th2 je zapojen v humorální imunitě spoluprací s B lymfocyty, díky produkci cytokinů IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10 (O'Garra and Murphy 1993).

V nerovnováze způsobené autoimunitními chorobami může docházet k přesmyku imunitních odpovědí a prolaktin se tak může podílet na Th2 imunitní odpovědi svým vlivem na zvýšenou produkci a vývoj imunitních buněk. Tím se zvýší jejich aktivita a může propuknout autoimunitní choroba.

Mezi známé lidské autoimunitní choroby, u kterých byl zjištěván imunostimulační vliv prolaktinu, patří například systémový lupus erythematodes, celiakie, revmatoidní a psoriatická artritida či systémová skleróza (Fojtikova et al. 2010).

Bioaktivní prolaktin z mononukleárních buněk periferní krve je u pacientů se SLE sekretován v signifikantně vyšší míře než u zdravých kontrol a to jak po stimulaci buněk mitogenem konkavalinem A, tak bez ní (Larrea et al. 1997).

Skupina Ledesma-Soto a kol. zjišťovala, jestli zvýšená hladina exprese prolaktinového receptoru u myší koreluje s časným nástupem příznaků SLE a zvýšením počtu přechodných-1 B buněk po podávání prolaktinu, protože prolaktin je spojen s autoimunitními chorobami vyznačujícími se abnormální aktivací B lymfocytů. Bylo zjištěno, že všechny B buňky myších slezin tvoří prolaktinový receptor, ale výše jeho exprese závisí na stádiu, ve kterém se B buňky nacházejí. Přechodné-1 B buňky ho vyjadřují nejvíce v porovnání se zralými buňkami. Hyperprolaktinémie výrazně zvýšila produkci přechodných buněk u myší, které byly vysoce rizikové pro onemocnění SLE. Produkce zralých B buněk však nebyla účinkem prolaktinu zvýšena. To ukazuje na významný vliv prolaktinu při vývoji a zrání B buněk sleziny. Hyperprolaktinémie také zvýšila expresi prolaktinového receptoru u přechodných B buněk, což ukazuje, že korelace stupně onemocnění s úrovní exprese receptoru pro prolaktin hraje roli ve vývoji a zhoršení SLE. Prolaktin by tak možná mohl být dobrým testovacím markerem pro zjišťování SLE (Ledesma-Soto et al. 2012).

Ve studii Kapur a kol. byly sledovány hodnoty PRL v séru u dětských pacientů s aktivní celiakií, u pacientů v remisi a na přísné dietě, a u zdravých kontrol. Zjistilo se, že hyperprolaktinémie se objevuje u pacientů s aktivní celiakií a pouze u jednoho pacienta s dietou, u zbytku pozorovaných případů byla hladina prolaktinu v normě. Vzájemný vztah byl prokázán u zvýšené hladiny sérového prolaktinu a dobou trvání příznaků a věku pacientů u skupiny s aktivní celiakií. U pacientů s dietou byla zjištěna korelace mezi prolaktinem a stupněm atrofie klků a zánětlivé infiltrace lamina propria, kdy vyšší koncentrace prolaktinu je spojena s vyšším postižením střevní sliznice. Hodnota prolaktinu je tedy bezprostředně spjata se střevní patologií a může tak být důležitým ukazatelem průběhu nemoci (Kapur et al. 2004). Korelace hladiny prolaktinu s aktivitou onemocnění prokázala i skupina Reifen a kol. (Reifen et al. 1997). Prolaktin má zřejmě vliv na patogenezi celiakie, nicméně na toto téma ještě nebylo provedeno tolik výzkumů, aby prolaktin mohl být považován za její spolehlivý indikátor.

Prolaktin má negativní vliv na perzistenci a patogenezi revmatoidní artritidy (RA). Erb a kol. sledovali případ 44leté pacientky s RA. Byla léčena antirevmatickou medikací zahrnující kortikosteroidy, ovšem bez zlepšení akutní fáze. Po zlomenině stehenní kosti byly pacientce vyšetřeny hormonální hladiny pro zjištění osteoporózy, přičemž byla zjištěna zvýšená hladina prolaktinu v séru. Byla zahájena léčba kabercolinem (dopaminergní agonista, který snižuje hladiny prolaktinu) a po dvou měsících klesla hodnota prolaktinu do normálu. Tím se zlepšily příznaky RA, kdy v kloubech nebyly žádné známky synovitidy a RA je sérologicky i klinicky pod kontrolou (Erb et al. 2001).

Mezi autoimunitní choroby, jež mohou být negativně ovlivněny vysokou hladinou prolaktinu, patří i roztroušená skleróza. T lymfocyty zde působí proti buňkám centrální nervové soustavy, čímž způsobují demyelinizaci. Častější výskyt choroby u žen napovídá, že velkou roli hraje pohlavní dimorfismus a s ním spojené rozdíly v koncentraci pohlavních hormonů (Nociti et al. 2010).

U systémové sklerózy charakterizované fibrózou kůže a vnitřních orgánů byla prokázána zvýšená produkce prolaktinu T lymfocyty a zvýšená hladina prolaktinu v séru oproti zdravým kontrolám (Czuwara-Ladykowska et al. 2006).

1.3.3. Úloha prolaktinu v onkogenezi a nákaze parazity

Receptory pro prolaktin se nacházejí v mnoha orgánech, díky čemuž může mít abnormální aktivace prolaktinové dráhy souvislost se vznikem některých nádorových onemocnění, jako je například hepatocelulární karcinom. U pacientů s tímto maligním nádorovým onemocněním byla zjištěna zvýšená exprese prolaktinu v séru a také zvýšená exprese fosforylované JAK-2, která může mít vypovídající hodnotu v prognóze onemocnění. Pacienti s vysokou expresí p-JAK2 vykazovali vyšší pooperační rizika a pokud měli zároveň vysokou expresi receptoru pro prolaktin, celkově se snížila jejich naděje na přežití. Přes tuto signální dráhu byla prokázána i zvýšená proliferace rakovinných buněk (Yeh et al. 2012). Podobné výsledky byly zjištěny u rakoviny mléčné žlázy. Výzkum na myších potvrdil, že signální dráha PRLR/ JAK2 je nezbytná pro vypuknutí prolaktinem vyvolaného nádoru mléčné žlázy, ale pro růst a další vývoj rakovinných buněk nepostradatelná není. Prolaktin tedy nejspíš funguje jako místní růstový faktor v nádorových buňkách, protože zvyšuje expresi PRLR a jeho ligandu (Sakamoto et al. 2010). Prolaktin ale může mít také protinádorový efekt. Výzkum 16kDa izoformy prokázal, že její exprese v nádorových buňkách prostaty může snižovat jejich schopnost tvořit nádory, což je nejspíš způsobeno antiangiogenním efektem této izoformy (Kim et al. 2003).

Prolaktin též aktivuje imunitní odpověď při nákaze parazity. U myši nakažených parazitickým prvokem *Trypanozoma cruzi*, jimž byl podkožně podáván prolaktin, byla navozena imunitní odpověď zvýšenou proliferací T lymfocytů a v akutní fázi i zvýšenou proliferací buněčných subpopulací T lymfocytů CD3+CD4+ a CD3+CD8+, které spolupracují při zvládnání infekce. Navíc prolaktin aktivoval makrofágy a produkci oxidu dusného, což mělo za následek snížení trypanozom v krvi během vrcholné nákazy (Filipin Mdel et al. 2011).

Zkoumáním lidských mononukleárních buněk periferní krve pacientek s hyperprolaktinemií, které byly nakaženy parazitem *Toxoplasma gondii*, se zjistilo, že autologní prolaktin, stejně jako endogenní prolaktin rekombinovaný značně omezuje intracelulární růst parazita v těchto buňkách. Byla prokázána i pozitivní korelace mezi uvolňováním IL-10 a hladinou prolaktinu. Výzkum naznačuje, že prolaktin by mohl být jedním z faktorů působících na snižování počtu parazita v těle, takže hyperprolaktinémie v těhotenství může snižovat riziko šíření nákazy *T. gondi* (Dzitko et al. 2012).

1.4. Vrozená imunita

1.4.1. Vrozená imunitní reakce

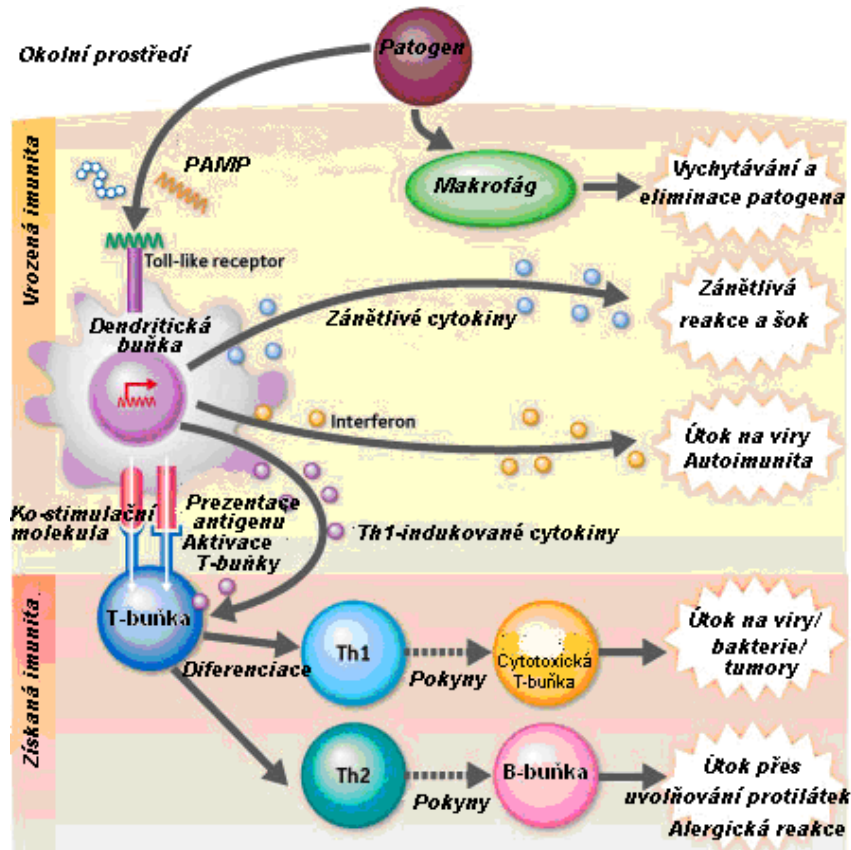
Vrozená neboli nespecifická imunita je fylogeneticky konzervovaná, zárodečně určená prvotní složka obrany organismu proti patogenům a v určitých formách se vyskytuje u všech mnohobuněčných živočichů (Medzhitov and Janeway 2000). Po rozpoznání patogenu je charakteristická okamžitou reakcí bez paměťové stopy. Adaptivní imunitu nejen předchází, ale zároveň se s ní i prolíná (viz Obr. 4). Skládá se z mechanické, chemické a buněčné složky. Mechanická složka zahrnuje zejména epidermis, mukóзовý sekret s antimikrobiálními účinky a řasinkový epitel (Basset et al. 2003; Mogensen 2009).

Složka chemická zahrnuje molekuly rozpoznávající evolučně konzervované vzory na patogenech, jako jsou například Toll-like receptory, peptidy a proteiny, které hydrolyzují patogeny. Další částí jsou cytokiny, jež se účastní organizace imunitní odpovědi. Mechanická a chemická složka jsou v první linii obrany proti škodlivým mikroorganismům a jejich působkům, protože epitelové buňky jsou v neustálém kontaktu s bakteriemi a jejich antigeny. Na mnoho pro jiné buňky prozánětlivých faktorů však epitelové buňky nevyvolávají obranou reakci. Je to proto, že musí rozpoznávat běžnou, fyziologickou mikroflóru, kde imunologicky neodpovídají, od buněk patogenních (Philpott et al. 2001).

Mastocyty, dendritické buňky, přirození zabíječi (NK) buňky, epitelové buňky, makrofágy a granulocyty tvoří složku buněčnou (Basset et al. 2003). Mezi tu patří i buňky monocyt-makrofágové buněčné linie. Mnohé antigeny patogenů po vstupu do hostitelského organismu přimějí nezralé dendritické buňky na periferii k jejich přemístění do lymfatických orgánů, jako jsou uzliny nebo slezina, kde po dozrání slouží jako účinné antigen prezentující buňky pro T a B lymfocyty, vylučují cytokiny a zahajují imunitní odpověď (Banchereau and Steinman 1998). Mezi další stimulanty pro tento přesun slouží prozánětlivé cytokiny a ligand CD40+.

Buňky ve vrozené, ale i získané imunitě hrají různou roli podle toho, jakou skupinu cytokinů produkují. Imunitní odpověď můžeme rozdělit na Th1, kdy je vylučován

například IFN- γ a IL-2. Tyto cytokiny jsou schopny aktivovat makrofágy a cytotoxické T-lymfocyty a tím bojovat proti intracelulárním bakteriím a virům. Naopak Th2 odpověď se projevuje expresí cytokinů IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10, aktivující žírné buňky a eozinofily čímž se nastartuje obrana proti parazitům (Koyasu and Moro 2012). Pokud se započne např. Th1 imunitní odpověď je zde snaha pro její udržení a zároveň potlačení odpovědi



Obrázek 4: Vrozená a získaná imunita a jejich interakce (upraveno dle URL 1)

Th2. Ovšem za některých podmínek je možný i přesmyk odpovědí např. v imunizaci pacienta vakcínami proti alergiím nebo v léčbě některých autoimunitních onemocnění.

1.4.2. Monocyty

Buňky imunitního systému vznikají v primárních lymfatických orgánech z pluripotentních kmenových buněk. Patří mezi ně i monocyty, středně velké buňky

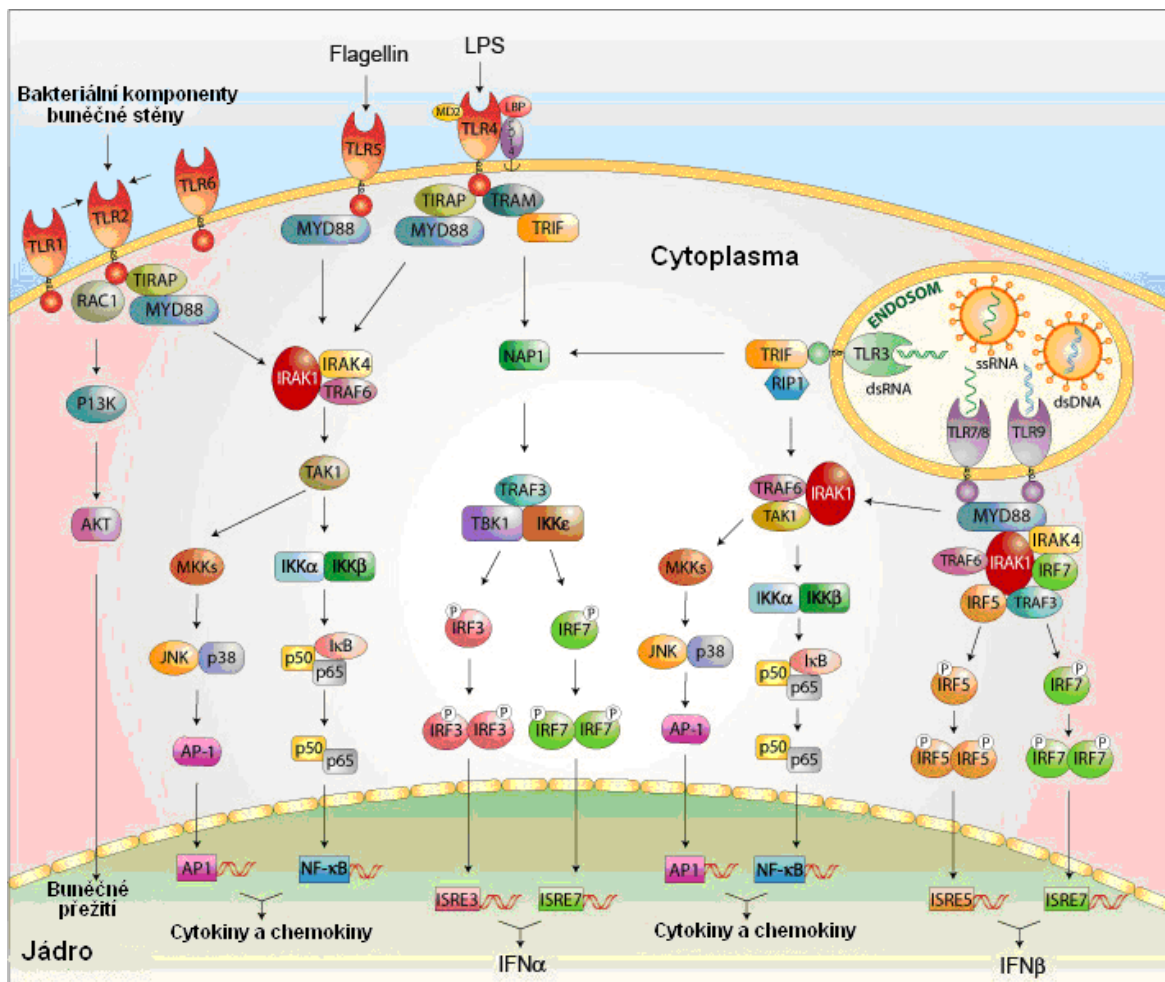
s jádrem ledvinovitého tvaru, které cirkulují v krvi a po vstupu patogenu do organismu dodávají napadeným tkáním makrofágy a dendritické buňky, v něž se cirkulující monocyt mění. Monocyty dále zesilují zánětlivý signál tím, že exprimují řadu prozánětlivých cytokinů a fungují také jako antigen prezentující buňky. Lidské cirkulující monocyty můžeme rozdělit do dvou hlavních podskupin. Studie Geissmanna a kol. zjišťovala hlavní podjednotky monocytů u myši. Dokázala, že exprese chemokinového receptoru CX₃CR1, který usnadňuje akumulaci monocytů v rozličných tkáních, také definuje dva typy lidských monocytů. První na svém povrchu vyjadřuje receptor CD14+ vázající lypopolysacharidy bakterií a indukující produkci prozánětlivých cytokinů. Druhá podskupina na svém povrchu exprimuje receptor CD16 pro FcγRIII a sdílí mnoho rysů s myšimi CX₃CR1^{high} monocyty (Geissmann et al. 2003). Dle nejnovějších studií se však lidské monocyty mohou klasifikovat do 3 podskupin podle míry exprese receptoru CD16+. Patří sem klasický CD14⁺⁺CD16⁻, intermediární CD14⁺⁺CD16⁺ a neklasický CD14⁺⁺CD16⁺ typ monocytů, z nichž každý má specializované funkce (Wong et al. 2012). Klasické monocyty během bakteriální nákazy *Streptokokus pneumoniae* regulují mechanismus T buněčné smrti zprostředkovaním apoptózy pomocí Fas. V nepřítomnosti monocytů by v případě zánětu probíhala u T buněk nekróza. T lymfocyty hrají klíčovou roli v obraně proti tomuto patogenu a monocyty indukci Fas- zprostředkované apoptózy regulují stupeň aktivace T buněk v místech akutní zánětlivé infekce (Daigneault et al. 2012). Výrazné nárůsty CD14⁺CD16⁺, maturovanějších CD14⁺⁺ monocytů byly zaznamenány u pacientů s těžkou bakteriální sepsí, což by mohlo souviset se zvýšenými hladinami IL-6 (Fingerle et al. 1993).

1.4.3. Toll-like receptory

Rozpoznávání bakteriálních struktur je evolučně velmi starý systém, který je podobný u savců, hmyzu i rostlin. Zárodečně omezený počet receptorů (PRRs) rozpoznává fylogeneticky neměnné s patogenem spojené molekulární vzory (PAMPs) nacházející se v jednotlivých třídách mikrobů. Navázání PAMPs na PRRs vyvolá složitý sled událostí vedoucí k expresi prozánětlivých genů a aktivaci zánětlivé reakce (Cook et al. 2004). Mezi tyto receptory patří C lektin, NOD receptory a hlavně rodina Toll-like receptorů (TLR) (Mogensen 2009). Jako první byl Toll receptor nalezen u octomilek *Drosophila*

melanogaster, kde hrál důležitou úlohu nejen v embryonálním vývoji, ale i v odpovědi dospělců proti houbám (Lemaitre et al. 1996). Později byly podobné buněčné receptory nalezeny i u savců. Toll-like receptory se objevují na mnoha buňkách imunitního systému včetně epiteliálních buněk, buněk monocyt-makrofágové řady, mastocytů, dendritických buněk, γ/δ T buněk, Th1 a Th2 α/β T lymfocytů a buněk B buněčné linie. Exprese TLR genů je nejvýraznější ve slezině a v leukocytech periferní krve (Medzhitov et al. 1997). U lidí rozlišujeme jedenáct zástupců TLRs, každý z nich identifikuje jiné druhy bakterií, virů a hub. Toll-like receptory rozpoznávají struktury na mikrobiálních buněčných površích zahrnující lypopolysacharidy, lipoproteiny, peptidoglykany, lipoarabinomannany a oligosacharidy (Basset et al. 2003), ale mohou také poznávat s nebezpečím spojené molekulární vzory (DAMPs), které pocházejí z poškozených buněk vlastní tkáně a mohou iniciovat a udržovat neinfekční zánětlivou odpověď (Lorne et al. 2010). TLR1, TLR2, TLR4 a TLR6 rozpoznávají mimo jiné různé druhy lipidů, zatímco TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9 rozpoznávají nukleové kyseliny a TLR5 zymosan. Vzhledem k identifikaci různých struktur je odlišná i jejich buněčná distribuce, kdy TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 a TLR10 se nalézají na buněčném povrchu, zatímco TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 se nacházejí uvnitř buňky v kompartmentech, jako jsou lysozomy nebo endozomy (Mogensen 2009). V Tabulce 1 (viz Příloha) je přehled TLRs a jejich ligandů.

Toll-like receptory se sestávají ze tří složek, kde extracelulární doména obsahuje několik na leucin bohatých opakování a je zodpovědná za detekci molekul spojených s patogenem. Dalšími částmi jsou transmembránová doména a cytoplazmatická doména, která je nazývána Toll/IL1 receptoru podobná doména (TIR), díky níž mají TLR podobné signální dráhy (Means et al. 2000). Tyto signální dráhy jsou vázané na jadernou translokaci transkripčních faktorů typu Rel (Rock et al. 1998). Navázáním PAMPs jednotlivé TLRs dimerizují a mění svojí konformaci pro vazbu adaptorového proteinu. Ten se následně páruje s proteinkinázami, což vede k aktivaci transkripčních faktorů a k transkripci mnoha prozánětlivých genů (viz Obr. 5). Mezi známé adaptorové molekuly vázající se na TIR doménu patří MyD88, MyD88 adaptoru podobný protein (MAL), TRIF, TRAM a SARM (O'Neill and Bowie 2007). Adaptory slouží jako vazba mezi ligand vázanými receptory a rozličnými serine/treoninovými kinázami, například MAPK kinázami (mitogenem aktivované proteinkinázy) (Kagan 2012; Kumar et al. 2011). Tyto dráhy hrají hlavní roli v navození prozánětlivé odpovědi aktivací exprese cytokinů a chemokinů prostřednictvím jaderného faktoru κ B nebo ve stimulaci produkce interferonů (Kagan 2012).



Obrázek 5: Schéma jednotlivých toll-like receptorů a jejich drah (upraveno dle URL 2)

1.5. Vliv prolaktinu, TLR2 a TLR4 na sepsi

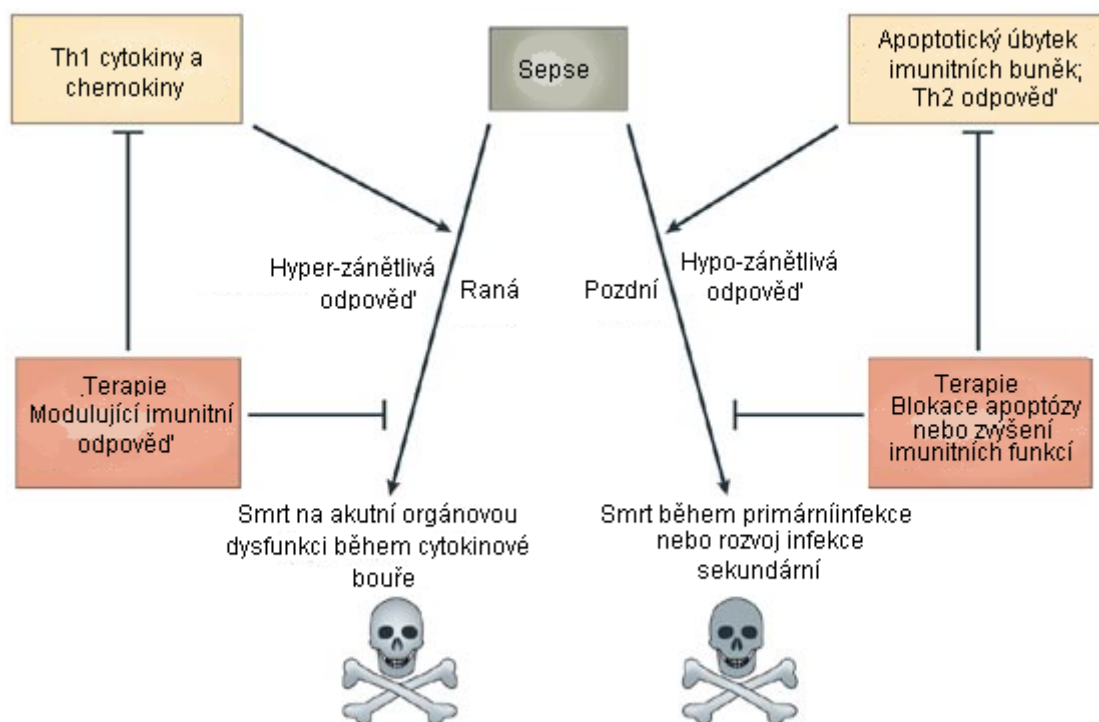
1.5.1. Sepsa

Sepsa je systémové onemocnění způsobené reakcí organismu na bakteriální nebo plísňovou infekci, kdy organismus není schopný zvládnout lokální zánět. Je jednou z nejčastějších příčin úmrtí u kriticky nemocných pacientů na jednotkách intenzivní péče. Projevuje se orgánovou dysfunkcí, abnormální hypoperfuzí, která zahrnuje laktázovou

acidózu a oligurii nebo sepsí indukovanou hypotenzí, kdy systolický krevní tlak je nižší než 90 mm Hg. Dalším projevem je horečka nad 39°C a celkově špatný stav organismu (Bone et al. 1992). Pacienti jsou náchylnější k nozokomiální infekci. Pokud v důsledku sepsy začnou selhávat orgány je sepsa považována za závažnou (Wheeler and Bernard 1999).

Hlavní úlohou spolupráce fyziologických systémů zahrnujících hypotalamo-hypofyzární osu, autonomní nervový systém a imunitní systém je zajistit účinnou obranu jednak proti patogenu, ale i proti vlastní přehnané imunitní reakci na patogen.

Pro sepsi je charakteristické nadměrné působení vrozené imunitní reakce, kdy její nastartování patogenem způsobí aktivaci makrofágů a neutrofilů, které produkují a zároveň odpovídají na cytokiny a chemokiny a další produkty například komplementového systému. Toto prozánětlivé prostředí dále způsobuje uvolňování sekundárních zánětlivých mediátorů, což při poruše regulačních imunitních mechanismů vede k nekontrolovatelnému zánětu a poškození hostitele vlastní imunitou (Rittirsch et al. 2008) nebo vede ke stavu, kdy organismus na patogena nereaguje (Boyd 2012).



Obrázek 6: Negativní vliv imunitního systému při sepsi (upraveno dle Hotchkiss and Nicholson 2006)

Imunitní odpověď je zahájena navázáním patogenu na příslušné molekuly, hlavně TLR, které spouštějí další zánětlivé kaskády zahrnující aktivaci různých transkripčních faktorů a nadprodukcii prozánětlivých cytokinů jako je TNF- α a interleukin-1 a cytokinů protizánětlivých například IL-6 (Namas et al. 2012). IL-6 dále aktivuje produkci C-reaktivního proteinu v hepatocytech (Zunszain et al. 2012), který je tak při sepsi výrazně zvýšený.

V této práci jsem se zabývala vlivem TLR2, TLR4 a prolaktinu na sepsi.

1.5.2. Sepse a Toll-like receptory

TLR2, který je aktivní jako heterodimer s TLR1 nebo TLR6, váže především peptidoglykany grampozitivních bakterií, jako jsou stafylokoky a streptokoky. TLR4 váže zejména lipopolysacharidy gramnegativních bakterií, kam patří také *E.coli* a rod *Salmonella*. Tyto TLR spouštějí kaskádu reakcí přes MyD88 signální dráhu a tím exprimují charakteristické prozánětlivé cytokiny (Pene et al. 2009), jež jsou uvolňovány do periferní krve. Svým působením aktivují T lymfocyty, makrofágy a polymorfonukleární granulocyty, které zahájí imunitní odpověď v postižených tkáních (Gosemann et al. 2010). Rozpoznávání bakteriálních struktur TLRs receptory je spojeno s dalšími koreceptory, jež s TLRs spolupracují. U TLR4 jsou to molekuly MD-2 a CD14 spojující se s extracelulární doménou TLR. Tyto molekuly zesilují odpověď na lipopolysacharidy (Akashi et al. 2003).

Mezi neaktivnější dráhy přenosu signálu patří mitogenem aktivované protein kinázové (MAPK) dráhy. U savců se dělí do tří rodin: c-Jun NH₂-terminální kináza (JNK), extracelulární signál-regulující protein kináza (ERK) a p38 mitogenem- aktivovaná protein kináza (p38). Tyto dráhy jsou aktivovány fosforylací ale pro regulaci je vytvořen systém účinných fosfatáz využívaných k defosforylací. MAP kináza fosfatáza-2 (MAPK-2) neboli duálně-specifická fosfatáza (DUSP) reguluje stejně jako MAPK1 signální dráhy MAPK. MAPK-2 hraje roli při regulaci sepse kdy myši bez MAPK-2 genu mají oproti divokému typu myši větší šanci na přežití intraperitoneální lipopolysacharidové nebo polymikrobiální infekce. V séru těchto myši jsou nižší hladiny prozánětlivých cytokinů a makrofágy v kostní dřeni MKP-2 -/- myši vykazují sníženou indukci TNF- α a protizánětlivého cytokinu IL-10. Zároveň byla po stimulaci LPS zvýšena fosforylace extracelulární signál-regulující protein kinázy a indukce MAPK-1 a snížena fosforylace

JNK a p38. To ukazuje, že snížení některých pro a protizánětlivých cytokinů je výhodné pro přežití sepse a zároveň je ukázáno jak je MAPK-2 zapojena do signální dráhy fosforylace a do ovlivňování MAPK-1 (Cornell et al., 2010).

Skupina Pene a kol. studovala, jestli TLR2 a/nebo TLR4 přispívají nebo naopak zabraňují vyčerpání dendritických buněk ve slezině u myši s polymikrobiální sepsí, protože vyčerpání dendritických buněk ze sekundárních lymfoidních orgánů je charakteristickým znakem imunitní dysfunkce, která je vyvolána sepsí. Bylo zjištěno, že nedostatek TLR2 i TLR4 snižuje sepsí vyvolané předčasné vyčerpání sleziny, protože jsou zapojeny do sepsí indukované apoptózy dendritických buněk, a zároveň, že tyto TLR nejsou nezbytné pro zrání dendritických buněk, která následuje po sepsí (Pene et al. 2009).

Také Alves-Filho a kol. se zabývali vlivem TLR2 na migraci neutrofilů a odolnost proti polymikrobiální sepsí. Tato studie byla opět prováděna na myších a stejně jako v předchozím výzkumu bylo zjištěno, že nedostatek TLR2 zvyšuje přežívání v polymikrobiální sepsí a také zabraňuje snížení migrace neutrofilů (Alves-Filho et al. 2009). Toto může naznačovat, že TLR sice kontrolují a navozují reakci proti patogenu, ale zároveň jejich další funkce mohou způsobovat snížení obranyschopnosti organismu a tím způsobovat pro organismus nevýhodnou náchylnost k sekundárním infekcím.

Práce Roggera a kol. sledovala, zda TLR4 hraje roli v ochraně před smrtelnou gramnegativní bakteriální sepsí způsobenou *E. Coli*. Zaměřili se na produkci cytokinů a přežití 4 typů myši: divoký typ, TLR4^{-/-}, MyD88^{-/-}. Čtvrtý typ myši TLR2^{-/-} byl použit jako kontrola. Ukázalo se, že pro produkci prozánětlivých cytokinů TNF a IL-6 je nezbytný TLR4 a MyD88, protože u myši bez těchto genů byla exprese skoro nedetekovatelná, ale naopak se ukázalo, že deficientní myši pro TLR4 a MyD88 jsou chráněny před smrtelnou bakteriální sepsí, způsobenou gramnegativními bakteriemi. To značí, že TLR4 a MyD88 jsou rozhodujícími efektoři pro vyvolání vrozené imunitní reakce při sepsí. Dalším unikátním zjištěním velmi důležitým pro možnou terapii bylo, že podání protilátky proti TLR4 může podpořit přežití pacientů s gramnegativní sepsí (Roger et al. 2009). Z těchto výzkumů je zřejmé, že TLR4 jsou sice nezbytné pro rozpoznání patogena, ale zároveň, že přehnaná reakce organismu na bakteriální nákazu výrazně snižuje šanci na přežití organismu a proto jsou hledány možnosti jak zablokovat TLR receptory a tím zvýšit šance na přežití.

Tato domněnka byla potvrzena díky výzkumu genipinu, který má protizánětlivé účinky a inhibuje signalizaci TLR. Genipin zabraňuje vysoké expresi IFN- β a TNF- α tím,

že zasahuje do signalizačních kaskád TLR2 a TLR4. Oslabení produkce prozánětlivých faktorů má pozitivní vliv na snížení úmrtnosti a oslabení orgánového poškození během sepse (Kim et al. 2012).

Také chitohexóza, polysacharid o malé molekulové hmotnosti je schopen vyvažovat zánětlivý atak vyvolaný lipopolysacharidy patogenů, tím, že se váže na aktivní místa TLRs a tím inhibuje LPS indukovanou produkci prozánětlivých cytokinů. Zároveň je schopen pomocí alternativní cesty přes TLR4 aktivovat makrofágy, které jsou odolné proti aktivaci LPS a jsou spojeny s opravou tkání a rozpoznáváním zánětu (Panda et al. 2012).

1.5.3. Sepsa a prolaktin

Při sepsi se exprese prolaktinu jakožto stresového cytokinu zvyšuje. Prolaktin následně zvyšuje expresi Bcl-2, který potlačuje stresem indukovanou apoptózu lymfocytů a tím zvyšuje vyhlídky na přežití při septických stavech (Felmet et al. 2005). Bylo prokázáno, že u dětí může prolongovaná hypoprolaktinemie způsobit lymfopenii a lymfoidní depleci a následně i smrt z nozokomiální infekce (Carcillo et al. 2012; Felmet et al. 2005). Tyto nálezy však jsou v rozporu s výzkumem Oberbecka a kol., který studoval imunomodulační vlastnosti prolaktinu u septických myší. Zvířata byla podrobena laparotomii nebo ligaci a punkci céka, což způsobilo sepsi. Některým byl podáván pouze fyziologický roztok, některým prolaktin. Po určitém čase byla zjišťována proliferace cytokinů IL-2, IL-6, IFN- γ a sledována apoptóza splenocytů. Tato skupina zjistila, že podáváním prolaktinu se výrazně zvýšila úmrtnost septických myší a zvýšila se i apoptóza splenocytů doprovázená jejich sníženou proliferací (Oberbeck et al. 2003). Oberbeck a kol. také sledovali účinky metoclopramidů na buněčné imunitní funkce u myší s polymikrobiální sepsí. Je známo, že metoclopramid zvyšuje uvolňování prolaktinu a tím moduluje imunitní funkce. U septických myší ošetřených touto složkou se zvýšila rychlost apoptózy splenocytů a také uvolňování cytokinů IL-6 a IFN- γ , jejichž výdej buňkami je při sepsi značně snížený. Na rozdíl od předchozí studie se ale nepotvrdila zvýšená mortalita zvířat (Oberbeck et al. 2004). U exprese cytokinů byla zjištěna snížená exprese IL-2, která je sice indukovaná sepsí, ale při podávání prolaktinu se ještě prohloubila. Oslabilo se sepsí indukované uvolňování IFN- γ . U IL-6 nebyly zjištěny žádné změny. Tímto je zřejmé, že podávání prolaktinu septickým myším má výrazný vliv na snížení přežití a na změny

v imunitní odpovědi (Oberbeck et al. 2003). Protichůdné závěry přinesl výzkum autorů Zhu a kol., kteří zjišťovali vliv prolaktinu na genovou expresi prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF- α v peritoneálních makrofázích, v makrofázích sleziny a Kupfferových buňkách u myši během pozdní sepse (vystavení makrofágů po více než 24 hodin). Ti zjistili, že podávání prolaktinu má významný vliv na zvyšování exprese všech cytokinů ve všech sledovaných buňkách. Znamenalo by to, že prolaktin má vliv na zvyšování cytokinové produkce během pozdní sepse, kdy jinak dochází k jejímu vyčerpání a může tak být prospěšný pro zlepšení buněčné imunity (Zhu et al. 1997).

2. Hypotézy a cíle diplomové práce

2.1. Hypotézy

Pro naši studii jsme postulovali následující hypotézy.

1) Hladina exprese mRNA periferního prolaktinu, TLR2 a TLR4 v monocytech je u pacientů se sepsí významně vyšší než u zdravých kontrol, protože organismus zaplavený infekčními agens aktivuje své obranné mechanismy.

2) Hladina exprese mRNA PRL v monocytech se u septických pacientů postupně s příznivým vývojem onemocnění snižuje, což znamená, že při záchytu pacienta se septickou příhodou je exprese mRNA PRL nejvyšší a s postupným uzdravováním klesá. Totéž platí pro TLR2 a TLR4.

3) Genotypy *PRL* -1149 G/T SNP mají vliv na míru exprese mRNA PRL v monocytech nejen u zdravých kontrol, ale ovlivňují také průběh sepse a šanci na přežití.

2.2. Cíle

1) Určit hodnoty exprese mRNA PRL, TLR2, TLR4 v CD14+ monocytech u kontrol, v důsledku sepse zemřelých pacientů a pacientů přeživších a vzájemně je porovnat mezi sebou a s dalšími klinickými údaji.

2) U pacientů přeživších stanovit hodnoty exprese PRL, TLR2, TLR4 mRNA ve třech po sobě následujících odběrech. Zjistit, zda existují rozdíly v expresi mezi jednotlivými odběry, jež by refletovaly proces uzdravování pacienta a podpořily význam prolaktinu jako stresového cytokinu. Porovnat tyto údaje s dalšími klinickými daty.

3) U každého pacienta provést genotypizaci *PRL* -1149 G/T SNP. Zjistit, zda určitý genotyp ovlivňuje míru exprese PRL, TLR2 a TLR4 a zda má některý genotyp protektivní či naopak rizikový účinek na průběh sepse či sepsí zapříčiněnou mortalitu.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

V letech 2008-2011 byly odebrány vzorky plné krve pacientům z Ústavu hematologie a krevní transfuze Praha (ÚHK), z Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny (KAR) 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a z Metabolické jednotky (MJ) Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Krev byla pacientům odebrána celkem třikrát, kdy se první odběr (A) uskutečnil ihned po záchytu pacienta se sepsí, další odběr (B) následoval po odeznění akutních příznaků, což bylo charakterizováno snížením horečky pod 38°C, snížením CRP pod 100 mg/l, oběhovou stabilizací a žádnou další orgánovou dysfunkcí a poslední odběr (C) proběhl po ukončení pacientovy hospitalizace. Každému pacientovi bylo odebráno zhruba 8 ml plné krve do zkumavek s protisrážlivou úpravou (kyselina ethylendiamintetraoctová-EDTA), která byla následně zpracována v laboratořích Ústavu obecné biologie a genetiky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Celkem byly zpracovány vzorky od 87 pacientů, ale do studie jich bylo zahrnuto 50, protože někteří pacienti nesplňovali všechny podmínky (změna diagnózy, jiná příčina úmrtí než v důsledku sepse, pouze jeden nebo dva odběry). Pacienti z MJ a KAR nebyli v této práci zahrnuti do statistického hodnocení, protože nebyla známa příčina sepse ani nebyly k dispozici klinické údaje potřebné pro zpracování. Někteří pacienti se tří odběrů nedožili, proto byly porovnávány pouze poslední odběry před smrtí. Pacienti, kteří prodělali dvě septické příhody, byli hodnoceni nezávisle, tzn. vzorek A, B, C z první septické příhody a vzorek A, B, C z druhé sepse. Po záchytu každého vzorku jsme ho spolu s příslušným jménem, rodným číslem, diagnózou a datem přijetí zapsali do databáze, kam jsme dále doplňovali příslušná klinická data. Se vzorkem jsme posléze pracovali pouze pod určeným číslem daného pacienta a písmenem vzorku. Příklad PRLUHKT 23A (23. pacient v naší databázi odebrán v Ústavu hematologie a krevní transfuze Praha při septické příhodě).

Jako kontrolní skupina byly použity buffy coaty od zdravých dárců z Transfúzního oddělení (TO) Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze. Celkem bylo zpracováno 40 vzorků.

Tabulka 2: Charakteristika hodnocených pacientů

Počet celkem (ženy)	ÚHKT 43 (12)	KAR 4 (1)	MJ 3 (1)	TO 40 (12)
Věk (průměr +/- SEM)	48,02 ± 2,295	62 ± 4,27	62,33 ± 2,4	41,13 ± 1,77
Transplantace Ano	32	0	0	NA
Infekční agens: Grampozitivní	15	NA	NA	NA
Infekční agens: Gramnegativní	8	NA	NA	NA
Infekční agens: Plísně	4	NA	NA	NA
Infekční agens: Blíže nespecifikováno	16	NA	NA	NA

Pozn: ÚHKT = Ústav hematologie a krevní transfuze; KAR = Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny; MJ = Metabolická jednotka; TO = Transfúzní oddělení; NA = neurčeno

Tabulka 3: Charakteristika hodnocených pacientů (ÚHKT, KAR, MJ dohromady)

Počet celkem (ženy)	Mrtví 17 (6)	Odběr A 33 (8)	Odběr B 33 (8)	Odběr C 33 (8)
Transplantace (%)	9 (52.9 %)	16 (48,49 %)	18 (54,55 %)	22 (66,67 %)
Infekční agens: Grampozitivní	3 (17.6 %)		12 (36,36 %)	
Infekční agens: Gramnegativní	2 (11.8 %)		6 (18,18 %)	
Infekční agens: Plísně	0 (0 %)		4 (12,12 %)	
Infekční agens: Nespecifikováno	5 (29.4 %)		11 (33,33 %)	

Pozn: U pacientů z KARu a MJ nebyla dodána některá klinická data.

3.2. Metody

3.2.1. Studium genové exprese mRNA pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase

Po odběru vzorku periferní krve byly imunomagneticky separovány monocyty, z nich následně vyizolována RNA, která byla poté pomocí reverzně transkriptázové

polymerázové řetězové reakce převedena do cDNA. Dalším krokem bylo zjišťování exprese jednotlivých genů za pomoci polymerázové řetězové reakce v reálném čase.

Izolace monocytů z plné krve

Z plné krve byly monocyty separovány pomocí Dynabeads magnetických kuliček s protilátkami proti CD14. Celá izolace probíhala na ledu v magnetickém stojanu

Použité chemikálie:

- Dynabeads CD14; Invitrogen, USA
- PBS (phosphat buffered saline) pH= 7,4; Invitrogen, USA
- RNA-*later* solution; Ambion, USA

Postup separace monocytů:

- 1) V 50 ml zkumavce naředíme 8 ml krve + 8 ml PBS.
- 2) Přidáme 70 μ l Dynabeads magnetických kuliček.
- 3) Zkumavku uzavřeme a za pravidelného občasného promíchání necháme inkubovat 5 minut na ledu, aby se protilátka navázaná na magnetické kuličky spojila s odpovídajícím antigenem na monocytech.
- 4) Poté zkumavku vložíme na 3 minuty do magnetického stojanu, který je také v nádobě s ledem.
- 5) Zkumavku otevřeme a pipetou odstraníme supernatant (směs PBS a periferní krve, ale již bez monocytů). Značené buňky zůstanou přichycené na stěně zkumavky přivrácené k magnetu.
- 6) Zkumavku vyndáme a doplníme 15 ml PBS. Důkladným protřepáním separované buňky promyjeme.
- 7) Opět zkumavku vložíme na 3 minuty do magnetického stojanu.
- 8) Odsajeme veškerou tekutinu.
- 9) Kroky 6, 7 a 8 opakujeme ještě jednou, abychom vyizolované buňky důkladně promyli.
- 10) Zkumavku vyjmeme ze stojanu a k získaným buňkám přidáme 1 ml roztoku RNA-*later*. Pipetováním dobře promícháme (nasátím a vypuštěním), abychom smyli všechny buňky ze stěn zkumavky.

- 11) Vzniklou směs přeneseme do kryozkumavky a uchováváme v mrazicím boxu při -80°C .

Izolace RNA z monocytů

Z monocytů vyizolujeme pomocí speciálních kolonek se silikagelovou membránou RNA, která je promývacími roztoky zbavena nežádoucích nečistot. Koncentraci a čistotu RNA změříme na spektrofotometru. Celá izolace je prováděna v laminárním boxu.

Použité chemikálie

- RNeasy Mini Kit; Qiagen, Německo
- Pufř RLT
- Pufř RW 1
- Pufř RPE (naředíme etanolem dle instrukcí výrobce)
- RNase-free voda

Postup izolace RNA z monocytů za pomoci kitu RNeasy mini

- 1) Monocyty v RNA lateru necháme rozmrazit při pokojové teplotě.
- 2) Buňky centrifugujeme při 8250g 10 minut.
- 3) Supernatant odsajeme pipetou.
- 4) Přidáme 600 μl pufř RLT pro lýzu buněk a pipetováním promícháme.
- 5) Buňky homogenizujeme pomocí jehly a injekční stříkačky - 5x nasajeme a vypustíme zpět. Buňky přeneseme do mikrozukumavky.
- 6) Přidáme 600 μl 70% etanolu a pipetováním promícháme.
- 7) 700 μl vzorku přeneseme na kolonku, která je usazená ve sběrné zkušavce, aniž bychom potřísnil okraje. Centrifugujeme 30 sekund při 18000g. Filtrát vylijeme, sběrnou zkušavku osušíme a použijeme dále.
- 8) Do kolonky přidáme pro promytí 700 μl pufř RW 1 a centrifugujeme 30 sekund při 18000g. Sběrnou zkušavku s filtrátem vyhodíme.
- 9) Vezmeme si novou sběrnou zkušavku a do ní přeneseme kolonku. Přidáme 500 μl pufř RPE a opět centrifugujeme 30 sekund na 18000g. Filtrát vylijeme, sběrnou zkušavku osušíme a použijeme znovu.
- 10) Přidáme opět 500 μl pufř RPE a centrifugujeme 2 minuty při 18000g. Filtrát

- 11) vylijeme a sběrnou zkumavku vrátíme pod kolonku. Centrifugujeme 1 minutu, abychom se úplně zbavili pufru RPE. Následně sběrnou zkumavku vyhodíme.
- 12) Vezmeme si novou sběrnou zkumavku a přeneseme kolonku. Přidáme 100 μ l
- 13) RNase-free vody a inkubujeme 2 minuty. Poté centrifugujeme 2 minuty při 18000g a filtrát s RNA si necháme. Kolonku vyhodíme.
- 14) K filtrátu přidáme 300 μ l pufru RLT a 300 μ l 96% etanolu a promícháme pipetou pro další promytí.
- 15) Směs přeneseme na novou kolonku (700 μ l) a opakujeme kroky 7-10.
- 16) Vezmeme si novou sběrnou zkumavku a přeneseme kolonku. Přidáme 40 μ l
- 17) RNase-free vody a inkubujeme 2 minuty. Poté centrifugujeme 2 minuty při
- 18) 18000g a filtrát (získanou RNA) přepipetujeme do kryozkumavky.
- 19) 15) Na nanofotometru změříme koncentraci a čistotu. RNA a uchovááme při 80°C.

Výsledná koncentrace RNA z 8ml plné periferní krve se pohybuje okolo 30ng/ μ l, ze 4ml buffy coatu kolem 60ng/ μ l.

Reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (RT PCR)

Díky reverzní transkripci můžeme převést RNA do komplementární DNA (cDNA), kterou dále využijeme v polymerázové řetězové reakci v reálném čase. Celý postup je prováděn v laminárním boxu.

Použité chemikálie

- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Life Technologies - Applied Biosystems, USA
 - 10x RT Pufr
 - 25x dNTP Mix (100mM)
 - 10x RT Random Primers
 - MultiScribe Reverse Transcriptase 50 U/ μ L

Postup RT PCR

- 1) Všechny komponenty kitu necháme roztát na ledu.

- 2) Podle počtu reakcí připravíme základní reakční směs, v Tabulce 4 je uvedeno množství na jednu reakci. Směs připravujeme dvakrát, jednu s a jednu bez reverzní transkriptázy – tato reakce poslouží jako negativní kontrola.

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro jednu reakci RT PCR

Komponenty	Objem (μl)	
	Směs s reverzní transkriptázou	Směs bez reverzní transkriptázy
10x RT Pufr	2,0	2,0
25x dNTP mix (100 mM)	0,8	0,8
10x RT Náhodné primery	2,0	2,0
MultiScribe Reverzní Transkriptáza	1,0	-
Voda (DNase, RNase free water)	4,2	5,2
Celkem	10,0	10,0

- 3) Do 96-ti jamkové destičky napipetujeme po 15μl reakční směsi pro daný gen. Reakce je prováděna v tripletech, protože každý vzorek a jeho gen sledujeme třikrát pro minimalizování chyb pipetování (~ technické triplety).
- 4) cDNA získanou v RT PCR 10x naředíme vodou (Water - DNase, RNase – None detect).
- 5) Do příslušných jamek napipetujeme 10μl naředěné cDNA. Pipetujeme tak, aby v jamkách nevznikaly bubliny.
- 6) Destičku přelepíme optickou folií a 2 minuty centrifugujeme při 500g.
- 7) Destičku vložíme do ABI Prism 7000 SDS a měříme pomocí relativní kvantifikace. Podmínky reakce nastavíme takto:
- | | |
|---------------------------------|--------------------|
| 1. krok (zničení případné RNA): | 2 minuty při 50°C |
| 2. krok (hot start): | 10 minut při 95°C |
| 3. krok (denaturace): | 15 sekund při 95°C |
| 4. krok (hybridizace, extenze): | 1 minutu při 60°C |
- (Kroky 3 a 4 se opakují 50x)
- 8) Po dokončení reakce uložíme data získaná z programu 7000 Sequence Detection Software 1.2.3, která následně budeme statisticky analyzovat.

3.2.2. Studium jednonukleotidového polymorfismu -1149 G/T v promotoru genu pro prolaktin

Pro tuto studii musíme nejprve vyizolovat DNA, amplifikovat a následně provést štěpení pomocí enzymu XapI. Poté provedeme elektroforézu, která nám naštěpené úseky zobrazí.

Izolace DNA

Na izolaci použijeme plnou nesrážlivou krev odebranou do EDTA (pacienti) či buffy coat (zdravé kontroly).

Použité chemikálie

- QIAamp DNA Blood Mini Kit; Qiagen, Německo
 - Pufir AL
 - Pufir AW1 (koncentrát, který naředíme etanolem podle instrukcí výrobce)
 - Pufir AW2 (koncentrát, který naředíme etanolem podle instrukcí výrobce)
 - Pufir AE
 - QIAGEN proteáza (smícháme s proteázovým rozpouštědlem)
 - Proteázové rozpouštědlo

Postup izolace DNA

- 1) Na dno mikrocentrifugační zkumavky napipetujeme 20 μ l QIAGEN Proteázy.
- 2) Přidáme 200 μ l plné krve (taktéž u buffy coatu).
- 3) Přidáme 200 μ l Pufir AL a 15 sekund vortexujeme.
- 4) Inkubujeme 10 minut při 56°C.
- 5) Poté krátce centrifugujeme, abychom odstranili kapičky z víčka.
- 6) Přidáme 200 μ l 96% etanolu a vortexujeme 15 sekund. Poté opět krátce centrifugujeme.
- 7) Směs opatrně přeneseme na kolonku, aniž bychom potřísnili okraje zkumavky.
- 8) Centrifugujeme 1 minutu při 6000g. Filtrát odstraníme a usadíme kolonku do čisté sběrné zkumavky.

- 9) Kolonku opatrně otevřeme a přidáme 500μl Pufr AW1. Zavřeme a 1 minutu centrifugujeme při 6000g. Opět odstraníme filtrát a kolonku přemístíme do nové sběrné zkumavky.
 - 10) Kolonku otevřeme a přidáme 500μl Pufr AW2. Zavřeme a centrifugujeme 3 minuty při 18000g.
 - 11) Filtrát odstraníme a kolonku přemístíme do nové sběrné zkumavky. Opatrně přidáme 200μl vody (PCR ultra H₂O).
 - 12) Inkubujeme 1 minutu při pokojové teplotě. Poté centrifugujeme 1 minutu při 6000g.
 - 13) Filtrát (získanou DNA) přepipetujeme do kryozkumavky. Uchovááme při 4°C, pro dlouhodobé skladování použijeme -20°C.
- Výnos z 200 μl vzorku periferní krve se pohybuje kolem 6μg DNA.

Polymerázová řetězová reakce

Slouží k amplifikaci úseku promotorové oblasti prolaktinu.

Použité chemikálie

- PCR reakční kit; Fermentas, Kanada
 - Taq DNA Polymerase (rekombinantní) 500u, 5u/ul
 - 10x Taq Pufr s (NH₄)₂SO₄
 - 25 mM MgCl₂
- Primery; East Port Praha, Česko
 - Primer F 5' - GCA GGT CAA GAT AAC CTG GA -3' (přímý)
 - Primer R 5' - CAT CTC AGA GTT GAA TTT ATT TCC TT -3' (zpětný)
- dNTP - původní koncentrace 100 mM byla zředěna na koncentraci 10mM.; Fermentas, Kanada

Postup PCR

- 1) Všechny reagenty kromě Taq polymerázy necháme rozmrazit na ledu a přípravu reakční směsi provádíme v laminárním boxu.
- 2) Připravíme reakční směs podle tabulky (Tab. 6). Směs nachystáme také pro jednu negativní kontrolu, kam místo vyizolovaného DNA dáme vodu a jednu pozitivní kontrolu, kde máme vzorek s již určeným genotypem.

- 3) Směs vortexujeme a připravíme si zkumavky pro vzorky.
- 4) Do každé zkumavky dáme 20 μ l reakční směsi.
- 5) Mimo laminární box přidáme 0,5 μ l x 30 ng/ μ l DNA, do negativní kontroly přidáme vodu a pipetováním promícháme.
- 6) V termocykleru nastavíme podmínky reakce:
 1. krok (počáteční denaturace): 2 minuty při 94°C
 2. krok (denaturace): 17 sekund při 94°C
 3. krok (hybridizace): 17 sekund při 55°C
 4. krok (extenze): 17 sekund při 72°C
 (Kroky 2, 3 a 4 se opakují 35x)
 5. krok (konečná extenze): 1 minutu při 72°C
- 7) Jakmile je víko termocycleru předeříté, vložíme vzorky a necháme proces běžet. PCR produkty uchováváme při 4°C, pro dlouhodobější uskladnění volíme -20°C. Přítomnost amplifikace žádaného úseku DNA potvrdíme elektroforeticky.

Tabulka 6: Složení směsi pro PCR

Komponenty	Objem (μl)
Voda (PCR ultra H ₂ O)	14,76
25mM MgCl ₂	2,00
Směs dNTPs (10mM každý dNTP)	0,40
Přímý primer (50 μ M)	0,32
Zpětný primer (50 μ M)	0,32
10x PCR pufr s (NH ₄) ₂ SO ₄	2,00
Taq DNA polymeráza (5U/ μ l)	0,20
Celkem	20,00

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Štěpíme amplifikovaný úsek a elektroforetickou separací zjišťujeme přítomnost alely G nebo T.

Použité chemikálie

- XapI (ApoI) Kit; Fermentas, Kanada
 - XapI (ApoI) 500u, 10u/ μ l
 - 10x Pufr Tango
 - 25mM MgCl₂; Fermentas, Kanada

Postup RFLP

- 1) Reagencie (kromě enzymu, který vyndáme z mrazáku až bezprostředně před použitím) necháme rozmrazit na ledu.
- 2) Připravíme reakční směs podle Tabulky 7.

Tabulka 7: Reakční směs pro restriční štěpení

Komponenty	Objem (μl)
Voda (PCR ultra H ₂ O)	2,5
25mM MgCl ₂	1,5
10x pufr Tango	0,5
XapI restriční endonukleáza	0,5
PCR templát	5,0
Celkem	10

- 3) Směs vortexujeme a připravíme si zkumavky pro vzorky.
- 4) Do každé zkumavky napipetujeme 5μl směsi.
- 5) Přidáme 5μl PCR produktu a promícháme pipetou.
- 6) V termocykleru nastavíme podmínky reakce:
 1. krok (restrikce): 120 minut při 37°C
 2. krok (denaturace enzymu): 25 minut při 80°C
- 7) Naštěpenou DNA uchováváme při 4°C

Elektroforetická separace

Nejprve elektroforeticky zjišťujeme úspěšnost PCR amplifikace. Pokud se podařila, pokračujeme restričním štěpením a elektroforetickou separací již naštěpených fragmentů. Zjišťujeme přítomnost konkrétní alely. U alely G vzniknou tři fragmenty o délce 17bp, 35bp a 85bp, u alely T 2 fragmenty 17bp a 120bp. Fragment o délce 17bp je kontrolní. Na gelu můžeme vidět homozygota TT s výrazným 120bp fragmentem, homozygota GG s fragmentem o délce 85bp a u heterozygota GT jsou viditelné 2 fragmenty - 120bp a 85bp. 120bp fragment je však výraznější. Z gelu odečteme výsledky.

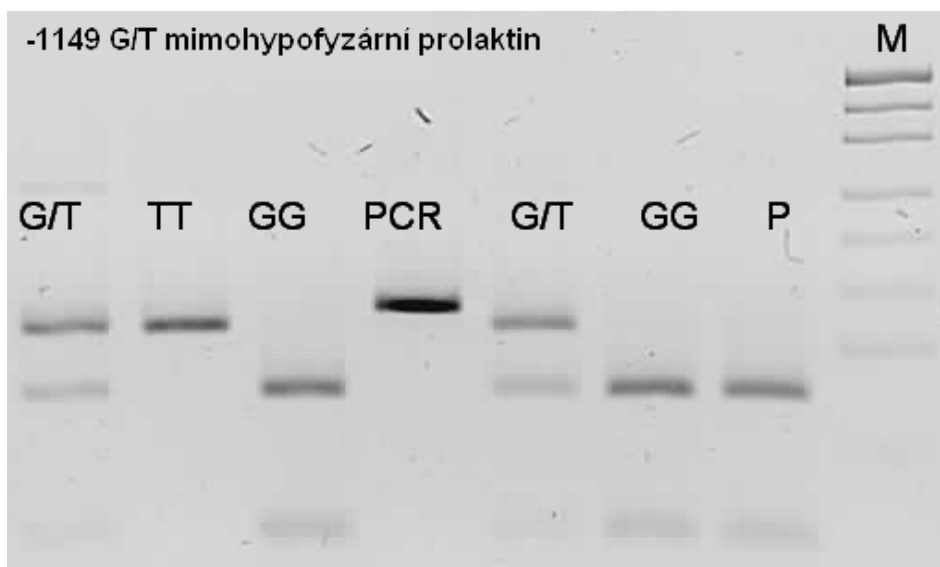
Použité chemikálie

- Agaróza (NuSieve 3:1 Agarose); Lonza, USA

- 10 x TBE pufr (Tris-borátový pufr) – připravíme smícháním 500ml destilované vody, 108g Tris, 55g kyseliny borité a 40 ml EDTA. Doplníme na 1000ml vodou.
 - 890 mM Tris base; Roth, Německo
 - 890 mM kyselina boritá; Amresco, USA
 - 20 mM EDTA pH=8; Lékárna FNKV, Česko
- Destilovaná voda; Ardeapharma, Česko
- GelRed, 10 000x concentrated in water; C-Consulting, Slovensko
- 6X Loading Dye Solution; Fermentas, Kanada
- Marker pUC19 DNA/MspI; Fermentas, Kanada

Postup elektroforézy

- 1) Navážíme 2g agarózy (resp. 3g) a rozpustíme ji ve 100ml 1x TBE pufru.
- 2) Provaříme v mikrovlnné troubě. Poté přidáme 2,5 μ l GelRed. Řádně promícháme a nalijeme do vaničky a vložíme hřebeny pro vytvoření požadované velikosti a počtu jamek. Necháme 20 minut ztuhnout.
- 3) Elektroforetickou vanu naplníme 1x TBE pufrem.
- 4) Ztuhlý gel vložíme do vany a dbáme na to, aby byl gel zcela ponořen v TBE pufru.
- 5) Do jamek nanášíme 5 μ l PCR produktu (resp. 10 μ l produktu restričního štěpení spolu s 2 μ l nanášecího barviva. Do první jamky nanese negativní kontrolu. Do poslední jamky v napipetujeme 1,2 μ l markeru (mezi produkty restričního štěpení dáme již ověřený PCR produkt – pro kontrolu štěpení – a také pozitivní kontrolu s již určeným genotypem).
- 6) Elektroforézu necháme probíhat 30 minut při stejnosměrném napětí o velikosti 5V/cm.
- 7) Po skončení gel prohlížíme pod UV kamerou, která nám umožní výsledek elektroforézy zviditelnit, vyfotit a dále zpracovat (viz Obr. 7).



Obrázek 7: Foto výsledků genotypizace SNP *PRL* -1149 G/T

M – marker

P – pozitivní kontrola se známým genotypem

PCR – produkt PCR před štěpením

T – alela T

G – alela G

4. Výsledky

4.1. Statistické zpracování

Po provedení polymerázové řetězové reakce v reálném čase byly získány pro každý vzorek tři hodnoty Ct (PCR cyklus, ve kterém je zaznamenán nárůst fluorescence nad prahovou hranici – cycle treshold) pro tři sledované cílové geny, a u každého genu směrodatná odchylka SD, která pro naše použití nesměla být větší než 0,3. Tyto tři Ct hodnoty (~ technické triplety) byly u každého genu zprůměrovány a dále používána již tato průměrná Ct hodnota. Jako housekeeping gen byl použit gen pro fosfoglycerátkinázu (*PGKI*), jejíž exprese by u této studie měla být konstantní. Od průměrné hodnoty Ct každého cílového genu byla odečtena průměrná hodnota Ct *PGKI* a tím získána hodnota dCt, která vyjadřuje rozdíl relativní exprese mezi sledovaným genem a endogenní kontrolou v rámci vzorku. Poté byla vypočítána hodnota 2^{-dCt} , jež představuje relativní množství RNA cílového genu. Tato hodnota je vyjadřována v arbitrárních jednotkách (AJ). Takto získaná data byla dále statisticky porovnávána mezi sledovanými skupinami pomocí počítačového programu GraphPad prism 5.0.

Před samotným statistickým hodnocením byl proveden Shapirův- Wilkův test normality, abychom zjistili, zda je rozložení dat normální. Protože data neměla normální rozdělení, vše bylo hodnoceno pomocí neparametrických testů. Data zahrnující dvě skupiny byla porovnávána pomocí Man-Whitneyho testu pro nepárové hodnoty. Data zahrnující tři nebo více skupin byla porovnávána pomocí Kruskal-Wallisova a Dunnova vícenásobného porovnávacího testu. Statistická významnost byla přijata na 5% hladině. Korelace mezi jednotlivými daty byly hodnoceny pomocí Spearmanova korelačního testu. Statistické rozdíly v distribuci genotypů byly hodnoceny χ^2 testem. Významnost byla definována Bonferoniho korekcí, kde P je menší než 0,05.

Tabulka 8: Ukázka matematického zpracování vzorku před statistickým hodnocením

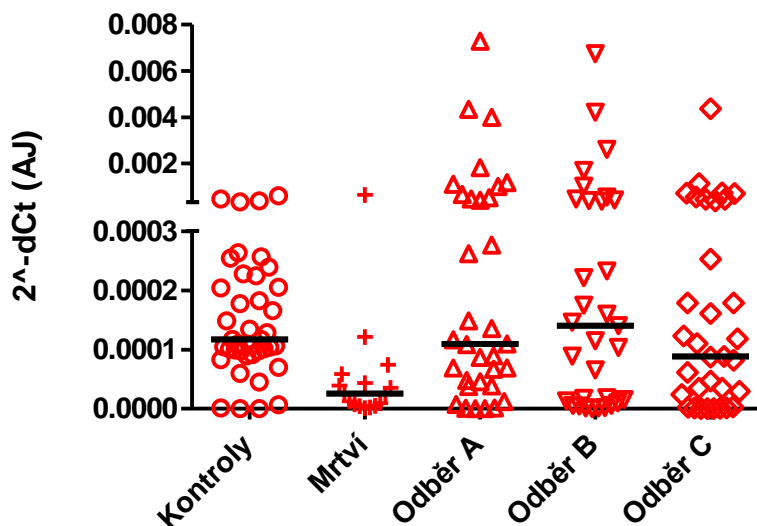
vzorek	c RNA ng/μl	PGK1		PRL		dCt	2-dCt
		průměr Ct	směrodatná odchylka	průměr Ct	směrodatná odchylka		
PRLUHKT64C	74,4	30,59	0,24	40,38	0,29	9,79	0,0011295783

4.2. Výstupy ze statistických hodnocení

Hladina exprese mRNA PRL u všech sledovaných skupin

Mezi jednotlivými skupinami nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly. Ačkoli jsou fyziologické hladiny mRNA PRL velmi nízké (viz Graf 1), u zemřelých pacientů bylo ve srovnání se zdravými jedinci zaznamenáno další, téměř trojnásobné, avšak statisticky nevýznamné snížení hladin PRL mRNA (2,97x, P=NS).

U odběru A přeživších pacientů nedošlo oproti fyziologickým hladinám k žádným změnám. Tento odběr byl následován statisticky nevýznamnou upregulací mRNA PRL exprese v odběru B. Odběr C ukázal trend ke snížení exprese mRNA 1,6x v porovnání s nejvyšší hladinou v odběru B (P=NS). Největší rozdíl v hladinách mRNA PRL jsme pozorovali mezi jedinci, kteří zemřeli na následky sepse, a druhým odběrem (B) pacientů, kteří komplikace sepse přežili: přeživší měli oproti zemřelým 5,4x vyšší hladiny mRNA PRL v monocytech. Tento rozdíl PRL exprese však nedosáhl statistické významnosti (P=NS).



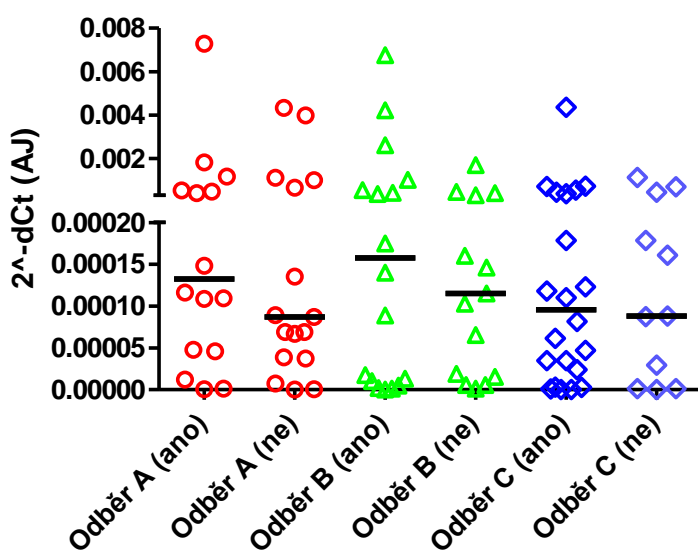
Graf 1: Hladina exprese mRNA PRL u všech sledovaných skupin

V grafu jsou horizontálními liniemi vyznačeny mediány (kontroly: 0,000117, mrtví: 0,000026, odběr A: 0,000109, odběr B: 0,000140, odběr C: 0,000088)

Kruskal-Wallis test	
P=	0,0691

Vliv transplantace na hladinu exprese mRNA PRL v jednotlivých odběrech

Pacienti, kteří podstoupili transplantaci, mají oproti netransplantovaným vyšší hladinu PRL mRNA (viz Graf 2): v odběrech A 1,52x, v odběrech B 1,38x a v odběrech C 1,25x. Výsledky jsou statisticky nevýznamné.



Graf 2: Vliv transplantace na hladinu exprese mRNA PRL v jednotlivých odběrech

Kruskal-Wallis test	
P=	0,9308

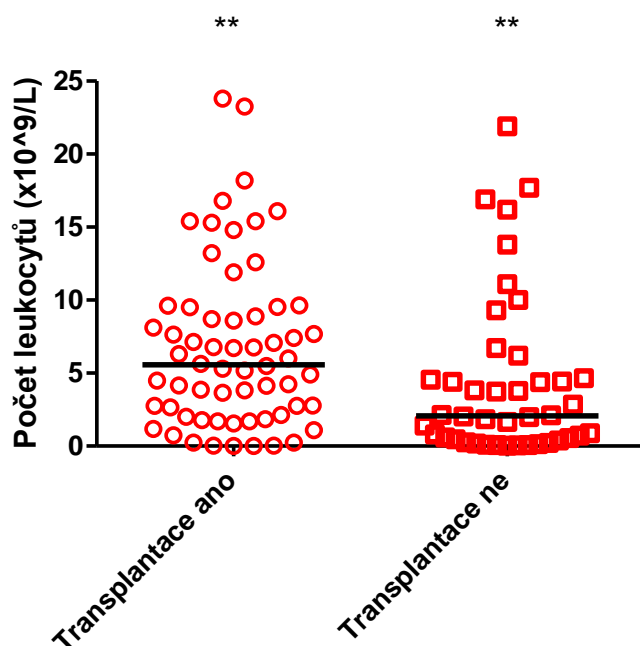
V grafu jsou horizontálními liniemi vyznačeny mediány (viz Tab. 9)

Tabulka 9: Mediány hodnot hladin mRNA PRL (AJ) u vzorků odebraných před a po transplantaci

	Transplantace ano	Transplantace ne
Odběr A	0,000132253	0,000086917
Odběr B	0,000157633	0,000114688
Odběr C	0,000110016	0,000088130

Vliv transplantace na počty leukocytů

V Grafu 3 je znázorněn vliv transplantace na počty leukocytů. Nejsou rozlišeni přeživší a mrtví pacienti. Úsečka znázorňuje mediány. Vzorky, které byly odebrány po transplantaci pacienta, měly 2,16x více leukocytů než vzorky odebírané pacientům, kteří transplantaci (ještě) neprodělali. Výsledek je statisticky signifikantní ($P = 0,0065$).



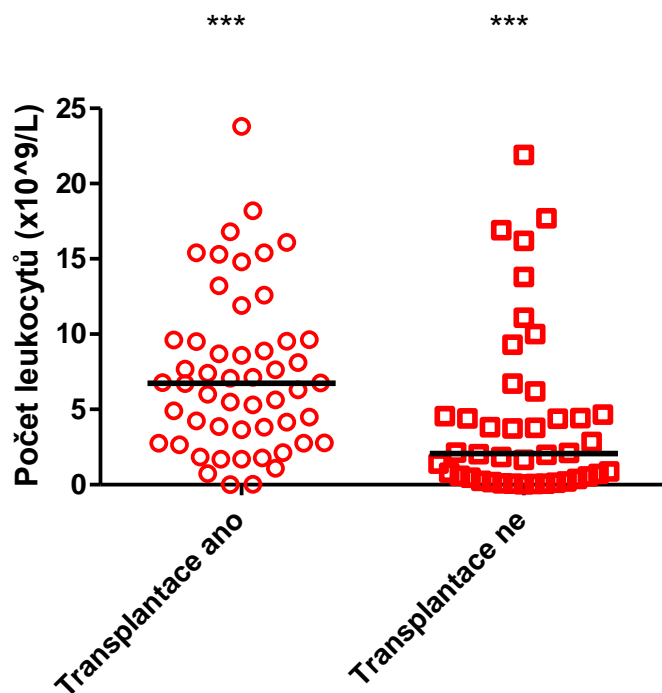
Graf 3: Vliv transplantace na počty leukocytů

Mann-Whitney test	
P=	0,0065

V grafu jsou horizontální linií vyznačeny mediány (transplantace ano: 5,565, transplantace ne: 2,070).

Vliv transplantace na počty leukocytů u přeživších pacientů

Vzorky, které byly odebrány po transplantaci přeživších pacientů, měly 1,96 x více leukocytů než vzorky odebírané pacientům, kteří transplantaci (ještě) neprodělali. Výsledek je statisticky signifikantní ($P = 0.0006$), viz Graf 4.



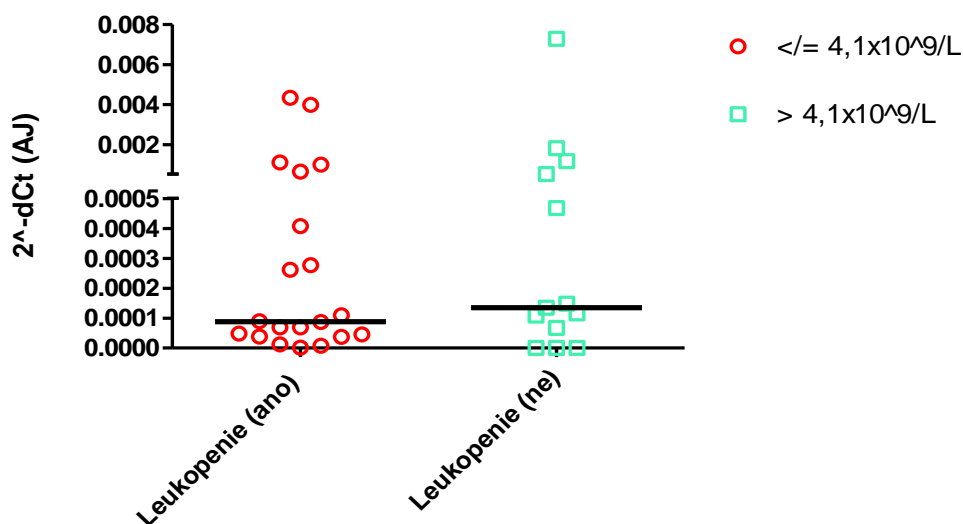
Graf 4: Vliv transplantace na počty leukocytů u přeživších pacientů

Mann-Whitney test	
P=	0,0006

V grafu jsou horizontální linií vyznačeny mediány (transplantace ano: 6,745; transplantace ne: 2,070).

Vliv leukopenie na hladinu exprese mRNA PRL v prvním odběru

Zjistili jsme, že leukopenie nemá statisticky významný vliv na hladinu mRNA PRL (viz Graf 5). U normopenických pacientů měla hladina exprese mRNA tendenci být 1,54x vyšší než u exprese pacientů leukopenických.



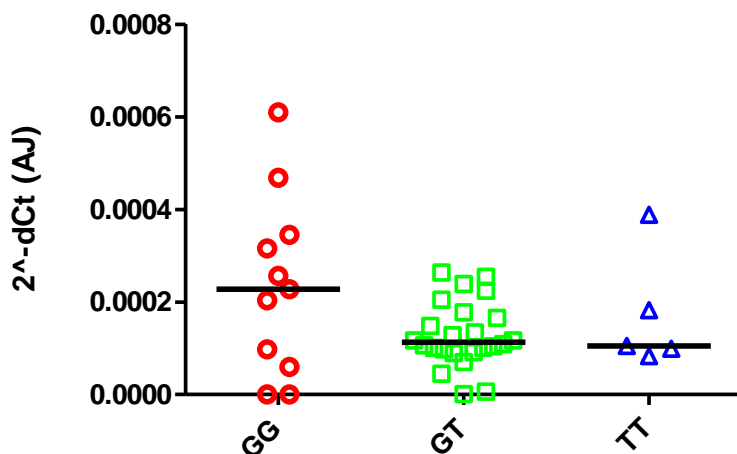
Graf 5: Vliv leukopenie na hladinu exprese mRNA PRL v prvním odběru

Mann Whitney test	
P=	0,7263

V grafu jsou horizontální čarou vyznačeny mediány (leukopenie ano: $6,890e-005$; leukopenie ne: $0,0001415$).

Vliv *PRL* -1149 G/T SNP na fyziologickou hladinu exprese mRNA

Hladiny exprese mRNA PRL byly porovnávány u jednotlivých genotypů zdravých kontrol (viz Graf 6). Exprese genotypu GG je 2x vyšší než u genotypu GT a 2,2x vyšší než u genotypu TT. Výsledky však jsou statisticky nesignifikantní ($P = NS$).



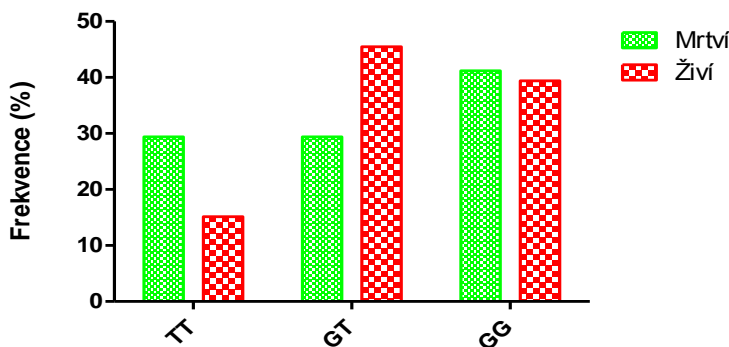
Graf 6: Vliv SNP -1149 G/T na fyziologickou hladinu exprese mRNA

Kruskal-Wallis test	
P=	0,4572

V grafu jsou vyznačeny mediány (GG: 0,000228, GT: 0,000109, TT: 0,000105)

Vliv genotypu na přežití septického šoku

Nebyl zjištěn žádný statisticky významný vliv konkrétní alely či genotypu PRL - 1149 G/T jednonukleotidového polymorfismu na přežití sepse, neboť frekvence genotypů a alel se mezi skupinou pacientů, kteří přežili, a těmi, jež v důsledku sepse zemřeli, nelišily (viz Graf 7). (Genotypy P = 0,3923; alely P = 0,5463).

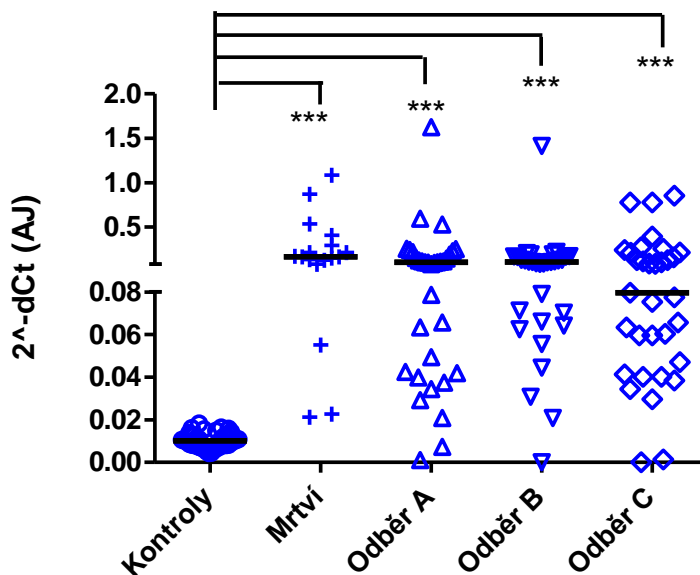


Graf 7: Vliv genotypu na přežití septického stavu

Expres mRNA TLR2 a TLR4 u všech sledovaných skupin

Expres mRNA TLR2 i TLR4 byla statisticky významně vyšší u všech sledovaných skupin oproti zdravým kontrolám (viz Graf 8,9).

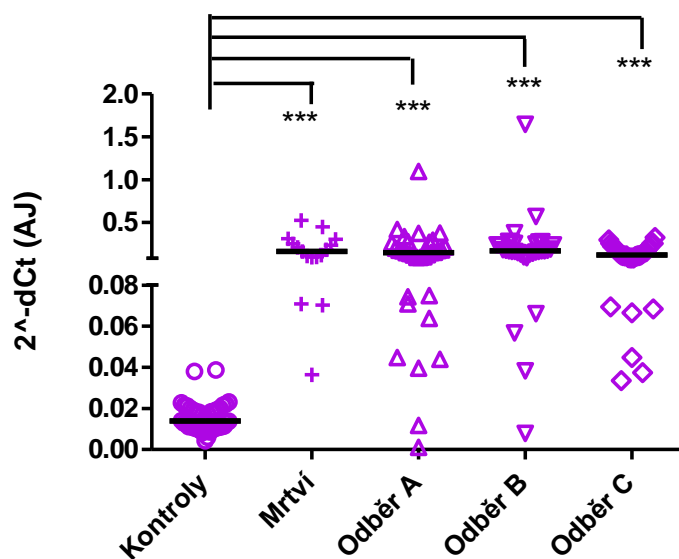
U přeživších pacientů míra exprese TLR2 mRNA od odběru A mírně stoupá k odběru B a v odběru C zase klesá; stejně tak nejvyšších hladin exprese TLR4 mRNA u přeživších je dosaženo ve druhém odběru B, a ve třetím odběru C se exprese vrací k normálu a je nejnižší, avšak stále ještě významně zvýšena oproti hodnotám u zdravých jedinců. Celkově nejvyšší exprese mRNA TLR2 i TLR4 dosahovaly odběry od zemřelých pacientů, kde hladina mRNA byla u TLR2 16,4x vyšší a u TLR4 11,8x vyšší než u kontrol. U všech hodnocených skupin byla exprese mRNA TLR4 vyšší než exprese mRNA TLR2.



Graf 8: Hladina exprese mRNA TLR2 u všech sledovaných skupin

Kruskal-Wallis test	
P=	< 0,0001

V grafu jsou horizontálními liniemi vyznačeny mediány (Kontroly: 0,010133, Mrtví: 0,142938, A: 0,102949, B: 0,105843, C: 0,079660).



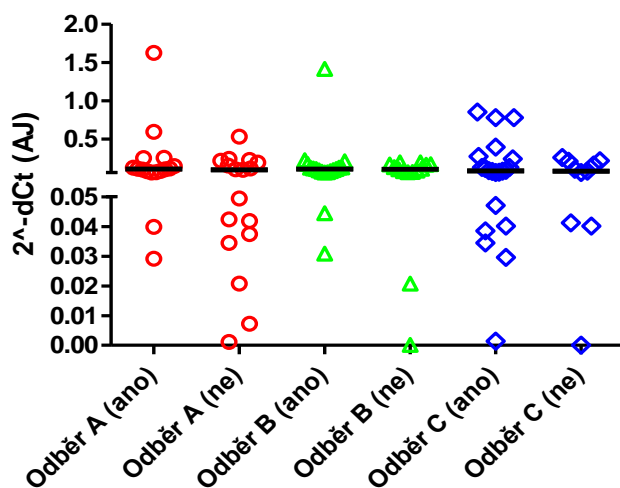
Graf 9: Hladina exprese mRNA TLR4 u všech sledovaných skupin

Kruskal-Wallis test	
P=	< 0,0001

V grafu jsou horizontálními liniemi vyznačeny mediány (Kontroly: 0,013937, Mrtví: 0,208771, A: 0,149685, B: 0,170755, C: 0,119080).

Vliv transplantace na hladinu exprese mRNA TLR2 v jednotlivých odběrech

Neprokázali jsme žádné statisticky významné rozdíly v jednotlivých odběrech A, B, C v závislosti na transplantaci (viz Graf 10).



Graf 10: Vliv transplantace na hladinu exprese mRNA TLR2 v jednotlivých odběrech

Kruskal-Wallis test	
P=	0,8679

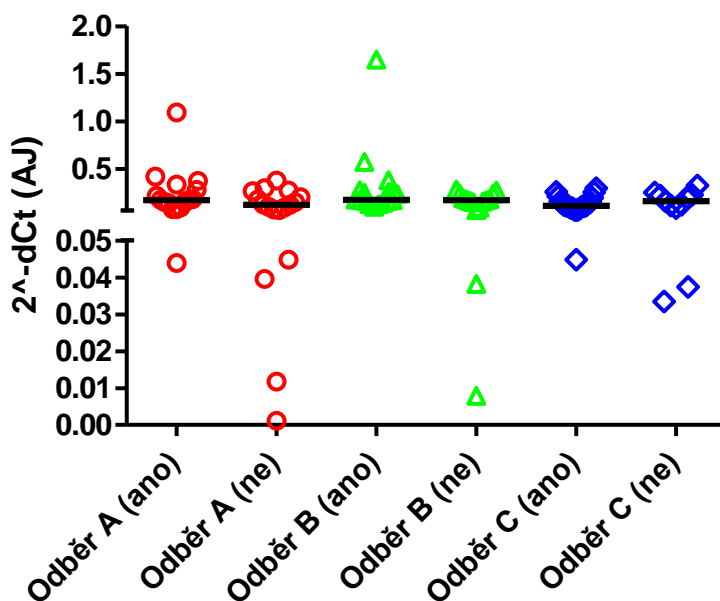
V grafu jsou horizontálními liniemi vyznačeny mediány jednotlivých hodnot (viz Tab. 10)

Tabulka 10: Mediány hodnot hladin mRNA TLR2 (AJ) u vzorků odebraných před a po transplantaci

	Transplantace ano	Transplantace ne
Odběr A	0,107413505	0,095722
Odběr B	0,106211261	0,103665
Odběr C	0,08251878	0,077482

Vliv transplantace na hladinu exprese mRNA TLR4 v jednotlivých odběrech

Obdobně jako u TLR2 jsme zjistili, že transplantace na hladiny jednotlivých odběrů pravděpodobně nemá statisticky významný vliv na míru exprese mRNA TLR4 v monocyttech (viz Graf 11).



Graf 11: Vliv transplantace na hladinu exprese mRNA TLR4 v jednotlivých odběrech

Kruskal-Wallis test	
P=	0,0908

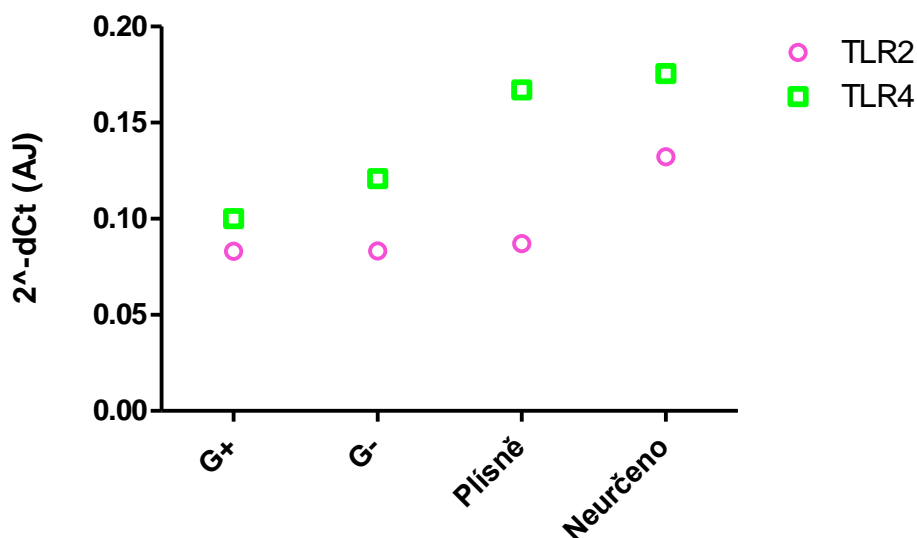
V grafu jsou vyznačeny horizontálními liniemi mediány (Tab. 11).

Tabulka 11: Mediány hodnot hladin mRNA TLR4 (AJ) u vzorků odebraných před a po transplantaci

	Transplantace ano	Transplantace ne
Odběr A	0,17077144	0,11949316
Odběr B	0,173765866	0,16957554
Odběr C	0,11188888	0,160428237

Vliv patogenu na hladinu exprese mRNA TLR2 a TLR4 v prvních odběrech

V tomto grafu je znázorněn vliv jednotlivých typů patogenů na expresi TLR2 a TLR4 mRNA (viz Graf 12). Skupiny byly definovány podle typu patogenu detekovaného na základě pozitivní hemokultury. Nebyla zjištěna žádná statisticky významná spojitost mezi jednotlivými druhy patogenů a expresí TLR2 nebo TLR4.



Graf 12: Vliv patogenu na hladinu exprese mRNA TLR2 a TLR4 v prvních odběrech

Kruskal-Wallis test	TLR2	TLR4
P=	0,3935	0,6635

Body znázorňují hodnoty mediánů hladin TLRs v jednotlivých skupinách.

Korelace hladin PRL, TLR2 a TLR4 mRNA s vybranými klinickými parametry

Míru exprese mRNA PRL, TLR2 a TLR4 jsme porovnali s některými naměřenými klinickými markery pomocí korelace. Exprese mRNA prolaktinu v monocytech byla korelována s hladinami sérového prolaktinu (sPRL), kortizolu, IL-6, IL-10, C-reaktivním proteinem (CRP) a mRNA TLR2 a TLR4; produkce TLR2 a TLR4 mRNA byla dále vztažena k hladinám CRP.

Slabou, ale statisticky významnou negativní korelaci jsme odhalili mezi mRNA PRL a mRNA TLR2 v odběru B a také mezi mRNA TLR4 a CRP v odběru C. P hodnoty a Spearmanovy koeficienty jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 12: Korelace mRNA PRL s vybranými klinickými daty

	Odběr A	Odběr B	Odběr C
mRNA PRL/sPRL	P= 0,9794 (r=0,004679)	P= 0,2117 (r= -0,2233)	P= 0,0635 (r= 0,08693)
mRNA PRL/CRP	P= 0,5216 (r=0,1156)	P= 0,8680 (r= 0,03009)	P= 0,3946 (r= -0,1558)
mRNA PRL/kortizol	P= 0,3401 (r= 0,1715)	P= 0,3993 (r= 0,1517)	P= 0,0971 (r= -0,2937)
mRNA PRL/IL-6	P= 0,2374 (r= 0,2308)	P= 0,6117 (r= -0,1003)	P= 0,5627 (r= -0,1142)
mRNA PRL/IL-10	P= 0,1081 (r= 0,3102)	P= 0,0692 (r= 0,3484)	P= 0,2513 (r= 0,2243)
mRNA PRL/mRNA TLR2	P= 0,4577 (r= -0,1339)	P= 0,0096 (r= -0,4442)	P= 0,3568 (r= 0,1657)
mRNA PRL/mRNA TLR4	P= 0,5131 (r= -0,1180)	P= 0,6174 (r= 0,09094)	P= 0,0001 (r= 0,0493)
mRNA TLR2/CRP	P= 0,3418 (r= 0,0516)	P= 0,0832 (r= 0,3061)	P= 0,7890 (r= 0,04923)
mRNA TLR4/CRP	P= 0,1543 (r= 0,2537)	P= 0,2076 (r= 0,2252)	P= 0,0333 (r= -0,3772)

r ~ Spearmanův koeficient, sPRL ~ sérový prolaktin

5. Diskuze

V této práci byla hodnocena role mimohypofyzárního prolaktinu produkovaného monocyty periferní krve a dopad vrozené imunity zastoupené především působením toll-like receptorů na imunitní procesy během sepse.

Nejprve byla hodnocena exprese mRNA PRL (Graf 1). Dle studie Dostála a kol., jsme očekávali statisticky významně zvýšené hladiny exprese mRNA PRL krátce po rozvinutí sepse s postupným snižováním během uzdravování (Dostal et al. 2003). Naše data však ukázala nejvyšší nárůst hladiny exprese mRNA PRL ve druhém odběru, což může značit zpoždění aktivace exprese mRNA PRL v monocyttech. Toto zpoždění by mohlo být vysvětleno přednostním využitím intracelulárního prolaktinu, který je uložen v zásobních vezikulech v buňce. Tato doměnka je ovšem v rozporu s tvrzením Ben-Jonathan a jejích kolegů, kteří tvrdí, že mimohypofyzární prolaktin, narozdíl od hypofyzárního, žádná zásobní granula nemá (Ben-Jonathan et al., 2008). Na podporu našeho tvrzení bylo provedeno imunohistochemické barvení monocytů pomocí lidské monoklonální protilátky proti prolaktinu. V těchto buňkách byl jednak vidět intracelulární prolaktin v blízkosti jádra a zhruba v 25 % buněk i prolaktin skladovaný v zásobních granulách v cytoplasmě (nepublikovaná pozorování).

Pozorovali jsme statisticky nevýznamné zvýšení genové exprese PRL ve všech odběrech přeživších pacientů ve srovnání s kontrolami. Tento fakt souvisí s imunomodulačními vlastnostmi prolaktinu. Během stresové reakce příznivě ovlivňuje aktivitu imunokompetentních buněk a zároveň podporuje a stimuluje imunitní systém. Na krysích modelech, které byly vystaveny chladovému stresu a kterým byl injekčně podáván prolaktin, bylo potvrzeno, že prolaktin zvyšuje v peritoneálních makrofágách produkci lymfocyty-aktivujícího faktoru (LAF) neboli IL-1 a také prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- α . Zároveň stimuluje proliferaci periferních lymfocytů a zvyšuje jejich citlivost k účinkům IL-1 a tím má vliv na protektivní funkci během stresu (Fomicheva et al. 2004).

Zellweger a kol. došli k závěru, že podávání prolaktinu myším, které prodělaly hemoragický šok, zvyšuje jejich šanci na přežití (Zellweger et al. 1996a; Zellweger et al. 1996b). Naše závěry se shodují také s výzkumem Felmet a kol., kteří zjistili, že prolongovaná hypoprolaktinemie zhoršuje stav septických pacientů, protože prolaktin je schopen potlačovat stresem-indukovanou apoptózu lymfocytů (Felmet et al. 2005). U

pacientů, kteří na sepsi zemřeli, jsme však zjistili nejnižší hladiny exprese mRNA PRL ze všech sledovaných skupin. Bohužel nejspíš malá velikost vzorku nevedla k statistické významnosti tohoto pozorování

Vzhledem k faktu, že někteří hematologičtí pacienti v této studii podstoupili transplantaci kostní dřeně, bylo součástí práce studium vlivu transplantace na aktivitu exprese PRL genu v monocytech (Graf 2). Zjistili jsme statisticky nevýznamný nárůst hladiny genové exprese PRL ve všech vzorcích pacientů podstoupivších transplantaci. Podobný efekt, ale hypofyzárního prolaktinu, byl prokázán i u myši, kdy myši 4 dny po prodělané transplantaci měly 2,4x vyšší expresi než myši falešně operované (Shen et al. 1992).

Vliv transplantace kostní dřeně na počty leukocytů jsme hodnotili jak u všech pacientů, tak jen u pacientů přeživších (Grafy 3 a 4). Zjistili jsme statisticky významné zvýšení u obou skupin pacientů, kteří transplantaci kostní dřeně prodělali, oproti netransplantovaným. Tento výsledek by mohl být objasněn potransplantačním přílivem buněk dárce. Jiné vysvětlení vychází ze skutečnosti, že zatímco pacienti s některými nádorovými onemocněními krve, kteří jsou léčeni například chemoterapií, radioterapií nebo podáváním imunosupresiv, mají v důsledku drastické léčby snížené počty zdravých buněk (např. leukocytů v krvi), transplantovaní pacienti, jejichž organismus přijal dárcovské buňky, mohou nastartovat maturaci a proliferaci krvetvorných buněk. Díky těmto faktům by bylo logické očekávat zvýšenou expresi monocytárního prolaktinu i u studované skupiny mrtvých pacientů, protože 53 % z nich prodělalo transplantaci. Zde však byla PRL genová exprese překvapivě nejnižší. Je známo, že před smrtí buněčné mechanismy přepnou buňku do jakéhosi modifikovaného modu, kdy přetrvávají bazální funkce, avšak imunitní systém je vypnut. Toto však nemůže vysvětlit downregulaci monocytární exprese PRL genu, neboť transkripce obou v naší studii sledovaných toll-like receptorů byla naopak vysoce aktivní. Je tedy možné, že naopak kvůli nedostatečné aktivaci PRL transkripce v monocytech nedokázala u těchto pacientů nastartovat relevantní imunitní odpověď organismu, což mělo pro organismus fatální dopad. Význam tohoto zjištění by mohl být v predikci dalšího vývoje sepse.

Prolaktin významně ovlivňuje hematopoézu buněk. Vede ke zrání a proliferaci a T (Carreno et al. 2005) i B lymfocytů (Orbach and Shoenfeld 2007). Účastní se potlačení stresem-indukované apoptózy lymfocytů (Felmet et al. 2005). Z tohoto důvodu jsme předpokládali i sníženou expresi mRNA PRL u leukopenických pacientů. Potvrdili jsme

1,54x sníženou genovou expresi u leukopenických pacientů oproti normopenickým (P=NS), ale efekt tohoto zjištění je stále nejasný (Graf 5).

V mimohypofyzárním promotoru PRL genu se nachází SNP -1149 G/T, jehož G alela byla spojena s jeho vyšší promotorovou aktivitou (Stevens et al. 2001). Ve shodě s tímto nálezem jsme za fyziologických podmínek očekávali nejvyšší expresi PRL genu u genotypu GG (Graf 6). Naměřili jsme 2x vyšší expresi u genotypu GG než u GT, ale zároveň hladina exprese genotypu GT se neliší od genotypu TT. Rozdíly ve frekvencích však nejsou statisticky významné, což může být dáno malou velikostí vzorku. Neprokáali jsme také vliv SNP PRL -1149 G/T na přežití septického stavu (Graf 7), ani vliv na míru exprese v průběhu stresové reakce (data neprezentována). Přestože se ovlivnění průběhu sepse určitým genotypem neočekávalo a tento závěr je logický, je třeba vždy přistupovat k diskutovaným výstupům opatrně se zřetelem velikosti námi hodnoceného souboru.

Toll-like receptory jsou jednou z prvních složek vrozené imunity, která se podílí na detekci a eliminaci patogenů (Sandor and Buc 2005) a hraje tak důležitou roli během sepse. V souladu s naším očekáváním jsme detekovali statisticky významný nárůst genové exprese TLR2 i TLR4 u všech pacientů (mrtví i přeživší) oproti zdravým kontrolám, což ukazuje na aktivaci vrozené imunity invazí patogena (Graf 8,9). Nejvyšší genová exprese u obou TLRs byla zaznamenána u zemřelých pacientů, což by mohlo ukazovat na patologickou enormní aktivaci vrozené imunity před smrtí, kdy je po průniku patogena do organismu nadměrně aktivována zánětlivá odpověď, ve které neovladatelné cytokiny-zprostředkované obranné hostitelské mechanismy mají letální dopad na buňky a orgány (Hotchkiss and Nicholson 2006).

Podobně jako u genové exprese PRL jsme sledovali, zda má transplantace vliv na hladiny TLR2 nebo TLR4 v jednotlivých odběrech (Graf 10,11). Neprokáali jsme žádné rozdíly mezi jednotlivými odběry. Tento závěr je příliš obecný, na prokázání vlivu transplantace na expresi mRNA TLRs bychom potřebovali další klinické údaje, např. o časovém rozpětí mezi transplantacemi a odebráním vzorku, které jsme bohužel neměli k dispozici.

Vliv jednotlivých patogenů na genovou expresi mRNA TLR2 a TLR4 byl dalším cílem pozorování (Graf 12). Nejistili jsme žádné významné změny v expresi TLR2 ani TLR4, ačkoli jsme je předpokládali, protože každý z toll-like receptorů rozpoznává pouze určité druhy patogenů, což nás vedlo k domněnce pozitivní regulace genové exprese TLR4 gram-negativními bakteriemi a TLR2 gram-pozitivními bakteriemi. Tento výsledek může

souviset s tím, že tyto toll-like receptory rozpoznávají i nemikrobiální ligandy nekrotických nebo odumřelých buněk, které vznikají například při poranění tkání (Lorne et al. 2010).

Jedním z cílů práce bylo odhalit případné korelace a tedy vztahy exprese mRNA PRL, TLR2 a TLR4 s klinickými parametry (Tab. 12). V první řadě bylo zajímavé zjistit, zda produkce mimohypofyzárního PRL bude korelovat s hladinami sérového prolaktinu. To se však neprokázalo a naše výsledky jen podporují odlišné regulační mechanismy obou typů prolaktinu, protože monocytární prolaktin je za fyziologických podmínek, narozdíl od adenohypofyzárního protějšku z monocytů uvolňován ve velmi nízkých dávkách a spíše působí na lokální než na systémové úrovni (Montgomery 2001). Prolaktin má imunostimulační účinky a působí proti supresivnímu vlivu kortisolu. Očekávali jsme proto negativní korelaci s hladinami kortisolu (Mavoungou et al. 2005) a IL-10 a naopak pozitivní korelaci s produkcí IL-6, avšak nepodařilo se nám odhalit souvislost mezi těmito sledovanými parametry. Obdobně, korelace míry exprese RNA PRL s hladinou CRP, zánětlivého markeru tvořeného v játrech (Wunder et al. 2006) neprokázala vztah těchto dvou parametrů. Oproti tomu se podařilo odhalit slabou, ale statisticky významnou korelaci hladin CRP a mRNA TLR4, a slabou, ale statisticky signifikantní korelaci exprese mRNA PRL a TLR2. Tato by případně naznačovala možnou stimulaci produkce prolaktinu v monocytech aktivovanými TLR2.

6. Závěr

Ve své diplomové práci jsem se zabývala úlohou mimohypofyzárního prolaktinu a vrozené imunitní reakce při sepsi. Změřila a vyhodnotila jsem expresi mRNA PRL, TLR2 a TLR4 u 43 pacientů a 40 zdravých kontrol pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase a dále jsem určila genotypy v jednonukleotidovém polymorfismu -1149 G/T. Ze získaných dat jsem vyvodila tyto závěry:

- 1) Při sepsi dochází k aktivaci vrozené imunity a monocytárního prolaktinu, což se projeví slabým zvýšením exprese mRNA PRL a významnou upregulací mRNA exprese TLR2 a TLR4 oproti sledovaným kontrolám.
- 2) Transplantace významně ovlivňuje počty leukocytů u septických pacientů, avšak na míru aktivace transkripce PRL genu v monocytech pravděpodobně nemá vliv.
- 3) PRL -1149 G/T SNP patrně nemá vliv na odpověď organismu při sepsi, ale možná ovlivňuje fyziologické hladiny PRL. Pro definitivní potvrzení tohoto závěru bude nutné provést testování na rozsáhlejším souboru.
- 4) Nepotvrdili jsme postupné snižování exprese mRNA PRL, TLR2 a TLR4, jež by doprovázelo klinické zlepšení (uzdravování) pacienta; statisticky nevýznamné zvýšení hladiny genové exprese v odběrech B lze snad vysvětlit opožděnou aktivací vrozené imunitní reakce, ale důkaz pro toto tvrzení musí být studován na rozsáhlejším souboru dat.

7. Seznam použitých zdrojů

- Akashi S, Saitoh S, Wakabayashi Y, Kikuchi T, Takamura N, Nagai Y, Kusumoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Adachi Y et al. . 2003. Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. *The Journal of experimental medicine* 198(7):1035-1042.
- Alves-Filho JC, Freitas A, Souto FO, Spiller F, Paula-Neto H, Silva JS, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Ferreira SH, and Cunha FQ. 2009. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(10):4018-4023.
- Bandúrová L. 2010. Působení prolaktinu jako cytokinu. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 13(1):5.
- Banchereau J, and Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673):245-252.
- Basset C, Holton J, O'Mahony R, and Roitt I. 2003. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* 21 Suppl 2:S12-23.
- Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD, and LaPensee CR. 2006. Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 17(3):110-116.
- Ben-Jonathan N, LaPensee CR, and LaPensee EW. 2008. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine reviews* 29(1):1-41.
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, and Steinmetz RW. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine reviews* 17(6):639-669.
- Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Susarla S, Czura CJ, and Tracey KJ. 2002. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 36(6):1231-1236.

- Berwaer M, Martial JA, and Davis JR. 1994. Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. *Mol Endocrinol* 8(5):635-642.
- Besedovsky HO, and del Rey A. 2011. Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity. *Neurochemical research* 36(1):1-6.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, and Sibbald WJ. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101(6):1644-1655.
- Boyd JH. 2012. Toll-Like Receptors and Opportunities for New Sepsis Therapeutics. *Current infectious disease reports*.
- Brand JM, Frohn C, Cziupka K, Brockmann C, Kirchner H, and Luhm J. 2004. Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells. *European cytokine network* 15(2):99-104.
- Carcillo JA, Dean JM, Holubkov R, Berger J, Meert KL, Anand KJ, Zimmerman J, Newth CJ, Harrison R, Burr J et al. . 2012. The randomized comparative pediatric critical illness stress-induced immune suppression (CRISIS) prevention trial. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies* 13(2):165-173.
- Carreno PC, Sacedon R, Jimenez E, Vicente A, and Zapata AG. 2005. Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. *Journal of neuroimmunology* 160(1-2):135-145.
- Clevenger CV, and Kline JB. 2001. Prolactin receptor signal transduction. *Lupus* 10(10):706-718.
- Cook DN, Pisetsky DS, and Schwartz DA. 2004. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature immunology* 5(10):975-979.
- Corbacho AM, Valacchi G, Kubala L, Olano-Martin E, Schock BC, Kenny TP, and Cross CE. 2004. Tissue-specific gene expression of prolactin receptor in the acute-phase response induced by lipopolysaccharides. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 287(4):E750-757.

- Cornell TT, Rodenhouse P, Cai Q, Sun L, and Shanley TP. 2010. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 regulates the inflammatory response in sepsis. *Infection and immunity* 78(6):2868-2876.
- Czuwara-Ladykowska J, Sicinska J, Olszewska M, Uhrynowska-Tyszkiewicz I, and Rudnicka L. 2006. Prolactin synthesis by lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 60(4):152-155.
- Daigneault M, De Silva TI, Bewley MA, Preston JA, Marriott HM, Mitchell AM, Mitchell TJ, Read RC, Whyte MK, and Dockrell DH. 2012. Monocytes Regulate the Mechanism of T-cell Death by Inducing Fas-Mediated Apoptosis during Bacterial Infection. *PLoS pathogens* 8(7):e1002814.
- Dannies PS. 2002. Mechanisms for storage of prolactin and growth hormone in secretory granules. *Molecular genetics and metabolism* 76(1):6-13.
- De Bellis A, Bizzarro A, Pivonello R, Lombardi G, and Bellastella A. 2005. Prolactin and autoimmunity. *Pituitary* 8(1):25-30.
- Dorshkind K, and Horseman ND. 2001. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 23(3):288-294.
- Dostal C. 2005. Prolaktin - významný činitel vztahu mezi neuroendokrinním a imunitním systémem člověka - editorial. *Vnitřní lékařství* 51(11):1228-1123.
- Dostal C, Moszkorzova L, Musilova L, Lacinova Z, Marek J, and Zvarova J. 2003. Serum prolactin stress values in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases* 62(5):487-488.
- Dzitko K, Lawnicka H, Gatkowska J, Dziadek B, Komorowski J, and Dlugonska H. 2012. Inhibitory effect of prolactin on Toxoplasma proliferation in peripheral blood mononuclear cells from patients with hyperprolactinemia. *Parasite immunology* 34(6):302-311.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, and Vizi ES. 2000. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological reviews* 52(4):595-638.
- Erb N, Pace AV, Delamere JP, and Kitis GD. 2001. Control of unremitting rheumatoid arthritis by the prolactin antagonist cabergoline. *Rheumatology* 40(2):237-239.

- Eskandari F, Webster JI, and Sternberg EM. 2003. Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis research & therapy* 5(6):251-265.
- Felmet KA, Hall MW, Clark RS, Jaffe R, and Carcillo JA. 2005. Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J Immunol* 174(6):3765-3772.
- Filipin Mdel V, Brazao V, Santello FH, Caetano LC, Toldo MP, and do Prado JC, Jr. 2011. Prolactin: does it exert an up-modulation of the immune response in *Trypanosoma cruzi*-infected rats? *Veterinary parasitology* 181(2-4):139-145.
- Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, and Ziegler-Heitbrock HW. 1993. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 82(10):3170-3176.
- Fojtikova M, Cejkova P, Becvar R, Vencovsky J, Tomasova Studynkova J, and Cerna M. 2010. Polymorphism of the extrapituitary prolactin promoter and systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 30(12):1691-1693.
- Fomicheva EE, Nemirovich-Danchenko EA, and Korneva EA. 2004. Immunoprotective effects of prolactin during stress-induced immune dysfunction. *Bulletin of experimental biology and medicine* 137(6):544-547.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, and Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological reviews* 80(4):1523-1631.
- Geissmann F, Jung S, and Littman DR. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19(1):71-82.
- Gerlo S, Davis JR, Mager DL, and Kooijman R. 2006. Prolactin in man: a tale of two promoters. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 28(10):1051-1055.
- Gerlo S, Verdood P, Gellersen B, Hooghe-Peters EL, and Kooijman R. 2004. Mechanism of prostaglandin (PG)E₂-induced prolactin expression in human T cells: cooperation of two PGE₂ receptor subtypes, E-prostanoid (EP) 3 and EP4, via calcium- and cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated signaling pathways. *J Immunol* 173(10):5952-5962.
- Goffin V, Bernichtein S, Touraine P, and Kelly PA. 2005. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endocrine reviews* 26(3):400-422.

- Gosemann JH, van Griensven M, Barkhausen T, Kobbe P, Thobe BM, Haasper C, Pape HC, Krettek C, Hildebrand F, and Frink M. 2010. TLR4 influences the humoral and cellular immune response during polymicrobial sepsis. *Injury* 41(10):1060-1067.
- Hiraoka Y, Tatsumi K, Shiozawa M, Aiso S, Fukasawa T, Yasuda K, and Miyai K. 1991. A placenta-specific 5' non-coding exon of human prolactin. *Molecular and cellular endocrinology* 75(1):71-80.
- Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E, and Dorshkind K. 1997. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *The EMBO journal* 16(23):6926-6935.
- Hotchkiss RS, and Nicholson DW. 2006. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nature reviews Immunology* 6(11):813-822.
- Chavez-Rueda K, Hernandez J, Zenteno E, Leanos-Miranda A, Legorreta-Haquet MV, and Blanco-Favela F. 2005. Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. *Clin Immunol* 116(2):182-191.
- Chikanza IC. 1999. Prolactin and neuroimmunomodulation: in vitro and in vivo observations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 876:119-130.
- Jara LJ, Navarro C, Medina G, Vera-Lastra O, and Blanco F. 2006. Immune-neuroendocrine interactions and autoimmune diseases. *Clinical & developmental immunology* 13(2-4):109-123.
- Kagan JC. 2012. Defining the subcellular sites of innate immune signal transduction. *Trends in immunology*.
- Kapur G, Patwari AK, Narayan S, and Anand VK. 2004. Serum prolactin in celiac disease. *Journal of tropical pediatrics* 50(1):37-40.
- Kelley KW, Weigent DA, and Kooijman R. 2007. Protein hormones and immunity. *Brain, behavior, and immunity* 21(4):384-392.
- Kim J, Luo W, Chen DT, Earley K, Tunstead J, Yu-Lee LY, and Lin SH. 2003. Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer research* 63(2):386-393.
- Kim TH, Yoon SJ, and Lee SM. 2012. Genipin attenuates sepsis by inhibiting Toll-like receptor signaling. *Molecular medicine* 18(1):455-465.

- Koyasu S, and Moro K. 2012. Role of Innate Lymphocytes in Infection and Inflammation. *Frontiers in immunology* 3:101.
- Kumar H, Kawai T, and Akira S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology* 30(1):16-34.
- Lane RD, Waldstein SR, Chesney MA, Jennings JR, Lovallo WR, Kozel PJ, Rose RM, Drossman DA, Schneiderman N, Thayer JF et al. . 2009. The rebirth of neuroscience in psychosomatic medicine, Part I: historical context, methods, and relevant basic science. *Psychosomatic medicine* 71(2):117-134.
- Larrea F, Martinez-Castillo A, Cabrera V, Alcocer-Varela J, Queipo G, Carino C, and Alarcon-Segovia D. 1997. A bioactive 60-kilodalton prolactin species is preferentially secreted in cultures of mitogen-stimulated and nonstimulated peripheral blood mononuclear cells from subjects with systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82(11):3664-3669.
- Ledesma-Soto Y, Blanco-Favela F, Fuentes-Panana EM, Tesoro-Cruz E, Hernandez-Gonzalez R, Arriaga-Pizano L, Legorreta-Haquet MV, Montoya-Diaz E, Chavez-Sanchez L, Castro-Mussot ME et al. . 2012. Increased levels of prolactin receptor expression correlate with the early onset of lupus symptoms and increased numbers of transitional-1 B cells after prolactin treatment. *BMC immunology* 13:11.
- Lee YC, Raychaudhuri S, Cui J, De Vivo I, Ding B, Alfredsson L, Padyukov L, Costenbader KH, Seielstad M, Graham RR et al. . 2009. The PRL -1149 G/T polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis and rheumatism* 60(5):1250-1254.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, and Hoffmann JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86(6):973-983.
- Liu Y, Gong W, Breinholt J, Norskov-Lauritsen L, Zhang J, Ma Q, Chen J, Panina S, Guo W, Li T et al. . 2011. Discovery of the improved antagonistic prolactin variants by library screening. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 24(11):855-860.
- Lorne E, Dupont H, and Abraham E. 2010. Toll-like receptors 2 and 4: initiators of non-septic inflammation in critical care medicine? *Intensive care medicine* 36(11):1826-1835.

- Malaguarnera L, Imbesi RM, Scuto A, D'Amico F, Licata F, Messina A, and Sanfilippo S. 2004. Prolactin increases HO-1 expression and induces VEGF production in human macrophages. *Journal of cellular biochemistry* 93(1):197-206.
- Matera L, Contarini M, Bellone G, Forno B, and Biglino A. 1999. Up-modulation of interferon-gamma mediates the enhancement of spontaneous cytotoxicity in prolactin-activated natural killer cells. *Immunology* 98(3):386-392.
- Matera L, Mori M, Geuna M, Buttiglieri S, and Palestro G. 2000. Prolactin in autoimmunity and antitumor defence. *Journal of neuroimmunology* 109(1):47-55.
- Mavoungou E, Bouyou-Akotet MK, and Kreamsner PG. 2005. Effects of prolactin and cortisol on natural killer (NK) cell surface expression and function of human natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp44 and NKp30). *Clin Exp Immunol* 139(2):287-296.
- Means TK, Golenbock DT, and Fenton MJ. 2000. The biology of Toll-like receptors. *Cytokine & growth factor reviews* 11(3):219-232.
- Medzhitov R, and Janeway C, Jr. 2000. Innate immunity. *The New England journal of medicine* 343(5):338-344.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, and Janeway CA, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388(6640):394-397.
- Mellai M, Giordano M, D'Alfonso S, Marchini M, Scorza R, Giovanna Danieli M, Leone M, Ferro I, Liguori M, Trojano M et al. . 2003. Prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms in multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Human immunology* 64(2):274-284.
- Mogensen TH. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews* 22(2):240-273, Table of Contents.
- Montes de Oca P, Macotela Y, Nava G, Lopez-Barrera F, de la Escalera GM, and Clapp C. 2005. Prolactin stimulates integrin-mediated adhesion of circulating mononuclear cells to endothelial cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 85(5):633-642.
- Montgomery DW. 2001. Prolactin production by immune cells. *Lupus* 10(10):665-675.
- Mravec B, Bernadič M, Hulín I, Kiss A, Kvetňanský R, Kukanová B, Pečeňák J, 2007, 1.vyd, 284 s, Bratislava, SAP, ISBN 80-8095-005-9

- Namas R, Zamora R, An G, Doyle J, Dick TE, Jacono FJ, Androulakis IP, Nieman GF, Chang S, Billiar TR et al. . 2012. Sepsis: Something old, something new, and a systems view. *Journal of critical care* 27(3):314 e311-311.
- Nociti V, Frisullo G, Tartaglione T, Patanella AK, Iorio R, Tonali PA, and Batocchi AP. 2010. Multiple sclerosis attacks triggered by hyperprolactinemia. *Journal of neuro-oncology* 98(3):407-409.
- O'Garra A, and Murphy K. 1993. T-cell subsets in autoimmunity. *Current opinion in immunology* 5(6):880-886.
- O'Neill LA, and Bowie AG. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology* 7(5):353-364.
- Oberbeck R, Schmitz D, Wilsenack K, Schuler M, Biskup C, Schedlowski M, Nast-Kolb D, and Exton MS. 2003. Prolactin modulates survival and cellular immune functions in septic mice. *The Journal of surgical research* 113(2):248-256.
- Oberbeck R, Schmitz D, Wilsenack K, Schuler M, Pehle B, Schedlowski M, and Exton MS. 2004. Metoclopramide and cellular immune functions during polymicrobial sepsis. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes* 36(2):116-122.
- Orbach H, and Shoenfeld Y. 2007. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews* 6(8):537-542.
- Panda SK, Kumar S, Tupperwar NC, Vaidya T, George A, Rath S, Bal V, and Ravindran B. 2012. Chitohexaose activates macrophages by alternate pathway through TLR4 and blocks endotoxemia. *PLoS pathogens* 8(5):e1002717.
- Peeva E, and Zouali M. 2005. Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes. *Immunology letters* 101(2):123-143.
- Pene F, Courtine E, Ouaz F, Zuber B, Sauneuf B, Sirgo G, Rousseau C, Toubiana J, Balloy V, Chignard M et al. . 2009. Toll-like receptors 2 and 4 contribute to sepsis-induced depletion of spleen dendritic cells. *Infect Immun* 77(12):5651-5658.
- Philpott DJ, Girardin SE, and Sansonetti PJ. 2001. Innate immune responses of epithelial cells following infection with bacterial pathogens. *Current opinion in immunology* 13(4):410-416.
- Ploszaj T, Motyl T, Orzechowski A, Zimowska W, Wareski P, Skierski J, and Zwierzchowski L. 1998. Antiapoptotic action of prolactin is associated with up-regulation of Bcl-2 and down-regulation of Bax in HC11 mouse mammary

- epithelial cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 3(4):295-304.
- Radhakrishnan A, Raju R, Tuladhar N, Subbannayya T, Thomas JK, Goel R, Telikicherla D, Palapetta SM, Rahiman BA, Venkatesh DD et al. . 2012. A pathway map of prolactin signaling. *Journal of cell communication and signaling*.
- Reifen R, Buskila D, Maislos M, Press J, and Lerner A. 1997. Serum prolactin in coeliac disease: a marker for disease activity. *Archives of disease in childhood* 77(2):155-157.
- Rittirsch D, Flierl MA, and Ward PA. 2008. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nature reviews Immunology* 8(10):776-787.
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, and Bazan JF. 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(2):588-593.
- Roger T, Froidevaux C, Le Roy D, Reymond MK, Chanson AL, Mauri D, Burns K, Riederer BM, Akira S, and Calandra T. 2009. Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(7):2348-2352.
- Roggero E, Besedovsky HO, and del Rey A. 2011. The role of the sympathetic nervous system in the thymus in health and disease. *Neuroimmunomodulation* 18(5):339-349.
- Saha S, Gonzalez J, Rosenfeld G, Keiser H, and Peeva E. 2009. Prolactin alters the mechanisms of B cell tolerance induction. *Arthritis and rheumatism* 60(6):1743-1752.
- Sakamoto K, Triplett AA, Schuler LA, and Wagner KU. 2010. Janus kinase 2 is required for the initiation but not maintenance of prolactin-induced mammary cancer. *Oncogene* 29(39):5359-5369.
- Sandor F, and Buc M. 2005. Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands. *Folia biologica* 51(5):148-157.
- Shen GK, Montgomery DW, Ulrich ED, Mahoney KR, and Zukoski CF. 1992. Up-regulation of prolactin gene expression and feedback modulation of lymphocyte proliferation during acute allograft rejection. *Surgery* 112(2):387-393; discussion 393-384.

- Sinha YN. 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine reviews* 16(3):354-369.
- Sternberg EM, Chrousos GP, Wilder RL, and Gold PW. 1992. The stress response and the regulation of inflammatory disease. *Annals of internal medicine* 117(10):854-866.
- Stevens A, Ray D, Alansari A, Hajeer A, Thomson W, Donn R, Ollier WE, Worthington J, and Davis JR. 2001. Characterization of a prolactin gene polymorphism and its associations with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 44(10):2358-2366.
- Straub RH. 2007. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* 28(5):521-574.
- Swaminathan G, Varghese B, Thangavel C, Carbone CJ, Plotnikov A, Kumar KG, Jablonski EM, Clevenger CV, Goffin V, Deng L et al. . 2008. Prolactin stimulates ubiquitination, initial internalization, and degradation of its receptor via catalytic activation of Janus kinase 2. *The Journal of endocrinology* 196(2):R1-7.
- Tomio A, Schust DJ, Kawana K, Yasugi T, Kawana Y, Mahalingaiah S, Fujii T, and Taketani Y. 2008. Prolactin can modulate CD4+ T-cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet. *Immunology and cell biology* 86(7):616-621.
- Vera-Lastra O, Jara LJ, and Espinoza LR. 2002. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmunity reviews* 1(6):360-364.
- Weigent DA, Carr DJ, and Blalock JE. 1990. Bidirectional communication between the neuroendocrine and immune systems. *Common hormones and hormone receptors. Annals of the New York Academy of Sciences* 579:17-27.
- Wheeler AP, and Bernard GR. 1999. Treating patients with severe sepsis. *The New England journal of medicine* 340(3):207-214.
- Whicher JT, and Evans SW. 1990. Cytokines in disease. *Clinical chemistry* 36(7):1269-1281.
- Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, and Wong SC. 2012. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunologic research* 53(1-3):41-57.
- Wunder DM, Yared M, Bersinger NA, Widmer D, Kretschmer R, and Birkhauser MH. 2006. Serum leptin and C-reactive protein levels in the physiological spontaneous

- menstrual cycle in reproductive age women. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 155(1):137-142.
- Xu D, Lin L, Lin X, Huang Z, and Lei Z. 2010. Immunoregulation of autocrine prolactin: suppressing the expression of costimulatory molecules and cytokines in T lymphocytes by prolactin receptor knockdown. *Cellular immunology* 263(1):71-78.
- Yeh YT, Lee KT, Tsai CJ, Chen YJ, and Wang SN. 2012. Prolactin promotes hepatocellular carcinoma through Janus kinase 2. *World journal of surgery* 36(5):1128-1135.
- Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, DeMaso CM, and Chaudry IH. 1996a. Prolactin: a novel and safe immunomodulating hormone for the treatment of immunodepression following severe hemorrhage. *The Journal of surgical research* 63(1):53-58.
- Zellweger R, Zhu XH, Wichmann MW, Ayala A, DeMaso CM, and Chaudry IH. 1996b. Prolactin administration following hemorrhagic shock improves macrophage cytokine release capacity and decreases mortality from subsequent sepsis. *Journal of immunology* 157(12):5748-5754.
- Zhu XH, Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, and Chaudry IH. 1997. Effects of prolactin and metoclopramide on macrophage cytokine gene expression in late sepsis. *Cytokine* 9(6):437-446.
- Zunszain PA, Hepgul N, and Pariante CM. 2012. Inflammation and Depression. *Current topics in behavioral neurosciences*.

Citace z webových stránek:

URL 1: <http://www.rikenresearch.riken.jp/eng/frontline/5028> staženo 18.8.2012

URL 2: http://discover8.com/article/Recognition_and_Signaling_by_Toll_Like_Receptors_0 staženo 18.8.2012

URL 3: <http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/> staženo 17.8.2012

8. Přílohy

1. Tabulka 1: Toll-like receptory a jejich ligandy
2. Pre-print verze publikace přijaté do tisku

Tabulka 1: Toll-like receptory a jejich ligandy

TLR a ko-receptor	Lokalizace v buňce	Ligandy
TLR1/2	Povrch buňky	Triacyl lipopeptidy
TLR2 (dektin-1, lektin C)	Povrch buňky	Peptidoglykan, lipoarabinomannan, hemaglutinin, fosfolipomannan, glykosylfosfatidyl inositolmucin, zymosan
TLR3	Endozomy	ssRNA virus, dsRNA virus, respirační syncytiální virus, myší cytomegalovirus
TLR4 (MD2, CD14, LBP)	Povrch buňky	Lipopolysacharid, mannan, glykoinositolfolipidy, respirační syncytiální virus, endogenní oxidované fosfolipidy produkované po infekci H5N1 virem ptačí chřipky, pneumolysin <i>ze streptokokus pneumonia, paklitaxel.</i>
TLR5	Povrch buňky	Flagellin z bakterií
TLR6/2 (CD36)	Povrch buňky	diacyl lipopeptidy z mycoplasmat, lipoteichová kyselina
TLR7	Endolysozom	ssRNA viry, purinové analogové sloučeniny (imidazoquinoliny), RNA z bakterií ze skupiny B streptokoků
TLR8	Endolysozom	ssRNA z RNA virů, purinové analogové sloučeniny (imidazoquinoliny)
TLR9	Endolysozom	dsDNA viry, herpes simplex virus a myší cytomegalovirus, CpG motivy z bakterií a virů, hemozin malarických parazitů

Upravené dle (Kumar et al. 2011)