

Souhrn

Charakterizace antigen presentujících buněk (APC) u alergického astmatu

Astma bronchiale je chronické zánětlivé onemocnění, jehož výskyt za posledních dvacet let prudce vzrostl, především v západních zemích. Tato práce je zaměřena zejména na popis dendritických buněk, které hrají v patogenezi astmatu důležitou roli. Dendritické buňky (DC), B lymfocyty a makrofágy jsou antigen presentujícími buňkami reagujícími s Th lymfocyty.

Detailní popis dendritických buněk by umožnil určit, zda Th lymfocyty reagují více s DC nebo s makrofágy v plicní tkáni. Na základě tohoto zjištění by bylo možné přerušit vazbu mezi Th lymfocyty a DC, omezit tím zánětlivou kaskádu reakcí a snížit výskyt alergického astmatu. Nejdůležitějšími zástupci APC jsou DC. U pacientů s alergickým astmatem je charakteristická kumulace DC v bronchiální mucose a jejich zvýšené množství. U DC v plicní tkáni se předpokládá, že se jedná o dlouho žijící APC. Mohou být popsány na základě povrchových markerů CD11b, B220, CD8a, CD11c, MHCII.

Při pokusech jsme použili laboratorní myši s rozdílným typem stadia alergického astma. Dělili jsme je na memory (rechallenged), recovery, naive a naive control skupiny myší. Memory mice – myši byly podrobeny i.p. imunizaci alergenem 1. a 21. den, poté 28. a 29. den vystaveny aerosolu 1% alergenu a 84. den imunizovány alergenem OVA AF 594 i.n. Recovery mice – byly pouze podrobeny i.p. imunizaci a 1% aerosolu alergenu. Skupina Naive – myši byly imunizovány pouze i.n. alergenem a Naive kontrol skupina nebyla vystavena alergenem. Na základě rozdílné časové imunizace jsme mohli porovnat přítomnost buněk v orgánech imunitního systému. Obrázky buněk byly pořízeny pomocí Nikon florescent microscope se zvětšením 40x.

V první části výzkumu jsme se zaměřili na chování buněk, které pohltily alergen OVA AF 594 v orgánech imunitního systému, v závislosti na čase. Buňky byly barveny barvivem DAPI (barvivo zobrazující nukleus) a pozorovány v ledvině, slinivce a v játrech po 1, 2, 3, 4 hodinách poté co pokusná zvířata obdržela alergen OVA AF 594 i.n. Ve všech sledovaných orgánech bylo viditelné zvýšení počtu OVA-

DAPI dvojitě pozitivních buněk po 4 hodinách. DAPI je barvivo na zobrazení buněk obsahujících jádro, proto nemůžeme říci zda se jednalo přímo o DC či makrofágy.

V druhé části naší práce jsme se pokusili detailně popsat a rozlišit DC a makrofágy pomocí jejich charakteristických povrchových znaků. U DC jsme použili monoklonální protilátky anti CD11c a anti MHCII, u makrofágů anti F4/80, anti CD11b, anti MHCII. Hodnotili jsme, zda buňky, které byly pozitivní pro OVA alergen, nesou na svém povrchu i typické DC marky. Při pokusu jsme používali dvojitě barvení monoklonálními protilátkami, proto někdy docházelo ke snížení ostrosti barvení jedné protilátky druhou. Ve většině případů se tudíž jevily buňky, které pohltily OVA alergen, jako single pozitivní většinou pro MHCII a CD11b. Abychom mohli s jistotou říci, jaký typ buněk více interaguje s alergenem, bylo by vhodné použít průtokovou cytometrii a jiné typy protilátek s intenzivnějším barvením.