

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Hana Kubátová

Adheze monocytů na endotel *in vitro*

Monocyte adhesion on the endothelium *in vitro*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Ivana Králová Lesná, Ph.D.

Praha, 2017

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, 28. 4. 2017

Podpis:

Hana Kubátová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce MUDr. Ivaně Králové Lesné, Ph.D. za vedení diplomové práce, laskavý přístup a cenné rady. Také bych ráda velmi poděkovala Prof. Ing. Rudolfu Polednemu, CSc. za obětavé odborné konzultace a Mgr. Soně Čejkové, Ph.D. za uvedení do problematiky a seznámení s výzkumným prostředím a v neposlední řadě doc. RNDr. Stanislavu Vybíralovi, CSc., který mě poprvé zavedl do IKEM. Velký dík patří mé rodině a přátelům za neuvěřitelnou trpělivost, podporu a pochopení, kterými mě zahrnovali během celého studia a také Janu Bartuškoví, který se velkou měrou podílel na statistickém zpracování dat a tištění dokumentů a byl mi během psaní práce velkou oporou.

Abstrakt

Kardiovaskulární choroby jsou celosvětově nejčastější příčinou úmrtí. Studium faktorů ovlivňujících iniciaci a rozvoj aterosklerózy a následně jejích komplikací, napomáhá lepšímu porozumění vzniku této choroby a hledání vhodných způsobů léčby. Iniciálním krokem rozvoje aterosklerózy je adheze monocytů na endoteliální povrch. Cílem této práce bylo zavést a otestovat *in vitro* model adheze monocytů na endotel a vyhodnotit výsledky dvěma metodami – měřením intenzity fluorescenčního signálu a počítáním adherovaných buněk v zorném poli. V tomto modelu byly využity endoteliální buňky stimulované TNF- α , cytokinem zvoleným vzhledem ke známému efektu na aktivaci endotelu a expresi adhezních molekul. Nejnižší koncentrace TNF- α zvyšující procento adheze THP-1 monocytů na endoteliální buňky ve srovnání s negativní kontrolou byla 1 ng TNF- α /ml. Optimální koncentrace TNF- α zvyšující procento adheze THP-1 monocytů na endoteliální buňky byla 10 ng TNF- α /ml. Vliv TNF- α na zvýšení adheze THP-1 monocytů se projevil už po 5 minutách koinkubace s HUVEC. Optimální doba koinkubace THP-1 monocytů s HUVEC byla 30 – 40 minut při použití 10 ng TNF- α /ml. Kromě koncentrace TNF- α a doby koinkubace měl na procento adheze vliv i počet přidanych THP-1 monocytů. Byl optimalizován model adheze monocytů na endotel *in vitro* a výsledky vyhodnoceny dvěma metodami.

Klíčová slova: monocyty, endotel, adheze

Abstract

Cardiovascular diseases are the major causes of death worldwide. Studying factors leading to initiation and progression of atherosclerosis and its complications leads to a better understanding of underlying mechanisms of this disease and to development of novel treatments. Adhesion of monocytes on the endothelial surface is the initial step of atherosclerosis. The main aim of this study was to establish and test an *in vitro* model of monocyte adhesion on the endothelial cells and to evaluate the results by means of two methods – measuring the fluorescence signal intensity and counting adhered cells. Because of its well known effects on endothelial cells activation and adhesion molecules expression TNF- α was chosen for endothelial cells stimulation. The lowest concentration of TNF- α affecting the percentage of adhered monocytes in comparison with negative control was 1 ng TNF- α /ml. The optimal concentration of TNF- α increasing the percentage of adhered monocytes was 10 ng TNF- α /ml. The influence of TNF- α on the adhesion was observed already after 5 minutes of coincubation of THP-1 monocytes with HUVEC. Using the optimal concentration of 10 ng/ml led to the highest percentage of adhered monocytes after 30 – 40 minutes of coincubation with HUVEC. Other factor affecting the percentage of adhered monocytes (along with the TNF- α concentration and the time of coincubation) was the amount of added THP-1 monocytes. The model of monocyte adhesion on endothelium *in vitro* was optimized and results were evaluated by using two methods.

Key words: monocytes, endothelium, adhesion

Obsah

Prohlášení.....	2
Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah.....	6
Seznam zkratk.....	9
1. Úvod.....	11
2. Kardiovaskulární choroby.....	12
3. Ateroskleróza.....	13
3.1. Iniclace aterosklerózy.....	13
3.1.1. Adheze na endotel a některé adhezní molekuly.....	14
3.1.2. Lokomoce.....	16
3.1.3. Průnik.....	17
3.1.4. Akumulace lipidových částic.....	18
3.2. Progrese aterosklerózy.....	20
3.3. Komplikace aterosklerózy.....	21
4. <i>In vitro</i> modely.....	22
5. Vybrané <i>in vivo</i> modely.....	24
6. Cíle diplomové práce.....	27
7. Materiál a metody.....	28
7.1. Přístroje a laboratorní plast.....	28
7.2. Chemikálie.....	29
7.3. Metody.....	30
7.3.1. Kultivace buněk.....	30
7.3.2. Pracovní protokol.....	30

8.	Statistické hodnocení výsledků.....	33
8.1.	Fluorescence.....	33
8.2.	Počty buněk.....	33
9.	Výsledky.....	35
9.1.	Vliv rostoucí koncentrace TNF- α na adhezi THP-1 monocytů na endotel <i>in vitro</i>	35
9.1.1.	Fluorescence.....	35
9.1.2.	Počty buněk.....	36
9.1.3.	Fluorescence.....	36
9.1.4.	Počty buněk.....	38
9.2.	Vliv prodlužující se doby koinkubace na adhezi THP-1 monocytů na endotel <i>in vitro</i>	38
9.2.1.	Fluorescence.....	38
9.2.2.	Počty buněk.....	40
9.3.	Porovnání kombinace vlivu koncentrace TNF- α a času koinkubace na adhezi THP-1 monocytů na endotel <i>in vitro</i>	41
9.3.1.	Fluorescence.....	41
9.3.2.	Počty buněk.....	44
10.	Diskuze a závěry.....	46
10.1.	Výchozí literární údaje.....	46
10.2.	Diskuze výsledků.....	48
10.2.1.	Vliv rostoucí koncentrace TNF- α na adhezi THP-1 monocytů na endotel <i>in vitro</i>	48
10.2.2.	Vliv prodlužující se doby koinkubace na adhezi THP-1 monocytů na endotel <i>in vitro</i>	49
10.2.3.	Porovnání kombinace vlivu koncentrace TNF- α a času koinkubace na adhezi THP-1 monocytů na endotel <i>in vitro</i>	49
10.3.	Závěry.....	50

11. Závěr.....	52
12. Literární přehled.....	53
Příloha:	63

Seznam zkratek

ABCA1, ABCG1 – ATP-binding cassette A1 transportér, ATP-binding cassette G1 transportér

ACAT – acyl-koenzym A cholesterol acyltransferáza

ANOVA – analýza rozptylu (analysis of variance)

ApoA-1, ApoE, ApoB – apolipoprotein A1, apolipoprotein E, apolipoprotein B

BMI – index tělesné hmotnosti (body mass index)

CD36 – scavengerový receptor třídy B (translokáza mastných kyselin)

CD68 – membránový glykoprotein monocytů a makrofágů

DMSO - dimethylsulfoxid

EGF-A – epidermal growth factor like doména A

EGM-2, EBM-2 – růstové médium pro endoteliální buňky (endothelial cell growth medium),

základní růstové médium pro endoteliální buňky (endothelial growth basal medium)

ELAM-1/E-selektin – endoteliální-leukocytární adhezní molekula (endothelial leukocyte adhesion molecule 1)/endoteliální selektin

ER – endoplazmatické retikulum

ERK-1 – extracelulárním signálem regulovaná kináza

FCS – fetální telecí sérum (fetal calf serum)

GA-1000 – gentamicin-amphotericin

HDL – lipoproteinové částice s vysokou hustotou (high density lipoprotein particles)

hEGF – lidský epidermální růstový faktor (human epidermal growth factor)

hFGF-B – lidský základní růstový faktor fibroblastů (basic human fibroblastic growth factor)

HUVEC – lidské endoteliální buňky z pupečnickové žíly (human umbilical vein endothelial cells)

ICAM-1/CD54, ICAM-2/CD102 – mezibuněčná adhezní molekula 1 a 2 (intercellular adhesion molecule 1, 2)

IFN- γ – interferon γ

ICHS – ischemická choroba srdeční

IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 – interleukin 1 β , 6, 8, 12

JAM-A – junkční adhezní molekula A

LDL, oxLDL – lipoproteinové částice s nízkou hustotou (low density lipoprotein particles), oxidované LDL

LDL-R – receptor pro LDL částice

LFA-1/ $\alpha_L\beta_2$ integrin/CD11a-CD18 – antigen asociovaný s funkcí lymfocytů (lymphocyte function-associated antigen 1)

LPS - lipopolysacharid

L-selektin – leukocytární selektin

Mac-1/ $\alpha_M\beta_2$ integrin/CD11b-CD18 – macrophage-1 antigen

MAPK – mitogenem aktivované protein kinázy

MMP-1, MMP-2, MMP-3 a MMP-9 – matrixové metaloproteinázy

NF- κ B – nukleární faktor κ B

P/S – penicilin-streptomycin

PBS – fosfátem pufovaný fyziologický roztok (phosphate buffered saline)

PCSK9 – proprotein konvertáza subtilisin/kexin typu 9

PECAM-1 – adhezní molekula krevních destiček a endoteliálních buněk (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1)

PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza

PMA - phorbol myristát acetát

P-selektin – trombocytární selektin

PSGL-1/CD162 – P-selektin glykoprotein ligand-1

R³-IGF-1 – inzulínu podobný růstový faktor 1 (insulin like growth factor 1) – rekombinantní forma IGF-1 s argininem v pozici 3

RPMI-1640 – Roswell Park Memorial Institute medium

SR-A – scavengerový receptor třídy A (scavenger receptor class A)

TLR2,TLR4 – Toll-like receptor 2, Toll-like receptor 4

TNF- α – tumor nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)

UPR – unfolded protein response

VCAM-1/CD106 – vaskulární adhezní molekula (vascular cell adhesion molecule 1)

VE-cadherin – vaskulární-endoteliální cadherin

VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

VLA-4/ $\alpha_4\beta_1$ integrin/CD49d-CD29 – very late antigen-4

VSMC – buňky hladkého svalu cévní stěny (vascular smooth muscle cells)

1. Úvod

Ateroskleróza a její komplikace představují závažnou komorbiditu například u pacientů trpících obezitou, diabetem nebo některými autoimunitními chorobami. Jednou z možností studia aterosklerózy jsou *in vitro* modely a některé animální modely, které umožňují lépe pochopit mechanismy vedoucí k iniciaci a progresi aterosklerózy. Mohou pak také posloužit při hledání nových způsobů léčby této choroby.

Iniciálním krokem v rozvoji aterosklerózy je adheze leukocytů (například monocytů a T-lymfocytů) na povrch endoteliálních buněk. Následná extravazace monocytů z krevního oběhu do tkání pomáhá organismu vypořádat se s infekcí. Přítomnost některých prozánětlivých cytokinů v krvi (například při chronické infekci) spojená s vysokou hladinou lipoproteinových částic s nízkou hustotou (LDL) a triglyceridů vede k aktivaci endotelu. Aktivovaný endotel vystavuje na svém povrchu adhezní molekuly vážící monocyty. Po zachycení a diapedéze se tyto monocyty přeměňují v makrofágy, které pomocí scavengerových receptorů pohlcují oxidované LDL částice. Ukládání těchto částic v makrofázích ve formě cholesteryl esterů následně vede ke vzniku pěnových buněk. Množství pěnových buněk a volných lipidových částic v cévní stěně může postupem času narůstat a dát tak vzniknout aterosklerotickým plakům. Ty postupně zmenšují průsvit postižené cévy a případně mohou prasknout a následně cévu zneprůchodnit. Pokud se plaky vyskytují v důležitých arteriích, jejich ruptura může způsobit infarkt myokardu nebo cévní mozkovou příhodu.

Právě studium účinků různých látek na adhezi monocytů na endotel je důležité při vývoji nových terapeutických metod. Důležitou roli v tomto studiu hrají *in vitro* studie, velmi často využívající buněčnou linii THP-1 monocytů a lidské endoteliální buňky z pupečnickové žíly (HUVEC). Stimulace endoteliálních buněk prozánětlivým cytokinem (například tumor nekrotizujícím faktorem α) a následná adheze monocytů jsou ovlivňovány podáním studované látky. Optimalizace koncentrace prozánětlivého cytokinu a doby koinkubace monocytů a endoteliálních buněk by mohla usnadnit srovnání účinků různých látek na adhezi monocytů a interpretaci výsledků.

2. Kardiovaskulární choroby

Kardiovaskulární choroby jsou v současné době celosvětově nejčastější příčinou úmrtí. Přestože v posledních letech došlo v přepočtu na 100 tisíc obyvatel ke snížení počtu úmrtí na kardiovaskulární choroby, jen v roce 2015 zemřelo především na následky ischemické choroby srdeční (IČS) a cévních mozkových příhod 17,9 milionu lidí (Wang et al., n.d.).

V Evropě jsou ohroženi především lidé starší 75 let, v mladších věkových kategoriích s dvakrát vyšší pravděpodobností muži v porovnání se stejně starými ženami. Celkově umírají v Evropě každoročně na kardiovaskulární choroby více než 4 miliony lidí, což představuje asi 45 % všech úmrtí. V přepočtu na 100 tisíc obyvatel jsou nicméně více postiženy země mimo Evropskou unii a země východní Evropy (Townsend et al., 2016).

Situace v České republice se mezi lety 1994 a 2009 zlepšila, došlo ke snížení počtu úmrtí na kardiovaskulární choroby, obzvláště na akutní infarkt myokardu a cévní mozkové příhody, naopak chronická ischemická choroba srdeční zůstává, podobně jako srdeční selhání, jednou z hlavních příčin úmrtí a to především u pacientů starších 75 let (Davidková et al., 2013). Možným vysvětlením tohoto pozitivního trendu je zlepšující se zdravotní péče a zároveň pozitivní vývoj ve výskytu některých rizikových faktorů rozvoje kardiovaskulárních chorob. Mezi lety 1986 až 2008 došlo u vybraného reprezentativního vzorku obyvatel z 6 oblastí České republiky k signifikantnímu snížení hodnot krevního tlaku a hladin cholesterolu v krvi, a ke zlepšení informovanosti a léčby pacientů s hypertenzí. Na druhou stranu se nesnižuje prevalence obezity (hodnota indexu tělesné hmotnosti (BMI) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$), u mužů naopak dokonce výrazně stoupá. V české populaci je také stále vysoké procento kuřáků (Cífková et al., 2010). Kouření je u hyperlipidemických pacientů (v porovnání s nekuřáky trpícími hyperlipidemií) spojeno s vyšší hladinou triglyceridů a non-HDL cholesterolu v krvi a také s tzv. hypertriglyceridemickým pasem, což je nezávislý prediktor vysoké hladiny glukózy v krvi a inzulínové rezistence (Cibicková et al., 2014). Nadváha a obezita jsou pak již u adolescentů spojeny s vyšším krevním tlakem, vyšší hladinou triglyceridů a LDL-cholesterolu a tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α , tumor necrosis factor α) v krvi (Ghomari-Boukhatem et al., 2016).

3. Ateroskleróza

Ateroskleróza je chronické nebolestivé onemocnění tepen, které se může bez výraznějších klinických příznaků rozvíjet desítky let. Projevuje se vznikem plaků, které se postupem času zvětšují a zužují tak průsvit postižené cévy. V pokročilém stádiu může dojít k narušení plaku a k úplné obturaci cévy trombem. Právě ischemická choroba srdeční a cévní mozkové příhody, hlavní příčiny úmrtí v České republice (Wang et al., n.d.), a dále trombotické komplikace ICHS a angina pectoris, mohou vznikat jako důsledek aterosklerózy. Nejvíce postižena je intima, což je vrstva cévní stěny nejbliže u lumina cévy. Zahrnuje jednovrstevný endotel, na nějž navazuje proteoglykanová vrstva s buňkami hladkého svalstva bohatými na drsné endoplazmatické retikulum. Pod proteoglykanovou vrstvou je vrstva muskuloelastická, ve které se vyskytují hlavně buňky hladkého svalstva bohaté na myofilamenta a dále vlákna elastinu a kolagenu. I u zdravých jedinců lze pozorovat například v oblasti větvení cév fyziologické ztluštění intimy (Glagov et al., 1992). Tato místa pak často bývají náchylnější ke vzniku aterosklerotických plaků, přičemž tyto patologické změny byly zachyceny i u lidí mladších 20 let bez klinických projevů aterosklerózy. Okolo 40. roku věku už bylo pozorováno ztluštění stěny alespoň jedné koronární arterie minimálně v 70 % sledovaných případů (Tuzcu et al., 2001). Prevalence aterosklerotických plaků stoupá u mužů lineárně se zvyšujícím se věkem. U žen je tento růst dvojfázový: výskyt plaků stoupá pozvolněji než u mužů, nicméně asi po 50. roce věku dochází k jeho akceleraci (Joakimsen et al., 1999).

Rozvoj aterosklerózy je urychlen u některých autoimunitních onemocnění. U premenopauzálních pacientek s revmatoidní artritidou byl zaznamenán vyšší výskyt aterosklerotických plaků a prozánětlivých cytokinů v krvi v porovnání se zdravými kontrolami (Pahor et al., 2006). Ateroskleróza také představuje závažnou komorbiditu například u pacientů s chronickým selháním ledvin (Olechnowicz-Tietz et al., 2013) a diabetiků, kteří mají dvakrát vyšší riziko rozvoje ischemické choroby srdeční (The Emerging Risk Factors Collaboration, 2010).

3.1. Iniciace aterosklerózy

Dlouhodobě vysoká hladina LDL částic (lipoproteinové částice s nízkou hustotou, low density lipoprotein particles) v krevní plasmě přispívá k rozvoji aterosklerózy. Kromě stravy ovlivňuje množství LDL částic v plasmě také počet aktivních LDL receptorů především

v játrech na povrchu hepatocytů (Linton et al., 1999; Tavori et al., 2016). Dlouhodobé vystavení endotelu vyšší hladině LDL částic vede ke zvýšení jeho permeability pro tyto částice (Guretzki et al., 1994). Role LDL receptoru (LDL-R), vyskytujícího se na povrchu makrofágů, je při vzniku pěnových buněk ale zřejmě zanedbatelná, neboť při vyšších hladinách cholesterolu dochází ke snížení jeho exprese. Významnější vliv na velikost aterosklerotických lézí má zřejmě pouze za podmínek mírné hyperlipidémie (Linton et al., 1999). Oxidativní modifikace LDL částic, ke které pravděpodobně dochází až ve stěně artérií, ale hraje v rozvoji aterosklerózy klíčovou roli (shrnutí v Yoshida and Kisugi, 2010). Oxidované LDL částice (oxLDL) se ochotněji váží do extracelulární matrix intimy, nejintenzivněji zřejmě v raných fázích rozvoje aterosklerózy (Wang et al., 2001). Výskyt oxLDL částic v subendoteliálním prostoru potencuje transmigraci monocytů přes endotel (Hashimoto et al., 2007). Kromě lipidů, které se mohou hromadit v extracelulární matrix intimy, hraje důležitou roli v rozvoji aterosklerózy i zvýšená hladina prozánětlivých cytokinů v krvi vedoucí k aktivaci endotelu. Aktivace endotelu je fyziologický děj vedoucí k vystavení některých adhezních molekul na jeho povrchu a následné vazbě cirkulujících leukocytů a trombocytů. Klíčovou roli hrají selektiny (E, P, a L-selektin) a molekuly z rodiny imunoglobulinů (především mezibuněčné adhezní molekuly (ICAM-1, 2 a 3) a vaskulární adhezní molekuly (VCAM-1)) (Blankenberg et al., 2003).

3.1.1. Adheze na endotel a některé adhezní molekuly

Selektiny jsou transmembránové glykoproteiny vážící specificky sacharidové zbytky. Hrají důležitou roli v iniciální adhezi leukocytů na endotel.

Endoteliální selektin (E-selektin) je exprimován v endoteliálních buňkách po stimulaci některými prozánětlivými cytokiny, např. tumor nekrotizujícím faktorem α (TNF- α) nebo růstovými faktory, např. vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF) (Chen et al., 2013; Kim et al., 2001). Exprese na endotelu je výrazně vyšší už po 3 hodinách kokultivace s monocyty aktivovanými lipopolysacharidy (LPS) a projevuje se vyšší adhezí těchto monocytů k endotelu. Tento efekt je krátkodobý, po 24 hodinách se exprese E-selektinu snižuje až k bazálním hodnotám (Roux et al., 1997). Přítomnost E-selektinu je zřejmě důležitá pro udržení aktivace antigenu asociovaného s funkcí lymfocytů (lymphocyte function-associated antigen 1, LFA-1, jinak $\alpha_L\beta_2$ integrin), což je integrin vyskytující se na povrchu leukocytů a vážící se na ICAM-1. LFA-1 zprostředkuje podobně jako antigen makrofágů 1

(macrophage-1 antigen, Mac-1, jinak $\alpha_M\beta_2$ integrin) pevnější interakci mezi endotelem a leukocyty, ačkoliv tato interakce je pouze přechodná a bez přítomnosti E-selektinu afinita LFA-1 klesá už asi po jedné minutě (Eniola-Adefeso et al., 2009). Hladina solubilního E-selektinu v krvi, což je marker zvýšeného rizika rozvoje aterosklerózy, je signifikantně zvýšená u dětí trpících obezitou, diabetem nebo hypertenzí v porovnání se zdravými kontrolami a koreluje s hodnotami BMI a hladinou cholesterolu a triglyceridů v krvi (Glowinska et al., 2005).

Trombocytární selektin (P-selektin) je exprimován v endoteliálních buňkách a trombocytech. K expresi na povrchu buňky dojde například po kontaktu s oxidovanými LDL částicemi, což následně vede ke zvýšení adheze monocytů na endotel (Mehta et al., 1995). Podobnou roli hraje P-selektin i při adhezi trombocytů. U apolipoprotein E (ApoE) deficientních myší, hojně využívaného modelu aterosklerózy, byla zaznamenána vyšší exprese P-selektinu v místech náchylných ke vzniku aterosklerotických plaků. Tato exprese byla spojena se zpomalením pohybu trombocytů po povrchu cévy a jejich vyšší adhezí, která předcházela akumulaci leukocytů v intimě (Massberg et al., 2002). P-selektin se váže na P-selektin glykoprotein ligand-1 (PSGL-1), který se nachází na povrchu leukocytů. Právě tato vazba spustí signalizační kaskádu, která vyústí v aktivaci β_2 integrinů (LFA-1 a Mac-1), což dále podpoří vazbu neutrofilních granulocytů na ICAM-1 (Wang et al., 2007; Xu et al., 2007). Blokace P-selektinu nebo PSGL-1 vede snížení akumulace neutrofilních granulocytů na endoteliálním povrchu (Ramos et al., 1999). Vazba P-selektinu exprimovaného na trombocytech a PSGL-1 exprimovaného monocytu navíc hraje roli při vzniku komplexů monocytů a trombocytů, které zvyšují adhezi monocytů na endotel a tvorbu clusterů na jeho povrchu (da Costa Martins, 2004). Kromě toho působí P-selektin i jako aktivátor sekrece některých prozánětlivých cytokinů (interleukinu 12, 1- β a 8 (IL-12, IL-1 β , IL-8) a TNF- α) monocytu. U monocytů kultivovaných v jamkách pokrytých P-selektinem se zvýšila sekrece TNF- α už po 2 hodinách a vrcholila po 4 hodinách, kdy byla 10x vyšší než u monocytů kultivovaných bez přítomnosti P-selektinu. Pokud byly monocytu předem stimulovány podáním interferonu γ (IFN- γ), vzestup sekrece TNF- α vyvolaný P-selektinem byl ještě výraznější (Suzuki et al., 2013).

L-selektin je exprimován konstitutivně v leukocytech jeho hlavním ligandem je opět PSGL-1. Může zprostředkovat vazbu mezi neutrofilními granulocyty už navázanými na endotel (přes P-selektin) a volnými neutrofilními granulocyty unášenými proudem.

Zvyšuje tak výrazně pravděpodobnost vazby cirkulujících neutrofilních granulocytů na P-selektin. Akumulace takto zachycených granulocytů akceleruje s postupujícím časem (Walcheck et al., 1996).

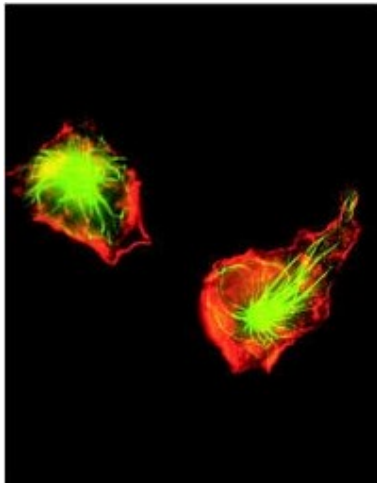
Obecně se selektiny se podílí na přechodném kontaktu krevních buněk a endotelu (tethering) – způsobí zpomalení pohybu těchto buněk po povrchu cévy (rolling). To může následně přispět ke vzniku pevnější vazby zprostředkované intercelulární adhezní molekulou (ICAM) a vaskulární adhezní molekulou (VCAM) exprimovanými v buňkách endotelu, a následné extravazaci leukocytů do cévní stěny (Blankenberg et al., 2003).

In vitro experimenty ukázaly, že nestimulované endoteliální buňky exprimují ICAM-1 konstitutivně, ale tato exprese je poměrně nízká a v klidovém stavu hraje klíčovou roli v adhezi monocytů především ICAM-2 (Schenkel et al., 2004). Kokultivace endoteliálních buněk a monocytů vede ke zvýšení exprese ICAM-1 během 1 až 2 hodin s vrcholem po 4 – 8 hodinách. Toto zvýšení je alespoň částečně zprostředkováno společným působením prozánětlivých cytokinů, především TNF- α a interleukinu 1 (IL-1) (Takahashi et al., 1996). Jak už bylo zmíněno, P-selektin je nezbytný pro plnou aktivaci $\alpha_M\beta_2$ integrinu na povrchu monocytů, což je jeden z ligandů ICAM-1 (Wang et al., 2007). Dalším ligandem ICAM-1 je LFA-1, pro jehož přetrvávající částečnou aktivaci je důležitá přítomnost E-selektinu (Eniola-Adefeso et al., 2009).

Exprese VCAM-1 v endoteliálních buňkách je za normálních podmínek nedetekovatelná, ale je podobně jako u ICAM-1 indukována během 1 – 2 hodin po kontaktu endoteliálních buněk a monocytů, a vrcholí asi po 6 hodinách. Po 24 hodinách klesá až k bazálním hodnotám (Takahashi et al., 1996). Podobně na zvýšení exprese VCAM-1 působí i kontakt endotelu s trombocyty (Massberg et al., 2002). Blokáda $\alpha_4\beta_1$ integrinu (jinak VLA-4, very late antigen-4), což je ligand VCAM-1, nebo samotného VCAM-1 vedla naopak ke zrychlení pohybu monocytů po cévní stěně (Ramos et al., 1999).

3.1.2. Lokomoce

Po pevnějším zachycení monocytů na endotelu následuje lokomoce těchto monocytů po povrchu endoteliálních buněk zprostředkovaná především ICAM-1, ICAM-2 a VCAM-1 exprimovanými na endotelu a jejich ligandů na povrchu monocytů. Při blokaci těchto molekul protilátkami nejsou monocyty schopné se přesunout z místa adheze k nejbližšímu mezibuněčnému spoji a proniknout přes něj diapedézou. Naopak bez přítomnosti blokujících



Obrázek č. 1:

Morfologie monocyty na podkladu, F-aktin na periferii (červeně) a mikrotubuly okolo jádra (zeleně), upraveno dle (Worthylake et al., 2001).

protilátek dojde po pevné adhezi monocyty k jeho polarizaci. Na předním konci buňky se tvoří filopodia a na zadním uropod. Monocyt prodlužuje filopodia a posouvá se za nimi ve směru nejbližšího mezibuněčného spoje, v průměru tak urazí vzdálenost asi 20 μm během necelých 20 minut (Schenkel et al., 2004). Zároveň je nezbytné, aby během pohybu docházelo k retrakci uropodu. Na tomto procesu se podílí RhoA, což je enzym z Rho rodiny malých GTPáz a jeho downstream efektor protein kináza 1 asociovaná Rho (p160ROCK, Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1), což je serin/threonin kináza. Právě aktivace p160ROCK vede zřejmě ke snížení výskytu β_2 integrinů (ligandů ICAM) na zadním konci buňky a jejich přednostní lokalizaci na předním konci buňky. Při tvorbě filopodií dochází také k přestavbě cytoskeletu buňky – okolo jádra monocyty se

nachází především síť mikrotubulů, zatímco na periferii převládá F-aktin (Worthylake et al., 2001).

3.1.3. Průnik

Už iniciální adheze monocyty na endotel vyvolá změny v hustotě a rozložení aktinových filament, což vede ke změně elasticity endoteliálních buněk (sníží se modul pružnosti těchto buněk) a sníží se také adhezivita endoteliálních buněk k substrátu (Kataoka et al., 2002).

Po přesunu monocyty ke spojení mezi endoteliálními buňkami dochází k jejich diapedéze, na které se opět významným způsobem podílí integriny a imunoglobuliny. K přestupu leukocyty přes endotel může dojít transcelulární i paracelulární cestou. Dosud není úplně jasné, zda některá z nich převládá, ale zdá se, že *in vivo* je častější cesta paracelulární (Schulte et al., 2011). Junkční adhezní molekula A (JAM-A, junction adhesion molecule A) z rodiny imunoglobulinů se nachází v mezibuněčných spojích endotelu. Vystavení JAM-A na lumenální povrchu endoteliálních buněk umožní jeho vazbu na LFA-1 na povrchu T-lymfocytů a neutrofilních granulocytů. JAM-A se pak následně podílí na jejich transmigraci (Ostermann et al., 2002). U ApoE deficientních myši krměných vysokotukovou

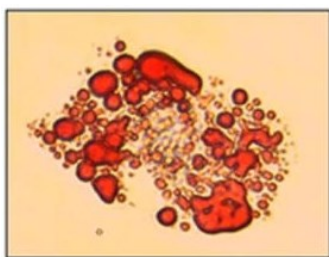
dietou dochází k fokální redistribuci JAM-A z mezibuněčných spojů na lumenální stranu endoteliálních buněk. Tento přesun spojený i s vyšší expresí JAM-A byl pozorován preferenčně v oblastech arterie náchylných k rozvoji aterosklerotických plaků. U myši postrádajících endoteliální JAM-A byly zaznamenány menší léze s nižším počtem infiltrovaných T-lymfocytů. JAM-A je zároveň exprimována i u monocytů, jeho absence má ale rozdílné účinky. JAM-A deficientní monocyty sice více adherují na aktivovaný endotel, ale nejsou schopny dokončit diapedézu zřejmě v důsledku zvýšené aktivace β_2 integrinů. Zůstávají poté uvězněné mezi endoteliálními buňkami a bazální membránou, což může následně vést k vaskulárnímu poškození (Schmitt et al., 2014). Další molekulou klíčovou pro úspěšnou diapedézu leukocytů (neutrofilních granulocytů a T-lymfocytů a monocytů) přes endotel je vaskulární-endoteliální cadherin (VE-cadherin), který se nachází v mezibuněčných spojích endoteliálních buněk. Za normálních okolností se přes α a β -catenin váže na aktinový cytoskelet a plasticita tohoto spojení je klíčová pro otevření cesty pro paracelulární transport (Schulte et al., 2011). Oxidované LDL částice v subendoteliálním prostoru snižují expresi VE-cadherinu v endoteliálních buňkách a naopak zvyšují expresi adhezivní molekuly krevních destiček a endoteliálních buněk 1 (PECAM-1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, jinak CD31). Obě v konečném důsledku vede k urychlení iniciace přechodu adherovaných monocytů přes endotel a k jejich intenzivnější transendoteliální migraci. V *in vitro* podmínkách byla pozorována kompletní diapedéza monocytů izolovaných z periferní krve už po 9 minutách po přidání ke konfluentní vrstvě HUVEC (Hashimoto et al., 2007). Do 30 minut transmigruje v *in vitro* podmínkách až 55 % všech adherentních monocytů (Hashimoto et al., 2012).

Dle dostupných údajů mohou být vlastnosti endotelu ovlivněny i působením vnějších faktorů, například pasivním kouřením. Vystavení endoteliálních buněk cigaretovému kouři vedlo k rychlému reverzibilnímu zvýšení permeability endotelu, způsobenému odlišným rozložením adherent junctions mezi endoteliálními buňkami (Low et al., 2007).

3.1.4. Akumulace lipidových částic

Akumulace lipidových částic a monocytů a makrofágů v intimě aorty byla zaznamenána už u lidských plodů mladších 6 měsíců, u nichž vyšší hladina cholesterolu v krvi koreluje s hladinou cholesterolu v krvi matky. Vyšší výskyt lézí u plodů také koreloval s výskytem hypercholesterolemie matek (Napoli et al., 1997). *In vitro* experimenty ukázaly,

že už 48 hodin po migraci monocytů přes vrstvu endoteliálních buněk dojde k jejich přeměně



Obrázek č. 2:

Pěnová buňka, lipidové kapénky obarveny použitím Oil red O (olejová červeň), upraveno dle (Bekkering et al., 2014).

na makrofágy charakteristické velkým počtem lysozomů. Pokud byl při kokultivaci přítomen prozánětlivý cytokin $TNF-\alpha$, došlo k postupné přeměně makrofágů na pěnové buňky naplněné lipidovými kapénkami již během 3 dnů. Podobně jako $TNF-\alpha$, potencuje akumulaci oxLDL i IL-6 (Hashizume et al., 2012). Klíčovou roli v akumulaci lipidů v makrofázích hrají tzv. scavengerové receptory, například SR-A nebo CD36 (scavengerový receptor třídy A a třídy B). CD36 je receptor oxidovaných LDL částic vyskytující se u monocytů a makrofágů a jeho inhibice v tomto modelu vedla ke snížení počtu pěnových

buněk asi o jednu třetinu (Westhorpe et al., 2012). Vznik pěnových buněk po transmigraci přes endotel je výraznější u monocytů izolovaných od starších jedinců. V porovnání s monocyty izolovanými od mladších jedinců, byl u monocytů starších jedinců snížen eflux cholesterolu z buňky, což mohlo být způsobeno sníženou expresí ATP-binding cassette A1 transportéru (ABCA1) (Angelovich et al., 2016). ABCA1 a ATP-binding cassette G1 (ABCG1) jsou transportéry podílející se na efluxu cholesterolu z buňky. Při vystavení buněk nízkým koncentracím cholesterolu se sice nezvyší exprese ABCA1 i ABCG1, ale dojde k omezení degradace obou transportérů, což umožní přizpůsobit eflux cholesterolu z buňky aktuálním podmínkám (Hsieh et al., 2014). Pokud není k dispozici dostatek apolipoproteinu A-1 (ApoA-1) nebo HDL, na které by mohl být volný cholesterol vázán a odváděn mimo buňku, dochází k jeho hromadění. Podobný účinek má inhibice acyl-koenzym A cholesterol acyltransferázy (ACAT) katalyzující vznik cholesteryl esterů z volného cholesterolu (Warner et al., 1995). Volný cholesterol se hromadí především v membráně endoplazmatického retikula (ER), která za normálních okolností ve srovnání s plasmatickou membránou obsahuje cholesterolu jen málo. Nadbytek cholesterolu v membráně ER spouští unfolded protein response (UPR), což je dráha vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů, které mají za úkol normalizovat funkci endoplazmatického retikula. Pokud je cholesterolová zátěž příliš vysoká, vede spuštění této dráhy k depleci vápníku z ER a následně k apoptóze makrofágů (Feng et al., 2003). SR-A hraje spolu s CD36 důležitou roli při internalizaci oxidovaného LDL. Aktivace monocytů po vystavení oxLDL vedla k posílení exprese SR-A a CD36 a některých prozánětlivých cytokinů ($TNF-\alpha$, IL-6, IL-8). Naopak exprese ABCA1 a ABCG1 byla v tomto

modelu chronicky snížena. V dlouhodobé aktivaci makrofágů zřejmě hrají roli Toll-like receptory 2 a 4 (TLR2 a TLR4), které po navázání oxLDL aktivují některé mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK), například extracelulárními signály regulovanou kinázu (ERK-1) a fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K), a následně způsobí epigenetické změny vedoucí k odlišné expresi některých genů (Bekkering et al., 2014). Kromě toho působení oxLDL zvyšuje expresi JAM-A u endoteliálních buněk (Schmitt et al., 2014).

3.2. Progrese aterosklerózy

Hromadící se tukové částice a makrofágy v matrix intimy dávají vznik raným lézím (rozlišuje se typ I a II).

Léze typu I (iniciální léze) jsou charakterizovány extracelulárními lipidovými depozity, které lze detekovat pod mikroskopem nebo chemicky. Vyšší výskyt lipidů v intimě je následně doprovázen zvýšenou extravazací monocytů z krve a jejich akumulací v cévní stěně.

Léze typu II už obsahují pěnové buňky rozmístěné ve vrstvách. Vedle makrofágů hromadí lipidy v cytoplasmě i intimální buňky hladkého svalů. Mohou, ale nemusí být viditelné na lumenální povrchu cévy jako žlutavé body nebo proužky (fatty streaks).

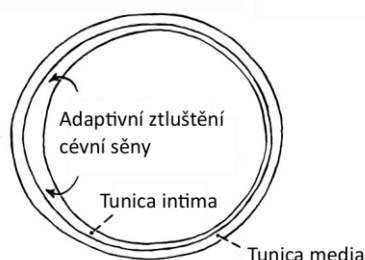
Léze typu III představují přechodný typ mezi ranými lézemi a lézemi pokročilými. Obsahují lipidové částice vmezeřené mezi buňky hladkého svalů v intimě. Postupně nahrazují intimální matrix a překrývá je vrstva pěnových buněk a makrofágů (Stary et al., 1994).

U lézí typu IV (ateromů) už je dobře definované jádro tvořené extracelulárním nahromaděním lipidů v intimě. To vede k disperzi buněk hladkého svalů a změně jejich morfologie. Kromě toho jsou ateromy náchylné ke vzniku ruptur (Stary et al., 1995). Allahverdian et al. (2014) zjistili, že velká část pěnových buněk v intimě vzniká přeměnou buněk hladkého svalů (VSMC, vascular smooth muscle cell) a množství těchto buněk postupně stoupá s rozvojem aterosklerotického plaku. Takto vzniklé pěnové buňky vykazují pokles exprese ABCA1 transportéru zodpovědného za eflux cholesterolu a zřejmě v menší míře váží apoA-I (Choi et al., 2009). U buněk pocházejících z myeloidní linie (monocytárního původu) k podobnému poklesu nedochází. Podobně jako pěnové buňky monocytárního původu ale přeměněné buňky hladkého svalů intimy na povrchu exprimují CD68, marker makrofágů (Allahverdian et al., 2014). Jedním ze stimulů podporujících vznik pěnových buněk z VSMC je vystavení vysoké koncentraci glukózy. U těchto buněk stoupá exprese CD36

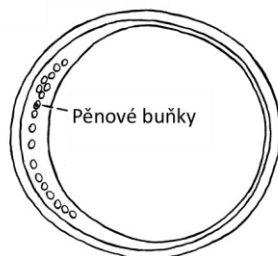
a naopak klesá exprese ABCG1 s prodlužujícím se časem a zvyšující se koncentrací glukózy (Xue et al., 2010).

Pokud v místě plaku vzniká nová fibrózní tkáň, hovoříme o lézi typu Va. Tkáň plaku

Koronární arterie v místě náchylném ke vzniku aterosklerotických lézí



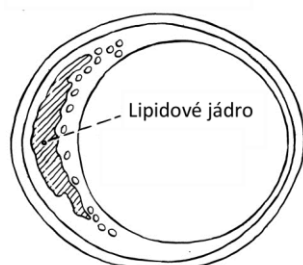
Léze typu II



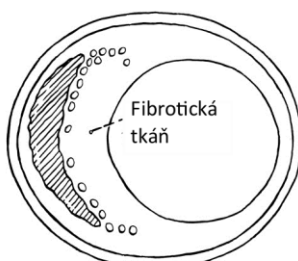
Léze typu III



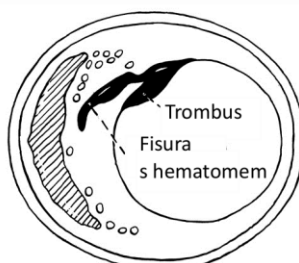
Léze typu IV (aterom)



Léze typu V (fibroaterom)



Léze typu VI (komplikovaná léze)



Obrázek č. 3:

Nákres různých typů lézí v proximální části interventrikulární větve levé koronární arterie, upraveno dle (Stary et al., 1995).

může kalcifikovat (léze typu Vb), případně je zde fibrózní tkáň, ale lipidové jádro chybí (léze typu Vc). Podobně jako u lézí typu IV zde hrozí vznik ruptur. Postižena v tomto případě bývá i tunica media, ve které se mohou hromadit makrofágy (Stary et al., 1995). Vyšší množství makrofágů a T-lymfocytů bylo zaznamenáno v placích s lipidovým jádrem v porovnání s plaky fibrózními. Nahromadění leukocytů je spojeno s neovaskularizací, která je opět výraznější u lipidových plaků, zejména u jejich báze. Nově tvořené cévy v oblasti plaku vykazují vysokou expresi adhezních molekul – E-selektinu, ICAM-1 a VCAM-1, což by mohlo vysvětlit intenzivnější extravazaci leukocytů v těchto místech. VEGF, jehož výskyt je spojován

s neovaskularizací, by mohl být příčinou vyšší exprese E-selektinu (de Boer et al., 1999; Kim et al., 2001).

3.3. Komplikace aterosklerózy

Pokud se k rozvoji lézí typu IV nebo V přidruží další komplikace – ruptura, krvácení a vznik hematomů a trombů, označujeme je pak jako typ VI (Stary et al., 1995).

U mužů byl zaznamenán zvýšený výskyt měkkých plaků (při vyšetření ultrazvukem se jeví jako echolucentní), které obsahují více lipidů a jsou náchylnější k rupturám (Joakimsen et al., 1999). Roli ve výskytu ruptur zřejmě hraje i neovaskularizace. Výraznější novotvorba cév v oblasti plaku a přiléhající stěny aorty byla zaznamenána právě u plaků s vysokým obsahem lipidů a byla spojena s vyšším výskytem krvácení a zánětu. Plaky s tenčí fibrózní tkání na povrchu byly signifikantně náchylnější k ruptuře (Moreno, 2004). Na remodelaci plaku a jeho případné ruptuře v pozdních fázích rozvoje aterosklerózy se mohou podílet i matrixové metaloproteinázy (MMP). Jedná se o endopeptidázy štěpící některé složky extracelulární matrix, například kolagen a elastin. Expresí MMP-1, MMP-3 a MMP-9, je v oblasti plaku zvýšena v porovnání s okolní nepostiženou tkání (Higashikata et al., 2006). Přítomnost oxidovaného LDL zvyšuje produkci MMP-9 a MMP-2 v buňkách hladkého svalu cévy (Saneipour et al., 2015; Zhao et al., 2011). Terapie statiny sice nepřispívá k regresi vývoje plaku, ale zvětšuje tloušťku fibrózní tkáně na povrchu už po 6 měsících, což přispívá k jeho vyšší stabilitě (Hou et al., 2016).

4. *In vitro* modely

Iniciace a progresse aterosklerózy a komplikace s ní spojené jsou vzhledem ke klinickému významu aterosklerózy předmětem rozsáhlých výzkumů. Kromě vývoje nových zobrazovacích metod a forem hodnocení stádia vývoje plaku a jeho náchylnosti k rupturám, se v současnosti věnuje hodně pozornosti molekulárním mechanismům stojícím za rozvojem této choroby. *In vitro* modely umožňují studovat jednotlivé součásti intimy (extracelulární matrix, buňky hladkého svalu, monocyty a makrofágy a další), jednotlivé molekuly účastnící se aktivace endotelu a kontaktu buněk nebo vliv jednotlivých cytokinů na adhezi buněk a expresi genů. Výhodou je možnost vysokého počtu opakování experimentů a k dispozici je velká škála buněčných linií s různými vlastnostmi.

Kromě studia adheze monocytů na endotel *in vitro* za statických podmínek (Roux et al., 1997), je v současnosti možné sledovat procesy ovlivňující adhezi i v přirozenějších podmínkách například v průtokové komůrce (da Costa Martins, 2004; Schmitt et al., 2014) nebo přímo v perfundované karotidě (Ramos et al., 1999), Massberg et al. (2002) byli dokonce schopni sledovat adhezi trombocytů na endotel *in vivo*.

Klíčovou roli ve výzkumu rozvoje aterosklerózy hrají lidské endoteliální buňky z pupečnickové žíly HUVEC (human umbilical vein endothelial cells). Po nárůstu do plné

konfluenci představují vhodný model pro studium vlastností endotelu a lze je využít při studiu transmigrace monocytů přes endotel (Hashimoto et al., 2012; Schulte et al., 2011). Již v roce 1989 u nich byla poprvé popsána inducibilní exprese E-selektinu (jinak ELAM-1, endothelial leukocyte adhesion molecule 1) (Bevilacqua et al., 1989). Za normálních okolností v neaktivovaném stavu exprimují na svém povrchu konstitutivně ICAM-2, exprese ICAM-1 a VCAM-1 je velmi nízká (VCAM-1 exprimuje v klidových podmínkách ve vyšší míře asi jen 5 % buněk, příčina tohoto jevu je neznámá). Po stimulaci prozánětlivým cytokinem (IL-1 β nebo TNF- α) vzroste exprese ICAM-1 a VCAM-1, zatímco exprese ICAM-2 se nemění (Schenkel et al., 2004). HUVEC exprimují i JAM-A (Ostermann et al., 2002). Jednou z nevýhod HUVEC je omezená doba jejich kultivace. Nejedná se o buněčnou linii a s každou pasáží stoupá v kultuře počet stárnoucích buněk. Okolo páté pasáže už představují neproliferující senescentní buňky s odlišnou morfologií více než 60 % všech přítomných buněk (Zhang et al., 2014).

Vzhledem k významu monocytů a následně makrofágů v rozvoji aterosklerózy bylo důležitým krokem ve výzkumu této choroby zavedení lidské monocytární leukemické buněčné linie. Linie monocytů/makrofágů (konkrétně histiocytů) U-937 byla izolována a zavedena v roce 1976. Buňky pocházely z pleurálního výpotku 37 letého pacienta s lymfomem. V menší míře jsou schopné fagocytózy a produkují lysozym (Sundstrom et al., 1976). V současnosti zřejmě nejpoužívanější monocytární buněčnou linií ve výzkumu aterosklerózy je pak linie THP-1 (Qin, 2012). Byla zavedena v roce 1980, kdy byly izolovány monoblasty z krve jednoletého chlapce trpícího akutní monocytární leukémií. Tyto monoblasty si zachovaly i po 8 až 10 měsících od izolace původní morfologickou strukturu, schopnost fagocytózy a aktivace proliferace T-lymfocytů (Tsuchiya et al., 1980). Po kultivaci s phorbol myristát acetátem (PMA) diferencují po 72 hodinách v makrofágy (Mei et al., 2007). V podmínkách *in vitro* je ke stimulaci THP-1 monocytů častou používán prozánětlivý cytokin TNF- α . THP-1 makrofágy produkují po aktivaci TNF- α prozánětlivé cytokiny IL-6 a IL-8 (Choi et al., 2010) a mohou následně dát vzniknout pěnovým buňkám. Vznik pěnových buněk z monocytů izolovaných z periferní krve vrcholí už po 3 dnech koinkubace s TNF- α (Westhorpe et al., 2012). Inkubace THP-1 monocytů a monocytů izolovaných z lidské krve s TNF- α u nich vede k výraznější akumulaci cholesteryl esterů a to zřejmě v důsledku aktivace ACAT1 a zvýšené exprese SR-A (Hashizume et al., 2012; Lei et al., 2009). U pěnových buněk vzniklých z THP-1 makrofágů je po vystavení TNF- α také snížena exprese ABCA1

transportéru, což vede k výraznější akumulaci cholesterolu, a tento efekt je alespoň částečně kompenzován působením protizánětlivého IL-10 (Mei et al., 2007).

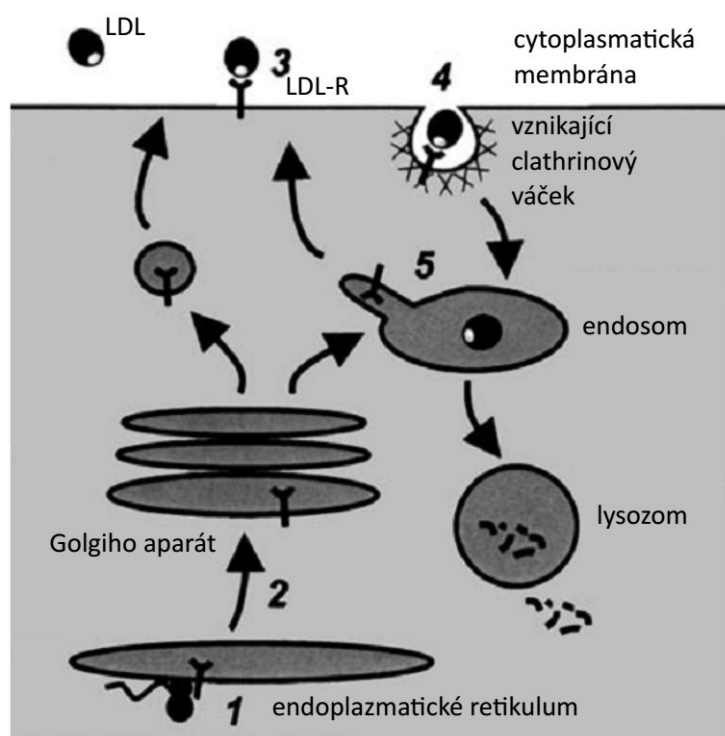
Mezi často používané modely patří myší linie makrofágů patří J774 (Ferri et al., 2012; Kellner-Weibel et al., 1998). V porovnání s nestimulovanými peritoneálními makrofágy vykazují J774 srovnatelnou nebo výraznější schopnost chemotaxe a fagocytózy i aktivity vybraných lysozomálních enzymů (Snyderman et al., 1977).

5. Vybrané *in vivo* modely

Poznatky získané *in vitro* lze dále aplikovat při výzkumu prováděném na experimentálních zvířecích modelech a ověřit je tak v přirozených podmínkách *in vivo*. V současnosti jsou ve výzkumu rozvoje a progresu aterosklerózy intenzivně využívány především myší modely. Některé inbrední kmeny vykazují vyšší náchylnost k rozvoji aterosklerózy, pokud je jim podávána dieta s vysokým obsahem tuků (Linton et al., 1999). Jeden z nich, kmen C57BL/6, posloužil v roce 1992 k vytvoření kmenu apolipoprotein E deficientní myši v současnosti hojně využívané při studiu rozvoje a progresu aterosklerózy. Linie vznikla po injekci buněk s inaktivovaným ApoE genem do myších blastocyst, ze vzniklých chimér byli schopni nefunkční gen na potomstvo přenést 2 samečci a jedna samička (Piedrahita et al., 1992). Apolipoprotein E je součástí téměř všech lipoproteinových částic (kromě LDL) a je jedním z ligandů LDL receptoru. Jeho úplná deficeience u homozygotních myší se projevuje až 5x vyšší hladinou cholesterolu v plasmě nezávislou na věku a pohlaví. Mírně zvýšená je i hladina triglyceridů v krevní plasmě. Naopak hladina HDL částic v plasmě, které jsou u myší hlavními lipoproteinovými částicemi, je u tohoto modelu snížena. Tento pokles v hladině HDL částic je spojen s vyšším výskytem lipoproteinových částic s nižší hustotou. I na běžné dietě mají ApoE deficientní myši patologický lipidogram, což může již po několika měsících vést ke vzniku pěnových buněk a aterosklerotických lézí (Zhang et al., 1992). Dieta s vysokým podílem tuků (High fat diet nebo Western type diet) se liší v různých experimentech, všeobecně lze říci, že obsahuje okolo 0,2 % cholesterolu a 10 – 20 % tuku například ve formě kokosového oleje či mléčného tuku. U ApoE deficientních myší její podávání výrazně urychlí rozvoj aterosklerózy a rané léze lze u tohoto kmene pozorovat již po 6 týdnech (Tavori et al., 2016).

Další možností navození hypercholesterolemie je knock out genu pro LDL receptor. Kmen LDL deficientní myši byl zaveden v roce 1993 podobným způsobem jako kmen ApoE

deficientní myši (injekce buněk s disrupcí genu pro LDL-R do blastocyst C57BL/6 myši a následný vznik chimérických jedinců, z nichž někteří byli schopni tento gen přenést na potomstvo). V porovnání s kontrolami mají LDL-R deficientní myši s normální dietou dvakrát vyšší hladinu cholesterolu v plasmě, ale normální hladinu triglyceridů. Podobně jako ApoE deficientní myši má tento kmen v plasmě vyšší zastoupení lipoproteinových částic s nižší hustotou (až 9x v porovnání s kontrolami) ale nedoprovázený snížením množství HDL částic (Ishibashi et al., 1993). Nasazení vysokotukové diety vede u LDL-R deficientních myši ke zvýšení hladiny cholesterolu téměř čtyřnásobně v porovnání s účinkem normální diety, podobně i hladina triglyceridů je u tohoto kmene na vysokotukové dietě více než dvojnásobná (Linton et al., 1999).



Obrázek č. 4: Cyklus LDL-R

(1) LDL receptor je složen v endoplazmatickém retikulu a přes (2) Golgiho aparát pokračuje do plazmatické membrány, kde může vázat LDL částice (3), následuje jeho internalizace (endocytóza clathrinových váčků (4)) do endosomů (5), kde dojde v kyselém pH k disociaci LDL částic od LDL-R, přičemž LDL částice pokračují do lysozomu a LDL-R je recyklován a vrací se zpět do plazmatické membrány, upraveno dle (Gent and Braakman, 2004)

LDL a ApoE deficientní myši pak mohou posloužit jako vhodný podklad pro studie založené na transplantaci kostní dřeně nebo pro tvorbu transgenních modelů.

Jak už bylo uvedeno výše, LDL receptor na povrchu makrofágů se zřejmě na akumulaci lipidů a vzniku pěnových buněk podílí jen za specifických okolností (Linton et al., 1999). Na druhou stranu degradace jaterního LDL receptoru u transgenní linie C57BL/6 myši exprimujících lidskou proprotein konvertázu subtilisin/kexin typu 9 (PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) vedla k extrémnímu nárůstu hladin cholesterolu, triglyceridů a apolipoproteinu B (ApoB) v plasmě

(Tavori et al., 2016). PCSK9 se neváže do vazebného místa LDL receptoru, ale na jednu z jeho podjednotek (konkrétně na EGF-A repetici, EGF-A = epidermal growth factor like

doména A), která se podílí na recyklaci receptoru z endosomu. Vazba PCSK9 vede podobně jako vazba ligandu LDL receptoru k internalizaci tohoto receptoru do endosomu, ale místo recyklace je receptor degradován v lysozomech. Vazba PCSK9 vyžaduje přítomnost vápníku a již po jedné hodině dochází k internalizaci receptorů do endosomů, po dvou hodinách pak do lysozomů (Zhang et al., 2007). U transgenních myší exprimujících lidskou PCSK9 výhradně v makrofázích nebyla pozorována vyšší hladina cholesterolu a triglyceridů v séru ani velikost lézí. Lidská PCSK9 exprimovaná makrofágy ale působí lokálně, hromadí se v lézích, což vede následně k vyšší infiltraci monocytů do těchto lézí (Giunzioni et al., 2016). V současnosti je právě použití terapie založené na protilátkách proti PCSK9 novým přístupem při snižování hypercholesterolemie a představuje vedle terapie statiny další nástroj v boji proti rozvoji aterosklerózy (Stroes et al., 2014).

6. Cíle diplomové práce

- 1) Zavést model adheze monocytů na endotel *in vitro*, který bude následně sloužit při zkoumání vlivu účinků různých látek na adhezi monocytů. Ověřit adhezi monocytů na endotel dvěma metodami: měřením intenzity fluorescenčního signálu a počítáním buněk v zorném poli.
- 2) Zjistit optimální koncentraci TNF- α , při které dojde k nárůstu adheze THP-1 monocytů na endoteliální buňky.
- 3) Zjistit optimální dobu působení optimální koncentrace TNF- α , při které dojde k nejvyšší adhezi THP-1 monocytů na endoteliální buňky.

7. Materiál a metody

7.1. Přístroje a laboratorní plast

Laminární box S@feFlow 1.8, třída II, typ A2 (BioAir, Itálie)

Termostat SHEL LAB CO2 Incubator (Sheldon Manufacturing, Inc., USA)

Světelný mikroskop (OPTIKA, Itálie)

Vodní lázeň třepací SW23 (JULABO GmbH, Německo)

Centrifuga 5702 R (Eppendorf, Německo)

Vortex VX-100 (Labnet International, Inc., USA)

Manuální jednobáňové pipety Eppendorf Research® plus (rozsah 0,5 – 1000 µl) (Eppendorf, Německo)

Manuální multikanálová pipeta Eppendorf Research® plus (rozsah 30 – 300 µl) (Eppendorf, Německo)

Špičky: Vertex® Pipette Tips (Scientific Specialties, Inc., USA), Eppendorf® epT.I.P.S. (Merck Life Science, Německo)

Pipeter pipetus® (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Německo)

Sérologické pipety (Corning® Costar® Stripette®, Merck Life Science, Německo; Gosselin, Francie)

JuLI™ Smart fluorescent cell analyzer (Ruskin Technology Ltd., Velká Británie), software JuLI Biotech, verze 1.1.8.

Synergy 2 Multi-Mode reader (Biotek, USA), software Gen5™ Data Analysis Software

Vi-CELL XR (Vi-CELL™ Cell Counter for Cell Viability Analyzer) (Beckman Coulter Life Sciences, USA)

Laboratorní plast:

Kultivační lahve Corning® cell culture flasks (25 cm², 75 cm²) (Merck Life Science, Německo)

96 jamkové destičky Corning® 3603 (Corning Incorporated, USA)

7.2. Chemikálie

DMSO (dimethylsulfoxid) (Thermo Fisher Scientific, USA), lot number: 3235C046

RPMI 1640 (BIOSERA, Francie), médium doplněno 2 mM L-glutaminu, 100 U penicilinu/ml + 100 µg streptomycinu/ml a 10 % FCS (fetální telecí sérum)

FCS (fetal calf serum, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA)

P/S (Penicilin-streptomycin, zásobní roztok: 10000 jednotek penicilinu/ml a 10 mg streptomycinu/ml, Sigma-Aldrich (Merck Life Science), Německo)

L-glutamin (200 mM zásobní roztok, Sigma-Aldrich (Merck Life Science), Německo)

EGM-2 BulletKit (CC-3156 & CC-4176) (Lonza, Švýcarsko)

- součástí balení je bazální médium EBM-2, které bylo dle pokynů výrobce doplněno

EGM-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors:

Přidaná látka	Zastoupení v médiu
FCS	2 %
hydrokortizon	0,04 %
hFGF-B	0,4 %
VEGF	0,1 %
R3-IGF-1	0,1 %
kyselina askorbová	0,1 %
hEGF	0,1 %
GA-1000	0,1 %
heparin	0,1 %

Calcein AM (calcein acetoxymethyl, Molecular Probes, USA), 1000x ředěný v DMSO, lot number: 1494759

PBS (pufrovaný fyziologický roztok, Dulbecco Phosphate Buffered Saline, w/o Calcium, w/o Magnesium, BIOSERA, Francie)

Trypsin (BIOSERA, Francie)

TNF-α (R&D Systems, USA)

7.3. Metody

7.3.1. Kultivace buněk

THP-1

Veškerá manipulace s buňkami probíhala v laminárním boxu. K experimentům byla vybrána buněčná monocytární linie THP-1 (ECACC 88081201). Buňky byly skladovány v kapalném dusíku v kultivačním médiu s 10 % DMSO. Po rozmrazení (rychlé ohřátí obsahu zamrazovací ampule na 37 °C a následné vymytí DMSO čerstvým médiem) byly buňky kultivovány v RPMI 1640 s 10 % FCS a 1 % L-glutaminu (2 mM) a 1 % P/S (penicilin: 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml) a přechovávány v termostatu při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂. Médium bylo měněno každých 72 hodin. Buňky byly pasážovány, když jejich množství přesáhlo počet 1x10⁶/ml. Koncentrace živých buněk použitých do experimentu byla zjišťována po barvení trypanovou modří na přístroji Vi-Cell a dosahovala v průměru 97,38 ± 0,98 %.

HUVEC

Veškerá manipulace s buňkami probíhala v laminárním boxu. V experimentech byly použity buněčné kultury lidských endoteliálních buněk z pupečnickové žíly - HUVEC (human umbilical vein endothelial cells, pooled donor, lot number: 369948, Lonza, Švýcarsko). Buňky byly skladovány v kapalném dusíku v kultivačním médiu s 10 % DMSO. Po rozmrazení (rychlé ohřátí obsahu zamrazovací ampule na 37 °C a následné vymytí DMSO čerstvým médiem) byly buňky kultivovány v EGM-2 BulletKit (CC-3156 & CC-4176) a přechovávány v termostatu při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂. Médium bylo měněno každých 72 hodin. Buňky byly pasážovány, když dosáhly plné konfluence, případně dříve pro povzbuzení buněčného dělení. Koncentrace živých buněk použitých do experimentu byla zjišťována po barvení trypanovou modří na přístroji Vi-Cell a dosahovala v průměru 94,25 ± 0,67 %.

7.3.2. Pracovní protokol

1. krok

Prvním krokem bylo nasazení HUVEC v požadovaném množství do 96 jamkové destičky. Nejdříve bylo odsáto původní médium z kultivační lahve a buňky opláchnuty pufovaným fyziologickým roztokem (PBS). Po odebrání PBS následovalo přidání trypsinu, který působil v termostatu při 37 °C po dobu alespoň 3 minut (ne déle než 10 minut). Lehkým poklepem byly uvolněny zbylé stále adherované buňky a následně zastavena činnost trypsinu

přidáním 100 % FCS (v poměru 1:1). Suspenze byla centrifugována při 25 °C po dobu 5 minut při 800 rpm. Po odsátí supernatantu bylo přidáno čerstvé médium (EGM-2 BulletKit (CC-3156 & CC-4176)). Po zjištění koncentrace živých buněk na přístroji Vi-CELL následovalo nasazení do 96 jamkové destičky. Do každé jamky bylo přidáno 50 000 buněk. Buňky byly kultivovány v termostatu dalších 24 – 48 hodin do dosažení plné konfluence.

2. krok

Po nárůstu buněk do plné konfluence bylo odsáto staré médium a nahrazeno 100 µl EBM-2 s 2 % FCS (negativní kontrola) nebo EBM-2 s 2 % FCS a různými koncentracemi TNF- α (dle typu prováděného experimentu). Zásobní roztok TNF- α měl koncentraci 10 µg/ml, pro účely našeho experimentu jej bylo nutno naředit odpovídajícím množstvím PBS (na cílovou koncentraci 1 µg/ml). Pro danou koncentraci TNF- α byl počet použitých jamek (počet experimentů) minimálně 5 a maximálně 8. Endoteliální buňky pak byly kultivovány s TNF- α (v případě negativní kontroly pouze v živném médiu s 2 % FCS) dalších 16 – 24 hodin.

3. krok

Po 24 hodinách bylo odsáto médium s TNF- α a přidána suspenze THP-1 monocytů značených calceinem (popsáno níže). V závislosti na typu prováděného experimentu bylo ke konfluentní vrstvě HUVEC přidáno 50 000 nebo 100 000 THP-1 monocytů. Buňky byly kokultivovány v při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂ (doba kokultivace se lišila v závislosti na typu prováděného experimentu).

Příprava calceinem značených THP-1 monocytů

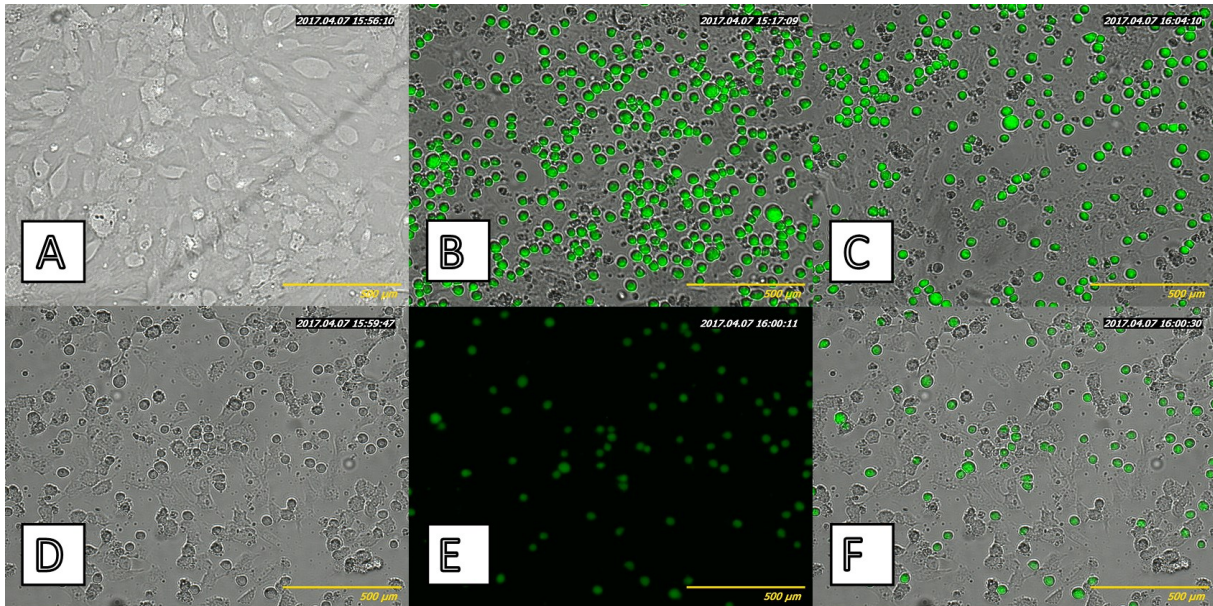
Suspenze THP-1 byla centrifugována při 25 °C po dobu 5 minut při 800 rpm a po odsátí supernatantu byly buňky resuspendovány v čerstvém médiu (RPMI 1640 s přidaným FCS, L-glutaminem a P/S). Následně byla zjištěna koncentrace živých buněk v suspenzi na přístroji Vi-CELL. Po přidání calceinu (25 µl calceinu (1000x ředěný v DMSO) na 1 ml buněčné suspenze) následovala inkubace v termostatu při 37 °C po dobu 40 minut. Po inkubaci byly buňky znovu centrifugovány a médium s calceinem nahrazeno médiem čerstvým. Po opětovném změření koncentrace živých buněk na přístroji Vi-CELL bylo možné calceinem značené THP-1 monocyty přidat v požadovaném počtu ke konfluentní vrstvě HUVEC.

Měření intenzity fluorescenčního signálu

Ihned po uplynutí stanovené doby kokultivace byla změřena intenzita fluorescenčního signálu v každé jamce na přístroji Synergy 2 (485 nm excitace, 528 nm emise). Po oplachu neadherovaných buněk PBS (3x – 4x, křížem a opatrně po stěně jamky), byl fluorescenční signál změřen znovu. Každé měření bylo srovnáno s negativní kontrolou (vizte str. 30).

Počítání buněk

Na přístroji JuLI byla vyfotografována oblast jamky s konfluentní vrstvou HUVEC a s nejvyšším množstvím adherovaných THP-1, nejdříve pod bílým světlem, následně pak po excitaci modrým světlem (488 nm excitace, 520 nm emise). Obě fotografie byly spojeny a následně byl vyhodnocen počet adherovaných THP-1 monocytů v programu ImageJ (National Institute of Health, MD, USA) (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Pro danou koncentraci TNF- α , pro daný počet přidaných THP-1 monocytů nebo pro daný čas kokultivace byl počet vyfotografovaných jamek minimálně 3 a maximálně 5.



Obrázek č. 5

(A) konfluentní vrstva HUVEC bez přidaných THP-1 monocytů; (B) konfluentní vrstva HUVEC s THP-1 monocyty (bez oplachu); (C) konfluentní vrstva HUVEC s adherovanými THP-1 monocyty (po oplachu); (D) HUVEC a THP-1 monocyty (bílé světlo); (E) THP-1 monocyty značené calceinem (modré světlo); (F) složení fotografií (D) a (E); fotografie pořízeny a složeny na přístroji JuLI

8. Statistické hodnocení výsledků

8.1. Fluorescence

Na data získaná z měření fluorescenčního signálu byl nejdříve aplikován Dixonův neparametrický test extrémních odchylek (test na odlehlost výsledků), který vyřadil výsledky zatížené hrubou chybou. Následoval výpočet procenta adherovaných monocytů na konfluentní vrstvu HUVEC.

Procento adherovaných THP-1 bylo vyjádřeno jako poměr fluorescenčního signálu změřeného po promytí PBS ku fluorescenčnímu signálu změřenému před promytím PBS.

Procento adherovaných THP-1 monocytů bylo vypočítáno dle vzorce:

$$\% \text{ adheze} = F_A \times 100 / F_T$$

F_A – fluorescence všech adherovaných THP-1

F_T – fluorescence celkového množství přidaných monocytů (Braut-Boucher et al., 1995, p.).

Pro zjištění statistické významnosti mezi jednotlivými testovanými koncentracemi TNF- α nebo jednotlivými testovanými časy působení TNF- α byla použita dle druhu experimentu jednofaktorová či dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA, an analysis of variance) s opakováním.

V případě zamítnutí nulové hypotézy v testu ANOVA následovala post-hoc analýza pomocí Tukeyho HSD testu, která měla za cíl identifikovat statisticky významné rozdíly mezi konkrétními dvojicemi výběrů (koncentrací či časů). Pro srovnání vlivu počtu přidaných THP-1 monocytů na procento adheze byl použit párový Studentův t-test.

8.2. Počty buněk

Po zpracování fotografií v programu ImageJ byl vypočítán průměrný počet buněk v zorném poli pro danou koncentraci TNF- α nebo pro negativní kontrolu. Opět byla provedena jednofaktorová či dvoufaktorová ANOVA a post hoc Tukeyho HSD test (HSD = honest significant difference).

Adheze monocytů na endotel je vyjádřena jako průměr % adheze ze 4 – 8 jamek (experimentů) \pm směrodatná odchylka.

Pro veškeré použité testy byla použita hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

Poznámka:

Jak ANOVA, tak Tukeyho HSD test jsou parametrické testy, u kterých předpokládáme normalitu a homoskedasticitu (shodnost rozptylu, rozptyl je nezávislý na parametru) výběrů. Normalitu nelze vzhledem k malému počtu opakování v experimentech testovat, nicméně byla předpokládána na základě běžně užívané praxe v podobných experimentech (Braut-Boucher et al., 1995; Schenkel et al., 2004). Oba testy jsou navíc vůči případným odchylkám od normality dosti robustní. Homoskedasticita byla testována Levenovým testem.

Obecně nelze předpokládat normalitu dat vyjádřených v procentech a je nutné provést jejich transformaci. Transformace nicméně není nutná v případě, že se výsledky nepohybují v extrémních hodnotách (tj. v blízkosti 0 % či 100 %). Vzhledem k tomu, že tuto podmínku výsledky splňují, je v testech počítáno s procenty bez transformace.

Odkazy:

Tukeyho HSD test online nástroj:

http://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/

Dvoufaktorová ANOVA s opakováním online nástroj:

<http://scistatcalc.blogspot.cz/2013/11/two-factor-anova-test-calculator.html#>

Levenův test online nástroj:

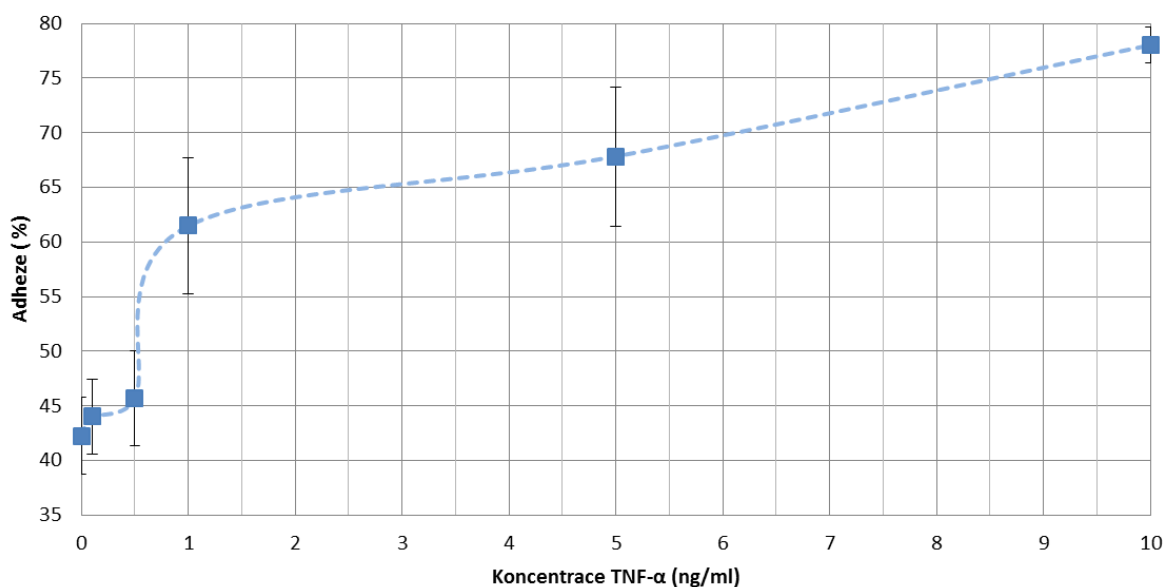
<http://scistatcalc.blogspot.cz/2013/12/levenes-test-equality-of-variances.html>

9. Výsledky

9.1. Vliv rostoucí koncentrace TNF- α na adhezi THP-1 monocytů na endotel *in vitro*

9.1.1. Fluorescence

Pro určení nejnižší koncentrace TNF- α vedoucí k signifikantně vyšší adhezi THP-1 monocytů na endotel v porovnání s negativní kontrolou jsme k HUVEC přidali rostoucí řadu koncentrací TNF- α a porovnali jsme procento adheze mezi těmito koncentracemi po 30 minutách koinkubace s THP-1 (graf č. 1). Přidání 0,1 ng TNF- α /ml neovlivnilo ve srovnání s negativní kontrolou adhezi THP-1 monocytů. Také při použití 0,5 ng TNF- α /ml nedošlo k signifikantnímu zvýšení adheze monocytů na endotel, ačkoliv byl zaznamenán pozitivní trend v růstu počtu adherovaných buněk. K výraznému zvýšení adheze ale došlo při použití 1 ng TNF- α /ml ($p = 0,001$). Koncentrace 1 ng TNF- α /ml byla proto považována za nejnižší použitelnou koncentraci vedoucí k signifikantnímu zvýšení adheze THP-1 monocytů. Další zvýšení přidané koncentrace TNF- α na 5 a 10 ng/ml vedlo k dalšímu nárůstu počtu adherovaných buněk ($p = 0,002$), přičemž tento nárůst byl více pozvolný. Zatímco procento adheze mezi 1 a 5 ng TNF- α /ml se signifikantně nelišilo, rozdíl procenta adheze mezi 5 a 10 ng TNF- α /ml už byl signifikantní výrazně ($p = 0,002$).

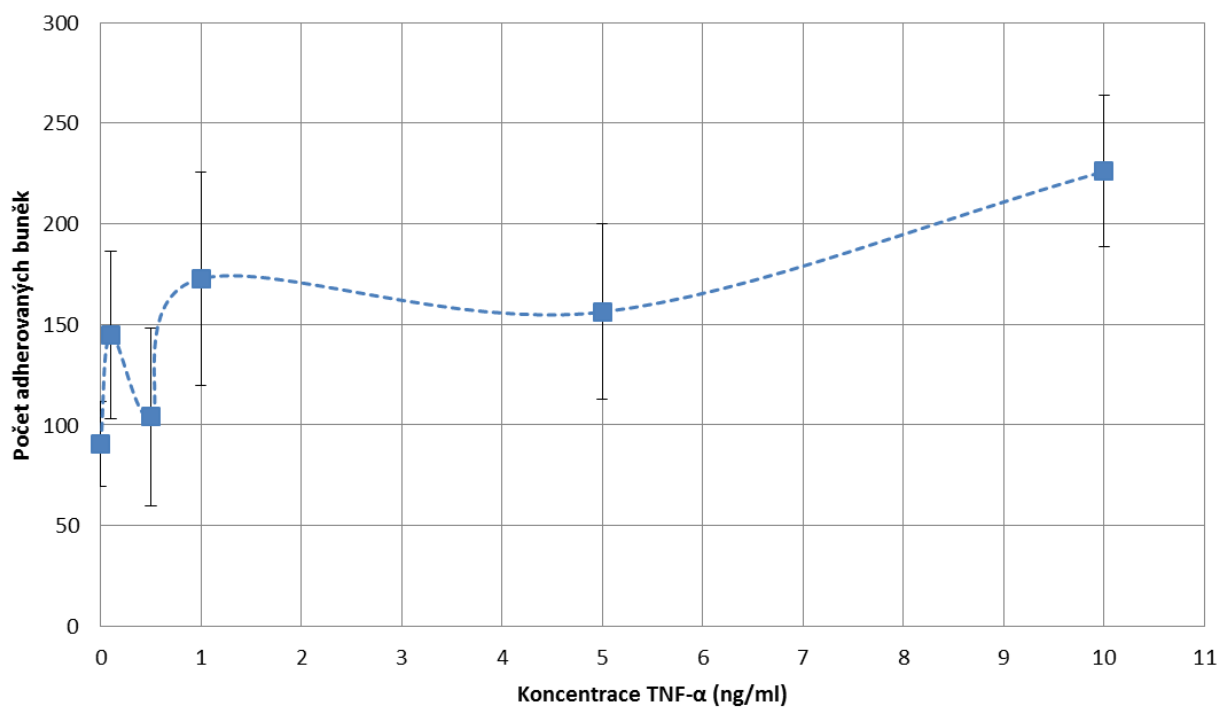


Graf č. 1: Závislost procenta adheze THP-1 monocytů na koncentraci přidaného TNF- α

Procento adheze THP-1 monocytů vyjádřené jako poměr počtu adherovaných buněk ku počtu všech přidaných buněk v závislosti na koncentraci TNF- α (hodnoty jsou vždy průměr z 8 jamek). HUVEC byly stimulované různými koncentracemi TNF- α po dobu 24 hodin. Fluorescence byla měřena po 30 minutách koinkubace HUVEC s THP-1.

9.1.2. Počty buněk

Kontrola výsledků metodou počítání buněk (graf č. 2) potvrdila vliv koncentrace na počet adherovaných buněk (jednofaktorová ANOVA, $p = 0,001$). V následné post hoc analýze se ale kvůli velkému rozptylu dat signifikantně lišily pouze počty buněk v jamkách s 10 ng TNF- α v porovnání jak s negativní kontrolou ($p = 0,001$), tak s 0,5 ng TNF- α /ml ($p = 0,004$).



Graf č. 2: Závislost počtu adherovaných THP-1 monocytů na koncentraci TNF- α

Počet adherovaných THP-1 monocytů v zorném poli (průměr z 5 jamek) v závislosti na koncentraci TNF- α . Fotografování probíhalo po oplachu neadherovaných THP-1 monocytů, které v jamce zůstaly po 30 minutové koinkubaci se stimulovanými HUVEC.

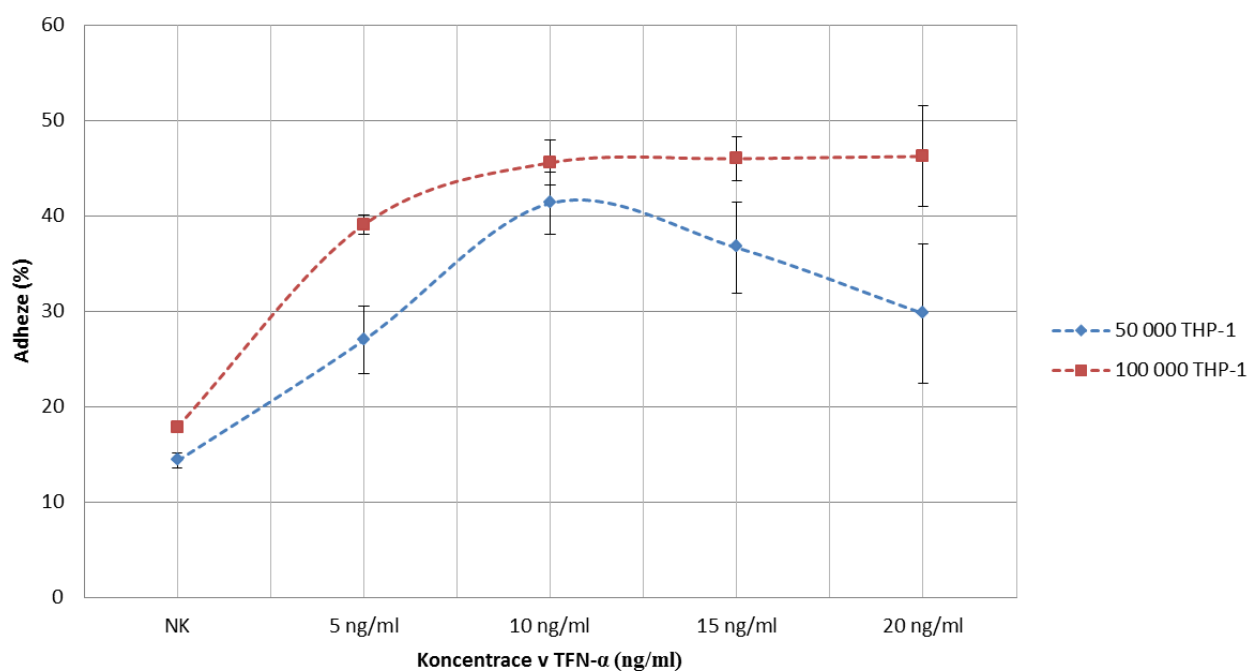
9.1.3. Fluorescence

Dalším cílem bylo zjistit, zda má na procento adheze vliv také počet přidávaných THP-1 (graf č. 3). Opět byla k HUVEC přidána rostoucí řada koncentrací TNF- α a v tomto experimentu 50 000 nebo 100 000 THP-1 monocytů. Po 20 minutách koinkubace bylo porovnáno zvýšení procenta adheze mezi těmito koncentracemi a pro různá množství přidávaných THP-1 monocytů.

Při použití 50 000 THP-1 se potvrdil výsledek předchozího experimentu, kdy zvýšení koncentrace TNF- α z 5 na 10 ng/ml vedlo k signifikantně vyššímu procentu adheze THP-1

monocytů ($p = 0,001$). Další zvýšení koncentrace TNF- α na 15 ng/ml už se dalším zvýšením procenta adheze neprojevovalo. Při použití 20 ng TNF- α /ml došlo dokonce ke snížení procenta adheze (statisticky významného při srovnání s 10 ng TNF- α /ml, $p = 0,003$).

Tento pokles nebyl zaznamenán, pokud bylo přidáno dvojnásobné množství THP-1 monocytů. Právě srovnání vlivu počtu přidávaných THP-1 monocytů na procento adheze přineslo zajímavé výsledky. Přidání 100 000 THP-1 monocytů vedlo ve všech případech k signifikantně vyššímu procentu adheze v porovnání s 50 000 THP-1. Trend zvyšujícího se počtu adherovaných monocytů v závislosti na zvyšující se koncentraci TNF- α byl ale v obou případech shodný. Procento adheze stoupalo se zvyšující se koncentrací TNF- α , přičemž nejvyšších hodnot bylo dosaženo pro koncentraci 10 ng TNF- α /ml. Koncentrace 15 a 20 ng TNF- α /ml se od 10 ng TNF- α /ml signifikantně nelišily.

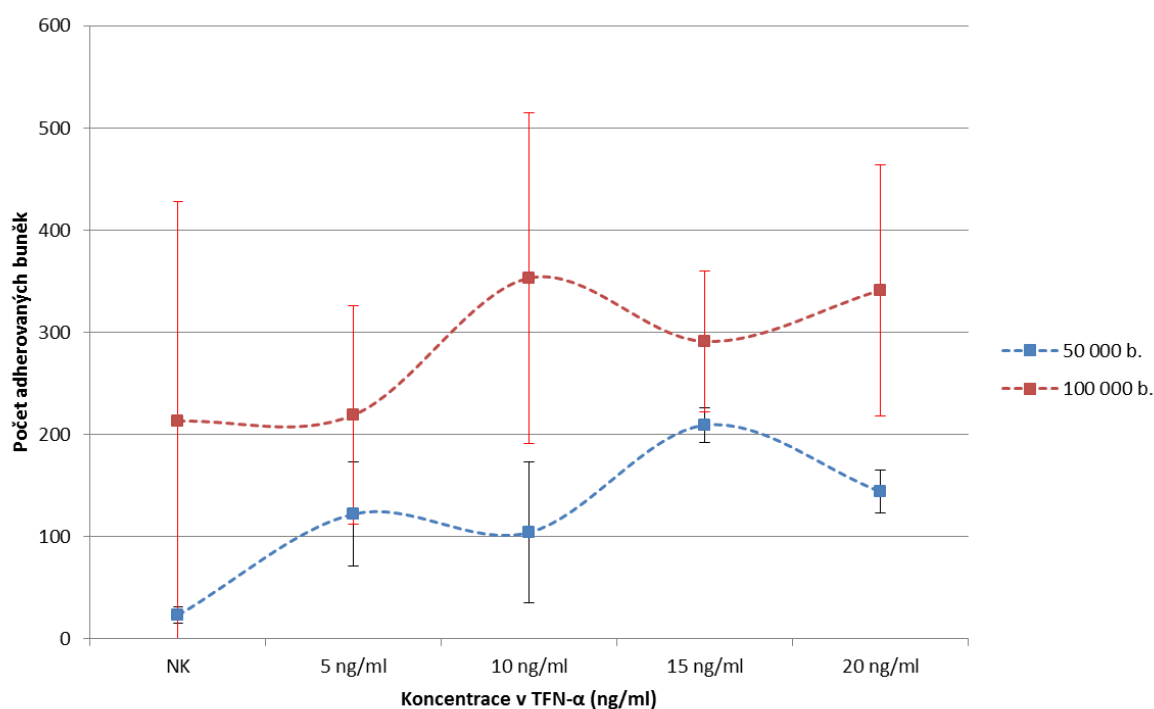


Graf č. 3: Závislost procenta adheze THP-1 monocytů na koncentraci přidaného TNF- α (srovnání vlivu množství přidávaných monocytů na procento adheze)

Procento adheze THP-1 monocytů na endotel po 20 minutách koinkubace (data jsou průměr ze 6 jamek). Procento adheze bylo při použití 100 000 THP-1 monocytů vždy signifikantně vyšší než procento adheze při použití 50 000 THP-1 monocytů. Nejvyšší procento adheze bylo v obou případech zaznamenáno u koncentrace 10 ng TNF- α /ml. Signifikanční pokles procenta adheze při koncentraci 20 ng TNF- α /ml byl pozorován pouze při použití 50 000 THP-1.

9.1.4. Počty buněk

Hodnocení množství adherovaných THP-1 monocytů na endotel pomocí metody počítání buněk nepřineslo zpřesnění výsledků (graf č. 4). Potvrdil se vliv celkového počtu přidaných THP-1 monocytů na množství adherovaných buněk (dvoufaktorová ANOVA s opakováním: $p = 0,003$), ale při post hoc analýze počtu adherovaných buněk nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi stejnými koncentracemi TNF- α ani u jedné ze zkoumaných dvojic. Vliv koncentrace TNF- α na počet adherovaných buněk při použití této metody nebyl prokázán (dvoufaktorová ANOVA s opakováním: $p = 0,370$).



Graf č. 4: Závislost počtu adherovaných THP-1 monocytů na koncentraci TNF- α (srovnání vlivu množství přidaných monocytů na počet adherovaných monocytů)

Počet adherovaných monocytů v zorném poli (průměr ze 3 jamek) v závislosti na koncentraci TNF- α . Srovnání vlivu počtu přidaných monocytů na adhezi po 20 minutách koinkubace s HUVEC. Kvůli velkému rozptylu hodnot nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi různými koncentracemi TNF- α .

9.2. Vliv prodlužující se doby koinkubace na adhezi THP-1 monocytů na endotel *in vitro*

9.2.1. Fluorescence

Dalším úkolem bylo zjistit, zda má i doba inkubace THP-1 s HUVEC vliv na procento adheze THP-1 monocytů (graf č. 5). THP-1 monocyty (v množství 50 000 buněk na jamku)

byly přidány ke konfluentní vrstvě HUVEC aktivované 10 ng TNF- α /ml postupně v 5 až 20 minutových intervalech (pro ilustraci rozložení destičky na obr. č. 4). Nejkratší čas koinkubace byl 10 minut a nejdelší 70 minut. Jak se ukázalo, stimulace HUVEC 10 ng TNF- α /ml vedla k signifikantně vyššímu procentu adheze THP-1 monocytů už po 10 minutách koinkubace v porovnání s negativní kontrolou (HUVEC neaktivované přidáním TNF- α , koinkubace s THP-1 monocyty po dobu 30 minut, $p = 6,179 \times 10^{-6}$, v grafu není kvůli zachování přehlednosti uvedena). Další prodlužování koinkubace vedlo k postupnému nárůstu procenta adheze THP-1 monocytů a tento nárůst vrcholil mezi 30. a 40. minutou (mezi hodnotami procenta adheze po 30, 35 a 40 minutách nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl). Absolutně nejvyšší hodnota procenta adheze byla pozorována po 40 minutách koinkubace, kdy stoupla až na $52,03 \pm 3,37$ %. Po 50 minutách inkubace procento adheze signifikantně kleslo v porovnání s hodnotami pro 35 a 40 minut ($p = 0,043$ a $p = 0,001$) a po dalších 20 minutách se už míra adheze výrazně nezměnila.

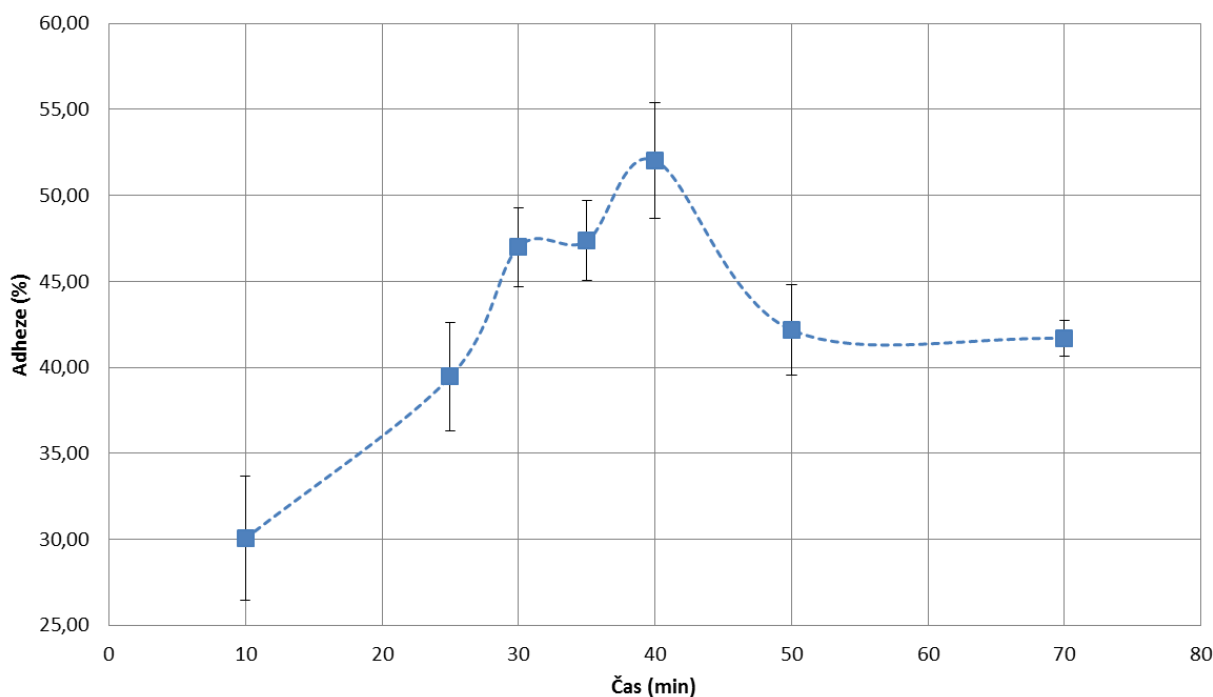
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	30	70	50	40	35	30	25	10				
B	30	70	50	40	35	30	25	10				
C	30	70	50	40	35	30	25	10				
D	30	70	50	40	35	30	25	10				
E	30	70	50	40	35	30	25	10				
F	30	70	50	40	35	30	25	10				
G												
H												

TNF- α 10 ng/ml

NK 1 - EBM-2 + 2% FCS

Obrázek č. 6:

Rozložení testové destičky, čísla v buňkách jsou časy koinkubace HUVEC s THP-1 v minutách.

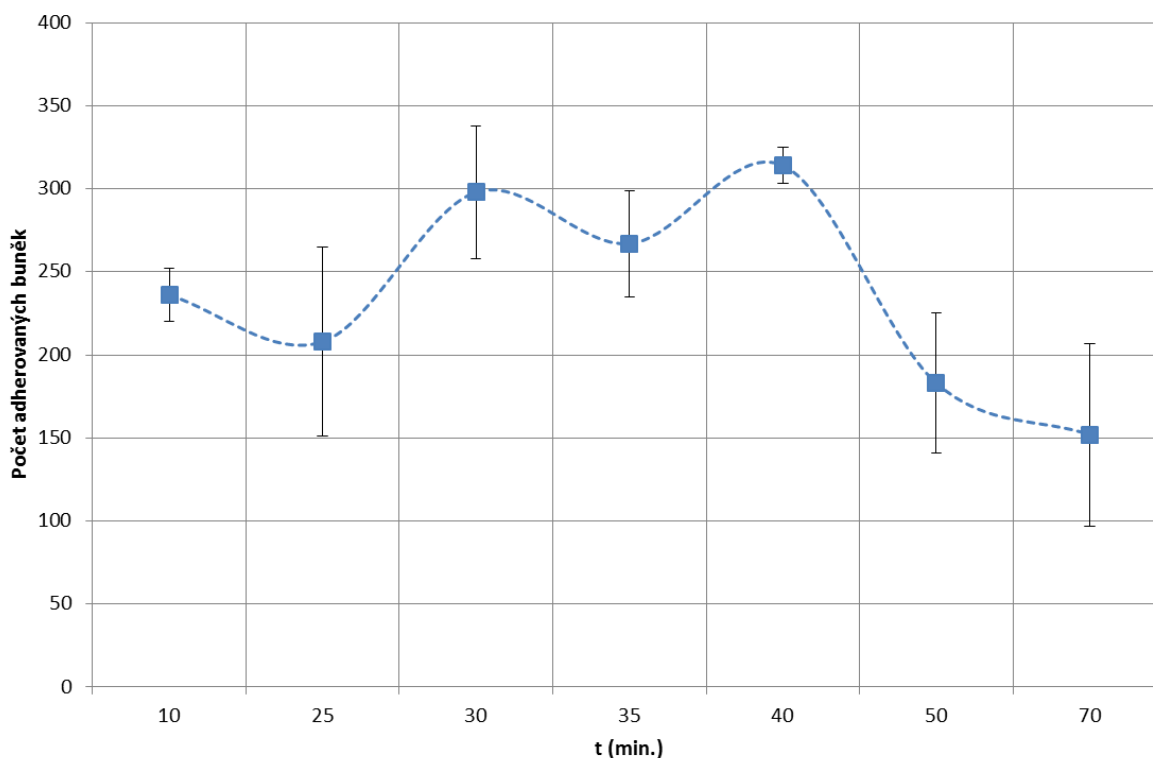


Graf č. 5: Závislost procenta adheze THP-1 monocytů na délce koinkubace s HUVEC

Vliv délky koinkubace THP-1 monocytů na procento adheze při stimulaci HUVEC 10 ng TNF- α /ml. Data jsou průměr ze 6 jamek. Hodnota procenta adheze stoupala s prodlužující se dobou koinkubace až do 30. minuty. Mezi hodnotami procenta adheze po 30, 35 a 40 minutách nebyl signifikantní rozdíl. V 50. minutě došlo k poklesu procenta adheze, který byl patrný i v 70. minutě.

9.2.2. Počty buněk

Ověření metodou počítání adherovaných buněk nevedlo k dalšímu zpřesnění, ale výsledky zhruba odpovídaly metodě měření fluorescenčního signálu (graf č. 6). Jednofaktorová ANOVA prokázala vliv času na počet adherovaných buněk ($p = 0,001$). Post hoc analýza Tukeyho HSD testem ale kvůli velkým rozptylům hodnot našla jen několik signifikantních rozdílů mezi různými časy koinkubace. Konkrétně se signifikantně lišily počty buněk v jamkách po 30 a 40 minutách v porovnání s jamkami po 50 a 70 minutách (30 a 40 minut vs. 50 minut vždy $p < 0,05$, 30 a 40 minut vs. 70 minut vždy $p < 0,01$), počet buněk v jamkách po 35 minutách se signifikantně lišil jen v porovnání s jamkami po 70 minutách ($p = 0,042$). V průměru nejvyšší počet adherovaných buněk na zorné pole byl zaznamenán po 40 minutách koinkubace (314 ± 42 buněk).



Graf č. 6: Závislost počtu adherovaných THP-1 monocytů na době koinkubace

Vliv délky koinkubace THP-1 monocytů s HUVEC stimulovanými 10 ng TNF- α /ml na počet adherovaných THP-1 monocytů. Data jsou průměr ze 4 jamek. Kvůli velkému rozptylu hodnot byl signifikantní rozdíl v počtu adherovaných monocytů nalezen pouze při porovnání jamek po 30 a 40 minutách s jamkami po 50 a 70 minutách. Po 35 minutách byla hodnota počtu adherovaných buněk signifikantně vyšší v porovnání s hodnotou po 70 minutách.

9.3. Porovnání kombinace vlivu koncentrace TNF- α a času koinkubace na adhezi THP-1 monocytů na endotel *in vitro*

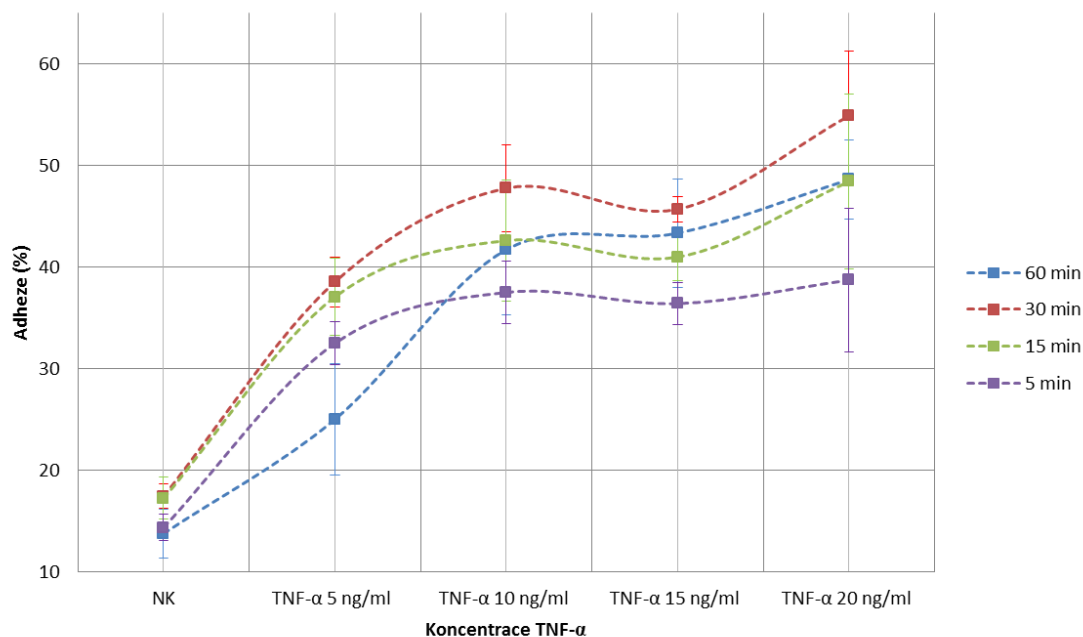
9.3.1. Fluorescence

Následující kombinovaný experiment byl použit k porovnání síly vlivu času koinkubace a koncentrace TNF- α na procento adheze (grafy č. 7 a 8). Opět byla použita vzestupná řada koncentrací 5, 10, 15 a 20 ng TNF- α /ml a pro každou koncentraci byly zvoleny 4 doby koinkubace: 5, 15, 30 a 60 minut.

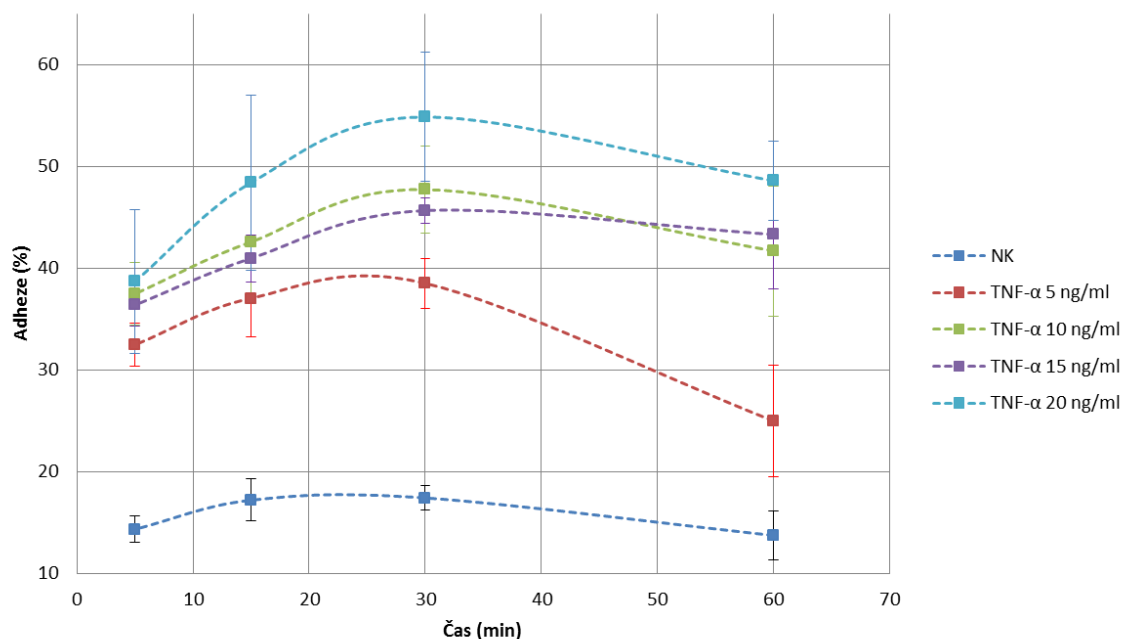
Analýza dat pomocí dvoufaktorové ANOVY s opakováním ukázala, že jak v případě času ($p = 1,606 \times 10^{-5}$), tak koncentrace TNF- α ($p < 1 \times 10^{-10}$) jsou vlivy faktorů signifikantní. Mezi oběma faktory nedochází dle testu k interakci (tedy že se například s prodlužujícím se časem inkubace nemění rozdíl vlivu koncentrace TNF- α na procento adheze a naopak, $p = 0.159$).

Už po pěti minutách inkubace došlo ke zvýšení procenta adheze u všech použitých koncentrací TNF- α ve srovnání s negativní kontrolou (vždy $p < 0,01$), ale jednotlivé koncentrace se od sebe svým účinkem na adhezi signifikantně nelišily. Po 15 minutách byly výsledky obdobné, TNF- α ovlivnilo statisticky významně procento adheze ve všech přidaných koncentracích ve srovnání s negativní kontrolou (vždy $p < 0,01$). Signifikantně se mezi sebou lišily pouze koncentrace 5 a 20 ng TNF- α /ml ($p = 0,016$). Po 30 minutách už se jednotlivé použité koncentrace TNF- α mezi sebou signifikantně lišily ve svém účinku na procento adheze THP-1 monocytů (vždy $p < 0,05$). Jedinou výjimku představovaly koncentrace 10 a 15 ng TNF- α /ml, mezi kterými nebyl nalezen významný rozdíl. Další růst adheze zaznamenaný při použití 20 ng TNF- α /ml byl sice statisticky významný, ale poměrně mírný (10 vs 20 ng TNF- α : $p = 0,026$). Po 60 minutách pak došlo k vymizení rozdílů mezi procenty adheze u vyšších koncentrací TNF- α a od 10 ng TNF- α /ml už se hodnota procenta adheze statisticky významně neměnila (graf č. 7).

Délka koinkubace THP-1 s HUVEC (graf č. 8) neměla statisticky významný vliv na procento adheze u negativní kontroly a 10 ng TNF- α /ml. U dalších koncentrací TNF- α se čas koinkubace signifikantně projevil jen v několika případech. Při použití 5 ng TNF- α /ml došlo k signifikantnímu snížení procenta adheze mezi 15. a 60. minutou a 30. a 60. minutou koinkubace ($p = 0,006$, respektive $p = 0,002$). Při použití 15 ng TNF- α /ml procento adheze mezi 5. a 30. a 5. a 60. minutou signifikantně stoupl ($p = 0,005$, respektive $p = 0,037$). Pro koncentraci 20 ng TNF- α /ml byl zaznamenán signifikantní růst procenta adheze pouze mezi časy 5 a 30 minut ($p = 0,005$).



Graf č. 7: Závislost procenta adheze THP-1 monocytů na koncentraci přidaného TNF-α pro různé doby koinkubace



Graf č. 8: Závislost procenta adheze THP-1 monocytů na době koinkubace pro různé koncentrace přidaného TNF-α

Grafy č. 7 a 8

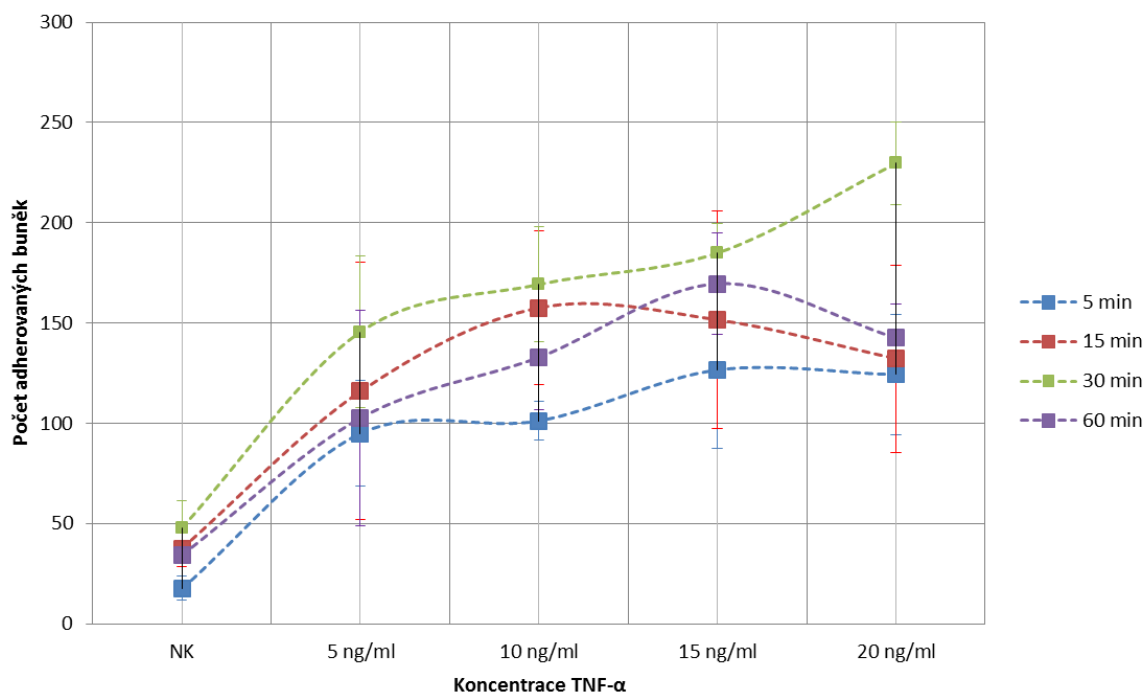
Porovnání vlivu koncentrace TNF-α a doby koinkubace na procento adherovaných THP-1 monocytů. Data jsou průměr ze 4 jamek (NK) nebo 5 jamek (5, 10, 15 a 20 ng TNF-α/ml). Procento adheze stoupalo v závislosti na koncentraci TNF-α pro všechny časy. Po 30 minutách byla hodnota procenta adheze nejvyšší při použití koncentrace 20 ng TNF-α/ml.

9.3.2. Počty buněk

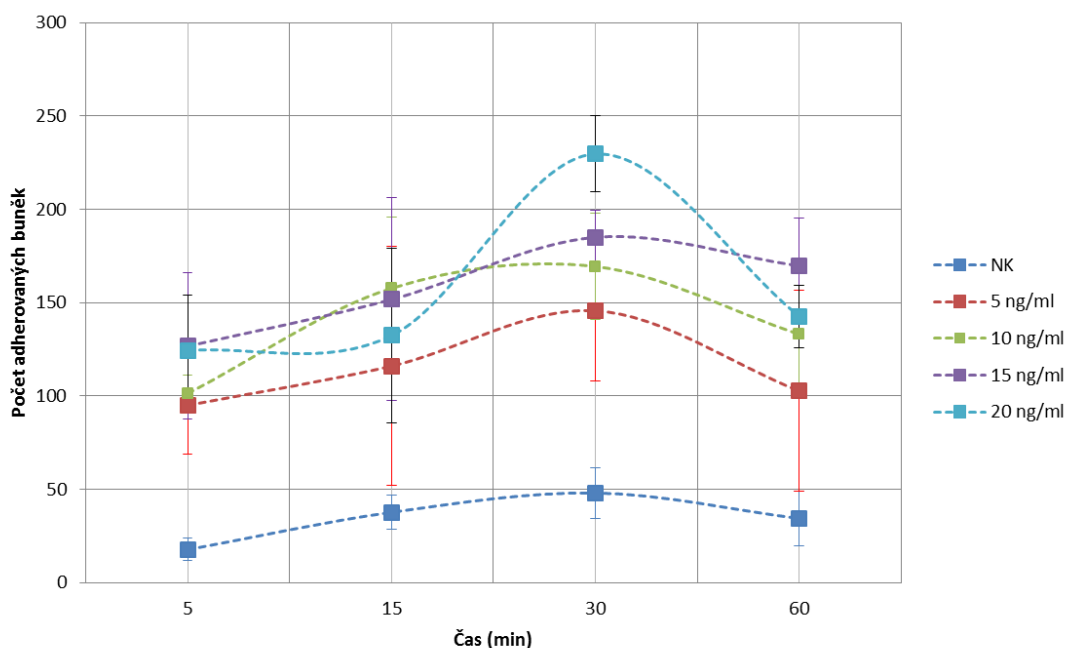
Hodnocení počtu adherovaných buněk přineslo méně jasné výsledky (graf č. 9). Analýza dat použitím dvoufaktorové ANOVY potvrdila, že jak koncentrace přidaného TNF- α ($p = 5.972 \times 10^{-9}$), tak délka koinkubace s THP-1 ($p = 1.604 \times 10^{-3}$) má vliv na počet adherovaných buněk. Mezi oběma faktory opět nebyla zjištěna interakce ($p = 0,853$).

Vliv koncentrace TNF- α se po 5 minutách koinkubace projevil pouze při srovnání počtů buněk v jamkách s negativní kontrolou a v jamkách s 15 a 20 ng TNF- α /ml ($p = 0,011$, respektive $p = 0,013$). Po 15 minutách se počet adherovaných buněk v jamkách s různými koncentracemi TNF- α statisticky významně nelišil, dokonce nebylo pozorováno zvýšení počtu adherovaných buněk v porovnání s negativní kontrolou. To se změnilo po 30 minutách koinkubace, kdy došlo u všech použitých koncentrací TNF- α k signifikantnímu zvýšení počtu adherovaných buněk v porovnání s negativní kontrolou (kromě 5 ng TNF- α byla hodnota p vždy $< 0,01$). Vliv jednotlivých koncentrací TNF- α na počet adherovaných buněk se statisticky významně nelišil s jedinou výjimkou – byl nalezen signifikantní rozdíl mezi 5 a 20 ng TNF- α /ml ($p = 0,043$). Po 60 minutách koinkubace byl, podobně jako po 5 minutové inkubaci, nalezen signifikantní rozdíl v počtu adherovaných buněk pouze při srovnání jamek s 15 a 20 ng TNF- α a negativní kontrolou ($p = 0,009$, respektive $p = 0,035$).

Vliv doby koinkubace na počet adherovaných buněk (graf č. 10) byl pro jednotlivé použité koncentrace TNF- α ve všech případech nesignifikantní pouze s jedinou výjimkou. Pro koncentraci 20 ng TNF- α /ml se počet adherovaných buněk statisticky významně lišil mezi časy 5 a 30 minut ($p = 0,036$), což bylo přesně v souladu s výsledky analýzy intenzity fluorescenčního signálu.



Graf č. 9: Závislost počtu adherovaných buněk na koncentraci přidaného TNF- α pro různé doby koinkubace



Graf č. 10: Závislost počtu adherovaných THP-1 monocytů na době koinkubace pro různé koncentrace TNF- α

Grafy č. 9 a 10

Srovnání vlivu koncentrace TNF- α a doby koinkubace na počet adherovaných THP-1 monocytů v zorném poli (data jsou průměr ze 3 jamek).

10. Diskuze a závěry

10.1. Výchozí literární údaje

TNF- α je prozánětlivý cytokin s pleiotropními účinky. Podobně jako IL-1 β a lipopolysacharidy (LPS) je často využíván pro stimulaci endoteliálních buněk při studiu adheze leukocytů. Právě adheze leukocytů (např. monocytů, T-lymfocytů nebo neutrofilních granulocytů) je jedním z iniciálních kroků v rozvoji aterosklerózy. Linie THP-1 monocytů je spolu s kulturami HUVEC často využívaná při studiu vlivu různých látek na adhezi monocytů na endotel. Jak už bylo zmíněno výše, stimulace HUVEC TNF- α vede ke zvýšení exprese adhezních molekul na povrchu těchto buněk. TNF- α v těchto experimentech slouží jako pozitivní kontrola (Choi et al., 2004; Han et al., 2007; Kwon et al., 2005). Právě určení optimální koncentrace TNF- α stimulující HUVEC a zároveň optimalizace doby koinkubace HUVEC s THP-1 monocyty by mohlo zlepšit interpretaci výsledků adhezních experimentů. Zároveň by zavedení jednotné koncentrace TNF- α ke stimulaci HUVEC a doby koinkubace HUVEC s THP-1 monocyty umožnilo snadnější srovnání vlivu různých testovaných látek na adhezi THP-1 monocytů.

Koncentrace TNF- α běžně používané ke stimulaci leukocytů nebo endoteliálních buněk *in vitro*, se pohybují řádově v jednotkách až desítkách ng/ml (Mei et al., 2007; Schleser et al., 2006; Westhorpe et al., 2012), přičemž použití koncentrací 50 ng TNF- α /ml a vyšších už je spíše výjimečné (Choi et al., 2010; Schulte et al., 2011). Koncentrace 10 ng TNF- α /ml je jednou z nejběžněji používaných.

Zvýšená hladina TNF- α byla nalezena například u pacientek s revmatoidní artritidou a u žen trpících bulimií a anorexií. Hladina TNF- α v krvi se za normálních okolností pohybuje řádově v pg/ml, přičemž u těchto pacientů stoupá zhruba dvojnásobně (Nakai et al., 2000, 1999; Pahor et al., 2006). Hladina TNF- α v krevní plasmě je tedy zhruba tisícinásobně nižší než koncentrace tohoto cytokinu používaná v *in vitro* studiích. Nutnost použití vyšších dávek cytokinů v *in vitro* studiích ve srovnání s koncentrací v plasmě lze vysvětlit několika způsoby.

TNF- α je produkován přímo v místě aterosklerotického plaku monocyty a T-lymfocyty, lokálně tedy může jeho hladina dosahovat vyšších hodnot než hladina v krevní plasmě. Produkce TNF- α T-lymfocyty v místě aterosklerotické léze vede ke zvýšené infiltraci makrofágů a akumulaci lipidů (Kyaw et al., 2013), přičemž tyto makrofágy jsou pak lokálně zdrojem dalšího TNF- α a dochází k amplifikaci zánětu. Po vazbě na P-selektin roste exprese TNF- α u monocytů izolovaných z periferní krve (vrchol asi po 4 hodinách) a tato exprese je

ještě potencována preinkubací s interferonem γ (Suzuki et al., 2013). Produkce PCSK9 v myších peritoneálních makrofázích ještě posiluje expresi TNF- α vyvolanou působením LPS (Giunzioni et al., 2016). Třicetiminutová stimulace THP-1 monocytů podáním LPS u nich vedla po 3 hodinách k výrazné produkci TNF- α . (Roux et al., 1997).

V podmínkách *in vitro* je navíc obvykle používán ke stimulaci endoteliálních buněk pouze jeden cytokin. *In vivo* může docházet k potenciaci účinků TNF- α díky přítomnosti dalších látek. Subkutánní podání nízké dávky TNF- α v kombinaci s IL-4 (který samostatně nevykazuje prozánětlivé účinky) vedlo u paviánů k výraznější expresi VCAM-1 a zvýšené infiltraci T-lymfocytů v porovnání se stejnou dávkou samotného TNF- α nebo IL-4 (Briscoe et al., 1992). Stimulace HUVEC TNF- α v kombinaci s histaminem zvýšila signifikantně počet adherovaných THP-1 monocytů v porovnání se samotným TNF- α . Kombinace TNF- α s histaminem (uvolňovaným například bazofily nebo mastocyty při reakci na alergen) zvýšila expresi E-selektinu, ICAM-1 a VCAM-1 (Chen et al., 2013). Koinkubace myších srdečních endoteliálních buněk s TNF- α a IL-17A vedla k prodloužení doby exprese E-selektinu na povrchu těchto buněk v porovnání se stimulací samotným TNF- α . To následně vedlo ke zpomalení pohybu neutrofilních granulocytů po endotelu. Aplikace TNF- α společně s IL-17A ke zvýšené transmigraci neutrofilních granulocytů přes endotel v porovnání s aplikací samotného TNF- α . Aplikace TNF- α společně s IFN- γ zvýšila expresi společně s TNF- α transmigraci efektorových T-lymfocytů (Griffin et al., 2012). IFN- γ potencuje vliv TNF- α na degradaci inhibitorů nukleárního faktoru κ B (NF- κ B), které za normálních okolností brání translokaci tohoto transkripčního faktoru do jádra, ačkoliv samotný IFN- γ translokaci NF- κ B do jádra nezvyšuje (Cheshire and Baldwin, 1997). Stimulace THP-1 makrofágů TNF- α vede k produkci IL-6, který se podílí na zvýšení exprese SR-A. Inkubace THP-1 makrofágů se sérem od pacientů s revmatoidní artritidou (se zvýšenou koncentrací IL-6 a TNF- α) vedla k vyšší akumulaci oxLDL a expresi SR-A v porovnání se sérem od zdravých dárců et al., 2012). Právě přítomnost látek potencujících účinky TNF- α *in vivo* nebo lokálně zvýšená hladina TNF- α v místě zánětlivého ložiska by mohla alespoň částečně vysvětlit nutnost použití vyšších koncentrací TNF- α v podmínkách *in vitro*.

Doba preinkubace endoteliálních buněk s TNF- α se u různých autorů liší, ale pohybuje se zhruba od 4 hodin (Schleser et al., 2006), 5 hodin (Chen et al., 2013), 6 hodin (Schenkel et al., 2004; Sneddon et al., 2006), 8 hodin (Han et al., 2007; Kwon et al., 2005), 16 hodin (Schulte et al., 2011), po 24 až 72 hodin (Westhorpe et al., 2012). Doba stimulace s jinými

prozánětlivými cytokiny, např. IL-1 β , se obvykle pohybuje v podobném rozmezí: 6 hodin (Choi et al., 2004; Kataoka et al., 2002; Sneddon et al., 2006), 24 hodin (Hashimoto et al., 2011). V našem případě byly HUVEC inkubovány s TNF- α po dobu 24 hodin a tento čas byl dostačující ke zvýšení procenta adheze THP-1 monocytů. Jak už bylo zmíněno, aktivace endoteliálních buněk TNF- α se projevuje zvýšením exprese E-selektinu, ICAM-1 a VCAM-1. Při subkutánní aplikaci TNF- α přetrvávala u paviánů zvýšená exprese těchto molekul i po 48 hodinách (Briscoe et al., 1992). Právě E-selektin, ICAM-1 a VCAM-1 produkované HUVEC se mohly podílet na zvýšení procenta adheze THP-1 monocytů v našich experimentech.

U různých autorů se doba koinkubace THP-1 monocytů s HUVEC liší. Pohybuje se zhruba od 10 minut (Chen et al., 2013), 30 minut (Sneddon et al., 2006) až po 60 minut (Han et al., 2007; Kwon et al., 2005), při použití monocytů získaných z periferní krve až 1,5 hodiny (Schenkel et al., 2004). V jednom případě autoři zvolili 24 hodinovou dobu koinkubace THP-1 monocytů a HUVEC (Choi et al., 2004).

10.2. Diskuze výsledků

10.2.1. Vliv rostoucí koncentrace TNF- α na adhezi THP-1 monocytů na endotel *in vitro*

Ke zvýšení procenta adheze THP-1 monocytů v porovnání s negativní kontrolou stačila preinkubace HUVEC s 1 ng TNF- α /ml. Nejvyšší procento adheze po 20 minutách koinkubace THP-1 monocytů s HUVEC bylo zaznamenáno pro koncentraci 10 ng TNF- α /ml. Při použití nejvyšší koncentrace 20 ng TNF- α /ml došlo překvapivě k poklesu procenta adheze THP-1 monocytů. Pokud bylo nicméně přidáno dvojnásobné množství THP-1 monocytů, pokles procenta adheze nebyl zaznamenán. Vysvětlením by mohlo být vyčerpání kapacity buněk: počet přidávaných THP-1 monocytů nebyl dostačující pro další zvýšení procenta adheze. I při použití dvojnásobného množství buněk ale dosáhlo procento adheze po 20 minutách koinkubace maximálních hodnot pro koncentraci 10 ng TNF- α /ml a s vyššími koncentracemi se už statisticky významně neměnilo.

Hodnocení výsledků metodou počítání buněk se ukázalo jako nespolehlivé. Hlavním problémem byl velký rozptyl v počtu buněk napočítaných v jednotlivých jamkách. Zvýšení počtu fotografovaných jamek ze 3 na 5 nepřispělo ke zpřesnění výsledků.

10.2.2. Vliv prodlužující se doby koinkubace na adhezi THP-1 monocytů na endotel *in vitro*

Otestovali jsme vliv délky koinkubace na procento adheze THP-1 monocytů. Ukázalo se, že již desetiminutová inkubace THP-1 monocytů s HUVEC stimulovanými 10 ng TNF- α /ml zvýšila procento adheze v porovnání s nestimulovanými HUVEC. S prodlužujícím se časem procento adheze dále stoupalo a vrcholilo mezi 30. a 40. minutou koinkubace. Po 50 minutách byl zaznamenán pokles procenta adheze, který přetrval až do 70. minuty.

Hodnocení metodou počítání buněk nepřispělo k dalšímu zpřesnění výsledků opět hlavně kvůli velkému rozptylu v počtu buněk v jednotlivých jamkách. Přesto výsledky potvrdily optimální dobu koinkubace 40 minut a zároveň byl zaznamenán i pokles v 50. a 70. minutě.

10.2.3. Porovnání kombinace vlivu koncentrace TNF- α a času koinkubace na adhezi THP-1 monocytů na endotel *in vitro*

Koncentrace TNF- α měla na procento adheze větší vliv než doba koinkubace THP-1 monocytů s HUVEC. Už pětiminutová koinkubace THP-1 monocytů s HUVEC se projevila zvýšením procenta adheze pro 5, 10, 15 i 20 ng TNF- α /ml v porovnání s negativní kontrolou. Další prodlužování doby koinkubace vedlo k prohloubení rozdílů vlivu koncentrace TNF- α na procento adheze. Rozdíly byly nejvýraznější po 30 minutách, kdy bylo dosaženo nejvyššího procenta adheze při použití 20 ng TNF- α /ml. To je v rozporu s výsledkem jednoho z předchozích experimentů (graf č. 3), ve kterém bylo procento adheze nejvyšší pro koncentraci 10 ng TNF- α /ml. Tento rozpor je možné vysvětlit například odlišným časem koinkubace, která byla v prvním experimentu kratší (20 minut). Po 60 minutách již nebyl rozdíl v procentu adheze mezi 10 a 20 ng TNF- α /ml signifikantní. Procento adheze při použití 10 ng TNF- α /ml se s prodlužující se dobou koinkubace signifikantně neměnilo (ačkoliv by pozorován trend postupného zvyšování procenta adheze THP-1 monocytů až do 30 minut koinkubace) – v porovnání s ostatními použitými koncentracemi byl vliv 10 ng TNF- α /ml na adhezi THP-1 monocytů nejstabilnější.

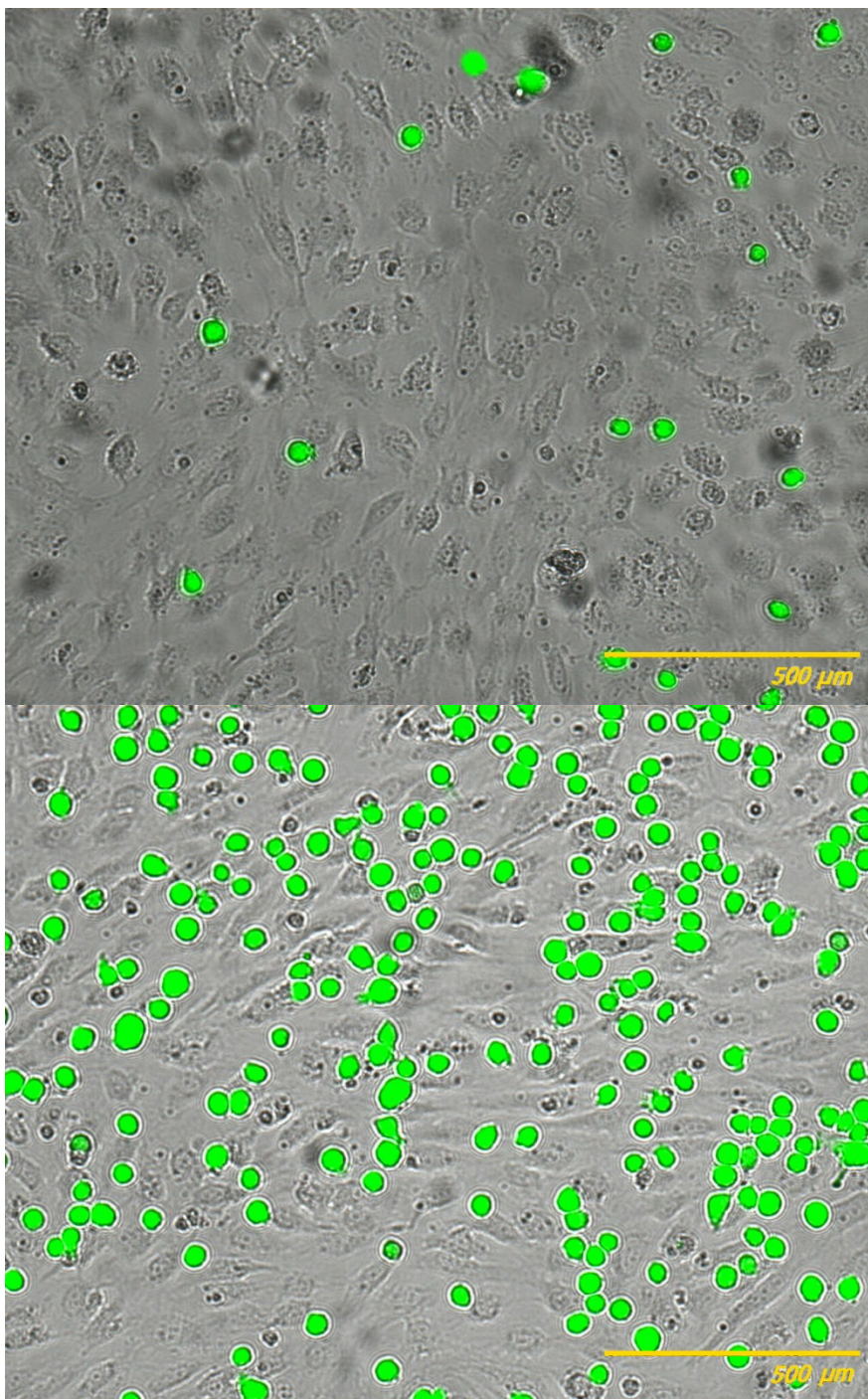
V předchozím experimentu, kdy byly testovány různé doby koinkubace THP-1 monocytů s HUVEC byl rozdíl mezi jednotlivými časy koinkubace při použití 10 ng TNF- α /ml výraznější (graf č. 5). Tento nesoulad by mohl být alespoň částečně vysvětlen nižším počtem jamek použitých v tomto experimentu, odlišnými časy koinkubace a velkým rozptylem dat, který znemožnil postihnout jemnější nuance změny procenta adheze.

Hodnocení výsledků metodou počítání buněk potvrdilo vliv koncentrace TNF- α i doby koinkubace na počet adherovaných buněk (srovnání grafů č. 7 a 8 s grafy č. 9 a 10). Výsledky potvrzovaly závěry z měření fluorescenčního signálu, ale kvůli velkému rozptylu dat byly méně přesné (post hoc analýza našla jen několik statisticky signifikantních rozdílů mezi jednotlivými koncentracemi TNF- α a dobami koinkubace).

10.3. Závěry

Po 20 minutách koinkubace byla zaznamenána nejvyšší hodnota procenta adheze při použití 10 ng TNF- α /ml. Doba koinkubace měla v porovnání s TNF- α slabší vliv na adhezi monocytů. Změna procenta adheze s prodlužující se dobou koinkubace měla u všech testovaných koncentrací TNF- α podobný průběh s vrcholem ve 30. minutě. Vliv 30 minutové koinkubace na adhezi THP-1 monocytů se výrazněji projevil při použití vyšších koncentrací TNF- α . Vedle koncentrace TNF- α a doby koinkubace HUVEC a THP-1 monocytů má na procento adheze vliv i počet přidaných THP-1 monocytů na jamku. Přidáním 100 000 THP-1 monocytů lze dosáhnout vyššího procenta adheze, ale průběh křivky je podobný jako při použití 50 000 buněk. Při použití 50 i 100 000 THP-1 byla po 20 minutách zaznamenána nejvyšší adheze pro koncentraci 10 ng TNF- α /ml.

Metoda měření fluorescenčního signálu představuje jednoduchý a přesný nástroj kvantifikace míry adheze monocytů na endotel. Metoda počítání buněk není v tomto modelu vhodná vzhledem k velkému rozptylu počtu buněk v jednotlivých jamkách. Možným řešením by bylo další zvýšení počtu vyfotografovaných jamek nebo vyfotografování více zorných polí v rámci jedné jamky a zprůměrování těchto hodnot. Metoda počítání buněk je nicméně ve srovnání s metodou měření fluorescence výrazně časově náročnější a další zvýšení počtu vyfotografovaných jamek by pak už zřejmě vyžadovalo fixaci buněk.



Obrázek č. 7:

THP-1 monocyty adherované na konfluentní vrstvu HUVEC, srovnání počtu adherovaných buněk při použití 10 ng TNF- α /ml (dolní fotografie) s negativní kontrolou (horní fotografie). Doba koinkubace byla 20 minut, 50 000 THP-1. Vyfotografováno na přístroji JuLI.

11. Závěr

Byl zaveden a otestován *in vitro* model adheze THP-1 monocytů na konfluentní vrstvu HUVEC po aktivaci TNF- α . Adheze byla hodnocena dvěma metodami. Nejprve měřením fluorescenčního signálu a následně počítáním adherovaných fluorescenčně značených THP-1 monocytů. Metoda měření fluorescenčního signálu je poměrně jednoduchá a výsledky jsou snadno interpretovatelné. Metoda počítání buněk v zorném poli je méně spolehlivá především kvůli velkému rozptylu dat, ale odráží přibližně výsledky metody měření fluorescenčního signálu.

Optimální koncentrace TNF- α ke stimulaci lidských endoteliálních buněk z pupečnickové žíly v tomto modelu je 10 ng/ml. Optimální doba koinkubace THP-1 monocytů s endoteliálními buňkami z pupečnickové žíly po stimulaci 10 ng TNF- α /ml je 30 – 40 minut při použití 50 000 THP-1 monocytů.

12. Literární přehled

- Allahverdian, S., Chehroudi, A.C., McManus, B.M., Abraham, T., Francis, G.A., 2014. Contribution of Intimal Smooth Muscle Cells to Cholesterol Accumulation and Macrophage-Like Cells in Human Atherosclerosis. *Circulation* 129, 1551–1559.
- Angelovich, T.A., Shi, M.D.Y., Zhou, J., Maisa, A., Hearps, A.C., Jaworowski, A., 2016. Ex vivo foam cell formation is enhanced in monocytes from older individuals by both extrinsic and intrinsic mechanisms. *Exp. Gerontol.* 80, 17–26.
- Bekkering, S., Quintin, J., Joosten, L.A.B., van der Meer, J.W.M., Netea, M.G., Riksen, N.P., 2014. Oxidized Low-Density Lipoprotein Induces Long-Term Proinflammatory Cytokine Production and Foam Cell Formation via Epigenetic Reprogramming of Monocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 1731–1738.
- Bevilacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone, M.A., Seed, B., 1989. Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1: An Inducible Receptor for Neutrophils Related to Complement Regulatory Proteins and Lectins. *Science* 243, 1160–1165.
- Blankenberg, S., Barboux, S., Tiret, L., 2003. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170, 191–203.
- Braut-Boucher, F., Pichon, J., Rat, P., Adolphe, M., Aubery, M., Font, J., 1995. A non-isotopic, highly sensitive, fluorimetric, cell-cell adhesion microplate assay using calcein AM-labeled lymphocytes. *J. Immunol. Methods* 178, 41–51.
- Briscoe, D., Cotran, R., Pober, J., 1992. Effects of tumor-necrosis-factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell-adhesion molecule-1 in vivo - correlation with CD3+ T-cell infiltration. *J. Immunol.* 149, 2954–2960.
- Chen, C., Khismatullin, D.B., 2013. Synergistic Effect of Histamine and TNF- α on Monocyte Adhesion to Vascular Endothelial Cells. *Inflammation* 36, 309–319.
- Cheshire, J.L., Baldwin, A.S., 1997. Synergistic activation of NF-kappa B by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon via enhanced I kappa B alpha degradation and de novo I kappa B beta degradation. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6746–6754.
- Choi, H.M., Oh, D.H., Bang, J.S., Yang, H.-I., Yoo, M.C., Kim, K.S., 2010. Differential effect of IL-1 β and TNF- α on the production of IL-6, IL-8 and PGE2 in fibroblast-like synoviocytes and THP-1 macrophages. *Rheumatol. Int.* 30, 1025–1033.
- Choi, H.Y., Rahmani, M., Wong, B.W., Allahverdian, S., McManus, B.M., Pickering, J.G., Chan, T., Francis, G.A., 2009. ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression and

- Apolipoprotein A-I Binding Are Impaired in Intima-Type Arterial Smooth Muscle Cells. *Circulation* 119, 3223–3231.
- Choi, J.-S., Choi, Y.-J., Park, S.-H., Kang, J.-S., Kang, Y.-H., 2004. Flavones mitigate tumor necrosis factor- α -induced adhesion molecule upregulation in cultured human endothelial cells: role of nuclear factor- κ B. *J. Nutr.* 134, 1013–1019.
- Cibicková, L., Karásek, D., Langová, K., Vaverková, H., Orság, J., Lukes, J., Novotný, D., 2014. Correlation of lipid parameters and markers of insulin resistance: does smoking make a difference? *Physiol. Res.* 63, S387.
- Cífková, R., Škodová, Z., Bruthans, J., Adámková, V., Jozífová, M., Galovcová, M., Wohlfahrt, P., Krajčoviechová, A., Poledne, R., Stávek, P., Lánská, V., 2010. Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. Czech MONICA and Czech post-MONICA. *Atherosclerosis* 211, 676–681.
- Collaboration, E.R.F., others, 2010. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *The Lancet* 375, 2215–2222.
- da Costa Martins, P., 2004. Platelet-Monocyte Complexes Support Monocyte Adhesion to Endothelium by Enhancing Secondary Tethering and Cluster Formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 193–199.
- Davídkovová, H., Kyselý, J., Kříž, B., Vojtíšek, P., Bobák, M., 2013. Trends in cardiovascular mortality and hospitalisations, and potential contribution of in-hospital case-fatality rates to changes in national mortality in the Czech Republic 1994–2009. *Heart* 99, 409–416.
- de Boer, O.J., van der Wal, A.C., Teeling, P., Becker, A.E., 1999. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc. Res.* 41, 443–449.
- Eniola-Adefeso, O., Huang, R.B., Smith, C.W., 2009. Kinetics of LFA-1 Mediated Adhesion of Human Neutrophils to ICAM-1—Role of E-Selectin Signaling Post-Activation. *Ann. Biomed. Eng.* 37, 737–748.
- Feng, B., Yao, P.M., Li, Y., Devlin, C.M., Zhang, D., Harding, H.P., Sweeney, M., Rong, J.X., Kuriakose, G., Fisher, E.A., Marks, A.R., Ron, D., Tabas, I., 2003. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat. Cell Biol.* 5, 781–792.

- Ferri, N., Tibolla, G., Pirillo, A., Cipollone, F., Mezzetti, A., Pacia, S., Corsini, A., Catapano, A.L., 2012. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels. *Atherosclerosis* 220, 381–386.
- Ghomari-Boukhatem, H., Bouchouicha, A., Mekki, K., Chenni, K., Belhadj, M., Bouchenak, M., 2016. Blood pressure, dyslipidemia and inflammatory factors are related to body mass index in scholar adolescents.
- Giunzioni, I., Tavori, H., Covarrubias, R., Major, A.S., Ding, L., Zhang, Y., DeVay, R.M., Hong, L., Fan, D., Predazzi, I.M., Rashid, S., Linton, M.F., Fazio, S., 2016. Local effects of human PCSK9 on the atherosclerotic lesion: PCSK9 and atherosclerotic lesion inflammation. *J. Pathol.* 238, 52–62.
- Glagov, S., Stary, H.C., Blankenhorn, D.H., others, 1992. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. *Arter. Thromb Vasc Biol* 12, 120–134.
- Glowinska, B., Urban, M., Peczynska, J., Florys, B., 2005. Soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) and selectins (sE selectin, sP selectin, sL selectin) levels in children and adolescents with obesity, hypertension, and diabetes. *Metabolism* 54, 1020–1026.
- Griffin, G.K., Newton, G., Tarrío, M.L., Bu, D. -x., Maganto-Garcia, E., Azcutia, V., Alcaide, P., Grabié, N., Luscinskas, F.W., Croce, K.J., Lichtman, A.H., 2012. IL-17 and TNF- Sustain Neutrophil Recruitment during Inflammation through Synergistic Effects on Endothelial Activation. *J. Immunol.* 188, 6287–6299.
- Guretzki, H.-J., Gerbitz, K.-D., Olgemöller, B., Schleicher, E., 1994. Atherogenic levels of low density lipoprotein alter the permeability and composition of the endothelial barrier. *Atherosclerosis* 107, 15–24.
- Han, J.-M., Lee, W.S., Kim, J.-R., Son, J., Nam, K.-H., Choi, S.-C., Lim, J.-S., Jeong, T.-S., 2007. Effects of diarylheptanoids on the tumor necrosis factor- α -induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9457–9464.
- Hashimoto, K., Kataoka, N., Nakamura, E., Tsujioka, K., Kajiya, F., 2007. Oxidized LDL specifically promotes the initiation of monocyte invasion during transendothelial migration with upregulated PECAM-1 and downregulated VE-cadherin on endothelial junctions. *Atherosclerosis* 194, e9–e17.

- Hashimoto, K., Kataoka, N., Nakamura, E., Hagihara, K., Hatano, M., Okamoto, T., Kanouchi, H., Minatogawa, Y., Mohri, S., Tsujioka, K., Kajiya, F., 2011. Monocyte trans-endothelial migration augments subsequent transmigratory activity with increased PECAM-1 and decreased VE-cadherin at endothelial junctions. *Int. J. Cardiol.* 149, 232–239.
- Hashimoto, K., Kataoka, N., Nakamura, E., Hagihara, K., Okamoto, T., Kanouchi, H., Mohri, S., Tsujioka, K., Kajiya, F., 2012. Live-cell visualization of the trans-cellular mode of monocyte transmigration across the vascular endothelium, and its relationship with endothelial PECAM-1. *J. Physiol. Sci.* 62, 63–69.
- Hashizume, M., Mihara, M., 2012. Atherogenic effects of TNF- α and IL-6 via up-regulation of scavenger receptors. *Cytokine* 58, 424–430.
- Higashikata, T., Yamagishi, M., Higashi, T., Nagata, I., Iihara, K., Miyamoto, S., Ishibashi-Ueda, H., Nagaya, N., Iwase, T., Tomoike, H., Sakamoto, A., 2006. Altered expression balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid plaque disruption: Results of quantitative tissue analysis using real-time RT-PCR method. *Atherosclerosis* 185, 165–172.
- Hou, J., Xing, L., Jia, H., Vergallo, R., Soeda, T., Minami, Y., Hu, S., Yang, S., Zhang, S., Lee, H., Yu, B., Jang, I.-K., 2016. Comparison of Intensive Versus Moderate Lipid-Lowering Therapy on Fibrous Cap and Atheroma Volume of Coronary Lipid-Rich Plaque Using Serial Optical Coherence Tomography and Intravascular Ultrasound Imaging. *Am. J. Cardiol.* 117, 800–806.
- Hsieh, V., Kim, M.-J., Gelissen, I.C., Brown, A.J., Sandoval, C., Hallab, J.C., Kockx, M., Traini, M., Jessup, W., Kritharides, L., 2014. Cellular Cholesterol Regulates Ubiquitination and Degradation of the Cholesterol Export Proteins ABCA1 and ABCG1. *J. Biol. Chem.* 289, 7524–7536.
- Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard, R.D., Hammer, R.E., Herz, J., 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* 92, 883.
- Joakimsen, O., Børnaa, K.H., Stensland-Bugge, E., Jacobsen, B.K., 1999. Age and sex differences in the distribution and ultrasound morphology of carotid atherosclerosis The Tromsø Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 3007–3013.

- Kataoka, N., Iwaki, K., Hashimoto, K., Mochizuki, S., Ogasawara, Y., Sato, M., Tsujioka, K., Kajiya, F., 2002. Measurements of endothelial cell-to-cell and cell-to-substrate gaps and micromechanical properties of endothelial cells during monocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 15638–15643.
- Kellner-Weibel, G., Jerome, W.G., Small, D.M., Warner, G.J., Stoltenborg, J.K., Kearney, M.A., Corjay, M.H., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., 1998. Effects of Intracellular Free Cholesterol Accumulation on Macrophage Viability. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 423.
- Kim, I., Moon, S.-O., Hoon Kim, S., Jin Kim, H., Soon Koh, Y., Young Koh, G., 2001. Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through Nuclear Factor- κ B Activation in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 7614–7620.
- Kwon, O.E., Lee, H.S., Lee, S.W., Chung, M.Y., Bae, K.H., Rho, M.-C., Kim, Y.-K., 2005. Manassantin a and b isolated from *Saururus chinensis* inhibit TNF- α -induced Cell adhesion molecule expression of human umbilical vein endothelial cells. *Arch. Pharm. Res.* 28, 55–60.
- Kyaw, T., Winship, A., Tay, C., Kanellakis, P., Hosseini, H., Cao, A., Li, P., Tipping, P., Bobik, A., Toh, B.-H., 2013. Cytotoxic and Proinflammatory CD8+ T Lymphocytes Promote Development of Vulnerable Atherosclerotic Plaques in ApoE-Deficient Mice. *Circulation* 127, 1028–1039.
- Lei, L., Xiong, Y., Chen, J., Yang, J.-B., Wang, Y., Yang, X.-Y., Chang, C.C.Y., Song, B.-L., Chang, T.-Y., Li, B.-L., 2009. TNF- α stimulates the ACAT1 expression in differentiating monocytes to promote the CE-laden cell formation. *J. Lipid Res.* 50, 1057–1067.
- Linton, M.F., Babaev, V.R., Gleaves, L.A., Fazio, S., 1999. A direct role for the macrophage low density lipoprotein receptor in atherosclerotic lesion formation. *J. Biol. Chem.* 274, 19204–19210.
- Low, B., Liang, M., Fu, J., 2007. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Mediates Sidestream Cigarette Smoke-Induced Endothelial Permeability. *J. Pharmacol. Sci.* 104, 225–231.
- Massberg, S., Brand, K., Grüner, S., Page, S., Müller, E., Müller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., Nieswandt, B., Gawaz, M., 2002. A Critical Role of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation. *J. Exp. Med.* 196, 887–896.

- Mehta, A., Yang, B., Khan, S., Hendricks, J.B., Stephen, C., Mehta, J.L., 1995. Oxidized Low-Density Lipoproteins Facilitate Leukocyte Adhesion to Aortic Intima Without Affecting Endothelium-Dependent Relaxation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 2076–2083.
- Mei, C., Chen, Z., Liao, Y., Wang, Y., Peng, H., Chen, Y., 2007. Interleukin-10 inhibits the down-regulation of ATP binding cassette transporter A1 by tumour necrosis factor- α in THP-1 macrophage-derived foam cells. *Cell Biol. Int.* 31, 1456–1461.
- Moreno, P.R., 2004. Plaque Neovascularization Is Increased in Ruptured Atherosclerotic Lesions of Human Aorta: Implications for Plaque Vulnerability. *Circulation* 110, 2032–2038.
- Nakai, Y., Hamagaki, S., Takagi, R., Taniguchi, A., Kurimoto, F., 1999. Plasma Concentrations of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and Soluble TNF Receptors in Patients with Anorexia Nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 1226–1228.
- Nakai, Y., Hamagaki, S., Takagi, R., Taniguchi, A., Kurimoto, F., 2000. Plasma concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and soluble TNF receptors in patients with bulimia nervosa. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 53, 383–388.
- Napoli, C., D'armiento, F.P., Mancini, F.P., Postiglione, A., Witztum, J.L., Palumbo, G., Palinski, W., 1997. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 100, 2680.
- Olechnowicz-Tietz, S., Gluba, A., Paradowska, A., Banach, M., Rysz, J., 2013. The risk of atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. *Int. Urol. Nephrol.* 45, 1605–1612.
- Ostermann, G., Weber, K.S.C., Zerneck, A., Schröder, A., Weber, C., 2002. JAM-1 is a ligand of the β 2 integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat. Immunol.* 3, 151–158.
- Pahor, A., Hojs, R., Gorenjak, M., Rozman, B., 2006. Accelerated atherosclerosis in premenopausal female patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 27, 119–123.
- Piedrahita, J.A., Zhang, S.H., Hagaman, J.R., Oliver, P.M., Maeda, N., 1992. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 4471–4475.

- Qin, Z., 2012. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* 221, 2–11.
- Ramos, C.L., Huo, Y., Jung, U., Ghosh, S., Manka, D.R., Sarembock, I.J., Ley, K., 1999. Direct demonstration of P-selectin–and VCAM-1–dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E–deficient mice. *Circ. Res.* 84, 1237–1244.
- Roux, M.E., Lecoq, D., Meyer, D., Dosne, A.M., 1997. Requirement of prestimulated THP-1 monocytic cells for endothelial cell activation. Involvement of TNF alpha. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 8, 39–47.
- Saneipour, M., Ghatreh-Samani, K., Heydarian, E., Farrokhi, E., Abdian, N., 2015. Adiponectin inhibits oxidized low density lipoprotein-induced increase in matrix metalloproteinase 9 expression in vascular smooth muscle cells. *ARYA Atheroscler.* 11, 191–195.
- Schenkel, A.R., Mamdouh, Z., Muller, W.A., 2004. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol* 5, 393–400.
- Schleser, S., Ringseis, R., Eder, K., 2006. Conjugated linoleic acids have no effect on TNF α -induced adhesion molecule expression, U937 monocyte adhesion, and chemokine release in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 186, 337–344.
- Schmitt, M.M.N., Megens, R.T.A., Zerneck, A., Bidzhekov, K., van den Akker, N.M., Rademakers, T., van Zandvoort, M.A., Hackeng, T.M., Koenen, R.R., Weber, C., 2014. Endothelial Junctional Adhesion Molecule-A Guides Monocytes Into Flow-Dependent Predilection Sites of Atherosclerosis Clinical Perspective. *Circulation* 129, 66–76.
- Schulte, D., Kueppers, V., Dartsch, N., Broermann, A., Li, H., Zarbock, A., Kamenyeva, O., Kiefer, F., Khandoga, A., Massberg, S., Vestweber, D., 2011. Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability. *Embo J.* 30, 4157–4170.
- Sneddon, A.A., McLeod, E., Wahle, K.W.J., Arthur, J.R., 2006. Cytokine-induced monocyte adhesion to endothelial cells involves platelet-activating factor: Suppression by conjugated linoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1761, 793–801.
- Snyderman, R., Pike, M., Fischer, D., Koren, H., 1977. Biologic and Biochemical Activities of Continuous Macrophage Cell Lines P388d1 and J774.1. *J. Immunol.* 119, 2060–2066.

- Sary, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W., 1994. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 14, 840–856.
- Sary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W., 1995. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. *Circulation* 92, 1355.
- Stroes, E., Colquhoun, D., Sullivan, D., Civeira, F., Rosenson, R.S., Watts, G.F., Bruckert, E., Cho, L., Dent, R., Knusel, B., Xue, A., Scott, R., Wasserman, S.M., Rocco, M., 2014. Anti-PCSK9 Antibody Effectively Lowers Cholesterol in Patients With Statin Intolerance. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 2541–2548.
- Sundstrom, C., Nilsson, K., 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565–577.
- Suzuki, J., Hamada, E., Shodai, T., Kamoshida, G., Kudo, S., Itoh, S., Koike, J., Nagata, K., Irimura, T., Tsuji, T., 2013. Cytokine Secretion from Human Monocytes Potentiated by P-Selectin-Mediated Cell Adhesion. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 160, 152–160.
- Takahashi, M., Ikeda, U., Masuyama, J.-I., Kitagawa, S.-I., Kasahara, T., Shimpo, M., Kano, S., Shimada, K., 1996. Monocyte-endothelial cell interaction induces expression of adhesion molecules on human umbilical cord endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 32, 422–429.
- Tavori, H., Giunzioni, I., Predazzi, I.M., Plubell, D., Shivinsky, A., Miles, J., Devay, R.M., Liang, H., Rashid, S., Linton, M.F., Fazio, S., 2016. Human PCSK9 promotes hepatic lipogenesis and atherosclerosis development via apoE- and LDLR-mediated mechanisms. *Cardiovasc. Res.* 110, 268–278.
- Townsend, N., Wilson, L., Bhatnagar, P., Wickramasinghe, K., Rayner, M., Nichols, M., 2016. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur. Heart J.* 37, 3232–3245.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K., 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia-cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26, 171–176.

- Tuzcu, E.M., Kapadia, S.R., Tutar, E., Ziada, K.M., Hobbs, R.E., McCarthy, P.M., Young, J.B., Nissen, S.E., 2001. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults. *Circulation* 103, 2705–2710.
- Walcheck, B., Moore, K.L., McEver, R.P., Kishimoto, T.K., 1996. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro. *J. Clin. Invest.* 98, 1081.
- Wang, H., n.d. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* 388, 1459–1544.
- Wang, H.-B., Wang, J.-T., Zhang, L., Geng, Z.H., Xu, W.-L., Xu, T., Huo, Y., Zhu, X., Plow, E.F., Chen, M., Geng, J.-G., 2007. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. *Nat. Immunol.* 8, 882–892.
- Wang, X., Greilberger, J., Ratschek, M., Jürgens, G., 2001. Oxidative modifications of LDL increase its binding to extracellular matrix from human aortic intima: influence of lesion development, lipoprotein lipase and calcium. *J. Pathol.* 195, 244–250.
- Warner, G.J., Stoudt, G., Bamberger (1), M., Johnson, W.J., Rothblat, G.H., 1995. Cell Toxicity Induced by Inhibition of Acyl Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase and Accumulation of Unesterified Cholesterol. *J. Biol. Chem.* 270, 5772–5778.
- Westhorpe, C.L.V., Dufour, E.M., Maisa, A., Jaworowski, A., Crowe, S.M., Muller, W.A., 2012. Endothelial cell activation promotes foam cell formation by monocytes following transendothelial migration in an in vitro model. *Exp. Mol. Pathol.* 93, 220–226.
- Worthylake, R.A., Lemoine, S., Watson, J.M., Burridge, K., 2001. RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J. Cell Biol.* 154, 147–160.
- Xu, T., Zhang, L., Geng, Z.H., Wang, H.-B., Wang, J.-T., Chen, M., Geng, J.-G., 2007. P-selectin cross-links PSGL-1 and enhances neutrophil adhesion to fibrinogen and ICAM-1 in a Src kinase-dependent, but GPCR-independent mechanism. *Cell Adhes. Migr.* 1, 115–123.
- Xue, J. -h., Yuan, Z., Wu, Y., Liu, Y., Zhao, Y., Zhang, W. -p., Tian, Y. -l., Liu, W. -m., Liu, Y., Kishimoto, C., 2010. High glucose promotes intracellular lipid accumulation in vascular smooth muscle cells by impairing cholesterol influx and efflux balance. *Cardiovasc. Res.* 86, 141–150.

- Yoshida, H., Kisugi, R., 2010. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin. Chim. Acta* 411, 1875–1882.
- Zhang, C., Zhen, Y.-Z., Lin, Y.-J., Liu, J., Wei, J., Xu, R., Hu, G., 2014. KNDC1 knockdown protects human umbilical vein endothelial cells from senescence. *Mol. Med. Rep.*, 82–88.
- Zhang, D.-W., Lagace, T.A., Garuti, R., Zhao, Z., McDonald, M., Horton, J.D., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., 2007. Binding of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 to Epidermal Growth Factor-like Repeat A of Low Density Lipoprotein Receptor Decreases Receptor Recycling and Increases Degradation. *J. Biol. Chem.* 282, 18602–18612.
- Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A., Maeda, N., 1992. Spontaneous Hypercholesterolemia and Arterial Lesions in Mice Lacking Apolipoprotein E. *Science* 258, 468–471.
- Zhao, B., Luo, X., Shi, H., Ma, D., 2011. Tissue factor pathway inhibitor-2 is downregulated by ox-LDL and inhibits ox-LDL induced vascular smooth muscle cells proliferation and migration. *Thromb. Res.* 128, 179–185.

Příloha:

Poster (prezentován na 20. kongresu o ateroskleróze ve Špindlerově Mlýně)

Adheze monocytů na endotel in vitro

IKE
M

H. Kubátová¹, S. Čejková¹, I. Králová Lesná¹, R. Poledne¹

¹Centrum experimentální medicíny, Laboratoř pro výzkum aterosklerózy, IKEM, Praha

Úvod

Iniciálním a klíčovým krokem v tvorbě aterosklerotických plaků je adheze monocytů k aktivovanému endotelu. Kromě jiných faktorů je aktivace endotelu ovlivněna hladinou prozánětlivých cytokinů v plazmě. Zavedení in vitro modelu umožní studovat vliv nízkomolekulárních látek na adhezi monocytů k endotelu.

Metoda

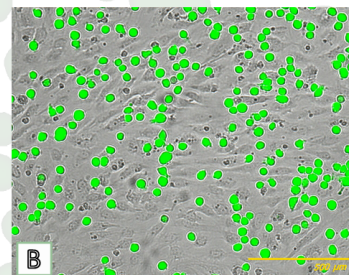
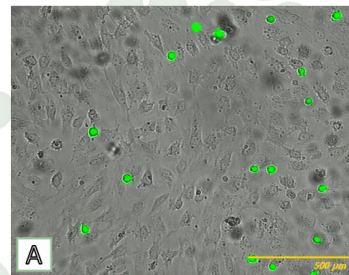
Vliv různých koncentrací TNF- α a délka jejich působení na adhezi lidských monocytů (THP-1) ke kultuře endoteliálních buněk (HUVEC) byly studovány in vitro. Míra adheze byla určena intenzitou fluorescence adherovaných monocytů označených calceinem.

Výsledky

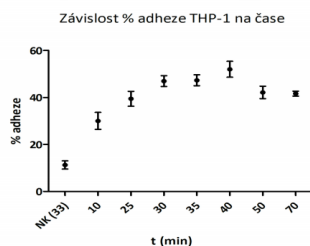
Při koncentraci 50 tisíc monocytů/ml byla nejvyšší adheze monocytů detekována pro koncentraci 10 ng TNF- α /ml. Délka intervalu mezi 15' - 40' pozitivně korelovala s počtem adherovaných THP-1 monocytů. Při dalším prodloužení intervalu byl pozorován trend k poklesu počtu adherovaných monocytů. Adheze THP-1 monocytů na endotel je tedy závislá na čase i koncentraci přidaného TNF- α , přičemž vliv koncentrace na tuto adhezi je výraznější.

Závěr

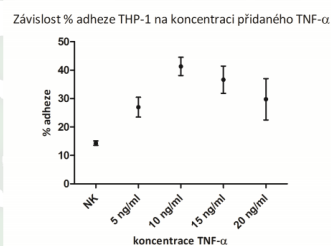
Byl zaveden model umožňující testovat vliv biologicky aktivních nízkomolekulárních látek na intenzitu adheze monocytů k endotelu. Optimální koncentrace TNF- α v tomto modelu je 10 ng/ml, přičemž délka působení je 30-40'.



Počet THP-1 adherovaných po 30 minutách, porovnání negativní kontroly (A) a 10 ng TNF- α /ml (B).



S prodloužícím se časem vzrůstá postupně množství adherovaných THP-1 s maximem ve 40. minutě. V 50. minutě lze naopak pozorovat pokles % adheze. Rozdíl mezi jednotlivými časy jsou vysoce signifikantní, významně se neliší pouze % adheze po 30 a 35 minutách a po 25, 50 a 70 minutách.



Se zvyšující se koncentrací vzrůstá postupně množství adherovaných THP-1. Nejvyšší počet adherovaných buněk byl zaznamenán při použití 10 ng TNF- α /ml. Při vyšších koncentracích cytokinu byl zaznamenán mírný pokles % adheze.

Podpořeno Grantovou agenturou Univerzity Karlovy.