



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VLIV ELEKTRICKÝCH PULZŮ NA LIDSKÉ KREVNÍ FAGOCYTY

INFLUENCE OF ELECTRICAL PULSES ON HUMAN BLOOD PHAGOCYTES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michaela Chorvátová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Doc. Mgr. Lukáš Kubala, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1387/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Michaela Chorvátová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Doc. Mgr. Lukáš Kubala, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Vliv elektrických pulzů na lidské krevní fagocyty

Zadání diplomové práce:

Cílem práce bude popis možnosti ovlivnění životnosti a funkcí neutrofilních granulocytů elektrickými pulzy s využitím stimulační platformy se sítí zlatých interdigitálních elektrod.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Michaela Chorvátová
student(ka)

Doc. Mgr. Lukáš Kubala, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Fagocytárne bunky cirkulujúce v krvnom riečisku hrajú kľúčovú úlohu ako v obrane organizmu pred patogénmi, tak v patológii zápalových ochorení. Cielené ovplyvnenie ich funkcií má teda potenciálne využitie pre moduláciu imunitnej odpovede, hlavne behom zápalovej fáze. Predložená diplomová práca bola zameraná na sledovanie vplyvu elektrických pulzov na najabundantnejšiu populáciu fagocytov v ľudskej periférnej krvi, a to neutrofilov. Teoretická časť práce popisuje úlohu neutrofilov v rozvoji imunitnej odpovedi a účinky elektrického poľa na rôzne bunky. Ďalšou dôležitou časťou práce bola optimalizácia elektrickej stimulácie buniek s využitím unikátnej platformy so sieťou zlatých elektród. U vyizolovaných neutrofilov stimulovaných elektrickými pulzmi bola sledovaná aktivácia vybraných signálnych dráh, degranulácia, produkcia ROS, citrulinácia histónu H3 a expresia povrchových markerov. Celkovo bolo pozorované, že elektrická stimulácia indukovala aktiváciu neutrofilov, avšak štatisticky významný vplyv bol zaznamenaný len u vložených elektrických pulzov o veľkosti 1 V, a to v prípade produkcie ROS a pri veľkosti pulzov 10 mV a 100 mV u degranulácie metaloproteinázy MMP8. Absencia významných efektov u väčšiny sledovaných parametrov bola pravdepodobne spôsobená nežiadanou aktiváciou neutrofilov v kontrolných vzorkách.

Kľúčové slová

Aktivácia neutrofilov, citrulinácia H3, degranulácia, elektrická stimulácia, MAPK, metaloproteináza, myeloperoxidáza, neutrofilny, povrchové markery neutrofilov, reaktívne druhy kyslíka, zápal.

Abstract

The phagocytic cells circulating in the bloodstream play a key role in both the defense of the body and the pathology of inflammatory diseases. Thus, targeting their functions has potential to modulate an immune response, especially during the inflammatory phase. This master's thesis was focused on the influence of electric pulses on the most abundant phagocyte population in human peripheral blood, namely neutrophils. The theoretical part describes the role of neutrophils in the development of the immune response and the effects of the electric field on various cells. Consequent part of the thesis was the optimization of the electrical stimulation of neutrophils using a unique platform with a network of gold electrodes. In stimulated cells by electrical pulses, activation of selected signaling pathways, degranulation, ROS production, citrullination of histone H3 and expression of surface markers were monitored. Overall, electrical stimulation was observed to induce neutrophil activation but only electrical pulses of size 1 V were found to be statistically significant in the case of ROS production and 10 mV and 100 mV electrical pulses in the case of metalloproteinase MMP8 degranulation. The absence of significant effects in the most observed parameters was probably due to unwanted activation of neutrophils in control samples.

Key words

Activation of neutrophils, citrullination of H3, degranulation, electric stimulation, MAPK, metalloproteinase, myeloperoxidase, neutrophils, surface markers of neutrophils, reactive oxygen species, inflammation.

CHORVÁTOVÁ, Michaela. *Vliv elektrických pulzů na lidské krevní fagocyty*. Brno, 2019. 57 s. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/116141>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. Mgr. Lukáš Kubala, Ph.D..

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne a že som všetky použité literárne zdroje správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana fakulty FCH VUT.

.....

Michaela Chorvátová

Pod'akovanie:

Na tomto mieste by som rada poďakovala predovšetkým vedúcemu svojej diplomovej práce doc. Mgr. Lukášovi Kubalovi, Ph.D. za odborné vedenie, konzultácie a ochotu behom celého vypracovávania práce. Ďalej patrí moja veľká vďaka Mgr. Anne Kocurkovej za jej trpezlivosť a pomoc pri práci v laboratóriu a konzultantovi Ing. Jiřímu Ehlichovi za cenné rady ku teoretickej časti práce. Taktiež ďakujem celému Oddeleniu Biofyziky imunitného systému (BFÚ AV ČR, v.v.i.) za vytvorenie veľmi príjemného pracovného prostredia a v neposlednej rade rodine a blízkym, ktorí ma behom celého štúdia podporovali.

OBSAH

| | | |
|-------|------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | ÚVOD..... | 8 |
| 2 | TEORETICKÁ ČASŤ..... | 9 |
| 2.1 | Imunitný systém..... | 9 |
| 2.1.1 | Imunocyty..... | 9 |
| 2.2 | Neutrofilné granulocyty..... | 11 |
| 2.2.1 | Likvidačné mechanizmy neutrofilov..... | 12 |
| 2.3 | Zápal..... | 17 |
| 2.3.1 | Neutrofilny v zápale..... | 17 |
| 2.3.2 | Liečba zápalu..... | 18 |
| 2.4 | Interakcia elektrického poľa s biologickými systémami..... | 19 |
| 2.5 | Účinky EP na bunky..... | 20 |
| 2.5.1 | Vplyv EP na signálne dráhy..... | 21 |
| 2.5.2 | Ďalšie vybrané možné efekty EP na bunky..... | 23 |
| 2.5.3 | Liečba zápalu pomocou EP..... | 23 |
| 3 | CIEĽ PRÁCE..... | 25 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNA ČASŤ..... | 26 |
| 4.1 | Použitý materiál..... | 26 |
| 4.1.1 | Biologický materiál..... | 26 |
| 4.1.2 | Použité prístroje..... | 26 |
| 4.1.3 | Použité chemikálie..... | 27 |
| 4.1.4 | Zásobné roztoky a pufre..... | 28 |
| 4.2 | Metódy..... | 30 |
| 4.2.1 | Izolácia neutrofilov..... | 30 |
| 4.2.2 | Elektrická stimulácia..... | 31 |
| 4.2.3 | Detekcia proteínov pomocou metódy Western blot..... | 32 |
| 4.2.4 | Detekcia metaloproteináz pomocou ELISA..... | 34 |
| 4.2.5 | Stanovenie myeloperoxidázovej aktivity..... | 35 |
| 4.2.6 | Meranie produkcie ROS..... | 35 |
| 4.2.7 | Analýza povrchových markerov pomocou prietokovej cytometrie..... | 36 |
| 4.2.8 | Štatistická analýza..... | 37 |
| 5 | VÝSLEDKY..... | 38 |
| 5.1 | Detekcia aktivácie MAP kináz..... | 38 |

| | | |
|-----|--------------------------------------------------------|----|
| 5.2 | Stanovenie produkcie metaloproteináz MMP8 a MMP9 | 39 |
| 5.3 | Stanovenie aktivity MPO | 39 |
| 5.4 | Meranie produkcie ROS | 40 |
| 5.5 | Detekcia citrulinácie histónu H3 | 41 |
| 5.6 | Expresia povrchových markerov CD11b a CD15 | 41 |
| 6 | DISKUSIA | 44 |
| 7 | ZÁVER | 47 |
| | ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV | 48 |
| | ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV | 56 |

1 ÚVOD

U človeka tvoria neutrofilny 50 až 70 % všetkých cirkulujúcich leukocytov a sú prvými bunkami vrodenej imunity, ktoré prichádzajú do miesta zápalu z krvného obehu na základe chemotaktických signálov. Po príchode na poškodené miesto rozpoznávajú a eliminujú patogény či iné telu škodlivé látky rôznymi mechanizmami. Hlavným mechanizmom, ktorý neutrofilny využívajú na našu obranu je fagocytóza, pri ktorej "požierajú" svoj cieľ a uzatvárajú ho vo vnútri membránovo viazanej organely tzv. fagozómu. Po zapuzdrení do fagozómu neutrofilny usmrúta patogéna s využitím mechanizmov závislých od NADPH oxidázy (ROS) či antibakteriálnych proteínov, ktoré sa uvoľňujú buď do fagozómu, alebo do extracelulárneho prostredia pri procese známom pod pojmom degranulácia. Tieto antimikrobiálne proteíny však zohrávajú úlohu aj pri tvorbe NETs (neutrofilných extracelulárnych pascí), nie až tak dávno objavenom eliminačnom mechanizme neutrofilov. Neutrofilné extracelulárne pasce vznikajúce pri tomto procese pozostávajú z DNA štruktúr uvoľnených v dôsledku dekonenzácie chromatinu, pričom vo svojej štruktúre majú naviazané práve antimikrobiálne proteíny pochádzajúce z granúl a históny. Tento komplex spolu vytvára sieť, do ktorej je patogén zachytený a následne usmrtený.

Okrem tejto ochrannej funkcie však môžu neutrofilny predstavovať kritické bunky, ktoré príliš dlhým zotrúvaním v miestach zápalu spôsobujú poškodenie tkanív nadmerným vykonávaním likvidačných mechanizmov a navodzujú chronický stav zápalu. A preto kontrolované ovplyvnenie ich funkcií je dôležitou stratégiou pri týchto ochoreniach. V súčasnosti sa k liečbam chronického zápalu využívajú širokospektrálne liečivá, ako sú glukokortikoidy či nesteroidné protizápalové lieky alebo rôzne fyzikálne metódy pre chronické kožné rany. Nevýhodou týchto možností je, že buď neovplyvňujú funkciu neutrofilov, alebo naopak môžu ovplyvňovať ich aktivitu potenciálne škodlivým spôsobom. Elektrická stimulácia by mohla v tomto smere priniesť novú možnosť ovplyvnenia funkcií a životnosti neutrofilov.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

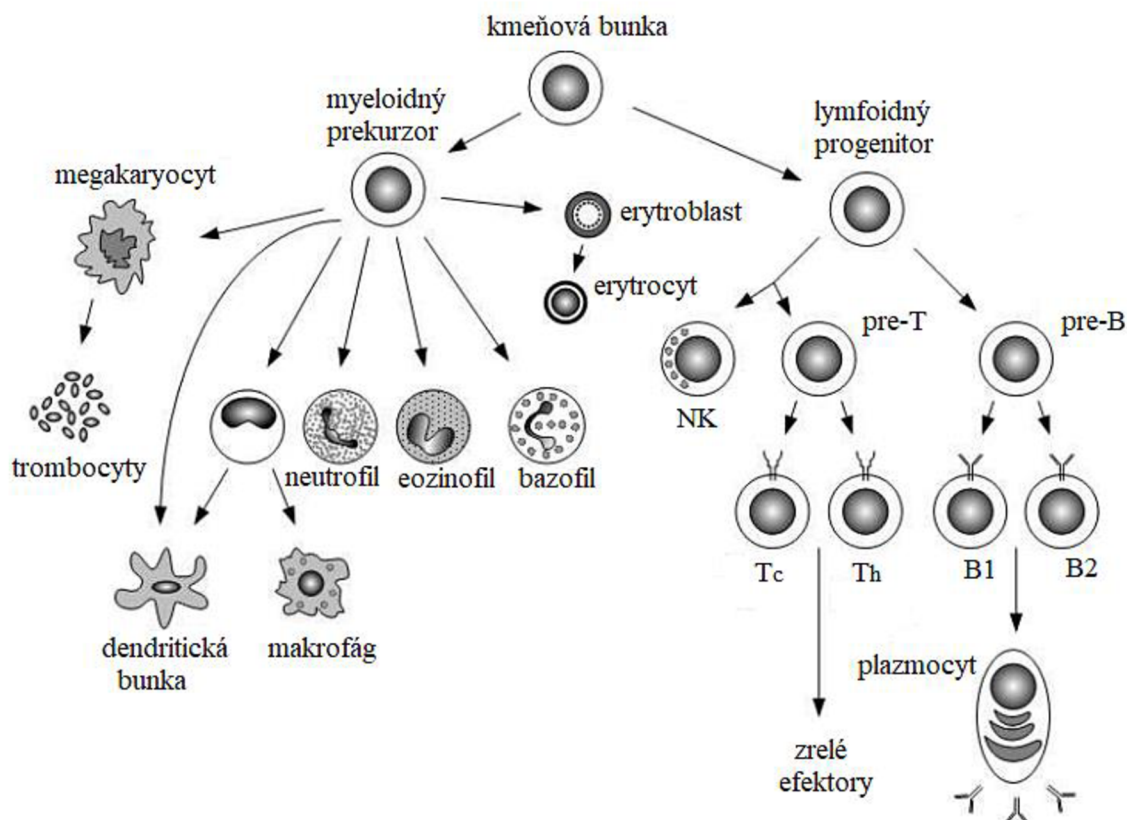
2.1 Imunitný systém

Imunitný systém (z latinského slova *imunis*, čo znamená „voľný“ alebo „nedotknutý“) chráni telo pred škodlivými vplyvmi prostredia a je nevyhnutný pre prežitie. Je zložený zo špecializovaných buniek tzv. imunocytov vrátane ich produktov (napr. protilátky, cytokíny, komplement), bariérových orgánov (koža či sliznica) a niektorých ich fyziologických funkcií (peristaltika, činnosť riasinkového epitelu, kašeľ). Tento systém tak spolu zaisťuje homeostázu a integritu organizmu. [1; 2] Okrem nervového systému je to najkomplexnejší systém, ktorým ľudské telo disponuje. Zdravá imunita dokáže odhaliť a potlačiť infekciu, rozpoznáva hostiteľské bunky ako vlastné, čím ich chráni pred útokom a taktiež má pamäť z predchádzajúceho kontaktu s infekciou. [3]

Imunitnú reakciu vyvolávajú cudzorodé látky alebo vlastné poškodené bunky či tkanivové štruktúry. Imunitné reakcie voči nim zaisťujú vo vzájomnej kooperácii imunitné mechanizmy. Tie možno rozdeliť do dvoch základných kategórií: nešpecifický (vrodený) a špecifický (získaný) mechanizmus. Nešpecifické mechanizmy sú evolučne staršie a pozostávajú zo zložiek bunčných a humorálnych. Bunčné zložky zahŕňajú monocyty, dendritické bunky, makrofágy, granulocyty a prirodzene cytotoxické bunky (NK), ale aj bunky epitelu kože, pľúc a čreva tvoriace rozhranie medzi organizmom a jeho prostredím. Humorálne zložky nešpecifickej imunity tvorí komplementový systém, lektíny, interferóny a iné sérové proteíny. [4; 5] Špecifické mechanizmy reagujú na cudzorodé látky o určitej štruktúre, ktoré nazývame antigény. Tie sa rozpoznávajú prostredníctvom vysoko špecifických molekúl ako sú protilátky, humorálna zložka špecifickej imunity, či antigénne špecifických receptorov B-, T-lymfocytov, bunčná zložka špecifickej imunity. Charakteristickým rysom špecifickej zložky imunity je imunologická pamäť a k úplnému rozvoju špecifickej imunitnej reakcie je treba niekoľko dní až týždňov. [4]

2.1.1 Imunocyty

Imunitnej reakcie sa zúčastňuje veľké množstvo rôznych typov buniek, ktoré sa označujú pod súhrnným pojmom imunocyty. Najvýznamnejšiu úlohu zohrávajú leukocyty. Leukocyty (biele krvinky) majú rozmanitú štruktúru a funkciu, avšak majú spoločný pôvod. Všetky imunocyty (ale aj krvné doštičky a erytrocyty) sa tvoria z pluripotentných kmeňových buniek kostnej drene. [1] Kmeňové bunky sa v dreni udržujú v malom počte celý život. Pod vplyvom rôznych faktorov sa potom ich časť diferencuje na rôzne typy leukocytov (Obr. 1), ktoré potom sprostredkovávajú imunitnú odpoveď. [4]



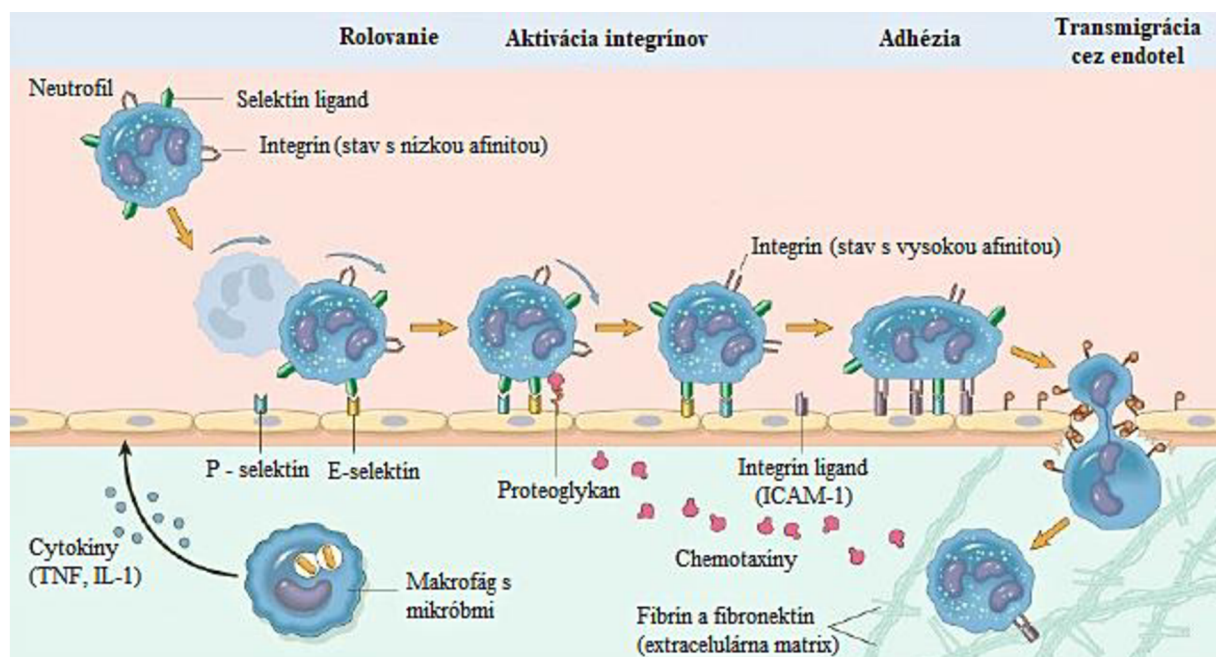
Obr. 1: Diferenciácia leukocytov z kmeňovej bunky. [4]

Leukocyty sa delia na polymorfonukleárne granulocyty a agranulocyty. Základom pre rozdelenie leukocytov do týchto dvoch skupín je prítomnosť či absencia granúl v cytoplazme buniek. [6] Tieto granuly sú pozorovateľné pod mikroskopom po ofarbení buniek. Granulocyty majú vo svojej cytoplazme husto sfarbené granuly a patria k nim eozinofily, bazofily a neutrofil, pričom neutrofil sú najpočetnejším typom a hrajú zásadnú úlohu pri vrodenej obrane pred infekciami. Bazofily a eozinofily majú úlohu pri alergických reakciách a likvidácii parazitov. [7] Medzi agranulocyty sa radia monocyty a lymfocyty. Lymfocyty sa ďalej delia na B- a T- lymfocyty a sú zodpovedné za špecifickú imunitnú odpoveď. Predpona v názve vyplýva z miesta ich diferenciácie, a tým je týmus (T-lymfocyty) alebo kostná dreň (B-lymfocyty). [8] Akonáhle sa aktivujú, spúšťajú rôzne imunitné reakcie. Aktivované B bunky, tiež známe ako plazmatické bunky, produkujú vysoko špecifické protilátky, ktoré sa viažu na agens vyvolávajúce imunitnú odpoveď. T bunky, nazývané pomocné T bunky vylučujú látky, ktoré privolávajú ďalšie imunitné bunky a pomáhajú koordinovať ich odpoveď. Ďalšia skupina nazývaná cytotoxické T bunky zas napadá vírusom infikované alebo inak pozmenené bunky. [9] Monocyty sú charakterizované schopnosťou fagocytovať, produkovať cytokíny a prezentovať antigén. Akonáhle opúšťajú krv a migrujú do tkanív, môžu sa diferencovať na makrofágy a dendritické bunky. [10]

2.2 Neutrofilné granulocyty

Neutrofilné granulocyty (neutrofily), tiež známe ako polymorfonukleárne leukocyty (PMNL), sú najzastúpenejšou zložkou nielen polymorfonukleárných granulocytov, ale aj celkovo leukocytov cirkulujúcich v periférnej krvi človeka. Tieto bunky ako časť vrodeného imunitného systému tvoria hlavnú obrannú líniu proti patogénom. [11; 12] Miestom produkcie neutrofilov je kostná dreň, kde sa z kmeňových buniek diferencujú na zrelé neutrofily vybavené granulami s množstvom antimikrobiálnych látok. Zrelé neutrofily sú z kostnej drene neustále uvoľňované do obehu v počtoch až 10^{11} za deň pri bežných podmienkach. Tieto leukocyty majú pomerne krátky polčas v krvi (kedysi sa predpokladalo, že približne šesť až osem hodín) a následne sú z obehu odstraňované v slezine, pečeni a samotnej kostnej dreni. [13]

V cirkulácii zdravých jedincov sa neutrofily nachádzajú v kľudovom stave, avšak pri zápalových podmienkach, za účelom udržania homeostatických podmienok, aktivované endoteliálne bunky vychytávajú prechádzajúce neutrofily. Tie následne migrujú do miesta infekcie, kde sa pripravujú na interakciu s patogénom a jeho následné zneškodnenie. [14] Celý proces prebieha v niekoľko po sebe nasledujúcich krokoch (Obr. 2).



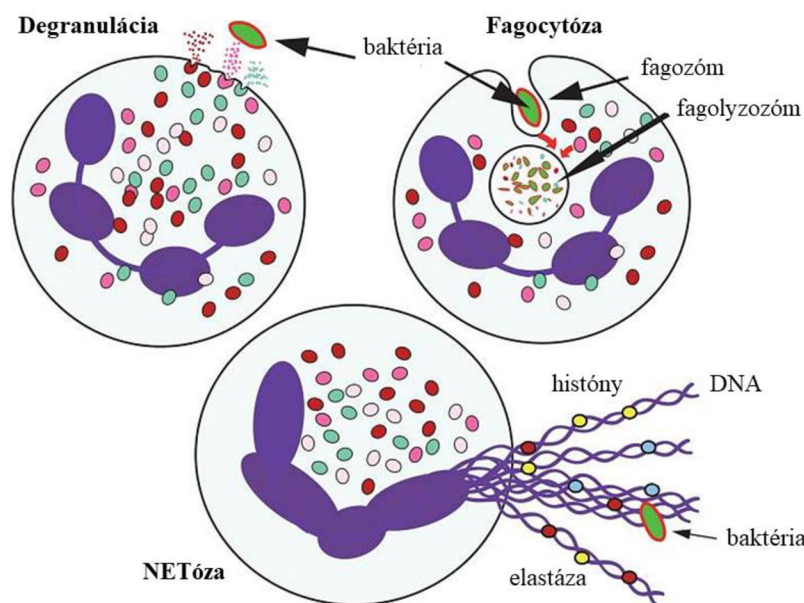
Obr. 2: Prechod leukocytu ku miestu zápalu. [15]

V prvom kroku dochádza ku vytvoreniu slabých a prechodných adhézných interakcií medzi leukocytmi a endoteliálnymi bunkami postkapilárnych venózných stien v tesnej blízkosti zapáleného tkaniva. [16] To je umožnené aktiváciou endoteliálnych buniek sprostredkovanou cytokínmi (napr. TNF, IL-1), ktoré sú produkované mononukleárnymi fagocytmi. Pri tejto aktivácii dôjde ku exprimácii selektínov (P- a E- selektíny) a chemokínov na povrch endoteliálnych buniek. Interakcia selektínov a chemokínov s ich príslušnými ligandmi na povrchu neutrofilov spúšťa aktiváciu integrínov prítomných na povrchu neutrofilov

(napr. Mac-1, LFA-1), ktoré sa viažu na ligandy endoteliálnych buniek (napr. ICAM-1). Tesné väzby medzi integrínmi a ich ligandmi vedú k spomaleniu leukocytov a ku ich pevnej adhézii. Nasleduje rolovanie a plazenie pozdĺž endotelu za účelom nájdenia miesta, v ktorom bude prebiehať transmigrácia neutrofilov z krvného riečiska do zapáleného tkaniva pomocou chemotaktického gradientu. Tento aktívny a usmernený pohyb neutrofilov zaisťujú chemotaktické faktory (chemotaxíny), ktoré sú uvoľňované v mieste zápalu a môžu pochádzať priamo z baktérií (malé peptidy obsahujúce aminokyselinu N-formylmetionín) alebo môžu vznikajúť v organizme (napr. pri aktivácii komplementu). Pre každý chemotaxín existuje na povrchu neutrofilu príslušný receptor, ktorého expresia sa zvyšuje behom zápalu. Medzi tieto receptory patria cytokínové receptory ako TNFRs, ďalej TL receptory, integrínové receptory, FcR a GPC receptory rozpoznávajúce fMLP. [17; 18; 19] Transmigrácia však závisí od mnoho rôznych faktorov, ako je napríklad distribúcia a hustota integrínových ligandov, chemoatraktantov, cytokínov či adhezívnych ligandov. [20]

2.2.1 Likvidačné mechanizmy neutrofilov

Neutrofilý ako prvá línia vrodenných imunitných buniek prichádzajú do miesta bakteriálnej infekcie, kde vyvíjajú rôzne antimikrobiálne mechanizmy zabraňujúce rozšíreniu patogénov (Obr. 3). Akonáhle je identifikovaná cudzia molekula alebo endogénna hrozba začnú neutrofilý spúšťať obranné reakcie zahŕňajúce fagocytózu, degranuláciu či netózu. [21; 11] Neutrofil tiež môže mať regulačné funkcie spojené s produkciou chemokínov a cytokínov, aby upozornil ďalšie bunky v blízkosti nebezpečenstva, a tým maximalizoval imunitnú odpoveď hostiteľa. [14]



Obr. 3: Antimikrobiálne mechanizmy využívané neutrofilmi. Fagocytóza zahŕňa pohlcovanie mikroorganizmu do fagocytárnej vakuoly, ktorá sa po dozretí stáva fagolyzozómom. V tejto novej organele sa mikroorganizmus zničí pôsobením ROS, nízkeho pH a degradujúcimi enzýmami. Neutrofily tiež degranulujú, pričom do prostredia uvoľňujú obsah svojich granúl. Keď je mikroorganizmus príliš veľký na to, aby bol pohltý, neutrofil môže produkovať extracelulárne pasce (NETs) vytvorené DNA vláknami a proteínmi z granúl. [12]

2.2.1.1 Fagocytóza

Fagocytóza je základným mechanizmom imunitného systému pre odstraňovanie patogénov, apoptických a senescentných buniek či iných cudzorodých látok. Neutrofily sú jedným z hlavných typov buniek aktívne zapojených do tohto procesu, a tak prispievajú k udržaniu homeostázy tkaniva a ku obrane pred napadnutím patogénmi. [22] Po kontakte, neutrofily pohltia mikroba do fagocytickej vakuoly nazývanej fagozóm, ktorý sa následne spojí s okolitými lyzozómami (špecifické a nešpecifické granuly neutrofilov) za vzniku fagolyzozómu. V týchto útvaroch sú mikroby a častice usmrcované a rozložené na jednoduché látky. [18; 23]

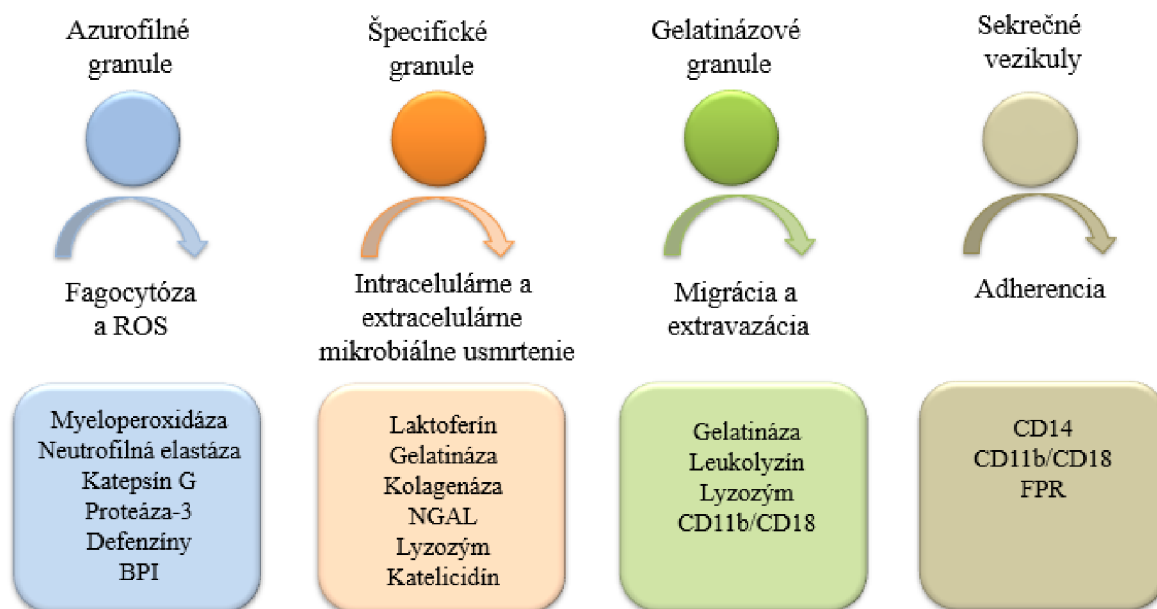
Aktivácia neutrofilov vedie ku tvorbe reaktívnych druhov kyslíka a dusíka (ROS a NOS) produkovaných aktivovanou NADPH oxidázou. [22; 18] ROS sa môžu uvoľňovať extracelulárne do prostredia v mieste infekcie alebo intracelulárne vo fagolyzozóme po fagocytóze baktérie. Po uvoľnení sa superoxidový anión (O_2^-) premení na peroxid vodíka (H_2O_2) spontánne alebo v reakcii katalyzovanej superoxididismutázou. Peroxid vodíka potom môže oxidovať železnaté ióny, pričom sa vytvorí vysoko reaktívny hydroxylový radikál ($\cdot OH$). Navyše, po tomto procese známom ako oxidatívne vzplanutie, enzým myeloperoxidáza (MPO), lokalizovaný v granulách, premieňa peroxid vodíka na vysoko baktericídne pôsobiacu kyselinu

chlóru (HOCl). Tieto kyslíkaté deriváty majú schopnosť obmedziť rast baktérie, pretože môžu difundovať cez membrány bakteriálnych patogénov a poškodzovať ich DNA, membránové proteíny a lipidy. [17]

Súčasne s týmito mechanizmami závislými na kyslíku sú tiež aktivované mechanizmy na kyslíku nezávislé. Tie sú sprostredkované baktericidnými peptidmi a proteázami pochádzajúcimi z granúl neutrofilov. [24]

2.2.1.2 Degranulácia

V prípade, že nenastane fagocytóza a nevznikne fagozóm ďalším z možných mechanizmov usmrtenia mikroorganizmov je degranulácia do vonkajšieho prostredia bunky, ktorá spočíva v exocytóze granúl s obsahom antibakteriálnych látok do prostredia. Neutrofilý obsahujú najmenej štyri rôzne typy granúl, a to primárne (azurofilné), sekundárne (špecifické), terciárne (gelatinázové) granuly a sekrečné vezikuly (Obr. 4). [24]



Obr. 4: Obsah granúl neutrofilov. Azurofilné granuly, ktoré obsahujú kyslé hydrolázy a mikrobicídne proteíny, fúzujú s fagozómami za vzniku fagolyzozómu slúžiaceho pre deštrukciu patogénov. Špecifické granuly saúčastnia ako intracelulárneho, tak aj extracelulárneho mikrobiálneho usmrtenia a sú bohaté na antibiotické látky. Granuly gelatinázové sa mobilizujú, keď neutrofil roluje pozdĺž endotelu a obsahuje enzýmy degradujúce matricu a membránové receptory. Sekrečné vezikuly obsahujú membránové receptory, ktoré sú kľúčové pre chemotakticky riadenú migráciu a pre vytvorenie pevného kontaktu s endotelom. [25]

Primárne granuly sú hlavným miestom pre uskladnenie najtoxickejších mediátorov. Obsahujú myeloperoxidázu a spektrum neutrofilných serinových proteáz (NSP) ako katepsín G, neutrofilná elastáza, proteáza-3 a proteáza-4. NSP sú rozhodujúcim faktorom pre efektívne fungovanie neutrofilov a výrazne prispievajú k imunitnej ochrane proti bakteriálnym infekciám. Napr. neutrofilná elastáza môže priamo usmrtiť gramnegatívne baktérie *E. coli* štiepením ich bielkovín na vonkajšej membráne, čo vedie ku strate integrity membrány

a následnej smrti bunky. V primárnych granulách sa tiež nachádza kationový antimikrobiálny peptid, baktericídny proteín zvyšujúci permeabilitu (BPI), ktorého väzba na lipopolysacharidy (LPS) vedie ku zvýšeniu permeability bakteriálnej membrány, hydrolýze fosfolipidov a nakoniec ku smrti baktérie. [26; 27]

Sekundárne granuly neobsahujú myeloperoxidázu a sú charakteristické prítomnosťou laktoferínu. Tento glykoproteín viažúci železo je prítomný vo väčšine biologických tekutín cicavcov a uvoľňuje sa z neutrofilov počas zápalových reakcií. Na ochranu pred baktériami využíva dva hlavné mechanizmy. Blokuje vstup patogénov kompetitívne sa viažúcich na bunkové receptory ako sú glykozaminoglykány alebo degraduje virulenciu proteínov produkovaných baktériami pomocou ich proteolýzy. Špecifické granuly však okrem laktoferínu obsahujú širokú škálu ďalších antimikrobiálnych zlúčenín ako napr. kalprotektín, katelicidín LL-37, s gelatinázou asociovaný lipokalín (NGAL) a lyzozým. [27]

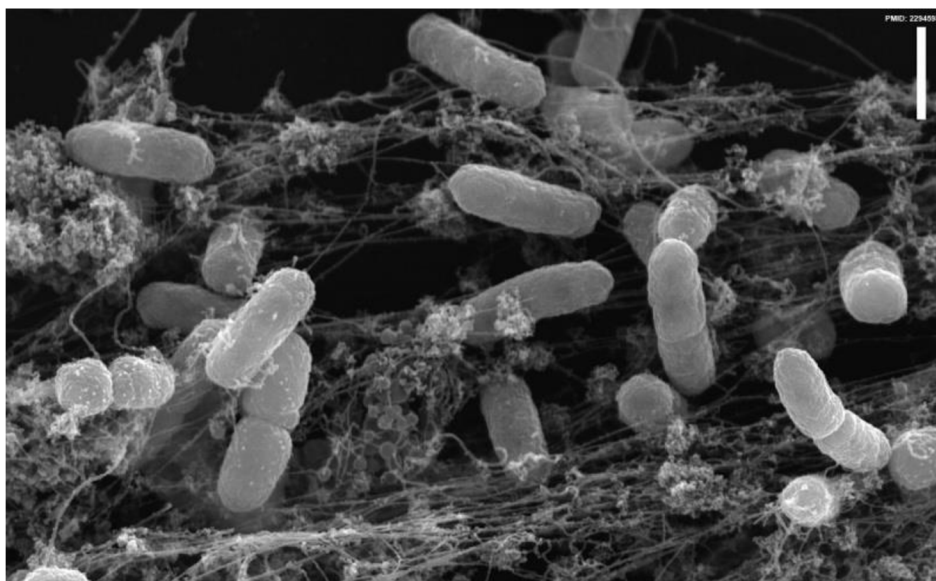
Terciárne granuly tiež nazývané gelatinázové sú chudobné na antimikrobiálne látky, ale slúžia ako miesto pre uskladnenie mnohých metaloproteináz, ako je gelatináza (MMP9) a kolagenáza (MMP8), ktoré sú schopné degradovať všetky druhy proteínov extracelulárnej matrice. [27; 28]

Sekrečné vezikuly slúžia ako zásobné organely membránových proteínov obalených okolo matrice plazmových proteínov. Sú vytvorené endocytózou počas dozrievania neutrofilov v kostnej dreni. Behom degranulácie sekrečné vezikuly inkorporujú svoju membránu do povrchovej membrány neutrofilov a sú plne integrované do povrchu počas transendoteliálnej migrácie neutrofilov. Úplná charakterizácia obsahu proteínov v sekrečných vezikulách ešte nie je známa. [14]

Ku degranulácii dochádza až vo chvíli, keď sú aktivované signálne dráhy vedúce od receptorov umiestnených na povrchu bunky alebo vo vnútri fagozómu. Takýto signál aktivuje procesy v cytoplazme vedúce ku presunu granúl ku bunecnej alebo fagozomálnej membráne a následnej sekrécii ich obsahu. Toto je dôležitý kontrolný mechanizmus, pretože neutrofilové sú bohaté na proteázy, ktoré môžu poškodzovať aj vlastné tkanivá. [29]

2.2.1.3 NETóza

Okrem fagocytózy a degranulácie neutrofilové tiež používajú antibakteriálnu stratégiu pomocou pôsobenia neutrofilných extracelulárnych pascí (NETs). Kontakt baktérie s fagocytmi spôsobí, že neutrofilové extrudujú 3D štruktúru pozostávajúcu z dekonenzovanej DNA/histónov, ktorá nesie so sebou antimikrobiálne peptidy a enzýmy uvoľnené z granúl. Tento celý proces je známy pod pojmom NETóza a môže byť spúšťaný v reakcii na lipopolysacharidy, GM-CSF a IL-8. NETs sú zložené z vlákien DNA asociovaných s histónmi a antibakteriálnymi proteínmi. Tento komplex spolu vytvára sieť, do ktorej sa môže patogén zachytiť a následne je usmrtený antimikrobiálnymi peptidmi (Obr. 5). [27; 30]



Obr. 5: *Baktéria Salmonella chytená v NETs. [31]*

Proteíny NETs sú primárne kationové (DNA-viažúce) baktericídne proteíny zahŕňajúce históny, defenzíny, neutrofilnú elastázu, proteázu-3, katepsín G, laktoferín a myeloperoxidázu. Obzvlášť významnou komponentou NETs je komplex S100A8/9 známy ako kalprotektín, ktorý tvorí 40 % neutrofilných cytosolických proteínov, ktoré sú lokalizované na NETs. Tieto proteíny umožňujú usmrcovať druhy *Candida* a zamedziť rast *Aspergillus fumigates*. [14]

Dekondenzácia chromatinu je spojená s citrulináciou histónu H3. Citrulinácia je posttranslačná modifikácia, ktorá vedie ku konverzii arginínu na citrulín a je katalyzovaná skupinou enzýmov závislých na vápniku známych ako peptidylarginínindeiminázy (PAD). Tento proces je dôležitý pre formovanie neutrofilných extracelulárnych pascí. [21] Mechanizmus tvorby NETs je tiež úzko spojený s tvorbou ROS. Produkcia ROS je zodpovedná za aktiváciu azurozómu, proteínového komplexu zloženého z MPO, serínovej proteázy, neutrofilnej elastázy a katepsínu G. Produkovaný peroxid vodíka je spotrebovaný myeloperoxidázou za tvorby kyseliny chlórnej a iných oxidantov. Generácia oxidantov pomocou MPO uvoľňuje neutrofilnú elastázu z azurozómu, čo umožňuje jej translokáciu do jadra. Následne v jadre napomáha dekonenzácii chromatinu, ktorá je kľúčovou udalosťou v tvorbe NETs. Nakoniec sa cytoplazmatické prostredie zmieša s jadrovým materiálom, pretože membrána jadra a cytoplazmy sa rozpadajú, čo vedie k uvoľneniu neutrofilných extracelulárnych pascí. [21; 27]

2.3 Zápal

Zápal je súhrnom fyziologických reakcií ako odpoveď na porušenie integrity organizmu, ktoré vedú ku ochrane proti infikovaniu poškodeného miesta, ku jeho lokalizácii a následne zahojeniu. Za vyvolanie zápalu sú zodpovedné rozličné štruktúry, medzi ktoré patria hlavne infekčné mikroorganizmy, ale taktiež môžu zápal vyvolať poranenia spôsobené chemickými alebo fyzikálnymi vplyvmi. [4] Zápalové reakcie sú charakterizované bolesťou, začervenaním, teplom a opuchmi v mieste infekcie, čo odráža tri typy zmien v zasiahnutých cievach. Prvou je zväčšenie priemeru ciev vedúce ku zvýšenému prekrveniu, a tým ku zvýšeniu tepla a začervenaníu. Namiesto toho, aby boli pevne spojené, sa endoteliálne bunky obklopujúce stenu cievy separujú, a to následne vedie ku prestupu tekutín a bielkovín z krvi a ich lokálnej akumulácii v tkanive. To sa prejaví opuchom a bolesťou, ale aj akumuláciou plazmatických proteínov napomáhajúcich v obrane hostiteľa. Druhá zmena spočíva v tom, že endoteliálne bunky na povrchu ciev sa aktivujú, čo vedie ku exprimovaniu adhezívnych molekúl, ktoré podporia väzbu cirkulujúcich leukocytov. Po pripojení leukocytov ku endotelu nasleduje ich prienik do tkanív (známy pod pojmom extravazácia), kde môžu splniť svoju obrannú funkciu. Akonáhle začne zápal, prvé bunky prirahované ku miestu infekcie sú neutrofilové. Nasledujú monocyty a v neskorších štádiách zápalu sa vyskytujú aj iné leukocyty ako eozinofily a lymfocyty. [8]

Zápal je ústrednou zložkou imunitnej odpovede. Existujú dva typy zápalu, a to akútne a chronické. Akútne pretrváva v rádoch niekoľkých minút, hodín či dní a dochádza ku kompletnému zahojeniu poraneného tkaniva. Naproti tomu chronické zápal pretrváva dlhšie a vždy vedie v určitej miere ku deštrukcii tkaniva a jeho následnému nahradzovaniu väzivom. Zatiaľ čo akútne zápal je fyziologickou obrannou reakciou, chronické zápal je obvykle patologické a môže byť spôsobené príliš dlhým či opakovaným vystavením toxickým činidlám, alebo aj ako dôsledok autoimunitných ochorení, kedy imunitný systém nie je schopný rozoznávať antigény vlastných tkanív od cudzích. [4; 32]

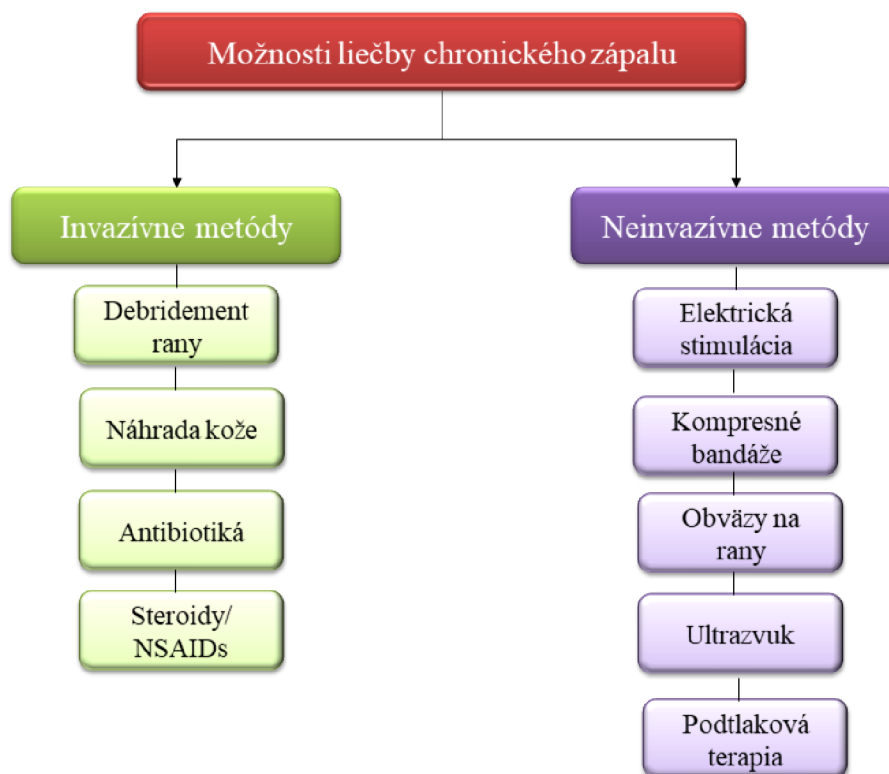
2.3.1 Neutrofilové v zápale

Neutrofilové sú prvými bunkami prichádzajúcimi ku miestam infekcie, a preto zohrávajú kľúčovú úlohu v zápalových procesoch. [33] Tieto bunky môžu byť rýchlo aktivované prozápalovými stimulmi, pričom migrujú na infikované a zapálené miesto, kde bojujú proti infekcii a pokiaľ je stav zápalu akútne dôjde ku plnej reparácii poškodeného tkaniva. Chemokíny, lipidové mediátory, fragmenty komplementu a produkty rozpadu tkanív spúšťajú migráciu neutrofilov do chorých tkanív. Pri lokálnej aktivácii uvoľňujú transmigrované neutrofilové svoje cytotoxické efekty, proteázy a oxidanty, ktoré spôsobujú poškodenie tkaniva. [33; 34] V tom prípade, ak teda zápal prejde do chronického, ochranná funkcia a špecifita neutrofilov je narušená a nesprávne nasmerovaná proti vlastným bunkám. [34] Niektoré stavy chronických zápalov sú charakterizované až príliš dlhým prítokom neutrofilov, a to napr. pri cystickej fibróze, chronickej obštrukčnej chorobe pľúc, reumatoidnej artritíde, ateroskleróze, zápale obličiek či

kardiovaskulárnych ochoreniach. U chorôb ako Lupus a chronická parodontálna choroba boli zas pozorované zmeny vo funkčnosti neutrofilov, a to nízka hustota granúl, znížená schopnosť fagocytózy a zvýšená tvorba NETs. [12; 35] Celkovo možno konštatovať, že chronické zápalové procesy sú závažným patologickým procesom vyskytujúcim sa naprieč ľudskou populáciou a je potreba ich liečiť. V súčasnosti existujú rôzne liečebné postupy, ktoré budú diskutované v nasledujúcom texte.

2.3.2 Liečba zápalu

Ako typický príklad chronického zápalu a liečby týchto ochorení boli vybrané kožné chronické rany. V súčasnosti existujú rôzne liečebné stratégie na liečbu chronického zápalu, a to fyzikálne alebo chemické metódy. Niektoré z nich sú invazívne, ako je napr. debridement rany a substitučná kožná terapia, zatiaľ čo iné sú neinvazívne, ako napr. kompresné bandážovanie, krytie rán, hyperbarická kyslíková terapia či ultrazvuk (Obr. 6). [36] Tieto metódy môžu byť drahé, časovo náročné a príliš pomalé. Pri použití chemických agents ako sú steroidy či nesteroidné protizápalové lieky (NSAIDs) zas existujú rôzne nebezpečné vedľajšie účinky pri ich dlhodobom používaní. [37]



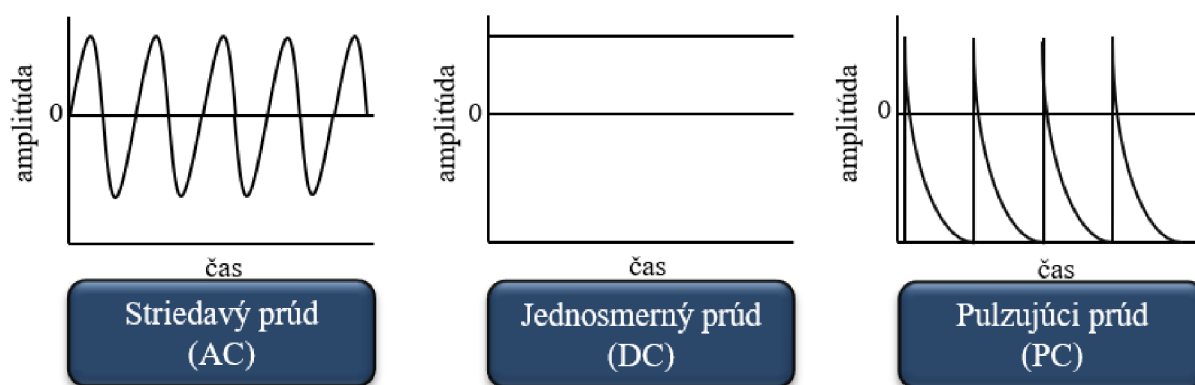
Obr. 6: Vybrané metódy pri liečbe chronického zápalu. [38]

Napriek množstvu možností tak zostáva liečba chronického zápalu významnou ekonomickou záťažou a klinickým problémom. Využitie elektrickej stimulácie na liečbu akútnych aj chronických rán predstavuje neinvazívnu terapiu s minimálnymi vedľajšími účinkami. [38; 39]

2.4 Interakcia elektrického poľa s biologickými systémami

Ako prvý, kto zmeral elektrický prúd v oblasti zranenej ľudskej pokožky bol nemecký fyziológ Emil Du Bois-Reymond, a to pred viac než 150 rokmi. Zistil, že zranenie, ktoré narušuje epiteliálnu vrstvu okamžite generuje endogénne elektrické pole (EP). [40] Od tej doby sa začala rozvíjať moderná elektrofyziológia a bolo preukázané, že endogénne generované elektrické prúdy majú rozhodujúcu úlohu v dôležitých biologických procesoch ako napr. v embryogenézi, oprave či remodelácii tkanív, ale tiež v normálnom raste organizmu. [41]

Po zistení, že endogénne EP je vo vysokej miere zapojené do procesu hojenia sa v posledných desaťročiach oblasť výskumu presunula ku terapii s externe aplikovaným EP. [40] Externé EP môže byť definované ako neendogénne bioelektrické pole generované z externých zdrojov energie aplikované na bunky či tkanivá pomocou elektród. V súčasnosti sa v experimentoch *in vitro* používajú rôzne druhy elektrickej stimulácie. Lišiť sa môžu typom vloženého elektrického prúdu (jednosmerný, striedavý, pulzujúci prúd atď.) alebo rozsahom stimulačných parametrov (amplitúda, frekvencia, trvanie). [39; 41; 42]



Obr. 7: Najvyužívanejšie formy elektrického prúdu pri liečbe akútnych a chronických rán. [38]

Pre štúdie *in vitro* a *in vivo* sú komerčne dostupné rady elektrických stimulačných zariadení. Materiály, ktoré sa využívajú pre elektródy sú uhlík, platina, irídium, zlato, titan, volfrám, platinovo-irídiové zliatiny, nitrid titaničitý či nehrdzavejúca oceľ. [39; 41] Nasledujúca Tab. 1 zhrňa rôzne druhy materiálu pre elektródy, ktoré sú v súčasnosti využívané pre stimuláciu buniek a tkanív.

Tab. 1: *Elektródy využívané pre in vitro a in vivo elektrickú stimuláciu buniek a tkanív. [41]*

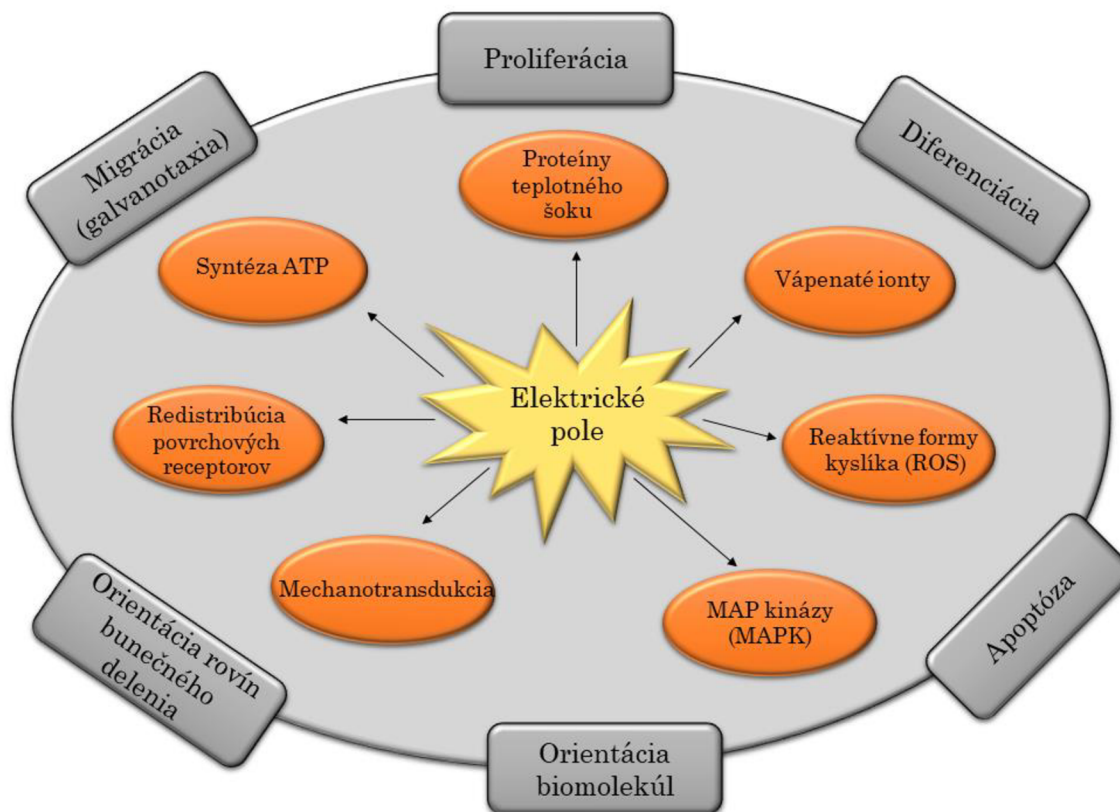
| <i>Materiál elektród</i> | <i>Stimulované bunky/tkanivá</i> |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Uhlík | 2D a 3D bunkové kultúry srdca 2D kultúry neuroblastómu a Schwann buniek |
| Platina | 2D a 3D kultúry C2C12 svalových buniek |
| Zliatina platiny a irídia | Hlboká mozgová stimulácia a elektródy kochleárných implantátov |
| Zlato | 3D kultúry kardiomyocytov |
| Titan, Nitrid titánu | Kardiomyocyty v Matrigel skafolde |
| Volfrám | Mozgová stimulácia |
| Tantal | Elektródy kardiostimulátoru |
| Zliatina niklu a chrómu (Nichrom) | Periférna nervová stimulácia |
| Zliatina niklu a titánu (Nitinol) | Endovaskulárne neurálne rozhrania |
| Nehrdzavejúca oceľ | Endokrinné žľazy u potkanov a embryonálne kmeňové bunky myši; 2D kultúry ľudských mezenchymálnych kmeňových buniek |

V klinickom prostredí sa teraz elektrická stimulácia pomocou externého EP využíva intenzívne, hlavne pre oživenie poškodených a postihnutých tkanív v nervosvalovom systéme a pre urýchlenie hojenia zranených muskuloskeletálnych tkanív, ako je kosť či kĺbová chrupavka. Spoločne tieto biofyzikálne mechanizmy prispievajú ku potlačeniu ochorení kostí typu osteoartróza a osteonekróza. Ďalej bolo tiež dokázané, že priama stimulácia mozgu je prínosná pre liečbu Parkinsonovej choroby, a to zlepšením symptómov prostredníctvom stimulácie bazálnych ganglií. [41; 43] Elektrická stimulácia sa tiež používa v niekoľko ďalších disciplínach ako je elektroanalgezia na kontrolu chronickej bolesti, kardiostimulátory na reguláciu tepu, kochleárna stimulácia na podporu sluchu a obnovenie mobility ľudí s ochrnutými končatinami. [36]

2.5 Účinky EP na bunky

Elektrické ovplyvnenie biologických systémov/buniek s EP môže vyvolať priaznivé biochemické a fyziologické reakcie za predpokladu, že dĺžka expozície a sila EP je v rámci limitov tolerancie. Vplyv EP na osud mnohých buniek v organizme je známy, avšak prevládajúci mechanizmus jeho interakcie s biologickými systémami nie je stále úplne jasný.

[41] U rôznych typov buniek cicavcov vrátane kmeňových buniek je dobre preskúmaná rada rozličných molekulárnych mechanizmov aktivovaných stimuláciou pomocou EP.



Obr. 8: Schéma molekulárnych mechanizmov aktivovaných pôsobením EP na bunky. [41]

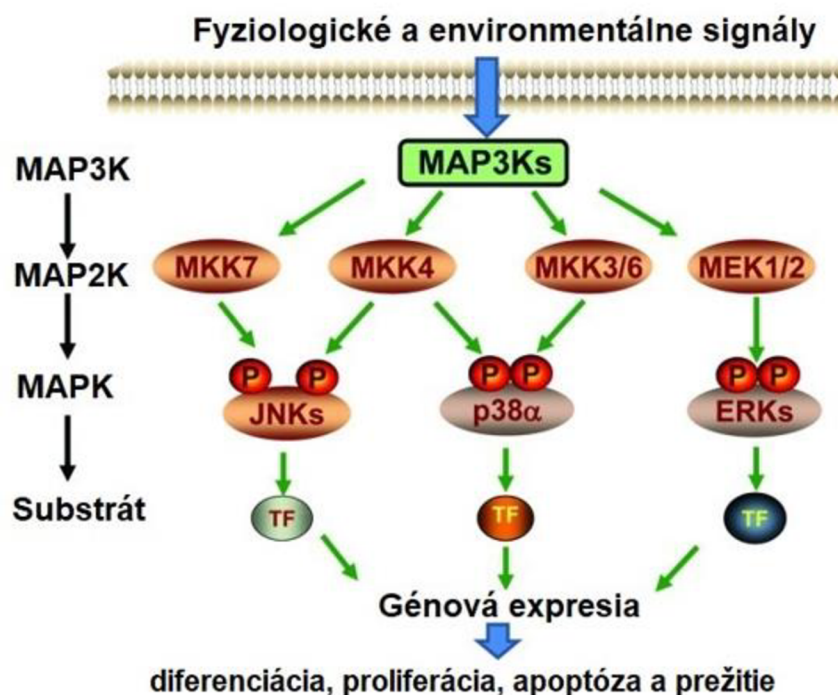
Ako je možné vidieť na Obr. 8, EP ovplyvňuje v bunkách radu signálnych dráh bunecných procesov a fyziologických funkcií. Elektrické pole moduluje hladiny intracelulárneho vápnika, sekundárneho mediátora riadiaceho početné bunkové procesy a signalizačné kaskády, ktoré zas riadia proliferáciu a diferenciáciu buniek. EP môže tiež ovplyvňovať migráciu buniek, orientáciu buniek počas mitózy či navodiť riadenú bunkovú smrť- apoptózu. [41; 43] V nasledujúcom texte sú vybrané vplyvy EP diskutované podrobnejšie.

2.5.1 Vplyv EP na signálne dráhy

Aktivácia signálnych dráh je jedným z možných mechanizmov, ktorým elektrická stimulácia ovplyvňuje funkciu bunky. Stimulácia pomocou EP môže spustiť aktiváciu citlivých receptorov na bunkovej membráne, ako je receptor epidermálneho rastového faktora (EGFR) a receptor acetylcholínu. Aktivácia týchto receptorov iniciuje intracelulárne dráhy ako PI3K/Akt, integrín, Rho a MAPK kaskáda. [43]

Mitogénom aktivované proteinkinázy tiež známe ako MAP kinázy (MAPKs) sú rodinou serín/treonín kináz, ktoré sa podieľajú na riadení bunkových odpovedí na širokú škálu extracelulárnych signálov vrátane EP. [43] Signálna MAPK kaskáda predstavuje mechanizmus,

ktorý bunke umožňuje vnímať extracelulárne signály a reagovať na ne vhodným spôsobom. Sekvenčná aktivácia proteinkináz v tejto dráhe sprostredkováva reguláciu spektra biologických dejov ako je proliferácia, diferenciácia, metabolizmus či apoptóza v závislosti na type stimulu a bunke. [44] U cicavcov sú známe tri hlavné MAPK podskupiny, a to JNK, p38 a ERK. MAPKs ležia v kaskáde proteinkináz. MAP kináza je aktivovaná niekoľkostupňovou fosforylačnou kaskádou kináz, v ktorej v každom kroku predchádzajúca kináza aktivuje nasledujúcu, pričom aktivovaná MAP3K aktivuje MAP2K a tá nakoniec aktivuje MAPK (Obr. 9). [45; 46]



Obr. 9: Schéma rôznych typov MAPK, intracelulárnych enzýmov, ktorých aktivácia extracelulárnymi signálmi ovplyvňuje bunkovú aktivitu a funkciu. [47]

MAPKs sú aktivované prostredníctvom fosforylácie hydroxyly na zvyškoch treonínu a tyrozínu a aktivovaná MAPK následne môže fosforylovať ďalšie proteíny v cytoplazme a jadre. [45; 46] Zvýšená MAPK aktivita indukovaná EP bola zaznamenaná u diferenciácie leukemickej bunčnej línie HL-60. [41] Štúdie s fibrosarkómom a gliómovými bunkami preukázali, že EP spúšťa tvorbu peroxidu vodíka prostredníctvom aktivácie NADPH oxidázy. Nadmerná produkcia superoxidu počas tohto procesu podporuje fosforyláciu ERK, čo následne vedie ku MAPK aktivácii, reorganizácii cytoskeletu a migrácii. Iné štúdie tiež uvádzajú účasť MAPK signálnej dráhy v galvanotaxii, spolu s ďalšími bukovými odpoveďami na EP. [43]

2.5.2 Ďalšie vybrané možné efekty EP na bunky

Jedným z bezprostredných účinkov z hľadiska bunkovej odpovede na stimuláciu pomocou EP je zvýšenie hladiny intracelulárneho vápnika. Zvýšenie hladiny sa uskutočňuje dvoma základnými spôsobmi, a to buď prívodom Ca^{2+} z extracelulárneho priestoru cez iónové kanály uložené v plazmatickej membráne, alebo uvoľňovaním Ca^{2+} z vnútorných zásob v endoplazmatickom retikulu (ER) prostredníctvom špecializovaných receptorov/kanálov na ER. Vápnikom sprostredkovaná signalizácia reguluje mnoho rôznych bunkových procesov a ovplyvňuje takmer každý aspekt života bunky. [41]

Membránové ATPázy sú schopné absorbovať definované kvantá elektrickej energie z elektrických polí so špecifickou frekvenciou a veľkosťou, čo môže byť využité na reguláciu aktivity membránových proteínov. Keď aplikované pole zasiahne mitochondriálnu membránu, môže zvýšiť a urýchliť syntézu ATP. Preto by mohol byť každý bunkový proces, ktorý je obmedzený energetickou dostupnosťou vyvážený aplikovaným elektrickým prúdom. ATP je kriticky dôležitá molekula pre fungovanie prakticky každej bunky a jej syntéza a spotreba môže byť urýchlená pomocou elektrickej stimulácie. [41; 48]

Mnoho bunkových procesov je spúšťaných a kontrolovaných pomocou väzieb receptor-ligand. Bolo preukázané, že externé EP je schopné spôsobiť zmeny v distribúcii receptora. Tieto zmeny môžu ovplyvňovať bunkové odpovede, a to zmenou kinetiky alebo afinity interakcií medzi ligandom a receptorom. [49]

Nedávne výskumy naznačujú, že glykolipidy v plazmatickej membráne sa môžu pod vplyvom EP redistribuovať a zhromažďovať do nanodoménových štruktúr, známych tiež pod pojmom lipidové rafty. Následná polarizácia raftov vedie ku riadenej migrácii buniek. Lin a spol. nedávno preukázali vznik raftov a bunkovú migráciu riadenú EP. Lipidové rafty sa tiež môžu podieľať na mnohých biologických javoch, ako sú axonálne výrastky nervových buniek či u hojenia rán a imunitných reakcií. [50]

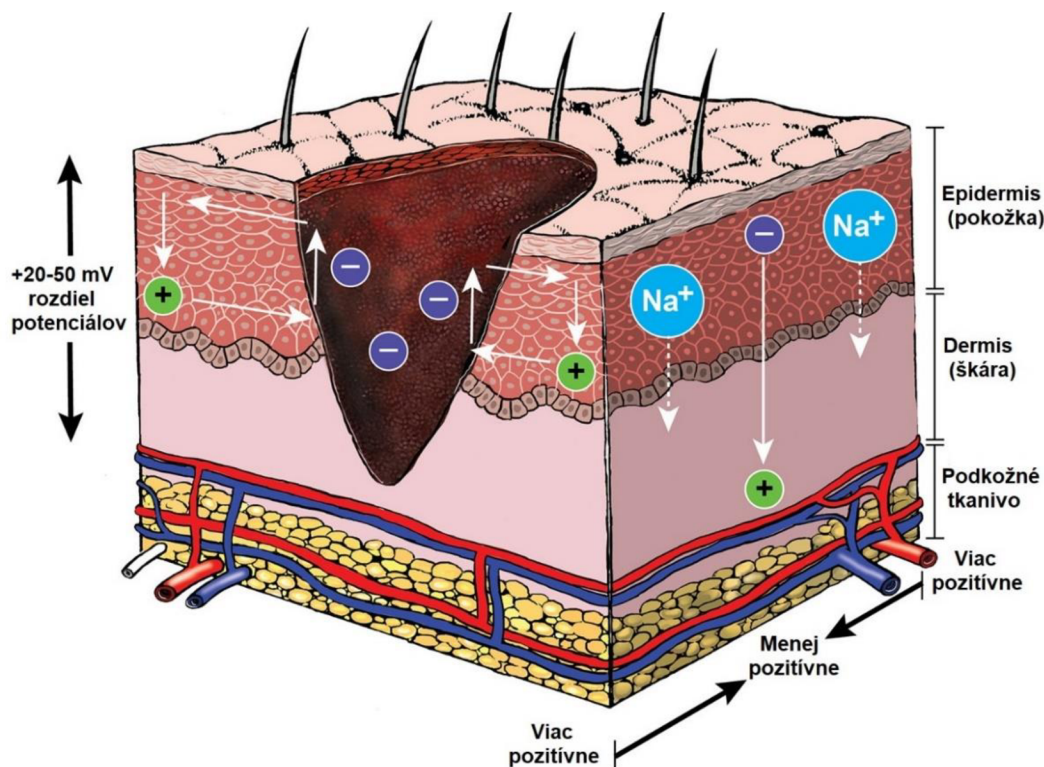
Tieto efekty EP boli okrem experimentov na kmeňových bunkách [41] testované aj na rôznych iných typoch buniek podieľajúcich sa na hojení rán, ako sú makrofágy, fibroblasty, epidermálne bunky, baktérie či endoteliálne bunky. Taktiež sa preukázali zmeny v bunkovej migrácii, proliferácii a orientácii, zvýšení syntézy proteínov a dokonca aj antibakteriálne účinky EP. [36]

2.5.3 Liečba zápalu pomocou EP

EP sa využíva v liečbe rôznych ochorení spojených s chronickým zápalom. Najčastejšie uplatnenie zatiaľ nachádza v liečbe chronických kožných rán. Kožné rany vytvárajú endogénne EP, ktoré sa zúčastňuje mnohých procesov hojenia rán. Tieto pozorovania viedli k hypotéze, že aplikovaná elektrická stimulácia môže podporovať chronické hojenie rán imitáciou prirodzeného elektrického prúdu, ktorý sa vyskytuje v kožných zraneniach (Obr. 10). [51]

Pri aplikovaní elektrickej stimulácie *in vivo* klinické štúdie preukázali priaznivé účinky na uzatváranie rany a rýchlosť hojenia. Okrem toho, bola zaznamenaná aj zvýšená angiogenéza, kontrakcia rany a antibakteriálne účinky. [36]

Ukázalo sa, že nielen ľudská koža ale aj mozog, svaly, srdce a kosti produkujú prirodzené elektrochemické signály. [36]



Obr. 10: Nepoškodená koža má určitý endogénny elektrický potenciál, čo je spôsobené aktívnym transportom sodíkových iónov cez Na^+/K^+ ATPázové pumpy v epiderme. Narušením epitelu začne vplyvom tohto endogénneho potenciálu prechádzať prúd nazývaný ako "prúd poranenia". Tento potenciál o veľkosti približne 10-60 mV je merateľný v okolí rany cca 2-3 mm a smeruje negatívnym pólom ku strede jamy a pozitívnym k jej okrajom, čím priťahuje bunky ku rane. Prúd je udržiavaný vo vlhkom prostredí a prestane pôsobiť pri vyschnutí rany. [36; 51]

Okrem chronických kožných rán sa aplikuje terapia pomocou EP pre liečbu zápalových ochorení ako lupienka, tendinitída, reumatoidná artritída [52], osteoartritída či neuritída. [37] Existuje však značná variabilita vo forme aplikovaného elektrického poľa, trvaní liečby, dávke a type rany. [36]

3 CIEĽ PRÁCE

Aj napriek množstvu experimentov preukazujúcich vplyv elektrického poľa na rôzne typy buniek sú neutrofily skupinou, ktorá v tomto ohľade významne zaostáva. Našou hypotézou je, že elektrická stimulácia spôsobuje aktiváciu neutrofilov. Cieľom práce bude overenie tejto hypotézy a objasnenie efektov pôsobenia elektrického poľa na neutrofilné granulocyty. Za týmto účelom boli vybrané parametre pre vykonanie experimentálnej časti zobrazené v nasledujúcej schéme.



Obr. 11: Schéma zobrazujúca vybrané parametre pre experimentálnu časť práce.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Biologický materiál

V tejto práci bola použitá krv zdravých darcov, ktorá bola odobratá odbornou sestrou v súlade s etickým povolením na Biofyzikálnom ústave AV ČR, v.v.i. po podpísaní informovaného súhlasu. Krv bola ihneď spracovaná za účelom zisku neutrofilov.

4.1.2 Použité prístroje

Tab. 2: Prístroje použité pre experimentálnu časť.

| <i>Spoločnosť, Zem pôvodu</i> | <i>Prístroj</i> |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------|
| ACEA Biosciences, USA | Stimulačná platforma E-Plate 16 |
| Bandelin, Nemecko | Sonikátor HD2070 sonopuls |
| BD Biosciences, USA | Prietokový cytometer BD FACSVers TM |
| BDL, UK | Vodná kúpeľ SUB Aqua Pro |
| Benchmark Scientific, USA | Roler TubeRoller, Trepáčka BV1000 Vortex mixer |
| BioRad, USA | Aparatúra pre SDS-PAGE a Western blot |
| Biosan, Litva | Termoblok Thermo-shaker TS-100C |
| Eppendorf, Nemecko | Centrifuga 5417R, Centrifuga 5804R, Mini Spin Plus |
| Grant Instruments, UK | Vodný kúpeľ SUB Aqua Pro |
| HANNA Instruments, UK | pH meter pH211 Microprocessor pH Meter |
| IKA, Nemecko | Vortex Lab Dancer vario Yellow Line |
| Innovatis, Švajčiarsko | Počítač buniek CASY Cell Counter |
| Lovibond, UK | Inkubátor BOD Incubator TC 135S |
| Nikon, Japonsko | Mikroskop Eclipse TS100 |
| OWON Technology, Čína | Generátor funkcií AG2052F |
| SLT, Rakúsko | Premývačka Microplate Washer F109121S 96PW |
| Tecan, Švajčiarsko | Fluorimeter Infinite M200, Spektrofotometer Sunrise |

4.1.3 Použité chemikálie

Tab. 3: Používané chemikálie behom experimentálnej časti.

| <i>Spoločnosť, Zem pôvodu</i> | <i>Chemikálie</i> |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abcam, UK | Anti-Histone H3 protilátka (citrulline R2 + R8 + R17) (5103) ChIP Grade |
| Agfa HealthCare, Belgicko | Ustáľovač G354, Vývojka G150 |
| Aditiva, Česká republika | Sušené odtučnené mlieko |
| Amresco, USA | BSA |
| Braun Melsungen AG, Nemecko | Voda na injekcie, Chlorid sodný 0,9% |
| Bio-Rad Laboratories, USA | B-merkaptóetanol |
| Cell Signaling Technology, USA | Protilátka: Anti-rabbit IgG-HRP, p38 MAPK, Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), SAPK/JNK, Phospho-SAPK/JNK (T183/Y185), p44/42 MAPK (ERK1/2), Phospho-p44/42 MAPK |
| Fluka BioChemika, Švajčiarsko | PMSF |
| Lachema, Česká republika | Glycerol, Bromfenolová modrá |
| Life Technologies, India | Amplex UltraRed Reagent; CD15 [HI98], Anti-human, Host mouse, FITC |
| ONEX, Česká republika | Octan sodný trihydrát |
| PAN-Biotech, USA | RPMI-1640 médium |
| Penta, Česká republika | Metanol, Chlorid sodný, Etanol 96% |
| Pierce, USA | BCA™ Protein Assay Reagent A, B |
| R&D Systems, USA | Duaset ELISA Kit Human MMP-9, Duaset ELISA kit Human Total MMP-8 |
| Roche, Švajčiarsko | Fosfatázové inhibičné tablety (PhosSTOP), Proteázové inhibičné tablety (cOmplete ULTRA) |
| SERVA Electrophoresis GmbH, Nemecko | SDS, TRIS, APS |
| Sigma-Aldrich, Nemecko | Dextran T 500 z <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; Akrylamid/Bis-akrylamid 30%, APS, EDTA, HEPES, Želatína, Histopaque 1077, Tween 20, TEMED, Peroxid vodíka 30%, TMB, DMF 99,8% |
| Sony Biotechnology, USA | CD11b, Anti-mouse/human, APC |
| SDT, Nemecko | Substrát s(HS)TMB |
| Thermo Fisher Scientific, USA | PageRuler™ Plus Prestained Protein ladder 26620; SuperSignal West Femto Chemiluminiscent Substrate; SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate |

4.1.4 Zásobné roztoky a pufre

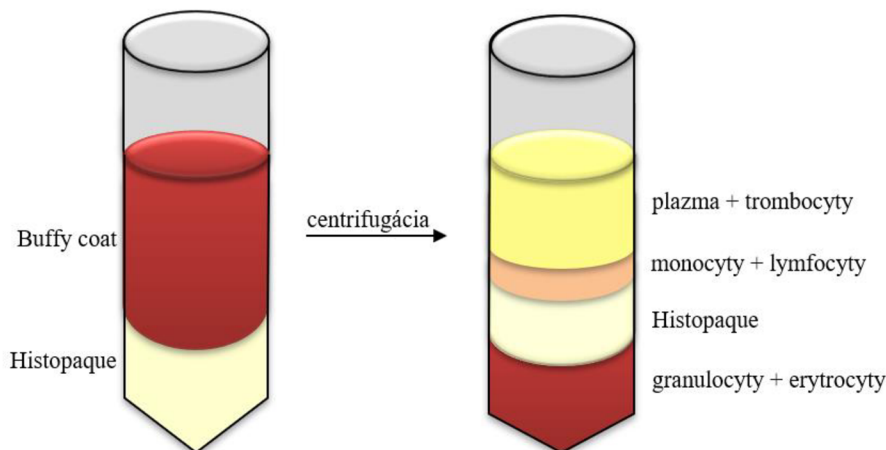
| | |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Acetátový pufer</i> (pH 4,4) | 4,08 g octan sodný trihydrát; doplnené do 100 ml destilovanou H ₂ O; pH upravené na 4,4; uchovávané v chladničke |
| <i>Laemmli pufer</i> (5x koncentrovaný) | 200 mM TRIS-HCl pH 6,8; 5% β-mercaptoethanol; 200 mM DTT; 5% SDS; 0,03% brómfenolová modrá; zamrazené na -20 °C |
| <i>Lyzačný pufer</i> | 50 mM TRIS-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl, 10% glycerol, 1% SDS; 1 mM EDTA; PhosStop a cOmplete ULTRA tablety; PMSF; uchovávané pri RT |
| <i>NaCl (1,8% roztok)</i> | 1,8 g NaCl; rozpustené v 100 ml destilovanej vody; prefiltrované cez filtračnú membránu (0,22 μm); sterilne rozplnené po 5 ml do skúmaviek; uchovávané v chladničke |
| <i>PBS pufer</i> (pH 7,5) | 8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2 g KH ₂ PO ₄ ; 2,3 g Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O; doplnené do 1000 ml destilovanou H ₂ O; pH upravené na 7,5; uchovávané pri 4 °C |
| <i>Roztok TMB</i> (20 mM) | 4,8 mg TMB; 1 ml DMF; uchovávané v chladničke |
| <i>Roztok H₂O₂</i> (60 mM) | 38 μl H ₂ O ₂ ; 5 ml destilovaná H ₂ O |
| <i>RPMI médium</i> | 10,39 g kompletne práškové RPMI-1640; rozpustené v 900 ml destilovanej H ₂ O; po 30 minútach pH znížené (max. na pH 4,2); po úplnom rozpustení pH upravené späť na hodnotu 7,2; pridané 0,94 g Na ₂ CO ₃ a pH upravené na 7,3; doplnené do 1000 ml destilovanou H ₂ O; prefiltrované cez filtračnú membránu (0,22 μm); sterilne rozplnené po 60 ml; uchovávané v chladničke |
| <i>RPMI I médium</i> | RPMI médium; 0,1% želatína; 20 mM HEPES |
| <i>Running pufer</i> (5x koncentrovaný) | 15,25 g TRIS; 72,1 g glycín; 5 g SDS; pH upravené na 8,3 a doplnené do 1000 ml destilovanou H ₂ O; používať 1krát koncentrovaný riedený destilovanou H ₂ O; uchovávané pri RT |
| <i>Transfer pufer</i> (10x koncentrovaný) | 30,3 g TRIS; 144,9 g glycín; 5 g SDS; pH upravené na 8,3 a doplnené do 1000 ml destilovanou H ₂ O; používať 1krát koncentrovaný (100 ml 10krát koncentrovaný + 200 ml MeOH + 700 ml destilovaná H ₂ O); uchovávané pri RT |
| <i>TBST pufer</i> (10x koncentrovaný) | 30 g TRIS; 5 ml Tween 20; 2 g KCl; 80 g NaCl; pH upravené na 7,6 a doplnené do 1000 ml destilovanou H ₂ O; k premytiu membrán používať 1krát koncentrovaný riedený destilovanou H ₂ O; uchovávané pri RT |
| <i>0,5M TRIS HCl pufer</i> (pH 6,8) | 6,057 g TRIS báza; 0,298 g EDTA; 60 ml destilovaná H ₂ O; pH upravené na 6,8 a doplnené do 100 ml destilovanou H ₂ O; uchovávané pri 4°C |

| | |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>1,5M TRIS HCl pufer (pH 8,8)</i> | 18,171 g TRIS báza; 0,298 g EDTA; 80 ml destilovaná H ₂ O; pH upravené na 8,8 a doplnené do 100 ml destilovanou H ₂ O; uchovávané pri 4°C |
| <i>5% mlieko (blokovací roztok)</i> | 5 g sušené odtučnené mlieko; 100 ml 1x TBST; uchovávané pri -20 °C |
| <i>1% želatína (blokovací roztok)</i> | 5 g želatína; 100 ml 1x TBST; uchovávané pri -20 °C |

4.2 Metódy

4.2.1 Izolácia neutrofilov

Používané látky (PBS, RPMI, voda pre hemolýzu, Histopaque 1077 a 1,8% roztok NaCl) boli pred izoláciou umiestnené do RT. Dextran bol predhriaty umiestnením do inkubátora pri 37 °C. Neutrofilý boli separované pomocou gradientovej centrifugácie (viď Obr. 12).

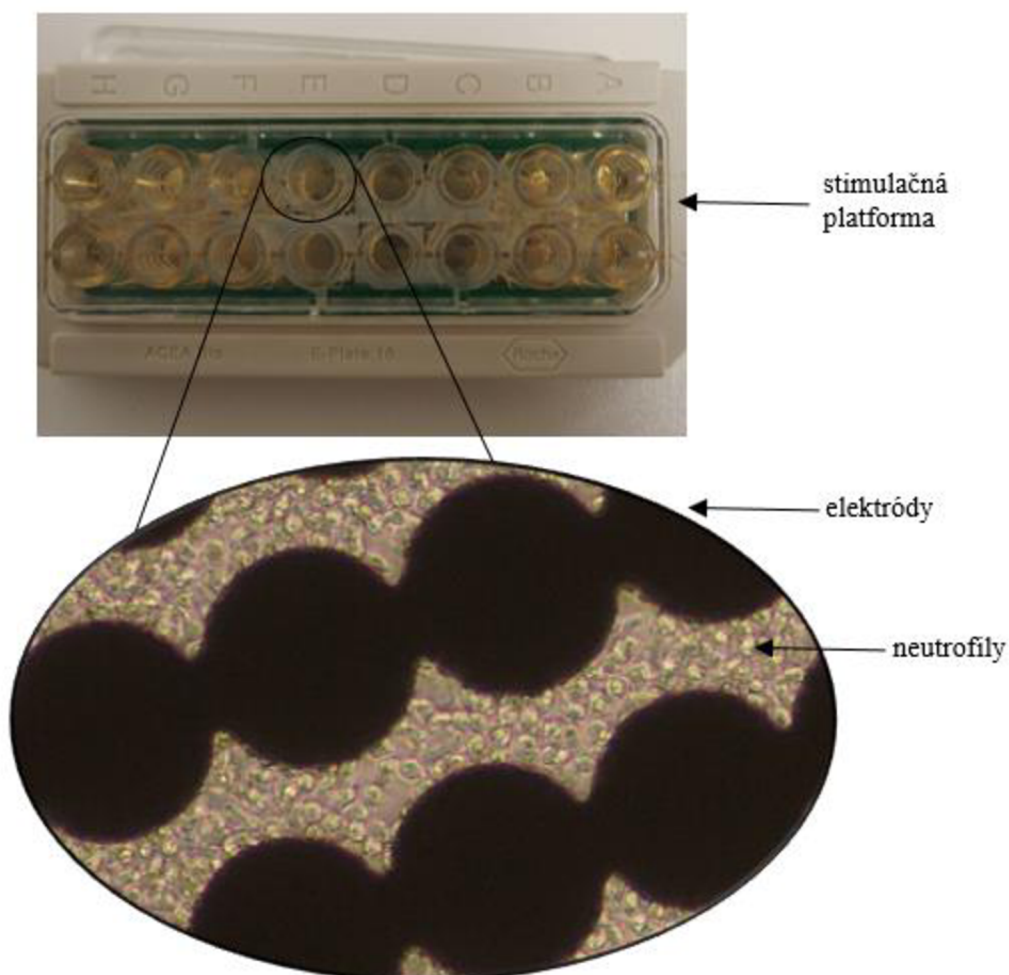


Obr. 12: Metóda separácie neutrofilov je založená na rozdielnej hustote separovaných buniek. Pri aplikovaní odstredivej sily sa častice pohybujú médiom s gradientom hustoty (Histopaque 1077), pričom každá bunka bude sedimentovať do tej časti, ktorej hustota sa rovná hustote bunky.

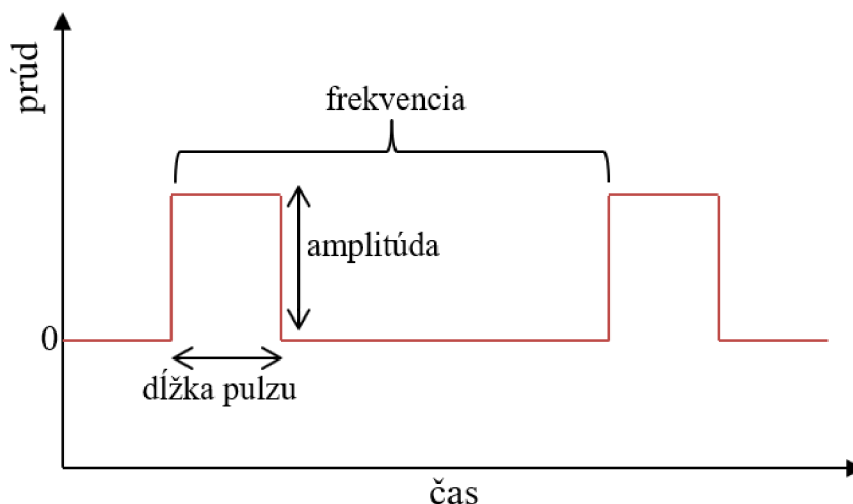
Bolo odobrané 20 ml krvi od zdravého darcu do striekačky obsahujúcej citrát sodný (100 μ l citrátu na 1 ml krvi). Takto odobraná krv bola rýchlo a jemne zmiešaná s 10 ml 3% dextransu v centrifugačnej skúmavke a nechaná po dobu 45 minút pri RT pre sedimentáciu erytrocytov na dno skúmavky. Supernatant (buffy coat) bol odobraný a opatrne navrstvený na 10 ml Histopaque 1077 v skúmavke tak, aby vzniklo ostré rozhranie medzi oboma roztokmi. Leukocyty s Histopaque 1077 boli centrifugované pri 390g 30 minút pri RT, bez brzdy (0) a s minimálnou akceleráciou (1). Supernatant bol vyliaty, pričom na dne skúmavky zostal pelet neutrofilných granulocytov s erytrocytmi, ktoré bolo potreba hemolyzovať. Hemolýza bola prevedená tak, že k peletu v skúmavke bolo pridané 5 ml destilovanej vody pre injekcie a po dobu 30 s bol obsah skúmavky opatrne premiešavaný Pasteurovou pipetou (hemolýzu je možné opakovať). K peletu s vodou bolo potom po uplynutí 30 s pridané 5 ml 1,8% NaCl, a to pre vyrovnanie osmolality, nasledované premiešaním Pasteurovou pipetou. Celkový objem v skúmavke bol doplnený na 45 ml pomocou PBS. Následne bola prevedená centrifugácia pri 190g po dobu 10 minút pri RT s akceleráciou (9) a brzdou (9) na maximum. Supernatant bol odliaty a k bunkám opatrne pridaný 1 ml média RPMI, v ktorom boli bunky premiešané Pasteurovou pipetou. Nasledovným krokom bolo stanovenie počtu neutrofilov a ich viabilita na počítači buniek CASY (Innovatis, Švajčiarsko). Nakoniec boli neutrofilý nariedené v RPMI na požadovanú koncentráciu $4 \cdot 10^6$ buniek/ml. Ihneď po nariedení nasledovala elektrická stimulácia.

4.2.2 Elektrická stimulácia

Jamky stimulačnej platformy (ACEA Biosciences, USA) boli vymyté etanolom denaturovaným s metanolom a potom ešte trikrát s destilovanou vodou. Izolované a nariadené neutrofily o koncentrácii $4 \cdot 10^6$ buniek/ml boli v množstve 100 μ l napipetované do jamôk stimulačnej platformy a ponechané 30 minút v inkubátore pri 37 °C. Po uplynutom čase bolo pod optickým mikroskopom (Nikon, Japonsko) skontrolované, či neutrofily naadherovali na jamky platformy (viď Obr. 13). Následne boli neutrofily stimulované pomocou elektrických pulzov o frekvencii 1 Hz a dĺžke pulzu 100 ms po dobu 10 minút. Boli vkladané pulzy o veľkosti elektrického napätia 10 mV, 100 mV a 1 V (viď Obr. 14) a ako negatívna kontrola slúžili jamky, do ktorých sa nevpušťaťali žiadne pulzy (0 V). Po tejto stimulácii bola stimulačná platforma inkubovaná po rôzne dlhú dobu pri 37 °C. Spracovanie vzoriek pre analýzy je ďalej uvedené v nasledujúcich kapitolách popisujúcich jednotlivé metodologické postupy.



Obr. 13: Ukážka naadherovaných neutrofilov v jamke stimulačnej platformy zachytená na optickom mikroskope.



Obr. 14: Schéma vkladanych elektrickych pulzov. Frekvencia pulzov bola zvolená na 1 Hz, dĺžka pulzov na 100 ms a veľkosť amplitúdy bola menená postupne na 10 mV, 100 mV a 1 V.

4.2.3 Detekcia proteínov pomocou metódy Western blot

Western blot je metóda využívaná pre kvalitatívne a semikvantitatívne stanovenie proteínu vo vzorke. Pri tejto technike sa zmes proteínov separuje na základe molekulovej hmotnosti, pričom proteíny sú následne prenesené na membránu. Membrána sa potom inkubuje s protilátkami špecifickými pre daný proteín, ktoré umožnia jeho vizualizáciu.

4.2.3.1 Príprava vzoriek

Pre prípravu vzoriek na detekciu proteínov bola platforma s neutrofilmi inkubovaná 1 h pri 37 °C. Po 1 h bol obsah jamky odobraný a k peletu v jamkách bolo pridaných 100 µl lyzačného pufru, ktorý sa nechal pôsobiť 5 min a následne bol odobraný do skúmaviek typu Eppendorf. Ďalej boli vzorky povarené po dobu 5 min v termobloku (Biosan, Litva) pri 100 °C a sonikované 5 s pri najnižšej intenzite pomocou sonikátoru (Bandelin, Nemecko). Následne bola u nich stanovená koncentrácia proteínov s využitím kitu BCA™ Protein Assay Reagent A, B (Pierce, USA). Tento kit pracuje na princípe dvoch reakcií. Najprv nastáva redukcia meďnatého kationtu Cu^{2+} , ktorý pochádza z $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, na meďný kation Cu^+ . Nasleduje reakcia Cu^+ kationtu s kyselinou bicinchonínovou za vzniku fialového komplexu, ktorý sa dá stanoviť spektrofotometricky, pričom intenzita sfarbenia je priamo úmerná koncentrácii proteínov. Vzorky boli po vyhodnotení spektrofotometrického merania na prístroji Sunrise (TECAN, Rakúsko) nariadené na približne rovnakú koncentráciu, a to 600 µg/ml. Následne bol ku vzorkám pridaný Laemmli pufer v pomere 1:4 (1 diel pufru ku 4 dielom vzorky) a vzorky boli znova povarené 5 min v termobloku pri 100 °C. Zahriatie vzoriek v prítomnosti SDS, ktorý sa nachádza v Laemmli puffri spôsobí narušenie primárnej, sekundárnej a kvartérnej štruktúry proteínov. Takto pripravené vzorky boli uchovávané v mrazničke pri -20 °C.

4.2.3.2 Elektroforetická separácia proteínov

Pre separáciu proteínov bola použitá metóda SDS-PAGE, pri ktorej sú vplyvom SDS proteíny denaturované, získavajú negatívny náboj a putujú v elektrickom poli ku kladnej elektróde.

Prvým krokom bola príprava gélov potrebných pre separáciu (vid' Tab. 4). Nasledovalo rozmrazenie vzoriek a ich povarenie po dobu 5 min pri 100 °C v termobloku. Takto pripravené homogénne vzorky boli pipetované po 20 μ l (na jamku 10 μ g) do jamôk gélu, pričom bolo vždy do každého gélu napipetované aj 3 μ l štandardu (Thermo Fisher Scientific, USA), ktorý slúžil na aproximáciu veľkosti proteínu a monitorovanie separácie. Nasledovalo spustenie SDS-PAGE (BioRad, USA), pri ktorej došlo ku separácii proteínov podľa molekulových hmotností. Na začiatku bolo napätie nastavené na 90 V pre fokusáciu vzoriek, potom bolo zvýšené na 120 V až do konca separácie. Celá separácia trvala približne dve hodiny.

Tab. 4: Zloženie gélov pre 4 gély o hrúbke 1,5 mm.

| | 12% rozdeľovací gél | Hrebienkový gél |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------|
| Destilovaná H ₂ O [ml] | 10 | 13 |
| 1,5 M TRIS pH 8,8 [ml] | 7,5 | - |
| 0,5 M TRIS pH 6,8 [ml] | - | 5,6 |
| Akrylamid 30% [ml] | 12 | 4 |
| SDS 10% [ml] | 1,8 | 1,8 |
| TEMED* [μ l] | 45 | 45 |
| APS* 10% [μ l] | 250 | 250 |

* APS a TEMED boli do gélu pridávané vždy ako posledné zložky

4.2.3.3 Prenos proteínov

Separované proteíny boli prenesené na polyvinylidendifluoridovú membránu pomocou blotovacieho zariadenia (BioRad, USA), kedy došlo k presunu proteínov z gélu na povrch membrány pôsobením jednosmerného elektrického prúdu o veľkosti 230 mA po dobu pôsobenia 2,5 h. Po celú dobu bola aparátúra chladená pomocou ľadu a ľadových bločkov. Následne boli membrány blokované umiestnením do blokovacieho roztoku, aby neskôr nedošlo ku nešpecifickej väzbe protilátok na povrch membrány. Blokovanie prebiehalo po dobu 1 h pri RT na roleri (Benchmark Scientific, USA).

4.2.3.4 Imunodetekcia proteínov

Po blokovaní boli membrány inkubované cez noc pri 4 °C na roleri so zriedenou primárnou protilátkou pripravenou v blokovačom roztoku, pričom primárna protilátka špecificky interagovala so skúmaným proteínom. Pre odstránenie prebytočnej nenaviazanej protilátky boli potom membrány premyté trikrát v TBST pufri a následne inkubované v roztoku sekundárnej protilátky nariadenej v blokovačom roztoku po dobu 1 h na roleri (koncentrácie protilátok a blokovačie roztoky vid' Tab. 5). Sekundárna protilátka viažúca primárnu protilátku bola konjugovaná s chrenovou peroxidázou. Po inkubácii boli membrány opäť trikrát premyté v TBST pufri. Potom bol na membrány nanesený chemiluminiscenčný substrát obsahujúci luminol. V prítomnosti chrenovej peroxidázy bol luminol oxidovaný, čo viedlo ku vzniku produktu v excitovanom stave. Tento produkt sa stabilizoval uvoľnením fotónov svetla, čo bolo zaznamenané na rádiografickom filme (Agfa, Belgicko). Množstvo svetla bolo priamo úmerné množstvu chrenovej peroxidázy, a tým teda aj množstvu proteínu.

Tab. 5: Riedenie použitých protilátok pre dané proteíny.

| <i>Detegovaný proteín</i> | <i>Blokovačie roztoky</i> | <i>Primárna protilátka</i> | <i>Sekundárna protilátka</i> |
|-----------------------------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|
| p38 MAPK | 5% mlieko | 1:1000 | 1:3000 |
| Phospho-p38 MAPK | 5% mlieko | 1:1000 | 1:2000 |
| p44/42 MAPK (Erk 1/2) | 5% mlieko | 1:1000 | 1:3000 |
| Phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) | 5% mlieko | 1:1000 | 1:2000 |
| Anti-Histone H3 (citrulline R2 + R8 + R17) | 1% želatína | 1:500 | 1:3000 |

4.2.4 Detekcia metaloproteináz pomocou ELISA

Pomocou nepriamej ELISA bola v supernatantoch zo vzoriek z neutrofilov o koncentrácii $4 \cdot 10^6$ buniek/ml stanovovaná koncentrácia metaloproteináz MMP9 (gelatináza) a MMP8 (kolagenáza) uvoľnených z buniek pri degranulácii. Všetky použité roztoky, štandardy a pufer boli pripravené podľa priloženého návodu ku sade pre detekciu metaloproteináz (R&D Systems, USA).

Pre prípravu vzoriek na detekciu proteínov bola platforma s neutrofilmi inkubovaná 1 h pri 37 °C. Po 1 h bol obsah jamky odobraný a centrifugovaný pri 800g, 7 min pri 4 °C. Supernatanty boli odpipetované a uchovávané v mrazničke pri -70 °C pre ďalšie merania. Do 96-jamkovej doštičky pre ELISA bolo napipetované 100 µl primárnej protilátky (capture antibody) a doštička bola inkubovaná pri RT do druhého dňa. Potom bola primárna protilátka odsatá a premytá premývacím roztokom (0,05% Tween 20 v PBS) pomocou premývačky (SLT, Rakúsko). Následne boli jamky blokovanie pridaním 300 µl reagenčného riedidla

(0,1% BSA v PBS) po dobu 1 h pri RT. Reagenčné riedidlo bolo odsaté a doštička znova dvakrát premytá premývacím roztokom. Do jamôk bola napipetovaná kalibračná rada štandardu a vzorky (supernatanty) v množstve 100 μ l a doštička bola inkubovaná pri RT po dobu 2 h. Obsah jamôk bol po uplynutom čase odsatý a dvakrát premytý premývacím pufrom. Potom bolo do jamôk napipetované po 100 μ l sekundárnej protilátky (detection antibody) a ponechané pri RT 2 hodiny. Po odsatí a dvojnásobnom premytí jamôk bolo napipetované po 100 μ l Streptavidinu značeného chrenovou peroxidázou (Streptavidin-HRP) a ponechané v tme po dobu 20 minút pri RT. Po odsatí a dvojnásobnom premytí bol do jamôk pridaný roztok TMB, pričom prebehla reakcia (enzým chrenová peroxidáza katalyzovala oxidáciu TMB v prítomnosti peroxidu vodíka), pri ktorej vzniklo modré sfarbenie jamôk. Doštička sa nechala ešte niekoľko minút pri RT a potom bolo do jamôk napipetované 50 μ l 2N H₂SO₄ (stop solution), čo spôsobilo zastavenie reakcie a zmenu modrého sfarbenia na žlté. Nakoniec bola zmeraná absorbanca pri 450 nm.

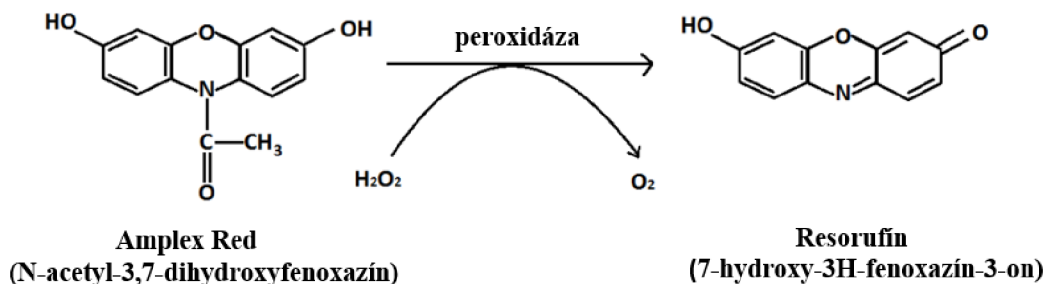
4.2.5 Stanovenie myeloperoxidázovej aktivity

MPO je lyzozomálny enzým prítomný v primárnych granulách neutrofilov a behom degranulácie po aktivácii neutrofilov je uvoľňovaný von z bunky do prostredia. Aktivita MPO bola stanovovaná v supernatantoch pomocou chromogénneho substrátu TMB. Princíp stanovenia spočíva v oxidácii TMB pomocou MPO za prítomnosti H₂O₂, pričom vzniká farebný produkt.

Vzorky boli spracované rovnakým spôsobom ako na stanovenie metaloproteináz pomocou ELISA (viď sekcia 4.2.4). Následne bola pripravená reakčná zmes pozostávajúca z 1 ml 300 mM octanu sodného, 110 μ l 20 mM TMB roztoku a 10 μ l 60 mM roztoku H₂O₂. Vzorka o objeme 15 μ l bola napipetovaná spolu so 105 μ l reakčnej zmesi do 96-jamkovej doštičky a ihneď bola zmeraná absorbanca pri 655 nm (Tecan, Švajčiarsko) v priebehu 2,5 min.

4.2.6 Meranie produkcie ROS

Pre overenie aktivácie neutrofilov elektrickou stimuláciou bola meraná produkcia ROS s využitím próby Amplex Red (N-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazín). Táto próba nemá fluorescenčné vlastnosti a až enzýmom katalyzovaná oxidácia Amplex Red pomocou ROS produkuje vysoko fluorescenčný resorufín (viď Obr. 15), ktorý má excitačné maximum pri 563 nm a emisné maximum pri 587 nm. [53]



Obr. 15: Oxidácia Amplex Red na resorufín. [54]

Ihneď po elektrickej stimulácii bola do jamôk stimulačnej platformy pridaná próba Amplex Red tak, aby jej koncentrácia činila 0,1 μM . Platforma bola následne inkubovaná pri 37 °C, pričom v priebehu 1 h, 2 h, 3 h a 4 h bola z jamôk odoberaná časť supernatantu do fluorescenčnej doštičky, kde bola potom zaznamenávaná fluorescencia pomocou fluorimetra (Tecan, Švajčiarsko). Excitačné maximum bolo nastavené na 560 nm a emisné maximum na 600 nm.

4.2.7 Analýza povrchových markerov pomocou prietokovej cytometrie

Pre skúmanie aktivácie neutrofilov bola prevedená analýza markerov, ktoré sú pri aktivácii exprimované na povrch neutrofilov. Analýza bola prevedená pomocou prietokovej cytometrie, pri ktorej sú bunky konjugované s fluorescenčne značenou protilátkou namierenou proti určitému imunofenotypickému znaku (povrchovému markeru) na povrchu bunky. Pomocou tohto znaku potom môžu byť bunky identifikované a bližšie analyzované.

Po elektrickej stimulácii bola platforma s neutrofilmi inkubovaná 3 h pri 37 °C. Následne bol takmer celý obsah jamky (80 μl) odobratý a jamky boli prepláchnuté pomocou PBS. Potom bolo pridaných 50 μl 10x nariedeného PBS EDTA a ponechané po dobu 5 min pôsobiť. Medzičasom boli pripravené polypropylénové skúmavky prepláchnuté 0,1% želatínou (pre blokáciu nešpecifickej väzby adhérence neutrofilov) a bolo do nich napipetované 2 ml média RPMI I. Do takto pripravených skúmaviek bolo po uplynutí 5 min pridané po 100 μl neutrofilov v PBS EDTA a suspenzia bola centrifugovaná pri 250g po dobu 5 min pri 4 °C. Supernatant bol odliaty a pelet resuspendovaný v 100 μl média RPMI I. V takto pripravenej vzorke boli bunky ofarbené pridaním 5 μl 10x zriedenej protilátky APC anti-mouse/human CD11b Antibody (BioLegend, USA) a 5 μl protilátky FITC Mouse Anti-Human CD15 (eBioscience, USA). Vzorky s protilátkami boli inkubované 30 min na ľade a v tme. Po uplynutí inkubácie bolo ku vzorkám pridané po 4 ml ľadového RPMI, suspenzia bola centrifugovaná pri 250g po dobu 5 min pri 4 °C. Supernatant bol odliaty a pelet resuspendovaný v 150 μl ľadového RPMI. Vzorky boli umiestnené na ľad do tmy a čo najrýchlejšie analyzované pomocou prietokového cytometra (BD Bioscience, USA).

4.2.8 Štatistická analýza

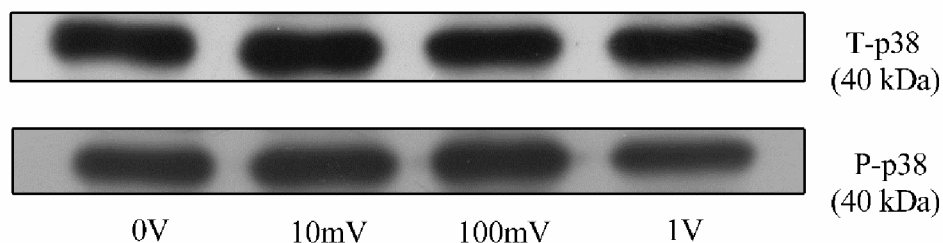
Dáta boli analyzované s využitím softvéru GraphPad Prism ver. 6.01 (Kalifornia, USA). Údaje boli vyhodnotené pomocou jednovýberového t-testu. Jednovýberový t-test porovnáva priemer skupiny čísel s hypotetickou hodnotou, ktorá sa rovná v našom prípade 100 %. Táto hodnota nemá žiadny rozptyl, pretože sú voči nej vzťahnuté ostatné hodnoty v určitom dni merania. V každom teste boli dáta vyjadrené ako priemer \pm štandardná chyba priemeru (SEM). Štatistická významnosť bola definovaná pri hodnote $P < 0,05$.

5 VÝSLEDKY

5.1 Detekcia aktivácie MAP kináz

Hlavnou signalizačnou dráhou, ktorá riadi reakcie na externú stimuláciu elektrickým prúdom je aktivácia MAPK signálnej kaskády. [41] Keďže zložky MAPK signalizačnej dráhy sú kinázy, detekcia ich aktivácie zahŕňa stanovenie ich fosforylačného stavu. Pre toto vyhodnotenie bola použitá metóda Western blot, pri ktorej sa využíva špecifickej protilátky proti danému proteínu. Následnou vizualizáciou tejto protilátky sa deteguje žiadaný proteín, a to v podobe tzv. bendu, ktorý sa porovná so štandardom o známej molekulovej hmotnosti. Namerané dáta vo forme skenu rádiografického filmu sa pri tejto metóde ešte kvantifikujú s využitím denzitometrického merania. Pomocou neho sa dá zistiť intenzita bendu a výsledkom je optická hustota, ktorá udáva semikvantitatívne množstvo žiadaného proteínu.

V súčasnosti sú známe tri rôzne druhy MAP kináz, a to p38, ERK a JNK. Pre všetky tieto kinázy bola detegovaná ich expresia a fosforylačný stav. Aktivovaný stav kinázy bol preukázaný fosforylačnou formou normalizovanou na celkovú hladinu proteínov. Ako je možné vidieť na Obr. 16, došlo ku aktivácii MAPK signalizačnej kaskády, avšak neboli zistené žiadne rozdiely v hladinách celkových proteínov (T-p38) a vo fosforylovannej forme (P-p38) u kinázy p38 medzi negatívnou kontrolou tzn. bez elektrickej stimulácie a vzorkami s ovplyvnením. Po týchto zisteniach nebola vyhodnocovaná ani optická hustota.

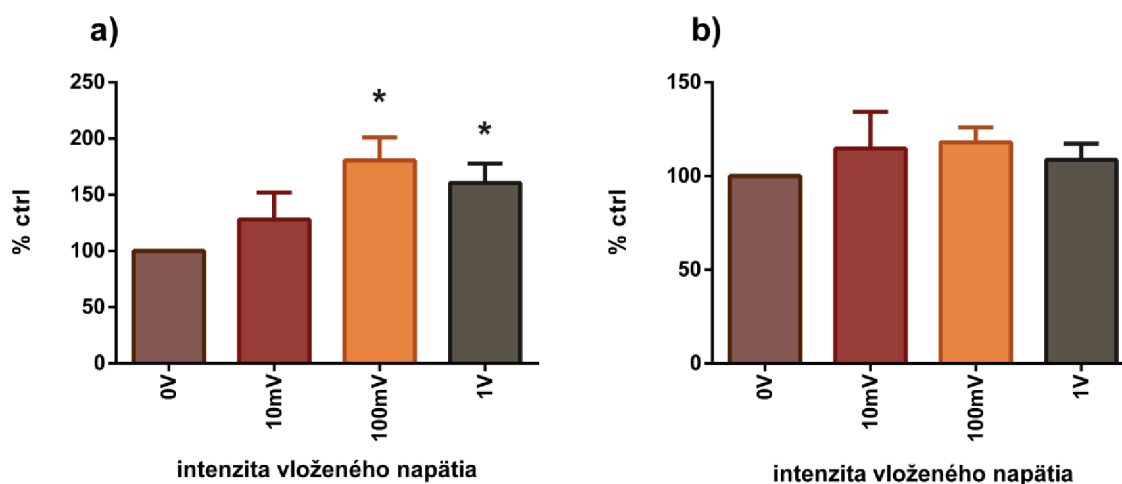


Obr. 16: Výsledky Western blotu lyzátov neutrofilov ukazujúce hladinu proteínov celkovej (T-p38) a fosforylovannej formy (P-p38) p38 kinázy o veľkosti 40 kDa zobrazené ako jednotlivé čierne bendy. Vzorky boli podrobené elektrickej stimulácii o rôznej intenzite po dobu 10 minút. Ako negatívna kontrola bola určená vzorka bez elektrickej stimulácie (0 V). Reprezentatívna snímka rádiografického filmu zo 4 nezávislých experimentov ($n = 4$).

Okrem MAP kinázy p38, bol vykonaný Western blot aj pre ostatné kinázy z MAPK signalizačnej kaskády, a to konkrétne u ERK a JNK kináz pre zistenie ich expresie po elektrickej stimulácii a taktiež ich fosforylačného stavu. Výsledky u oboch týchto MAP kináz boli negatívne, nebola detegovaná žiadna expresia, a teda ani fosforylácia. Dáta preto nie sú ani uvedené.

5.2 Stanovenie produkcie metaloproteináz MMP8 a MMP9

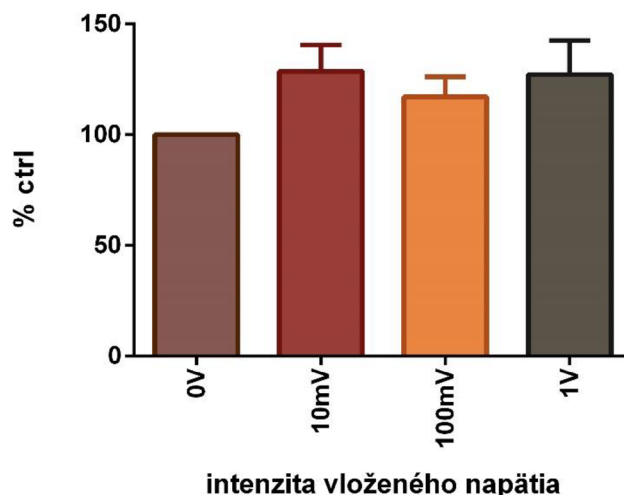
Pre stanovenie uvoľňovania metaloproteináz MMP8 a MMP9 zo stimulovaných neutrofilov bola prevedená sendvičová ELISA. Boli použité supernatanty zo vzoriek z neutrofilov o koncentrácii $4 \cdot 10^6$ buniek/ml a spracované tak, ako je popísané v kapitole 4.2.4. Hodnoty výsledných koncentrácií metaloproteináz vo vzorkách stanovené meraním absorbancie pri 450 nm boli podľa kalibračnej krivky prepočítané na konkrétnu koncentráciu pre jednotlivé vzorky. Následne boli hodnoty vztiahnuté ku negatívnej kontrole (100 %), za ktorú sa považovala vzorka bez ovplyvnenia elektrickými pulzmi. Ako je možné vidieť na Obr. 17 hladina enzýmu MMP8 bola signifikantnejšie zvýšená len pri intenzite vloženého napätia 100 mV a 1 V. U metaloproteinázy MMP9 je zas možné pozorovať náznak trendu, že vložené napätie indukovalo uvoľňovanie, avšak detegované rozdiely neboli štatisticky významné.



Obr. 17: Hladina produkcie metaloproteináz stanovená pomocou ELISA v supernatantoch a) MMP8; b) MMP9. Vzorky boli podrobené elektrickej stimulácii o rôznej intenzite po dobu 10 minút. Ako negatívna kontrola bola určená vzorka bez elektrickej stimulácie (100 %) voči ktorej boli ostatné hodnoty vztiahnuté. Citlivosť stanovenia dosahovala u MMP8 rozmedzie hodnôt 500 až 4000 pg/ml a u MMP9 30 až 2000 pg/ml. Každý stĺpec predstavuje priemer \pm SEM z experimentov uskutočnených v duplikáte; $n = 3-4$. Štatisticky významné rozdiely medzi negatívnou kontrolou a ovplyvnenými vzorkami sú označené symbolom *, pričom $* P < 0,05$.

5.3 Stanovenie aktivity MPO

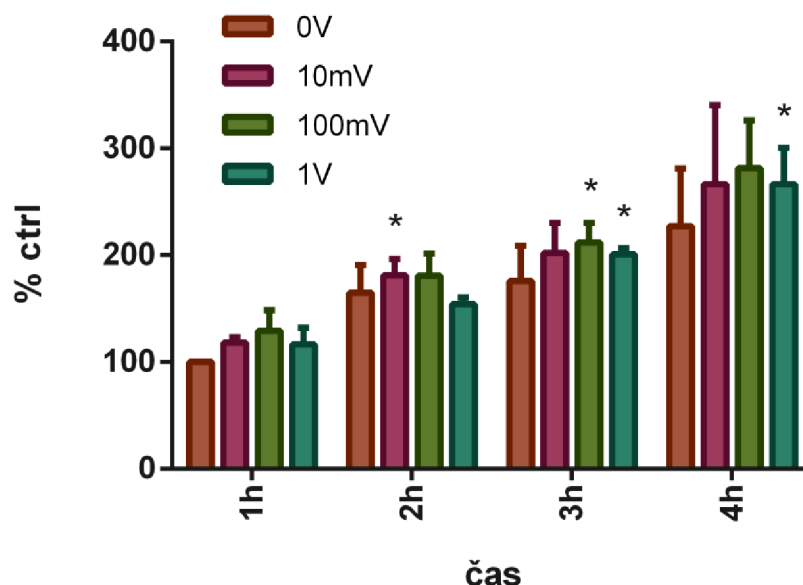
Pre stanovenie aktivity MPO v supernatantoch zo vzoriek neutrofilov bol využitý chromogénny substrát TMB, ktorý je oxidovaný pomocou MPO. Výsledkom tejto reakcie je farebný produkt, ktorý sa dá stanoviť meraním absorbancie pri 655 nm. Hodnoty absorbancie boli vztiahnuté ku negatívnej kontrole (100 %), za ktorú sa považovala vzorka bez ovplyvnenia elektrickými pulzmi. Z vyhodnotených výsledkov je zrejmé, že elektrická stimulácia indukovala mierne zvýšenie uvoľňovania MPO, avšak tieto rozdiely opäť neboli štatisticky významné vďaka rozptylu dát (viď Obr. 18).



Obr. 18: Výsledky stanovenia aktivity MPO v supernatantoch pomocou TMB eseje. Vzorky boli podrobené elektrickej stimulácii o rôznej intenzite po dobu 10 minút. Ako negatívna kontrola bola určená vzorka bez elektrickej stimulácie (100 %) voči ktorej boli ostatné hodnoty vztiahnuté. Každý stĺpec predstavuje priemer \pm SEM z experimentov uskutočnených v duplikáte; $n = 5$.

5.4 Meranie produkcie ROS

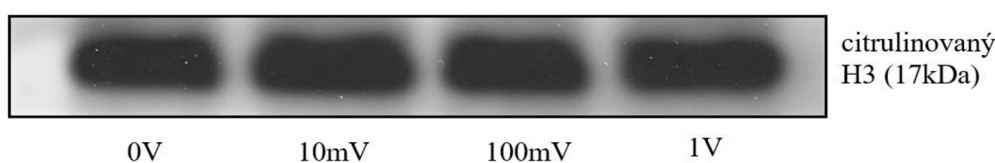
Ďalším vyhodnocovaným parametrom bola produkcia radikálov po ovplyvnení buniek. Analýza bola prevedená s využitím Amplex Red, vysoko špecifického fluorogénneho substrátu pre peroxidázovú aktivitu závislú na H_2O_2 , pričom bola meraná fluorescencia s rastúcim časom. Ku ovplyvneným bunkám bola pridaná Amplex Red, pričom v priebehu 4 h bolo odoberané médium obsahujúce zoxidovanú Amplex Red, ktorá bola úmerná množstvu vyprodukovaných radikálov. Výstupom merania bola stredná intenzita fluorescencie (MFI), ktorá bola následne vztiahnutá ku negatívnej kontrole (100 %) tzn. bez ovplyvnenia. Na Obr. 19 je zobrazené ako boli radikály produkované postupne s časom. Je možné vidieť, že ich produkcia s časom stúpala. Štatisticky významné rozdiely oproti neovplyvnenej kontrole boli zaznamenané pri ovplyvnení elektrickými pulzmi o veľkosti 10 mV pri čase po 2 h, v čase po 3 h to bolo u pulzov o veľkosti 100 mV a 1 V a po 4 h pri veľkosti pulzov 1 V. Najväčší vplyv na zvýšenie produkcie ROS malo teda vloženie pulzov s veľkosťou 1 V, a to vo všetkých časoch merania.



Obr. 19: Fluorimetrické stanovenie produkcie ROS. Vzorky boli podrobené elektrickej stimulácii o rôznej intenzite po dobu 10 minút. Za negatívnu kontrolu bola určená vzorka bez elektrickej stimulácie po 1 h (100 %) voči ktorej boli ostatné hodnoty vztiahnuté. Každý stĺpec predstavuje priemer \pm SEM z experimentov uskutočnených v duplikáte; $n = 3$.

5.5 Detekcia citrulinácie histónu H3

Mnoho výskumov zistilo, že citrulinácia histónov je dôležitým molekulárnym mechanizmom pri NETóze spojenej s aktiváciou neutrofilov. [55] Pre overenie, či došlo ku citrulinácii histónu H3 po ovplyvnení elektrickou stimuláciou bola využitá metóda Western blot. Z Obr. 20 možno usúdiť, že elektrická stimulácia indukovala citrulináciu histónu ako v ovplyvnených vzorkách, tak aj v negatívnej kontrole bez významných rozdielov.

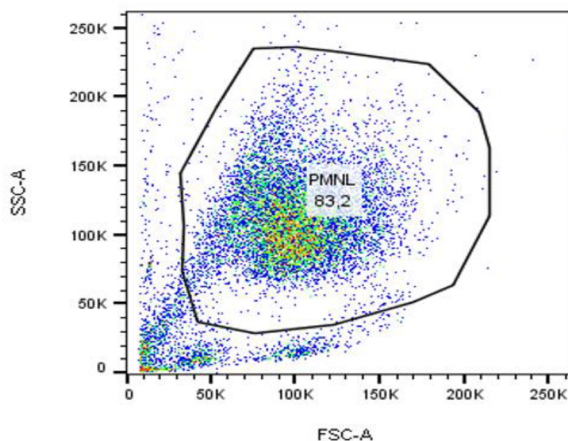


Obr. 20: Výsledok Western blotu lyzátov neutrofilov ukazujúci citrulinovaný histón H3 o veľkosti 17 kDa. Vzorky boli podrobené elektrickej stimulácii o rôznej intenzite po dobu 10 minút. Ako negatívna kontrola bola určená vzorka bez elektrickej stimulácie (0 V). Repräsentatívna snímka rádiografického filmu; $n = 3$.

5.6 Expresia povrchových markerov CD11b a CD15

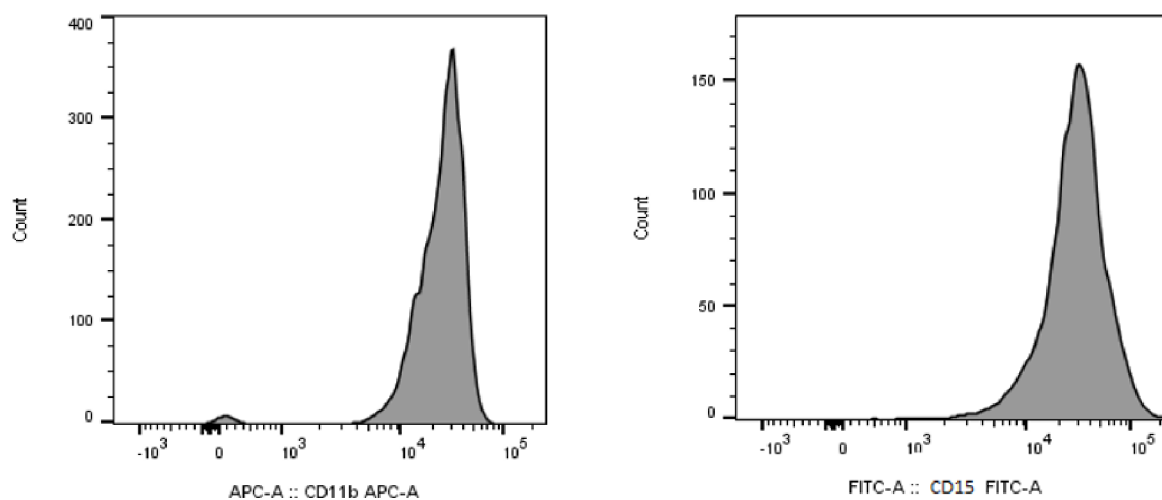
Cieľom tohto experimentu bolo zistenie, či vložené elektrické pulzy zvýšia aktiváciu neutrofilov, ktorá sa prejaví zvýšenou expresiou povrchových markerov CD11b a CD15 predstavujúcich molekuly exprimované na povrch neutrofilov pri ich aktivácii. Toto stanovenie bolo uskutočnené pomocou prietokovej cytometrie. Pri tejto metóde sa najprv na základe

priameho rozptylu svetla, ktorý nám poskytuje informácie o veľkosti bunky a bočného rozptylu, ktorý zas dáva informácie o granularite bunky vyberú ("vygatuju"-viď Obr. 21) neutrofilné granulocyty a u nich sa potom vyhodnotí expresia povrchových markerov, ako je popísané nižšie.

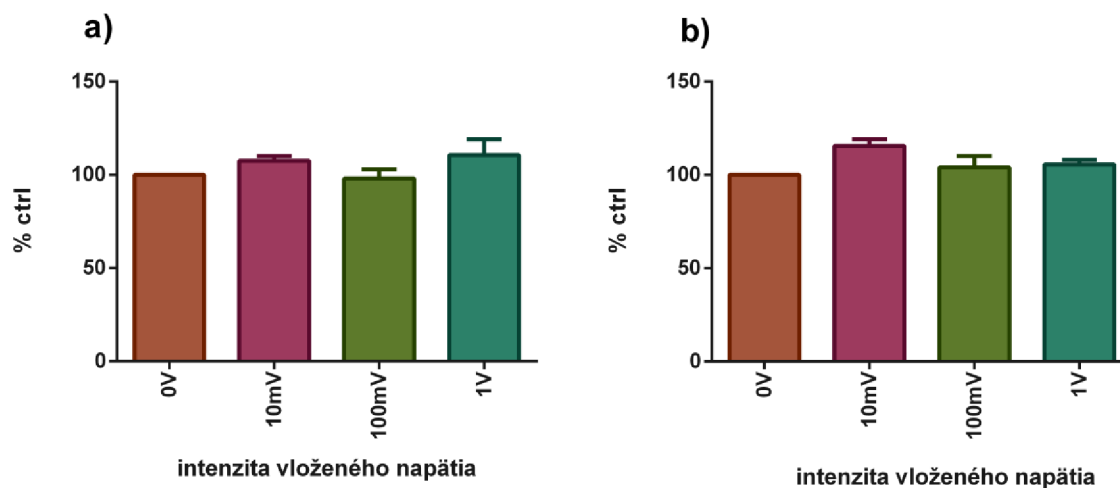


Obr. 21: Typické "gatovanie", pri ktorom boli vybraté bunky (neutrofily) pre následnú analýzu.

Pomocou protilátok značených fluorochrómom bola vyhodnotená relatívna priemerná intenzita fluorescencie (RFU), ktorá predstavuje koľko bolo vo vzorke relatívneho množstva fluorochrómu, inými slovami koľko sa naviazalo protilátky značenej daným fluorochrómom (typické rozloženie CD11b a CD15 viď Obr. 22). A keďže protilátka rozpoznala určitý antigén, v našom prípade povrchový marker, tak RFU jednotka nepriamo vyjadrovala koľko sa vo vzorke nachádzalo markeru. Expresia týchto markerov aktivácie neutrofilov je zobrazená na Obr. 23, z ktorého je patrné, že nedošlo ku žiadnemu významnému posunu v skúmaných receptoroch a relatívne veľká expresia bola zaznamenaná bohužiaľ aj v prípade negatívnej kontroly.



Obr. 22: Reprezentatívne histogramy z prietokovej cytometrie zobrazujúce typické rozloženie CD11b značenej fluorochrómom APC (vľavo), CD15 značenej pomocou FITC (vpravo).



Obr. 23: Výsledky z prietokovej cytometrie preukazujúce hladiny povrchových markerov a) CD11b a b) CD15. Vzorky boli podrobené elektrickej stimulácii o rôznej intenzite po dobu 10 minút. Jednotky RFU boli prepočítané na % negatívnej kontroly ku ktorej boli ostatné hodnoty vzťahnuté, pričom ako negatívna kontrola slúžila vzorka bez elektrickej stimulácie (100 %). Každý stĺpec predstavuje priemer \pm SEM z experimentov uskutočnených v duplikáte; $n = 2$.

6 DISKUSIA

Predložená diplomová práca pojednáva o mechanizme pôsobenia elektrického poľa na neutrofilny, kľúčové bunky nešpecifickej imunity. Na základe literatúry [56] boli vybrané parametre elektrickej stimulácie, čo zahŕňalo použitie elektrických pulzov o frekvencii 1 Hz a dĺžke pulzu 100 ms po dobu 10 minút. Veľkosť vkladaneho elektrického napätia dosahovala hodnôt 10 mV, 100 mV a 1 V a ako negatívna kontrola slúžili vzorky neutrofilov, do ktorých sa nevpúšťali žiadne pulzy (0 V). Po ovplyvnení neutrofilov týmito parametrami bol skúmaný stav ich aktivácie, a to rôznymi metódami diskutovanými nižšie.

Jednou z hlavných a zároveň najlepšie preštudovaných signálnych dráh, ktorá zohráva dôležitú úlohu v mnohých aspektoch imunitne sprostredkovaných zápalových odpovedí je signálna MAPK transdukčná dráha. Táto kaskáda je hlavným signalizačným systémom, ktorým bunky prenášajú extracelulárne signály do bunkového jadra. [44] Behom experimentálnej časti bola testovaná hypotéza, či elektrická stimulácia aktivuje v neutrofiloch túto signálnu dráhu. Aktivácia sa prejavuje fosforyláciou jednotlivých kináz MAPK dráhy. Tieto proteínkinázy môžu modulovať aktivitu iných intracelulárnych proteínov pridaním fosfátových skupín na ich serín/treonín aminokyseliny. [57] Aktivácia jednotlivých kináz bola skúmaná pomocou fosforylačného stavu normalizovaného na celkový stav kinázy s využitím techniky Western blot. Bola zistená expresia a fosforylácia p38 kinázy, avšak bez rozdielu medzi kontrolou bez elektrickej stimulácie a ovplyvnenými vzorkami. Z týchto výsledkov vyplýva, že elektrická stimulácia nemala žiadny vplyv na aktiváciu tejto kinázy. Taktiež bol prevedený Western blot aj pre ostatné kinázy z MAPK dráhy, a to pre ERK a JNK, pričom výsledky boli negatívne. To mohlo byť pravdepodobne spôsobené tým, že aj bunky v kontrolných jamkách bez aplikovaného prúdu boli aktivované behom procesu ich izolácie a potom hlavne vďaka adhezii na povrch jamôk stimulačnej platformy. Následne potom aplikácia EP neindukovala žiadny ďalší signifikantný nárast fosforylácie sledovaných MAP kináz.

V reakcii na mediátory infekcie či zápalu mobilizujú neutrofilny intracelulárne granuly a uvoľňujú ich kontrolovaným spôsobom v procese známom pod pojmom degranulácia. Uvoľnenie rôznych látok z granúl do extracelulárneho prostredia pomáha zabíjať baktérie, ale za patologických podmienok sa tieto toxické látky vylučujú do obehu, čo môže viesť ku systémovému zápalu a poškodzovať tak hostiteľské tkanivo. [58] Bolo preukázané, že nadmerná degranulácia neutrofilov je bežným znakom mnohých zápalových ochorení. [29] Jednou zo zložiek týchto granúl sú metaloproteinázy, proteolytické enzýmy schopné degradovať zložky extracelulárnej matrix alebo aktivovať rastové faktory a cytokíny. Sú rozdelené do rôznych podskupín podľa ich substrátovej špecifity a molekulárnej štruktúry. My sme sa zaoberali kolagenázou (MMP8) a gelatinázou (MMP9), ktorých hladina produkcie bola stanovená pomocou senvičovej ELISA. MMP8 je skladovaná ako latentný enzým (pro-MMP8) v špecifických granulách a je rýchlo uvoľňovaná degranuláciou pri aktivácii neutrofilov. [59] Hladina MMP8 bola zvýšená pri pulzoch o intenzite vloženého napätia 100 mV a 1 V so

štatistickou významnosťou. Metaloproteináza MMP9 skladovaná v gelatinázových granulách zas zohráva dôležitú úlohu pri extravazácii a migrácii neutrofilov vďaka svojej schopnosti degradovať hlavné zložky bazálnej membrány. Táto metaloproteináza je taktiež uvoľňovaná z gelatinázových granúl behom aktivácie neutrofilov. [60] Počas experimentov bolo pozorované, že vložené napätie nemalo výraznejší vplyv na zvýšenie hladiny MMP9 oproti negatívnej kontrole, u ktorej bolo zaznamenané dokonca podobné množstvo hladiny. Tieto výsledky naznačujú, že nielen mediátory ako fMPL, IL-8 a TNF [60], ale aj elektrická stimulácia indukuje uvoľnenie tejto metaloproteinázy.

Ďalší proteínový marker používaný pre exocytózu tentoraz primárnych granúl je MPO. Myeloperoxidáza, najabundantnejší enzým týchto granúl, katalyzuje oxidáciu chloridových a iných halogenidových iónov v prítomnosti peroxidu vodíka za vzniku kyseliny chlórnej a ďalších vysoko reaktívnych produktov, ktoré sprostredkovávajú účinné antimikrobiálne pôsobenie. [61] Pre stanovenie aktivity MPO vo vzorkách neutrofilov bol využitý chromogénny substrát TMB, ktorý je oxidovaný pomocou MPO. Výsledky aj v tomto prípade preukázali, že použitá elektrická stimulácia nemala významný vplyv na degranuláciu MPO, keďže aktivita bola pozorovaná rovnako vo všetkých vzorkách vrátane negatívnej kontroly. Koordinácia uvoľňovania MPO degranuláciou nie je úplne objasnená, avšak existujú dôkazy, že zvýšené hladiny ROS a aktivácia p38 MAPK zohrávajú v tomto procese významnú úlohu. [61] To koreluje s výsledkami tejto práce, kedy boli pozorované ako zvýšené hladiny ROS a aktivácia p38 MAPK, tak aj hladiny exocytózy MPO v tých istých vzorkách. MPO je tiež známa ako hlavná zložka potrebná pre NETs [62], čo takisto koreluje s výsledkami, ktoré preukazujú aktivitu MPO v rovnakých vzorkách, v akých bola pozorovaná citrulinácia histónu H3 typická pre NETózu.

Neutrofilý v reakcii na fagocytózu, imunitné stimuly alebo bakteriálne zložky aktivujú komplex NADPH oxidázy, ktorá produkuje superoxidové anióny a ROS odvodené z tohto radikálu. Medzi ROS patrí napr. hydroxylový radikál, kyselina chlórna či peroxid vodíka. [63] Kvôli svojej stabilite a membránovej permeabilite sa H_2O_2 zvyčajne volí ako marker pre kvantifikáciu extracelulárneho uvoľňovania ROS u neutrofilov. [53] Po ovplyvnení neutrofilov sme teda chceli zistiť, či v nich bola spustená produkcia ROS. To bolo prevedené pomocou Amplex Red, špecifického fluorogénneho substrátu pre peroxidázovú aktivitu závislú na H_2O_2 , pričom bola meraná fluorescencia s rastúcim časom behom 4 h. S rastúcim časom rástla aj hladina fluorescenčného produktu, čo znamenalo aj zvyšujúcu sa tvorbu H_2O_2 . Najväčší rozdiel produkcie voči kontrole, ktorá bola stanovená pre vzorku bez ovplyvnenia a pri 1 h, bol zaznamenaný pri vložení pulzov o veľkosti napätia 1 V, a to pri každom čase. Ďalej v čase po 2 h bol štatisticky významný rozdiel pri pulzoch o napätí 10 mV a po 4 h pri 1 V. Tieto výsledky teda naznačujú, že elektrický pulz o veľkosti napätia 1 V mal výraznejší vplyv na zvýšenie produkcie ROS.

Ďalším skúmaným parametrom behom experimentov bola detekcia tvorby citrulinovaných histónov, čo je špecifickým ukazovateľom tvorby NETs. Neutrofilny iniciujú tvorbu NETs v odpovedi na patogény a pri *in vitro* aktivácii rôznymi činidlami ako je PMA, IL-8 či LPS. [64] Cieľom tohto experimentu bolo zistenie, či dochádza ku citrulinácii H3 aj po elektrickej stimulácii neutrofilov. Pre toto otestovanie bola vybraná metóda Western blot. Bolo zistené, že elektrická stimulácia indukovala citrulináciu histónu vo všetkých ovplyvnených vzorkách a aj v negatívnej kontrole bez významných rozdielov. Podobne ako v prípade aktivácie MAP kináz, absencia rozdielu medzi kontrolou a stimulovanými bunkami môže byť spojená s predošlou aktiváciou buniek spôsobenou ich izoláciou a následnou adhérenciou na platformu. V literatúre sa tiež uvádza, že citrulinovaný histón H3 môže pochádzať nielen z procesu tvorby NETs, ale aj z mŕtvych buniek [55], takže u stimulovaných neutrofilov nemusela nutne prebehnúť NETóza.

Cieľom posledného prevedeného experimentu bolo overenie, či vložené elektrické napätie zvýši aktiváciu neutrofilov, ktorá sa prejaví zvýšenou expresiou povrchových markerov CD11b a CD15. CD11b je receptor z rodiny integrínov, ktorý zohráva dôležitú úlohu pri adhézii neutrofilov ku endoteliálnym bunkám väzbou na adhéziu molekulu ICAM-1. [65] Po aktivácii neutrofilov sa CD11b translokuje z intracelulárneho priestoru do plazmatickej membrány. Táto zvýšená povrchová expresia slúži ako základ pre vyššie spomínanú adhéziu neutrofilov. [66] S využitím prietokovej cytometrie bolo zistené, že aj bunky neovplyvnené elektrickou stimuláciou vykazovali relatívne vysokú expresiu CD11b, ktorá bola porovnateľná s expresiou u ovplyvnených buniek. Ďalší povrchový marker charakteristický pre aktiváciu neutrofilov je sacharidový antigén CD15, známy aj pod pojmom Levis X, ligand pre selektíny účastniace sa adhézii neutrofilov. [67] Ani u tohto markeru neboli pozorované výrazné rozdiely medzi ovplyvnenými a neovplyvnenými bunkami a ku jeho zvýšenej expresii dochádzalo teda aj u neovplyvnených neutrofilov. Rozdiely medzi neovplyvnenou kontrolou a ovplyvnenými vzorkami u oboch povrchových markerov boli len v rádoch 10 až 20 %, čo predstavuje v rámci prietokovej cytometrie a povrchovej expresie veľmi nízku výpovednú hodnotu a taktiež pre túto metódu by bolo treba výrazne zvýšiť počet technických opakovaní, aby mohli byť hodnotené aj takéto malé rozdiely. Taktiež je možné, že výsledky ovplyvnili aj mŕtve bunky, ktoré mohli byť zahrnuté pri "gatovaní" neutrofilov. Ďalšou možnosťou je, že po pridaní protilátky proti daným markerom, pre ktorú sú na povrchu neutrofilov receptory, začali neutrofilny fagocytovať túto protilátku z okolia. A preto nastala zvýšená expresia receptorov pre tieto protilátky, namiesto toho aby sa zvýšila ich expresia vplyvom elektrickej stimulácie. To by sa dalo do budúcnosti vyriešiť farbením fixovaných buniek, čím by sa zabránilo možnému efektu nešpecifického pohlčovania protilátky neutrofilmi.

7 ZÁVER

Predložená diplomová práca sa zaoberala vplyvom elektrickej stimulácie na funkcie neutrofilov, významných bunkových zložiek imunitného systému, pričom bol skúmaný stav ich aktivácie. Bolo preukázané, že použitá stimulácia mala vplyv len u vložených elektrických pulzov o veľkosti 1 V, a to v prípade produkcie ROS a u degranulácie metaloproteinázy MMP8 pri pulzoch o veľkosti 10 mV a 100 mV. V ostatných prípadoch merania neboli preukázané žiadne významné rozdiely medzi ovplyvnenými bunkami a neovplyvnenou kontrolou. Výsledky však mierne mohol ovplyvniť aj zisk neutrofilov a následné narábanie s nimi, kedy sa už počas neho mohli neutrofilové bunky naaktivovať, pretože tieto bunky sú veľmi citlivé na akúkoľvek manipuláciu vrátane adhérencie na platformu. Vplyv elektrickej stimulácie s danými parametrami bol už skúmaný, avšak nie u týchto buniek, takže v budúcnosti by bolo potrebné modifikovať experimentálny prístup tak, aby nedochádzalo ku nechcenej aktivácii neutrofilov. Celkovo možno zhrnúť, že výskum vplyvu EP na neutrofilové bunky by mohol mať potenciálne využitie v liečbe chronického zápalu, kedy by sa pomocou elektrickej stimulácie ovplyvňovali mechanizmy, ktoré neutrofilové bunky nadmerne využívajú práve pri tomto type ochorení.

ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] PETR, Jilek. *Imunologie*. Grada, 2014, 96 s. ISBN 978-80-247-4822-1.
- [2] How does the immune system work?. *InformedHealth* [online]. Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care, b.r. [cit. 2018-10-29]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279364/>
- [3] ASHLEY, Lentz a Freezor ROBERT. Principles of immunology. *Nutrition in Clinical Practice*. 2003, 18(6), 451-460. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1177/0115426503018006451>
- [4] JIŘINA, Hořejší Václav Bartůňková. *Základy imunologie*. Triton, 2009, 320 s. ISBN 9788073872809.
- [5] CLARK, Rachael a Thomas KUPPER. Old Meets New: The Interaction Between Innate and Adaptive Immunity. *Journal of Investigative Dermatology*. 2005, 125(4), 629-637. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23856.x>. ISSN 0022-202X. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15324763>
- [6] PRINYAKUPT, Jaronrut a Charnchai PLUEMPITIWIRIYAWAJ. Segmentation of white blood cells and comparison of cell morphology by linear and naïve Bayes classifiers. *Biomedical engineering online*. 2015, 14, 63-63. DOI: 10.1186/s12938-015-0037-1. ISSN 1475-925X. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4485641/>
- [7] BEENHOUWER, David O. Chapter 17 - Molecular Basis of Diseases of Immunity. *Molecular Pathology*. San Diego: Academic Press, 2009, s. 291-304. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374419-7.00017-2>. ISBN 978-0-12-374419-7. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744197000172>
- [8] MURPHY, Kenneth, Travers PAUL, Walport MARK a Janeway CHARLES. *Janeway's immunobiology*. New York: Garland Science, 2012. ISBN - 978-0815342434.
- [9] L., Dean. Blood and the cells it contains. *Blood Groups and Red Cell Antigens*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2005. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2263/>
- [10] CHIU, Stephen a Ankit BHARAT. Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 2016, 21(3), 239-245. DOI: 10.1097/MOT.0000000000000313. ISSN 1531-7013. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4858348/>

- [11] ZARBOCK, Alexander. *Neutrophil Adhesion and Activation under Flow*. *Microcirculation*, 2009, 16, 31-42 s. DOI: 10.1080/10739680802350104. ISSN 1073-9688. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1080/10739680802350104>
- [12] ROSALES, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?. *Front Physiol.* 2018, 9, 113. DOI: 10.3389/fphys.2018.00113. ISSN 1664-042X. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29515456>
- [13] FURZE, R. C. a S. M. RANKIN. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*. Nov, 125(3), 281-8. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.02950.x. ISSN 1365-2567. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19128361>
- [14] BORREGAARD, Niels. *Neutrophils, from marrow to microbes*. 2010, 33, 657-670 s. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094463>
- [15] DAMJANOV, Ivan. ROBBINS AND COTRAN PATHOLOGIC BASIS OF DISEASE, 7TH EDITION. *Shock*. 2005, 23(5), 482-483. Dostupné také z: https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2005/05000/ROBBINS_AND_COTRAN_PATHOLOGIC_BASIS_OF_DISEASE.,16.aspx
- [16] SUSSAN, Nourshargh. *Leukocyte Migration into Inflamed Tissues*. 2014, 41(5), 694-707 s. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>
- [17] NGUYEN, Giang T., Erin R. GREEN a Joan MECSAS. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017, 7, 373-373. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00373. ISSN 2235-2988. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5574878/>
- [18] FERENČÍK, Miroslav. *Imunitní systém: informace pro každého*. Grada Publishing a.s, 2005, 236 s. ISBN 8024711966.
- [19] CICCHETTI, Gregor, Philip G. ALLEN a Michael GLOGAUER. Chemotactic Signaling Pathways in Neutrophils: from Receptor to Actin Assembly. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2002, 13(3), 220-228. DOI: 10.1177/154411130201300302. Dostupné také z: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/154411130201300302>
- [20] KARENBERG, K., H. HUDALLA a D. FROMMHOLD. Leukocyte recruitment in preterm and term infants. *Mol Cell Pediatr*. Dec, 3(1), 35. DOI: 10.1186/s40348-016-0063-5. ISSN 2194-7791. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27778308>
- [21] KENNY, E. F., A. HERZIG, R. KRÜGER et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife*. 06, 6. DOI: 10.7554/eLife.24437. ISSN 2050-084X. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28574339>

- [22] CHACKO, B. K., S. B. WALL, P. A. KRAMER et al. Pleiotropic effects of 4-hydroxynonenal on oxidative burst and phagocytosis in neutrophils. *Redox Biol.* 10, 9, 57-66. DOI: 10.1016/j.redox.2016.06.003. ISSN 2213-2317. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27393890>
- [23] URBAN, C. F., S. LOURIDO a A. ZYCHLINSKY. How do microbes evade neutrophil killing?. *Cell Microbiol.* Nov, 8(11), 1687-96. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00792.x. ISSN 1462-5814. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16939535>
- [24] COWLAND, Jack B. a Niels BORREGAARD. *Granulopoiesis and granules of human neutrophils*. John Wiley & Sons Ltd, 2016, 273, 11-28 s. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1111/imr.12440>
- [25] LAWRENCE, Shelley Melissa, Ross CORRIDEN a Victor NIZET. Age-Appropriate Functions and Dysfunctions of the Neonatal Neutrophil. *Frontiers in Pediatrics*. Shelley Melissa Lawrence, Pediatrics, Neonatal-Perinatal Medicine, UCSD, USA, slawrence@ucsd.edu, 2017, 5(23). DOI: 10.3389/fped.2017.00023. ISSN 2296-2360. Dostupné také z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fped.2017.00023>
- [26] CALAFAT, Jero, Hans JANSSEN, Edward F. KNOL, Johan MALM a Arne EGESTEN. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is membrane-associated in azurophil granules of human neutrophils, and relocation occurs upon cellular activation. *Journal of pathology, microbiology and immunology*. 2008, 108(3), 201-208. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2000.d01-45.x>
- [27] TENG, Tie-Shan, Ai-ling JI, Xin-Ying JI a Yan-Zhang LI. Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. *Journal of Immunology Research*. 2017, 2017, 14. DOI: 10.1155/2017/9671604. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1155/2017/9671604>
- [28] MURAV'EV, R.A., V.A. FOMINA a V.V. ROGOVIN. Gelatinase Granules of Neutrophil Granulocytes. *Biology Bulletin*. 2003, 30(4), 317-318. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1024848004025>. ISSN 1062-3590. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1023/A:1024848004025>
- [29] LACY, Paige. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy, asthma, and clinical immunology: official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. 2006, 2(3), 98-108. DOI: 10.1186/1710-1492-2-3-98. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2876182/>
- [30] GALLUCCI, Stefania, Roberto CARICCHIO a Philip L. COHEN. Cellular Injury and Apoptosis. *The autoimmune diseases*. 2014, s. 245-256. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384929-8.00017-4>

- [31] BRINKMANN, V. a A. ZYCHLINSKY. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol.* Sep, 198(5), 773-83. DOI: 10.1083/jcb.201203170. ISSN 1540-8140. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22945932>
- [32] WANG, L., F. S. WANG a M. E. GERSHWIN. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med.* Oct, 278(4), 369-95. DOI: 10.1111/joim.12395. ISSN 1365-2796. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26212387>
- [33] KRUGER, Philipp, Mona SAFFARZADEH, Alexander N. R. WEBER et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS pathogens.* 2015, 11(3), 1004651-1004651. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004651. ISSN 1553-7374. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4357453/>
- [34] CHISTIAKOV, D. A., Y. V. BOBRY SHEV a A. N. OREKHOV. Neutrophil's weapons in atherosclerosis. *Exp Mol Pathol.* Dec, 99(3), 663-71. DOI: 10.1016/j.yexmp.2015.11.011. ISSN 1096-0945. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26551083>
- [35] SELDERS, Gretchen S., Allison E. FETZ, Marko Z. RADIC a Gary L. BOWLIN. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerative biomaterials.* 2017, 4(1), 55-68. DOI: 10.1093/rb/rbw041. ISSN 2056-3418. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5274707/>
- [36] HUNCKLER, Jerome a Achala DE MEL. A current affair: electrotherapy in wound healing. *Journal of multidisciplinary healthcare.* 2017, 10, 179-194. DOI: 10.2147/JMDH.S127207. ISSN 1178-2390. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5404801/>
- [37] ODELL, Robert a Richard SORGNARD PHD. *Anti-inflammatory effects of electronic signal treatment.* 2008, 11, 891-907 s.
- [38] UD-DIN, S. a A. BAYAT. Electrical Stimulation and Cutaneous Wound Healing: A Review of Clinical Evidence. *Healthcare (Basel).* Oct, 2(4), 445-67. DOI: 10.3390/healthcare2040445. ISSN 2227-9032. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27429287>
- [39] THAKRAL, Gaurav, Javier LAFONTAINE, Bijan NAJAFI, Talal K. TALAL, Paul KIM a Lawrence A. LAVERY. Electrical stimulation to accelerate wound healing. *Diabetic foot & ankle.* 2013, 4, 1034024022081. DOI: 10.3402/dfa.v4i0.22081. ISSN 2000-625X. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3776323/>
- [40] ZHAO, M. Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration. *Semin Cell Dev Biol.* Aug, 20(6), 674-82. DOI:

- 10.1016/j.semcd.2008.12.009. ISSN 1096-3634. Dostupné také z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19146969>
- [41] THRIVIKRAMAN, G., S. K. BODA a B. BASU. Unraveling the mechanistic effects of electric field stimulation towards directing stem cell fate and function: A tissue engineering perspective. *Biomaterials*. Jan, 150, 60-86. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.003. ISSN 1878-5905. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29032331>
- [42] PE, Houghton. Electrical stimulation therapy to promote healing of chronic wounds: a review of reviews. *Dovepress* [online]. Chronic Wound Care Management and Research, 2017, 20174, 25-44 [cit. 2019-01-18]. DOI: <https://doi.org/10.2147/CWCMR.S101323>. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/electrical-stimulation-therapy-to-promote-healing-of-chronic-wounds-a-peer-reviewed-fulltext-article-CWCMR>
- [43] LIU, Qian a Bing SONG. Electric field regulated signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014, 55, 264-268. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.09.014>. ISSN 1357-2725. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272514002969>
- [44] KESHET, Y. a R. SEGER. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol*. 2010, 661, 3-38. DOI: 10.1007/978-1-60761-795-2_1. ISSN 1940-6029. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811974>
- [45] ZHANG, Wei a Hui Tu LIU. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*. 03/01/online, 12, 9. DOI: 10.1038/sj.cr.7290105. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>
- [46] XU, Bing-e, Fred ROBINSON, Gray PEARSON, Kevin BERMAN, Mahesh KARANDIKAR, Tara BEERS GIBSON a Melanie H. COBB. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions*. *Endocrine Reviews*. 2001, 22(2), 153-183. DOI: 10.1210/edrv.22.2.0428. ISSN 0163-769X. Dostupné také z: <https://dx.doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428>
- [47] WANG, J. a Y. XIA. Assessing developmental roles of MKK4 and MKK7 in vitro. *Commun Integr Biol*. Jul, 5(4), 319-24. DOI: 10.4161/cib.20216. ISSN 1942-0889. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23060952>
- [48] TEISSIE, J., B. E. KNOX, T. Y. TSONG a J. WEHRLE. Synthesis of adenosine triphosphate in respiration-inhibited submitochondrial particles induced by microsecond electric pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981, 78(12), 7473-7477. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC349290/>

- [49] WOLF-GOLDBERG, Tami, Alexander BARBUL, Nadav BEN-DOV a Rafi KORENSTEIN. Low electric fields induce ligand-independent activation of EGF receptor and ERK via electrochemical elevation of H⁺ and ROS concentrations. *BBA - Molecular Cell Research*. 2013, 1833(6), 1396-1408. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.011>.
- [50] LIN, Bo-Jian, Shun-Hao TSAO, Alex CHEN, Shu-Kai HU, Ling CHAO a Pen-Hsiu Grace CHAO. Lipid rafts sense and direct electric field-induced migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017, 114(32), 8568-8573. DOI: 10.1073/pnas.1702526114. ISSN 1091-6490. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5559012/>
- [51] ASHRAFI, M., T. ALONSO-RASGADO, M. BAGUNEID a A. BAYAT. The efficacy of electrical stimulation in lower extremity cutaneous wound healing: A systematic review. *Exp Dermatol*. 02, 26(2), 171-178. DOI: 10.1111/exd.13179. ISSN 1600-0625. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27576070>
- [52] JOHNSON, Mary and Waite Lee and Waite Gabi. Noninvasive treatment of inflammation using electromagnetic fields: Current and emerging therapeutic potential. *Biomedical sciences instrumentation*. 2004, 40, 469-74.
- [53] ZHOU, Mingjie, Zhenjun DIWU, Nataliya PANCHUK-VOLOSHINA a Richard P. HAUGLAND. A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases. *Analytical Biochemistry*. 1997, 253(2), 162-168. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2391>. ISSN 0003-2697. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269797923915>
- [54] YAN, Fei, Serene WILLIAMS, Guy D. GRIFFIN, Ramesh JAGANNATHAN, Susan E. PLUNKETT, Kenneth H. SHAFER a Tuan VO-DINH. Near-real-time determination of hydrogen peroxide generated from cigarette smoke. *Journal of Environmental Monitoring* [online]. 2005, 7(7) [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1039/b502061a. ISSN 1464-0325. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b502061a>
- [55] LI, Yongqing, Baoling LIU, Eugene Y. FUKUDOME et al. Identification of citrullinated histone H3 as a potential serum protein biomarker in a lethal model of lipopolysaccharide-induced shock. *Surgery*. 2011, 150(3), 442-451. DOI: 10.1016/j.surg.2011.07.003. ISSN 1532-7361. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3170094/>
- [56] HERNANDEZ, Damian, Rodney MILLARD, Priyadharshini SIVAKUMARAN et al. Electrical Stimulation Promotes Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells International*. 2016, 2016, 1-12 s. DOI: 10.1155/2016/1718041.
- [57] HOMMES, D. W., M. P. PEPPELENBOSCH a S. J. H. VAN DEVENTER. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-

- inflammatory targets. *Gut*. 2003, 52(1), 144-151. ISSN 0017-5749. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC1773518/>
- [58] LEY, Klaus, Hal M. HOFFMAN, Paul KUBES, Marco A. CASSATELLA, Arturo ZYCHLINSKY, Catherine C. HEDRICK a Sergio D. CATZ. Neutrophils: New insights and open questions. *Science Immunology*. 2018, 3(30), 4579. DOI: 10.1126/sciimmunol.aat4579. Dostupné také z: <http://immunology.sciencemag.org/content/3/30/eaat4579.abstract>
- [59] ZAMPINI, R., M. E. ARGANAÑARAZ, D. C. MICELI a S. A. APICHELA. Detection of the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2 in llama (*Lama glama*) oviduct. *Reprod Domest Anim*. Jun, 49(3), 492-8. DOI: 10.1111/rda.12317. ISSN 1439-0531. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24750476>
- [60] NAGAOKA, I. a S. HIROTA. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in neutrophils in glycogen-induced peritoneal inflammation of guinea pigs. *Inflamm Res*. Feb, 49(2), 55-62. DOI: 10.1007/s000110050559. ISSN 1023-3830. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10738943>
- [61] KHAN, Amjad A., Mohammed A. ALSAHLI a Arshad H. RAHMANI. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Medical sciences (Basel, Switzerland)*. 2018, 6(2), 33. DOI: 10.3390/medsci6020033. ISSN 2076-3271. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC6024665/>
- [62] METZLER, Kathleen D., Tobias A. FUCHS, William M. NAUSEEF et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*. 2011, 117(3), 953. DOI: 10.1182/blood-2010-06-290171. Dostupné také z: <http://www.bloodjournal.org/content/117/3/953.abstract>
- [63] WINTERBOURN, Christine C., Anthony J. KETTLE a Mark B. HAMPTON. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annual Review of Biochemistry*. 2016, 85(1), 765-792. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060815-014442. ISSN 0066-4154. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014442>
- [64] BRINKMANN, Volker, Ulrike REICHARD, Christian GOOSMANN, Beatrix FAULER, Yvonne UHLEMANN, David S. WEISS, Yvette WEINRAUCH a Arturo ZYCHLINSKY. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 2004, 303(5663), 1532. DOI: 10.1126/science.1092385. Dostupné také z: <http://science.sciencemag.org/content/303/5663/1532.abstract>
- [65] KIM, Donghyuk a Christy L. HAYNES. The role of p38 MAPK in neutrophil functions: single cell chemotaxis and surface marker expression. *The Analyst*. 2013, 138(22), 6826-6833. DOI: 10.1039/c3an01076g. ISSN 1364-5528. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3867262/>

- [66] ABDEL-SALAM, Bahaa K. A. a Hossam EBAID. Expression of CD11b and CD18 on polymorphonuclear neutrophils stimulated with interleukin-2. *Central-European journal of immunology*. 2014, 39(2), 209-215. DOI: 10.5114/ceji.2014.43725. ISSN 1426-3912. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4440019/>
- [67] NAKAYAMA, F., S. NISHIHARA, H. IWASAKI et al. *CD15 Expression in Mature Granulocytes Is Determined by 1,3-Fucosyltransferase IX, but in Promyelocytes and Monocytes by 1,3-Fucosyltransferase IV*. 2001, 276, 16100-6 s. DOI: 10.1074/jbc.M007272200.

Zoznam Použitých Skratiek a Symbolov

| | |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------|
| APC | alofykokyanín |
| APS | peroxodisíran amonný |
| AR | Amplex Red |
| ATP | adenozíntrifosfát |
| BSA | bovinný sérový albumín |
| BPI | baktericidný proteín zvyšujúci permeabilitu |
| GM-CSF | faktor stimulujúci kolónie granulocytov a makrofágov |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| DTT | ditiotritol |
| EDTA | etyléndiamintetraoctová kyselina |
| EGFR | receptor epidermálneho rastového faktora |
| ELISA | enzýmová imunoanalýza |
| EP | elektrické pole |
| ER | endoplazmatické retikulum |
| ERK | kináza regulovaná mimobunkovým signálom |
| EtOH | etanol |
| FITC | fluoresceín izotiokyanát |
| fMLP | N-formylmetionín-leucyl-fenylalanín |
| HEPES | 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazínétánsulfónová kyselina |
| HRP | chrenová peroxidáza |
| ICAM-1 | medzibunková adhézna molekula 1 |
| IL-1 β | interleukín 1 beta |
| IL-8 | interleukín 8 |
| kDa | kilodalton (jednotka predstavujúca molekulovú hmotnosť 1000 daltonov) |
| LFA-1 | antigén súvisiaci s lymfocytovou funkciou |
| LPS | lipopolysacharid |
| Mac-1 | makrofágový antigén 1 |
| MAPK | mitogénom aktivovaná proteinkináza |
| MeOH | metanol |

| | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------|
| MFI | stredná intenzita fluorescencie (mean fluorescence intensity) |
| MMP8 | metaloproteináza medzibunkovej hmoty 8 |
| MMP9 | metaloproteináza medzibunkovej hmoty 9 |
| MPO | myeloperoxidáza |
| NETs | neutrofilné extracelulárne pasce |
| NK | bunka-prirodzený zabíjač |
| NSAIDs | nesteroidné protizápalové lieky |
| NSP | neutrofilné serínové proteázy |
| PAD | peptidylarginindeiminázy |
| PBS | fosfátový pufer |
| PI3K/Akt | fosfatidylinozitol-3-OH kináza/proteinkináza Akt |
| PMA | forbol-12-myristát-13-acetát |
| PMNL | polymorfonukleárne leukocyty |
| PMSF | fenylmetylsulfonyl chlorid |
| P38 | proteinkináza o veľkosti 38 kDa |
| RFU | relatívna intenzita fluorescencie (relative fluorescence intensity) |
| RT | izbová teplota |
| SDS | dodecylsírany sodný |
| SDS-PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovom géli v prítomnosti dodecylsírany sodného |
| SEM | štandardná chyba priemeru (standard error of the mean) |
| TBST | Tris pufer s prídavkom Tween 20 |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametylétyléndiamín |
| TNF | faktor spôsobujúci nekrózu nádoru |
| TMB | 3,5,3',5'-tetramethylbenzidín |
| TRIS | tris(hydroxymetyl)aminometán |
| Tween 20 | polysorbát 20 |