

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Halyna Pidhorodetská

Modulace chemokinového profilu lidských makrofágů a renálního epitelu

Modulation of human macrophages and renal epithelium chemokine profile

Diplomová práce

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

Praha 2018

Prohlášení

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

V Praze dne 4.1.2018

Halyna Pidhorodetská

.....

Poděkování

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

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

Abstrakt

Jeden z hlavních účinků prozánětlivých cytokinů je indukce chemokinů a exprese adhezivních molekul, které regulují migraci imunitních buněk do centra poškození. Chemoatraktivní gradient zajišťuje kromě toho také fyziologický přísun buněk do tkání a lymfatických orgánů za normálních okolností. Chemokiny jsou chemotaktické cytokiny, které tvoří velmi rozsáhlou a rozmanitou skupinu vylučovaných proteinů, které mají mnoho funkcí jednak v procesech udržujících homeostázu, ale i ve stavech zánětlivých.

Produkce některých chemokinů má také zásadní vliv na odhojení štěpu. Další pochopení mechanismů, kterými se účastní chemokiny akutní rejekce, by mohlo přispívat ke zlepšení léčebných kroků v transplantologii.

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

Indukce CD54 byla největší u THP-1 buněk, u buněk RA byla exprese menší, u buněk RPTEC nebyl antigen detekován ani po stimulaci. Hladiny chemokinů v supernatantech byly měřeny pomocí technologie Luminex.

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

Abstract

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

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

In this diploma thesis, serum chemokine levels were monitored in renal transplant patients, but these measurements did not show significant dynamics. Furthermore, the effect of pro-inflammatory cytokines on the release of chemokines from renal epithelial cells and monocytes was studied. Experiments were performed to monitor the levels of individual chemokines such as ENA-78, IL-8, MCP-1, MIP-1 β , RANTES, GRO alpha, THP-1 (monocyte/macrophage cell line), RPTEC (renal epithelial cells of proximal tubules) and RA (renal cell tumor lines). TNF- α (tumor necrosis factor alpha) was used to stimulate. Chemokine ENA-78 was most produced in the RA cell culture, chemokine IL-8 (CXCL-8) had the highest level in RPTEC cells, the highest levels of MCP-1 were achieved in RA cells. Overall, the highest values for TNF- α stimulated THP-1 cells reached the RANTES chemokine, with peak RPTEC cells reaching the GRO alpha chemokine.

Induction of CD54 was greatest in THP-1 cells, RA expression was less, in RPTEC cells the antigen was not detected even after stimulation. Chemokine levels in supernatants were measured using Luminex technology.

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

Obsah

1 Úvod	11
2 Literární přehled	13
2.1 Souhra přirozené a adaptivní imunity	13
3 Patofyziologie ischemicko/reperfuzního poškození	16
4 Studená ischemie	17
5 Imunobiologie rejekce	18
5.1 Hyperakutní rejekce	19
5.2 Akutní rejekce	19
5.2.1 Akutní T-buňkami zprostředkované rejekce (TCMR-Acute T-cell-mediated rejection).....	19
5.2.2 Akutní protilátkami zprostředkovaná rejekce (ABMR-Acute antibody-mediated rejection).....	20
6 Chemokiny	21
6.1 Chemokinové receptory a jejich signalizace.....	23
6.2 CXC chemokiny	23
6.2.1 CXCL8 (IL-8)	24
6.2.2 CXCL5 (ENA-78).....	24
6.2.3 CXCL1-3 (Gro- α , β , γ).....	25
6.2.4 CXCL9	25
6.2.5 CXCL10	25
6.2.6 CXCL11	26
6.2.7 CXCL12	26
6.2.8 CXCL13	27
6.2.9 CXCL14	27
6.3 CC chemokiny	27
6.3.1 CCL2 (MCP-1).....	28
6.3.2 CCL4 (MIP-1 β).....	28
6.3.3 CCL5 (RANTES).....	29
7 Principy použitých metod.....	31
7.1 Určení životnosti buněk-Vi-CELL XR.....	31
7.2 Luminex	31

7.3 Průtoková cytometrie	32
8 Cíle práce	33
9 Materiál a metody	33
9.1 Tkáňové kultury: RA, RPTEC a THP-1	33
9.2 Rozmražení adherentních buněčných linií RA a RPTEC	33
9.3 Pasážování adherentních buněčných linií RA a RPTEC	34
9.4 Tkáňové kultury: THP-1	34
9.5 Rozmražení buněčných linií THP-1	35
9.6 Pasážování buněčných linií THP-1	35
9.7 Příprava buněčných linií THP-1 k pokusu	36
10 Metodika	36
10.1 Stanovení koncentrace chemokinů	36
10.2 Stimulace buněk pomocí TNF- α	38
10.2.1 Stimulace RA buněk pomocí TNF- α	38
10.2.2 Stimulace RPTEC buněk pomocí TNF- α	39
10.2.3 Stimulace THP-1 buněk pomocí TNF- α	40
10.2.4 Charakteristika souboru pacientů	40
11 Statistika	41
12 Výsledky	42
12.1 Efekt prozánětlivého cytokinu TNF- α na expresi chemokinů	42
12.1.1 Exprese IL-8/CXCL8 linií buněk THP-1, RA a RPTEC	42
12.1.2 Exprese MCP-1/CCL2 linií buněk THP-1, RA a RPTEC	43
12.1.3 Exprese RANTES/CCL5 linií buněk THP-1, RA a RPTEC	44
12.1.4 Exprese ENA-78/CXCL5 linií buněk THP-1, RA a RPTEC	45
12.1.5 Exprese GRO alpha linií buněk THP-1, RA a RPTEC	46
12.2 Tvorba chemokinů jednotlivými buňkami	47
12.3 Exprese molekuly CD54 u jednotlivých buněk	50
12.4 Porovnání typů léčby bez indukce vs Simulect	51
12.4.1 ENA-78 typ léčby, srovnání ENA-78; bez indukce vs Simulect	51
12.4.2 IL-8 typ léčby, srovnání IL-8; bez indukce vs Simulect	52
12.4.3 MCP-1 typ léčby, srovnání MCP-1; bez indukce vs Simulect	54
12.4.4 MIP-1 β typ léčby, srovnání MIP-1 β ; bez indukce vs Simulect	55

12.4.5 RANTES typ léčby, srovnání RANTES; bez indukce vs Simulect	56
12.5 Hladiny chemokinů u pacientů s transplantovanou ledvinou	62
12.5.1 Sérové hladiny ENA-78 u pacientů s transplantovanou ledvinou.....	62
12.5.2 Sérové hladiny IL-8 u pacientů s transplantovanou ledvinou	63
12.5.3 Sérové hladiny MCP-1 u pacientů s transplantovanou ledvinou	64
12.5.4 Sérové hladiny MIP-1 β u pacientů s transplantovanou ledvinou.....	65
12.5.5 Sérové hladiny RANTES u pacientů s transplantovanou ledvinou.....	66
13 Diskuze	67
14 Závěr.....	70
15 Seznam použité literatury	71

Seznam zkratek

AKI	Acute kidney injury; akutní poškození ledvin
ATP	Adenosintrifosfát
ABMR	Antibody mediated rejection; protilátkami zprostředkovaná rejekce
APC	Antigen presenting cell; buňka prezentující antigen
ACRs	Atypické receptory
BLC	B lymphocyte chemoattractant
BRAK	Breast and kidney – expressed chemokine
CLRs	C – type lectin receptors
CC	CC chemokiny
CDC	Complement dependent cytotoxicity assay; komplement-dependentní cytotoxický test
CXC	CXC chemokiny
DAMP	Damage/danger - associated molecular patterns; molekuly uvolněné z poškozených buněk
DGF	Delayed graft function; opožděná funkce štěpu
DC	Dendritic cell, dendritická buňka
DSA	Donor specific antibodies; donor specifické protilátky
dsRNA	Double-stranded RNA; dvouvláknová RNA
DARC	Duffy Antigen Receptor for Chemokines
ELISA	Enzyme – linked immuno sorbent assay; enzymová imunoanalýza na pevné fázi
ENA– 78	Epithelial Neutrophil-Activating Protein 78; Epiteliální neutrofilu aktivující protein 78
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid; kyselina ethylendiamintetraoctová
FBS	Fetal bovine serum; fetální bovinní sérum
FCS	Fetal calf serum; fetální telecí sérum
FDC	Follicular dendritic cells; Folikulární dendritické buňky
FS	Forward scatter; přední rozptyl
GC Tfh	Germinal center CD4 (+) T follicular helper
GaGs	Glykosaminoglykany
HCC	Hepatocelulární karcinom
HLA	Human leukocyte antigen; lidský leukocytární antigen
RPTEC	Human renal proximal tubule epithelial cell
I– TAC	IFN – γ – inducible T – cell chemoattractant; IFN- γ -indukovatelný chemoatraktant T-buněk
IRAK	IL – 1 receptor associated kinases
IFN- γ	Interferon gamma
IP – 10	Interferon gamma a – induced protein 10
IL	Interleukin
IL-1 β	Interleukin - 1 beta
IMDM	Iscove`s modified Dulbecco`s medium
I/RI	Ischemicko/reperfuzní poškození

LPS	Lipopolysaccharide, lipopolysacharid
MIP – 1 β	Macrophage inflammatory protein – 1 beta; Makrofágový zánětlivý protein - 1 beta
MAP	Mitogen-activated protein kinases
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1; Monocytární chemotaktický protein – 1
Mig	Monokine induced by interferon gamma
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NK	Natural killer cells; NK buňky
NLRs	NOD – like receptors; receptory podobné Nod
NF – κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
I κ B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns; struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy
PRR	Pattern recognition receptors; receptor rozpoznávající vzor
RA	Renal adenocarcinoma epithelial cell
RLRs	RIG – I – like receptors
SS	Side scatter; boční rozptyl
SDF – 1	Stromal cell derived factor – 1
TCMR	T-cell mediated rejection; T-buňkami zprostředkovaná rejekce
TLRs	Toll – like receptors; receptory skupiny toll
TIR	Toll/interleukin 1 receptor
TNF – α	Tumor necrosis factor; faktor nekrotizující nádory

1 Úvod

Raná fáze imunitní reakce proti alotransplantátu

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

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

Uvolnění chemokinů, bohatá infiltrace štěpu, rozpoznání antigenu pomocnými T lymfocyty a další dílčí kroky probíhající často v kombinacích, mají klíčovou roli v zahájení akutního odhojení. Akutní rejekce je doprovázena zvláště chemokiny, jenž se váží na receptory CXCR3 a CCR5. Zmíněné receptory jsou exprimované na T lymfocytech, NK buňkách (natural killer cells) a makrofázích. Je na místě zmínit skutečnost, že produkce některých chemokinů má zásadní vliv na odhojení štěpu. Další pochopení mechanismů, kterými se účastní chemokiny akutní rejekce, by mohlo přispívat ke zlepšení léčebných kroků v transplantologii.

2 Literární přehled

2.1 Souhra přirozené a adaptivní imunity

Odmítnutí transplantátu se po dlouhá léta přisuzovalo hlavně adaptivní imunitě. Otázka přirozené imunity byla vnímána spíše jako vedlejší. V dnešní době již existuje mnoho průkazných studií zachycujících důležitost přirozené imunity v transplantačních reakcích. Některé experimentální modely ukázaly, že potlačení přirozené imunity může aktivovat sled událostí, které mohou podporovat toleranci štěpu namísto odvržení.

Přirozená imunita slouží jako první obranná linie proti patogenní invazi. Infekční mikroorganismy mají na svém povrchu vysoce konzervované molekulární struktury zvané PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). PAMPs interagují s velkým počtem receptorů, které se označují jako PRRs (pattern recognition receptors). PRRs jsou exprimovány konstitutivně na buňkách imunitního systému a parenchymálních buňkách. Tento mechanismus rozpoznání spouští aktivaci přirozené imunity, kterou doprovází masivní produkce prozánětlivých látek. Zánětlivé mediátory mají své důležité postavení během časně fáze poškození tkáně a celá situace postupně vede k aktivaci imunity adaptivní. Tento princip stanovil už v roce 1989 Charles Alderson Janeway. Až později v devadesátých letech došlo k rozšíření této hypotézy. Záslouhou Dr. Polly Matzinger se objasnil i mechanismus aktivace přirozené imunity stimuly neinfekčního původu. Buňky postižené hypoxií nebo jinak stresované také uvolňují molekuly s podobnými strukturálními motivy jako PAMPs. Vlastní molekuly uvolněné například z nekrotických buněk se nazývají DAMPs (damage/danger-associated molecular patterns). I v tomto případě je zajištěna spolupráce s PRRs. Tento model jen vysvětluje jak je i v případě rejekcí zapojena přirozená imunita, v momentě kdy poraněný štěp produkuje DAMPs (*Cheung et al., 2013*).

Spojení mezi přirozenou a adaptivní imunitou záleží zejména na prezentaci antigenu imunokompetentním lymfocytům. Nejsilnější antigen prezentující buňky (APCs-antigen presenting cells) jsou buňky dendritické (DCs-endritic cells). Dalšími APC jsou B-buňky, makrofágy, $\gamma\delta$ T-buňky a další. Základní předpoklad pro aktivaci adaptivní imunity je zánětlivé prostředí, které podněcuje fenotypovou změnu nezralých DCs do formy zralé. V přítomnosti PAMPs a DAMPs jsou zralé DCs buňky schopny účinně aktivovat T-lymfocyty v lymfatických uzlinách. T-lymfocyty jsou do lymfatických uzlin atrahovány

pomocí chemokinů uvolněných z DCs. Ve chvíli, kdy už jsou DCs samy schopny produkovat chemokiny, jedná se o jejich pozdější stupeň zralosti (*Cucchiari et al., 2016*).

Naivní T-buňka potřebuje ke své aktivaci tři důležité kroky:

- 1) kontakt mezi antigenem prezentovaným APC a T buněčným receptorem (TCR)
- 2) kostimulace
- 3) signály regulující diferenciaci Th efektorových subpopulací

Pro rozpoznání nebezpečí využívá přirozená imunita celou řadu membránových a cytoplazmatických receptorů. PRRs můžeme dělit podle strukturní homologie na skupiny TLRs (Toll-like receptors), NLRs (NOD-like receptors), CLRs (C-type lectin receptors) a RLRs (RIG-I-like receptors). Rozpoznávací schopnost mají také pentraxiny a komplement představující rozpustné mediátory. U TLRs je přenos zánětlivého signálu zařizován cytoplazmatickou TIR doménou (Toll/interleukin 1 receptor).

TIR doména rekrutuje adaptorové proteiny (MyD88-Myeloid differentiation primary response gene 88), aktivuje intracelulární kinázy (IRAK-IL-1 receptor associated kinases), proteinkinázy C a I κ B kinázy. Veškeré tyto události vedou v konečném důsledku až k aktivaci transkripce prozánětlivých genů, včetně cytokinů, chemokinů a dalších přidružených molekul. NLRs ve spolupráci s TLRs se podílejí na aktivaci zánětlivé cesty NF- κ B a MAP kináz. Ukázalo se, že NLRs hrají obzvlášť důležitou úlohu v myším modelu ischemicko/reperfuzního poškození.

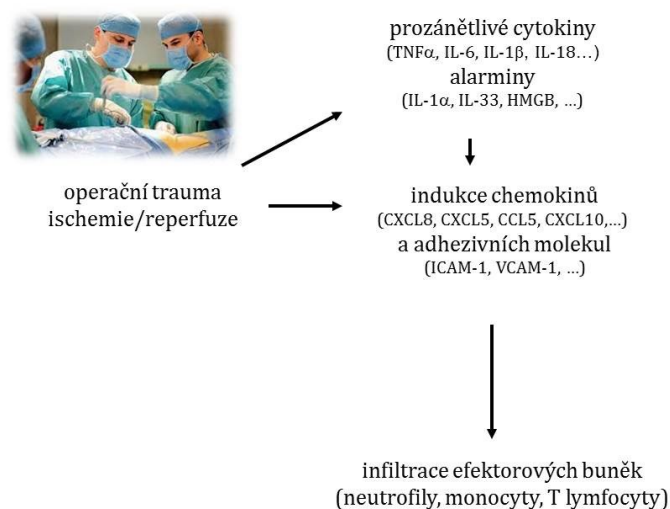
V procesu vytváření inflamazomu, což je multiproteinový komplex proteolytického charakteru, je využita molekula kaspáza-1. Zajišťuje se tak štěpení prekurzorů prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-18) (*Cheung et al., 2013*). Komplement zastupuje humorální složku adaptivní imunity. I přes všechny jeho ochranné funkce, pro štěp může být velmi škodlivý. Hraje zde roli celá řada faktorů, ať už smrt mozku dárce, koagulace anebo I/RI. Prezentace antigenu T-lymfocytům, při transplantacích, je možná třemi základními cestami. U přímé cesty je situace taková, že dárcovské DCs prezentují přímo antigen T-lymfocytům příjemce. Nepřímá cesta probíhá tak, že DCs příjemce zachytí antigen, dozrávají a antigen prezentují T-lymfocytům. V třetím případě DCs příjemce zachycují membránové fragmenty dárcovských DCs pro nepřímou prezentaci (*Nankivell et al., 2010*).

Jakékoliv poškození transplantátu (I/RI, infekce, léková toxicita, ...) může vždy teoreticky vést k produkci PAMPs a DAMPs molekul s následnou aktivací přirozené imunity. Další studium přirozené imunity bude zřejmě jen dále potvrzovat její význam v transplantační medicíně. Ovšem stěžejní překážka je v tom, že klinický scénář je oproti in vitro terénu značně redundantní.

3 Patofyziologie ischemicko/reperfuzního poškození

Ischemicko/reperfuzní poškození (I/RI) je hlavním iniciačním faktorem v rozvoji akutního i chronického renálního selhávání po orgánové transplantaci. Ischemii vyvolává náhlé přechodné snížení průtoku krve a často se vyskytuje u patofyziologických stavů jako je šok, sepse nebo v průběhu transplantací. Ischemická tkáň trpí sníženým přívodem kyslíku, a i když je obnovení průtoku krve nezbytné, reperfuze sama o sobě může zhoršovat zánět a stav oxidace.

V rámci renálního I/RI především dochází k ataku endoteliálních buněk a tubulárních epitelálních buněk. V případě rozsáhlých lézí, může dojít až k akutnímu poškození ledvin (AKI) nebo opožděnému rozvoji funkce štěpu (DGF). Infiltrované leukocyty a veškeré druhy renálních buněk se podílejí na tvorbě chemokinů, jejichž exprese nastává již brzy po I/RI a atrahují zánětlivé buňky do centra poranění. Všeobecně se ví, že neutrofilů jsou jedny z prvních leukocytů mívajících do poškozeného místa, a právě chemokiny jsou jejich silnými atraktanty. Některé studie ovšem zmiňují, že chemokiny nejsou zapojeny výhradně v akutní zánětlivé odpovědi. Vysoké exprese se objevují zejména v reparativním období. I přes obrovský pokrok v medicíně, je současná terapie zaměřena převážně na důsledky I/RI (aktivace přirozené imunity, DGF). Lepší pochopení mechanismů I/RI a další zkoumání chemokinů by mohlo přispět k minimalizaci zmíněných důsledků (*Ponticelli, 2014*).



Obrázek č.1: Ischemicko/reperfuzní poškození. Převzato: *Stříž I. Imunologické aspekty orgánových transplantací. Postgraduální medicína 2017*

4 Studená ischemie

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

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

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

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

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

5 Imunobiologie rejekce

Rejekce neboli odhojení je souhrn imunitních mechanismů, které jsou vyvolány na základě antigenní rozdílnosti mezi dárcem a příjemcem. I přes zavedení nejnovějších imunopresivních medikamentů a léčebných postupů, patří rejekce mezi nejobtížnější řešitelný problém v této problematice. Rejekce je možno členit ať už z pohledu klinického (hyperakutní, akutní, chronická), subklinického (histologický obraz dle Banffské klasifikace) nebo hrají svou roli v odhojování patofyziologické procesy (endoteliální, cévní, intersticiální) (*Sulková, 2000*).

Vzhledem k tomu, že se na poškození štěpu podílí nespočet multifaktoriálních vlivů a prakticky vždy kombinovaně, nejpřesvědčivějším diagnostickým průkazem zůstává biopsie štěpu. Banffská kategorizace navrhuje mimo jiné rejekci zprostředkovanou protilátkami (*Djamali et al., 2014*), T-buňkami zprostředkovanou rejekci a rejekci vaskulární.

Na rejekci zprostředkovanou protilátkami se v nynější době klade značný důraz a považuje se za zásadní příčinu dysfunkce a selhání funkce štěpu po transplantaci. Už v období před transplantací začíná imunologické ohrožení štěpu, ať už perioperačním ischemicko/reperfučním poškozením anebo degradací štěpu již v těle dárce po jeho úmrtí, nepočítaje komorbidity a věk dárce před smrtí.

Zvýšená exprese HLA antigenů v rámci štěpu a tvorba prozánětlivých cytokinů, chemokinů a adhezivních molekul je iniciována právě ischemií s následnou reperfuzí. Tyto transplantační antigeny zapříčiňují zesílenou aktivitu imunitního systému, intenzivnější buněčný atak štěpu a tím pádem větší riziko ztráty štěpu.

5.1 Hyperakutní rejekce

Tento typ rejekce zapříčiňují již předem připravené hostitelské protilátky, které se typicky váží k antigenům dárce (HLA antigeny I.třídy). Hyperakutní rejekce většinou nastává během několika hodin po reperfuzi transplantovaným orgánem a brzy vede k jeho zničení.

Komplement je hlavní aktér, který se podílí na afunkci štěpu (*Akiyoshi et al., 2012*). Vznik preformovaných protilátek, jenž se váží na endotel transplantátu, může být iniciován na základě předešlých transplantací nebo těhotenství. U příjemců krevních transfuzí může též docházet k tvorbě těchto předem utvářených protilátek. Nevratné poškození štěpu způsobené ischemií s následnou reperfuzí má charakteristický mikroskopický obraz v podobě nekrózy endotelu a trombotizace. Terapeutickými postupy hyperakutní rejekci nelze zvrátit, na místě jsou potřeba volit spíše preventivní kroky se zaměřením na kompatibilitu v ABO systému a negativní komplement dependentní cytotoxický (CDC) cross-match test. Detekce protilátek pomocí této metody může do velké míry eliminovat riziko odhojení, proto se v současnosti s tímto typem rejekce téměř nesetkáváme.

5.2 Akutní rejekce

K akutnímu odhojení dochází obvykle v řádu dnů až týdnu po transplantaci. Dle převládajícího mechanismu lze dělit akutní rejekce na ty, které jsou zprostředkované T-buňkami (CD4+, CD8+ T-lymfocyty) a dále na ty, u kterých mají hlavní roli protilátky. Snížené riziko může být zajištěno profylakticky pomocí imunosupresiv.

5.2.1 Akutní T-buňkami zprostředkované rejekce (TCMR-Acute T-cell-mediated rejection)

Základem veškerých celulárních rejekcí jsou interagující T-lymfocyty příjemce s dárcovskými HLA antigeny, které jsou přítomné na cévním endotelu či předkládané antigen prezentujícími buňkami. V případě přímého rozpoznání aloantigeny T lymfocyty reagují na štěp svými cytotoxickými působky. V tomto případě hovoříme o cytotoxických CD8+ CTL T-lymfocytech (Tc) a k jejich aktivaci napomáhají CD4+ pomocné T-lymfocyty (Th). Tato pomocná úloha je zajištěna cytokinovým mikroprostředím, zvláště pak produkcí IL-2. Aktivita CD4+ lymfocytů je různorodá a největší efekt na finální typ Th imunitní odpovědi mají právě cytokiny. Th1 typ reakce s tvorbou TNF- β , IL-2 a IFN- γ

je charakteristický pro tubulointerstickální zánětlivý obraz během buněčné rejekce. Ovšem jedny a tytéž buňky jsou schopny zajistit i odpověď typu Th2, která podporuje děje mířící k aktivaci B lymfocytů a k tvorbě imunoglobulinu izotypu E (IgE).

Ukazuje se, že TCMR (T-cell mediated rejection) může působit jako senzibilizující faktor pro spuštění ABMR (antibody mediated rejection) a mít nepříznivý vliv na celkový výsledek této rejekce. T buňky se často vyskytují v lézích, které se používají k diagnostikování ABMR. Cytolytické působení Tc lymfocytů je zajištěno vzájemným působením dvou molekul (Fas-Fas-ligand), jejichž interakce utváří procesy směřující k programované buněčné smrti (apoptóze). Na indukci kaspázami zprostředkované buněčné smrti se dále účastní serinové proteázy, jako granzymy A, B a perforin. Velmi důležitým cytotoxickým mechanismem CD8⁺ CTL T lymfocytů je sekrece TNF-β neboli lymfotoxinu, jelikož není v tomto případě nutný přímý kontakt buněk a může tedy proto docházet k poškození zdravých buněk v okolí.

Rejekční mechanismy nejsou doprovázené pouze cytotoxicitou, ale svou úlohu zde může mít i imunopatologická reakce pozdní přecitlivělosti, založená na mobilizaci makrofágů a prozánětlivých cytokinů, kterou indukují CD4⁺ lymfocyty. Nepřímá reakce je zprostředkována APC, které primárně transplantační antigen opracují a posléze jej předloží na svém buněčném povrchu. Tento děj je základním udržovacím procesem běžné fyziologie. Kromě přímé a nepřímé cesty imunitního rozpoznání HLA antigenů se můžeme setkat i s označením „semi-direct“ dráha. Základním principem této dráhy je výměna HLA molekul mezi membránami APC dárce a příjemce (*Nankivell et al., 2010*).

5.2.2 Akutní protilátkami zprostředkovaná rejekce (ABMR-Acute antibody-mediated rejection)

Rejekce zprostředkované protilátkami patří mezi hlavní faktory vedoucí k dysfunkci štěpu po transplantaci ledviny. Akutní forma představuje spíše vzácnou komplikaci a nastupuje nejčastěji kolem sedmého dne po transplantaci. Většinou je zprostředkována protilátkami proti neshodným antigenům dárce (tzv. donor specifické protiláky-DSA).

B-lymfocyty k tvorbě protilátek potřebují pomoc CD4⁺ T-lymfocytů, které byly aktivovány nepřímým rozpoznáním. Mezi rizikové okolnosti pro vznik této rejekce patří dialyzační doba, předešlá senzitivace HLA antigeny a výskyt panel reaktivních protilátek. K senzitivaci dochází například při opakovaných transplantacích nebo během těhotenství. Podstatné diagnostické kritérium je detekce C4d na buňkách endotelu. Tato komponenta

vzniká během aktivace komplementu klasickou dráhou. Další cesta není závislá na komplementu a dochází při ní k aktivaci NK buněk (NK-natural killer cells), makrofágů a polymorfonukleárních leukocytů. V důsledku nahromadění těchto zánětlivých buněk dochází k poškození tkáně (*Slatinská et al., 2014*).

6 Chemokiny

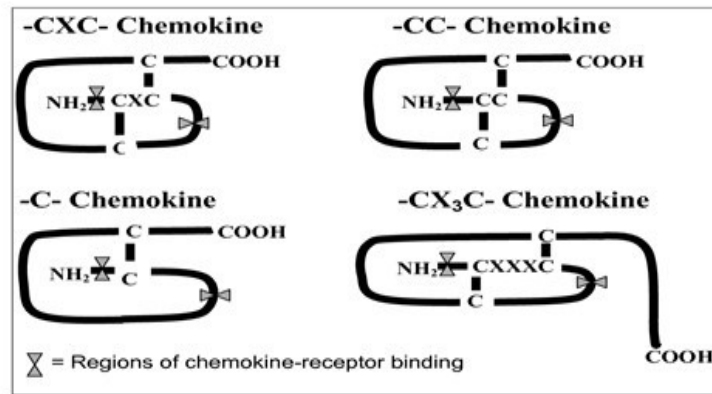
Chemokiny jsou chemotaktické cytokiny, které tvoří velmi rozsáhlou a rozmanitou skupinu vylučovaných proteinů o velikosti 8-14 kDa (*Roy et al., 2014*) a mají mnoho funkcí jednak v procesech udržujících homeostázu, ale i ve stavech zánětlivých. Jejich sekrece probíhá pomocí buněk imunitního systému,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

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

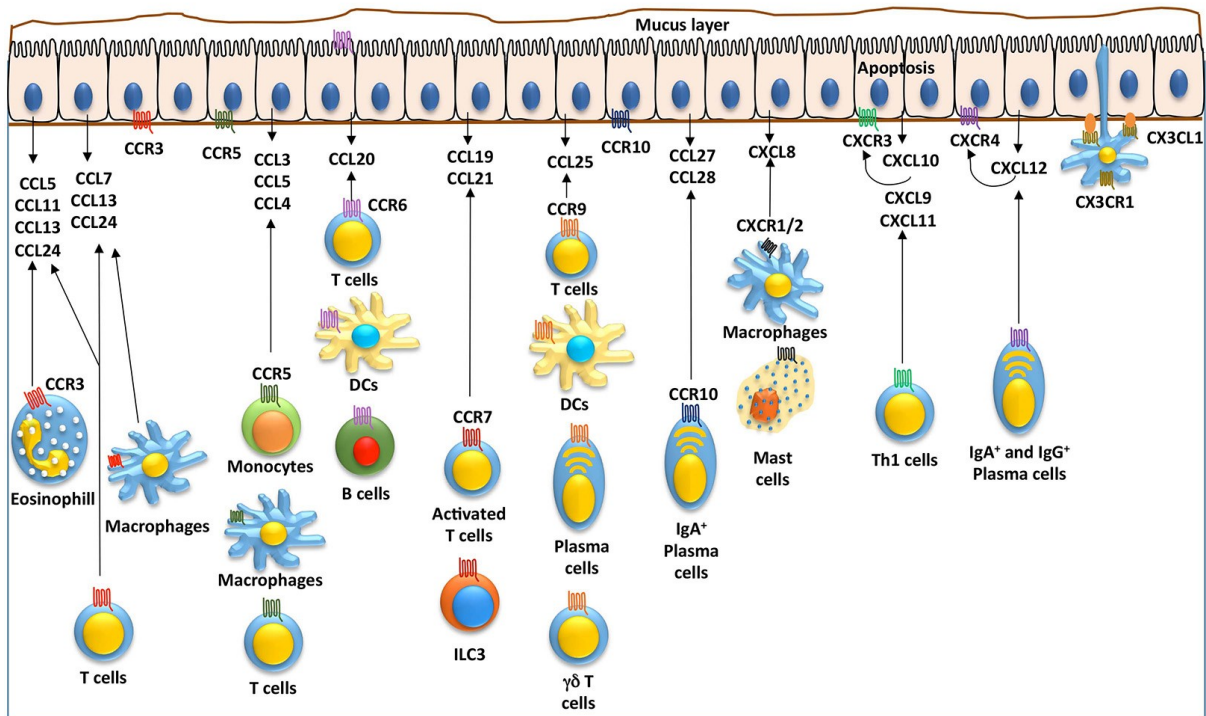
Na obrázku č.2 můžeme vidět přítomnost jedné aminokyseliny mezi prvním a druhým cysteinem u CXC chemokinů, v případě CX3C chemokinů až tři aminokyseliny. Chemokinům typu C první a třetí cystein chybí a u CC chemokinů jsou cysteiny umístěny hned vedle sebe. Většina chemokinů je ve svých účincích redundantní a promiskuitní, a proto nedostatek nějakého konkrétního chemokinu je bez problému nahrazen přebytkem jiného.

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

V tabulce č.1 je znázorněné široké spektrum chemokinů s jejich receptory. Chemokinové receptory jsou zpravidla exprimovány na mnoha buněčných populacích, jak nám znázorňuje obrázek č.3.



Obrázek č.2: Strukturální odlišnosti základních skupin chemokinů. *Převzato z: Stříž et al. 2015*



Obrázek č.3: Chemokiny atrahující jednotlivé populace imunitních buněk. *Převzato z: <https://atlasofscience.org/chemokines-an-answer-to-the-gut-inflammation/>, (Kulkarni N, Pathak M, Lal G J Leukoc Biol. (2):377-394, 2017)*

6.1 Chemokinové receptory a jejich signalizace

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

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

6.2 CXC chemokiny

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

Veškeré humánní ELR-CXC chemokiny (CXCL1-CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8) atrahují a aktivují převážně neutrofilní leukocyty do místa poškození. Tyto chemokiny mohou být prakticky exprimovány širokým spektrem buněk, ať už primárně imunitními či neimunitními, například endoteliálními či epiteliálními buňkami (*Mortier et al., 2011*). ELR-CXC chemokin s největší schopností atrahovat právě neutrofilny je IL-8 (CXCL8), který patří mezi první popsane zástupce ve své třídě.

6.2.1 CXCL8 (IL-8)

Interleukin 8 se svou funkcí řadí mezi prozánětlivé chemokiny se schopností atrahovat ve velké míře převážně neutrofilní leukocyty (*Kuai et al., 2012*). Chemotaxi vykonává za pomoci svých specifických chemokinových receptorů, CXCR1 a CXCR2. Indukce tohoto chemokinu je možná díky prozánětlivým cytokinům, jako je interleukin-1 beta (IL-1 β), tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) nebo se mohou na stimulaci podílet virová a bakteriální agens (*Hwang et al., 2004*). Bylo zjištěno, že také nádorové buňky exprimují IL-8, kterým za těchto okolností jeho autokrinní vliv napomáhá růstu nádoru, invazi do tkáně a šíření metastáz (*Keeley et al., 2010*). IL-8 nezapřičiňuje pouze chemotaxi, ale podílí se i na degranulaci zásobních proteinů buňky, indukci respiračního vzplanutí a mnoho dalších.

6.2.2 CXCL5 (ENA-78)

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

6.2.3 CXCL1-3 (Gro- α , β , γ)

Konstitutivní exprese těchto chemokinů vzájemně souvisí s angiogenezí, růstem a metastázami nádorů, jako je například melanom (*Amiri et al., 2003*). Hlavní funkcí CXCL1-3 je regulace přísunu neutrofilních leukocytů.

6.2.4 CXCL9

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

6.2.5 CXCL10

CXCL10 neboli IP-10 (interferon gamma a-induced protein 10) je významná signální molekula, která je převážně zaměřena na regulaci přísunu aktivovaných T buněk v rámci imunitních reakcí. CXCL10 je důležitý polarizační faktor pro prozánětlivou fenotypovou odpověď Th1 (*Gangur et al., 1998*). CXCL10 plní své biologické funkce prostřednictvím chemokinového receptoru CXCR3. Z názvu již vyplývá, že indukce tohoto chemokinu je zajištěna interferonem gamma (INF γ). Tento chemokin z rodiny CXC je již i klinicky potvrzen jako významný biomarker v transplantační medicíně (*Romagnani et al., 2012*). Zvýšené hladiny CXCL10 spolu se zvýšenou srdeční infiltrací Th1 buněk byly též pozorovány u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním (*Altara et al., 2016*). Pleiotropní charakter této molekuly poskytuje schopnost vysoké chemotaktické aktivity, regulace růstu a proliferace buněk, indukce apoptózy a angiogeneze u infekčních a zánětlivých onemocnění a u rakoviny. (Rozšíření terapeutických obzorů je podmíněno dalším budoucím poznáním.)

6.2.6 CXCL11

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

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

6.2.7 CXCL12

Tento homeostatický chemokin má velmi široký biologický záběr. Mezi jeho funkce patří přísun zralých T a B lymfocytů a regulace migrace hemopoetických kmenových buněk z kostní dřeně. Synonymem pro tento chemokin je SDF-1 (Stromal cell derived factor-1) a všechny izoformy vznikají alternativním sestřihem. Interakce CXCL12 s receptorem CXCR4 je asociována s mnoha nemocemi, jako jsou nádory, astma nebo infekce HIV. Receptor CXCR4 je zároveň i koreceptor pro virus HIV a je vůbec nejhojnějším chemokinovým receptorem u mnoha typů rakoviny. Dále byla také vysoká exprese CXCR4 spojena s velmi špatnou prognózou pacientů s hepatocelulárním karcinomem (HCC). Některé studie ukazují, že u CXCL12/ CXCR4 knockout myši dochází k embryonální letalitě, což opět potvrzuje zřetelný biologický význam (angiogeneze, vývoj orgánů, imunitní regulace, ...) tohoto chemokin-receptorového páru (*Colobran et al., 2007*).

6.2.8 CXCL13

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

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

6.2.9 CXCL14

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

6.3 CC chemokiny

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

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

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

6.3.1 CCL2 (MCP-1)

MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) představuje klíčový chemokin regulující migraci a infiltraci monocyto/makrofágové linie. MCP-1 se s vysokou afinitou váže na receptor CCR2, který je exprimován velkým počtem buněk. CCL2/CCR2 osa prokazatelně asociuje s různými onemocněními (*Deshmane et al., 2009*). Hromadící se důkazy nasvědčují, že MCP-1 je schopný narušit integritu hematoencefalické bariéry a ovlivnit tak události vedoucí k poškození a krvácení (*Yao et al., 2014*). Díky svým chemotaktickým vlastnostem a atrahování monocytů a T-lymfocytů do štetu, se výrazně podílí i na odmítnutí transplantátu. Zjistilo se, že terapie pomocí MCP-1 může být zajímavou léčebnou strategií při hojení diabetických ran (*Wood et al., 2014*).

6.3.2 CCL4 (MIP-1 β)

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

6.3.3 CCL5 (RANTES)

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

Tabulka č.1: Chemokiny a jejich receptory

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

7 Principy použitých metod

7.1 Určení životnosti buněk-Vi-CELL XR

K určení životnosti a počtu buněk byl používán buněčný analyzátor Vi-CELL XR, Beckman Coulter. Zařízení určuje viabilitu pomocí vitálního barvení trypanovou modří. Když buňka nemá porušenou buněčnou membránu, trypanová modř se do ní nedostane. Pakliže buňka není životaschopná, dochází k porušení membrány a trypanová modř se dostává do cytoplazmy. Barvička obarvuje cytoplazmu buněk. Populace buněk je následně snímána CCD kamerou. Přístroj pak stanovuje koncentraci, velikost buněk a zastoupení živých a mrtvých buněk v procentech (www.beckmancoulter.com).

K měření životnosti buněk se používá též průtokový cytometr. Ke stanovení se využívá propidium jodid. Propidium jodid neprochází do buňky, když není buněčná membrána porušena. Když dojde k narušení membrány, propidium jodid projde do buňky a váže se na DNA.

7.2 Luminex

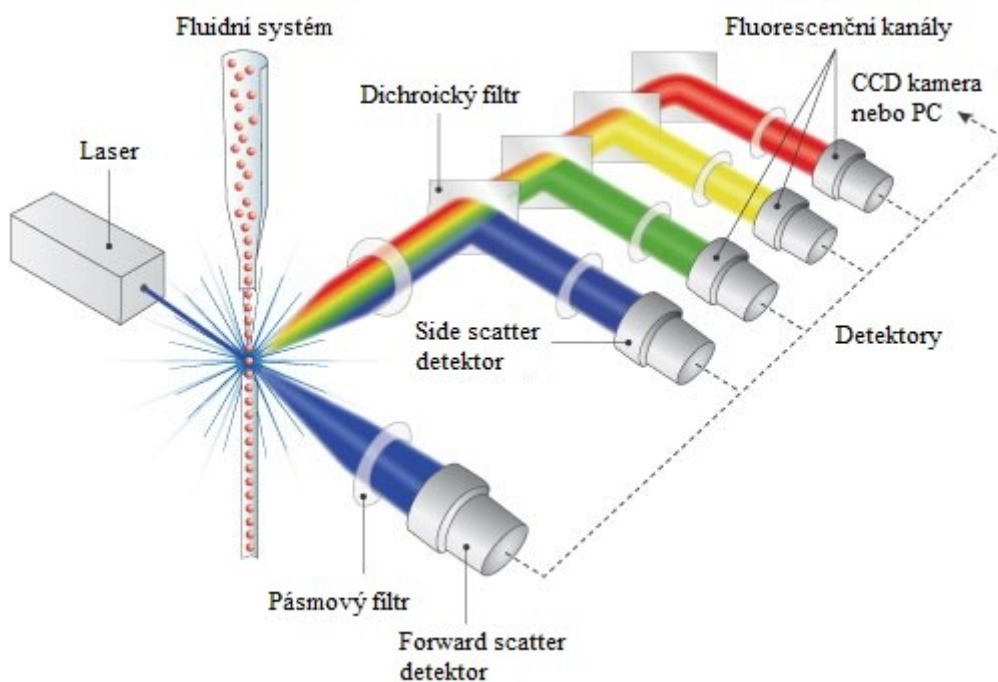
Tato metoda je založena na analýze mikropartikulí. Nespornou výhodou je možnost stanovovat zároveň větší množství rozpustných faktorů a získat tak z jednoho měření celý soubor výsledků. Jde o kombinaci metodiky ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) a průtokové cytometrie.

Základem analýzy jsou reakce na molekulární úrovni, které probíhají na barevně kódovaných mikropartikulích. Ty po excitaci laserem poskytují fluorescenční signál. Mikropartikule označené fluorochromem s navázanými specifickými protilátkami tvoří základ této metody. Ke vzorkům je přidána směs mikropartikulí a dochází k navázání analytu na určité protilátky. Dále je přidána specifická protilátka s navázaným biotinem. Tato dvojice-protilátka s biotinem zajišťuje vznik sendviče (protilátka-antigen-protilátka), tím že se také váže na určovaný analyt. V následujícím kroku hraje hlavní roli streptavidin, který je označený fluorescenční značkou (fykoerytrinem). Vzorek je následně v přístroji detekován dvěma lasery. Jeden laser slouží k identifikaci analytu prostřednictvím detekce fluorochrom mikročástice specifické pro analyt. Druhý laser slouží k odhalení velikosti signálu fykoerytrinu. Fykoerytrin je úměrný koncentraci navázaného analytu.

7.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je v současné době standardní metodou pro hodnocení buněk v suspenzi. Suspenze se nejčastěji značí monoklonální protilátkou, která je vázána s fluorochromem. Monoklonální protilátky se vážou na antigeny sledovaných buněk. Buněčná suspenze je v průtokovém cytometru regulována tak, aby každá buňka letěla jedna za druhou. Tenký proud suspenze je křížen laserovým paprskem a díky tomu je umožněno měření vlastností buněk. Odklon laseru určuje granularitu a velikost buněk. Každá částice v buněčné suspenzi způsobí, že laser se od ní odrazí do strany a rozptýlí. Pakliže jsou na částice navázány molekuly fluorochromů (ty se mohou použitým laserovým paprskem excitovat), vyzáří se tak ještě excitované (fluorescenční) světlo.

U každé buňky bývají zaznamenány dvě optická měřítka: forward scatter (FS) a side scatter (SS) a dva parametry, které vyjadřují fluorescenci na odlišných vlnových délkách. Forward scatter dává informaci o velikosti měřené buňky a vyjadřuje přímý rozptyl světla. Side scatter je boční rozptyl světla a je úměrný granularitě buňky (Bartůňková *et al.*, 2011).



Obrázek č.4: Schéma průtokové cytometrie (upraveno dle: www.semrock.com)

8 Cíle práce

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

9 Materiál a metody

9.1 Tkáňové kultury: RA, RPTEC a THP-1

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

9.2 Rozmražení adherentních buněčných linií RA a RPTEC

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

1. Příprava 20 % FBS + IMDM média
2. ampule s buňkami se ponoří do vodní lázně
3. po rozmražení se celý obsah ampule přepipetuje do centrifugační zkumavky
4. pomalu se přikapávají 2 ml připraveného rozmrazovacího média
5. dále se zvolna doplní médiem do 20 ml
6. centrifugace 5 minut při 300 g
7. odlití supernatantu
8. resuspendace buněk v 10 % FBS + IMDM médiu
9. odebrání vzorku na změření počtu a viability buněk
10. přenesení buněk do kultivační lahve
11. uložení do termostatu 37 °C s 5 % CO₂.

9.3 Pasážování adherentních buněčných linií RA a RPTEC

1. Odlít médium
2. odlepení buněk pomocí trypsin-EDTA + škrabkou
3. přepipetování buněk do centrifugační zkumavky
4. přidání FBS pro deaktivaci EDTA (1:1)
5. centrifugace 5 minut při 300 g
6. odlití supernatantu
7. resuspendace buněk v 10 % FBS + IMDM médiu
8. odebrání vzorku na změření počtu a životnosti buněk
9. přenesení buněk do kultivační lahve
10. uložení do termostatu 37 °C s 5 % CO₂.

9.4 Tkáňové kultury: THP-1

Tato lidská leukemická buněčná linie byla izolována z krve chlapce s akutní monocystickou leukémií. THP-1 buněčné linii chybí povrchové či cytoplazmatické imunoglobuliny, avšak charakteristickým znakem je přítomnost C3b a Fc receptorů (*Tsuchiya et al., 1980*). THP-1 buňky se staly jedním z nejvíce používaných buněčných linií při zkoumání signálních drah, mechanismů, funkce a regulace monocytů a makrofágů (*Qin 2012*). THP-1 buňky po rozdělení na makrofágy mohou polarizovat do fenotypu M1 inkubací s lipopolysacharidem (LPS) a interferonem- γ (IFN- γ). Do fenotypu M2 je tomu tak inkubací s interleukinem-4 (IL-4) nebo interleukinem-13 (IL-13) (*Genin et al., 2015*). Pro práci v laboratoři je výhodou, že neadherují k povrchu kultivační nádoby, ale rostou v suspenzi.

9.5 Rozmražení buněčných linií THP-1

Buňky jsou uchovávány v tekutém dusíku při -180 °C

1. Ampule s buňkami se ponoří do vodní lázně
2. po rozmražení se po kapkách přidává RPMI médium, které obsahuje glutamin a 20% FBS, do celkového objemu 20 ml
3. centrifugace 5 minut při 300 g
4. po odsátí supernatantu se buněčná peleta roztřepe a přidá se 20 ml kultivačního média (RPMI 1640 médium obsahující 2mM L-glutamin, 10% FBS, 1% streptomycin a 1% penicilin)
5. centrifugace 5 minut při 300 g
6. resuspendace buněk v kultivačním médiu
7. přenesení buněk do kultivační lahve
8. uložení do termostatu 37 °C s 5 % CO₂.

9.6 Pasážování buněčných linií THP-1

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

9.7 Příprava buněčných linií THP-1 k pokusu

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

10 Metodika

10.1 Stanovení koncentrace chemokinů

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

K práci byl využit komerční kit Human Luminex Performance Assay Base Kit, Panel A (R&D Systems).

Zpočátku byly rozmrazeny kontrolní i stimulované supernatanty nebo séra pacientů. Dále se připravil promývací roztok (20 ml cash buffer + 480 ml destilované vody) a kalibrátor (20 ml Calibrator disent RD5K se dalo do 20 ml destilované vody). V následujícím kroku se připravily standardy podle dodané karty (ředění Standard 1, 2 hotovým Calibrator Diluent RD5K). Do zkumavek se dále připravila kalibrační řada, u které jako blank (S0) byl použit hotový Calibrator Diluent RD5K, S1-300 μ l Calibrator Diluent RD5K + 100 μ l Standard Coctail 1 + 100 μ l Standard Coctail 2, S2-S7-200 μ l Calibrator disent RD5K. Ze zkumavky S1 se do S2 přeneslo 100 μ l roztoku, S2 do S3 a pak se roztok přenášel až do zkumavky S7. Dále bylo nutné připravit mikropartikule (na každou jamičku se počítalo 50 μ l Micropartikule Diluent + 5 μ l Micropartikule IL). Mikrotitrační destička měla membránu, kterou bylo potřeba navlhčit (100 μ l promývacího

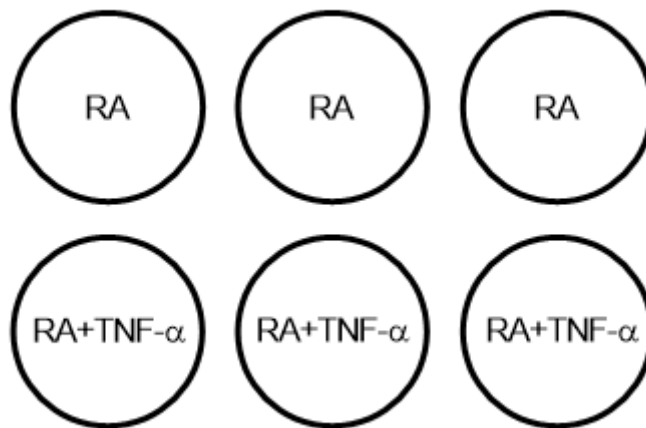
roztoku do každé jamičky) a následně promývací roztok odsát na odsávače. Potom se do destičky nepipetovaly standardy i vzorky (50 μ l). K těmto standardům i vzorkům byly přidány připravené mikrokuličky (50 μ l). Destička se přikryla stříbrnou fólií a vše se nechalo inkubovat tři hodiny při laboratorní teplotě (na třepačce). Tou dobou byl připraven Biotin Antibody Coctail (na každou jamičku se počítalo 50 μ l Antibody Diluent + 5 μ l Biotin Antibody Concentrate IL). Po tříhodinové inkubaci se vše třikrát promylo. Potom byl nepipetovaný hotový Biotin Antibody Coctail. Opět došlo k inkubaci po dobu jedné hodiny při laboratorní teplotě (na třepačce). Jeden z posledních kroků byl v přípravě streptavidin-PE (na každou jamku se počítalo 50 μ l promývacího roztoku + 5 μ l streptavidin-PE). Po hodinové inkubaci se vše třikrát promylo. Všude se přidal připravený streptavidin-PE (50 μ l) a nechalo se inkubovat půl hodiny při laboratorní teplotě. Opět se muselo vše třikrát promýt promývacím roztokem. Nakonec se vzorky resuspendovaly v promývacím roztoku a byly přepipetovány do destičky, která byla měřena. Vlastní měření probíhalo na přístroji Luminex® 100TM.

10.2 Stimulace buněk pomocí TNF- α

10.2.1 Stimulace RA buněk pomocí TNF- α

1. Narostlá monovrstva RA buněk do 6-jamkové destičky.
2. Jamky s monovrstvou promyty IMDM bez FBS (2x po 1 ml). Opatrně, aby se neporušila monovrstva.
3. Příprava média IMDM s TNF α o c = 10 ng/ml (potřeba 9 ml respektive 12 ml).
Výpočet: $V = (10 \cdot 12\ 000) / 10\ 000$
 $V = 12\ \mu\text{l}$
4. Dle náčrtu pipetováno 2 ml média, média s TNF.
5. Po 24 hodinách odebrání a stočení supernatantů a zamraženo - triplety - použity na Luminex

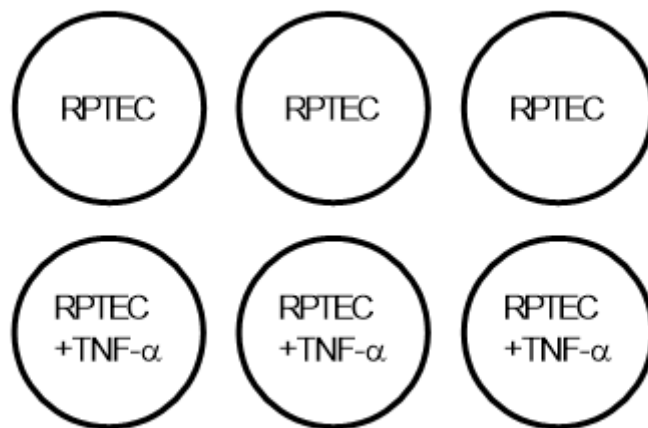
Destička RA:



10.2.2 Stimulace RPTEC buněk pomocí TNF- α

1. Narostlá monovrstva RPTEC buněk do 6-jamkové destičky.
2. Jamky s monovrstvou promyty IMDM bez FBS (2x po 1 ml). Opatrně, aby se neporušila monovrstva.
3. Příprava média IMDM s TNF α o $c = 10$ ng/ml (potřeba 9 ml respektive 12 ml).
Výpočet: $V = (10 \cdot 12\ 000) / 10\ 000$
 $V = 12\ \mu\text{l}$
4. Dle náčrtu pipetováno 2 ml média, média s TNF.
5. Po 24 hodinách odebrání a stočení supernatantů a zamraženo - triplety - použity na Luminex

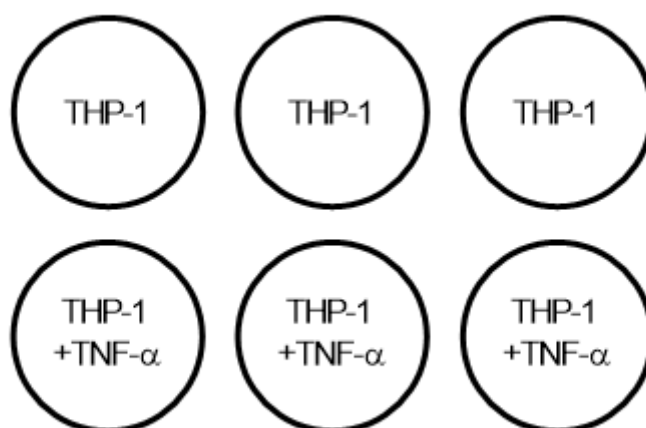
Destička RPTEC:



10.2.3 Stimulace THP-1 buněk pomocí TNF- α

1. Příprava THP-1 buněk o koncentraci $1 \cdot 10^6$ bb/ml. Buňky naředěny v médiu RPMI na koncentraci dle Vi-cell $0,95 \cdot 10^6$ bb/ml o životnosti 90,6 %.
2. Příprava média RPMI s TNF- α o $c = 10$ ng/ml (potřeba 9 ml respektive 12 ml).
Výpočet: $V = (10 \cdot 12\ 000) / 10\ 000$
 $V = 12\ \mu\text{l}$
3. Dle náčrtu pipetováno do 6-ti jamkové destičky 2 ml média s THP-1, média s THP-1 + TNF.
4. Po 24 hodinách odebrání a stočení supernatantů a zamraženo - triplety - použity na Luminex.

Destička THP-1:



10.2.4 Charakteristika souboru pacientů

V této diplomové práci byly sledovány sérové hladiny chemokinů u pacientů s transplantovanou ledvinou. Soubor pacientů tvořil 39 mužů ve věku od 24 do 71 let a 14 žen ve věku od 25 do 76 let.

11 Statistika

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

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

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

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

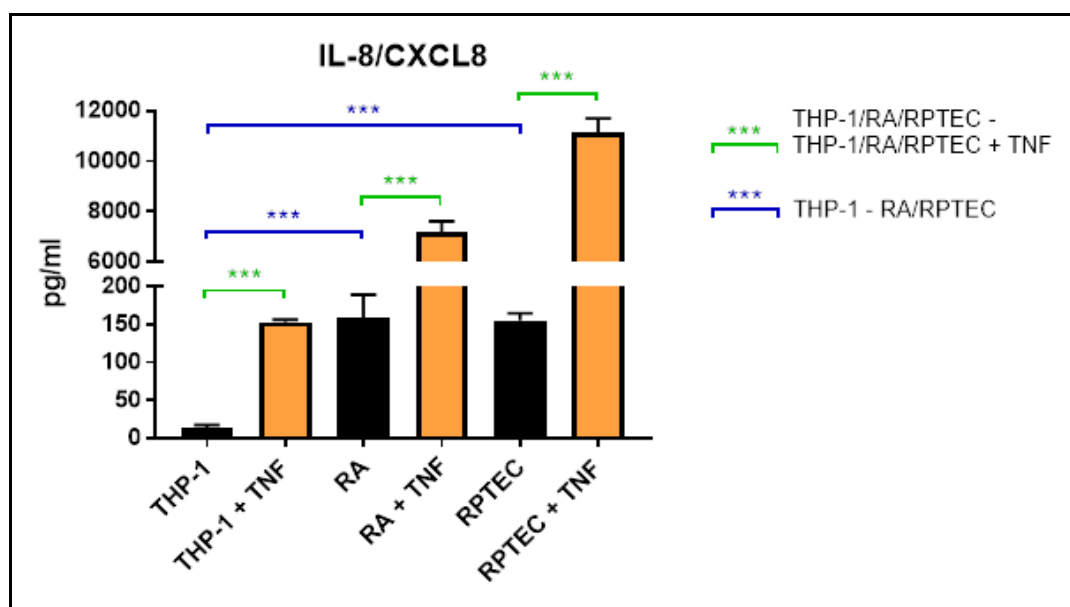
Výsledky byly vypočteny a grafy vytvořeny ve statistickém programu STATISTICA 12 CZ a GraphPad Prism 7.

12 Výsledky

12.1 Efekt prozánětlivého cytokinu TNF- α na expresi chemokinů

12.1.1 Exprese IL-8/CXCL8 linií buněk THP-1, RA a RPTEC

Graf č.1: Efekt prozánětlivého cytokinu TNF- α na expresi IL-8/CXCL8 linií buněk THP-1, RA a RPTEC



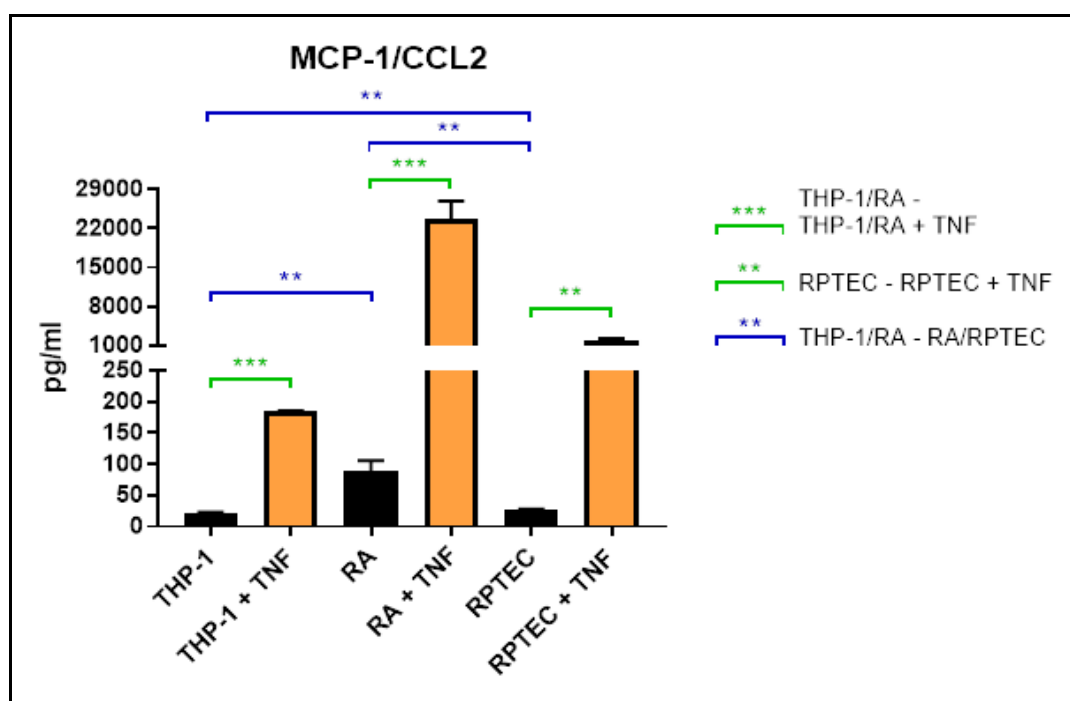
Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní.

Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

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

12.1.2 Expresa MCP-1/CCL2 linií buněk THP-1, RA a RPTEC

Graf č.2: Efekt prozánětlivého cytokinu TNF- α na expresi MCP-1/CCL2 linií buněk THP-1, RA a RPTEC



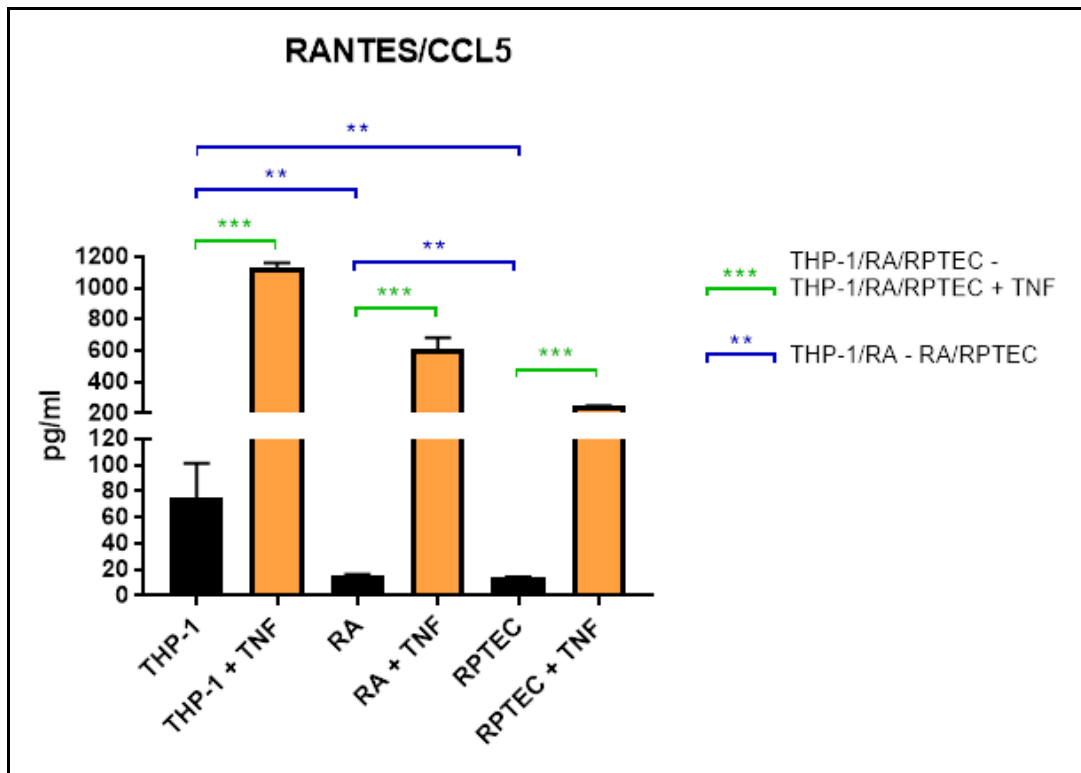
Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní.

Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

Expresa MCP-1 byla významně vyšší u nestimulovaných RA buněk oproti liniím THP-1 buněk a RPTEC. Po stimulaci byla největší exprese u RA. Stimulace obecně zvyšovala expresi u všech buněčných linií.

12.1.3 Expres RANTES/CCL5 linií buněk THP-1, RA a RPTEC

Graf č.3: Efekt prozánětlivého cytokinu TNF- α na expresi RANTES/CCL5 linií buněk THP-1, RA a RPTEC



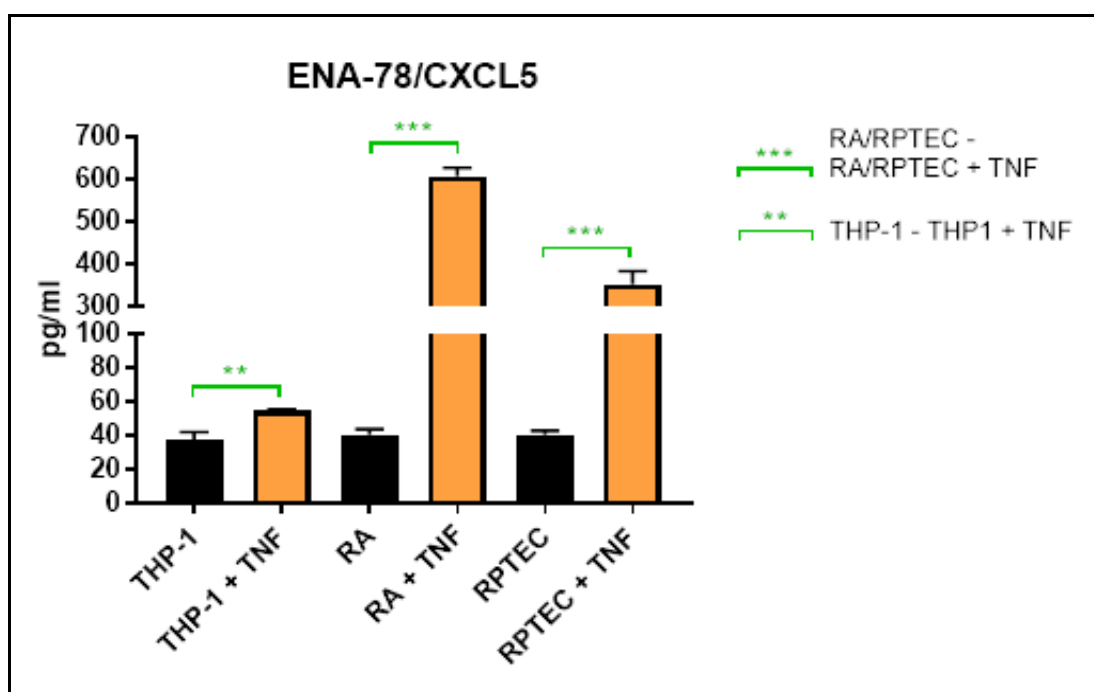
Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní.

Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

Nestimulované THP-1 mají vyšší expresi RANTES než epiteliální linie. Po stimulaci byla nejvyšší exprese u THP-1. Stimulace obecně zvyšovala expresi u všech buněčných linií.

12.1.4 Exprese ENA-78/CXCL5 linií buněk THP-1, RA a RPTEC

Graf č.4: Efekt prozánětlivého cytokinu TNF- α na expresi ENA-78/CXCL5 linií buněk THP-1, RA a RPTEC



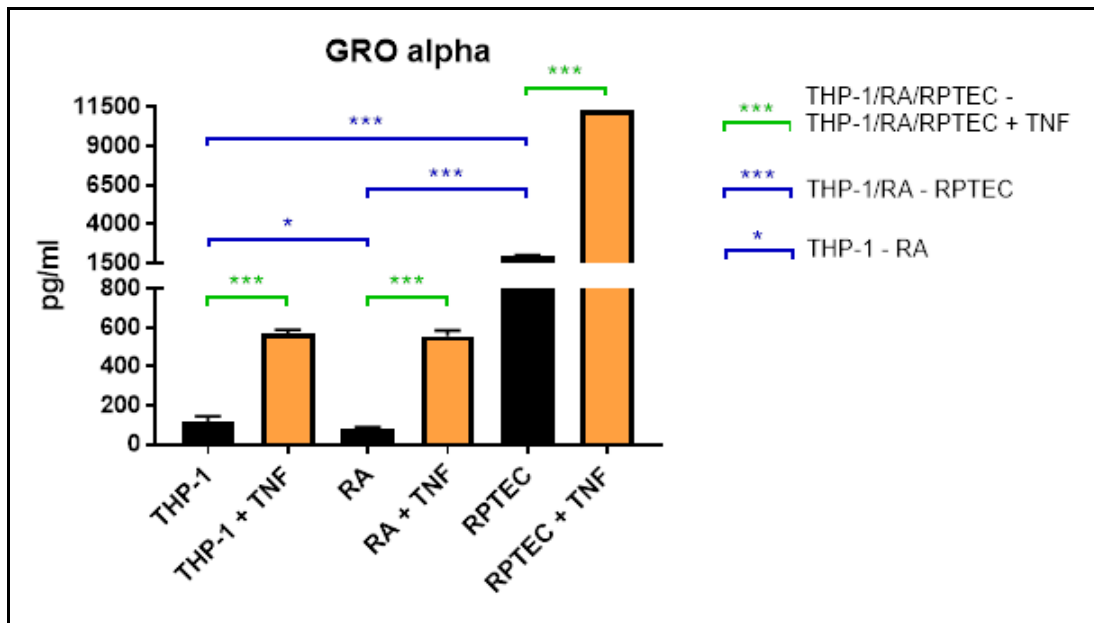
Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní.

Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

Všechny linie produkují ENA-78 i v nestimulovaném stavu. Po stimulaci TNF- α byla největší exprese zaznamenána u RA buněk. Stimulace výrazněji zvyšovala expresi u RA a RPTEC buněk.

12.1.5 Expresse GRO alpha linií buněk THP-1, RA a RPTEC

Graf č.5: Efekt prozánětlivého cytokinu TNF- α na expresi GRO alpha linií buněk THP-1, RA a RPTEC



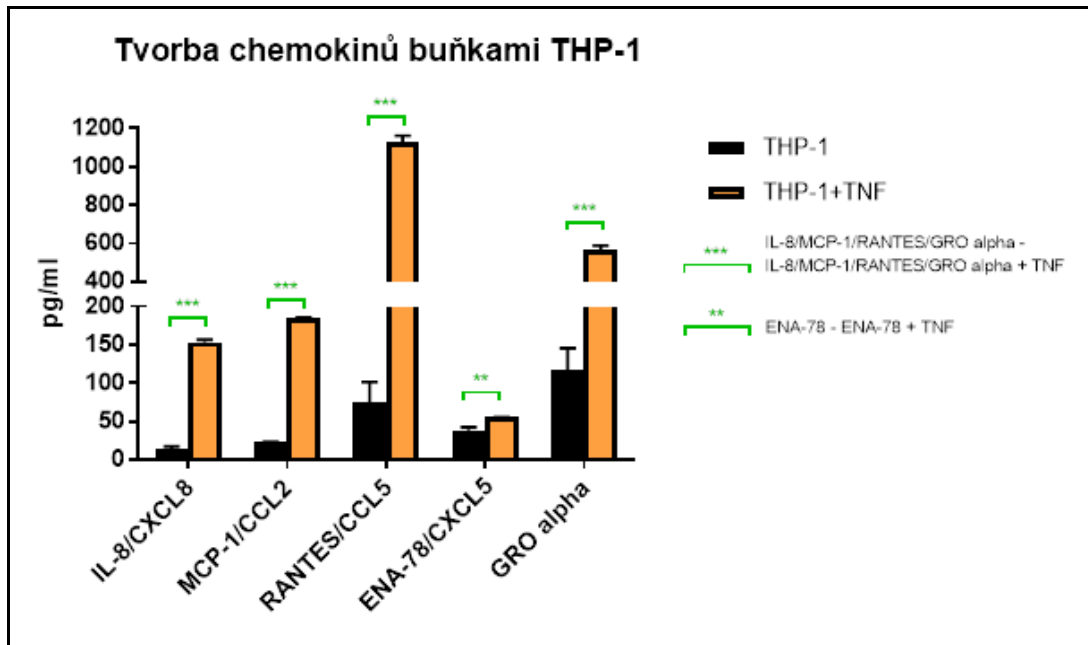
Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní.

Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

Linie RPTEC produkuje GRO alpha i v nestimulovaném stavu oproti ostatním liniím. Po stimulaci byla exprese GRO alpha významně vyšší u všech buněčných linií. Zvýšená exprese byla zaznamenána u stimulovaných RPTEC.

12.2 Tvorba chemokinů jednotlivými buňkami

Graf č.6: Tvorba chemokinů buňkami THP-1

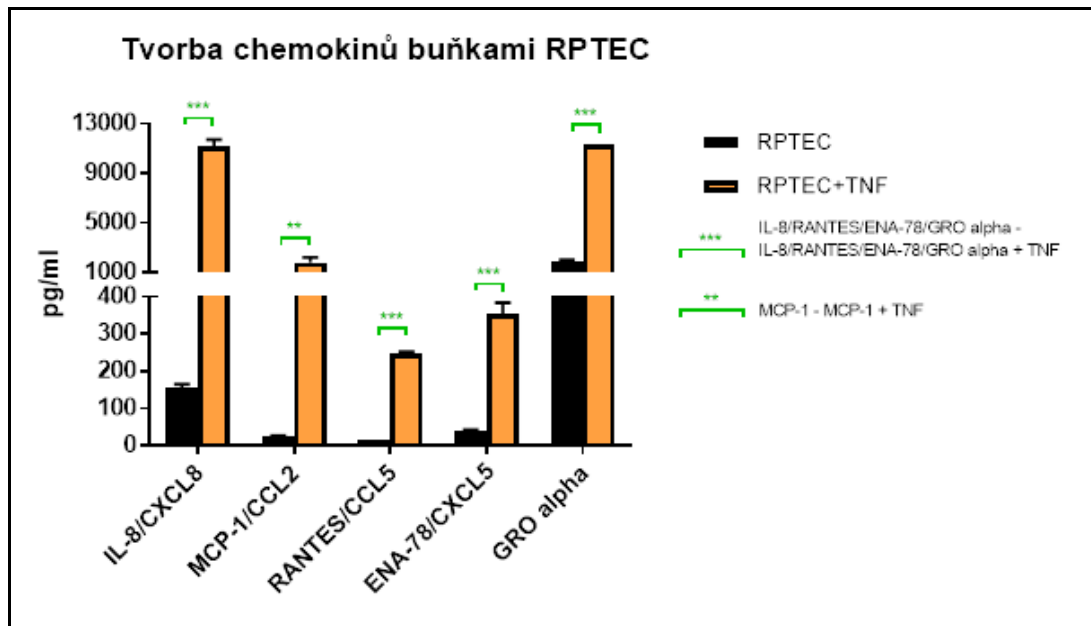


Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní.

Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

U nestimulované buněčné linie THP-1 byla zaznamenána nejvyšší produkce GRO alpha a RANTES. Po stimulaci byla zvýšená tvorba všech měřených chemokinů.

Graf č.7: Tvorba chemokinů buňkami RPTEC

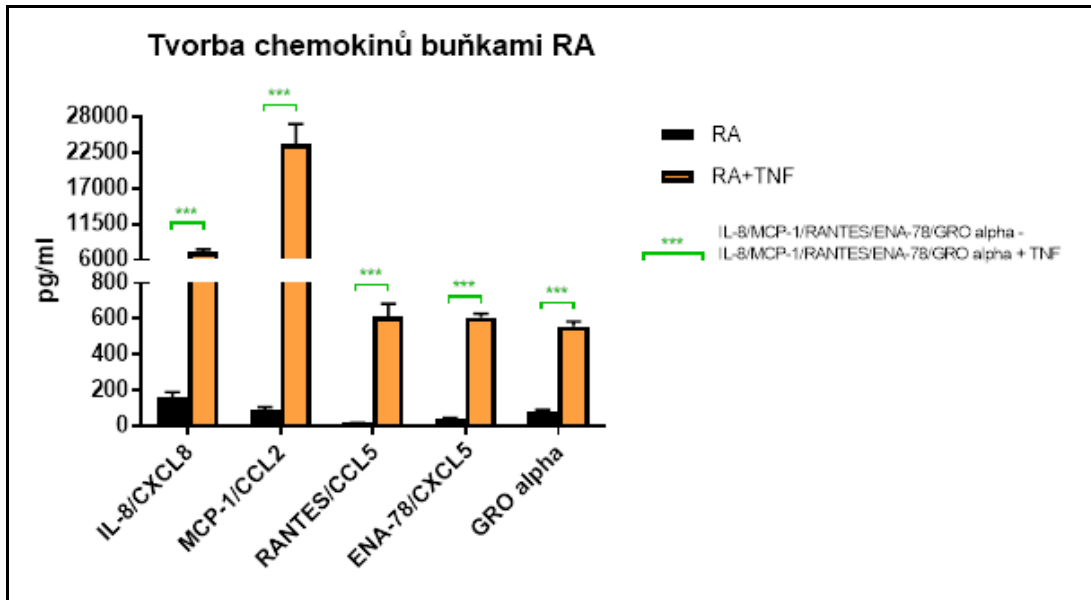


Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní.

Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

U nestimulovaných RPTEC byla zaznamenána zvýšená produkce GRO alpha a IL-8. Po stimulaci byla zjištěna zvýšená produkce u všech měřených chemokinů.

Graf č. 8: Tvorba chemokinů buňkami RA



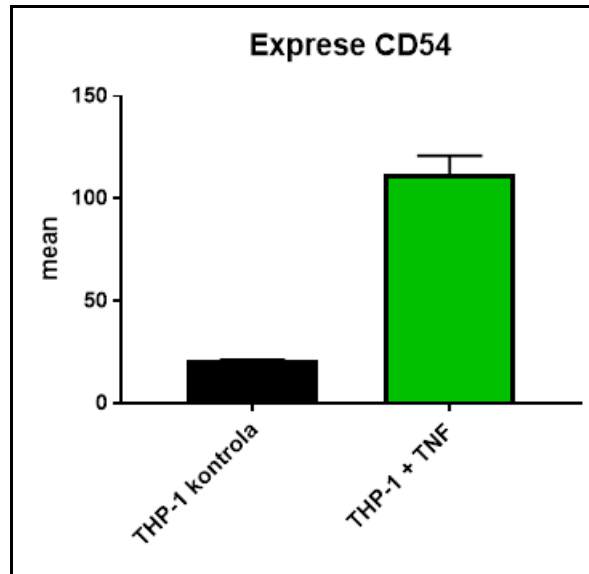
Hodnoty * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ byly považovány za signifikantní.

Měřeno metodou Luminex. Směrodatná odchylka byla vypočítaná z tripletu.

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

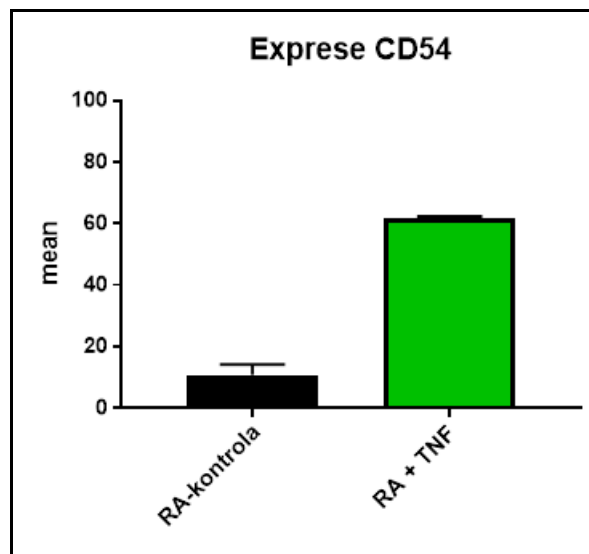
12.3 Exprese molekuly CD54 u jednotlivých buněk

Graf č.9: Efekt TNF- α na expresi molekuly CD54 u THP-1 buněk



Po stimulaci THP-1 buněk cytokinem TNF- α byla exprese CD54 významně vyšší.

Graf č.10: Efekt TNF- α na expresi molekuly CD54 u RA buněk



Po stimulaci RA buněk cytokinem TNF- α byla exprese CD54 významně vyšší.

12.4 Porovnání typů léčby bez indukce vs Simulect

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

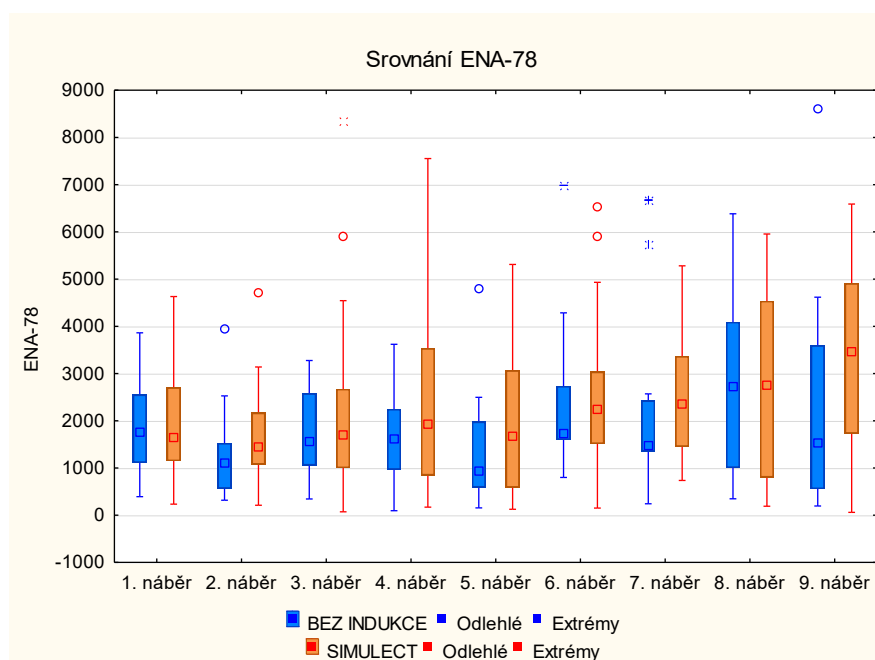
Tabulka č.2: ENA-78 typ léčby, srovnání ENA-78; bez indukce vs Simulect

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

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

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

Graf č.11: Srovnání ENA-78



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

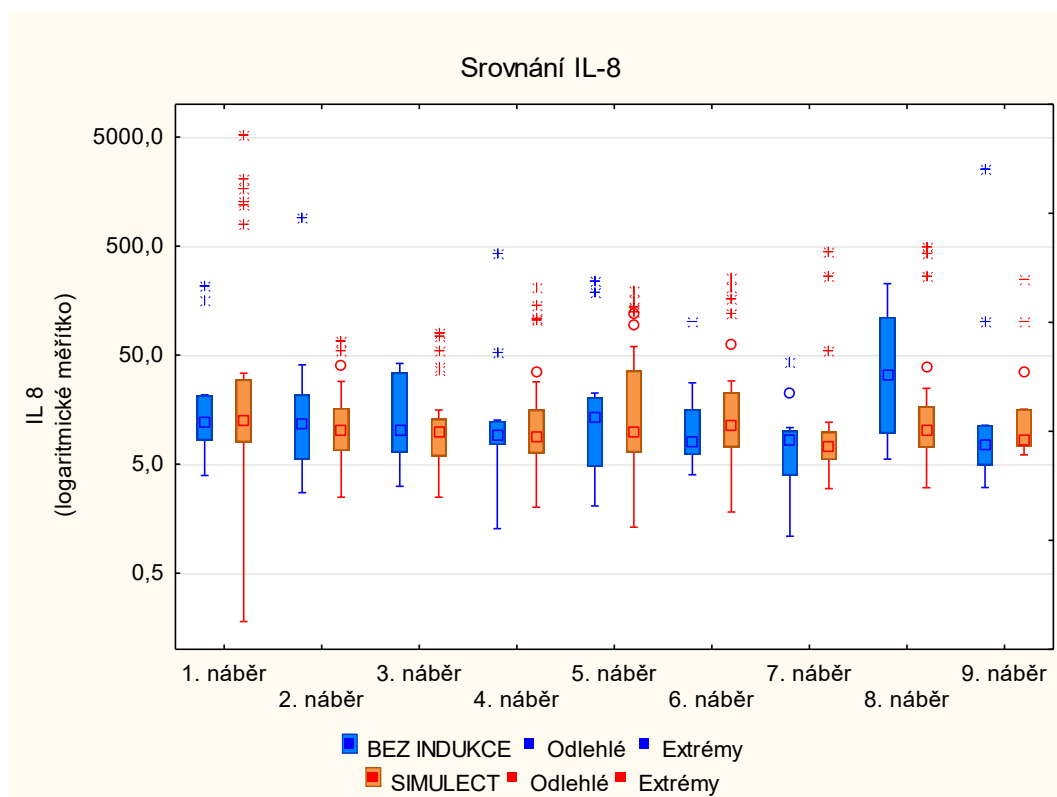
12.4.2 IL-8 typ léčby, srovnání IL-8; bez indukce vs Simulect

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

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

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

Graf č.12: Srovnání IL-8



Jelikož bylo v rámci IL-8 naměřeno velké množství silně extrémních hodnot, bylo pro osu y použito logaritmické měřítko. Při použití standardního lineárního měřítka nebyly krabice vůbec vidět. U logaritmického měřítka jsou na ose y stejné vzdálenosti např. mezi dvojicemi (5,50), (50,500) a (500,5000). Nejvíce extrémní hodnoty byly zjištěny u prvního

náběru pro SIMULECT, který byl zároveň i náběrem s nejnižší hodnotou ze všech měření. Naměřené hodnoty pro tento náběr tedy vykazovaly nejvyšší variabilitu. Vysoká variabilita hodnot napříč všemi náběry znemožňuje statisticky prokázat rozdíly. Data, která se z velké části překrývají, a přitom výrazně kolísají statistické testy založené na pravděpodobnosti nepovažují za průkazně rozdílná. Například pro 8. náběr je celý krabicový graf pro léčbu BEZ INDUKCE umístěn výše než pro léčbu s pomocí SIMULECTu, ale tato skutečnost je „vyvážena“ přítomností extrémních hodnot pro SIMULECT. Data nevykazují žádný patrný časový trend.

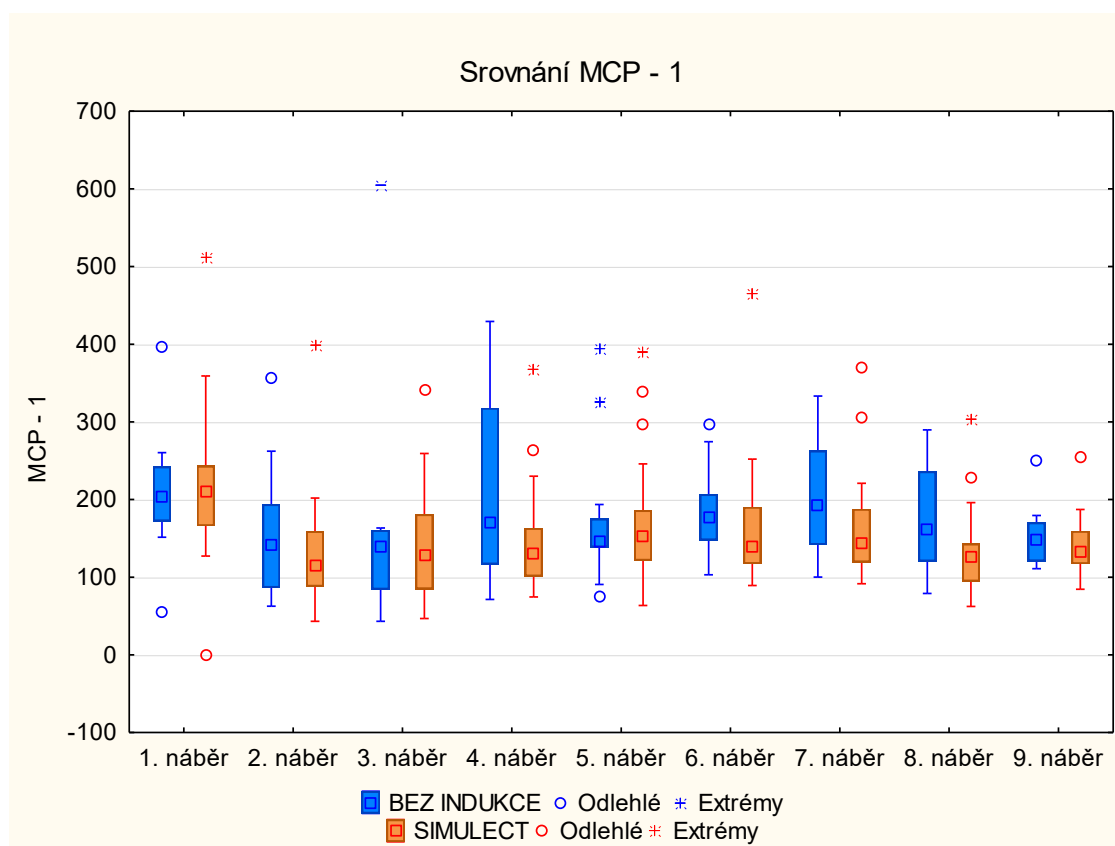
12.4.3 MCP-1 typ léčby, srovnání MCP-1; bez indukce vs Simulect

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

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

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

Graf č.13: Srovnání MCP-1



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

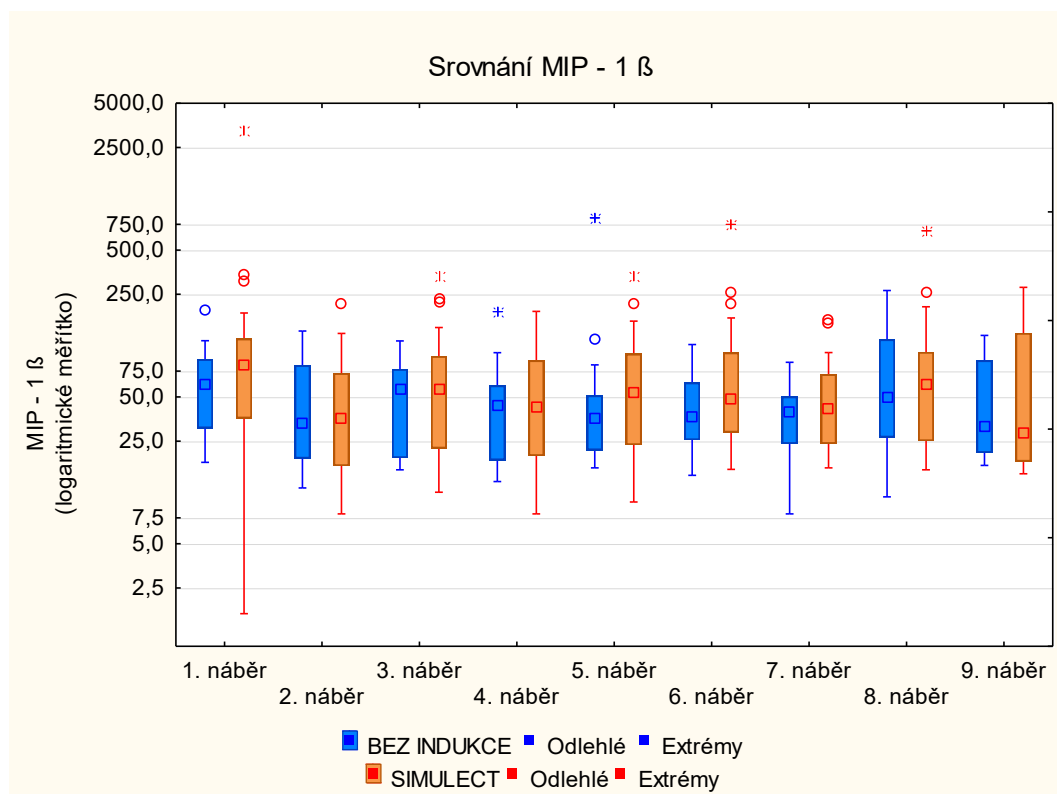
12.4.4 MIP-1 β typ léčby, srovnání MIP-1 β ; bez indukce vs Simulect

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

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

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

Graf č.14: Srovnání MIP-1 β



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

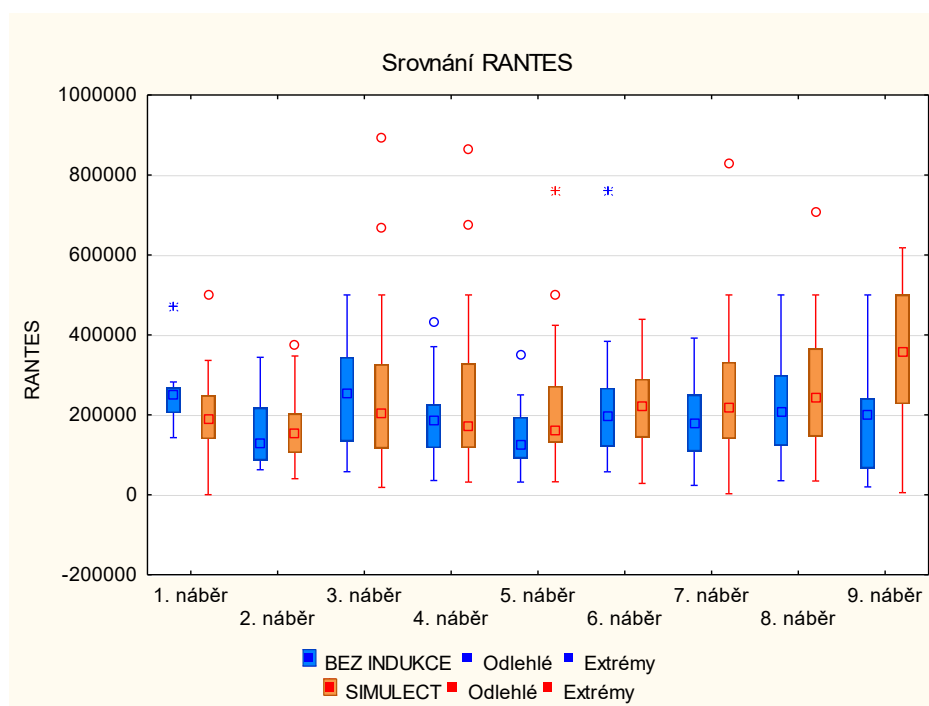
12.4.5 RANTES typ léčby, srovnání RANTES; bez indukce vs Simulect

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

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

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

Graf č.15: Srovnání RANTES



Na základě grafu je patrný výrazný rozdíl pro 9. náběr, kdy hodnoty RANTES pro SIMULECT převýšily hodnoty pro léčbu BEZ INDUKCE. U prvního náběru je rozdíl ve

prospěch vyšších hodnot při léčbě bez indukce dán vyšším mediánem a nízkou variabilitou hodnot.

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

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

Popisná statistika

Tabulka č.7: ENA-78 – bez indukce

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

Tabulka č.8: ENA-78 – simulect

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

Tabulka č.9: IL-8 – bez indukce

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

Tabulka č.10: IL-8 – simulect

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

Tabulka č.11: MCP-1 – bez indukce

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

Tabulka č.12: MCP-1 – simulect

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

Tabulka č.13: MIP-1 β – bez indukce

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

Tabulka č.14: MIP-1 β – simulect

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

Tabulka č.15: RANTES – bez indukce

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

Tabulka č.16: RANTES – simulect

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

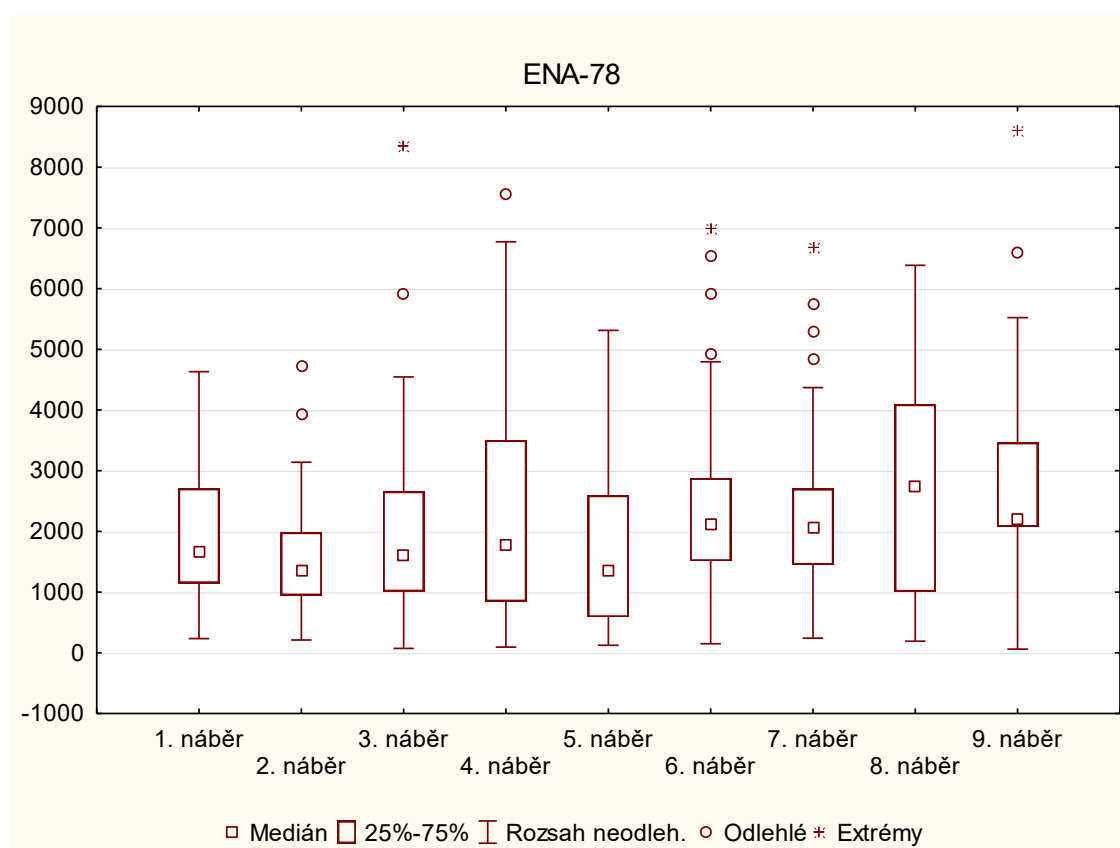
12.5 Hladiny chemokinů u pacientů s transplantovanou ledvinou

12.5.1 Sérové hladiny ENA-78 u pacientů s transplantovanou ledvinou

Tabulka č.17: ENA-78

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

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



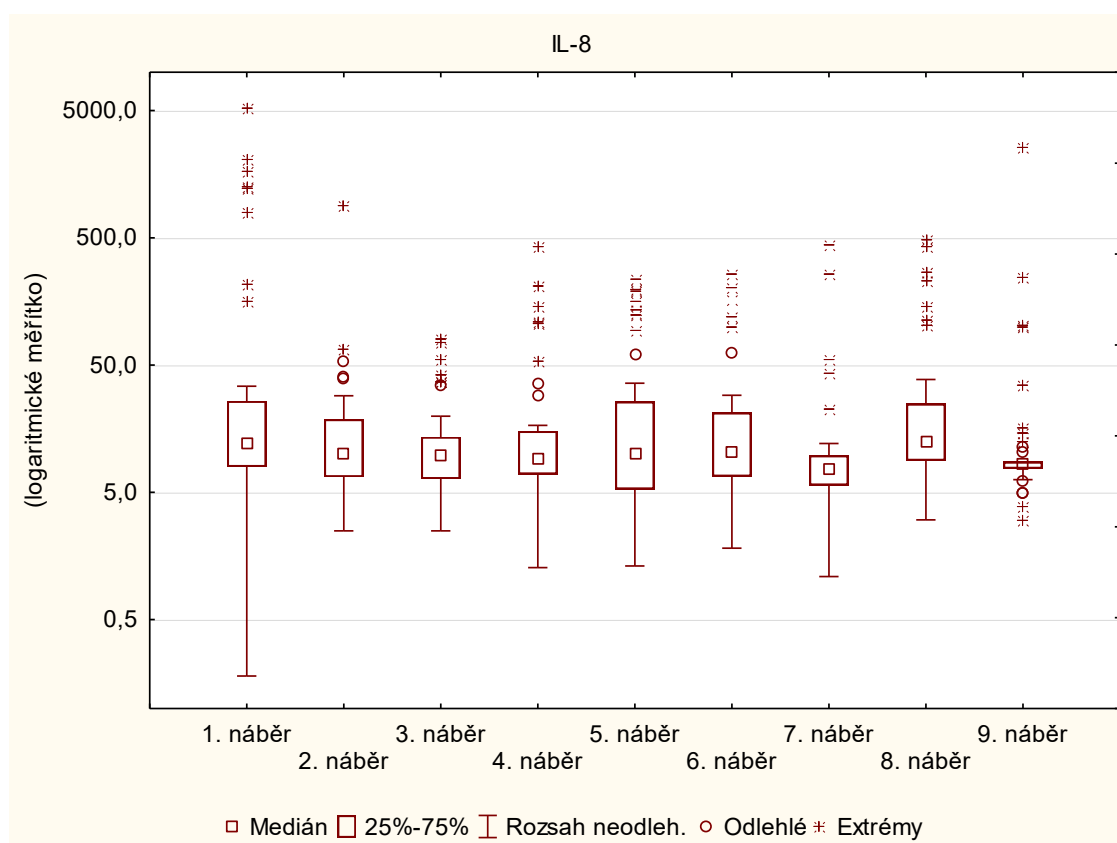
Hodnoty ENA-78 pro prvních 5 náběrů kolísají v mediánu okolo 1500, pro zbylé náběry pak kolem 2000. Dochází tedy postupně k určitému nárůstu. Odlehlé, popř. extrémní hodnoty se vyskytují u všech náběrů kromě prvního.

12.5.2 Sérové hladiny IL-8 u pacientů s transplantovanou ledvinou

Tabulka č.18: IL-8

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

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



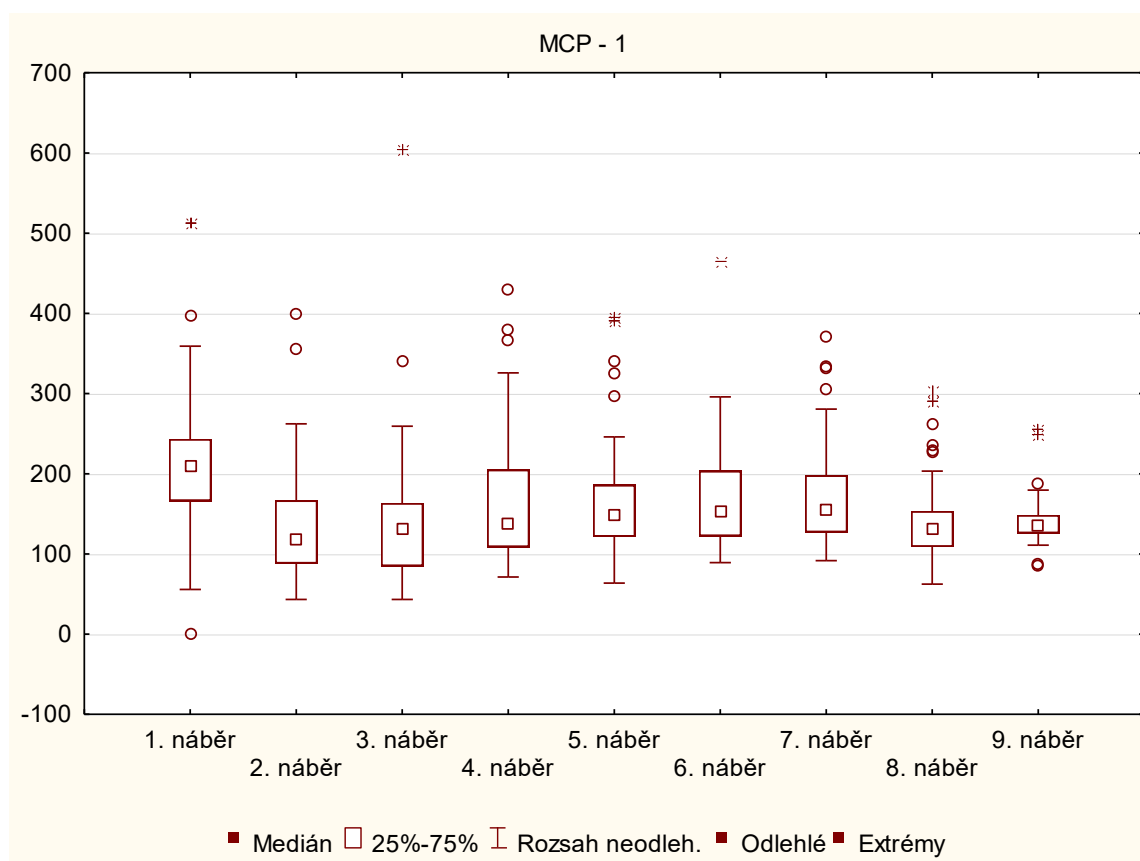
Hodnoty IL-8 v mediánu kolísají okolo 10 pro celé pooperační období. Pro všechny náběry se také vyskytují silně extrémní hodnoty, nejvíce u prvního náběru. V grafu tedy bylo nutné pro osu y použít logaritmické měřítko.

12.5.3 Sérové hladiny MCP-1 u pacientů s transplantovanou ledvinou

Tabulka č.19: MCP-1

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

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



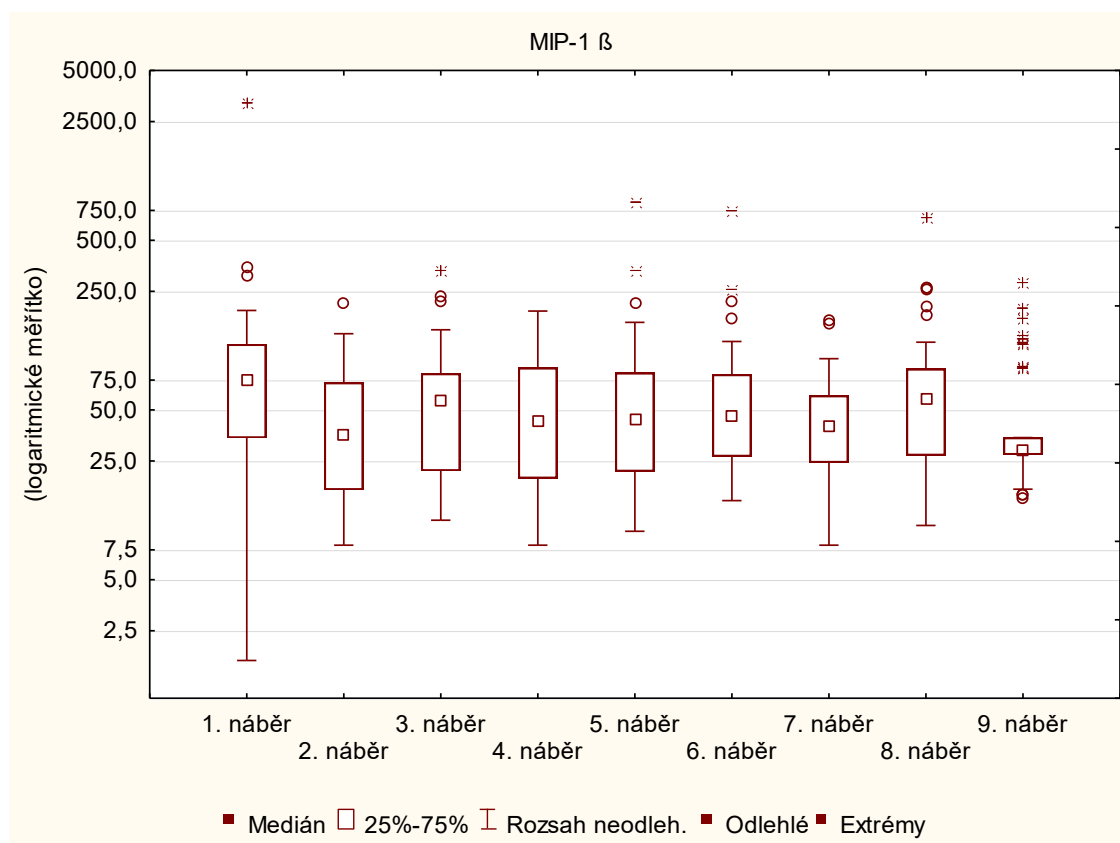
Hodnoty MCP-1 jsou nejvyšší u prvního náběru, kdy se pohybují okolo mediánu 200. Pro ostatní náběry již dochází ke kolísání mediánu mezi 110 a 160. U všech náběrů se vyskytují odlehlé či extrémní hodnoty.

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

Tabulka č.20: MIP-1 β

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

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



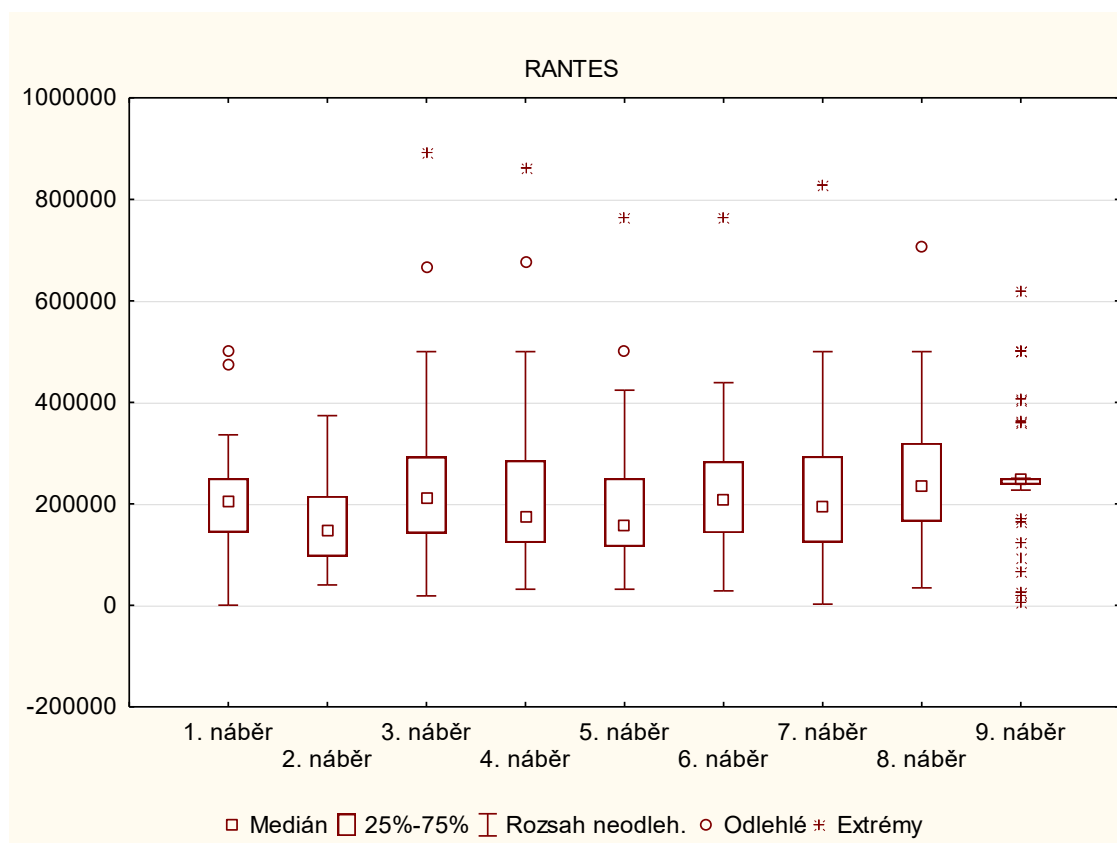
Nejvyšší hodnoty MIP-1 β byly zjištěny u prvního náběru, kdy medián činil 75 pg/ml. Hodnoty u náběrů 2 až 8 pouze mírně kolísaly. Poslední náběr vykázal nejnižší hodnoty okolo mediánu 29, ovšem s větším počtem extrémně se vychylujících hodnot v rozmezí 75 až 279.

12.5.5 Sérové hladiny RANTES u pacientů s transplantovanou ledvinou

Tabulka č.21: RANTES

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

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



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

13 Diskuze

Mezi hlavní cíle této diplomové práce patřilo sledování sérových hladin chemokinů u pacientů s transplantovanou ledvinou a dále posouzení efektu prozánětlivých cytokinů na uvolnění chemokinů v buněčném supernatantu. Pokusy byly provedeny na nádorové linii buněk RA (renal adenocarcinoma epithelial cell), primární linii ledvinových buněk RPTEC (human renal proximal tubule epithelial cell) a THP-1 buněčné linii (nádorová monocytární linie). Koncentrace byla stanovena u chemokinů IL-8, MCP-1, RANTES, ENA-78 a GRO- α . Cytokiny stimulují epiteliální buňky k tvorbě různých chemokinů (*Bergese et al., 1995*). K našim experimentům byl využit TNF- α .

Z naměřených hodnot ENA-78 u léčby bez indukce a Simulectu jsme vysledovali postupný nárůst hladiny. Statistické rozdíly však nebyly významné, neboť p-hodnota testu byla vyšší než hladina 0,05. Nejvyšší hladiny chemokinu ENA-78 bylo dosaženo u buněčné kultury RA + TNF (stimulace nádorových linií ledvinových buněk pomocí TNF- α) v rozmezí 600-700 pg/ml. To můžeme vysvětlit tím, že ve zdravé tkáni, jsou primárním zdrojem chemokinu ENA-78 (CXCL-5) epiteliální buňky, ale v zánětlivé tkáni jsou hlavním zdrojem tohoto chemokinu buňky způsobující zánět-neutrofilie (*Minshall et al., 1997*).

Byla dokázána korelace mezi ENA-78 a angiogenezí tumoru u zvířecích modelů *in vivo*, kdy při imunoneutralizaci ENA-78 došlo k utlumení růstu tumoru a metastáz, k redukcii angiogenezi a k rozšíření apoptózy buněk nádoru (*Fulton, 2008*).

Hodnoty IL-8 u léčby bez indukce a Simulectu vykazovaly nejvyšší variabilitu. Avšak vysoká variabilita hodnot napříč všemi náběry znemožňovala statistické prokázání rozdílů, naměřená data nevykazovala časový trend. Nejvyšší hladiny chemokinu IL-8 (CXCL-8) byla u tkáňové kultury RPTEC + TNF (stimulace primární linie ledvinových buněk TNF- α), s hodnotami blížíci se 12000 pg/ml.

Expresí hladiny CXCL-8 koreluje s časem ischemie při ledvinové transplantaci. V biopsii odmítnutých ledvin, která proběhla méně než po 2 měsících po transplantaci, byla koncentrace CXCL-8 v moči významně vyšší a předcházela diagnostice odmítnutí transplantovaného orgánu. Po léčbě, CXCL-8 koncentrace v moči byla snížena k normálu. Největší hladiny CXCL-8 můžeme vidět u pacientů s biopsií odmítnutí orgánů v kombinaci s akutní tubulární nekrózou (*Ulricker, 2007*).

Sledování hladiny IL-8 (CXCL-8) po transplantaci ledviny, může být jedním z vyšetření, které by mohlo indikovat výskyt zánětu, díky vyšší hladině IL-8. Tento zánět by mohl být lokalizován u transplantovaného orgánu, a pokud by nedošlo k léčbě tohoto zánětu, mohlo by následovat odmítnutí transplantovaného orgánu pacientem.

Nejvyšších hodnot MCP-1 bylo dosaženo u RA + TNF, které dosahovaly v rozmezí 22000-29000 pg/ml. RA (rakovinné ledvinové buňky) tvořily nejvíce chemokin MCP-1. Tato skutečnost může být vysvětlena tím, že tento chemokin má jistou úlohu s patogenezi nádoru, proto jeho hladina byla nejvyšší u rakovinných buněk.

Monocyt chemoatraktant protein-1 (MCP-1/CCL2) je jedním z klíčových chemokinů, které regulují migraci a infiltraci monocytů/makrofágů. CCL2 a jeho receptor CCR2 byl zaznamenán ve spojitosti s mnoha onemocněními. Migrace monocytů krevním řečištěm přes vaskulární endothelium je důležitá pro imunologickou ochranu tkání, ale také jako odpověď v zánětlivém procesu (*Deshmane et al., 2009*).

MCP-1 je chemokin, který reguluje chemotaxi monocytů a diferenciaci T-lymfocytů připojením k molekule CCR2. Jeho úloha je ve spojitosti patogeneze zánětlivých onemocnění, arterosklerózy a rakoviny (*Bianconi et. al., 2018*).

MIP-1 β u léčby bez indukce a Simulectu nebyl statisticky prokázán rozdíl, navíc zde byly naměřeny nejnižší rozdíly mezi těmito dvěma typy léčby.

Chemokiny MIP-1 α a MIP-1 β jsou produkovány makrofágy po stimulaci bakteriálními endotoxiny (*Sherry, B., et al., 1988*). Jejich hlavní role spočívá v imunitní odpovědi při infekci a během zánětu (*Ren, Guo, Guo, et al., 2010*). Aktivují lidské granulocyty (neutrofile, eozinofily a bazofily), které se podílejí na akutním neutrofilním zánětlivém procesu (*Irving et al., 1990*). Jsou produkovány mnoha buňkami, ale nejvíce makrofágy, dendritickými buňkami a lymfocyty. MIP-1 má úlohu v chemotaktickém a předzánětlivém efektu mající vliv i na homeostázu (*Maurer, von Stebut, 2004*).

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

Nejvíce tvořeným chemokinem u THP-1 byl RANTES, hodnoty byly naměřeny u THP1 + TNF, v rozmezí 1000-1200 pg/ml. Vysokou hladinu chemokin RANTES u buněčné linie THP-1 můžeme vysvětlit tím, že RANTES (CCL5) je chemokin vytvářený mnoha kmenovými a ne-kmenovými buňkami, mající roli v migraci a umístování efektoru a

paměti T-buněk v průběhu infekce. RANTES receptor CCR5, je hlavním cílem anti-HIV léků, založených na principu blokování vstupu tohoto viru na tento receptor. Avšak defekty v receptorech RANTES, mohou vést k akutní infekci, která může způsobit vážná onemocnění (*Crawford et al., 2011*).

Nejvyšších hodnot u chemokinu GRO alpha bylo dosaženo u RPTEC + TNF, hodnoty se blížily k číslu 11500 pg/ml. Věk regulující geny mohou sloužit jako markery stáří. Jeden gen s transkriptem zvyšujícím se v množství s věkem lidského organismu v pokožce epitelálních buněk je chemokin GRO-alpha (růst regulující protein alpha). Když se chemokiny, jako například GRO-alpha stanou neregulovány, takže jsou chronicky tvořeny, může dojít k poškození tkáně, angiogenezi a ke vzniku nádoru. Můžeme proto GRO-alpha chápat jako potencionální marker pro stáří a výskyt rakoviny. Podle výsledků testů, byla tvorba GRO-alpha snížena o 75 % u SZ95 sebocytů (buňky mazových žláz linie SZ95), a o 58 % v buňkách melanomu A375. Dále byla dokázána korelace mezi zastavenou tvorbou (silencing) GRO-alpha s interleukinem-6 (IL-6), IL-8 a vaskulárním růstovým faktorem sekrece v obou typech testovaných buněk. GRO-alpha můžeme považovat za marker stáří buněk (i rakoviny) (*Fimmel et al., 2007*).

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

CD-54 neboli ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) je protein supergenu imunoglobulinu, který se tvoří na povrchu mnoha buněk a je regulován v odpovědi mnoha mediátory způsobující zánětlivou reakci, včetně prozánětlivých cytokinů, hormonů, buněčných stresorů a virových infekcí (*Roebuck a Finnegan, 1999*).

Z předešlého výzkumu můžeme odvodit, že některé receptory chemokinů ukázaly významnou roli v akutní ledvinové transplantaci rejekci. Ischemická poranění jsou dány genetickým vybavením transplantovaného orgánu, který zvyšuje riziko vzniku zánětu tkáně, negativní následky funkce a přežití transplantovaného orgánu (*Ulricker, 2007*).

Chemokiny mají velmi důležitou roli v selektivním náboru monocytů, neutrofilů a lymfocytů, stejně tak mají důležitou roli v indukované chemotaxi skrze aktivaci G-protein-coupled receptorů (*Deshmane et al., 2009*).

Sérové hladiny chemokinů u pacientů po transplantaci ledviny vykazovaly výraznou interindividuální variabilitu a nebyl zaznamenán rozdíl mezi jednotlivými

imunosupresivními režimy. Nezdá se, že by tyto parametry mohly v budoucnosti sloužit jako biomarkery komplikací u orgánových transplantací.

14 Závěr

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

Chemokin ENA-78 byl nejvíce produkován u buněčné kultury RA + TNF, chemokin IL-8 (CXCL-8) měl nejvyšší hladinu u buněk RPTEC + TNF, největší hladiny MCP-1 bylo dosaženo u buněk RA + TNF.

Celkově nejvyšších hodnot u buněk THP-1 (THP1 + TNF) měl chemokin RANTES, u buněk RPTEC + TNF maximální hladiny dosáhl chemokin GRO alpha.

Expresí CD54 byla největší u THP-1 + TNF buněk, s hodnotami 100-150, zatímco u buněk RA + TNF byla exprese menší s hodnotami 60-80. Vyšší hladinu exprese CD54 u THP-1 + TNF buněk si můžeme vysvětlit tím, že CD54 se nepodílí na procesu tvorby rakoviny či jejího úplného zneškodnění.

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

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

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

Sérové hladiny chemokinů u pacientů po transplantaci ledviny vykazovaly výraznou interindividuální variabilitu a nebyl zaznamenán rozdíl mezi jednotlivými

imunosupresivními režimy. Nezdá se, že by tyto parametry mohly v budoucnosti sloužit jako biomarkery komplikací u orgánových transplantací.

15 Seznam použité literatury

Akiyoshi T, Hirohashi T, Alessandrini A, Chase CM, Farkash EA, Neal Smith R, Madsen JC, Russell PS, Colvin RB. Role of complement and NK cells in antibody mediated rejection. *Hum Immunol*. 2012 Dec;73(12):1226-32.

Albert Venencia, Arulselvi Subramanian, Deepak Agrawal, Sanjeev Kumar Bhoi, Pooja Pallavi, A. K. Mukhopadhyay. RANTES levels in peripheral blood, CSF and contused brain tissue as a marker for outcome in traumatic brain injury (TBI) patients. *BMC Res Notes*. 2017; 10: 139.

Altara R, Mallat Z, Booz GW, Zouein FA. The CXCL10/CXCR3 Axis and Cardiac Inflammation: Implications for Immunotherapy to Treat Infectious and Noninfectious Diseases of the Heart. *J Immunol Res*. 2016;2016:4396368. Epub 2016 Oct 3.

Amiri KI, Richmond A. Fine tuning the transcriptional regulation of the CXCL1 chemokine. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2003;74:1-36.

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

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

Bartůňková J., Paulík M. a kolektiv. *Vyšetřovací metody v imunologii. 2., přepracované a doplněné vydání*. Praha: Grada, 2011

Bianconi V, et al. The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1: An Overview. In: *Current Opinion in Hematology*[online]. 2018, 25(1), s. 44-51 [cit. 2017-12-01].

Blanchet X, Langer M, Weber C, Koenen RR, von Hundelshausen P. Touch of chemokines. *Front Immunol*. 2012 Jul 12;3:175.

Cole Katherine E., Christine A. Strick, Timothy J. Paradis, Kevin T. Ogborne, Marcel Loetscher, Ronald P. Gladue, Wen Lin, James G. Boyd, Bernhard Moser, Douglas E. Wood, Barbara G. Sahagan, Kuldeep Neote. Interferon-inducible T Cell Alpha

Chemoattractant (I-TAC): A Novel Non-ELR CXC Chemokine with Potent Activity on Activated T Cells through Selective High Affinity Binding to CXCR3. *J Exp Med*. 1998 Jun 15; 187(12): 2009–2021.

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

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

Crawford A, et al. A Role for the Chemokine RANTES in Regulating CD8 T Cell Responses during Chronic Viral Infection. 2011. [Doi:org/10.1371/journal](https://doi.org/10.1371/journal).

Cucchiari D, Podestà MA, Ponticelli C. The Critical Role of Innate Immunity in Kidney Transplantation. *Nephron*. 2016;132(3):227-37.

Daughton Havenar C, Lindqvist M, Heit A, Wu JE, Reiss SM, Kendric K, Bélanger S, Kasturi SP, Landais E, Akondy RS, McGuire HM, Bothwell M, Vagefi PA, Scully E; IAVI Protocol C Principal Investigators, Tomaras GD, Davis MM, Pognard P, Ahmed R, Walker BD, Pulendran B, McElrath MJ, Kaufmann DE, Crotty S. CXCL13 is a plasma biomarker of germinal center activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Mar 8;113(10):2702-7.

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

Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009 Jun;29(6):313-26.

Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, Zhong W, Matas A, Samaniego M. Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. *Am J Transplant*. 2014 Feb;14(2):255-71.

Fimmel S, et al. GRO-alpha: a potential marker for cancer and aging silenced by RNA interference. 2007. *Ann N Y Acad. Sci*. DOI: 10.1196/annals.1404.016

Fulton, Amy M. Chemokine receptors in cancer. New York, NY: Humana, 2008. ISBN 978-1-60327-266-7.

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

Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*. 2015 Aug 8;15:577.

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

Cheung Kitty P., Sashi G. Kasimsetty, and Dianne B. McKay. Innate immunity in donor procurement. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013 Apr; 18(2): 154–160.

Irving S.G., et al. Two inflammatory mediator cytokine genes are closely linked and variably amplified on chromosome 17q. 1990. *Nucleic Acids Res*. 18 (11): 3261–70. doi:10.1093/nar/18.11.3261.

Keeley Ellen C., Borna Mehrad, and Robert M. Strieter. CXC Chemokines in Cancer Angiogenesis and Metastases. *Adv Cancer Res*. 2010; 106: 91–111.

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

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

Maurer M., von Stebut, E. Macrophage inflammatory protein-1. 2004. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 36 (10): 1882–6. doi:10.1016/j.biocel.2003.10.019

Mikolajczyk Tomasz P., Ryszard Nosalski, Piotr Szczepaniak, Klaudia Budzyn, Grzegorz Osmenda, Dominik Skiba, Agnieszka Sagan, Jing Wu, Antony Vinh, Paul J. Marvar, Bartłomiej Guzik, Jakub Podolec, Grant Drummond, Heinrich E. Lob, David G. Harrison, Tomasz J. Guzik. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *FASEB J*. 2016 May; 30(5): 1987–1999.

Minshall EM, et al. Eotaxin mRNA and protein expression in chronic sinusitis and allergen-induced nasal responses in seasonal allergic rhinitis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;17(6):683–90.

Mortier Anneleen, Nele Berghmans, Isabelle Ronsse, Karolien Grauwen, Steve Stegen, Jo Van Damme, and Paul Proost. Biological Activity of CXCL8 Forms Generated by Alternative Cleavage of the Signal Peptide or by Aminopeptidase-Mediated Truncation. *PLoS One*. 2011; 6(8): e23913.

Nankivell Brian J., M.D., Ph.D., and Stephen I. Alexander, M.B., B.S., M.P.H. Rejection of the Kidney Allograft. *N Engl J Med* 2010;363:1451-62.

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

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

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

Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*. 2012 Mar;221(1):2-11.

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

Ren M., Guo, Q., Guo, L., et al. Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. 2010. *EMBO J*. 29 (23): 3952–66. doi:10.1038/emboj.2010.256

Roebuck K.A., Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. 1999. *J Leukoc Biol*.

Romagnani P, Crescioli C. CXCL10: a candidate biomarker in transplantation. *Clin Chim Acta*. 2012 Sep 8;413(17-18):1364-73.

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

Sherry B., et al. "Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. 1988. *J. Exp. Med*. 168 (6): 2251–9. doi:10.1084/jem.168.6.2251

Slatinská Janka, Ondřej Viklický. Antibody – mediated rejection: Current view on pathophysiology and therapy. *Aktuality v Nefrologii*. 2014

Sulková, S. a kolektiv (2000). Hemodialýza, Maxdorf Jesenius

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

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

Ulricker, Oliver N. Transplantation immunology research trends. New York: Nova Biomedical Books, c2007. ISBN 978-1-60021-578-0.

Ulvmar Maria Helena, Elin Hub, and Antal Rot. Atypical chemokine receptors. *Exp Cell Res*. 2011 Mar 10; 317(5): 556–568.

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

Viklický, O., Janoušek, L., Baláž, P., a kolektiv (2008). *Transplantace ledviny v klinické praxi*, Grada Publishing, a.s.

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

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

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

Wood S, Jayaraman V, Huelsmann EJ, Bonish B, Burgad D, Sivaramakrishnan G, Qin S, DiPietro LA, Zloza A, Zhang C, Shafikhani SH. Pro-inflammatory chemokine CCL2 (MCP-1) promotes healing in diabetic wounds by restoring the macrophage response. *PLoS One*. 2014 Mar 11;9(3):e91574.

Yao Yao, Stella E. Tsirka. Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Blood-Brain Barrier. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Feb; 71(4): 683–697.