

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Halyna Pidhorodetská

Chemokiny u transplantace ledviny a jejich tvorba lidskými makrofágy a renálním epitelem

Chemokines in kidney transplantation and their production by human macrophages and renal epithelial cells

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. MUDr. Ilja Stříž, CSc.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 30.4.2018

Halyna Pidhorodetská

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Iljovi Střížovi za vedení mé diplomové práce, cenné rady a všestrannou pomoc. Také bych ráda poděkovala Mgr. Kristýně Kopecké, DiS. za věnovaný čas v laboratoři a ochotu konzultovat v průběhu zpracování mé diplomové práce. Velké poděkování patří MUDr. Josefu Šírkovi za velkou oporu po celou dobu mého magisterského studia a v neposlední řadě děkuji rodičům za finanční podporu.

Tato práce byla vypracována za využití podpory MZ ČR-RVO („Institut klinické a experimentální medicíny-IKEM, IČ 00023001“)

Abstrakt

Jeden z hlavních účinků prozánětlivých cytokinů je indukce chemokinů a exprese adhezivních molekul, které regulují migraci imunitních buněk do centra poškození. Chemoatraktivní gradient zajišťuje kromě toho také fyziologický přísun buněk do tkání a lymfatických orgánů za normálních okolností. Chemokiny jsou chemotaktické cytokiny, které tvoří velmi rozsáhlou a rozmanitou skupinu vylučovaných proteinů, které mají mnoho funkcí jednak v procesech udržujících homeostázu, ale i ve stavech zánětlivých. Produkce některých chemokinů má také zásadní vliv na odhojení štěpu. Další pochopení mechanismů, kterými se účastní chemokiny akutní rejekce, by mohlo přispívat ke zlepšení léčebných kroků v transplantologii.

V této diplomové práci byly sledovány sérové hladiny chemokinů u pacientů s transplantovanou ledvinou, tato měření však neukázala významnou dynamiku. Dále byl sledován vliv efektu prozánětlivých cytokinů na uvolnění chemokinů z buněk renálního epitelu a monocytů. Byly prováděny experimenty, kde se sledovaly hladiny jednotlivých chemokinů jako ENA-78, IL-8, MCP-1, MIP-1 β , RANTES, GRO- α , u buněčných kultur THP-1 (monocyto/makrofágová buněčná linie), RPTEC (renální epiteliální buňky proximálních tubulů) a RA (nádorová linie ledvinových buněk). Ke stimulaci byl použit TNF- α (tumor nekrotizující faktor alfa).

TNF- α měl v našem experimentu efekt na uvolnění chemokinů z buněk renálního epitelu a lidských monocytů, ale i u buněk rakovinných. Dále byly zjištěny vyšší hladiny chemokinů IL-8 a GRO- α u pacientů s transplantovanou ledvinou. U linie rakovinných buněk byly nejvyšší hladiny chemokinů MCP-1 a IL-8. U myeloidní linie THP-1 byla nejvyšší hladina u chemokinů RANTES a GRO- α . Efekt TNF- α na expresi molekuly CD54 u THP-1 buněk a RA buněk byl značný, v obou případech byly hladiny CD54 po stimulaci zvýšené.

V našem experimentu sérové hladiny chemokinů u pacientů po transplantaci ledviny vykazovaly výraznou interindividuální variabilitu a nebyl zaznamenán rozdíl mezi jednotlivými 2 imunosupresivními režimy.

Klíčová slova: chemokiny, ENA-78, IL-8, MCP-1, MIP-1 β , RANTES, GRO- α

Abstract

One of the main effects of pro-inflammatory cytokines is the induction of chemokines and the expression of adhesive molecules that regulate the migration of immune cells to the center of the damage. Chemoattractant gradient also provides a physiological delivery of cells to tissues and lymphatic organs under normal circumstances. Chemokines are chemotactic cytokines that form a very large and diverse group of secreted proteins that have many functions both in processes that maintain homeostasis but also in inflammatory states.

Production of some chemokines also has a major effect on graft rejection. Further understanding of the mechanisms involved in the acute rejection chemokine could contribute to improving treatment steps in transplantology.

In this diploma thesis, serum chemokine levels were monitored in renal transplant patients, but these measurements did not show significant dynamics. Furthermore, the effect of pro-inflammatory cytokines on the release of chemokines from renal epithelial cells and monocytes was studied. Experiments were performed to monitor the levels of individual chemokines such as ENA-78, IL-8, MCP-1, MIP-1 β , RANTES, GRO- α , THP-1 (monocyte/macrophage cell line), RPTEC (renal epithelial cells of proximal tubules) and RA (renal cell tumor lines).

TNF- α had an effect on the release of chemokines from renal epithelial cells and human monocytes, but also in cancer cells. In addition, higher levels of IL-8 and GRO- α chemokines were found in renal transplant patients. In the cancer cell line, the highest levels of chemokines were MCP-1 and IL-8. The THP-1 myeloid line had the highest level of chemokines RANTES and GRO- α . The effect of TNF- α on expression of the CD54 molecule on THP-1 cells and RA cells was significant, in both cases CD54 levels were increased after stimulation.

In our experiment, serum chemokine levels in kidney transplant patients showed marked interindividual variability and no difference was observed between 2 individual immunosuppressive regimens.

Key words: chemokines, ENA-78, IL-8, MCP-1, MIP-1 β , RANTES, GRO- α

Obsah

1 Úvod	11
2 Literární přehled	13
2.1 Imunitní systém.....	13
2.1.1 Vrozená a adaptivní imunita	14
3 Ischemicko/reperfuzní poškození	19
3.1 Mechanismus ischemicko/reperfuzního poškození	19
3.2 Ischemicko/reperfuzní poškození během transplantace ledvin.....	20
4 Studená ischemie	21
5 Rejekce transplantátu.....	22
6 Chemokiny	27
6.1 Chemokinové receptory a jejich signalizace.....	29
6.2 CXC chemokiny	31
6.2.1 CXCL8 (IL-8)	32
6.2.2 CXCL5 (ENA-78).....	32
6.2.3 CXCL1-3 (GRO- α , β , γ).....	32
6.2.4 CXCL9	32
6.2.5 CXCL10	33
6.2.6 CXCL11	33
6.2.7 CXCL12	33
6.2.8 CXCL13	34
6.2.9 CXCL14	34
6.3 CC chemokiny	35
6.3.1 CCL2 (MCP-1).....	35
6.3.2 CCL4 (MIP-1 β).....	35

6.3.3 CCL5 (RANTES).....	36
7 Cíle práce.....	38
8 Materiál a metody.....	38
8.1 Tkáňové kultury: RA, RPTEC a THP-1	38
8.2 Rozmražení adherentních buněčných linií RA a RPTEC	38
8.3 Pasážování adherentních buněčných linií RA a RPTEC	39
8.4 Tkáňové kultury: THP-1	39
8.5 Rozmražení buněčných linií THP-1	39
8.6 Pasážování buněčných linií THP-1	40
8.7 Příprava buněčných linií THP-1 k pokusu.....	40
9 Metodika.....	41
9.1 Stanovení koncentrace chemokinů metodikou Luminex.....	41
9.2 Stimulace buněk pomocí TNF- α	42
9.2.1 Stimulace RA buněk pomocí TNF- α	42
9.2.2 Stimulace RPTEC buněk pomocí TNF- α	42
9.2.3 Stimulace THP-1 buněk pomocí TNF- α	43
9.2.4 Metodika barvení CD54	43
9.2.5 Charakteristika souboru pacientů	43
10 Statistika	44
11 Výsledky.....	45
11.1 Efekt prozánětlivého cytokinu TNF- α na produkci chemokinů	45
11.1.1 Produkce IL-8/CXCL8 linií buněk THP-1, RA a RPTEC	45
11.1.2 Produkce MCP-1/CCL2 linií buněk THP-1, RA a RPTEC	46
11.1.3 Produkce RANTES/CCL5 linií buněk THP-1, RA a RPTEC	47
11.1.4 Produkce ENA-78/CXCL5 linií buněk THP-1, RA a RPTEC	48
11.1.5 Produkce GRO- α linií buněk THP-1, RA a RPTEC	49

11.2	Tvorba chemokinů jednotlivými buňkami.....	50
11.3	Produkce molekuly CD54 u jednotlivých buněk	53
11.4	Porovnání typů léčby bez indukce vs Simulect	54
11.4.1	ENA-78 typ léčby, srovnání ENA-78; bez indukce vs Simulect	54
11.4.2	IL-8 typ léčby, srovnání IL-8; bez indukce vs Simulect	56
11.4.3	MCP-1 typ léčby, srovnání MCP-1; bez indukce vs Simulect.....	57
11.4.4	MIP-1 β typ léčby, srovnání MIP-1 β ; bez indukce vs Simulect	58
11.4.5	RANTES typ léčby, srovnání RANTES; bez indukce vs Simulect	60
11.5	Hladiny chemokinů u pacientů s transplantovanou ledvinou	66
11.5.1	Sérové hladiny ENA-78 u pacientů s transplantovanou ledvinou.....	66
11.5.2	Sérové hladiny IL-8 u pacientů s transplantovanou ledvinou	67
11.5.3	Sérové hladiny MCP-1 u pacientů s transplantovanou ledvinou	68
11.5.4	Sérové hladiny MIP-1 β u pacientů s transplantovanou ledvinou.....	69
11.5.5	Sérové hladiny RANTES u pacientů s transplantovanou ledvinou.....	70
12	Diskuze	71
13	Závěr.....	74
14	Seznam použité literatury	76

Seznam zkratek

ATP	Adenosintrifosfát
ABMR	Antibody mediated rejection; protilátkami zprostředkovaná rejekce
APC	Antigen presenting cell; buňka prezentující antigen
BLC	B lymphocyte chemoattractant
BRAK	Breast and kidney-expressed chemokine
CLRs	C-type lectin receptors
CC	CC chemokiny
CIT	Cold ischemia time
CXC	CXC chemokiny
DAMP	Damage/danger-associated molecular patterns; molekuly uvolněné z poškozených buněk
DC	Dendritic cell, dendritická buňka
dsRNA	Double-stranded RNA; dvouvláknová RNA
DARC	Duffy Antigen Receptor for Chemokines
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay; enzymová imunoanalýza na pevné fázi
ENA-78	Epithelial Neutrophil-Activating Protein 78; Epiteliální neutrofily aktivující protein 78
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid; kyselina ethylendiamintetraoctová
FBS	Fetal bovine serum; fetální bovinní sérum
FCS	Fetal calf serum; fetální telecí sérum
FS	Forward scatter; přední rozptyl
GC Tfh	Germinal center CD4 (+) T follicular helper
GRO-α	Growth related oncogene-alpha
HLA	Human leukocyte antigen; lidský leukocytární antigen
RPTEC	Human renal proximal tubule epithelial cell
IRAK	IL-1 receptor associated kinases
IFN-γ	Interferon gamma
IP-10	Interferon gamma a-induced protein 10
IL	Interleukin
IL-1β	Interleukin-1 beta
IMDM	Iscove`s modified Dulbecco`s medium
I/RI	Ischemicko/reperfuzní poškození
LPS	Lipopolysaccharide, lipopolysacharid
MIP-1β	Macrophage inflammatory protein-1 beta; Makrofágový zánětlivý protein-1 beta
MAP	Mitogen-activated protein kinases
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1; Monocytární chemotaktický protein-1
MIG	Monokine induced by interferon gamma
MyD88	Myeloid diferentiation primary response gene 88

NK	Natural killer cells; NK buňky
NLRs	NOD-like receptors; receptory podobné Nod
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
IκB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns; struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy
PRR	Pattern recognition receptors; receptory rozpoznávající vzor
RA	Renal adenocarcinoma epithelial cell
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RLRs	RIG-I-like receptors
SS	Side scatter; boční rozptyl
Tc	Cytotoxický T lymfocyt
TLRs	Toll-like receptors; receptory skupiny toll
TIR	Toll/interleukin 1 receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor; faktor nekrotizující nádory
Th	Pomocný T lymfocyt
WIT	Warm ischemia time

1 Úvod

Raná fáze imunitní reakce proti alotransplantátu

Imunitní odpověď uplatňující se v odmítnutí ledvinného alotransplantátu zajišťují jednak mechanismy přirozené, a zvláště pak ty, které známe pod pojmem adaptivní imunita. Počáteční imunitní odezvu zajišťují především složky přirozené imunity. V rané fázi imunitní reakce proti transplantátu dochází k uvolnění prozánětlivých cytokinů, převážně IL-1 β a TNF- α . Tyto cytokiny jsou hojně exprimovány buňkami endoteliálními, epiteliálními a také dalšími buňkami parenchymu. K indukci prozánětlivých cytokinů přispívá I/RI štěpu s následnou hypoxií, ale svou zásluhu má i samotné operační trauma. Degradace renálních tubulárních buněk, buněk endotelu a vyvolání zánětlivé odezvy (včetně produkce prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β , IL-6) v ledvinném parenchymu jsou způsobeny právě mírou I/RI. Na přímé indukci transkripčních a zánětlivých faktorů, jako je například Heat shock protein-1 (faktor tepelného šoku-1) nebo NF- κ B, se značně podílejí tyto zmíněné patofyziologické stavy (*Thorburn et al., 2009*).

Po chirurgické resekci je orgán uložen ve studeném roztoku pro zachování viability buněk. Fáze studené ischemie může sice škodlivé procesy zmírnit, ovšem naprosto jim zabránit nikoliv. Mnoho studií prokazuje jasný vztah mezi dobou studené ischemie a akutním odhojením štěpu (*Ponticelli, 2015*). Jeden z hlavních účinků prozánětlivých cytokinů je indukce chemokinů a exprese adhezivních molekul, které regulují migraci imunitních buněk do centra poškození. Tvorba chemokinů pomocí prozánětlivých cytokinů je zprostředkována NF- κ B dráhou, jejíž stimulaci napomáhá ischemie a oxidační stres. V dnešní době je považován TNF- α za jasný induktor chemokinů. Před pár lety se podařilo prokázat pomocí neutralizační anti-TNF- α protilátky inhibici chemokinů, například IL-8 nebo MCP-1. Počáteční přísun leukocytů do štěpu zajišťuje chemotaktický gradient chemokinů, který je tvořen aktivovaným endotelem a buňkami ledvinného parenchymu, v pozdější fázi se do role dostávají i lymfocyty a makrofágy. Časné chemokiny obstarávají přísun zejména leukocytů, které nemají antigenní specifitu (makrofágy, přirození zabíječi, neutrofily,...), dále dochází k chemotaxi i antigenně specifických lymfocytů T do transplantovaného štěpu a ke vzniku zánětu (*Viklicky et al., 2008*).

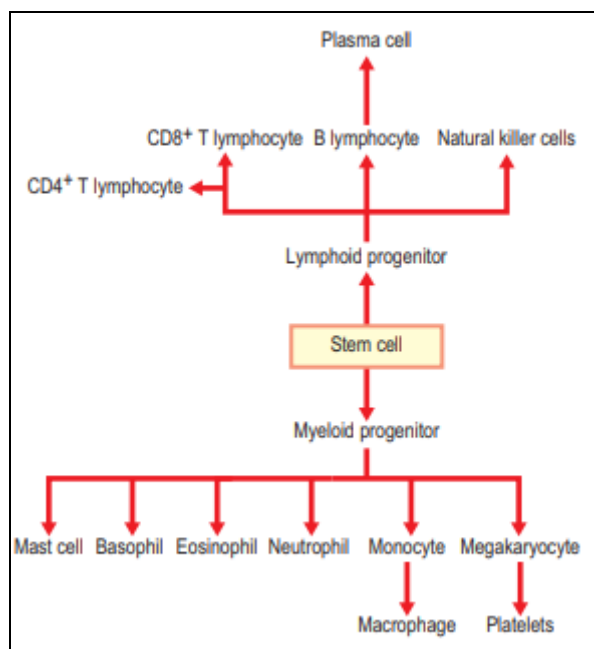
Uvolnění chemokinů, bohatá infiltrace štěpu, rozpoznání antigenu pomocnými T-lymfocyty a další dílčí kroky probíhající často v kombinacích, mají klíčovou roli v zahájení akutního odhojení. Akutní rejekce je doprovázena zvláště chemokiny, jenž se váží na

receptory CXCR3 a CCR5. Zmíněné receptory jsou exprimované na T-lymfocytech, NK buňkách a makrofázích. Je na místě zmínit skutečnost, že produkce některých chemokinů má zásadní vliv na odhojení štěpu. Další pochopení mechanismů, kterými se účastní chemokiny akutní rejekce, by mohlo přispívat ke zlepšení léčebných kroků v transplantologii.

2 Literární přehled

2.1 Imunitní systém

Součástí imunitního systému jsou nejen orgány, ale i mnoho rozdílných typů buněk (obrázek č.1). Všechny buňky imunitního systému, tkáňové buňky a bílé krvinky (leukocyty) se vyvíjejí z pluripotentních kmenových buněk v kostní dřeni. Tyto hemopoetické kmenové buňky také zvyšují počet červených krvinek (erythrocyty). Produkce leukocytů probíhá dvěmi hlavními cestami diferenciací. Lymfoidní linie produkuje T-lymfocyty a B-lymfocyty. NK buňky jsou velkými granulárními lymfocyty, vyvíjejí se také z lymfatických progenitorů. Myeloidní linie produkuje mononukleární fagocyty, monocyty, makrofágy, granulocyty (bazofilní, eozinofilní a neutrofilní), trombocyty a žírné buňky. Trombocyty se podílejí na srážení krve a zánětu, žírné buňky jsou podobné bazofilům, ale nacházejí se ve tkáních (Stewart, 2012).



Obrázek č.1: Buňky imunitního systému.

Převzato z: Greenwood et al. Medical Microbiology: With STUDENT CONSULT online access. 2012.

2.1.1 Vrozená a adaptivní imunita

První linií obrany proti primární infekci je vrozený imunitní systém, který spolupracuje s adaptivním imunitním systémem a spolu vytvářejí imunitní odpověď (obrázek č.2). NK a DC buňky jsou důležitými složkami vrozeného imunitního systému. NK buňky mohou přímo lyzovat infikované buňky nebo vylučovat cytokiny, které jako např. IFN- γ , ovlivňují adaptivní odpověď, zatímco DC rozpoznávají cizí patogeny prostřednictvím receptorů (Gangappa et al, 2008).

Vrozená imunita	Adaptivní imunita
Široká specifita Žádná změna s opakovanou expozicí Mechanické bariéry Bakteriální substance Rostlinná flóra	Specifita Paměť
Humorální Proteiny akutní fáze Interferony Lysozomy Komplement	Protilátka
Buňkami zprostředkovaná NK buňky Fagocyty	T lymfocyty

Obrázek č.2: Buňky imunitního systému.

Převzato z: Greenwood et al. Medical Microbiology: With STUDENT CONSULT online access. 2012.

Vrozená imunita

Složky vrozeného imunitního systému rozpoznávají struktury, které jsou pro dané mikroorganismy jedinečné. Patří sem komplexní lipidy a sacharidy, např. peptidoglykan u bakterií a lipopolysacharidy gramnegativních bakterií. Jiné mikrobiálně specifické

molekuly zahrnují dvouřetězovou RNA nalezenou v replikujících virech a nemetylované sekvence CpG bakterií. Vrozený imunitní systém je schopen rozpoznat tyto struktury, reagovat přiměřeně a zároveň nerozpoznávat vlastní struktury, aby nedošlo k autoimunitní reakci. Mikrobiální produkty rozpoznávané vrozenou imunitou označujeme jako molekulární vzory spojené s patogenem (PAMP), jsou důležité pro přežití mikroorganismů a nemohou být snadno vyřazeny nebo mutovány. Různé třídy mikroorganismů vyjadřují různé PAMP, které jsou rozpoznány různými receptory rozpoznání vzoru (PRR) na hostitelských buňkách a cirkulujících molekulách. Rozpoznání mikrobiálních složek receptory buněk vrozené imunity vede k řadě výsledků, včetně uvolňování cytokinů, zánětu a aktivaci buněk. Cytokiny produkované vrozeným imunitním systémem signalizují přítomnost infekčních agens a ovlivňují typ získané imunitní odpovědi (*Stewart, 2012*).

ILC

Skupina buněk ILC je charakterizována klasickou morfologií a nepřítomností přeskupených antigen specifických receptorů, proto nevykazují antigenní specificitu, která je známá u T a B-lymfocytů. ILC zahrnuje NK (cNK) buňky, LT_i buňky a necytotoxickou skupinu ILC, která je seskupena do skupiny: ILC1, ILC2 a ILC3. ILC jsou rozděleny do odlišných skupin na základě jejich fenotypových a funkčních znaků, zejména na cytotoxické nebo ILC killer (př. cNK buňky) a necytotoxické ILC helper-like (př. LT_i buňky) (*Spits et al., 2013*).

Necytotoxické pomocné buňky jsou rozděleny do tří skupiny: skupina 1 ILC (ILC1) složená z ILC, které vylučují IFN- γ a TNF; skupina 2 ILC (ILC2) produkující 2 cytokiny, IL-5 a IL-13 a skupinu 3 ILC (ILC3) vylučující IL-17 a IL-22, zahrnující LT_i buňky. Transkripční profil exprese cytokinů a funkce efektorů těchto necytotoxických ILC buněk připomínají linie CD4⁺ T pomocných buněk (*Klose et al., 2014*).

Je možné, že NK buňky jsou vrozenou formou CD8⁺ T buněk (*Hazenberg a Spits, 2014*).

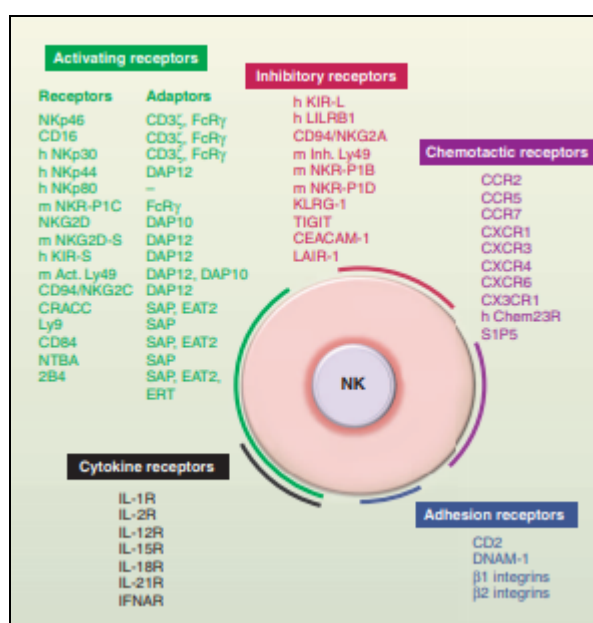
NK buňky

NK buňky byly uznány jako hlavní producenti cytokinů, jako je IFN- γ v mnoha fyziologických a patologických podmínkách. NK buňky dále produkují řadu cytokinů mající jak prozánětlivé, tak imunosupresivní funkce např. TNF- α , IL-10 a růstové faktory

např. GM-CSF (faktor stimulující kolonie granulocytů makrofágů), G-CSF (faktor stimulující kolonie granulocytů) a IL-3. NK buňky také vylučují řadu chemokinů: CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP1- α), CCL4 (MIP1- β), CCL5 (RANTES), XCL1 (lymfotaktin) a CXCL8 (IL-8) (Walzer et al., 2005).

Sekrece chemokinů NK buňkami je klíčem k jejich kolonizaci k jiné hematopoetické buňce jako je DC buňka v oblastech výskytu zánětu (Moretta et al., 2005).

Produkce IFN- α buňkami NK pomáhá vytvářet odpověď T-buněk v lymfatických uzlinách, případně určuje přímou interakci mezi Th0 lymfocyty a NK buňkami migrujících k sekundárnímu oddílu lymfoidů od zanícené periferní tkáně, a mající nepřímý účinek na DC buňky (Martín-Fontecha et al., 2004). Na obrázku č.3 vidíme NK buněčné receptory.



Obrázek č.3: NK mohou exprimovat povrchové buněčné receptory, které patří do skupiny: aktivace (zelená), inhibice (červená), adheze (modrá), cytokiny (černá) a chemotaktické receptory (fialová).

Převzato z: Vivier et al. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. 2011.

Adaptivní imunita

Odpověď adaptivní imunity je mnohem pomalejší než u vrozené imunity, je charakterizována specificitou a pamětí. Lymfocyty patřící mezi leukocyty, jsou hlavními

buňkami zodpovědnými za adaptivní imunitu. Lymfocyty se dělí na B a T-lymfocyty. B-buňky jsou zodpovědné za humorální imunitu, kdežto T-buňky zprostředkovávají buněčnou imunitu. B-buňky obsahují receptory B-buněk (BCR) známé jako membránové imunoglobuliny na povrchu buněk, které po navázání na antigen vedou k diferenciaci B-lymfocytů k plazmatickým buňkám, tyto buňky vylučují velké množství rozpustných imunoglobulinů (Ig, známé jako protilátky), které se vážou na antigeny. Krevní sérum obsahuje polyklonální protilátky, které jsou vylučovány plazmatickými buňkami s mnoha specifickými vlastnostmi. Sérové protilátky jsou produkovány v důsledku stimulace antigeny, přítomnost či nepřítomnost specifických protilátek má velký význam v klinickém testování (*Ahmed et al., 2009*).

Lymfocyty

Lymfocyty tvoří přibližně 20% z bílých krvinek cirkulujících v krvi. Dospělé lymfatické buňky mají delší životnost a mohou přežívat i několik let. Tyto mononukleární buňky jsou heterogenní ve velikosti a morfologii. Typickými zástupci menších lymfocytů jsou T a B-lymfocyty (*Stewart, 2012*).

T-lymfocyty mohou být rozděleny podle jejich funkce do tří skupin: cytotoxické T-buňky (Tc), T pomocné buňky (Th) a regulační T-buňky (Treg). Rozdílná exprese markerů na buněčném povrchu, stejně tak jako odlišné profily sekrece cytokinů, poskytují cenné informace o jejich různorodé povaze a funkci (*Zhu et al., 2010*).

T-buňky dozrávají v thymusu, exprimují TCR (receptor T-buněk) a mohou exprimovat buď CD8 glykoprotein na svém povrchu pak jsou nazývány CD8⁺ T-buňky (cytotoxické) nebo exprimují CD4 glykoprotein a pak se nazývají CD4⁺ buňky (pomocné T-buňky). CD4⁺ buňky se rozdělují do různých podmnožin: Th1 (T pomocník), Th2, Th9, Th17, Th22, Treg (regulační T-buňky) a Tfh (pomocné folikulární T-buňky), které jsou charakterizovány různými profily cytokinů. Tyto různé CD4⁺ podmnožiny mají klíčovou roli v imunitní a efektorové odpovědi funkce T-buněk (*Raphael et al., 2015*).

B-lymfocyty se rozdělují do dvou odlišných buněčných typů: MBC a LLPC. Primárně se nacházejí v sekundárních lymfatických orgánech, antigen specifické MBC buňky se nacházejí s vyšší četností než naivní B-buňky specifické pro stejný antigen, ačkoli aktivně neprodukují protilátky, exprimují s vyšší afinitou receptor B-buněk (BCR). Zprostředkovávají rychlé odezvy jako odpověď k infekci, zrychleným dělením a

diferenciací na protilátky sekretující plazmatické buňky, které zároveň doplňují zásobu MBC buněk. Na rozdíl od nich existují LLPC buňky především v kostní dřeni a konstitutivně produkují a vylučují protilátky, dále obsahují minimální úroveň BCR nebo žádné a nelze je stimulovat, aby se dělily nebo zvýšily rychlost tvorby protilátek. Plazmové buňky jsou tedy terminálně diferencované buňky, které průběžně zpracovávají efektorové funkce (produkují protilátku) v nepřítomnosti antigenní stimulace (*Kalia et al., 2006*).

Lymfocyty jsou aktivovány antigenem, správnou kombinací cytokinů, signalizujícími molekulami produkovanými jinými lymfocyty a makrofágy (*Stewart, 2012*).

Imunita a její role v transplantologii

T-lymfocyty recipienta mohou rozpoznat donorový aloantigen dvěma cestami. V přímé cestě hostitelské T-lymfocyty rozpoznávají nativní molekuly MHC exprimované k buňkám APC transplantátu. Nepřímou cestou jsou hostitelské T-lymfocyty rozpoznány peptidy odvozenými od aloantigenů dárce v kontextu vlastních MHC molekul exprimovaných na buňkách APC příjemce (*Briscoe a Sayegh, 2002*).

Jakmile vlastní T-buňky dostanou signál přes TCR a příslušné kostimulační molekuly pro úplnou aktivaci, a další podněty od cytokinů nebo povrchových buněčných receptorů potřebných pro diferenciaci, přemění se na efektorové buňky. Zralý efektor T-buněk CD4⁺ nebo CD8⁺ je schopen zprostředkovat poškození štěpu (*Sallusto et al., 2004*).

Dlouhotrvající triumviát efektorových cest při odmítnutí štěpu je: cytotoxicita zprostředkovaná T-buňkami, zpožděný typ hypersenzitivity a poškození zprostředkované protilátkami. Relativní význam každé z těchto cest při odmítnutí štěpu závisí na různých faktorech, včetně transplantovaného orgánu, stavu senzibilizace příjemce, souběžné infekce a imunosupresivních protokolů (*Martinez a Rosen, 2005*).

3 Ischemicko/reperfuzní poškození

Ischemie a reperfuze jsou přirozeným procesem při ledvinné transplantaci. Smrtí mozku se zhoršuje tok krve kvůli hemodynamickým poruchám v kadaveru dárce. Renální tepny se začnou stahovat a způsobují absolutní ischemii během operace, kdy dochází k odoperování dárcovské ledviny z kadaveru. Studená ischemie během skladování ledvinného alograftu může také způsobit další ischemická poškození (*Southard et al. 1985; Ploeg et al., 1988; Dong a Tilney 2001*).

Transplantace ledvin od žijícího příbuzného dárce je vystavena teplé ischemii začínající stahováním artérií. Po rekonstrukci krevního oběhu v transplantátu se objevuje konečná fáze poranění během reperfuze označovaná jako reperfuzní poškození. Ischemicko/reperfuzní poškození je okamžitou nespecifickou zánětlivou odpovědí (*Koo a Fuggle, 2000*).

Jako odpověď je endotel aktivován reaktivními molekulami kyslíku a zánětlivými cytokiny, následně jsou zahrnuty adhezní molekuly P-selektin a E-selektin, které indukují adhezi krevních destiček k epitelu. Leukocyty, zpočátku neutrofily, pak monocyty a makrofágy se infiltrují do postižené tkáně (*Koo a Fuggle, 2002*).

3.1 Mechanismus ischemicko/reperfuzního poškození

Krevní oběh se zastaví, substráty a energie dochází, buněčná homeostáza a iontový gradient již nelze udržet. Postižené buňky jsou ve stresové situaci. Na začátku ischemie je poskytován adenosintrifosfát z glykolýzy, avšak zásoby glykogenu jsou omezené a brzy dojdou, mezitím dochází k produkci vedlejších produktů a toxických metabolitů včetně laktátu (*Gulec, 2011*).

Během ischemie dochází ke změnám metabolismu, intracelulární pH klesá v důsledku anaerobní glykolýzy a hydrolýzy adenosintrifosfátu. Při obnovení normální hladiny pH během reperfuze v ischemických buňkách dochází ke zrychlenému zničení buněk, fenomén označován jako “pH paradox”. Reperfuze zhoršuje poškození vyvoláním zánětlivé reakce, která zahrnuje radikály (neobsahující kyslík), endotelové faktory a leukocyty. Toto spuštění narušuje mikrocirkulaci s atrakcí, aktivací, adhezí a migrací neutrofilů (*Massberg a Messmer, 1998*).

Cílové místo ischemicko/reperfuzního poškození je vaskulární endotel a mikrocirkulace transplantátu (*Gulec, 2011*).

Aktivace leukocytů a interakce mezi leukocyty a endotelem vyvolávajícím zánět, probíhají v počáteční fázi, uvolňování reaktivních molekul kyslíku z různých zdrojů, aktivace komplementů a spouštění vrozené imunity, způsobující apoptózu a nekrózu buněk je odpovědí pozdní fáze ischemicko/reperfuzního poranění. Chemotaktické mediátory během ischemie aktivují leukocyty a enzymy, jako je fosfolipáza A₂, která přeměňuje fosfolipidy buněčné membrány na kyselinu arachidonovou a lysozomy, které jsou proteolytickými patogenními agens a nekrotickými buňkami. Samotná kyselina arachidonová je prekurzorem pro zánětlivé mediátory, jako jsou leukotrieny a prostaglandiny. Pomocí cest lipoxygenázy a cyklooxygenázy metabolity kyseliny arachidonové, především leukotrieny, zvyšují vaskulární endoteliální adhezi leukocytů a zvyšují postkapilární propustnost. Když se leukocyty vážou na endotel, adhezí molekuly jako je P-selektin a L-selektin, kromě mezibuněčné adhezí molekuly (ICAM), se vyskytují a usměrňují více leukocytů na toto místo. Ve skutečnosti leukocyty uvolňují některé chemotaktické látky, které do této oblasti lákají mnohem více leukocytů. Leukocyty také uvolňují lysozomy a produkují molekuly reaktivního kyslíku, které jsou nezbytné při ischemicko/reperfuzním poranění. Bylo prokázáno, že aktivované neutrofily také uvolňují elastázu, katepsin G, heparanázu, kolagenázu a hydrolytické enzymy, které jsou pravděpodobně přímo cytotoxické pro hepatocyty (*Kang, 2002*).

3.2 Ischemicko/reperfuzní poškození během transplantace ledvin

Lepší pochopení základních mechanismů ischemicko/reperfuzního poškození pomůže dalšímu zajištění přežití štěpu. Téměř 30% pozdní dysfunkce štěpu po transplantaci ledvin je způsobeno ischemicko/reperfuzním poškozením (*Jassem et al., 2002*).

Ischemicko/reperfuzní poranění je jedním z nejdůležitějších nespecifických a neimunologických faktorů ovlivňujících jak pozdní funkci štěpu, tak pozdní dysfunkci aloimplantátu (*Halloran et al., 1988, Womer et al., 2000*).

Transplantovaná ledvina může být náchylná k ischemicko/reperfuznímu poškození v různých stádiích transplantace. Hemodynamická nestabilita mrtvých (kadaverních) dárců může také způsobit opakovanou teplou ischemii *in situ* napadající ledvinu. Teplá ischemie

se může vyskytnout i při pořizování orgánů. Chlazení *in situ* může být užitečné k minimalizaci ischemicko/reperfuzního poškození při recidivování orgánů od zemřelého dárce (Koo *et al.*, 1998).

Orgány od dárců, kterým nebije srdce, mohou podstupovat riziko delších period teplé ischemie před chlazením s ledovým perfúzním roztokem. Studená ischemie je dalším problémem a ledvinné alografty jsou vystaveny určitému stupni chladné ischemie při svém skladování. I když se jedná o relativně krátké časové období, ledvinný aloštěp podstupuje studenou ischemii během transplantace ledvin. Po opětovném toku krevního oběhu se začnou uvolňovat zánětlivé cytokiny a vrozená imunita je aktivována reaktivními molekulami kyslíku. Tato časná odpověď vrozené imunity a ischemické poškození vyvolávají adaptivní odpovědi (Gulec, 2011).

4 Studená ischemie

Mezi hlavní předpoklady úspěšné transplantace ledviny patří také kvalita odebraného orgánu a uskladnění odebraného orgánu (konzervace do doby transplantace). Studená ischemie se podílí na nastartování škodlivých vlivů, které jsou zesilovány díky obnovení krevního průtoku. Tato poškození vytvářejí zánětlivé prostředí a celkově řídí aktivaci imunitní odezvy. Tento negativní dopad se projevuje v situacích jako jsou aloimunitní reaktivita, opožděná funkce štěpu a tvorba progresivních chorobných změn. Jakmile je orgán odebrán chirurgickým týmem, ukládá se do ledového roztoku, aby se maximalizovala životaschopnost buněk. Úplnému zabránění poškození buněk studená ischemie nemůže předejít, škodlivé účinky však může zmírnit. Hypoxické prostředí způsobuje zvýšenou tvorbu kyslíkových radikálů mitochondriemi. Přítomnost kyslíku je nutná k tvorbě adenosintrifosfátu.

Buňky stresované ischemií mají tendenci dodávat ATP procesem zvaným glykolýza. Anaerobní glykolýza spouští takové akce, které mají postupně za následek tvorbu kyseliny mléčné. Nahromadění této kyseliny směřuje k acidóze uvnitř buňky. V momentě, kdy jsou glykolytické substráty vyčerpány, proces anaerobní tvorby energie se zastaví. Snížená produkce ATP, a s tím spojená inhibice Na/K ATPázy, zapříčiňuje dysbalanci mezi intracelulárními ionty draslíku a extracelulárními ionty sodíku. Nerovnováha v těchto

iontech vede k buněčnému otoku. Veškeré negativní zásahy do metabolismu buňky mohou v konečném důsledku vést až ke smrti buňky.

Při reperfuzi dochází ke vzniku zánětu a oxidační stres je také typický problém při ischemicko/reperfuzním poškození. Poškozené buňky endotelu uvolňují prozánětlivé mediátory, proteolytické enzymy a další formy reaktivního kyslíku. Obzvláště epitelální buňky proximálních tubulů jsou citlivé na negativní dopady reperfuze a náchylněji podléhají nekróze (*Ponticelli, 2014*).

Díky nynějším bohatým znalostem o ischemii a jejím škodlivým vlivům, je více než jasné, jaký význam má minimalizace doby trvání studené ischemie (CIT). Pro transplantační chirurgii je tento časový termín velmi významný. CIT se definuje jako doba od zahájení perfuze konzervačního roztoku orgánem v těle dárce až do obnovení krevního oběhu orgánem v těle příjemce. Stejně důležitý časový termín je doba trvání teplé ischemie. To je doba od zastavení průtoku krve orgánem dárce do zahájení perfuze konzervačním roztokem (*Viklicky et al., 2008*).

Studie Debout et al. potvrdila proporcionální vztah mezi každou přibývajícím hodinou CIT a rizikem selhání transplantátu. Stejný tým autorů rovněž stvrdil vztah mezi každou další hodinou CIT a rizikem smrti. Během prvního roku po transplantaci byly přítomny nejvíce škodlivé události, ale doba trvání studené ischemie může mít vliv na výsledky i ve střednědobém horizontu (*Debout et al., 2015*).

5 Rejekce transplantátu

Nespecifická imunita v rejekci

Při zánětu se regulují molekuly nespecifické imunity mající roli při zranění, zhoršuje se proces odmítnutí buď přímo nebo nepřímo prostřednictvím aktivace a nábojem T-lymfocytů. Zraněná tkáň exprimuje ligandy podobné toll receptorům - molekulární vzorec spojený s poškozením (DAMP) a další molekuly nespecifické imunity (*Alegre et al., 2008*).

Receptory podobné genu Toll obvykle detekují patogeny, ale mohou také vnímat přítomnost molekul cizí tkáně a produkovat faktory způsobující zranění a aktivaci

dendritických buněk. Tyto buňky mají důležitou roli v podpoře akutního odmítnutí (*Kim et al., 2008*).

Nárůst MHC (major histocompatibility complex) třídy I, peptidu příbuzné sekvence A (MICA) protilátek na povrchu endotelu může aktivovat NK buňky a CD8⁺ T-buňky. Kromě toho existuje spojitost mezi špatnými výsledky transplantace a senzibilizací k vysoce polymorfním MICA antigenům v transplantacích odpovídajících HLA-1 (*Sumitran-Holgersson, 2008*).

Protilátkami zprostředkovaná rejekce

Protilátky, které mohou zprostředkovat rejekci, zahrnují protilátky proti HLA molekulám, antigenům endoteliárních buněk a AB0 antigenům krevních skupin na endoteliálních buňkách a červených krvinkách. Většina příjemců nemá před transplantací protilátky proti molekulám HLA, pokud nebyli senzitivní na expozici aloantigenů během těhotenství, transfúzi krve nebo předchozí transplantaci (*Nankivell a Alexander, 2010*).

Protilátky proti antigenům krevní skupiny

Ledviny vybrané pro transplantaci jsou rutinně přiděleny příjemcům s kompatibilní krevní skupinou, ale AB0-nekompatibilní ledviny byly také úspěšně transplantovány za využití experimentálního protokolu, který zahrnoval perioperační odstranění protilátek od příjemce za pomoci plazmaferézy nebo imunoabsorpce. Poté, co byly odstraněny, mohly po transplantaci protilátky proti krevní skupině být navýšeny na úroveň, která byla před zahájením léčby (*Lynch a Platt, 2008*).

Přibližně jedna třetina transplantací orgánů byla provedena přes bariéru AB0 (nekompatibilní s AB0), nepodléhající žádné formě Ab-zprostředkované rejekci a většímu výskytu akutní buněčné rejekce než AB0 kompatibilní štěpy (*Cooper, 1990*).

Odmítnutí zprostředkované protilátkami AB0-nekompatibilních renálních aloimplantátů může být rozděleno do dvou podtypů, hyperakutní (vyskytující se do 24 hodin) a akutní humorální rejekce (obvykle se vyskytující během 30 dnů) (*Toma, 1994*). Při hyperakutním odmítnutí se nevytváří žádná moč nebo se její tvorba dramaticky sníží během několika hodin, dále je tu spojitost se sníženým počtem krevních destiček, Abs a komplementu (C3, C4). Humorální odmítnutí je spojeno s progresivním vývojem venozní kongesce a

arteriální a glomerulární trombózy spojené s intersticiálním edémem a krvácením (*Wu et al., 2003*).

Hyperakutní rejekce

Odmítnutí renálního štěpu, ke kterému dochází téměř okamžitě po uvolnění svorek je klasifikováno jako hyperakutní. Namísto “růžovění” v důsledku normální reperfuze se ledvina zdá být ochablá a skvrnitá, odrážející ukládání protilátek proti HLA antigenům, exprimovány na endotel glomerulů a mikrovaskulatury. Aktivace kaskády klasických komplementů uvnitř štěpu je doprovázena endoteliální nekrózou, ukládáním krevních destiček a místní koagulací (*Colvin, 2007*).

Akutní rejekce zprostředkovaná protilátkami

Odmítnutí zprostředkované protilátkami často začíná během několika dnů po transplantaci (nebo během týdnů, pokud byla podána antilymfocytová protilátka). Hlavním rysem je rychlá dysfunkce štěpu v důsledku zánětu. Došlo-li k anamnestické reakci v důsledku předchozí expozice příslušného antigenu, dochází rychle ke zvýšení titrů komplementu fixujícího protilátky (*Terasaki, 2003*).

Hlavní cíle těchto protilátek jsou MHC antigeny vystavené endoteliem příjemcovými peritubulárními a glomerulárními kapilárami (*Dragun et al., 2005*).

Poškozené endotelové buňky uvolňují různé molekuly: von Willebrandův faktor a P-selektin, které podporují agregaci krevních destiček; cytokiny a chemokiny, jako je IL-1 α , IL-8 a chemokin (C-C motiv) ligand 2 (CCL2), které způsobují, že leukocyty přilnou ke glomerulům (glomerulitida) nebo dilataci peritubulárních kapilárií a chemoatraktanty C3a, C5a, C4d, což jsou markery aktivace klasického komplementu, který se často nachází v peritubulárních kapilárách. C5b spustí sestavu membránového útoku (C5b-C9) způsobující lokální endoteliální nekrózu a apoptózu, oddělení endoteliálních buněk z bazální membrány (*Colvin, 2007*).

Rejekce zprostředkovaná T-buňkami

Nejběžnější forma akutního odmítnutí aloimplantátu nastává, když jsou prezentovány aloantigeny dárce na T-lymfocytech příjemce pomocí APC buněk. Nezralé dendritické

buňky štěpu nesoucí antigeny dárce z transplantovaného orgánu k lymfatickým uzlinám a slezině příjemce dospívají v APC buňky (*Larsen et al., 1990*).

Antigen prezentující dendritické buňky příjemce se také účastní a cirkulují štěpem. APC buňky se nacházejí v lymfatických orgánech, kde aktivují T-buňky příjemce, tyto T-buňky se rozdělují do různých podskupin a vracejí se do štěpu, kde se podílejí na zničení transplantovaného orgánu. Dendritické buňky a makrofágy prezentují antigen k T-buňkám, a B-buňky mohou mít funkci v podobě zachycení a prezentaci antigenů s využitím povrchových imunoglobulinů a molekul MHC třídy II (*Nankivell a Alexander, 2010*).

Vaskulární rejekce

Histologické vlastnosti vaskulární rejekce zahrnují infiltraci cév mononukleárními buňkami, endoteliální buněčnou apoptózu, syntézu matrix proteinů a kolagenů intimálními myofibroblasty. $CD4^{+}$ a $CD8^{+}$ T-buňky a makrofágy napadají subendothelium a intimu svaloviny artérií pomocí intercelulární adhezní molekuly 1 (ICAM-1) nebo vaskulární buněčné adhezní molekuly (VCAM) na aktivovaném endotelu pomocí chemokinů (př. CCL4, CCL5, CXCL8) (*Middleton et al., 2002*).

Experimentální důkazy naznačují, že anti-MHC protilátky, T-buňkami zprostředkovaná imunita vůči malým MHC antigenům, přirozené NK buňky a $IFN-\gamma$ mají roli v invazi cév (*Sun et al., 2006*).

Pozdně akutní rejekce

Pozdní akutní rejekce aloštěpu je často závažná a obtížně zvrátitelná s vysokým rizikem následné ztráty štěpu. Jeho hlavní příznaky jsou aktivní imunitní zánět a chronické tubulointersticiální poškození, což často doprovází protilátky zaměřené proti štěpu (*Sun et al., 2006*).

K takové rejekci může dojít u příjemců štěpů s vysokým stupněm imunity proti transplantátu nebo v případě, kdy pacienti dostávají snížené množství imunosupresiv, např. kvůli rakovině nebo těžké předchozí infekci (*Nankivell a Alexander, 2010*).

Chronická rejekce

Chronické odmítnutí aloimplantátu - probíhající imunitní poškození k štěpu - je způsobeno poruchou dostatečné udržovací imunosuprese pro kontrolu reziduálních lymfocytů nebo protilátek transplantátu. Jeho vlastnosti zahrnují postupný pokles funkce ledvin, invazi renálního parenchymu T-buňkami a perzistentní infiltraci interstitia T-buňkami a makrofágy. Občas je možné vidět proliferace hladkého svalstva a hyperplasii v cévách, formující neointimu, ohniskové destrukce vnitřní elastické lamely a cévní okluze (*Solez et al, 2008*).

Při chronické rejekci zprostředkované protilátkami nejsou detekovány existující specifické protilátky dárce nebo protilátky generované po transplantační depozici na kapilárním endotelu. Endoteliální poranění na glomerulárních a peritubulárních kapilárách způsobují buněčnou hypertrofii, subendoteliální depozici fibrilárního materiálu, expanzi a duplikaci glomerulární bazální membrány nebo interpozici mezangiálních buněk (transplantační glomerulopatie) (*Colvin, 2007*).

6 Chemokiny

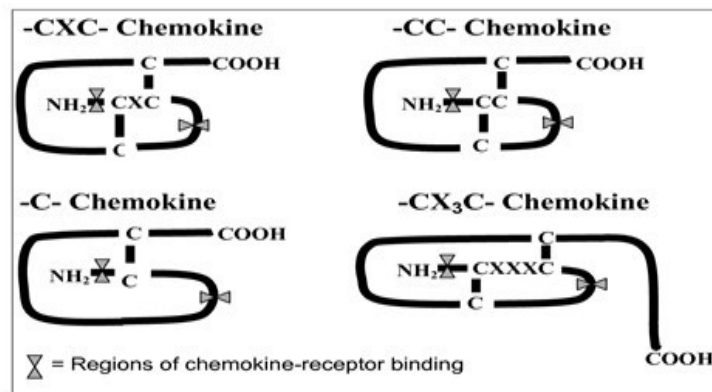
Chemokiny jsou chemotaktické cytokiny, které tvoří velmi rozsáhlou a rozmanitou skupinu vylučovaných proteinů o velikosti 8-14 kDa (*Roy et al., 2014*) a mají mnoho funkcí jednak v procesech udržujících homeostázu, ale i ve stavech zánětlivých. Jejich sekrece probíhá pomocí buněk imunitního systému, ale i nejrůznějších dalších buněk organismu. Chemoatraktivní gradient zajišťuje jednu z hlavních rolí, kterou je řízení migrace buněk do centra poškození či fyziologický přísun buněk za normálních okolností. Chemokiny mohou významně přispět jako užitečné diagnostické a prognostické biomarkery.

Chemokiny mohou být děleny do čtyř hlavních tříd rozdílných na základě rozmístění konzervovaných cysteinů na N-konci molekuly: CC, CXC, CX3C, C.

Na obrázku č.4 můžeme vidět přítomnost jedné aminokyseliny mezi prvním a druhým cysteinem u CXC chemokinů, v případě CX3C chemokinů až tři aminokyseliny. Chemokinům typu C první a třetí cystein chybí a u CC chemokinů jsou cysteiny umístěny hned vedle sebe. Většina chemokinů je ve svých účincích redundantní a promiskuitní, a proto nedostatek nějakého konkrétního chemokinu je bez problému nahrazen přebytkem jiného.

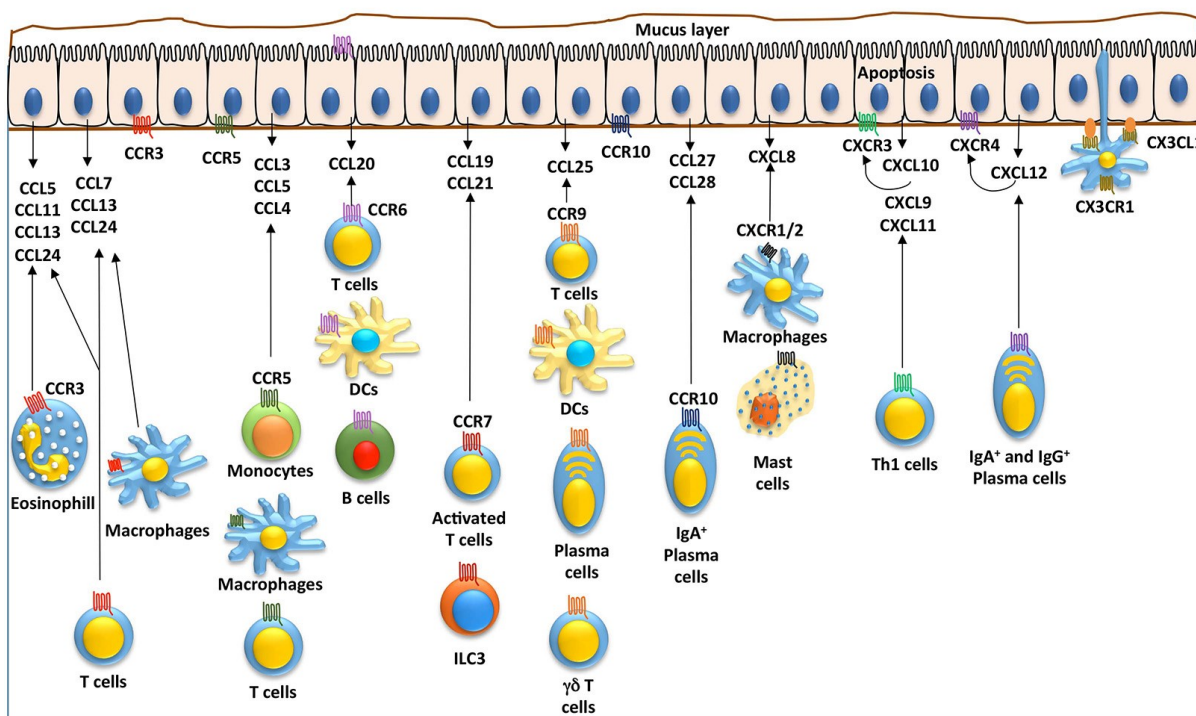
Pro vzájemné působení chemokinů s jejich receptory je velmi typické, že jeden chemokin se obvykle může vázat s celou řadou buněčných receptorů (*Colobran et al., 2007*). V tomto přehledu blíže popíší dvě hlavní početné skupiny chemokinů, a to rodinu CXC a CC.

V tabulce č.1 je znázorněné široké spektrum chemokinů s jejich receptory. Chemokinové receptory jsou zpravidla exprimovány na mnoha buněčných populacích, jak nám znázorňuje obrázek č.5.



Obrázek č.4: Strukturální odlišnosti základních skupin chemokinů.

Převzato z: Striž et al. 2015



Obrázek č.5: Chemokiny atrahující jednotlivé populace imunitních buněk.

*Převzato z: <https://atlasofscience.org/chemokines-an-answer-to-the-gut-inflammation/>,
(Kulkarni N, Pathak M, Lal G J Leukoc Biol. (2):377-394, 2017)*

Funkce cytokinů a chemokinů v renální transplantaci

Úloha cytokinů a chemokinů při transplantaci ledvin je extrémně složitá a studie prokázaly účast mediátorů souvisejících s produkcí T pomocných lymfocytů 1 (Th1) a T pomocných lymfocytů 2 (Th2). Podle Cardoni et al., v indukčním stádiu zánětlivé odpovědi k renální transplantaci, APC, aktivované T-lymfocyty a NK buňky, v přítomnosti IL-12, IL-18 a TNF- α , dochází ke zvýšení produkce Th1 buněk. V důsledku toho dochází ke zvýšení exprese genu CD-26 a LAG-2 (geny aktivace lymfocytů), CCR5 receptorů (RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3 a MIP-1 β /CCL4 receptor) a CXCR3 receptorů (IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 a MIG/CXCL9 receptor) exprimované v aktivovaných buňkách Th1. Avšak v přítomnosti IL-4, IL-10 a IL-13 dochází ke zvýšení tvorby Th2 buněk a stimulaci exprese u: CD30, CD62L (jehož exprese podporuje nábor periferních lymfoidních orgánů), CCR3 (receptor eotaxinu v eozinofilech), CCR4 (receptor TARC/CCL17, thymus a aktivačně regulovaný chemokin), MDC/CCL22 (chemokin odvozený z makrofágů, exprimovaný v T, NK a dendritických buňkách), CCR8 (I-309/CCL1 receptor, který je exprimován v T-buňkách a neutrofilech) a CXCR4 (SDF-1 α / β /CXCL12 receptor, což je faktor odvozený ze stromatu, který je exprimován v aktivovaných T-CD4 buňkách, dendritických buňkách a eozinofilech), (Cardoni et al., 2005).

6.1 Chemokinové receptory a jejich signalizace

Pro uplatnění biologických rolí chemokinů je důležitá vzájemná interakce s jejich receptory. Chemokinová signalizace je zajištěna po vazbě jejich receptoru s G-proteinem. Signalizační procesy zapříčiňují cytoskeletální změny související s migrací a pohybem buněk podél gradientů chemokinů (Wang et al., 2013). Receptory chemokinů jsou součástí rozšířené skupiny receptorů s typickou trojrozměrnou strukturou: extracelulární N-terminální doména (N-konec), úsek procházející 7×membránou, extracelulární, cytoplasmatické smyčky a karboxylová terminální doména (C-konec). N-konec spolu s extracelulárními smyčkami hraje významnou úlohu v interakci s chemokiny, zatímco C-konec se podílí na signální transdukci (Lee et al., 2014).

V dnešní době je známo okolo 25 druhů chemokinových receptorů, jež lze rozdělovat na CCR rodinu, CXCR, XCR1 a rodinu CX3CR (*Blanchet et al., 2012*). Hlavní funkcí CCR skupiny je regulace T lymfocytů, makrofágů a dendritických buněk, například v rámci patofyziologie roztroušené sklerózy (RS) nebo u rejekcí transplantovaných orgánů. Na přísunu neutrofilů, efektorových T a B buněk se převážně účastní skupina CXCR. Vzájemná souhra CXC/CXCR hraje klíčovou roli v apoptóze, buněčné proliferaci, angiogenezi, regulaci růstu nádorů a u transplantací. Kromě spřažení s G-proteinem, chemokiny také interagují s glykosaminoglykany. Mimo klasické receptory byly již popsány i tzv. atypické receptory. Jako příklad lze uvést DARC, CXCR7, DG atd. Tyto receptory sice sdílí strukturní vlastnosti s normálními chemokinovými receptory, ale nejsou schopny signální transdukce. Funkce atypických receptorů spočívá spíše v zajištění biologické dostupnosti a modulace chemokinové koncentrace (*Ulvmar et al., 2011*). Promiskuitní párování chemokinů s receptory, jakož i schopnost tvorby chemokinů různými buňkami a atrahování každé buňky celou řadou receptorů, dává tomuto systému tak pružné a přizpůsobivé podmínky.

Chemokiny a jejich receptory ve spojitosti s onemocněním ledvin a alografit rejekcí

Závažnost intersticiálního poškození dobře koreluje s funkcí ledvin a má prognostickou hodnotu pro glomerulární onemocnění (*Eddy, 2000*).

Studie dokázaly, že celkový počet intersticiálních T-lymfocytů a makrofágů koreluje s výsledkem onemocnění. Stejně tak počet chemokin receptor exprimujících, infiltrujících a zánětlivých buněk koreluje se závažností onemocnění. Počet intersticiálních CXCR3 a CCR5 pozitivních buněk (které většinou představují intersticiální infiltraci T-buněk) koreluje s renální funkcí a proteinurií v době renální biopsie při glomerulárních onemocněních (*Segeer et al., 2004*).

U pacientů s membránovou nefropatií byl počet intersticiálních CD68-pozitivních makrofágů, exprese CCL2/MCP-1 a počet intersticiálních CCR2-pozitivních buněk významně vyšší u počátečních biopsií u pacientů, u nichž došlo k rozvoji end-stage renálního onemocnění (ESRD) ve srovnání s těmi, které nevyvinuly ESRD (*Yoshimoto et al., 2004*).

U glomerulonefritidy byl CCR2 exprimován jak glomerulárními, tak i intersticiálními makrofágy ve spojení s expresí CCL2/MCP-1 vnitřními renálními buňkami a zánětlivými buňkami (*Segerer et al., 2000*).

V různých formách glomerulonefritidy byl fraktalkinový receptor CX3CR1 exprimován T-buňkami v intersticiu a makrofázích, jak v glomerulích, tak v intersticiálních infiltrátech. CXCR1 je receptor pro CXCL8/IL-8, hlavní chemoatraktant pro polymorfonukleární leukocyty (PMN) (*Murphy et al., 2000*). Exprese CXCL8/IL-8 byla popsána při glomerulárních onemocněních ve spojení s PMN infiltrací (*Segerer et al., 2000*).

CXCR1 byl exprimován glomerulárními PMN buňkami s vysokým počtem u membranoproliferativní glomerulonefritidy a lupusové nefritidy. Dále je CXCR1 exprimován vnitřními buňkami ledvin buňkami hladkého svalstva na endotelu malého počtu peritubulárních kapilár a žíldka v podocytech. Na základě ranných studií modelů srdce alograftů Hancock et al., byly provedeny studie o potenciální roli CXCR3 a odpovídajících ligandech CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10 a CXCL11/I-TAC během renálního odmítnutí aloštěpu (*Hancock, 2002*).

Panzer a kol. prokázali signifikantní zvýšení CXCR3 pozitivních buněk během akutního odhojení aloimplantátu a významnou indukci odpovídajících ligandů (*Panzer et al., 2004*).

Ve srovnání mezi humorálním a buněčným odmítnutím byla prokázána buněčná rejekce spojená s akumulací CXCR3-pozitivních buněk u renálních aloimplantátů (*Segerer et al., 2005*).

6.2 CXC chemokiny

Rodinu CXC chemokinů je možné rozdělit do dvou hlavních podtříd podle toho, zda je přítomna nebo nepřítomna glutamát-leucin-arginin varianta. Tato kombinace se obvykle vyskytuje před prvním konzervativním cysteinovým zbytkem. Jedná se o tzv. ELR-CXC chemokiny (ELR⁺ či ELR⁻). V jednom případě se ELR motiv objevuje, ve druhém nikoli.

Veškeré humánní ELR-CXC chemokiny (CXCL1-CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8) atrahují a aktivují převážně neutrofilní leukocyty do místa poškození. Tyto chemokiny mohou být prakticky exprimovány širokým spektrem buněk, ať už primárně imunitními či neimunitními, například endoteliálními či epiteliálními buňkami (*Mortier et*

al., 2011). ELR-CXC chemokin s největší schopností atrahovat právě neutrofilů je IL-8, který patří mezi první popsané zástupce ve své třídě.

6.2.1 CXCL8 (IL-8)

IL-8 se svou funkcí řadí mezi prozánětlivé chemokiny se schopností atrahovat ve velké míře převážně neutrofilní leukocyty (*Kuai et al., 2012*). Chemotaxi vykonává za pomoci svých specifických chemokinových receptorů, CXCR1 a CXCR2. Indukce tohoto chemokinu je možná díky prozánětlivým cytokinům, jako je IL-1 β , TNF- α nebo se mohou na stimulaci podílet virová a bakteriální agens (*Hwang et al., 2004*).

6.2.2 CXCL5 (ENA-78)

Epiteliální neutrofilů aktivující protein 78 se řadí mezi CXC chemokiny, má silné chemotaktické účinky a atrahuje mimo neutrofilů, také makrofágy (*Balamayooran et al., 2012*). Zvýšená sekrece ENA-78 byla pozorována v krvi a synoviální tekutině u pacientů s revmatoidní artritidou. ENA-78 a některé další chemokiny bývají hojně exprimovány ve střevní sliznici u pacientů s ulcerózní kolitidou či Crohnovou chorobou (*Walz et al., 1997*). Vysoká exprese tohoto chemokinu byla také sledována u buněk hladkého svalstva, endoteliálních a epiteliálních buněk.

6.2.3 CXCL1-3 (GRO- α , β , γ)

Hlavní funkcí GRO- α , β , γ je regulace přísunu neutrofilních leukocytů.

6.2.4 CXCL9

V poslední době se tomuto chemokinu bez ELR motivu, který je chemotaktický pro T-lymfocyty, připisuje angiostatický účinek namísto angiogenního. Podstatné je, že angiostatické chemokiny inhibují progresivní změny, například u karcinomu ovárií a díky tomu se jeví jako nadějně terapeutické cíle (*Rainczuk et al., 2012*). Původní zkratka MIG=monokine induced by interferon γ říká, že indukce CXCL9 je možná pouze prostřednictvím IFN γ . Dnes už se ví, že jeho exprese je signalizována i interakcí dsRNA s TLR3 v leukocytech nebo jinými TLR ligandy u fibroblastů (*Proost et al., 2004*).

6.2.5 CXCL10

CXCL10 neboli IP-10 (interferon γ a-induced protein 10) je významná signální molekula, která je převážně zaměřena na regulaci přísunu aktivovaných T-buněk v rámci imunitních reakcí. CXCL10 je důležitý polarizační faktor pro prozánětlivou fenotypovou odpověď Th1 (*Gangur et al., 1998*). CXCL10 plní své biologické funkce prostřednictvím chemokinového receptoru CXCR3. Z názvu již vyplývá, že indukce tohoto chemokinu je zajištěna IFN γ . Tento chemokin z rodiny CXC je již i klinicky potvrzen jako významný biomarker v transplantační medicíně (*Romagnani et al., 2012*). Pleiotropní charakter této molekuly poskytuje schopnost vysoké chemotaktické aktivity, regulace růstu a proliferace buněk, indukce apoptózy a angiogeneze u infekčních a zánětlivých onemocnění a u rakoviny. (Rozšíření terapeutických obzorů je podmíněno dalším budoucím poznáním.)

6.2.6 CXCL11

Další představitel CXC chemokinové rodiny je CXCL11. Tento chemokin interaguje s vyšší afinitou s chemokinovým receptorem CXCR3, než je tomu i jiných ligandů pro tento receptor. CXCL11 neboli I-TAC (IFN- γ -inducible T-cell chemoattractant) se kromě CXCR3 váže i na receptor CXCR7. Při této vazbě ale nedochází k indukci klasické signální dráhy (buněčná migrace, tok vápníku).

Prvně byl CXCL11 objeven v astrocytech, později se ukázala jeho indukce v celé řadě buněčných typů, včetně bazálních keratinocytů, buněk endotelu, bronchiálních epitelálních buňkách atd. Chemokin CXCL11 sdílí svůj receptor CXCR3 ještě s dalšími chemokiny, CXCL9 a CXCL10. Pro celé trio platí, že regulují přísun hlavně efektorových T-buněk (*Cole et al., 1998*). Mnohostranné vlastnosti dvojice CXCL11/CXCR3 se uplatňují v nesčetných chorobných stavech. Další pozornost zaměřená na funkce tohoto chemokinu by mohla přinést nové potencionální terapeutické využití.

6.2.7 CXCL12

Tento homeostatický chemokin má velmi široký biologický záběr. Mezi jeho funkce patří přísun zralých T a B-lymfocytů a regulace migrace hemopoetických kmenových buněk z kostní dřeně. Synonymem pro tento chemokin je SDF-1 (Stromal cell derived factor-1) a všechny izoformy vznikají alternativním sestřihem. Interakce CXCL12 s receptorem CXCR4 je asociována s mnoha nemocemi, jako jsou nádory, astma nebo

infekce HIV. Receptor CXCR4 je zároveň i koreceptor pro virus HIV a je vůbec nejhojnějším chemokinovým receptorem u mnoha typů rakoviny. Dále byla také vysoká exprese CXCR4 spojena s velmi špatnou prognózou pacientů s hepatocelulárním karcinomem (HCC). Některé studie ukazují, že u CXCL12/CXCR4 knockout myši dochází k embryonální letalitě, což opět potvrzuje zřetelný biologický význam (angiogeneze, vývoj orgánů, imunitní regulace,...) tohoto chemokin-receptorového páru (*Colobran et al., 2007*).

6.2.8 CXCL13

CXCL13 chemokin též zvaný BLC (B lymphocyte chemoattractant) je důležitý pro rozvoj lymfoidních orgánů. Pomocí receptoru CXCR5 plní své specifické funkce a podílí se zejména na organizování folikulárních B-buněk a germinálních center. Jelikož GC Tfh buňky (germinal center CD4⁺ T follicular helper) dokáží produkovat CXCL13, bylo zkoumáno případné využití tohoto chemokinu jako krevního markeru pro určení aktivity germinálních center (*Daughton et al., 2016*).

Za hlavní buněčný zdroj CXCL13 v lymfoidních orgánech jsou považovány folikulární dendritické buňky (FDC) (*Vermi et al., 2008*). Kromě biologického významu exprese CXCL13, je třeba zmínit i možnost další potenciální terapie v podobě látek namířených proti CXCL13.

6.2.9 CXCL14

Tento relativně nový chemokin převážně zajišťuje stimulaci migrace imunitních buněk a svou úlohu také plní v antimikrobiální imunitě. Jeho široké zastoupení je sledováno v normální tkáni, především v epitelu. CXCL14 je též známý pod názvem BRAK (breast and kidney-expressed chemokine) a jak pojmenování napovídá, původní identifikace proběhla v prsu a ledvinných buňkách. Signální dvojici tvoří s receptorem CXCR4 a díky tomu může potlačit CXCL12 indukovanou migraci THP-1 buněk a CD34⁺ lidských buněk kostní dřeně. Nová studie Witte A. et al poprvé ukazuje, že krevní destičky exprimují vysoký počet CXCL14. Zmiňuje také silný efekt CXCL14, odvozeného od destiček, na endoteliální migraci a monocyty (*Witte et al., 2017*).

6.3 CC chemokiny

Tato pestrá rodina chemokinů se uplatňuje v procesech zánětlivých nebo za normálních homeostatických podmínek. CC chemokiny jsou chemoatraktanty pro celou řadu buněk imunitního i neimunitního původu a jejich tvorbu obstarává široké spektrum buněk. Pro dobrou srozumitelnost se tato skupina dělí na prozánětlivé CC chemokiny (CCL1-5, CCL7-8, CCL11, CCL13, CCL23-24, CCL26), CC chemokiny udržující homeostázu (CCL14-16, CCL18, CCL25, CCL27, CCL28) a homeostatické CC chemokiny indukované během poškození (CCL17, CCL19-22).

Produkce prozánětlivých CC chemokinů atrahujících hlavně T-buňky, monocyty a eosinofilní leukocyty obvykle nastává až po ELR-CXC chemokinech, které přitahují v první řadě neutrofilní leukocyty. Prozánětlivé CC chemokiny vykonávají své specifické funkce nejčastěji ve spolupráci s receptory CCR2, CCR3 a CCR5.

Vzhledem k množství chemokinů spadajících do této chemokinové rodiny, k doplnění informací jsem vybrala pouze ty, se kterými jsem se ve své prozatimní praxi setkala nejvíce.

6.3.1 CCL2 (MCP-1)

MCP-1 představuje klíčový chemokin, který převážně reguluje migraci a infiltraci monocyto/makrofágové linie. MCP-1 se s vysokou afinitou váže na receptor CCR2, který je exprimován velkým počtem buněk. Díky svým chemotaktickým vlastnostem a atrahování monocytů a T-lymfocytů do štetu, se výrazně podílí i na odmítnutí transplantátu. Zjistilo se, že terapie pomocí MCP-1 může být zajímavou léčebnou strategií při hojení diabetických ran (*Wood et al., 2014*).

6.3.2 CCL4 (MIP-1 β)

MIP-1 β využívá k plnění svých biologických funkcí receptor CCR5. Tento receptor je současně i koreceptor pro vstup viru HIV do buňky. MIP-1 β řídí migraci CD8⁺ T-buněk a monocytů do místa zánětu. Kromě schopnosti chemotaxe, mezi další funkce tohoto chemokinu patří schopnost indukovat degranulaci žírných buněk, aktivaci NK buněk a uvolňování prozánětlivých cytokinů. Značné zvýšení exprese MIP-1 β v CD8⁺ a CD4⁺ T-buňkách v místě poškození bylo prokázáno u pacientů se sarkoidózou (*Barczyk et al., 2014*).

6.3.3 CCL5 (RANTES)

Mnoho studií potvrzuje významnou roli RANTES při podporování imunitní reakce ve směru CD8⁺ T buněk během imunitní odpovědi u celé řady chorob. Receptor CCR5 spřažený s G-proteinem tvoří s tímto chemokinem hlavní interakční dvojici. Atrahování T-lymfocytů, monocytů a dalších nejrozličnějších buněčných typů je zajištěno i v případě párů CCL5/CCR1, CCR3. Zjistilo se, že RANTES představuje slibný terapeutický efekt pro léčbu cévní dysfunkce u hypertenze (*Mikolajczyk et al., 2016*). Na jaře tohoto roku byla vydána publikace, která ukazuje signifikantní korelaci mezi hladinou RANTES během 24 hodin po zranění a časnou úmrtností u pacientů s traumatickým poraněním mozku (*Albert et al., 2017*).

Tabulka č.1: Chemokiny a jejich receptory. *Převzato z: Stříž et al. 2015*

Označení	Původní jméno	Chromozom	Receptor
CCL chemokiny			
CCL1	I-309	17q11.2	CCR8
CCL2	MCP-1	17q11.2-q21.1	CCR2, CCR3, DARC, CCBP2
CCL3	MIP-1 α	17q12	CCR1, CCR5, CCBP2
CCL4	MIP-1 β	17q21-q23	CCR5, CCBP2
CCL5	RANTES	17q11.2-q12	CCR1, CCR3, CCR5, DARC, CCBP2, CCRL2
CCL6	jen u hlodavců	lidský nepopsán	u myši vazba na CCR1
CCL7	MCP-3	17q11.2-q12	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, DARC, CCBP2
CCL8	MCP-2	17q11.2	CCR2, CCR3
CCL9	MIP-1g	11q14.1	CCR1
CCL10	je identický s CCL9		název CCL10 se proto již nepoužívá
CCL11	Eotaxin	17q21.1-q21.2	CCR3, CCR5, DARC, D6
CCL13	MCP-4	17q11.2	CCR2, CCR3, CCR5, DARC, CCBP2
CCL14	HCC-1	17q11.2	CCR1
CCL15	HCC-2	17q11.2	CCR1, CCR3, DARC
CCL16	MIP-1d; HCC-4	17q11.2	CCR1
CCL17	TARC	16q13	CCR4, DARC, CCBP2
CCL18	PARC	17q11.2	CCR8, DARC
CCL19	MIP-3 β	9p13	CCR7, CCRL1, CCRL2
CCL20	MIP-3 α	2q33-q37	CCR6
CCL21	6Ckine	9p13	CCR7, CCRL1
CCL22	MDC	16q13	CCR4, DARC, CCBP2
CCL23	MPIF-1	17q11.2	CCR1, FPR2
CCL24	Eotaxin-2	7q11.23	CCR3
CCL25	TECK	19p13.2	CCR9, CCRL1
CCL26	Eotaxin-3, MIP-4 α	7q11.2	CCR3
CCL27	CTACK	9p13	CCR10
CCL28	MEC	5p12	CCR3, CCR10
CXC chemokiny			
CXCL1	GRO- α	4q13.3	CXCR2, DARC
CXCL2	GRO- β	4q13.3	CXCR2, DARC
CXCL3	GRO- γ	4q13.3	CXCR2, DARC
CXCL4	PF4	4q13.3	CXCR3
CXCL5	ENA-78	4q13.3	CXCR2, DARC
CXCL6	GCP-2	4q13.3	CXCR1, CXCR2, DARC
CXCL7	NAP-2	4q13.3	CXCR2, DARC
CXCL8	IL-8	4q13.3	CXCR1, CXCR2, DARC
CXCL9	MIG	4q21.1	CXCR3
CXCL10	IP10	4q21.1	CXCR3
CXCL11	I-TAC	4q21.1	CXCR3, CXCR7, DARC
CXCL12	SDF-1 α	10q11.1	CXCR4, CXCR7
CXCL13	BCA-1	4q21.1	CXCR5
CXCL14	BRAX	5q31	?
CXCL16	SR-PSOX	17p13.2	CXCR6
CXCL17	DMC	19q13.2	?
XC chemokiny			
XCL1	Lymphotactin	1q23	XCR1
XCL2	SCM-1 β	1q24.2	XCR1
CX3C chemokiny			
CX3CL1	Fractalkine	16q13	CX3CR1
Další cytokiny ovlivňující migraci buněk			
MIF	Macrophage migration inhibitory factor	22q11.23	CXCR2, CXCR4; CXCR7, CD74
IL-16	T cell chemoattractant	15q26.1-3	CD4

7 Cíle práce

- Posouzení efektu TNF- α na uvolnění chemokinů z buněk renálního epitelu a linie lidských monocytů
- Sledování sérových hladin chemokinů u pacientů s transplantovanou ledvinou

8 Materiál a metody

8.1 Tkáňové kultury: RA, RPTEC a THP-1

K našim experimentům byly využity nádorové linie ledvinových buněk (RA-renal adenocarcinoma epithelial cell) (American Tissue Culture Collection, Manassas, Virginie, USA), primární linie ledvinových buněk (RPTEC-human renal proximal tubule epithelial cell) (BioWhittaker Inc., Walkersville, Maryland, USA) a THP-1 myeloidní buněčné linie (American Tissue Culture Collection, Manassas, Virginie, USA).

8.2 Rozmražení adherentních buněčných linií RA a RPTEC

Buňky jsou uchovávány v tekutém dusíku při -180 °C.

1. Příprava 20 % FBS (GIBCO, Gaithersburg, Maryland, USA) + IMDM média (Life technologies TM, Carlsbad, California, United States)
2. po rozmražení se celý obsah ampule přepipetuje do centrifugační zkumavky (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
3. pomalu se přikapávají 2 ml připraveného rozmrazovacího média
4. dále se zvolna doplní médiem do 20 ml
5. centrifugace 5 minut při 300 g
6. resuspendace buněk v 10 % FBS + IMDM médiu
7. odebrání vzorku na změření počtu a viability buněk
8. přenesení buněk do kultivační lahve (Corning Inc., Corning, New York, USA)
9. uložení do termostatu 37 °C s 5 % CO₂. (Sanyo Electric, Osaka, Japonsko)

8.3 Pasážování adherentních buněčných linií RA a RPTEC

1. Odlepení buněk pomocí trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) + škrabkou
2. přepipetování buněk do centrifugační zkumavky
3. přidání FBS pro deaktivaci EDTA (1:1)
4. centrifugace 5 minut při 300 g
5. resuspendace buněk v 10 % FBS + IMDM médiu
6. odebrání vzorku na změření počtu a životnosti buněk
7. přenesení buněk do kultivační lahve, uložení do termostatu 37 °C s 5 % CO₂.

8.4 Tkáňové kultury: THP-1

Tato lidská leukemická buněčná linie byla izolována z krve chlapce s akutní monocystickou leukemií. THP-1 buněčné linii chybí povrchové či cytoplazmatické imunoglobuliny, avšak charakteristickým znakem je přítomnost C3b a Fc receptorů (*Tsuchiya et al., 1980*). THP-1 buňky po rozdělení na makrofágy mohou polarizovat do fenotypu M1 inkubací s LPS a IFN- γ . Do fenotypu M2 je tomu tak inkubací s IL-4 nebo IL-13 (*Genin et al., 2015*). Pro práci v laboratoři je výhodou, že neadherují k povrchu kultivační nádoby, ale rostou v suspenzi.

8.5 Rozmražení buněčných linií THP-1

Buňky jsou uchovávány v tekutém dusíku při -180 °C

1. Ampule s buňkami se ponoří do vodní lázně
2. po rozmražení se po kapkách přidává RPMI médium (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), které obsahuje glutamin a 20% FBS, do celkového objemu 20 ml
3. centrifugace 5 minut při 300 g

4. po odsátí supernatantu se buněčná peleta roztřepe a přidá se 20 ml kultivačního média (RPMI 1640 médium obsahující 2mM L-glutamin, 10% FBS, 1% streptomycin a 1% penicilin) (GIBCO, Gaithersburg, Maryland, USA)
5. centrifugace 5 minut při 300 g
6. resuspendace buněk v kultivačním médiu
7. přenesení buněk do kultivační lahve, uložení do termostatu 37 °C s 5 % CO₂.

8.6 Pasážování buněčných linií THP-1

1. Buňky se přenesou do centrifugační zkumavky
2. centrifugace 5 minut při 300 g
3. po slítí supernatantu se buněčná peleta roztřepe a přidá se čerstvé kultivační médium
4. odebere se vzorek na změření počtu a životnosti buněk
5. buňky se udržují cca o koncentraci $2-9 \times 10^5$ buněk/ml v termostatu při 37 °C s 5 % CO₂.

8.7 Příprava buněčných linií THP-1 k pokusu

1. Buňky se přenesou do centrifugační zkumavky
2. centrifugace 5 minut při 300 g
3. po slítí supernatantu se buněčná peleta roztřepe a přidá se čerstvé kultivační médium
4. odebere se vzorek na změření počtu a životnosti buněk
5. koncentrace buněk pro experimenty byla 1×10^6 buněk/ml
(k tomuto účelu sloužil buněčný analyzátor Vi-CELL XR (Beckman Coulter, Indianapolis, Indiana, USA))

9 Metodika

9.1 Stanovení koncentrace chemokinů metodikou Luminex

Tato metoda byla použita ke stanovení koncentrace chemokinů po stimulaci RA buněk, RPTEC buněk a THP-1 buněk prozánětlivým cytokinem (TNF- α) (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). Dále sloužila ke stanovení hladin chemokinů u pacientů transplantovaných v IKEMu v letech 2011-2013 v časech před transplantací (Tx), 7. den po Tx, 14. den po Tx, 21. den po Tx, 1 měsíc po Tx, 2 měsíce po Tx, 3 měsíce po Tx, 6 měsíců po Tx, 12 měsíců po Tx.

K práci byl využit komerční kit Human Luminex Performance Assay Base Kit, Panel A.

Zpočátku byly rozmrazeny kontrolní i stimulované supernatanty nebo séra pacientů. Dále byl připraven promývací roztok (20 ml wash buffer + 480 ml destilované vody) a kalibrátor (20 ml Calibrator Diluent RD5K byl dán do 20 ml destilované vody). V následujícím kroku byly připraveny standardy podle dodané karty (ředění Standard 1, 2 hotovým Calibrator Diluent RD5K). Do zkumavek byla dále připravena kalibrační řada, u které jako blank (S0) byl použit hotový Calibrator Diluent RD5K, S1-300 μ l Calibrator Diluent RD5K + 100 μ l Standard Coctail 1+100 μ l Standard Coctail 2, S2-S7-200 μ l Calibrator Diluent RD5K. Ze zkumavky S1 bylo přeneseno do zkumavky S2 100 μ l roztoku, S2 do S3 a pak byl roztok přenášen až do zkumavky S7. Dále bylo nutné připravit mikropartikule (na každou jamičku bylo počítáno 50 μ l Micropartikule Diluent+5 μ l Micropartikule IL). Mikrotitrační destička měla membránu, kterou bylo potřeba navlhčit (100 μ l promývacího roztoku do každé jamičky) a následně promývací roztok odsát na odsávače. Potom byly do destičky napipetovány standardy i vzorky (50 μ l). K těmto standardům i vzorkům byly přidány připravené mikrokuličky (50 μ l). Destička byla přikryta stříbrnou fólií a vše bylo inkubováno tři hodiny při laboratorní teplotě (na třepače). Tou dobou byl připraven Biotin Antibody Coctail (na každou jamičku bylo počítáno 50 μ l Antibody Diluent+5 μ l Biotin Antibody Concentrate IL). Po tříhodinové inkubaci bylo vše 3x promyto. Potom byl napipetovaný hotový Biotin Antibody Coctail. Opět došlo k inkubaci po dobu jedné hodiny při laboratorní teplotě (na třepače). Jeden z posledních kroků byl v přípravě streptavidin-PE (na každou jamku bylo počítáno 50 μ l promývacího roztoku + 5 μ l streptavidin-PE). Po hodinové inkubaci bylo vše 3x promyto. Všude byl přidán připravený streptavidin-PE (50 μ l) a inkubován půl hodiny při laboratorní teplotě. Opět bylo vše 3x promyto promývacím roztokem. Nakonec byly

vzorky resuspendovány v promývacím roztoku a byly přepipetovány do destičky, která byla měřena. Vlastní měření probíhalo na přístroji Luminex® 100TM (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA).

9.2 Stimulace buněk pomocí TNF- α

9.2.1 Stimulace RA buněk pomocí TNF- α

1. Narostlá monovrstva RA buněk do 6-jamkové destičky (Corning Inc., Corning, New York, USA).
2. Jamky s monovrstvou promyty IMDM bez FBS (2x po 1 ml). Opatrně, aby se neporušila monovrstva.
3. Buňky stimulovány TNF- α o konečné koncentraci 10 ng/ml
4. Pipetováno 2 ml média, média s TNF- α
5. Po 24 hodinách odebrání a stočení supernatantů a zamraženo - triplety - použity na Luminex

9.2.2 Stimulace RPTEC buněk pomocí TNF- α

1. Narostlá monovrstva RPTEC buněk do 6-jamkové destičky.
2. Jamky s monovrstvou promyty IMDM bez FBS (2x po 1 ml). Opatrně, aby se neporušila monovrstva.
3. Buňky stimulovány TNF- α o konečné koncentraci 10 ng/ml
4. Pipetováno 2 ml média, média s TNF- α .
5. Po 24 hodinách odebrání a stočení supernatantů a zamraženo - triplety - použity na Luminex

9.2.3 Stimulace THP-1 buněk pomocí TNF- α

1. Příprava THP-1 buněk o koncentraci $1 \cdot 10^6$ bb/ml. Buňky naředěny v médiu RPMI na koncentraci dle Vi-cell $0,95 \cdot 10^6$ bb/ml o životnosti 90,6 %.
2. Příprava média RPMI s TNF- α o $c = 10$ ng/ml (potřeba 9 ml respektive 12 ml).

Výpočet: $V = (10 \cdot 12\ 000) / 10\ 000$

$$V = 12\ \mu\text{l}$$

3. Pipetováno do 6-ti jamkové destičky 2 ml média s THP-1, média s THP-1+TNF- α .
4. Po 24 hodinách odebrání a stočení supernatantů a zamraženo - tripletly - použity na Luminex.

9.2.4 Metodika barvení CD54

Povrchové znaky

Ke sledování povrchových znaků na buňkách je třeba využít specifické monoklonální protilátky, které jsou značeny fluorescenční značkou a během inkubace se váží na receptor. Jako negativní buňky jsou vyhodnoceny ty, které na svém povrchu nemají sledovaný antigen. Pozitivní buňky jsou ty, které nesou sledovaný antigen. V závěru se vyhodnotí procentuální výskyt v negativních/pozitivních buňkách nebo denzita exprimovaného receptoru na povrchu buňky (*Shapiro, 2005*).

Pro sledování stimulace byl zvolen povrchový znak CD54. K určení byla použita monoklonální protilátka anti-CD54 FITC (Beckman Coulter).

Nejprve byly kontrolní buňky a buňky s TNF- α dle vypočítaného množství napipetovány do kultuviční destičky. Následně probíhala inkubace 24 h při 37°C v 5% CO₂. Potom se do každé zkumavky napipetovalo 10 μl anti-CD54 FITC a 100 μl buněčné suspenze. Poté proběhla inkubace po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci se přidal 1 ml ředícího roztoku. K měření byl využit průtokový cytometr Cyan ADP 9C.

9.2.5 Charakteristika souboru pacientů

V této diplomové práci byly sledovány sérové hladiny chemokinů u pacientů s transplantovanou ledvinou. Soubor pacientů tvořil 39 mužů ve věku od 24 do 71 let a 14 žen ve věku od 25 do 76 let. Byli transplantováni v IKEMu v letech 2011-2013 v časech před transplantací (Tx), 7. den po Tx, 14. den po Tx, 21. den po Tx, 1 měsíc po Tx, 2

měsíce po Tx, 3 měsíce po Tx, 6 měsíců po Tx a 12 měsíců po Tx. Z tohoto souboru mělo 18 pacientů rejekci. Typy léčby použité při léčbě transplantovaných pacientů byly standardní nebo indukční. Standardní léčba se skládá z takrolimusu, mykofenolátu mofetilu a kortikosteroidů. Indukční léčba probíhala u rizikových pacientů, například u těch, kteří měli přítomnost alospecifických protilátek. Podával se anti-thymoglobulin (ATG) nebo basiliximab (anti-CD25).

10 Statistika

V rámci statistického zpracování byla provedena popisná statistika i testování hypotéz. Hladiny chemokinů byly číselně popsány pomocí průměru, směrodatné odchylky, mediánu, minima a maxima a graficky pomocí vícenásobných krabicových grafů.

U některých chemokinů byly naměřeny extrémní hodnoty, což znemožnilo jejich zobrazení v grafu při použití klasického lineárního měřítka. Místo něj bylo použito měřítko logaritmické. Testování hypotéz bylo provedeno na základě p-hodnoty s hladinou významnosti 0,05. Srovnání hladiny chemokinů u dvou typů léčby bylo provedeno pomocí dvouvýběrových testů. Volba konkrétního dvouvýběrového testu byla provedena na základě výsledků testování jejich předpokladů, konkrétně normálního rozdělení a homogenity rozptylu. Předpoklad normálního rozdělení byl testován pomocí *Shapiro-Wilkova testu*, předpoklad homogenit rozptylu pomocí *Levenova testu*.

Pokud data splňovaly předpoklady normality i homogenity, byl použit *dvouvýběrový t-test*. Vzhledem k přítomnosti extrémních hodnot a asymetrie dat byl předpoklad normálního rozložení splněn zřídka. V případě, že nebyl splněn předpoklad normality a nebyl splněn předpoklad homogenity, byl použit *Mann-Whitneyho test*. Pokud nebyl splněn žádný z předpokladů normality a homogenity, byl použit *mediánový test*.

U všech dvouvýběrových testů p-hodnota nižší než 0,05 indikovala prokázání statisticky významného rozdílu.

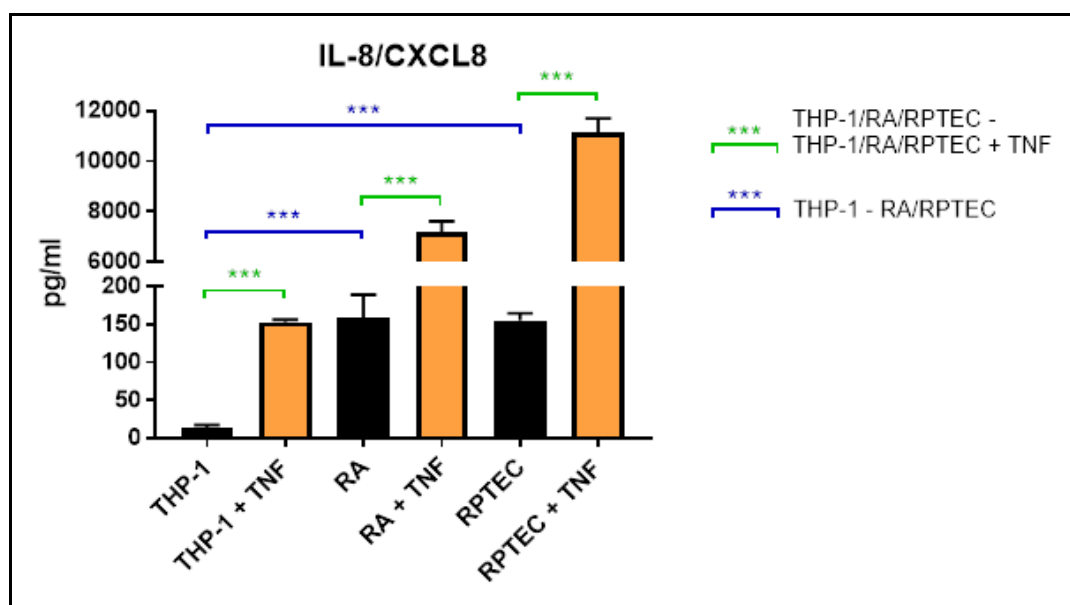
Výsledky byly vypočteny a grafy vytvořeny ve statistickém programu STATISTICA 12 CZ a GraphPad Prism 7.

11 Výsledky

11.1 Efekt prozánětlivého cytokinu TNF- α na produkci chemokinů

11.1.1 Produkce IL-8/CXCL8 linií buněk THP-1, RA a RPTEC

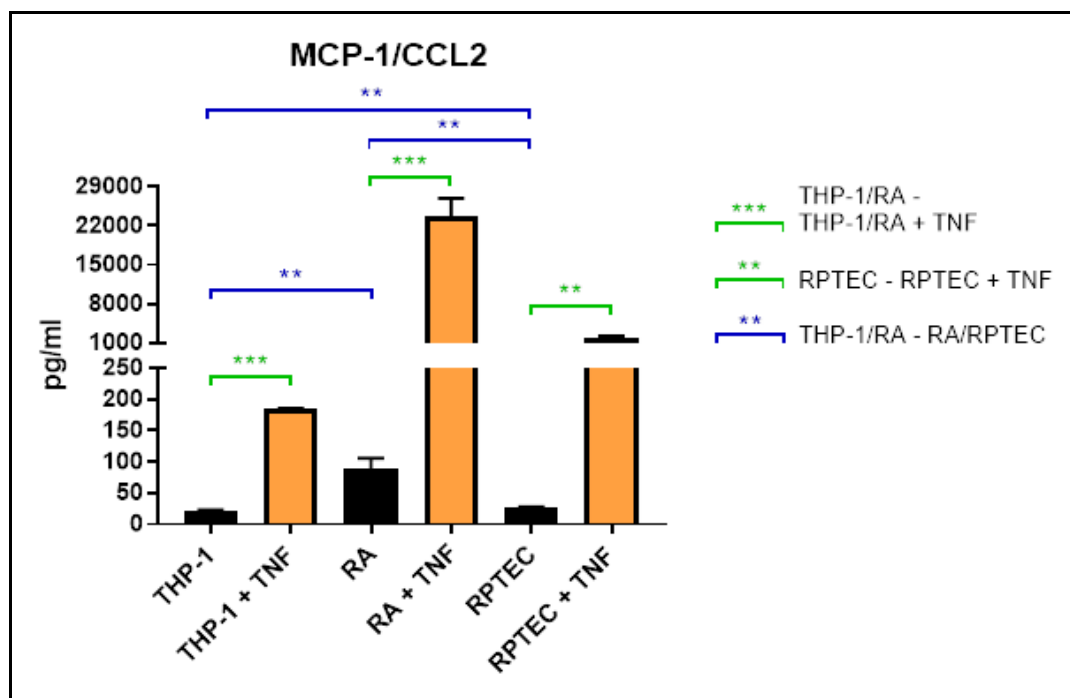
Byla porovnávána produkce IL-8 u stimulovaných a nestimulovaných buněčných linií THP-1, RA a RPTEC. Ke stimulaci byl použit cytokin TNF- α . Produkce IL-8 byla významně vyšší u primárních renálních epiteliálních buněk než u monocytární buněčné linie, a to u stimulovaných i nestimulovaných (graf č.1).



Graf č.1: Efekt prozánětlivého cytokinu TNF- α na produkci IL-8/CXCL8 linií buněk THP-1, RA a RPTEC. Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní. Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

11.1.2 Produkce MCP-1/CCL2 linií buněk THP-1, RA a RPTEC

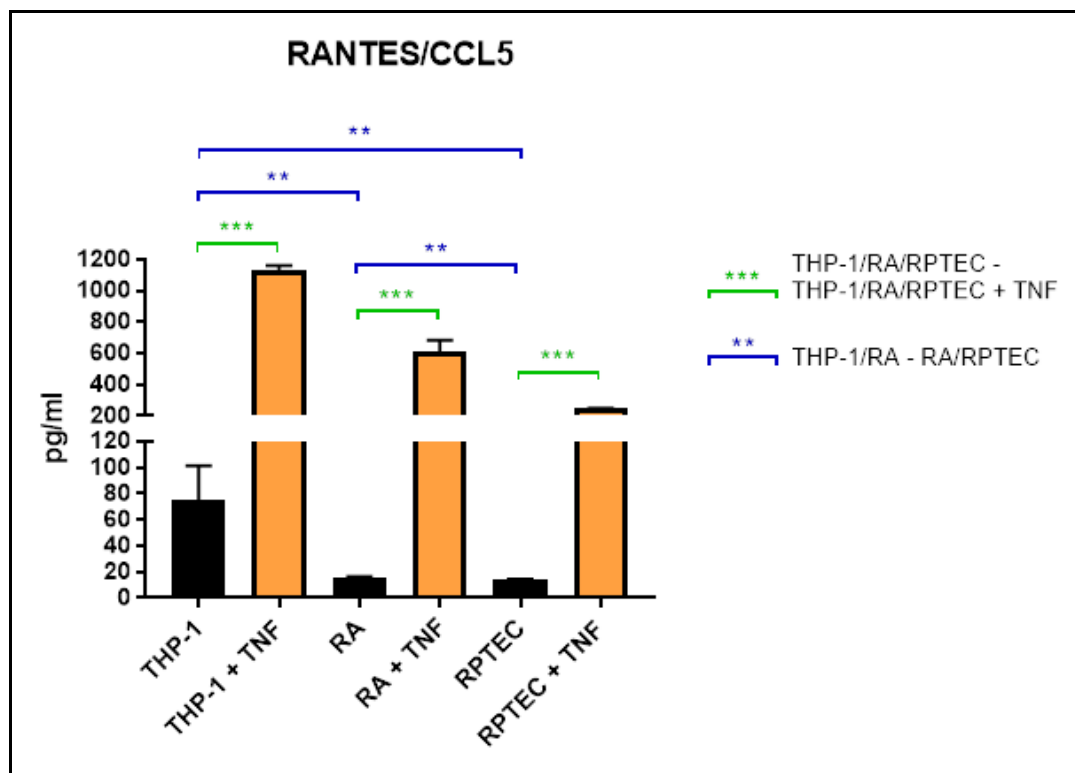
Produkce MCP-1 byla významně vyšší u nestimulovaných RA buněk oproti liniím THP-1 buněk a RPTEC. Po stimulaci byla největší produkce u RA. Stimulace obecně zvyšovala produkci u všech buněčných linií (graf č.2).



Graf č.2: Efekt prozánětlivého cytokinu TNF- α na produkci MCP-1/CCL2 linií buněk THP-1, RA a RPTEC. Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní. Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

11.1.3 Produkce RANTES/CCL5 linií buněk THP-1, RA a RPTEC

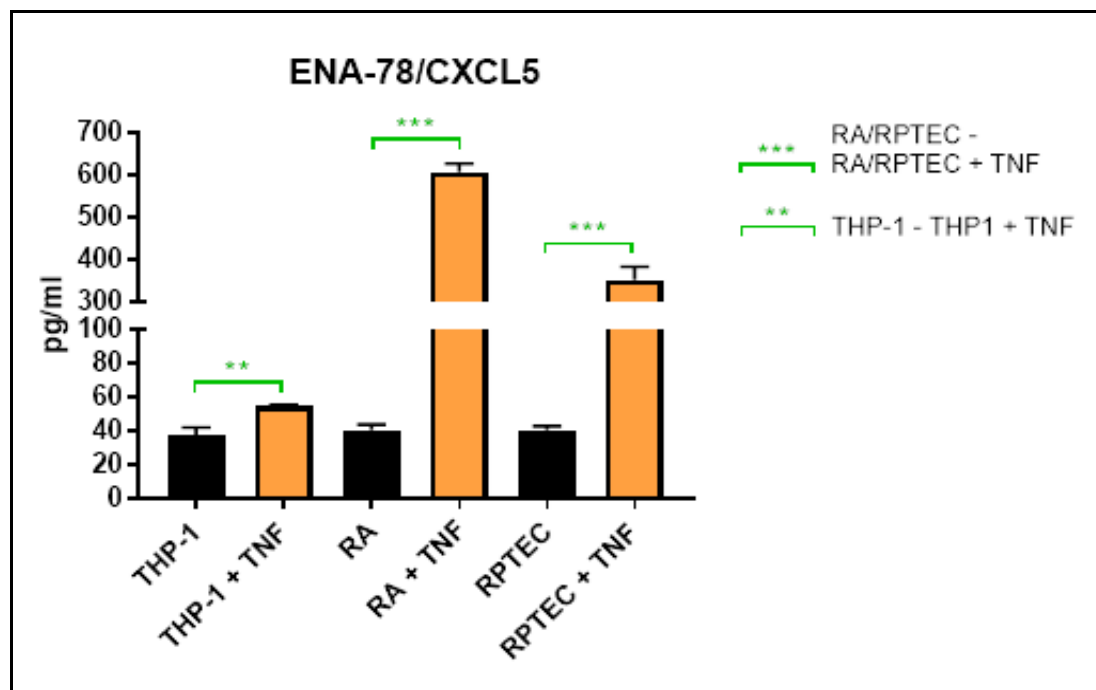
Nestimulované THP-1 mají vyšší produkci RANTES než epiteliální linie. Po stimulaci byla nejvyšší produkce u THP-1. Stimulace obecně zvyšovala produkci u všech buněčných linií (graf č.3).



Graf č.3: Efekt prozánětlivého cytokinu TNF- α na produkci RANTES/CCL5 linií buněk THP-1, RA a RPTEC. Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní. Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

11.1.4 Produkce ENA-78/CXCL5 linií buněk THP-1, RA a RPTEC

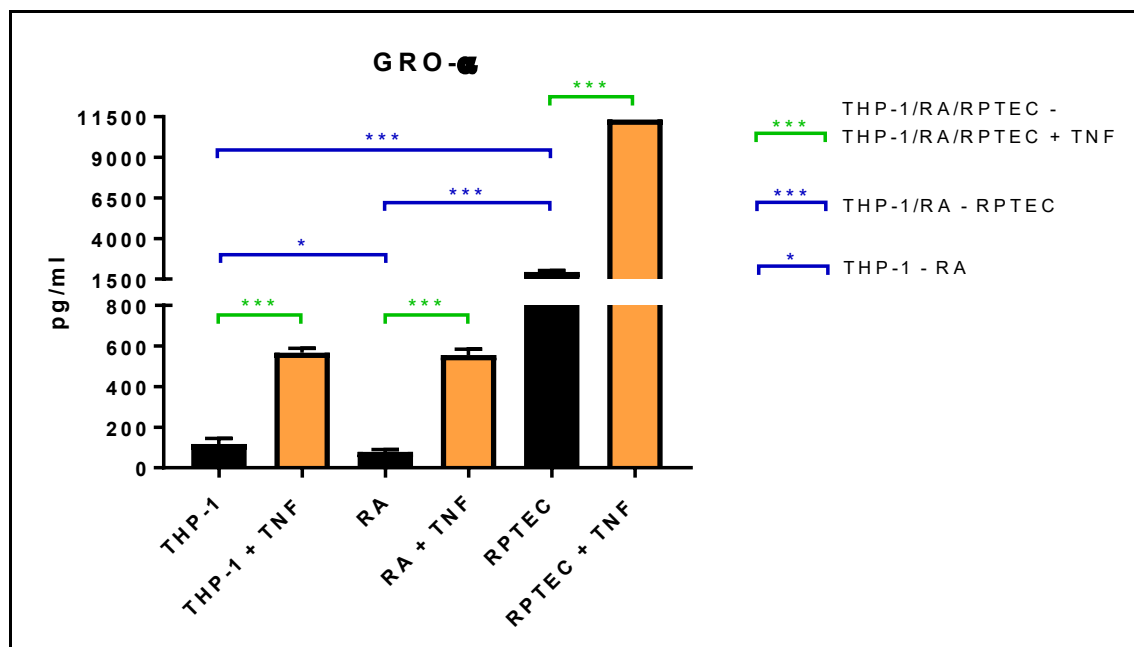
Všechny linie produkují ENA-78 i v nestimulovaném stavu. Po stimulaci TNF- α byla největší produkce zaznamenána u RA buněk. Stimulace výrazněji zvyšovala produkci u RA a RPTEC buněk (graf č.4).



Graf č.4: Efekt prozánětlivého cytokinu TNF- α na produkci ENA-78/CXCL5 linií buněk THP-1, RA a RPTEC. Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní. Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

11.1.5 Produkce GRO- α linií buněk THP-1, RA a RPTEC

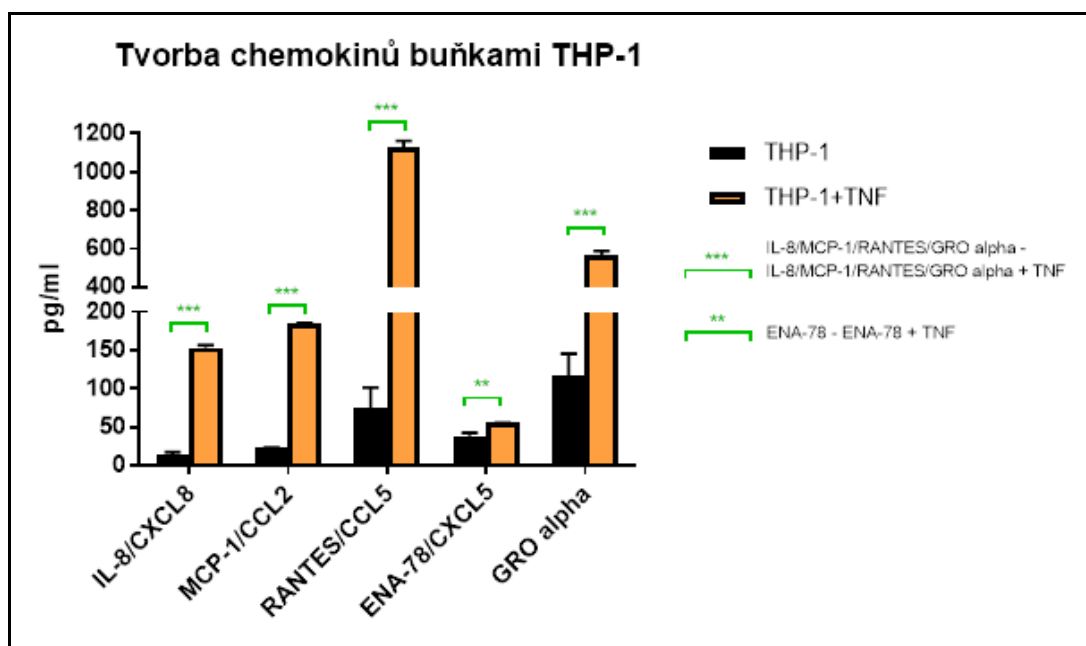
Linie RPTEC produkuje GRO- α i v nestimulovaném stavu oproti ostatním liniím. Po stimulaci byla produkce GRO- α významně vyšší u všech buněčných linií. Zvýšená produkce byla zaznamenána u stimulovaných RPTEC (graf č.5).



Graf č.5: Efekt prozánětlivého cytokinu TNF- α na produkci GRO- α linií buněk THP-1, RA a RPTEC. Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní. Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

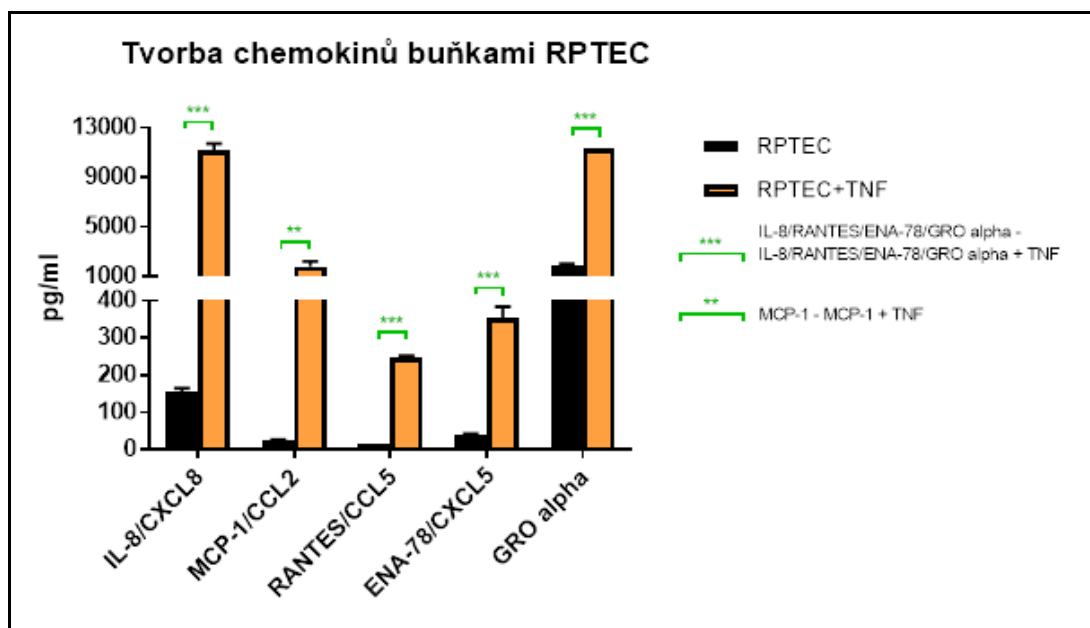
11.2 Tvorba chemokinů jednotlivými buňkami

U nestimulované buněčné linie THP-1 byla zaznamenána nejvyšší produkce GRO- α a RANTES. Po stimulaci byla zvýšená tvorba všech měřených chemokinů (graf č.6).



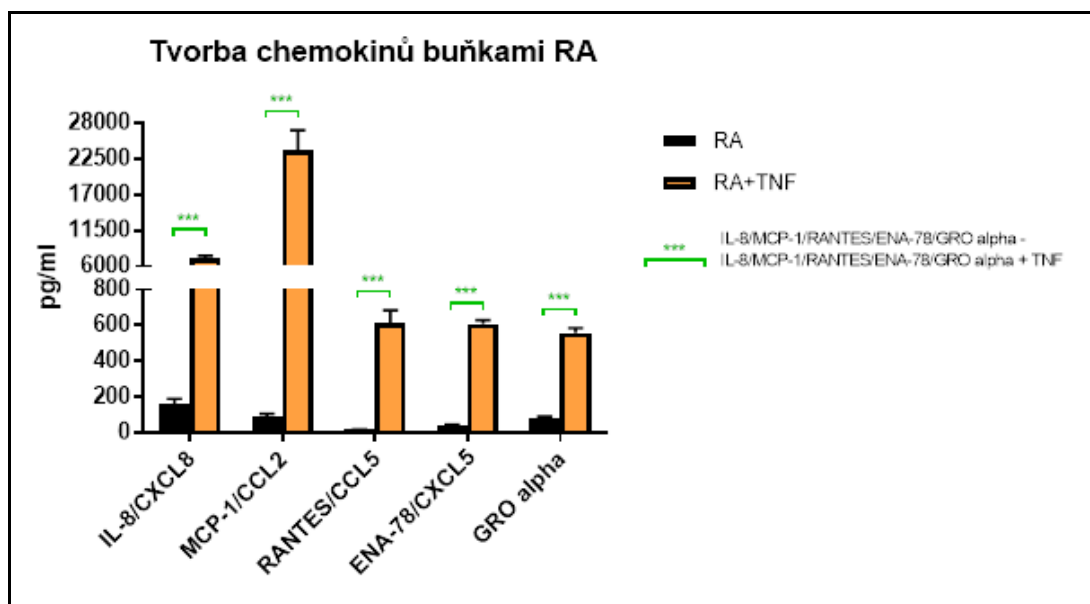
Graf č.6: Tvorba chemokinů buňkami THP-1. Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní. Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

U nestimulovaných RPTEC byla zaznamenána zvýšená produkce GRO- α a IL-8. Po stimulaci byla zjištěna zvýšená produkce u všech měřených chemokinů (graf č.7).



Graf č.7: Tvorba chemokinů buňkami RPTEC. Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní. Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

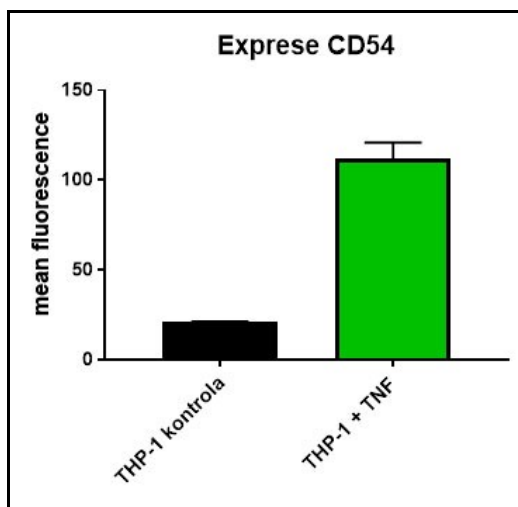
U nestimulovaných RA byla zaznamenána nejvyšší produkce IL-8. Po stimulaci byla zjištěna zvýšená produkce u všech měřených chemokinů. Významně nejvyšší byla u MCP-1 (graf č.8).



Graf č. 8: Tvorba chemokinů buňkami RA. Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní. Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

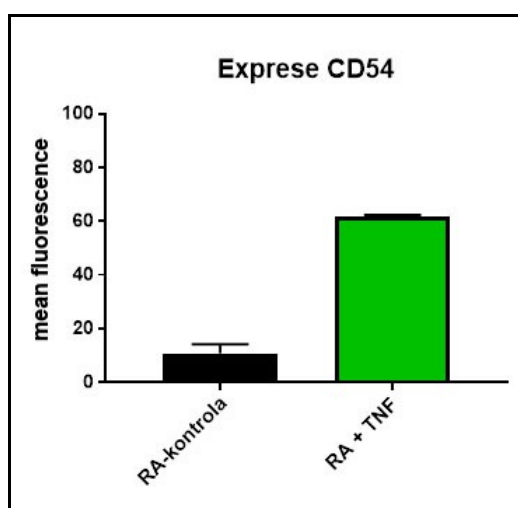
11.3 Produkce molekuly CD54 u jednotlivých buněk

Po stimulaci THP-1 buněk cytokinem TNF- α byla produkce CD54 významně vyšší (graf č.9).



Graf č.9: Efekt TNF- α na produkci molekuly CD54 u THP-1 buněk. Měřeno průtokovou cytometrií. Směrodatná odchylka byla vypočítána z tripletu.

Po stimulaci RA buněk cytokinem TNF- α byla produkce CD54 významně vyšší (graf č.10).



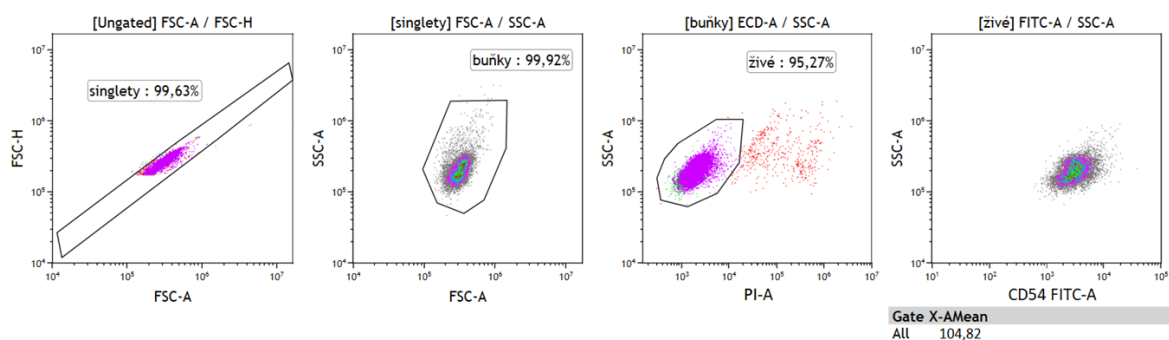
Graf č.10: Efekt TNF- α na produkci molekuly CD54 u RA buněk. Měřeno průtokovou cytometrií. Směrodatná odchylka byla vypočítána z tripletu.

U buněk RPTEC nebyl antigen detekován ani po stimulaci.

Vyhodnocení výsledků z průtokové cytometrie - Program Kaluza Analysis 1.5a

Gateovací strategie aktivovaných buněk (CD54+, barvené FITC)

Nejdříve byly zagateovány singlety, pak z nich buňky (FSC oproti SSC), pak z nich živé buňky (živé jsou ty, které jsou negativní na propidium iodide) a nakonec se živé buňky použily na zjištění aktivace (FITC oproti SSC). U živých buněk se zkoumaly hodnoty meanu (aritmetického průměru) intenzity barvení FITC. Hodnoty meanů se pak porovnávaly. Znázorněno na obrázku č. 6.



Obrázek č.6: Ukázka gateovací strategie

11.4 Porovnání typů léčby bez indukce vs Simulect

11.4.1 ENA-78 typ léčby, srovnání ENA-78; bez indukce vs Simulect

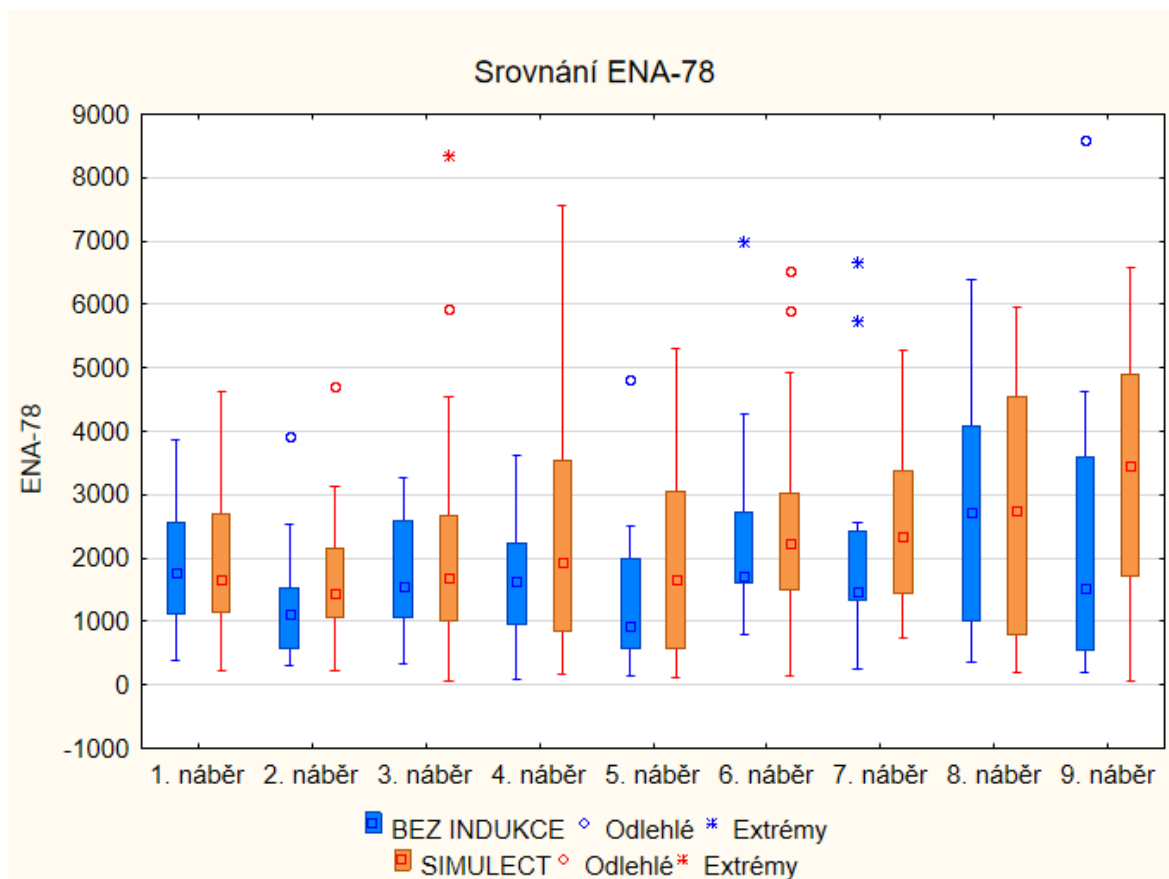
Tabulka č.2: ENA-78 typ léčby, srovnání ENA-78; bez indukce vs Simulect

náběr	použitý test	p-hodnota	rozdíl statisticky významný
náběr 1	dvouvýběrový t-test	0,97	NE
náběr 2	Mann-Whitneyho test	0,21	NE
náběr 3	Mann-Whitneyho test	0,76	NE
náběr 4	Mann-Whitneyho test	0,66	NE
náběr 5	Mann-Whitneyho test	0,31	NE
náběr 6	Mann-Whitneyho test	0,62	NE
náběr 7	Mann-Whitneyho test	0,22	NE
náběr 8	dvouvýběrový t-test	0,76	NE
náběr 9	Mann-Whitneyho test	0,16	NE

Statisticky významný rozdíl v hladině ENA-78 u léčby bez indukce a Simulectu nebyl prokázán pro žádný náběr (všechny p-hodnoty vyšší než 0,05).

Kromě testování je srovnání možné vizuálně posoudit na základě vícenásobného krabicového grafu.

Mezi dvojicemi grafů (graf č.11) není pro žádný náběr patrný výrazný rozdíl. Rozsahy hodnot mírně kolísají. U SIMULECTu je patrný postupný nárůst hodnot od 5. do 9. náběru. Naměřené hodnoty jsou více variabilní pro poslední dva náběry (širší mezikvartilové i min-max rozpětí).



Graf č.11: Srovnání ENA-78

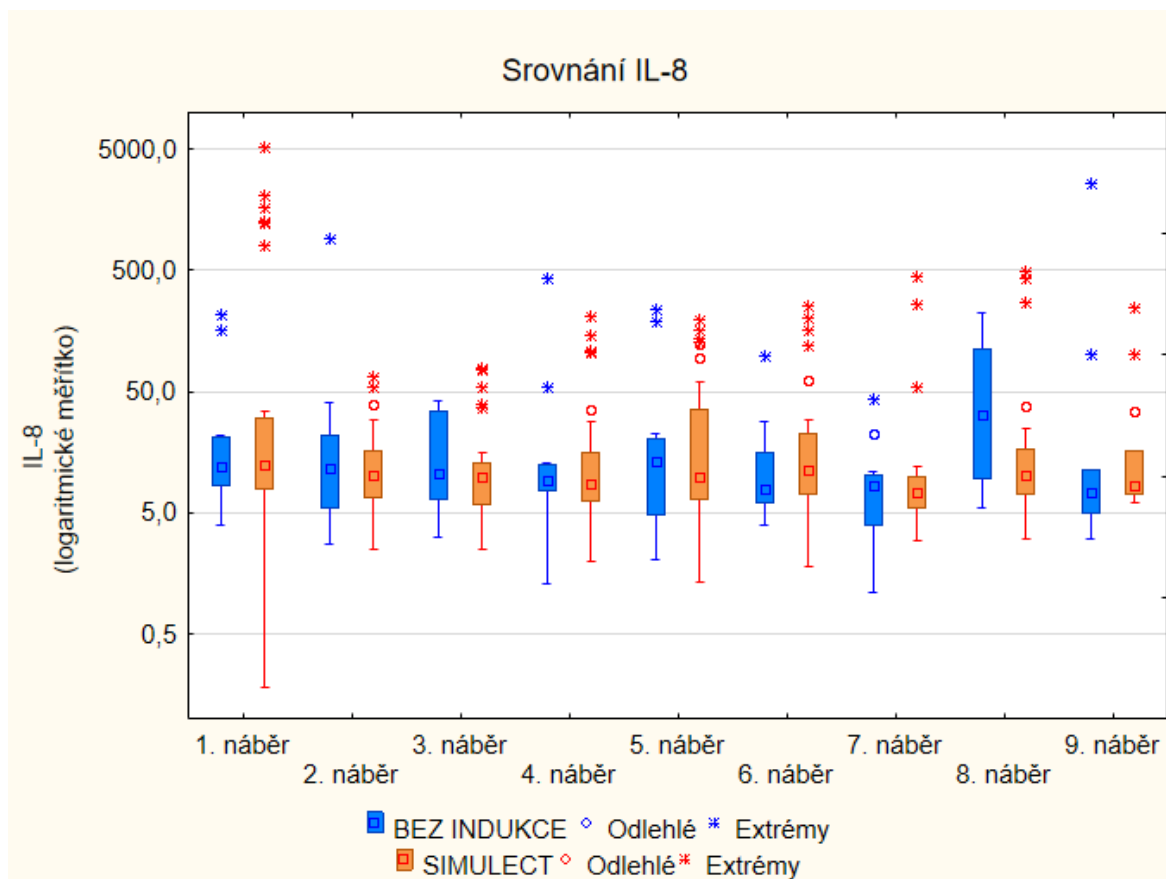
12.4.2 IL-8 typ léčby, srovnání IL-8; bez indukce vs Simulect

Tabulka č.3: IL-8 typ léčby, srovnání IL-8; bez indukce vs Simulect

náběr	použitý test	p-hodnota	rozdíl statisticky významný
náběr 1	Mediánový test	0,49	NE
náběr 2	Mediánový test	0,92	NE
náběr 3	Mann-Whitneyho test	0,72	NE
náběr 4	Mann-Whitneyho test	0,89	NE
náběr 5	Mann-Whitneyho test	0,72	NE
náběr 6	Mediánový test	0,10	NE
náběr 7	Mediánový test	0,73	NE
náběr 8	Mann-Whitneyho test	0,08	NE
náběr 9	Mediánový test	0,87	NE

Statisticky významný rozdíl v hladině IL-8 u léčby bez indukce a Simulectu nebyl prokázán pro žádný náběr (všechny p-hodnoty vyšší než 0,05).

Jelikož bylo v rámci IL-8 naměřeno velké množství silně extrémních hodnot, bylo pro osu y použito logaritmické měřítko (graf č.12). Při použití standardního lineárního měřítka nebyly krabice vůbec vidět. U logaritmického měřítka jsou na ose y stejné vzdálenosti např. mezi dvojicemi (5,50), (50,500) a (500,5000). Nejvíce extrémní hodnoty byly zjištěny u prvního náběru pro SIMULECT, který byl zároveň i náběrem s nejnižší hodnotou ze všech měření. Naměřené hodnoty pro tento náběr tedy vykazovaly nejvyšší variabilitu. Vysoká variabilita hodnot napříč všemi náběry znemožňuje statisticky prokázat rozdíly. Data, která se z velké části překrývají, a přitom výrazně kolísají statistické testy založené na pravděpodobnosti nepovažují za průkazně rozdílná. Například pro 8. náběr je celý krabicový graf pro léčbu BEZ INDUKCE umístěn výše než pro léčbu s pomocí SIMULECTu, ale tato skutečnost je „vyvážena“ přítomností extrémních hodnot pro SIMULECT. Data nevykazují žádný patrný časový trend.



Graf č.12: Srovnání IL-8

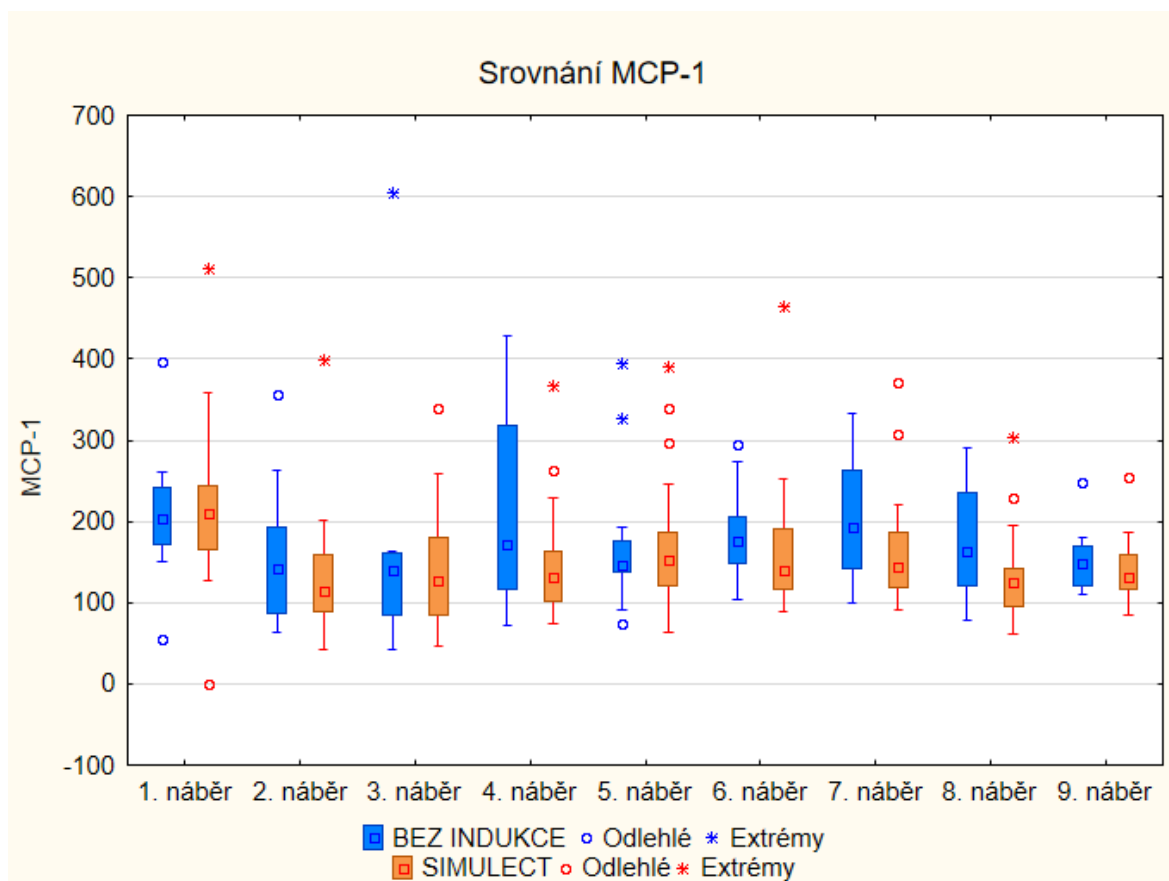
11.4.3 MCP-1 typ léčby, srovnání MCP-1; bez indukce vs Simulect

Tabulka č.4: MCP-1 typ léčby, srovnání MCP-1; bez indukce vs Simulect

náběr	použitý test	p-hodnota	rozdíl statisticky významný
náběr 1	Mann-Whitneyho test	0,97	NE
náběr 2	Mann-Whitneyho test	0,37	NE
náběr 3	Mann-Whitneyho test	0,99	NE
náběr 4	Mediánový test	0,10	NE
náběr 5	Mann-Whitneyho test	0,93	NE
náběr 6	Mann-Whitneyho test	0,12	NE
náběr 7	Mann-Whitneyho test	0,07	NE
náběr 8	Mann-Whitneyho test	0,06	NE
náběr 9	dvouvýběrový t-test	0,51	NE

Statisticky významný rozdíl v hladině MCP-1 u léčby bez indukce a Simulectu nebyl prokázán pro žádný náběr (všechny p-hodnoty vyšší než 0,05).

Pro první náběr byly naměřeny o něco vyšší mediány než pro ostatní náběry. Jinak data kolísají podobně jako na předchozích grafech a mezi dvojicemi léčeb pro jednotlivé náběry nepozorujeme výrazné rozdíly (graf č.13).



Graf č.13: Srovnání MCP-1

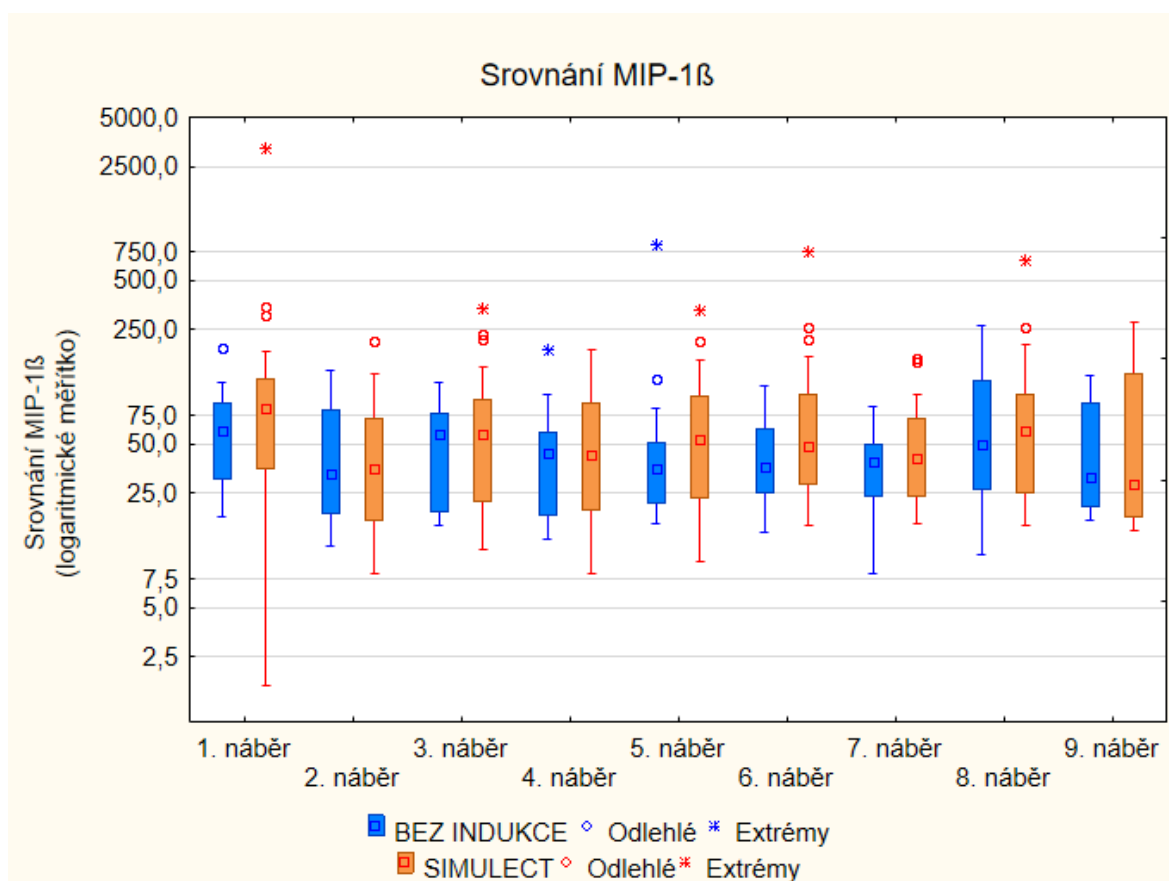
11.4.4 MIP-1 β typ léčby, srovnání MIP-1 β ; bez indukce vs Simulect

Tabulka č.5: MIP-1 β typ léčby, srovnání MIP-1 β ; bez indukce vs Simulect

náběr	použitý test	p-hodnota	rozdíl statisticky významný
náběr 1	Mann-Whitneyho test	0,44	NE
náběr 2	Mann-Whitneyho test	0,87	NE
náběr 3	Mann-Whitneyho test	0,58	NE
náběr 4	Mann-Whitneyho test	0,61	NE
náběr 5	Mann-Whitneyho test	0,61	NE
náběr 6	Mann-Whitneyho test	0,21	NE
náběr 7	Mann-Whitneyho test	0,54	NE
náběr 8	Mann-Whitneyho test	0,92	NE
náběr 9	Mediánový test	0,87	NE

Statisticky významný rozdíl v hladině MIP-1 β u léčby bez indukce a Simulectu nebyl prokázán pro žádný náběr (všechny p-hodnoty vyšší než 0,05).

Pro MIP-1 β bylo z důvodu vysoce extrémních hodnot nutné použít logaritmické měřítko (graf č.14). Mezi dvojicemi léčeb jsou pro všechny náběry zanedbatelné rozdíly, čemuž odpovídají vysoké vypočtené p-hodnoty. Ze všech druhů chemokinů vykazuje MIP-1 β nejnížší rozdíly mezi dvěma typy léčby.



Graf č.14: Srovnání MIP-1 β

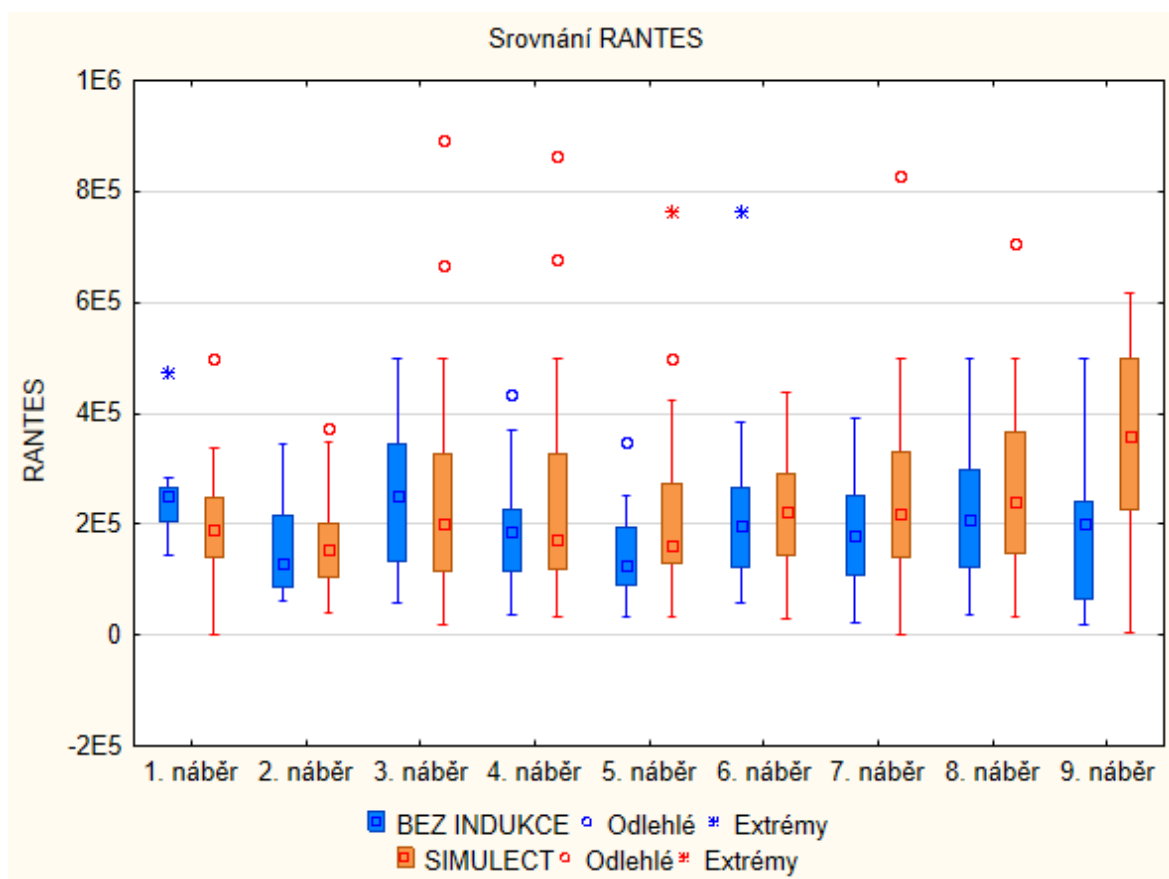
11.4.5 RANTES typ léčby, srovnání RANTES; bez indukce vs Simulect

Tabulka č.6: RANTES typ léčby, srovnání RANTES; bez indukce vs Simulect

náběr	použitý test	p-hodnota	rozdíl statisticky významný
náběr 1	Mann-Whitneyho test	0,04*	ANO
náběr 2	Mann-Whitneyho test	0,62	NE
náběr 3	Mann-Whitneyho test	0,79	NE
náběr 4	Mann-Whitneyho test	0,57	NE
náběr 5	Mann-Whitneyho test	0,09	NE
náběr 6	Mann-Whitneyho test	0,73	NE
náběr 7	Mann-Whitneyho test	0,21	NE
náběr 8	dvouvýběrový t-test	0,47	NE
náběr 9	dvouvýběrový t-test	0,04*	ANO

Statisticky významný rozdíl v hladině RANTES u léčby bez indukce a Simulectu byl prokázán pro náběry 1 a 9 (p-hodnoty nižší než 0,05). Na základě následujícího grafu lze upřesnit, že pro náběr 1 byla hladina RANTES statisticky významně vyšší pro léčbu bez indukce a pro náběr 9 byla hladina RANTES statisticky významně vyšší pro léčbu s použitím Simulectu.

Na základě grafu (graf č.15) je patrný výrazný rozdíl pro 9. náběr, kdy hodnoty RANTES pro SIMULECT převýšily hodnoty pro léčbu BEZ INDUKCE. U prvního náběru je rozdíl ve prospěch vyšších hodnot při léčbě bez indukce dán vyšším mediánem a nízkou variabilitou hodnot.



Graf č.15: Srovnání RANTES

Ze 45 testů byl prokázán statisticky významný rozdíl pouze ve dvou případech. Je potřeba skepticky poznamenat, že při hladině významnosti 0,05 je každý dvacátý test statisticky významný pouze na základě náhodného kolísání hodnot, tj. bez konkrétní příčiny. Vzhledem k tomu, že rozdíly mezi náběry nemají systematický charakter (například kdyby několik náběrů za sebou vykázalo rozdíl ve prospěch jedné skupiny), lze tedy dva zjištěné statisticky významné rozdíly považovat pouze za výsledek náhody.

Statistické testování neprokázalo rozdíly v hladině chemokinů na základě dvou zvolených typů léčby.

Popisná statistika

Tabulka č.7: ENA-78-bez indukce

náběr	N	průměr	medián	minimum	maximum	sm. odchylka
náběr 1	12	1889	1770	392	3863	1056
náběr 2	12	1321	1109	318	3932	1029
náběr 3	10	1708	1552	343	3275	964
náběr 4	13	1846	1624	95	3620	1128
náběr 5	13	1423	928	155	4806	1283
náběr 6	13	2342	1720	799	6987	1670
náběr 7	13	2163	1473	243	6667	1919
náběr 8	11	2594	2730	348	6384	1914
náběr 9	10	2387	1528	194	8594	2632

Tabulka č.8: ENA-78-simulect

náběr	N	průměr	medián	minimum	maximum	sm. odchylka
náběr 1	29	1905	1652	235	4631	1093
náběr 2	29	1637	1434	211	4712	947
náběr 3	29	2147	1698	72	8344	1773
náběr 4	29	2388	1940	171	7553	1934
náběr 5	29	1919	1660	125	5312	1438
náběr 6	29	2473	2249	151	6532	1600
náběr 7	23	2497	2343	735	5282	1333
náběr 8	24	2809	2746	192	5955	1932
náběr 9	15	3376	3462	61	6590	1838

Tabulka č.9: IL-8-bez indukce

náběr	N	průměr	medián	minimum	maximum	sm. odchylka
náběr 1	12	41	12	4	217	70
náběr 2	12	88	12	3	908	258
náběr 3	10	18	10	3	42	15
náběr 4	13	44	9	1	428	116
náběr 5	13	42	13	2	239	78
náběr 6	13	17	8	4	100	26
náběr 7	13	10	8	1	43	11
náběr 8	11	64	32	6	226	72
náběr 9	10	273	7	3	2580	811

Tabulka č.10: IL-8-simulect

náběr	N	průměr	medián	minimum	maximum	sm. odchylka
náběr 1	30	417	13	0	5174	1056
náběr 2	29	15	10	2	67	15
náběr 3	29	17	10	2	79	20
náběr 4	29	28	9	2	209	49
náběr 5	29	39	10	1	197	56
náběr 6	29	38	11	2	258	65
náběr 7	23	39	7	3	438	102
náběr 8	24	59	10	3	485	133
náběr 9	15	33	8	6	247	64

Tabulka č.11: MCP-1-bez indukce

náběr	N	průměr	medián	minimum	maximum	sm. odchylka
náběr 1	12	209	203	56	396	80
náběr 2	12	155	142	63	356	86
náběr 3	10	169	140	43	604	158
náběr 4	13	211	171	71	429	117
náběr 5	13	175	147	75	395	90
náběr 6	13	186	176	103	296	60
náběr 7	13	205	193	100	333	76
náběr 8	11	178	162	79	290	71
náběr 9	10	152	149	111	249	41

Tabulka č.12: MCP-1-simulect

náběr	N	průměr	medián	minimum	maximum	sm. odchylka
náběr 1	30	212	210	0	512	87
náběr 2	29	127	114	43	399	68
náběr 3	29	144	128	47	340	69
náběr 4	29	146	131	75	367	64
náběr 5	29	167	152	64	390	75
náběr 6	29	163	141	89	464	74
náběr 7	23	163	144	92	370	67
náběr 8	24	132	125	62	303	54
náběr 9	15	141	132	84	256	42

Tabulka č.13: MIP-1 β -bez indukce

náběr	N	průměr	medián	minimum	maximum	sm. odchylka
náběr 1	12	70	60	18	193	51
náběr 2	12	51	33	12	141	42
náběr 3	10	54	57	16	120	36
náběr 4	13	53	44	13	190	50
náběr 5	13	104	36	16	830	220
náběr 6	13	45	37	15	114	29
náběr 7	13	42	40	8	86	23
náběr 8	11	87	50	10	265	92
náběr 9	10	57	32	17	131	45

Tabulka č.14: MIP-1 β -simulect

náběr	N	průměr	medián	minimum	maximum	sm. odchylka
náběr 1	30	196	82	2	3232	579
náběr 2	29	55	36	8	215	47
náběr 3	29	76	57	11	335	76
náběr 4	29	62	43	8	191	53
náběr 5	29	72	53	10	330	72
náběr 6	29	93	48	16	755	141
náběr 7	23	55	41	16	168	42
náběr 8	24	98	60	16	675	138
náběr 9	15	80	29	15	279	84

Tabulka č.15: RANTES-bez indukce

náběr	N	průměr	medián	minimum	maximum	sm. odchylka
náběr 1	12	250103	250000	142968	472966	82221
náběr 2	12	158492	129009	62753	343977	90440
náběr 3	8	252552	253149	57560	500000	145477
náběr 4	12	197602	186344	35808	434015	113528
náběr 5	13	147126	124571	31733	348804	91414
náběr 6	12	239276	198079	57397	762673	188398
náběr 7	13	183484	179242	23554	391907	107564
náběr 8	11	227089	207688	35165	500000	137908
náběr 9	10	186765	201293	19883	500000	142388

Tabulka č.16: RANTES-simulect

náběr	N	průměr	medián	minimum	maximum	sm. odchylka
náběr 1	28	197872	189718	222	500000	96441
náběr 2	29	165347	154161	40241	373947	87857
náběr 3	28	258578	202618	18603	892078	201524
náběr 4	27	254596	171526	31744	862906	196768
náběr 5	27	219022	162740	32424	762741	155854
náběr 6	29	226767	221881	28587	438883	111683
náběr 7	22	263576	219010	2500	828671	185953
náběr 8	24	268747	242547	34538	706126	163523
náběr 9	15	326033	358641	5348	617795	169178

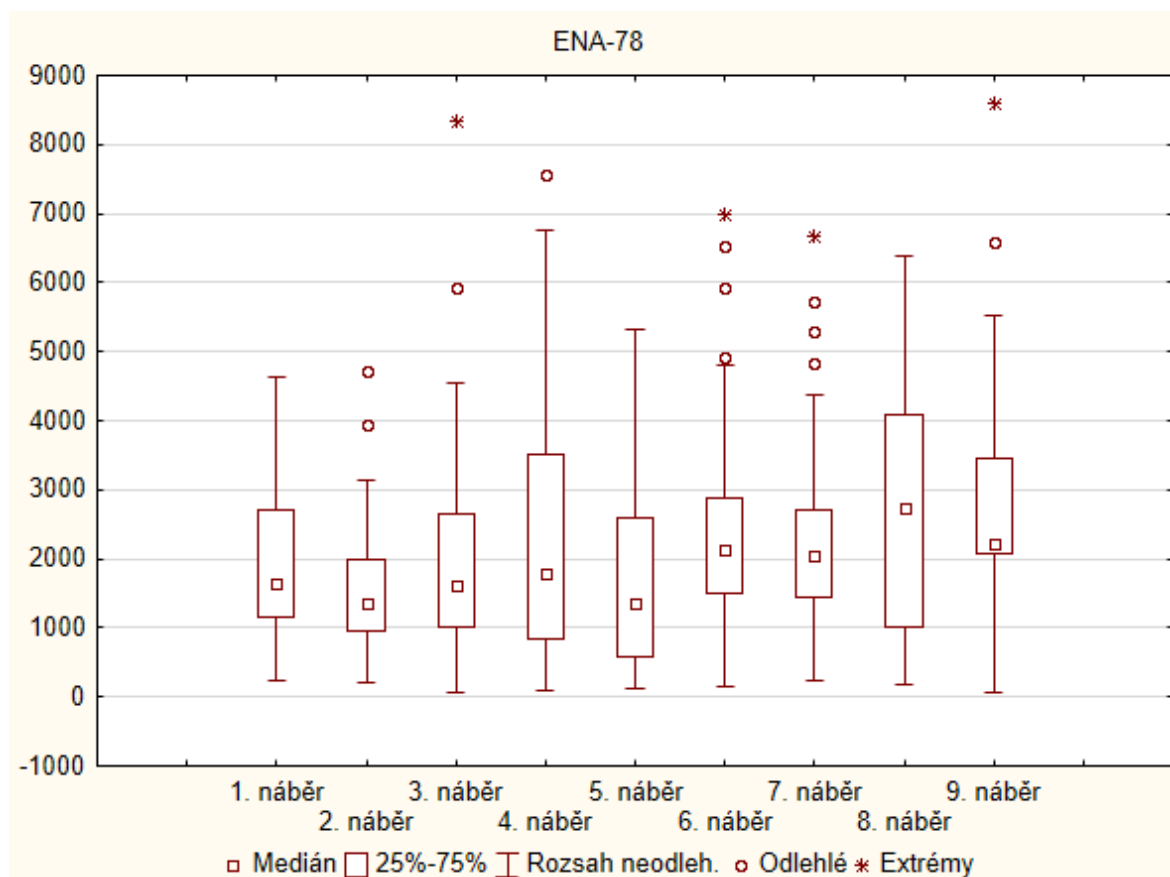
11.5 Hladiny chemokinů u pacientů s transplantovanou ledvinou

11.5.1 Sérové hladiny ENA-78 u pacientů s transplantovanou ledvinou

Tabulka č.17: ENA-78

náběr	N	průměr	medián	minimum	maximum	sm. odchylka
náběr 1	43	1889	1656	235	4631	1044
náběr 2	43	1536	1355	211	4712	947
náběr 3	43	1995	1614	72	8344	1531
náběr 4	43	2210	1780	95	7553	1710
náběr 5	43	1756	1350	125	5312	1380
náběr 6	43	2425	2126	151	6987	1584
náběr 7	43	2323	2050	243	6667	1421
náběr 8	43	2739	2730	192	6384	1710
náběr 9	43	2660	2214	61	8594	1702

Hodnoty ENA-78 pro prvních 5 náběrů kolísají v mediánu okolo 1500, pro zbylé náběry pak kolem 2000. Dochází tedy postupně k určitému nárůstu. Odlehlé, popř. extrémní hodnoty se vyskytují u všech náběrů kromě prvního (graf č.16).



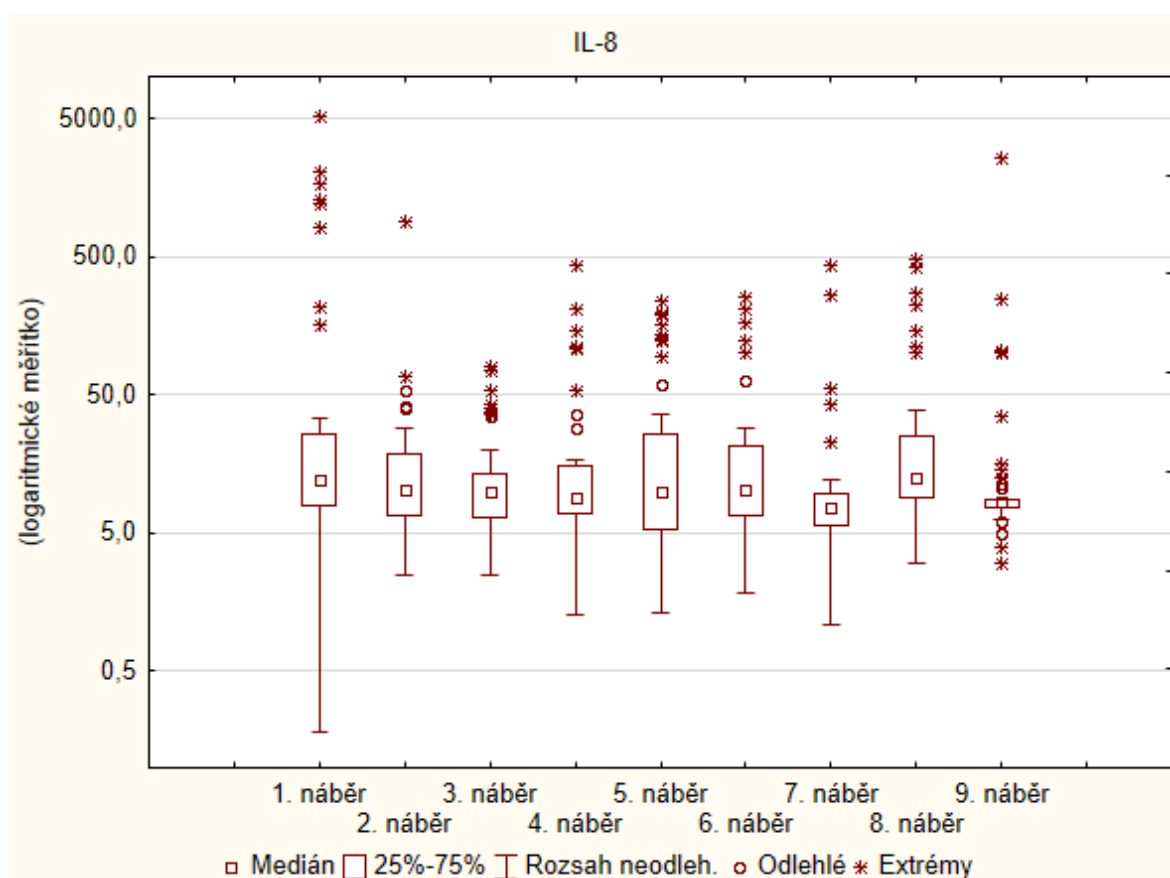
Graf č.16: Sérové hladiny ENA-78 u pacientů s transplantovanou ledvinou

11.5.2 Sérové hladiny IL-8 u pacientů s transplantovanou ledvinou

Tabulka č.18: IL-8

náběr	N	průměr	medián	minimum	maximum	sm. odchylka
náběr 1	43	302	12	0	5174	895
náběr 2	43	35	10	2	908	137
náběr 3	42	17	10	2	79	18
náběr 4	43	33	9	1	428	74
náběr 5	43	39	10	1	239	62
náběr 6	43	31	10	2	258	56
náběr 7	43	25	8	1	438	76
náběr 8	43	52	13	3	485	106
náběr 9	43	79	8	3	2580	393

Hodnoty IL-8 v mediánu kolísají okolo 10 pro celé pooperační období. Pro všechny náběry se také vyskytují silně extrémní hodnoty, nejvíce u prvního náběru. V grafu (graf č.17) tedy bylo nutné pro osu y použít logaritmické měřítko.



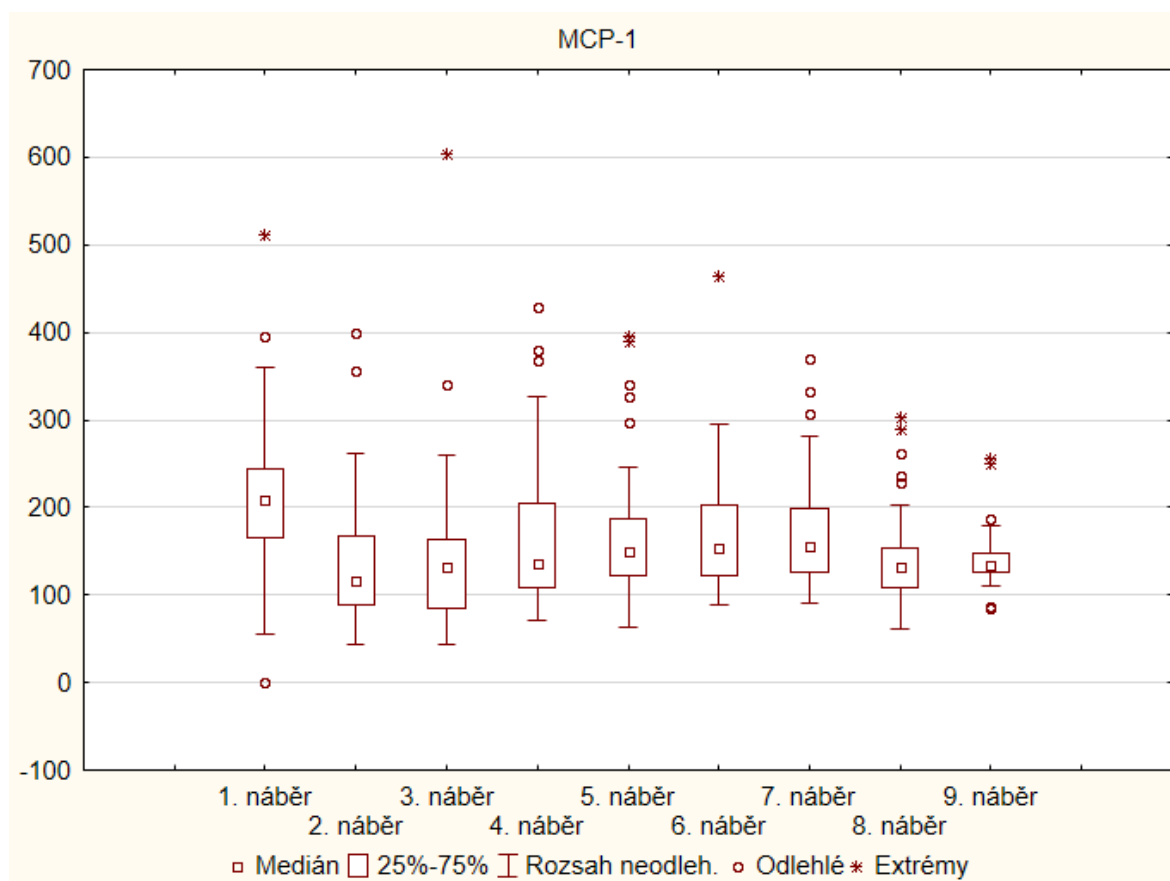
Graf č.17: Sérové hladiny IL-8 u pacientů s transplantovanou ledvinou

11.5.3 Sérové hladiny MCP-1 u pacientů s transplantovanou ledvinou

Tabulka č.19: MCP-1

náběr	N	průměr	medián	minimum	maximum	sm. odchylka
náběr 1	43	211	209	0	512	83
náběr 2	43	134	117	43	399	72
náběr 3	43	148	132	43	604	93
náběr 4	43	166	137	71	429	87
náběr 5	43	169	150	64	395	78
náběr 6	43	170	154	89	464	69
náběr 7	43	174	156	92	370	67
náběr 8	43	144	132	62	303	56
náběr 9	43	141	135	84	256	32

Hodnoty MCP-1 jsou nejvyšší u prvního náběru, kdy se pohybují okolo mediánu 200. Pro ostatní náběry již dochází ke kolísání mediánu mezi 110 a 160. U všech náběrů se vyskytují odlehlé či extrémní hodnoty (graf č.18).



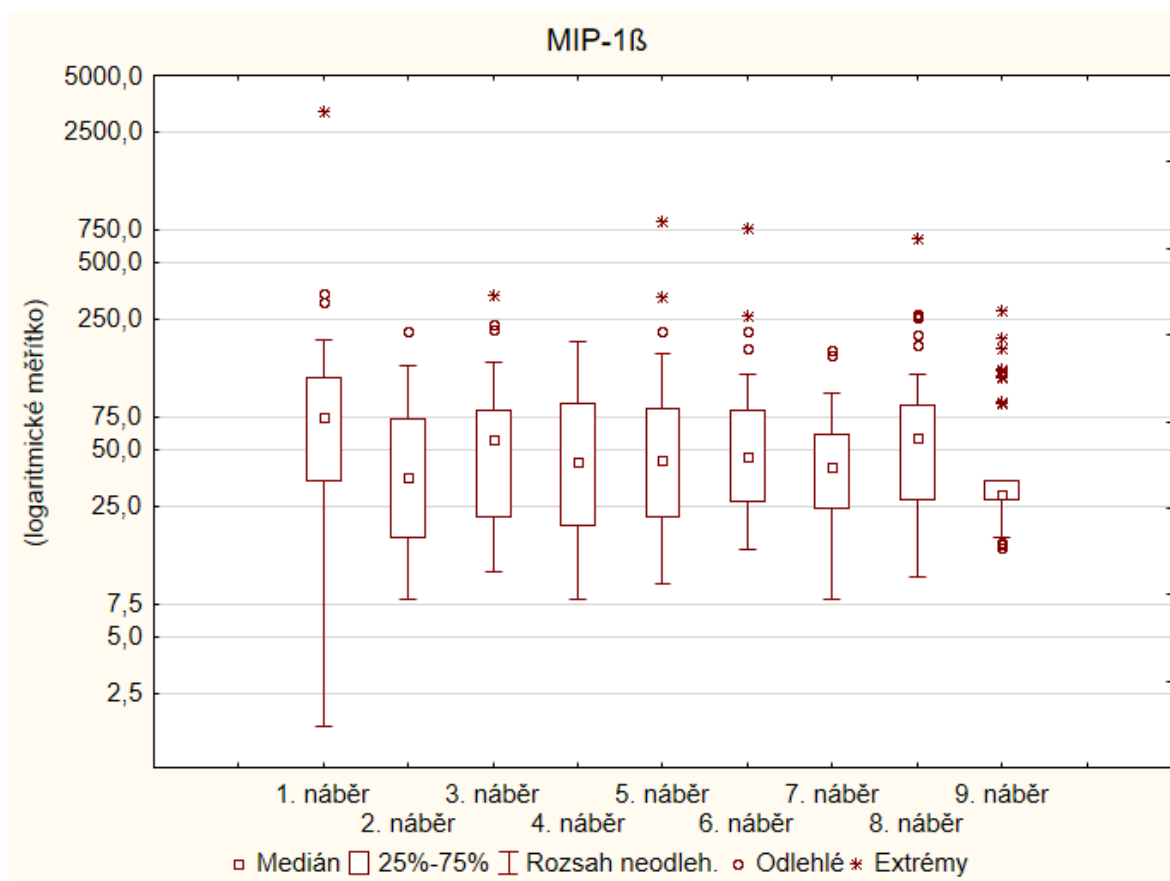
Graf č.18: Sérové hladiny MCP-1 u pacientů s transplantovanou ledvinou

11.5.4 Sérové hladiny MIP-1 β u pacientů s transplantovanou ledvinou

Tabulka č.20: MIP-1 β

náběr	N	průměr	medián	minimum	maximum	sm. odchylka
náběr 1	43	158	75	2	3232	485
náběr 2	43	53	35	8	215	44
náběr 3	43	69	57	11	335	65
náběr 4	43	59	43	8	191	51
náběr 5	43	81	44	10	830	133
náběr 6	43	78	46	15	755	118
náběr 7	43	49	40	8	168	33
náběr 8	43	88	58	10	675	113
náběr 9	43	53	29	15	279	57

Nejvyšší hodnoty MIP-1 β byly zjištěny u prvního náběru, kdy medián činil 75 pg/ml. Hodnoty u náběrů 2 až 8 pouze mírně kolísaly. Poslední náběr vykázal nejnižší hodnoty okolo mediánu 29, ovšem s větším počtem extrémně se vychylujících hodnot v rozmezí 75 až 279 (graf č.19).



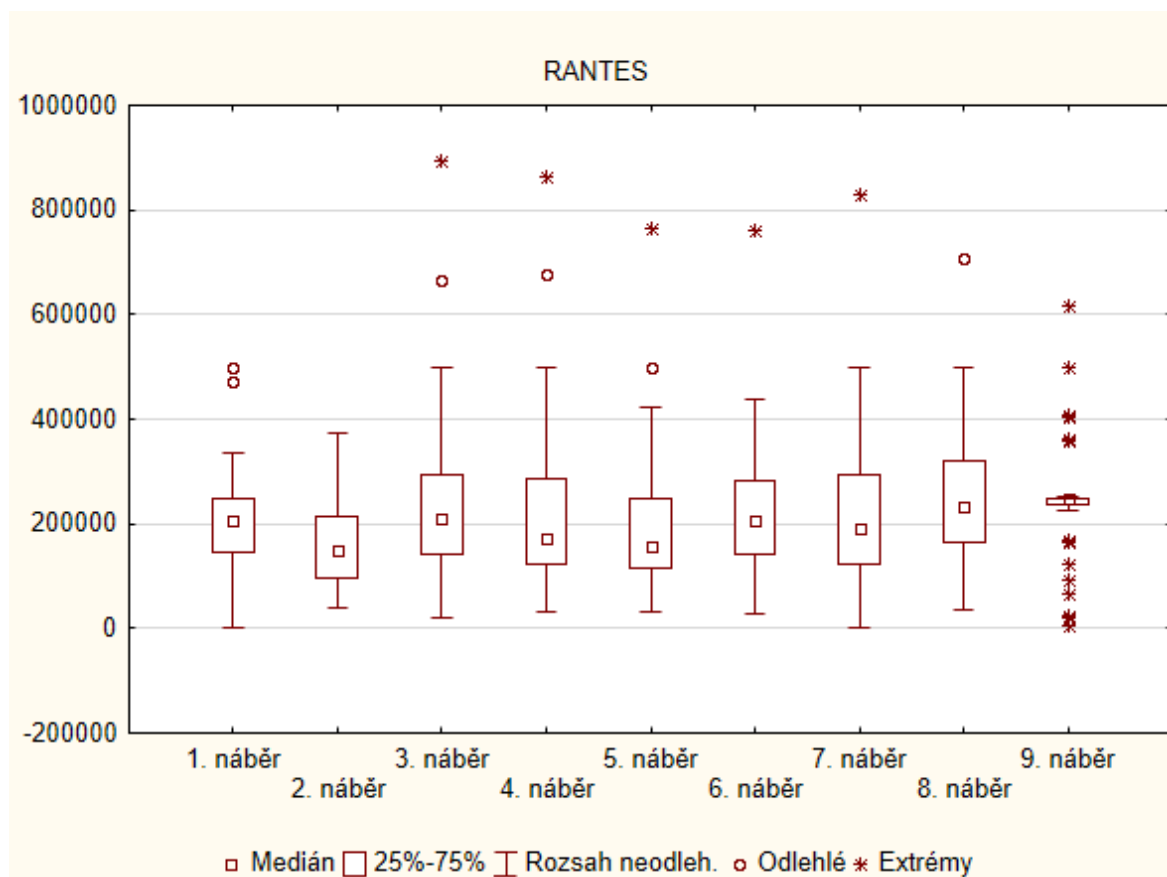
Graf č.19: Sérové hladiny MIP-1 β u pacientů s transplantovanou ledvinou

11.5.5 Sérové hladiny RANTES u pacientů s transplantovanou ledvinou

Tabulka č.21: RANTES

náběr	N	průměr	medián	minimum	maximum	sm. odchylka
náběr 1	43	212960	205209	222	500000	91104
náběr 2	43	162670	148924	40241	373947	85481
náběr 3	43	249849	211843	18603	892078	172997
náběr 4	43	231124	173252	31744	862906	168339
náběr 5	43	193106	159110	31733	762741	136357
náběr 6	43	229388	208053	28587	762673	132913
náběr 7	43	226217	192921	2500	828671	148669
náběr 8	43	251829	235094	34538	706126	139816
náběr 9	43	261817	250000	5348	617795	129456

Naměřené hodnoty RANTES byly pro prvních 8 náběrů velmi podobné. Jejich mediány se pohybovaly okolo 200 000, s několika odlehlými a extrémními hodnotami. Devátý náběr vykázal na jednu stranu velkou těsnost hodnot okolo 250 000, na druhou stranu větší množství extrémních hodnot jak směrem k minimu, tak směrem k maximu (graf č.20).



Graf č.20: Sérové hladiny RANTES u pacientů s transplantovanou ledvinou

12 Diskuze

Výsledky experimentu provedeného pro tuto diplomovou práci, kdy byly sledovány sérové hladiny chemokinů u pacientů s ledvinným transplantátem a u buněčných kultur, se v jistých ohledech shodují s experimenty provedenými v rámci jiných studií.

Z naměřených hodnot ENA-78 u léčby bez indukce a Simulectu jsme vysledovali postupný nárůst hladiny. Statistické rozdíly však nebyly významné. Všechny linie produkovaly ENA-78 i v nestimulovaném stavu, avšak po stimulaci TNF- α byla největší exprese zaznamenána u RA buněk v rozmezí 600-700 pg/ml.

Ze studie provedené Thornburn et al. bylo zjištěno, že TNF- α indukuje přednostně expresi RANTES, MCP-1, IP-10, I-TAC, zatímco IL-1 β indukuje převážně IL-8 a ENA-78 (Thornburn et al., 2009). Stejného výsledku došli již v roce 1995 Schmouder et al., kteří zkoumali, zda by ENA-78 mohl být produkován lidskými renálními epiteliálními buňkami. Bylo zjištěno, že primární kultury lidských renálních kortikálních epiteliálních buněk s atributy tubulárních buněk mohou při stimulaci s IL-1 β výrazně zvýšit hladiny mRNA pro ENA-78. Kromě toho tyto buňky vylučovaly významně zvýšenou hladinu ENA-78 ve srovnání s kontrolami, když byly stimulovány IL-1 β (Schmouder et al., 1995).

Z daných výsledků můžeme tedy usuzovat, že všechny linie produkovaly ENA-78, výraznějších rozdílů však bylo dosaženo až po stimulaci TNF- α , pokud by však stimulace proběhla pomocí IL-1 β , mohly by být hladiny ENA-78 zřejmě vyšší.

Hodnoty IL-8 u léčby bez indukce a Simulectu vykazovaly nejvyšší variabilitu, přičemž vysoká variabilita hodnot napříč všemi náběry znemožňovala statistické prokázání rozdílů, naměřená data nevykazovala časový trend. Nejvyšší hladiny chemokinu IL-8 byly zjištěny u tkáňové kultury RPTEC+TNF (stimulace primární linie ledvinových buněk TNF- α), s hodnotami blízkými se k 12000 pg/ml. Produkce IL-8 korelovala s časem ischemie při ledvinné transplantaci. Nejnižší produkce IL-8 byla naměřena u THP-1 (lidské leukemické buněčné linie).

Podobných výsledků bylo dosaženo ve studii z roku 2017, jen s tím rozdílem, že zde byla sledována hladina IL-8 ve vzorcích moči v den 1 a 14 dní po renální transplantaci jako marker časně i dlouhodobé renální funkce. 87 pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledviny, bylo sledováno po dobu průměrně 30 měsíců. Koncentrace IL-8 byla v den 1 negativně korelující s koncentrací kreatininu časně po renální transplantaci, stejně tak v dlouhodobém pozorování. Vyšší hladina IL-8 ve vzorcích moči v den 1 po transplantaci však byla nepříznivým markrem pro časnou a dlouhodobou funkci transplantátu. Vyšší

obsah IL-8 ve vzorcích moči byl v pozitivní korelaci s aktivitou MMP-9 (metalloproteinázy-9) v moči. Bylo tedy dokázáno, že obě molekuly spolu přispívají k ischemii u transplantovaných ledvin (*Kwiatkowska et al., 2017*). Dále můžeme konstatovat, že vyšší hladina IL-8 v moči i v krvi, není příznivým markrem pro funkci transplantátu.

Nejvyšších hodnot MCP-1 bylo dosaženo u RA+TNF, které dosahovaly rozmezí 22 000-29 000 pg/ml. Stimulované RA (rakovinné ledvinové buňky) tedy produkovaly nejvíce chemokinu MCP-1.

Vyšší hodnoty pro RANTES a MCP-1 bylo dosaženo v experimentu z roku 2016, provedeném čínskými vědci, který byl zaměřen na expresi RANTES a MCP-1 u renální alotransplantace s chronickou dysfunkcí alotransplantátu (CRAD). Ve srovnání s kontrolou byla exprese RANTES u pacientů třetího stupně IF/TA ($52.60 \pm 4.77 \%$) a exprese MCP-1 ($67.78 \pm 6.82 \%$). Expresce RANTES a MCP-1 byly významně vyšší v renální tkáni s CRAD v porovnání se zdravou tkání, přičemž exprese těchto molekul měla tendenci se zvyšovat spolu se stupněm onemocnění IF/TA. V rámci této studie byla prokázána spojitost mezi intersticiální fibrózou, tubulární atrofií IF/TA, dysfunkcí alotransplantátu a zvýšenou expresí RANTES a MCP-1 (*Yan et al., 2016*). Vyšší hladiny RANTES, GRO- α a MCP-1 jsou tedy spojené s patologickým stupněm onemocnění ledvin (pro intersticiální fibrózu, tubulární atrofií).

Další studie sledovala pomocí real-time PCR změny v expresi genů pro vybrané cytokiny a chemokiny v biopsiích odebraných celkem 74 příjemcům ledviny. Byla studována exprese mRNA pro IL-10, TGF- β 1, IL-6, MCP-1, RANTES a TNF- α u pacientů s chronickou nefropatií alotransplantátu (CAN) vzhledem ke kontrole. Studie prokázala pozitivní korelace mezi zvýšenou expresí IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1 a proteinurií. Vyšší hladina intrarenálního MCP-1 u pacientů s CAN zvyšovala riziko pro odmítnutí transplantátu do 42 měsíců (*Hribova et al., 2007*).

Rovněž studie Raza et al. poukázala na možnost využití sledování hladin MCP-1 v moči za účelem predikce možné rejekce ledvinového transplantátu (*Raza et al., 2016*).

Studie provedená Boratynska et al. prokázala u 10% příjemců ledviny s polyomavirovou infekcí asociaci mezi tubulointersticiálním zánětem a zvýšeným množstvím MCP-1 v moči (*Boratynska et al., 2006*).

U hodnot RANTES byl statisticky významný rozdíl u léčby bez indukce a Simulectu pro náběry 1 a 9, p-hodnoty byly nižší než 0,05. Pro náběr 1 byla hladina RANTES statisticky významně vyšší pro léčbu bez indukce a pro náběr 9 byla hladina RANTES statisticky

významně vyšší pro léčbu s použitím Simulectu. Nejvíce tvořeným chemokinem u THP-1 byl RANTES, hodnoty dosahovaly u THP1+TNF koncentrace 1000-1200 pg/ml.

Studie z roku 2010 od Matl et al. hledala klinický, laboratorní, morfologický a molekulární prediktor pro krátkodobé přijetí renálního transplantátu. U 257 pacientů byla provedena biopsie ledvinného transplantátu 3 měsíce po transplantaci. U pacientů se subklinickou rejekcí byla prokázána zvýšená intrarenální exprese RANTES, IP-10 a dalších molekul v porovnání s pacienty s normální morfologií transplantátu. Zároveň byla prokázána korelace mezi subklinickou rejekcí, výskytem pozdní akutní rejekce a selháním transplantátu rok po transplantaci. Navíc byla prokázána přímá souvislost mezi zvýšenou expresí RANTES a IP-10 u subklinické rejekce a odmítnutím transplantátu do roka od transplantace (Matl et al., 2010).

Studie z roku 2004 prokázala pozitivní korelaci mezi chemokiny, receptory chemokinů a infiltrujícími leukocyty při akutní rejekci, přičemž byla zaznamenána nízká exprese MCP-1, RANTES, CCR1, CCR2 a CCR5 v CAN (Rüster et al., 2004).

K podobnému výsledku došli i autoři studie Viklicky et al., kde bylo zahrnuto v experimentu 730 pacientů, kteří obdrželi ledvinný transplantát v letech 2002-2005, včetně 21 pacientů, kteří měli akutní protilátkami zprostředkovanou rejekci. Při porovnání transplantátu nevykazujícího a vykazujícího rejekci, bylo u druhé skupiny zjištěno snížení regulační složky, což zahrnovalo nižší expresi FoxP3, TGF-1, RANTES a CD20 (Viklicky et al., 2010).

Nejvyšších hodnot u chemokinu GRO- α bylo dosaženo u RPTEC+TNF, hodnoty se blížily koncentraci 1500 pg/ml, nejnižší naopak u RA.

Studie z roku 2015 dokázala, že intra-alograftní B-buňky jsou klíčový mediátorem CAD (chronického poškození alotransplantátu). B-buňky mohou přispívat k CAD sekrecí cytokinů a chemokinů. B-buňky identifikované v CAD jsou asociovány s vývojem terciální lymfoidní tkáně s germinálními centry v ledvinném alotransplantátu. Izolované intra-alograftní B-buňky byly kultivovány a byla u nich zjištěna exprese některých cytokinů, a to zejména GRO- α (hodnoty nižší než 10 000 pg/ml), RANTES, IL-6 a MCP-1 (Tse et al., 2015).

Expresí CD54 byla největší u THP-1+TNF buněk, s hodnotami 100-150 mean, zatímco u buněk RA+TNF byla exprese menší s hodnotami 60-80 mean. Je zajímavé, že na primárních buňkách renálního epitelu nebyla tato molekula indikována.

V roce 2001 byl proveden experiment za použití UFC (urine flow cytometry), neinvazivního nástroje pro diagnózu akutní a chronické rejekce ledvinného alograftu. Byla analyzována exprese povrchových antigenů po dobu 30 dnů po diagnóze a léčbě 24 akutních rejekčních (AR) epizod. UFC bylo provedeno na 59 vzorcích moči od 17 pacientů majících diagnostická kritéria pro AR. Bylo zjištěno, že HLA-DR byl nejvíce prevalentní antigen zaznamenan v průběhu prvních dnů po AR (91.7% vzorků), dále CD14 (50%) a CD54 (41.7%). U pacientů s přetrvávajícím poškozením štěpu i po léčbě byla prokázána přítomnost CD54+ a CD14+ buněk v moči (*Robert et al., 2001*).

V našem experimentu byla zaznamenána vyšší hladina CD54 u kultury THP-1+TNF.

Tato diplomová práce i experimenty provedené v předchozích letech, dokazují, že chemokiny nacházející se v séru nebo moči u pacientů s ledvinným transplantátem, mohou sloužit jako prognostické markery pro vývoj funkce štěpu a jejich zvýšení může předcházet rejekci transplantátu.

13 Závěr

Cílem této práce bylo posoudit efekt TNF- α na uvolnění chemokinů z buněk renálního epitelu a linie lidských monocytů a dále sledovat sérové hladiny chemokinů u pacientů s transplantovanou ledvinou.

Efekt TNF- α na uvolnění chemokinů z buněk byl takový, že u chemokinů IL-8, MCP-1, RANTES, ENA-78, GRO- α byla dokázána vyšší hladina těchto chemokinů po stimulaci TNF- α , tedy u všech sledovaných chemokinů byla zvýšená hladina po stimulaci.

TNF- α měl velký efekt v našem experimentu na uvolnění chemokinů z buněk renálního epitelu a lidských monocytů, ale i u buněk rakovinných a buněk THP-1 myeloidní linie.

Dále byly zjištěny vyšší hladiny chemokinů IL-8 (hodnoty 13 000 - 9 000) a GRO- α (hodnoty 13 000 - 9 000) u pacientů s transplantovanou ledvinou. U linie rakovinných buněk byly nejvyšší hladiny chemokinů MCP-1 (hodnoty 28 000 - 22 500) a IL-8 (hodnoty 11 500 - 6 000), hladina chemokinů IL-8 byla nižší u rakovinných buněk než u pacientů s transplantovanou ledvinou. U myeloidní linie THP-1 byla nejvyšší hladina u chemokinů RANTES (hodnoty 1 200 - 1 000) a GRO- α (hodnoty 600 - 400), hladina chemokinů GRO- α byla nižší než u pacientů s transplantovanou ledvinou.

Efekt TNF- α na expresi molekuly CD54 u THP-1 buněk a RA buněk byl značný, v obou případech byly hladiny CD54 po stimulaci zvýšené. Exprese CD54 byla největší u THP-1 buněčné linie (hodnoty po stimulaci 100-150), zatímco u buněk RA byla exprese menší (hodnoty po stimulaci 60-80).

Z daného výzkumu zjišťujeme, že výskyt některých chemokinů v buněčném supernatantu u jednotlivých buněčných kultur je spojen s úlohou jednotlivých chemokinů. Ty, které mají úlohu spojenou pouze se zánětlivou reakcí, jejich hladiny byly nižší u buněk rakovinných než u buněčné linie pacientů s transplantovanou ledvinou, zatímco ty chemokiny, které mají hlavní úlohu v procesu tvorby či zneškodnění rakovinných buněk, byly tvořeny více u buněk rakovinných.

Ty, chemokiny, které mají hlavní úlohu v zánětlivém procesu, mohou být důležitými markery v procesu po-transplantačních testech, jejichž hladiny při biopsii, v krevním séru či v moči, mohou znamenat výskyt zánětu v transplantovaném orgánu, který by následně mohl znamenat odmítnutí daného orgánu.

Abychom posoudili efekt prozánětlivých cytokinů na uvolnění chemokinů v buněčném supernatantu, je potřebné znát úlohu prozánětlivých cytokinů a chemokinů. Jestliže se prozánětlivé cytokiny podílejí na stimulaci zánětlivé reakce, mají zpravidla vliv i na tvorbu chemokinů.

Avšak v našem experimentu sérové hladiny chemokinů u pacientů po transplantaci ledviny vykazovaly výraznou interindividuální variabilitu a nebyl zaznamenán rozdíl mezi jednotlivými 2 imunosupresivními režimy. Nezdá se, že by tyto parametry mohly v budoucnosti sloužit jako biomarkery komplikací u orgánových transplantací.

14 Seznam použité literatury

Ahmed, A., Saha, B., Patwardhan, A., Shivprasad, S., Nandi, D. The major players in adaptive immunity. *Resonance*. 2009, 14(5), 455-471.

Albert V, Subramanian A, Agrawal D, Bhoi SK, Pallavi P, Mukhopadhyay AK. RANTES levels in peripheral blood, CSF and contused brain tissue as a marker for outcome in traumatic brain injury (TBI) patients. *BMC Res Notes*. 2017; 10: 139.

Alegre ML, Leemans J, Le Moine A, Florquin S, De Wilde V, Chong A, Goldman M. The multiple facets of toll-like receptors in transplantation biology. *Transplantation* 2008;86:1-9.

Balamayooran G, Batra S, Cai S, Mei J, Worthen GS, Penn AL, Jeyaseelan S. Role of CXCL5 in leukocyte recruitment to the lungs during secondhand smoke exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;47(1):104-11.

Barczyk A, Pierzchała E, Caramori G, Sozańska E. Increased expression of CCL4/MIP-1 β in CD8⁺ cells and CD4⁺ cells in sarcoidosis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2014;27(2):185-93.

Blanchet X, Langer M, Weber C, Koenen RR, von Hundelshausen P. Touch of chemokines. *Front Immunol*. 2012;3:175.

Boratynska M, Dubinski B, Rybka K, Jezior D, Szyber P, Klinger M. Immunocytological Urinalysis and Monocyte Chemotactic Peptide-1 in Renal Transplant Recipients With Polyomavirus Replication. *Transplantation Proceedings*. 2006;38:151-4.

Briscoe, D.M., Sayegh, M. H. A rendezvous before rejection: where do T cells meet transplant antigens? *Nat Med* 2002;8:220-222.

Cardoni, R. L., Prigoshin, N., Tambutti, M. L., Ferraris, J. R. Regulatory cytokines in the response to the allogeneic renal transplant. *Medicina* 2005;65:54-62.

Cole Katherine E., Christine A. Strick, Timothy J. Paradis, Kevin T. Ogborne, Marcel Loetscher, Ronald P. Gladue, Wen Lin, James G. Boyd, Bernhard Moser, Douglas E. Wood, Barbara G. Sahagan, Kuldeep Neote. Interferon-inducible T Cell Alpha Chemoattractant (I-TAC): A Novel Non-ELR CXC Chemokine with Potent Activity on Activated T Cells through Selective High Affinity Binding to CXCR3. *J Exp Med*. 1998; 187(12): 2009–2021.

Colobran R., R Pujol-Borrell, Ma P Armengol, and M Juan. The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity. *Clin Exp Immunol*. 2007; 148(2): 208–217.

Colobran R, Pujol-Borrell R, Armengol MP, Juan M. The chemokine network. II. On how polymorphisms and alternative splicing increase the number of molecular species and configure intricate patterns of disease susceptibility. *Clin Exp Immunol.* 2007;150(1):1-12.

Colvin, R. B. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1046- 56.

Cooper, D. K. C. Clinical survey of heart transplantation between ABO blood group-incompatible recipients and donors. *J Heart Transplant*, 1990, 9:376- 381.

Daughton Havenar C, Lindqvist M, Heit A, Wu JE, Reiss SM, Kendric K, Bélanger S, Kasturi SP, Landais E, Akondy RS, McGuire HM, Bothwell M, Vagefi PA, Scully E; IAVI Protocol C Principal Investigators, Tomaras GD, Davis MM, Poignard P, Ahmed R, Walker BD, Pulendran B, McElrath MJ, Kaufmann DE, Crotty S. CXCL13 is a plasma biomarker of germinal center activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(10):2702-7.

Debout A, Foucher Y, Trébern-Launay K, Legendre C, Kreis H, Mourad G, Garrigue V, Morelon E, Buron F, Rostaing L, Kamar N, Kessler M, Ladrière M, Poignas A, Blidi A, Soullillou JP, Giral M, Dantan. Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney Int.* 2015;87(2):343-9.

Dong, V. H., Tilney, N. L. Reduction of ischemia/reperfusion injury in organ transplants by cytoprotective strategies *Current Opinion in Organ Transplantation* 2001, 6:69–74.

Dragun D, Müller DN, Bräsen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelhä M, Dechend R, Kintscher U, Rudolph B, Hoebeke J, Eckert D, Mazak I, Plehm R, Schönemann C, Unger T, Budde K, Neumayer HH, Luft FC, Wallukat G. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 2005;352:558-69.

Eddy, A.A. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr. Nephrol.* 2000, 15, 290–301.

Gangappa, S., Kokko, K. E., Carlson, L. M., Gourley, T., Newell, K. A., Pearson, T. C., Ahmed, R., Larsen, C., P. Immune responsiveness and protective immunity after transplantation. *Transplant International.* 2008, 21(4), 293-303.

Gangur V, Simons FE, Hayglass KT. Human IP-10 selectively promotes dominance of polyclonally activated and environmental antigen-driven IFN- γ over IL-4 responses. *FASEB J.* 1998;12(9):705-13.

Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer.* 2015;15:577.

Gulec, B. Ischemia Reperfusion Injury in Kidney Transplantation, Kidney Transplantation - New Perspectives, Magdalena Trzcinska (Ed.) 2011.

Halloran, P. F., Aprille, M. A., Farewell, V., et al. Early function as the principal correlate of graft survival. A multivariate analysis of 200 cadaveric renal transplants treated with a protocol incorporating antilymphocyte globulin and cyclosporine. Transplantation 1988 46: 223 – 228.

Hancock, W.W. Chemokines and transplant immunobiology. J. Am. Soc. Nephrol. 2002, 13, 821–824.

Hazenbergh, M. D., Spits, H. Human innate lymphoid cells. 2014, Blood 124, 700-707.

Hribova P., Lacha J., Kotsch K., Volk HD., Brabcova I., Skibova J., Vitko S., and Viklicky O. Intrarenal cytokine and chemokine gene expression and kidney graft outcome. Kidney Blood Press Res. 2007;30(5):273-82.

Hwang Sue-Yun, Ju-Young Kim, Kyoung-Woon Kim, Mi-Kyung Park, Youngmee Moon, Wan-Uk Kim, Ho-Youn Kim. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF- κ B- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. Arthritis Res Ther. 2004; 6(2): R120–R128.

Jassem, W., Fuggle, S. V., Rela, M., Koo, D. D. H., Heaton, N. D. The Role of Mitochondria in Ischemia / Reperfusion Injury. Transplantation 2002, 73(4): 493–499.

Kalia, V., Sarkar, S., Gourley, T. S., Rouse, B. T., Ahmed, R. Differentiation of memory B and T cells. Current Opinion in Immunology. 2006, 18(3), 255-264.

Kang, K. J. Mechanism of Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury and Protection Against Reperfusion Injury. Transplantation Proceedings 2002, 34: 2659–2661

Kim, I. K., Bedi, D. S., Denecke C., Ge ,X., Tullius, S. G. Impact of innate and adaptive immunity on rejection and tolerance. Transplantation 2008;86:889-94.

Klose CSN, Flach M, Möhle L, Rogell L, Hoyler T, Ebert K, Fabiunke C, Pfeifer D, Sexl V, Fonseca-Pereira D, Domingues RG, Veiga-Fernandes H, Arnold SJ, Busslinger M, Dunay IR, Tanriver Y, Diefenbach A. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid lineages. 2014, Cell 157, 340-356.

Koo, D. D. H., Fuggle, S. V. Impact of ischemia/reperfusion injury and early inflammatory responses in kidney transplantation. Transplant Rev 2000; 14: 210-224.

Koo, D. D. H., Fuggle, S. V. Chemokines in ischemia/reperfusion injury. Current Opinion in Organ Transplantation 2002, 7:100–106.

Koo, D. D. H; Welsh, K. I.; Roake, J. A.; Morris, P. J., Fuggle, S. V. Ischemia/Reperfusion Injury in Human Kidney Transplantation An Immunohistochemical Analysis of Changes after Reperfusion *Am J Pathol* 1998, 153:557–566.

Kuai Wen-Xia, Qiong Wang, Xiao-Zhong Yang, Yao Zhao, Ren Yu, and Xiao-Jun Tang. Interleukin-8 associates with adhesion, migration, invasion and chemosensitivity of human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol*. 2012 Mar 7; 18(9): 979–985.

Kwiatkowska E., Domanski L., Boberb J., Safranows K., Zymanska-Pasternak J., Suleckab A., Pawlikd A., Ciechanowskia K. and Kwiatkowskie S. Urinary IL-8 is a marker of early and long-term graft function after renal transplation. *Renal Failure*, 2017. Vol. 39, No. 1, 484–490.

Larsen, C. P., Morris, P. J., Austyn, J. M. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens: a novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med* 1990;171:307-14.

Lee Hyo Jin, Ik-Chan Song, Hwan-Jung Yun, Deog-Yeon Jo, and Samyong Kim. CXC chemokines and chemokine receptors in gastric cancer: From basic findings towards therapeutic targeting. *World J Gastroenterol*. 2014 Feb 21; 20(7): 1681–1693.

Lynch, R. J., Platt, J. L. Accommodation in organ transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant*. 2008;13:165-70.

Martinez, O. M. a Rosen, H. R. Basic concepts in transplant immunology. *Liver Transplantation*. 2005, 11(4), 370-381.

Martín-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. 2004, *Nat Immunol.*, 1260-5.

Massberg, S., Messmer, K. The Nature of Ischemia/Reperfusion Injury. *Transplantation Proceedings* 1998, 30, 4217–4223

Matl I., Hribova P., Honsova E., Brabcova I., and Viklicky O. Pontential Predictive Markers in Protocol Biopsies for Premature Renal Graft Loss. *Kidney Blood Press Res* 2010;33:7–14. Czech Republic. 2010.

Middleton, J., Patterson, A. M., Gardner, L., Schmutz, C., Ashton, B. A. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 2002; 100:3853-60.

Mikolajczyk TP, Nosalski R, Szczepaniak P, Budzyn K, Osmenda G, Skiba D, Sagan A, Wu J, Vinh A, Marvar PJ, Guzik B, Podolec J, Drummond G, Lob HE, Harrison DG, Guzik TJ. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-

cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *FASEB J.* 2016; 30(5): 1987–1999.

Moretta, A., Marcenaro, E., Sivori, S., Della Chiesa, M., Vitale, M., Moretta, L. Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. 2005, *Trends Immunol.*, 668-75.

Mortier A, Berghmans N, Ronsse I, Grauven K, Stegen S, Van Damme J, Proost P. Biological Activity of CXCL8 Forms Generated by Alternative Cleavage of the Signal Peptide or by Aminopeptidase-Mediated Truncation. *PLoS One.* 2011; 6(8): e23913.

Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., Power, C.A. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2000, 52, 145–176.

Nankivell, B. J., Alexander, S. I. Rejection of the Kidney Allograft. *N. Engl. J. Med.* 2010;363:1451-62.

Panzer, U., Reinking, R.R., Steinmetz, O.M., Zahner, G., Sudbeck, U., Fehr, S., Pfälzer, B., Schneider, A., Thaiss, F., Mack, M., Conrad, S., Huland, H., Helmchen, U., Stahl, R.A. CXCR3 and CCR5 positive T-cell recruitment in acute human renal allograft rejection. *Transplantation* 2004, 78, 1341–1350.

Ploeg, R. J., Vreugdenhil, P., Goossens, D., Mcanulty, J. F., Southard, J. H., Belzer, F. O. Effect of pharmacologic agents on the function of the hypothermically preserved dog kidney during normothermic reperfusion. *Surgery* 1988, 103: 676-683

Ponticelli C. Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(6):1134-40.

Ponticelli CE. The impact of cold ischemia time on renal transplant outcome. *Kidney Int.* 2015;87(2):272-5.

Proost P, Verpoest S, Van de Borne K, Schutyser E, Struyf S, Put W, Ronsse I, Grillet B, Opdenakker G, Van Damme J. Synergistic induction of CXCL9 and CXCL11 by Toll-like receptor ligands and interferon- γ in fibroblasts correlates with elevated levels of CXCR3 ligands in septic arthritis synovial fluids. *J Leukoc Biol.* 2004;75(5):777-84.

Rainczuk A, Rao J, Gathercole J, Stephens AN. The emerging role of CXC chemokines in epithelial ovarian cancer. *Reproduction.* 2012;144(3):303-17.

Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N., Forsthuber, T. G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine.* 2015, 74(1), 5-17.

Raza A., Firasat S., Khaliq S., Khan AR., Mahmood S., Aziz T., Mubarak M., Naqvi SA., Rizvi SA., Abid A. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1/CCL2) Levels and Its Association with Renal Allograft Rejection. *Immunol Invest.* 2017;46(3):521-262.

Robert I., Reisman L. Serial evaluation of cell surface markers for immune activation after acute renal allograft rejection by urine flow cytometry - correlation with clinical outcome. *Transplantation.* 2001;71(9):1317-20.

Romagnani P, Crescioli C. CXCL10: a candidate biomarker in transplantation. *Clin Chim Acta.* 2012;413(17-18):1364-73.

Roy Ishan, BS, Douglas B. Evans, MD, and Michael B. Dwinell, PhD. Chemokines and chemokine receptors: Update on utility and challenges for the clinician. *Surgery.* 2014; 155(6): 961–973.

Rüster M., Sperschneider H., Fünfstück R., Stein G., and Gröne HJ. Differential expression of beta-chemokines MCP-1 and RANTES and their receptors CCR1, CCR2, CCR5 in acute rejection and chronic allograft nephropathy of human renal allografts. *Clin Nephrol.* 2004;61(1):30-9.

Sallusto, F., Geginat, J., Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Ann Rev Immunol* 2004;22:745-763.

Segerer, S., Banas, B., Wornle, M., Schmid, H., Cohen, C.D., Kretzler, M., Mack, M., Kiss, E., Nelson, P.J., Schlondorff, D., Gröne, H.J. CXCR3 is involved in tubulointerstitial injury in human glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* 2004, 164, 635–649.

Segerer, S., Bohmig, G.A., Exner, M., Kerjaschki, D., Regele, H., Schlondorff, D. Role of CXCR3 in cellular but not humoral renal allograft rejection. *Transpl. Int.* 2005, 18, 676–680.

Segerer, S., Cui, Y., Hudkins, K.L., Goodpaster, T., Eitner, F., Mack, M., Schlondorff, D., Alpers, C.E. Expression of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor chemokine receptor 2 in human crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000, 11, 2231–2242.

Segerer, S., Nelson, P.J., and Schlondorff, D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000, 11, 152–176.

Shapiro H. M. (2005): *Practical Flow Cytometry.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. *Acta Pharmacol Sin.* 2007;28(7):1037-44.

Schmouder RL., Streiter RM., Walz. A., and Kunkel SL. Epithelial-derived neutrophil-activating factor-78 production in human renal tubule epithelial cells and in renal allograft rejection. *Transplantation*. 1995;59(1):118-24.

Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008;8:753-60.

Southard, J. H., Rice, M. J., Ametani, M., Belzer, F. O. Effects of short-term hypothermic perfusion and cold storage on function of the isolated-perfused dog kidney. *Cryobiology* 1985, 22: 147-155.

Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie AN, Mebius RE, Powrie F, Vivier E. Innate lymphoid cells-a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13, 2013, 145-149.

Stewart, J. Innate and acquired immunity. In: Greenwood, D., Barer, M., Slack, R., Irving, W. *Medical Microbiology: With STUDENT CONSULT online access*. 18th edition. The Great Britain: Churchill Livingstone, 2012, s. 9-28.

Sumitran-Holgersson, S. Relevance of MICA and other non-HLA antibodies in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol* 2008;20:607-13.

Sun Q, Liu ZH, Ji S, Chen J, Tang Z, Zeng C, Zheng C, Li LS. Late and early C4d-positive acute rejection: different clinico-histopathological subentities in renal transplantation. *Kidney Int* 2006; 70:377-83.

Terasaki, P. I. Humoral theory of transplantation. *Am. J. Transplant* 2003;3:665-73.

Thorburn E, Kolesar L, Brabcova E, Petrickova K, Petricek M, Jaresova M, Slavcev A, Striz I. CXC and CC chemokines induced in human renal epithelial cells by inflammatory cytokines. *APMIS*. 2009;117(7):477-87.

Toma, H. ABO-incompatible renal transplantation. *Urol. Clin. North. Am.*, 1994, 2 1 :299-3.

Tse GH., Johnston CJ., Kluth D., Gray M., Gray D., Hughes J., and Marson LP. Intrarenal B Cell Cytokines Promote Transplant Fibrosis and Tubular Atrophy. *Am J Transplant*. 2015;15(12):3067-80.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980;26(2):171-6.

Ulvmar Maria Helena, Elin Hub, and Antal Rot. Atypical chemokine receptors. *Exp Cell Res.* 2011; 317(5): 556–568.

Vermi W, Lonardi S, Bosisio D, Uguccioni M, Danelon G, Pileri S, Fletcher C, Sozzani S, Zorzi F, Arrigoni G, Doglioni C, Ponzoni M, Facchetti F. Identification of CXCL13 as a new marker for follicular dendritic cell sarcoma. *J Pathol.* 2008;216(3):356-64.

Viklicky O., Hribova P., Volk H., Slatinska J., Petrsek J., Bandur S., Honsova E., and Reinke P. Molecular Phenotypes of Acute Rejection Predict Kidney Graft Prognosis. Czech Republic and Germany. *J Am Soc Nephrol* 21: 173–180, 2010.

Viklicky, O., Janoušek, L., Baláž, P. Transplantace ledviny v klinické praxi, Grada Publishing, a.s. 2008

Walz A, Schmutz P, Mueller C, Schnyder-Candrian S. Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease. *J Leukoc Biol.* 1997;62(5):604-11.

Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L., Vivier, E. 2005, *Blood* 106, 2252.

Wang X, Sharp JS, Handel TM, Prestegard JH. Chemokine oligomerization in cell signaling and migration. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013;117:531-78.

Witte A, Chatterjee M, Lang F, Gawaz M. Platelets as a Novel Source of Pro-Inflammatory Chemokine CXCL14. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(4):1684-1696.

Womer, K. L., Vella, J. P., Sayegh, M. H. Chronic allograft dysfunction: mechanisms and new approaches to therapy. *Semin Nephrol* 2000, 20:126–147.

Wood S, Jayaraman V, Huelsmann EJ, Bonish B, Burgad D, Sivaramakrishnan G, Qin S, DiPietro LA, Zloza A, Zhang C, Shafikhani SH. Pro-inflammatory chemokine CCL2 (MCP-1) promotes healing in diabetic wounds by restoring the macrophage response. *PLoS One.* 2014;9(3):e91574.

Wu, A., Buhler, L. H., Cooper, D. K. C. ABO-incompatible organ and bone marrow transplantation: current status. *Transplant International.* 2003, 16(5), 291-299.

Yan Q., Jiang H., Wang B., Sui W., Zhou H., and Zou G. Expression and Significance of RANTES and MCP-1 in Renal Tissue With Chronical Renal Allograft Dysfunction. Nephrology Department of Guilin 181st Hospital, Guangxi Key Laboratory of Metabolic Diseases Research, Guangxi, China and Department of Urology, The Fifth Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zhuhai, China. 2016.

Yoshimoto, K., Wada, T., Furuichi, K., Sakai, N., Iwata, Y., Yokoyama, H. CD68 and MCP-1/CCR2 expression of initial biopsies reflect the outcomes of membranous nephropathy. *Nephron Clin. Pract.* 98, 2004, c25–34.

Zhu, J., Yamane, H., Paul, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 2010; 28:445-489.