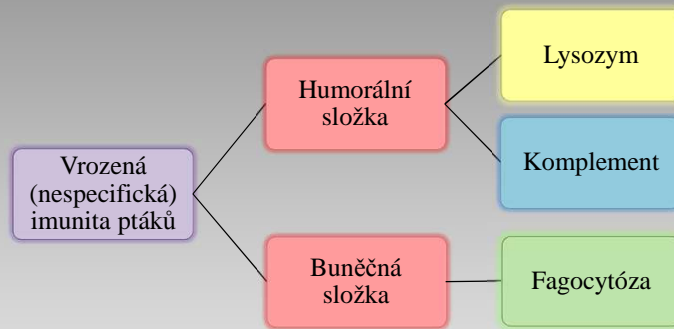


Úvod

Imunitní systém ptáků jakožto jeden ze základních homeostatických mechanismů organismu zahrnuje stejně jako u ostatních živočichů imunitu nespecifickou a specifickou. Předmětem našeho zájmu se stala imunita nespecifická neboli vrozená, jež je evolučně starší a neměnná. Mechanismy této imunity, jejichž aktivace je v případě potřeby takřka okamžitá, dělíme na složku humorální a buněčnou. Humorální složku zde představuje především komplementový systém a lysozym, mimo to také různé druhy interferonů, laktinů či sérových proteinů. Složku buněčnou reprezentují fagocyty a cytotoxické buňky. Pro měření imunitních parametrů jsme jako modelové organismy vybrali následující druhy ptáků: křepekla japonská (*Coturnix japonica*), kur domácí (*Gallus gallus f. domestica*) a sýkora koňadra (*Parus major*).



Obr. 1: Modelové organismy. Zleva: křepekla japonská (*Coturnix japonica*), kur domácí (*Gallus gallus f. domestica*), sýkora koňadra (*Parus major*)



Obr. 2: Námí studované mechanismy vrozené imunity ptáků

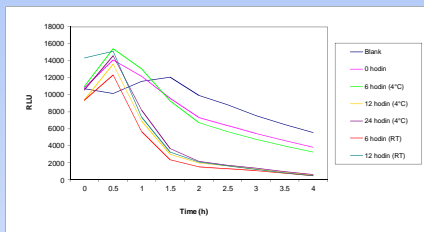
Komplementový systém ptáků

Komplementový systém představuje hlavní komponentu humorální nespecifické imunity. Jako takový se skládá z 25-30 sérových a membránových proteinů kooperujících jak mezi sebou, tak i s dalšími imunitními mechanismy jako je například fagocytóza.

Složku komplementu se v reakci na cizorodý podnět kaskádovitě aktivují a tím spouštějí imunitní reakci. Terminálním produktem této kaskády je tzv. MAC (membrane attack complex). Ten perforuje membrány některých mikroorganismů a způsobuje tak jejich lýzi.

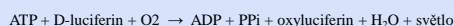
K aktivaci komplementového systému dochází 3 možnými způsoby – klasickou, alternativní a laktinovou cestou. Dříve se vědci domnívali, že ptáci jsou schopni pouze klasické cesty aktivace, nedávno však byly konkrétně u kuřat objeveny i další dvě cesty, tedy alternativní a laktinová.

Stanovení aktivity komplementového systému



Obr. 3: Stanovení aktivity komplementu křepekly japonské, její plazma byla před hlubokým zamražením (-80°C) skladována při různých podmínkách a po různé dlouhou dobu. Blank – PBS (pH 7,4). Z grafu je patrné, že staří plazmy či teplota při skladování neměly na aktivitu komplementu vliv, jaký by se dal očekávat – tedy čím starší krev či vyšší teplota, tím nižší aktivita. Naopak, naměřené hodnoty plazmy, jež byla zamrazena v nejkratších z námi zvolených intervalech (0 hodin, 6 hodin) vykazují překvapivě nejvyšší aktivitu komplementu.

Relativně nová metoda stanovení bakteriolýtické aktivity komplementu využívá bioluminescenční bakterie *Escherichia coli* (K12pGFP_{luxB}Amp). Bakteriální luminescence (viz rovnice) je přitom přímo úměrná jejich viabilitě.

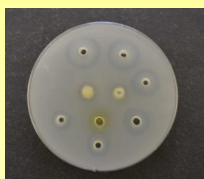


Princip metody je založen na měření kinetiky bioluminescence v závislosti na baktericidních účincích komplementového systému, odečítáme čas potřebný pro usmrcení 50% bakterií. Čím vyšší je tedy aktivita komplementu, tím více bakterií zlyžuje a tím nižší bioluminescenční signál získáme. V průběhu měření se postupovalo dle Buchtková et al. (2011) za použití luminometru Immunotech LM - OIT.

Stanovení lysozymu v plazmě

Lysozym patří do skupiny hydrolytických enzymů. Jako takový rozkládá základní komponentu buněčných stěn bakterií - polysacharid murein. Lýzí podléhají především grampozitivní bakterie, jejichž mureinová vrstva na rozdíl od gramnegativních bakterií postrádá vnější lipopolysacharidovou membránu. U ptáků, stejně jako u všech obratlovců je lysozym součástí krvní plazmy či slin, dále také vaječného bílku a žloutku.

Množství lysozymu lze stanovit metodou radiální difúze v agaróze s přísadkou *Micrococcus luteus* dle Laemmliho (1970) modifikovaná podle Hyršl & Šimek (2005). V rámci metody dochází k difúzi lysozymu do okolního gelu a následně interakci s *M. luteus*, jež se projevuje vyčerpáním okolí jamky, do které byl nanesen vzorek. Plocha prosvětlená přitom odráží aktivitu lysozymu.



Obr. 4: Agarózový gel s difúzními zónami – po obvodu lysozym pro kalibraci, uvnitř vzorky slepičí plazmy.

Koncentrace lysozymu v plazmě kura domácího byla z kalibrační křivky přepočtena jakožto hodnota 0,1 mg/ml, tedy o něco nižší než u savců, u kterých se koncentrace lysozymu pohybuje s mezidruhovými rozdíly mezi 0,3 a 0,5 mg/ml. Plazma byla připravena centrifugací krve při 2500 x g/10 min, poté zamrazena při -20°C. Množství lysozymu nanášené do jamek bylo 50µl.

Fagocytóza

Fagocytóza je u ptáků zprostředkována funkčními ekvivalenty savčích neutrofilů označovaných jako heterofily. Průběh fagocytózy je zpočátku stejný u obou typů těchto granulocytů, avšak konečné fáze, tedy likvidace pohlceného mikroorganismu je značně odlišná.

Savčí neutrofilové využívají primárně oxidativních mechanismů známých také pod názvem respirační vzplanutí. Tento proces je zahájen aktivací membránového enzymu NADPH oxidázy a postupnou produkci reaktivních kyslíkových intermediátů. Výsledkem je myeloperoxidázou katalyzovaný vznik baktericidních chlomanových aniontů.

Ptačí heterofily však myeloperoxidázu postrádají, přesto však k respiračnímu vzplanutí dochází, avšak v daleko menší míře než u savčích neutrofilů. Prvotně jsou proto využívány mechanismy na kyslíku nezávislé, tedy neoxidativní. Za ty je zodpovědný především beta-defensin, který je hlavní komponentou heterofilních granúl.

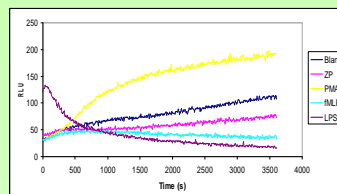
Stanovení respiračního vzplanutí fagocytů

Stanovení respiračního vzplanutí čili baktericidní schopnosti fagocytů je založeno na chemiluminiscenční analýze. Ta je zprostředkována luminoforem, který je excitován prostřednictvím volných kyslíkových radikálů. Během návratu luminoforu z excitovaného do základního stavu dochází k emisi světla, jehož hodnota je přímo úměrná míře fagocytózy.

K běžnému stanovení respiračního vzplanutí neutrofilů savců či ryb se jako luminofor používá luminol. Z důvodu nízké hladiny produkovaných kyslíkových radikálů je však v případě ptáků nutno použít mnohem citlivější luminofor. Takovým se osvědčil být Pholasin – fotoprotein extrahovaný z mořských měkkýšů rodu *Pholas dactylus* (Šild and Hórák, 2010).

1) Stanovení senzitivity fagocytů k různým typům aktivátorů

Modelový organismus: křepekla japonská, staří krve: 18 hodin. Zvolené aktivátory: LPS (lipopolysacharid), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát), ZP (zymosanové partikule), fMLP (formylmetionylleucylfenylalanin)

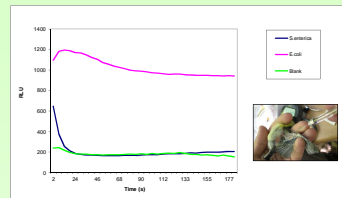


Obr. 5: Reakce křepekly japonské na různé druhy aktivátorů.

Z výše uvedeného grafu vyplývá, že nejrychlejší je reakce s LPS, k té dochází během několika málo vteřin, kdy dosahuje maxima a poté prudce klesá. Intenzivní reakce byla zaznamenána také u reakce s PMA, křivka má však tentokrát charakter postupného růstu s maximem dosaženým až po několika minutách. Naopak velmi slabou reakci vykazuje ZP, kde takřka nedochází k žádnému nárůstu intenzity. Stejnou situaci jsme zaznamenali také v případě fMLP, která se však díky absenci receptorů pro tento typ aktivátoru dala očekávat (Kogut et al. 1998).

2) Aktivita respiračního vzplanutí mláďat sýkory koňadry v reakci na LPS *S. enterica* a *E. coli*

LPS bakterií ředěny s puřem (DPBS, pH 7,4) v poměru 1:1, staří krve : 2-6 hodin



Obr. 6: Respirační vzplanutí sýkory koňadry v reakci na LPS *E. coli* a *S. enterica*

Reakce fagocytů s LPS *E. coli* je v porovnání se *S. enterica* znatelně vyšší, což koreluje s výsledky Šild a Hórák 2010. Křivka vykazuje trend růstu s maximem dosaženým po několika málo sekundách. Následně dochází k pozvolnému klesání, které se přibliží k hodnotě blanku až po více než hodině. Naopak reakce se *S. enterica* dosahuje maxima ihned po jejím přidání. Stejně tak pokles na úroveň blanku, tedy vyčerpání volných radikálů je téměř okamžitý.

Příprava vzorků a podmínky měření:

Námí provedená měření probíhala za použití kitu typu ABEL® Cell Activation Test Kit for Whole Blood or Isolated Cells with Pholasin and Adjuvant-K™. Měření pomocí tohoto typu luminoforu probíhalo na vzorcích plné krve odebrané z křídelní žíly ptáků do heparizovaných kapilár. Krev byla poté až do počátku měření skladována při 4°C. Jako blank byla použita plazma daného ptačího druhu získaná centrifugací při 2500 x g/10 min. K měření luminescence byl použit opět luminometr Immunotech LM - OIT.

Závěr: Výše uvedené metody stanovení komplementu, lysozymu či fagocytózy, tedy základních mechanismů vrozené imunity se v našem případě osvědčily jako použitelné pro větší studie. Především stanovení respiračního vzplanutí pomocí Pholasinu je velice praktická a přesná metoda, která v případě ptáků nahrazuje malou citlivost luminolu. V rámci této metody byly vůbec poprvé použity jako modelové organismy sýkora koňadra či křepekla japonská.

Literatura: Buchtková S., Šimková A., Rohlenová K., Flajšhans M., Lojek A., Lilise E., Hyršl P.: The seasonal changes in innate immunity of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 318: 169–175, 2011.
Hyršl P., Šimek V.: An analysis of hemolymph protein profiles during the final instar, prepupa and pupa of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Biologia*, 207–23, 2005.
Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 – 685, 1970.
Kogut M.H., Holtzaple C., Lowry V.K., Genovese K., Stanker L.L.: Functional responses of neonatal chicken and turkey heterophils following stimulation by inflammatory agonists. *Am J Vet Res* 59: 1404-1408, 1998.
Šild E. and Hórák P.: Assessment of oxidative burst in avian whole blood samples. Validation and application of a chemiluminescence method based on Pholasin. *Behav Ecol Sociobiol*, 64: 2064-2076, 2010.