

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Veronika Švachová

Subpopulace lidských monocytů a makrofágů

Subpopulation of human monocyte and macrophages

Diplomová práce

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

Praha 2013

Prohlášení

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

V Praze dne 2. 5. 2013

Veronika Švachová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Iljovi Střížovi, CSs. za vedení diplomové práce, věnovaný čas a přátelskou pomoc během studia. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Evě Brabcové za cenné rady a především za zaškolení pro práci v laboratoři. Mé obrovské díky patří také RNDr. Aleně Sekerkové za uvedení do problematiky průtokové cytometrie a za připomínky, které pomohly k vylepšení mé práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodičům za podporu po celou dobu mého studia.

Finanční prostředky pro tuto práci byly využity z grantového projektu: Monocytární subpopulace u transplantací ledvin a regulační mechanismy diferenciacce lidských makrofágů (IGA MŽČR NS/10524-3).

Abstrakt

Monocyty a makrofágy patří mezi významné složky vrozené imunitní odpovědi. Tyto mononukleární fagocyty tvoří heterogenní populace buněk, které v přítomnosti různých signálů z mikroprostředí mohou měnit svůj fenotyp a funkci. Cílem této práce byla modulace jejich fenotypu spektrem stimulans a porovnání těchto změn na THP-1 monocyto/makrofágové linii a na monocytech izolovaných z lidské periferní krve. Expresí povrchových znaků byla měřena pomocí průtokové cytometrie. Dále byla analyzována produkce IL-8 metodou Luminex a koncentrace solubilního kalprotektinu pomocí metody ELISA. K nejvýznamnější změně exprese povrchových znaků docházelo po stimulaci IFN γ . Tento cytokin indukoval povrchovou expresi molekuly CD54, CD14 a HLA-DR na THP-1 buněčné linii. Při použití IFN γ o vyšších koncentracích pak byly THP-1 buňky ve zvýšené míře apoptické a zvyšovaly expresi a produkci kalprotektinu. Na membránách monocytů IFN γ aktivoval pouze expresi CD54. Cytokin IL-4 zvyšoval expresi znaku CD36 na THP-1 buňkách a inhiboval expresi molekuly CD163 na monocytech. Působením LPS pak docházelo k potlačení aktivace molekuly HLA-DR na monocytech. Inkubací s THP-1 buňkami naopak LPS indukoval produkci IL-8. Po stimulaci pomocí TNF α docházelo k aktivaci CD54 a zvýšené produkci IL-8 THP-1 buňkami. Práce přispěla ke standardizaci stimulačních podmínek modulace fenotypu lidských mononukleárních fagocytů a prokázala některé rozdíly v odpovědi na cytokiny mezi lidskými monocyty a monocyto/makrofágovou linií THP-1.

Abstract

Monocytes and macrophages are important components of the innate immune response. These mononuclear phagocytes form a heterogeneous cell population, of which phenotype and functions can be modified under the influence of different signals coming from the surrounding microenvironment. The aim of this work was to modulate the phenotype of these cells by a variety of stimulants and to compare the changes induced on the model of THP-1 monocytic cell line and on the human peripheral blood monocytes. Surface marker expression was analyzed by flow cytometry. Further on, IL-8 production was evaluated by Luminex assay and the concentration of soluble calprotectin was assessed by ELISA. The most significant changes in surface marker expression were induced by exposure to IFN γ . This cytokine increased the expression of CD54, CD14 and HLA-DR on the surface of THP-1 cell line. Higher concentrations of IFN γ promoted higher apoptotic rate and augmented calprotectin expression and production in THP-1 cell line. On the surface of monocytes, IFN γ stimulation resulted only in the upregulation of CD54 expression. IL-4 increased the expression of CD36 by THP-1 cell line and inhibited the expression of CD163 by human monocytes. LPS stimulation caused the suppression of HLA-DR activation in monocytes and enhanced IL-8 production in THP-1. TNF α activated CD54 expression and IL-8 production in THP-1 cells. This work contributed to the standardization of stimulating conditions leading to phenotype modulation of human mononuclear phagocytes and demonstrated some differences between human monocytes and THP-1 monocytic cell line in the response to cytokine stimulation.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část	10
2.1	Systém mononukleárních fagocytů	10
2.2	Vývoj mononukleárního fagocytárního systému	10
2.3	Morfologie monocytárních elementů	11
2.4	Monocyty	12
2.4.1	Subpopulace monocytů.....	12
2.4.2	Apoptóza monocytů.....	15
2.4.3	Monocytární buňky v kostní dřeni.....	17
2.5	Makrofágy	17
2.5.1	Rozdělení makrofágů podle anatomické lokalizace	18
2.5.2	Rozdělení makrofágů podle fenotypu.....	19
2.6	Další faktory ovlivňující diferenciaci a růst mononukleárů.....	22
2.7	Úloha fagocytů ve vybraných imunopatologických stavech.....	23
2.7.1	Subpopulace monocytů a transplantace	24
2.7.2	Ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění.....	24
2.7.3	Subpopulace monocytů a chronické renální onemocnění (CKD).....	25
2.7.4	HIV	25
2.7.5	Revmatická artritida.....	25
2.8	Sledované povrchové znaky.....	26
2.8.1	CD14.....	26
2.8.2	CD16 (FcγRIII).....	27
2.8.3	HLA-DR	27
2.8.4	CD36.....	27
2.8.5	CD54 (ICAM-1)	28
2.8.6	CD163.....	29
2.8.7	Kalprotektin	29

2.9	THP-1 buněčná linie.....	31
3	Cíle práce	32
4	Materiál a metody	32
4.1	Kultivační podmínky buněčné linie THP-1	32
4.1.1	Rozmrazování buněk	32
4.1.2	Pasážování buněk.....	33
4.1.3	Příprava THP-1 buněk k pokusu.....	33
4.2	Izolace a příprava lidských periferních monocytů	33
4.3	Sledování změny exprese povrchových znaků monocytů a THP-1 buněk	35
4.4	Průtoková cytometrie	35
4.5	Stanovení produkce solubilního kalprotektinu buňkami THP-1 metodou ELISA	36
4.6	Stanovení produkce IL-8 stimulovanými THP-1 buňkami metodou Luminex.	37
4.7	Měření životnosti a počtu buněk po stimulaci	39
4.8	Stanovení apoptických THP-1 buněk.....	39
4.9	Statistika.....	40
5	Výsledky	40
5.1	Životnost THP-1 buněk a krevních monocytů po stimulaci	40
5.2	Vliv stimulans na povrchovou expresi jednotlivých CD znaků.....	41
5.2.1	Efekt stimulans na povrchovou expresi molekuly CD54	43
5.2.2	Efekt stimulans na povrchovou expresi znaku HLA-DR	48
5.2.3	Efekt stimulans na povrchovou expresi molekuly CD14	51
5.2.4	Efekt stimulans na povrchovou expresi molekuly CD36	53
5.2.5	Efekt stimulans na povrchovou expresi molekuly CD16	54
5.2.6	Efekt stimulans na povrchovou expresi molekuly CD163	55
5.3	Vliv stimulans na produkci solubilního kalprotektinu THP-1 buňkami	57
5.4	Expese povrchového kalprotektinu po stimulaci spektrem cytokinů	58
5.5	Životnost populací THP-1 buněk rozdělených dle profilu SS/FS.....	63
5.6	Intracelulární versus extracelulární expese kalprotektinu THP-1 buňkami po stimulaci IFN γ	66

5.7	Stanovení produkce IL-8 THP-1 buňkami po stimulaci	67
6	Shrnutí výsledků	68
7	Diskuze	69
8	Závěr	76
9	Seznam zkratk	77
10	Seznam použité literatury	80

1 Úvod

Správná funkce imunitního systému je nezbytná pro udržení homeostázy organismu a podléhá přísným regulačním mechanismům. Jeho hlavním úkolem je ochrana před možnými nebezpečnými agens (obranyschopnost), a to nejen z vnějšího prostředí, ale také z prostředí vnitřního, kdy z organismu odstraňuje staré či jinak poškozené vlastní buňky. Dále udržuje toleranci vůči vlastním tkáním a zachovává celistvost organismu. Imunitní mechanismy můžeme rozdělit na dvě skupiny: specifická (adaptivní) imunita a nespecifická (vrozená). Právě naše sledované mononukleární fagocytární buňky patří k hlavním složkám buněčné nespecifické imunity. Mezi hlavní zástupce těchto buněk řadíme monocyty, které kolují v periferní krvi a přestupem do tkání se diferencují na tkáňové makrofágy. Makrofágy zastávají významnou roli v průběhu zánětu, a pomocí specifických receptorů (pattern recognition receptors) rozpoznávají nebezpečné vzory na povrchu buňky, kterou následně fagocytují. Zpracované fragmenty proteinů z poškozené buňky vystavují pomocí MHC II. třídy na svém povrchu T-lymfocytům. Díky této prezentaci tvoří makrofágy významný spojník mezi přirozenou a adaptivní imunitou a jsou tedy nezbytné k zahájení antigeně specifických imunitních procesů.

Mononukleární fagocytární buňky představují heterogenní populace buněk. Periferní monocyty zahrnují další subpopulace, které mají jasný fenotyp a danou imunoregulační funkci. Rovněž makrofágy reprezentují různorodé populace buněk, které mohou při různých signálech z mikroprostředí organismu měnit svůj fenotyp a funkci, a tím přispívat k regulaci imunitní odpovědi. Zdrojem těchto signálů jsou pak především Th lymfocyty prostřednictvím své produkce cytokinů. Například v prostředí IFN γ makrofágy aktivují antimikrobiální, mikrobicidní a tumoricidní mechanismy a zvyšuje se jejich schopnost prezentovat antigen. Na druhou stranu v prostředí IL-4 a IL-13 se vyvíjejí makrofágy s protizánětlivým fenotypem, které jsou zapojené v procesu hojení. K vývoji makrofágů s regulačními vlastnostmi pak přispívají glukokortikoidy, apoptické buňky či prostředí IL-10. Díky heterogenitě mononukleárních fagocytů a především možnému přepnutí makrofágů z určitého fenotypu na jiný, zaujímají tyto buňky důležitou roli při vývoji a progresi mnohých onemocnění.

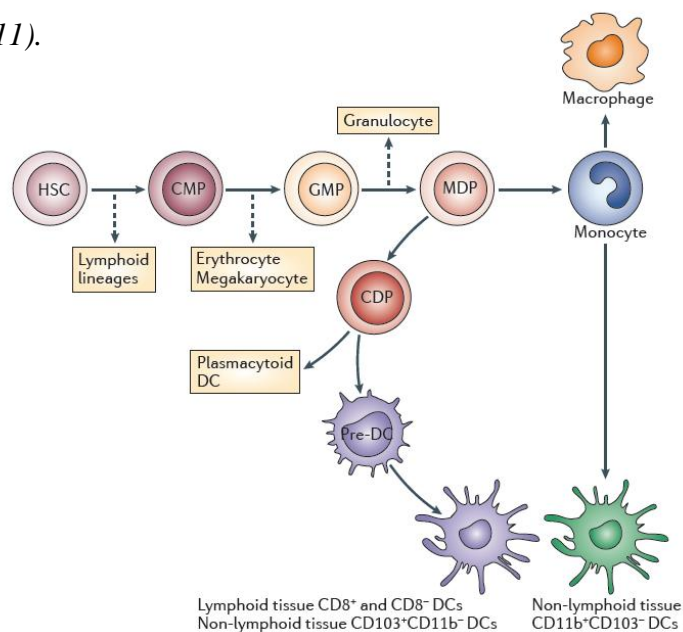
2 Teoretická část

2.1 Systém mononukleárních fagocytů

Mononukleární fagocytární systém byl původně definován jako systém představující skupinu leukocytů, která zahrnuje tkáňové makrofágy, cirkulující krevní monocyty a jejich myeloidní progenitory přítomné v kostní dřeni. Van Furth dále tyto buňky definoval jako fagocyty, které jsou schopné adherovat ke sklu a fagocytovat (*van Furth et Cohn, 1968; van Furth, 1972*). Do stejné skupiny můžeme rovněž zařadit dendritické buňky, které byly objeveny Steinmanem, jako zřetelná linie mononukleárních fagocytů, která se specializuje především na antigenní prezentaci T buňkám (*Steinman et Cohn, 1974*).

2.2 Vývoj mononukleárního fagocytárního systému

Vývoj mononukleárního fagocytárního systému začíná v kostní dřeni z hematopoetické kmenové buňky (HSC), která je společným prekurzorem všech krevních buněk. V dalším kroku se HSC diferencuje v běžný myeloidní progenitor (CMP), který už má omezený diferenciační potenciál. Následně vzniká granulocyto-makrofágový prekurzor (GMP) a z něj makrofágový dendritický progenitor (MDP). MDP se dále diferencuje do dvou větví: nezralé elementy dendritické řady a monoblasty. Z monoblastů vznikají promonocyty a monocyty. Monocyty opouští kostní dřeň a dostávají se do periferní krve, ve které zůstávají několik dní a poté vstupují do tkání, kde doplňují tkáňové makrofágy (*Chow et al., 2011*).



Obrázek 1: Vývoj mononukleárního fagocytárního systému (*Chow et al., 2011*)

2.3 Morfologie monocytárních elementů

- **Monoblast**

Monoblast je špatně rozlišitelný od myeloblastu. Dosahuje velikosti 20 až 30 μm . Jádro je oválné, chromatin jemný s prominentním jadérkem. Cytoplazma je bazofilní, vzácně může být azurofilní a obsahuje granula.

- **Promonocyt**

Promonocyt již více připomíná monocytární elementy. Jádro promonocytu má zavinutý ledvinovitý tvar, jemný chromatin a můžeme zde ještě nalézt zřetelná jadérka. Cytoplazma je variabilní (bazofilní či azurofilní) a obsahuje granula.

- **Nezralý monocyt**

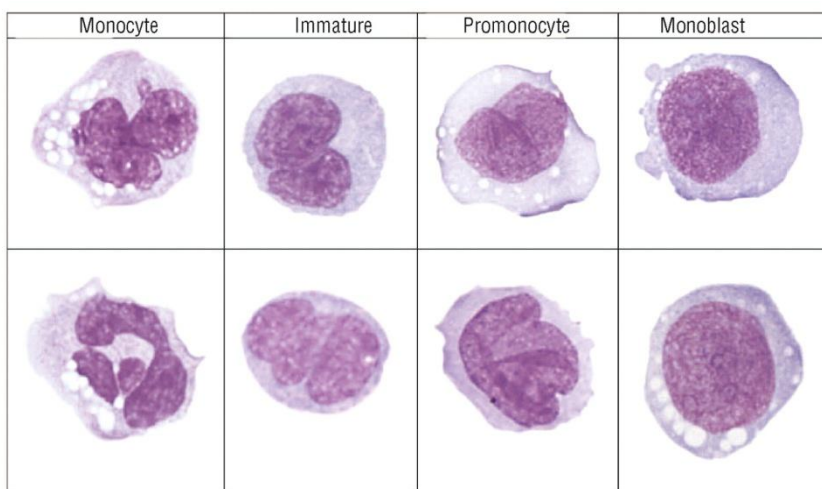
Nezralý monocyt má více kondenzovaný chromatin a řídký výskyt jadérek. Cytoplazma je méně bazofilní než u předchozích stádií. Oproti zralým monocytům jsou méně vyžralé a menší.

- **Monocyt**

Zralý monocyt (20 až 25 μm) má nepravidelné ledvinovité jádro s kondenzovaným chromatinem a je bez jadérka. Cytoplazma je šedá a příležitostně se zde objevují azurofilní granula a vakuoly (*Penka a Slavičková, 2011; Goasguen et al., 2009*)

- **Makrofág**

Dochází k významnému nárůstu velikosti buňky. Zvyšuje se počet cytoplazmatických granulí a počet jasných cytoplazmatických vakuol. Dochází také ke zvýšené heterogenitě buněčného tvaru (*Kaushansky et al., 2010*).



Obrázek 2: Morfologie monocytárních elementů (*Goasguen et al., 2009*)

2.4 Monocyty

Monocyty jsou typem bílých krvinek tvořících 5–10 % leukocytů periferní krve. V klidovém stádiu doplňují tkáňové rezidentní makrofágy a dendritické buňky. V případě prozánětlivých, metabolických a imunitních stimulů se rychle zvyšuje jejich přísun a diferenciaci do makrofágů a dendritických buněk, které pak vykonávají imunitní odpověď. Diferenciací přispívají k obranyschopnosti, tkáňové remodelaci a hojení. Samy produkují zánětlivé cytokiny. Díky receptorům rozpoznávajícím patogeny odstraňují různé biologické substance a toxické molekuly (*Gordon et Taylor, 2005*).

2.4.1 Subpopulace monocytů

Cirkulující monocyty v periferní krvi tvoří heterogenní populaci lišící se fenotypem a funkcí. První studie rozdělovaly monocyty na dvě populace na základě velikosti a denzity. Hlavní populace, „klasické monocyty“, se vyznačuje větší velikostí a hustotou. Minoritní populace, „přechodné monocyty“, se snadněji uvolňuje z extravaskulárního rezervoáru a má menší denzitu a velikost (*Akiyama et al., 1983*). Později byly monocyty rozděleny na základě exprese znaků CD14 (koreceptor pro vazbu LPS) a CD16 (nízkoafinitní FcγR-III) na populaci CD14⁺⁺CD16⁻ a populaci CD16⁺ monocytů (*Passlick et al., 1989*). Populaci CD16⁺ je možné dále dělit na základě exprese znaku CD14 na CD14⁺⁺CD16⁺ monocyty a CD14^{low}CD16⁺ monocyty. Jednotlivé skupiny monocytů jsou vybaveny i rozdílnými scavenger receptory pro odstranění různých patogenů.

2.4.1.1 Subpopulace CD14⁺CD16⁻ (Mon1, klasické)

Tato populace „klasických monocytů“ má v periferní krvi největší zastoupení (80 - 90 %). Mon1 jsou velké buňky s vysokou fagocytární a myeloperoxidázovou aktivitou, supresorovou aktivitou pro antigenem aktivované lymfocyty a vysokou, protilátkami zprostředkovanou cytotoxicitou (ADCC). Navíc uvolňují vysokou hladinu superoxidových radikálů (*Passlick et al., 1989*). Populace se vyznačuje vysokou expresí chemokinového receptoru CCR2. Ligandem tohoto receptoru je MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), jenž je hlavním chemokinem, který reguluje migraci monocytů a makrofágů do místa zánětu (*Deshmane et al., 2009*).

Hlavní fenotypické rozlišení Mon1 od ostatních subpopulací monocytů:

Mon1 se vyznačují vysokou expresí CD14, CD64, receptoru pro IL-6, chemokinového receptoru CCR2 a scavenger receptoru CD163. Populace má však nízkou expresi VCAM receptoru, CD204 a absenci CD16 (*Shantsila et al., 2011*).

2.4.1.2 Subpopulace CD14⁺⁺CD16⁺ (Mon2, přechodné)

Tato populace (3–9 % ze všech monocytů) se vyznačuje kombinací některých znaků typických pro zralé dendritické buňky, jako je vysoká produkce IL-12, vysoká exprese HLA-DR, CD11c a kostimulační molekuly CD86. Na druhou stranu si populace zachovává vysokou expresi CD14 a vysokou fagocytární aktivitu (*Grage-Griebenow et al., 2001*).

Hlavní fenotypické rozlišení Mon2 od ostatních subpopulací monocytů:

Mon2 mají největší expresi ICAM receptoru, Tie2, CXCR4, CD163, VEGF receptoru, ferritinu, ApoB a CD115. Ve srovnání s předchozím subsetem se vyznačují zvýšenou regulací CD16, VCAM-1 receptoru a CD204 (*Shantsila et al., 2011*).

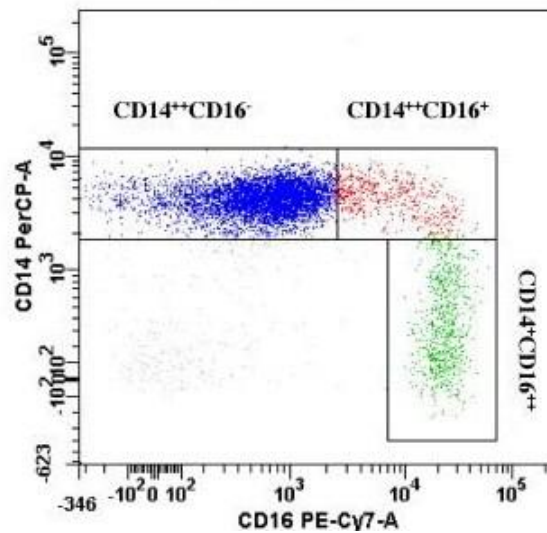
2.4.1.3 Subpopulace CD14^{low}CD16⁺ (Mon3, neklasické)

Populace se svým fenotypem nejvíce podobá zralým tkáňovým makrofágům. Sdílí i některé charakteristiky dendritických buněk. V periferní krvi se vyskytuje v množství okolo 6–13 % ze všech monocytů. Vykazuje nízké hladiny exprese CD14, silnou expresi CD16 a současně sníženou expresi CD11b a CD33 ve srovnání s Mon1. Dále je pro ně charakteristická vysoká exprese MHC I. a II. třídy a s tím spojená vysoká antigen prezentující kapacita (*Ziegler-Heitbrock et al., 1993*). Na rozdíl od ostatních subpopulací monocytů nevykazuje expresi chemokinového receptoru CCR2 a díky tomu ji můžeme dobře odlišit od populace Mon2.

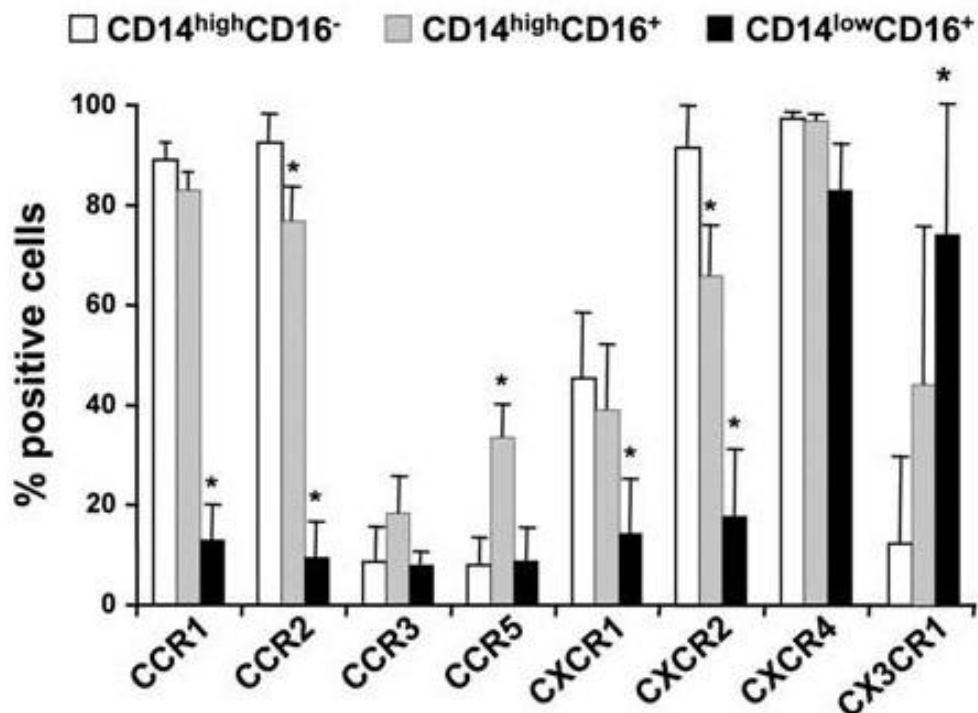
Hlavní fenotypické rozlišení Mon3 od ostatních subpopulací monocytů:

Ze všech subsetů má maximální expresi CD16, VCAM-1 receptoru a CD204. Na druhou stranu se Mon3 vyznačují sníženou expresí CD14, IL-6 receptoru, CD64, CCR2 a CD163 (*Shantsila et al., 2011*).

Subpopulace Mon2 a Mon3 se svými vlastnostmi překrývají a v mnohých studiích vystupují jako jedna populace nesoucí označení CD16⁺ monocyty. Tyto monocyty jsou hlavními zdroji prozánětlivých cytokinů (TNF α , IL-12) a na rozdíl od klasických monocytů produkují nízké množství protizánětlivého IL-10. Díky těmto vlastnostem označujeme CD16⁺ monocyty za prozánětlivé (Frankenberger *et al.*, 1996). Procentuální zastoupení těchto buněk roste u pacientů s chronickým a akutním zánětlivým onemocněním a s věkem pacienta. Obecně mají CD16⁺ monocyty zvýšenou kapacitu pro endoteliální adhezi díky vysoké expresi VLA-4 a CD11c. Subpopulace má kratší délku telomer a vyšší expresi β -galaktosidázy. Uvolňuje zánětlivé cytokiny v odpovědi na nízko intenzivní stimuly a zvyšuje kapacitu pro udržení lymfocytární proliferace (Merino *et al.*, 2011).



Obrázek 3: Rozdělení jednotlivých populací monocytů (upraveno dle Zawada *et al.*, 2012).



Obrázek 4: Expres chemokininových receptorů jednotlivými subpopulacemi monocytů (Ancuta et al., 2003).

2.4.2 Apoptóza monocytů

Pokud monocyty neprostoupí do tkáně a nestane se tak z něj makrofág, koluje v krevním oběhu až 3 dny a poté prochází spontánní apoptózou. Populace Mon1 ve srovnání s CD16⁺ monocyty má vyšší expresi glutation metabolizujících genů (př. GSH peroxidáza, mikrosomální GSH S-transferáza). Tyto antioxidantní geny a následná exprese antioxidantních proteinů vede k lepší ochraně Mon1 před oxidativním poškozením. CD14^{+/low}CD16⁺ monocyty jsou náchylnější ke spontánní apoptóze a apoptóze indukované ROS (reaktivní kyslíkaté látky). Exprimují vysokou hladinu proapoptických genů a proteinů (TNF α , kaspáza 3, Bax, cytochrom c) a vystavují vyšší míru aerobní respirace vyplývající z vyšší produkce ROS z mitochondrií (Zhao et al., 2010).

	Mon1	Mon2	Mon3
Počet buněk v 1 μ l	360 \pm 87	25 \pm 15	39 \pm 13
% ze všech monocytů	85 \pm 6	6 \pm 3	10 \pm 4
Velikost	++	+++	+
Granularita	++	++	+
CD14	+++	+++	+
CD16 (Fc γ R-III)	-	+	++
CD64 (Fc γ R-I)	++	++	+
CD32 (Fc γ R-II)	+++	+++	+
CCR2	+++	++	+
CCR5	-		+++
TLR4	+	++	+
CD86	++	+++	+++
MHC I, MHC II	++	+++	+++
CD163	++	+++	+
CD204	+	++	+++
CD115	+	++	+
IL-6 receptor	++	++	+
Tie2	+	++	+
Apolipoprotein B	+	++	+
Ferritin	++	+++	+
VEGF receptor 1	++	+++	+
Integrin β 2 (CD18)	++	++	+
Integrin α 4 (CD49d)	+	++	+++
Fagocytóza a MPO	+++	+++	+
ADCC	+++	++	+
APC	+	+++	+++
Citlivost k zabíjení T buněk	+++	\pm	\pm
T buněčná suprese	+++	-	-
MLR	\pm	++	+++
Polyklonální (CD3) T buněčná aktivace	+	+++	++
Agregace s destičkami	+	++	+
Chemotaktická aktivita	+++	+++	+++
Nádorová cytotoxicita	+++	++	+

Tabulka 1: Shrnutí základních charakteristik subsetů monocytů. Upraveno dle *Shantsila et al., 2011* a *Grage-Griebenow et al., 2001*.

CD14, koreceptor pro vazbu LPS; CCR2, chemokinový receptor typu 2; CCR5, chemokinový receptor typu 5; TLR4, Toll like receptor 4; CD86, kostimulační molekula; MHC, major histocompatibility komplex; CD163, CD204, scavenger receptory; CD115, receptor pro macrophage colony-stimulating faktor, Tie2; receptor pro angiopoetin; VEGF receptor, receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor; MPO, myeloperoxidázová aktivita; ADCC, protilátkami zprostředkovaná cytotoxicita; APC, antigen prezentující kapacita; MLR, směsná lymfocytární reakce

2.4.3 Monocytární buňky v kostní dřeni

Ve srovnání s krví je v kostní dřeni absolutní počet monocytů třikrát větší. Počet Mon2 zde dosahuje až desetkrát většího množství než v periferní krvi. V kostní dřeni se objevuje další populace buněk monocytů charakteristická jako CD14^{low} CD16⁻. Zmíněná populace se však již v periferní krvi nevyskytuje. Tato skupina buněk je zastoupena v počtu 8–20 % z celkového množství všech monocytů přítomných v kostní dřeni. CD14^{low} CD16⁻ monocyty pravděpodobně představují pól progenitorových buněk, které prochází maturací (*Shantsila et al., 2011*).

2.5 Makrofágy

(z řečtiny *makros* „velká“ + *phagein* „jíst“)

Výstupem monocytů z krevního řečiště do tkáně se z těchto buněk stávají makrofágy. Tyto buňky jsou především zodpovědné za fagocytózu (Ilja Mečnikov – Nobelova cena za popis fagocytózy, 1908) různých patogenů, homeostázy, odstranění mrtvých a starých buněk z organismu a remodelaci tkáně po zánětu. Fagocytóza se uskutečňuje díky konstitutivní expresi rozmanitých receptorů na povrchu buňky (PRRs - pattern recognition receptors). Významnými PRRs jsou Toll like receptory (TLRs), scavenger receptory, RIG-like receptory (RLRs), Nod-like receptory (NLRs), manózoový receptor a receptory C lektinového typu (CLRs) (*Gordon et al., 2005*). Makrofágy patří mezi vysoce heterogenní buňky, které mohou rychle změnit svoji fyziologii v odpovědi na místní signály z mikroprostředí (*Mosser et Edwards, 2008*). Mají uplatnění jak ve vrozené tak v adaptivní imunitě. Hlavními povrchovými znaky pro identifikaci makrofágů jsou F4/80 (myši), CD68 (lidé).

Subpopulace makrofágů

Makrofágy můžeme rozdělit do jednotlivých subpopulací na základě jejich anatomického umístění či podle funkční aktivity.

2.5.1 Rozdělení makrofágů podle anatomické lokalizace

Osteoklasty

Mají rozhodující úlohu pro udržení homeostázy v kostech. Jedná se o obří buňky, které degradují kostní matrix a uvolňují vápník z kostí. Defekt v jejich diferenciaci a snížení počtu osteoklastů vede k osteopetróze. Naopak zvýšená funkce či zvýšený počet těchto buněk způsobuje osteoporózu.

Alveolární makrofágy

Jedná se o rezidentní makrofágy v plicích, jenž fagocytují vdechnuté cizorodé částice jako je prach, alergeny či mikroorganismy a podílí se na regulaci imunitní odpovědi.

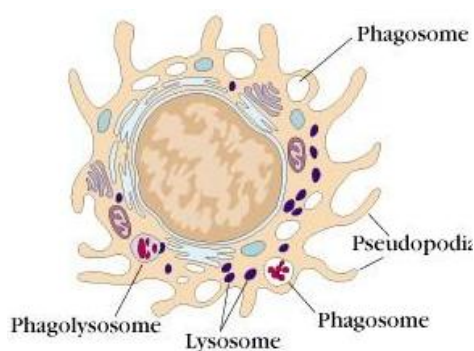
Kupfferovy buňky

Tyto velké buňky hvězdčovitého či pyramidového tvaru jsou specializovanými makrofágy vyskytujícími se v jaterních sinusech. Slouží jako filtrační bariéra pro odstranění mikrobiálních částic, endotoxinů a dalších škodlivých substancí, jenž přichází portální krví.

Makrofágy centrálního nervového systému - mikroglie, perivaskulární makrofágy, meningeální makrofágy, choroid-plexus makrofágy

Histiocyty - makrofágy vyskytující se v pojivové tkáni

Makrofágy sekundárních lymfatických orgánů - makrofágy marginální zóny sleziny, makrofágy subkapsulárních sinusů lymfatických uzlin



Obrázek 5: Stavba makrofágové buňky (Anonym, 2013a)

2.5.2 Rozdělení makrofágů dle fenotypu

Spíše než stabilní populace makrofágy představují široké spektrum aktivovaných fenotypů. Ve snaze klasifikovat tyto buňky, dělíme makrofágy na dvě hlavní skupiny: M1 makrofágy představující klasicky aktivované makrofágy a M2, čili alternativně aktivované makrofágy. M2 populace zahrnuje dramaticky rozdílné buňky lišící se svojí biochemií a fyziologií, proto se nabízí populaci těchto fagocytů rozlišit na základě jejich funkce a to na makrofágy účastníci se hojení, regulační makrofágy a s tumorem asociované makrofágy (TAMs) (*Mosser et al., 2008*).

2.5.2.1 Klasicky aktivované makrofágy (M1 makrofágy)

Klasicky aktivované makrofágy jsou důležitou komponentou obranyschopnosti. Jedná se o efektorové buňky, které jsou indukovány během buňkami zprostředkované imunitní odpovědi. Výsledkem činnosti M1 makrofágů je zvýšení mikrobicidní a tumoricidní kapacity sekrecí vysoké hladiny prozánětlivých mediátorů. Produkci TNF α , IL-1 β a zvýšenou aktivitou NOS¹ (syntetáza oxidu dusnatého) přispívají k aktivaci antimikrobiálních mechanismů a zabíjení patogenů (*Hesse et al. 2001*). Dalšími produkty klasicky aktivovaných makrofágů jsou cytokiny IL-12, IL-6 a IL-23, které jsou nezbytné pro polarizaci Th1 a Th17 buněk. Klasicky aktivované makrofágy se dále vyznačují vysokou antigen prezentující kapacitou, která je asociována se zvýšenou expresí MHC II. třídy (*Mosser a Edwards, 2008*).

Aktivace M1 makrofágů

Pro polarizaci M1 makrofágů je nezbytný signál v podobě IFN γ . IFN γ připravuje makrofágy na aktivaci. Pro úplnou aktivaci je potřeba 2. signálu, tím je například TNF. Exogenní TNF poskytuje druhý signál přímo. Fyziologicky ale makrofág získává 2. signál vlastní produkcí TNF α . Tato produkce je výsledkem ligace Toll-like receptorů (například po expozici mikrobem či mikrobiálních produktů jako je lipopolysacharid) (*Mosser, 2003*).

¹ NOS je enzym, který katalyzuje produkci NO z L-argininu.

Zdroje IFN γ pro aktivaci M1 makrofágů

1. NK buňky – Tyto buňky odpovídají na stres a infekci produkcí cytokinu IFN γ . NK buňky produkují IFN γ pouze přechodně, a proto nemohou udržovat stálou populaci takto aktivovaných makrofágů.
2. Th1 buňky – Produkují IFN γ trvale a jsou tedy nezbytné pro udržení aktivované populace M1 makrofágů. Díky tomu poskytují stabilní obranyschopnost proti intracelulárním mikroorganismům.

2.5.2.2 Alternativně aktivované makrofágy (M2 makrofágy)

Jak již bylo zmíněno, alternativně aktivované makrofágy zahrnují širokou škálu buněk, jejichž fenotypy se vzájemně prolínají. Pro přehlednost je rozdělíme na 3 skupiny lišící se způsobem aktivace a funkcí (*Mosser et al., 2008*).

1. makrofágy zapojené v procesu hojení (wound healing macrophages)
2. regulační makrofágy
3. TAM – sdílí charakteristiky jak regulačních tak hojících makrofágů

2.5.2.2.1 Makrofágy zapojené v procesu hojení

Vyznačují se především protizánětlivými vlastnostmi. Regulují zánět a podporují hojení tkáně. Jejich přítomnost je asociována s expresí extracelulárních matrixových proteinů (fibronektin, BIGH3), které se podílejí na remodelaci tkáně v průběhu hojící fáze akutních zánětlivých reakcí, ale také při chronických zánětlivých onemocněních (*Gratchev et al., 2001*). Poskytnutím profibrogenních faktorů fibroblastům zvyšují fibriogenezi. Naopak klasicky aktivované makrofágy uvolňují antifibrogenní a fibrolytické faktory (*Song et al., 2000*). Doprovází je také zvýšená exprese arginázy 1. Argináza je enzym hydrolyzující L-arginin na močovinu a L-ornitin. Ornitin je poté prekurzorem polyaminů a kolagenu. Tyto látky opět podporují proces remodelace. Snižováním NOS aktivity, selhávají v produkci oxidu dusnatého (*Hesse et al., 2001*). Tyto makrofágy špatně podporují proliferaci nativních T buněk. Minimálně zvyšují regulaci MHC II. třídy a CD86. Chybí jim účinná schopnost prezentace antigenu (*Edwards et al., 2006*). Jsou také důležitými efektorovými buňkami, které přispívají k odstranění parazitů a hlístic (*Anthony et al., 2006*). Rovněž zvyšují expresi manozového receptoru, který zprostředkovává vazbu a ingesci mikroorganismů, jenž mají na svém povrchu mannózu (*Stein, 1992*).

Aktivace hojících makrofágů

Aktivace se může odehrávat jak v adaptivní, tak ve vrozené imunitní odpovědi. Stimuly nezbytné pro polarizaci makrofágů jsou Th2 cytokiny IL-4 a IL-13, které jsou produkovány zejména při alergii či buněčné a humorální odpovědi během parazitární infekce. Hlavním zdrojem IL-4 jsou $CD4^+$ T buňky, bazofily a žírné buňky. Buňky vrozené imunity produkují IL-4 v odpovědi na zranění, ale také v přítomnosti chitinu, který je strukturálním biopolymerem hub a parazitů. Chitin zprostředkovává jak alternativní aktivaci makrofágů, tak produkci leukotrienu B_4 , který je nezbytný pro nábor buněk (Resse *et al.*, 2007). Tato aktivace je tedy vrozenou reakcí na zranění, která může nastat i v případě neexistence adaptivní imunity. Nicméně Th2 buňky jsou nezbytné pro údržbu a plnou aktivaci v odpovědi na parazity (Loke *et al.*, 2007).

2.5.2.2.2 Regulační makrofágy

Jedná se o buňky s protizánětlivým fenotypem, které silně produkují IL-10 a TGF β . Produkci IL-10 umožňují diferenciaci Th2 buněk a regulační T buněčnou odpověď (Anderson *et al.*, 2002). Na rozdíl od „hojících makrofágů“ exprimují relativně vysokou hladinu kostimulačních molekul (CD80 a CD86) a mohou tedy prezentovat antigen T buňkám. Hlavními znaky pro jejich identifikaci je sfingokináza 1 a LIGHT (ligand patřící do TNF super-rodiny) (Edwards *et al.*, 2006).

Aktivace regulačních makrofágů

K diferenciaci regulačních makrofágů přispívá celá řada faktorů. Poprvé byla tato populace sledována *in vitro* po stimulaci v přítomnosti IgG imunitního komplexu (ligace Fc γ RI) a TLR agonisty (LPS, CD40 ligand, lipoteichová kyselina) (Gerber *et Mosser*, 2001). K dalším faktorům pro diferenciaci patří apoptické buňky. Po fagocytóze apoptických buněk dochází k inhibici tvorby prozánětlivých cytokinů (především IL-1 β) a chemokinu IL-8. Naopak se zvyšuje produkce TGF β 1, prostaglandinu E2 a destičkového aktivačního faktoru (PAF) (Fadok *et al.*, 1998). Mezi další významné látky přispívající k indukci regulačních makrofágů patří: glukokortikoidy, IL-10, ligandy pro GPCRs (G-protein-coupled receptors) a prostaglandiny (Mosser *et Edwards*, 2008).

2.5.2.2.3 TAM (makrofágy asociované s tumorem)

Tyto makrofágy infiltrují nádorovou tkáň a svými imunosupresivními vlastnostmi přispívají k podpoře růstu nádorů a symbiotickému vztahu s neoplastickými buňkami. TAM jsou odvozené z cirkulujících monocytárních prekurzorů, které jsou do neoplastické tkáně lákány především chemokiny (například CCL2) (Mantovani et al., 1992). K podpoře migrace a přežití dále přispívá vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) (Barleon et al., 1996) a M-CSF (Lin et al., 2001). Diferenciaci v nádoru umožňuje IL-10 a TGFβ. Tyto cytokiny jsou produkovány jak nádorovými buňkami, tak samotnými TAM. V nádorovém mikroprostředí tedy získávají fenotyp a funkci podobnou M2 makrofágům. Jsou málo cytotoxické, chudé na produkci NO (Dinapoli, 1996), podporují proliferaci a angiogenezi a špatně prezentují antigen. Vykazují vysokou produkci IL-10, nízkou produkci IL-12 a potlačují adaptivní imunitní odpověď (Mantovani et al., 2002). Hustota TAM v lidských nádorech koreluje se špatnou prognózou onemocnění (Bingle et al., 2002).

2.6 Další faktory ovlivňující diferenciaci a růst mononukleárů

- **M-CSF**

M-CSF, také známý pod názvem CSF-1, je glykoprotein o velikosti 70–90 kDa, který slouží jako hlavní růstový faktor pro makrofágy. V prostředí in vitro M-CSF diferencuje monocyty na makrofágy. Dále je zahrnut v proliferaci a přežívání monocytů, makrofágů a jejich vývojových progenitorů.

- **GM-CSF**

Je granulocyto-makrofágový kolonie stimulující faktor o velikosti 19–32 kDa, který stimuluje kmenové buňky k vývoji granulocytů a monocytů. Tento protein je sekretován širokým spektrem buněk (makrofágy, monocyty, T buňky, fibroblasty, endoteliální buňky, keratinocyty) (Handin et al., 2003). V přítomnosti GM-CSF a IL-4 dochází k diferenciaci monocytů do dendritických buněk, které se však mohou vyvíjet i přímo z CD34⁺ kmenového hematopoetického progenitoru (Romani, 1994).

Samotná diferenciacie mononukleárů je iniciována v momentě, kdy monocyty přechází přes endoteliální bariéru. Při přechodu může přijít do kontaktu s žírnou buňkou, která uvolňuje GM-CSF, IL-4, IL-13, TNF a CD40L. Tyto uvolněné faktory následně přispívají k diferenciaci monocytů do dendritických buněk. Pokud se monocyty střetne se stromální buňkou (fibroblast), začne tato buňka produkovat IL-6. IL-6 kontroluje samotnou diferenciaci monocytů na makrofágy. Zpětně zvyšuje expresi M-CSF receptoru a díky tomu mohou monocyty opět vázat M-CSF a diferencovat se do makrofágů (*Chomarat et al., 2000*). Na diferenciaci monocytů v makrofágy se dále aktivně podílejí i kaspázy, které jsou však především zahrnuté v apoptóze. Právě kaspáza 3 a 9 v lidských periferních krevních monocitech indukuje diferenciaci do makrofágů v odpovědi spolu s M-CSF. Tato kaspázová aktivační cesta zahrnuje uvolnění mitochondriálního cytochromu c a zpožděnou nadprodukcii Bcl-2 a kaspázového inhibitorového proteinu p53. Reakce je specifická pouze pro diferenciaci do makrofágů. Při diferenciaci monocytů do dendritických buněk v prostředí IL-4 a GM-CSF nejsou aktivní fragmenty kaspázy 3 identifikovatelné (*Sordet, 2002*).

2.7 Úloha fagocytů ve vybraných imunopatologických stavech

Díky rozdílnému fenotypu mononukleárních fagocytů, který představuje jak zánětlivé tak imunosupresivní vlastnosti, hrají monocyty a makrofágy jednu z rozhodujících rolí při vývoji a progresi mnohých onemocnění. Zásadní roli pak hraje přesmyk makrofágů z jednoho fenotypu na druhý. Například v tukové tkáni zdravého jedince převládají makrofágy s hojícím fenotypem, které udržují funkci adipocytů, inzulínovou senzitivitu a glukózovou toleranci. Dietou indukovaná obezita pak u těchto makrofágů vede k přepnutí na M1 prozánětlivý fenotyp, který přispívá k inzulínové rezistenci vedoucí k diabetu 2. typu (*Lumeng et al., 2007*). K podobnému přepnutí dochází i v případě progresu nádorů, kdy dochází k přesmyku makrofágů s M1 fenotypem na TAM. M1 aktivují zabíjející mechanismus pro nádorovou tkáň. TAM mají naopak imunosupresivní vlastnosti, díky nimž dochází k podpoře růstu nádoru (*Mantovani et al., 2002*). Mononukleární fagocyty jsou dále zapojené v autoimunitních onemocněních, patogenezi fibrózy, přispívají k rozvoji alergií a astmatu, ateroskleróze atd. (*Murray et Wynn, 2011*). V následujícím textu budou dále podrobněji rozebrány subpopulace monocytů v souvislosti s vybranými patologickými stavy.

2.7.1 Subpopulace monocytů a transplantace

Transplantace ledvin je spojena s evidentním posunem poměru specifických populací monocytů $CD14^+CD16^+$ a $CD14^+CD163^+$ v periferní krvi. Počet $CD14^+CD16^+$ monocytů před transplantací bývá obvykle vyšší ve srovnání se zdravými jedinci. Během prvního týdne po transplantaci pak klesá počet $CD14^+CD16^+$ monocytů, které migrují do štěpu nebo jsou selektivně odstraněny (data z biopsie štěpu z etických důvodů neznámá). Efekt poklesu populace těchto zánětlivých monocytů je také ovlivněn typem imunosupresivní léčby. K úpravě na základní hodnoty dochází po dvou měsících. V případě akutní rejekce jejich zvýšená hladina koreluje s klinickým stavem pacienta.

Periferní monocyty, exprimující znak $CD163$, mají imunosupresivní vlastnosti především díky zvýšené produkci IL-10. Procentuální množství těchto buněk před transplantací ledviny je srovnatelné se zdravými dárci. Bezprostředně po transplantaci se však množství $CD163^+$ monocytů zvyšuje a dle typu imunosuprese zůstává jejich počet zvýšený více než 6 měsíců (*Sekerková et al., článek v připomínkovém řízení*).

Dále bylo prokázáno, že v časně fázi po alogenní transplantaci kostní dřeně či alogenní transplantaci periferních kmenových buněk si monocyty ponechávají svoji fagocytární funkci. Dochází však ke snížení schopnosti oxidativního vzplanutí, které je závislé na typu stimulu (*Miyagawa et Klingemann, 1997; Rommeley et al., 2011*).

2.7.2 Ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění

Časně stádium onemocnění je spojeno s výskytem zánětlivého infiltrátu monocytů a makrofágů. Při aterogenezi dochází ke zvýšené expresi selektivních a integrinových ligandů na povrchu endotelu, což umožňuje přísun cirkulujících monocytů. Po adhezi monocyty procházejí do tunici intimi cévy. V subendoteliálním prostoru se dále diferencují na makrofágy a dochází ke zvýšení zánětlivého procesu proliferace a další produkci prozánětlivých cytokinů. Makrofágy díky široké škále PRRs pohlcují oxLDL a další lipidy, což má za následek vznik pěnových buněk (*Zawada et al., 2012*).

Při kardiovaskulárním onemocnění je zvýšeno procento $CD14^+CD16^+$ monocytů v periferní krvi ve srovnání se zdravými jedinci. Celkové množství všech monocytů však zůstává konstantní. Tyto monocyty zde hrají proaterosklerotickou roli především díky vysoké endoteliální aktivitě (\uparrow exprese chemokinových receptorů) a zánětlivé kapacitě. Vysoký počet $CD14^+CD16^+$ monocytů koreluje také s přežitím pacienta při

kardiovaskulárním onemocnění a může být užitečným potenciálním diagnostickým markerem. (Rogacev et al., 2011).

2.7.3 Subpopulace monocytů a chronické renální onemocnění (CKD)

CKD (chronic kidney disease) je závažné zánětlivé onemocnění, při kterém dochází k poškození endotelu. Vyznačuje se progresivní ztrátou renální funkce. Velmi často bývá choroba diagnostikována spolu s vysokým krevním tlakem, cukrovkou a kardiovaskulárním onemocněním. U pacientů s CKD dochází k nárůstu absolutního počtu CD16⁺ monocytů. Toto množství koreluje s plazmatickou koncentrací M-CSF (Saionji et Ohsaka, 2001). V začátcích onemocnění hodnota glomerulární filtrace, proteinurie a koncentrace sérové fosfatázy není asociována s celkovým počtem monocytů ani s celkovým množstvím zánětlivých CD16⁺ monocytů. Nejvyšší absolutní počet CD16⁺ monocytů mají pacienti na hemodialýze (Rogacev et al., 2011).

2.7.4 HIV

Potenciálním cílem pro virus HIV jsou také monocyty a makrofágy, které jsou důležitým rezervoárem pro replikaci viru. Replikace viru je v monocytech omezena a vyžaduje diferenciaci monocytu na makrofág (Triques et Stevenson, 2004). V periferní krvi pacientů dochází ke zvýšení počtu CD16⁺ monocytů, které dále stoupá s progresí onemocnění. CD16⁺ monocyty podporují vysokou úroveň replikace viru HIV při diferenciaci monocytu na makrofág a interakci s T buňkami. Zvýšené množství monocytů během HIV infekce a následný nábor monocytů převážně do lymfatických uzlin a mozku přispívá k šíření HIV a vývoji produktivní infekce v T buňkách (Ancuta et al., 2006).

2.7.5 Revmatická artritida

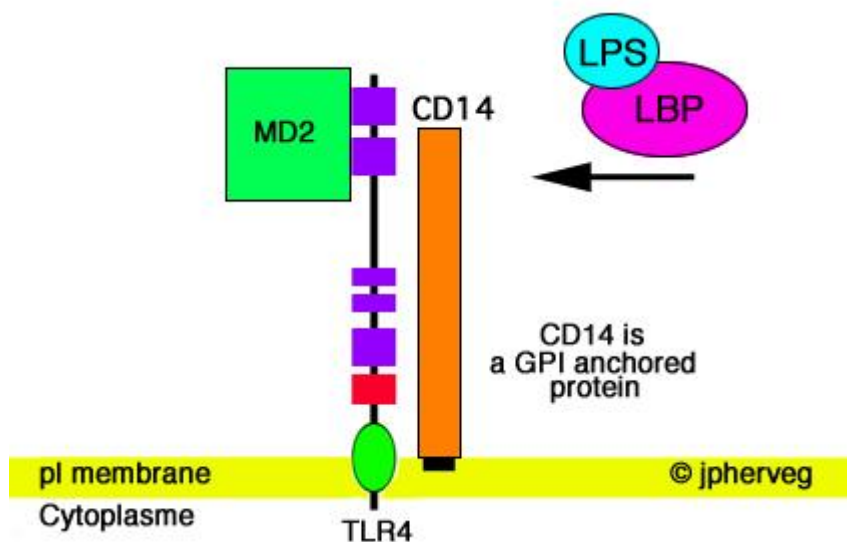
RA je chronické zánětlivé onemocnění, které postihuje zejména klouby. Hlavní roli v destrukci kloubů mají synoviální tkáňové makrofágy, především díky své vysoké produkci prozánětlivých cytokinů. Onemocnění doprovází také zvýšené množství CD16⁺ monocytů v periferní krvi, jejichž počet koreluje s hladinou C-reaktivního proteinu a sedimentací erytrocytů. Při léčbě glukokortikoidy pak procento CD16⁺ monocytů klesá. Exprese CD16 hraje u onemocnění dominantní roli, neboť ligací s IgG a následným vznikem imunokomplexu dochází k produkci TNF α a IL-1 makrofágem. Samotná exprese molekuly CD16 se zvyšuje v prostředí TGF- β , M-CSF a IL-10. Navíc bylo zjištěno, že

CD16⁺ monocyty a makrofágy exprimují vyšší míru TLR-2, která je opět spojena s vyšší produkcí prozánětlivých cytokinů. Tato exprese může být opět indukována M-CSF a IL-10. Na druhou stranu TGF- β redukuje tuto expresi (*Iwahashi et al., 2004*). Zůstává však stále nejasné, zda synoviální makrofágy v kloubu postiženého zánětem mají původ pouze v populaci CD16⁺ monocytů nebo zda se mohou diferencovat i z klasických CD16⁻ monocytů pod vlivem cytokinů jako je například TGF- β (*Ziegler-Heitbrock, 2007*).

2.8 Sledované povrchové znaky

2.8.1 CD14

Molekula CD14 je hlavním identifikačním znakem pro monocyty a makrofágy. Můžeme ji nalézt i na dendritických buňkách, v omezené míří na granulocytech, B lymfocytech a buňkách prsní žlázy. CD14 se vyskytuje ve dvou formách. První forma je vázaná glykosylfosfatidylinositolovou kotvou do membrány buněk. Druhá forma je solubilní. Tato solubilní forma se uvolňuje z membrány nebo je přímo syntetizována monocyty, jaterními buňkami či buňkami prsní žlázy. CD14 protein je koreceptorem pro rozpoznávání bakteriálního lipopolysacharidu. V přítomnosti LBP (lipopolysacharide-binding protein), který opsonizuje LPS, se tento komplex váže na CD14 a následně aktivuje TLR-4 (*Ziegler-Heitbrock et Ulevitch, 1993*).



Obrázek 6: Rozpoznávání lipopolysacharidu (*Herveg, 2013*)

2.8.2 CD16 (FcγRIII)

Jedná se o glykoprotein sloužící jako nízkofinitní receptor pro Fc část IgG protilátky. Vyskytuje se ve dvou izoformách. Obě izoformy mají téměř identické extracelulární domény. Liší se však způsobem ukotvení v membráně. FcγRIIIA je ukotvený pomocí transmembránového peptidu. Nachází se především na NK buňkách a dále na makrofázích a monocyttech. FcγRIIIB je vázaný přes GPI (glykosylfosfatidylinositol) a přítomný u neutrofilů. Hlavní role receptoru je zapojení v signální transdukci, aktivaci NK buněk a v protilátkami zprostředkované buněčné cytotoxicitě. Mutace genu je spojena s citlivostí k opakovaným virovým infekcím a k systémovému lupus erythematosus (*Withmueller et al., 1992*).

2.8.3 HLA-DR

HLA-DR je izotopová forma molekuly MHC II. třídy. Skládá se ze dvou nekovalentně spojených transmembránových podjednotek α a β . Hlavním úkolem tohoto povrchového receptoru je prezentace antigenních peptidů T lymfocytům, které rozpoznávají cizí fragment pomocí svého TCR receptoru. HLA-DR je konstitutivně exprimován monocyty, makrofágy, dendritickými buňkami a B lymfocyty. Vlivem IFN γ mohou být HLA-DR molekuly exprimovány i dalšími buňkami (epiteliální či endoteliální buňky).

2.8.4 CD36

CD36 je multifunkční membránový receptor, který můžeme najít na krevních destičkách, mononukleárních fagocytech, adipocytech, hepatocytech, myocytech, buňkách mikrovaskulárního endotelu či na některých buňkách epitelu. Jako jedna z jeho prvních vlastností byla objevena schopnost sloužit jako receptor pro thrombospondin-1 a další proteiny s doménou známou jako TSRs (trombospondin type I repeat) (*Asch et al., 1987*). Na mikrovaskulárních endoteliálních buňkách díky tomu slouží jako negativní regulátor angiogeneze. Inhibuje růstové faktory (VEGF, FGF2) a namísto toho generuje anti-angiogenetické signály, které vedou k apoptóze (*Dawson, 1997*). Na membránách makrofágů a monocytů slouží jako B scavenger receptor. Rozpoznává specifické lipidy a lipidové komponenty bakteriální stěny, endogenně odvozené ligandy (apoptické buňky), oxidačně modifikované lipoproteiny a glykované proteiny. K indukci exprese molekuly CD36 dochází díky oxLDL a IL-4 běžnou signální cestou závislou na protein kináze C a PPAR γ (*Feng et al., 2000*). Podporuje zánětlivou odpověď a fagocytózu. Může

interagovat s dalšími receptory (TLRs, integriny). Molekula CD36 také váže dlouhý řetězec mastné kyseliny a podílí se na jeho transportu do buňky. V destičkách podporuje aktivaci, agregaci a sekreci (*Silverstein et Febbraio, 2009*).

Expozice fosfatidylserinu na povrchu jednoho makrofágu a lipidové rozpoznávání receptorem CD36 na druhém makrofágu je nezbytné pro cytokiny indukovanou (IL-4, GM-CSF) fúzi makrofágů, která vede ke vzniku mnohojaderné obrovské buňky (*Helming et al., 2009*).

Molekula CD36 svými vlastnostmi přispívá k mnohým patologiím. Díky rozpoznávání a internalizace oxLDL receptorem CD36 na povrchu makrofágů podporuje tvorbu pěnových buněk, aterosklerotických plaků a spouštění zánětlivých reakcí (aktivace NF- κ B) (*Martín-Fuentes et al., 2007*). Podobně přispívá k patogenezi Alzheimerovi choroby díky vazbě CD36 na mirkogliích a β -amyloid peptidu (*Coraci et al., 2002*).

2.8.5 CD54 (ICAM-1)

CD54 je intercelulární adhezivní molekula patřící do imunoglobulinové super-rodiny. Nachází se především na buňkách endotelu a antigen prezentujících buňkách (APC). Exprese CD54 může být indukována působením prozánětlivých cytokinů (TNF α , IL-1, IFN γ). Naopak inhibice je indukována glukokortikoidy. Molekula je zahrnuta jak ve vrozené tak v adaptivní imunitě. Hlavní funkcí CD54 je adheze aktivovaných leukocytů k buňkám endotelu a jejich následná migrace do místa zánětu. Adheze je umožněná díky vazbě s β 2 integriny LFA-1 (CD11a/CD18) a Mac-1 (CD11b/CD18) na leukocytech. Mezi další ligandy CD54 patří fibrinogen a rinoviry. Molekula CD54 se na APC uplatňuje i jako kostimulační molekula. Vznik vazby ICAM-1 s LFA-1 usnadňuje úzký kontakt APC s T buňkou a umožňuje tím interakci TCR (T buněčný receptor) s MHC komplexem. CD54 může také sloužit jako marker aktivace antigen prezentujících buněk. Zvýšená hladina solubilní CD54 byla pozorována u pacientů s aterosklerózou, srdečním selháním či transplantační vaskulopatií a může být příčinou dalších prozánětlivých odpovědí (*Lawson et Wolf, 2009*).

2.8.6 CD163

CD163 je transmembránový protein patřící do rodiny SRCR (scavenger receptor cystein-rich superfamily). Jedná se o specifický marker monocyto-makrofágové populace buněk vykazující silné protizánětlivé vlastnosti. Jeho hlavní funkcí je vazba komplexu hemoglobin-haptoglobin. Hemoglobin, který se z erytrocytů uvolňuje, je vázán haptoglobinem. Formace toho komplexu exponuje nový epitop, který se váže na CD163. Hb-hp-CD163 je internalizován do časného endozomu. CD163 se recykluje a vrací se zpátky na membránu. Hb-Hp komplex dále metabolizuje v lysozomu. Vazbou komplexu na CD163 dochází k aktivaci intercelulární signalizace, jejímž výsledkem je uvolnění IL-10 a CO, které vykonávají silný protizánětlivý efekt (*Madsen et al., 2004*). Dále molekula CD163 může vázat TWEAK (TNF příbuzný slabý induktor apoptózy). TWEAK je členem TNF rodiny a hraje důležitou roli v procesech spojených se zánětem, proliferací a apoptózou. CD163 pak inhibuje apoptickou aktivitu TWEAK (*Bover et al., 2007*). CD163 je také ligandem pro některé bakterie a viry.

Exprese CD163 je silně indukována protizánětlivými mediátory, především glukokortikoidy, IL-10 a IL-6. Exprese je naopak snižována prozánětlivými mediátory a dalšími faktory (IFN γ , TNF α , IL-4, hypoxie, oxidativní stres atd.). Čerstvě izolované monocyty z periferní krve exprimují relativně nízkou hladinu CD163. Exprese se však zvyšuje s diferenciací na makrofágy. Vysoká exprese je charakteristická pro CD14⁺⁺ CD16⁺ populaci monocytů. Molekula CD163 je také detekovatelná jako solubilní protein v plazmě. Koncentrace solubilního proteinu (sCD163) se zvyšuje zejména u pacientů se zánětlivým onemocněním (RA, astma) a doprovází také infekční onemocnění (pneumonie, sepse) (*Kowal et al., 2011*).

2.8.7 Kalprotektin

(L1 antigen, calgranulin A a B, MRP14/MRP8, S100A8/S100A9)

Kalprotektin je stále významnějším senzitivním nespecifickým diagnostickým markerem zánětlivých onemocnění vyznačující se antibakteriálními, antiproliferačními a regulačními vlastnostmi. Tento protein byl poprvé izolován z granulocytů a označen jako L1 protein. Představuje okolo 60 % všech bílkovin obsažených v cytosolu neutrofilů. Kalprotektin se objevuje i na membránách monocytů (*Fagerhol et al., 1980*). Jeho přítomnost byla také zjištěna na endoteliálních a epiteliálních buňkách (*Zwaldo et al.,*

1986). Díky schopnosti proteinu vázat Ca^{2+} byla molekula přejmenována na kalprotektin (Steinbakk et al., 1990).

Struktura

Protein tvoří heterokomplex skládající se ze dvou těžkých řetězců (MRP-8) a jednoho lehkého řetězce (MRP-14), které jsou nekovalentně spojeny (Naess-Andresen et al., 1995). Komplex patří do rodiny S-100 proteinů, která obecně modulují progresi buněčného cyklu, diferenciaci buněk a cytoskeletální membránové interakce (Kligman et Hilt, 1988). Kalprotektin také obsahuje zinek vázající doménu, která není ovlivněná vazbou vápníku. Sekvence vázající zinek je zahrnuta v antibakteriální aktivitě kalprotektinu (Loomans et al., 1998).

Extracelulární kalprotektin

Kalprotektin bývá z buněk uvolňován během buněčné aktivace neutrofilů a monocytů a dále v důsledku apoptózy či nekrózy z porušené buňky (Naess-Andresen et al., 1995). Hladina extracelulárního kalprotektinu přímo koreluje se sníženou viabilitou polymorfonukleárů. Experimentálně byla zjištěna zvýšená koncentrace extracelulárního kalprotektinu po inkubaci s *Candida albicans* (Voganatsi et al., 2001). Extracelulární kalprotektin má významné mikrobicidní a fungicidní vlastnosti. Jeho minimální inhibiční koncentrace je srovnatelná s mnohými antibiotiky (Steinbakk et al., 1990). Kompeticí o zinek potlačuje růst bakterií (Santhanagopalan et al., 1995). Kalprotektin může také inhibovat metaloproteinázy, s nimiž opět soutěží o zinek, a tím omezuje jejich účast jako enzymatických kofaktorů pro invazivní organismy (Muraio et al., 1989).

Membránový kalprotektin

Membránový kalprotektin se připojuje na heparin a heparan sulfát proteoglykanu na endoteliálních buňkách přes podjednotku MRP-14 (Robinson et al., 2002). Tato interakce s aktivovaným endotelem vede k uvolnění kalprotektinu do tělních tekutin. Uvolněný kalprotektin během zánětu zvyšuje expresi CD11b na monocytech a podílí se na následném transendoteliálním migračním mechanismu (Newton et al., 1997). Membránový kalprotektin dále inhibuje vazbu monocytů ke kolagenu a fibronektinu. Na druhou stranu v zánětlivých podmínkách (uvolnění $\text{TNF}\alpha$, IL-6, produkce

superoxidového aniontu) tyto extracelulární matrix proteiny indukují samotnou expresi kalprotektinu (*Mahnke et al., 1995*).

Kalprotektin jako diagnostický marker

Zvýšené množství je spojené se střevními záněty, kde se screeningově stanovuje hladina kalprotektinu ve stolici. Koncentrace kalprotektinu koreluje s výskytem zánětlivého onemocnění střev, kolorektálním karcinomem, ulcerózní kolitidou či s Crohnovým onemocněním (*Tibble et Bjarnason, 2001*). Rostoucí koncentrace plazmatického kalprotektinu doprovází také cystickou fibrózu, bakteriální infekce v ledvinách, akutní rejekce při transplantaci, meningitidy, pneumonie, tuberkulózu, revmatickou artritidu, parodontitidy atd. Referenční hodnoty pro stanovení kalprotektinu v plazmě jsou pro muže: 50–910 µg/l a u žen 80–880 µg/l.

2.9 THP-1 buněčná linie

Jedná se o linii lidských monocytárních buněk, která byla izolována z ročního chlapce trpícího monocystickou leukémií. Tyto monocyty mají Fc a C3b receptory. Chybí jim povrchové a cytoplazmatické imunoglobuliny (*Tsuchiva et al., 1980*). Pro naše experimenty je výhodou, že buňky rostou v suspenzi a neadherují k povrchu kultivační nádoby. Po stimulaci LPS produkují zvýšené množství IL-1 (*Krakauer et Oppenheim, 1983*). Díky působení kyseliny retinové či 12-O-tetradekanyl-forbol-13-acetátu buňky diferencují, adherují k povrchu umělohmotné nádoby, dochází k indukci fagocytózy a inhibici růstu buněk. Změna morfologie buněk je poté doprovázená zvýšenou aktivitou tkáňové trasglutaminázy (*Mehta et Lopez-Berestein, 1986*).

3 Cíle práce

1. Modulace fenotypu mononukleárních fagocytů v čase po stimulaci širokým spektrem cytokinů. Modelem pro sledování této změny byly THP-1 buňky a monocyty izolované z lidské krve.
2. Monitorování produkce solubilního kalprotektinu a IL-8 po stimulaci THP-1 buněk.

4 Materiál a metody

V diplomové práci nám jako model sloužily izolované lidské krevní monocyty a THP-1 buňky. Tyto buňky jsme stimulovali spektrem stimulans (TNF α , IFN γ , LPS, IL-17, IL-25, IL-10, IL-4, IL-1 β) a pomocí průtokové cytometrie v čase sledovali změnu povrchové exprese jednotlivých molekul. Supernatant stimulovaných THP-1 buněk dále sloužil pro detekci solubilního kalprotektinu (ELISA) a chemokin IL-8 (technologie Luminex).

4.1 Kultivační podmínky buněčné linie THP-1

4.1.1 Rozmrazování buněk

THP-1 buňky (American Tissue Culture Collection) jsou uchovávány v tekutém dusíku při teplotě -180 °C. Ampule byly po přenesení z dusíku ponořeny do vodní lázně a po kapkách přidáván roztok 20% fetálního bovinního séra (FBS; PAA Laboratories GmbH) a média RPMI s 2 mM L-glutaminem (PAA Laboratories GmbH) do celkového objemu 20 ml. Buňky byly následně centrifugovány 5 minut při 1300 otáčkách za minutu. Po odsátí supernatantu byla peleta buněk roztřepána a přidáno 20 ml roztoku obsahujícího 10% FBS a médium RPMI s glutaminem obohaceného o antibiotika (kultivační médium). Buňky byly opět centrifugovány, resuspendovány v médiu a přeneseny do kultivační lahve.

4.1.2 Pasážování buněk

Buňky byly přeneseny do centrifugační zkumavky a stočeny (5 minut, 1300 otáček/min). Po stočení a slití supernatantu bylo k roztřepené peletce buněk přidáno čerstvé kultivační médium. Kultura buněk byla udržována v kultivačních lahvích o koncentraci přibližně $2-9 \times 10^5$ buněk/ml v termostatu při teplotě 37 °C v 5% CO₂.

pozn. K prevenci bakteriální kontaminace THP-1 buněk byl do RPMI média přidán streptomycin a penicilin (Pen Strep, GIBCO).

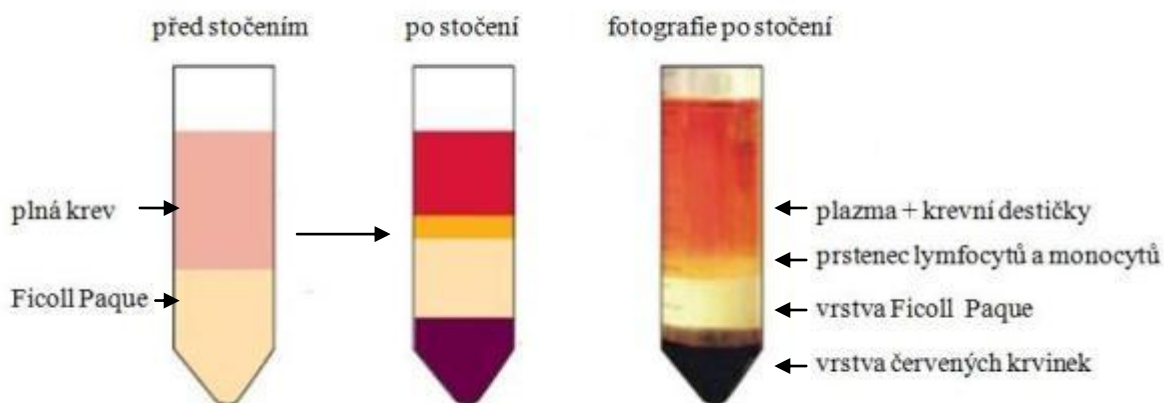
4.1.3 Příprava THP-1 buněk k pokusu

Buňky byly centrifugovány a resuspendovány v čerstvě připraveném kultivačním médiu. Pro pokus byla připravena suspenze buněk o přibližné koncentraci 1×10^6 buněk/ml (buňky spočítány pomocí buněčného analyzátoru vi-CELL XR, Beckman Coulter). Následně bylo pipetováno po 500 µl připravené suspenze buněk do 30 jamkové destičky určené pro tkáňové kultury a přidány stimulans o různých koncentracích (IL-1β, IL-4, IL-10, IL-17, IL-25, LPS, TNFα, IFNγ). Po 24, 48 a 72 hodinách byly buňky odebírány do mikrozkušavky a stočeny (5 minut, 1300 otáček/min). Supernatant dále sloužil pro stanovení produkce solubilního kalprotektinu (ELISA) a chemokinu IL-8 (Luminex). Zbylá peleta buněk byla resuspendována v 500 µl kultivačního média a buňky byly dále značeny protilátkami proti jednotlivým povrchovým znakům a analyzovány pomocí průtokové cytometrie.

4.2 Izolace a příprava lidských periferních monocytů

Periferní krev odebírána do zkumavky s K₂EDTA byla opatrně promíchána a naředěna v PBS (*Phosphate Buffered Saline*) v poměru 1:1. Vrstvu Ficoll Paque ve Falconn zkumavce jsme převrstvili v poměru 1:2 naředěnou krví. Krev byla kapána opatrně po stěnách zkumavky, abychom zamezili promíchání vrstev. Po centrifugaci (30 minut, 1800 otáček/min, nejnižší stupeň zrychlení a brzdění) se díky hustotnímu gradientu rozdělily jednotlivé složky krve (obrázek 7). Pomocí Pasteurovy pipety jsme pak odebrali prstenec mononukleárních buněk, který je viditelný na rozhraní Ficollové vrstvy a plazmy a suspenzi přenesli do čisté zkumavky. Buňky jsme následně dvakrát promyli v PBS (1. centrifugace: 10 minut při 1200 otáčkách, nejnižší stupeň zrychlení, nejvyšší stupeň brzdění; 2. centrifugace: 5 minut při 1200 otáčkách). Po odstranění supernatantu jsme

suspenzi buněk naředili pomocí kultivačního média na koncentraci 1×10^6 buněk/ml a po 500 μ l (obdobně jako u THP-1 buněk) pipetovali do 30jamkové kultivační destičky s příslušnými stimulans. Odběr vzorků pro analýzu se prováděl po 24 a 48 hodinách.



Obrázek 7: Izolace buněk pomocí hustotního gradientu (upraveno dle Anonym, 2013b)

Monocyty mají tendenci již během první hodiny po izolaci adherovat k plastikovému povrchu kultivační jamky. Po 2 hodinách je již většina z nich přisedlá. V delším časovém horizontu však mohou opět zpětně přecházet do média. Tato jejich vlastnost nám komplikuje další postup práce. Monocyty jsme zkusili „odlepovat“ chladem a pomocí Trypsin EDTA solution (Sigma). Nejlepších výsledků jsme dosáhli působením tohoto roztoku, a proto byl použit pro postup naší další práce. Po uplynutí inkubační doby jsme tedy z jamky odstranili nepřisednuté buňky. Tato neadherující populace zahrnuje převážně lymfocyty. Do jamky bylo následně přidáno 300 μ l Trypsin EDTA solution, kterou jsme nechali 7 - 10 minut působit. Po tomto časovém intervalu došlo k odlepení přisedlých monocytů. Suspenze byla odebrána do mikrozkušavky a centrifugována (5 minut, 1300 otáček). Po odstranění supernatantu bylo k peletě buněk přidáno 500 μ l čerstvého kultivačního média. Takto připravené buňky jsme dále značili protilátkami proti jednotlivým povrchovým znakům a analyzovali na průtokovém cytometru.

4.3 Sledování změny exprese povrchových znaků monocytů a THP-1 buněk

Použitá stimulans: TNF α [0,1–100 ng/ml], LPS, IL-17, IL-25 [100 ng/ml], IL-10, IL1 β , IL-4 [10 ng/ml], IFN γ [0,1–2000 ng/ml] (R&D systems).

Použité monoklonální protilátky proti povrchovým molekulám: CD54 - PE (BD Bioscience), CD14 - FITC, CD14 - PC7, CD16 - ECD, CD36 - FITC (Beckman Coulter), kalprotektin - FITC (Acris antibodies); CD163RM3/1 - FITC, CD163GHI - PE (BioLegend). V experimentech byly jednotlivé protilátky použité v koncentraci doporučené výrobcem.

Monocyty a THP-1 buňky byly inkubovány v kultivačních jamkách s danými stimulans. V časových intervalech 24, 48 a 72 hodin byly buňky odebírány pro analýzu. Do zkušavky byly pipetovány monoklonální protilátky proti povrchovým znakům spolu se 100 μ l suspenze buněk nesuspendovaných v kultivačním médiu (postup viz příprava THP-1 buněk a monocytů pro experiment). Směs se důkladně zvortexovala a inkubovala 20 minut ve tmě. Následně byl přidán 1 ml promývacího roztoku a poté provedena analýza na průtokovém cytometru.

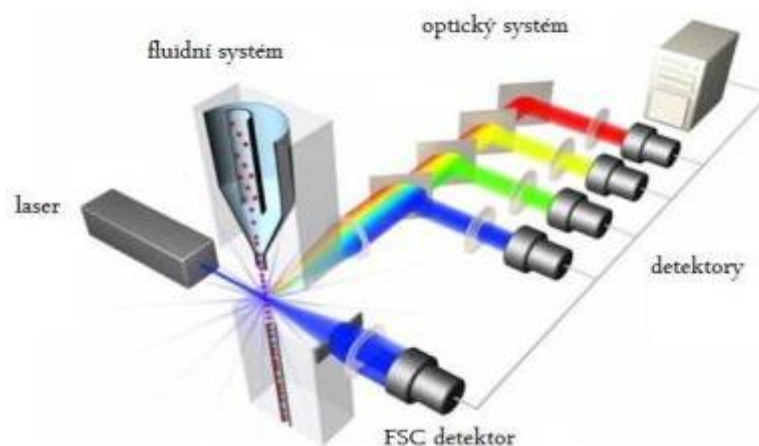
4.4 Průtoková cytometrie

Pro analýzy povrchové exprese znaků byl použit průtokový cytometr Cyan ADP 9C, Dako (3 lasery, 9 barev). Pro vyhodnocení životnosti buněk (vitální barvení propidium jodidem) a apoptózy Cytomics FC 500, Beckman Coulter (2 lasery, 5 barev). Data byla vyhodnocena pomocí Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter).

Princip průtokové cytometrie

Jedná se o standardní metodu, která slouží k analýze buněk v buněčné suspenzi. Monoklonální protilátky s navázanou fluorescenční značkou (fluorochromem) se specificky vážou na povrchové či intracelulární znaky buněk. Suspenze značených buněk je přetlakem stříkána skrz trysku. Díky tomu se vytvoří tenký proud suspenze, v němž jsou buňky řazeny za sebou (fluidní systém). Tento proud buněk následně prochází optickým systémem, kde je protínán laserovým paprskem. Z bočního odrazu světla posuzujeme

granularitu buněk (SS, side scatter). Čím více se světlo od buňky odrazí, tím je částice více granulovaná. Z přímého rozptylu (lomu) světla (detektor ve vodorovné ose s procházejícím paprskem) usuzujeme velikost buňky (FS, forward scatter). Buňky s větší velikostí rozptylují světlo více. Pokud je dále navázaná fluorescenční značka, dojde díky použitému laseru k excitaci světla. Paprsky excitovaného světla jsou vedeny na detektory. Elektronický systém pak převádí optický signál z detektorů na elektrický a zároveň ho digitalizuje pro počítačovou analýzu (Bartůňková, 2011).



Obrázek 8: Základní komponenty průtokového cytometru (upraveno dle Rowley, 2013)

4.5 Stanovení produkce solubilního kalprotektinu buňkami THP-1 metodou ELISA

THP-1 buňky byly opět stimulovány danými látkami (TNF α , IL-10, IL-1 β , IL-4 o koncentraci 10 ng/ml; IFN γ o koncentraci 2 μ g/ml a LPS, IL-17, IL-25 o koncentraci 100 ng/ml). V inkubačních časech 24, 48 a 72 hodin jsme vzorky odebrali, stočili a supernatant použili pro stanovení produkce solubilního kalprotektinu. Pro analýzu byl použit *Phical* Calprotectin ELISA Kit, Immun Diagnostik. Příprava vzorku byla provedena dle návodu výrobce. Absorbance připraveného vzorku se měřila pomocí ELISA readeru.

Postup testu

Jedná se o sandwich formát, kdy je na destičce navázaná vysokoafinitní monoklonální protilátka proti lidskému kalprotektinu. Do jamky destičky se pipetuje 100 µl vzorku a v případě, že vzorek obsahuje stanovovaný analyt, váže se kalprotektin na protilátku přichycenou ke stěně destičky. Po hodinové inkubaci a promytí přidáváme další protilátku proti stanovovanému kalprotektinu, která je vázaná s biotinem. Opět následuje hodinová inkubace a promytí. V dalším kroku přidáváme konjugát, který se váže na biotin (extravidin peroxidáza). Po inkubaci a promytí přidáváme substrát pro peroxidázu (tetramethylbenzidin). V posledním kroku pipetujeme stop soluci (kyselina sírová), která zastaví reakci a způsobí změnu barvy roztoku v destičce z modré na žlutou. Intenzita zbarvení (absorbance) je přímo úměrná koncentraci kalprotektinu ve vzorku.

4.6 Stanovení produkce IL-8 stimulovanými THP-1 buňkami metodou Luminex

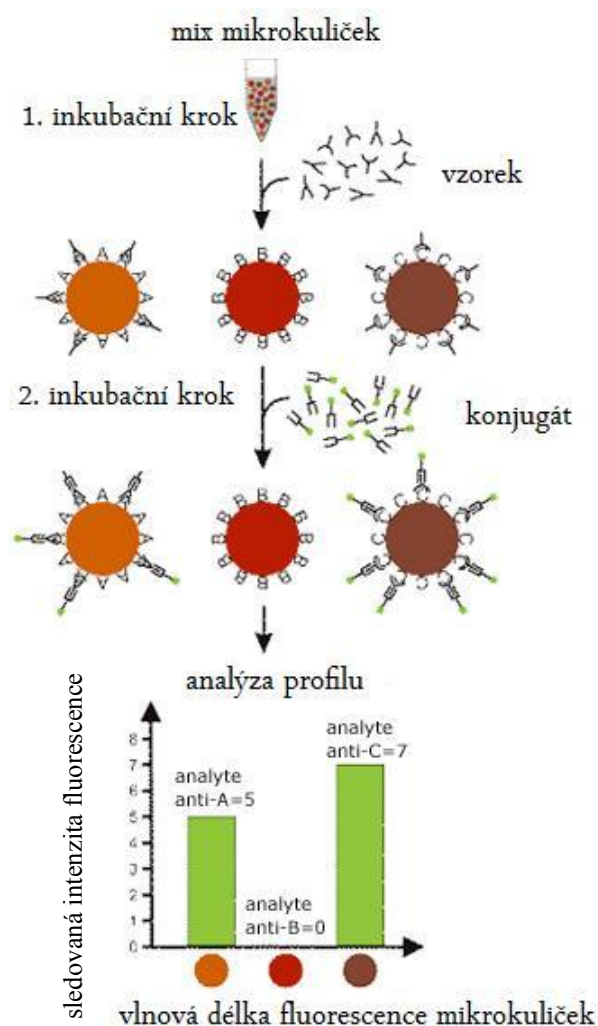
Po odběru stimulovaných vzorků v jednotlivých inkubačních časech jsme THP-1 buňky stočili a supernatant použili pro experiment. Jako stimulans nám posloužili následující látky: TNF α , IL-1 β , IL-4, IFN γ o koncentraci 10 ng/ml a LPS, IL-17 o koncentraci 100 ng/ml. Pro analýzu byl použit přístroj Luminex¹⁰⁰ System (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA). Příprava vzorků pro pokus byla provedena dle návodu výrobce kitu (Fluorokine MAP, Human MultiAnalyte Profiling Base Kit A, R&D Systems).

Princip metody luminex

Luminex kombinuje metodu průtokové cytometrie a imunoanalytického stanovení. K měření slouží směs různých mikrokuliček (mikropartikulí). Každý druh mikropartikule je definován individuálním barevným tónem (fluorochromem) a má navázanou specifickou protilátku či antigen proti danému solubilnímu faktoru, který chceme měřit. Díky rozdílnosti v navázaných barvičkách poskytne kulička po excitaci laserem určitý fluorescenční signál a díky tomu analyzátor pozná konkrétní druh mikropartikule. Z jedné reakční zkumavky vzorku můžeme tedy stanovit více faktorů.

V prvním kroku přípravy vzorku pipetujeme do destičky 50 µl mikropartikulí s 50 µl vzorku a inkubujeme 3 hodiny v temnu na shakeru. V našem případě se stanovovaný IL-8 váže na povrch kuličky. Po následném promytí nenavázaného substrátu (3 x 100 µl

promývacího roztoku) se v druhém kroku přidává sekundární protilátka proti stanovovanému IL-8 (50 μ l), která je konjugovaná s biotinem. Opět necháme inkubovat 1 hodinu a poté promytím odstraníme zbytek nenavázané protilátky. Následně se přidá 50 μ l streptavidinu konjugovaného s fykoerytrinem a opět inkubujeme (30 minut). Streptavidin se váže na biotin. Destičku naposledy promyjeme a resuspendujeme mikropartikule v 100 μ l promývacího roztoku. Takto připravené vzorky analyzujeme. Luminex obsahuje dva lasery. První laser (523 nm neodým/ytrium-hlinito granátový) excituje fykoerytrin. Intenzita fluorescence je pak úměrná množství stanovovaného solubilního faktoru (IL-8). Druhý laser (635 nm diodový) excituje fluorochromy obsažené v mikrokuličkách.



Obrázek 9: Princip metody Luminex. Na obrázku chybí znázornění kroku, kdy se přidává streptavidin konjugovaný s fykoerytrinem (upraveno dle Anonym, 2013c).

4.7 Měření životnosti a počtu buněk po stimulaci

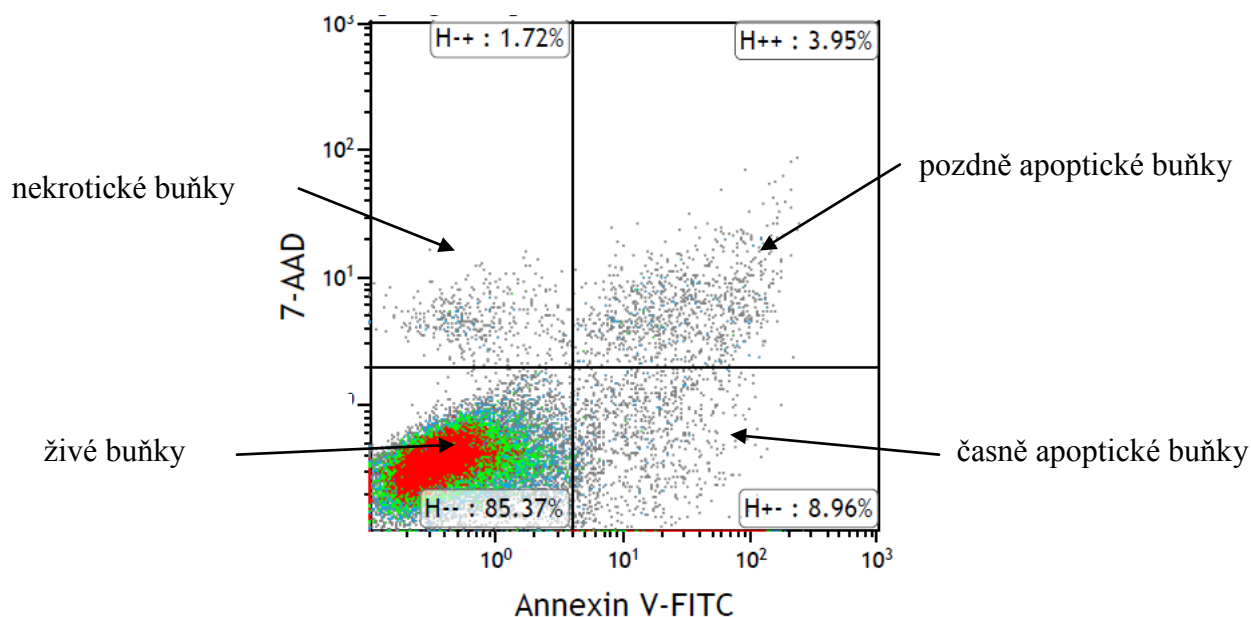
Životnost a počet buněk po stimulaci byl měřen v jednotlivých inkubačních časech pomocí analyzátoru Vi-Cell XR (Beckman Coulter). Přístroj stanovuje životnost pomocí vitálního barvení trypanovou modří. Trypanová modř obarvuje cytoplazmu buněk. Barvička však neprojde skrz neporušenou buněčnou membránu. V případě, že je buňka mrtvá, dochází k rozrušení buněčné membrány a trypanová modř se dostane dovnitř buňky. Populace buněk je pak snímána CCD kamerou a přístroj následně pomocí obrazové analýzy vyhodnocuje koncentraci buněk, procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk a velikost buněk.

Životnost byla také hodnocena pomocí barvení propidium jodidem na průtokovém cytometru. Tento indikátor rovněž neprochází neporušenou membránou. V případě poškození membrány projde propidium jodid dovnitř buňky a váže se k bázím nukleové kyseliny.

4.8 Stanovení apoptických THP-1 buněk

THP-1 buňky byly stimulovány IFN γ [2 μ g/ml]. Po 24, 48 a 72 hodinách byly buňky odebírány, centrifugovány a resuspendovány v čerstvém kultivačním médiu. Pro následnou analýzu byl použit ANNEXIN V-FITC/ 7-AAD Kit, Beckman Coulter. Postup práce se řídil návodem výrobce.

Principem detekce apoptických buněk je značení pomocí dvou vitálních barev (Annexin V a 7-AAD). Annexin V se váže na fosfatidyl serin (PS). V případě živé buňky je PS lokalizovaný na vnitřní straně plazmatické membrány. Pokud buňka vstupuje do časně fáze apoptózy, zůstává integrita buněčné membrány zachována, avšak dochází ke ztrátě asymetrie jejích membránových fosfolipidů. PS se translokuje na vnější stranu membrány (signál pro fagocyty) a váže se na něj Annexin V. Vazba k fosfatidyl serinu je závislá na vápenatých iontech. Vitální barvivo 7-AAD (7-aminoactinomycin D) se v případě poškození membrány váže na pár bází guanin-cytosin. Pokud 7-AAD prostoupí přes membránu a buňka není schopná ho aktivně pumpovat ven a zároveň je navázán Annexin V, nachází se buňka v pozdní apoptóze. V případě, že není navázán Annexin V, ale jenom 7-AAD soudíme, že je buňka nekrotická.



Obrázek 10: Detekce apoptických a nekrotických buněk pomocí vitálních barev Annexin V a 7-AAD.

4.9 Statistika

Pro statistické vyhodnocení byl použit t-test a Bonferroniho korekce hladin významnosti.

5 Výsledky

5.1 Životnost THP-1 buněk a krevních monocytů po stimulaci

Pomocí vitálního barvení (propidium jodid, trypanová modř) jsme zjišťovali vitalitu krevních monocytů a THP-1 buněk po stimulaci v čase 24, 48 a 72 hodin. Krevní monocyty si udržovaly životnost nad 90 % při použití všech typů stimulans. THP-1 buňky si po dobu stimulace zachovávaly taktéž vysoké procento životaschopnosti s výjimkou stimulace TNF α a IFN γ . V případě inkubace s TNF α docházelo po 48 hodinách k poklesu životnosti pod 90 %. Při působení IFN γ začaly THP-1 buňky po 48 hodinové inkubaci rychle umírat. V čase 72 hodin přežívalo již pouze přibližně 32 % buněk.

typ vzorku	stimulans	životnost (%) ± směrodatná odchylka	
		24 hod	48 hod
krevní monocyty	kontrola	95,6 ± 3,2	93,5 ± 3,1
	TNFα [10 ng/ml]	97,2 ± 1,2	92,8 ± 9,0
	LPS [100 ng/ml]	96,8 ± 0,8	95,5 ± 3,7
	IL-17 [100 ng/ml]	96,8 ± 1,4	97,7 ± 0,6
	IL-25 [100 ng/ml]	95,1 ± 2,3	98,9 ± 0,7
	IL-10 [10 ng/ml]	94,8 ± 3,0	96,7 ± 1,2
	IL-4 [10 ng/ml]	95,7 ± 1,2	96,6 ± 2,9
	IL-1β[10 ng/ml]	96,7 ± 0,9	97,0 ± 1,2
	IFNγ [2 μg/ml]	94,5 ± 2,6	91,0 ± 5,9

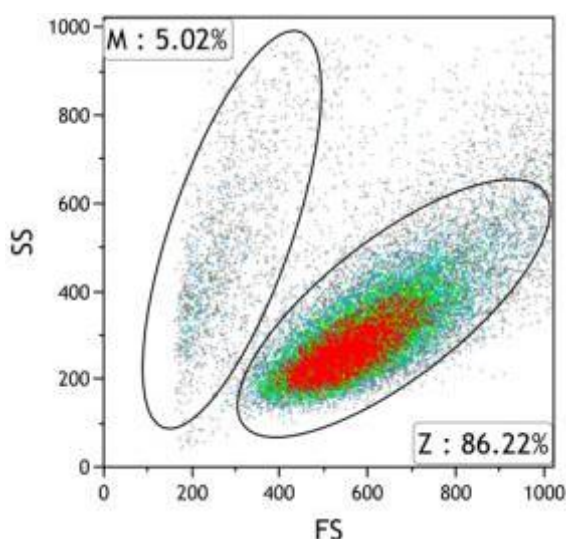
typ vzorku	stimulans	životnost (%) ± směrodatná odchylka		
		24 hod	48 hod	72 hod
THP-1	kontrola	90,7 ± 7,1	90,8 ± 6,0	90,8 ± 3,1
	TNFα [10 ng/ml]	91,1 ± 4,1	85,1 ± 9,6	85,4 ± 0,7
	LPS [100 ng/ml]	93,0 ± 2,9	91,5 ± 3,0	90,6 ± 0,2
	IL-17 [100 ng/ml]	94,0 ± 2,4	95,9 ± 0,8	91,9 ± 1,3
	IL-25 [100 ng/ml]	92,8 ± 0,8	93,1 ± 3,0	95,0 ± 1,9
	IL-10 [10 ng/ml]	91,7 ± 8,7	91,2 ± 6,6	92,3 ± 1,4
	IL-4 [10 ng/ml]	90,3 ± 8,2	92,6 ± 4,1	83,4 ± 8,5
	IL-1β[10 ng/ml]	90,1 ± 9,2	93,0 ± 5,2	93,0 ± 1,1
	IFNγ [2 μg/ml]	93,0 ± 2,7	73,0 ± 12,8	32,5 ± 0,1

Tabulka 2: Vitalita buněk po stimulaci v čase. Měřeno pomocí vitálního barvení (propidium jodid, analýza na průtokovém cytometru; trypanova modř, analýza na přístroji vi-CELL XR). Hodnoty v tabulce jsou průměrem 3–5 nezávislých měření.

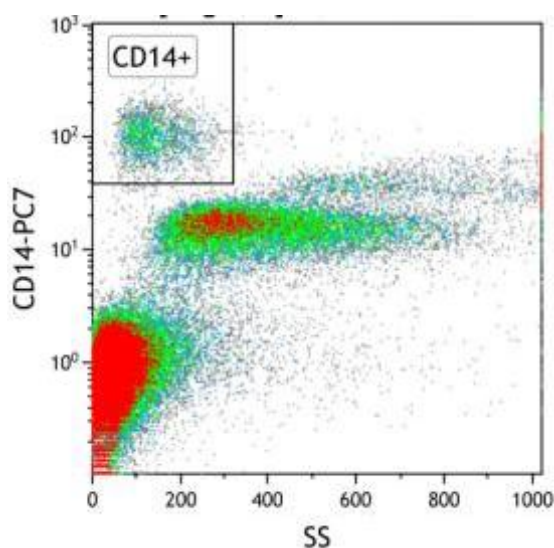
5.2 Vliv stimulans na povrchovou expresi jednotlivých CD znaků

Pokud není uvedeno jinak, byly v experimentech použity následující koncentrace stimulans: TNFα [10 ng/ml], LPS [100 ng/ml], IL-17 [100 ng/ml], IFNγ [2 μg/ml], IL-25 [100 ng/ml], IL-1β [10 ng/ml], IL-4 [10 ng/ml], IL-10 [10 ng/ml]. Stimulované vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru.

Na profilu SS/FS můžeme rozlišit dvě populace THP-1 buněk lišící se svou velikostí (obrázek 11). Pro analýzu těchto buněk bylo hodnoceno procento pozitivních buněk a průměrná hodnota intenzity fluorescence (MFI) sledovaného znaku pro majoritní (větší) populaci (zdůvodnění viz podkapitola 5.5). Procentuální zastoupení znaku a MFI bylo hodnoceno také pro krevní monocyty, kdy byla pro gateovací strategii využita protilátka proti CD14 (obrázek 12).



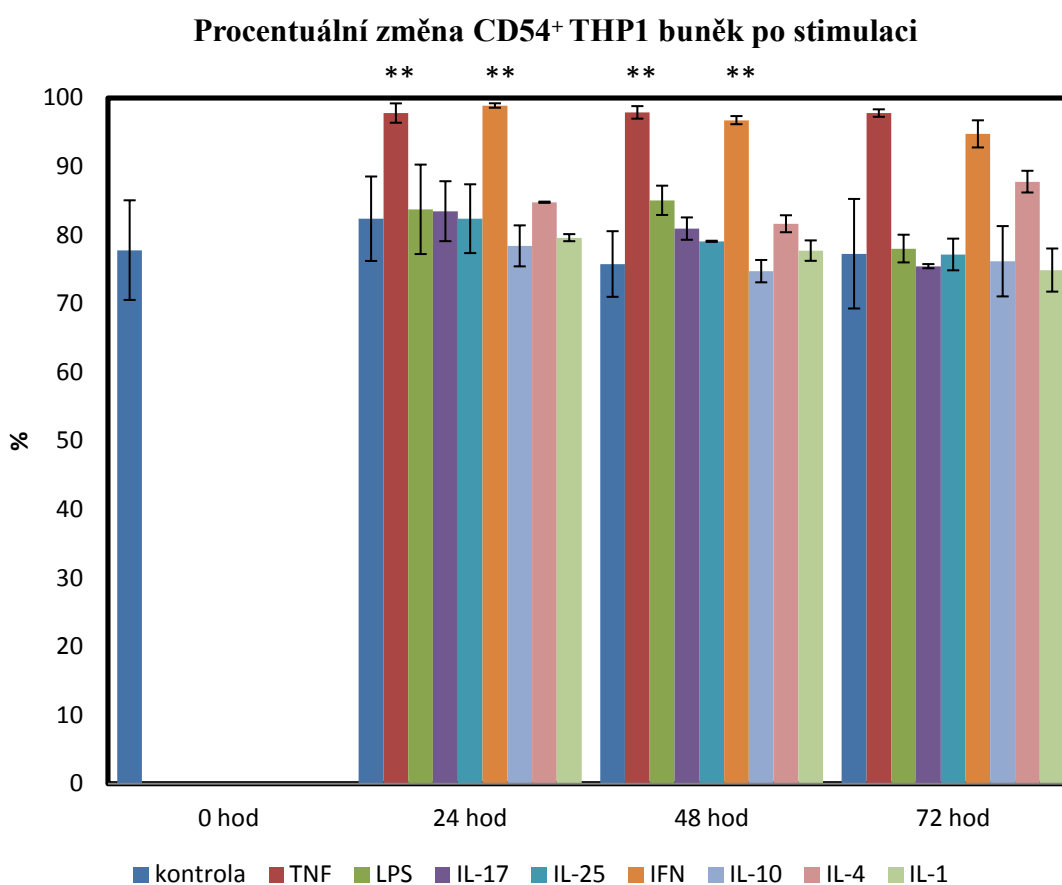
Obrázek 11: Gateovací strategie pro THP-1 buňky. Pro analýzu povrchové exprese jednotlivých znaků gateováno na populaci majoritních buněk.



Obrázek 12: Gateovací strategie pro monocyty. Gateováno přes znak CD14. Na ukázkovém obrázku je znázorněna plná neizolovaná periferní krev.

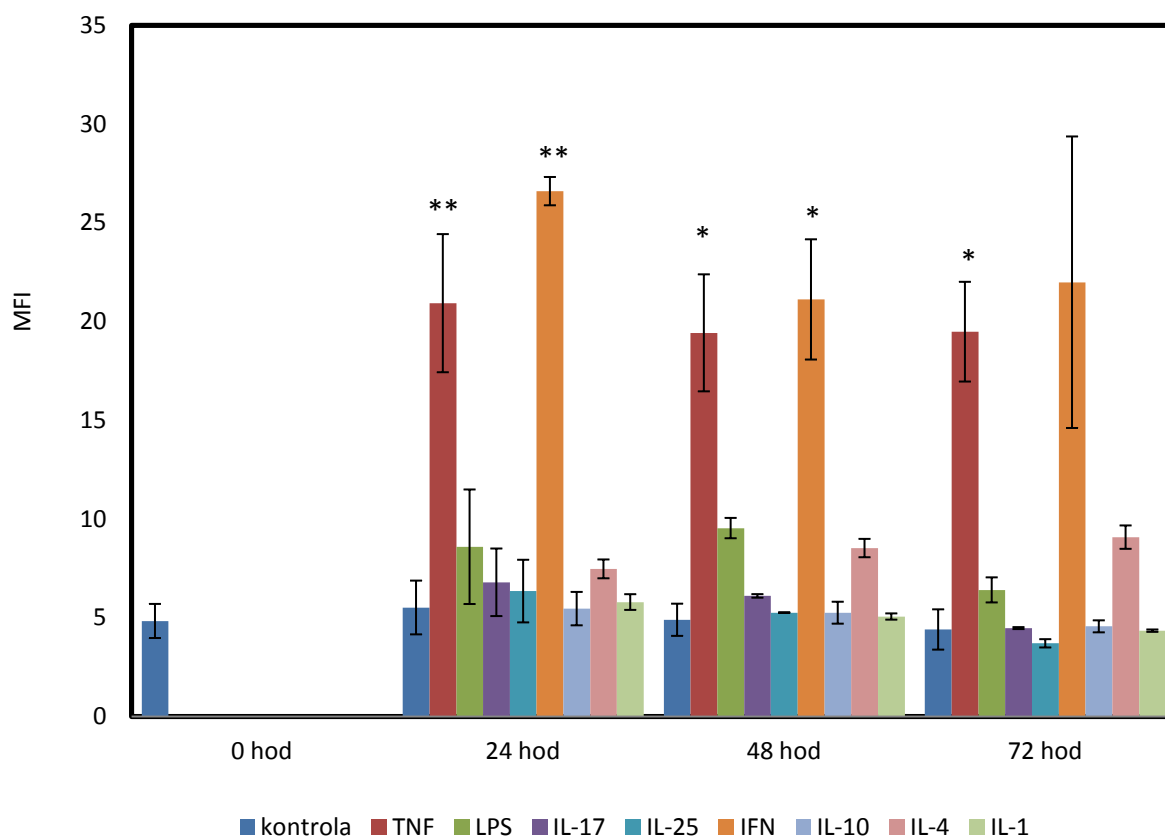
5.2.1 Efekt stimulans na povrchovou expresi molekuly CD54

Již nestimulované THP-1 buňky dosahovaly vysokého procenta pozitivitu pro znak CD54 (78 %). Stimulace pomocí TNF α a IFN γ během 24 hodin zvýšila pozitivitu buněk téměř k 100 %. Rovněž při použití těchto stimulans docházelo k nárůstu střední hodnoty intenzity fluorescence 3–5x oproti kontrole. Ostatní použité látky neindukovaly změnu exprese molekuly CD54.



Graf 1: Procentuální změna CD54 pozitivních THP-1 buněk v jednotlivých inkubačních časech po stimulaci. Vynesené hodnoty jsou průměrem 2–3 nezávislých měření. Symbol „**“ představuje hladinu signifikance $p < 0,001$ vztáženou ke kontrolnímu vzorku v daném čase.

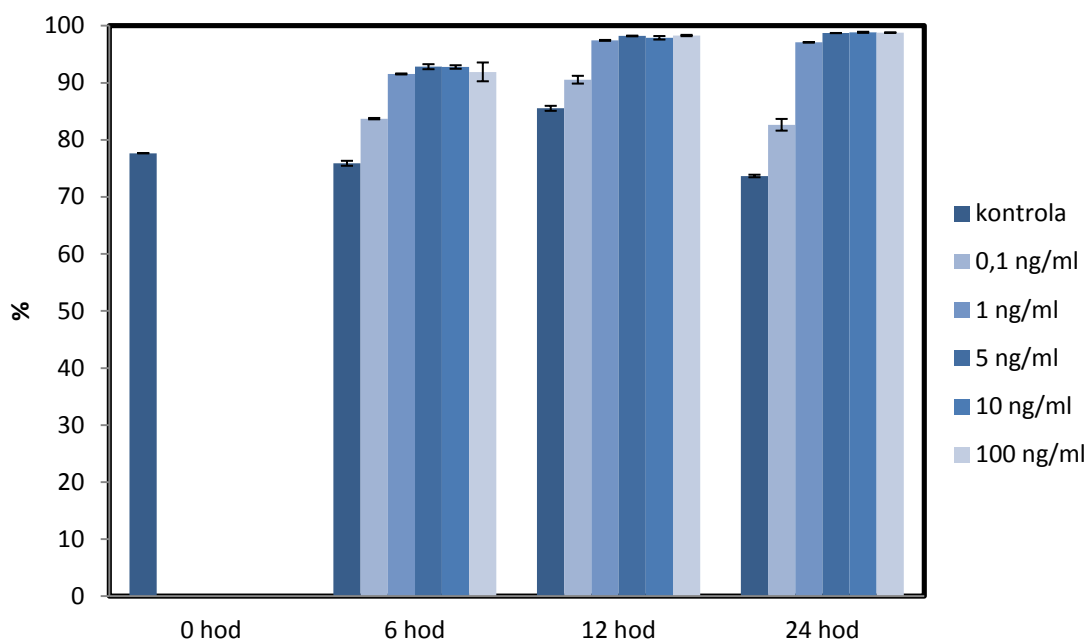
Změna intenzity fluorescence molekuly CD54 po stimulaci



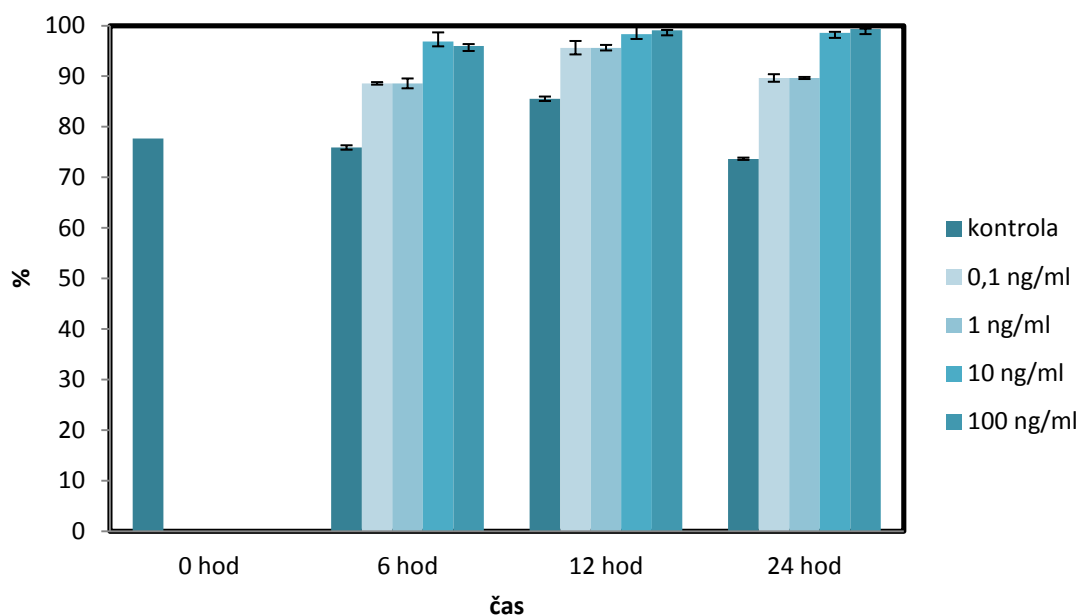
Graf 2: Změna průměrné hodnoty intenzity fluorescence molekuly CD54 pro THP-1 buňky. Výsledky jsou průměrem 2–3 nezávislých pokusů. Symbol „*“ označuje hodnotu hladiny signifikance $p < 0,05$; symbol „**“ hladinu signifikance $p < 0,001$ vztaženou ke kontrole v daném čase.

Na základě těchto výsledků jsme dále stimulovali buňky různými koncentracemi $\text{TNF}\alpha$ a $\text{IFN}\gamma$ a opět sledovali procentuální zastoupení buněk pozitivních na znak CD54 a průměrnou intenzitu fluorescence. Časy odečtu jsme zkrátily na 6, 12 a 24 hodin. V případě stimulace $\text{TNF}\alpha$ docházelo k nárůstu pozitivních buněk i intenzity fluorescence znaku již během 6 hodin. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán v čase 12 hodin. Již koncentrace 1 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ byla dostačující pro stimulaci buněk. Obdobně i po působení $\text{IFN}\gamma$ jsme dosáhli maximálního vrcholu hodnot v čase 12 hodin od stimulace. Výraznější zvýšení hodnot nastalo po působení $\text{IFN}\gamma$ o koncentraci 10 ng/ml.

A) Procentuální změna CD54⁺ THP1 buněk po stimulaci TNF α o různé koncentraci



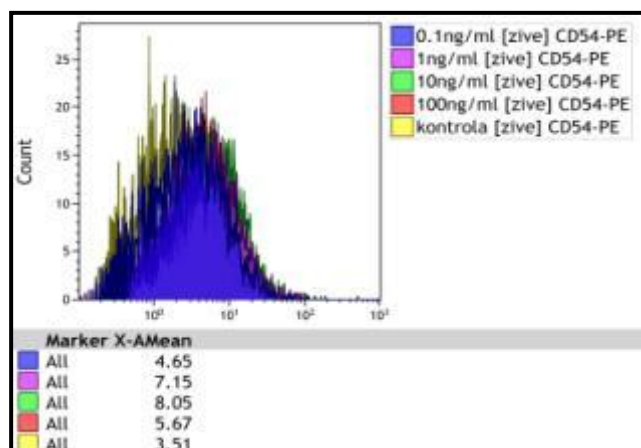
B) Procentuální nárůst CD54⁺ buněk po stimulaci IFN γ o různé koncentraci



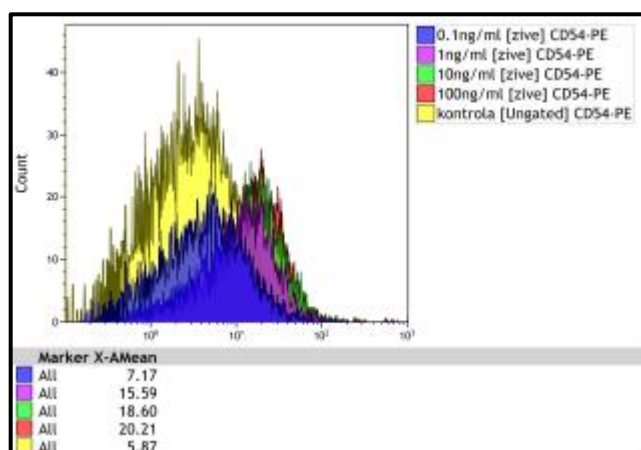
Graf 3: Procentuální změna THP-1 buněk pozitivních na znak CD54 po stimulaci: A) TNF α [0,1 až 100 ng/ml], B) IFN γ [0,1 až 100 ng/ml]. Časy odečtu 6, 12, 24 hodin. Vynesené hodnoty a směrodatné odchylky jsou průměrem doubletu jednoho měření.

Změna průměrné hodnoty intenzity fluorescence molekuly CD54 po stimulaci TNF α

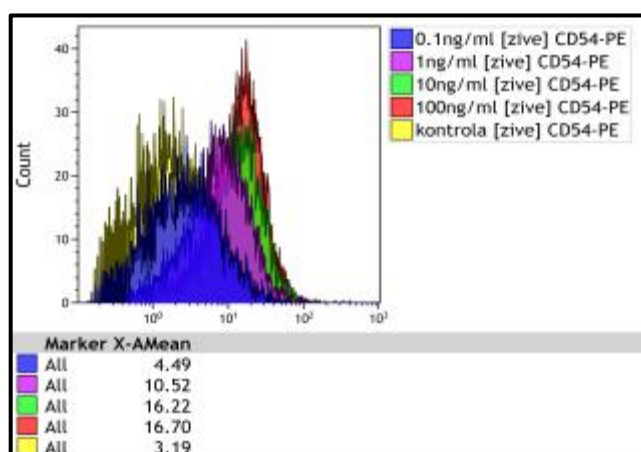
A) inkubace 6 hodin



B) inkubace 12 hodin



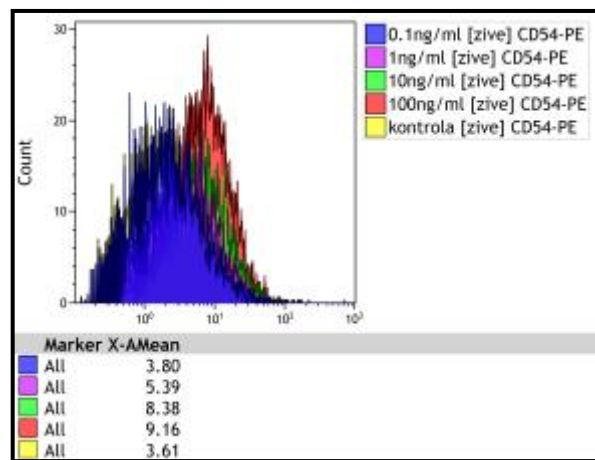
C) inkubace 24 hodin



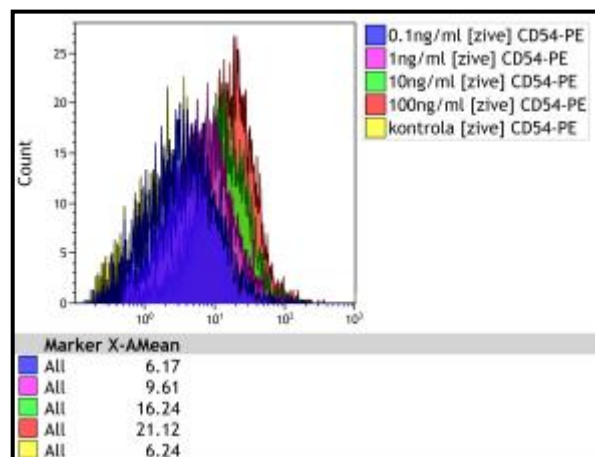
Obrázek 13: Posun průměrné hodnoty intenzity fluorescence znaku CD54 na THP-1 buňkách po stimulaci TNF α [0,1–100 ng/ml] v čase A) 6 hodin, B) 12 hodin, C) 24 hodin.

Změna průměrné hodnoty intenzity fluorescence molekuly CD54 po stimulaci IFN γ

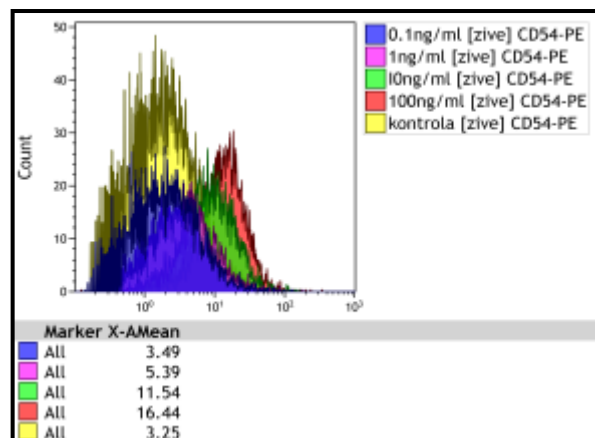
A) inkubace 6 hodin



B) inkubace 12 hodin

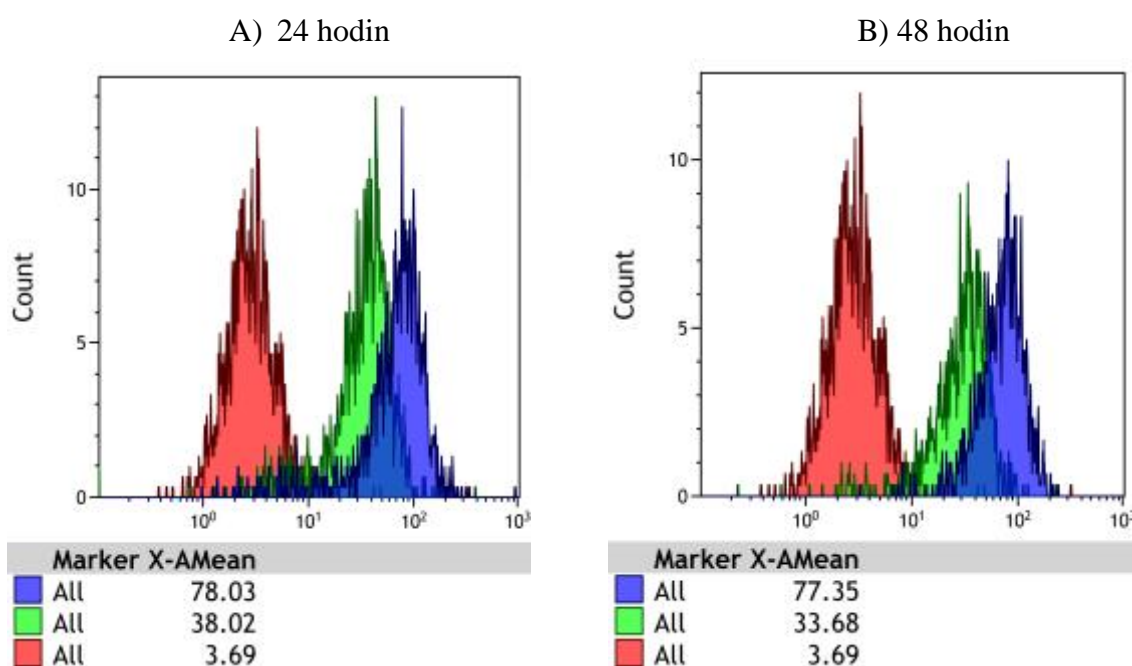


C) inkubace 24 hodin



Obrázek 14: Posun průměrné intenzity fluorescence molekuly CD54 na THP-1 buňkách po stimulaci IFN γ [0,1–100 ng/ml] v čase A) 6 hodin, B) 12 hodin, C) 24 hodin.

V krvi (6 dárců) se procento CD54⁺ monocytů blíží 100 % (97,4 % ± 2,9 %). Intenzita fluorescence znaku pro monocyty z plné i izolované krve v čase 0 dosahovala srovnatelných hodnot (MFI 4,2 ± 0,9). Po 24 hodinové inkubaci docházelo ke zvýšení MFI nestimulovaných kontrolních monocytů (35,8 ± 13,3). V dalším inkubačním čase již tento nárůst nebyl patrný. Působení IFN γ vedlo po 24 hodinách k indukci průměrné intenzity fluorescence (24 hodin MFI 85 ± 19, 48 hodin MFI 89 ± 36). Toto zvýšení však nebylo statisticky významné.



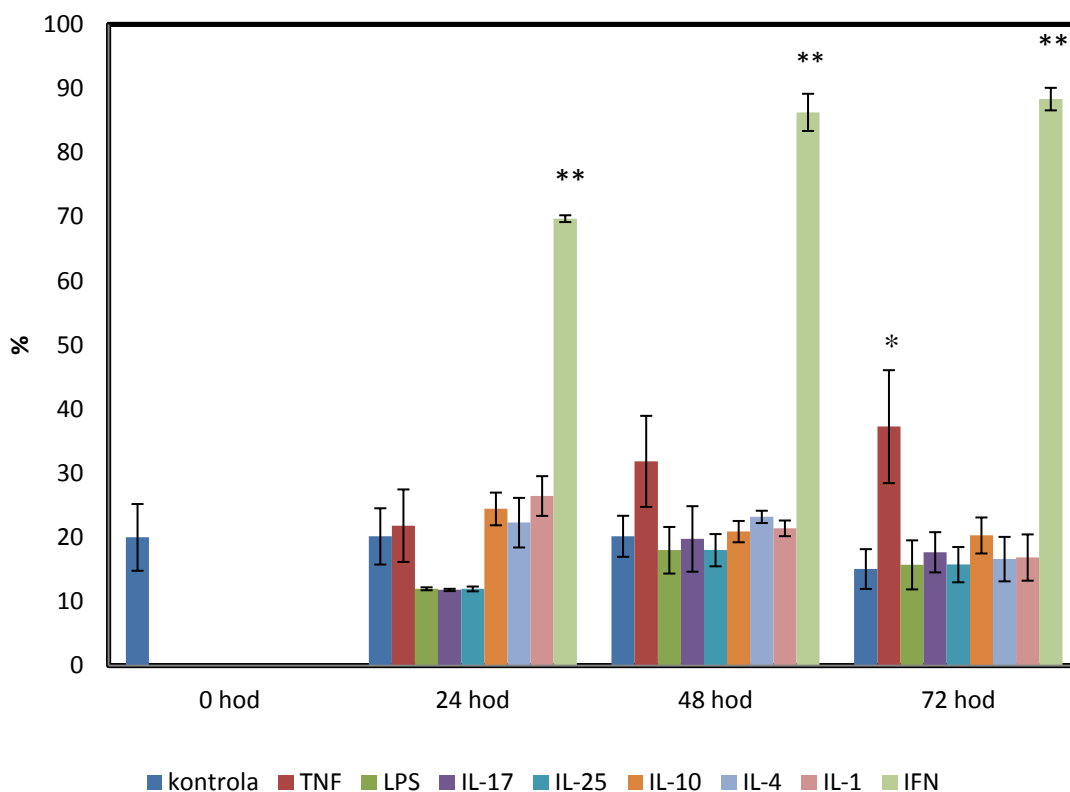
Obrázek 15: Posun průměrné hodnoty intenzity fluorescence molekuly CD54 po stimulaci izolovaných monocytů cytokinem IFN γ (modrá barva) oproti nestimulované kontrole (zelená barva): A) po 24 hodinách, B) po 48 hodinách. Červená populace značí MFI izolovaných CD54⁺ monocytů v čase 0.

5.2.2 Efekt stimulans na povrchovou expresi znaku HLA-DR

Po stimulaci THP-1 buněk zůstávaly průměrné hodnoty intenzity fluorescence molekuly HLA-DR neměnné. MFI ve všech inkubačních časech dosahoval hodnot 3,2 (SD ± 0,4). Procentuální zastoupení HLA-DR pozitivních buněk bylo pro kontrolní nestimulované vzorky v čase konstantní (19 %, SD ± 2). Zvýšené procento HLA-DR⁺ buněk bylo zaznamenáno po stimulaci IFN γ (p < 0,001). V čase 24 hodin došlo k nárůstu pozitivní populace na 70 % (SD ± 0,5), po 48 hodinách ke zvýšení až na 86 % (SD ± 3). Nárůst

pozitivní populace byl rovněž patrný po stimulaci TNF α (48 hodin: 32 %, SD \pm 7; 72 hodin: 37,3 %, SD \pm 8,8). Ostatní použité látky neovlivňovaly procentuální zastoupení HLA-DR⁺ THP-1 buněk.

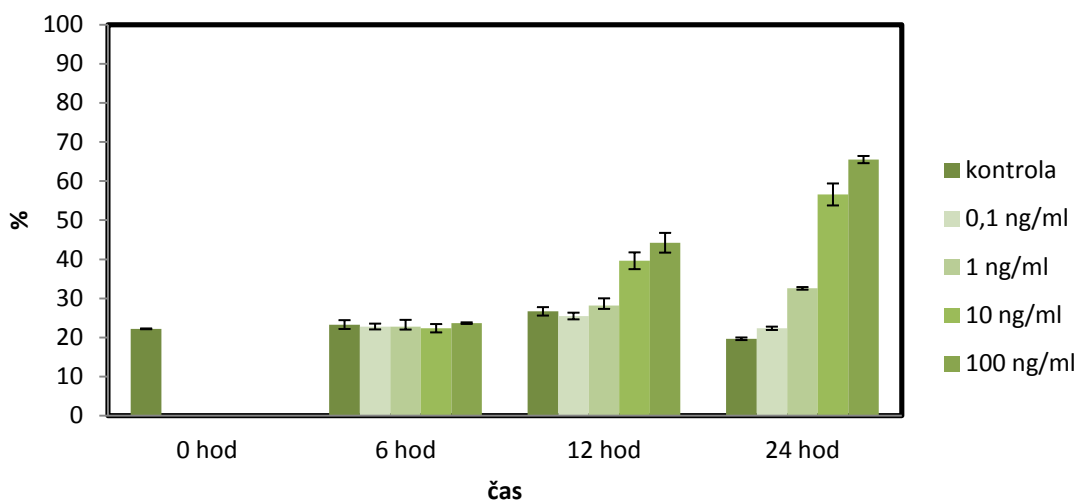
Procentuální zastoupení HLA-DR⁺ THP1 buněk po stimulaci



Graf 4: Procentuální změna HLA-DR⁺ THP-1 buněk po stimulaci spektrem látek. Naměřené hodnoty jsou průměrem 2–3 nezávislých měření. Symbol „***“ značí hladinu signifikance $p < 0,001$; symbol „*“ hladinu signifikance $p < 0,05$ vztaženou vůči kontrole v daném inkubačním čase.

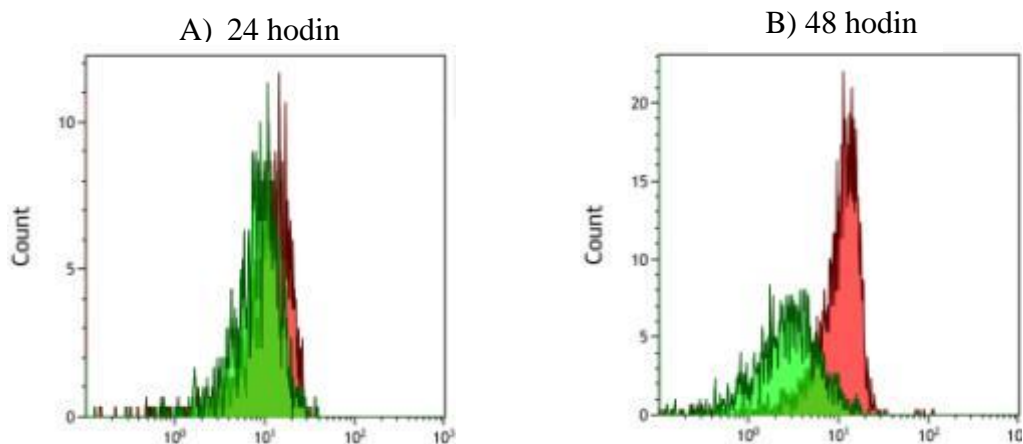
Na základě výsledků stimulace THP-1 buněk interferonem γ jsme v následujícím experimentu použili tento cytokin v různých koncentracích [0,1 až 100 ng/ml] a procentuální změnu HLA-DR⁺ buněk sledovali v kratších časových intervalech (6, 12 a 24 hodin). Ke zvýšení počtu pozitivních buněk docházelo až po 12 hodinové inkubaci. Nejnižší použitá koncentrace IFN γ [0,1 ng/ml] neměla vliv na změnu exprese znaku.

Procentuální nárůst HLA-DR⁺ THP1 buněk po stimulaci IFN γ



Graf 5: Změna procentuálního zastoupení THP-1 buněk pozitivních na znak HLA-DR v čase 6, 12 a 24 hodin po působení IFN γ o různé koncentraci. Vynesené hodnoty jsou průměrem doubletu jednoho měření.

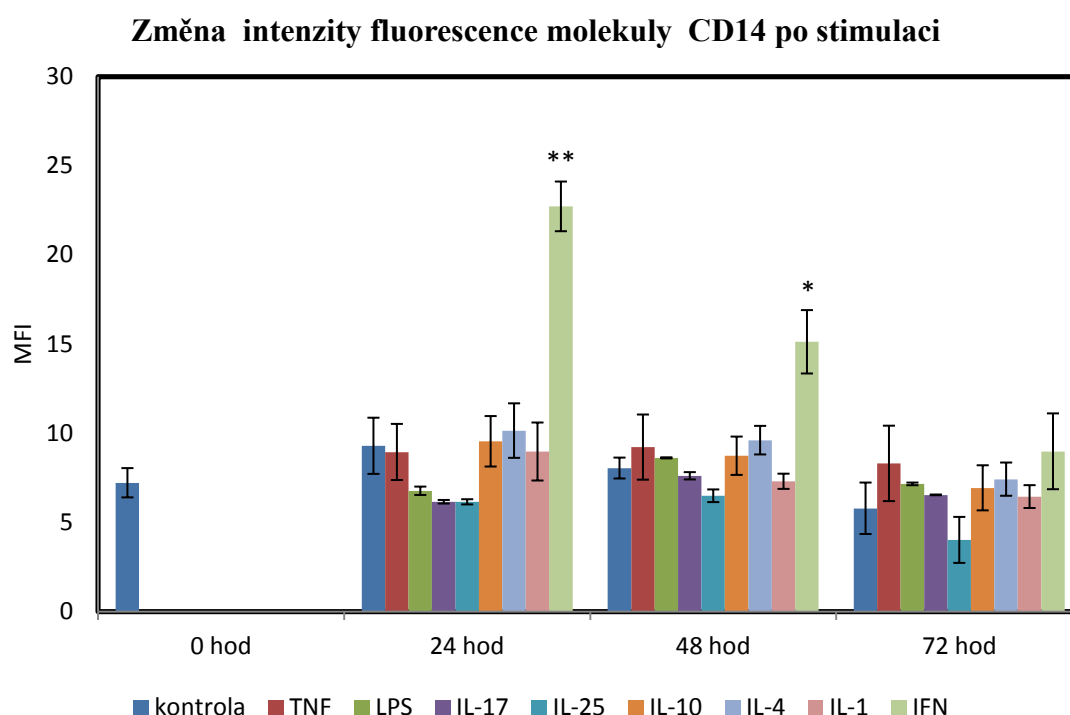
Na izolovaných monocyttech se molekula HLA-DR vyskytovala v $64 \pm 9,2$ % (6 dárců). Během 24 hodinové inkubace toto procento rostlo na 94 ± 4 % HLA-DR⁺ monocytů. Žádná z použitých stimulans významně neovlivňovala procento HLA-DR pozitivních buněk oproti kontrolnímu vzorku. Při vyhodnocování MFI docházelo po 48 hodinové inkubaci k poklesu fluorescence po stimulaci LPS oproti kontrole (kontrola v čase 48 hod MFI $14 \pm 2,1$; LPS MFI $7 \pm 2,1 \rightarrow p < 0,05$). Ostatní stimulans neměla statisticky významný vliv na průměrnou hodnotu intenzity fluorescence znaku.



Obrázek 16: Pokles MFI HLA-DR⁺ monocytů po stimulaci lipopolysacharidem [100 ng/ml] (zelená) oproti kontrole (červená) v čase: A) 24 hodin, B) 48 hodin. Posun po stimulaci LPS v čase 48 hodin statisticky významný ($p < 0,05$).

5.2.3 Efekt stimulans na povrchovou expresi molekuly CD14

Ke zvýšení MFI molekuly CD14 na povrchu THP-1 buněk docházelo opět po působení IFN γ . Oproti kontrole (MFI $9,3 \pm 1,6$) došlo po 24 hodinách k navýšení intenzity fluorescence téměř 2,5krát (MFI $22,7 \pm 1,4$; $p < 0,001$). Po 48 hodinové inkubaci jsme však již zaznamenali pokles střední hodnoty intenzity fluorescence ($15,1 \pm 1,8$; $p < 0,05$). Po 72 hodinách pak byly hodnoty MFI znaku CD14 srovnatelné s kontrolním vzorkem, který nebyl stimulován. Ostatní látky neměly vliv na expresi molekuly.

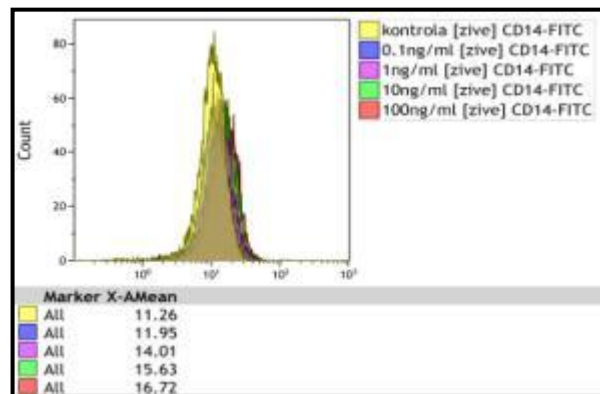


Graf 6: Změna průměrné hodnoty intenzity fluorescence povrchové molekuly CD14 na stimulovaných THP-1 buňkách v čase. Vynesené hodnoty a směrodatné odchylky jsou průměrem 2–3 nezávislých pokusů. Symbol „**“ značí hladinu signifikance $p < 0,001$, symbol „*“ pak hladinu signifikance $p < 0,05$, které jsou vztažené ke kontrolnímu nestimulovanému vzorku v daném inkubačním čase.

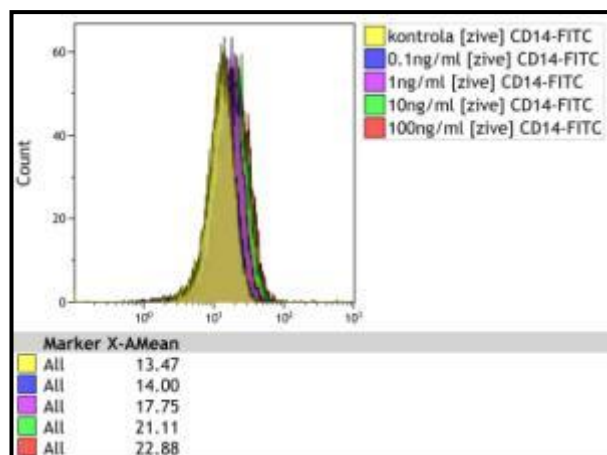
Na základě výsledku tohoto pokusu jsme v opět následujícím experimentu použili ke stimulaci IFN γ o různých koncentracích [0,1–100 ng/ml] a časy odečtu zkrátily na 6, 12 a 24 hodin. Během 6 hodin od inkubace docházelo k nárůstu průměrné hodnoty intenzity fluorescence. Již IFN γ o koncentraci 1 ng/ml indukoval změnu exprese molekuly CD14.

Změna průměrné hodnoty intenzity fluorescence molekuly CD14 po stimulaci IFN γ

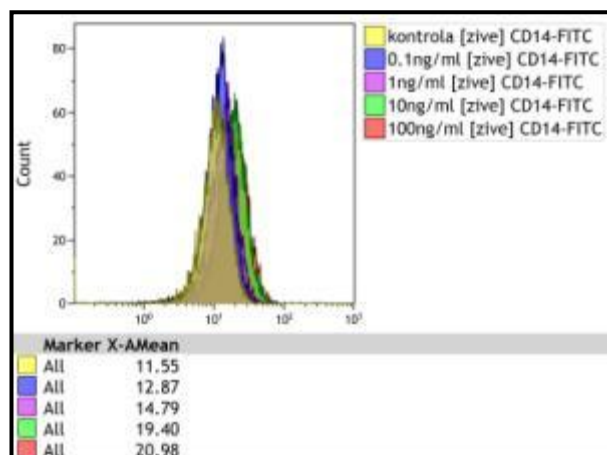
A) inkubace po 6 hodinách



B) inkubace po 12 hodinách



C) inkubace po 24 hodinách

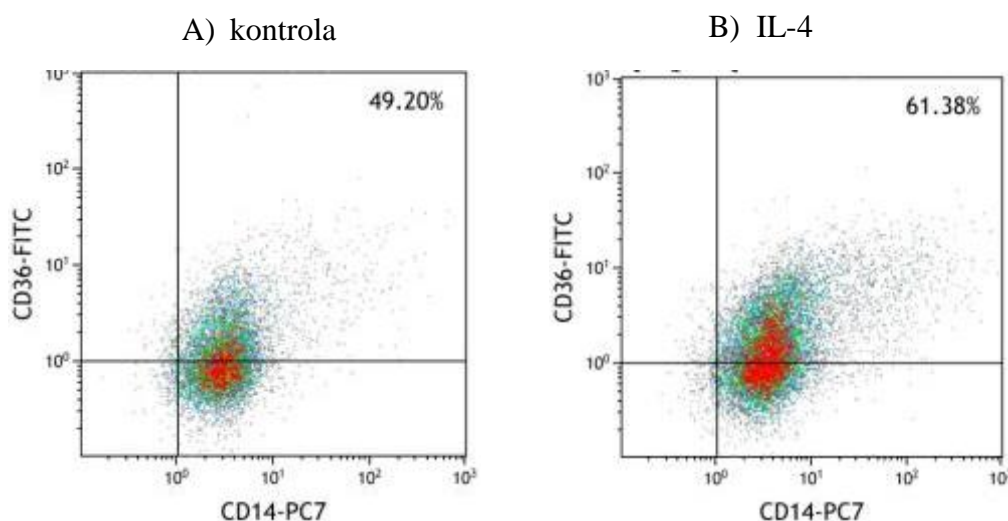


Obrázek 17: Sledování změny průměrné hodnoty intenzity fluorescence molekuly CD14 exprimované na povrchu THP-1 buněk po stimulaci IFN γ o různé koncentraci [0,1–100 ng/ml] v čase 6, 12 a 24 hodin.

Pro izolované monocyty nebyla průměrná hodnota intenzity fluorescence v čase kvůli vysokým směrodatným odchylkám mezi jednotlivými dárci hodnotitelná (data nejsou prezentována). V plné krvi byl však MFI napříč šesti zdravými dárci konstantní ($15,1 \pm 2,9$).

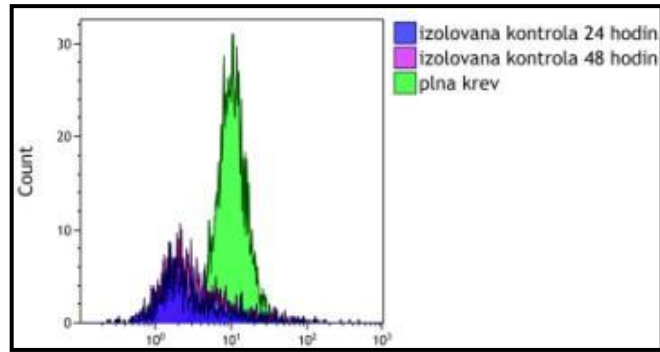
5.2.4 Efekt stimulans na povrchovou expresi molekuly CD36

Působením cytokinu IL-4 byl zaznamenán nárůst procentuálního množství CD36⁺ THP-1 buněk. Největšího procentuálního rozdílu mezi takto stimulovaným a kontrolním vzorkem bylo dosaženo po 48 hodinové inkubaci. Oproti kontrole (51 %, SD $\pm 4,4$) došlo ke zvýšení na 63,5 % (SD $\pm 4,4$; $p < 0,05$) CD36⁺ THP-1 buněk. Hodnoty jsou průměrem 3 nezávislých měření. Ostatní látky neměly vliv na procentuální zastoupení molekuly CD36. Intenzita fluorescence znaku zůstávala pro všechny stimulans i kontrolu ve všech inkubačních časech konstantní (MFI 3 – 4; data nejsou prezentována).



Obrázek 18: Procentuální znázornění nárůstu populace buněk pozitivních na znak CD36 po 48 hodinové inkubaci. A) nestimulované THP-1 buňky, B) THP-1 buňky stimulované IL-4 [10 ng/ml] ($p < 0,05$).

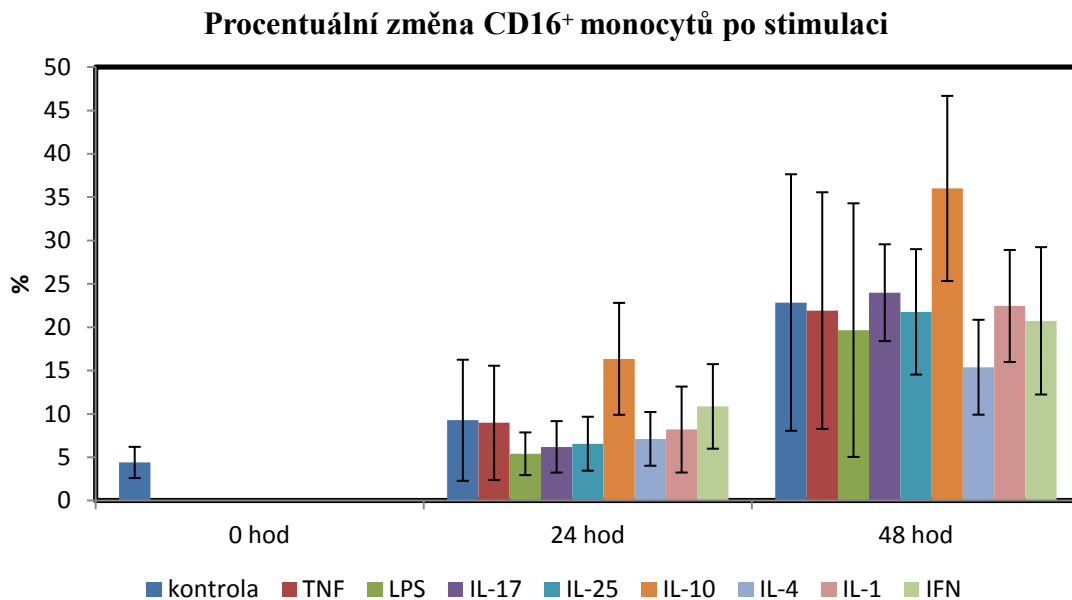
Krevní monocyty mají oproti THP-1 buňkám vyšší míru exprese molekuly CD36. V periferní krvi byl znak CD36 prezentován na všech monocytech i po jejich izolaci. V jednotlivých inkubačních časech pak exprese znaku klesla pod 90 % (24 hodin $88,1 \pm 6,5$; 48 hodin $84,6 \pm 8,5$) Výsledky jsou průměrem 6 nezávislých měření. Žádná ze stimulans však významně neovlivňovala procentuální změnu exprese znaku ani průměrnou hodnotu intenzity fluorescence (data nejsou prezentována).



Obrázek 19: Posun populace izolovaných CD36⁺ monocytů v čase 24 a 48 hodin oproti CD36⁺ monocytům v periferní krvi.

5.2.5 Efekt stimulans na povrchovou expresi molekuly CD16

Molekula CD16 není na povrchu THP-1 buněk prezentována. Na periferních monocytech byla zastoupena v 4,4 % (SD ± 1,9; 6 dárců). Po izolaci postupně rostlo procento CD16⁺ monocytů i bez použití stimulans (inkubace 48 hodin 22,8 ± 14,8 % CD16⁺ buněk). Díky vysokým směrodatným odchylkám však není toto zvýšení statisticky významné. Stimulací pomocí cytokinu IL-10 bylo dosaženo nejvyššího procentuální navýšení CD16⁺ monocytů (inkubace 48 hodin: 36 ± 10,7 %), avšak ani tento nárůst není statisticky významný.

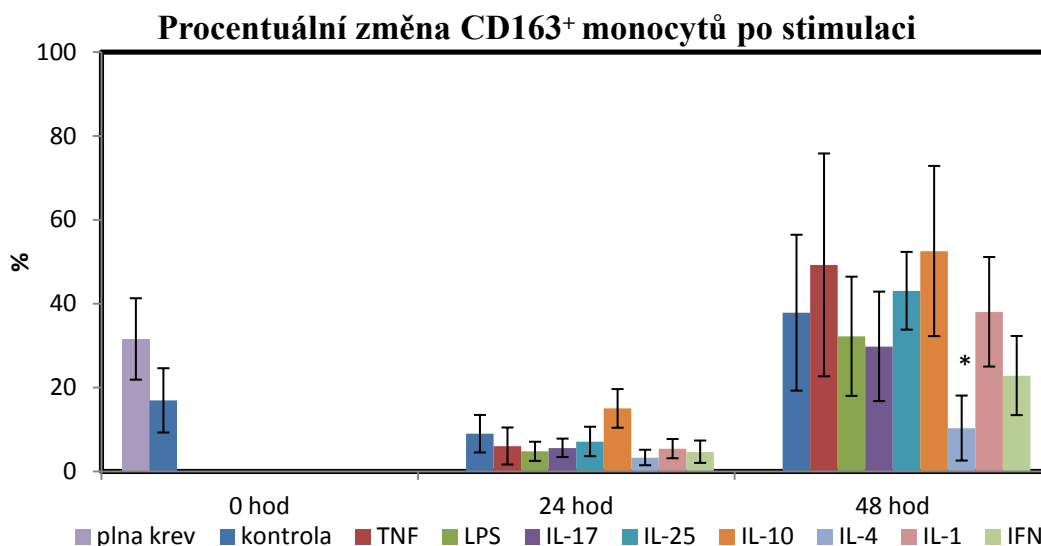


Graf 7: Procentuální změna izolovaných CD16⁺ monocytů po stimulaci spektrem látek v čase 0, 24 a 48 hodin. Vynesené hodnoty jsou průměrem 6 nezávislých měření, při kterých byla použita krev různých dárců.

5.2.6 Efekt stimulans na povrchovou expresi molekuly CD163

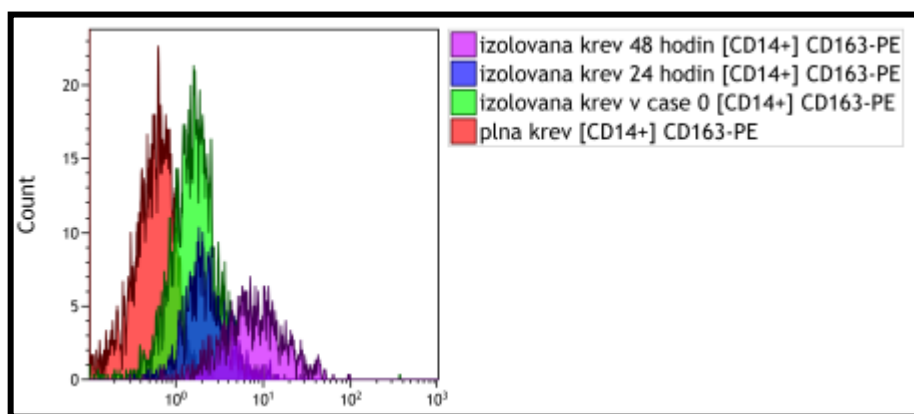
Pro sledování exprese molekuly CD163 byly použité dva klony protilátek (CD163GHI a CD163RM3/1). Jednotlivé klony se liší místem vazby na doménu molekuly CD163. Experimentem bylo zjištěno, že THP-1 buňky na svém povrchu neexprimují doménu pro vazbu CD163GHI. Vazba klonu CD163RM3/1 pak byla velmi variabilní. V inkubačních časech procento takto zachycených CD163⁺ buněk dosahovalo širokého rozmezí (30 – 100 %). Kvůli vysokým směrodatným odchylkám nejsou naměřená data statisticky významná (data nejsou prezentována). Střední intenzita fluorescence znaku se však ve všech inkubačních časech, a pro všechny působící látky pohybovala ve stejných hodnotách (MFI 2,5 – 3,5).

Pomocí klonu CD163GHI byla molekula CD163 detekovaná na periferních monocyttech v průměrném zastoupení 31,6 % (SD ± 9,7). Izolaci monocytů tento znak ztrácely. Po 24 hodinové inkubaci klesla exprese na 9,0 % (SD ± 4,5). V čase 48 hodin se procentuální zastoupení CD163⁺ monocytů opět zvyšovalo (37,8 %; SD ± 18,6). Z použitých látek inhiboval procentuální zastoupení znaku cytokin IL-4. V čase 24 hodin klesl počet pozitivních buněk na 3,3 % (SD ± 1,8). V čase 48 hodin po stimulaci tímto cytokinem bylo průměrně naměřeno 10,3 % CD163⁺ monocytů (SD ± 7,8; p < 0,05). Ostatní stimulans neměla statisticky významný vliv na expresi znaku.

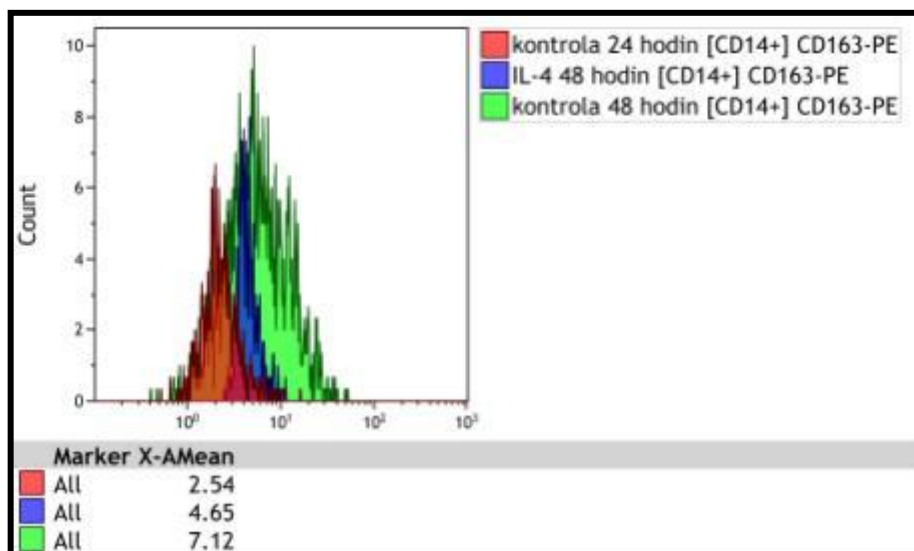


Graf 8: Procentuální množství CD163 pozitivních monocytů po stimulaci spektrem látek v čase 0, 24 a 48 hodin. Pro detekci molekuly CD163 byl použit klon protilátky CD163GHI. Vynesené hodnoty jsou průměrem 6 nezávislých opakování s různými dárci krve. Symbol „*“ značí hladinu významnosti p < 0,05 vtaženou ke kontrolnímu vzorku v daném čase.

Klon CD163RM3/1 zachycoval na monocytech v plné krvi $26,2 \pm 12,2$ % CD163⁺ buněk (n = 6). Izolací však bylo dosaženo téměř 100% zastoupení znaku ($95 \pm 6,4$ %). V čase se pak po působení jednotlivých látek procentuální zastoupení CD163⁺ monocytů neměnilo. Stimulans rovněž výrazně neovlivňovala průměrnou hodnotu intenzity fluorescence znaku. Ta po 24 hodinové inkubaci dosahovala hodnoty 3,4 (SD \pm 0,9). V čase 48 hodin pak MFI stoupl na 10,8 (SD \pm 5,8). Stimulací s IL-4 bylo dosaženo nepatrné inhibice průměrné hodnoty intenzity fluorescence znaku CD163 (4,9; SD \pm 2,7). Tento pokles nebyl statisticky významný.



Obrázek 20: Posun populace CD163⁺ monocytů vlivem izolace. K detekci znaku použit klon CD163RM3/1.



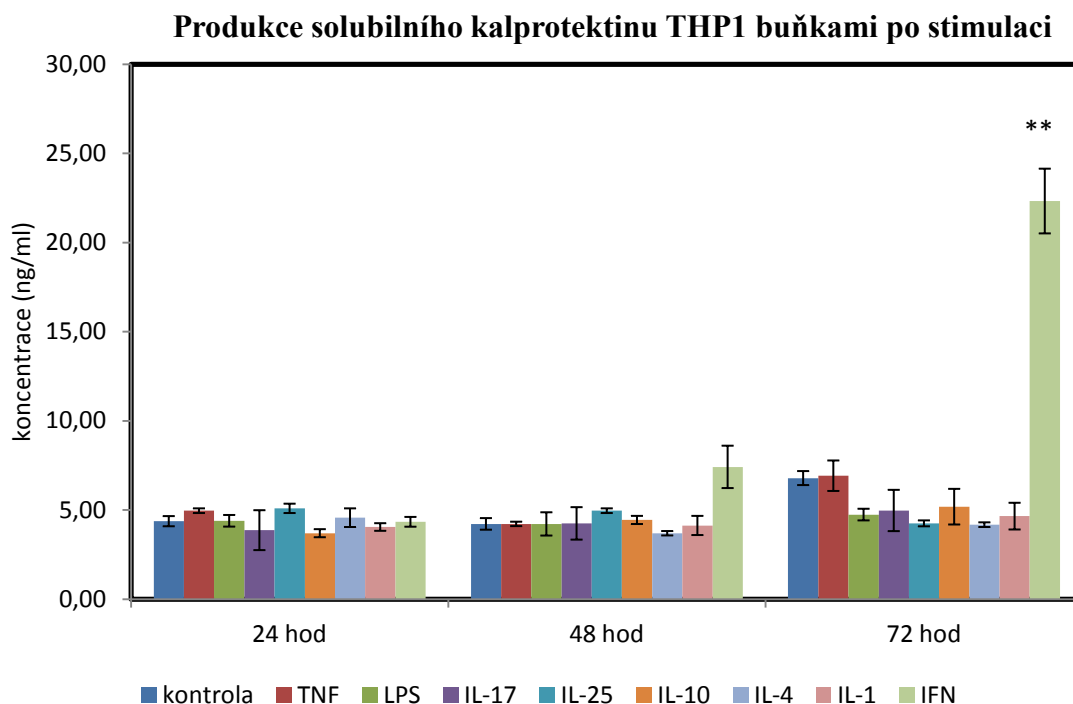
Obrázek 21: Porovnání střední hodnoty intenzity fluorescence molekuly CD163 pro nestimulované izolované monocyty v čase 24 hodin a 48 hodin ve srovnání s inhibičním efektem IL-4 v čase 48 hodin. Pro detekci znaku použit klon monoklonální protilátky CD163RM3/1.

5.3 Vliv stimulans na produkci solubilního kalprotektinu THP-1 buňkami

K THP-1 buňkám byla opět přidávána různá stimulans. V čase 24, 48 a 72 hodin jsme od stimulovaných buněk odebírali supernatanty a pomocí metody ELISA sledovali produkci solubilního kalprotektinu. V supernatantech kontrolních vzorků dosahovala hladina kalprotektinu 5,4 ng/ml (průměr ze všech inkubačních časů). K nárůstu produkce kalprotektinu pak docházelo pouze po inkubaci s IFN γ (graf 9). Po 48 hodinové stimulaci bylo zaznamenáno nepatrné zvýšení na 7,4 ng/ml (SD \pm 1,2). V čase 72 hodin již byla výsledná naměřená koncentrace po inkubaci s tímto cytokinem 22,3 ng/ml (SD \pm 1,8; $p < 0,001$).

koncentrace (ng/ml) \pm směrodatná odchylka			
stimulans	24 hodin	48 hodin	72 hodin
kontrola	4,37 \pm 0,28	4,22 \pm 0,33	6,79 \pm 0,39
IL-4 [10 ng/ml]	4,57 \pm 0,52	3,70 \pm 0,12	4,18 \pm 0,13
IL-10 [10 ng/ml]	3,70 \pm 0,23	4,44 \pm 0,23	5,19 \pm 1,00
TNF α [10 ng/ml]	4,96 \pm 0,13	4,22 \pm 0,12	6,92 \pm 0,85
IL-1 β [10 ng/ml]	4,05 \pm 0,21	4,13 \pm 0,54	4,66 \pm 0,75
IL-17 [100 ng/ml]	3,87 \pm 1,12	4,25 \pm 0,91	4,97 \pm 1,16
LPS [100 ng/ml]	4,40 \pm 0,33	4,22 \pm 0,65	4,74 \pm 0,33
IL-25 [100 ng/ml]	5,09 \pm 0,26	4,96 \pm 0,13	4,25 \pm 0,17
IFN γ [2 μ g/ml]	4,34 \pm 0,27	7,41 \pm 1,19	22,32 \pm 1,81

Tabulka 3: Množství solubilního kalprotektinu [ng/ml] v supernatantech THP-1 buněk po stimulaci spektrem látek. Vynesené hodnoty jsou vypočítány z tripletu jednoho měření.



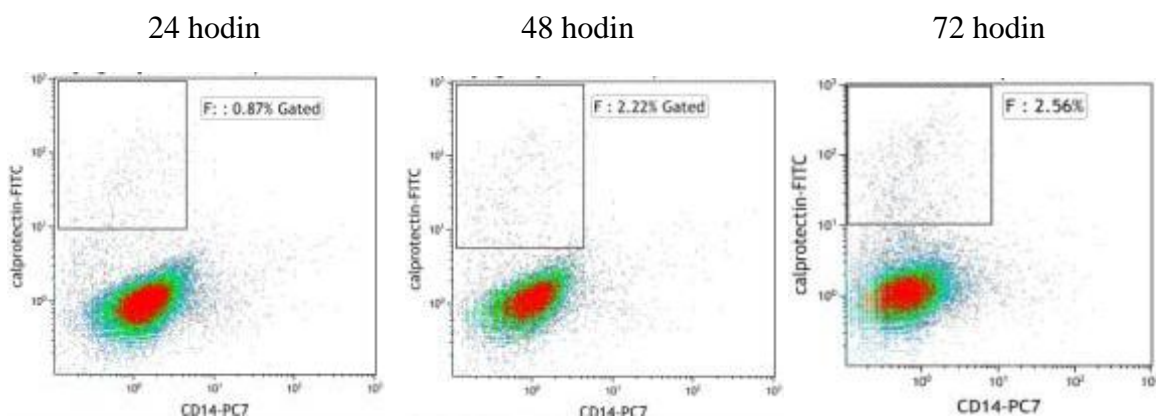
Graf 9: Sledování produkce solubilního kalprotektinu z odebraných supernatantů THP-1 buněk po stimulaci v čase. Vynesené hodnoty jsou průměrem tripletu jednoho měření. Symbol „**“ značí hladinu signifikance ($p < 0,001$).

Na základě těchto výsledků jsme následně provedli analýzu povrchové exprese kalprotektinu na THP-1 buňkách.

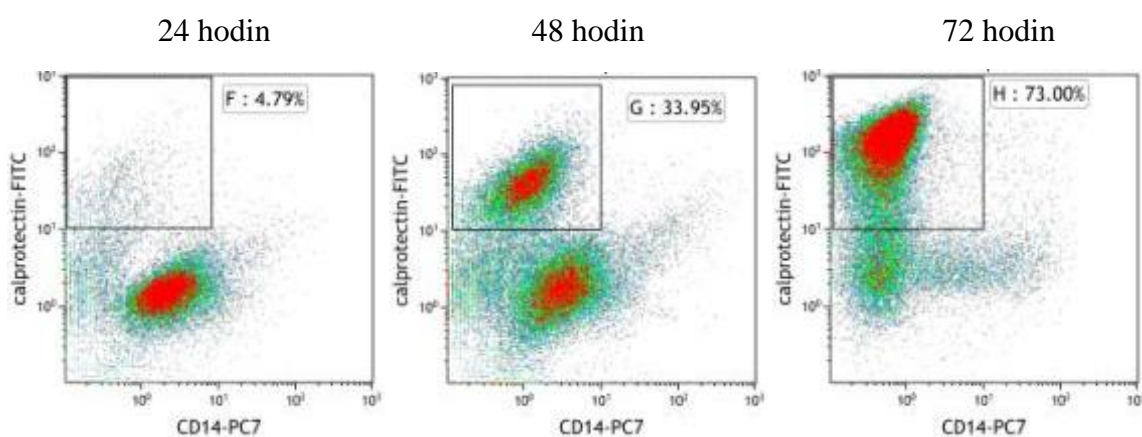
5.4 Exprese povrchového kalprotektinu po stimulaci spektrem cytokinů

Měřením bylo zjištěno, že kontrolní buňky i stimulované THP-1 buňky (výjimka IFN γ) exprimují na svém povrchu kalprotektin minimálně (2,1 %; SD \pm 0,7). Jediná látka, která indukovala změnu exprese, byl cytokin IFN γ . Pro THP-1 buňky stimulované tímto cytokinem bylo po 24 hodinové inkubaci 3,8 % kalprotektin pozitivních THP-1 buněk (SD \pm 1,5). Po 48 hodinách došlo k výraznému nárůstu na 33,7 % (SD \pm 0,3; $p < 0,05$) a po 72 hodinách dokonce na 69,3 % (SD \pm 5,2) kalprotektin pozitivních THP-1 buněk. Výsledky jsou průměrem dvou nezávislých měření, která byla provedena v doubletu.

A) Kontrolní THP-1 buňky bez stimulace



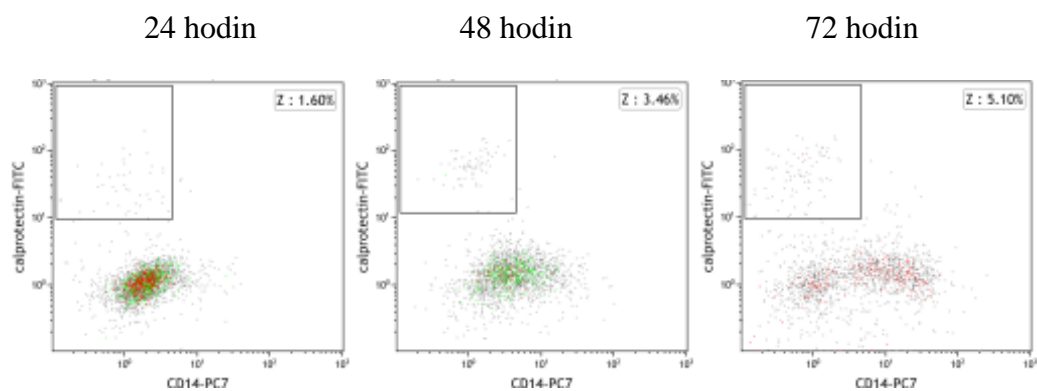
B) THP-1 buňky stimulované IFN γ



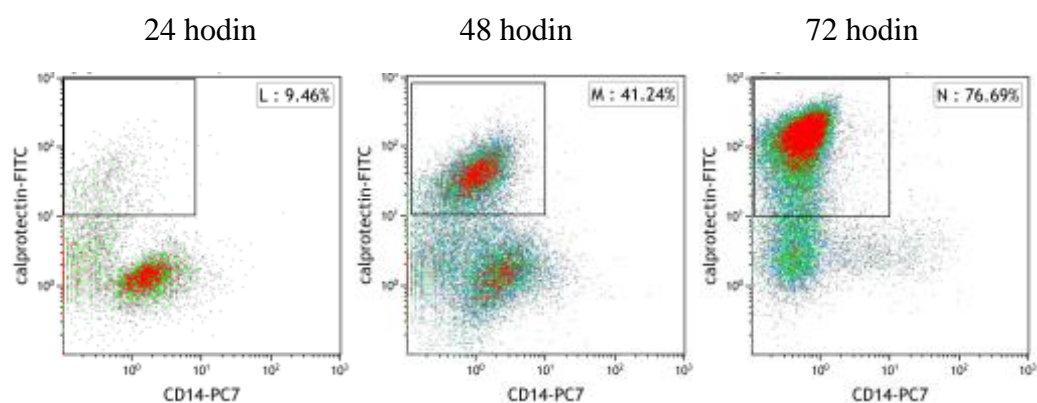
Obrázek 22: Procentuální zastoupení THP-1 buněk pozitivních na povrchový kalprotektin v inkubačních časech 24, 48 a 72 hodin. A) kontrolní vzorky bez stimulace; B) vzorky stimulované IFN γ o koncentraci 2 μ g/ml.

Stimulace IFN γ posouvala v čase vzhled SS/FS. Docházelo k procentuálnímu zvýšení populace THP-1 buněk s menší velikostí (viz gateovací strategie obrázek 11). Z tohoto důvodu jsme zažetovali obě dvě populace zvlášť a znovu pro ně hodnotili procentuální změnu povrchové exprese kalprotektinu. Z výsledků je patrné, že buňky s větší velikostí mají expresi kalprotektinu stejně nízkou, jako kontrolní vzorky. Naproti tomu THP-1 buňky s malou velikostí zvyšují s prodlužujícím inkubačním časem procentuální zastoupení buněk pozitivních na kalprotektin po stimulaci s IFN γ .

A) gateováno na populaci větších buněk



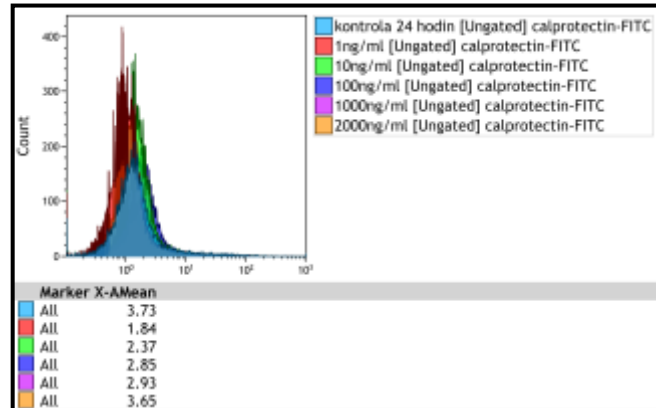
B) gateováno na populaci menších buněk



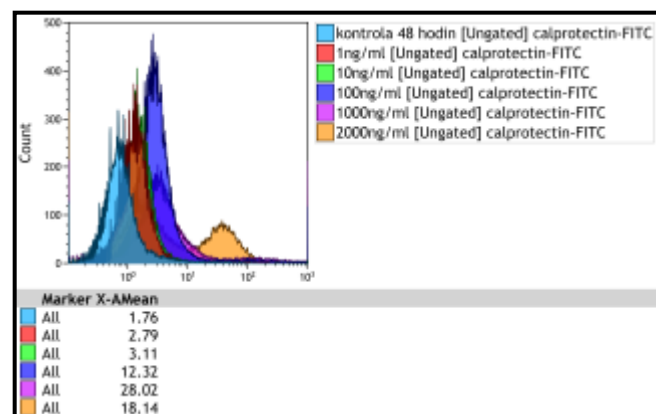
Obrázek 23: Podle gateovací strategie na základě profilu SS/FS vyhodnocení kalprotektin pozitivních THP-1 buněk v inkubačních časech 24, 48 a 72 hodin po stimulaci IFN γ [2 μ g/ml]. A) Gateováno na populaci buněk s větším FS profilem. B) Gateováno na populaci buněk s menším FS profilem.

Porovnání průměrných hodnot intenzity fluorescence molekuly kalprotektinu exprimované na THP-1 buňkách po stimulaci různými koncentracemi IFN γ

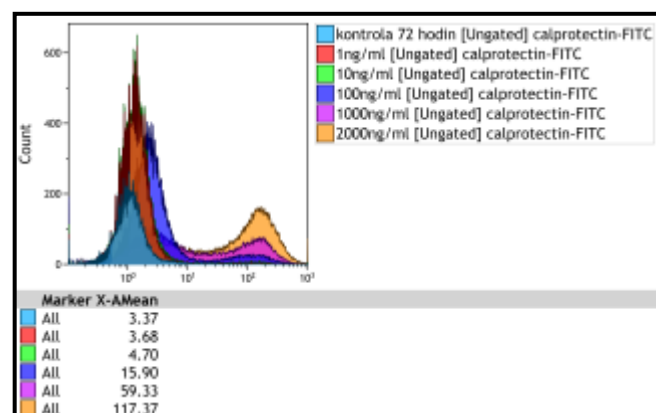
A) inkubace 24 hodin



B) inkubace 48 hodin

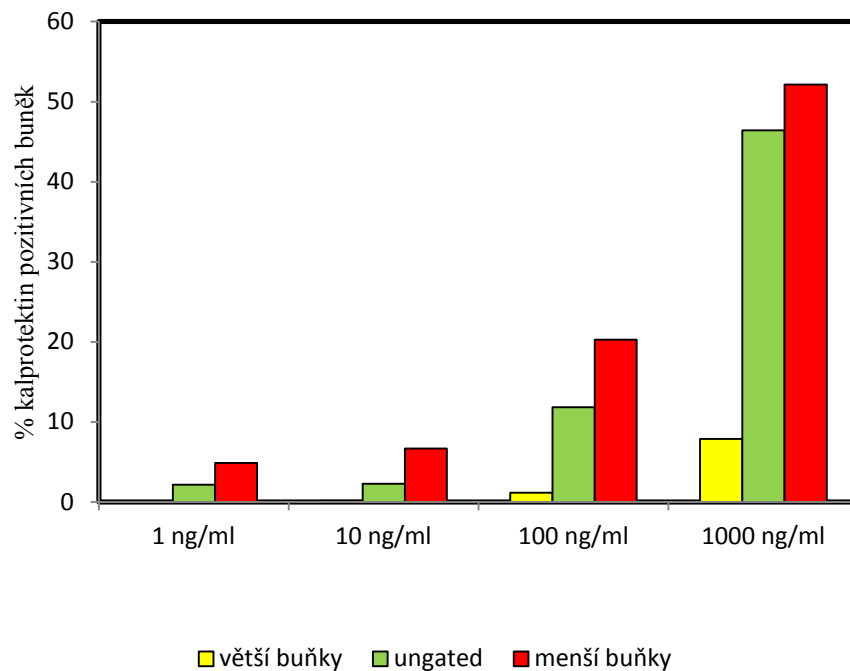


C) inkubace 72 hodin



Obrázek 24: Porovnání průměrné hodnoty intenzity fluorescence molekuly kalprotektinu na THP-1 buňkách (ungated) po stimulaci IFN γ [1–2000 ng/ml] v čase: A) 24 hodin, B) 48 hodin, C) 72 hodin.

Množství kalprotektin pozitivních THP1 buněk dle rozdělení profilu SS/FS po stimulaci IFN γ



Graf 10: Procentuální zastoupení jednotlivých populací THP-1 buněk pozitivních na kalprotektin po stimulaci IFN γ o různé koncentraci [1–1000 ng/ml] v čase 24, 48 a 72 hodin. Populace THP-1 buněk je rozdělena dle profilu SS/FS na skupinu s menší a větší velikostí. Zelená populace (ungated) označuje expresi všech buněk. Vynesené hodnoty jsou výsledkem jednoho měření.

Z předchozích pokusů víme, že THP-1 buňky začínají po stimulaci IFN γ [2 μ g/ml] po 48 hodinové inkubaci rychle umírat. Tyto výsledky vedou k hypotéze, že buňky s menší velikostí mohou již procházet procesem apoptózy či nekrózy. Tento závěr vybízí k další myšlence, a to že kalprotektin není u této populace exprimován na povrchu buňky, ale že buněčná membrána je již natolik poškozená, že protilátka projde dovnitř buňky. Tím pádem bychom neznačili povrchový kalprotektin, ale kalprotektin intracelulární. V následujícím experimentu jsme se snažili ověřit tyto domněnky.

5.5 Životnost populací THP-1 buněk rozdělených dle profilu SS/FS

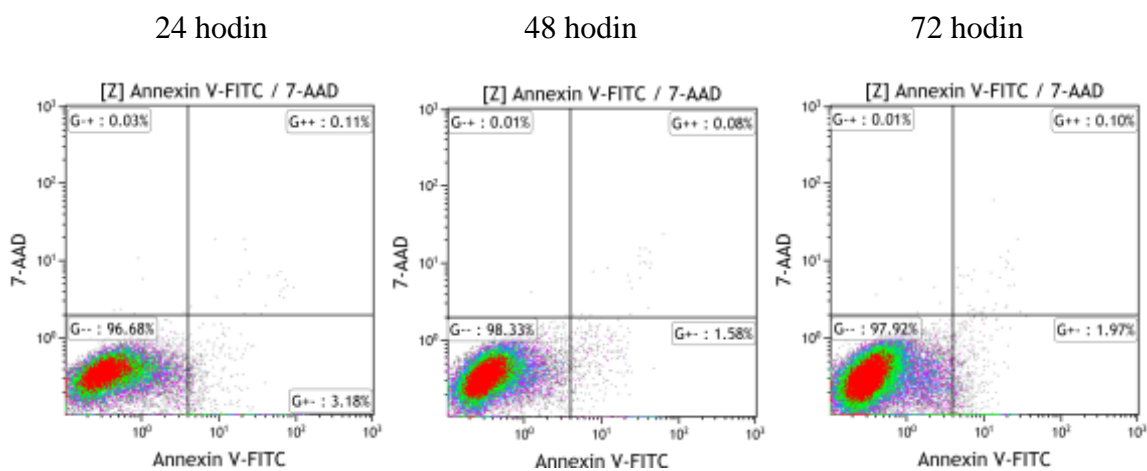
Pomocí barvení Annxinem a 7-AAD jsme zjišťovali, zda populace buněk, které jsou jasně rozlišitelné na profilu SS/FS, jsou živé nebo v apoptóze či nekróze. Náš předpoklad, že buňky s menší velikostí jsou ve zvýšené míře apoptické či nekrotické, se experimentem potvrdil. Z gateovací strategie zaměřené na populaci THP-1 buněk s menší velikostí vyplývá, že se většina z nich nachází ve stádiu časně či pozdní apoptózy. Pro kontrolní nestimulovaný vzorek je z těchto buněk, které mají menší FS, 55 % v apoptóze ($SD \pm 10,9$) a 22 % v nekróze ($SD \pm 7,5$). Pro vzorek stimulovaný IFN γ [2 $\mu\text{g/ml}$] dochází k procentuálnímu nárůstu apoptických buněk na 73 % ($SD \pm 3,7$). Procento nekrotických buněk po stimulaci tímto cytokinem dosahuje 17 % ($SD \pm 7$). Buňky s větší velikostí (profilem FS) jsou živé.

čas (hod)		buňky s větší velikostí (%)				buňky s menší velikostí (%)			
		živé	časně apoptické	pozdně apoptické	nekrotické	živé	časně apoptické	pozdně apoptické	nekrotické
kontrola	0	99,7	0,1	0,1	0,1	19,4	2,4	44,1	34,0
	24	96,9	3,0	0,1	0,0	11,5	43,4	29,3	15,8
	48	98,6	1,3	0,1	0,0	22,7	31,6	23,2	22,4
	72	97,9	2,0	0,1	0,0	38,9	20,7	24,9	15,6
IFN γ	24	95,3	4,6	0,1	0,0	12,4	35,0	33,6	19,0
	48	90,7	4,7	3,6	1,0	14,6	9,9	67,6	7,9
	72	70,7	16,0	10,2	3,1	3,5	13,6	58,4	24,5

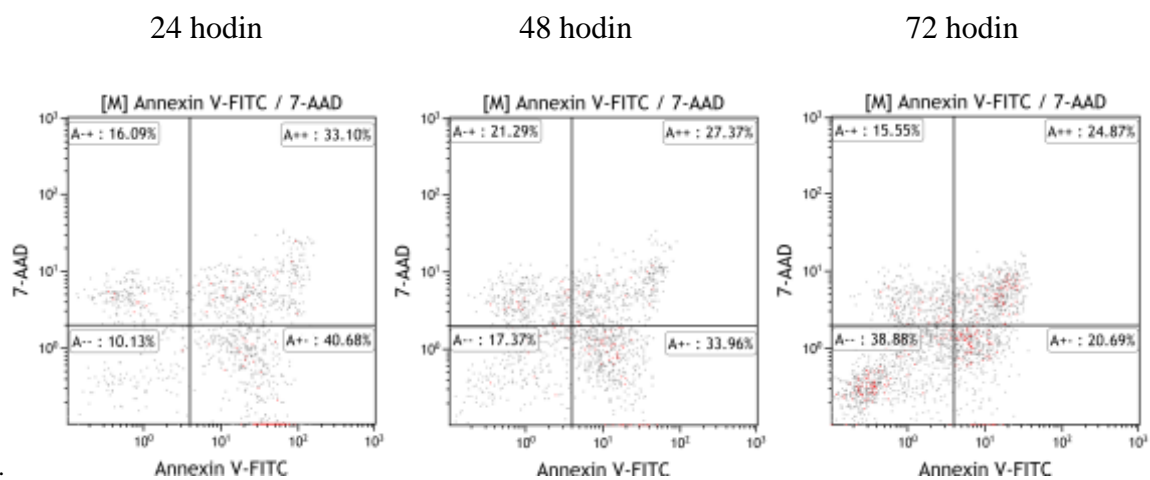
Tabulka 4: Procentuální zastoupení buněk rozdělených na dvě populace na základě profilu SS/FS. Procento buněk vyjadřuje zastoupení v dané populaci, nikoliv ze všech změřených (ungated) buněk. Vynesené hodnoty jsou průměrem doubletu jednoho měření.

Životnost populací THP-1 buněk

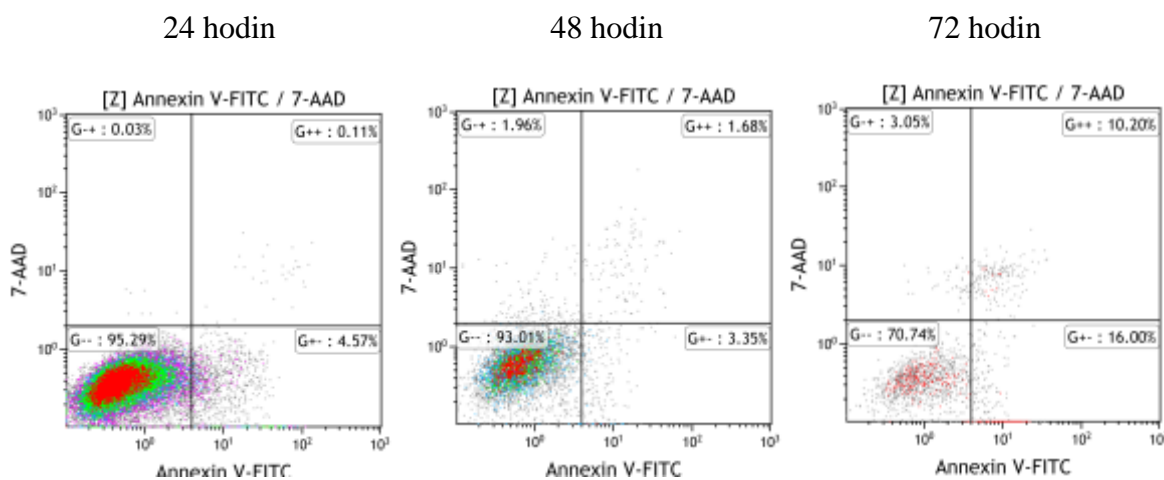
A) kontrolní vzorky - gateováno na populaci s větším FS profilem



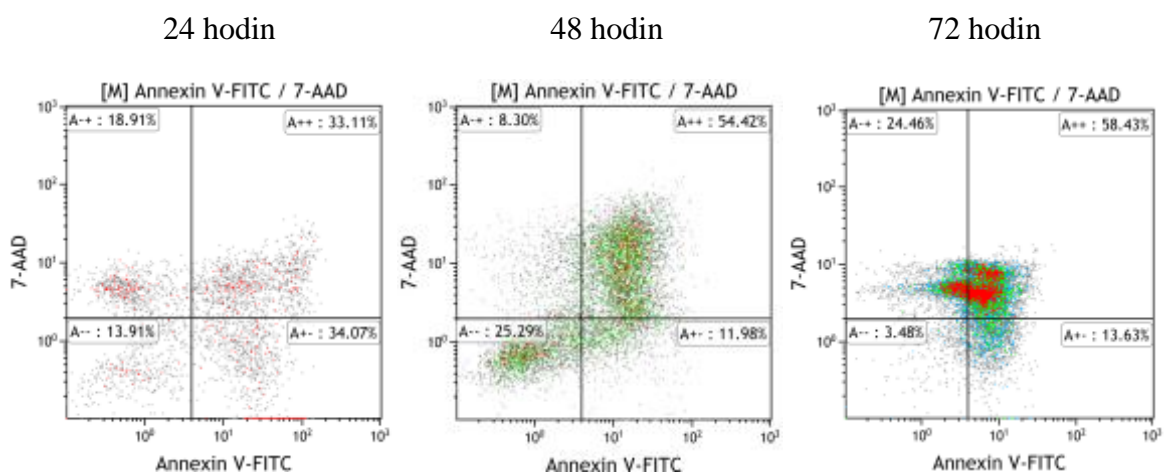
B) kontrolní vzorky - gateováno na populaci s menším FS profilem



C) vzorky stimulované IFN γ - gateováno na populaci s větším FS profilem



D) vzorky stimulované IFN γ - gateováno na populaci s menším FS profilem

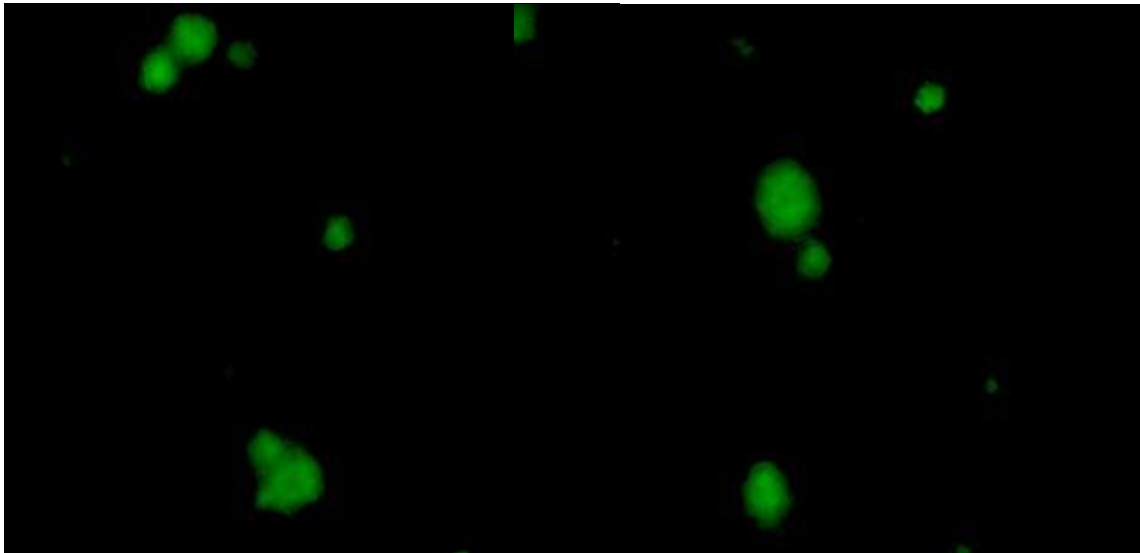


Obrázek 25: Stanovení životnosti jednotlivých populací THP-1 buněk pomocí značení Annexinem V a 7-AAD po stimulaci v čase 24, 48 a 72 hodin: A) kontrolní nestimulované buňky s větší velikostí, B) kontrolní nestimulované buňky s menší velikostí, C) THP-1 buňky s větší velikostí stimulované IFN γ [2 μ g/ml], D) THP-1 buňky s menší velikostí stimulované IFN γ [2 μ g/ml]. Gate - + představuje nekrotické buňky, ++ pozdně apoptické, - - živé a +- buňky časně apoptické.

Výsledek experimentu potvrdil hypotézu, že kalprotektin je po stimulaci vysokými koncentracemi IFN γ exprimován apoptickými buňkami.

5.6 Intracelulární versus extracelulární exprese kalprotektinu THP-1 buňkami po stimulaci IFN γ

V experimentu jsme se snažili ověřit hypotézu možného průchodu protilátky proti kalprotektinu skrz membránu apoptické THP-1 buňky po stimulaci IFN γ . Domněnky se nám nepodařilo potvrdit. Na snímku z fluorescenčního mikroskopu není jasně patrné, zda protilátka projde skutečně dovnitř buňky, neboť samotný kontrolní vzorek má vysokou autoflouescenci (způsobeno přítomností fenolové červeně v médiu, snímek není ukázán). Kit pro intracelulární značení buněk jsme neměli k dispozici.



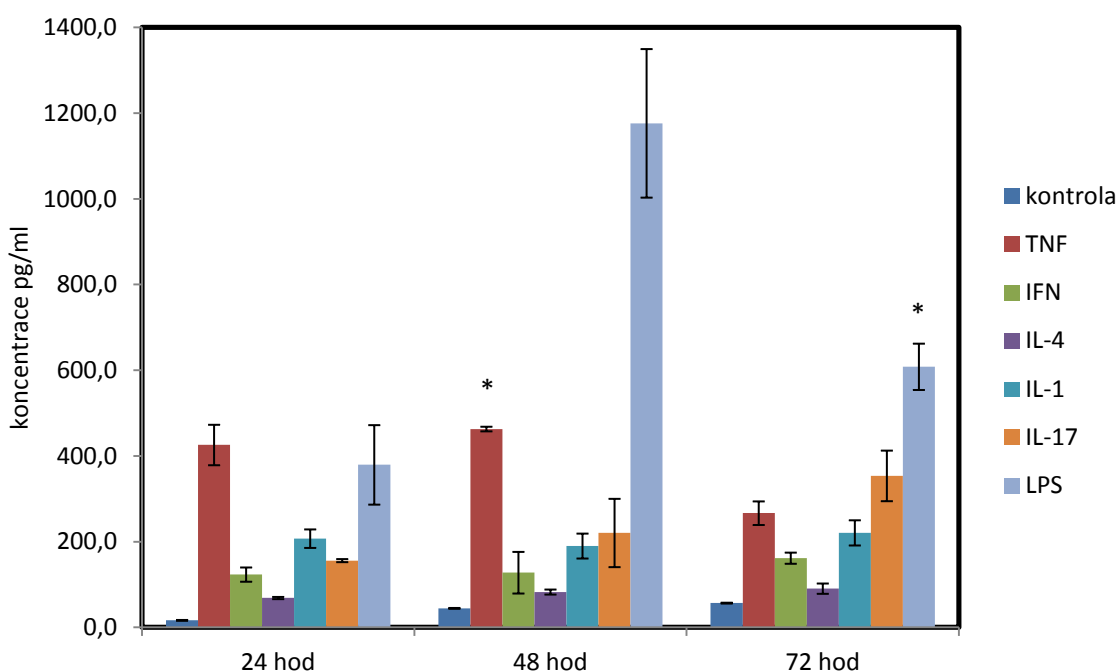
Obrázek 26: Snímek z fluorescenčního mikroskopu. Na obrázku THP-1 buňky stimulované IFN γ [2 μ g/ml] po 72 hodinové inkubaci. Buňky jsou značené protilátkou proti kalprotektinu (FITC).

5.7 Stanovení produkce IL-8 THP-1 buňkami po stimulaci

THP-1 buňky byly opět inkubovány se spektrem stimulans: LPS, IL-17 [100 ng/ml], TNF α , IL-1 β , IL-4, IFN γ [10 ng/ml]. Následně byly v čase 24, 48 a 72 hodin odebírány supernatanty, které sloužily ke stanovení chemokinu IL-8 metodou Luminex.

Ke zvýšení hladiny IL-8 v supernatantech docházelo po inkubaci se všemi použitými stimulans. Nejvyšší produkce tohoto chemokinu THP-1 buňkami bylo dosaženo po působení lipopolysacharidu ($p < 0,05$) a TNF α ($p < 0,05$). Produkce IL-8 po stimulaci LPS nabývala nejvyšších hodnot po 48 hodinové inkubaci (1176,4 pg/ml \pm 173,3). Po inkubaci s TNF α pak byla naměřená hladina chemokinu 463 pg/ml (SD \pm 5,4). Ostatní látky sice indukovaly expresi IL-8, ale toto zvýšení nebylo statisticky významné.

Produkce IL-8 po stimulaci THP1 buňkami



Graf 9: Produkce IL-8 po stimulaci THP-1 buněk v čase. Vynesené hodnoty jsou průměrem doubletu jednoho měření. Hladina IL-8 po stimulaci LPS byla změřena dvakrát, neboť při prvotním pokusu změřené hodnoty nespádaly do kalibrační řady. Symbol „*“ označuje hladinu signifikance $p < 0,05$.

6 Shrnutí výsledků

1. Zvýšená exprese molekuly CD54 na povrchu THP-1 buněk po stimulaci TNF α a IFN γ . Krevní monocyty měly oproti THP-1 buňkám vyšší expresi znaku bez použití stimulans. IFN γ rovněž zvyšoval průměrnou hodnotu intenzity fluorescence molekuly CD54 na monocytech.
2. Působením lipopolysacharidu došlo k inhibici exprese molekuly HLA-DR na monocytech. LPS však neměl vliv na inhibici molekuly HLA-DR přítomné na povrchu THP-1 buněk.
3. IFN γ zvyšoval expresi molekuly HLA-DR na THP-1 buňkách. Znak na izolovaných krevních monocytech neovlivňoval.
4. Procentuální nárůst CD36⁺ THP-1 buněk po stimulaci IL-4.
5. Zvýšení intenzity fluorescence molekuly CD14 na THP-1 buňkách po stimulaci IFN γ . Stimulace IFN γ bez vlivu na aktivaci membránové molekuly CD14 na monocytech.
6. THP-1 buňky bez exprese molekuly CD16. Na druhou stranu procento CD16⁺ monocytů narůstalo v jednotlivých inkubačních časech s největší indukcí po stimulaci IL-10.
7. IL-4 inhiboval expresi molekuly CD163 na monocytech. Exprese tohoto znaku na THP-1 buněčné linii nebyla hodnotitelná.
8. THP-1 buňky byly po působení vyšších koncentrací IFN γ ve zvýšené míře apoptické či nekrotické. Použití stejné koncentrace tohoto cytokinu nemělo vlivu na vitalitu izolovaných monocytů.
9. IFN γ zvyšoval expresi solubilního kalprotektinu v supernatantech THP-1 buněk.
10. Kalprotektin byl ve zvýšené míře exprimován u apoptických THP-1 buněk po stimulaci vyššími koncentracemi IFN γ .
11. LPS a TNF α aktivovaly produkci IL-8 THP-1 buňkami.

7 Diskuze

Hlavním cílem této práce bylo zjistit vliv jednotlivých stimulans na změnu exprese povrchových znaků přítomných na mononukleárních buňkách. Jako model byly použity THP-1 buňky a monocyty izolované z lidské periferní krve.

Jedním ze sledovaných povrchových znaků byla molekula **CD54**, která se nachází na endoteliálních buňkách a buňkách prezentujících antigen. Stimulací pomocí IFN γ a TNF α docházelo ke zvýšení CD54⁺ THP-1 buněk téměř na 100 %. Rovněž byl zaznamenán nárůst průměrné intenzity fluorescence oproti nestimulovaným buňkám. Maximálních hodnot bylo dosaženo po 12 hodinové inkubaci. Tento výsledek potvrzuje závěry in vitro studie, která dokazovala, že k aktivaci adhezivní molekuly CD54 dochází v prozánětlivých podmínkách. V prostředí IL-1, TNF α a IFN γ pak prokázala zvýšení exprese nejen povrchové molekuly CD54, ale i její solubilní formy buňkami endotelu (Rothlein *et al.*, 1988). V naší práci však očekávaná indukce po stimulaci s prozánětlivým cytokinem IL-1 β nebyla prokázána. Veya se svými spolupracovníky potvrdil aktivaci molekuly CD54 i na THP-1 buňkách po stimulaci IFN γ (Vey *et al.*, 1992). Protizánětlivý cytokin IL-10 neměl vliv na případnou inhibici exprese této adhezivní molekuly.

Oproti THP-1 buňkám byl na nestimulovaných krevních monocyttech znak CD54 zastoupen téměř 100 %. Ke zvýšení průměrné hodnoty intenzity fluorescence docházelo stejně jako u THP-1 buněk po stimulaci IFN γ . Toto zvýšení však nebylo statisticky významné. Ostatní použitá stimulans neindukovala změnu exprese.

Aktivace molekuly CD54 je spojena se zvýšenou adhezí leukocytů k buňkám endotelu a jejich následnou migrací do místa zánětu. Aktivovaný znak CD54 se na antigen prezentujících buňkách uplatňuje především jako kostimulační molekula pro bližší kontakt TCR receptoru s MHC.

Dalším sledovaným znakem byla molekula **HLA-DR**, která je významnou formou molekuly MHC II. třídy, jejímž hlavním úkolem je prezentace antigenních peptidů T lymfocytům. Molekula HLA-DR hraje nezastupitelnou roli v oblasti transplantační imunologie. Kompatibilita mezi dárcem a příjemcem v lokusech HLA-DR je významná v délce přežívání štěpu především u transplantace ledvin. Shoda je také nezbytná pro transplantaci kostní dřeně. Jak ukázala studie Havemana (Haveman *et al.*, 1999),

snížená exprese molekuly HLA-DR je spolehlivým prediktivním markerem pro vývoj sepse u pacientů po transplantaci jater. Pacienti, u kterých se rozvinula bakteriální sepe, měli po transplantaci méně než 30 % HLA-DR⁺ monocytů. Pokud měl pacient 7 dní po transplantaci méně než 50 % HLA-DR⁺ monocytů, měl 71% predikci k vývoji onemocnění. Na základě výsledků této studie jsme předpokládali, že pokud budeme buňky inkubovat s LPS, který je hlavní složkou vnější membrány gramnegativních bakterií, dosáhneme rovněž poklesu exprese znaku. Po 48 hodinové inkubaci monocytů s lipopolysacharidem došlo téměř k dvojnásobnému snížení průměrné hodnoty intenzity fluorescence molekuly HLA-DR oproti kontrolním vzorkům. Bylo zaznamenáno i nepatrné procentuální snížení počtu HLA-DR⁺ monocytů. Pokles však nebyl statisticky významný. Tento výsledek potvrdil i závěry další studie (*Yang et al., 2008*), ve které rovněž stimulovali monocyty in vitro s LPS se srovnatelným inhibičním výsledkem na expresi molekuly HLA-DR. Při působení LPS na THP-1 buňky nedocházelo k žádné inhibici exprese sledovaného znaku. Na druhou stranu jsme prokázali významnou stimulaci molekuly HLA-DR přítomné na THP-1 buňkách po působení IFN γ . K procentuálnímu zvýšení HLA-DR pozitivních buněk docházelo již po 12 hodinové inkubaci, a to dvojnásobně oproti kontrole na 47 % HLA-DR pozitivních buněk. Po 72 hodinách pak narostlo procento HLA-DR⁺ THP-1 buněk téměř na 90 %. Tyto výsledky potvrzují experimenty provedené již v roce 1989 (*Portillo et al., 1989*), kdy byla zjištěna indukce HLA-DR molekuly na THP-1 buňkách po inkubaci s interferonem gama. Jiná in vitro studie potvrdila zvyšující se expresi znaku HLA-DR po stimulaci IFN γ i u dalších nádorových buněčných linií jako například u buněk izolovaných z melanomu, gliomu, karcinomu kolonu či buněk izolovaných z karcinomu cervixu (*Carrel et al., 1985*). IFN γ v naší práci aktivoval expresi znaku pouze na THP-1 buňkách. Při působení na monocyty izolované z periferní krve neměl vliv na změnu exprese znaku.

Stimulace IFN γ měla dále významný vliv na expresi znaku **CD14** vázaného na membránách THP-1 buněk. Po 24 hodinové inkubaci bylo dosaženo zvýšení průměrné hodnoty intenzity fluorescence molekuly CD14 (téměř 2,5x více oproti kontrole). Při působení tohoto cytokinu na monocyty však k žádné aktivaci exprese nedošlo. Naše výsledky jsou srovnatelné se závěry jiné studie (*Tamai et al., 2003*), která navíc potvrdila společný synergický efekt IFN γ s LPS na zvýšenou expresi znaku CD14 ale i zvýšenou expresi TLR4 receptoru na povrchu THP-1 buněk.

Molekula CD14 slouží jako koreceptor pro vazbu bakteriálního lipopolysacharidu, který po vazbě aktivuje TLR-4. V naší práci jsme očekávali, že po stimulaci LPS dojde k aktivaci exprese znaku. Na monocitech izolovaných z periferní krve jsme dosáhli nepatrného zvýšení MFI po 48 hodinové stimulaci. Tento nárůst nebyl statisticky významný. Pro THP-1 buňky jsme po stimulaci IFN γ neprokázali žádnou změnu exprese znaku CD14. Tyto naše výsledky jsou v rozporu s dalšími studiemi. Například Landmann (*Landmann et al., 1996*) ve své práci prokázal, že po dvoudenní inkubaci monocytů s LPS dochází ke dvojnásobnému zvýšení hladiny membránové molekuly CD14. Ve své práci rovněž zaznamenal nárůst produkce solubilní formy tohoto znaku i CD14mRNA. Pro svůj experiment použil 3 modely: PBMC (mononukleární buňky periferní krve), purifikované monocity a monocity odvozené od makrofágů. Právě s PBMC dosáhl po stimulaci LPS nejnižší aktivace exprese znaku CD14. To může vysvětlovat neúspěch naší hypotézy, kdy inkubaci s LPS došlo pouze k nepatrné aktivaci exprese znaku.

Mezi další sledované znaky patřila molekula **CD36**. Tento scavenger receptor má velké množství ligandů (např. modifikované LDL, dlouhé řetězce mastných kyselin) a jeho zvýšená exprese může být důležitým aspektem reakce na zánětlivé či proaterosklerotické mediátory. V této práci žádná z použitých stimulans neměla vliv na změnu exprese znaku CD36 přítomného na monocitech. Na modelu THP-1 buněk jsme po stimulaci IL-4 zaznamenali procentuálnímu zvýšení exprese znaku oproti kontrole o 12 %. Cytokin IL-4 stimuluje in vitro vývoj monocytů směrem k dendritickým buňkám, in vivo pak především aktivaci M2 makrofágů. Exprese CD36 se in vitro zvyšuje právě během diferenciacie monocytů (*Huh et al., 1996*). Předpokládáme, že ke zvýšení exprese tohoto sledovaného znaku dochází právě z důvodů diferenciacie buněk.

V rámci grantu, díky kterému byla vypracována tato práce, se sledovala exprese znaku CD36 u pacientů po transplantaci ledvin, kdy pro následnou imunosupresivní léčbu byl nasazen Thymoglobulin nebo Simulect (Basiliximab). Změna exprese molekuly CD36 však nebyla prokázána (*Šekerková et al., článek v recenzním řízení*). V jiné studii Jiang a jeho spolupracovníci sledovali vliv imunosupresivní léčby právě na expresi znaku CD36 a následný rozvoj dyslipidémie u pacientů po transplantaci ledvin (*Jiang et al., 2011*). Protože CD36 molekula je ligandem pro LDL, předpokládá se vztah její zvýšené exprese k případnému výskytu dyslipidémie. Z výsledků této studie plyne, že právě imunosupresivní léčba může přispívat k rozvoji tohoto onemocnění, které je následně

vysokým rizikem pro rozvoj kardiovaskulárních komplikací a vývoje glomerulární aterosklerózy. Přispívá také k chronické vaskulární rejekci. Pacienti, kteří pro imunosupresivní léčbu užívali cyklosporinA (CsA) měli na rozdíl od imunosuprese pomocí tarkolinu (FK506) zvýšenou hladinu sérových lipidů. Koncentrace CsA pak pozitivně korelovala s hladinou LDL a expresí molekuly CD36.

Další pozorovanou molekulou byl receptor **CD16**. CD16⁺ monocyty patří mezi hlavní zdroje prozánětlivých cytokinů a doprovází mnohá zánětlivá onemocnění. V periferní krvi bylo průměrně naměřeno $4,4 \pm 1,9$ % CD16⁺ monocytů. Po izolaci těchto buněk docházelo v čase k postupnému nárůstu CD16⁺ populace. V čase 48 hodin bylo pro nestimulované kontroly zjištěno téměř 23 % CD16⁺ monocytů. Prozánětlivé stimuly neměly statisticky významný vliv na případnou další aktivaci exprese znaku. Na druhou stranu po působení protizánětlivého IL-10 jsme dosáhli po 48 hodinách zvýšení této pozitivní populace na 36 % (SD $\pm 10,7$). IL-10 je potenciálním induktorem diferenciaci M2 makrofágů. Wang ve své práci potvrdil aktivaci exprese molekuly CD16 na makrofázích po stimulaci tímto cytokinem. Dále prokázal, že IL-10 indukuje masivní apoptózu makrofágů. Pokud jsou však přítomné IgG protilátky, apoptóza není indukována a molekula CD16 na těchto buňkách umožňuje protilátkami zprostředkovanou buněčnou cytotoxicitu (*Wang et al., 2001*). Na základě výsledků této studie předpokládáme, že monocyty po stimulaci diferencují. Makrofágy se však vyznačují sníženou expresí CD14, ta se ale po stimulaci IL-10 neprokázala. THP-1 buněčná linie znak CD16 neexprimovala.

V rámci grantové studie se u pacientů po transplantaci ledvin rovněž dlouhodobě sledovala exprese znaku CD16 (nízkoafinitní receptor pro Fc část IgG protilátky). Obecně platí, že pacienti před transplantací mají zvýšené procento CD16⁺ monocytů (9,5 %) oproti kontrole (6,8 %, 13 dárců). Bezprostředně po transplantaci procento CD16⁺ monocytů klesá. Nejnižší hodnoty byly naměřené po 14 dnech od transplantace, kdy došlo k poklesu na 5,3 % pozitivních buněk. K úpravě počtu na základní hodnoty docházelo během následujících 2–3 měsíců. Jelikož jsou CD16⁺ monocyty silně prozánětlivé a jsou významným zdrojem prozánětlivých cytokinů, procentuální pokles CD16⁺ populace po transplantaci je způsoben imunosupresivní léčbou. Při užití léčby Simulectem byl pokles ještě nepatrně nižší oproti imunosupresi Thymoglobulinem (*Sekerková et al., článek v připomínkovém řízení*). Sledování znaku CD16 bylo později užitečným markerem pro sledování akutní rejekce u pacientů. V Německu byla provedena obdobná studie, kdy

rovněž sledovali hladinu prozánětlivých CD16⁺ monocytů u pacientů po transplantaci ledvin. Z výsledku této studie vyplývá, že zvýšené množství zánětlivých CD16⁺ monocytů je s vysokou pravděpodobností důležitým prediktorem pro vývoj aterosklerotických komplikací u pacientů po transplantaci ledvin (*Ulrich et al., 2008*).

Pro sledování molekuly **CD163** jsme použili dva klony monoklonálních protilátek (CD163GHI, CD163RM3). Tyto klony se liší místem vazby na tuto molekulu. CD163GHI se váže na SRCR doménu 7, CD163RM3 na SRCR doménu 9. Molekula CD163 je specifickým znakem pro populace monocyto-makrofágových buněk. V různých studiích můžeme vidět odlišnou povrchovou expresi znaku. Maniecki se svými spolupracovníky zabýval tímto možným procentuálním rozdílem mezi jednotlivými klony. Z výsledku této studie vyplývá, že vazba protilátky závisí na přítomnosti vápníku a typu použitého koagulancia. Protilátka anti-CD163GHI nevykazuje v přítomnosti vápníku vazbu. Při použití heparinu dále dochází k výraznějšímu poklesu vzniku možné vazby. Protilátka anti-CD163RM3 se naopak vyznačuje slabou vazbou k CD163 v nepřítomnosti vápníku a silnou afinitou v jeho přítomnosti (*Maniecki et al., 2011*). Kultivační médium RMPI, ve kterém byly inkubovány monocyty a THP-1 buňky obsahuje vápenaté ionty. Tato skutečnost může přispívat k procentuálnímu rozdílu detekovaných CD163⁺ monocytů při použití daných klonů monoklonálních protilátek. Právě v případě klonu RM3 jsme po izolaci a inkubaci zjistili téměř 100% zastoupení znaku. U klonu GHI jsme dosáhli mnohem nižšího procentuálního zastoupení CD163⁺ monocytů. V čase 24 hodin to bylo průměrně kolem 9 % CD163⁺ monocytů pro nestimulované kontrolní vzorky. Tyto výsledky dále potvrzují i závěry Moniuszka a týmů jeho spolupracovníků, kteří ve své práci rovněž sledovali změnu exprese znaku s použitím rozdílných antikoagulants, ale také vliv na změnu exprese po izolaci monocytů pomocí hustotního gradientu. Ve své studii sledovali právě klon protilátky anti-CD163GHI. Po izolaci monocytů pomocí hustotního gradientu se vazba protilátky na molekulu CD163 vytrácela. Po izolaci naměřili pouze 6,5 % ($\pm 18,3$ %) CD163⁺ monocytů, což odpovídá našim naměřeným výsledkům (*Moniuszko et al., 2006*).

Molekula CD163 je obecně charakteristická svými protizánětlivými vlastnostmi. Očekávali jsme tedy, že po stimulaci s prozánětlivými stimulans dojde k poklesu exprese znaku a naopak že při působení protizánětlivého IL-10 zaznamenáme aktivaci tohoto

transmembránového proteinu (CD163). Podle našich předpokladů IL-4 inhiboval expresi znaku na monocytech. Tento efekt byl nejlépe patrný při použití klonu CD163GHI. Po 24 hodinové inkubaci s tímto cytokinem bylo zaznamenáno procentuální snížení pozitivní populace monocytů téměř 2,5x. V čase 48 hodin bylo dosaženo téměř 4x menšího procentuálního zastoupení CD163⁺ monocytů oproti nestimulované kontrole. Při použití klonu CD163RM3 nebyl efekt IL-4 natolik výrazný. Další použité prozánětlivé stimuly expresi znaku neovlivňovali. Naopak protizánětlivý IL-10 indukoval expresi znaku při použití obou klonů. Toto zvýšení však nebylo statisticky významné.

Expresie znaku CD163 byla v rámci grantu uskutečněného v naší laboratoři měřena u pacientů po transplantaci ledvin. Pro studii byl použit klon monoklonální protilátky CD163GHI. Hladina protizánětlivých CD163⁺ monocytů před transplantací byla téměř srovnatelná se zdravými kontrolami. Průměrně bylo naměřeno 12,8 % CD163⁺ monocytů. Toto procento je nižší oproti kontrolním vzorkům měřených v rámci vypracování této diplomové práce. Tento posun je pravděpodobně zapříčiněn nižším počtem kontrolních vzorků oproti grantové studii. U pacientů po transplantaci docházelo během prvních 14 dnů k výraznému procentuálnímu nárůstu CD163⁺ monocytů, který je způsoben vlivem imunosupresivní léčby. Po 14 dnech po transplantaci měli pacienti léčení Simulectem průměrně 76,7 % CD163⁺ monocytů. Při imunosupresi Thymoglobulinem bylo zaznamenáno zvýšení populace na 52,2 % pozitivních buněk. Ještě devadesát dní po transplantaci si pacienti při použití obou typů imunosupresiv zachovávali vysoké procento těchto protizánětlivých monocytů. Procento CD163⁺ monocytů výrazněji kleslo až po 9 měsících od transplantace (Thymoglobulin 22,5% CD163⁺ monocytů, Simulect 38,2 % CD163⁺ monocytů) (*Sekerková et al., článek v recenzním řízení*).

IL-8 je významný chemokin jehož hlavním úkolem je chemotaxe polymorfonukleárů do místa zánětu. Tento cytokin je produkován celou škálou buněk v odpovědi na zánětlivé faktory jako je IL-1, LPS či TNF (*Marie et al., 1999*). V naší práci jsme z odebraných supernatantů stimulovaných THP-1 buněk měřili produkci tohoto chemokinu. Naše měření potvrdilo aktivaci produkce IL-8 po působení prozánětlivými stimuly. Nejvyšší aktivace bylo dosaženo pomocí LPS, což potvrzuje výsledky předchozích studií (*například Baqui et al., 1999*). K statisticky významnému zvýšení došlo i po působení TNF α . Cytokiny IL-1 β a IFN γ produkci tohoto chemokinu indukovaly minimálně.

Ze supernatantů stimulovaných THP-1 buněk jsme dále stanovovali produkci solubilního **kalprotektinu**. Jeho zvýšená koncentrace může být užitečným ukazatelem pro predikci akutní rejekce po transplantaci. V klinické praxi se hladina kalprotektinu stanovuje již rutinně ve stolici, kdy zvýšená koncentrace koreluje s výskytem zánětlivých onemocnění střev (*Tibble et Bjarnason, 2001*). V našem experimentu kontrolní vzorky dosahovaly průměrně koncentrace 5,4 ng/ml. Referenční hodnoty pro přítomnost kalprotektinu v krevní plazmě se pohybují pro muže v rozmezí 50 – 910 ng/ml. Musíme si však uvědomit, že hlavním zdrojem solubilního kalprotektinu jsou především neutrofilové granulocyty, nikoliv monocyty. Po stimulaci THP-1 buněk docházelo po 72 hodinové inkubaci s IFN γ k výraznému nárůstu produkce kalprotektinu (22,3 ng/ml, $p < 0,001$). Ze závěrů jiných studií vyplývá, že uvolňování kalprotektinu z buňky je způsobeno především aktivací buňky v důsledku apoptózy či nekrózy. Zvýšená hladina tedy koreluje se sníženou viabilitou polymorfonukleárních leukocytů (*Naess-Andresen et al, 1995*). Z našeho měření víme, že právě po působení IFN γ o vyšší koncentraci je většina THP-1 buněk po 72 hodinové inkubaci v apoptóze. Můžeme tedy shrnout, že produkce solubilního kalprotektinu po stimulaci tímto cytokinem je zapříčiněná právě sníženou životností THP-1 buněk.

Užití stejné koncentrace IFN γ nemělo v experimentech vliv na vitalitu izolovaných monocytů. Je důležité mít na paměti, že THP-1 jsou buňky leukemické a mají tedy některé vlastnosti odlišné oproti monocytům izolovaným ze zdravého dárce. Tím si vysvětlujeme, proč zvolená koncentrace IFN γ snižovala vitalitu THP-1 buněk, zatímco životnost monocytů nebyla ovlivněna.

Na základě výsledků zvýšené produkce solubilního kalprotektinu po stimulaci IFN γ jsme rovněž sledovali změnu exprese membránového kalprotektinu. Kontrolní vzorky exprimovaly kalprotektin na svém povrchu minimálně. V případě stimulace IFN γ došlo po 48 hodinové inkubaci k výraznému zvýšení kalprotektinu pozitivních THP-1 buněk (po 48 hodinách bylo naměřeno téměř 34 % pozitivních buněk a v čase 72 hodin dokonce 69 %). Z profilu SS/FS THP-1 buněk víme, že se tyto leukemické monocyty dělí na dvě populace buněk lišící se svou velikostí (majoritní populace THP-1 s větší velikostí a minoritní populace s menším profilem FS). Právě při působení IFN γ docházelo k výraznému posunu THP-1 buněk směrem k minoritní populaci, proto jsme zažetovali jednotlivé populace a pro každou z populací znovu vyhodnotili expresi povrchového kalprotektinu. THP-1 s větší velikostí vykazovaly stejně nízkou povrchovou expresi

sledovaného znaku jako nestimulované kontrolní buňky. Naproti tomu populace buněk s menší velikostí vykazovala vysoké procento buněk pozitivních na kalprotektin. Dalším úkolem bylo zjistit životnost jednotlivých populací THP-1 buněk. Předpokládali jsme, že menší buňky mají sníženou vitalitu. Pro tento pokus nám posloužilo barvení pomocí Annexinu V, které nám umožnilo posoudit, v jakém stavu se buňky nacházejí. Hypotéza, že menší buňky jsou mrtvé, se potvrdila. Přibližně 70 % těchto menších buněk se nacházelo v apoptóze a kolem 20 % v nekróze. Víme tedy, že kalprotektin je produkován a exprimován ve větší míře apoptickými buňkami. Je však vysoce pravděpodobné, že membrána buňky, která je stimulovaná IFN γ o vyšších koncentracích (> 100 ng/ml), je už natolik poškozená, že protilátka proti kalprotektinu projde dovnitř buňky a ve výsledku tedy značíme kalprotektin intracelulárně.

8 Závěr

Při modulaci fenotypu THP-1 buněk a monocytů izolovaných z lidské periferní krve jsme zjistili některé odlišnosti v povrchové expresi membránových molekul mezi těmito dvěma modely. Hlavní rozdíly jsme prokázali po stimulaci IFN γ , po jehož působení docházelo k aktivaci molekuly HLA-DR a CD14 na THP-1 buněčné linii. Změna exprese těchto znaků však na membránách monocytů nebyla zaznamenána. Vysoké koncentrace interferonu gama navíc významně snižovaly vitalitu THP-1 buněk, kdy úměrně se sníženou životností buněk rostla exprese kalprotektinu. Mezi další sledované povrchové znaky patřily molekuly CD54, CD16, CD36 a CD163. Právě detekce znaků CD16 či CD163 na membránách monocytů se ukazuje jako možný diagnostický marker pro nástup akutní rejekce u pacientů po transplantaci.

9 Seznam zkratek

7-AAD	7-aminoactinomycin D
ADCC	Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity; buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
APC	Antigen presenting cell; buňka prezentující antigen
ApoB	Apolipoprotein B
Bax	Bcl-2 associated X protein
BIGH3=TGFB1	Transforming growth factor beta induced protein; protein indukující transformující růstový faktor beta
CCR	Chemokine receptor; chemokinový receptor
CD	Cluster of differentiation; diferenciační antigen
CDP	Common dendritic progenitor; běžný dendritický progenitor
CKD	Chronic kidney disease; chronické onemocnění ledvin
CLRs	C-type lectin receptors; receptory C-lektinového typu
CMP	Common myeloid progenitor; běžný myeloidní progenitor
CO	Carbon monoxide; oxid uhelnatý
CRP	C-reactive protein, C-reaktivní protein
DC	Dendritic cell, dendritická buňka
ECD	Electron Coupled Dye (PE-Texas Red)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid; kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, enzymová imunoanalýza na pevné fázi
FBS	Fetal bovine serum, fetální bovinní sérum
FcγR	Fc gamma receptor
FGF	Fibroblast growth factor; růstový faktor fibroblastů
FITC	Fluorescein thioisocyanate, fluorescein thioisokyanát
FS	Forward scatter; přední rozptyl
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
GMP	Granulocytes and macrophages progenitor; progenitor granulocytů a makrofágů
GPCRs	G protein coupled receptors; receptory vázané s G proteiny
GPI	Glycophosphatidylinositol; glykofosfatidylinositol
GSH	Glutathione; glutathion
Hb	Hemoglobin

HLA	Human leukocyte antigen; lidský leukocytární antigen
Hp	Haptoglobin
HSC	Hematopoietic stem cell; hematopoetická kmenová buňka
ICAM	Intercellular adhesion molecule; mezibuněčná adhezivní molekula
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
LBP	Lipopolysaccharide binding protein; protein vázající lipopolysacharid
LDL	Low density lipoprotein; lipoprotein s nízkou hustotou
LFA	Lymphocyte function associated antigen; adhezivní molekula leukocytů
LIGHT (TNFSF14)	TNF ligand superfamily member 14; ligand patřící do rodiny TNF
LPS	Lipopolysaccharide, lipopolysacharid
Mac-1	Membrane attack komplex type 1; komplex typu 1 atakující membránu
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1; chemotaktický protein-1 monocytů
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor; faktor stimulující kolonie makrofágů
MDP	Macrophage dendritic cell progenitor; makrofágovo-dendritický progenitor
MF	Macrophages; makrofágy
MFI	Mean intensity fluorescence; průměrná intenzita fluorescence
MHC	Major histocompatibility complex; hlavní histokompatibilní komplex
MLR	Mixed lymphocytes reaction; směsná lymfocytární reakce
MPO	Myeloperoxidase; myeloperoxidáza
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural killer cells; NK buňky
NLRs	Nod-like receptors; receptory podobné Nod
NO	Nitric oxide; oxid dusnatý
Nod	Nucleotide-binding oligomerization domain; doména vázající oligomerní nukleotid
NOS	Nitric oxide synthase; syntéza oxidu dusnatého
PAF	Platelet activating factor; faktor aktivující destičky
PBS	Phosphate buffered saline; fosfátový pufr
PE	Phycoerythrin; fykoeritrin
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ ; receptor γ aktivovaný proliferací peroxisomu
PRR	Pattern recognition receptor; receptor rozpoznávající vzor
PS	Phosphatidylserine; fosfatidyl serin

RA	Rheumatoid arthritis; revmatoidní artritida
RIG	Retinoic acid-inducible gene; inducibilní gen kyseliny retinové
RLRs	RIG-like receptors; receptory podobné RIG
ROS	Reactive oxygen species; reaktivní formy kyslíku
SD	Standard deviation; směrodatná odchylka
SrcR	Scavenger receptor cystein-rich superfamily; scavenger receptor s rodiny bohaté na cystein
SS	Side scatter; boční rozptyl
TAM	Tumor associated macrophages; makrofágy asociované s nádorem
TCR	T cell receptor; T buněčný receptor
TGF	Transforming growth factor; transformující růstový faktor
Tie2	Angiopoietin receptor 2
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor; faktor nekrotizující nádory
TWEAK	TNF related weak inducer of apoptosis; slabý induktor apoptózy příbuzný TNF
VCAM	Vascular cell adhesion molecule; adhezivní molekula cévní buňky
VEGF	Vascular endothelial growth factor; růstový faktor cévního endotelu
VLA-4	Very late antigen 4; velmi pozdní antigen 4

10 Seznam použité literatury

Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol.* 2002;72(1):101-106.

Akiyama Y, Miller PJ, Thurman GB, et al. Characterization of a human blood monocyte subset with low peroxidase activity. *The Journal of clinical investigation.* 1983;72(3):1093-1105.

Ancuta P, Kunstman KJ, Autissier P, et al. CD16+ monocytes exposed to HIV promote highly efficient viral replication upon differentiation into macrophages and interaction with T cells. *Virology.* 2006;344(2):267-276.

Ancuta P, Rao R, Moses A, et al. Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16+ Monocytes. *The Journal of Experimental Medicine.* 2003;197(12):1701-1707.

Anthony RM, Urban JF, Alem F, et al. Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nature Medicine.* 2006;12(8):955-960.

Anonym (2013a): Immunoweb home page: <http://www.immunoweb.com/images/Macrophage.htm> (6.4.2013)

Anonym (2013b): Biocompare home page: <http://www.biocompare.com/Application-Notes/118624-Human-PBMC-Isolation-and-Counting-Using-the-Scepter-2-0-Handheld-Automated-Cell-Counter/> (7.4.2013)

Anonym (2013c): Progen biotechnik home page: <http://www.progen.de/en/multiplex-technology/luminex-technology.html> (4.1.2013)

Asch AS, Barnwell J, Silverstein RL, Nachman RL. Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *The Journal of clinical investigation.* 1987;79(4):1054-1061.

Baqui AA, Meiller TF, Falkler WA. Enhanced interleukin-8 production in THP-1 human monocytic cells by lipopolysaccharide from oral microorganisms and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Oral microbiology and immunology.* 1999;14(5):275-280.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood.* 1996;87(8):3336-3343.

Bartůňková J, Paulíková J, Paulík M. *Výšetrovací metody v imunologii.* 2.vyd. Praha:Grada,2011:68-69.

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of Pathology.* 2002;196(3):254-265.

Bover LC, Cardó-Vila M, Kuniyasu A, et al. A Previously Unrecognized Protein-Protein Interaction between TWEAK and CD163: Potential Biological Implications. *The Journal of Immunology*. 2007;178(12):8183-8194.

Carrel S, Schmidt-Kessen A, Giuffrè L. Recombinant interferon- γ can induce the expression of HLA-DR and -DC on DR-negative melanoma cells and enhance the expression of HLA-ABC and tumor-associated antigens. *European Journal of Immunology*. 1985;15(2):118-123.

Coraci IS, Husemann J, Berman JW, et al. CD36, a Class B Scavenger Receptor, Is Expressed on Microglia in Alzheimer's Disease Brains and Can Mediate Production of Reactive Oxygen Species in Response to β -Amyloid Fibrils. *The American Journal of Pathology*. 2002;160(1):101-112.

Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *The Journal of cell biology*. 1997;138(3):707-717.

Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2009;29(6):313-326.

Dinapoli MR, Calderon CL, Lopez DM. The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduce expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *J Exp Med*. 1996;183(4):1323-1329.

Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006;80(6):1298-1307.

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(4):890-898.

Fagerhol MK, Dale I, Anderson T. Release and Quantitation of a Leucocyte Derived Protein (L1). *Scandinavian Journal of Haematology*. 1980;24(5):393-398.

Feng J, Han J, Pearce SFA, et al. Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR- γ . *Journal of Lipid Research*. 2000;41(5):688-696.

Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood*. 1996;87(1):373-377.

Gerber JS, Mosser DM. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *Journal of immunology*. 2001;166(11):6861-6868.

Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Vallespi T, Brunning R, Mufti GJ. Morphological evaluation of monocytes and their precursors. *Haematologica*. 2009;94(7):994-997.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews. Immunology*. 2005;5(12):953-964.

Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*. 2001;69(1):11-20.

Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H-D, Ernst M. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64+ / CD16+ blood monocytes. *European Journal of Immunology*. 2001;31(1):48-56.

Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, et al. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. *Scandinavian journal of immunology*. 2001;53(4):386-392.

Handin RI, Lux SE, Stossel TP. *Blood: principles and practice of hematology*. 2nd ed. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams, 2003:462-463.

Haveman JW, van den Berg AP, van den Berk JM, et al. Low HLA-DR expression on peripheral blood monocytes predicts bacterial sepsis after liver transplantation: relation with prednisolone intake. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 1999;1(3):146-152.

Helming L, Winter J, Gordon S. The scavenger receptor CD36 plays a role in cytokine-induced macrophage fusion. *Journal of cell science*. 2009;122(4):453-459.

Herveg JP: Genemol home page: <http://genemol.org/genemol/pictures/TRL4.jpg> (4.1.2013)

Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *Journal of immunology*. 2001;167(11):6533-6544.

Huh HY, Pearce SF, Yesner LM, Schindler JL, Silverstein RL. Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood*. 1996;87(5):2020-2028.

Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature immunology*. 2000;1(6):510-514.

Chow A, Brown BD, Merad M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nature reviews. Immunology*. 2011;11(11):788-798.

Iwahashi M, Yamamura M, Aita T, et al. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(5):1457-1467.

Jiang Y, Xie XB, Peng LK, et al. Dyslipidemia in Human Kidney Transplant Recipients Receiving Cyclosporine and Tacrolimus is Associated With Different Expression of CD36 on Peripheral Blood Monocytes. *Transplantation proceedings*. 2011;43(5):1612-1615.

Kaushansky K, Williams JW. *Williams hematology*. 8th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2010, část 8, kapitola 67.

Kligman D, Hilt DC. The S100 protein family. *Trends in biochemical sciences*. 1988;13(11):437-443.

Kowal K, Silver R, Slawinska E, Bielecki M, Chyczewski L, Kowal-Bielecka O. CD163 and its role in inflammation. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*. 2011;49(3):365-374.

Krakauer T, Oppenheim JJ. Interleukin 1 production by a human acute monocytic leukemia cell line. *Cellular immunology*. 1983;80(2):223-229.

Landmann R, Knopf HP, Link S, Sansano S, Schumann R, Zimmerli W. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*. 1996;64(5):1762-1769.

Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological reports*. 2009;61(1):22-32.

Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med*. 2001;193(6):727-740.

Loke Pn, Gallagher I, Nair MG, et al. Alternative Activation Is an Innate Response to Injury That Requires CD4+ T Cells to be Sustained during Chronic Infection. *The Journal of Immunology*. 2007;179(6):3926-3936.

Loomans HJ, Hahn BL, Li QQ, Phadnis SH, Sohnle PG. Histidine-based zinc-binding sequences and the antimicrobial activity of calprotectin. *The Journal of infectious diseases*. 1998;177(3):812-814.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(1):175-184.

Madsen M, Møller HJ, Nielsen MJ, et al. Molecular Characterization of the Haptoglobin-Hemoglobin Receptor CD163: Ligand binding properties of the scavenger receptor cysteine-rich domain region. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(49):51561-51567.

Mahnke K, Bhardwaj R, Sorg C. Heterodimers of the calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 are expressed on the surface of human monocytes upon adherence to fibronectin and collagen. Relation to TNF-alpha, IL-6, and superoxide production. *Journal of Leukocyte Biology*. 1995;57(1):63-71.

Maniecki MB, Etzerodt A, Moestrup SK, Moller HJ, Graversen JH. Comparative assessment of the recognition of domain-specific CD163 monoclonal antibodies in human monocytes explains wide discrepancy in reported levels of cellular surface CD163 expression. *Immunobiology*. 2011;216(8):882-890.

Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology today*. 1992;13(7):265-270.

- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 2002;23(11):549-555.
- Marie C, Roman-Roman S, Rawadi G. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in interleukin-8 production by human monocytes and polymorphonuclear cells stimulated with lipopolysaccharide or Mycoplasma fermentans membrane lipoproteins. *Infect Immun*. 1999;67(2):688-693.
- Martín-Fuentes P, Civeira F, Recalde D, et al. Individual Variation of Scavenger Receptor Expression in Human Macrophages with Oxidized Low-Density Lipoprotein Is Associated with a Differential Inflammatory Response. *The Journal of Immunology*. 2007;179(5):3242-3248.
- Mehta K, Lopez-Berestein G. Expression of tissue transglutaminase in cultured monocytic leukemia (THP-1) cells during differentiation. *Cancer research*. 1986;46(3):1388-1394.
- Merino A, Buendia P, Martin-Malo A, Aljama P, Ramirez R, Carracedo J. Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *Journal of immunology*. 2011;186(3):1809-1815.
- Miyagawa B, Klingemann HG. Phagocytosis and burst activity of granulocytes and monocytes after stem cell transplantation. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1997;129(6):634-637.
- Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2003;73(2):209-212.
- Mosser DM, Edwards PE. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(12):958-969.
- Moniuszko M, Kowal K, Rusak M, Pietruczuk M, Dabrowska M, Bodzenta-Lukaszyk A. Monocyte CD163 and CD36 expression in human whole blood and isolated mononuclear cell samples: influence of different anticoagulants. *Clinical and vaccine immunology*. 2006;13(6):704-707.
- Murao S, Collart FR, Huberman E. A protein containing the cystic fibrosis antigen is an inhibitor of protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(14):8356-8360.
- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(11):723-737.
- Naess-Andresen CF, Egelanddal B, Fagerhol MK. Calcium binding and concomitant changes in the structure and heat stability of calprotectin (L1 protein). *Clinical molecular pathology*. 1995;48(5):278-284.
- Newton RA, Thiel M, Hogg N. Signaling mechanisms and the activation of leukocyte integrins. *J Leukoc Biol*. 1997;61(4):422-426.

Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989;74(7):2527-2534.

Penka M, Slavičková M, Slaviček M. *Hematologie a transfúzní lékařství*. 1. vydání Praha: Grada,2011:23-24

Portillo G, Turner M, Chantry D, Feldmann M. Effect of cytokines on HLA-DR and IL-1 production by a monocytic tumour, THP-1. *Immunology*. 1989;66(2):170-175.

Reese TA, Liang HE, Tager AM, et al. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature*. 2007;447(7140):92-96.

Robinson MJ, Tessier P, Poulsom R, Hogg N. The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(5):3658-3665.

Rogacev KS, Seiler S, Zawada AM, et al. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *European heart journal*. 2011;32(1):84-92.

Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*. 1994;180(1):83-93.

Rommeley M, Spies-Weisshart B, Schilling K, Hochhaus A, Sayer HG, Scholl S. Reconstitution and functional analyses of neutrophils and distinct subsets of monocytes after allogeneic stem cell transplantation. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2011;137(9):1293-1300.

Rothlein R, Czajkowski M, O'Neill MM, Marlin SD, Mainolfi E, Merluzzi VJ. Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. *Journal of immunology*. 1988;141(5):1665-1669.

Rowley, Flow Cytometry: A Survey and the Basics. Labome home page: <http://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html> (5.1.2013)

Saionji K, Ohsaka A. Expansion of CD4⁺CD16⁺ blood monocytes in patients with chronic renal failure undergoing dialysis: possible involvement of macrophage colony-stimulating factor. *Acta haematologica*. 2001;105(1):21-26.

Santhanagopalan V, Hahn BL, Sohnle PG. Resistance of zinc-supplemented *Candida albicans* cells to the growth inhibitory effect of calprotectin. *The Journal of infectious diseases*. 1995;171(5):1289-1294.

Shantsila E, Wrigley B, Tapp L, et al. Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2011;9(5):1056-1066.

Sekerková A, Kryštůfková E, Brabcová E. CD14⁻CD16⁺ and CD14⁺CD16³⁺ monocyte subpopulations in kidney allograft transplantation. *Článek v recenzním řízení*.

- Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Science signaling*. 2009;2(72):re3.
- Song E, Ouyang N, Horbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cellular immunology*. 2000;204(1):19-28.
- Sordet O, Rébé C, Plenchette S, et al. Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood*. 2002;100(13):4446-4453.
- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. 1992;176(1):287-292.
- Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet*. 1990;336(8718):763-765.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: II. Functional properties in vitro. *The Journal of Experimental Medicine*. 1974;139(2):380-397.
- Tamai R, Sugawara S, Takeuchi O, Akira S, Takada H. Synergistic effects of lipopolysaccharide and interferon- γ in inducing interleukin-8 production in human monocytic THP-1 cells is accompanied by up-regulation of CD14, Toll-like receptor 4, MD-2 and MyD88 expression. *Journal of Endotoxin Research*. 2003;9(3):145-153.
- Tibble JA, Bjarnason I. Non-invasive investigation of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2001;7(4):460-465.
- Triques K, Stevenson M. Characterization of restrictions to human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes. *Journal of virology*. 2004;78(10):5523-5527.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 1980;26(2):171-176.
- Ulrich C, Heine GH, Gerhart MK, Kohler H, Girndt M. Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008;8(1):103-110.
- van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*. 1968;128(3):415-435.
- van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*. 1972;46(6):845-852.

Vey E, Zhang JH, Dayer JM. IFN-gamma and 1,25(OH)2D3 induce on THP-1 cells distinct patterns of cell surface antigen expression, cytokine production, and responsiveness to contact with activated T cells. *Journal of immunology*. 1992;149(6):2040-2046.

Voganatsi A, Panyutich A, Miyasaki KT, Murthy RK. Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. *J Leukoc Biol*. 2001;70(1):130-134

Wang ZQ, Bapat AS, Rayanade RJ, Dagtas AS, Hoffmann MK. Interleukin-10 induces macrophage apoptosis and expression of CD16 (Fc gamma RIII) whose engagement blocks the cell death programme and facilitates differentiation. *Immunology*. 2001;102(3):331-337.

Wirthmueller U, Kurosaki T, Murakami MS, Ravetch JV. Signal transduction by Fc gamma RIII (CD16) is mediated through the gamma chain. *The Journal of Experimental Medicine*. 1992;175(5):1381-1390.

Yang HM, Yu Y, Chai JK, Hu S, Sheng ZY, Yao YM. Low HLA-DR expression on CD14+ monocytes of burn victims with sepsis, and the effect of carbachol in vitro. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 2008;34(8):1158-1162.

Yesner LM, Huh HY, Pearce SF, Silverstein RL. Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996;16(8):1019-1025.

Zawada AM, Rogacev KS, Schirmer SH, et al. Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology*. 2012;217(12):1273-1284.

Zhao C, Tan YC, Wong WC, et al. The CD14+/lowCD16+ monocyte subset is more susceptible to spontaneous and oxidant-induced apoptosis than the CD14+CD16- subset. *Cell Death & Disease*. 2010;1(11). e95

Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunology today*. 1993;14(3):121-125.

Ziegler-Heitbrock HWL, Fingerle G, Ströbel M, et al. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *European Journal of Immunology*. 1993;23(9):2053-2058.

Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007;81(3):584-592.

Zwadlo G, Schlegel R, Sorg C. A monoclonal antibody to a subset of human monocytes found only in the peripheral blood and inflammatory tissues. *The Journal of Immunology*. 1986;137(2):512-518.