

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Pavlína Javorová

Interakce lidských imunitních buněk s ultramalými nanočásticemi
Interaction of human immune cells with ultrasmall nanoparticles

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze, 5.1.2021

Podpis

Pavλίna Javorová

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som rada pod'akovala svojej školiteľke doc. RNDr. Marii Hubálek Kalbáčovej, Ph.D, za jej cenné odborné rady, ochotu a čas , ktorý mi venovala v priebehu vypracovania tejto diplomovej práce.

Zároveň by som chcela pod'akovať všetkým kolegyniam z nášho laboratória za ich pomoc a prínosné rady, ktoré mi poskytli počas celej doby, ktorú som tu strávila.

Abstrakt

Aplikace nanočástic v oblasti teranostiky vyžaduje znalost specifické interakce nanočástic s imunitním systémem. Jedny z prvních buněk, se kterými nanočástice po vstupu do těla interagují jsou buňky mononukleárního fagocytárního systému.

Cílem diplomové práce je připravit in vitro studii, která popisuje vliv dvou druhů zlatých a tří druhů křemíkových ultramalých nanočástic na imunitní buňky. Imunitní buňky jsou prezentovány v podobě primárních PBMC izolovaných z plné krve a buňky monocytární buněčné linie THP-1 v podobě monocytů a diferencovaných makrofágů. V průběhu experimentů s primárními buňkami je kladen důraz na zachování konceptu personalizované proteinové korony. Po charakterizaci použitých imunitních buněk jsou následně buňky stimulovány ultramalými nanočásticemi a je sledován vliv těchto nanočástic na buněčný metabolismus, životnost, stupeň diferenciací a sekreci pro- a protizánětlivých cytokinů. Výsledkem analýzy je zohlednění dalšího použití testovaných nanočástic v oblasti biomedicíny.

Klíčová slova: primární monocyty, buněčné linie, diferenciací, makrofágy, cytokiny, cytotoxicita

Abstract

The application of nanoparticles in the field of theranostics requires knowledge of the specific interaction of nanoparticles with the immune system. One of the first cells with which nanoparticles interact when given to the body are cells of the mononuclear phagocytic system. The aim of this diploma thesis is to prepare an in vitro study that describes the effect of two types of gold and three types of silicon ultra-small nanoparticles on immune cells. Immune cells are presented in the form of primary PBMCs isolated from whole blood, and cells of monocytic cell line THP-1 in the form of monocytes and differentiated macrophages. During the experiments with primary cells, emphasis is placed on maintaining the concept of personalized protein corona. After characterization of the immune cells used, cells are subsequently stimulated with ultra-small nanoparticles and the influence of these nanoparticles on cell metabolism, viability, degree of differentiation and secretion of pro- and antiinflammatory cytokines is monitored. The outcome takes into account further use of the tested nanoparticles in the field of biomedicine.

Key words: primary monocytes, cell lines, differentiation, macrophages, cytokines, cytotoxicity

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Prehľad literatúry	11
2.1	Bunky imunitného systému	11
2.2	Zlaté a kremíkové nanočastice.....	13
2.3	Definovanie nanočastíc	13
2.4	Interakcia nanočastíc s biologickým prostredím.....	14
2.5	Spôsoby vstupu nanočastíc do bunky.....	16
2.6	Lokalizácia ultramalých nanočastíc vo vnútri bunky.....	17
2.7	Cytotoxicita nanočastíc	17
2.8	Použitie ultramalých zlatých a kremíkových nanočastíc v teranostike.....	18
3	Ciele práce	19
4	Materiály a metódy.....	20
4.1	Materiály.....	20
4.1.1	Biologický materiál izolovaný z darcov.....	20
4.1.2	Bunky	20
4.1.3	Nanočastice.....	21
4.2	Metódy a techniky.....	24
4.2.1	Odber biologického materiálu	24
4.2.2	Frakcionácia plnej krvi.....	24
4.2.3	Kultivačné podmienky a pasážovanie	28
4.2.4	Diferenciácia buniek	30
4.2.5	Doba zdvojenia buniek.....	31
4.2.6	Experimentálne podmienky.....	31
4.2.7	Meranie metabolickej aktivity a životnosti buniek.....	35
4.2.8	Prietoková cytometria	39
4.2.9	Farbenie	42

4.2.10	Mikroskopia.....	44
4.2.11	Cytokínový profil buniek	45
4.3	Štatistické metódy a techniky	47
5	Výsledky	47
5.1	Výber protokolu na separáciu buniek z plnej krvi	47
5.2	Všeobecná charakterizácia buniek	50
5.2.1	Bunky bunkovej línie THP-1	50
5.2.2	Primárne bunky	64
5.3.	Experimenty s nanočasticami	76
5.2.3	Experimenty so zlatými nanočasticami	77
5.2.4	Experimenty s kremíkovými nanočasticami	94
6	Diskusia	102
6.1	Výber vhodnej metódy izolácie buniek	102
6.2	Charakteristika monocytárnej populácie	103
6.3	Charakteristika diferencovaných buniek	104
6.4	Analýza odpovedi buniek na stimuláciu nanočasticami	107
7	Záver	110
8	Zoznam použitej literatúry	111

Zoznam skratiek

% (V/V)	objemové percento
7AAD	7-aminoaktinomycínu D
APC	allofykocyanin
ATP	adenozín-5'-trifosfátu
AuPEG NP	zlatá nanočastica modifikovaná PEG
AuPEG-NH ₂ NP	zlatá nanočastica modifikovaná PEG- NH ₂
CD	z angl. cluster of differentiation
DAPI	4',6-diamidín-2-fenylindol
dH ₂ O	destilovaná voda
ECAR	extracellular acidification rate
EDTA	kyseliny etyléndiamintetraoctovej
ELISA	z angl. enzyme-linked immuno sorbent assay
FACS	z angl. fluorescent activated cell sorting
FBS	fetálne bovinné sérum
FITC	fluorescein isotiokyanát
FSC	z angl. forward scatter
GM-CSF	z angl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HEPES	pufrovacie činidlo zwitterionovej kyseliny sulfónovej
IL-x	interleukín
LPS	lipopolysacharid
M-CSF	z angl. macrophage colony-stimulating factor
MDM3	Makrofág stimulovaný 3 dni PMA
MDM6	Makrofág stimulovaný 3dni PMA+ 3 dni fáza odpočinku
NP	z angl. nanoparticle
OCR	z angl. oxygen consumption rate- spotreba O ₂
PBMC	z angl. peripheral blood mononuclear cells
PBS	fosfátový pufer
PE	R- fykoerytrín
PEG	polyetylénglykol
PEG-NH ₂	polyetylénglykol terminovaný tiolovou skupinou
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate

SD	z angl. standard deviation
SiC NP	kremíková nanočastica
SiCNH ₂ NP	kremíková nanočastica
SiCOH17 NP	kremíková nanočastica, šarža 2017
SiCOH20 NP	kremíková nanočastica, šarža 2020
SSC	z angl. side scatter
STED	z angl. stimulated emission depletion microscopy
TEM	transmisná elektrónová mikroskopia
TNF- α	tumor- nekrotizujúci faktor alfa

1 Úvod

V posledných rokoch došlo k veľkému pokroku vo výskume a následnej aplikácii nanomateriálov do oblasti biomedicíny. Výskum je zameraný na odhalenie potenciálnej cytotoxicity nanočastíc, ich distribúciu na úrovni organizmu a buniek a vyvolania bunkovej odpovedi. Či už sú nanočastice použité za účelom zobrazovania, diagnostiky alebo cielej terapie, po podaní nanočastíc do tela dochádza vždy k odpovedi imunitného systému. Odpoveď imunitného systému na úrovni buniek po zacielenom podaní nanočastíc nebola doteraz detailnejšie charakterizovaná. Reakcia organizmu na zvolenú terapiu nesúvisí iba s reakciou zacieleného orgánu, ale aj s odpoveďou imunitného systému. Preto sa predpokladá, že všetky nanočastice majú určitý imunomodulačný účinok, ktorý by mal byť skúmaný *in vivo* či *in vitro* štúdiou. Literárny úvod poskytuje stručný prehľad o spôsobe špecifickej interakcie nanočastíc so živým systémom. Tieto zákonitosti je treba ďalej zohľadniť pri príprave štúdie, v jej priebehu a pri konečnej analýze.

2 Prehľad literatúry

2.1 Bunky imunitného systému

Ľudská krv sa skladá z dvoch hlavných frakcií- plazma a bunky. Samostatnú frakciu, ktorá nie je často spomínaná tvoria vačky nachádzajúce sa voľne v plazme (Savelyeva *et al.*, 2017).

Dôležitou bunkovou populáciou z hľadiska imunitných reakcií sú leukocyty. Sú tvorené dvomi majoritnými populáciami- polymorfonukleárnymi a mononukleárnymi bunkami. Preferenčná izolácia mononukleárov je založená na ich rozdielnej vznášavej hustote. Následnou purifikáciou monocytárnej populácie od lymfocytov je možné získať bunky profesionálnych fagocytov (Gill, 2019).

Vrstva mononukleárných fagocytov zahŕňa imunitné bunky pôvodom z hematopoietickej bunky z kostnej drene, ktoré cirkulujú v krvi ako monocyty a po adekvátnom stimule sú schopné infiltrovať tkanivo kde vystupujú v podobe diferencovaných makrofágov alebo dendritických buniek. Tieto bunky sú schopné nešpecifického pohlcovania cudzorodého materiálu a apoptotických buniek z okolia (Hume, 2006; Jenner *et al.*, 2014).

Ľudské monocyty tvoria významnú časť adaptívnej imunity. Vyznačujú sa vysokým stupňom plasticity. Populácia cirkulujúcich monocytov/ makrofágov je geneticky veľmi rôznorodá (Cormican & Griffin, 2020). Monocyty sú najčastejšie klasifikované do troch subpopulácií na základe fenotypu- expresie špecifických povrchových molekúl CD14 a CD16. Klasické monocyty tvoria majoritnú subpopuláciu, sú charakterizované ako CD14⁺⁺ CD16⁻ bunky. Druhou najabundantnejšou populáciou sú tzv. intermediárne monocyty, ktoré na svojom povrchu exprimujú oba typy CD molekúl a sú charakterizované ako CD14⁺ CD16⁺ monocyty. Monocyty CD14⁻ CD16⁺ sú nazývané neklasické monocyty a tvoria najmenšiu populáciu monocytov v krvi zdravého jedinca (Ziegler-Heitbrock, 1996). Novšie štúdie ale ukazujú, že genetická variabilita existuje aj na úrovni týchto subpopulácií a celková heterogenita monocytov by nemala byť charakterizovaná len na základe ich fenotypu (Merah-Mourah *et al.*, 2020). Tiež sa ukázalo, že existuje preukázateľná intraindividuálna heterogenita monocytárnej populácie u zdravých jedincov v expresii typických povrchových markerov pre populáciu monocytov/ makrofágov, ktorými sú CD11b, CD14, CD 16, CD 68, CD 163, CD 206. Bolo zároveň detekovaných viacero súvislostí medzi zmenou expresie špecifických povrchových CD markerov monocytov/ makrofágov a konkrétnou diagnózou (Cornwell *et al.*, 2018; Fadini *et al.*, 2013; Prat *et al.*, 2020).

CD 11b je typ $\beta 2$ integrínu, viaže široké spektrum ligandov, po väzbe komplementových proteínov sprostredkúva fagocytózu opsonizovaných partikulí (Podolnikova *et al.*, 2015).

CD 14 je považovaná za marker ľudských monocytov. Ide o LPS- väzobný proteín exprimovaný aj na makrofágoch (Sugawara *et al.*, 1999).

Subpopulácia monocytov exprimuje povrchový receptor CD 16, ktorým bunka rozpoznáva infikované a nádorové bunky a mediuje cytotoxickú odpoveď.

CD68 proteín je exprimovaný monocytmi aj makrofágmi (Pulford *et al.*, 1990). Je majoritne lokalizovaný intracelulárne, ale je detekovaný aj ako povrchový marker. Jeho presná úloha nie je objasnená, ale je považovaný za markerový proteín poškodeného a nádorového tkaniva (Chistiakov *et al.*, 2017).

CD163 má funkciu receptora a transportéru hemoglobínu v makrofágoch. Je exprimovaný aj infiltrujúcimi monocytmi. (Schaer *et al.*, 2006)

Manózoový receptor CD 206 je exprimovaný na makrofágoch a dendritických bunkách. Je dôležitý pri procese fagocytózy cudzorodých látok. (Azad *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2018)

Model dynamiky monocytárnej populácie spočíva v premene klasických monocytov, ktorých doba cirkulácie je približne 24 hodín na cirkulujúce intermediárne monocyty. Väčšina klasických monocytov ale z cirkulácie putuje cez endotel do tkanív alebo zomiera. Intermediárne monocyty môžu v krvi cirkulovať až štyri dni a predpokladá sa, že väčšina z nich je premenená na neklasické monocyty. Neklasické monocyty majú najdlhšiu dobu cirkulácie (až 7 dní) a pokiaľ neprechádzajú endotelom do tkaniva, tak približne po týždni zomierajú apoptózou (Patel *et al.*, 2017).

Po obdržaní špecifického signálu môžu monocyty diferencovať v makrofágy a infiltrovať sa do miesta poškodenia. Monocyt pri diferenciácii prechádza morfolofickými zmenami-zväčšuje sa objem cytoplazmy (Sokol *et al.*, 1987), zvyšuje sa vnútorná granularita buniek (McCullough *et al.*, 1999) a z pôvodne suspenzných monocytov sa stávajú adherentné bunky (Chang *et al.*, 2009). Infiltrujúce monocyty /makrofágy sú schopné prechádza endotelom do miesta poškodenia v tkanive, ale bolo zistené, že väčšina populácie rezidentných tkanivových makrofágov je založená už v období intrauterinného vývoja jedinca (Schulz *et al.*, 2012) a je udržiavaná ich lokálnou proliferáciou po celý život. Na jej obnove sa infiltrujúce monocyty podieľajú len minimálne (Soucie *et al.*, 2016).

Podľa signálu, ktorý vedie k diferenciácii monocytu vznikajú cytotoxické M1 makrofágy, ktoré sú charakteristické prozápalovou polarizáciou imunitnej odpovede. Sú charakteristické zvýšenou mierou expresie povrchovej molekuly CD11b a CD 68 a expresiou enzýmu inducibilná NO syntáza. Môžu vznikáť ale aj M2 makrofágy indukujúce protizápalovú

odpoveď a procesy hojenia. Tieto sú typické zvýšenou mierou expície CD163 a CD206 molekúl na svojom povrchu a expíciou arginázy (Venosa *et al.*, 2016). V *in vitro* podmienkach sa používa k diferenciacii monocytov do M1 makrofágov M-CSF a následne polarizácia LPS. M1 makrofágy sú tiež nazývané klasicky aktivované. K diferenciacii do alternatívne aktivovaných makrofágov M2 sa využíva protokol s použitím M-CSF a následnou polarizáciou IL-4 (Young *et al.*, 1990; Kreutzenberg & Vigili, 2013).

2.2 Zlaté a kremíkové nanočastice

Zlaté nanočastice patria medzi štandardne používaný materiál v oblasti nanomedicíny. Z počiatku boli aplikované z dôvodu biokompatibility zlata, ktoré je v medicíne používané už dlhé roky. Pribúdajúcimi štúdiami skúmajúcimi cytotoxicitu a imunogénnosť zlatých nanočastíc bola potvrdená aj biokompatibilita nanozlata. (Orlando *et al.*, 2016; Shukla *et al.*, 2005).

Nanočastice na bázi kremíku boli v minulosti preferenčne využívané v oblasti technológií. Pribúdajúcimi štúdiami s pozitívnymi výsledkami porovnávajúcimi vplyv kremíku v podobe mikročastíc a nanočastíc na ľudské telo sa ich aplikácia presunula aj do oblasti biomedicíny a spolu so zlatými nanočasticami sú najčastejšie používanými nanomateriálmi v oblasti humánnej diagnostiky a terapie. (Jaganathan & Godin, 2012)

Aj keď oba typy nanočastíc všeobecne vykazujú dobrú biokompatibilitu s ľudskými bunkami v *in vitro* aj *in vivo* štúdiách, nie je možné tieto výsledky zovšeobecniť a je potrebné ku každej potenciálnej aplikácii nanočastíc pristupovať veľmi individuálne, vzhľadom na cieleňý objekt ich aplikácie. Všetky štúdie preukazujú, že použitie akéhokoľvek druhu nanočastíc vo vysokých koncentráciách vyvoláva cytotoxický efekt bez ohľadu na jeho biokompatibilitu pri použití v nižších koncentráciách. Pre aplikáciu nanomateriálu v podmienkach *in vivo* je nutné, aby bola prevedená precízna charakteristika daného nanomateriálu v *in vitro* štúdií.

2.3 Definovanie nanočastíc

Nanomateriál tvorí heterogénna skupina nanomateriálov na báze uhlíku, polymérnych a kovových nanomateriálov. Ich výsledné vlastnosti sú určené chemickým zložením,

veľkosťou, povrchovou modifikáciou a tvarom. Nepredpokladajú sa totožné vlastnosti s príslušným mikro- a makromateriálom (Schwirn *et al.*, 2014).

Samostatnou podskupinou nanomateriálov sú nanočastice. Sú definované ako nanoobjekty, ktorých všetky vonkajšie rozmery sú v rozmedzí nanoškály (1- 100 nm) a ktorých dĺžky najdlhšej a najkratšej osi sa výrazne nelíšia (ISO/TS 80004-2:2015(en)). Nanočastice sa nachádzajú všade okolo nás. Vznikajú cielene alebo ako vedľajšie produkty rôznych procesov v prírode a technológiách (ISO/TS 80004-1:2015(en)). Za ultramalé nanočastice sú v biologickom kontexte väčšinou považované nanočastice s priemerom do 10 nm (Yu *et al.*, 2017). Medzi ultramalé nanočastice sú zaradované aj kvantové bodky (QD). Sú vyčlenené ako samostatný druh nanočastíc vzhľadom k svojim elektrickým a optickým vlastnostiam, ktoré súvisia s ich chemickým zložením a veľkosťou. Typicky ide o častice s veľkosťou 1,5 – 10 nm (Bera *et al.*, 2010).

Ultramalé nanočastice sú schopné prestupovať glomeruly v obličkách a tak sú rýchlo z cirkulácie odstránené vylučovacou sústavou. Tento spôsob ich eliminácie z tela zvyšuje bezpečnosť ich použitia (K. P. García *et al.*, 2014).

Nanomateriály majú široké spektrum využitia. Prehľad literatúry sa sústreďuje na popisovanie vlastností nanomateriálu, ktoré sú dôležité pre jeho aplikáciu v oblasti výskumu a biomedicíny.

2.4 Interakcia nanočastíc s biologickým prostredím

Po vystavení nanočastíc biologicky komplexnému prostrediu dochádza k masívnej adsorbácii biomolekúl k jej povrchu a vytvoreniu tzv. biomolekulárnej, alebo proteínovej korony. Formovanie proteínovej korony trvá po celú dobu kontaktu nanočastice s biologickým prostredím. Abundantné proteíny v prostredí sa viažu na povrch nanočastice ako prvé a neskôr môžu byť nahradené proteínmi, ktoré sú v prostredí menej abundantné a k povrchu sa viažu pomalšie, často s vyššou afinitou (Cedervall *et al.*, 2007). Molekuly, ktoré sa viažu k povrchu nanočastice priamo, s veľkou silou a vytvárajú monovrstvu tvoria tzv. hard koronu. Na ne sa viažu ďalšie proteíny v niekoľkých vrstvách a vytvárajú tzv. soft koronu. Softkorona predstavuje veľmi dynamickú štruktúru. Posledné štúdie ukazujú, že proteínové zloženie soft a hard korony sú veľmi podobné a hlavným rozdielom je väzbová sila ktorou sa sem proteíny viažu. Soft korona má pravdepodobne väčší vplyv na interakciu buniek s nanočasticami práve kvôli jej dynamickej štruktúre, ktorá odráža molekulárne zloženie prostredia (Mohammad-Beigi *et al.*, 2020). Literatúra nie je konzistentná v otázke vplyvu soft a hard korony na

interakciu s bunkami a táto teória je poslednou publikovanou. Štruktúra proteínovej korony u ultramalých nanočastíc, ktorých rozmery sú častokrát menšie ako rozmery proteínov nie je doposiaľ objasnená.

V roku 2014 bol predstavený koncept tzv. personalizovanej proteínovej korony. Je považovaný za kľúčový faktor v aplikácii nanomaterálov v oblasti biomedicíny. Vychádza zo skutočnosti, že molekulárne zloženie proteínovej korony je určené zdrojom týchto molekúl. Zdrojom molekúl môžu byť v podmienkach *in vivo* rôzne telesné tekutiny, najčastejšie ide o krv. Podľa Plasma Proteome Database bolo dodnes identifikovaných viac ako 10 000 proteínov v proteóme ľudskej plazmy. Predpokladá sa, že väčšina z nich stále identifikovaná nie je. Zloženie krvnej plazmy je individuálne, je podmienené geneticky a aktuálnym zdravotným stavom jedinca (Mohammad J. Hajipour *et al.*, 2014; Nanjappa *et al.*, 2014). Po inkubácii nanočastíc s plazmou pacientov so známou diagnózou a následnej analýze proteínovej korony boli nájdené určité štruktúrne podobnosti v rámci skupín pacientov s rovnakou diagnózou. Medzi skupinami pacientov s rozdielnou diagnózou boli pozorované veľké odlišnosti. Rovnako to bolo aj s výsledkami cytotoxických testov, spôsobe internalizácie nanočastíc do bunky, zmien v produkcii ROS a indukcii zápalovej odpovedi buniek. Výsledné rozdiely medzi skupinami boli väčšinou vyhodnotené ako významné (Mohammad Javad Hajipour *et al.*, 2015). Analýza patologických zmien v plazme pacientov s využitím nanočastíc môže slúžiť ako nový spôsob stanovenia špecifických patologických biomarkerov a následne ako skrínovacia metóda s dobrou senzitivitou a potenciálnou včasnou diagnostikou (Corbo *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2019).

Všetky publikované štúdie sa ale v závere zhodujú v tom, že zloženie proteínovej korony je priamo závislé zložení krvnej plazmy. Zloženie krvnej plazmy je vysoko individuálne a aj napriek existujúcim podobnostiam v rámci určitých skupín pacientov sa nedajú tieto poznatky generalizovať na celú populáciu. Pri aplikovaní získaných poznatkov do praxe je nutné pristupovať striktne individuálne.

V podmienkach *in vivo* nie je zcelo možné eliminovať tvorbu proteínovej korony. Je ale možné do istej miery jej zloženie regulovať. Zatiaľ čo v *in vitro* podmienkach je možné testovať stimuláciu buniek nanočasticami bez proteínovej korony a študovať jej účinok na bunky (Bělinová *et al.*, 2020; Machova *et al.*, 2020). *In vitro* štúdie odhalili, že prítomnosť proteínovej korony má vplyv na cytotoxicitu nanočastíc. Prítomnosť proteínovej korony na nanočasticiach v mnohých prípadoch znižuje ich cytotoxicitu (Mohammad Javad Hajipour *et al.*, 2015; Jafari *et al.*, 2020; Khanal *et al.*, 2020).

Z dôvodu silnej interakcie nanočastíc s biologickým prostredím sú po intravenóznom podaní častice opsonizované a odstránené z cirkulácie fagocytmi. To môže limitovať transport nanočastice do cieľového miesta a dosiahnutie terapeutického účinku. Za účelom stabilizácie nanočastíc a prolongácii ich cirkulácie sú modifikované tzv. „stealth“ polymérmi. Medzi najčastejšiu a najdlhšie používanú modifikáciu patrí PEGylácia. Jedná sa o kovalentné naviazanie reťazca PEG (polyetylén glykol) k povrchu nanočastice pomocou funkčnej skupiny samotného PEG-u alebo jeho derivátu (Fam *et al.*, 2020). Účinok tejto povrchovej modifikácie spočíva v stérickom odpudzovaní proteínov (Jeon *et al.*, 1991). Veľa práci potvrdzuje prolongovanú cirkuláciu takto modifikovaných nanočastíc v *in vivo* modeloch (Abuchowski *et al.*, 1977; Patsula *et al.*, 2019; Sheng *et al.*, 2016; Termsarasab *et al.*, 2014) a tiež menšie množstvo proteínov v štruktúre proteínovej korony (He *et al.*, 2010; Partikel *et al.*, 2019).

European Medicines Agency (EMA) schválila maximálnu dennú dávku 500 mg/ kg PEG a esterov PEG za bezpečnú, bez ohľadu na trvanie a spôsob podania, s výnimkou inhalácie (EMA/CHMP/704195/2013). Dnes je FDA schválených 26 liečiv, ktorých chemická štruktúra obsahuje modifikáciu PEG-om. Jedno z liečiv je na báze nanočastice. Aj keď je dnes PEGylácia schválenou a často používanou chemickou modifikáciou mnohých produktov, ktoré sa dostávajú do priameho kontaktu s ľuďmi, stále sa uvažuje o jeho možnej toxicite.

2.5 Spôsoby vstupu nanočastíc do bunky

Nanočastice prekonávajú fyziologické a imunologické baréry, interagujú s organizmom až na úrovni tkanív a buniek, ktoré dokážu penetrovať. Nanočastice boli detekované v rôznych bunkových kompartmentoch (Barua & Mitragotri, 2014).

V súvislosti s nanočasticami boli popísané rôzne druhy ich vstupu do bunky. Išlo o pasívne aj aktívne transportné mechanizmy. Aktívne boli nanočastice internalizované do vnútra bunky rôznymi endocytickými dráhami- receptorom sprostredkovanou na klatrín závislou endocytózou, receptorom sprostredkovanou na caveolín závislou endocytózou, na klatrín- a caveolín-nezávislou endocytózou a makropinocytózou (Foroozandeh & Aziz, 2018).

Špecifickým druhom endocytózy je fagocytóza. Ide o aktívny proces pohlcovania a eliminácie častíc z okolia, ktorý je typický pre imunitné bunky nazývané profesionálne fagocyty (monocyty, makrofágy, dendritické bunky, neutrofily, osteoclasty). Po rozpoznaní cieľovej častice a aktivácii procesu pohlcovania je častica internalizovaná do vznikajúceho

fagozómu, ktorý maturuje do podoby fagolizozómu, ktorý obsahuje degradačné enzýmy (Uribe-Querol & Rosales, 2020).

Zdá sa, že internalizácia nanočastíc je závislá na aktívnom cytosklete buniek hlavne v prípadoch nanočastíc s polomerom väčším ako 10 nm. Na lokalizáciu nanočastíc s väčším priemerom na bunkovom povrchu ale funkčnosť aktívneho cytosketu buniek pravdepodobne nemá vplyv (C. P. García *et al.*, 2013). V prípade agregácie nanočastíc môžu byť aj ultramálne nanočastice internalizované aktívnym transportom.

2.6 Lokalizácia ultramalých nanočastíc vo vnútri bunky

Distribúcia nanočastíc v bunke závisí na ich veľkosti, spôsobe vstupu častíc do bunky a inkubačnom čase.

Schopnosť ultramalých nanočastíc penetrovať tkanivové bariéry, zdravé aj nádorové bunky kde často prenikajú až do ich jadra je využívaná v oblasti cielej terapie. Po vhodnej povrchovej modifikácii sú použité ako nosiče liečiv či regulátorov génovej expresie. Po vstupe do jadra môžu tieto častice pôsobiť cytotoxicky (Boyoglu *et al.*, 2013) alebo cielene modulovať génovú expresiu (Huo *et al.*, 2019).

2.7 Cytotoxicita nanočastíc

Mnohé štúdie potvrdzujú, že existuje určitá závislosť medzi cytotoxicitou použitých nanočastíc a ich fyzikálno-chemickými vlastnosťami. Bolo ukázané, že na cytotoxicitu použitého nanomateriálu má vplyv tvar a veľkosť častíc (Lee *et al.*, 2019), ich povrchová funkcionizácia (Kapara *et al.*, 2020), zeta potenciál (Shao *et al.*, 2015), ktorý súvisí s ich agregáciou a solubilitou vo vodných roztokoch a tiež inkubačná doba nanočastíc v systéme a zvolená koncentrácia v prostredí (Mohammad Javad Hajipour *et al.*, 2015).

V štúdií, ktorá popisuje distribúciu chemicky rovnakých zlatých nanočastíc s rôznou veľkosťou v organizme a cytotoxicitu bolo dokázané, že neplatí priama závislosť medzi veľkosťou nanočastíc a mierou ich cytotoxicity. Na základe veľkosti nanočastíc pravdepodobne nie je možné ani určiť, akým spôsobom budú nanočastice po intravenóznom podaní preferenčne odstraňované z tela (Boyoglu *et al.*, 2013; X. D. Zhang *et al.*, 2011).

Nie je možné stanoviť pravidlá, ktorými by bolo možné odhadnúť vplyv nanočastíc na sledovaný systém. Z princípu akým nanočastice interagujú s biologickým prostredím, je nutné previesť cieleňú štúdiu vplyvu určitých nanočastíc na každý systém samostatne.

2.8 Použitie ultramalých zlatých a kremíkových nanočastíc v teranostike

V posledných rokoch sa použitie ultramalých zlatých nanočastíc s minimálnym stupňom povrchovej modifikácie sústredilo na ich testovanie v *in vivo* zobrazovaní (Han *et al.*, 2019), ako potenciálnych nosičov liečiv schopných prekonávať tkanivové bariéry s cieleňým transportom do jadra buniek (Sokolova *et al.*, 2020), pre transport liečiv do solídnych nádorov (Bugno *et al.*, 2019) a pre cieleňý transport kombinovaný s konvečnou terapiou nádorov (Luo *et al.*, 2019). Všetky štúdie potvrdili, že ultramale nanočastice na bázi zlata majú vysokú schopnosť penetrácie zdravého aj nádorového tkaniva bez vyvolania abnormálnej imunitnej reakcie a po d'álšej povrchovej modifikácii by mohli byť aplikované ako cieleňé terapeutikum.

Čerstvé výsledky Cambridgskej výskumnej skupiny ukazujú potenciál ultramalých kremíkových nanočastíc špecificky regulovať T bunky. Použitie častice boli schopné priamej väzby na komplex povrchového receptora T buniek a spustiť signálnu dráhu prenášajúcu signál až do jadra buniek (Vis *et al.*, 2018, 2020)

3 Ciele práce

1. Zaviest' metódu na izoláciu ľudských imunitných buniek z plnej žilnej krvi.
2. Zaviest' protokol na diferenciáciu monocytov do makrofágov, respektíve jednotlivých subtypov M0, M1 a M2.
3. Porovnať monocyty a diferencované makrofágy z hľadiska bunkovej morfológie a expresie povrchových CD markerov.
4. Charakterizovať interakciu vybraných imunitných buniek s ultramalými nanočasticami.

4 Materiály a metódy

4.1 Materiály

4.1.1 Biologický materiál izolovaný z darcov

Výsledky publikované v tejto práci zahrňujú experimenty s primárnym materiálom celkovo siedmych darcov. Pre experimenty s nanočasticami boli následne zvolení dvaja darcovia- jedna žena (Darca F) a jeden muž (Darca M) rovnakého veku (rok narodenia 1995) a s rovnakou krvnou skupinou (A, Rh+).

Darcom bola odobratá plná žilná krv na ďalšie spracovanie. Z krvi bola izolovaná plazma, sérum a bunky. Darcovia boli ženy a muži (4 ženy, 3 muži) v čase odberu vzorku vo veku 24- 47 rokov (roky narodenia 1995- 1973), zdraví, bez poruchy krvotvorby, nádorového ochorenia, akéhokoľvek akútneho alebo chronického ochorenia. V čase odberu a minimálne jeden týždeň pred odberom vzorku darca musel byť bez príznakov akútneho ochorenia a nemohol byť ani v štádiu rekonvalescencie. Minimálne mesiac pred odberom darca neužíval žiadne liečivé prípravky. Liečivými prípravkami sú myslené liečivá, tak ako ich definuje Státni ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL). Žiadne kontrolné vyšetrenia a odbery vzorkov za účelom zistenia zdravotného stavu darca neboli z našej strany vykonané. Všetky postupy v tejto štúdiu, ktoré zahrňujú prácu s primárnymi bunkami boli schválené Etickou komisiou Všeobecnej fakultnej nemocnice v Prahe. Každý darca podpísal informovaný súhlas.

4.1.2 Bunky

V tejto štúdiu boli použité ľudské bunky vo forme monocytárnej bunkovej línie THP-1 (American Tissue Culture Collection) a primárnych imunitných buniek izolovaných z plnej žilnej krvi zdravých darcov.

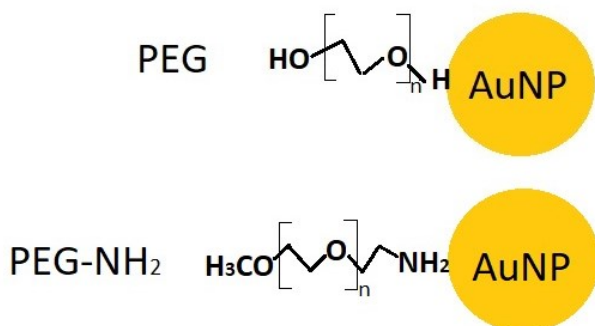
THP-1 bunky boli pôvodne získané z periférnej krvi detského pacienta s akútnou monocytickou leukémiou. Monoblasty boli izolované centrifugáciou v hustotnom gradiente (Tsuchiya *et al.*, 1980). Dnes sú používané ako model ľudských monocytov (Bosshart & Heinzelmann, 2016). Primárne ide o suspenzné bunky. V mojej práci boli diferencované do adherentných buniek pripomínajúcich makrofágy.

Primárne bunky boli zastúpené mononukleárnou frakciou imunitných buniek (PBMC). Primárny izolát predstavoval suspenzné bunky. Tie boli pri niektorých experimentoch diferencované a polarizované do makrofágov.

4.1.3 Nanočastice

4.1.3.1 Zlaté nanočastice

Zlaté nanočastice použité v tejto štúdií boli vyrobené v laboratóriu Ing. Aleny Řezníčkovéj, PhD na Ústave inžinierstva pevných látok VŠCHT v Prahe. Vo všetkých pokusoch bol použitý materiál z jednej šarže. Materiál bol doručený vo forme roztoku konkrétneho typu nanočastíc v destilovanej vode (dH₂O) v sklenenej vialke. Tieto roztoky boli ďalej skladované pri teplote 4 °C a chránené pred svetlom. Pred použitím boli roztoky nanočastíc prefiltrované cez 0,22 µm filter (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švajčiarsko). Nepredpokladajú sa žiadne zmeny chemických, fyzikálnych či biologických vlastností po filtrácii. Zlaté nanočastice boli použité v dvoch variantách- AuPEG NP a AuPEG-NH₂ NP. Ide o ultramalé zlaté nanočastice približne sférického tvaru s naviazaným reťazcom polyetylénglykolov (PEG). AuPEG NP tvorí zlaté sférické jadro s priemerom približne 5,8 nm s naviazaným reťazcom PEG bez terminácie. AuPEG-NH₂ NP sú tvorené rovnakým jadrom s priemerom približne 4,1 nm s naviazaným reťazcom PEG terminovaným amínovou skupinou NH₂ (PEG-NH₂). Grafické znázornenie štruktúry nanočastíc je na Obrázku 1.



Obrázok 1: Grafické znázornenie štruktúry zlatých nanočastíc použitých v tejto práci. V hornej časti obrázku je znázornená štruktúra AuPEG NP, v spodnej AuPEG-NH₂ NP.

Tieto nanočastice vznikli metódou rozprašovania zlata (Au) do zachytávacieho roztoku príslušného PEG-u po dobu 900 s pri teplote 25 °C. Následne bol medziprodukt nariedený s dH₂O v objemovom pomere 1:9. Použitie dH₂O ako rozpúšťadla bolo z dôvodu stabilizácie nanočastíc. OH skupiny PEG-u vytvárajú vodíkové mostíky s molekulami vody, dochádza k vzniku hydratačného obalu, ktorý zvyšuje stabilitu nanočastíc a zabraňuje ich agregácii (Reznickova *et al.*, 2017). Ako kontrolné vzorky pre kultiváciu buniek boli použité rovnaké roztoky príslušných PEG-ov , ktoré sa použili pri výrobe nanočastíc. Roztoky oboch typov nanočastíc boli sfarbené do tmavočervena (koloidné zlato), roztoky príslušných PEG-ov boli

bezfarebné. Koncentrácia nanočastíc vo vodnom roztoku bola $[\text{AuPEG NP}] = 12,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $[\text{AuPEG-NH}_2 \text{ NP}] = 13,9 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Konkrétna šarža nanočastíc použitá v tejto práci bola opakovane zanalyzovaná pre určenie veľkosti nanočastíc metódou TEM. Údaje o veľkosti nanočastíc pochádzajú z tohoto merania.

Výsledky štúdie dr. Rezníčkovej publikované v článku „PEGylated gold nanoparticles: Stability, cytotoxicity and antibacterial activity“ (Reznickova *et al.*, 2019) ukazujú, že sa jedná o nanočastice sférického tvaru s veľmi úzkou distribúciou veľkosti, ktoré prirodzene netvorí zhluky. Z hľadiska teploty a času sú stabilné. Pri použití koncentrácie $14 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ pôsobia oba typy nanočastíc na bunkovú líniu SAOS-2 cytotoxicky, pri koncentrácii $7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ stimulujú bunkový metabolizmus. Ani u jedného typu zlatých nanočastíc nebol preukázaný významný antibakteriálny účinok. Významné charakteristiky nanočastíc sú zhrnuté v Tabuľke 1 (podľa Reznickova *et al.*, 2019).

	AuPEG NP	AuPEG-NH ₂ NP
Priemer podľa TEM [nm]	$5,7819 \pm 0,2844$	$4,1262 \pm 0,1586$
Distribúcia veľkosti [\pm nm]	< 5%	< 4%
Zeta potenciál v dH ₂ O [mV]	-24.7 ± 4.5	-47.0 ± 1.3
Absorpčné maximum SPR [nm]	513	501
Koncentrácia Au v roztoku NPs v dH ₂ O [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	90,4	82,8

Tabuľka 1: Zhrnutie fyzikálno- chemických vlastností AuPEG NP a AuPEGNH₂ NP použitých v tejto práci. Podľa Reznickova *et al.*, 2019.

4.1.3.2 Kremíkové nanočastice

Kremíkové nanočastice použité v tejto štúdii boli vyrobené v laboratóriu profesora Adama Galiho, PhD, DSc vo Wignerovom výskumnom centre pre fyziku Maďarskej akadémie vied v Budapešti, Maďarsko. Materiál bol doručený vo forme roztoku konkrétneho typu nanočastíc v dH₂O v sklenenej vialke. Tieto roztoky boli ďalej skladované pri teplote 4°C a chránené pred svetlom. Pred aplikáciou boli roztoky sonikované v sonikačnom kúpeli po dobu 30 minút a kúpeľ bol chladený ľadom. Kremíkové nanočastice, ktoré predstavovali modifikované alebo nemoifikované kvantové bodky na bázi karbidu kremíku, boli použité

v troch variantách- SiC NP, SiCNH₂ NP a SiCOH NP. Varianta SiCOH NP bola použitá ako dva samostatné vzorky pochádzajúce z rozdielnej šarže- z roku 2017 a 2020 (ďalej označované ako SiCOH17 NP a SiCOH20 NP). Jedná sa o sférické nanočastice s priemerom menším ako 5 nm s normálnou distribúciou veľkosti. Ich zeta potenciál (ζ) vo vode bol približne -35 mV (Beke *et al.*, 2013; Bělinová *et al.*, 2020).

Roztok SiC NP bol sfarbený dožltá, roztoky ostatných kremíkových nanočastíc boli bezfarebné. Koncentrácia nanočastíc v príslušných vodných roztokoch bola c [SiC NP]= 8 mg·ml⁻¹, c [SiOH17 NP]= 1 mg·ml⁻¹, c [SiOH20 NP]= 2 mg·ml⁻¹, c [SiNH₂ NP]= 3 mg·ml⁻¹.

Jednotlivé modifikované druhy nanočastíc vznikli chemickou modifikáciou SiC NP, ktoré boli syntetizované chemickým leptaním kryštalického karbidu kremíku (polytyp 3C-SiC) (Beke *et al.*, 2013). Z kremíkoveho a grafitoveho prášku bol vyrobený karbid kremíku v mikrokryštalickej forme. Ten bol chemickým leptaním vo vodnom roztoku kyseliny fluorovodíkovej (HF) a kyseliny dusičnej (HNO₃) zbavený nečistôt a následne opláchnutý v dH₂O. Proces leptania a oplachu bol zopakovaný, vzorka bola sonikovaná, centrifugovaná a tekutá fáza obsahovala výsledné nanočastice- kremíkové kvantové bodky karbidu kremíku (SiC NP). SiC NP boli ďalej chemicky transformované a povrch nanočastíc bol terminovaný funkčnými skupinami obsahujúcimi kyslík, majoritne karboxylovou skupinou (COOH). Prítomnosť týchto skupín umožňuje ďalšie povrchové modifikácie SiC NP (Szekrényes *et al.*, 2014). Redukciou týchto terminovaných SiC NP tetrahydridoboritanom sodným (Na[BH₄]) vo vodnom prostredí boli syntetizované SiOH NP (Beke *et al.*, 2016). Hydroxylová skupina (OH) SiOH NP bola chemicky aktivovaná použitím aminopropyldimetyloxyasilanu (APDMES). Silanizáciou SiOH NP bol syntetizovaný posledný druh kremíkových nanočastíc použitých v tejto práci- SiCNH₂ NP. Podrobná charakteristika nanočastíc a postup ich výroby sú popísané v článkoch (Beke *et al.*, 2013, 2016; Bělinová *et al.*, 2020; Szekrényes *et al.*, 2014). Výsledky štúdie ukazujúcej vplyv týchto nanočastíc na monocytárnu bunkovú líniu THP-1 z nášho laboratória ukazujú, že povrchová terminácia nanočastíc má zásadný vplyv na metabolickú aktivitu buniek. Rovnako dôležitá je aj prítomnosť proteínovej korony a zvolená koncentrácia nanočastíc. Po dlhodobej kultivácii (7 dní) buniek v prostredí s nanočasticami boli pozorované morfológické zmeny naznačujúce diferenciáciu monocytov. Cytokínový profil monocytickej línie naznačuje, že bunky odpovedajú na prítomnosť všetkých kremíkových nanočastíc použitých v štúdiu. Bunky opôsobené kremíkovými nanočasticami produkovali zvýšené množstvo niektorých prozápalových cytokínov oproti bunkám, ktoré nedošli do kontaktu so žiadnymi nanočasticami (Bělinová *et al.*, 2020). Treba poznamenať, že spôsob kultivácie buniek s kremíkovými nanočasticami v popísanej štúdiu a v tejto práci sa líšia.

4.2 Metódy a techniky

4.2.1 Odber biologického materiálu

Odber plnej krvi bol vykonaný z prístupnej periferej žily v lakt'ovej jamke lekárom. K odberu bol použitý vakuový uzavretý odberový systém. Za účelom izolácie buniek bol odber vykonaný do skúmavky s antikoagulans EDTA BD Vacutainer® K2E (EDTA) s odberovým objemom 6 ml (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Za účelom separácie séra bola použitá skúmavka s barérovým gélom BD Vacutainer® SSTTM II Advanced s odberovým objemom 8,5 ml (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Finálny objem vzorky v rámci jedného odberu bol približne 15- 20 ml žilnej krvi od jedného darcu. To zodpovedá 3- 4 odberovým skúmavkám.

4.2.2 Frakcionácia plnej krvi

Odobratá nekoagulovaná žilná krv bola použitá na izoláciu primárnych buniek a krvnej plazmy. Koagulovaná krv bola použitá k príprave krvného séra.

Z finálneho objemu nekoagulovanej krvi bolo odoberatých 100 μ l vzorky na analýzu krvného obrazu a krvného diferenciálu na analyzéri BC-5300Vet Auto Hemato Analyzer (Mindray Bio-Medical Electronics, Shenzhen, Čína) kalibrovanom pre vzorku ľudskej krvi.

4.2.2.1 Separácia krvnej plazmy a séra

Po odbere žilnej krvi do odberovej skúmavky na separáciu séra bola skúmavka vložená do inkubátora s teplotou 37 °C na 30- 60 minút k samovoľnej koagulácii krvi. Následne bola skúmavka centrifugovaná (3000 \times g, 10 min pri 4 °C) k úplnému oddeleniu koagula od séra. Za sterilných podmienok bolo sérum Pasterovou pipetou prenesené do skúmaviek z polypropylénu a skladované pri -80°C. Po celú dobu práce bola vzorka udržiavaná pri teplote do 8 °C. Vzorka, ktorá bola lipimická, hemolyzovaná alebo ikterická nebola k ďalším postupom a analýzam použitá. Sérum bolo zanalyzované v Laboratóriu klinickej biochémie ÚLBLD Všeobecnej fakultnej nemocnice v Prahe. Elektroforézou boli stanovené nasledovné hodnoty: celkové množstvo bielkovín, albumín, α -1-globulín, α -2-globulín, β -1-globulín, β -2-globulín, γ -globulín, albumino-globulínový kvocient.

Vyzolované sérum nebolo inaktivované a vo všetkých experimentoch tejto práce bolo použité v tejto forme.

Metóda izopyknickej centrifugácie v roztoku Ficoll (popísaná ďalej) umožňovala zo vzorky nekoagulovanej krvi izoláciu krvnej plazmy aj buniek zároveň. Po prvom

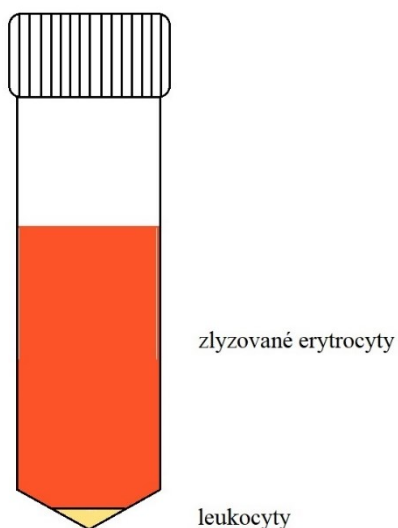
centrifugovaní vzorku došlo k separácii plazmy, ktorá bola odobratá Pasterovou pipetou do skúmaviek z polypropylénu a skladovaná pri -80 °C.

4.2.2.2 Separácia buniek

Separácia buniek z plnej krvi prebiehala vždy zo vzorky nekoagulovanej krvi v sterilných podmienkach laminárneho boxu. Boli použité štyri metódy izolácie (metóda 1- 4), ktoré sa líšia vo výslednom izoláte. Presný počet živých buniek v izoláte bol určený mechanickým počítaním vzorky nafarbenej trypanovou modrou (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) v Burkerovej komôrke. Izoláty boli resuspendované v kultivačnom médiu. Kultivačné médium sa rozumie RPMI 1640 (Biosera, Nuaille, Francúzsko) s obsahom 10 % (V/V) neinaktivovaného autológneho séra alebo fetálneho bovinného séra (FBS), 2 mM L-glutamínu, 10000 u/ml penicilínu a 10 µg/ml streptomycínu (všetky Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Pôvod séra pre kultiváciu primárnych buniek bol volený podľa plánovaných experimentov. Optimalizáciou protokolov a porovnaním príslušných izolátov bola vybraná optimálna metóda izolácie s ohľadom na tému mojej práce. Detaily sú popísané v kapitole 5.

Separácia leukocytov lyzačným roztokom (Metóda 1)

K izolácii leukocytov z plnej krvi bol použitý 0,16 M roztok NH₄Cl v dH₂O s obsahom 0,13 mM kyseliny etyléndiamintetraoctovej (EDTA) a 17,1 mM chloridu sodného (NaCl). Tento roztok preferenčne lyzuje erytrocyty (Chernyshev *et al.*, 2008). Lyzačný roztok bol pridaný k plnej krvi v objemovom pomere 1:10. Zmes bola inkubovaná približne 7 min v tme pri teplote 37 °C. Krv bola následne centrifugovaná (300×g, 5 min pri 22°C). Usporiadanie vzorku po centrifugácii znázorňuje Obrázok 2. Bunková peleta bola premytá v 20 ml fosfátového pufru PBS, centrifugovaná ako v predchádzajúcom kroku a izolát buniek bol resuspendovaný v kultivačnom médiu. Výsledkom separácie lyzačným roztokom NH₄Cl je fáza leukocytov.

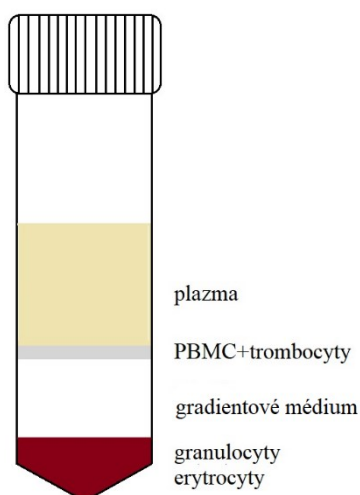


Obrázok 2: Usporiadanie vzorky plnej krvi s lyzačným roztokom NH_4Cl po prvej centrifugácii. Peleta na dne skúmavky je tvorená leukocytárnou populáciou, supernatan obsahuje zlyzované erytrocyty a trombocyty.

Separácia mononukleárných buniek izopyknickou centrifugáciou (Metóda 2)

Mononukleárne krvné bunky (PBMC z angl. peripheral blood mononuclear cells) boli z plnej krvi separované izopyknickou centrifugáciou v hustotnom gradiente. Hustotný gradient tvoril Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA). Ide o roztok vetveného polyméru sacharózy s epichlorohydrínom, diatrizoátom sodným a EDTA.

Na dno centrifugačnej skúmavky bol nanesený Ficoll. Nekoagulovaná krv bola nariadená v objemovom pomere 1:1 s 0,005 % (V/V) roztokom EDTA v PBS a opatrne navrstvená na Ficoll. Po centrifugácii ($400\times g$, 30 min pri 20 °C, brzdenie= 0) bola do polypropylénovej skúmavky odobratá z hornej fáze plazma a uskladnená v -80 °C . Usporiadanie vzorku po centrifugácii znázorňuje Obrázok 3. Prstenec PBMC bol odobratý do samostatnej skúmavky a dvakrát premytý v 0,005 % (V/V) roztoku EDTA v PBS so znižujúcim počtom otáčok centrifugácie ($200\times g$ a $100\times g$, vždy 10 min pri 20 °C). Postupným znižovaním otáčok pri centrifugovaní sa minimalizoval obsah trombocytov vo výslednom izoláte. Výsledný izolát, ktorý predstavovala mononukleárna fáza (PBMC), bol resuspendovaný v kultivačnom médiu.

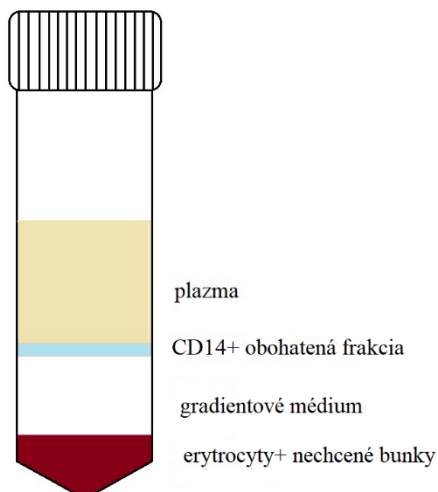


Obrázok 3: Usporiadanie vzorky plnej krvi po centrifugácii nariedenej roztokom EDTA v PBS, ktorá bola navrstvená na separačný polymér Ficoll a centrifugovaná. Prstenec PBMC a plazma boli odobraté do samostatných skúmavok na ďalšiu analýzu.

Separácia monocytmi obohatenej frakcie (Metóda 3)

Použitím komerčnej súpravy pluriSpin® Human Monocyte Enrichment (pluriSelect Life Science, Leipzig, Nemecko) bola vyizolovaná vrstva buniek s obohatenou populáciou monocytov. Produkt funguje na princípe negatívnej selekcie buniek exprimujúcich CD14 molekulu (monocyty). Označuje granulocyty, NK bunky, T aj B lymfocyty, ktoré sú po centrifugácii na gradientovom médiu koncentrované s erytrocytmi v bunkovej pelete. CD14+ bunky ostávajú intaktné a tvoria samostatnú fázu. Jedná sa o rovnaký princíp separácie buniek ako v prípade metódy 2, ale v tejto metóde je cieľová populácia buniek ešte obohatená o CD14+ populáciu. Usporiadanie vzorku po centrifugácii znázorňuje Obrázok 4. Vzhľadom na vstupný materiál by mala izolovaná frakcia obsahovať 84 % - 92 % CD14+ buniek.

Postup separácie prebiehal podľa protokolu výrobcu, ako gradientové médium bolo zvolené Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA). Izolát v podobe populácie buniek bohatej na monocyty bol po izolácii resuspendovaný v kultivačnom médiu.



Obrázok 4: Usporiadanie vzorky plnej krvi po pridaní pluriSpin® roztoku, nariadení PBS a následnej centrifugácii. Prstenec buniek s nabohatenou CD14+ populáciou a plazma boli odobraté do samostatných skúmavok na ďalšiu analýzu.

Sorting monocytov (Metóda 4)

Izoláty leukocytov a mononukleárnych buniek, ktoré boli získané z plnej krvi vyššie popísanými postupmi boli použité na sorting monocytov prietokovým cytometrom. Populácia monocytov bola sortovaná po identifikácii na FSC-A/ SSC-A dot plote a farbenie vzorky nebolo potrebné. Tiež bola vyskúšaná metóda izolácie po farbení vzorku. Monocyty boli izolované ako CD14+ bunky. Primárne izoláty boli farbené v objeme 300 ul protilátkou riedenou v objemovom pomere 1: 100 pri teplote 4 °C, 30 minút, v tme. Bola použitá protilátka antiCD14 konjugovaná s FITC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Cieľová populácia bola sortovaná použitím FACS Aria IIu cell sorter vybaveným piatimi laserami: 355 nm, 405 nm, 488 nm, 561 nm, 633 nm (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) v spolupráci s Ing. Martinom Bájecným (Ústav patologickej fyziológie 1. lekárskej fakulty Univerzity Karlovej, Praha). Sorting prebiehal do skúmavky s kultivačným médiom.

4.2.3 Kultivačné podmienky a pasážovanie

Bunková línia THP-1

THP-1 bunky boli uchovávané v tekutom dusíku v teplote -180 °C . Kryogénne skúmavky s objemom 2 ml (Simport Scientific, Montreal, Kanada) so zamrazenými bunkami boli prenesené do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C na približne 1 minútu. V sterilných podmienkach laminárneho boxu bolo pridaných 700 ul vytemperovaného kultivačného média RPMI 1640 (Biosera, Nuaille, Francúzsko) s obsahom 10 % (V/V) neinaktivovaného FBS, 2

mM L-glutamínu, 10000 u/ml penicilínu a 10 µg/ml streptomycínu (všetky Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Bunková suspenzia bola prenesená do centrifugačnej skúmavky s objemom 15 ml (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švajčiarsko), médium bolo doplnené do objemu 5 ml a bunky boli centrifugované (300×g, 5 min pri 22° C). Po odstránení supernatantu bola bunková peleta resuspendovaná v 1 ml kultivačného média, prenesená do štandardnej kultivačnej fľašky a bunky boli kultivované ako sa popisuje ďalej.

THP-1 bunky boli štandardne kultivované v 25 cm² kultivačných fľaškách (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švajčiarsko) v kultivačnom médiu RPMI 1640 (Biosera, Nuaille, Francúzsko) s obsahom 10% (V/V) neinaktivovaného FBS, 2 mM L-glutamínu, 10000 u/ml penicilínu a 10 µg/ml streptomycínu (všetky Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) v inkubátore (37 °C, 5 % CO₂). Suspenzná monocytárna línia bola kultivovaná pri vysokej konfluencii a koncentrácia buniek bola udržiavaná na hodnote približne 10⁶ buniek/ ml bunkovej suspenzie. Pasážovanie buniek a výmena média prebiehali podľa potreby. Časť bunkovej suspenzie bola odobratá a do kultivačnej fľašky bolo vrátených približne 3 000 000- 4000 000 buniek, objem média bol doplnený do finálnych 5 ml.

Adherentné makrofágy diferencované z monocytárnej línie THP-1 boli vždy čerstvo pripravené pre daný experiment a neboli kultivované dlhodobo. Ich kultivácia v priebehu diferenciacie prebiehala v rovnakom kultivačnom médiu ako v prípade THP-1 monocytov ale s prídavkom diferenciačného agens. Podmienky diferenciacie sú špecifikované v podkapitole „Diferenciácia buniek“. V prípade, že monocytárna línia nedosahovala vysokej konfluencie a koncentrácia buniek v kultúre nebola 1,3 ×10⁶ buniek/ ml a viac, bunky neboli využité k diferenciacii a čakalo sa na dosiahnutie optimálnej konfluencie.

Primárne bunky

Primárny izolát získaný akoukoľvek vopred popisovanou metódou bol kultivovaný v 25 cm² kultivačných fľaškách (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švajčiarsko) v médiu RPMI 1640 (Biosera, Nuaille, Francúzsko) s obsahom 10 % (V/V) neinaktivovaného autológneho séra alebo neinaktivovaného FBS, 2 mM L-glutamínu, 10000 u/ml penicilínu a 10 µg/ml streptomycínu (všetky Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Pôvod séra pre kultiváciu primárnych buniek bol volený podľa plánovaných experimentov. Autológne sérum použité pre kultiváciu nebolo staršie ako jeden mesiac. Pri dlhodobej kultivácii primárne bunky neboli pasážované.

Diferenciácia primárnych buniek do makrofágov prebiehala v štandardnom kultivačnom médiu s autológnym sérom a pridaním cytokínov. Podmienky diferenciácie primárnych buniek sú špecifikované v podkapitole 4.2.4.

Disociácia adherentných makrofágov diferencovaných z bunkovej línie THP-1 alebo primárnych buniek prebiehala enzymaticky, použitím roztoku proteolytických a kolagenolytických enzýmov akutázy StemPro® Accutase® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Bez oplachu buniek bol enzým inkubovaný s bunkami 10-15 minút pri izbovej teplote. K zastaveniu reakcie nebolo nutné pridávať sérum. Spotreba enzýmu bola približne 100 ul akutázy na 1 cm² kultivačnej plochy.

4.2.4 Diferenciácia buniek

Diferenciácia THP-1 monocytov

Diferenciácia monocytov bunkovej línie THP-1 do makrofágov prebiehala pomocou diesteru forbolu (PMA- Phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Bunky boli nasadené v koncentrácii 200 000 buniek/ cm² do štandardného kultivačného média s pridaním PMA. Výsledná koncentrácia PMA sa pohybovala pri optimalizačných experimentoch v rozmedzí 1 μM – 10 nM. Protokol bol optimalizovaný na výslednú koncentráciu PMA 100 nM. Monocyty boli stimulované PMA 3 dni. Po troch dňoch bolo médium vymenené za štandardné kultivačné médium bez diferenciačného agens a bunky boli držané v kultúre ďalšie tri dni-fáza odpočinku. Výsledkom tohoto protokolu sú bunky pripomínajúce makrofágy, ktoré budú v texte označované ako MDM6. Podľa literatúry sa protokolom s fázou odpočinku diferencujú bunky, ktoré morfológicky najviac pripomínajú ľudské makrofágy (Daigneault *et al.*, 2010) a zodpovedajú M0 typu (Genin *et al.*, 2015).

Alternatívne je možné získať makrofágy rovnakým postupom, ale diferenciácia končí v deň 3 po stimulácii PMA a bunky neprejdú fázou odpočinku. Výsledkom tohoto protokolu sú bunky pripomínajúce makrofágy, ktoré budú v texte označované ako MDM3.

Výsledky 3- a 6-dňového protokolu diferenciácie sú popísané v kapitole „Výsledky“.

Diferenciácia primárnych buniek

Diferenciácia do M0 makrofágu

PBMC boli nasadené v koncentrácii 1 000 000 buniek/ ml a inkubované v štandardnom kultivačnom médiu s faktorom stimulujúcim kolónie makrofágov (M-CSF, z angl. Macrophage

Colony-Stimulating Factor) v koncentrácii 50 ng/ ml (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) po dobu 7 dní. V deň 7 sa médium s neadherovanými bunkami odstránilo a adherentné bunky boli považované za makrofágy typu M0. Tie bolo ďalej možné polarizovať.

Diferenciácia do M1 makrofágu

Diferenciácia M1 makrofágov prebehla polarizovaním M0 makrofágov, ktoré boli inkubované s roztokom lipopolysacharidu (LPS) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) v štandardnom médiu po dobu 2 hodín.

Diferenciácia do M2 makrofágu

Diferenciácia M2 makrofágov prebehla polarizovaním M0 makrofágov, ktoré boli inkubované s roztokom interleukínu-4 (IL-4) (10 ng/ ml) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) v štandardnom médiu po dobu 24 hodín.

4.2.5 Doba zdvojenia buniek

Doba zdvojenia buniek bola stanovená pre monocyty a makrofágy pôvodom z bunkovej línie aj primárne bunky. Experiment prebiehal v príslušných kultivačných médiách za štandardných kultivačných podmienok. Počiatočná koncentrácia buniek bola 10 000 buniek/ cm^2 pre THP-1 monocyty, 15 000 buniek/ cm^2 pre THP-1 makrofágy a 10 000 buniek/ cm^2 pre primárne bunky. Bunky línie boli nasadené do 6-jamkovej doštičky s kultivačnou plochou 9,026 cm^2 , primárne bunky boli nasadené do 24-jamkovej doštičky s kultivačnou plochou 1,864 cm^2 (obe TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švajčiarsko). Objem kultivačného média bol použitý podľa odporúčania výrobcu. Po 4 h, 24 h a 48 h boli všetky bunky z jamky pozbierané a bol určený ich počet manuálnym počítaním v Bürkerovej komôrke. V každom časovom intervale boli zanalyzované práve dve jamky. Získané dáta boli analyzované pomocou internetovej stránky <https://doubling-time.com/compute.php> a https://doubling-time.com/compute_more.php (obe V. Roth MD, Doubling Time Calculator (2006)).

4.2.6 Experimentálne podmienky

V tejto práci boli použité zlaté a kremíkové nanočastice charakterizované v kapitole 4.1.3. Tie boli pridané k bunkám v kultivačnej nádobe pre 24-hodinovú stimuláciu. Súčasťou každého

experimentu bola kontrolná vzorka. Kontrolnú vzorku predstavovali bunky kultivované v príslušnom kultivačnom médiu bez prídavku nanočastíc alebo iných stimulačných agens.

V prípade THP-1 monocytov a MDM6 makrofágov boli použité iba zlaté nanočastice a roztoky príslušných PEG-ov. V rámci jedného experimentu boli použité v nasledujúcich koncentráciách:

[AuPEG NP]₁= 1 µg/ ml,

[AuPEG NP]₂= 7 µg/ ml,

[AuPEG NP]₃= 12,2 µg/ ml,

[AuPEG-NH₂ NP]₁= 1 µg/ ml,

[AuPEG-NH₂ NP]₂= 7 µg/ ml,

[AuPEG-NH₂ NP]₃= 13,9 µg/ ml,

[PEG]= 10 % (V/ V),

[PEG-NH₂]= 10 % (V/ V)

V prípade THP-1 buniek bol vykonaný experiment dlhodobej kultivácie (7 dní) THP-1 monocytov s nanočasticami AuPEG NP a AuPEG-NH₂ NP. Nanočastice boli použité v koncentráciách [AuPEG NP]= 12,2 µg/ ml a [AuPEG-NH₂ NP]= 13,9 µg/ ml. Bunky boli nasadené do 6-jamkovej doštičky (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švajčiarsko) v koncentrácii 10 000 buniek/ cm² v štandardnom kultivačnom médiu. K bunkám boli pridané roztoky nanočastíc a bunky boli takto kultivované po dobu 7 dní v inkubátore. Jednu vzorku tvorila nestimulovaná kontrola. V deň 7 boli spravené histologické preparáty príslušných vzoriek ako je popísané v kapitole 4.2.9.1 a bola sledovaná morfológia buniek.

Pri stimulácii primárnych buniek boli použité kremíkové nanočastice aj zlaté nanočastice s roztokmi príslušných PEG-ov. V tomto prípade boli použité ešte dva typy kontrolných vzoriek pre preukázanie biologického účinku nanočastíc. Jednalo sa o bunky stimulované lipopolysacharidom (LPS, 50 µg/ ml) a bunky stimulované médiom s obsahom dH₂O (10 % V/V). Bunky stimulované LPS boli použité ako prozápalová kontrola. Použitá koncentrácia LPS vychádza z predchádzajúcich experimentov z nášho laboratória a je používaná dlhodobo.

Keďže nanočastice boli vo forme vodných roztokov príslušného typu nanočastíc, bolo potrebné použiť kontrolnú vzorku opôsobenú rovnakým množstvom dH₂O pre vylúčenie jej

(osmotického) vplyvu na bunky. V rámci jedného experimentu boli použité stimulačné agens v nasledujúcich koncentráciách:

[AuPEG NP]= 12,2 µg/ ml,

[AuPEG-NH₂ NP]= 13,9 µg/ ml,

[PEG]= 10 % (V/ V),

[PEG-NH₂]= 10 % (V/ V),

[SiC NP]= 100 µg/ ml,

[SiCOH17 NP]= 100 µg/ ml,

[SiCOH20 NP]= 100 µg/ ml,

[SiCNH₂ NP]= 100 µg/ ml,

[LPS]= 50 µg/ ml,

[dH₂O]= 10 % (V/V)

Všeobecné charakteristiky pokusov s nanočasticami

Bunky boli nasadené v kultivačnom médiu do kultivačnej nádoby vždy v objeme 75 % z celkového objemu kultivačnej nádoby. Roztok nanočastíc v kultivačnom médiu bol pridaný v 25 % z celkového objemu kultivačnej nádoby.

Pri experimentoch so suspenznými bunkami boli bunky nasadené do kultivačnej nádoby v rovnaký deň prídania nanočastíc. Experimenty s adherentnými bunkami si vyžadovali nasadenie adherentných buniek do kultivačnej nádoby minimálne 24 hodín pred začatím experimentu, aby bola adherencia buniek ku dnu nádoby obnovená. V prípade, že adherencia buniek nebola obnovená, roztok nanočastíc bol pridaný priamo k bunkám, bez výmeny média.

Pokusy s bunkovou líniou THP-1

Pre experimenty s nanočasticami boli THP-1 monocyty nasadené v koncentrácii 10 000 buniek/ cm² kultivačnej plochy v štandardnom kultivačnom médiu s prídavkom neinaktivovaného FBS priamo do 96-jamkovej doštičky s guľatým dnom (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švajčiarsko). Priamo k nim bol pridaný roztok nanočastíc. Výsledný objem na jednu jamku bol 100 µl. Meranie metabolickej aktivity metódou MTS prebiehalo v rovnakej kultivačnej nádobe po prídání potrebného množstva MTS roztoku. Tu bola každá vzorka meraná v pentaplikáte s odpovedajúcim blankom v triplikáte. Kontrolná vzorka bola vždy zastúpená v dvojnásobnom počte opakovaní.

Pre experimenty s nanočasticami boli použité MDM6 makrofágy diferencované z THP-1 línie použitím 6-dňového protokolu s fázou odpočinku. Makrofágy boli nasadené v koncentrácii 15 000 buniek/ cm² kultivačnej plochy v štandardnom kultivačnom médiu s prídavkom neinaktivovaného FBS priamo do 96-jamkovej doštičky s plochým dnom (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švajčiarsko). Pridanie roztoku nanočastíc a meranie metabolickej aktivity prebehli rovnako ako v prípade suspenzných THP-1 buniek.

Po celú dobu experimentov boli bunky línie kultivované v kultivačnom médiu s prídavkom výhradne neinaktivovaného FBS ako je popísané v podkapitole 4.2.3.

Pokusy s primárnymi bunkami

Keďže experimenty stimulácie primárnych buniek boli pomerne zložité a obsahovali okrem základných meraní cytotoxicity nanočastíc aj kontrolné merania, sú prezentované ako prehľadný zoznam s doplňujúcim komentárom. Zoznam má poukázať predovšetkým na časový sled jednotlivých krokov v rámci celého experimentu.

1. Odber plnej žilnej krvi od darcu
 - analýza krvi na hemoanalýze
 - krvný rozter na histologické farbenie vzorky a charakterizáciu bunkových typov
2. Izolácia imunitných buniek (PBMC) zo vzorky krvi metódou izopyknickej centrifugácie
 - odber krvnej plazmy pre ďalšiu analýzu
 - stanovenie celkového počtu živých PBMC farbením trypanovou modrou
 - cytometrická analýza povrchových CD markerov PBMC
3. Inkubácia PBMC v kultivačnom médiu s prídavkom autológneho séra 24 h v inkubátore
 - stanovenie celkového počtu živých buniek v izoláte farbením trypanovou modrou
 - cytometrická analýza povrchových CD markerov
4. Pridanie nanočastíc a ďalších agens pre 24-hodinovú stimuláciu
5. Analýza morfológie, metabolickej aktivity a životnosti PBMC po stimulácii nanočasticami
 - odber bunkového supernatantu pre ďalšiu analýzu (napr. stanovenie cytokínov)
 - morfológia buniek- dokumentácia svetelným mikroskopom
 - MTS metóda
 - 7AAD/ Hoechst 33342 metóda

Pre experimenty s nanočasticami boli použité primárne bunky (PBMC), ktoré boli z krvi izolované metódou izopyknickej centrifugácie s použitím Ficollu (metóda 2) a kultivované 24 hodín v štandardnom kultivačnom médiu s obsahom neinaktivovaného autológneho séra. PBMC boli následne nasadené v koncentrácii 500 000 buniek/ 1 ml do 24-jamkovej doštičky pre suspenzné bunky (Sarstedt, Nümbrecht, Nemecko) a bol k nim pridaný roztok nanočastíc. Výsledný objem na jednu jamku bol 1 ml. Meranie metabolickej aktivity metódou MTS prebiehalo presadením buniek do 96-jamkovej doštičky s guľatým dnom (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švajčiarsko). Tu bola každá vzorka meraná v pentaplikáte s odpovedajúcim blankom v triplikáte. Kontrolná vzorka bola vždy zastúpená v dvojnásobnom počte opakovaní.

Po celú dobu experimentov boli bunky kultivované v kultivačnom médiu s prídavkom výhradne neinaktivovaného autológneho séra ako je popísané v podkapitole 4.2.2.2.

4.2.7 Meranie metabolickej aktivity a životnosti buniek

4.2.7.1 MTS metóda pre meranie metabolickej aktivity buniek

Ako základný test celkovej metabolickej aktivity a proliferácie buniek bola použitá kolorimetrická metóda MTS CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Využitá bola pri experimentoch s nanočasticami pre odhalenie cytotoxicity častíc, pre stanovenie odpovedi buniek na cytokíny a rozličné kultivačné podmienky.

Metóda je založená na redukcii tetrazoliovej zložky MTS roztoku bunkovými NAD(P)H-dependentnými dehydrogenázami za vzniku farebného formazánového produktu, ktorý je rozpustný v kultivačnom médiu. Množstvo formazánového produktu je možné stanoviť zmeraním absorbančie pri vlnovej dĺžke (λ) 492 nm a 620 nm, ktorá slúži ako referenčná hodnota. Hodnota absorbančie pri $\lambda = 492$ nm je priamo úmerná dehydrogenázovej aktivite v danej vzorke.

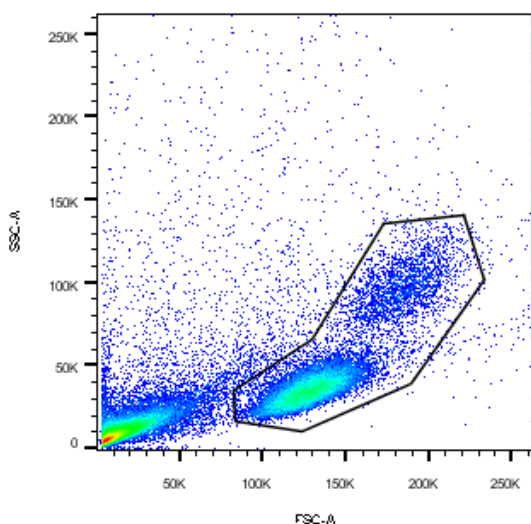
Vo všetkých experimentoch bol ku každej vzorke pridaný blank pre odčítanie pozadia. Blank bol roztok totožný s roztokom pridaným k bunkám, ale neobsahoval žiadne bunky.

V prípade suspenzných aj adherentných buniek bolo priamo do bunkovej suspenzie pridané množstvo MTS roztoku potrebné pre vytvorenie výslednej koncentrácie 10% (V/V). Po pridaní MTS roztoku boli bunky inkubované 2 hodiny pri 37 °C v CO₂ inkubátore. Kultivačná doštička bola jemne pretrepaná kvôli dobrému rozptýleniu farebného produktu.

Absorbancia bola zmeraná pri $\lambda = 492$ nm a $\lambda = 620$ nm pre odčítanie pozadia na doštičkovom spektrometri Tecan Spark® multimode microplate reader (Tecan, Männedorf, Švajčiarsko).

4.2.7.2 7AAD/ Hoechst metóda pre stanovenie životnosti buniek a normalizácia dát

Normalizácia MTS dát suspenzných buniek prebiehala na celkový počet živých buniek v každej vzorke. Po zmeraní absorbancie bol objem každej jamky v 96-jamkovej doštičke doplnený do objemu 300 μ l farbiacim roztokom, ktorý obsahoval 7-aminoaktinomycínu D (7AAD, BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) a Hoechst 33342 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) v PBS. Výsledná koncentrácia oboch bola 10 μ g/ ml. Inkubácia s farbami prebiehala 30 minút pri izbovej teplote a v tme. Analýza prebiehala na cytometri FACS Canto II HTS vybaveným tromi laserami: 405 nm, 488 nm, 633 nm a so softvérom BD FACSDiva™ software v. 6.1.3 (oba BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Vylúčenie debris, mrtvých buniek a erytrocytov z analýzy bolo dosiahnuté ohraňovaním populácie buniek na FSC-A/ SSC-A dot plote a je znázornené na Obrázku 5. Namerané dáta boli vyhodnotené pomocou FlowJoVX software (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA).

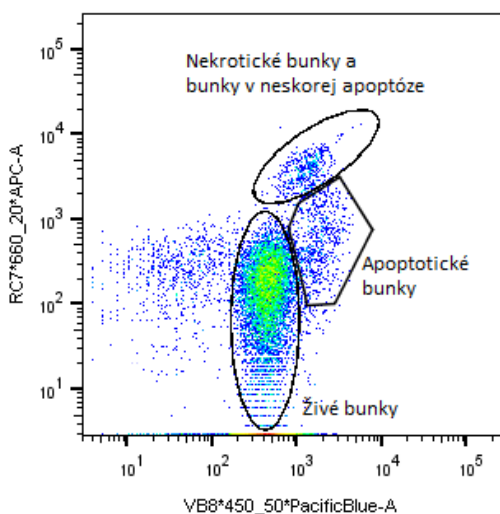


Obrázok 5: Stratégia ohraňovania populácie buniek vo vzorke s vylúčením erytrocytov, bunkovej debris a mŕtvych buniek. Ohraňovaná populácia predstavuje sledované bunky (PBMC).

Populácia buniek bola analyzovaná na pozitívitu 7AAD a Hoechst 33342 signálu. Signál zo 7AAD bol sledovaný v kanále APC-A, signál z Hoechst 33342 v PacificBlue-A kanále. Dvojitým farbením 7AAD/ Hoechst 33342 bolo možné stanoviť zastúpenie živých,

apoptotických a nekrotických buniek vo vzorke. Nastavenie positivity, resp. negativity populácie bolo nastavené nefarbenou kontrolou pre každý typ vzorky samostatne.

Táto metóda využíva zmien plazmatickej membrány buniek počas bunkovej smrti. Bunková membrána postupne stráca svoju integritu až je úplne rozpadnutá (Y. Zhang *et al.*, 2018). DNA- viažuca farba 7AAD neprechádza membránou bunky, interaguje iba s nukleovou kyselinou buniek s narušenou integritou membrány. Silný signál je očakávaný u buniek s vysokým stupňom poškodenia- nekrotické bunky a bunky v neskoršej apoptóze (Philpott *et al.*, 1996). Hoechst 33342 je vitálna DNA-viažuca farba prestupujúca plazmatickou membránou. Po väzbe na dsDNA emituje modrú fluorescenciu. Signál je očakávaný u živých a apoptotických buniek (Schmid *et al.*, 1994). Životnosť buniek bola určená ohraňčením bunkových populácií na dot plote Hoechst 33342/ 7AAD (PacificBlue-A/ APC-A). Bunky bolo charakterizované nasledovne: živé bunky Hoechst 33342⁺ 7AAD⁻, apoptotické bunky Hoechst 33342⁺⁺ 7AAD⁻ alebo 33342⁺⁺ 7AAD⁺, nekrotické bunky a bunky v neskoršej apoptóze Hoechst 33342⁻ 7AAD⁺⁺. Stratégia ohraňčenia buniek je znázornená na Obrázku 6.



Obrázok 6: Stratégia ohraňčenia živých, apoptotických a nekrotických buniek vo vzorke na základe positivity farbením 7AAD/ Hoechst 33342 farieb počas cytometrickej analýzy vzorky. Signál z farby Hoechst 33342 bol sledovaný v kanáli PacificBlue-A, signál zo 7AAD bol sledovaný v kanáli APC-A.

Výsledky MTS merania boli normalizované na počet buniek vo vzorke. Životnosť buniek je prezentovaná ako priemerná hodnota zastúpenia jednotlivých subpopulácií buniek na základe analýzy Hoechst 33342/ 7AAD positivity vo vzorke z troch nezávislých experimentov

Výsledky MTS merania u adherentných buniek boli normalizované na celkové množstvo DNA vo vzorke. K normalizácii bol použitý CyQUANT™ NF Cell Proliferation

Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Metóda je založená na stanovení celkového obsahu DNA buniek DNA-viažucou fluorescenčnou farbou. Predpokladá sa, že množstvo DNA vo vzorke je proporciálne množstvu buniek v danej vzorke. K bunkám je pridaný roztok permeabilizačného agens plazmatickej membrány a fluorescenčnej DNA-viažucej farby. Po inkubácii farby so vzorkom je zmeraná fluorescencia v každom vzorku. Fluorescencia bola meraná pri $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 530$ na Tecan Spark® multimode microplate reader (Tecan, Männedorf, Švajčiarsko) a snímaná zospodu. Výsledky z MTS metódy boli následne normalizované na konkrétne hodnoty fluorescencie z jadier.

4.2.7.3 Sea Horse metóda pre meranie metabolizmu ATP

Energetický metabolizmus adenosín-5'-trifosfátu (ATP) v monocytoch (THP-1) a diferencovaných makrofágoch (MDM6) bol skúmaný pomocou komerčnej súpravy Seahorse XFP Real-Time ATP Rate Assay Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Metóda bola zameraná na stanovenie glykolytickej frakcie ATP a frakcie produkovanej mitochondriálnou oxidatívnou fosforyláciou. ATP bola kvantifikovaná na základe meraní spotreby kyslíku (OCR, z angl. oxygen consumption rate) a acidifikácie extracelulárneho prostredia (ECAR, z angl. extracellular acidification rate). Extracelulárne prostredie predstavovalo chemicky definované médium typu RPMI bez séra, ktoré bolo súčasťou súpravy, svojím zložením sa ale líšilo od štandardného kultivačného média.

K stanoveniu produkcie ATP z glykolýzy a mitochondriálnej oxidatívnej fosforylácie boli po zmeraní bazálnych OCR a ECAR v definovanom čase pridané metabolické modulátory oligomycín a následne rotenon v kombinácii s antimycínom A. Oligomycín inhibuje ATP syntázu (komplex V) a to umožňuje po výpočte stanoviť mitochondriálnu frakciu ATP. Následným zablokovaním komplexu I a komplexu III elektrontransportného reťazca pridaním rotenonu a antimycínu A je možné stanoviť glykolytickú frakciu ATP. K celkovej acidifikácii prostredia prispievajú obe metabolické dráhy. Kyslík je spotrebovaný pri oxidatívnej fosforylácii.

Experiment prebiehal podľa návodu výrobcu. Monocyty boli nasadené v koncentrácii 150 000 buniek/ cm^2 a 300 000 buniek/ cm^2 , makrofágy MDM6 v koncentrácii 100 000 buniek/ cm^2 . Pred meraním (cca 60 min) a počas samotného merania boli bunky v prostredí bez CO_2 . Meranie parametrov OCR a ECAR prebehlo v rámci jedného experimentu deväťkrát v každej vzorke, každá vzorka bola v rámci experimentu v triplikáte. Výsledné dáta sú prezentované ako priemerná hodnota stanovovaných parametrov z troch nezávislých experimentov. Meranie

prebiehalo na prístroji The Agilent Seahorse XFp Analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

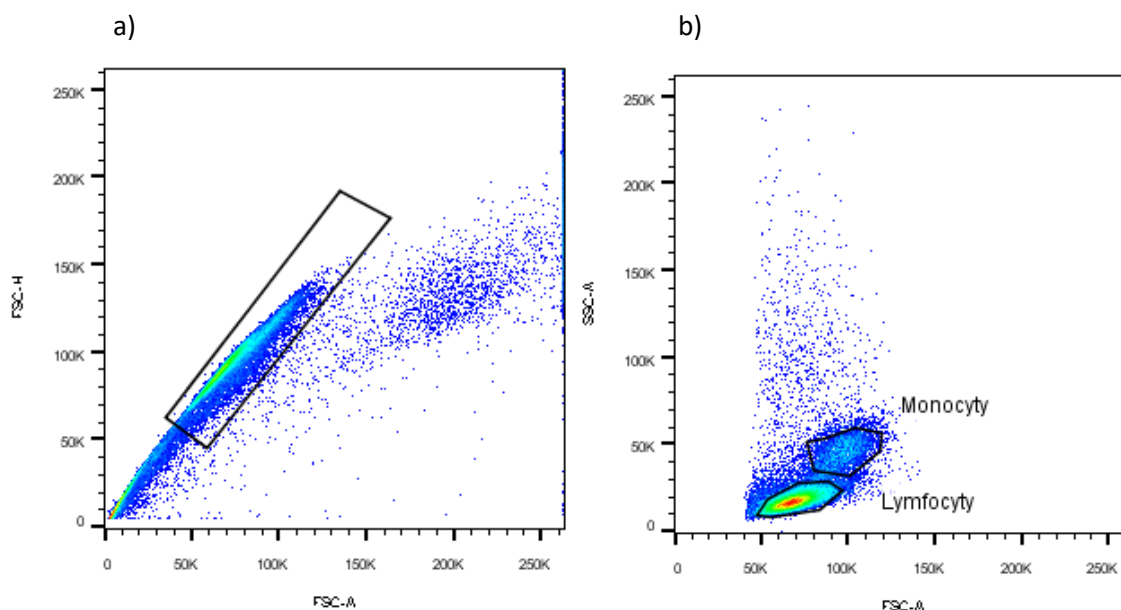
4.2.8 Prietoková cytometria

Pred samotným farbením na cytometrickú analýzu bol primárny izolát v deň izolácie kultivovaný 60 minút v príslušnom kultivačnom médiu v CO₂ inkubátore (37 °C, 5 % CO₂). Disociácia adherentných buniek pred cytometrickou analýzou prebiehala štandardne enzymaticky, ako je popísané v kapitole 4.2.3.

Analyzované alebo sortované bunky boli centrifugované (300×g, 5 min pri 22°C) a bunková peleta bola farbená kombináciou protilátok konjugovaných s fluorochrómom proti povrchovým molekulám. Všetky vzorky boli farbené a analyzované v polypropylénových skúmavkách s objemom 5 ml (Falcon®, Corning Incorporated, Corning, NY, USA). Primárne bunky boli farbené v objeme 50 ul alebo 100 ul. Bunky pochádzajúce z bunkovej línie v objeme 100 ul. Komerčné protilátky boli nariadené s bunkovou suspenziou v objemovom pomere 1:100, v prípade protilátok konjugovaných s fluorochrómom Brilliant Violet 421™ (BioLegend, San Diego, CA, USA) v objemovom pomere 1:200. Zmes protilátok bola pridaná k vzorke pri izbovej teplote a bunky boli následne inkubované pri teplote 4 °C po dobu 30 minút v tme. Zafarbená vzorka bola jedenkrát premytá PBS a analyzovaná na príslušnom cytometri vo finálnom objeme 400 ul.

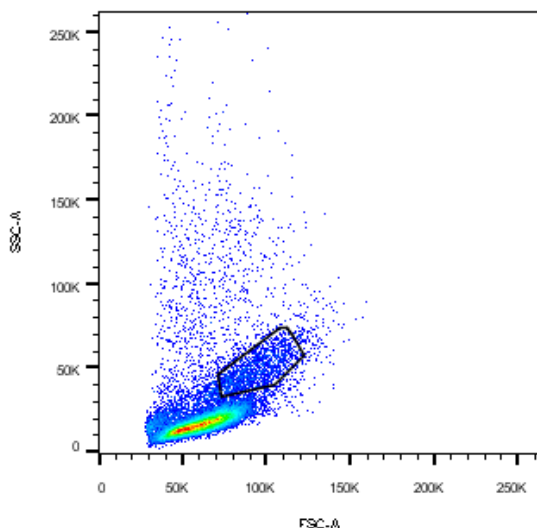
Vzorky boli analyzované na FACS Canto II HTS vybaveným tromi laserami: 405 nm, 488 nm, 633 nm a so softvérom BD FACSDiva™ software v. 6.1.3 (oba BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA).

Namerané dáta boli vyhodnotené pomocou FlowJovX software (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Z pokročilej analýzy boli vylúčené doublety buniek zobrazením v FSC-A/ FSC-H. Toto zobrazenie zároveň umožnilo vylúčiť debris, mŕtve bunky a erytrocyty (vo vzorke primárnych buniek). Pri analýze primárnych buniek v závislosti na použitej technike izolácie boli jednotlivé populácie leukocytov ohraničené na dot plote FSC-A/ SSC-A. Stratégia postupného ohraničovania populácii buniek je zobrazená na Obrázku 7 (a, b). Stanovenie hranice pozitivity/ negativity pre daný znak bolo pomocou nastavenia hranice na nefarbenej kontrolnej vzorke.

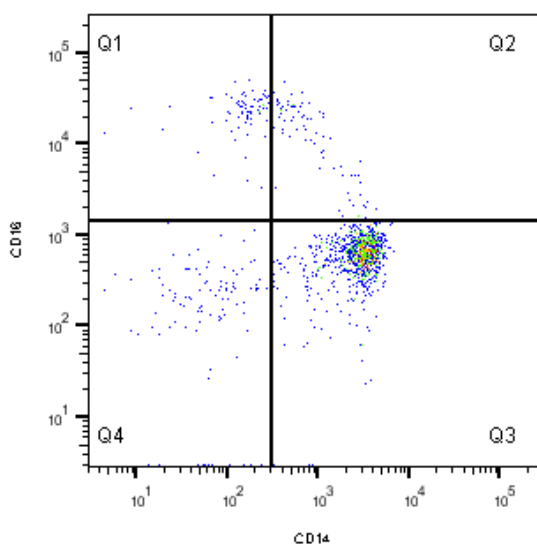


Obrázok 7: Stratégia postupného ohraničenia bunkových populácií na príklade izolátu PBMC z izolačnej metódy 2. a) Ohraničenie singletov a súčasné vylúčenie debris, mrtvých buniek a erytrocytov na dot plote FSC-A/ FSC-H. b) Populácia singletov zobrazená na dot plote FSC-A/ SSC-A pre ohraničenie jednotlivých populácií leukocytov (monocytov a lymfocytov).

Správnosť ohraničenia populácie bola validovaná analýzou špecifických povrchových markerov. Cytometrická analýza sa vzhľadom na tému práce sústredila predovšetkým na povrchové markery populácie monocytov/ makrofágov (CD45, CD11b, CD14, CD16, CD68, CD86, CD163, CD206) a v menšom rozsahu boli analyzované aj markery lymfocytárnej a granulocytárnej populácie (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD56). Táto analýza mala určiť kvalitu a normalitu primárneho izolátu a dáta z nej nebudú prezentované. Monocytárna populácia bola identifikovaná na dot plote FSC-A/ SSC-A (Obrázok 8) a zároveň musel byť prítomný špecifický vzor distribúcie monocytárných subpopulácií vzhľadom na expersiu markerov CD14 a CD16 (Obrázok 9). Následne bola identifikovaná populácia analyzovaná na prítomnosť ostatných markerov. Hodnotené bolo percentuálne zastúpenie pozitívnych buniek v danej populácii buniek.



Obrázok 8: Reprezentatívny dot plot FSC-A/ SSC-A leukocytárnej populácie s ohraničením monocytov.



Obrázok 9: Reprezentatívny dot plot koexpresie CD14 a CD16 molekúl v monocytárnej populácii.

V prípade, že sa v cytometrickej analýze primárneho izolátu vyskytli akékoľvek abnormality, bunky neboli použité na ďalšie experimenty.

M0, M1 a M2 makrofágy diferencované z primárnych buniek boli analyzované na prítomnosť znakov CD45, CD11b, CD14, CD16, CD68, CD86, CD163 a CD206.

Analýza buniek THP-1 populácie a diferencovaných MDM3 a MDM6 buniek bola zameraná výhradne na markery monocytov/ makrofágov (CD45, CD11b, CD14, CD16, CD68, CD86, CD163, CD206).

Zoznam použitých konjugovaných protilátok je zhrnutý v Tabuľke 2.

Protilátka	Fluorochróm	Zdroj	Klon
antiCD3	PE-Cy5	DAKO	UCHT1
antiCD4	PE-Cy5	DAKO	MT310
antiCD8	PE-Cy5	DAKO	DK25
antiCD11b	PE-Cy5	BD	ICRF44
antiCD14	FITC	DAKO	TÜK 4
antiCD16	PE-Cy5	BD	3G8
antiCD19	FITC	Invitrogen	MHCD1901
antiCD20	FITC	DAKO	B-Ly1
antiCD45	FITC	DAKO	T29/33
antiCD56	PE	DAKO	MOC-1
antiCD68	FITC	DAKO	KP1
antiCD86	FITC	DAKO	BU63
antiCD163	Brilliant Violet 421™	BioLegend	GHI/ 61
antiCD206	APC	BioLegend	15-2

Tabuľka 2: Zoznam konjugovaných protilátok proti povrchovým CD markerom, ktoré boli použité k cytometrickej analýze vzoriek, ktoré sú prezentované v tejto práci.

4.2.9 Farbenie

4.2.9.1 Histologické farbenie

Histologické preparáty boli zhotovené rozterom bunkovej suspenzie alebo krvi na podložné mikroskopické sklo a následne spracované Pappenheimovou panoptickou metódou, ktorá pozostáva z dvoch farbení: farbenie May-Grünwald a farbenie Giemsa. Toto farbenie umožňuje analýzu morfológie a diferenciálneho počtu krvných buniek. May-Grünwald je zmesou acidického eozínu a alkalického metylénovej modrej. Giemsa obsahuje acidický eozín a alkalický azur. Metylénová modrá farbí acidické komponenty domodra, eozín bazické komponenty dočervena a azur sfarbuje bazické komponenty červeno a fialovo.

Pred farbením boli pripravené farbiace roztoky v správnom riedení. Zásobný roztok May-Grünwald (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Nemecko) bol riedený v objemovom pomere 1:1 s destilovanou vodou. Roztok Giemsa (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Nemecko) bol riedený s destilovanou vodou v objemovom pomere 1:15.

Bunky v suspenzii boli centrifugované (300×g, 5 min pri 22 °C) a peleta resuspendovaná v malom objeme PBS aby sa vytvorila hustá suspenzia buniek. V prípade krvného náteru bola použitá nekoagulovaná krv a náter bol vykonaný hneď po odbere. Na

podložné mikroskopické sklo 76 × 26 mm (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, Nemecko) bola nanosená malá kvapka vzorky (objem do 10 ul) a pomocou krycieho skla v tenkej vrstve rozprestrená po celej dĺžke podložného skla. Po úplnom zaschnutí bol rozter fixovaný metylalkoholom (Dr. Kulich Pharma, s. r. o., Hradec Králové, Česko)(5 minút). Prebytok fixatíva bol zliaty a preparát bol farbený pripraveným roztokom May-Grünwald (5 minút). Sklíčko bolo opláchnuté destilovanou vodou a farbené pripraveným roztokom Giemsa (20 minút). Sklíčko bolo opláchnuté obyčajnou vodou, zospodu otreťé a schlo vo vertikálnej polohe bez krytia.

4.2.9.2 Fluorescenčné farbenie

Imunohistochemickým značením vinkulínu a aktínu bola sledovaná lokalizácia fokálnych adhezií a adherentných spojení v rámci bunky a formovanie podozómov pri diferenciácii makrofágu. Detekcia fluorescenčného faloidínu umožňovala vizualizáciu filamentárneho aktínu a poskytnúť obraz o cytoskelete. Vinkulín, ako univerzálny marker fokálnych kontaktov, umožňoval lokalizovať tieto adherentné spojenia a formovanie podozómov.

Makrofágy M1, M2 a MDM3 a MDM6 boli nasadené v koncentrácii 30 000 buniek/cm² na podložné sklo so štyrmi komorami v klasickom kultivačnom médiu pre primárne bunky alebo bunkovú líniu a inkubované 24 hodín v CO₂ inkubátore (37 °C, 5% CO₂). Médium bolo odsaté a adherované bunky boli opláchnuté PBS, fixované v roztoku 4% (V/V) paraformaldehydu v PBS (15 minút pri izbovej teplote) a znovu opláchnuté PBS. Permeabilizácia buniek prebiehala v 0,1% Triton™ X-100 (V/V) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) v PBS (20 minút pri izbovej teplote) a následne boli bunky dvakrát opláchnuté PBS. Po permeabilizácii boli inkubované v blokovacej zmesi 0,05 % TWEEN (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a 1 % FBS (V/V) v PBS (20 minút pri izbovej teplote), znova dvakrát premyté PBS. Primárna monoklonálna myšia IgG protilátka antivinkulín (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) riedená v blokovacej zmesi v objemovom pomere 1:200 bola inkubovaná s bunkami 1 hodinu pri teplote 37 °C. Bunky boli znovu dvakrát premyté PBS. Sekundárna protilátka proti myšej IgG konjugovaná s fluorochromom Alexa Fluor 568 a faloidín konjugovaný s Alexa Fluor 488 (obe Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) boli riedené v blokovacej zmesi v objemovom pomere 1:1000 a inkubované s bunkami (45 minút, 37 °C). Po opláchnutí buniek v PBS bolo pre lepšiu vizualizáciu zafarbené jadro pomocou 4',6-diamidín-2-fenylindol (DAPI). Roztok DAPI v PBS (1 µg/ml) bol inkubovaný s bunkami 15 minút pri teplote 37 °C. Zafarbený preparát bol opláchnutý PBS, zaliaty do Shandon Immu-

Mount™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a uskladnený v chladničke.

4.2.10 Mikroskopia

Pre analýzu a úpravu dát z mikroskopu bol použitý voľne dostupný softvér ImageJ (NIH).

4.2.10.1 Svetelná a fluorescenčná mikroskopia

Kultivačné nádoby a histologické preparáty boli pozorované invertovaným svetelným mikroskopom Olympus IX71 (Olympus, Tokio, Japonsko) vybaveným farebnou kamerou Olympus DP74 (Olympus, Tokio, Japonsko) a objektívmi UPlanFI 4×, CPlanFI 10×, LPlanFI 20×, LUCPlanFL 40× a olejovým objektívom UPlanFI 100× (všetky Olympus, Tokio, Japonsko). Pre fluorescenčne značené preparáty je mikroskop vybavený lampou Olympus U-RFL-T. K ich snímaniu boli použité zrkadlové jednotky NUA ($\lambda_{\text{ex}}=360\text{-}370\text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}}=420\text{-}460\text{ nm}$), NIBA ($\lambda_{\text{ex}}=470\text{-}495\text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}}=510\text{-}550\text{ nm}$), GFP ($\lambda_{\text{ex}}=425\text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}}=505\text{ nm}$), WG ($\lambda_{\text{ex}}=510\text{-}550\text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}}=570\text{ nm}$).

Analýza prebiehala na softvère cellSense Standard (Olympus, Tokio, Japonsko).

4.2.10.2 Superrezolučná mikroskopia STED

Fluorescenčne značený preparát makrofágov M1 aM2 bol pripravený ako je popísané v 4.2.9.2 a bol analyzovaný na dočasne zapožičanom mikroskope Stedycon (Abberior GmbH, Göttingen, Nemecko), ktorý umožňuje rozlíšenie približne 30 nm. Analýza prebiehala v spolupráci s Mgr. Annou Fučíkovou, PhD z Katedry chemickej fyziky a optiky Matematicko-fyzikálnej fakulty Univerzity Karlovej.

4.2.10.3 Elektronová mikroskopia TEM

Lokalizácia zlatých nanočastíc v makrofágoch bola analyzovaná transmisnou elektrónovou mikroskopiou.

Makrofágy boli diferencované z THP-1 monocytov použitím trojdňového protokolu bez fáze odpočinku ako je popísané v 4.2.4. Po diferenciacii boli štandardne disociované a nasadené do 6-jamkovej doštičky (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švajčiarsko) v štandardnom kultivačnom médiu v koncentrácii 25 000 buniek / cm^2 . Každá jamka obsahovala na dne tri guľaté krycie sklíčka s priemerom 15 mm. Bunky boli takto

kultivované 24 hodín v CO₂ inkubátore (37 °C, 5% CO₂). Na druhý deň bolo médium s minimom neadherovaných buniek odstránené a k bunkám bol pridaný roztok zlatých nanočastíc AuPEG NPs (12,2 µg/ ml) a AuPEG-NH₂ NPs (13,9 µg/ ml) v štandardnom kultivačnom médiu. Bunky boli stimulované 24 hodín v CO₂ inkubátore (37 °C, 5% CO₂). Ako kontrolná vzorka slúžili bunky kultivované v štandardnom kultivačnom médiu bez prídania nanočastíc. Po stimulácii boli krycie sklíčka s adherovanými bunkami fixované v roztoku 2,5% (V/V) glutaraldehydu v 0,1 M HEPES pufrí po dobu 30 minút. Vzorky boli uskladnené v 0,1 M HEPES a prevezené do Servisného laboratória elektrónovej mikroskopie UMG AV ČR, kde prebehla analýza na elektrónovom mikroskope Jeol JEM-1400 FLASH transmission electron microscope.

4.2.11 Cytokínový profil buniek

Odobratý supernatant po stimulácii primárnych buniek zlatými a kremíkovými nanočasticami bol rozmrazený a použitý na analýzu cytokínového profilu. K analýze bola vybratá vzorka supernatantov z jedného experimentu. K analýze boli použité dve semikvantitatívne metódy. Cytokínový profil 42 cytokínov bol stanovený použitím komerčnej súpravy Human Cytokine Antibody Array- Membrane (Abcam, Veľká Británia). Stanovenie prítomnosti interleukínu 8 (IL-8) a tumornekrotizujúceho faktoru α (TNF- α) prebehlo využitím komerčnej súpravy LEGENDplex™ Multy- Analyte Flow Assay Kit- Human Inflammation Panel 1 Mix and Match Subpanel (BioLegend, San Diego, CA, USA). Výsledky oboch analýz budú vzťahnuté k výsledku analýzy kontrolnej vzorky, ktorá nebola stimulovaná nanočasticami ani iným agens, a vyjadrené ako jej percentuálna hodnota.

Human Cytokine Antibody Array- Membrane

Pomocou Human Cytokine Antibody Array- Membrane bolo analyzovaných celkom 6 vzoriek supernatantov. Išlo o kontrolu buniek bez stimulácie, pozitívnu kontrolu stimulovanú LPS, a vzorky buniek stimulovaných nanočasticami SiCOH17 NP, SiCOH20 NP, SiCNH₂ NP, SiC NP a AuPEG-NH₂ NP. V rámci každého vzorku bolo semikvantitatívne detekovaných 42 cytokínov. Metóda detekcie cytokínov je založená na princípe ELISA s vylepšenou senzitivitou. Každá membrána obsahuje 6 negatívnych kontrolných bodov, 6 pozitívnych kontrolných bodov a 42 bodov v duplikátoch pre naviazanie cytokínov. Rozvrhnutie membrány je znázornené na Obrázku 10.

	A	B	C	D	E	F		G	H	I	J	K	L
1	Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	1	GM-CSF	GRO	GRO- α	I-309	IL-1 α	IL-1 β
2	Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	2	GM-CSF	GRO	GRO- α	I-309	IL-1 α	IL-1 β
3	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	3	IL-8	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN- γ
4	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	4	IL-8	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN- γ
5	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	5	MIP-1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β 1
6	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	6	MIP-1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β 1
7	TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-I	Angiogenin	Oncostatin M	7	Thrombopoietin	VEGF	PDGF BB	Leptin	Neg	Pos
8	TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-I	Angiogenin	Oncostatin M	8	Thrombopoietin	VEGF	PDGF BB	Leptin	Neg	Pos

Obrázok 10: Rozvrhnutie membrány Human Cytokine Antibody Array- Membrane použitej k analýze supernatantov. Simultánne umožňuje detekciu až 42 ľudských cytokínov.

Experiment prebiehal podľa návodu výrobcu. Na membránu bola nanesená vzorka supernatantu v objeme 650 μ l a bola doriedená do 1 ml vhodným pufrom. Inkubácia supernatantu s membránou prebiehala cez noc pri teplote 4 °C. Chemiluminiscentné dáta boli získané na prístroji ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Dáta boli vyhodnotené softvérom Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Z každého bodu membrány reprezentujúceho konkrétny cytokín bolo vybratých 13 najžiarivejších pixelov. Z denzitometrických údajov týchto pixelov bola určená priemerná hodnota a štandardná odchýlka. Tieto dáta boli následne normalizované vzhľadom na pozitívnu aj negatívnu kontrolu.

LEGENDplex™ Multi- Analyte Flow Assay Kit

Súpravou LEGENDplex™ boli analyzované celkom 4 vzorky supernatantov. Išlo o kontrolu buniek bez stimulácie, pozitívnu kontrolu stimulovanú LPS, a vzorky buniek stimulovaných nanočasticami AuPEG NP a AuPEG-NH₂ NP. Tieto vzorky sú totožné so vzorkami analyzovanými prvou metódou. V rámci každého vzorku boli semikvantitatívne detekované dva cytokíny- IL-8 a TNF- α pomocou cytometrickej analýzy. Princípom metódy je rovnako „sandwich“ ELISA. Súprava obsahuje guľičky s definovanou veľkosťou a internou intenzitou fluorescencie. Konkrétny typ guľičiek viaže práve jeden cytokín. Guľičky obsahujú väzobné miesta s protilátkami pre konkrétny cytokín. Po inkubácii vzorku (supernatantu) sa konkrétny cytokín viaže do väzbového miesta definovanej guľičky. Následne sú pridané biotinylované detekčné protilátky, ktoré sa na analyt viažu a po pridaní komplexu streptavidín-

fykoerytrín sú detekované na cytometri. Podľa definovanej veľkosti a internej fluorescence guličky je možné určiť, ktorý cytokín je detekovaný. Veľkostne je možné guličky odlíšiť zobrazením SSC-A projekcie a intenzita vnútornej fluorescence je odlišiteľná v kanáli APC-A. Semikvantitatívne bolo množstvo konkrétneho analytu viazaného na príslušný typ guličky stanovené odčítaním signálu v kanáli PE-A. Prezentovaný je medián intenzity fluorescence v danom kanále.

Experiment prebiehal podľa návodu výrobcu. Bola zvolená varianta prípravy vzorku v 96-jamkovej doštičke s kónickým dnom (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Vzorky boli po príprave prenesené do polypropylénových skúmaviek s objemom 5 ml (Falcon®, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) a merané na FACS Canto II HTS pomocou dvoch laserov: 405 nm, 488 nm a so softvérom BD FACSDiva™ software v. 6.1.3 (oba BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Namerané dáta boli vyhodnotené pomocou FlowJovX software (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA).

4.3 Štatistické metódy a techniky

Všetky dáta prezentované v tejto práci pochádzajú z minimálne troch nezávisle zopakovaných experimentov. Konkrétny počet opakovaní bude uvedený pri prezentovaní výsledkov v kapitole „Výsledky“. Dáta budú prezentované ako reprezentatívna vzorka dát alebo ako jeden celkový súbor dát po štatistickom vyhodnotení.

Dáta boli štatisticky zanalyzované použitím softvéru Statistika (StatSoft, Inc). Metódou vizualizácie krabicových grafov boli vylúčené extrémne a odľahlé hodnoty. Pre overenie správnosti vylúčenia dát bol použitý Grubbsov test odľahlých hodnôt. Distribúcia dát bola stanovená Shapiro- Wilkovým testom. K určenie signifikantnosti rozdielov kontrolnej vzorky a skúmaných vzoriek bol použitý neparametrický Wilcoxonov test. Jednofaktorová ANOVA bola použitá pre porovnanie súborov dát z jednotlivých vzorkov medzi sebou. Ďalšie závislosti medzi jednotlivými dvojicami skupín vzorkov boli analyzované Fisherovým post- hoc testom. Signifikantnosť výsledkov bola sledovaná na hladine $p < 0,05$ a nižšej. Hladina signifikantnosti $p < 0,05$ bude vo výsledkoch značená ako „*“, $p < 0,01$ ako „**“ a $p < 0,001$ ako „***“.

5 Výsledky

5.1 Výber protokolu na separáciu buniek z plnej krvi

V prvom rade bolo potrebné zaviesť vhodnú metódu izolácie imunitných buniek z plnej krvi. Existuje viacero metód, ktoré ale prinášajú odlišné výsledky. Keďže moja práca sa

zameriava predovšetkým na charakterizáciu populácie monocytov, bolo potrebné vyizolovať takú populáciu imunitných buniek, ktorá by obsahovala dostatočné množstvo monocytov s ohľadom na zachovanie ich funkčnosti. Celkovo boli použité štyri metódy izolácie. Metóda 1 umožňovala izoláciu všetkých leukocytov, metóda 2 mononukleárnu vrstvu leukocytov a metóda 3 populáciu mononukleárov s vysokým podielom monocytov. Ako štvrtá metóda bol použitý sorting buniek na FACS (z angl. fluorescence-activated cell sorter).

Najvyšší výťažok krvných buniek poskytla metóda 1 s použitím lyzačného roztoku červených krviniek. Výsledným izolátom boli všetky leukocyty- teda lymfocyty, monocyty a polymorfonukleárne granulocyty. Z výsledného množstva buniek v izoláte tvorila populácia monocytov približne 5 % celkovej bunkovej populácie. Majoritne bola zastúpená populácia granulocytov. Zloženie izolátu bolo potvrdené histologickým farbením bunkového náteru. Ukážka reprezentatívneho dot plotu z cytometrickej analýzy zobrazujúca jednotlivé populácie leukocytov je na Obrázku 11 a).

Mononukleárna vrstva získaná druhou metódou s využitím Ficoll-Paque obsahovala dve bunkové populácie- lymfocyty a monocyty. Percentuálne zastúpenie monocytov v rámci celej bunkovej populácie bolo priemerne 5 %. Analýzou histologického preparátu sa zloženie izolátu potvrdilo. Reprezentatívny dot plot z analýzy na cytometri s vyznačenými populáciami lymfocytov a monocytov je na Obrázku 11 b).

Ďalšia metóda izolácie imunitných buniek umožňovala vyizolovať populáciu mononukleárných buniek obohatenú na CD14+ bunky, teda monocyty. K izolácii bola použitá komerčná súprava PluriSpin. Očakávaná čistota izolátu má byť podľa výrobcu 84 %- 92 %. Z troch nezávislých experimentov bolo stanovené, že reálna čistota izolátu je približne 52 % (SD= 3,5). Celkový výťažok imunitných buniek tejto metódy je pomerne nízky. V porovnaní s metódou izolácie celej mononukleárnej frakcie (metóda 2) ide o tretinové výťažky. Vo výslednom izoláte CD14+ obohatenej populácie bolo pomerne vysoké množstvo mŕtvych buniek, ktoré nebolo možné odstrániť. Reprezentatívny dot plot z cytometrickej analýzy s vyznačenou populáciou monocytov je na Obrázku 11 c).

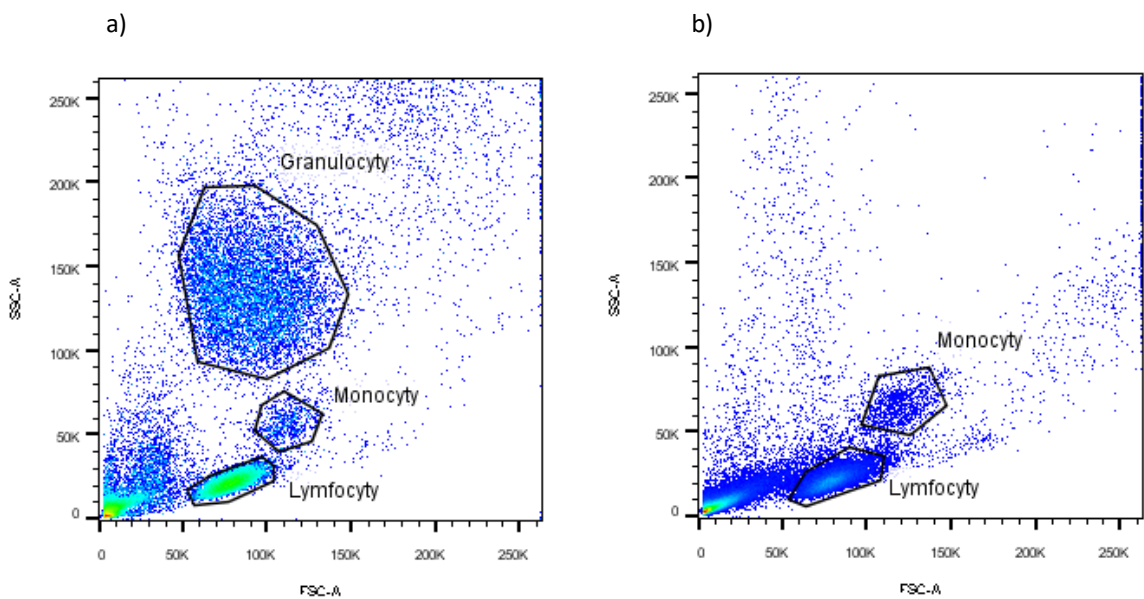
Poslednou metódou- sorting buniek- bolo z populácie mononukleárov možné získať najčistejší izolát tvorený prevažne monocytmi. Množstvo sortovaných buniek získaných zo štandardného vzorku krvi (cca 15 ml) bolo ale nízke- približne 3 % zo všetkých buniek. Reprezentatívny dot plot z FACS-u s vyznačenou sortovanou populáciou monocytov je na Obrázku 11 d).

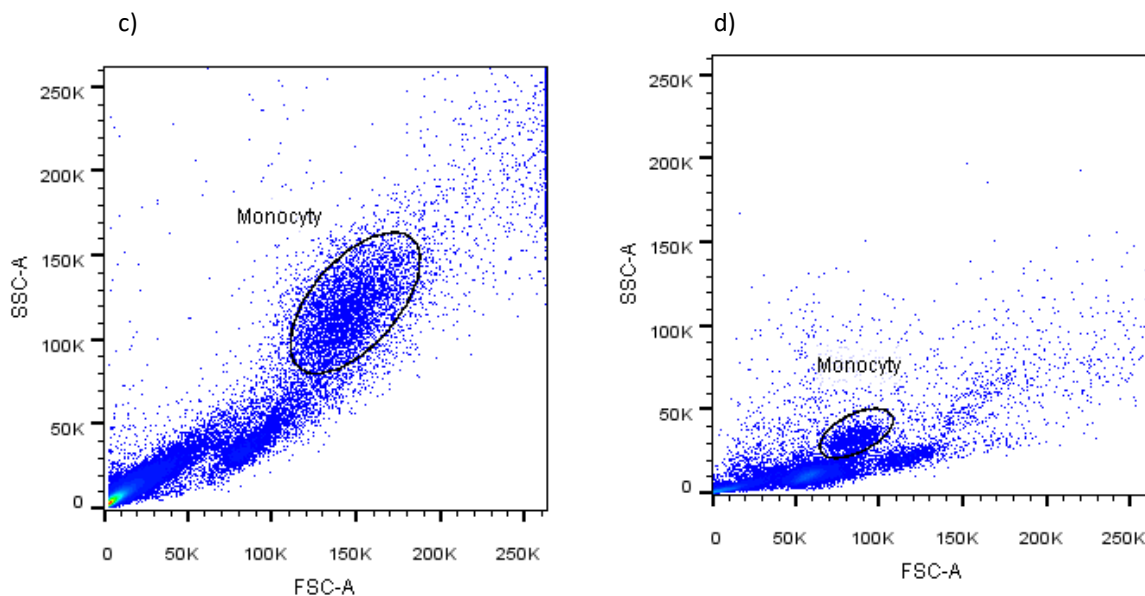
Okrem cytometrickej a histologickej analýzy primárnych izolátov bola tiež skúmaná funkčnosť vyizolovaných buniek. Podľa protokolu v kapitole 4.2.4 boli bunky stimulované M-

CSF. V prípade izolátov z prvých dvoch metód bola schopnosť monocytov diferencovať sa do adherentných makrofágov použitím štandardného protokolu zachovaná. Po stimulácii vysortovaných buniek (metóda 4) alebo nabohatenej populácie buniek na CD14+ (metóda 3) bunky morfológicky nevykazovali žiadne zmeny.

Mechanické počítanie buniek v Burkerovej komôrke doplnené farbením trypanovou modrou v deň izolácie a 24 hodín po izolácii ukázalo, že v kultúre sa nachádzalo viac ako 99 % živých buniek. Toto platilo pre izoláty získané všetkými popísanými metódami (metóda 1-4).

Ako najvhodnejšia metóda izolácie imunitných buniek vzhľadom na tému tejto práce bola zvolená metóda izolácie mononukleárnej vrstvy izopyknickou centrifugáciou (metóda 2). Táto metóda umožňuje vyizolovať populáciu imunitných buniek s dostatočným zastúpením monocytárnej populácie, ktorá je schopná diferencovať do adherentných makrofágov.





Obrázok 11: :Reprezentatívne dot ploty primárnych izolátov získané prietokovým cytometrom s ohraničením leukocytárných populácií. Vzorky vznikli po izolácii buniek z plnej krvi a) lyzačným roztokom erytrocytov (metóda 1), b) Izopyknicou centrifugáciou v hustotnom gradiente Ficoll-Paque (metóda 2), c) využitím komerčnej súpravy PluriSpin(metóda 3). Obrázok 11 d) ukazuje frakciu PBMC s vyznačenou sortovanou populáciou monocytov (metóda 4).

5.2 Všeobecná charakterizácia buniek

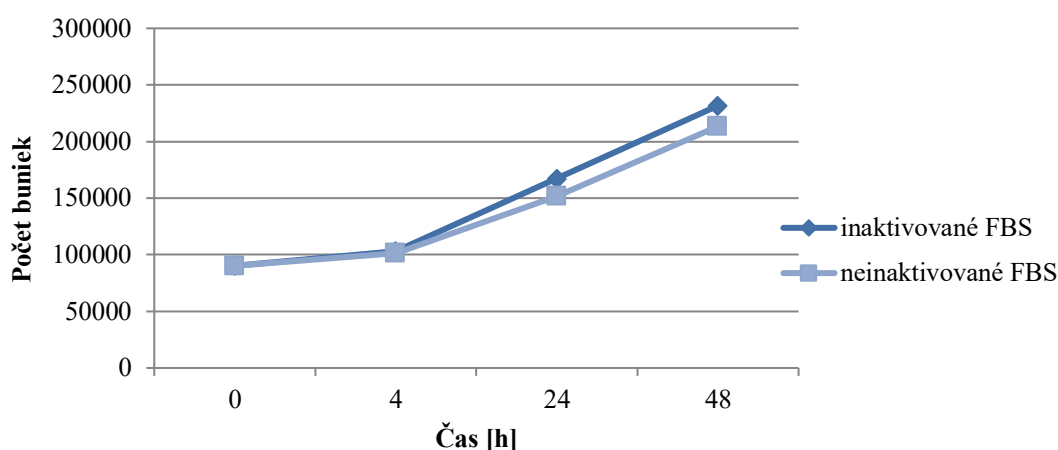
5.2.1 Bunky bunkovej línie THP-1

Monocytárne bunky

Proliferačná aktivita buniek

THP-1 monocyty boli kultivované v kultivačnom médiu RPMI s obsahom 10 % tepelne inaktivovaného séra alebo 10 % neinaktivovaného séra. Tepelnou inaktíváciou séra sa zruší funkčnosť proteínov komplementu. Vplyv prítomnosti funkčného komplementu na proliferáciu THP-1 buniek bol skúmaný stanovením doby zdvojenia buniek v podmienkach s inaktivovaným a neinaktivovaným sérom. Monocyty kultivované s prídavkom inaktivovaného séra sa zdvojili za 39,7 h (hodnota smerodatnej odchýlky je $SD= 2,72$ h). Hodnota udáva priemer zo štyroch nezávislých meraní. THP-1 bunky kultivované v sére s rovnakým objemom neinaktivovaného séra proliferovali o niečo pomalšie. Ich doba zdvojenia bola stanovená na 43,6 h ($SD= 7,37$ h). Hodnota udáva priemer z piatich nezávislých meraní. Vzhľadom k veľkosti štandardných odchýlok oboch meraní nebol nájdený výrazný rozdiel v proliferácii. Dynamiku rastu buniek v kultivačných podmienkach s inaktivovaným a neinaktivovaným sérom znázorňuje Graf 1.

Dynamika rastu THP-1 v rozdielnych kultivačných podmienkach



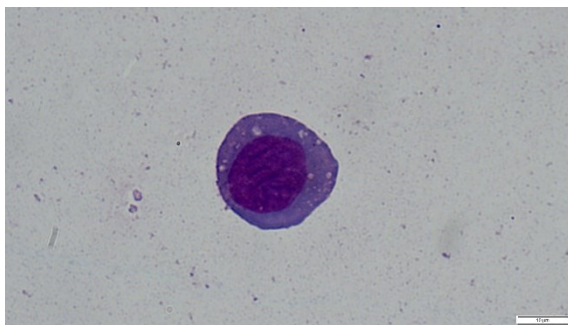
Graf 1: Dynamika rastu monocytov v prostredí s inaktivovaným a neinaktivovaným sérom. Dynamika bola sledovaná po dobu 48 hodín.

THP-1 bunky sú proliferačne aktívne. Vzhľadom na hodnotu smerodatnej odchýlky meraní má prítomnosť aktívneho komplementu v kultivačnom FBS pravdepodobne len malý vplyv na proliferačnú aktivitu THP-1 buniek. V snahe čo najviac sa priblížiť podmienkam *in vivo*, kde je komplementový systém funkčný, boli ďalej bunky štandardne kultivované v kultivačnom médiu s obsahom 10 % (V/V) neinaktivovaného FBS.

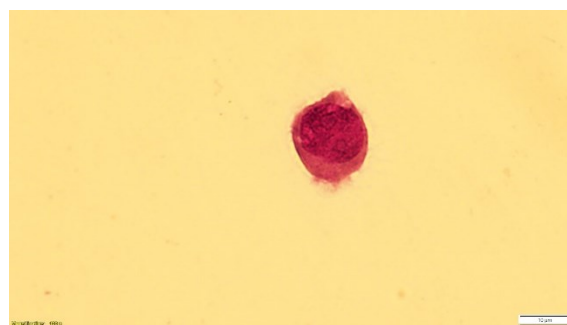
Morfológia buniek

Bunky THP-1 línie majú morfologické znaky veľmi podobné monocytom. Jedná sa ale o leukemickú líniu. Jadro malo väčšinou sférický tvar bez typického zárezu. Jadrová membrána bola hladká, ohraničená a bez lalokov. Cytoplazma často obsahovala malé váčky. Váčky za normálnych podmienok neboli detekované v jadre. V populácii sa často vyskytovali bunky, ktoré tvarom cytoplazmy a obvodovými invagináciami pripomínali makrofágy. To dokazovali výsledky histologického farbenia. Reprezentatívne obrázky histologických preparátov sú zobrazené na Obrázku 12 (a, b).

a)



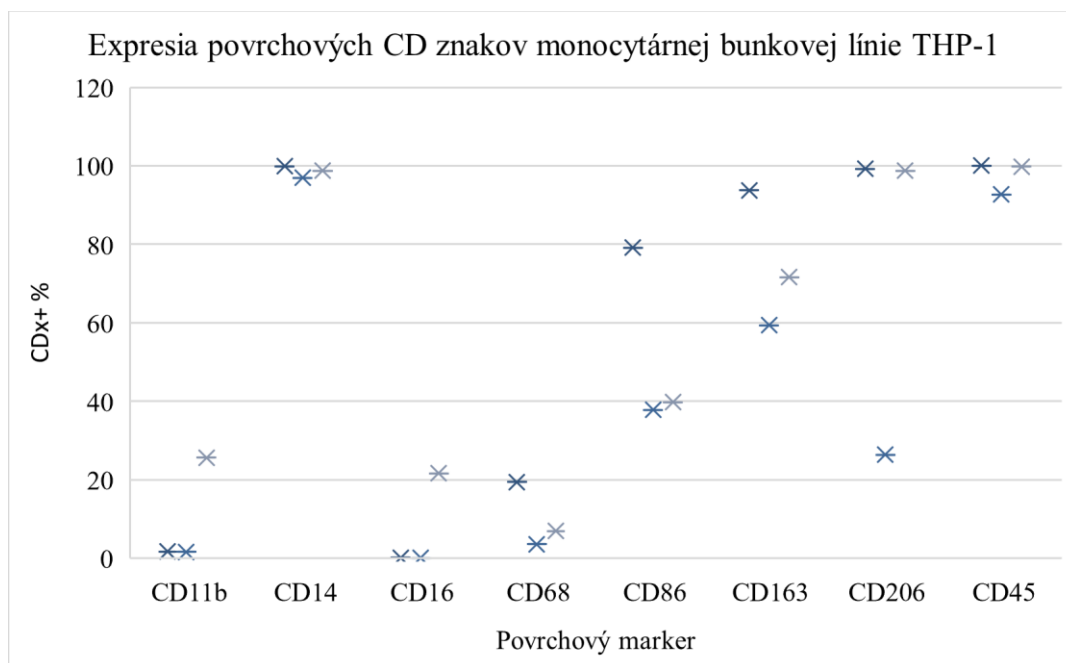
b)



Obrázok 12 a, b: Fotky histologických preparátov suspenzných THP-1 buniek z kultúry. Farbenie bunkového náteru May-Grunwald-Giemsa, pozorované svetelným mikroskopom pri zväčšení 100 ×, s imersným olejom. Mierka na obrázku reprezentuje 10 μm.

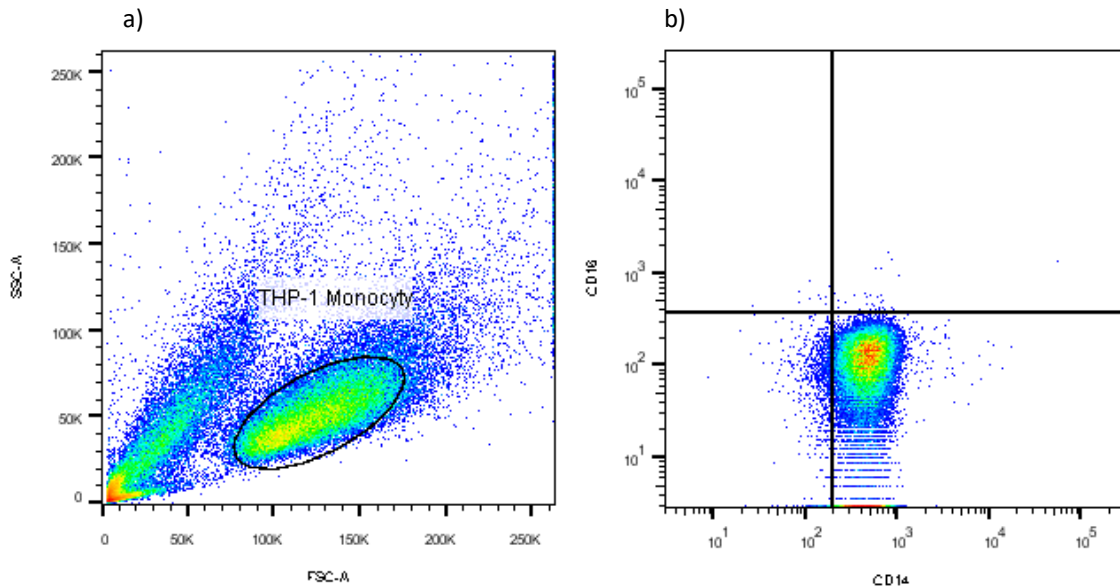
Expresia povrchových markerov CD

Expresný profil povrchových CD molekúl (z angl. cluster of differentiation) bol odlišný od primárnych monocytov a v čase bol nestabilný. Mieru expresie jednotlivých znakov typických pre monocyty/ makrofágy ukazuje Graf 2. Jediným z pozorovaných znakov s pomerne stabilnou mierou expresie počas jednotlivých meraní bol monocytárny marker CD14. Takmer 100 % buniek ho exprimuje.



Graf 2: Povrchová expresia markerových CD molekúl monocytov/ makrofágov. Výsledky zobrazujú percento pozitívnych buniek na sledovaný znak. Dáta pochádzajú z troch nezávislých meraní.

Typický vzor cytometrických dát koexpresie CD14 a CD16 molekúl pre monocyty nebol pozorovaný. Distribúcia buniek na základe predného (FSC-A) a bočného rozptylu (SSC-A) a cytometrické zobrazenie koexpresie CD14 a CD16 pre THP-1 bunky sú znázornené na Obrázku 13 (a, b). Obrázok 13 predstavuje reprezentatívnu vzorku.

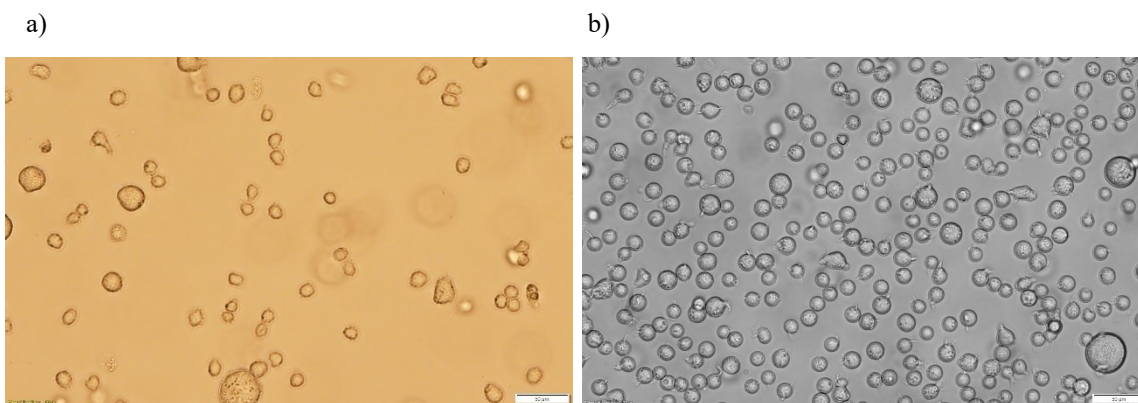


Obrázok 13: a) Distribúcia a ohraničenie THP-1 bunkovej populácie na dot plote FSC-A/ SSC-A. b) Dot plot znázorňujúci koexpresiu CD14 a CD16 molekuly u THP-1 populácie.

Diferencované bunky podobné makrofágom

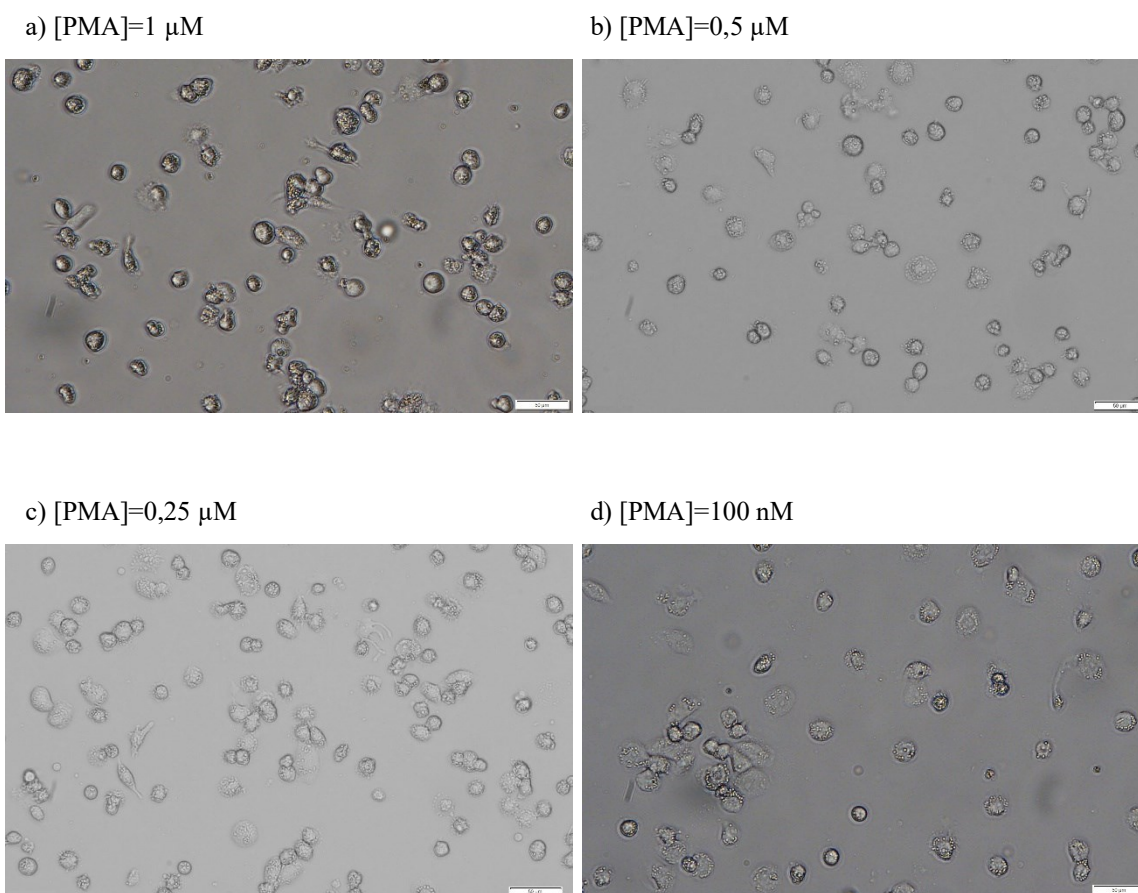
K získaniu adherentných buniek pripomínajúce ľudské makrofágy bol použitý protokol s použitím diferenciačného agens PMA v koncentrácii 10 nM- 1 μ M. Protokol bol aplikovaný vo variante s obsahom fáze odpočinku (MDM6) aj bez (MDM3). Boli skúmané morfológické odlišnosti v závislosti na použitej koncentrácii diferenciačného agens.

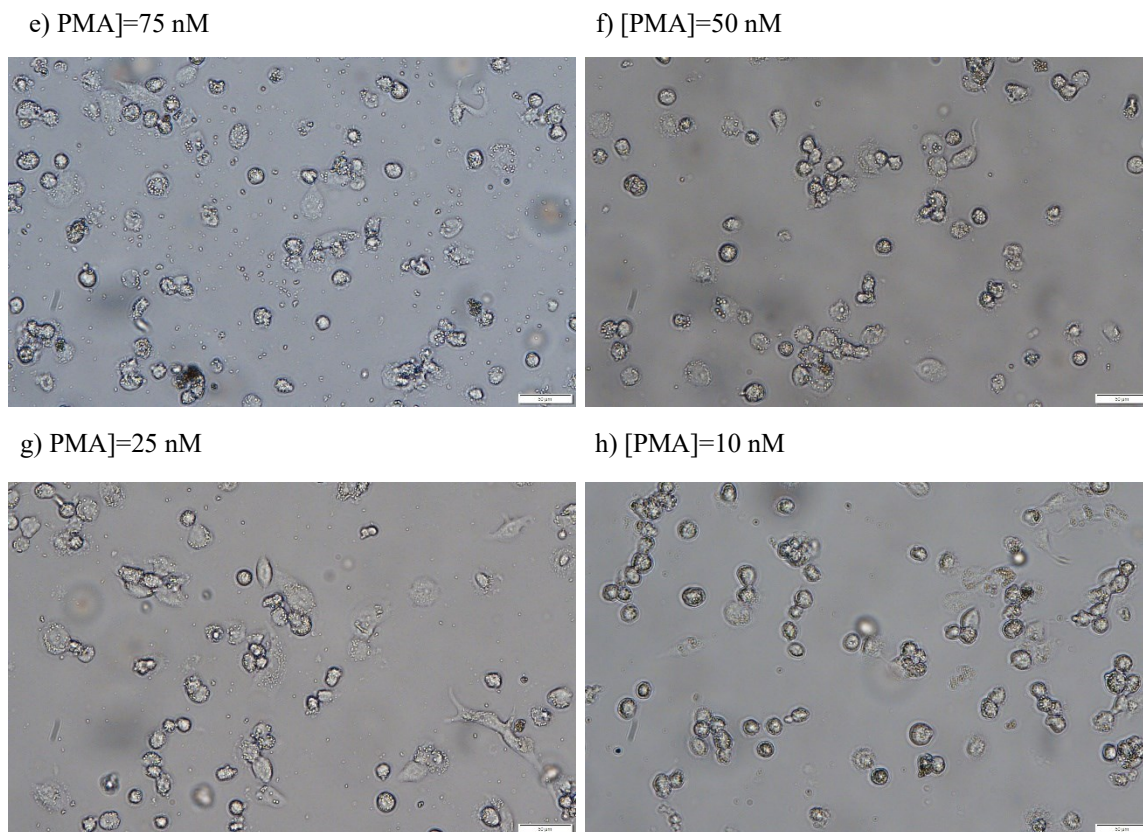
Po pridaní PMA (10 nM- 1 μ M) do kultúry monocytov boli malé morfológické zmeny pozorovateľné už po 20 minútach. Z hladkého povrchu buniek sa vytvárali malé cytoplazmatické výbežky. THP-1 monocyty v kultúre a prvotné morfológické zmeny po stimulácii monocytov PMA sú na Obrázku 14 (a, b).



Obrázok 14: a) THP-1 bunky v kultúre a b) THP-1 po 20 minútach inkubácie v roztoku 100 nM PMA v kultivačnom médiu. Pozorované mikroskopiou temného poľa. Mierka na obrázku reprezentuje 50 µm.

Výrazná zmena morfológie monocytov bola pozorovaná po troch dňoch diferenciácie buniek. Bunky boli adherentné, zmenšil sa veľkostný pomer jadra k cytoplazme a zvýšilo sa množstvo vakuol v cytoplazme (viz. Obrázok 12 a, b vs Obrázok 15 a-h). Neboli pozorované žiadne výrazné morfológické odlišnosti medzi bunkami diferenciovanými v prostredí s rôznou koncentráciou PMA. Morfológiu buniek po 3 dňoch diferenciácie v médiu s rôznou koncentráciou PMA zobrazuje Obrázok 15 (a- h).

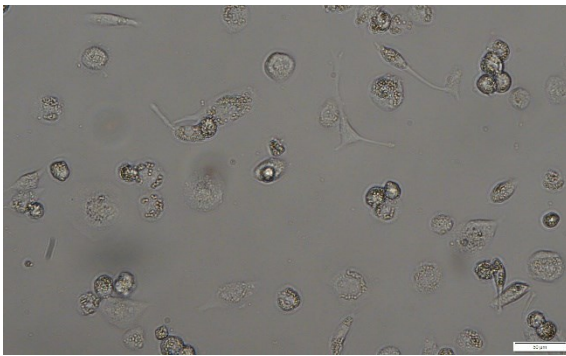




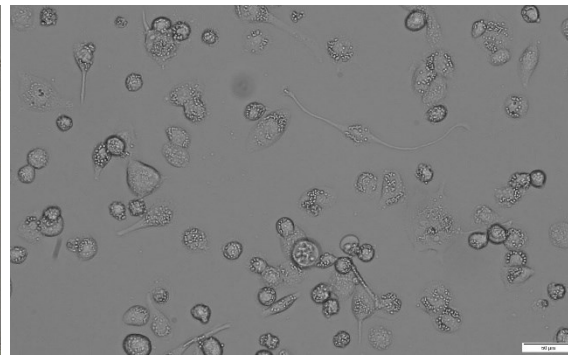
Obrázok 15 a- h: THP-1 bunky diferencované roztokom s rôznou koncentráciou PMA po dobu troch dní. Odpovedajúca koncentrácia PMA je uvedená nad každým obrázkom. Pozorované mikroskopiou temného poľa. Mierka na obrázkoch reprezentuje 50 μ m.

Po skončení fáze odpočinku v deň 6 boli morfológické zmeny ešte výraznejšie. Zmenšil sa najmä veľkostný pomer jadra k cytoplazme a na bunkách boli pozorované dlhé cytoplazmatické výbežky- pseudopódie. Zvýšil sa aj počet vakuol v cytoplazme buniek. (viz. Obrázok 12 a, b vs Obrázok 16 a-h). Morfológické zmeny súvisiace s diferenciaciou buniek (zväčšenie objemu a zvýšenie vnútornej granularity) bolo možné detekovať aj cytometrickou analýzou a distribúciou buniek na dot plote FSC-A/ SSC-A. Reprezentatívne dot ploty sú zobrazené na Obrázku 17 (a, b). Bunky diferencované v prostredí s vyššou iniciačnou koncentráciou PMA vytvárali viac cytoplazmatických výbežkov a ich morfológická premena bola výraznejšia. Morfológické odlišnosti MDM6 buniek v posledný deň diferenciacie v médiu s rôznou iniciačnou koncentráciou PMA zobrazuje Obrázok 16 (a- h).

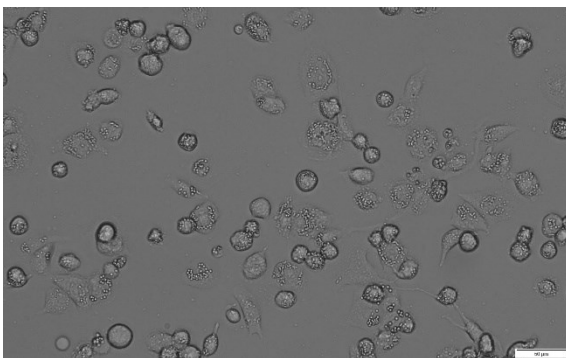
a) [PMA]=1 μ M



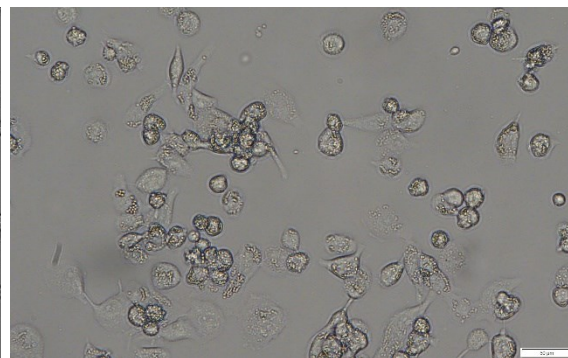
b) [PMA]=0,5 μ M



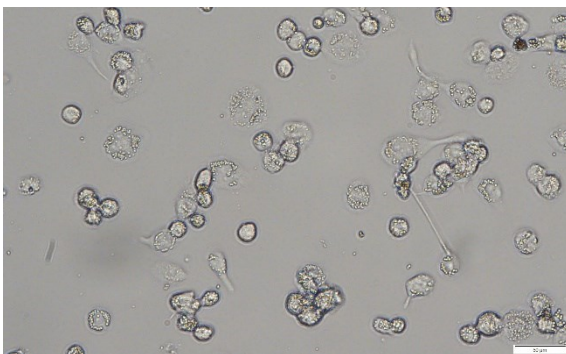
c) [PMA]=0,25 μ M



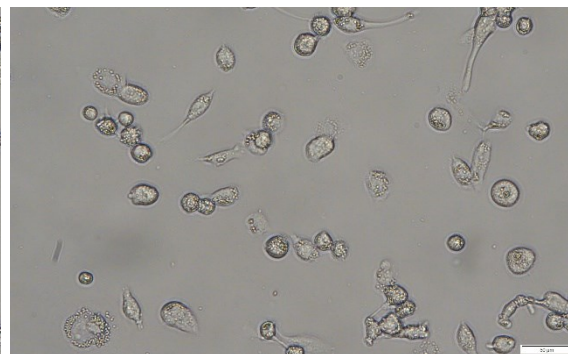
d) [PMA]=100 nM



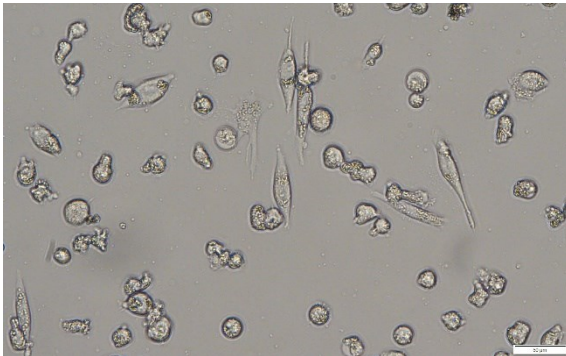
e) [PMA]=75 nM



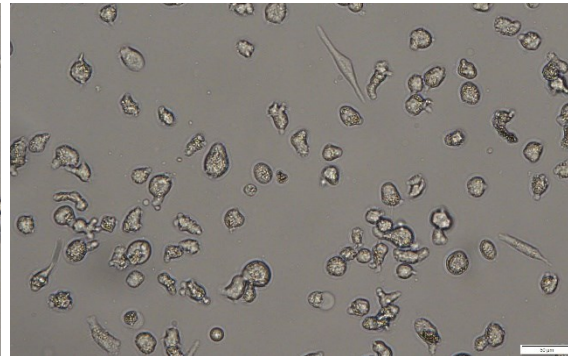
f) [PMA]=50 nM



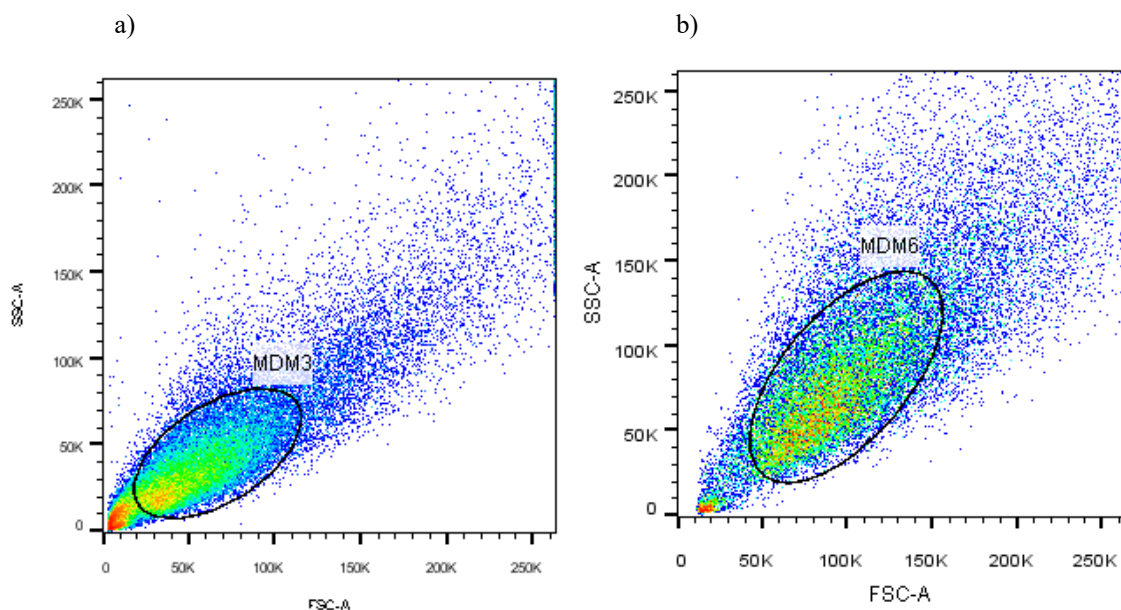
g) [PMA]=25 nM



h) [PMA]=10 nM



Obrázok 16 a- h: Diferencované bunky pripomínajúce makrofágy v posledný deň diferenciácie s fázou odpočinku. Použitá iniciačná koncentrácia PMA je uvedená nad každým obrázkom. Pozorované mikroskopiou temného poľa. Mierka na obrázkoch reprezentuje 50 μ m.

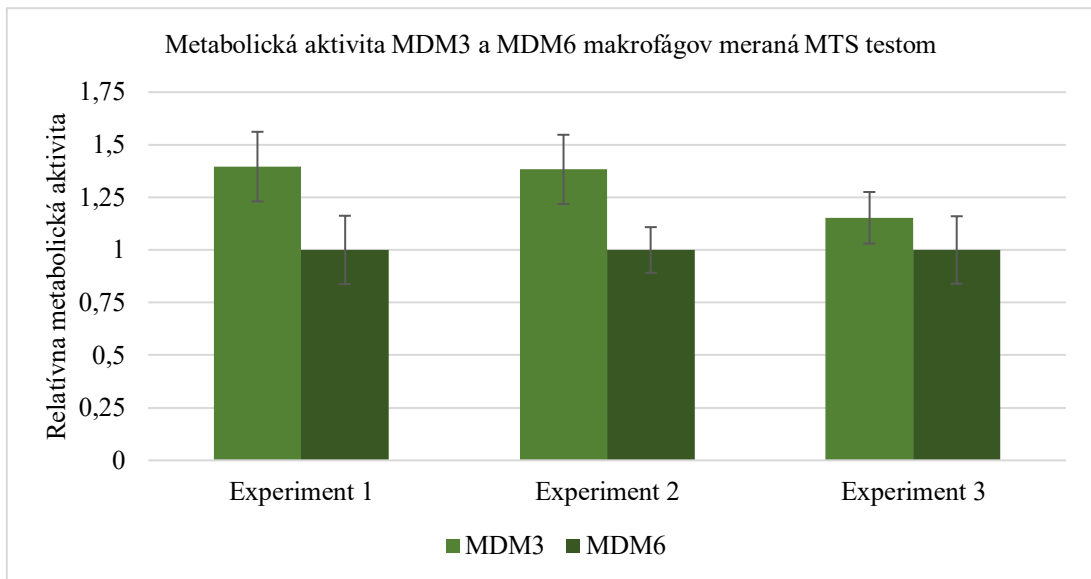


Obrázok 17: Reprezentatívne dot ploty distribúcie makrofágov v FSC-A/ SSC-A a) v tretí deň diferenciácie a b) šiesty deň diferenciácie. Diferenciáciou sa zvyšuje FSC aj SSC charakteristika bunkovej populácie.

Výsledný protokol používaný pre ďalšie diferenciacie THP-1 buniek bol šesťdňový protokol s fázou odpočinku a iniciačnou koncentráciou PMA 100 nM. Táto koncentrácia bola používaná v našom laboratóriu už v minulosti. Protokol s fázou odpočinku bol zvolený z dôvodu výraznejších morfológických zmien a podobnosti takto diferencovaných buniek s ľudskými primárnymi makrofágmi. Monocyty diferencované PMA by mali byť modelom ľudských M0 makrofágov.

V prípade použitia diferenciačného protokolu pre primárne monocyty, teda s použitím M-CSF, THP-1 bunky nevykazovali žiadne morfológické zmeny ani po šiestich dňoch inkubácie s M-CSF.

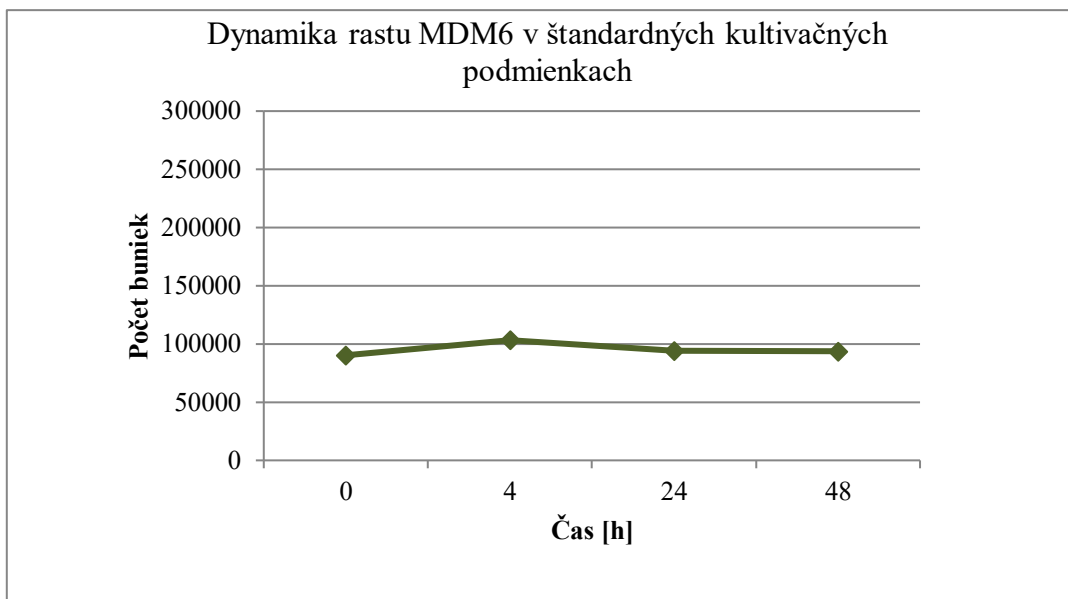
Meranie celkovej metabolickej aktivity buniek diferencovanými v prostredí s 100 nM PMA s využitím skráteného protokolu (MDM3) a protokolu s fázou odpočinku (MDM6) ukázali, že metabolicky aktívnejšie sú MDM3 o približne 31 % (SD= 13,67). Experiment bol trikrát zopakovaný a výsledná hodnota predstavuje priemernú hodnotu týchto meraní. Grafické znázornenie pomeru medzi metabolickou aktivitou MDM3 a MDM6 poukazuje Graf 3 a zachytáva tri experimenty samostatne.



Graf 3: Grafické znázornenie relatívnej metabolickej aktivity MDM 3 a MDM6 buniek meranej MTS testom. Dáta sú prezentované ako priemerná hodnota vypočítaná z 32 hodnôt v rámci každého experimentu. Chybové úsečky predstavujú smerodatnú odchýlku.

Proliferačná aktivita buniek

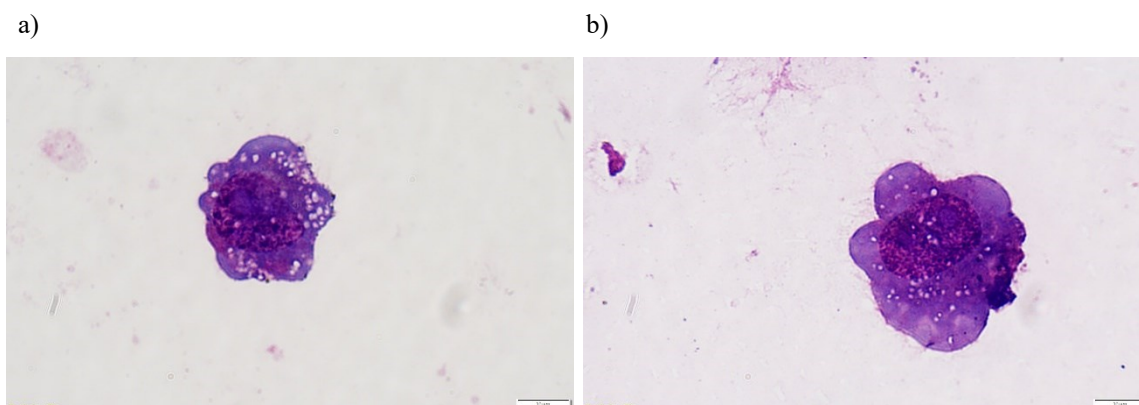
Analýzou doby zdvojenia MDM6 v štandardnom kultivačnom médiu sa ukazuje, že narozdiel od monocytov, diferencované makrofágy nie sú proliferačne aktívne alebo proliferujú len minimálne. Na základe dát z jednotlivých experimentov zopakovaných trikrát nezávisle na sebe nebolo možné kvantifikovať dobu zdvojenia. Dynamika rastu v štandardných kultivačných podmienkach je graficky znázornená na Grafe 4.



Graf 4: Dynamika rastu buniek podobných makrofágom diferencovaných z monocytárnej bunkovej línie THP-1 s použitím protokolu s fázou odpočinku a iniciačnou koncentráciou PMA 100 nM. Dynamika bola sledovaná po dobu 48 hodín.

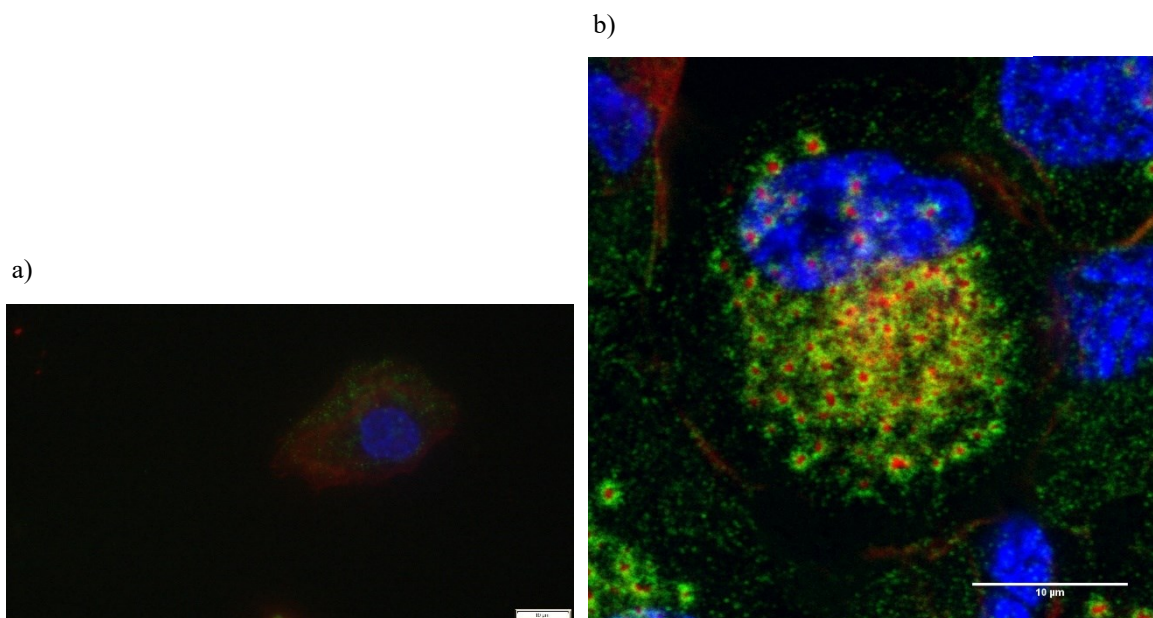
Morfológia buniek

Diferencované bunky podobné makrofágom sa odlišovali od THP-1 monocytov výrazne. Adherovali ku dnu kultivačnej nádoby, zmenšil sa veľkostný pomer jadra k cytoplazme a narástol počet vakuol v cytoplazme buniek. Histologickým farbením boli vizualizované invaginácie cytoplazmatickej membrány. Histologické farbenie neukázalo zmeny v tvare jadra. Reprezentatívne obrázky histologických preparátov sú zobrazené na Obrázku 18 (a, b).



Obrázok 18 a, b: Fotky histologických preparátov adherentných MDM6. Farbenie bunkového náteru May-Grunwald-Giemsa, pozorované svetelným mikroskopom pri zväčšení 100 ×, s imersným olejom. Mierka na obrázkoch reprezentuje 10 μ m.

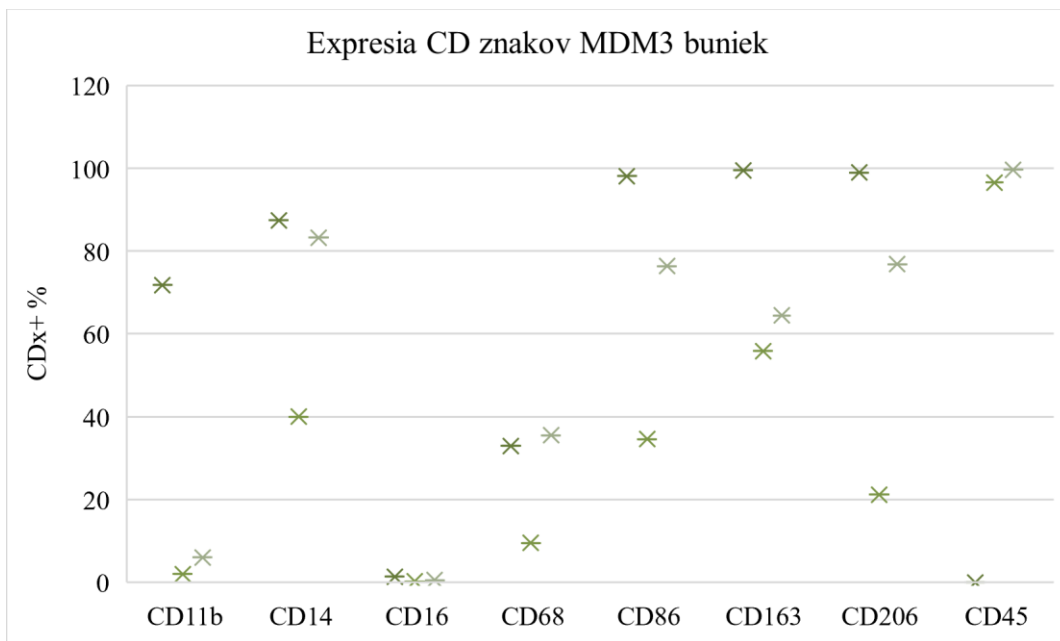
Na snímkach zo svetelného mikroskopu bolo vidieť formovanie pseudopódií. Jednou z morfológických zmien pri diferenciácii monocytov do makrofágov je aj tvorba ďalších na aktín bohatých štruktúr- podozómov. Tie sa podarilo detekovať imunohistochemickým farbením. U oboch typov makrofágov boli detekované podozomy. Reprezentatívny snímok z fluorescenčného mikroskopu MDM3 buniek so značením F-aktínu a vinkulínu je na Obrázku 19 a). Na Obrázku 19 b) je snímok z konfokálneho mikroskopu Leica TCS SP8 X (Wetzlar, Nemecko) preparátu MDM3 makrofágov, ktorý bol pripravený rovnako. Na konfokálnom mikroskope sa podarilo zachytiť detailnejšiu štruktúru podozómov. Snímka pochádza od Mgr. Terezy Bělinovej, PhD z nášho laboratória.



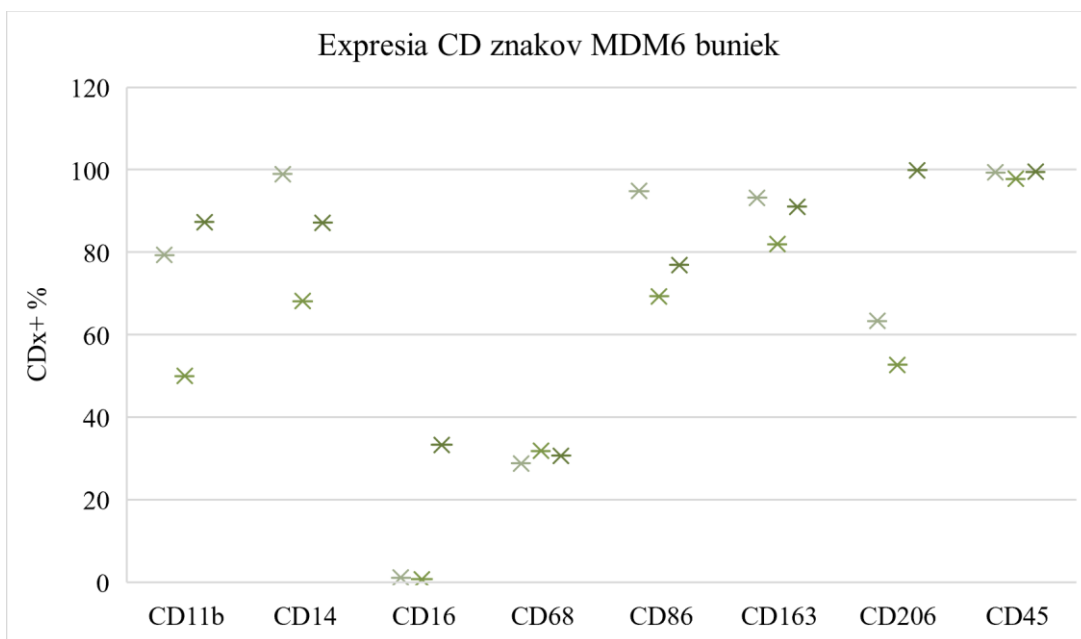
Obrázok 19: Fotky preparátov adherentných MDM3 makrofágov s imunohistochemickým farbením DAPI (modrá), vinkulínu (zelená) a aktínu (červená). Obrázok 19 a) pochádza zo svetelného mikroskopu Olympus IX71, Obrázok 19 b) z konfokálneho mikroskopu Leica TCS SP8 X a umožňuje vidieť detailnejšiu štruktúru podozómov. Mierka na obrázkoch reprezentuje 10 µm.

Expresia povrchových markerov CD

Expresný profil povrchových CD molekúl MDM3 a MDM6 bol v čase nestabilný rovnako ako u THP-1 monocytov. Z dát nebolo možné určiť trend zmeny expície, v zmysle poklesu alebo nárastu, jednotlivých povrchových molekúl. Neexistovala ani korelácia s expresným profilom M0 makrofágov, ktoré by mala táto diferencovaná línia buniek pripomínať. Rozdiely v troch nezávislých meraniach expície CD znakov zobrazuje pre MDM3 Graf 5, pre MDM6 bunky Graf 6.



Graf 5: Povrchová expresia CD molekúl makrofágov MDM3. Výsledky zobrazujú percento pozitívnych buniek na sledovaný znak. Dáta pochádzajú z troch nezávislých meraní.

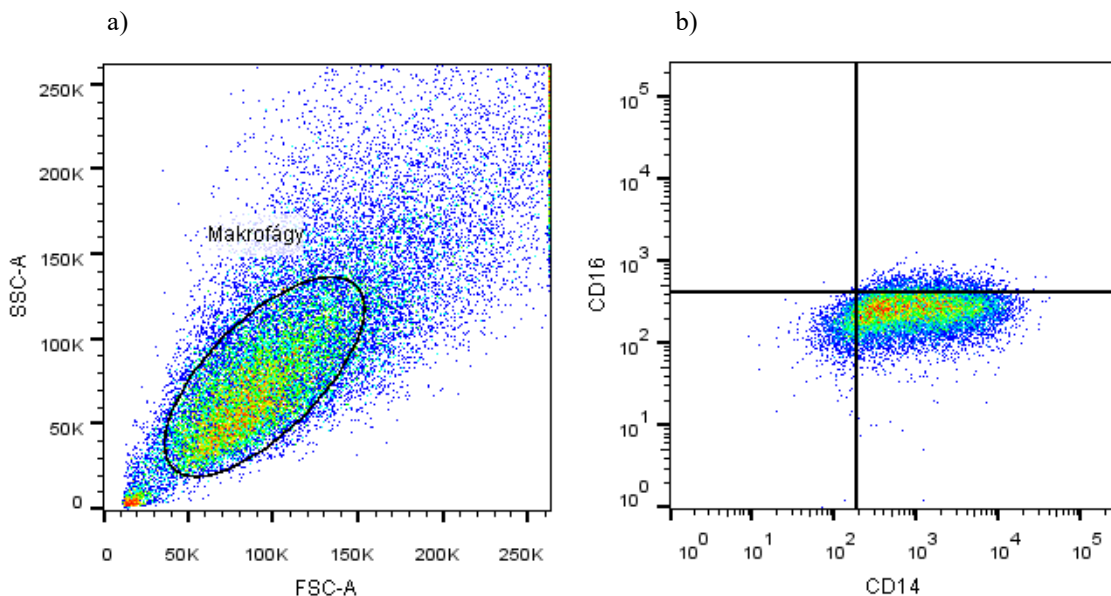


Graf 6: Povrchová expresia CD molekúl makrofágov MDM6. Výsledky zobrazujú percento pozitívnych buniek na sledovaný znak. Dáta pochádzajú z troch nezávislých meraní.

Výsledky analýzy cytometrických dát CD molekúl THP-1 monocytov a MDM3 a MDM6 makrofágov jasne nepotvrdili diferenciáciu či polarizáciu buniek. THP-1 monocyty a makrofágy (MDM6 a MDM3) sa medzi sebou v povrchovej expresii CD znakov odlišujú, ale

z dôvodu veľkých rozdielov medzi jednotlivými meraniami nie je možné určiť, že tieto zmeny súvisia s diferenciáciou buniek.

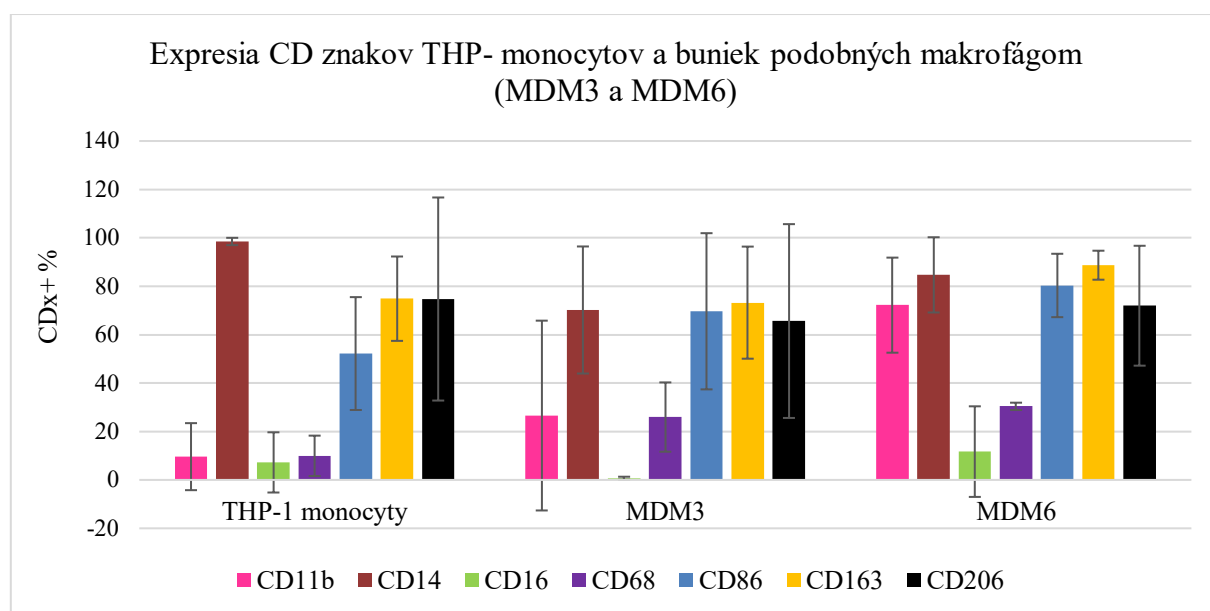
Zmena distribúcia buniek na základe FSC a SSC a grafické zobrazenie koexpresie CD14 a CD16 pre MDM6 bunky, ktoré sú ďalej v štúdiu používané sú znázornené na Obrázku 20 (a, b). Obrázok 20 predstavuje jednu konkrétnu vzorku.



Obrázok 20: a) Distribúcia a ohraničenie MDM6 populácie na dot plote FSC-A/ SSC-A. b) Dot plot znázorňujúci koexpresiu CD14 a CD16 molekuly u MDM6 populácie.

Literárne zdroje neposkytujú jasný protokol diferenciácie THP-1 buniek. Ja som použila protokol s fázou odpočinku a s iniciačnou koncentráciou PMA 100 nM. Morfologické zmeny buniek diferencovaných v prostredí s rôznou iniciačnou koncentráciou PMA boli pozorovateľné až na konci fáze odpočinku. Zmeny sa týkali najmä preformovania cytoplazmy a formovania podozómov (viz. Obrázok 19). Expresný profil CD znakov nie je možné jednoznačne určiť. Expresia bunkovej línie THP-1 pred a počas diferenciácie nie je stabilná a trend vývoja expresie jednotlivých CD znakov počas diferenciácie nie je možné stanoviť. Jasne preukázaným znakom u línie THP-1 bol CD14. Jeho expresia bola konštantná, medzi dátami z jednotlivých meraní bola len veľmi malá odchýlka. U MDM6 buniek bol pomerne konštantne intenzívne exprimovaný znak CD68, CD86 a CD163. Malá smerodatná odchýlka ukazuje na pomerne stabilnú mieru expresie týchto znakov. Molekula CD206, marker M2 makrofágov, je s podobnou intenzitou exprimovaný na monocytoch aj makrofágoch.

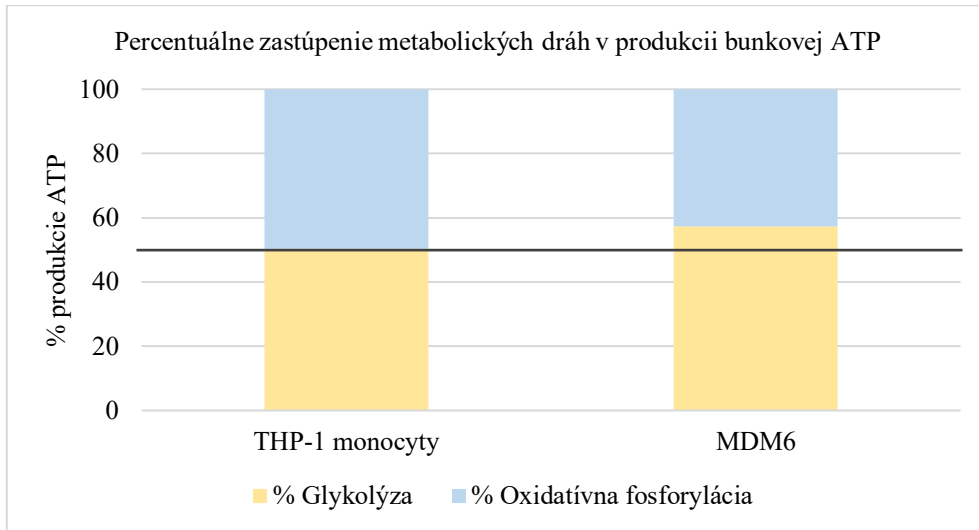
Cytometrická analýza nepotvrdila jasnú diferenciaciu či polarizáciu buniek. Zmeny nemajú konštantný trend. Ako zobrazuje sumarizujúci Graf 7, vysoké hodnoty smerodatných odchýlok vo všetkých meraniach vylučujú, že by išlo o štatisticky významnú zmenu exprese niektorého z povrchových markerov. Výsledkom diferenciačných protokolov s použitím PMA je pravdepodobne zmiešaná populácia monocytov/ makrofágov MDM3, v prípade MDM6 je možné hovoriť o populácii makrofágov rôznych subtypov. Miera exprese jednotlivých CD znakov v populácii THP-1 môže súvisieť so stupňom pre-diferenciácie monocytárnych buniek. Graf 7 nie je reprezentatívnym zobrazením súboru dát z troch nezávislých experimentov, ale slúži na sumarizujúce zobrazenie exprese CD znakov pred a počas diferenciácie THP-1 monocytov.



Graf 7: Sumarizujúci graf exprese CD molekúl THP-1 monocytov a diferencovaných makrofágov MDM3 a MDM6. Výsledky sú priemrom 3 nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodatnú odchýlku.

Metódou Sea Horse bolo skúmané či existuje rozdiel v metabolizme ATP THP-1 monocytov a diferencovaných makrofágov MDM6. Semikvantitatívne bolo stanovené množstvo ATP, ktoré vznikne glykolýzou a mitochondriálnou oxidatívnou fosforyláciou. Na syntéze bunkovej ATP sa nepodielajú len tieto dráhy, ale jedná sa o majoritné miesta produkcie ATP v ľudskej bunke. Experiment bol trikrát nezávisle zopakovaný a ukazuje sa, že leukemická monocytárna línia THP-1 produkuje približne rovnaké frakcie ATP pochádzajúce z glykolýzy a oxidatívnej fosforylácie (glykolýza 50,4 %, SD= 4,33). Tento výsledok nie je v súlade s literatúrou, ktorá prezentuje výsledky, že THP-1 bunky využívajú preferenčne dráhu

oxidatívnej fosforylácie (Suganuma *et al.*, 2010). Po diferenciácii týchto monocytov a vzniku adherentných buniek pripomínajúce makrofágy (MDM6) sa mierne zvýšila frakcia ATP produkovaná glykolýzou (glykolýza 57,25 %, SD= 8). Grafické znázornenie frakcii bunkovej ATP pochádzajúcej z glykolytickej dráhy a dráhy oxidatívnej fosforylácie je na Grafe 8.



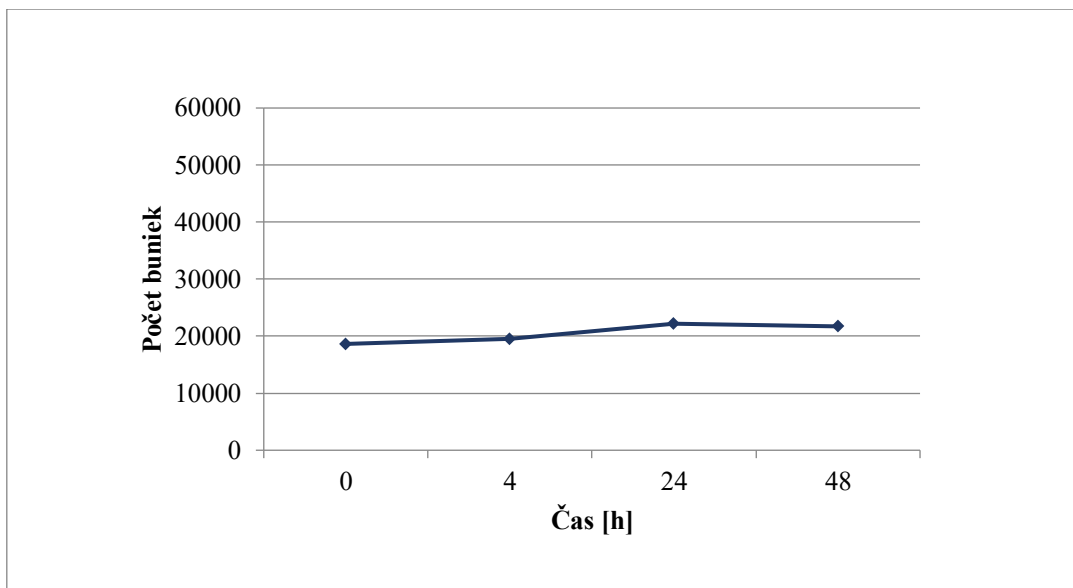
Graf 8: Grafické znázornenie frakcií bunkovej ATP pochádzajúcej z glykolytickej dráhy (žltá) a dráhy oxidatívnej fosforylácie (modrá) pre THP-1 monocyty a MDM6 makrofágy. Stredná čiara udáva 50 %.

5.2.2 Primárne bunky

V tejto práci som pracovala s primárnymi bunkami mononukleárnej vrstvy. Detailnejšia analýza morfológických parametrov je zameraná na populáciu monocytov. Kvalita a normalita primárneho materiálu vo forme plnej žilnej krvi alebo primárneho izolátu bola stanovená kontrolnými meraniami (krvný obraz, krvný diferenciál, krvný náter, analýza sér, cytometrická analýza lymfocytov...), ktoré sú popísané v kapitole 4 a ich výsledky nebudú prezentované. Počas všetkých experimentov platilo, že v prípade akejkoľvek abnormality vo výsledku kontrolných meraní nebude daná vzorka ďalej použitá v experimentálnej práci. Toto bolo dodržané.

Proliferačná aktivita primárnych buniek

Primárne mononukleárne bunky získané izolačnou metódou 2 a PBMC s nabohatením CD14+ populácie získané izolačnou metódou 3 boli pri experimentoch zameraných na charakterizáciu buniek inkubované v štandardnom kultivačnom médiu RPMI s 10 % (V/V) neinaktivovaného FBS. Experimenty ukazujú, že bunky ďalej neproliferujú. Na základe dát z jednotlivých experimentov nebolo možné kvantifikovať dobu zdvojenia ani bunkový rast. Dynamika rastu PBMC v týchto kultivačných podmienkach je graficky znázornená na Grafe 9.



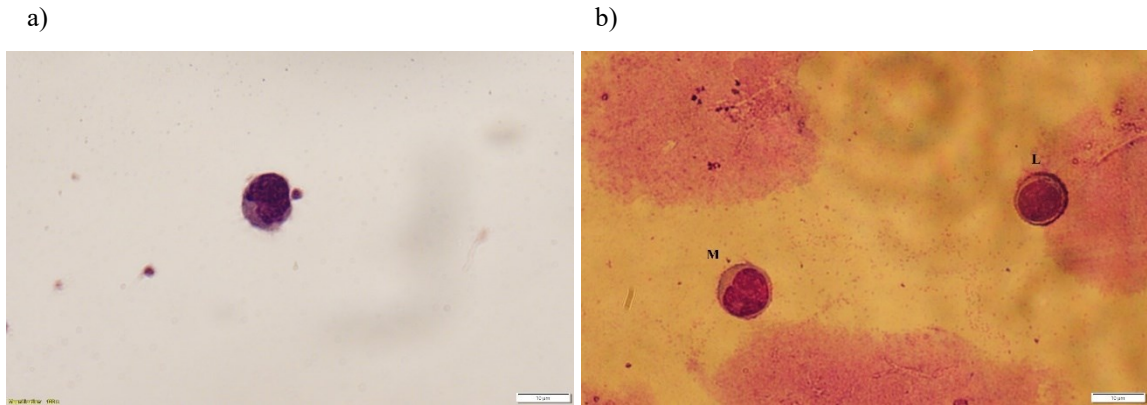
Graf 9: Dynamika rastu PBMC v médiu s neinaktivovaným FBS. Graf je zhrnutím 4 nezávislých experimentov kedy sa jednalo o dva vzorky získané izolačnou metódou 2 a dva vzorky získané izolačnou metódou 3. Dynamika bola sledovaná po dobu 48 hodín.

Analýza doby zdvojenia primárnych buniek počas 48 hodín od izolácie naznačuje, že primárne bunky sa už ďalej nedelia alebo len v minimálnej miere. To je v súlade s literatúrou (Ampel & Christian, 1997).

Morfológia primárnych buniek

Morfológia PBMC buniek v kultúre bola podobná s morfológiou THP-1 monocytov. PBMC mali rovnaký tvar ako THP-1 bunky, ich veľkostný pomer však bol asi 1:3 (PBMC: THP-1). V primárnom izoláte sa vyskytovala zmiešaná populácia monocytov a lymfocytov s prevahou lymfocytov. Jednotlivé populácie od seba nebolo možné v kultúre rozpoznať. Bunky boli rozpoznateľné po vizualizácii histologickými farbami. Na rozdiel od THP-1

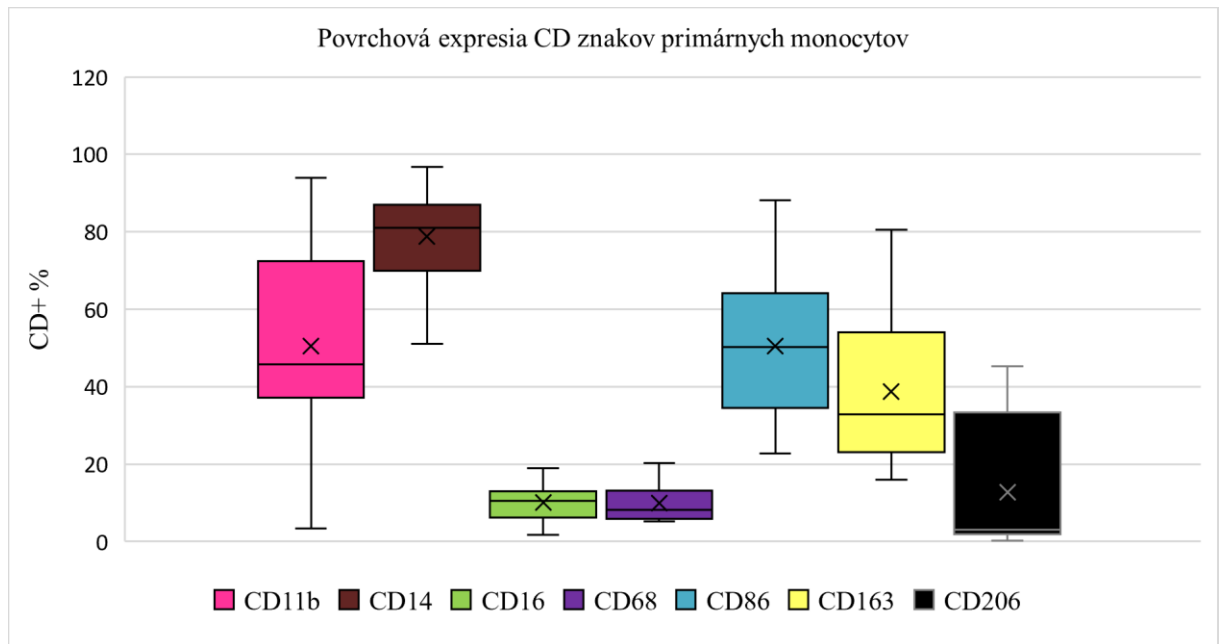
monocytov, jadro primárnych monocytov obsahovalo typický zárez na jednej strane, bunky neobsahovali žiadne cytoplazmatické vačky a povrch buniek bol hladký. Reprezentatívny obrázok histologického preparátu je na Obrázku 21 (a, b).



Obrázok 21: Fotky histologických preparátov PBMC buniek po izolácii z plnej krvi. a) Monocyt s typickým zárezom na jednej strane jadra. b) Lymfocyt (L) s monocytom (M).Farbenie bunkového náteru May-Grunwald-Giemsa, pozorované svetelným mikroskopom pri zväčšení 100 ×, s imersným olejom. Mierka na obrázku reprezentuje 10 µm.

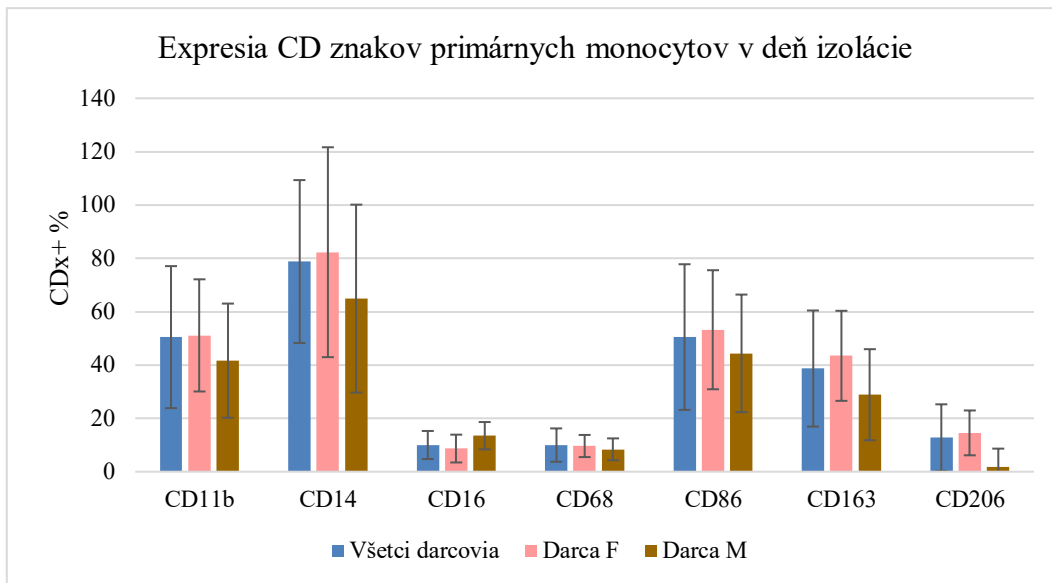
Expresia povrchových markerov CD

Povrchová expresia CD molekúl monocytárnej populácie v rámci PBMC bola stabilná. Malé rozdiely medzi jednotlivými meraniami boli pozorované na súbore meraní viacerých darcov aj v rámci jednotlivcov. Rozdiely boli menšie ako v prípade bunkovej línie THP-1. Mieru expresie jednotlivých znakov typických pre monocyty v deň izolácie v celkovom súbore dát zobrazuje Graf 10.



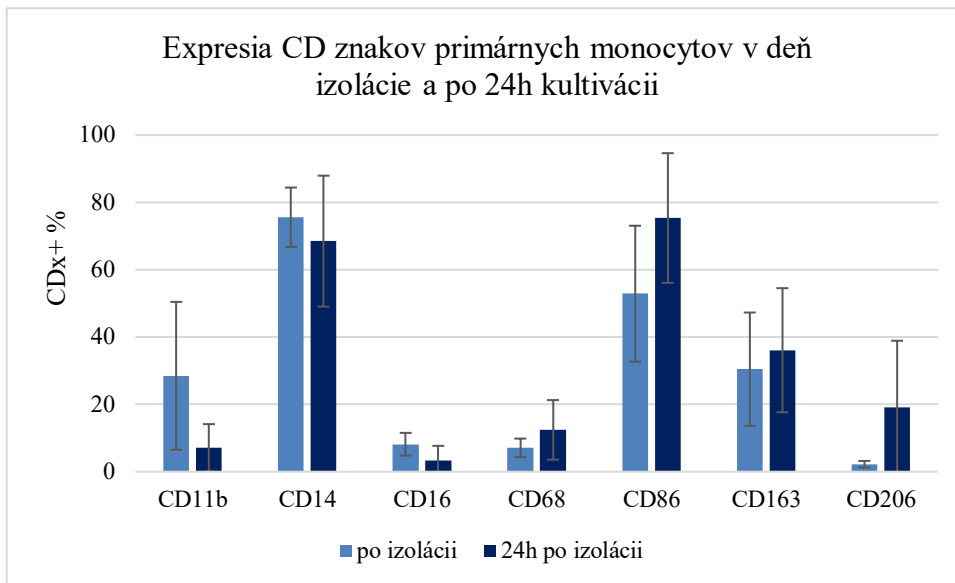
Graf 10: Expresia CD znakov monocytárnej populácie vo vzorke PBMC v deň izolácie z plnej krvi. Dáta sú prezentované ako krabicové grafy- stredná čiara reprezentuje medián, krížik priemer, plocha krabice vyjadruje interkvartilné rozpätie. Chybové úsečky ukazujú rozptyl. Dáta sú prezentované ako percento pozitívnej monocytárnej populácie. Dáta sumarizujú výsledky z 11 nezávislých meraní. Pre znaky CD14 a CD16 išlo o 22 nezávislých meraní. Bunky pochádzajú od 7 rôznych darcov.

Bola preukázaná aj intraindividuálna variabilita vo vzore expresie monocytárných CD znakov. Dáta vychádzajú z opakovanej analýzy monocytárnej populácie dvoch zdravých darcov. Intraindividuálna variabilita dvoch darcov (Darca F a Darca M) a variabilita v rámci celkového súboru dát je znázornená na Grafe 11.



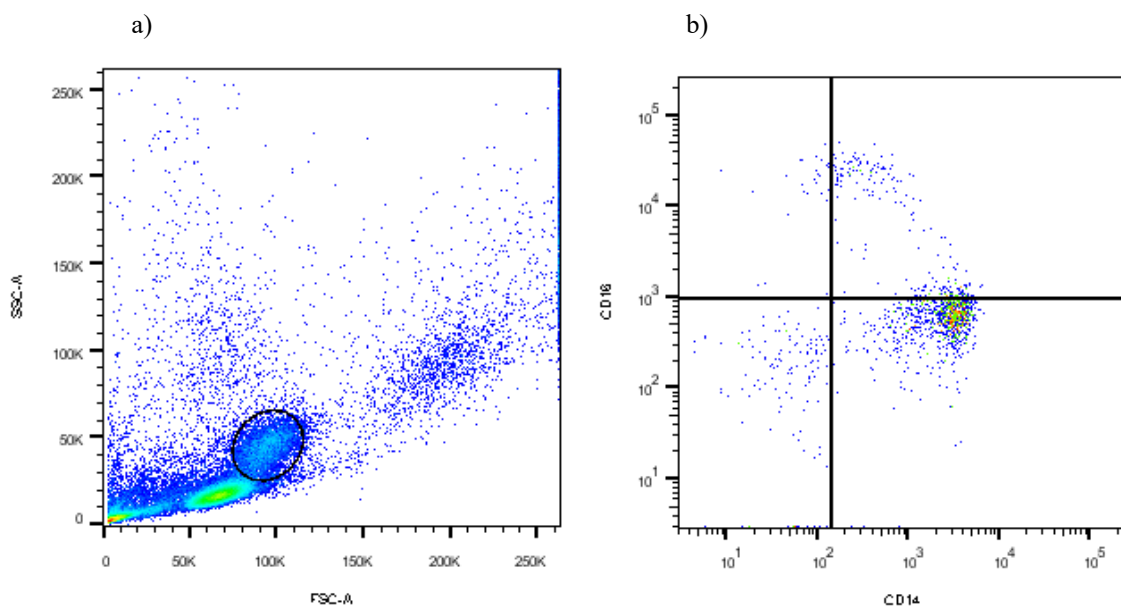
Graf 11: Sumarizujúci graf expresie CD molekúl primárných monocytov v populácii PBMC v deň izolácie. Graf zobrazuje vzor expresie CD znakov primárných monocytov vrámci populácie PBMC Darcu F (7 nezávislých meraní), Darcu M (3 nezávislé merania) a celého súboru získaných dát od všetkých darcov (11 nezávislých meraní, dáta CD14 a CD16 pochádzajú z 22 nezávislých meraní). Výsledky sú priemerom uvedeného počtu nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodatnú odchýlku.

Po izolácii boli bunky kultivované 24 hodín v médiu s autológnym neinaktivovaným sérom. Z cytometrické analýzy vzoriek v deň izolácie a 24 hodín po izolácii bolo zistené, že dochádza k zvýšeniu expresie CD znakov, ktoré sú spojené s diferenciáciou monocytov do makrofágov. Ide o CD68, CD86, CD163 a CD206. Expresia týchto markerov bola zvýšená vždy. Zmenu miery expresie povrchových CD markerov monocytárnej populácie v deň izolácie a 24 hodín po izolácii buniek zobrazuje Graf 12. Koeficient zmeny expresie CD znakov za 24 hodín nebolo možné určiť, nakoľko rozdiely medzi jednotlivými meraniami boli veľké. Dáta sú preto prezentované ako sumarizujúci graf s primernými hodnotami zastúpenia pozitívnych buniek v populácii monocytov a sú zobrazené príslušné smerodatné odchýlky.



Graf 12: Sumarizujúci graf expresie CD molekúl primárnych monocytov v populácii PBMC v deň izolácie (bledomodrá) a 24 hodín po izolácii (tmavomodrá). Bunky boli 24 h kultivované v médiu s autológnym sérom. Výsledky sú priemerom 4 nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodatnú odchýlku. Bunky pochádzali od rôznych darcov.

Pri cytometrickej analýze monocytov bol vždy pozorovaný typický vzor koexpresie CD14 a CD16 molekúl. Dominantnou bola vždy populácia klasických monocytov (CD14⁺⁺ CD16⁻). Distribúcia buniek na základe predného a bočného rozptylu a cytometrické zobrazenie koexpresie CD14 a CD16 pre monocyty sú znázornené na Obrázku 22 (a, b). Dáta prezentované na Obrázku 22 predstavujú reprezentatívnu vzorku.



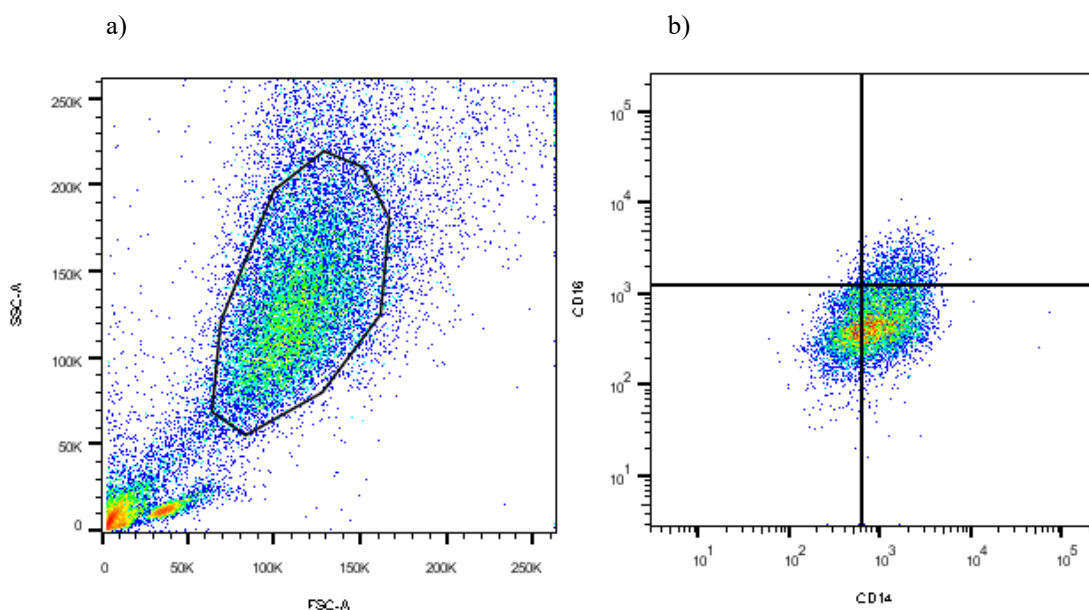
Obrázok 22: a) Distribúcia a ohraničenie monocytárnej populácie na dot plote FSC-A/ SSC-A. b) Dot plot znázorňujúci koexpresiu CD14 a CD16 molekuly. Populácia klasických monocytov sa nachádza v pravom spodnom kvadrante.

Makrofágy

Stimuláciou primárnych monocytov M-CSF došlo k diferenciacii populácie adherentných buniek, ktoré by mali predstavovať populáciu M0 makrofágov. Ďalšia analýza diferencovaných buniek prebiehala iba na adherentných bunkách.

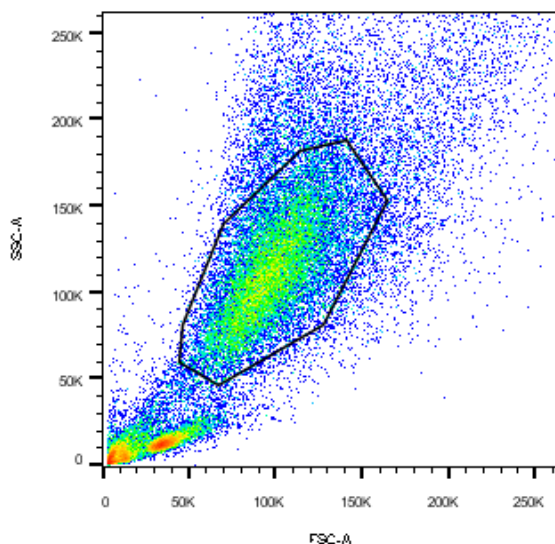
Populácia makrofágov po 7 dňoch diferenciacie vykazovala podobné morfológické zmeny ako v prípade diferenciacie THP-1 monocytov. Došlo k zmenšeniu pomeru jadra k cytoplazme, zvýšila sa vnútorná granularita buniek a došlo k formovaniu pseudopódií.

V populácii M0 makrofágov boli morfológické zmeny spomedzi všetkých typov makrofágov najmenej výrazné, bunky v kultúre sa podobali bunkám, ktoré slúžili ako nestimulovaná kontrola a pravdepodobne spontánne diferencovali (Obrázok 29). Zmeny v distribúcii M0 makrofágov v dot plote FSC-A/ SSC-A a zmeny v koexpresii molekúl CD14 a CD16 sú znázornené graficky dot plotmy z cytometrickej analýzy na Obrázku 23 (a, b). Adherentnosť buniek a zvýšenie vnútornej granularity buniek sú viditeľné na snímkach kultúry na Obrázku 26 a). Obrázok 26 b) z histologického preparátu zachytáva zmeny vo veľkostnom pomere jadra k cytoplazme a zmeny tvaru cytoplazmatickej membrány. Zmeny sú popísané vzhľadom na morfológiu monocytov po izolácii, ktorá je zachytená na Obrázku 23 a Obrázku 24.



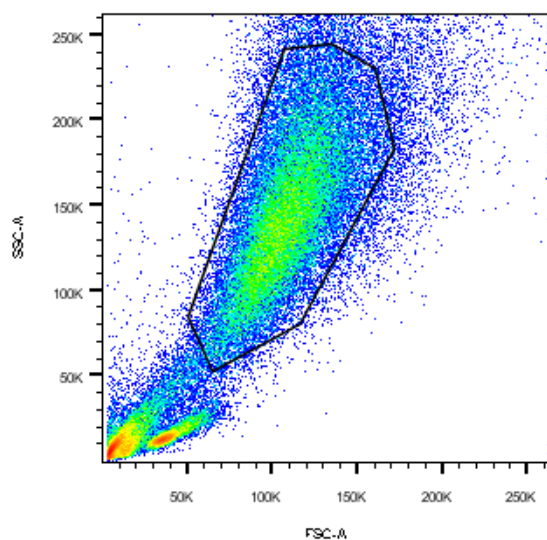
Obrázok 23: a) Distribúcia a ohraňenie populácie makrofágov M0 na dot plote FSC-A/ SSC-A. b) Dot plot znázorňujúci koexpresiu CD14 a CD16 molekuly u populácie M0.

M1 makrofágy vznikli polarizáciou M0 makrofágov použitím LPS. Zmena v distribúcii populácie po cytometrickej analýze na dot plote FSC-A/ SSC-A nebola oproti M0 bunkám výrazná (Obrázok 23 a vs Obrázok 24), na histologických preparátoch sa vyskytovali bunky, ktorých pokles pomeru jadra k cytoplazme bol výraznejší než tomu bolo pri diferenciacii do M0 makrofágov (Obrázok 21 vs obrázok 27 b). M1 bunky v kultúre nevykazovali výrazné zmeny morfológie oproti M0 kultúre (Obrázok 26 a vs Obrázok 27 a), oba typy buniek mali mierne pretiahnutý tvar (tzv. „fried egg“ morfológia).

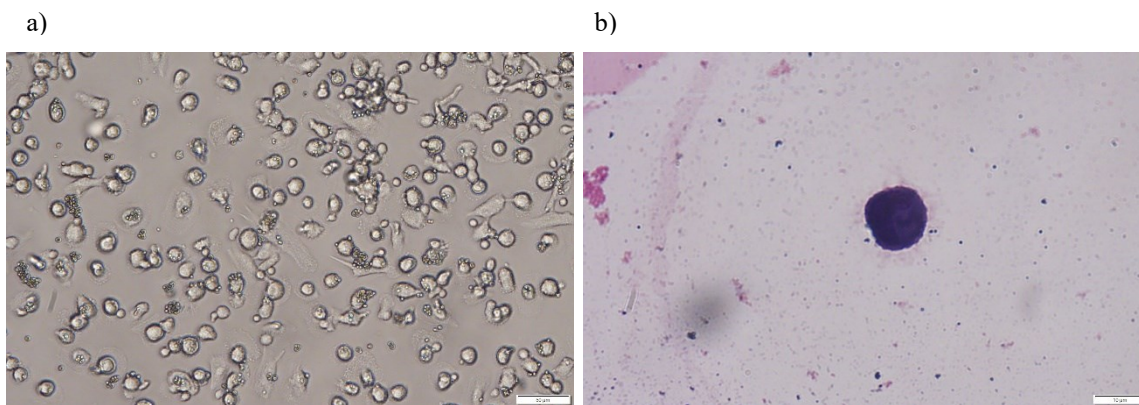


Obrázok 24: Distribúcia a ohraničenie populácie makrofágov M1 na dot plote FSC-A/ SSC-A z cytometrickej analýzy.

V prípade, že boli M0 makrofágy polarizované IL-4, bola získaná populácia M2 makrofágov. M2 makrofágy vykazovali najvýraznejšie morfológické zmeny spomedzi skúmaných subtypov makrofágov oproti monocytom. Bol pozorovaný najväčší posun v rámci SSC-A charakteristiky na cytometrických dátach (Obrázok 25). Pre bunky v kultúre bola charakteristická prítomnosť dlhých pseudopódií, celkovo mali bunky výrazne pretiahnutý tvar (Obrázok 28 a), histologické preparáty ukázali výrazné zmenšenie pomeru jadra k cytoplazme a zvlňenie plazmatickej membrány (Obrázok 28 b).

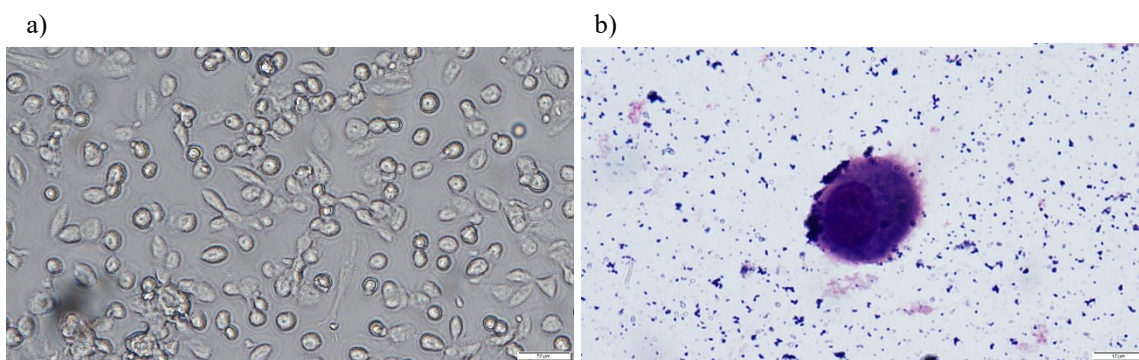


Obrázok 25: Distribúcia a ohraničenie populácie makrofágov M2 na dot plote FSC-A/ SSC-A z cytometrickej analýzy.



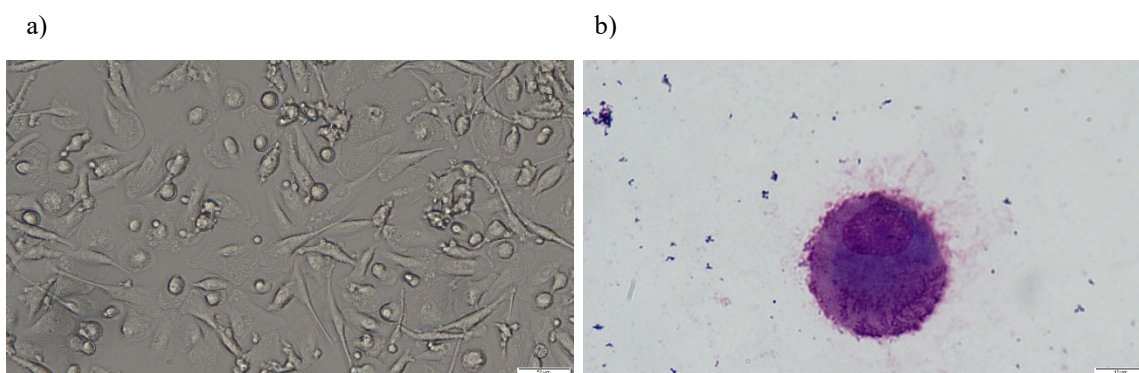
Obrázok 26: a) Adherentné makrofágy M0 v kultúre v posledný deň diferenciácie. Bunky obsahujú vakuoly a u časti buniek došlo k formovaniu pseudopódií. Pozorované mikroskopiou temného poľa. Mierka na obrázku reprezentuje 50 μm .

b) Snímka z histologického preparátu M0 makrofágov po diferenciácii. M0 makrofág s mierne zvlnenou plazmatickou membránou, veľkostný pomer jadra k cytoplazme je mierne znížený. Farbenie bunkového náteru May-Grunwald-Giemsa, pozorované svetelným mikroskopom pri zväčšení 100 \times , s imersným olejom. Mierka na obrázku reprezentuje 10 μm .



Obrázok 27: a) Adherentné makrofágy M1 v kultúre po polarizácii M0 buniek LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 hodiny). Bunky obsahujú vakuoly, majú pretiahnutý tvar a vytvorené pseudopódie. Pozorované mikroskopiou temného poľa. Mierka na obrázku reprezentuje 50 μm .

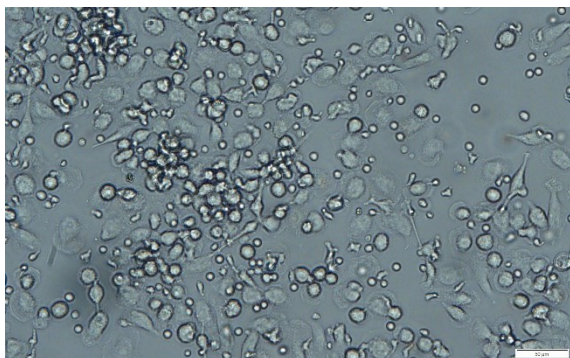
b) Snímka z histologického preparátu M1 makrofágov po polarizácii. M1 makrofág s mierne zvlnenou plazmatickou membránou, veľkostný pomer jadra k cytoplazme je znížený. Farbenie bunkového náteru May-Grunwald-Giemsa, pozorované svetelným mikroskopom pri zväčšení 100 \times , s imersným olejom. Mierka na obrázku reprezentuje 10 μm .



Obrázok 28: a) Adherentné makrofágy M2 v kultúre po polarizácii M0 buniek IL-4 (10 ng/ml , 24 hodín). Bunky obsahujú veľké množstvo vakuol, majú výrazne pretiahnutý tvar a vytvorené dlhé pseudopódie. Pozorované

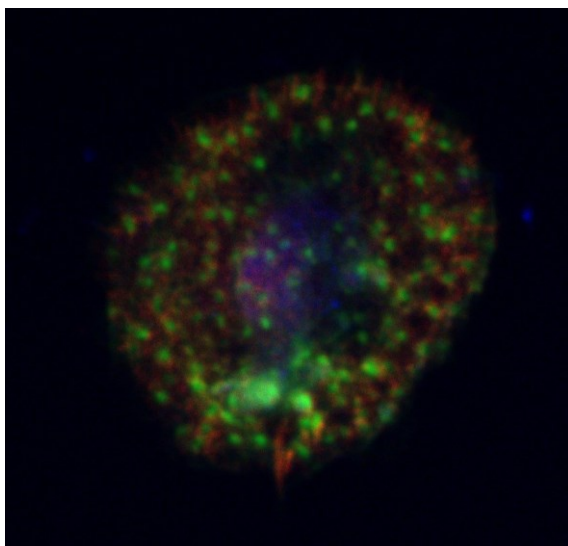
mikroskopiou temného poľa. Mierka na obrázku reprezentuje 50 μ m.

b) Snímka z histologického preparátu M2 makrofágov po polarizácii. M2 makrofágy s výrazne zvlnenou plazmatickou membránou, veľkostný pomer jadra k cytoplazme je oproti monocytom značne znížený. Farbenie bunkového náteru May-Grunwald-Giemsa, pozorované svetelným mikroskopom pri zväčšení 100 \times , s imersným olejom. Mierka na obrázku reprezentuje 10 μ m.



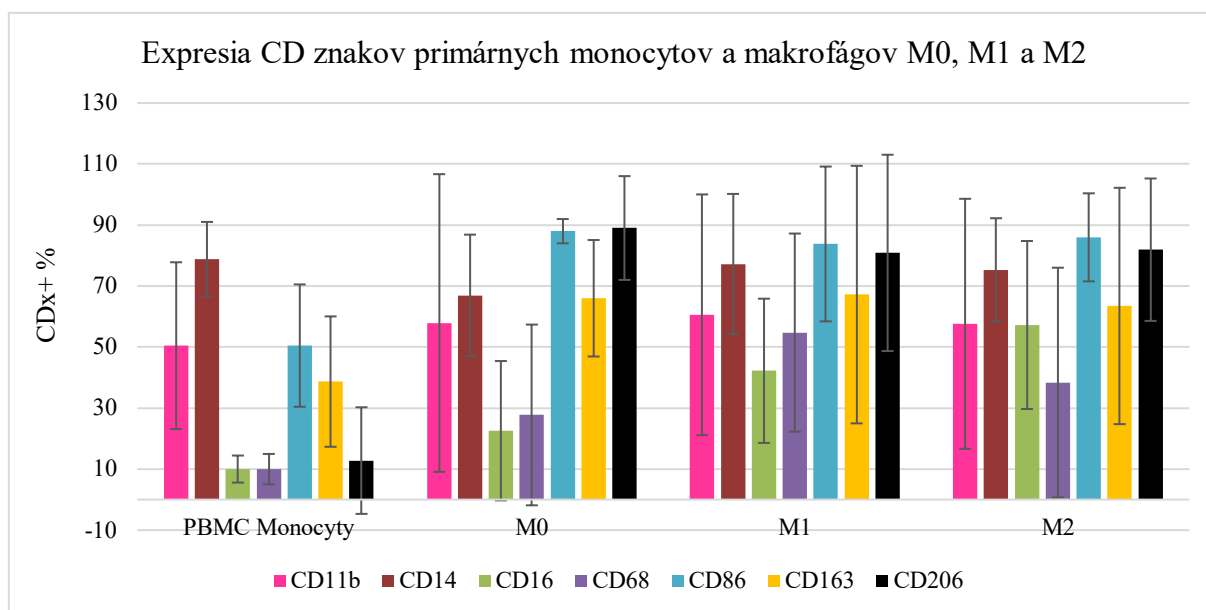
Obrázok 29: Adherentné bunky v kultúre, ktoré pravdepodobne spontánne diferencovali z primárnych monocytov po 7 dňoch v médiu s autológnym sérom bez pridania diferenciačného agens. Pozorované mikroskopiou temného poľa. Mierka na obrázku reprezentuje 50 μ m.

Prítomnosť typických podzémov po diferenciacii monocytov do makrofágov bola overená snímkami na STED mikroskope. Rozterové preparáty fixovaných buniek boli fluorescenčne farbené pre detekciu faloidínu a vinkulínu. Vizualizáciou faloidínu bol lokalizovaný F-aktín a vinkulín lokalizoval oblasti adherentných spojení. Reprezentatívna snímka makrofágu so značením F-aktínu a vinkulínu je na Obrázku 30. Detailná štruktúra ako zachytáva snímok z konfokálneho mikroskopu Obrázok 19 b) nebola viditeľná ani v prípade použitia Stedycon technológie.



Obrázok 30: Fotky preparátov adherentných makrofágov zo STED mikroskopu. Imunohistochemické farbenie DAPI (modrá), vinkulín (zelená) a aktín (červená).

Populácia makrofágov v kultúre alebo na histologických preparátoch nikdy nebola uniformná. Všetky analyzované bunky boli adherentné, čo som pri klasifikácii monocytov/ makrofágov považovala za jeden z hlavných znakov diferenciačného procesu. Charakteristiky popisujúce morfológické znaky jednotlivých subtypov makrofágov vyššie popisujú morfológiu majoritnej časti populácie, ktorá v danom vzorku bola pozorovaná. V súlade s nejednotnosťou morfológie sú aj cytometrické dáta, ktoré naznačujú, že využitie konkrétneho diferenciačného protokolu nevedie k vzniku uniformnej populácie M0/ M1, resp. M2 makrofágov, ale pravdepodobne sa jedná o zmiešanú populáciu makrofágov. Sumárny graf vzoru expresie CD markerov monocytárnej populácie a populácií makrofágov diferencovaných rôznymi protokolmi ako je písané v kapitole 4.2.4 predstavuje Graf 13. Nebolo možné určiť koeficient zmeny v expresii jednotlivých CD znakov rámci diferenciačného procesu z dôvodu veľkých odchýlok medzi jednotlivými meraniami. Graf 13 nie je reprezentatívnym zobrazením nameraných dát zo štyroch nezávislých experimentov, ale slúži na sumarizujúce zobrazenie dát vo forme priemerných hodnôt expresie CD znakov populácie monocytov/ makrofágov.



Graf 13: Sumarizujúci graf exprese CD molekúl populácie primárnych monocytoov vrámci PBMC v deň izolácie z plnej krvi a diferencovaných makrofágov. Makrofágy boli diferencované podľa protokolov do M0, M1, resp. M2 subtypov. Výsledky sú priemerom 4 nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodatnú odchýlku.

5.3. Experimenty s nanočasticami

Interakcia nanočastíc s bunkami po 24 hodinách stimulácie bola analyzovaná na úrovni celkovej metabolickej aktivity buniek, životnosti buniek a zmien v sekrécii cytokínov. Vo vybraných prípadoch bola sledovaná intracelulárna distribúcia nanočastíc a zmeny morfológie buniek po dlhodobej stimulácii.

Metabolická aktivita buniek

Potenciálna cytotoxicita nanočastíc bola stanovená analýzou bunkového metabolizmu MTS metódou, ktorá ukazuje aktivitu bunkových dehydrogenáz. Dáta sú prezentované ako metabolická aktivita stimulovaných buniek vztiahnutá k metabolickej aktivite nestimulovaných buniek, teda kontroly. Pokles celkovej aktivity buniek pod hranicu 75 % indikovalo cytotoxický efekt použitých agens na bunky. Zvýšenie metabolickej aktivity nad hranicu 100 % (vyššia aktivita ako kontrolná vzorka) bolo hodnotené ako pozitívna stimulácia buniek.

Životnosť buniek

K detailnejšiemu štúdiu účinku použitých agens na bunky bola využitá metóda analyzujúca ich životnosť- 7AAD/ Hoechst 33342 analýza. Bolo stanovené percentuálne zastúpenie apoptotických a nekrotických buniek, respektíve buniek v neskorej apoptóze, z celkovej populácie buniek. Podľa literatúry je množstvo apoptotických buniek v zmiešanej kultúre primárnych buniek menej ako 10 % (Prieto *et al.*, 2002). Bude sledovaná korelácia medzi výsledkami MTS metódy a metódy 7AAD/ Hoechst 33342.

Produkcia cytokínov

Potenciálny imunomodulačný účinok jednotlivých druhov nanočastíc bol stanovený analýzou sekretovaných cytokínov po stimulácii. Cytokínový profil bol sledovaný u dvoch vzoriek primárnych buniek (PBMC Darcu F, PBMC Darcu M). K analýze vzorku Darcu M boli použité dve metódy, ktorých výsledok bude porovnaný.

5.2.3 Experimenty so zlatými nanočasticami

Zlaté nanočastice boli použité na 24-hodinovú stimuláciu buniek línie THP-1 aj primárnych buniek. V prípade bunkovej línie boli stimulované monocyty a diferencované makrofágy MDM6. Primárne bunky predstavovali vzorky PBMC od dvoch darcov (Darca F, Darca M).

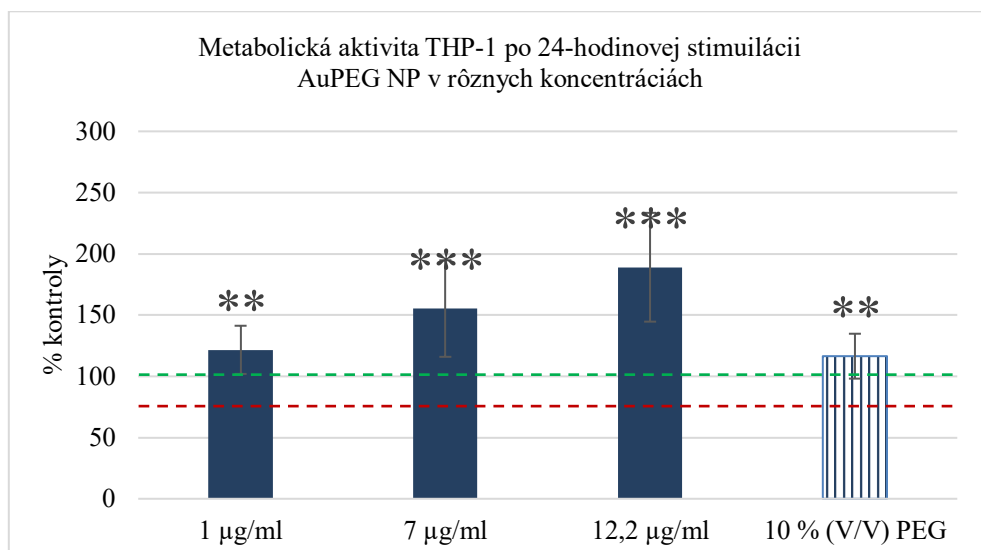
Po stimulácii buniek nanočasticami bola analyzovaná celková metabolická aktivita buniek. Pri experimentoch s PBMC bola sledovaná aj životnosť buniek a bol analyzovaný cytokínový profil buniek po stimulácii.

Interakcia Au NP s THP-1 monocytmi

Potencionálna cytotoxicita nanočastíc AuPEG NP a AuPEG-NH₂ NP bola stanovená MTS metódou. Prvé experimenty mali za úlohu stanoviť cytotoxicitu, prípadnú cytotoxickú koncentráciu Au NP pre THP-1 bunky. Boli zvolené tri rôzne koncentrácie nanočastíc v prostredí pre stimulované vzorky a jedno množstvo kontrolného roztoku PEG(NH₂). Dáta sú prezentované po vztiahnutí metabolickej aktivity stimulovanej vzorky k vzorke nestimulovanej a sú vyjadrené ako jej percentuálna hodnota.

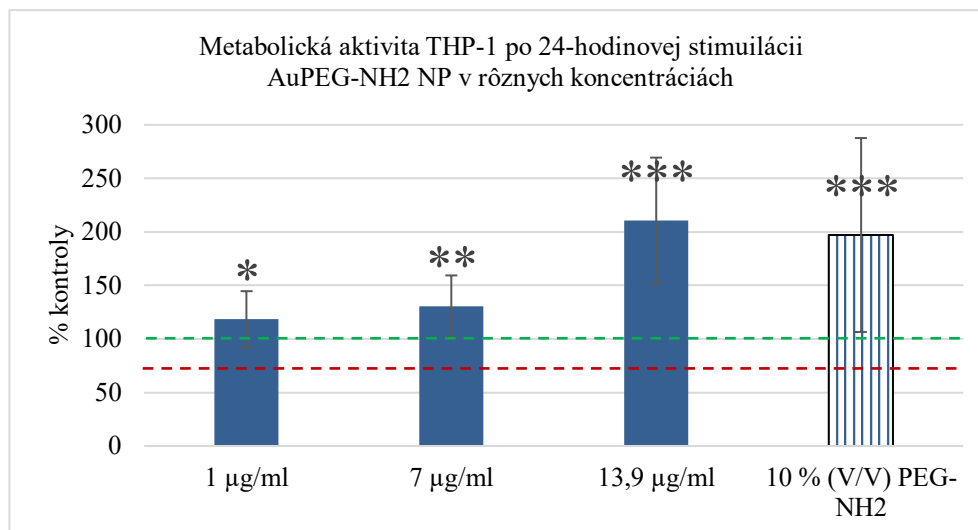
Výsledkom štyroch nezávislých analýz je, že v rozmedzí koncentrácií 1 µg/ ml – 12,2 µg/ ml AuPEG NP v prostredí sa neprejavuje cytotoxicita použitého materiálu. Stúpajúcou koncentráciou dochádza k stimulácii bunkového metabolizmu a to signifikantne. Kontrolný roztok PEG nepôsobí cytotoxicky na bunky pokiaľ je pridaný do kultivačného média v objeme

10 % z celkového objemu kultivačného média. Výsledky štyroch nezávislých meraní sú zhrnuté a prezentované v Grafe 14.



Graf 14: Metabolická aktivita THP-1 monocytov meraná metódou MTS po 24-hodinovej kultivácii s roztokom AuPEG NP s rôznou koncentráciou a PEG. Zelená čiara udáva kontrolu bez stimulácie, červená čiara udáva cytotoxický level. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty vypočítané zo štyroch nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodatnú odchýlku. Signifikantnosť zmeny voči kontrolnej vzorke bola stanovená na úrovni $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Rovnaký záver poskytla analýza AuPEG-NH₂ NP. Tieto nanočastice nepôsobia na THP-1 bunky cytotoxicky, pokiaľ je ich koncentrácia v prostredí v rozmedzí 1 µg/ml – 13,9 µg/ml. Kontrolný roztok PEG-NH₂ stimuluje metabolickú aktivitu buniek dvojnásobne oproti nestimulovanej kontrole pokiaľ je pridaný do kultivačného média v objeme 10 % z celkového objemu kultivačného média. S koncentráciou nanočastíc v prostredí signifikantne rastie aj metabolická aktivita THP-1 buniek. Výsledky štyroch nezávislých meraní sú zhrnuté a prezentované v Grafe 15.



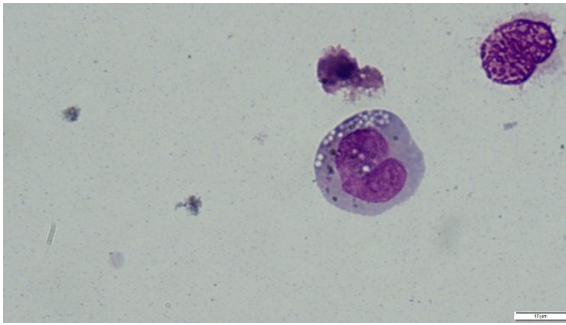
Graf 15: Metabolická aktivita THP-1 monocytov meraná metódou MTS po 24-hodinovej kultivácii s roztokom AuPEG-NH₂ NP s rôznou koncentráciou a PEG-NH₂. Zelená čiara udáva kontrolu bez stimulácie, červená čiara udáva cytotoxický level. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty vypočítané zo štyroch nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodajnú odchýlku. Signifikantnosť zmeny voči kontrolnej vzorke bola stanovená na úrovni $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Z prezentovaných dát vyplýva, že terminácia PEG reťazca tiolovou skupinou, nemá na bunkový metabolizmus výrazný vplyv. V prípade samotných roztokov PEG-ov, má prítomnosť tiolovej skupiny stimulačný efekt na THP-1 monocyty.

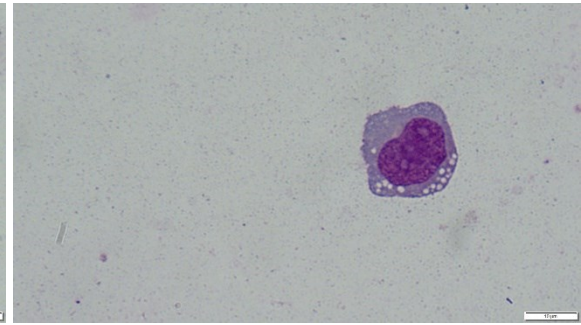
Dlhodobá kultivácia (7 dní) THP-1 monocytov so zlatými nanočasticami mala odhaliť diferenciačný potenciál nanočastíc. Morfológia stimulovaných buniek v deň 7 bola porovnaná s morfológiou nestimulovanej kontroly a tiež s fotografiami buniek po štandardnej diferenciácii pomocou PMA. Ten vyvoláva morfologické zmeny už po pár minútach stimulácie a po 6 dňoch je pozorovaná výrazná zmena bunkovej morfológie.

V prípade dlhodobej kultivácie buniek s AuNP neboli pozorované výrazné rozdiely medzi stimulovanými vzorkami a nestimulovanou kontrolou a neboli detekované podobnosti so zmenami buniek počas diferenciácie s použitím PMA. Morfológia buniek v kultúre bola u všetkých buniek rovnaká, bunky nezmenili tvar ani neadherovali ku dnu kultivačnej nádoby. Nanočastice tvorili veľké, tmavofialové zhluky. Histologické preparáty takisto neodhalili výrazné rozdiely medzi vzorkami. Na niektorých preparátoch vzoriek stimulovaných nanočasticami bolo detekované zvýšené množstvo cytoplazmatických vakuol oproti nestimulovanej kontrole. Toto je vidieť napríklad na obrázku 33 a. Reprezentatívne fotografie histologických preparátov nestimulovaných (Obrázok 31 a, b) a stimulovaných vzoriek (Obrázok 32 a, b a Obrázok 33 a, b) po dlhodobej kultivácii sú prezentované nižšie.

a)

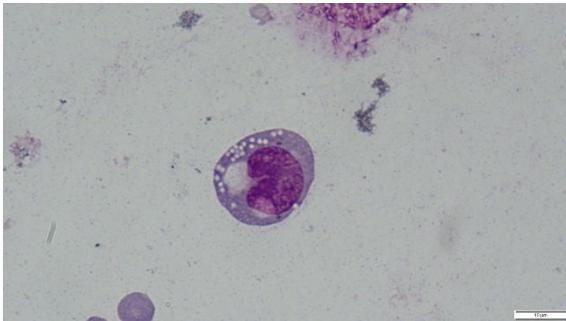


b)

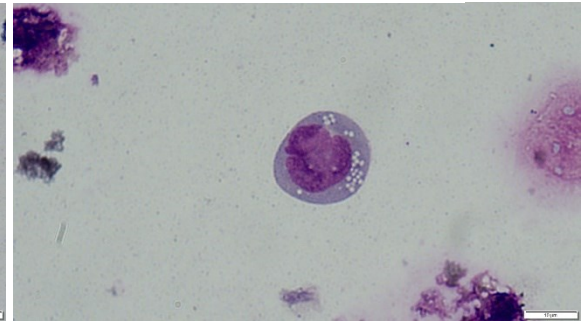


Obrázok 31 a, b: Fotografie histologických preparátov THP-1 monocytov po 7 dňoch v kultúre bez výmeny média. Vzorka slúžila ako nestimulovaná kontrola. Farbenie bunkového náteru May-Grunwald-Giemsa, pozorované svetelným mikroskopom pri zväčšení 100 ×, s imersným olejom. Mierka na obrázku reprezentuje 10 μm.

a)

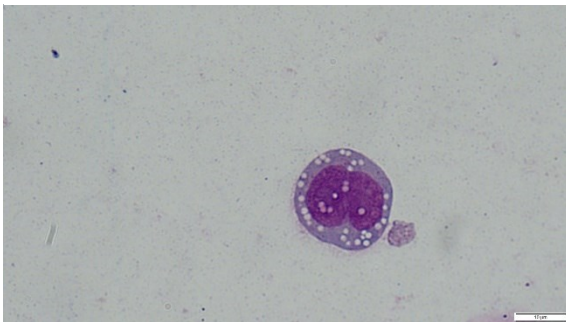


b)

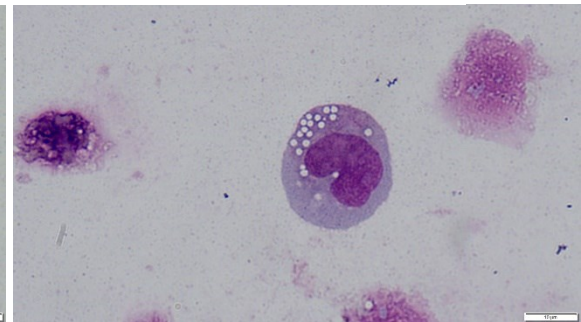


Obrázok 32 a, b: Fotografie histologických preparátov THP-1 monocytov po dlhodobej kultivácii s AuPEG NP (12,2 μg/ml). Morfológia buniek je podobná morfológii nestimulovanej kontrolnej vzorky. Farbenie bunkového náteru May-Grunwald-Giemsa, pozorované svetelným mikroskopom pri zväčšení 100 ×, s imersným olejom. Mierka na obrázku reprezentuje 10 μm.

a)



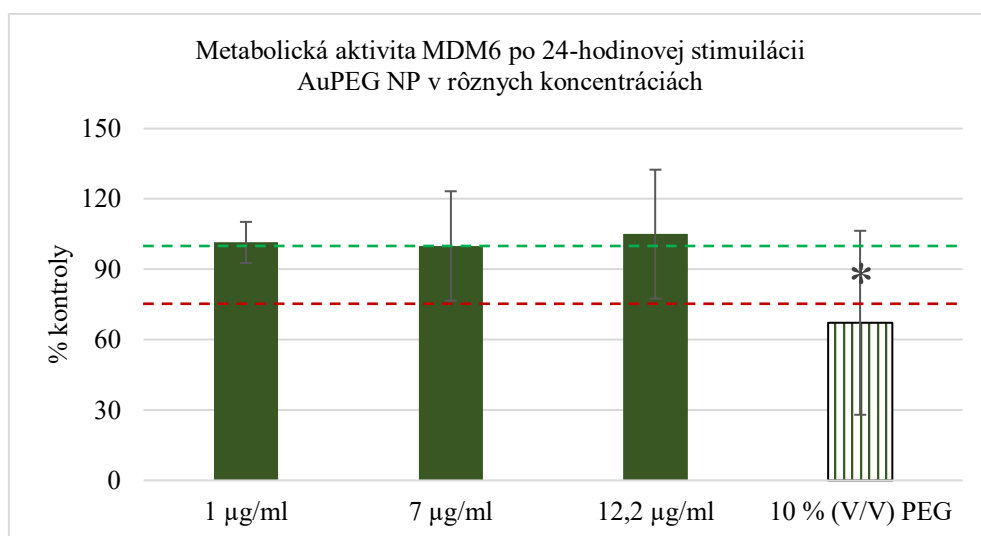
b)



Obrázok 313 a, b: Fotografie histologických preparátov THP-1 monocytov po dlhodobej kultivácii s AuPEG-NH2 NP (13,9 μg/ml). Na Obrázku 22 a) je vidieť veľké množstvo cytoplazmatických vakuol, ktoré sa nefarbia. Farbenie bunkového náteru May-Grunwald-Giemsa, pozorované svetelným mikroskopom pri zväčšení 100 ×, s imersným olejom. Mierka na obrázku reprezentuje 10 μm.

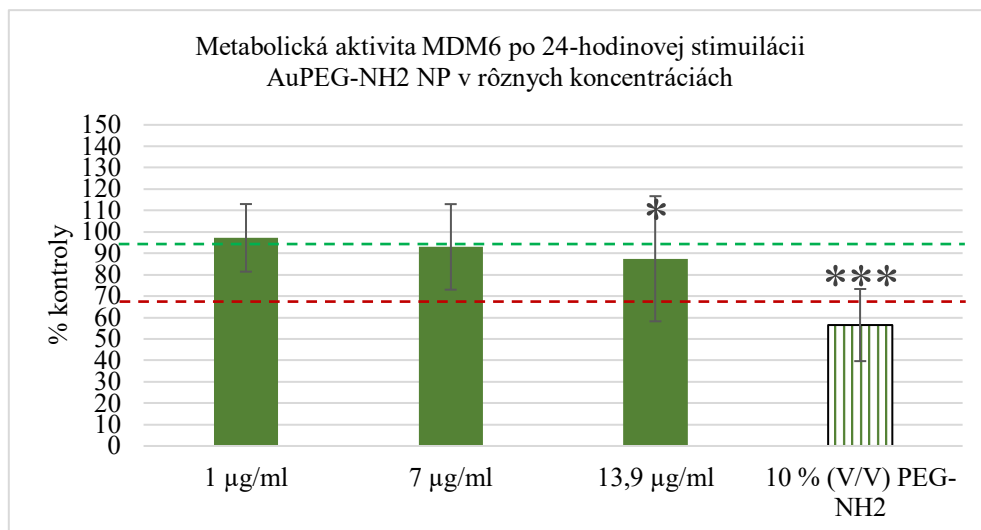
Interakcia Au NP s makrofágmi MDM3 a MDM6

Cytotoxicita nanočastíc bola analyzovaná aj na diferencovaných makrofágoch MDM6. AuPEG NP v rozmedzí použitých koncentrácií 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – 12,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ signifikantne nemenili bunkový metabolizmus a rozdiel oproti nestimulovanej kontrolnej vzorke bol len veľmi malý. Roztok PEG, ktorý tvoril 10 % výsledného kultivačného objemu pôsobil na bunky cytotoxicky. Tento účinok sa preukázal ako signifikantný. Zmeny v bunkovom metabolizme MDM6 buniek po inkubácii s AuPEG NP a PEG sú zobrazené na Grafe 16.



Graf 16: Metabolická aktivita MDM6 makrofágov meraná metódou MTS po 24-hodinovej kultivácii s roztokom AuPEG NP s rôznou koncentráciou a PEG. Zelená čiara udáva kontrolu bez stimulácie, červená čiara udáva cytotoxický level. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty vypočítané z piatich nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodatnú odchýlku. Signifikantnosť zmeny voči kontrolnej vzorke bola stanovená na úrovni $p < 0,05$ (*).

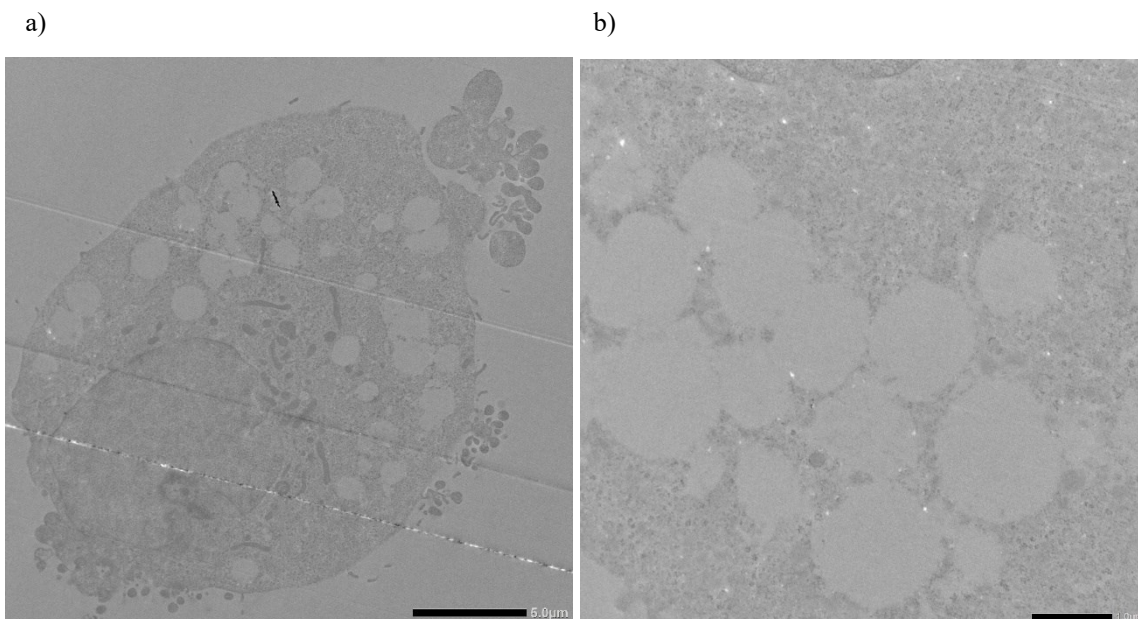
Veľké zmeny v metabolizme voči kontrolnej vzorke neboli zistené ani pri inkubácii makrofágov s AuPEG NH₂ NP. Pri najvyššej koncentrácii nanočastíc bol metabolizmus buniek mierne znížený, táto zmena sa oproti kontrolnej vzorke prejavila ako signifikantná, nedošlo však k preukázaniu cytotoxicity v žiadnej zo stimulovaných vzoriek. Príslušný roztok PEG-NH₂ pôsobil na bunky cytotoxicky. Tento pokles metabolickej aktivity buniek oproti kontrolnej vzorke sa ukázal ako signifikantný. Metabolickú aktivitu MDM6 buniek inkubovaných 24 hodín s AuPEG-NH₂ NPs zobrazuje Graf 17. Sumárne dáta vychádzajú z piatich nezávisle zopakovaných meraní.



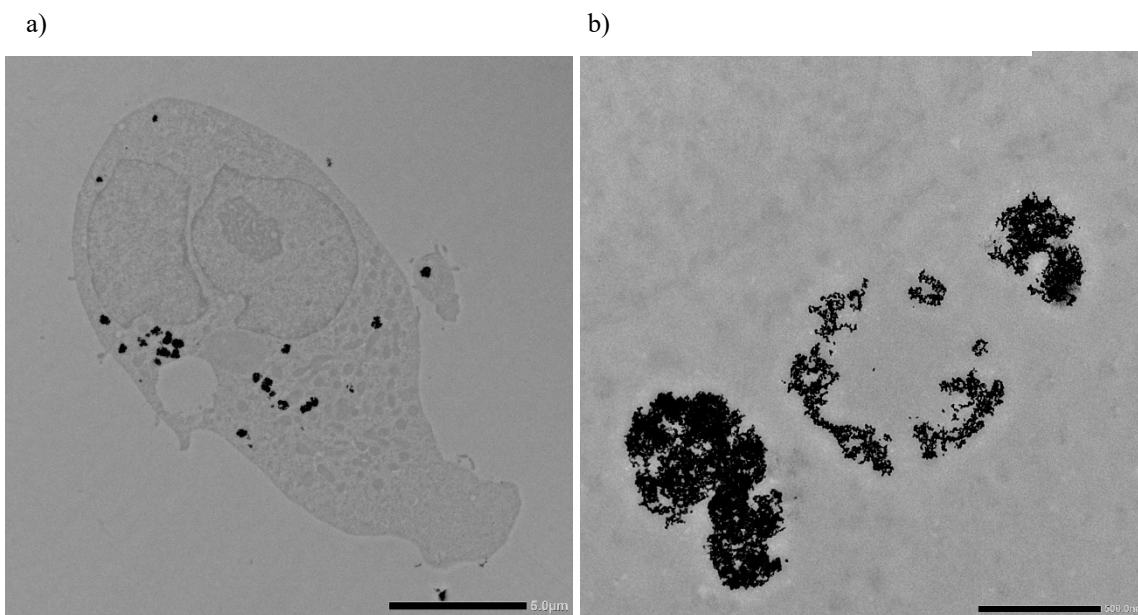
Graf 17: Metabolická aktivita MDM6 makrofágov meraná metódou MTS po 24-hodinovej kultivácii s roztokom PEG-NH₂ a AuPEG-NH₂ NP s rôznou koncentráciou. Zelená čiara udáva kontrolu, červená čiara udáva cytotoxický level. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty vypočítané z piatich nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodajnú odchýlku. Signifikantnosť zmeny voči kontrolnej vzorke bola stanovená na úrovni $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***)

Distribúcia nanočastíc v makrofágoch MDM3

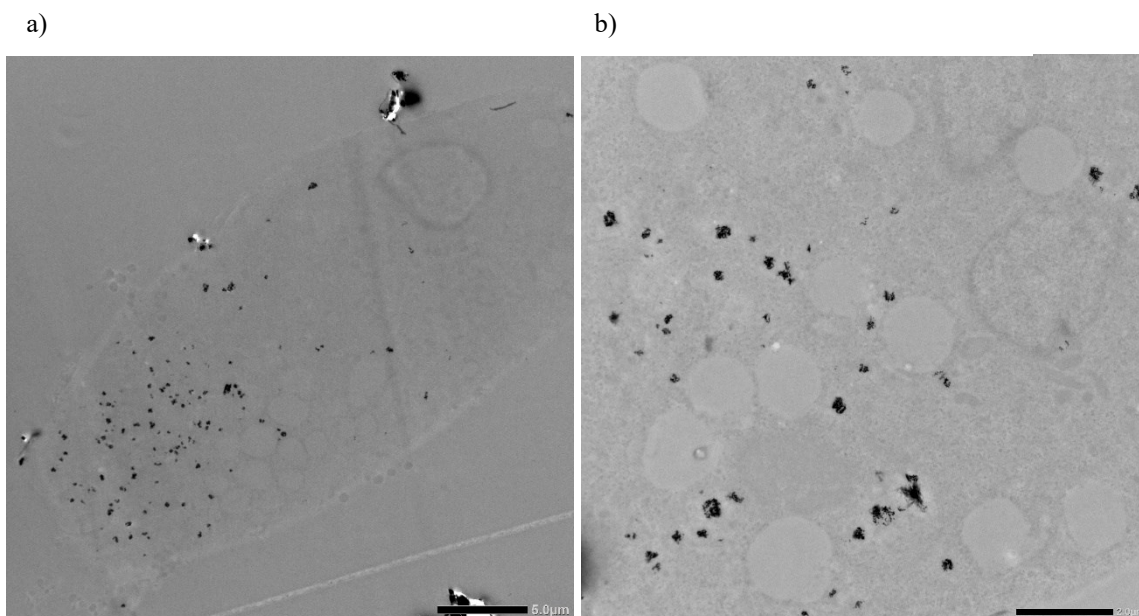
Interagovať môžu nanočastice s bunkami aj bez toho, aby do vnútra bunky aktívne či pasívne vstupovali. Dáta z metabolickej analýzy potvrdzujú, že bunky na prítomnosť nanočastíc v prostredí reagujú. Metabolické zmeny ale môžu súvisieť s prítomnosťou nanočastice vo vnútri bunky. Tá bola skúmaná elektrónovou mikroskopiou a dáta potvrdzujú, že oba typy nanočastíc sú po 24-hodinovej inkubácii s bunkami lokalizované intracelulárne, vo váčkoch v cytoplazme. Pravdepodobne ide o fagozómy. Nanočastice vytvárajú vždy klastry, v prípade AuPEG NP boli klastry najväčšie. Váčky s nanočasticami sa nachádzali vždy iba v cytoplazme bunky a nikdy nie v jadre. V prípade AuPEG-NH₂ NP boli váčky rozptýlené vo veľkej časti cytoplazmy, v prípade AuPEG NP bola ich distribúcia užšia a malé množstvo váčkov s nanočasticami bolo detekované aj v okolí jadrovej membrány. Kontrolná vzorka MDM3 makrofágov, ktorá nebola opôsobená nanočasticami a neobsahuje žiadne stopy internalizovaných cudzorodých častíc je na Obrázku 34 (a, b). Stimulované MDM3 AuPEG NP (Obrázok 35 a, b) a AuPEG-NH₂ NP (Obrázok 36 a, b) s detailom intracelulárnych váčkov obsahujúcich klastry nanočastíc sú zobrazené nižšie.



Obrázok 34 a, b: Snímky MDM3 preparátov snímané transmisným elektrónovým mikroskopom. Jedná sa o nestimulovanú kontrolnú vzorku. MDM3 obsahovali cytoplazmatické vaky bez prítomnosti elektrodensného materiálu-detail je vidieť na obrázku b. Mierka na Obrázku 34a) reprezentuje 5 μm , na Obrázku 34b) 1 μm .



Obrázok 35 a, b: Fotografie MDM3 buniek z TEM. Bunky boli kultivované 24 hodín s AuPEG NP (12,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Bunky obsahovali veľké zhluky nanočastíc v cytoplazmatických vákoch, pravdepodobne fagozómoch. Obrázok 35 b) predstavuje detailný záber váčkov so zhlukmi nanočastíc z obrázku a. Mierka na Obrázku 35a) reprezentuje 5 μm , na Obrázku 35b) 500 nm.



Obrázok 36 a, b: Fotografie MDM3 buniek z TEM. Bunky boli kultivované 24 hodín s AuPEG-NH₂ NP (13,9 µg/ml). V cytoplazme boli prítomné zhluky nanočastíc vo vačkoch. Vačky sa nachádzali vo veľkom objeme cytoplazmy bunka. Zhluky boli menšie ako v prípade vzorky AuPEG NP. Obrázok 36 b) predstavuje detailný záber vačkov z obrázku a. Mierka na Obrázku 36a) reprezentuje 5 µm, na Obrázku 36b) 2 µm.

Zlaté nanočastice v podobe AuPEG NP a modifikovaných AuPEG-NH₂ NP nepôsobia na monocyty THP-1 línie cytotoxicky v rozmedzí skúmaných koncentrácií. Ich zvyšujúcou sa koncentráciou v prostredí narastá aj metabolizmus buniek. V prípade vydifferentovaných makrofágov MDM6 boli zmeny metabolizmu oproti nestimulovanej kontrolnej vzorke len veľmi malé a nepreukázali sa ako signifikantné. V prípade kontrolných roztokov PEG a PEGNH₂, ktoré tvorili 10 % objemu celkového kultivačného objemu bol pozorovaný stimulačný účinok na monocyty. Na maktofágy pôsobili oba roztoky cytotoxicky.

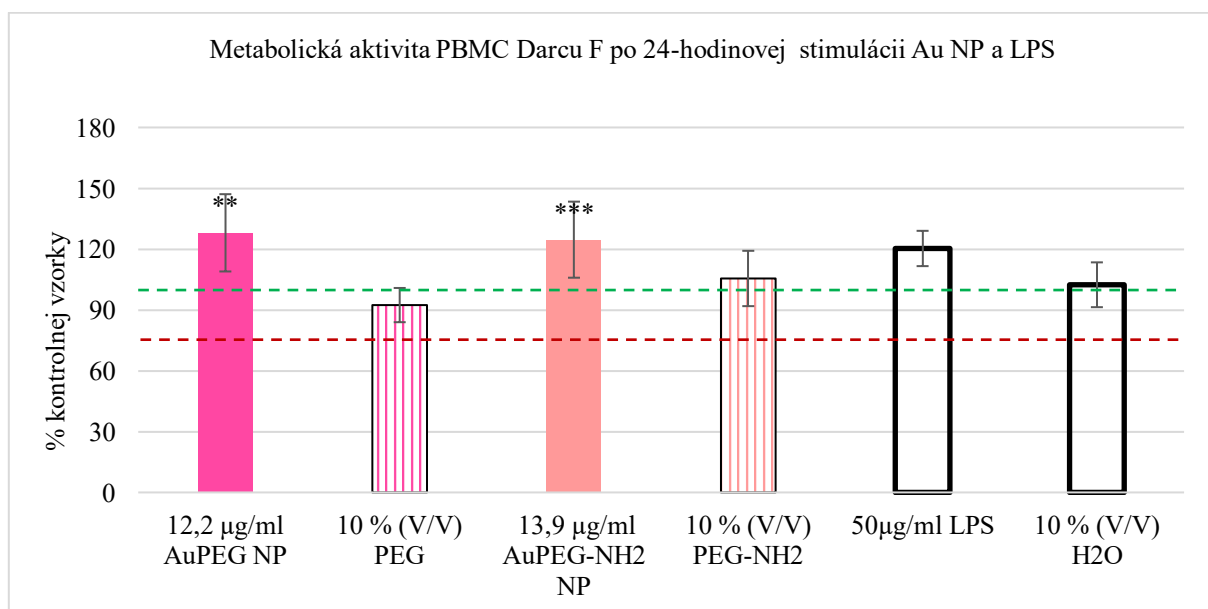
To, že bunky reagujú na prítomnosť nanočastíc v prostredí a interagujú s nimi bolo dokázané snímkami MDM3 makrofágov z elektrónového mikroskopu, ktoré dokazujú, že nanočastice sú po 24-hodinovej inkubácii viditeľné vo vnútri bunky a v podobe klastrov sú lokalizované v cytoplazmatických vačkoch, pravdepodobne fagozómoch.

Interakcia Au NP s primárnymi bunkami PBMC

Interakcia nanočastíc s imunitnými bunkami bola analyzovaná aj na primárnych bunkách. Išlo o PBMC dvoch zdravých darcov (Darca F a Darca M) ako je popísané v kapitole 4. Okrem rozdielov medzi primárnymi bunkami a bunkami línie boli sledované aj rozdiely

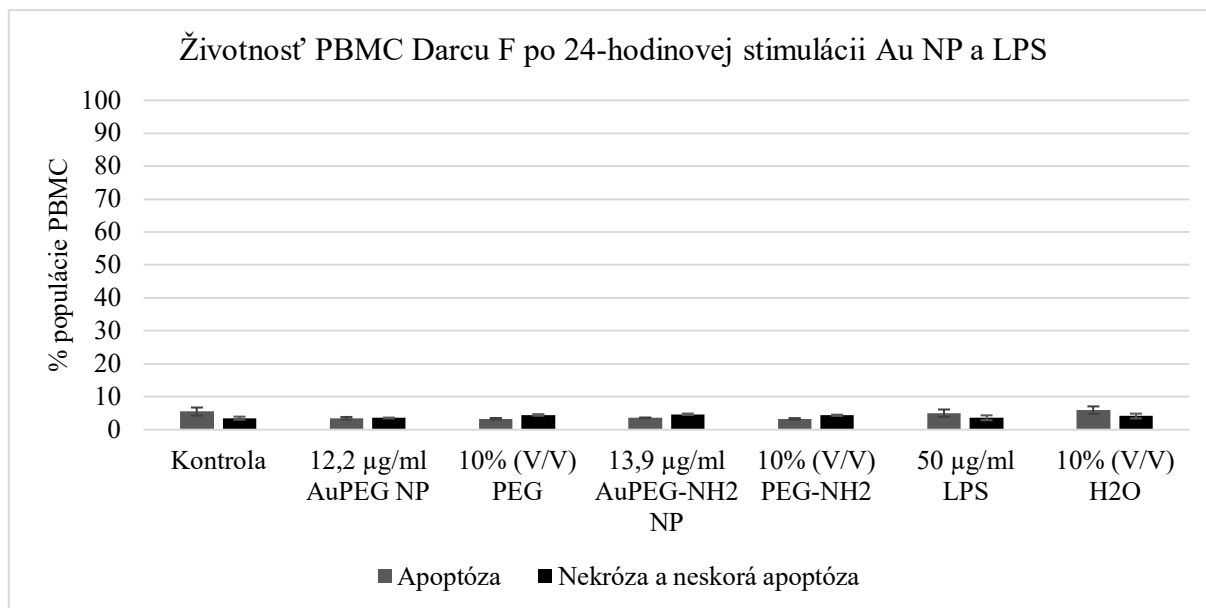
medzi dvoma jedincami, prípadné intraindividuálne rozdiely. Na základe analýzy metabolickej odpovede buniek THP-1 bola zvolená jedna koncentrácia nanočastíc, ktorou budú PBMC stimulované. V oboch prípadoch nanočastíc sa jednalo o najvyššie analyzované koncentrácie.

Analýza metabolickej aktivity buniek od Darcu F po 24-hodinovej kultivácii s AuPEG NP a AuPEG-NH₂ NP (a príslušných roztokov PEG-ov) ukázala, že oba typy častíc majú na bunky stimulačný účinok a ich metabolická aktivita v porovnaní s nestimulovanou kontrolou vzrástla. Tieto zmeny sú signifikantné. Bunky stimulované LPS stimulujú bunkový metabolizmus približne rovnako ako AuPEG-NH₂ NP a 10 % obsah dH₂O v kultivačnom médiu nemá vplyv na bunkový metabolizmus. Dáta z troch nezávislých meraní sú zhrnuté na Grafe 18.



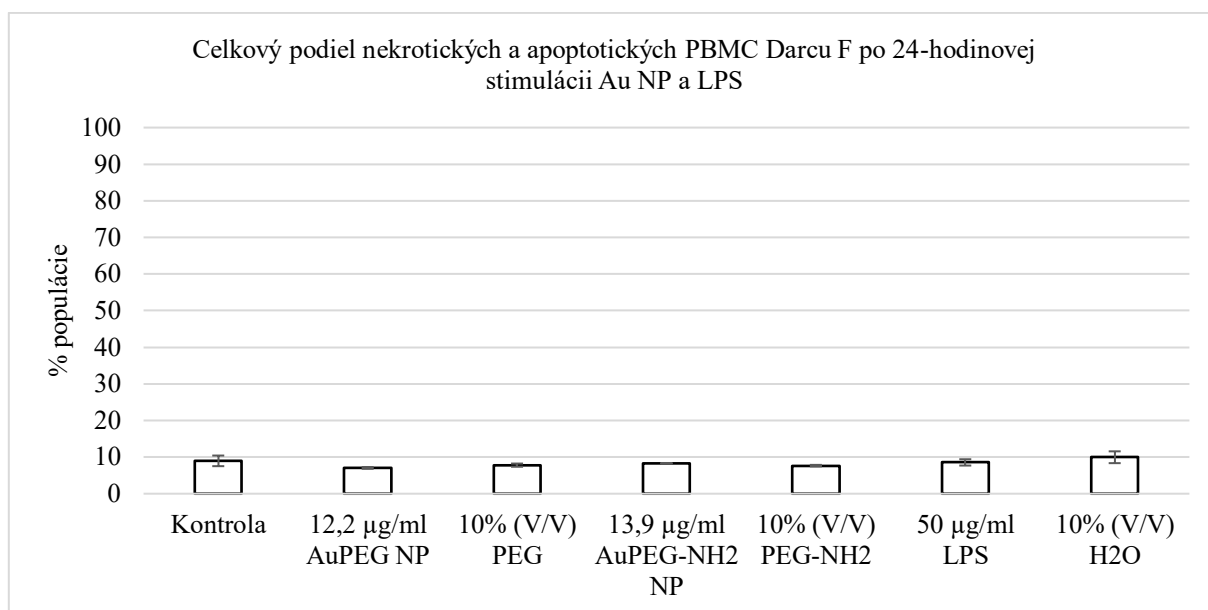
Graf 18: Metabolická aktivita PBMC Darcu F po 24-hodinovej kultivácii s AuPEG NP a AuPEG-NH₂ NP, roztokmi príslušných PEG-ov, LPS a dH₂O. Zelená čiara udáva kontrolu bez stimulácie, červená čiara udáva cytotoxický level. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty vypočítané zo štyroch nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodatnú odchýlku. Signifikantnosť zmeny voči kontrolnej vzorke bola stanovená na úrovni $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

V oboch typoch vzorkov nanočastíc a príslušných PEG-ov nedochádza k výraznej zmene populácie buniek, ktorá je v neskorej apoptóze alebo je nekrotická v porovnaní s kontrolnou vzorkou. 24-hodinová stimulácia teda neovplyvňuje životnosť buniek v kultúre a životnosť je zrovnateľná s bunkami nestimulovanej kontrolnej vzorky. Dáta z troch nezávislých experimentoch, ktoré boli merané metódou 7AAD/Hoechst 33342 sú prezentované na Grafe 19.



Graf 19: Podiel apoptotických (zobrazené šedou) a nekrotických buniek, resp. buniek v neskoréj apoptóze (zobrazené čiernou) v kultúre PBMC buniek od Darcu F 24 hodín po stimulácii s AuPEG NP, AuPEG-NH₂ NP, roztokmi príslušných PEG-ov, LPS a dH₂O. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty percentuálneho zastúpenia sledovaných populácií v rámci celej populácie PBMC a sú vypočítané zo štyroch nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodatnú odchýlku.

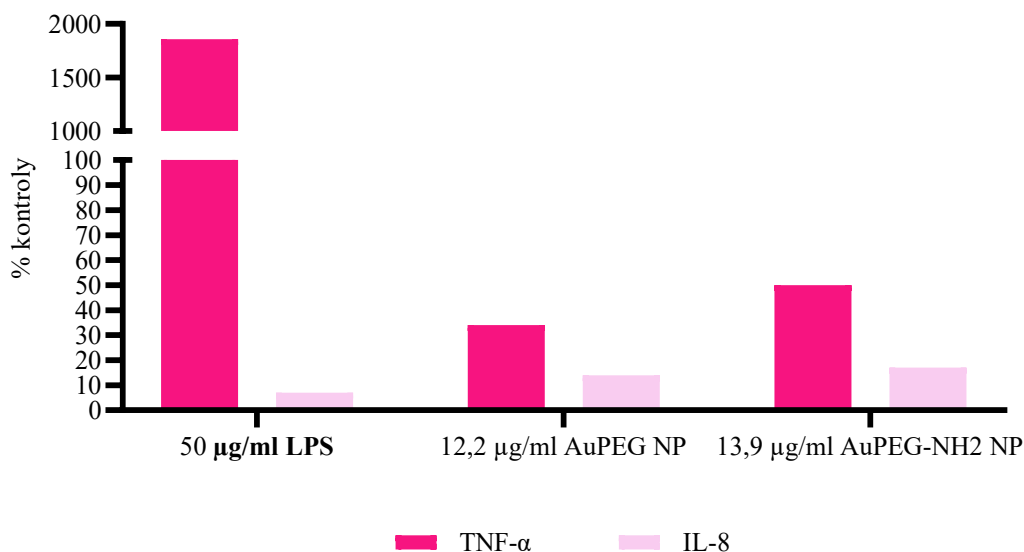
Celkový podiel nekrotický a apoptotických buniek v kultúre sa vplyvom nanočastíc signifikantne nemení. Tieto dáta zobrazuje Graf 20. Dáta z analýzy vzorky od Darcu F potvrdzujú, že podiel apoptotických buniek v zmiešanej kultúre primárnych buniek je okolo 5 %.



Graf 20: Celkový podiel apoptotických a nekrotických buniek v kultúre PBMC buniek od Darcu F 24 hodín po stimulácii s AuPEG NP, AuPEG-NH₂ NP, roztokmi príslušných PEG-ov, LPS a dH₂O. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty percentuálneho zastúpenia sledovaných populácií v rámci celej populácie PBMC a sú vypočítané zo štyroch nezávislých meraní.

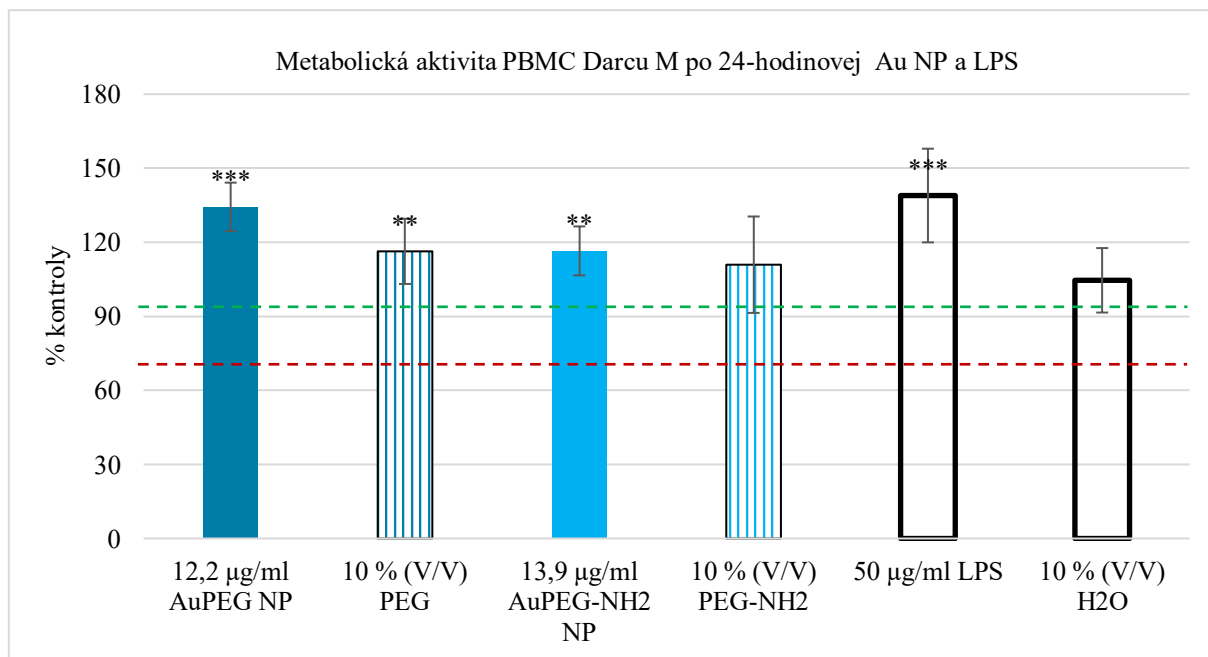
Analýza bunkových supernatantov slúžila k určeniu zmien v sekrécii cytokínov stimulovaných buniek oproti nestimulovanej kontrolnej vzorke. Supernatanty boli analyzované súpravou LEGENDplex™ ako je popísané v kapitole 4.2.11. Dáta ukazujú, že bunky stimulované LPS (50 µg/ml) produkujú niekoľkonásobne zvýšené množstvo TNF- α . Bunky stimulované AuPEG NP a AuPEG-NH₂ NP neprodukujú zvýšené množstvo IL-8 alebo TNF- α v odpovedi na vystavenie týmto nanočasticami v porovnaní s nestimulovanou kontrolou. Zmeny v sekrécii dvoch cieľových cytokínov po stimulácii buniek LPS alebo zlatými nanočasticami zobrazuje Graf 21.

Hladina TNF α a IL-8 v supernatante PBMC Darcu F po 24-hodinovej stimulácii Au NP a LPS



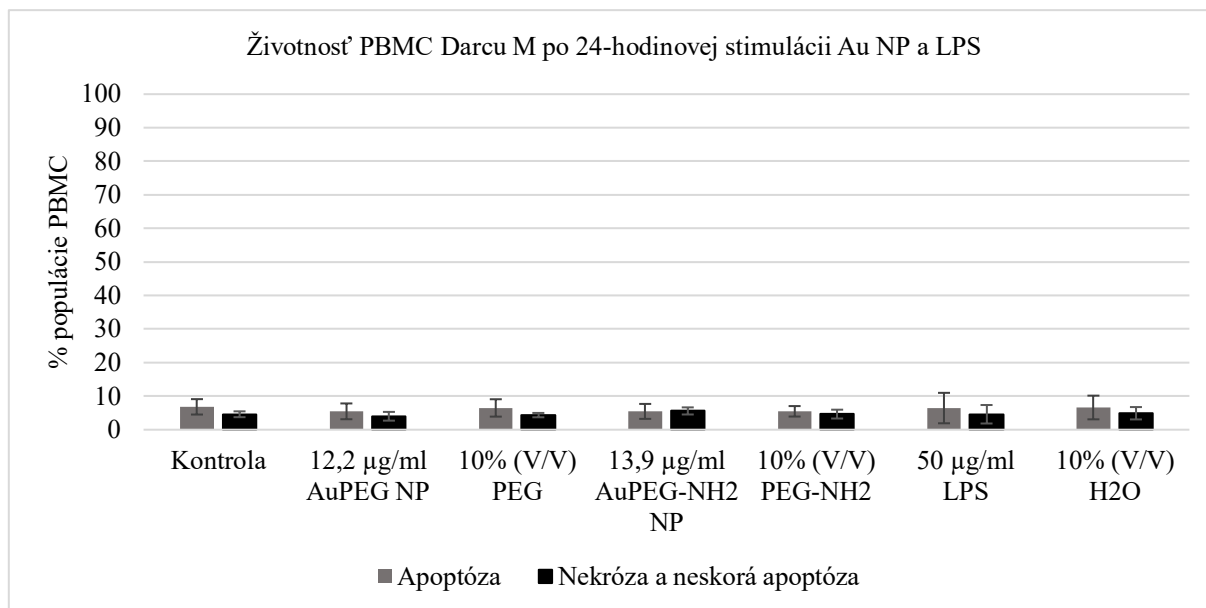
Graf 21: Zmeny v produkcii prozápalových cytokínov TNF- α a IL-8 buniek PBMC od Darcu F po stimulácii LPS, AuPEG NP a AuPEG-NH₂ NP. Cytokíny boli detekované v bunkovom supernatante. Dáta sú prezentované po vztiahnutí miery cytokínovej produkcie stimulovanej vzorky k vzorke nestimulovanej a sú vyjadrené ako jej percentuálna hodnota. Dáta pochádzajú z jedného merania súpravou LEGENDplex™.

Analýza metabolickej aktivity po vystavení nanočasticiam a LPS v prípade PBMC od Darcu M ukazujú podobné výsledky ako v prípade Darcu F. AuPEG NP, AuPEG-NH₂ NP aj LPS stimulujú bunkový metabolizmus. V prípade oboch typov nanočastíc ide o signifikantné zmeny. Miera stimulácie LPS u Darcu M koreluje s mierou stimulácie AuPEG NP. Prítomnosť 10 % (V/V) dH₂O v kultivačnom médiu nemá signifikantný vplyv na metabolickú aktivitu PBMC. Zmeny metabolickej aktivity PBMC buniek od Darcu M po 24-hodinovej stimulácii zhrňuje Graf 22.



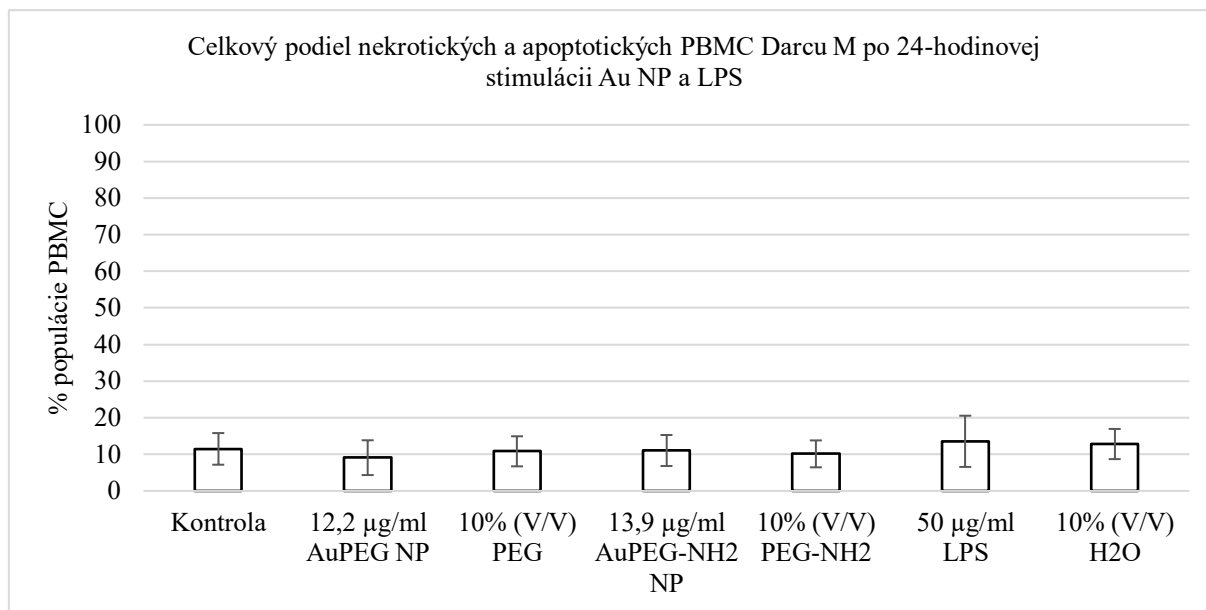
Graf 22: Metabolická aktivita PBMC Darcu M po 24-hodinovej kultivácii s AuPEG NP a AuPEG-NH2 NP, roztokmi príslušných PEG-ov, LPS a dH₂O. Zelená čiara udáva kontrolu bez stimulácie, červená čiara udáva cytotoxický level. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty vypočítané z troch nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodatnú odchýlku. Signifikantnosť zmeny voči kontrolnej vzorke bola stanovená na úrovni $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

Na vzorke buniek od Darcu M nie sú v prípade buniek stimulovaných nanočasticami detekované výrazné zmeny v zastúpení nekrotických a apoptotických buniek v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Ako v prípade darcu F, aj tu sa potvrdilo, že použité nanočastice nemajú po 24-hodinovej stimulácii buniek vplyv na ich životnosť a životnosť stimulovaných buniek je zrovnateľná so životnosťou nestimulovaných buniek. Percentuálne zastúpenie apoptotických, nekrotických a buniek v neskoršej apoptóze vo vzorke od Darcu M je na Grafe 23.



Graf 23: Podiel apoptotických (zobrazené šedou) a nekrotických buniek, resp. buniek v neskoréj apoptóze (zobrazené čiernou) v kultúre PBMC buniek od Darcu M 24 hodín po stimulácii s AuPEG NP, AuPEG-NH₂ NP, roztokmi príslušných PEG-ov, LPS a dH₂O. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty percentuálneho zastúpenia sledovaných populácií v rámci celej populácie PBMC a sú vypočítané z troch nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodatnú odchýlku.

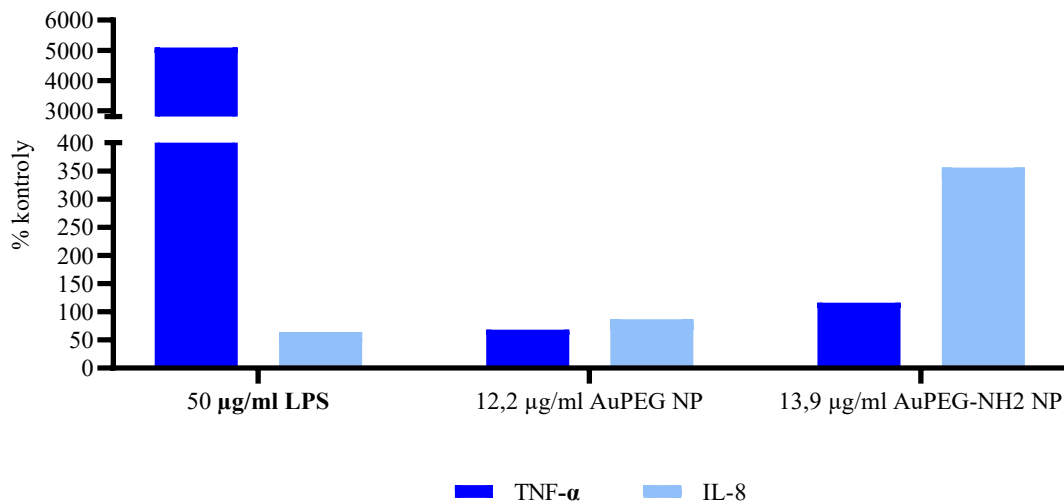
Výsledky z analýzy celkového počtu nekrotických a apoptotických buniek v kultúre PBMC Darcu M po stimulácii ukazujú totožný trend ako tomu je v prípade vzorky od Darcu F. Zmeny sú minimálne a tak sa aj tu preukázalo, že použité stimulačné agens nemajú vplyv na celkové zastúpenie apoptotických a nekrotických buniek v populácii PBMC. Tieto dáta zhrňuje Graf 24.



Graf 24: Celkový podiel apoptotických a nekrotických buniek v kultúre PBMC buniek od Darcu M 24 hodín po stimulácii s AuPEG NP, AuPEG-NH₂ NP, roztokmi príslušných PEG-ov, LPS a dH₂O. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty percentuálneho zastúpenia sledovaných populácií v rámci celej populácie PBMC a sú vypočítané z troch nezávislých meraní.

U Darcu M sa rovnako ako u Darcu F potvrdilo niekoľkonásobné zvýšenie produkcie TNF- α pri stimulácii buniek LPS (50 μ g/ml) v porovnaní s kontrolnou nestimulovanou vzorkou. Vzorka supernatantov bola analyzovaná súpravou LEGENDplexTM. Vzorky stimulované AuPEG-NH₂ NP vykazujú zvýšenie produkcie TNF- α aj IL-8 v porovnaní kontrolou. Toto v prípade darcu F nebolo pozorované. Zmeny v sekrécii dvoch cieľových cytokínov po stimulácii buniek LPS alebo zlatými nanočasticami zobrazuje Graf 25.

Hladina IL-8 v supernatante PBMC Darcu M po 24-hodinovej stimulácii Au NP a LPS analyzovaná dvomi metódami

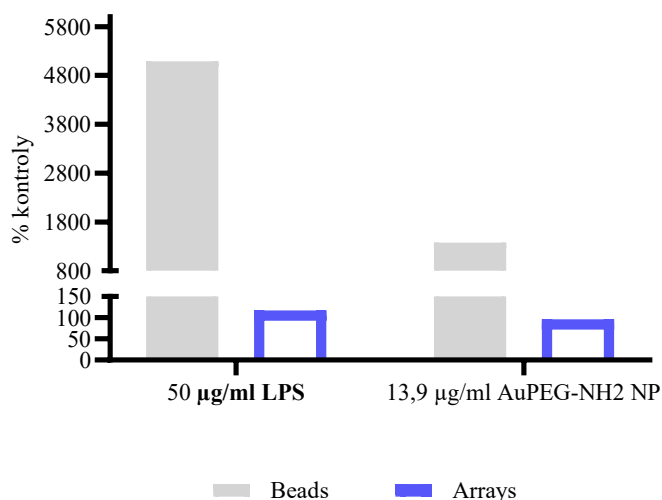


Graf 25: Zmeny v produkcii prozápalaových cytokínov TNF- α a IL-8 buniek PBMC od Darcu M po stimulácii LPS, AuPEG NP a AuPEG-NH₂ NP. Cytokíny boli detekované v bunkovom supernatante. Dáta sú prezentované po vztiahnutí miery cytokínovej produkcie stimulovanej vzorky k vzorke nestimulovanej a sú vyjadrené ako jej percentuálna hodnota. Dáta pochádzajú z jedného merania súpravou LEGENDplex™.

Analýza sekretovaných cytokínov prebehla pre porovnanie aj druhou metódou- Human Cytokine Antibody Array- Membrane – značená ako Array . Boli porovnané výsledky z prvej využitej metódy LEGENDplex™ Multi- Analyte Flow Assay Kit- Human Inflammation Panel 1 Mix and Match Subpanel- značená ako Beads. Analyzovaná vzorka pochádzala od Donora M. Dvoma metódami bola semikvantitatívne stanovená prítomnosť dvoch prozápalaových cytokínov- TNF α a IL-8 v supernatantoch buniek stimulovaných LPS a AuPEG-NH₂ NP.

Oboma metódami bolo semikvantitatívne určené, že množstvo TNF α v supernatante vzorky stimulovanej LPS je vyššie v porovnaní so vzorkou stimulovanou AuPEG-NH₂ NP. Výsledky tejto analýzy TNF α zobrazuje Graf 26.

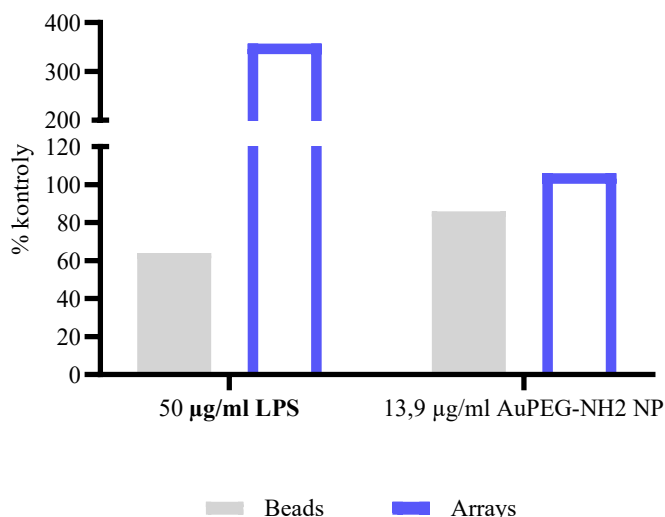
Hladina TNF- α v supernatante PBMC Darcu M po 24-hodinovej stimulácii Au NP a LPS analyzovaná dvomi metódami



Graf 26: Grafické znázornenie výsledkov analýzy prítomnosti TNF- α v supernatante buniek PBMC z jedného merania. Bunky boli po dobu 24 hodín stimulované LPS (50 µg/ml) alebo AuPEG-NH₂ NP (13,9 µg/ml). Dáta sú prezentované po vztiahnutí miery cytokínovej produkcie stimulovanej vzorky k vzorke nestimulovanej a sú vyjadrené ako jej percentuálna hodnota. Hladina cytokínu bola stanovená semikvantitatívne dvomi metódami označenými ako „Beads“ a „Arrays“.

Analýza prítomnosti IL-8 dvomi metódami zároveň nepreukázala jasný výsledok ani v jednej z analyzovaných vzoriek.. Výsledky metódy sú znázornené na Grafe 27.

Hladina IL-8 v supernatante PBMC Darcu M po 24-hodinovej stimulácii Au NP a LPS analyzovaná dvomi metódami



Graf 27: Grafické znázornenie výsledkov analýzy prítomnosti IL-8 v supernatante buniek PBMC z jedného merania. Bunky boli po dobu 24 hodín stimulované LPS (50 µg/ml) alebo AuPEG-NH₂ NP (13,9 µg/ml). Dáta sú

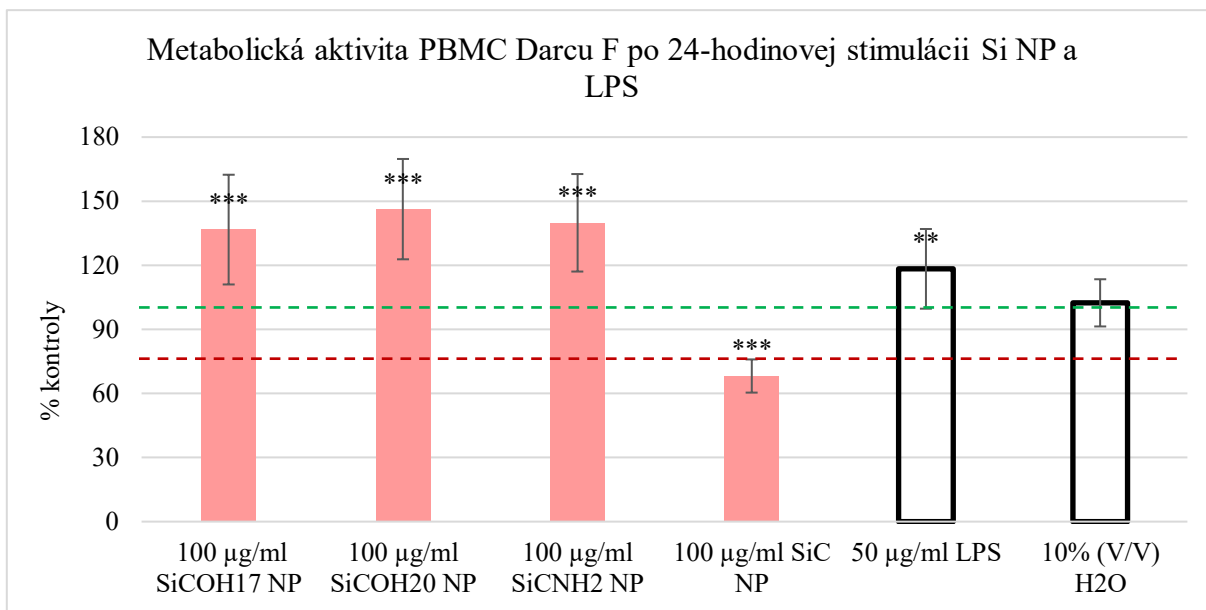
prezentované po vztiahnutí miery cytokínovej produkcie stimulovanej vzorky k vzorke nestimulovanej a sú vyjadrené ako jej percentuálna hodnota. Hladina cytokínu bola stanovená semikvantitatívne dvomi metódami označenými ako „Beads“ a „Arrays“.

Konzistencia nameraných dát bola v prípade oboch vzoriek primárnych buniek veľmi dobrá. Štatistická analýza len veľmi málo dát vyhodnotila ako odľahlé. Na vzorkoch PBMC rôzneho pôvodu analýza ukazuje, že použité nanočastice aj LPS v konkrétnych koncentráciách stimulujú metabolickú aktivitu buniek po 24 hodinách kultivácie. Au NP ani LPS nemajú vplyv na celkové zastúpenie nekrotických a apoptotických buniek v populácii. Bolo preukázané, že kultivácia PBMC v médiu s obsahom 10 % (V/V) dH₂O nemá žiadny vplyv na metabolickú aktivitu buniek, preto môžeme akýkoľvek stimulačný účinok dH₂O vo vodnom roztoku nanočastíc vylúčiť. Bolo tiež potvrdené, že stimuláciou buniek LPS (50 µg/ ml) dochádza k niekoľkonásobne vyššej sekrécii TNF-α v porovnaní s nestimulovanou kontrolnou vzorkou.

5.2.4 Experimenty s kremíkovými nanočasticami

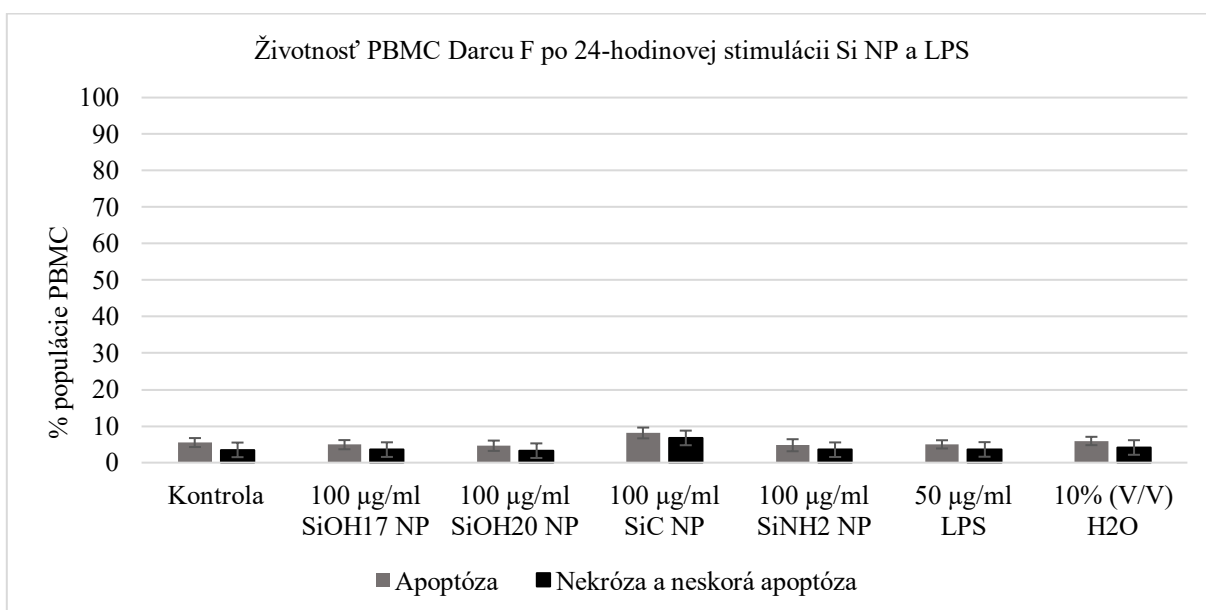
V našom laboratóriu bola v minulosti prevedená štúdia, ktorá analyzovala interakciu kremíkových nanočastíc a THP-1 monocytov. V tejto práci som použila rovnaké nanočastice a stimulovala som nimi primárne bunky PBMC od dvoch darcov. Výsledky oboch štúdií budú porovnané. Bola sledovaná metabolická aktivita, životnosť buniek a sekrécia cytokínov po stimulácii buniek nanočasticami.

Celková metabolická aktivita PBMC buniek od Darca F bola zvýšená po 24-hodinovej stimulácii SiCOH17 NP, SiCOH20 NP, SiCNH₂ NP aj LPS. SiC NP pôsobia na bunky cytotoxicky a znižujú ich metabolickú aktivitu približne na 60 %. Všetky zmeny boli vyhodnotené ako signifikantné. Prítomnosť 10 % (V/V) dH₂O v kultivačnom médiu nemá vplyv na metabolickú aktivitu PBMC. Metabolická aktivita PBMC buniek od Darca F po 24-hodinovej stimulácii je znázornená na Grafe 28.



Graf 28: Metabolická aktivita PBMC Darcu F po 24-hodinovej kultivácii s SiCOH NPs, SiC NP, SiCNH₂ NP, LPS a dH₂O. Zelená čiara udáva kontrolu bez stimulácie, červená čiara udáva cytotoxický level. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty vypočítané z troch nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodatnú odchýlku. Signifikantnosť zmeny voči kontrolnej vzorke bola stanovená na úrovni $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

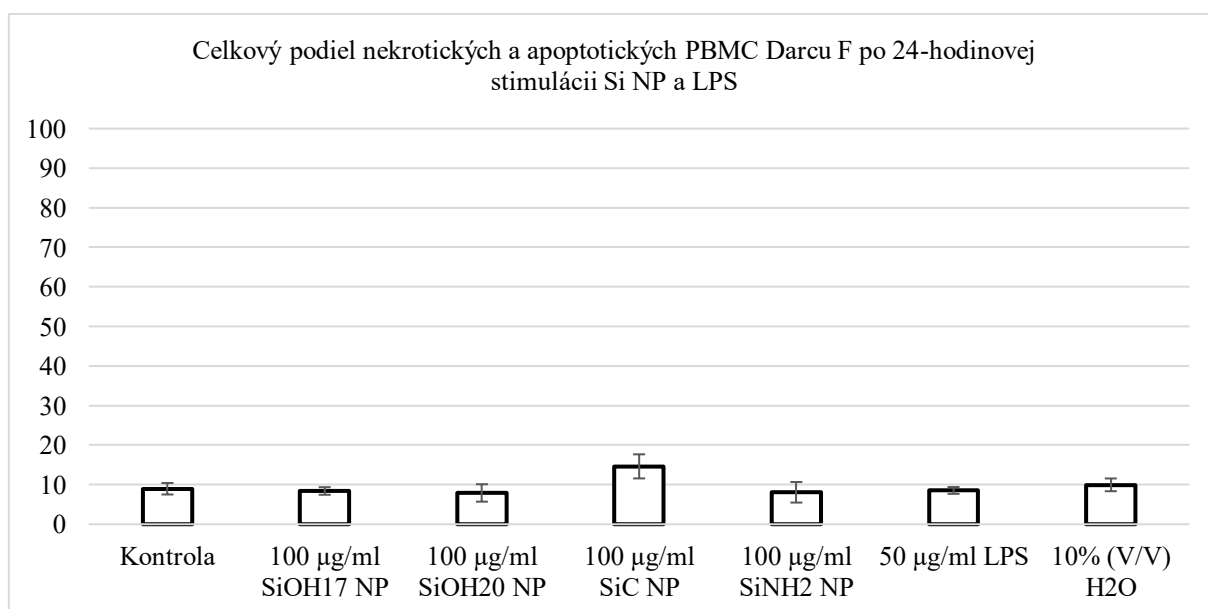
Percentuálne zastúpenie apoptotických a nekrotických buniek a buniek v neskorjej apoptóze nebolo prítomnosťou nanočastíc ovplyvnené. Mierne zvýšenie bolo pozorované vo vzorke stimulovanej SiC NP. Zastúpenie apoptotických buniek v kultúre koreluje s literatúrou. Toto zastúpenie znázorňuje Graf 29



Graf 29: Podiel apoptotických (zobrazené šedou) a nekrotických buniek, resp. buniek v neskorjej apoptóze (zobrazené čiernou) v kultúre PBMC buniek od Darcu F 24 hodín po stimulácii s SiCOH NPs, SiC NP, SiCNH₂ NP, LPS a dH₂O. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty percentuálneho zastúpenia sledovaných populácií

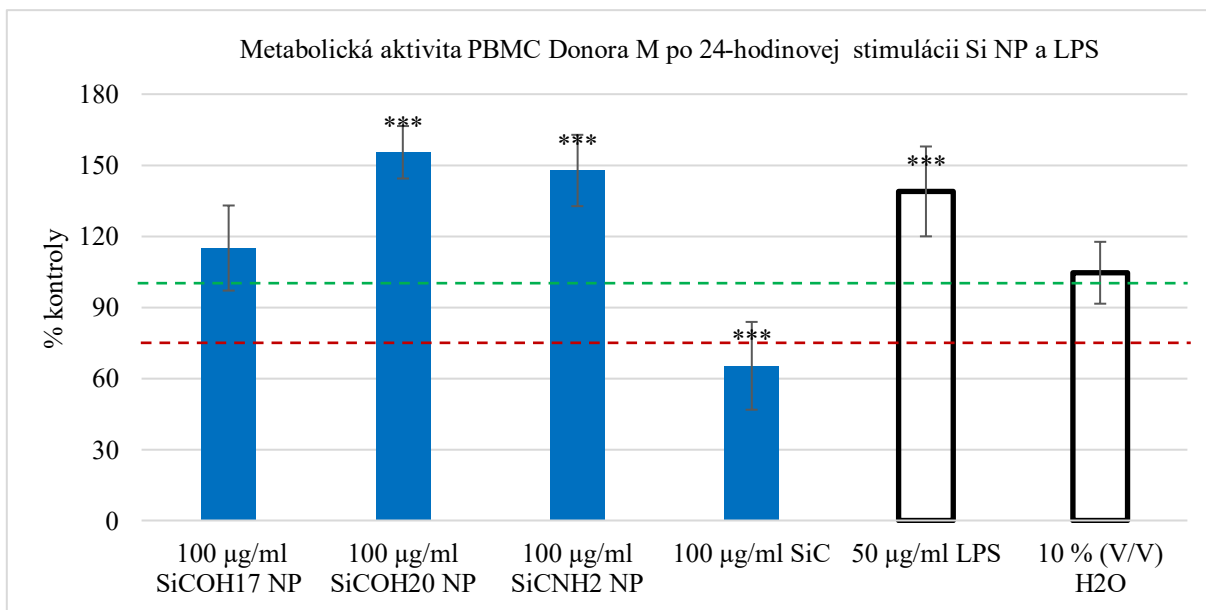
v rámci celej populácie PBMC a sú vypočítané z troch nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodatnú odchýlku.

Okrem zvýšeného množstva apoptotických buniek, bolo vo vzorke opôsobenej SiC NP zvýšené množstvo nekrotických buniek a v konečnom dôsledku celkové zastúpenie apoptotických a nekrotických buniek v rámci PBMC. Toto zvýšenie ale nie je abnormálne vzhľadom na bazálnu hodnotu apoptózy a nekrózy v bunkových kultúrach. Vo vzorke stimulovanej SiC nP nedochádza k indukcii masívnej apoptózy alebo nekrózy po 24-hodinovej stimulácii. Ostatné kremíkové nanočastice alebo LPS pravdepodobne na zastúpenie týchto subpopulácií nemajú vplyv. Celkový podiel apoptotických a nekrotických buniek graficky zobrazuje Graf 30.



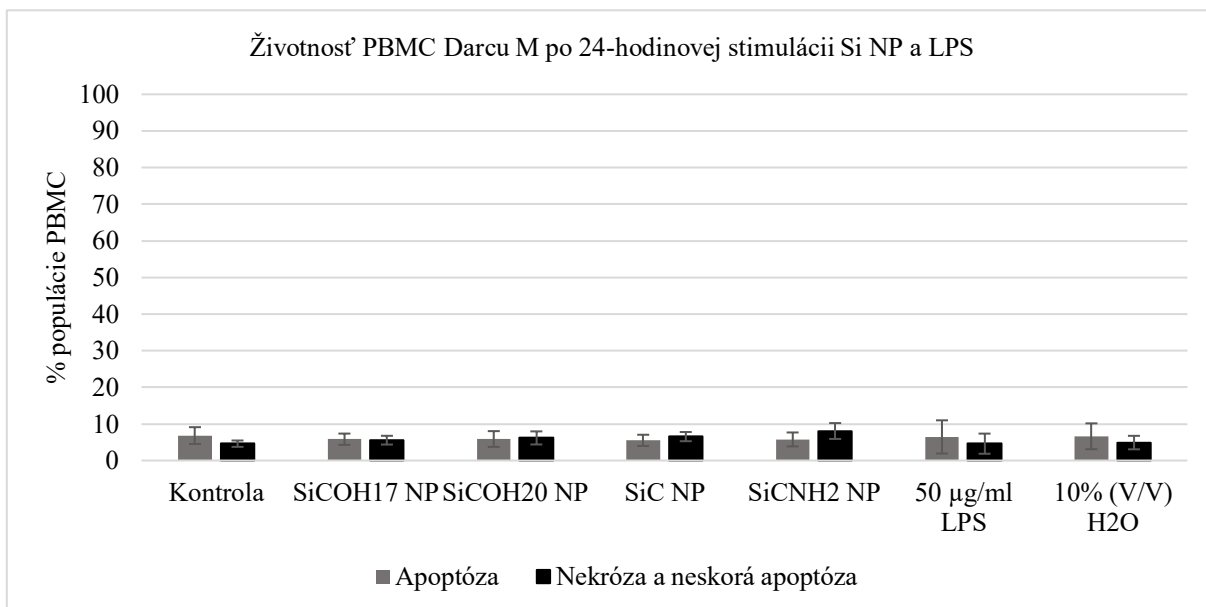
Graf 30: Celkový podiel apoptotických a nekrotických buniek v kultúre PBMC buniek od Darcu F 24 hodín po stimulácii s SiCOH NPs, SiC NP, SiCNH₂ NP, LPS a dH₂O. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty percentuálneho zastúpenia sledovaných populácií v rámci celej populácie PBMC a sú vypočítané z troch nezávislých meraní.

Analýza metabolickej aktivity PBMC z druhého darca koreluje s výsledkami analýzy buniek od darcu F. Rovnako je pozorovaný cytotoxický efekt SiC NP na PBMC po 24-hodinovej kultivácii. Ostatné kremíkové nanočastice a LPS bunkový metabolizmus stimulujú. Znázornenie analýzy metabolickej aktivity buniek je na Grafe 31.



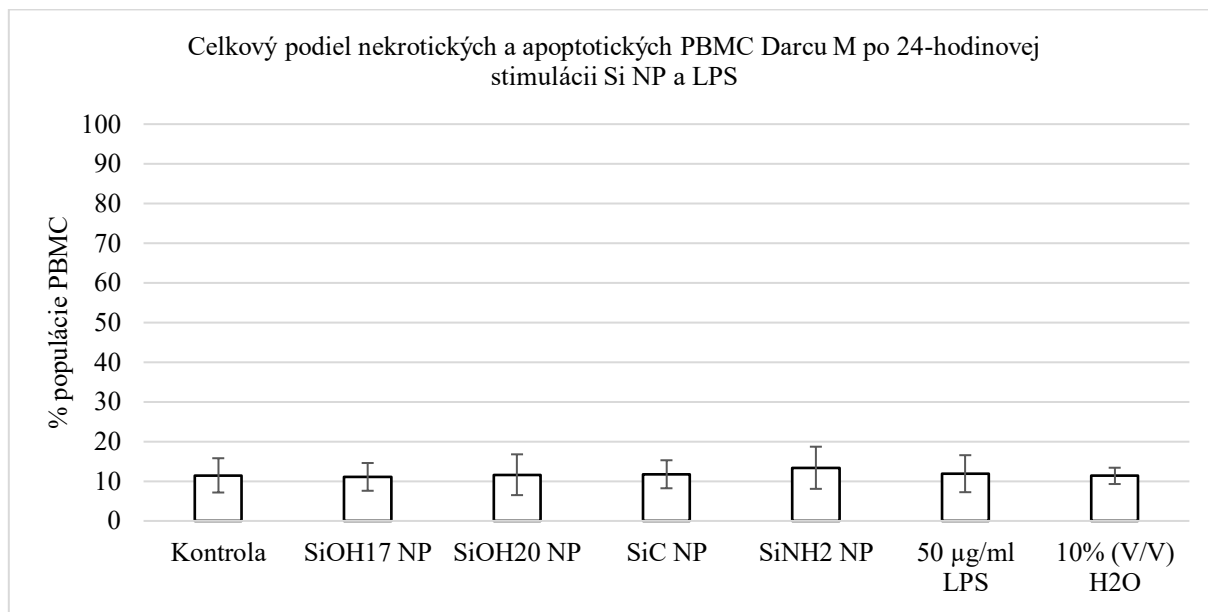
Graf 31: Metabolická aktivita PBMC Darcu M po 24-hodinovej kultivácii s SiCOH NPs, SiC NP, SiCNH₂ NP, LPS a dH₂O. Zelená čiara udáva kontrolu bez stimulácie, červená čiara udáva cytotoxický level. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty vypočítané z troch nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodatnú odchýlku. Signifikantnosť zmeny voči kontrolnej vzorke bola stanovená na úrovni $p < 0,001$ (***).

Analýza životnosti buniek vo vzorku využitím metódy 7AAD/ Hoechst 33342 ukázala mierne odlišnosti od prvej vzorky od Darcu F. Analýza metabolickej aktivity vykazovala medzi oboma vzorkami koreláciu. Životnosť buniek po 24-hodinovej stimulácii kremíkovými nanočasticami je znázornená na Grafe 32.



Graf 32: Podiel apoptotických (zobrazené šedou) a nekrotických buniek, resp. buniek v neskej apoptóze (zobrazené čiernou) v kultúre PBMC buniek od Darcu M 24 hodín po stimulácii s SiCOH NPs, SiC NP, SiCNH₂ NP, LPS a dH₂O. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty percentuálneho zastúpenia sledovaných populácií v rámci celej populácie PBMC a sú vypočítané z troch nezávislých meraní. Chybová úsečka udáva smerodatnú odchýlku.

Konečný graf (Graf 33), ktorý reprezentuje celkový podiel ukazuje, že ani jedny z nanočastíc nemajú zásadný vplyv na celkové zstúpenie nekrotických a apoptotických buniek v rámci PBMC buniek od darcu M. Vo vzorke PBMC od Darcu M nedošlo k miernym zmenám ani v prípade stimulácie buniek SiC NP. V prípade Darcu F sa dá predpokladať vplyv agens na životnosť, ale až v prípade kultivácie dlhšej ako je 24 hodín.

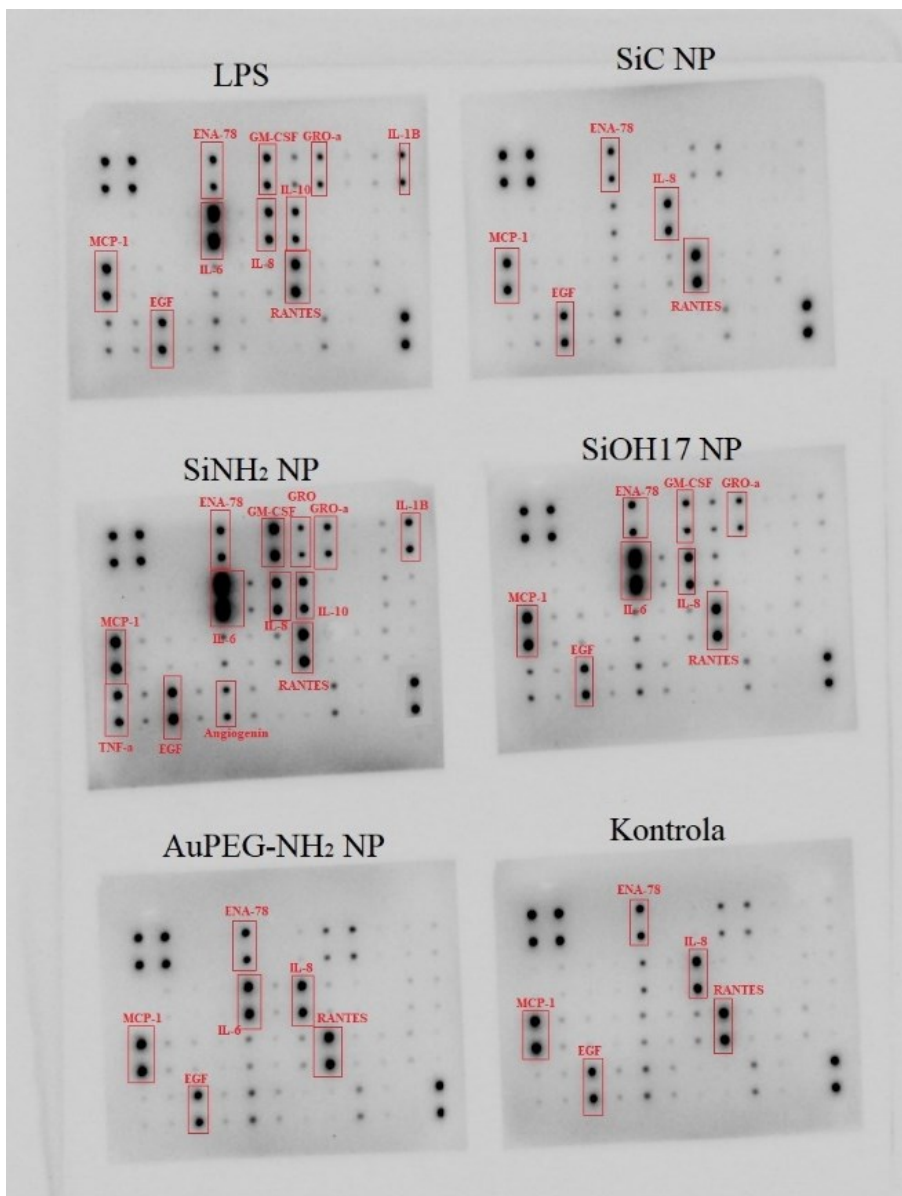


Graf 33: Celkový podiel apoptotických a nekrotických buniek v kultúre PBMC buniek od Darcu M 24 hodín po stimulácii s SiCOH NPs, SiC NP, SiCNH₂ NP, LPS a dH₂O. Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty percentuálneho zastúpenia sledovaných populácií v rámci celej populácie PBMC a sú vypočítané z troch nezávislých meraní.

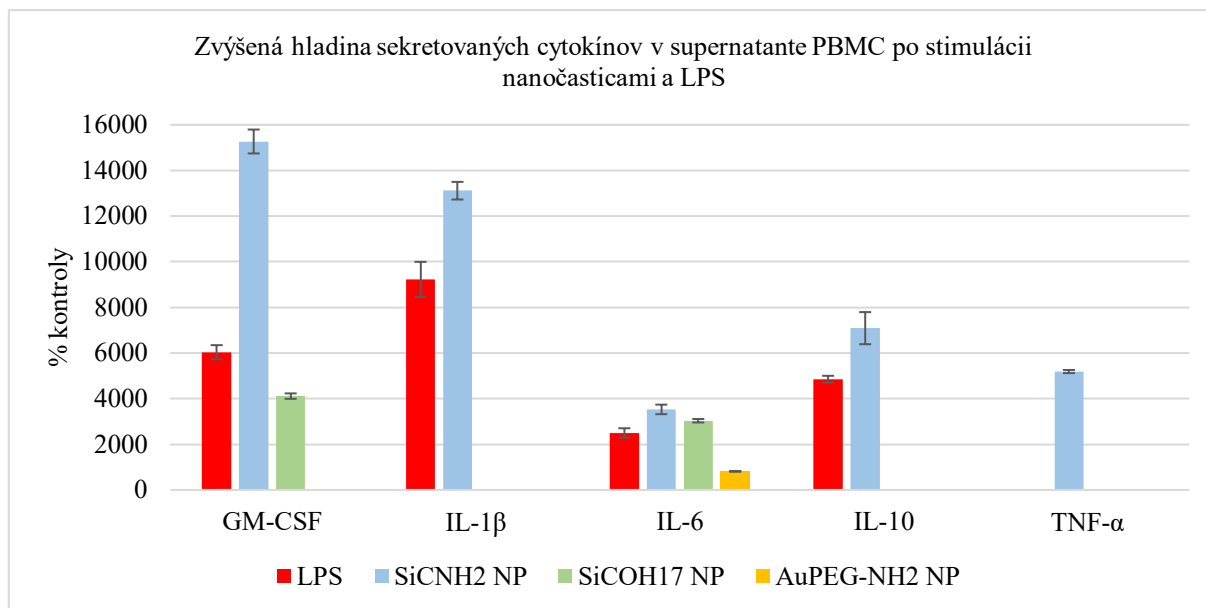
Analýza šiestich vzorkov supernatantov súpravou Human Cytokine Antibody Array-Membrane, ktoré boli uskladnené po stimulácii PBMC od Darcu M ukázala výrazné zvýšenie expresie piatich cytokínov po stimulácii. Denzitometrické dáta sú prezentované po vzťahnutí intenzity signálu analytu stimulovanej vzorky k vzorke nestimulovanej a sú vyjadrené ako jej percentuálna hodnota. V prípade stimulácie buniek SiC NP nebolo v analyzovanom supernatante detekované výrazné zvýšenie množstva ani jedného z analyzovaných cytokínov vzhľadom na nestimulovanú kontrolu.

Schéma usporiadanie membrány je na Obrázku 10 v kapitole 4.2.11. Denzitometrické dáta získané skenovaním na ChemiDoc zo všetkých vzoriek sú na Obrázku 37. Obrázok 37 obsahuje aj zvýraznené body, ktorých intenzita bola vyššia ako intenzita pozitívnej kontroly príslušnej membrány. Z dôvodu čo najpresnejších výsledkoch sme sa rozhodli, že budú

prezentované len dáta, u ktorých je možná jednoznačná analýza. Analýzou dát z týchto zvýraznených miest je možné s určitosťou stanoviť, ak je analyt v analyzovanej vzorke prítomný vo zvýšenom množstve. V prípade bodov s nižšou intenzitou interpretácia dát nie je jednoznačná a k potvrdeniu určitého záveru by bola potrebná kontrolná metóda. Vyhodnotené dáta prezentujúce mieru sekrécie 5 cytokínov zo stimulovaných vzoriek sú na Grafe 34.



Obrázok 37: Snímka denzitometrických dát šiestich membrán použitej súpravy Human Cytokine Antibody Array-Membrane po analýze vzorky. Súprava bola použitá na detekciu 42 cytokínov zo vzorky bunkového supernatantu PBMC buniek po 24- hodinovej stimulácii cudzorodým agens. Konkrétne agens sú uvedené nad každou membránou. Červené ohraničenia značia body s najvyššou intenzitou signálu. Popisky nas ohraničeniami označujú detekovaný cytokín v danom mieste membrány. Denzitometrické dáta boli získané snímaním na prístroji ChemiDoc.

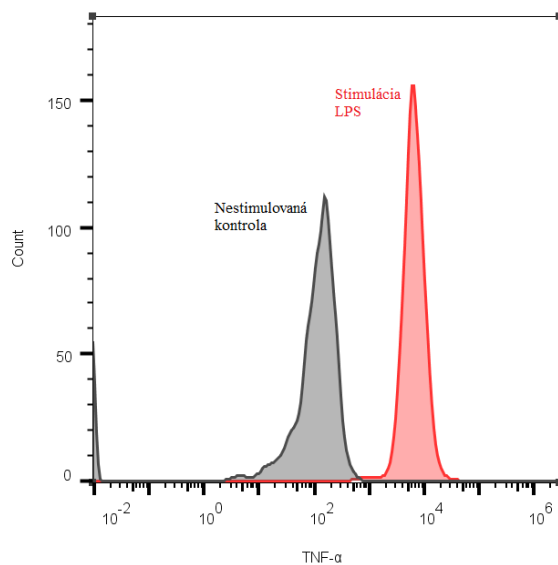


Graf 34: Zmeny v produkcii cytokínov buniek PBMC od Darcu M po stimulácii LPS (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), SiCNH₂ NP (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), SiCOH₁₇ NP (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a AuPEG-NH₂ NP (13,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cytokíny boli detekované v bunkovom supernatante. Dáta sú prezentované po vztiahnutí miery cytokínovej produkcie stimulovanej vzorky k vzorke nestimulovanej a sú vyjadrené ako jej percentuálna hodnota. Dáta pochádzajú z jedného merania súpravou Human Cytokine Antibody Array- Membrane.

Analýza supernatantov PBMC Darcu M po stimulácii zlatými a kremíkovými nanočasticami a LPS ukázala, že bunky reagujú na nanočastice zmenou sekrécie niektorých cytokínov. Vo vzorke bolo abundantných päť cytokínov- GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-10 a TNF- α . Profil sekrécie piatich vybraných cytokínov bol u vzoriek stimulovaných LPS a SiCNH₂ NP podobný. SiCNH₂ NP zvyšovali sekréciu cytokínov, ktorých zvýšená sekrécia je typická pre stimuláciu LPS, dokonca výraznejšie než samotné LPS.

Prítomnosť TNF- α v supernatante nestimulovanej kontrolnej vzorky alebo zvýšenie sekrécie TNF- α po stimulácii PBMC buniek LPS nebolo metódou Human Cytokine Antibody Array- Membrane jednoznačne potvrdené. Z dôvodu nejednoznačnosti výsledkov tejto analýzy bude v budúcnosti analyzovaná uskladnená vzorka séra od Darcu M odobratá v deň odberu spolu s použitými bunkami.

Analýzou rovnakej vzorky pomocou LEGENDplex™ Multi- Analyte Flow Assay Kit- Human Inflammation Panel 1 Mix and Match Subpanel toto potvrdené bolo (viz. Graf 26, Obrázok 38). Dáta z cytometrickej analýzy potvrdzujúce prítomnosť TNF- α v supernatante kontrolnej nestimulovanej vzorky a zvýšenie množstva TNF- α v supernatante pozitívnej stimulovanej kontroly sú prezentované na Obrázku 38. Uskladnená vzorka séra Darcu M bude rovnako analyzovaná metódou LEGENDplex™ Multi- Analyte Flow Assay Kit- Human Inflammation Panel 1 Mix and Match Subpanel pre stanovenie hladiny TNF- α v sére.



Obrázok 3832: Cytometrické dáta vo forme histogramu z analýzy PBMC supernatantov. PBMC pochádzali od Darcu M a boli stimulované 24 hodín LPS (50 µg/ml) alebo bez stimulácie kultivované v médiu s autológnyim sérom (10 % V/V). Histogram zobrazuje relatívne množstvo TNF-α v príslušnom supernatante nestimulovanej kontrolnej vzorky (šedá) a vzorky stimulovanej LPS (červená). Relatívne množstvo TNF-α bolo sledované v kanále PE-A. Vzorky boli analyzované metódou LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit- Human Inflammation Panel 1 Mix and Match Subpanel.

6 Diskusia

Cieľom predloženej diplomovej práce bolo popísať interakciu ultramalých zlatých a kremíkových nanočastíc na ľudské imunitné bunky. Popis interakcie sa zameriava na fenotypové zmeny buniek po ich vystavení nanočasticiam. V našom laboratóriu už bol analyzovaný vplyv ultramalých kremíkových nanočastíc na imunitné bunky monocytárnej bunkovej línie THP-1 (Bělinová *et al.*, 2020), ale doposiaľ sme nevedeli nič o správaní týchto buniek po stimulácii ultramalými zlatými nanočasticami ani o správaní primárnych imunitných buniek po styku so spomínanými typmi ultramalých nanočastíc. Aby sme porozumeli reakcii buniek na vystavenie nanočasticiam, veľká časť práce je venovaná charakterizácii imunitných buniek- primárnych buniek a buniek bunkovej línie THP-1. To umožňuje správne popísať zmeny buniek po stimulácii nanočasticami. Práca s primárnymi imunitnými bunkami bola pre naše laboratórium novou oblasťou a vyžadovala si zavedenie nových metód (izolácia primárnych buniek a charakterizácia buniek metódou prietokovej cytometrie) s ich následnou optimalizáciou. V druhej časti práce sa nachádzajú výsledky experimentov s použitím nanočastíc, ktoré opisujú ich vplyv na životnosť, morfológiu a proliferáciu buniek. Tiež bol sledovaný potenciálny imunomodulačný účinok a cytotoxicita nanočastíc. V prípade pokusov s primárnymi bunkami bol dôraz kladený na priblíženie sa podmienkam *in vivo* so zachovaním konceptu personalizovanej proteínovej korony- bunky darcu boli kultivované v médiu s obsahom autológneho séra.

6.1 Výber vhodnej metódy izolácie buniek

Prvým krokom v štúdiu bolo otestovať dostupné metódy izolácie imunitných buniek z plnej krvi. Hľadaný bol najvhodnejší protokol pre izoláciu primárnych monocytov z ľudskej periférnej krvi pre účely testovania vplyvu ultramalých nanočastíc. Boli testované celkom 4 izolačné metódy, ktorých výsledné izoláty sa líšili. Každý z testovaných protokolov mal určité výhody a nevýhody.

V metóde 1 boli po zlyzovaní erytrocytov izolované všetky leukocyty. Bunky boli funkčné, odpovedali na použité stimulačné agens a profil expzie povrchový CD znakov bol normálny. Výhodou bol aj výsledný počet buniek, ktoré boli vyizolované. Protokol nebol zvolený z dôvodu vysokého zastúpenia granulocytov (majoritne neutrofilov) vo výslednom izoláte. Neutrofily vykazujú vysokú schopnosť fagocytózy cudzorodého materiálu a tak by ďalej nebola pravdepodobne možná dostatočná analýza odpovedi monocytárnej populácie na stimuláciu nanočasticami.

Izolát v prípade metódy 2 predstavovala mononukleárna vrstva. Zastúpenie monocytov vrámci PBMC izolátu po použití tejto metódy izolácie bolo v súlade s publikovanou literatúrou (Chometon *et al.*, 2020). Bunky boli rovnako funkčné, odpovedali na použité stimulačné agens a profil expresie povrchový CD znakov bol normálny. Výsledné množstvo vyizolovaných buniek bolo menšie ako v prípade metódy 1, ale bolo pre naše účely dostačujúce.

Metódou 3 bola izolovaná mononukleárna vrstva s nabohatením monocytárnej populácie. Čistota izolátu bola oproti výrobcom sľubovaným výsledkom približne polovičná, ale zastúpenie monocytov bolo až 50 % čo bolo považované za dostatočné. Izolované bunky ale pravdepodobne neboli plne funkčné lebo neodpovedali na stimulačné agens (M- CSF). Expresný profil buniek bol normálny.

Metóda 4, ktorá predstavovala sorting buniek FACS bola najvhodnejšou z hľadiska čistoty izolátu. Výsledné množstvo izolovaných buniek by ale nebolo pre ďalšie experimenty dostačujúce a funkčnosť buniek bola pravdepodobne takisto narušená.

Pre účely testovania vplyvu nanočastíc na primárne imunitné bunky bola zvolená metóda 2. Izolačnou metódou 2 boli ďalej izolované primárne bunky pre všetky pokusy s nanočasticami.

6.2 Charakteristika monocytárnej populácie

K charakterizácii buniek bolo využité klasické zhotovenie a farbenie histologických preparátov a cytometrická analýza expresie povrchových CD markerov. Zhotovenie histologických preparátov slúžilo ako doplnujúca metóda ku klasickej svetelnej mikroskopii. Umožnilo pozorovať najmä anatómiu jadra a lepšie odhadnúť zmeny v pomere jadra k cytoplazme. Po vytvorení histologického preparátu nebolo možné sledovať prítomnosť dlhých cytoplazmatických výbežkov, ktoré boli typické pre diferenciáciu makrofágov a boli viditeľné v kultúre buniek. Z hľadiska zmien v morfológii pri diferenciácii monocytov do makrofágov bolo ideálne použiť obe metódy. Cytometrická analýza umožňovala merať zmeny v expresii CD znakov a tiež vnútornej granularite na tisícoch buniek naraz a pri tejto štúdií bola nezastupiteľnou najviac využívanou metódou.

Primárne monocyty a bunky monocytárnej línie THP-1 sú svojou morfológiou v kultúre veľmi podobné. Po bližšej analýze morfológie sú viditeľné najmä rozdiely v celkovej veľkosti buniek a tvare jadra. Jadro primárnych monocytov má učebnicový rožkový tvar s typickým zárezom na jednej strane. Jadro THP-1 monocytov má guľatý tvar čo môže svedčiť o nádorovej transformácii buniek.

Expresný profil povrchových CD znakov primárnych monocytov a monocytov leukemickej bunkovej línie sa trochu líši. Konštantný trend expresie bol pozorovaný iba u markerovej molekuly CD 14. Miera expresie ostatných pozorovaných znakov bola u týchto dvoch typov buniek odlišná, ale v podstate obe populácie vykazovali veľmi nízku bazálnu expresiu CD 16 molekuly. V prípade bunkovej línie je expresný profil v čase veľmi premenlivý, čo dokazujú nekonzistentné výsledky v rámci viacerých meraní.

Expresný profil povrchových CD markerov primárnych monocytov potvrdil, že cirkulujúce monocyty vykazujú podobné znaky povrchovej expresie CD znakov ako makrofágy (niekedy sa nazývajú M1 monocyty a M2 monocyty) (Graf 10, Graf 11). To znamená, že CD molekuly, ktoré sú v literatúre prezentované ako markery populácie makrofágov, sú exprimované aj na povrchu cirkulujúcich molekúl u jedincov, ktorí sú klasifikovaní ako zdraví. Intenzita ich expresie súvisí s aktuálnym zdravotným stavom jedinca. Je teda v čase variabilná. Môže odrážať prebiehajúci patologický proces (napr. zápal), ktorý sa ale nemanifestuje systémovo. Literatúra uvádza, že M1 (CD 11b⁺, CD 68⁺) alebo M2 (CD 163⁺, CD 206⁺) fenotyp cirkulujúcich monocytov priamo ukazuje na potenciál týchto buniek ďalej sa diferencovať v príslušný typ prozápalového alebo protizápalového makrofágu a ďalej tak polarizovať imunitnú odpoveď (Kreutzberg & Vigili, 2013). Publikovaných prác, ktoré ale popisujú túto skutočnosť, je ale len minimálne množstvo. Expresia makrofágových markerov na cirkulujúcich bunkách je prezentovaná väčšinou len v súvislosti so špecifickou diagnózou. To ako študent, ktorý čerpá podstatné množstvo informácií z publikovanej literatúry považujem za nedostatok.

Metabolická a proliferačná aktivita primárnych buniek je oproti bunkovej línii veľmi nízka. Tento výsledok zodpovedá publikovaným dátam, že mononukleárne bunky po izolácii za normálnych podmienok neproliferujú (Pinto *et al.*, 2011). Iba časť primárnych monocytov po izolácii je schopná proliferácie a to len po pridaní stimulačných agens (Moss & Hamilton, 2000). Imortalizovaná línia THP-1 je vo svojej monocytárnej forme schopná proliferovať neobmedzene, ale je veľmi závislá na konfluencii buniek v kultúre (dáta nie sú prezentované).

6.3 Charakteristika diferencovaných buniek

Výsledky ukazujú, že makrofágy diferencované z primárnych monocytov alebo THP-1 monocytov ďalej neproliferujú. To je v súlade s publikovanými štúdiami, ktoré dokazujú, že

obnovenie proliferáčnej aktivity makrofágov nastáva len u rezidentných tkanivových makrofágov (Rückerl & Allen, 2014).

Expresný profil CD molekúl u diferencovaných makrofágov sa tiež líši. U oboch typov buniek (primárne aj immortalizované) naznačuje prítomnosť zmiešanej populácie makrofágov a bol viditeľný aj vplyv spôsobu diferenciácie u buniek bunkovej línie.

Bunky línie THP-1 boli diferencované pridaním PMA. V literatúre sa uvádza, že výsledkom diferenciácie má byť populácia buniek pripomínajúca ľudské makrofágy typu M0. Bol teda zo začiatku skúšaný protokol stimulácie buniek PMA bez následnej fáze odpočinku (výsledkom sú bunky MDM3) a s obsahom fáze odpočinku (výsledkom sú bunky MDM 6). Pokiaľ usudzujeme, že markerom týchto buniek je výrazne exprimovaná molekula CD 68, tak moje výsledky ukazujú, že je len veľmi malé percento takýchto buniek v kultúre. Zatiaľ čo markery charakterizujúce M1 makrofágy (CD 11b) a M 2 makrofágy (CD 163, CD 206) sú v oboch testovaných populáciách exprimované hojne (Graf 5 a Graf 6). Výsledkom diferenciácie je morfológicky, aj na základe expresie CD markerov, v obchod prípadoch zmiešaná populácia makrofágov. Zo súboru meraní vyplýva, že detekcia CD markerov u makrofágov MDM6 vykazuje menšie odchýlky medzi meraniami v porovnaní s výsledkami meraní makrofágov MDM3 (Graf 7). To dokazuje, že populácia MDM6 je viac uniformná, populácia je tvorená prevažne diferencovanými makrofágmi a prítomnosť monocyto (prípadne len čiastočne diferencovaných monocytov) je už len minimálna. Ale aj tak výsledky ukazujú, že takto diferencovaná populácia buniek je heterogénna.

Variabilita v celkovom expresnom profile buniek THP-1 pravdepodobne súvisí s ich genetickou nestabilitou a tak táto monocytárna línia nie je vhodná k štúdiu expresného profilu CD markerov ľudských monocytov.

Analýza expresného profilu CD markerov typických pre monocyty a makrofágy po diferenciácii s využitím štandardných protokolov ukázala veľkú variabilitu. Je patrný rozdiel v miere expresie jednotlivých markerov medzi monocytmi a makrofágmi, ale už menšie rozdiely sú viditeľné v expresii povrchových markerov u jednotlivých bunkových populácií stimulovaných rôznymi diferenciačnými agens (Graf 13). V prípade primárnych buniek bola detekovaná aj intraindividuálna variabilita v expresnom profile monocytov prezentovaná na dvoch zdravých jedincoch (Graf 11) , čo môže mať následne vplyv na výsledok diferenciácie týchto buniek.

Je zaujímavé, že bunky, ktoré boli použité ako nestimulovaná kontrola vykazovali po 7 dňoch v kultúre rovnaké morfológické znaky ako cielene diferencované bunky. Dáta z cytometrickej analýzy, ktoré nie sú v práci prezentované, pretože daná analýza nebola opakovaná, ukazujú, že nie je rozdiel v povrchovej expresii CD znakov týchto buniek v porovnaní s cielene diferencovanými bunkami. Toto vo svojej štúdií pozoroval aj Chimal-Ramírez so svojimi kolegami (Chimal-Ramírez *et al.*, 2016). Tým, že bunky boli kultivované v médiu s obsahom autológneho neinaktivovaného séra, mohlo dôjsť k ich stimulácii práve vplyvom séra, ktoré prirodzene obsahuje rôzne cytokíny. V prípade primárnych buniek môže byť pozorovaná variabilita výsledkom genetickej heterogenity ľudských monocytov a zároveň neúplnou stimuláciou buniek.

Napriek tomu, že nie sú vidieť výrazné rozdiely v povrchovej expresii CD znakov medzi rôznymi populáciami makrofágov diferencovaných z primárnych buniek, mikroskopické snímky dokazujú, že v prípade vzorky M2 makrofágov sú bunky charakteristicky viac pretiahnuté než vo vzorke M1 makrofágov, ktorá sa podobná bežne známemu „egg-shape“ tvaru. V oboch prípadoch vzoriek ale neboli populácie ani morfológicky úplne uniformné.

U makrofágov odvodených z bunkovej línie THP-1 alebo primárnych monocytov boli detekované pre makrofágy typické podozomy, ktoré sme vizualizovali na konfokálnom mikroskope (Obrázok 19 b), pretože na bežnom fluorescenčnom mikroskope neboli dobre viditeľné (Obrázok 19 a). U kolegov z Matematicko-fyzikálnej fakulty UK bola možnosť využiť aj zapožičaný STED mikroskop, ale bez dlhej optimalizácie sa nám takisto nepodarilo vizualizovať štruktúru podozomov lepšie ako ako konfokálnym mikroskopom (Obrázok 30).

Primárne bunky a bunky bunkovej línie odpovedajú na rozdielne diferenciacné agens. Skúšala som stimulovať bunkovú líniu monocytov cytokínmi bežne používanými na stimuláciu primárnych buniek, ale bunky línie na tieto stimuly nereagovali. Skúsila som aj stimuláciu primárnych buniek PMA, ale znova nebola pozorovaná žiadna reakcia buniek. Treba brať do úvahy, že v prípade THP-1 buniek sa jedná o leukemickú líniu, ale napriek tomu je stále považovaná za model ľudských monocytov a často využívaná v štúdiách kde primárne monocyty substituujú. Skutočnosť, že sa jedná o zdravé primárne bunky a nádorovo transformované bunky môže vplývať na indukciu ich diferenciácie.

6.4 Analýza odpovedi buniek na stimuláciu nanočasticami

Výsledky analýzy metabolickej aktivity po 24-hodinovej stimulácii buniek nanočasticami ukázali, že použité zlaté nanočastice a príslušné roztoky PEG-ov majú na primárne bunky aj THP-1 monocyty mierne stimulačný vplyv, čo by mohlo byť vysvetlené javom zvaným hormesis, ktorý bol pozorovaný aj inými výskumníkmi v oblasti nanočastíc (Kawata *et al.*, 2009). Tento jav popisuje, že malé množstvo cytotoxických agens môže pôsobiť na bunky stimulačne. Nanočastice pravdepodobne stimulujú v monocytoch metabolické deje, ktoré v dlhšom časovom horizonte vyvolávajú bunkové zmeny. V prípade kremíkových nanočastíc bolo popísané, že pri dlhodobej kultivácii THP-1 buniek s nanočasticami časť buniek diferencuje do adherentných buniek podobných makrofágom alebo dendritickým bunkám, keď pri krátkodobej stimulácii (24 hodín) bola ich metabolická aktivita zvýšená (Bělinová *et al.*, 2020).

V prípade makrofágov bol vplyv zlatých nanočastíc na bunkový metabolizmus minimálny, ale kontrolné roztoky PEG-ov pôsobili na makrofágy cytotoxicky. Nedetekované zmeny v metabolizme makrofágov by mohli naznačovať, že sa nanočastice do buniek vôbec nedostali. Preto bola použitá transmisná elektrónová mikroskopia, pomocou ktorej sme oba typy zlatých nanočastíc v bunkách detekovali. AuPEG NP boli detekované vo vačkoch v bunke v pomerne veľkých zhlukoch, zatiaľčo AuPEG-NH₂ NP tvorili menšie zhluky a boli lokalizované vo viacerých intracelulárnych vačkoch. Toto dokazuje, že rôzna terminácia PEG reťazca, ktorý je kovalentne pripojený na zlatých nanočasticiach má vplyv na distribúciu v bunke, ale v krátkom časovom horizonte (24 hodín) zatiaľ nemá použitými metódami taký vplyv na bunkový metabolizmus aby bolo možné ho detekovať.

Zlaté nanočastice rovnako stimulovali bunkový metabolizmus primárnych buniek a súčasne nevykazovali žiadny vplyv na bazálnu mieru apoptózy a nekrózy v sledovanom časovom úseku ani u jedného z testovaných darcov buniek.

Súčasne sa analýzou prietokovým cytometrom preukázalo, že bunky stimulované AuPEG-NH₂ NP sekretujú do média prozápalový cytokín TNF- α , ktorý bol detekovaný u kontrolnej vzorky buniek stimulovaných LPS, ale v prípade stimulácie nanočasticami nebola jeho sekrecia oproti nestimulovanej kontrolnej vzorke tak silná. Bola stanovená tiež sekrecia cytokínu IL-8, ktorá bola po stimulácii buniek zlatými nanočasticami aj LPS veľmi nízka. Pre overenie týchto výsledkov boli rovnaké bunkové supernatanty použité pre detekciu cytokínov aj druhou metódou, ktorá umožňovala v jednej vzorke simultánne detekovať 42 cytokínov. Obe metódy potvrdili, že TNF- α je sekretovaný bunkami po stimulácii AuPEG-NH₂ NP aj LPS, ale jeho

sekrécia je výrazne vyššia po stimulácii LPS. Pri stanovení sekrécie IL-8 sa výsledky jednotlivých metód nezhodovali, ale vzhľadom k tomu, že toto meranie nebolo opakované, môže sa jednať o chybu danú jedným opakovaním. Pre ďalšie účely bude táto analýza zopakovaná.

Kremíkové nanočastice takisto pôsobia na primárne bunky mierne stimulačne, iba nemodifikované SiC NP pôsobia na bunky cytotoxicky, čo už bolo ukázané na štúdiu s monocytárnou bunkovou líniou THP-1 z nášho laboratória (Bělinová *et al.*, 2020).

Nebol preukázaný efekt nanočastíc na životnosť primárnych buniek v sledovanom čase, tzn. nebola detekovaná výrazná zmena v bazálnej miere apoptózy alebo nekrózy.

Najmenšie zmeny v profile sekretovaných cytokínov oproti kontrolnej nestimulovanej vzorke boli pozorované po stimulácii primárnych buniek SiC NP (Obrázok 37).

V prípade prozápalovej kontroly (bunky stimulované LPS 50 µg/ml) bol potvrdený výsledok z viacerých štúdií, ktoré popisujú stimuláciu mononukleárov LPS. Po stimulácii PBMC *in vitro* bunky sekretovali zvýšené množstvo IL-1β, IL-6, IL-10, GM-CSF a TNF-α.

Tiež bolo potvrdené, že PBMC v kultúre, bez stimulácie, produkujú IL-1β, IL-6, IL-10 a TNF-α. (Cavaillon *et al.*, 1990; De Groote *et al.*, 1992; Janský *et al.*, 2003). Zvýšené množstvo niektorých prozápalových cytokínov bolo sekretované po stimulácii všetkých nanočastíc s výnimkou SiC NP. Pre overenie, že sa nejednalo o cytokíny pochádzajúce z kultivačného autológneho séra bude v budúcnosti prevedená analýza séra z príslušného odberu.

Všetky použité nanočastice s výnimkou SiC NP indukovali v PBMC Donora M po 24-hodinovej stimulácii výraznú sekréciu minimálne jedného prozápalového cytokínu v porovnaní so sekréciou cytokínov nestimulovanej kontrolnej vzorky PBMC. Najvýraznejší efekt v stimulácii sekrécie cytokínov bol pozorovaný po stimulácii SiCNH₂ NP. V prípade použitia týchto nanočastíc ako potenciálnych nosičov liečiv bude potrebná podrobnejšia analýza sekrécie cytokínov, ktorá stanoví koncentráciu sledovaných cytokínov v prostredí buniek po špecifickej stimulácii nanočasticami, pretože metódy použité v tejto práci nedovoľujú kvantitatívne stanoviť prítomnosť cytokínov vo vzorke.

SiC NP neindukujú v bunkách PBMC po 24-hodinovej stimulácii tvorbu zvýšeného množstva niektorých z analyzovaných cytokínov oproti nestimulovanej kontrolnej vzorke PBMC. Pri použitej koncentrácii však v sledovanom čase pôsobili na bunky cytotoxicky čo

môže byť využité v prípade, pokiaľ by sme chceli pomocou týchto nanočastíc eliminovať populáciu mononukleárov, pretože v porovnávajúcej štúdií kde boli stimulované osteoblasty rovnakými nanočasticami sa SiC NP ukázali ako selektívna zbraň (Bělinová *et al.*, 2020) .

7 Záver

Bol zavedený protokol na izoláciu imunitných buniek z plnej žilnej krvi. Izolát predstavoval mononukleárnu vrstvu so zastúpením monocytov približne 5 %.

Bol zavedený protokol na diferenciáciu monocytov do makrofágov M0 využitím M-CSF. M0 makrofágy boli ďalej polarizované do M1 subtypu použitím LPS a do M2 subtypu použitím IL-4. Výsledkom diferenciácie a polarizácie bola vždy zmiešaná populácia makrofágov. Zmiešaný fenotyp populácií bol potvrdený morfológickou analýzou aj analýzou expície povrchových CD znakov.

V prípade THP-1 bunkovej línie bolo zistené, že vhodný protokol na diferenciáciu obsahuje trojdňovú stimuláciu buniek PMA a následne trojdňovú fázu odpočinku. Týmto postupom je možné získať zmiešanú populáciu adherentných makrofágov.

Výsledky analýzy metabolickej aktivity ukázali, že použité zlaté nanočastice majú na primárne bunky aj THP-1 monocyty veľmi podobný účinok, mierne ich stimulujú.

V prípade makrofágov bol vplyv zlatých nanočastíc na bunkový metabolizmus minimálny, ale napriek tomu boli nanočastice pomocou elektrónovej mikroskopie detekované vo vnútri buniek.

Testované kremíkové nanočastice takisto pôsobia na primárne bunky mierne stimulačne, okrem SiC NP, ktoré pôsobia na bunky cytotoxicky už po 24hodinách.

Nebol preukázaný efekt nanočastíc na životnosť primárnych buniek v sledovanom čase. Analýza sekretovaných cytokínov ukázala, že SiCNH₂ NP pôsobia na bunky podobne ako stimulácia lipopolysacharidom. Najmenšie zmeny v profile sekretovaných cytokínov oproti kontrolnej nestimulovanej vzorke boli pozorované po stimulácii primárnych buniek SiC NP.

8 Zoznam použitej literatúry

- Abuchowski, A., McCoy, J. R., Palczuk, N. C., van Es, T., & Davis, F. F. (1977). Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 252(11), 3582–3586.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)40292-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40292-4)
- Ampel, N. M., & Christian, L. (1997). In vitro modulation of proliferation and cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells from subjects with various forms of coccidioidomycosis. *Infection and Immunity*, 65(11), 4483–4487.
<https://doi.org/10.1128/iai.65.11.4483-4487.1997>
- Azad, A. K., Rajaram, M. V. S., & Schlesinger, L. S. (2014). Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *Journal of Cytology & Molecular Biology*, 1(1), 1–5. <https://doi.org/10.13188/2325-4653.1000003>
- Barua, S., & Mitragotri, S. (2014). Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nano Today*, 9(2), 223–243. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.04.008>
- Beke, D., Jánosi, T. Z., Somogyi, B., Major, D., Szekrényes, Z., Erostyák, J., Kamarás, K., & Gali, A. (2016). Identification of Luminescence Centers in Molecular-Sized Silicon Carbide Nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry C*, 120(1), 685–691.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b09503>
- Beke, D., Szekrényes, Z., Balogh, I., Czigány, Z., Kamarás, K., & Gali, A. (2013). Preparation of small silicon carbide quantum dots by wet chemical etching. *Journal of Materials Research*, 28(1), 44–49. <https://doi.org/10.1557/jmr.2012.223>
- Bělinová, T., Machová, I., Beke, D., Fučíková, A., Gali, A., Humlová, Z., Valenta, J., & Kalbáčová, M. H. (2020). Immunomodulatory potential of differently-terminated ultra-small silicon carbide nanoparticles. *Nanomaterials*, 10(3).
<https://doi.org/10.3390/nano10030573>
- Bera, D., Qian, L., Tseng, T. K., & Holloway, P. H. (2010). Quantum dots and their multimodal applications: A review. *Materials*, 3(4), 2260–2345.
<https://doi.org/10.3390/ma3042260>
- Bosshart, H., & Heinzelmann, M. (2016). THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals of Translational Medicine*, 4(21), 4–7. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.08.53>
- Boyoglu, C., He, Q., Willing, G., Boyoglu-Barnum, S., Dennis, V. A., Pillai, S., & Singh, S.

- R. (2013). Microscopic Studies of Various Sizes of Gold Nanoparticles and Their Cellular Localizations. *ISRN Nanotechnology*, 2013, 1–13.
<https://doi.org/10.1155/2013/123838>
- Bugno, J., Poellmann, M. J., Sokolowski, K., Hsu, H. jui, Kim, D. H., & Hong, S. (2019). Tumor penetration of Sub-10 nm nanoparticles: effect of dendrimer properties on their penetration in multicellular tumor spheroids. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 21, 102059. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102059>
- Cavaillon, J. M., Fitting, C., Haeffner-Cavaillon, N., Kirsch, S. J., & Warren, H. S. (1990). Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 58(7), 2375–2382.
<https://doi.org/10.1128/iai.58.7.2375-2382.1990>
- Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggard, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K. A., & Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), 2050–2055.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0608582104>
- Chang, D. T., Colton, E., Matsuda, T., & Anderson, J. M. (2009). Lymphocyte adhesion and interactions with biomaterial adherent macrophages and foreign body giant cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91A(4), 1210–1220.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.32218>
- Chernyshev, A. V., Tarasov, P. A., Semianov, K. A., Nekrasov, V. M., Hoekstra, A. G., & Maltsev, V. P. (2008). Erythrocyte lysis in isotonic solution of ammonium chloride: Theoretical modeling and experimental verification. *Journal of Theoretical Biology*, 251(1), 93–107. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.10.016>
- Chimal-Ramírez, G. K., Espinoza-Sánchez, N. A., Chávez-Sánchez, L., Arriaga-Pizano, L., & Fuentes-Pananá, E. M. (2016). Monocyte Differentiation towards Protumor Activity Does Not Correlate with M1 or M2 Phenotypes. *Journal of Immunology Research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6031486>
- Chistiakov, D. A., Killingsworth, M. C., Myasoedova, V. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2017). CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*, 97(1), 4–13. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.116>
- Chometon, T. Q., Da Silva Siqueira, M., Sant´anna, J. C., Almeida, M. R., Gandini, M., De Almeida Nogueira, A. C. M., & Antas, P. R. Z. (2020). A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocytederived dendritic cells.

- PLoS ONE*, 15(4), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231132>
- Corbo, C., Li, A. A., Poustchi, H., Lee, G. Y., Stacks, S., Molinaro, R., Ma, P., Platt, T., Behzadi, S., Langer, R., Farias, V., & Farokhzad, O. C. (2020). Analysis of the Human Plasma Proteome Using Multi-Nanoparticle Protein Corona for Detection of Alzheimer's Disease. *Advanced Healthcare Materials*, 2000948, 1–10. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000948>
- Cormican, S., & Griffin, M. D. (2020). Human Monocyte Subset Distinctions and Function: Insights From Gene Expression Analysis. *Frontiers in Immunology*, 11(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01070>
- Cornwell, W. D., Kim, V., Fan, X., Vega, M. E., Ramsey, F. V., Criner, G. J., & Rogers, T. J. (2018). Activation and polarization of circulating monocytes in severe chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulmonary Medicine*, 18(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12890-018-0664-y>
- Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B., & Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>
- De Groote, D., Zangerle, P. F., Gevaert, Y., Fassotte, M. F., Beguin, Y., Noizat-Pirenne, F., Pirenne, J., Gathy, R., Lopez, M., Dehart, I., Igot, D., Baudrihay, M., Delacroix, D., & Franchimont, P. (1992). Direct stimulation of cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine*, 4(3), 239–248. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(92\)90062-V](https://doi.org/10.1016/1043-4666(92)90062-V)
- Fadini, G. P., De Kreutzenberg, S. V., Boscaro, E., Albiero, M., Cappellari, R., Kränkel, N., Landmesser, U., Toniolo, A., Bolego, C., Cignarella, A., Seeger, F., Dimmeler, S., Zeiher, A., Agostini, C., & Avogaro, A. (2013). An unbalanced monocyte polarisation in peripheral blood and bone marrow of patients with type 2 diabetes has an impact on microangiopathy. *Diabetologia*, 56(8), 1856–1866. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2918-9>
- Fam, S. Y., Chee, C. F., Yong, C. Y., Ho, K. L., Mariatulqabtiah, A. R., & Tan, W. S. (2020). Stealth coating of Nanoparticles in drug-delivery systems. *Nanomaterials*, 10(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nano10040787>
- Foroozandeh, P., & Aziz, A. A. (2018). Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 13. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2728-6>

- García, C. P., Sumbayev, V., Gilliland, D., Yasinska, I. M., Gibbs, B. F., Mehn, D., Calzolari, L., & Rossi, F. (2013). Microscopic analysis of the interaction of gold nanoparticles with cells of the innate immune system. *Scientific Reports*, *3*, 1–7.
<https://doi.org/10.1038/srep01326>
- García, K. P., Zarschler, K., Barbaro, L., Barreto, J. A., O'Malley, W., Spiccia, L., Stephan, H., & Graham, B. (2014). Zwitterionic-coated “stealth” nanoparticles for biomedical applications: Recent advances in countering biomolecular corona formation and uptake by the mononuclear phagocyte system. *Small*, *10*(13), 2516–2529.
<https://doi.org/10.1002/sml.201303540>
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., & Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, *15*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1546-9>
- Gill, P. K. (2019). *Rapid Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells From Rapid Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells From Whole Blood With Ficoll Hypaque Density Centrifugation*. *14*(April), 0–4.
- Hajipour, Mohammad J., Laurent, S., Aghaie, A., Rezaee, F., & Mahmoudi, M. (2014). Personalized protein coronas: A “key” factor at the nanobiointerface. *Biomaterials Science*, *2*(9), 1210–1221. <https://doi.org/10.1039/c4bm00131a>
- Hajipour, Mohammad Javad, Raheb, J., Akhavan, O., Arjmand, S., Mashinchian, O., Rahman, M., Abdolahad, M., Serpooshan, V., Laurent, S., & Mahmoudi, M. (2015). Personalized disease-specific protein corona influences the therapeutic impact of graphene oxide. *Nanoscale*, *7*(19), 8978–8994. <https://doi.org/10.1039/c5nr00520e>
- Han, S., Bouchard, R., & Sokolov, K. V. (2019). Molecular photoacoustic imaging with ultra-small gold nanoparticles. *Biomedical Optics Express*, *10*(7), 3472.
<https://doi.org/10.1364/boe.10.003472>
- He, Q., Zhang, J., Shi, J., Zhu, Z., Zhang, L., Bu, W., Guo, L., & Chen, Y. (2010). The effect of PEGylation of mesoporous silica nanoparticles on nonspecific binding of serum proteins and cellular responses. *Biomaterials*, *31*(6), 1085–1092.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.046>
- Hume, D. A. (2006). The mononuclear phagocyte system. *Current Opinion in Immunology*, *18*(1), 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.008>
- Huo, S., Gong, N., Jiang, Y., Chen, F., Guo, H., Gan, Y., Wang, Z., Herrmann, A., & Liang, X. J. (2019). Gold-DNA nanosunflowers for efficient gene silencing with controllable transformation. *Science Advances*, *5*(10). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw6264>

- Jafari, S., Izadi, Z., Alaei, L., Jaymand, M., Samadian, H., Kashani, V. ollah, Derakhshankhah, H., Hayati, P., Noori, F., Mansouri, K., Moakedi, F., Janczak, J., Soltanian Fard, M. J., & Fayaz bakhsh, N. (2020). Human plasma protein corona decreases the toxicity of pillar-layer metal organic framework. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71170-z>
- Jaganathan, H., & Godin, B. (2012). Biocompatibility assessment of Si-based nano- and micro-particles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(15), 1800–1819. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.05.008>
- Janský, L., Reymanová, P., & Kopecký, J. (2003). Dynamics of Cytokine Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated by LPS or Infected by Borrelia. *Physiological Research*, *52*(5), 593–598.
- Jenner, W., Motwani, M., Veighey, K., Newson, J., Audzevich, T., Nicolaou, A., Murphy, S., MacAllister, R., & Gilroy, D. W. (2014). Characterisation of leukocytes in a human skin blister model of acute inflammation and resolution. *PLoS ONE*, *9*(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089375>
- Jeon, S. I., Lee, J. H., Andrade, J. D., & De Gennes, P. G. (1991). Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I. Simplified theory. *Journal of Colloid And Interface Science*, *142*(1), 149–158. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(91\)90043-8](https://doi.org/10.1016/0021-9797(91)90043-8)
- Kapara, A., Brunton, V., Graham, D., & Faulds, K. (2020). Investigation of cellular uptake mechanism of functionalised gold nanoparticles into breast cancer using SERS. *Chemical Science*, *11*(22), 5819–5829. <https://doi.org/10.1039/d0sc01255f>
- Kawata, K., Osawa, M., & Okabe, S. (2009). In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environmental Science and Technology*, *43*(15), 6046–6051. <https://doi.org/10.1021/es900754q>
- Khanal, D., Lei, Q., Pinget, G., Cheong, D. A., Gautam, A., Yusoff, R., Su, B., Yamaguchi, S., Kondyurin, A., Knowles, J. C., Georgiou, G., Macia, L., Jang, J. H., Ramzan, I., Ng, K. W., & Chrzanowski, W. (2020). The protein corona determines the cytotoxicity of nanodiamonds: implications of corona formation and its remodelling on nanodiamond applications in biomedical imaging and drug delivery. *Nanoscale Advances*, *2*(10), 4798–4812. <https://doi.org/10.1039/d0na00231c>
- Kreutzenberg, D., & Vigili, S. (2013). *An unbalanced monocyte polarisation in peripheral blood and bone marrow of patients with type 2 diabetes has an impact on microangiopathy An unbalanced monocyte polarization in peripheral blood and bone marrow of type 2 diabetic patients impacts on microa.* *56*, 1856–1866.

- Lee, Y. J., Ahn, E. Y., & Park, Y. (2019). Shape-dependent cytotoxicity and cellular uptake of gold nanoparticles synthesized using green tea extract. *Nanoscale Research Letters*, *14*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-2967-1>
- Luo, D., Wang, X., Zeng, S., Ramamurthy, G., Burda, C., & Basilion, J. P. (2019). Targeted Gold Nanocluster-Enhanced Radiotherapy of Prostate Cancer. *Small*, *15*(34), 1900968. <https://doi.org/10.1002/sml.201900968>
- Machova, I., Hubalek, M., Belinova, T., Fucikova, A., Stehlik, S., Rezek, B., & Kalbacova, M. H. (2020). The bio-chemically selective interaction of hydrogenated and oxidized ultra-small nanodiamonds with proteins and cells. *Carbon*, *162*, 650–661. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.02.061>
- McCullough, K. C., Basta, S., Knötig, S., Gerber, H., Schaffner, R., Kim, Y. B., Saalmüller, A., & Summerfield, A. (1999). Intermediate stages in monocyte-macrophage differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection. *Immunology*, *98*(2), 203–212. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00867.x>
- Merah-Mourah, F., Cohen, S. O., Charron, D., Mooney, N., & Haziot, A. (2020). Identification of Novel Human Monocyte Subsets and Evidence for Phenotypic Groups Defined by Interindividual Variations of Expression of Adhesion Molecules. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61022-1>
- Mohammad-Beigi, H., Hayashi, Y., Zeuthen, C. M., Eskandari, H., Scavenius, C., Juul-Madsen, K., Vorup-Jensen, T., Enghild, J. J., & Sutherland, D. S. (2020). Mapping and identification of soft corona proteins at nanoparticles and their impact on cellular association. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18237-7>
- Moss, S. T., & Hamilton, J. A. (2000). Proliferation of a subpopulation of human peripheral blood monocytes in the presence of colony stimulating factors may contribute to the inflammatory process in diseases such as rheumatoid arthritis. *Immunobiology*, *202*(1), 18–25. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(00\)80048-0](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(00)80048-0)
- Nanjappa, V., Thomas, J. K., Marimuthu, A., Muthusamy, B., Radhakrishnan, A., Sharma, R., Ahmad Khan, A., Balakrishnan, L., Sahasrabudhe, N. A., Kumar, S., Jhaveri, B. N., Sheth, K. V., Kumar Khatana, R., Shaw, P. G., Srikanth, S. M., Mathur, P. P., Shankar, S., Nagaraja, D., Christopher, R., ... Prasad, T. S. K. (2014). Plasma Proteome Database as a resource for proteomics research: 2014 update. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D959–D965. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1251>
- Orlando, A., Colombo, M., Prosperi, D., Corsi, F., Panariti, A., Rivolta, I., Masserini, M., & Cazzaniga, E. (2016). Evaluation of gold nanoparticles biocompatibility: a

- multiparametric study on cultured endothelial cells and macrophages. *Journal of Nanoparticle Research*, 18(3), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3359-4>
- Partikel, K., Korte, R., Stein, N. C., Mulac, D., Herrmann, F. C., Humpf, H. U., & Langer, K. (2019). Effect of nanoparticle size and PEGylation on the protein corona of PLGA nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 141(May), 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.05.006>
- Patel, A. A., Zhang, Y., Fullerton, J. N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A. A., Bigley, V., Flavell, R. A., Gilroy, D. W., Asquith, B., Macallan, D., & Yona, S. (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 214(7), 1913–1923. <https://doi.org/10.1084/jem.20170355>
- Patsula, V., Horák, D., Kučka, J., Macková, H., Lobaz, V., Francová, P., Herynek, V., Heizer, T., Páral, P., & Šefc, L. (2019). Synthesis and modification of uniform PEG-neridronate-modified magnetic nanoparticles determines prolonged blood circulation and biodistribution in a mouse preclinical model. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47262-w>
- Philpott, N. J., Turner, A. J. C., Scopes, J., Westby, M., Marsh, J. C. W., Gordon-Smith, E. C., Dalgleish, A. G., & Gibson, F. M. (1996). The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: Simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood*, 87(6), 2244–2251. <https://doi.org/10.1182/blood.v87.6.2244.bloodjournal8762244>
- Pinto, L. A., Galvão Castro, B., Soares, M. B. P., & Grassi, M. F. R. (2011). An Evaluation of the Spontaneous Proliferation of Peripheral Blood Mononuclear Cells in HTLV-1-Infected Individuals Using Flow Cytometry. *ISRN Oncology*, 2011, 1–6. <https://doi.org/10.5402/2011/326719>
- Podolnikova, N. P., Podolnikov, A. V., Haas, T. A., Lishko, V. K., & Ugarova, T. P. (2015). Ligand recognition specificity of leukocyte integrin $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ (Mac-1, CD11b/CD18) and its functional consequences. *Biochemistry*, 54(6), 1408–1420. <https://doi.org/10.1021/bi5013782>
- Prat, M., Le Naour, A., Coulson, K., Lemée, F., Leray, H., Jacquemin, G., Rahabi, M. C., Lemaitre, L., Authier, H., Ferron, G., Barret, J. M., Martinez, A., Ayyoub, M., Delord, J. P., Gladieff, L., Tabah-Fisch, I., Prost, J. F., Couderc, B., & Coste, A. (2020). Circulating CD14 high CD16 low intermediate blood monocytes as a biomarker of ascites immune status and ovarian cancer progression. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000472>

- Prieto, A., Díaz, D., Barcenilla, H., García-Suárez, J., Reyes, E., Monserrat, J., San Antonio, E., Melero, D., De La Hera, A., Orfao, A., & Alvarez-Mon, M. (2002). Apoptotic rate: A new indicator for the quantification of the incidence of apoptosis in cell cultures. *Cytometry*, *48*(4), 185–193. <https://doi.org/10.1002/cyto.10132>
- Pulford, K. A. F., Słpos, A., Cordell, J. L., Stross, W. P., & Mason, D. Y. (1990). Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen. *International Immunology*, *2*(10), 973–980. <https://doi.org/10.1093/intimm/2.10.973>
- Ren, J., Cai, R., Wang, J., Daniyal, M., Baimanov, D., Liu, Y., Yin, D., Liu, Y., Miao, Q., Zhao, Y., & Chen, C. (2019). Precision Nanomedicine Development Based on Specific Opsonization of Human Cancer Patient-Personalized Protein Coronas. *Nano Letters*, *19*(7), 4692–4701. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b01774>
- Reznickova, A., Slavikova, N., Kolska, Z., Kolarova, K., Belinova, T., Hubalek Kalbacova, M., Cieslar, M., & Svorcik, V. (2019). PEGylated gold nanoparticles: Stability, cytotoxicity and antibacterial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *560*(September 2018), 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.09.083>
- Reznickova, A., Slepicka, P., Slavikova, N., Staszek, M., & Svorcik, V. (2017). Preparation, aging and temperature stability of PEGylated gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *523*(April), 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.04.005>
- Rückerl, D., & Allen, J. E. (2014). Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection. *Immunological Reviews*, *262*(1), 113–133. <https://doi.org/10.1111/imr.12221>
- Savelyeva, A. V., Kuligina, E. V., Bariakin, D. N., Kozlov, V. V., Ryabchikova, E. I., Richter, V. A., & Semenov, D. V. (2017). Variety of RNAs in Peripheral Blood Cells, Plasma, and Plasma Fractions. *BioMed Research International*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/7404912>
- Schaer, C. A., Schoedon, G., Imhof, A., Kurrer, M. O., & Schaer, D. J. (2006). Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circulation Research*, *99*(9), 943–950. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000247067.34173.1b>
- Schmid, I., Uittenbogaart, C. H., & Giorgi, J. V. (1994). Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry.

- Cytometry*, 15(1), 12–20. <https://doi.org/10.1002/cyto.990150104>
- Schulz, C., Perdiguero, E. G., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S. E. W., Pollard, J. W., Frampton, J., Liu, K. J., & Geissmann, F. (2012). A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. *Science*, 335(6077), 86–90. <https://doi.org/10.1126/science.1219179>
- Schwirn, K., Tietjen, L., & Beer, I. (2014). Why are nanomaterials different and how can they be appropriately regulated under REACH? *Environmental Sciences Europe*, 26(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-26-4>
- Shao, X. R., Wei, X. Q., Song, X., Hao, L. Y., Cai, X. X., Zhang, Z. R., Peng, Q., & Lin, Y. F. (2015). Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell Proliferation*, 48(4), 465–474. <https://doi.org/10.1111/cpr.12192>
- Sheng, Y., Chang, L., Kuang, T., & Hu, J. (2016). PEG/heparin-decorated lipid-polymer hybrid nanoparticles for long-circulating drug delivery. *RSC Advances*, 6(28), 23279–23287. <https://doi.org/10.1039/c5ra26215a>
- Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R., & Sastry, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir*, 21(23), 10644–10654. <https://doi.org/10.1021/la0513712>
- Sokol, R. J., Hudson, G., & James, N. T. (1987). Human macrophage development: A morphometric study. *Journal of Anatomy*, 151, 27–35.
- Sokolova, V., Mekky, G., van der Meer, S. B., Seeds, M. C., Atala, A. J., & Epple, M. (2020). Transport of ultrasmall gold nanoparticles (2 nm) across the blood–brain barrier in a six-cell brain spheroid model. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75125-2>
- Soucie, E. L., Weng, Z., Geirsdottir, L., Molawi, K., Maurizio, J., Fenouil, R., Mossadegh-Keller, N., Gimenez, G., VanHille, L., Beniazza, M., Favret, J., Berruyer, C., Perrin, P., Hacohen, N., Andrau, J.-C., Ferrier, P., Dubreuil, P., Sidow, A., & Sieweke, M. H. (2016). Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells. *Science*, 351(6274), aad5510–aad5510. <https://doi.org/10.1126/science.aad5510>
- Suganuma, K., Miwa, H., Imai, N., Shikami, M., Gotou, M., Goto, M., Mizuno, S., Takahashi, M., Yamamoto, H., Hiramatsu, A., Wakabayashi, M., Watarai, M., Hanamura, I., Imamura, A., Mihara, H., & Nitta, M. (2010). Energy metabolism of

- leukemia cells: Glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leukemia and Lymphoma*, 51(11), 2112–2119. <https://doi.org/10.3109/10428194.2010.512966>
- Sugawara, S., Arakaki, R., Rikiishi, H., & Takada, H. (1999). Lipoteichoic acid acts as an antagonist and an agonist of lipopolysaccharide on human gingival fibroblasts and monocytes in a CD14- dependent manner. *Infection and Immunity*, 67(4), 1623–1632. <https://doi.org/10.1128/.67.4.1623-1632.1999>
- Suzuki, Y., Shirai, M., Asada, K., Yasui, H., Karayama, M., Hozumi, H., Furuhashi, K., Enomoto, N., Fujisawa, T., Nakamura, Y., Inui, N., Shirai, T., Hayakawa, H., & Suda, T. (2018). Macrophage mannose receptor, CD206, predict prognosis in patients with pulmonary tuberculosis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31565-5>
- Székrenyész, Z., Somogyi, B., Beke, D., Károlyházy, G., Balogh, I., Kamarás, K., & Gali, A. (2014). Chemical transformation of carboxyl groups on the surface of silicon carbide quantum dots. *Journal of Physical Chemistry C*, 118(34), 19995–20001. <https://doi.org/10.1021/jp5053024>
- Termsarasab, U., Yoon, I. S., Park, J. H., Moon, H. T., Cho, H. J., & Kim, D. D. (2014). Polyethylene glycol-modified arachidyl chitosan-based nanoparticles for prolonged blood circulation of doxorubicin. *International Journal of Pharmaceutics*, 464(1–2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.01.015>
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980; 26:171–176. DOI: 10.1002/ijc.2910260208. *International Journal of Cancer*, 176(2), 171–176.
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>
- Venosa, A., Malaviya, R., Choi, H., Gow, A. J., Laskin, J. D., & Laskin, D. L. (2016). Characterization of distinct macrophage subpopulations during nitrogen mustard-induced lung injury and fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 54(3), 436–446. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0120OC>
- Vis, B., Hewitt, R. E., Faria, N., Bastos, C., Chappell, H., Pele, L., Jugdaohsingh, R., Kinrade, S. D., & Powell, J. J. (2018). Non-Functionalized Ultrasmall Silica Nanoparticles Directly and Size-Selectively Activate T Cells. *ACS Nano*, 12(11), 10843–10854. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b03363>

- Vis, B., Hewitt, R. E., Monie, T. P., Fairbairn, C., Turner, S. D., Kinrade, S. D., & Powell, J. J. (2020). Ultrasmall silica nanoparticles directly ligate the T cell receptor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(1), 285–291. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911360117>
- Yu, M., Lei, B., Gao, C., Yan, J., & Ma, P. X. (2017). Optimizing surface-engineered ultrasmall gold nanoparticles for highly efficient miRNA delivery to enhance osteogenic differentiation of bone mesenchymal stromal cells. *Nano Research*, *10*(1), 49–63. <https://doi.org/10.1007/s12274-016-1265-9>
- Zhang, X. D., Wu, D., Shen, X., Liu, P. X., Yang, N., Zhao, B., Zhang, H., Sun, Y. M., Zhang, L. A., & Fan, F. Y. (2011). Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, *6*, 2071–2081. <https://doi.org/10.2147/ijn.s21657>
- Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., & Han, J. (2018). Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research*, *28*(1), 9–21. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.133>
- Ziegler-Heitbrock, H. W. L. (1996). Heterogeneity of human blood monocytes: The CD14+CD16+ subpopulation. *Immunology Today*, *17*(9), 424–428. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(96\)10029-3](https://doi.org/10.1016/0167-5699(96)10029-3)

Internetové zdroje:

ISO/TS 80004-1:2015(en), Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms

ISO/TS 80004-2:2015(en), Nanotechnologies — Vocabulary — Part 2: Nano-objects

(EMA/CHMP/704195/2013)- Propylene glycol used as an excipient, Committee for Human Medicinal Products (CHMP), European Medicines Agency (EMA)