

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Analýza imunitních buněk  
v kloubních výpotcích**

**Diplomová práce**

**Ondřej Janča**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2018**

**Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Eva Kriegová**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. Dr. Ing. Evy Kriegové a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 26. dubna 2018

.....

Ondřej Janča

## Souhrn

Osteoartróza (OA) je velmi heterogenní skupinou kloubních onemocnění. Přestože může přítomnost imunitních buněk zásadně ovlivňovat průběh patologických procesů v postiženém kloubu, imunitní prostředí kloubních výpotků je dosud málo studováno.

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium hlavních populací imunitních buněk v kloubních výpotcích OA pacientů, a to zejména na populaci buněk monocyto-makrofágové linie. K tomu bylo využito metod imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie a imunocytochemického barvení cytospinů. Dále práce hledala podobnosti v zastoupení imunitních populací jednotlivých zkoumaných pacientů s využitím datových sítí s cílem rozlišit fenotypy pacientů pro možnost diagnostiky onemocnění a úpravy léčby pacientům na míru.

Bylo zjištěno, že hlavní imunitní populace v kloubních výpotcích OA pacientů jsou lymfocyty, neutrofilů a buňky monocyto-makrofágové linie. Detailní analýza buněk monocyto-makrofágové linie identifikovala její subpopulace: monocyty, makrofágy a myeloidní dendritické buňky. U těchto subpopulací byla studována exprese znaků CD64, TLR2 a TLR4 a bylo zjištěno, že většina monocytů a makrofágů a malá část myeloidních dendritických buněk je pozitivní na všechny studované znaky. Analýza podobnosti zastoupení imunitních populací pacientů rozlišila 5 fenotypů: dva u mužů, dva u žen a jeden charakteristický velkým zastoupením neutrofilů.

Popis imunitních populací v synoviální tekutině může významně přispět k pochopení patogeneze OA, ale také návrhu léčebných a profylaktických strategií.

## Summary

Osteoarthritis (OA) is a very heterogeneous group of joint diseases. Although the presence of immune cells can significantly influence the progression of pathological processes in the affected joint, the actual immune environment of the synovial fluid is scarcely researched.

This diploma thesis is focused on the main immune cell populations in synovial fluids of OA patients with a special attention to the monocyte/macrophage cell lineage. The thesis utilizes the method of immunophenotyping using flow cytometry and immunocytochemical staining of cytopins. Additionally, the thesis examined the differences and correlation of the immune cell population's ratios among the studied patients utilizing data networks. The aim of this analysis was to distinguish different phenotypes of patients for use in diagnostics of the OA and personalization of treatment.

It was found, that main immune cell populations in the synovial fluid of OA patients are lymphocytes, neutrophils and the cells of monocyte/macrophage lineage. A thorough analysis of the monocyte/macrophage cell lineage identified its main subpopulations: monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells. These subpopulations were examined for an expression of cell markers CD64, TLR2 and TLR4 and it was found that most of monocytes and macrophages and a small fraction of myeloid dendritic cells express all examined cell markers. Correlation analysis of immune cell populations' ratios distinguished 5 patient phenotypes: two male, two female and one phenotype defined by a predomination of neutrophils.

The description of immune cell populations in the synovial fluid presented in this thesis can significantly contribute to the understanding of the pathogenesis of the OA and to the design of new treatment and prophylactic strategies.

Tímto děkuji především doc. Dr. Ing. Evě Kriegové za odborné vedení, dále všemu personálu Laboratoře molekulární imunologie Ústavu imunologie LF UP se zvláštním poděkováním Mgr. Zuzaně Mikulkové, Ph.D., Mgr. Gabriele Gabčové, MUDr. Gayaně Manukyan, Ph.D. a Mgr. Tereze Dýškové, Ph.D. za konzultace a neocenitelnou pomoc. Dále děkuji prof. MUDr. Jiřímu Gallovi, Ph.D. z Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc za poskytnutý biologický materiál a klinické charakteristiky. Také bych rád poděkoval doc. Mgr. Miloši Kudělkovi, Ph.D. z Fakulty elektrotechniky a informatiky Vysoké školy báňské – Technické univerzity Ostrava za vytvoření datových sítí a provedení statistických analýz. V neposlední řadě chci vyjádřit hluboké díky své rodině za trpělivost a neutuchající podporu, kterou mi prokazuje po celou dobu mého studia.

Tato práce vznikla za podpory grantu Agentury pro zdravotnický výzkum České republiky (AZV MZ ČR VES16-31852A) a Interní grantové agentury LF UP (LF UP\_2018\_016).

# Obsah

Prohlášení.....	i
Souhrn .....	ii
Summary .....	iii
Poděkování.....	iv
Obsah .....	v
Seznam symbolů a zkratk.....	vii
Seznam obrázků .....	viii
Seznam tabulek.....	xi
1 Úvod .....	1
2 Cíle práce.....	2
3 Literární přehled.....	3
3.1 Kloub a synoviální membrána.....	3
3.2 Synoviální tekutina a kloubní výpotek .....	6
3.3 Osteoartróza .....	7
3.4 Populace imunitních buněk v kloubních výpotcích.....	10
3.4.1 Vznik a diferenciacie imunitních buněk .....	10
3.4.2 Leukocyty vrozené imunity .....	12
3.4.3 Leukocyty antigenně-specifické imunity.....	14
3.5 Průtoková cytometrie .....	16
4 Materiál a metody.....	21
4.1 Biologický materiál.....	21
4.2 Použité chemikálie, roztoky a soupravy.....	22
4.2.1 Použité chemikálie .....	22
4.2.2 Použité soupravy .....	22
4.2.3 Použité roztoky.....	23
4.3 Seznam použitých přístrojů a vybavení.....	23
4.4 Schéma pracovního postupu.....	24
4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	25
4.5.1 Zpracování vzorků kloubních výpotků.....	25
4.5.2 Imunofenotypizace .....	27
4.5.3 Příprava cytospinů.....	29
4.5.4 Imunocytochemické barvení cytospinů .....	29
4.5.5 Světelná mikroskopie a skenování pomocí systému TissueFAXS.....	30
4.5.6 Statistické zpracování dat a použité programy .....	32

4.5.7 Konstrukce sítí pro vizualizaci dat .....	32
5 Výsledky .....	33
5.1 Fyzické vlastnosti vzorků .....	33
5.2 Výsledky měření průtokovou cytometrií.....	34
5.2.1 Identifikace a zastoupení hlavních populací imunitních buněk .....	34
5.2.2 Rozdíly v zastoupení hlavních imunitních populací mezi pohlavími .....	36
5.2.3 Analýza podobnosti a vizualizace dat pomocí konstrukce sítě .....	37
5.2.4 Detailní analýza buněk monocyto-makrofágové linie.....	40
5.3 Světelná mikroskopie a cytopspiny .....	43
6 Diskuze .....	44
7 Závěr.....	47
8 Použitá literatura.....	48

## Seznam symbolů a zkratek

- APC – allofykocyanin
- APC-Cy7 – allofykocyanin-cyanin 7
- BSA – bovinní sérový albumin
- CD – Cluster of Differentiation (CD klasifikace buněčných, zejména povrchových molekul)
- CLP – Common Lymphoid Progenitor, společný lymfoidní progenitor
- cMON – Classical Monocyte, klasický typ monocytu
- CMP – Common Myeloid Progenitor, společný myeloidní progenitor
- CSF – Colony Stimulating Factor, kolonie stimulující faktor
- FITC – isothiokyanát
- PE – fykoerythryn
- PE-Cy7 – fykoerythryn-cyanin 7
- PerCP-Cy5.5 – peridin-chlorofyl-protein-cyanin 5.5
- GMP – Granulocyte/Macrophage Progenitor, granulocyt-makrofágový progenitor
- IFN – interferon
- ICC barvení – imunocytochemické barvení
- IL – interleukin
- KI – konfidenční interval
- LPS – lipopolysacharid
- MEP – Megacaryocyte/Erythroid Progenitor, megakaryocyt-erytroidní progenitor
- MHC – Major Histocompatibility Complex, hlavní histokompatibilní komplex
- MON – monocyt, popř. monocytární
- MΦ – makrofág, popř. makrofágový
- N/A – Data Not Available, nedostupná data
- ncMON – Non-classical Monocyte, neklasický typ monocytu
- NK buňky – Natural Killer cells, přirození zabíječi
- NKT-lymfocyty – T-lymfocyty typu Natural Killer (přirození zabíječi)
- OA – osteoartróza, příp. osteoartritický
- PBS – Phosphate Buffer Saline, fosfátový pufr
- RBC – Red Blood Cell, erytrocyt
- SCF – Stem Cell Factor, faktor kmenových buněk
- TLR – toll-like receptor
- TNF- $\alpha$  – Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , tumor nekrotizující faktor  $\alpha$



## Seznam obrázků

- **Obrázek 1** – Stavba synoviálního kloubu. Převzato a upraveno z: [commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=30131665](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=30131665)
- **Obrázek 2** – Histologický řez a schéma synoviální membrány. Převzato a upraveno z: Mescher A. L. (2015): Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 14. edition. McGraw-Hill Education. New York, New York, USA.
- **Obrázek 3** – Průběh osteoartrózy. Převzato a upraveno z: [www.medicalmasters.org/wp-content/uploads/2016/10/osteoarthritis-stages.jpg](http://www.medicalmasters.org/wp-content/uploads/2016/10/osteoarthritis-stages.jpg)
- **Obrázek 4** – Nákres osteofytu. Převzato z: [www.totalorthosportsmed.com/wp-content/uploads/2017/06/Picture1.png](http://www.totalorthosportsmed.com/wp-content/uploads/2017/06/Picture1.png)
- **Obrázek 5** – Fáze hematopoézy. Převzato a upraveno z: Orkin S. H., Zon L. I. (2008): Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology Cell 132(4): 631–644.
- **Obrázek 6** – Graf excitačních a emisních spekter použitých fluoroforů. Vytvořeno pomocí webového nástroje Spectra Analyzer (Biolegend), dostupné online na: [www.biolegend.com/spectraanalyzer](http://www.biolegend.com/spectraanalyzer)
- **Obrázek 7** – Srovnání impulzu napětí na detektoru při detekci jednotlivé události a při překryvu dvou událostí. Dochází ke změně plochy při stejné amplitudě. Převzato a upraveno z: [expertcytometry.com/wp-content/uploads/2016/03/Figure\\_1.png](http://expertcytometry.com/wp-content/uploads/2016/03/Figure_1.png) a [https://expertcytometry.com/wp-content/uploads/2016/03/Figure\\_2.p](https://expertcytometry.com/wp-content/uploads/2016/03/Figure_2.p)
- **Obrázek 8** – Gate singletů na scattergramu FSC-A/FSC-H.
- **Obrázek 9** – Scattergramy izotypové kontroly a zkoumaného vzorku a positive gate na histogramu příslušného kanálu.
- **Obrázek 10** – Schéma pracovního postupu. Převzato a upraveno z: [www.pnhnetwork.ca/Content/assets/img/learn\\_more1.jpg](http://www.pnhnetwork.ca/Content/assets/img/learn_more1.jpg), [qcri.queensu.ca/assets/Imaging/picture-12.png](http://qcri.queensu.ca/assets/Imaging/picture-12.png), [images.cdn3.stockunlimited.net/clipart/medical-pipette\\_1337881.jpg](http://images.cdn3.stockunlimited.net/clipart/medical-pipette_1337881.jpg), [cdn1.iconfinder.com/data/icons/medical-lab/500/body-27-128.png](http://cdn1.iconfinder.com/data/icons/medical-lab/500/body-27-128.png), [www.leinco.com/immunohistochemistry-protocol](http://www.leinco.com/immunohistochemistry-protocol), [www.iconexperience.com/\\_img/v\\_collection\\_png/256x256/shadow/air\\_tube\\_carrier.png](http://www.iconexperience.com/_img/v_collection_png/256x256/shadow/air_tube_carrier.png), [www.accela.eu/files/fotos/27/big/tissuefaxs\\_48.jpg](http://www.accela.eu/files/fotos/27/big/tissuefaxs_48.jpg),

graphiccave.com/project/sand-clock-hourglass-vector-and-transparent-png,  
https://resources.rndsystems.com/images/site/  
/fmc005-protocol-step3.png,  
upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/6d/  
/Macrophage.svg/250px-Macrophage.svg.png,  
www.iconarchive.com/download/i65093/double-j-design/  
/ravenna-3d/Lock.ico

- **Obrázek 11** – Systém TissueFAXS PLUS. Převzato z [www.tissuegnostics.com/  
/systems/TF-PLUS-front-PxIM4.jpg](http://www.tissuegnostics.com/systems/TF-PLUS-front-PxIM4.jpg)
- **Obrázek 12** – Srovnání imunitních populací vzorku převládajícího fenotypu (A) a vzorku fenotypu N s predominujícími neutrofily (B) na scattergramu FSC-A/SSC-A.
- **Obrázek 13** – Graf zastoupení populací imunitních buněk ve studovaných vzorcích výpotků OA pacientů s převládajícím fenotypem.
- **Obrázek 14** – Graf zastoupení populací imunitních buněk ve studovaných vzorcích výpotků OA pacientů s fenotypem N (s převažující populací neutrofilů).
- **Obrázek 15** – Graf průměrných zastoupení hlavních imunitních populací u mužů a u žen. Středová čára představuje medián, krabicová část grafu pak 1. a 3. kvartil a vousy vymezují minimální a maximální hodnotu.
- **Obrázek 16** – Síť zkonstruovaná metodou LRNet, zobrazující podobnost profilů zkoumaných OA pacientů na základě zastoupení hlavních populací imunitních buněk. Na obrázku jsou patrné dvě podskupiny mužů (M1 a M2), dvě podskupiny žen (F1 a F2) a skupina pacientů s predominancí neutrofilů (N). Obrázek vytvořila výzkumná skupina doc. Mgr. Miloše Kudělky, Ph.D. z Fakulty elektrotechniky a informatiky Vysoké školy báňské – Technické univerzity Ostrava.
- **Obrázek 17** – Graf zastoupení hlavních populací imunitních buněk skupin definovaných metodou LRNet (mužské skupiny M1 a M2, ženské skupiny F1 a F2 a skupina s predominancí neutrofilů N1).
- **Obrázek 18** – Identifikace subpopulací monocyto-makrofágové linie (monocytů, makrofágů a myeloidních dendritických buněk) pomocí sekvence gates.
- **Obrázek 19** – Graf procentuálního zastoupení CD64+ buněk v populaci makrofágů, monocytů a myeloidních dendritických buněk (mDC).
- **Obrázek 20** – Graf procentuálního zastoupení TLR2+ buněk v populaci makrofágů, monocytů a myeloidních dendritických buněk (mDC).

- **Obrázek 21** – Graf procentuálního zastoupení TLR4+ buněk v populaci makrofágů, monocytů a myeloidních dendritických buněk (mDC).
- **Obrázek 22** – Snímek cytopsinu se znakem CD68 barveným pomocí systému DAB+ (hnědá barva) a jádry barvenými hematoxylinem (modrá barva).
- **Obrázek 23** – Snímek cytopsinu s fluorescenčním barvením znaku CD68 protilátkami s fluoroforem Alexa 488® (zelená barva) a jádry barvenými DAPI (modrá barva).

## Seznam tabulek

- **Tabulka 1** – Kellgrenova-Lawrencova radiografická klasifikace OA.
- **Tabulka 2** – Charakteristika souboru pacientů a zkoumaných vzorků.
- **Tabulka 3** – Panely protilátek pro extracelulární barvení.
- **Tabulka 4** – Panely protilátek pro intracelulární barvení.
- **Tabulka 5** – Kombinace CD znaků použité k detekci jednotlivých imunitních populací ve vzorcích výpotků OA pacientů.
- **Tabulka 6** – Komponenty systému TissueFAXS použitého v práci.
- **Tabulka 7** – Fyzické vlastnosti studovaných vzorků kloubních výpotků OA pacientů.

# 1 Úvod

Současný medicínský výzkum se mimo jiné stále více soustředí na diagnostiku predispozic a využití moderních metod k diagnostice nemocí ve stále rannějších stádiích. Nejinak je tomu v oblasti ortopedie. Jedním z vhodných cílů tohoto výzkumu je synoviální tekutina, či spíše její patologická forma, nazývaná kloubní výpotek. Při vzniku výpotku dochází k hromadění tekutiny a migraci imunitních buněk. Imunitní buňky migrují pomocí chemotaxe prostřednictvím chemokinů, vypouštěných buňkami v synoviální tekutině.

Poznatky o imunitním mikroprostředí v kloubních výpotcích dosud pocházely převážně z histopatologických analýz tkáňových řezů synoviální membrány a poukázaly na převahu T-lymfocytů, makrofágů a žírných buněk (Manferdini *et al.*, 2016). Existuje také několik studií kloubních výpotků, pracovaly však s buněčnými kulturami (Kurose *et al.*, 2010), nebo se věnovaly pouze vybraným populacím imunitních buněk (Dean *et al.*, 1993; Lande *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2017).

Tato práce poskytuje celkový a komplexní pohled na populace imunitních buněk v kloubních výpotcích se zvláštní pozorností věnovanou monocyto-makrofágové linii. Byl zkoumán soubor vzorků kloubních výpotků ortopedických pacientů s osteoartrózou, mezi nimiž byli muži i ženy různého věku. Byl posouzen vizuální stav vzorku a byla provedena imunofenotypizace vybraných panelů CD znaků barvením fluorescenčně značenými protilátkami a analýzou na průtokovém cytometru. Získaná data byla analyzována a byla hledána korelace mezi nimi a klinickými daty pacientů.

Z vybraných vzorků byly také připraveny cytopspiny. Cytospiny byly obarveny imunochemickým barvením s cílem vizualizovat makrofágy a byly skenovány automatizovaným skenovacím mikroskopem.

## **2 Cíle práce**

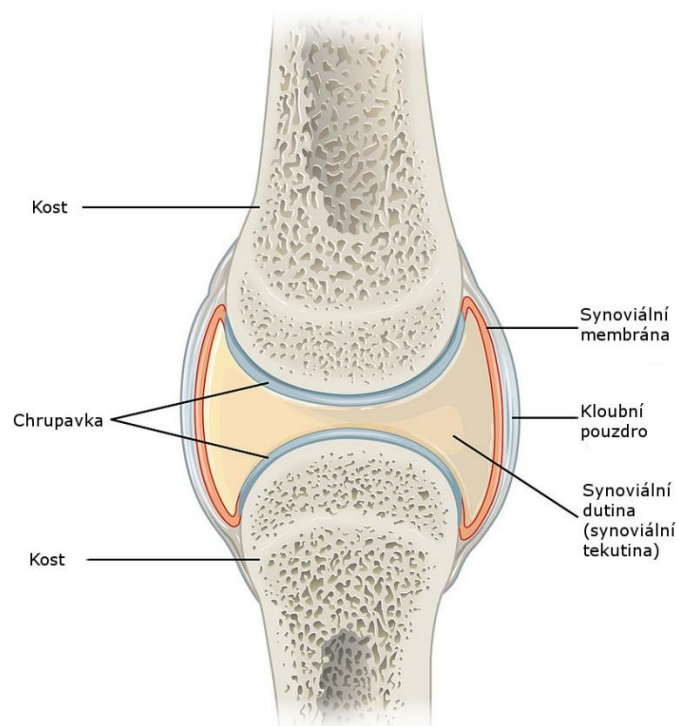
Cílem teoretické části práce byla literární rešerše zaměřená na současné poznatky o kloubních výpotcích a populacích imunitních buněk, které se v nich vyskytují, a dále literární rešerše osteoartrózy.

Cílem praktické části byla imunofenotypizace populací imunitních buněk ve vzorcích kloubních výpotků pacientů trpících osteoartrózou se zvláštní pozorností věnovanou buňkám monocyto-makrofágové linie s využitím metod průtokové cytometrie, statistické analýzy dat získaných pomocí průtokové cytometrie a mikroskopické analýzy cytospinů.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Kloub a synoviální membrána

Kloub (Obrázek 1) jako pohyblivé spojení kostí sestává ze dvou artikulujících kostí, na jejichž hlavicích v místě kontaktních ploch se nachází vrstva hyalinní chrupavky. Mezi hlavicemi kostí je malá mezera nazývaná synoviální dutina, která je vyplněna synoviální tekutinou. Synoviální dutina je po stranách obklopena synoviální membránou a celý kloub je uzavřen pevným vazivovým kloubním pouzdem. Hyalinní chrupavka na artikulujících kostech je bez cév a nervů, pórovitá, obsahuje velké množství kolagenu a její glykoproteinová struktura dokáže vázat velké množství tekutiny. Vrstva chrupavky na obou kostech je nerovnoměrně tlustá v závislosti na zatěžování jednotlivých částí kloubu. Při zátěži kloubu se chrupavka stlačuje a synoviální tekutina je z pórů chrupavky vytlačována do kloubní dutiny. Při odlehčení kloubu je pak tekutina osmoticky vtahována zpět do chrupavky. Tímto způsobem je udržována mezi chrupavkami mezera, takže nedochází ke tření. Proudění synoviální tekutiny také zajišťuje transport živin a zplodin, které je nezbytné pro výživu a zdraví chrupavek. Tlak tekutiny na synoviální membránu, vnitřní vrstvu kloubního pouzdra, pak brání volné migraci buněk skrz ni (Páč *et* Horáčková, 2009; Gallo *et al.*, 2011; OpenStax, 2018).

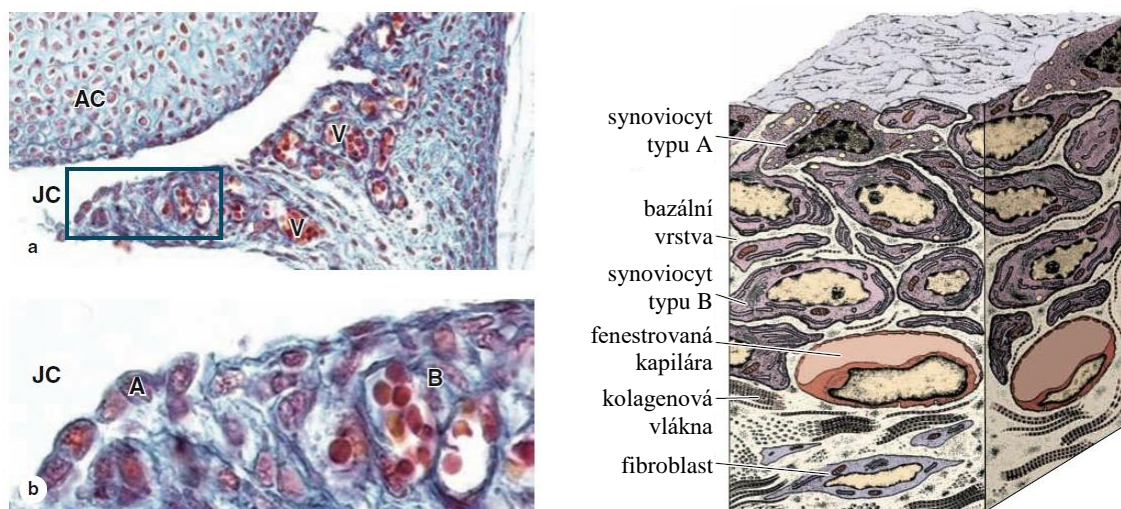


**Obrázek 1** – Stavba synoviálního kloubu.

Převzato a upraveno z: [commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=30131665](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=30131665)

V synoviální membráně (Obrázek 2) se vyskytují dva typy specializovaných buněk, tzv. synoviocytů: makrofágům podobné synoviocyty (typ A) a fibroblastům podobné synoviocyty (typ B). **Makrofágům podobné synoviocyty** pocházejí z monocyto-makrofágové buněčné linie. Nacházejí se na povrchu membrány v přímém kontaktu s tekutinou a vytvářejí vrstvu vzdáleně připomínající epitel – na rozdíl od epitelu však v tomto případě nenalezneme bazální laminu a buňky nemají mezibuněčné spoje (Mescher, 2015). Jejich hlavní funkcí je vychytávání, fagocytóza a degradace buněčných zbytků ze synoviální tekutiny. **Fibroblastům podobné synoviocyty** jsou odvozeny od mesenchymu a nacházejí se v hlubší vrstvě membrány. Jsou specializovány na syntézu komplexu proteinů synoviální tekutiny (hyaluronové kyseliny, mucinu a lubricinu) a mají k tomuto účelu rozlehlé endoplazmatické retikulum. Oba druhy buněk jsou v synoviální membráně upevněny kolagenovými vlákny a dalšími elementy pojivové tkáně. Synoviální membrána je protkána krevními cévami. Krevní cévy jsou fenestrované, tedy specializované na velkou vodní propustnost. Proteiny a hydrofobní látky fenestrovanými kapilárami prostupovat nemohou, jsou tedy odkázány na aktivní transport. Hluboká vrstva synoviální membrány je tvořena fibroblasty (Bartok *et* Firestein, 2010; Mescher, 2015).





**Obrázek 2** – Histologický řez a schéma synoviální membrány.

- (a) Synoviální membrána vystupuje do kloubní dutiny (JC) v podobě záhybů, kterými vedou krevní cévy (V). Na druhé straně kloubní dutiny se nachází chrupavka artikulující kosti (AC). (zvětšení 300 ×, barvení Mallory trichrome)
- (b) Detail synoviální membrány. Na povrchu membrány jsou makrofágům podobné synoviocyty (A), v hlubší vrstvě se nachází fibroblastům podobné synoviocyty (B). (zvětšení 400 ×, barvení Mallory trichrome)
- (c) Schematický náčrt synoviální membrány. Svrchní vrstva je tvořena makrofágům podobnými synoviocyty, pod nimi se nachází fibroblastům podobné synoviocyty. Vnitřní vrstvy membrány jsou prokány fenestrovanými krevními cévami. Hluboká vrstva je tvořena fibroblasty. Mezibuněčné prostory jsou vyplněny kolagenovými vlákny a dalšími elementy pojivové tkáně.

Převzato a upraveno z: Mescher A. L. (2015): Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 14. edition. McGraw-Hill Education. New York, New York, USA.

## 3.2 Synoviální tekutina a kloubní výpotek

Ve zdravém kloubu se nachází pouze malé množství synoviální tekutiny, jejíž většina je přítomna v pórech chrupavek. Při patologickém procesu objem prudce narůstá a patologická synoviální tekutina se pak označuje jako kloubní výpotek.

Synoviální tekutina je kapalina na bázi ultrafiltrátu krevní plazmy. Je tvořena komplexem glykoproteinů (mucinu, lubricinu a kyseliny hyaluronové), proteiny krevní plazmy (protilátky, hormony, aj.), glukózou, imunitními buňkami a dalšími složkami. Glykoproteiny jsou zásadní pro správnou funkci synoviální tekutiny: mucin zvyšuje její viskozitu, lubricin snižuje tření a kyselina hyaluronová se síťuje v trojrozměrnou síť, která pomáhá lépe distribuovat nárazy a zátěž vznikající při pohybu do celého objemu tekutiny (Schmidt *et al.*, 2007). Hladina glukózy souvisí se zánětem: při absenci zánětu je hladina glukózy stejná jako v krevním séru, při zánětu je výrazně nižší (Mundt *et Shanahan*, 2010).

Zdravý kloub obsahuje velice malé množství tekutiny, jejíž množství je v literatuře značně variabilní: Heilmann *et al.* (1996) uvádějí objem synoviální tekutiny u zdravého kloubu  $6,7 \pm 2,3$  ml ve srovnání s  $24,2 \pm 16,3$  ml u pacientů s aktivní artrózou; Kraus *et al.* (2007) uvádějí objem u zdravého kloubu 0,5–4,0 ml. Jelikož není možné odsát z kloubu všechnu synoviální tekutinu, aniž by nedošlo k narušení jeho funkce, v obou zmíněných pracích byla využita diluční metoda. Takto však není možné zkoumat populace imunitních buněk, jelikož tyto je třeba z tekutiny skutečně odebrat. To je jedním z hlavních důvodů, proč je imunitní prostředí kloubního výpotku dosud tak málo prostudované.

Při patologických procesech dochází k migraci imunitních buněk do tekutiny a její povaha se zásadně mění. Neinfekční zánětlivá patologie, například mechanické poranění, se projevuje zvýšeným objemem tekutiny beze změny barvy a konzistence. U infekčních zánětlivých procesů dochází k migraci velkého množství neutrofilů, takže výpotek je mléčně zakalený a glykoproteinový komplex bývá rozštěpen, a proto klesá viskozita výpotku. V případě narušení cév je výpotek krvavý.

Ve výpotku také mohou být přítomny krystaly, a to například krystaly kyseliny močové u pacientů trpících dnou (Kjeldsberg *et Knight*, 1986).

Poznatky o zastoupení imunitních buněk doposud pocházely převážně z histopatologických analýz tkáňových řezů synoviální membrány, odebraných během chirurgického zákroku, a poukázaly na převahu T-lymfocytů, makrofágů a žírných buněk

(Manferdini *et al.*, 2016). Existuje také několik studií kloubních výpotků, pracují však s buněčnými kulturami (Kurose *et al.*, 2010), nebo se věnují pouze vybraným populacím imunitních buněk. Li *et al.* (2017) se věnovali vlivu T-lymfocytů a jejich subpopulací v souvislosti s osteoartritidou; Dean *et al.* (1993) se věnovali žírným buňkám; Lande *et al.* (2004) se věnovali dendritickým buňkám.

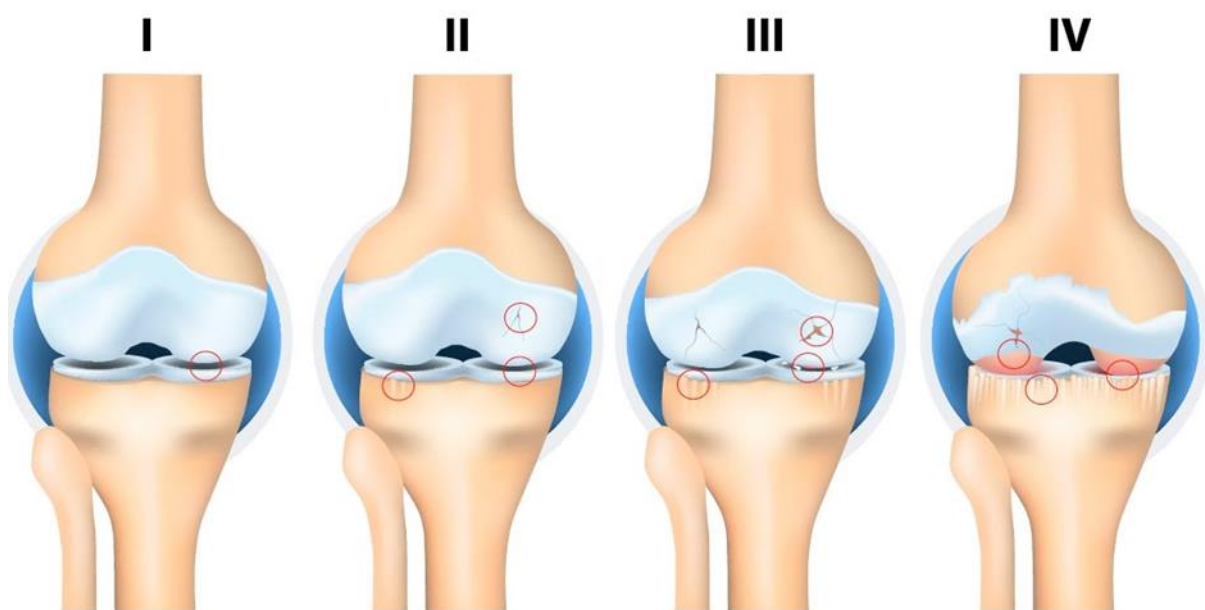
### 3.3 Osteoartróza

OA je vysoce heterogenní skupina degenerativních onemocnění kloubů s rozdílným klinickým fenotypem (Castañeda *et al.*, 2014). Společným znakem je chronický, zánětu podobný proces, který vede k degradaci kloubní chrupavky. OA je nejčastějším onemocněním kloubů v zemích vyspělého světa, v čele s OA kolena a kyčle (Grazio *et al.*, 2009). Je světově pátým nejčastějším důvodem invalidity (Horčíčka, 2004). Prevalence onemocnění roste s věkem: nemocí trpí až 80 % lidí ve věku nad 65 let (Fernandes *et al.*, 2013). Statistická data prevalence OA pro Českou republiku nejsou dostupná, ale vzhledem k obdobnému trendu ve všech vyspělých zemích s dostupnými daty lze předpokládat obdobná čísla i u nás. V největší míře postihuje OA klouby nesoucí váhu těla (kyčle, kolena), může však být postižen i ramenní kloub, bederní a krční obratle, mezičlávkové klouby prstů a další (Gallo *et al.*, 2011).

Podle příčiny rozlišujeme primární a sekundární OA. **Primární osteoartróza** je idiopatického charakteru (konkrétní příčina vzniku onemocnění není známá), jsou však známé faktory, které se na jejím vzniku významně podílejí. V první řadě jsou to genetické predispozice: nejlépe prostudovaná je souvislost s genem pro receptor vitamínu D (Keen *et al.*, 1997; Uitterlinden *et al.*, 1997), dále pak souvislost s geny AGC1 (Calcium-dependent mitochondrial aspartate and glutamate carrier), IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), ER- $\alpha$  (Estrogen receptor alpha), TGF- $\beta$  (Transforming growth factor beta), CRTM (Cartilage matrix protein), CRTL (Cartilage link protein) a s geny pro kolagen II, IX a XI (Spector *et al.*, 2004). Bui *et al.* (2012) popsali, že kromě genetických faktorů mají na vznik OA vliv také epigenetické faktory – demethylace v oblasti promotorů genů MMP-13 (Matrix metalloproteinase 13) a IL-1- $\beta$  (Interleukin 1  $\beta$ ). Dále se na vzniku OA podílejí pohlaví, věk, nadváha a obezita, sedavý způsob života a jednostranné zatížení těla (Musumeci *et al.*, 2015). **Sekundární osteoartróza** vzniká v důsledku mechanického úrazu kloubu nebo jako doprovodný projev jiného onemocnění (např. osteonekróza, kloubní neuropatie, zánět).

Klinickým projevem OA je bolest kloubů, a to zvláště po ránu. Při pohybu bolest neustupuje, ale narůstá. Později dochází ke ztuhlosti a snížení pohyblivosti (zvláště po ránu a po delší době bez pohybu), případně otoku a lokálnímu zvýšení teploty (Bonnet *et* Walsh, 2004).

Onemocnění se rozvíjí v průběhu až desítek let. Histologicky se projevuje narušením metabolismu chondrocytů, což vede k jejich postupné nekróze. V chrupavce tak vznikají díry a dochází ke změnám v její matrix. Dochází ke vzniku prasklin, které postupně prostupují chrupavkou až do kostní tkáně pod ní (Obrázek 3). Se zánikem částí chrupavky dochází k obušování kosti, takže se do synoviální tekutiny odlučují částice kostní tkáně. Při kontaktu kostí dochází ke vtlačování synoviální tekutiny do kostní tkáně, na což kost reaguje proliferací a vznikem kloubních výčnělků, tzv. osteofytů (Mačák, Mačáková *et* Dvořáčková, 2012; Obrázek 4). Bolestivost onemocnění je dána poškozením okolních tkání, neboť chrupavka sama inervovaná není. To také zapříčiňuje chybějící klinické projevy v raných fázích onemocnění.

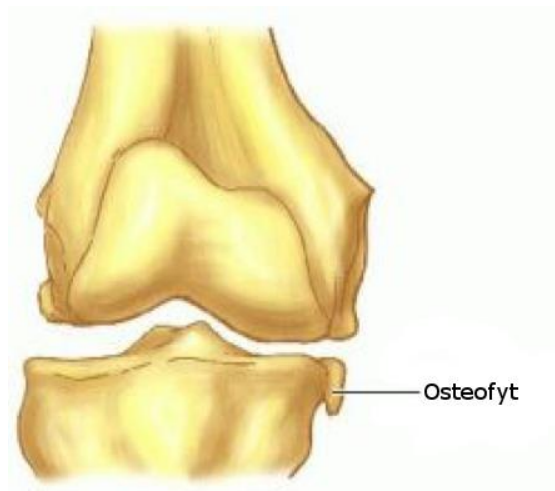


**Obrázek 3** – Průběh osteoartrózy.

I. Neprůkazná OA (minimální poškození), II. Mírná OA (zmenšení kloubní dutiny, rozpad chrupavky, vznik drobných osteofytů), III. Pokročilá OA (zásadní zmenšení kloubní dutiny, v chrupavce vznikají praskliny a šíří se až ke kosti), IV. Vážná OA (chrupavka je ve velkých plochách zcela odbouraná, kosti doléhají přímo na sebe, formace velkých osteofytů, později kostní deformita).

Převzato a upraveno z:

[www.medicalmasters.org/wp-content/uploads/2016/10/osteoarthritis-stages.jpg](http://www.medicalmasters.org/wp-content/uploads/2016/10/osteoarthritis-stages.jpg)



**Obrázek 4** – Nákres osteofytu.

Převzato z: [www.totalorthosportsmed.com/wp-content/uploads/2017/06/Picture1.png](http://www.totalorthosportsmed.com/wp-content/uploads/2017/06/Picture1.png)

K hodnocení stupně rozvoje OA byla navržena Kellgrenova-Lawrencova radiografická klasifikace OA (Kellgren *et* Lawrence, 1957). Stupeň rozvoje OA určuje ortopedický chirurg podle radiogramu postiženého kloubu zhodnocením míry poškození v jednotlivých částech kloubu na základě charakteristických příznaků (zúžení kloubní dutiny, přítomnost osteofytů, skleróza a deformita kostí). Přehled stupňů Kellgrenovy-Lawrencovy radiografické klasifikace OA a jejich charakteristiku uvádí Tabulka 1.

**Tabulka 1** – Kellgrenova-Lawrencova radiografická klasifikace OA.

KL stupnice	Zúžení			
	kloubní dutiny	Osteofyty	Skleróza	Deformita kostí
stupeň 0	×	×	×	×
stupeň 1	možné	×	×	×
stupeň 2	prokazatelné	prokazatelné	×	×
stupeň 3	prokazatelné	mnohočetné	prokazatelná	možná
stupeň 4	závažné	mohutné	závažná	prokazatelná

Vzhledem k velké heterogenitě klinických fenotypů OA různí pacienti odpovídají na léčbu různou měrou. Vzhledem k zásadní roli imunitního systému v rozvoji, průběhu i chronickém charakteru nemoci se studium imunitních buněk v kloubu jeví jako vhodný způsob rozlišení fenotypů tohoto onemocnění. Toto rozlišení fenotypů je klíčovým krokem ve studiu OA a v cestě k navržení vhodné léčebné strategie pro jednotlivé fenotypy.

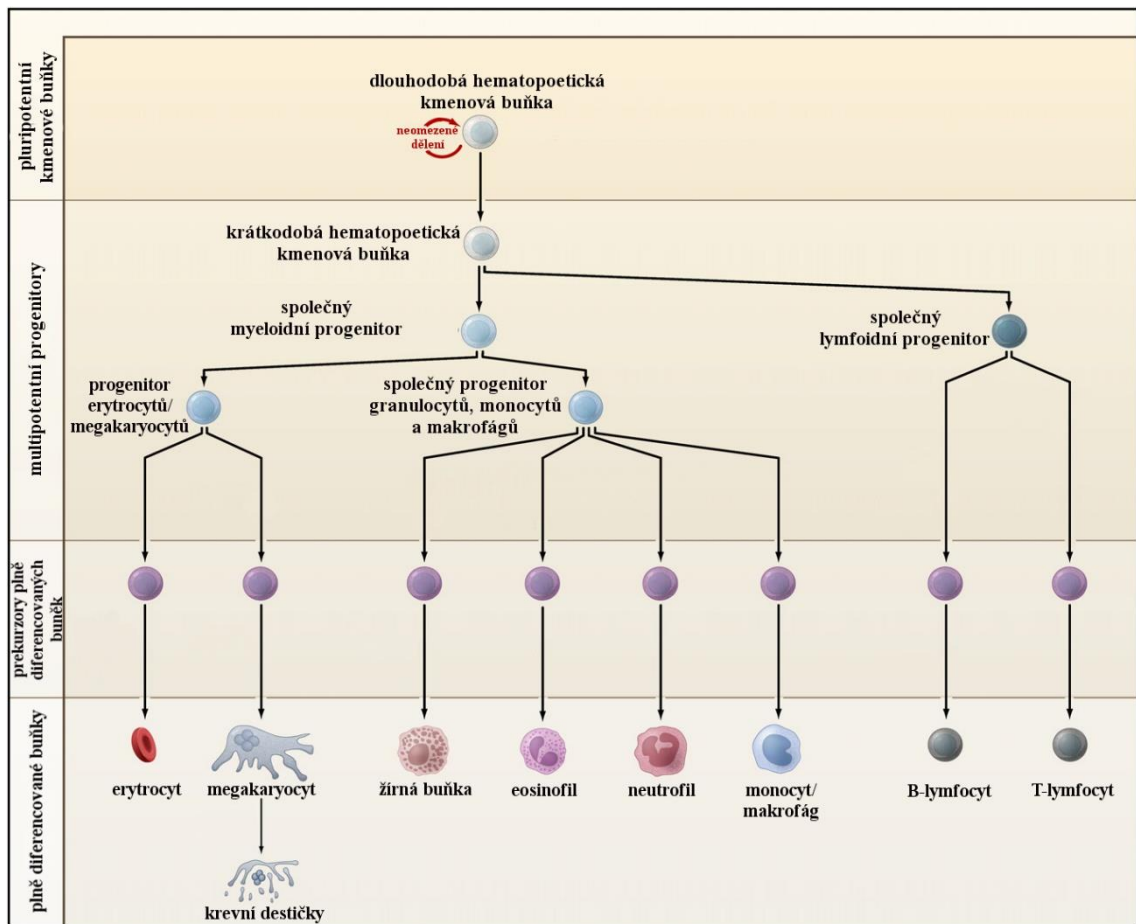
I přes nové poznatky o OA z posledních dvou desetiletí stále není jasná role imunitních buněk v průběhu onemocnění. Tato práce se zaměřila na identifikaci populací imunitních buněk v synoviální tekutině OA kloubů s cílem zmapovat jejich zastoupení.

### **3.4 Populace imunitních buněk v kloubních výpotcích**

#### **3.4.1 Vznik a diferenciaci imunitních buněk**

Imunitní buňky vznikají v těle hematopoézou, diferenciací z pluripotentních hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni (Obrázek 5). Růst a diferenciaci buněk v průběhu hematopoézy jsou řízeny kolonie stimulujícími faktory (CSF, Colony Stimulating Factor), erythropoetinem, trombopoetinem, růstovými faktory a cytokiny, regulací genové exprese a dalšími mechanismy (Mescher, 2015). Dlouhodobé hematopoetické kmenové buňky se nacházejí v klidovém stavu, kdy mají schopnost neomezeného dělení, čímž je udržována jejich populace. Při hematopoéze dochází k jejich aktivaci a diferenciaci v krátkodobé hematopoetické kmenové buňky, které se diferencují do dvou typů progenitorových buněk, které představují dvě základní hematopoetické linie: společný myeloidní progenitor (CMP, Common Myeloid Progenitor) a společný lymfoidní progenitor (CLP, Common Lymphoid Progenitor). Společné progenitorové buňky se označují jako multipotentní, neboť se mohou diferencovat do více typů buněk, ne však v buňky druhé linie (CMP se nedokáže diferencovat v buňky lymfoidní linie a CLP v buňky myeloidní linie). CMP se dále diferencuje ve společný progenitor megakaryocytů a erytrocytů (MEP, Megakaryocyte/Erythrocyte Progenitor) nebo společný progenitor granulocytů a monocytů/makrofágů (MGP, Monocyte-Macrophage/Granulocyte Progenitor; Orkin et Zon, 2008).

MEP, MGP a CLP se dále diferencují v prekurzory konečných buněk: z MEP se diferencují prekurzory megakaryocytů a erytrocytů, z MGP se diferencují prekurzory monocytů, neutrofilů, eozinofilů a žírných buněk a z CLP se diferencují prekurzory T-lymfocytů, B-lymfocytů a NK buněk (Orkin et Zon, 2008).



**Obrázek 5** – Fáze hematopoézy.

Převzato a upraveno z: Orkin *et* Zon (2008): Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. Cell 132(4): 631–644.

### 3.4.2 Leukocyty vrozené imunity

Jedním z hlavních mechanismů organismu sloužících k odstraňování patogenů a buněčných zbytků je fagocytóza. Fagocytujících typů buněk je v těle více a jsou označovány jako „profesionální“ a „neprofesionální“ fagocyty. Profesionální fagocyty se oproti neprofesionálním vyznačují tím, že fagocytóza je jejich primární funkcí a vznikají hematopoézou. Aktivně se pohybují krevním řečištěm a rychle se přesouvají za chemotaktickými signály do místa zánětu. Při fagocytóze uvolňují cytotoxické radikály kyslíku a dusíku, degradační enzymy, lipidové mediátory zánětu a cytokiny (Rabinovitch, 1995). Mezi neprofesionální fagocyty lze zařadit velké množství buněk, například fibroblasty a makrofágům podobné synoviocyty (typ A) (Gordon, 2016). Tyto buňky nejsou tolik fagocytárně aktivní, jako profesionální fagocyty, ale v omezené míře jsou schopné fagocytovat například mikroorganismy. Tato fagocytóza je zprostředkována fibronektinovými a lamininovými receptory, vzhledem k absenci Fc-receptorů však neprofesionální fagocyty nejsou schopné protilátkami iniciované fagocytózy (Rabinovitch, 1995).

Mezi **profesionální fagocyty** patří monocyty a jejich tkáňová forma makrofágy, neutrofile, eozinofily, dendritické buňky a žírné buňky.

**Monocyty** (MON) pocházejí z myeloidní progenitorové linie z prekursoru zvaného monoblast. Cytoplazma monocytů neobsahuje granula (jsou to agranulocyty) a jádro je charakteristicky laločnaté nebo ve tvaru písmene C. Chromatin je méně kondenzovaný než u lymfocytů, takže se při barvení jádro jeví světlejší (Mescher, 2015). Monocyty představují 10 % lidských leukocytů v krvi (Auffray *et al.*, 2009). Hlavní funkcí monocytů je rezervoár prekursorů pro doplňování populace makrofágů a během zánětu také dendritických buněk. Mimo to mají i další funkce: díky receptorům rozpoznávajícím patogenní vzory (TLRs, scavenger receptory, IgFc receptory) jsou schopny fagocytózy a hlídkují ve tkáni endotelu (Auffray *et al.*, 2007), rozeznávají mikrobiální patogeny a sekretují prozánětlivé cytokiny (Serbina *et al.*, 2008), exprimují MHC II a dokážou aktivovat cytotoxické (CD8<sup>+</sup>) a pomocné (CD4<sup>+</sup>) T-lymfocyty (Jakubzick *et al.*, 2017) a další. Monocyty v krvi tvoří dvě hlavní populace označované jako klasické (*classical*, cMON) a neklasické (*non-classical*, ncMON), které mají prozánětlivé (cMON) a protizánětlivé (ncMON) funkce (Yang *et al.*, 2014). Monocyty se mohou usadit ve tkáni, kde diferencují v tkáňově-specifickou formu, makrofágy. Mezi markery monocytů patří znaky CD11b, CD14, CD45 a CD68 (BioLegend, 2018).



**Makrofágy** ve tkáních odklízejí odumřelé zbytky buněk a MHC II exprimují jen v malé míře. Prostřednictvím interferonu gama (IFN- $\gamma$ ), produkovaným jak buňkami vrozené imunity (NK buňkami a NK T-lymfocyty), tak buňkami antigeně specifické imunity (cytotoxické a pomocné T-lymfocyty) a také lymfoidními buňkami vrozené imunity, dochází k jejich aktivaci (Artis *et Spits*, 2015). Po aktivaci prudce vzrůstá exprese MHC II a makrofág se soustředí na likvidaci patogenů. Jakmile makrofág rozpozná molekulární vzor charakteristický pro patogeny (PAMP, Pathogen Associated Molecular Pattern), dojde k jeho hyperaktivaci a výrazně naroste míra fagocytózy, metabolismu, tvorba cytokinů, lysozymů a produkce enzymů degradujících extracelulární matrix bakterií. Existují dvě hlavní skupiny makrofágů: M1 makrofágy, aktivované lipopolysacharidy a INF- $\gamma$ , specializované na záněty a intenzivní boj s infekcemi v tkáních, a M2 makrofágy, aktivované interleukinem 4 (IL-4), specializované na opravování poškozené tkáně a produkci protizánětlivého IL-10. Mezi znaky důležité pro identifikaci makrofágů patří znaky CD14, CD45, CD68, CD163 a HLA-DR (Khazen *et al.*, 2005).

**Dendritické buňky (DC)** jsou charakteristické svým paprskovitým tvarem a nachází se převážně ve tkáních, kde přichází organismus do styku s vnějším prostředím: v kůži, v epitelu střev a dýchacích cest a ve sliznicích. Specializují se na zpracování antigenů a jejich prezentaci pomocí MHC II T-lymfocytům. Ve tkáni se běžně nacházejí v neaktivovaném stavu. Neaktivní DC vystavují endogenní antigeny pomocí MHC I a hrají tak významnou roli v regulaci imunitní tolerance a autoimunity. Jakmile však pohltní patogenní antigen, dojde k jejich aktivaci. Aktivovaná DC začne exprimovat CCR7, chemotaktický receptor, který jí umožní cestovat do lymfatických uzlin. Zde dále stoupá exprese aktivačních cytokinů pro T-lymfocyty a MHC II (HLA-DR) a buňka začne patogenní antigen vystavovat na svém povrchu pro pomocné T-lymfocyty (CD4<sup>+</sup>; Mbongue *et al.*, 2014). Původ DC dosud není plně prozkoumán, byly však rozlišeny plazmatické DC, pocházející z lymfoidní buněčné linie, myeloidní DC, pocházející z myeloidní buněčné linie, a DC diferencované z CD14<sup>+</sup> monocytů (Collin *et al.*, 2013). Klíčové buněčné markery dendritických buněk jsou CD11b, CD11c, CD83 a HLA-DR (Collin, McGovern *et Haniffa*, 2013).

**Neutrofilly (NEU)** jsou nejběžnějšími fagocyty v krvi, představující 55–70 % všech cirkulujících leukocytů. Produkce v kostní dřeni dosahuje 10<sup>11</sup> neutrofilů za den, ale jejich životnost je pouze přibližně 5 dnů (Simon *et Kim*, 2010). Neutrofilly zajišťují nejrychlejší odpověď imunitního systému na infekci a likvidují široké spektrum patogenů

od bakterií, virů a parazitů po infikované a nádorové buňky. Zralé neutrofilny jsou charakteristické polymorfním laločnatým jádrem a granulemi v cytoplazmě. Na svém povrchu exprimují znaky CD11b, CD15, CD16, CD45 a další (Lakschevitz *et al.*, 2016).

**Eozinofily** jsou charakteristickým jádrem tvořeným dvěma laloky a obsahují v cytoplazmě granule obsahující faktory pro likvidaci cizopasných červů a faktory modulující zánět (Mescher, 2015). Eozinofily exprimují například buněčné znaky CD15, CD45, CD193 a Siglec-8 (BioLegend, 2018).

**Bazofily** jsou nejvzácnějším druhem cirkulujících leukocytů. Mají nepravidelné laločnaté jádro a granula v jejich cytoplazmě jsou silně bazické. Charakteristickými povrchovými znaky bazofilů jsou CD63, CD123 a CD203c (BioLegend, 2018).

**Žírné buňky** ve své cytoplazmě obsahují granula histaminu a heparinu. Jejich hlavní role spočívá v regulaci alergické reakce spojené s protilátkami IgE. Mimo to se však také podílejí na vrozené imunitě proti bakteriím (Echtenacher *et al.*, 1996), zvláště produkcí cytokinů rekrutujících neutrofilny do místa infekce, a dále fagocytózou a produkcí biologicky aktivních látek jako například tryptáza a chymáza – proteázy, sloužící k boji s patogeny (Yong, 1997). Povrchové buněčné znaky, sloužící k identifikaci žírných buněk, jsou například CD117 a CD203c (BioLegend, 2018).

**Neprofesionální fagocyty** také pohlcují částice, mrtvé buňky a patogeny, ale není to jejich primární funkce. Patří sem buňky epitelu, endotelu a mesenchymu, fibroblasty nebo například synoviocyty makrofágového typu.

### 3.4.3 Leukocyty antigenně-specifické imunity

Leukocyty antigenně-specifické imunity se odlišují od leukocytů vrozené imunity především tím, že jejich konečné formě předchází maturace. Při ní dochází k seznámení s antigeny, což je nezbytné pro vybudování imunitní paměti organismu.

**T-lymfocyty** putují v podobě prekurzorů z kostní dřeně do thymu, kde jsou jim prezentovány endogenní HLA antigeny a na základě jejich reakce jsou selektovány pouze vhodné T-lymfocyty, kterým je dovoleno dozrát. V této fázi je zničeno asi 95 % T-lymfocytů, zbylých 5 % vstupuje do krevního řečiště a migrují do sekundárních lymfatických orgánů. Při kontaktu se specifickým antigenem prezentovaným pomocí MHC II (resp. MHC I), který byl rozpoznán pomocí T-buněčného receptoru a jeho koreceptoru CD4 (resp. CD8) dochází k jejich aktivaci.

Aktivní T-lymfocyty se pak podílejí na rozvoji a průběhu imunitních a zánětlivých reakcí. Rozlišujeme čtyři základní subpopulace T-lymfocytů: pomocné lymfocyty (CD4<sup>+</sup>), které se specializují na produkci cytokinů; cytotoxické lymfocyty (CD8<sup>+</sup>), specializující se na likvidaci nádorových a virem napadených buněk; regulační lymfocyty (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>), které regulují průběh zánětu a iniciují a regulují opravu tkání; a **NK buňky** (CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>), které, přestože pocházejí z lymfocytární linie, se řadí mezi imunitní buňky vrozené imunity pro svou schopnost likvidovat patogeny bez předchozího setkání s nimi (Holub *et al.*, 2007). Charakteristickými markery T-lymfocytů či jejich subpopulací jsou CD3, CD4, CD8, CD45 a další (BioLegend, 2018).

**B-lymfocyty** dozrávají v kostní dřeni a migrují do sekundárních lymfatických orgánů. Zde se seznamují s antigenem a vytváří receptor, jehož součástí jsou imunoglobuliny IgM a IgD specifické pro daný antigen. Poté je B-lymfocyt uvolněn do krve. Při následném setkání s antigenem se mění B-lymfocyt v plazmatickou buňku, která vytváří protilátky. Některé B-lymfocyty se diferencují v tzv. paměťové B-lymfocyty, které vykazují výrazně rychlejší reakci na opakovanou přítomnost antigenu a jsou klíčové v otázce imunitní paměti (Kersey *et Gajl-Peczalska*, 1975). Charakteristickými buněčnými markery B-lymfocytů nebo jejich subpopulací jsou znaky CD19, CD20, CD24, CD38, CD45 a další (BioLegend, 2018).

### 3.5 Průtoková cytometrie

Moderní metodou identifikace buněk pomocí detekce jejich CD znaků je průtoková cytometrie. Principem této metody je měření a současná analýza souboru charakteristik jednotlivých částic, zpravidla buněk, unášených proudem kapaliny skrz paprsek laseru. Měřenými vlastnostmi jsou relativní velikost, relativní granularita (vnitřní komplexita) a relativní intenzita fluorescence. Relativní velikost a relativní granularita jsou určeny podle míry rozptylu světla, dopadajícího na částice. Fluorescence je vyvolána excitací fluoroforů, které jsou na částice navázány během přípravy vzorku prostřednictvím protilátek specifických proti zkoumanému znaku. Je možné použít více protilátek, které jsou svázané s různými fluorofory, současně. Současně použité fluorofory musí být voleny tak, aby docházelo k co možná nejmenšímu překryvu jejich emisních spekter (Nolla, 2013). Často používanými fluorofory jsou FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC a APC-Cy7.

**FITC** fluorescein isothiokyanát: jeho excitační/emisní spektrum dosahuje vrcholu při vlnových délkách 495 nm/519 nm, tedy spadá do zelené části spektra. K jeho excitaci se používá laser o vlnové délce 488 nm.

**PE** fykoerythryn: jeho excitační/emisní spektrum dosahuje vrcholu při vlnových délkách 565 nm/575 nm, tedy spadá do červené části spektra. K jeho excitaci se používá laser o vlnové délce 488 nm.

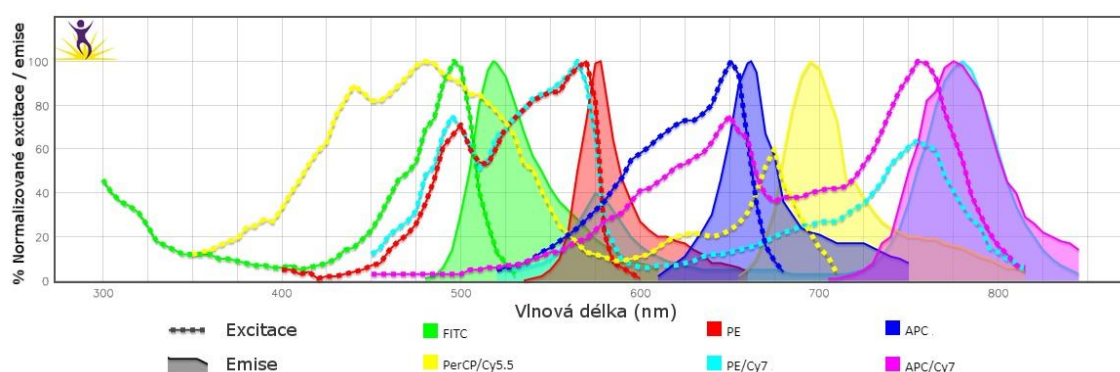
**PerCP-Cy5.5** peridin-chlorofyl-protein-cyanin 5.5: tandemový fluorofor tvořený peridin-chlorofyl-proteinem a derivátem cyaninu Cy5.5. Excitační a emisní spektra PerCP dosahují vrcholu při vlnových délkách 482 nm/675 nm, při spojení s Cy5.5 však dochází k Försterovu rezonančnímu přenosu energie (FRET), kdy je energie z excitovaného PerCP přenesena na Cy5.5 a fluorescenci emituje pouze Cy5.5. Vrchol emisního spektra celého komplexu se pak posouvá na 690 nm. K jeho excitaci se používá laser o vlnové délce 488 nm.

**PE-Cy7** fykoerythryn-cyanin 7: tvořen komplexem fykoerythrinu a derivátu cyaninu Cy7. V důsledku FRET dochází k posunu vrcholu emisního spektra PE a celý komplex tak má vrchol excitačních/emisních spekter při vlnových délkách 565 nm/774 nm. K jeho excitaci se používá laser o vlnové délce 488 nm.

**APC** allofykocyanin: jeho excitační/emisní spektra mají vrcholy při vlnových délkách 650 nm/660 nm. K jeho excitaci se používá laser o vlnové délce 633 nm (odpovídá laseru o vlnové délce 640 nm v použitém přístroji NovoCyte®).

**APC-Cy7** allofykocyanin-cyanin 7: Komplex dříve zmíněného allofykocyaninu a cyaninu Cy7. V důsledku FRET se vrchol emisního spektra komplexu přesouvá na 774 nm. Celý komplex pak má vrcholy excitačního/emisního spektra při vlnových délkách 650 nm/774 nm. K jeho excitaci se používá laser o vlnové délce 633 nm (odpovídá laseru o vlnové délce 640 nm v přístroji NovoCyte®).

Obrázek 6 zachycuje emisní a excitační spektra popsanych fluoroforů na grafu intenzity normalizované excitace/emise.



**Obrázek 6** – Graf excitačních a emisních spekter použitých fluoroforů. Tečkované linie představují excitační spektra jednotlivých fluoroforů odlišených barvou, plné linie s plochou pod křivkou představují jejich emisní spektra.

Vytvořeno pomocí webového nástroje Spectra Analyzer (Biolegend), dostupné online na: <https://www.biolegend.com/spectraanalyzer>.

Samotný průtokový cytometr sestává ze tří částí: fluidiky, optiky a elektroniky.

**Fluidika** zajišťuje transport částic do detekčního místa a jejich oddělení pomocí hydrodynamické fokusace.

**Optika** zajišťuje generování paprsků excitačních laserů, vede excitační světlo do detekčního místa a vede rozptýlené excitační světlo a emitované světlo do detektorů skrz sadu dichroických zrcadel, která záření rozdělí v závislosti na jeho vlnové délce.

**Elektronika** sestává z detektorů zajišťujících převod světelného záření na elektrické napětí a počítače, který získaná data zapisuje a analyzuje.

Při průchodu detekčním místem je částice ozářena paprskem excitačního světla a odchází ke dvěma jevům: v první řadě se excitační světlo na částici rozptýlí a dále excituje fluorofory navázané na částici, které pak emitují emisní světlo. Rozptýlené

excitační světlo i produkované emisní světlo jsou zachyceny optikou přístroje a dovedeny do detektorů. Průchod částice detekčním místem se na detektoru projeví jako pulz napětí.

Detekované částice jsou pak počítačem zaznamenávány jako tzv. události. Každá událost má přiřazeno několik hodnot, které ji popisují: čas detekce, **FSC** (forward scatter; světlo, rozptýlené v malém úhlu od původní dráhy paprsku, jehož intenzita je přímo úměrná velikosti částice), **SSC** (side scatter; světlo, rozptýlené ve velkém úhlu od původní dráhy paprsku, jehož intenzita je přímo úměrná vnitřní složitosti částice) a **relativní intenzita fluorescence** v jednotlivých detekčních kanálech. Události jsou detekovány jako pulz napětí na fotonásobiči a jednotlivé sledované hodnoty lze proto popsat několika veličinami: výškou píku, šířkou píku a velikostí plochy pod křivkou (Nolla, 2013).

Jak je patrné na Obrázku 6, emisní spektra používaných fluoroforů se překrývají. Z tohoto důvodu je pro správné měření při vícebarevných experimentech nutné provést tzv. **kompensaci**. Během ní jsou naměřena referenční data pomocí jednobarevně značených kontrolních vzorků (kuliček s navázanými fluorofory) přesně definovaných vlastností a software přístroje poté určí míru překryvu v jednotlivých kanálech a při měření vzorků pak naměřené hodnoty přepočítává tak, aby byl vliv překryvu eliminován.

Data jsou vizualizována zpravidla ve dvou podobách: **histogram** a **scattergram**. Histogram slouží k vizualizaci jednoho parametru: počet událostí s jednotlivými hodnotami relativní intenzity fluorescence v určitém kanále. Scattergram slouží k zobrazení dvou parametrů v kartézské soustavě souřadnic: zobrazuje hodnoty relativní intenzity fluorescence dvou kanálů současně.

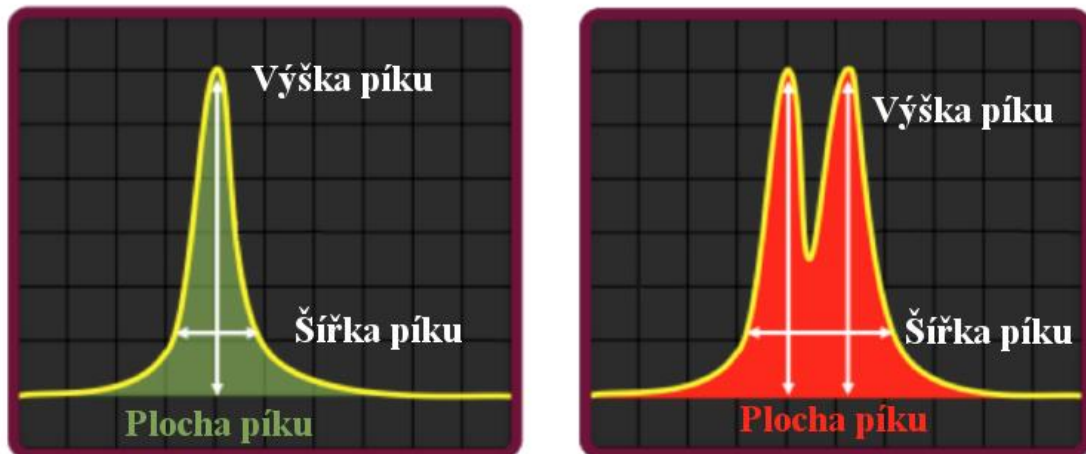
Data jsou při měření zobrazována v reálném čase, což umožňuje již při měření využít tzv. **gating**. **Gate**<sup>1</sup> je definovaná oblast grafu, která vymezuje skupinu dat (událostí), která je pak izolována jako **populace**. Takto je možné vytvářet hierarchii a díky vhodně zvolené sekvenci definovaných oblastí lze izolovat konkrétní subpopulaci buněk podle zvolených parametrů.

Z význačných užití gatingu, které se využívají již při měření, stojí za zmínku především **singletový gate**, který slouží k odfiltrování splených buněk a skupin buněk a splývajících událostí. Splené buňky a překrývající se události mají stejnou výšku impulzu (FSC-H), ale větší plochu (FSC-A), jelikož průchod detekčním místem trvá delší

---

<sup>1</sup> Český jazyk dosud nedisponuje obdobou angl. *gate*, jak je užíváno v kontextu průtokové cytometrie. V žargonu průtokové cytometrie je slovo [*gejt*] užíváno a skloňováno podle českého vzoru *hrad*. Vzhledem k povaze tohoto výrazu není v této práci slovo *gate* skloňováno.

dobu (Obrázek 7). Na rozdíl od izolovaných událostí jsou pak tyto překryté události na scattergramu FSC-A/FSC-H posunuty doprava. Gate se proto umísťuje na levou horní hranu populace (Obrázek 8).

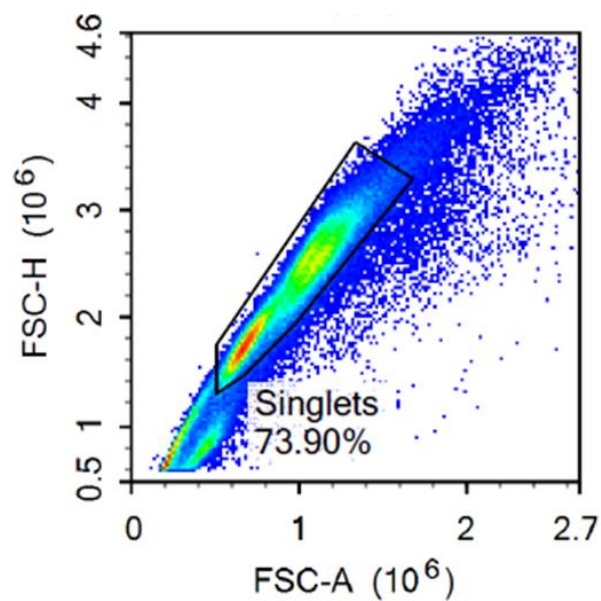


**Obrázek 7** – Srovnání impulzu napětí na detektoru při detekci jednotlivé události a při překryvu dvou událostí. Dochází ke změně plochy při stejné amplitudě.

Převzato a upraveno z:

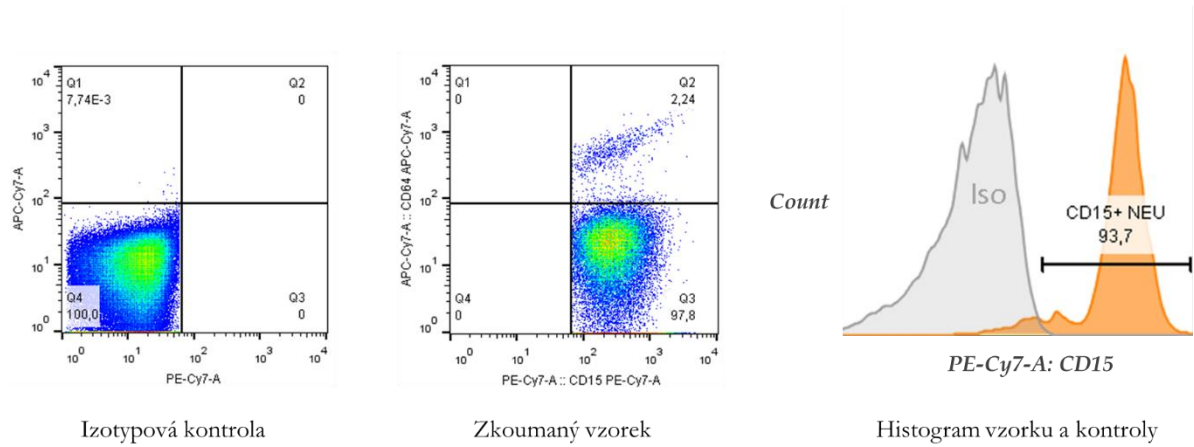
[expertcytometry.com/wp-content/uploads/2016/03/Figure\\_1.png](http://expertcytometry.com/wp-content/uploads/2016/03/Figure_1.png) a

[expertcytometry.com/wp-content/uploads/2016/03/Figure\\_2.png](http://expertcytometry.com/wp-content/uploads/2016/03/Figure_2.png)



**Obrázek 8** – Gate singletů na scattergramu FSC-A/FSC-H.

Dalším důležitým užitím gatingu je **gate positivity**, který se umísťuje do histogramů jednotlivých fluorescenčních kanálů na základě polohy událostí v izotypové kontrole (Obrázek 9). Gate positivity slouží k odfiltrování pozadí a autofluorescence vzorku.



**Obrázek 9** – Scattergramy izotypové kontroly a zkoumaného vzorku a gate positivity na histogramu příslušného kanálu umístěný na základě polohy izotypové kontroly.



## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

V práci byly zkoumány vzorky kloubních výpotků odebraných 53 pacientům trpících OA kolena. Pacienti byli vybráni na základě následujících kritérií: věk 40–85 let; diagnóza OA kolena na základě klinických a radiografických kritérií (Altman *et al.*, 1986) bez známek infekce, dny a endokrinních poruch v době odběru vzorku; zvýšený objem kloubního výpotku; bez podání kyseliny hyaluronové nebo steroidů injekční formou; bez chirurgického zákroku kolena v posledních třech měsících předcházejících odběru vzorku.

Ortopedický chirurg zhodnotil poškození kosti jednotlivých pacientů na základě radiogramů dle Kellgrenovy-Lawrencovy radiografické klasifikace OA (Tabulka 1). Bolestivost kloubu v době odběru byla určena dle vlastního zhodnocení pacienty na jedenáctistupňové stupnici (0–10): bez bolesti (0), mírná bolest (1–2), střední bolest (3–4), silná bolest (5–6), velmi silná bolest (7+).

Vzorky byly odebrány po získání informovaného souhlasu pacientů, který byl schválen etickou komisí Fakultní nemocnice a Univerzity Palackého v Olomouci (rozhodnutí č. VES16-31852A).

Přehled počtu pacientů dle jednotlivých charakteristik je uveden v Tabulce 2.

**Tabulka 2** – Charakteristika souboru pacientů a zkoumaných vzorků.

<b>Demografická charakteristika souboru pacientů</b>	
<b>Průměrný věk</b> (rozpětí)	64,5 (46–83)
<b>Průměrný BMI</b> (rozsah)	30,4 (21,6–47,8)
	<b>Počet pacientů</b>
<b>Celkový počet pacientů</b> (muži / ženy)	53 24 / 29
<b>Poškození dle stupnice KL</b> (stupeň 1 / 2 / 3 / 4)	4 / 17 / 27 / 5
<b>Bolestivost kloubu</b> (bez bolesti / mírná bolest / střední bolest / / silná bolest / velmi silná bolest)	5 / 15 / 28 / 5 / 0

## 4.2 Použité chemikálie, roztoky a soupravy

### 4.2.1 Použité chemikálie

- bovinní sérový albumin (BSA; SIGMA, kat. č. A2153-10G)
- metanol, p.a., chlazený na 4 °C (mikroCHEM)
- purifikovaná monoklonální myší protilátka proti lidskému znaku C68, klon Y1/82A (BioLegend, kat. č. 333801)
- monoklonální myší protilátky proti lidským znakům konjugované s fluorochromy (BioLegend): CD4-FITC (klon SK3), CD14-FITC (klon M5E2), CD3-FITC (klon OKT3), CD16-PE (klon 3G8), CD25-PE (klon M-A251), CD86-PE (klon IT2.2), CD55-PE (klon JS11), mix protilátek CD16/56-PE (klony UCHT1/3G8+MEM-188), CD45-PerCP-Cy5.5 (klon 2D1), CD11b-PerCP-Cy5.5 (klon ICRF44), CD127-PerCP-Cy5.5 (klon A019D5), CD303-PerCP-Cy5.5 (klon 201A), CD8-PE/Cy7 (klon SK1), CD15-PE/Cy7 (klon W6D3), CD163-PE/Cy7 (klon RM3/1), CD123-PE/Cy7 (klon 6H6), CD203c-PE/Cy7 (klon NP4D6), HLA-DR-APC (klon L243), CD62L-APC (klon DREG-56), CD69-APC (klon FN50), CD19-APC/Cy7 (klon SJ25C1), CD64-APC/Cy7 (klon 10.1), CD117-APC/Cy7 (klon 104D2), CD11c-APC/Cy7 (klon Bu15), CD206-APC/Cy7 (klon 15-2)
- polyklonální oslí protilátka proti myší protilátce IgG (ABCAM, kat. č. ab150105)
- Saponin (SERVA, kat. č. 34655.01)

### 4.2.2 Použité soupravy

- EnVision™+ Dual Link System-HRP (DAKO, kat. č. K4063)

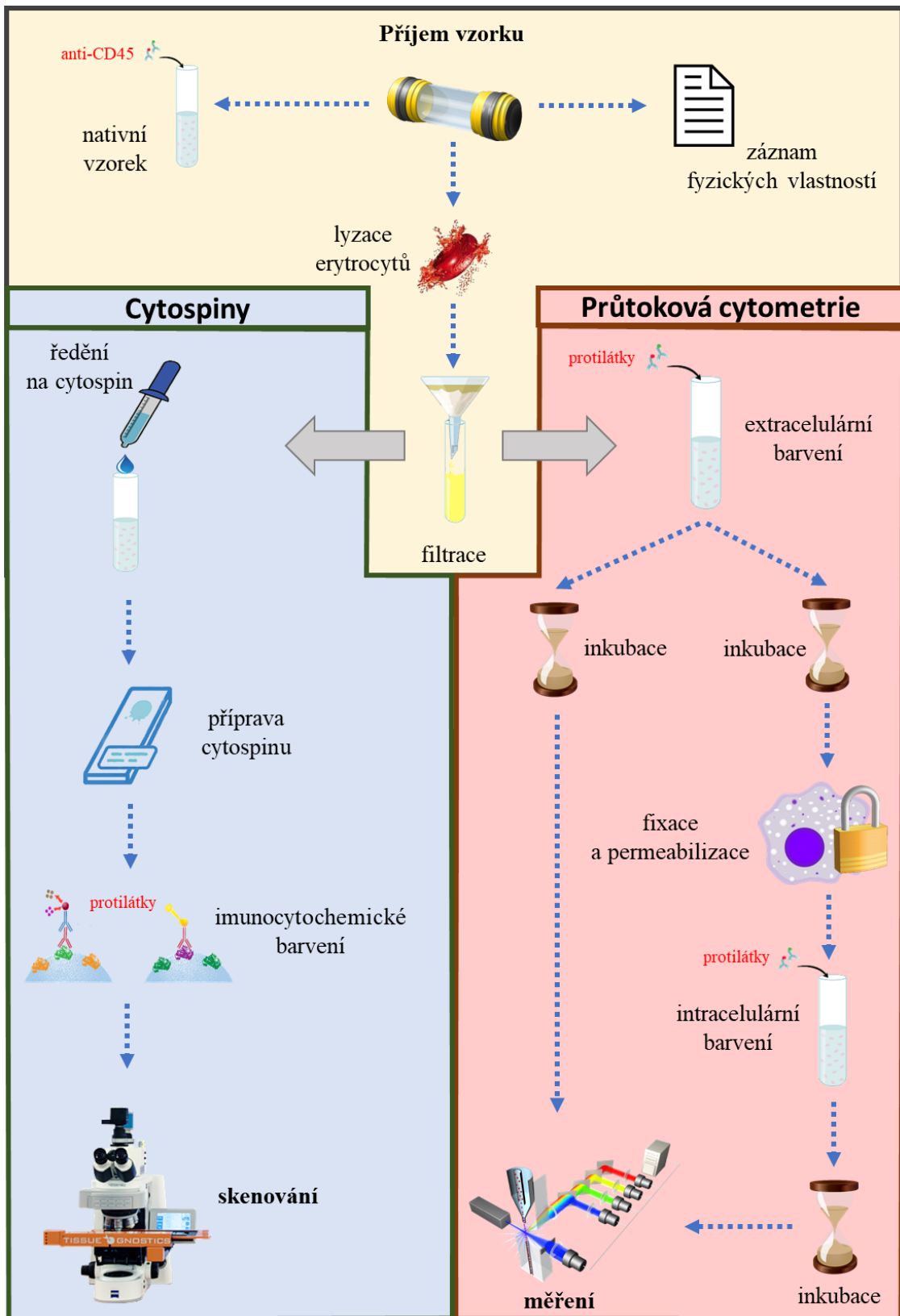
### 4.2.3 Použité roztoky

- 1x PBS: 8 g NaCl, 200 mg KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 240 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, doplnit destilovanou vodou do 1 L, pH upraveno na 7,4 (lékárna Fakultní nemocnice Olomouc)
- DAPI Fluoromount-G® (SouthernBiotech, kat. č. 0100-20)
- fixační pufr (Biolegend, kat. č. 420801)
- lyzační roztok pro hematologii: 8,3 g NH<sub>4</sub>Cl, 1 g KHCO<sub>3</sub>, 40 mg EDTA, doplnit destilovanou vodou do 1 000 ml, pH upraveno na 7,29 (lékárna Fakultní nemocnice Olomouc)
- permeabilizační a promývací pufr (1×), připraven zředěním Intracellular Staining Perm Wash Buffer 10X (Biolegend, kat. č. 421002) v PBS
- permeabilizační roztok: 50 mg BSA a 10 mg Saponinu rozpustit v 10 ml PBS
- promývací roztok: 50 mg BSA rozpustit v 10 ml PBS
- pufr pro barvení buněk (Biolegend, kat č. 420201)

### 4.3 Seznam použitých přístrojů a vybavení

- centrifuga 3K30 (Sigma Laborzentrifugen GmbH)
- centrifuga Thermo Scientific™ Cytospin™ 4 Cytocentrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc.)
- flowbox MSC 1.2 (Thermo Scientific GmbH)
- laboratorní digestoř N/900 M2 (MERCY, s.r.o.)
- průtokový cytometr BD FACSCanto™ II (BD Biosciences)
- průtokový cytometr NovoCyte® (ACEA Biosciences)
- skenovací systém TissueFAXS PLUS (TissueGnostics GmbH)

## 4.4 Schéma pracovního postupu



Obrázek 10 – Schéma pracovního postupu. Převzato a upraveno (viz Seznam obrázků).

## 4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

### 4.5.1 Zpracování vzorků kloubních výpotků

Vzorky kloubních výpotků byly odebrány metodou artrocentézy na Ortopedické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci a na Ústav imunologie byly dodány v 10ml zkumavkách. Po zaznamenání objemu, vzhledu, přítomnosti částic a viskozity vzorku bylo 50  $\mu$ l vzorku odebráno a smícháno s 50  $\mu$ l PBS v 5ml polystyrenové zkumavce pro průtokovou cytometrii (BD Falcon; dále jako cytometrická zkumavka). K takto naředěnému vzorku byl přidán 1  $\mu$ l fluoroforem značené protilátky proti lidskému znaku CD45 a po 20 minutách inkubace v temnu za laboratorní teploty bylo provedeno měření vzorku na průtokovém cytometru NovoCyte® (ACEA Biosciences). Toto měření poskytlo informaci o absolutním počtu buněk ve vzorku, která byla později využita při ředění vzorku pro přípravu cytospinu (viz 4.5.3 Příprava cytospinů).

Celý zbývající objem původního vzorku výpotku byl centrifugován (1 700 RCF, 10 min, 10 °C) a ze supernatantu byly odebrány 3 alikvoty po 0,5 ml, které byly uskladněny při -80 °C pro potřeby jiných analýz. Zbytek supernatantu byl odstraněn a buněčný pelet byl resuspendován ve 2 ml PBS a přefiltrován přes 70nm nylonový filtr do nové 10ml zkumavky. Do původní zkumavky byly přidány další 2 ml PBS, kterými byly opláchnuty případné buňky ulpělé na stěnách a v následujícím kroku byly také zfiltrovány a spojeny s primárním filtrátem. Zkumavka s filtrátem byla centrifugována (600 RCF, 10 min, 10 °C). Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v PBS o objemu odpovídajícím 1/10 objemu při příjmu vzorku.

Z takto připravené buněčné suspenze bylo 600  $\mu$ l rozděleno po 150  $\mu$ l do čtyř cytometrických zkumavek. Do každé zkumavky byl přidán 1  $\mu$ l protilátky podle příslušného panelu (viz 4.5.2 Imunofenotypizace, Tabulka 3), s výjimkou koktejlu CD3+CD16+CD56 v Panelu 1, kterého byly použity 4  $\mu$ l na každou reakci. Po 20 minutách inkubace ve tmě za laboratorní teploty bylo provedeno měření na průtokovém cytometru NovoCyte® (ACEA Biosciences).

Z buněčné suspenze některých vybraných vzorků bylo dalších 600  $\mu$ l použito pro intracelulární barvení. Připravený objem vzorku byl rozdělen po 150  $\mu$ l do čtyř cytometrických zkumavek. Do každé zkumavky byl přidán 1  $\mu$ l fluoroforem značené protilátky podle příslušného panelu (viz 4.5.2 Imunofenotypizace, Tabulka 4). Po 20 minutách inkubace ve tmě za laboratorní teploty byla provedena fixace: do každé zkumavky bylo přidáno 200  $\mu$ l fixačního pufru (Biolegend). Po 20 minutách inkubace

ve tmě za laboratorní teploty byl do každé zkumavky přidán 1 ml PBS a zkumavky byly centrifugovány (350 RCF, 7 min, 20 °C). Dále byla provedena permeabilizace buněk permeabilizačním a promývacím pufrem (Biolegend): supernatant byl po centrifugaci odstraněn a buněčný pelet byl resuspendován v 300 µl permeabilizačního a promývacího pufru a poté opět centrifugován (350 RCF, 7 min, 20 °C). Promytí bylo dvakrát zopakováno a poté byl buněčný pelet resuspendován ve 150 µl permeabilizačního a promývacího pufru a do každé zkumavky byl přidán 1 µl protilátky proti intracelulárnímu znaku dle příslušného panelu (viz 4.5.2 Imunofenotypizace, Tabulka 4). Po 20 minutách inkubace ve tmě za laboratorní teploty bylo do zkumavek přidáno 300 µl permeabilizačního a promývacího pufru a zkumavky byly centrifugovány (350 RCF, 7 min, 20 °C). Supernatant byl odstraněn a buněčný pelet byl resuspendován ve 200 µl pufru pro barvení buněk (Biolegend). Poté bylo provedeno měření na průtokovém cytometru BD FACSCanto OO (BD Biosciences).

Z vybraných vzorků byly také připraveny cytospiny pro mikroskopickou analýzu (viz kapitola 4.5.3 Příprava cytospinů).

## 4.5.2 Imunofenotypizace

Imunofenotypizace představuje proces identifikace buněk na základě exprese znaků, charakteristických pro určité populace a subpopulace (CD znaky). Tyto imunitní znaky jsou molekuly na povrchu nebo uvnitř buněk, které zpravidla souvisí s funkcí specializací dané buňky. Určením několika správně zvolených znaků lze identifikovat konkrétní populace a subpopulace buněk.

Pro imunofenotypizaci kloubních výpotků byly připraveny čtyři panely protilátek, zacílených na specifické populace imunitních buněk ve vzorcích (Tabulka 3). Panely byly připraveny pro rutinní výzkum na pracovišti a v práci byla využita pouze část z nich a nebyly vyhodnoceny všechny měřené znaky.

**Tabulka 3:** Panely protilátek pro extracelulární barvení.

Panel	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
Panel 1	CD3*	CD16+CD56*	CD4	CD203c	HLA-DR	CD117
Panel 2	CD4	CD25	CD127	CD15	HLA-DR	CD64
Panel 3	CD14	CD16 (klon 3G8)	CD45	CD163	CD11b	CD11c
ISO kontrola	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG2	IgG1

\*Protilátky CD3, CD16 a CD56 v Panelu 1 byly komerčně dodány ve formě jednoho koktejlu.

Dále byly připraveny dva panely protilátek, zacílených na populaci makrofágů, které byly využity při intracelulárním barvení (Tabulka 4).

**Tabulka 4:** Panely protilátek pro intracelulární barvení.

Panel	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
Panel 4	CD64	TLR2	CD68*	CD163	TLR4	CD14
ISO kontrola	IgG1	IgG1	IgG1*	IgG1	IgG2	IgG1

\*Protilátky v kanále pro PerCP-Cy5.5 byly do zkumavek přidány až po fixaci a permeabilizaci.

K detekci jednotlivých populací imunitních buněk ve studovaných vzorcích výpotků OA pacientů byly navrženy kombinace CD znaků uvedené v Tabulce 5.

**Tabulka 5** – Kombinace CD znaků použité k detekci jednotlivých imunitních populací ve vzorcích výpotků OA pacientů.

<b>Imunitní populace</b>	<b>Panel CD znaků</b>
<b>Lymfocyty</b>	CD3 <sup>+</sup>
<b>CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty</b>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
<b>CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty</b>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
<b>Regulační T-lymfocyty (Treg)</b>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup>
<b>NK buňky</b>	CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>
<b>Monocyty</b>	CD68 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> CD163 <sup>-</sup>
<b>Makrofágy</b>	CD68 <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup> CD163 <sup>+</sup>
<b>Neutrofilly</b>	CD15 <sup>+</sup>
<b>Žírné buňky</b>	CD203c <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>
<b>Myeloidní dendritické buňky</b>	CD68 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> CD163 <sup>-</sup>

Měření bylo provedeno na přístrojích BD FACSCanto II (BD Biosciences) a NovoCyte® (ACEA Biosciences). Na přístroji BD FACSCanto II byly měřeny vzorky barvené intracelulárně, na přístroji NovoCyte® pak vzorky barvené extracelulárně.



### 4.5.3 Příprava cytopsinů

Cytopsiny jsou fixované preparáty buněčné suspenze na podložním skle. Jsou vhodné pro vizualizaci vybraných buněk či znaků pomocí imunochemického barvení.

Při přípravě byla buněčná suspenze kloubního výpotku zředěna na vhodnou koncentraci (500 buněk/ $\mu$ l) a 200  $\mu$ l takto naředěné suspenze bylo přeneseno do speciálního nástavce cytopsinu s kanálkem. Nástavec byl umístěn v držáku tak, aby kanálek doléhal na podložní sklo. Mezi nástavcem a podložním sklem byl list filtračního papíru s vyříznutou dírou tak, že suspenze mohla protéct na sklo. Celá konstrukce byla vložena do centrifugy se speciálním rotorem (Thermo Scientific™ Cytospin™ 4 Cytocentrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., USA), kde při centrifugaci (28 RCF po dobu 5 minut) protékla buněčná suspenze kanálkem k podložnímu sklu, tekutina se vsákla do filtračního papíru a buňky zůstaly přilepené na skle.

Takto připravené cytopsiny byly usušeny při laboratorní teplotě přes noc a poté 3 min fixovány chlazeným metanolem (4 °C) a sušeny při laboratorní teplotě 30 minut. Zafixované cytopsiny byly uskladněny při 4 °C a poté hromadně barveny.

### 4.5.4 Imunocytochemické barvení cytopsinů

Připravené cytopsiny byly obarveny metodou imunocytochemického barvení. Všechny inkubace proběhly ve vlhké komůrce ve tmě za laboratorní teploty.

V první fázi bylo provedeno **imunohistochemické barvení pomocí soupravy EnVision™+ Dual Link System-HRP** (DAKO). Barvení proběhlo podle protokolu k použité soupravě: nejprve byla provedena permeabilizace roztokem PBS-BSA-Saponin, poté bylo provedeno blokování endogenního enzymu (10 min), poté byla aplikována primární myší protilátka proti lidskému intracelulárnímu znaku CD68 (30 min), následně byl cytopsin inkubován s polymerem značeným křenovou peroxidázou (30 min), poté byl cytopsin inkubován 10 minut s roztokem substrát-chromogen, a nakonec byl obarven hematoxylinem (5 min).

Druhým typem barvení, které bylo použito, bylo **fluorescenční barvení** s využitím primární monoklonální myší protilátky typu IgG proti lidskému intracelulárnímu znaku CD68 a sekundární oslí polyklonální protilátky proti myším protilátkám IgG. Pomocí olejového pera (DAKO) byla okolo cytopsinu vytvořena hydrofobní hranice. Cytopsin byl 5 minut permeabilizován ve 100  $\mu$ l PBS-BSA-Saponin. Roztok byl odsán, na cytopsin bylo aplikováno 100  $\mu$ l PBS-BSA-Saponin

a byl inkubován 15 min. Roztok byl odsán, na cytospin bylo aplikováno 100 µl roztoku blokujícího peroxidázy (DAKO) a byl inkubován 7 minut. Poté byl cytospin dvakrát promyt ve 100 µl PBS-BPA-Saponinu po dobu 7 min. Na cytospin bylo aplikováno 100 µl Protein blocking solution (DAKO) a byl inkubován 25 min. Roztok byl odsán a cytospin byl dvakrát promyt ve 100 µl PBS-BPA-Saponinu po dobu 7 min. Po odsátí roztoku byl cytospin připraven na aplikaci primární protilátky. Jako primární protilátka byla použita myší monoklonální protilátka proti lidskému znaku CD68, klon Y1/82-A (BioLegend), v konečné koncentraci 1:100 v roztoku PBS-BPA-Saponinu a objemu 100 µl. Cytospin byl s primární protilátkou inkubován přes noc.

Druhého dne byl roztok primární protilátky odsán a cytospin byl třikrát promyt ve 100 µl PBS-BSA po dobu 7 min. Poté byl cytospin připraven na aplikaci sekundární protilátky. Jako sekundární protilátka byla použita oslí polyklonální protilátka proti myším protilátkám IgG svázaná s fluoroforem AlexaFluor® 488 (ABCAM) v konečné koncentraci 1:500 v roztoku PBS-BPA-Saponinu. Na cytospin bylo aplikováno 100 µl roztoku sekundární protilátky a byl inkubován po dobu 60 minut v temnu. Poté byl cytospin třikrát promyt ve 100 µl PBS-BSA po dobu 5 minut. Následně byl cytospin omyt pod proudem destilované vody a sušen 30 minut při laboratorní teplotě. Po usušení bylo pro vizualizaci jader na cytospin aplikováno 100 µl DAPI Fluoromount-G® (SouthernBiotech), který obsahuje DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) pro barvení DNA a montovací médium.

#### **4.5.5 Světelná mikroskopie a skenování pomocí systému TissueFAXS**

K zaznamenání a analýze výsledků barvení cytospinů byl použit automatický zobrazovací a analyzační systém TissueFAXS PLUS (TissueGnostics GmbH, Rakousko; Obrázek 11). Systém umožňuje automatizované skenování až osmi vzorků na podložních sklech současně. Je vhodný pro barevnou i fluorescenční analýzu cytospinů, buněčných nátěrů, tkáňových řezů a tkáňových microarrays. Umožňuje záznam ve vysokém rozlišení ve viditelném světle a také v několika fluorescenčních kanálech. Mikroskop je vybaven revolverovým výměníkem objektivů a revolverovým výměníkem fluorescenčních filtrů. Přístroj dokáže pracovat v plně automatickém režimu snímání, kdy zaznamená snímky uživatelem definovaných ploch vzorku v definovaných kanálech a složí snímky v jeden obraz. Analýza obrazu je prováděna v softwarech HistoQuest a TissueQuest.

Oba softwary zajišťují jak detekci vybraných elementů, tak statistické zpracování a produkci statistických dat.

Software HistoQuest slouží k analýze snímků ve viditelném světle. S využitím patentovaného algoritmu dokáže detekovat a rozlišovat od sebe jednotlivé buňky a takto segmentovaný obraz nadále analyzovat statisticky. Může pracovat ve čtyřech módech: detekce buněk (jader, cytoplazmy a membrán), detekce barvené plochy, detekce malých útvarů (vhodné např. pro CISH a FISH) a v módu algoritmu pro detekci cytoskeletu.

Software TissueQuest slouží k analýze obrazových dat pořízených ve fluorescenčních kanálech. Dokáže pracovat ve stejných módech jako HistoQuest s výjimkou módu pro detekci cytoskeletu a buněčných membrán. Namísto toho umožňuje skládání obrazových dat z různých kanálů a vizualizaci a rozlišení různých buněčných struktur současně. Přehled komponentů použitého systému TissueFAXS uvádí Tabulka 6.

**Tabulka 6** – Komponenty použitého systému TissueFAXS.

<b>Komponenty</b>	<b>Použité komponenty</b>
<b>Zdroje světla</b>	VIS-LED Excite 120 PCQ metal halide
<b>Kamery</b>	Pixelink M-4 PCO Pixelfly USB monochrome
<b>Objektivy</b>	0,5× 20×
<b>Filtry pro fluorescenční mikroskopii</b>	DAPI FITC
<b>Rozšiřující moduly</b>	Automatický držák vzorků (8 pozic)



**Obrázek 11** – Systém TissueFAXS PLUS. Převzato z:

[www.tissuegnostics.com/images/systems/TF-PLUS-front-PxIM4.jpg](http://www.tissuegnostics.com/images/systems/TF-PLUS-front-PxIM4.jpg)

#### **4.5.6 Statistické zpracování dat a použité programy**

Při statistickém zpracování dat a ověření platnosti hypotéz byly využity neparametrický Mann-Whitney test, Spearmanův koeficient pořadové korelace a Shapiro-Wilk test normality. Statistické testy byly provedeny pomocí statistického softwaru R (The R Foundation). Za signifikantní byly považovány hodnoty  $P < 0,05$ .

Konfidenční intervaly průměrů byly vypočítány pomocí programu GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software). Obrázky byly vytvořeny v programech FlowJo® X (FlowJo, LLC) a MS PowerPoint 2016 (Microsoft Corporation).

#### **4.5.7 Konstrukce sítí pro vizualizaci dat**

Pro vizualizaci podobnosti a souvislostí mezi profily dat průtokové cytometrie jednotlivých pacientů byla využita konstrukce sítě (grafu) pomocí metody LRNet (Ochodkova *et al.*, 2017), založené na metodě analýzy nejbližších sousedů. Metoda analyzuje podobnost jednotlivých uzlů (členů souboru dat) na základě podobnosti jejich vlastností. Podobnost jednotlivých dvojic uzlů je znázorněna silou vazby mezi nimi a jejich vzájemnou vzdáleností. Uzly s největší podobností (nejsilnější vazbou) pak vytvářejí shluky. Podobnost mezi uzly v rámci shluku je vysoká (silné vazby), podobnost mezi jednotlivými shluky mezi sebou je pak nízká (slabé vazby). Síť, vytvořená touto metodou, zachycuje lokální vztahy mezi uzly a zároveň globální strukturu vztahů na těchto lokálních vztazích založenou. Výhodou metody LRNet oproti jiným metodám je její nezávislost na počtu a velikosti shluků.

Konstrukce sítě a její analýza byly provedeny výzkumnou skupinou doc. Mgr. Miloše Kudělky, Ph.D. z Fakulty elektrotechniky a informatiky Vysoké školy báňské – Technické univerzity Ostrava.

## 5 Výsledky

### 5.1 Fyzické vlastnosti vzorků

Před samotným zpracováním vzorků byly u zkoumaných vzorků (n = 53) určeny následující fyzické vlastnosti: objem, vzhled, přítomnost částic, viskozita. Přehled těchto vlastností a počty příslušných vzorků shrnuje Tabulka 7.

**Tabulka 7** – Fyzické vlastnosti studovaných vzorků kloubních výpotků OA pacientů.

<b>Objem vzorků</b>	<b>Počet vzorků</b>
<5 ml	6
5–25 ml	28
>25 ml	17
N/A	2

<b>Vzhled vzorků</b>	<b>Počet vzorků</b>
čirý nažloutlý	35
sytě žlutý	3
sytě žlutý viskózní	2
oranžový	5
nahnědlý se zákalem	7

\*N/A – data nedostupná

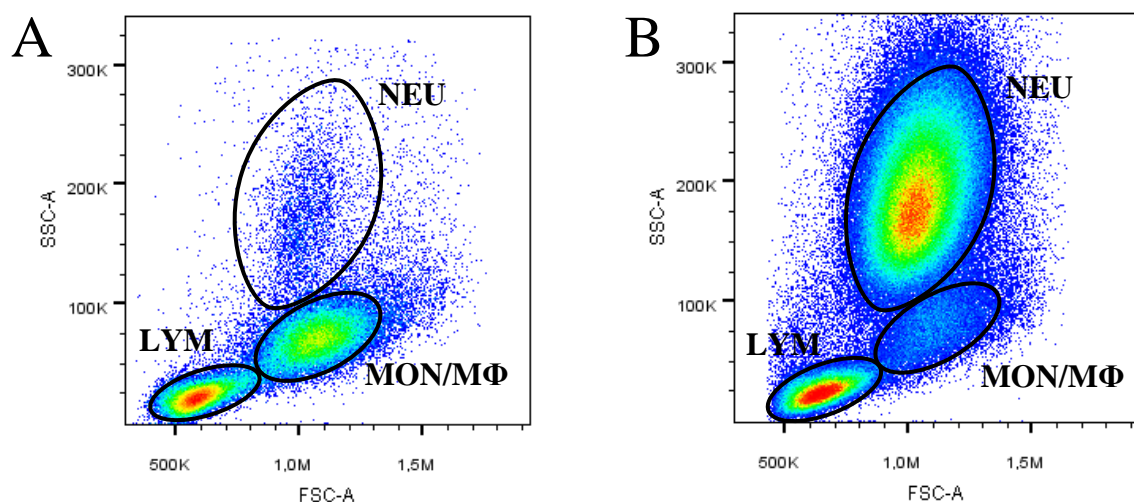
## 5.2 Výsledky měření průtokovou cytometrií

### 5.2.1 Identifikace a zastoupení hlavních populací imunitních buněk

Celkový počet imunitních buněk v jednotlivých vzorcích byl určen podle positivity znaku CD45 určené pomocí šestibarevné průtokové cytometrie a jeho průměrná hodnota byla  $424 \times 10^6/L$  (95% konfidenční interval [KI]  $132\text{--}715 \times 10^6/L$ ), což představovalo v průměru 30,3 % všech zaznamenaných buněk. Ostatní zaznamenané události představovaly buňky neimunitního původu, buněčné zbytky a jiné částice přítomné v kloubním výpotku.

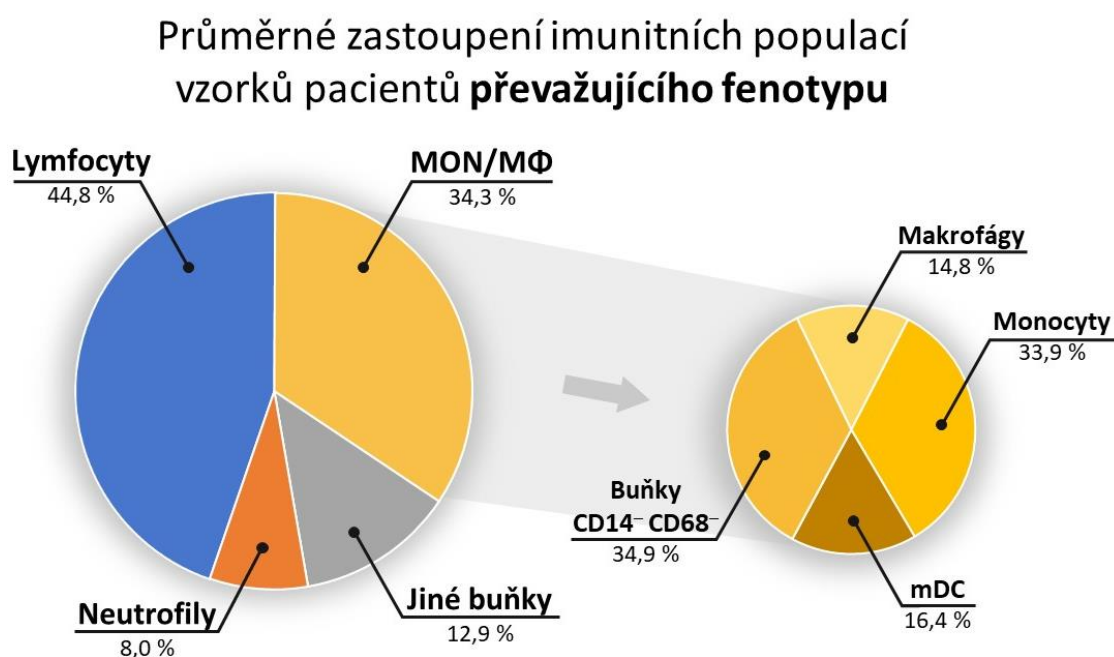
Vyšetření imunitních populací v kloubním výpotku na pracovišti, kde byla diplomová práce realizována, je komplexní a věnuje se do hloubky subpopulacím všech hlavních populací imunitních buněk (lymfocyty, buňky monocyto-makrofágové linie, neutrofilů) i minoritním populacím imunitních buněk, které se v kloubním výpotku vyskytují. Z toho důvodu byly panely zkoumaných znaků zacíleny i na populace, kterým se tato práce do hloubky nevěnuje. V této práci byly popsány hlavní populace imunitních buněk v kloubních výpotech a detailně byla prostudována pouze populace buněk monocyto-makrofágové linie.

Na základě zastoupení hlavních imunitních populací byly rozpoznány dva hlavní fenotypy (Obrázek 12): u většiny pacientů převažovaly populace lymfocytů a buněk monocyto-makrofágové linie; u 5 pacientů výrazně převažovala populace neutrofilů – tento fenotyp byl označen jako **fenotyp N**.



**Obrázek 12** – Srovnání imunitních populací vzorku převládajícího fenotypu (A) a vzorku fenotypu N s predominujícími neutrofilů (B) na scattergramu FSC-A/SSC-A. Legenda: NEU – gate neutrofilů; LYM – gate lymfocytů; MON/MΦ – gate buněk monocyt-makrofágové linie.

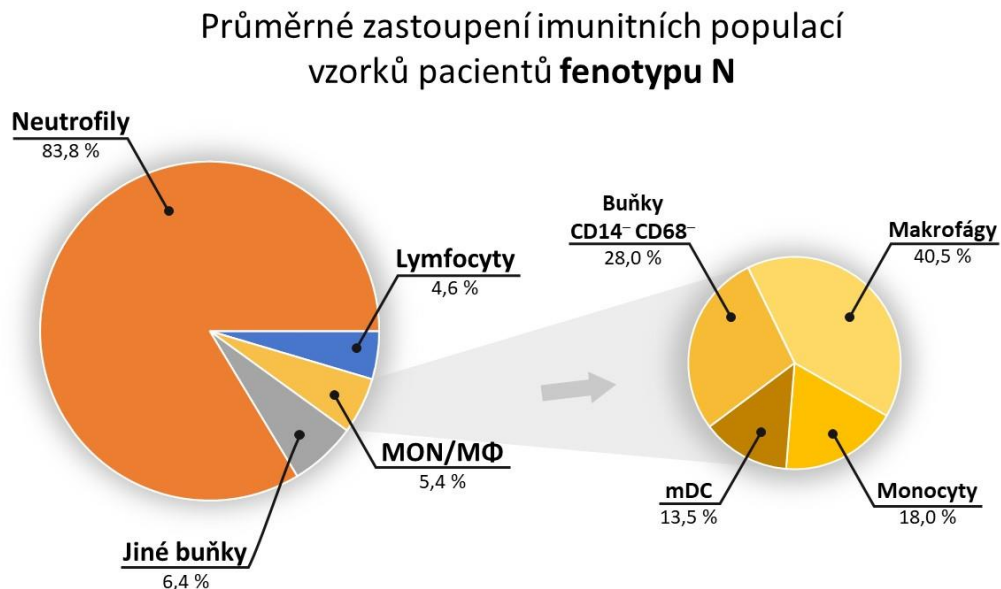
U většiny OA pacientů převažovaly populace lymfocytů se zastoupením 44,8 % (KI 39,6–50,0 %) a buněk monocyto-makrofágové linie se zastoupením 34,3 % (KI 29,6–39,0 %), méně početné pak byly neutrofilů se zastoupením 8,0 % (KI 6,0–10,0 %). Buňky neimunitního původu a minoritní populace (plazmacytoidní dendritické buňky, žírné buňky a další) nacházející se v kloubním výpotku představovaly zbývajících 12,9 % (KI 9,4–13,7 %) zaznamenaných buněk. Průměrné zastoupení hlavních imunitních populací ve vzorcích kloubních výpotků OA pacientů uvádí graf na Obrázku 13.



**Obrázek 13** – Graf zastoupení populací imunitních buněk ve studovaných vzorcích výpotků OA pacientů s převažujícím fenotypem.

U OA pacientů s fenotypem N (n = 5) byly nejpočetnější detekovanou populací imunitních buněk neutrofilů se zastoupením 83,8 % (KI 77,7–87,9 %). Tito pacienti splňovali požadavky pro zařazení do souboru, tedy pokud nevykazovali známky septické artritidy a nevykazovali klinické známky infekce. U těchto pacientů představovaly ostatní hlavní populace imunitních buněk podstatně menší část: lymfocyty představovaly 4,6 % (KI 0,6–8,6 %) všech imunitních buněk a buňky monocyto-makrofágové linie

pak 5,4 % (KI 0,2–10,6 %). Průměrné zastoupení hlavních imunitních populací ve vzorcích kloubních výpotků OA pacientů s fenotypem N uvádí graf na Obrázku 14. Nebyla nalezena korelace mezi fenotypem N a mírou poškození kloubu, stupněm rozvoje OA, bolestivostí kloubu ani BMI.



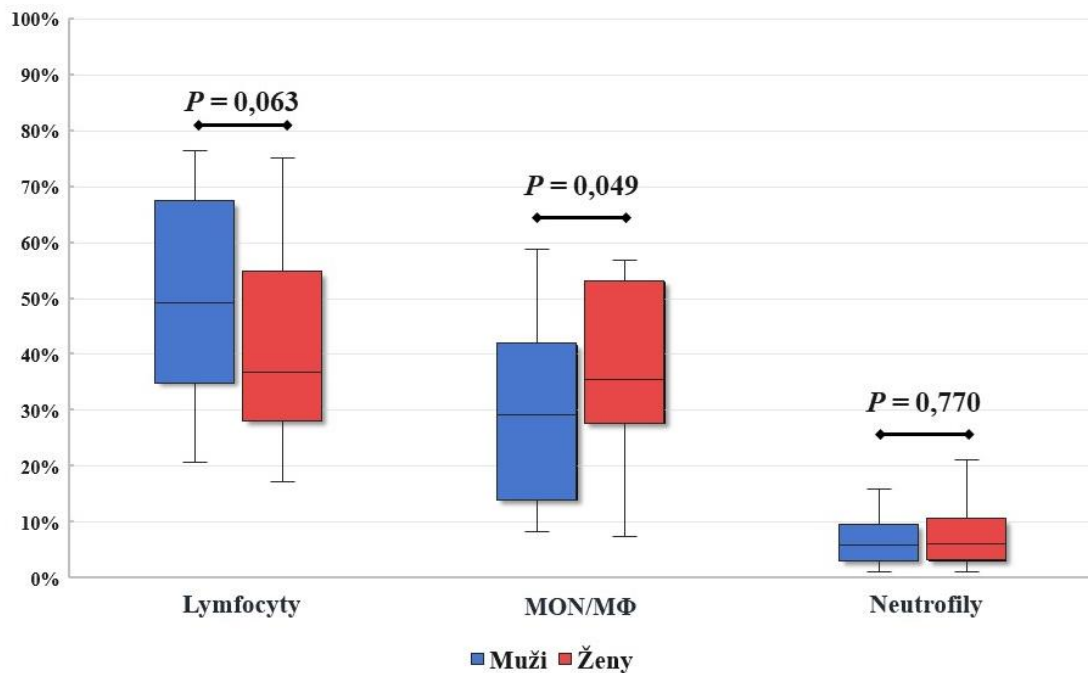
**Obrázek 14** – Graf zastoupení populací imunitních buněk ve studovaných vzorcích výpotků OA pacientů s fenotypem N (s převažující populací neutrofilů).

### 5.2.2 Rozdíly v zastoupení hlavních imunitních populací mezi pohlavími

Byly zjištěny významné rozdíly v zastoupení hlavních imunitních populací mezi pohlavími (Obrázek 15). Pacienti s fenotypem N nebyli do tohoto srovnání zařazeni. Celkem tedy byly rozdíly mezi pohlavími zkoumány u 48 pacientů. Byla srovnána procentuální zastoupení hlavních imunitních populací mezi muži ( $n = 21$ ) a ženami ( $n = 27$ ).

Největší rozdíly byly v zastoupení lymfocytů a buněk monocyto-makrofágové linie. Lymfocyty představovaly u mužů 50,2 % a u žen 40,5 % (KI 34,0–47,1 %);  $P = 0,063$ . Buňky monocyto-makrofágové linie představovaly u mužů 29,5 % (KI 22,5–36,6 %) a u žen 38,3 % (KI 32,0–44,6 %);  $P = 0,049$ . V zastoupení neutrofilů nebyl mezi muži a ženami zjištěn signifikantní rozdíl: zastoupení u mužů bylo 7,4 % (KI 4,7–10,0 %), u žen 8,5 % (5,5–11,5 %);  $P = 0,770$ .





**Obrázek 15** – Graf průměrných zastoupení hlavních imunitních populací u mužů a u žen. Středová čára představuje medián, krabicová část grafu pak 1. a 3. kvartil a vousy grafu vymezují minimální a maximální hodnotu.

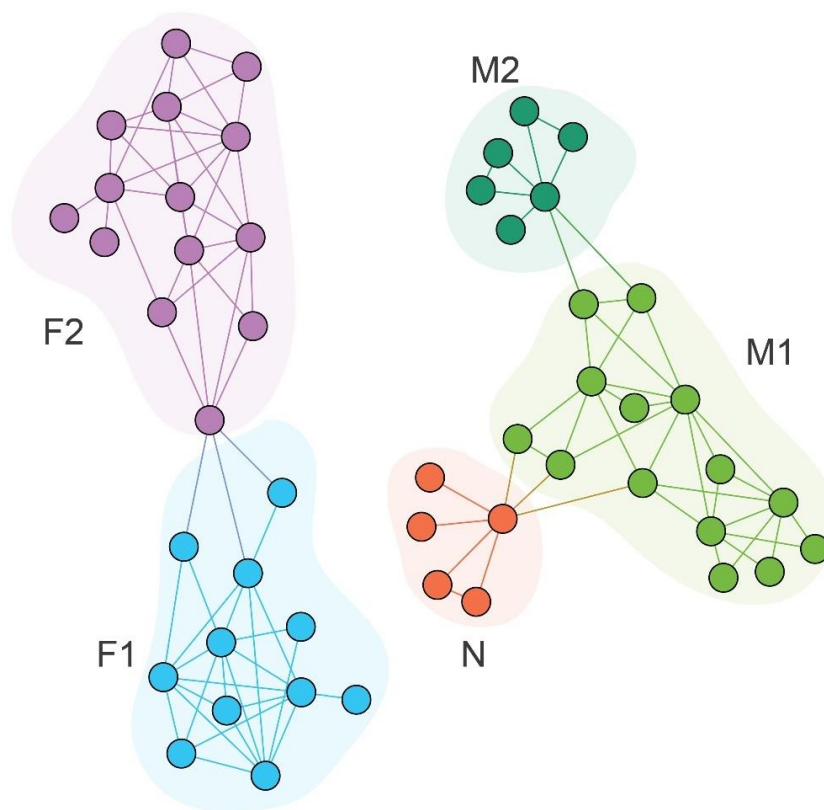
### 5.2.3 Analýza podobnosti a vizualizace dat pomocí konstrukce sítě

Metodou LRNet byla provedena analýza podobnosti a na jejím základě byla vytvořena datová síť. Uzly této sítě představují profily jednotlivých pacientů založené na zastoupení populací jednotlivých imunitních buněk a jejich vzdálenost, vazby mezi nimi a síla těchto vazeb vyjadřují podobnost profilů pacientů. Uzly (pacienti), kteří jsou v síti blízko sebe a případně mezi sebou mají vazbu, jsou si nejpodobnější co do zastoupení jednotlivých populací imunitních buněk. Naopak pacienti, kteří nejsou spojeni vazbou a jsou daleko od sebe, vykazují malou podobnost zastoupení zkoumaných buněčných populací. Shluky uzlů jsou odlišeny barevně a představují jednotlivé fenotypy pacientů s OA, které jsou charakteristické procentuálními zastoupeními buněk monocyto-makrofágové linie, lymfocytů a neutrofilů v kloubním výpotku.

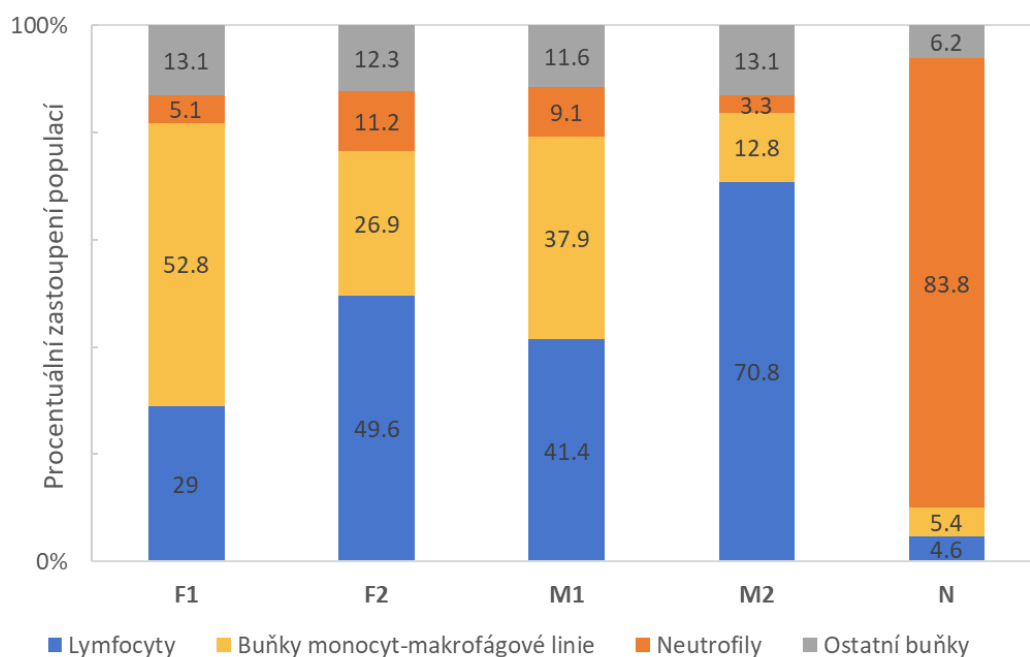
Pozice profilu každého zkoumaného pacienta je založena na poměru zastoupení hlavních imunitních populací: neutrofilů, lymfocytů a buněk monocyto-makrofágové linie. Do analýzy bylo zahrnuto 45 pacientů (20 mužů, 25 žen) a 8 pacientů bylo z analýzy vyřazeno pro chybějící data z důvodu malého objemu nebo nízké buněčnosti vzorku.

Síť, vytvořená metodou LRNet, ukazuje, že na základě zastoupení hlavních imunitních populací lze mezi pacienty rozlišit 5 odlišných skupin (Obrázek 16)

s odlišnými zastoupeními populací imunitních buněk (Obrázek 17). Mezi muži lze rozlišit dvě rozdílné skupiny a stejně tak mezi ženami. Pátá skupina je charakteristická predominancí neutrofilů. První podskupina mužů ( $n = 14$ ), označená jako **M1**, byla charakteristická podobným zastoupením lymfocytů a buněk monocyto-makrofágové linie a nízkým zastoupením neutrofilů a ostatních buněk. U druhé podskupiny mužů ( $n = 6$ ), označené jako **M2**, převažovala populace lymfocytů, následovaná buňkami monocyto-makrofágové linie a ostatními buňkami a s minoritním zastoupením neutrofilů. První podskupina žen, označená jako **F1**, ( $n = 11$ ) byla charakteristická převažující populací buněk monocyto-makrofágové linie, následovanou lymfocyty, dále ostatními buňkami a s minoritní populací neutrofilů. U druhé skupiny žen, označené jako **F2**, ( $n = 14$ ) převažovaly lymfocyty, následované buňkami monocyto-makrofágové linie a dále neutrofilů a ostatními buňkami.



**Obrázek 16** – Síť zkonstruovaná metodou LRNet, zobrazující podobnost profilů zkoumaných OA pacientů na základě zastoupení hlavních populací imunitních buněk. Na obrázku jsou patrné dvě podskupiny mužů (M1 a M2), dvě podskupiny žen (F1 a F2) a skupina pacientů s predominancí neutrofilů (N). Obrázek vytvořila výzkumná skupina doc. Mgr. Miloše Kudělky, Ph.D. z Fakulty elektrotechniky a informatiky Vysoké školy báňské – Technické univerzity Ostrava.

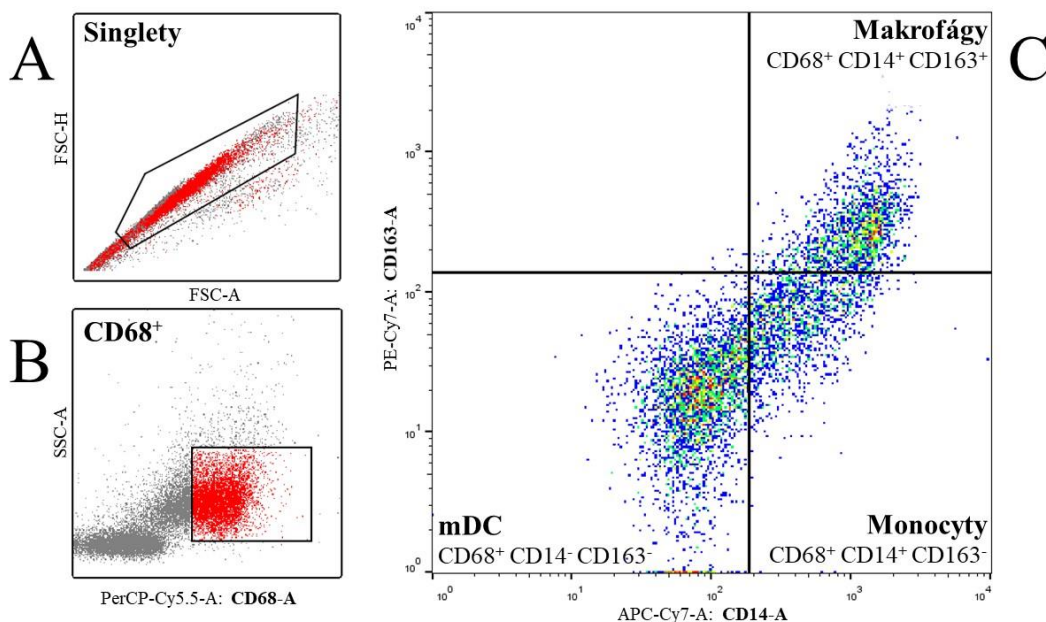


**Obrázek 17** – Graf zastoupení hlavních populací imunitních buněk skupin definovaných metodou LRNet (mužské skupiny M1 a M2, ženské skupiny F1 a F2 a skupina s predominancí neutrofilů N).

## 5.2.4 Detailní analýza buněk monocyto-makrofágové linie

**Buňky monocyto-makrofágové linie** byly vybrány pro hlubší analýzu, při které bylo využito kromě extracelulárního barvení také barvení intracelulární. Analýza byla provedena na souboru vzorků výpotků získaných od 19 pacientů.

Rozložení buněk monocyto-makrofágové linie z výpotků se ukázalo být komplikovaným, jelikož docházelo k překryvu jednotlivých subpopulací. Nakonec se ukázal jako nejvhodnější identifikovat monocyty podle fenotypu znaků  $CD68^+ CD14^+ CD163^-$ , makrofágy podle kombinace znaků  $CD68^+ CD14^+ CD163^+$  a myeloidní dendritické buňky dle fenotypu znaků  $CD68^+ CD14^- CD163^-$  (Obrázek 18).



**Obrázek 18** – Identifikace subpopulací monocyto-makrofágové linie (monocytů, makrofágů a myeloidních dendritických buněk) pomocí sekvence gates.

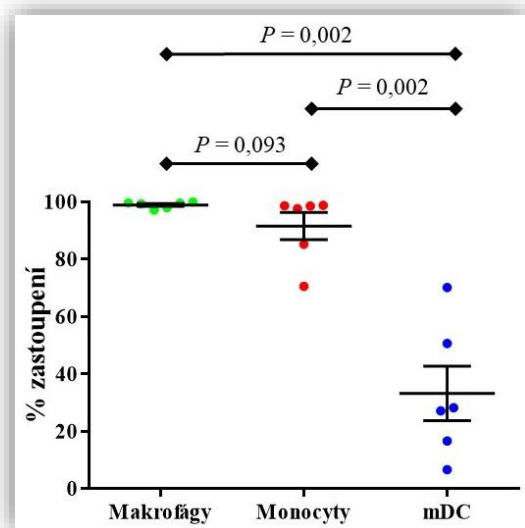
- (A) Populace všech zaznamenaných událostí zobrazená na scattergramu FSC-A/FSC-H. Gate vymezuje populaci singletů.
- (B) Populace singletů zobrazená na scattergramu CD68-A/SSC-A. Gate vymezuje buňky pozitivní na znak CD68 a byl umístěn podle polohy izotypové kontroly (není znázorněna).
- (C) Populace  $CD68^+$  buněk na scattergramu CD14/CD163. Makrofágy jsou pozitivní na oba znaky ( $CD14^+ CD163^+$ ), monocyty pouze na znak CD14 ( $CD14^+ CD163^-$ ) a myeloidní dendritické buňky (mDC) jsou negativní na oba znaky ( $CD14^- CD163^-$ ).

Ve vzorcích výpotků OA pacientů s převládajícím fenotypem bylo v rámci monocyto-makrofágové linie určeno následující průměrné zastoupení subpopulací: **monocyty** 33,9 % (KI 28,5–39,3 %), **makrofágy** 14,8 % (KI 10,7–19,0 %), **mDC** 16,4 % (KI 14,4–18,0). Velká část buněk monocyto-makrofágové linie (34,9 %; KI 31,2–38,0 %) neexprimovala znak CD14. Tato populace nebyla blíže prozkoumána.

Ve vzorcích výpotků OA pacientů s fenotypem N bylo v rámci monocyto-makrofágové linie určeno následující průměrné zastoupení subpopulací: **makrofágy** 40,5 % (KI 17,9–63,1 %), **monocyty** 18,8 % (KI 6,8–29,5 %), **mDC** 13,5 % (KI 7,9–19,3 %). **Buňky CD14<sup>+</sup>** představovaly 28,0 % (KI 12,3–44,0 %) z detekovaných buněk.

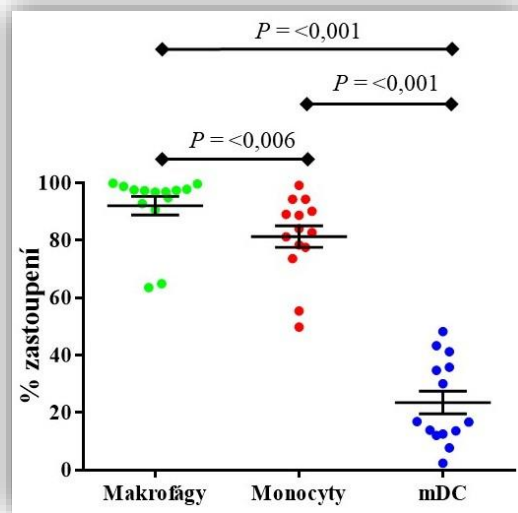
U těchto tří identifikovaných subpopulací (makrofágy, monocyty, mDC) byla dále zkoumána pozitivita na znaky CD64, TLR2 a TLR4.

Zastoupení buněk **CD64<sup>+</sup>** bylo nejvyšší u makrofágů (průměrně 99,0 %), nižší bylo u monocytů (91,6 %) a nejnižší u mDC (33,3 %). Rozdíl mezi pozitivitou na znak CD64 u makrofágů a monocytů nebyl statisticky signifikantní ( $P = 0,093$ ). Populace mDC se statisticky signifikantně odlišovala od obou zbývajících populací ( $P = 0,002$  v obou případech; Obrázek 19).



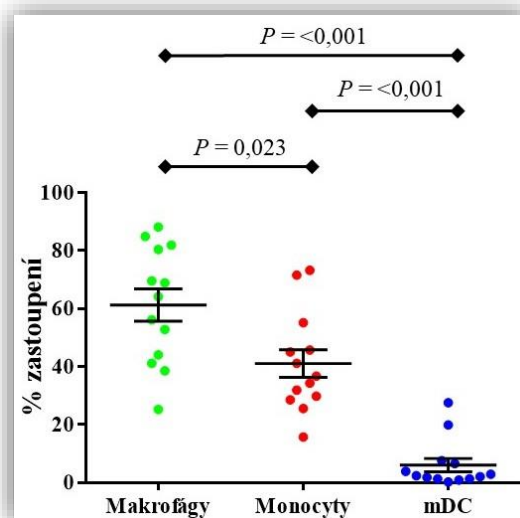
**Obrázek 19** – Graf procentuálního zastoupení CD64<sup>+</sup> buněk v populaci makrofágů, monocytů a myeloidních dendritických buněk (mDC).

Zastoupení buněk pozitivních na znak **TLR2** bylo nejvyšší u makrofágů (průměrně 92,0 %), nižší u monocytů (81,3 %) a nejnižší u mDC (23,5 %). Všechny tři populace se od sebe v pozitivitě na znak TLR2 statisticky významně odlišovaly (Obrázek 20).



**Obrázek 20** – Graf procentuálního zastoupení TLR2<sup>+</sup> buněk v populaci makrofágů, monocytů a myeloidních dendritických buněk (mDC).

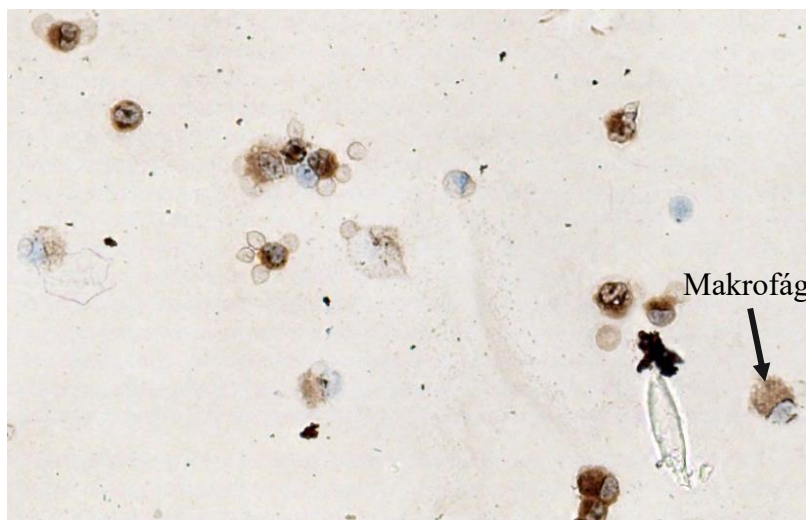
Zastoupení buněk pozitivních na znak **TLR4** bylo nejvyšší u makrofágů (průměrně 61,2 %), nižší bylo u monocytů (41,3 %) a nejnižší u mDC (23,5 %). Všechny tři populace se od sebe v pozitivitě na znak TLR4 statisticky významně odlišovaly (Obrázek 21).



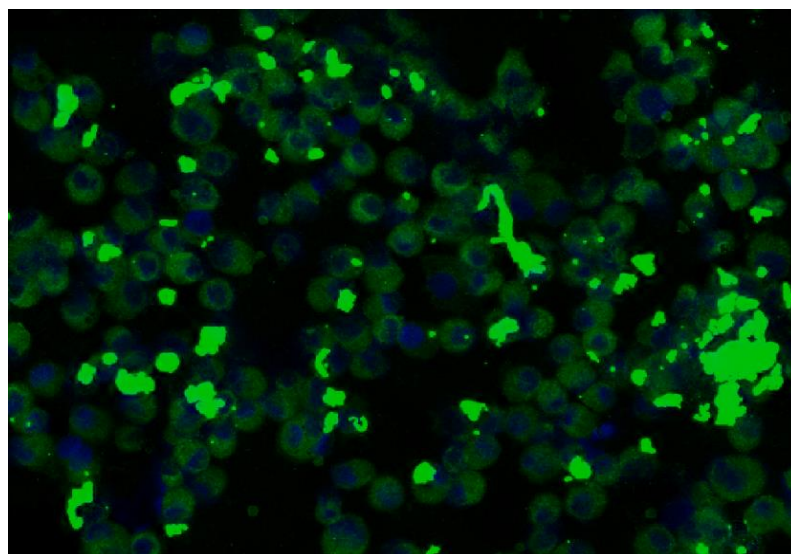
**Obrázek 21** – Graf procentuálního zastoupení TLR4<sup>+</sup> buněk v populaci makrofágů, monocytů a myeloidních dendritických buněk (mDC).

### 5.3 Světelná mikroskopie a cytospiny

Ze zkoumaných vzorků OA pacientů byly vybrány vhodné vzorky, ze kterých byly připraveny cytospiny. U připravených cytospinů byl pomocí imunocytochemického barvení s využitím systému DAB+ detekován intracelulární znak CD68 a jádra byla obarvena pomocí hematoxylinu (Obrázek 22) a dále byl stejný znak detekován fluorescenčním imunocytochemickým barvením s využitím primární protilátky proti znaku CD68 a sekundární protilátky nesoucí fluorofor Alexa 488® a obarvením jader pomocí DAPI (Obrázek 23).



**Obrázek 22** – Snímek cytospinu se znakem CD68 barveným pomocí systému DAB+ (hnědá barva) a jádry barvenými hematoxylinem (modrá barva).



**Obrázek 23** – Snímek cytospinu s fluorescenčním barvením znaku CD68 protilátkami s fluoroforem Alexa 488® (zelená barva) a jádry barvenými DAPI (modrá barva).

## 6 Diskuze

Předložená práce prokázala, že hlavními populacemi v kloubních výpotcích OA pacientů jsou lymfocyty, buňky monocyto-makrofágové linie a neutrofilů. Imunofenotypizací a následnou statistickou analýzou bylo rozpoznáno pět základních fenotypů: dva u mužů, dva u žen a fenotyp s vysokým zastoupením neutrofilů. Byla provedena detailní analýza buněk monocyto-makrofágové linie, která určila hlavní subpopulace této linie: makrofágy, monocyty a myeloidní dendritické buňky (mDC). Tyto tři subpopulace se lišily mírou exprese buněčných znaků CD64, TLR2 a TLR4. U vybraných vzorků byly připraveny cytopspiny a imunocytochemickým barvením znaku CD68 byly detekovány makrofágy.

Imunofenotypizací byly identifikovány dva hlavní fenotypy pacientů u žen i mužů: převládající fenotyp s predominancí lymfocytů a buněk monocyto-makrofágové linie; a méně častý fenotyp s predominancí neutrofilů označený jako fenotyp N. V kloubních výpotcích většiny OA pacientů se nacházelo více než 30% lymfocytů. Také jiní autoři (Saito *et al.*, 2002) popsali infiltraci lymfocytů v synoviální membráně u OA. Haynes *et al.* (2002) prokázali expresi aktivačních markerů (CD69, HLA-DR) na lymfocytech v synoviální membráně. V další práci bylo zjištěno, že T-lymfocyty v synoviální membráně OA pacientů mají sníženou expresi znaku CD3 (Sakkas *et al.*, 2004). Autoři usuzují, že zjištěné snížení může být způsobeno chronickou stimulací těchto buněk. Výzkum vlivu T-lymfocytů na OA na myších s depletovanými CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty (Hsieh *et al.*, 2013) naznačuje, že T-lymfocyty se mohou přímo podílet na degeneraci chrupavky, a tedy progresi OA.

Další početnou imunitní populací v kloubních výpotcích OA pacientů byly buňky monocyto-makrofágové linie, kterým byla v této práci věnována největší pozornost. Navzdory překryvu fenotypů se podařilo úspěšně rozlišit buňky jednotlivých subpopulací této linie na základě exprese znaků CD14, CD68 a CD163 a byly tak identifikovány populace monocytů, makrofágů a mDC. Přítomnost monocytů v kloubních výpotcích již byla popsána (Firestein *et Zvaifler*, 1987). Byla také popsána přímá korelace mezi mírou infiltrace makrofágů do synoviální tkáně a stupněm rozvoje OA (Benito *et al.*, 2005) a role makrofágů v destruktivních a zánětlivých procesech u OA (Bondeson *et al.*, 2006). Kromě těchto tří subpopulací byla detekována také velká populace CD14<sup>-</sup> buněk. Vzhledem k jejich podobnosti s makrofágy v dalších CD znacích byly tyto buňky označeny jako CD14<sup>-</sup> makrofágům podobné buňky.



Buňky s tímto fenotypem byly pozorovány ve střevě a bylo zjištěno, že fenotyp jejich CD znaků se odlišuje od fenotypu makrofágů v jiných tkáních (Smith *et al.*, 1997). Tato nespecifická populace makrofágů byla taktéž spojena s rozvojem Crohnovy choroby (Kamada *et al.*, 2008).

Poslední majoritní imunitní populací, která byla identifikována ve vzorcích kloubních výpotků OA pacientů, byly neutrofilů. Výskyt neutrofilů v synoviální membráně je nízký (Saito, 2002; Bondeson, 2006; Pessler *et al.*, 2008; Ogdie *et al.*, 2010), což koresponduje s nízkým výskytem neutrofilů u většiny OA pacientů. U 5 pacientů (fenotyp N) byl zjištěn extrémně zvýšený počet neutrofilů s nízkým procentuálním zastoupením ostatních hlavních imunitních populací. Neutrofilů jsou prvními buňkami, které jsou rekrutovány do místa zánětu (Bonnet *et al.*, 2004). Jejich funkce se zánětem úzce souvisí: podílí se na modulaci zánětlivé reakce produkcí cytokinů, prozánětlivých mediátorů a regulací dalších imunitních buněk (Benigni *et al.*, 2017). Rovněž bylo popsáno, že neutrofilů sekretují proteolytické enzymy, které způsobují destrukci chrupavky a kosti (Wright *et al.*, 2010). Výskyt extrémní infiltrace neutrofilů bez prokázané infekční etiologie, jako byl pozorován na našem souboru, dosud nebyl v literatuře popsán. Nebyla však nalezena žádná asociace fenotypu N s klinickými parametry: mírou poškození kosti (převažovala skupina 2), stupněm rozvoje OA (převažoval stupeň 2), bolestivostí kloubu (převažoval stupeň 2), ani BMI. Fenotyp N vyžaduje bližší prozkoumání na větším souboru pacientů.

V další části studie byly zkoumány rozdíly mezi muži a ženami. Bylo zjištěno, že v kloubních výpotcích mužů bylo významně méně buněk monocyto-makrofágové linie. Tento rozdíl lze připsat působení rozdílných hormonů u obou pohlaví. Bylo prokázáno, že estrogen má represivní účinek na buňky monocyto-makrofágové linie, spočívající převážně v potlačování exprese cytokinů a modulaci dalších prozánětlivých mediátorů (Pfeilschifter *et al.*, 2002). Vzhledem k vysokému věku pacientek v souboru lze předpokládat nižší hladinu estrogenu v důsledku menopauzy. Tato nízká hladina pak umožňuje buňkám monocyto-makrofágové linie produkovat ve větší míře cytokiny a prozánětlivé mediátory. S touto hypotézou koresponduje zvýšený výskyt osteoporózy a dalších degenerativních onemocnění kosterní soustavy pozorovaný u žen v postmenopauzálním období (Väänänen *et al.*, 1996).

Konstrukce sítě metodou LRNet odhalila v souboru pacientů pět odlišných fenotypů. U obou pohlaví byl identifikován fenotyp s predominancí buněk monocyto-makrofágové linie a fenotyp s predominancí lymfocytů. Dle dostupných informací je tato

analýza první svého druhu, protože současné poznatky vycházejí ze studií, zabývajících se imunitními buňkami v synoviální membráně (Haynes *et al.*, 2002; Manferdini *et al.*, 2016), nebo pouze jednotlivými populacemi imunitních buněk ve výpotku (Dean *et al.*, 1993; Lande *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2017).

Detailní analýza buněk monocyto-makrofágové linie v kloubních výpotcích OA pacientů odhalila zásadní rozdíly mezi skupinou pacientů s převahou neutrofilů a většinou OA pacientů. U většiny pacientů byly nejpočetnější identifikovanou populací monocyty a dále pak makrofágy a mDC. U pacientů fenotypu N převládaly makrofágy následované monocyty a mDC. Dále byla v linii buněk monocyto-makrofágové linie u obou fenotypů objevena populace CD14<sup>-</sup> buněk. Předpokládá se, že vzájemné působení makrofágů a neutrofilů podporuje a udržuje zánětlivou reakci (Lefkowitz *et al.*, 1995; Lefkowitz *et al.*, 2001). Výsledky získané v této diplomové práci korespondují s touto teorií, jelikož u pacientů s fenotypem N lze pozorovat elevaci v zastoupení obou těchto imunitních populací. Je potřeba dalších studií, které by prokázaly, zda zvýšená infiltrace neutrofilů a makrofágů souvisí s určitým stádiem OA.

Analýza míry exprese znaků CD64, TLR2 a TLR4 u populací monocytů, makrofágů a mDC odhalila významné rozdíly v expresi těchto znaků u zkoumaných populací. Exprese znaku CD64 (receptor protilátek typu IgG) byla nejvyšší u makrofágů, následovaných monocyty a nejmenší pak u mDC. Tamoutounour *et al.* (2012) využili znak CD64 k odlišení makrofágů (CD64<sup>+</sup>) a dendritických buněk (CD64<sup>-</sup>) ve střevě. V této diplomové práci byla potvrzena pozitivita makrofágů na znak CD64, avšak na rozdíl od práce Tamoutounour *et al.* (2012) byl znak CD64 detekován také na mDC, byť ve významně menší míře než u makrofágů. Míra exprese znaků TLR2 i TLR4 byla nejvyšší u makrofágů, menší pak u monocytů a nejmenší míra exprese byla detekována u mDC. Znaky TLR2 a TLR4 jsou toll-like receptory, detekující PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns, molekulární vzory asociované s patogeny; např. lipopolysacharidy, dsRNA ad.) a při navázání ligandu aktivují mechanismy vrozené imunity (Kumar *et al.*, 2011). Jsou přítomné na monocytech, makrofázích a granulocytech (BioLegend, 2018).

Předpokládá se, že zastoupení jednotlivých populací imunitních buněk by mohlo reflektovat konkrétní patologické stavy a že jejich analýza tedy může pomoci v klinice a volbě vhodné léčby.

## 7 Závěr

Tato práce přináší celkový pohled na hlavní populace imunitních buněk v kloubních výpotcích OA pacientů. Bylo zjištěno, že hlavními populacemi jsou lymfocyty, buňky monocyto-makrofágové linie a neutrofilů. Byly identifikovány dva fenotypy u žen i u mužů. U žen byl rozlišen fenotyp s převládající populací buněk monocyto-makrofágové linie a fenotyp s převládající populací lymfocytů; u mužů byl rozlišen fenotyp s převahou lymfocytů a buněk monocyto-makrofágové linie a fenotyp s převahou lymfocytů. Dále byl popsán fenotyp s převahou neutrofilů u obou pohlaví.

U monocyto-makrofágové linie buněk byla provedena detailní analýza, která odhalila, že hlavními subpopulacemi této linie jsou monocyty, makrofágy a mDC. Dále byla detekována velká skupina buněk, které neexprimovaly znak CD14, která dosud v synoviální tekutině nebyla zkoumána. U identifikovaných subpopulací buněk monocyto-makrofágové linie byly sledovány znaky CD64, TLR2 a TLR4 a byly zjištěny signifikantní rozdíly v expresi těchto znaků mezi jednotlivými subpopulacemi.

Tato práce poskytuje nový pohled na zastoupení imunitních populací ve výpotcích OA pacientů a přináší poznatky, které dosud nebyly popsány v literatuře. Zjištěné fenotypy pacientů mohou nalézt využití v klinické praxi při volbě léčby a sledování léčebné odpovědi.

## 8 Použitá literatura

1. Altman R., Asch E., Bloch D., Bole G., Borenstein D., Brandt K., Christy W., Cooke T. D., Greenwald R., Hochberg M., Howell D., Kaplan D., Koopman W., Longley S., Mankin H., McShane D. J., Medsger T., Meenan R., Mikkelsen W., Moskowitz R., Murphy W., Rothschild B., Segal M., Sokoloff L., Wolfe F. (1986): Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis and Rheumatology* 29: 1039–1049.
2. Artis D., Spits H. (2015): The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 517: 293–301.
3. Auffray C., Fogg D., Garfa M., Elain G., Join-Lambert O., Kayal S., Sarnacki S., Cumano A., Lauvau G., Geissmann F. (2007): Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science* 317(5838): 666–670.
4. Auffray C., Sieweke M. H., Geissmann F. (2009): Blood Monocytes: Development, Heterogeneity and Relationship with Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* 27: 669–692.
5. Benito M. J., Veale D. J., FitzGerald O., Van den Berg W. B., Bresnihan B. (2005): Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 64: 1263–1267.
6. BioLegend CD Molecule Chart. [online] [navštíveno 20. 04. 2018] Dostupné na: <https://www.biolegend.com/cdchart>
7. Biolegend Cell Markers. [online] [navštíveno 11. 4. 2018] Dostupné na: [https://www.biolegend.com/cell\\_markers](https://www.biolegend.com/cell_markers).
8. Bondeson J., Wainwright S. D., Lauder S., Amos N., Huges C. E. (2006): The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 8: R187.
9. Bonnet C. S., Walsh D. A. (2004): Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* 44(1): 7–16.

10. Bui C., Barter M. J., Scott J. L., Xu Y., Galler M., Reynard L. N., Rowan A. D., Young D. A. (2012): cAMP response element-binding (CREB) recruitment following a specific CpG demethylation leads to the elevated expression of the matrix metalloproteinase 13 in human articular chondrocytes and osteoarthritis. *The FASEB Journal* 26(7): 3000–3011.
11. Castañeda S., Roman-Blas J. A., Largo R., Herrero-Beaumont G. (2014): Osteoarthritis: a progressive disease with changing phenotypes. *Rheumatology* 53(1): 1–3.
12. Collin M., McGovern N., Haniffa M. (2013): Human dendritic cell subsets. *Immunology* 140(1): 22–30.
13. Dean G., Hoyland J. A., Denton J., Donn R. P., Freemont A. J. (1993): Mast cells in the synovium and synovial fluid in osteoarthritis. *British Journal of Rheumatology* 32(8): 671–675.
14. Delves P. J., Roitt I. M. (1998): *Encyclopedia of Immunology*, second edition. Academic Press, Sand Diego, California, USA.
15. Echtenacher B., Männel D. N., Hültner L. (1996): Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381(6577): 75–77.
16. Fernandes L., Hagen K. B., Bijlsma J. W., Andreassen O., Christensen P., Conaghan P. G., Doherty M., Geenen R., Hammond A., Kjekens I., Lohmander L. S., Lund H., Mallen C. D., Nava T., Oliver S., Pavelka K., Pitsillidou I., da Silva J. A., de la Torre J., Zanolini G., Vliet Vlieland T. P. (2013): EULAR recommendations for the non-pharmacological core management of hip and knee osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 72(7): 1125-1135.
17. Gordon S. (2016): Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* 44(3): 463–475.
18. Grazio S., Balen D. (2009): Obesity: Risk factor and Predictors of Osteoarthritis. *Lijecnicki Vjesnik* 131: 22–26.
19. Haynes M. K., Hume E. L., Smith J. B. (2002): Phenotypic Characterization of Inflammatory Cells from Osteoarthritic Synovium and Synovial Fluids. *Clinical Immunology* 105(3): 315–325.
20. Haynes M. K., Hume E. L., Smith J. B. (2002): Phenotypic characterization of inflammatory cells from osteoarthritic synovium and synovial fluids. *Clinical Immunology* 105(3): 315–325.

21. Heilmann H. H., Lindenhayn K., Walther H. U. (1996): Das Synovia-Volumen gesunder und arthrotischer menschlicher Kniegelenke. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 134(02): 144–148.
22. Holub M., Šterzl I., Kamínková E., Čechová D., Marečková H., Tlaskalová H., Říhová B., Humlová Z., Malíčková K., Petanová J., Zanvit P., Prokešová L. (2007): *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékaře*. Karolinum, Praha.
23. Horčíčka V. (2004): Osteoartróza. *Interní medicína pro praxi* 5: 238–243.
24. Hsieh J. L., Shiao A. L., Lee C. H., Yang S. J., Lee B. O., Jou I. M., Wu C. L., Chen S. H., Shen P. C. (2013): CD8+ T cell-induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 exacerbated osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 14(10): 19951–19970.
25. Human and Mouse CD Marker Handbook. [online] [navštíveno 3. 1. 2018] Dostupné na: [www.bdbiosciences.com/documents/cd\\_marker\\_handbook.pdf](http://www.bdbiosciences.com/documents/cd_marker_handbook.pdf).
26. Jakubzick C. V., Randolph G. J., Henson P. M. (2017): Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology* 17: 349–362.
27. Kamada N., Hisamatsu T., Okamoto S., Chinen H., Kobayashi T., Sato T., Sakuraba A., Kitazume M. T., Sugita A., Koganei K., Akagawa K. S., Hibi T. (2008): Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *The Journal of Clinical Investigation* 118(6): 2269–2280.
28. Keen R. W., Hart D. J., Lanchbury J. S., Spector T. D. (1997): Association of early osteoarthritis of the knee with a Taq I polymorphism of the vitamin D receptor gene. *Arthritis & Rheumatology* 40: 1444–1449.
29. Kellgren J. H., Lawrence J. S. (1957): Radiological Assessment of Osteo-Arthrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 16(4): 494–502.
30. Kersey J. H., Gajl-Peczalska K. J. (1975): T and B lymphocytes in humans. A review. *The American Journal of Pathology* 81(2): 446–457.
31. Khazen W., M'Bika J. P., Tomkiewicz C., Benelli C., Chany C., Achour A., Forest C. (2005): Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS letters* 579: 5631–5634.
32. Kjeldsberg C. R., Knight J. A. (1986): *Body Fluids*. Ed. 2. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, Illinois, USA.

33. Kraus V. B., Stabler T. V., Kong J., Varju G., McDaniel G. (2007): Measurement of Synovial Fluid Volume Using Urea. *Osteoarthritis and Cartilage* 15(10): 1217–1220.
34. Kumar H., Kawai T., Akira S. (2011): Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology* 30(1): 16–34.
35. Kurose R., Ichinohe S., Tajima G., Horiuchi S., Kurose A., Sawai T., Shimamura T. (2010): Characterization of human synovial fluid cells of 26 patients with osteoarthritis knee for cartilage repair therapy. *International Journal of Rheumatic Diseases* 13(1): 68–74.
36. Lakschevitz F. S., Hassanpour S., Rubin A., Fine N., Sun C., Glogauer M. (2016): Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Experimental Cell Research* 342(2): 200–209.
37. Lande R., Giacomini E., Serafini B., Rosicarelli B., Sebastiani G. D., Minisola G., Tarantino U., Riccieri V., Valesini G., Coccia E. M. (2004): Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis. *The Journal of Immunology* 173(4): 2815–2824.
38. Lange-Brokaar B. J. E., Ioan-Facina A., Van Osch G. J. V. M., Zuurmond A. M., Schoones J., Toes R. E. M., Huizinga T. W. J., Kloppenburg M. (2012): Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis and Cartilage* 20(12): 1484–1499.
39. Lefkowitz D. L., Lefkowitz S. S. (2001): Macrophage–neutrophil interaction: A paradigm for chronic inflammation revisited. *Immunology and Cell Biology* 79: 502–506.
40. Lefkowitz D. L., Mills K., Lefkowitz S. S., Bollen A., Moguilevsky N. (1995): Neutrophil–macrophage interaction: A paradigm for chronic inflammation. *Medical Hypotheses* 44(1): 58–62.
41. Li Y. S., Luo W., Zhu S. A. (2017): T Cells in Osteoarthritis: Alterations and Beyond. *Frontiers in Immunology* 8: 356.
42. Mačák J., Mačáková J., Dvořáčková J. (2012): *Patologie: 2., doplněné vydání.* Grada Publishing, Praha.

43. Manferdini C., Paoletta F., Gabusi E., Silvestri Y., Gambari L., Cattini L., Filardo G., Fleury-Cappellesso S., Lisignoli G. (2016): From osteoarthritic synovium to synovial-derived cells characterization: synovial macrophages are key effector cells. *Arthritis Research & Therapy* 18: 83.
44. Mbongue J., Nicholas D., Firek A., Langridge W. (2014): The Role of Dendritic Cells in Tissue-Specific Autoimmunity. *Journal of Immunology Research* 2014: 1–17.
45. Mescher A. L. (2015): Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 14. edition. McGraw-Hill Education. New York, New York, USA.
46. Mundt L. A., Shanahan K. (2011): Graff's Textbook of Routine Urinalysis and Body Fluids, second edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
47. Musumeci G., Aiello F. C., Szychlinska M. A., Di Rosa M., Castrogiovanni P., Mobasher A. (2015): Osteoarthritis in the XXIst Century: Risk Factors and Behaviours that Influence Disease Onset and Progression. *International Journal of Molecular Sciences* 16(3): 6093–6112.
48. Ogdie A., Li J., Dai L., Paessler M. E., Yu X., Diaz-Torne C., Akmatov M., Schumacher H. R., Pessler F. (2010): Identification of broadly discriminatory tissue biomarkers of synovitis with binary and multicategory receiver operating characteristic analysis. *Biomarkers* 15(2): 183–190.
49. Ochodková E., Zehnalová S., Kudelka M. (2017): Graph Construction Based on Local Representativeness. In: *Lecture Notes in Computer Science* 10392: 654–665. Springer, Cham, Německo.
50. OpenStax (2018): *Anatomy & Physiology*. OpenStax CNX, Houston, USA. Dostupné online na: <http://cnx.org/contents/14fb4ad7-39a1-4eee-ab6e-3ef2482e3e22@9.1>.
51. Gallo J., Tüdös Z., Kamínek M., Kalina R., Holibka R., Pilný J., Šos Z., Uvízl M., Špička J. (2011): *Ortopedie pro studenty lékařských a zdravotnických fakult*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká republika.
52. Páč I., Horáčková L. (2009): *Anatomie pohybového systému člověka*. Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, Česká republika.
53. Orkin S. H., Zon L. I. (2008): Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* 132(4): 631–644.



54. Pessler F., Dai L., Diaz-Torne C., Gomez-Vaquero C., Paessler M. E., Zheng D. H., Einhorn E., Range U., Scanzello C., Schumacher H. R. (2008): The synovitis of “non-inflammatory” orthopaedic arthropathies: a quantitative histological and immunohistochemical analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67(8): 1184–1187.
55. Pfeilschifter J., Köditz R., Pfohl M., Schatz H. (2002): Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocrine Reviews* 23(1): 90–119.
56. Rabinovitch M. (1995): Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in Cell Biology* 5(3): 85–87.
57. Saito I., Koshino T., Nakashima K., Uesugi M., Saito T. (2002): Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees. *Osteoarthritis and Cartilage* 10(2): 156–162.
58. Sakkas L. I., Koussidis G., Avgerinos E., Gaughan J., Platsoucas C. D. (2004): Decreased Expression of the CD3 $\zeta$  Chain in T Cells Infiltrating the Synovial Membrane of Patients with Osteoarthritis. *Clinical and Vaccine Immunology* 11(1): 195–202.
59. Serbina N. V., Jia T., Hohl T. M., Pmaer E. G. (2008): Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annual Review of Immunology* 26: 421–452.
60. Schmidt T. A., Gastelum N. S., Nguyen Q. T., Schumacher B. L., Sah R. L. (2007): Boundary lubrication of articular cartilage: Role of synovial fluid constituents. *Arthritis and Rheumatology* 56(3): 882–891.
61. Simon S. I., Kim M. H. (2010): A day (or 5) in a neutrophil's life. *Blood* 116(4): 511–512.
62. Smith P. D., Janoff E. N., Mosteller-Barnum M., Merger M., Orenstein J. M., Kearney J. F., Graham M. F. (1997): Isolation and purification of CD14-negative mucosal macrophages from normal human small intestine. *Journal of Immunological Methods* 202(1): 1-11.
63. Smith P. D., Smythies L. E., Mosteller-Barnum M., Sibley D. A., Russell M. W., Merger M., Orenstein J. M., Kearney J. F., Graham M. F. (2001): Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *Journal of Immunological Methods* 167: 2651–2656.

64. Spector T. D., MacGregor A. J. (2004): Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis and Cartilage* 12: 39–44.
65. Uitterlinden A. G., Burger H., Huang Q., Odding E., Duijn C. M., Hofman A., Birkenhäger J. C., van Leeuwen J. P., Pols H. A. (1997): Vitamin D receptor genotype is associated with radiographic osteoarthritis at the knee. *Journal of Clinical Investigation* 100: 259–263.
66. Väänänen H. K., Härkönen P. L. (1996): Estrogen and bone metabolism. *Maturitas* 23: S65–69.
67. Yang J., Zhang L., Yu C., Yang X. F., Wang H. (2014): Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research* 2: 1–9.
68. Yong L. C. (1997): The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. *Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* 49(6): 409–24.
69. Bartok B., Firestein G. S. (2010): Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews* 233(1): 233–235.
70. Collin M., McGovern N., Haniffa M. (2013): Human dendritic cell subsets. *Immunology* 140(1): 22–30.
71. Nolla H. (2013): Basic Principles in Flow Cytometry. [online] [navštíveno 23. 03. 2018] Dostupné na: [http://flowcytometry.berkeley.edu/Basic\\_Information.html](http://flowcytometry.berkeley.edu/Basic_Information.html).