

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Vliv vybraných klíštěcích serpinů na zánětlivou aktivaci
různých makrofágových subpopulací**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Hajduchová

Školitel: doc. RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

České Budějovice 2023

Hajduchová, K., 2023: Vliv vybraných klíštěcích serpinů na zánětlivou aktivaci různých makrofágových subpopulací. [The effect of selected tick serpins on inflammatory activation of different macrophage subpopulation Mgr. Thesis, in Czech.] – 59 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Cílem práce bylo vytvořit tři subpopulace makrofágů z lidských liniových THP-1 buněk pomocí různých stimulačních látek a diferenciacních faktorů. Morfologicky je porovnat a rozlišit na základě exprese povrchových markerů. Dále provést zánětlivou aktivaci pomocí LPS a otestovat vliv dvou vybraných klíštěcích serpinů na zánětlivou aktivaci buněk.

Annotation

The aim of this study was create three subpopulation of macrohages from human cell lineage THP-1 using different stimulating agents and differentiation factors. Morhologically compare and differentiate them based on the expresion of surface markers. Furhermore, to perform inflammatory activation using LPS and to test the effect of two selected tick serpins on inflammatory cell activation.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, dne 29. 11.2023

.....
Kateřina Hajduchová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jindřichu Chmelaři, Ph.D. za jeho podporu v době, která byla pro všechny náročná, že jsme společně zvládli i změnu tématu celé práce a snad nakonec všechno dotáhli do zdárného konce. Velké díky patří také Mgr. Ľubici Makušové, Mgr. Adéle Chlastákové, Ph.D. a Mgr. Zuzaně Beránkové, díky kterým byla má práce v laboratoři o mnoho veselejší a snazší. Dále děkuji za vše Ing. Evě Výletové a Mgr. Anně Kovaříkové, které se o nás všechny hezky starají.

V neposlední řadě děkuji své rodině za velkou podporu v době dokončovacích prací i celého studia.

Seznam použitých zkratek a vysvětlivek

ACTB	β-aktin
ALOX 15	Arachidonát 15-lipoxygenáza
ATB	Antibiotika
BMDM	Makrofágy odvozené z kostní dřeně u myši
BOFES	Fetální hovězí sérum
bp	Basepairs, počet párů bází
BSA	Hovězí sérový albumin
C1QA	Řetězec A komplementu C1q
CCL	Chemokinový ligand s C-C motivem
CD-163	Diferenční skupina/cluster of differentiation 163
CD200R	CD200 receptor 1
CD-80	Diferenční skupina/cluster of differentiation 80
cDNA	Přepsaná DNA (copy DNA)
CXCL	Chemokinový ligand s C-X-C motivem
DAMPs	Molekulární vzorce asociované s poškozením
DC	Dendritická buňka
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FcγRs	Fcγ receptor
FIZZ-1	Inflammatory zone 1
EMPs	Erytro-myeloidní progenitory
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
HPRT-1	Hypoxantin fosforibosyltransferáza 1
HSC	Hematopoetické buňky
IL	Interleukin
INF	Interferon
iNOS	Inducibilní syntáza oxidu dusnatého
IRF	Interferon regulační faktor
KC	Chemokiny pro neutrofilů
LFA1	Antigen 1 spojený s funkcí lymfocytů
LPS	Lipopolysacharid
M1	Makrofág M1
M2	Makrofág M2
ME	Mercaptoethanol
MHC-II	MHC glykoproteiny II. třídy
MMP	Matrixová metaloproteináza
MRC	Manózoový receptor
MyD88	Myeloidní diference genu primární odpovědi 88
NAFLD	Nealkoholické ztučnění jater
NET	Extracelulární past neutrofilů
NK buňky	Natural killer buňky, „přirozený zabíječ“

NLR	NOD-like receptory
NO	Oxid dusný
NOD	Nukleotid vázající oligomerázové doménové proteiny
PAMPs	Molekulární vzory na povrchu patogenních buněk
PRR	Receptory pro rozpoznávání vzorců
pb	Počet parů bází
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PGE2	Prostaglandin E2
PMA	Forbol 12-myristát 13-acetát
RNA	Ribonukleová kyselina
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RPL	Ribozomální protein
RPMI	Roswell Park Memorial Institute médium
qRT-PCR	Polymerázová řetězová reakce probíhající v přítomném čase
SCI	Systémový chronický zánět
SEM	Střední chyba průměru
SEPP	Selenoprotein
SGE	Extrakt ze slinných žláz
STAT	Přenašeč signálu a aktivátoru transkripce
sTNFRI	Rozpustný receptor pro tumor nekrotizující faktor I
T-25	Kultivační lahev 25 cm ²
TAM	Tumor asociované makrofágy
TGF-β	Transformující růstový faktor
TGM	Transglutamináza
Th	T-helpers
THP-1	Buněčná linie derivovaná z krev. oběhu leukemického pac.
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor, faktor nádorové nekrózy
UV	Ultrafialové záření
VD3	Dihydroxyvitamin D3
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor

Obsah

1	Teoretický úvod	1
1.1	Zánět.....	1
1.1.2	Průběh reakce při akutním zánětu	3
1.1.3	Chronický zánět.....	4
1.2	Makrofágy	6
1.2.1	Funkce makrofágů.....	7
1.2.2	Subpopulace makrofágů	8
1.3	Buněčná linie THP-1	11
1.3.1	Povrchové markery.....	12
1.4	Interakce klíště x hostitel.....	14
1.5	Serpiny.....	15
1.5.1	Iripin-3.....	16
1.5.2	Iripin-5.....	16
2	Cíle práce	17
3	Materiál a metody	18
3.1	Chemikálie a materiál	18
3.2	Buněčná kultura THP-1	18
3.2.1	Kultivace, pasážování.....	19
3.3	THP-1 diferenciaci.....	19
3.3.1	Diferenciaci makrofágů	19
3.3.2	Diferenciaci makrofágových subpopulací	19
3.3.3	Stimulace LPS, Iripinem-3 a Iripinem-5	20
3.3.4	Izolace RNA	20
3.3.5	Kvantitativní RT-PCR.....	21
3.3.6	Vyhodnocení výsledků	23
4	Výsledky	24
4.1	Výsledky qRT-PCR.....	24

4.1.1	Výběr vhodných primerů a referenčního genu	24
4.2	Morfologie subpopulací buněk.....	27
4.3	Výsledky qRT-PCR analýzy exprese znaků subpopulací	29
4.3.1	Výsledky exprese pro určení subpopulace M1	29
4.3.2	Výsledky exprese pro určení subpopulace M2a	29
4.3.3	Výsledky exprese pro určení subpopulace M2c	31
4.3.4	Exprese zánětlivých markerů v nestimulovaném stavu u kontrolních vzorků	32
4.3.5	Porovnání výsledků exprese zánětlivých markerů u subpopulace buněk M0	33
4.3.6	Porovnání výsledků exprese zánětlivých markerů u subpopulace buněk M1	35
4.3.7	Porovnání výsledků exprese zánětlivých markerů u subpopulace buněk M2a	37
4.3.8	Porovnání výsledků exprese zánětlivých markerů u subpopulace buněk M2c	39
5	Diskuse	41
6	Závěr	45
7	Seznam použité literatury	46

1 Teoretický úvod

1.1 Zánět

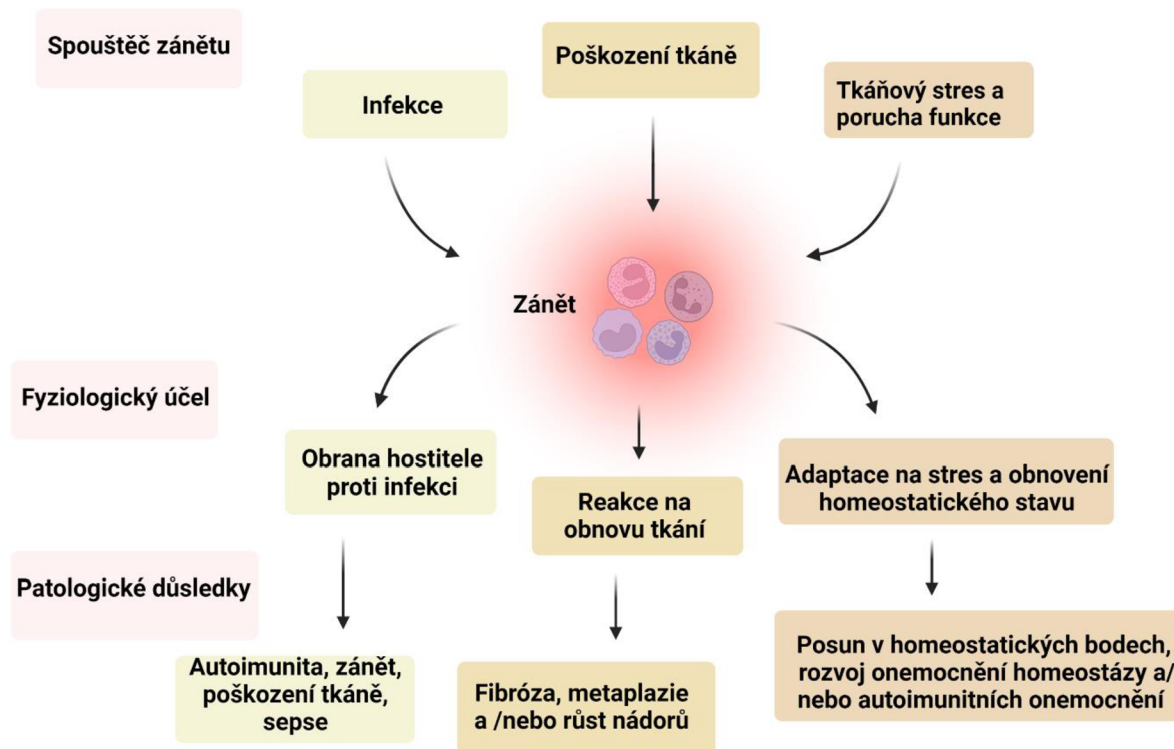
Zánět je koordinovaná lokální obranná reakce organismu vyvolaná mikrobiální infekcí či poraněním tkáně v těle vyšších obratlovců a představuje kritický mechanismus pro přežití (Liu et al., 2017). Tento proces je energeticky velmi náročný. Hlavní funkcí zánětu je eliminovat infekci, opravit poškozenou tkáň a vrátit organismus do stavu homeostázy (Barton, 2008). Imunitní systém reaguje na poškození tkáně, kdy dochází ke spuštění multifaktoriální sítě chemických látek, které iniciují a udržují reakci organismu tak, aby dokázal vyléčit postiženou tkáň (Liu et al., 2017). Celý proces je velmi přesně regulovaný, protože narušení rovnováhy tohoto mechanismu může vést k poškození tkáně nebo ke vzniku chronického zánětu (Kevin J. Tracey, 2002).

Mezi spouštěče, které vyvolají zánětlivou reakci patří poškození tkáně, infekce patogenními mikroorganismy nebo tkáňový stres. Každý z těchto spouštěčů představuje odlišný stres pro imunitní systém hostitele (Barton, 2008).

Imunitní systém je tvořen dvěma spolupracujícími větvemi. Vrozená imunita používá invariantní receptory k detekci a signalizaci mikrobiální infekce, tyto signály mají dvě hlavní funkce: spustit zánětlivou kaskádu, která pomáhá omezit infekci a aktivovat adaptivní imunitní systém. Adaptivní imunita spočívá ve tvorbě malého množství mikrobiálně specifických lymfocytů, což je proces velice účinný a specifický. Je ale podmíněn několika dny, než se plně rozvine, proto charakteristické znaky zánětu jsou zarudnutí, teplo, otok, bolest, které souvisí s rozpoznáváním vrozeného imunitního systému (Barton, 2008, Kevin J. Tracey, 2002). Zánětlivá odpověď na infekci se dá rozdělit do čtyř různých fází: rozpoznání infekce, rekrutaci buněk do místa infekce, eliminace zdroje zahrnující vyřešení zánětu a návrat k homeostáze (Barton, 2008).

Když imunitní buňky narazí na patogen, uvádí do pohybu lokální zánětlivou reakci, která zamezí rozšíření infekce. To zahrnuje především aktivaci a migraci leukocytů (neutrofilů, monocytů, eozinofilů) z cévního systému do míst poškození. (Belgiovine et al., 2016; Liu et al., 2017). Tyto kroky zahrnují aktivaci a zvýšenou expresi členů selektinové rodiny adhezivních molekul (L-,P-,E- selektin). Dochází k sekreci chemokinů, které rekrutují specifické populace leukocytů a efektorové buňky. Ty pak určují přirozené prostředí pro vývoj zánětlivé reakce (Liu et al., 2017). Úspěšné vyřešení zánětlivé reakce je založeno na řadě faktorů. Na buněčné úrovni je třeba snížit počet imunitních buněk v místě zánětu, na makroskopické úrovni je třeba obnovit integritu tkáně

pomocí aktivace tkáňově rezidentních buněk, které zahájí reparaci a návrat k homeostázi (Schett & Neurath, 2018). Obnova homeostáze a zdraví je podmíněna tím, že je zánět regulován protizánětlivými reakcemi, které musí být rychlé, reverzibilní, lokalizované, adaptivní na změny a integrovány nervovým systémem (Kevin J. Tracey, 2002). Schopnost rychle reagovat na zánětlivou invazi musí být v rovnováze se schopností zdržet se reakce. Obojí může způsobit nežádoucí stav v organismu, nadměrná imunitní reakce může vyvolat autoimunitní onemocnění. Pokud se zánět rozšíří do krevního oběhu dochází k sepsi až septickému šoku. Zánětlivá reakce může být v konečném důsledku nebezpečnější než samotný stimulus, který ji vyvolal (Kevin J. Tracey, 2002; Carl Nathan, 2002, Suzuki, 2019). Příčiny, fyziologický účel a patologické důsledky zánětu jsou shrnuty v Obr.1.



Obr.1: Příčiny, fyziologické a patologické důsledky zánětu, upraveno podle Medzhitov, 2008

1.1.2 Průběh reakce při akutním zánětu

Akutní zánětlivá reakce způsobená infekcí nebo poškozením tkáně, vyvolává koordinovaný přísun krevních složek do místa infekce nebo poškození. Receptory pro rozpoznávání vzorců (PRR) jsou proteiny cirkulující v krvi nebo jsou exprimovány na receptorech buněk vrozené imunity. Patogeny vstupující do těla kůží, perorálně nebo vdechnutím jsou rozpoznávány pomocí PRR prostřednictvím molekulárních vzorců asociovaných s patogenem (PAMPs), které vyvolávají zánětlivou reakci (Medzhitov, 2008, Brannon et al., 2022).

U mikrobiální infekce dojde ke spuštění receptorů vrozené imunity jako jsou Toll-like receptory (TLR) a NOD (nucleotide-binding oligomerization-domain protein) -like receptory (NLR). Počáteční rozpoznání infekce je zprostředkováno rezidentními makrofágy, dendritickými buňkami (DC) a neutrofily, které jsou prvními buňkami interagujícími s invazivními patogeny (Medzhitov, 2008, Brannon et al., 2022). Aktivované makrofágy a DC fungují jako antigen prezentující buňky a fagocytují cizorodé látky a tělesa, dále migrují do lymfatických uzlin, kde prezentují antigen lymfocytům (Brannon et al., 2022).

Po aktivaci jsou makrofágy hlavním zdrojem růstových faktorů a cytokinů, které ovlivňují endoteliální, epiteliální a mezenchymální buňky v místním mikro-prostředí (Mantovani et al., 2008). Aktivované endotelové buňky uvolňují zánětlivé cytokiny, např.: tumor nekrotizující faktor (TNF) a interleukiny (IL-1, IL-6, IL8 a IL-12) (Brannon et al., 2022). Bezprostředně poté dochází k vyvolání lokální zánětlivé reakce, kdy se do místa se dostávají plazmatické proteiny a neutrofily. Neutrofily lokalizují zánět na základě uvolňovaných cytokinů a chemokinů a poté se pomalu valí podél endotelu a pomocí regulovaných molekul selektinu exprimovaných na povrchu endotelu lokalizují přesnou polohu zánětu. Po dosažení zánětlivého místa se zvýší exprese integrinů na endotelu, který se pevně přilne k neutrofilům prostřednictvím LFA1, čímž iniciuje transmigraci. Dále aktivované neutrofily vylučují na svém povrchu selektiny (P-selektin a L-selektin) (Brannon et al., 2022). K usmrcení patogenů používají neutrofily několik mechanismů např.: uvolňování reaktivních forem kyslíku (ROS), reaktivních forem dusíku (RNS) nebo produkci extracelulárních pastí neutrofilů (NET) (Barton, 2008; Medzhitov, 2008, Brannon et al., 2022). Tyto látky však nedokáží rozlišit mezi nepřátelskou a hostitelkou tkání, a proto dochází k poškození místní tkáně, kterému nelze zabránit. Po zadržení infekce dojde pomocí apoptotických neutrofilů k rekrutaci monocytů a buněk adaptivní imunity, aby zahájily zánětlivou reakci. Úspěšná akutní zánětlivá reakce vede k eliminaci původců zánětu a dráždivých látek, které jsou z těla organismu odstraněny

(Medzhitov, 2008, Brannon et al., 2022). Následuje reparace tkáně, která je řízena především makrofágy sídlícími v místní tkáni a rekrutovanými makrofágy (Medzhitov, 2008).

Existují také zánětlivé stavy způsobené sterilním onemocněním bez patogenních příčin. Jedná se o mechanická poškození, vznik krevních sraženin nebo chemické dráždivé látky, které způsobí poškození na buněčné nebo tkáňové úrovni, což může iniciovat uvolňování molekulárních vzorců asociovaných s poškozením (DAMPs). Na uvolněné DAMPs reagují rezidentní imunitní buňky, což vede k produkci zánětlivých cytokinů (TNF a IL-1). I přesto, že není přítomen patogen, neutrofilů používají stejnou taktiku k potlačení zánětlivé reakce, nadměrné uvolňování ROS a NET může způsobovat poškození v okolních buňkách hostitele, což může vést k dalším patologickým stavům (Brannon et al., 2022).

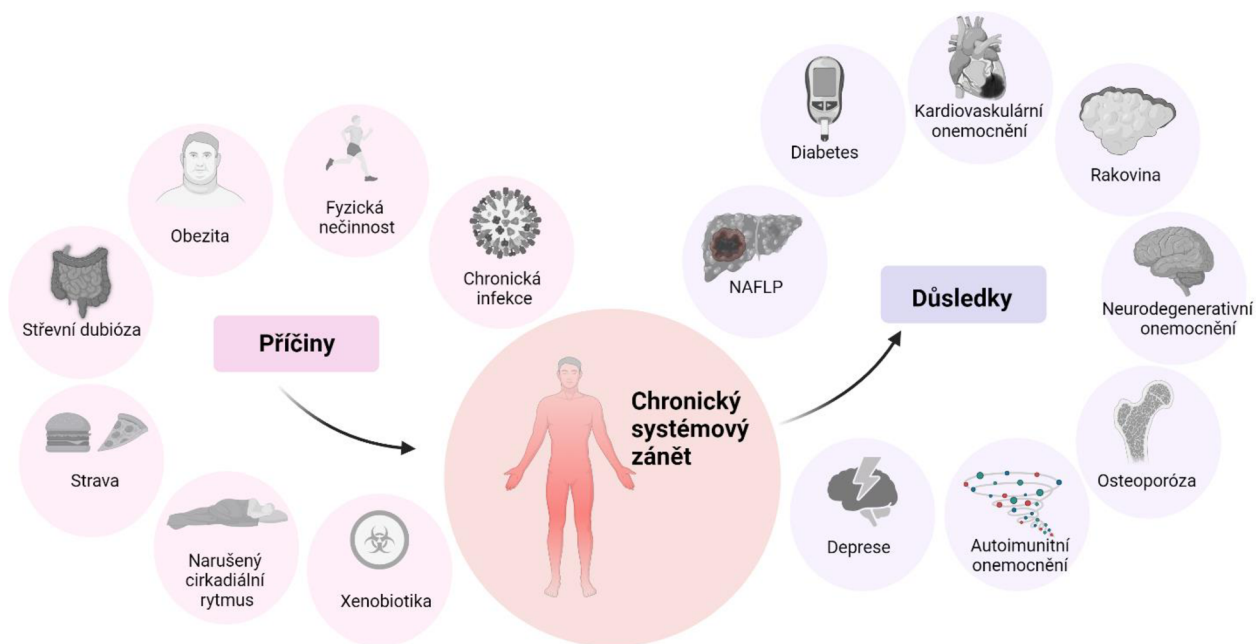
Pokud se nepodaří zánětlivou reakcí patogen či sterilní onemocnění odstranit, zánětlivý proces přetrvává. Mění svou charakteristiku, kdy neutrofilů jsou nahrazeny makrofágy, v případě infekce i T-lymfocyty. Když i tento systém selže, vzniká chronický zánět, který může být důsledkem dalších příčin poškození tkáně a vzniku mnoha onemocnění (Barton, 2008; Medzhitov, 2008).

1.1.3 Chronický zánět

Chronické zánětlivé stavy jsou spojeny s přetrvávajícími fyziologickými reakcemi, které mohou vést k degradaci tkáně a různým onemocněním. Ke vzniku chronického zánětu přispívá více faktorů včetně uvolňování zánětlivých mediátorů, produkovanými imunitními i neimunitními buňkami (Liu et al., 2017). V chronickém zánětu však hrají roli především aktivované makrofágy.

Chronický zánět podporuje vznik mnoha onemocnění, mezi které mohou patřit kardiovaskulární onemocnění, neurodegenerativní onemocnění, metabolický syndrom či autoimunitní onemocnění. Mezi potenciální příčiny vzniku chronických onemocnění patří: hromadění stárnoucích buněk, přetrvávající infekce, aktivované makrofágy, nerovnováha mezi pro- a proti-zánětlivými mediátory, genové mutace, epigenetické modifikace nebo špatný životní styl (Liu et al., 2017).

Rizikové faktory životního prostředí a životního stylu (Obr.2) mohou podporovat vznik systémového chronického zánětu (SCI). Ten může vést k několika onemocněním, které představují hlavní příčiny úmrtí na celém světě (Furman et al., 2019).



Obr.2: Příčiny chronického systémového zánětu, upraveno podle Furman et al., 2019

Mezi nejčastější spouštěče patří chronické infekce, fyzická nečinnost, obezita, střevní dubióza, nevhodná strava, sociální izolace, psychický stres, poruchy spánku, narušený cirkadiální rytmus nebo expozice k xenobiotikům (Obr.2). Mezi důsledky SCI patří metabolický syndrom, diabetes mellitus druhého typu, chronické onemocnění ledvin, nealkoholické ztučnění jater (NAFLD), kardiovaskulární onemocnění, neurodegenerativní poruchy, autoimunitní onemocnění či rakovina (Furman et al., 2019).

Metabolický syndrom je patologický stav, při kterém zánětlivé buňky pronikají do tukové a jiných tkání, kde se hromadí. Prozánětlivé mediátory (cytokiny) jsou nadměrně vylučovány zánětlivými buňkami a vedou k rozvoji aterosklerózy. Pokud dojde k chronickému ovlivnění cév, dochází k degradaci tkání nebo dysfunkci jiných orgánů (Suzuki, 2019).

Mezi autoimunitní zánětlivé nemoci patří chronická střevní onemocnění jako je Crohnova choroba nebo ulcerózní kolitida, ty postihují distální část tenkého nebo tlustého střeva. Dále pak revmatoidní artritida, která je nejzávažnějším zánětlivým onemocněním kloubů (Schett & Neurath, 2018).

V průběhu zánětu získávají důležitou roli makrofágy, a to buď zásadní pro- nebo proti-zánětlivou funkci. Jejich fyziologická změna je založena na vnitřních i vnějších mechanismech, které ovlivňují

přepínání funkce makrofágů a mohou představovat nový koncept v řešení léčby chronických zánětů (Schett & Neurath, 2018).

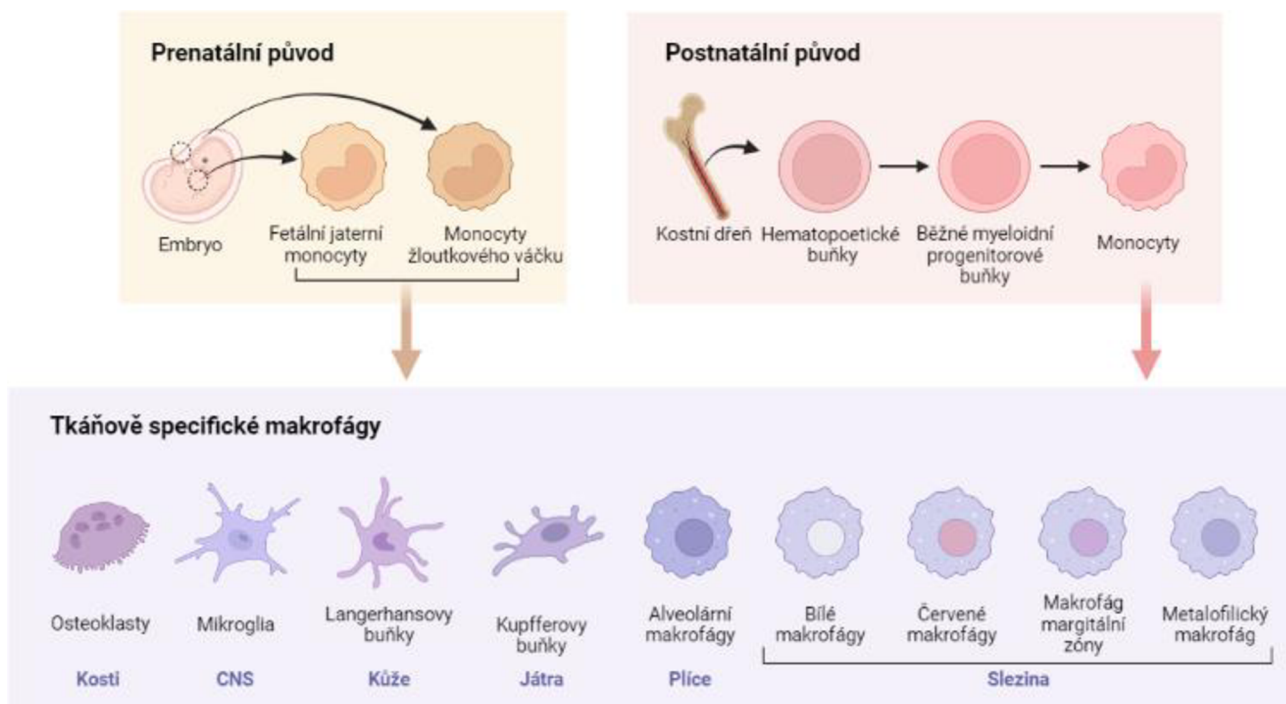
1.2 Makrofágy

Makrofágy jsou buňky imunitního systému, které představují jeden ze základních kamenů přirozené imunity. Uplatňují se jako antigen prezentující buňky a fagocyty. Jedná se o multifunkční typ buněk, který je přítomný ve většině tkání u obratlovců. Hrají roli ve všech aspektech biologie organismu, ať už se jedná o vývoj, homeostázu, opravy tkání nebo imunitní reakce na patogeny. Většinou jsou v organismu již v průběhu embryogeneze, u dospělých savců se nacházejí ve všech tkáních. Makrofágy vykazují funkční a morfológickou rozmanitost tak, že neustále mění svůj funkční stav v reakci na změnu fyziologie (Wynn et al., 2013).

Makrofágy se vyvíjejí během embryogeneze, kdy vznikají ze žloutkového váčku erytro-myeloidní progenitory (EMPs), které kolonizují embryonální tkáň a diferencují se na tkáňově specifické makrofágy již v průběhu těhotenství (Mass et al., 2023). V postnatálním vývoji vznikají monocyty ze společné hematopoetické kmenové buňky (HSC) pocházející z kostní dřeně. Procházejí mnoha diferenciačními kroky, následně jsou uvolňovány do periferní krve, odkud putují do tkání, kde doplňují populace tkáňových makrofágů (Gordon & Taylor, 2005, Mosser & Edwards, 2008, Mass et al., 2023).

Makrofágy lze rozdělit do dvou skupin podle původu (Obr.3.)

- Prenatální vývoj
 - Ze žloutkového váčku
 - Z fetálních jater
- Postnatální vývoj
 - Z kostní dřeně – diferenciace monocytů, která dává vzniknout dvěma fenotypům monocytů a tkáňově specifickým makrofágům (Obr.3)



Obr.3: Původ makrofágů, upraveno podle (Mosser & Edwards, 2008)

Tkáňově specifické makrofágy, které se od sebe liší, jak morfoloicky, tak funkčně v závislosti na typu tkáně, kde se nacházejí, vznikají vlivem lokálních cytokinů a dalších faktorů. Z toho důvodu se nazývají i různými jmény (Obr.3) (Kadomoto et al., 2022). Osteoklasty uvolňují minerály z kostí do krve, mikroglie zajišťují imunitní dohled v mozku, Langerhansovy buňky interagují s T-lymfocyty v kůži, Kupfferovy buňky v játrech se podílejí na likvidaci mikrobů a odpadních látek jako jsou buněčné zbytky z krevního oběhu, alveolární makrofágy v plicích slouží jako obrana proti inhalovaným patogenům a makrofágy ve slezině jsou zodpovědné za odstraňování starých červených krvinek (Davies et al., 2013; Mosser & Edwards, 2008; Pei & Yeo, 2016).

1.2.1 Funkce makrofágů

Makrofágy hrají zásadní roli při likvidaci patogenů, apoptotických buněk a buněčných zbytků. Jsou strategicky rozmístěny po celém těle, aby detekovaly invazi mikrobiálních patogenů. Makrofágy detekují endogenní signály nebezpečí, které jsou přítomny v částech nekrotických buněk. Pro účinnou detekci infekce jsou makrofágy vybaveny řadou receptorů, které umožňují rozpoznávání opsonizovaných patogenů prostřednictvím PRR, komplementu nebo Fcγ receptorů (FcγRs). Mimo to jsou makrofágy hlavním zdrojem senzoričských proteinů, jako je složka komplementu C1q, která po navázání na opsonizované patogeny spouští prozánětlivou kaskádu komplementu. Makrofágy

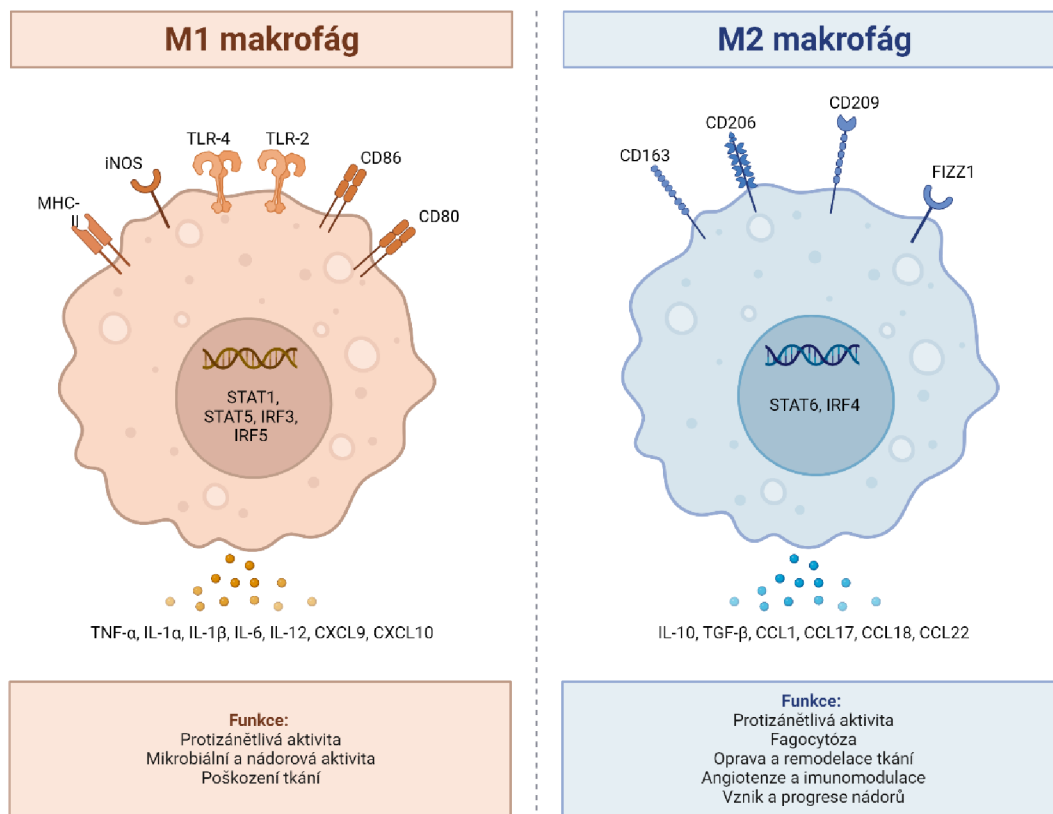
tak lze považovat za jeden z primárních senzorů nebezpečí v těle obratlovců (Hou et al., 2023; Mass et al., 2023; Mosser & Edwards, 2008).

Aktivované makrofágy migrují do míst infekce a uvolňují do svého okolí látky, které přispívají k likvidaci patogenů, což pak může vyvolat akutní nebo chronický zánět (viz kapitoly 1.1.2 a 1.1.3). Signalizační látky můžeme rozdělit na enzymy (proteolytické, antibakteriální), chemokiny, cytokiny – ať už prozánětlivé (IL-1 β , TNF- α , IL-6) nebo protizánětlivé (IL-10, TGF- β) (Gordon, 2003).

V nepřítomnosti infekce se makrofágy díky svému prostorovému rozmístění v orgánech dostávají do centra pozornosti a odstraňují potencionální infekce, které by mohly vyvolat zánětlivé nebo imunitní reakce. To zahrnuje především odstraňování odumírajících buněk, které vznikají při procesu pozitivní nebo negativní selekce v imunologických orgánech jako je brzlík, slezina, kostní dřeň a lymfatické uzliny. Neschopnost makrofágů včas odstranit apoptotické buňky má za následek přechod od apoptózy k nekróze nebo nekroptóze (imunogenní forma buněčné smrti), která může skončit vyvoláním tkáňového zánětu (Mass et al., 2023).

1.2.2 Subpopulace makrofágů

Od objevu makrofágů se předpokládalo, že existuje jen jeden typ, výsledky posledních let ale ukazují, že existuje více podtypů makrofágů. Makrofágy mohou být polarizovány na klasicky aktivované (M1) a alternativně aktivované (M2), kdy makrofágy M2 se dělí na podkategorie M2a, M2b, M2c a M2d. Tyto makrofágy se liší svými povrchovými markery, vylučovanými cytokiny a biologickými funkcemi viz. Obr.4. Makrofágy M1 jsou považovány za prozánětlivé a M2 za protizánětlivé, nicméně M1 makrofág se může změnit na M2 a naopak.



Obr.4: Shrnutí rozdílu mezi makrofágy M1 a M2, jejich povrchovými markery, vylučovanými cytokiny a biologickými funkcemi, upraveno podle Yao et al., 2019

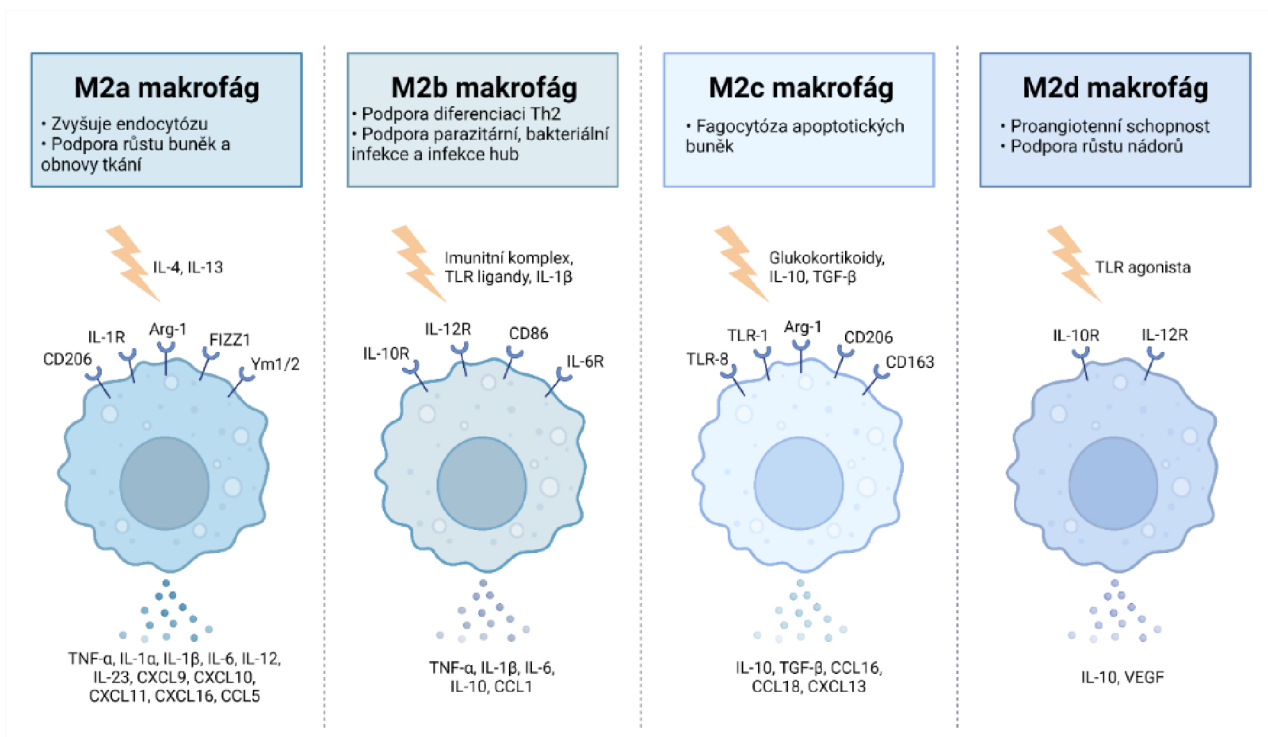
1.2.2.1 Makrofágy M1

Klasicky aktivované makrofágy M1 se podílejí na obraně proti bakteriální a virové infekci a na zabíjení zhoubných nádorových buněk. Fenotyp M1 je iniciován z klidového stavu makrofágů, které jsou zodpovědné za odpověď na PAMPs. Po aktivaci lipopolysacharidem (LPS) a Th1 cytokiny (především IFN- γ) se makrofágy polarizují na makrofágy M1 a vyznačují se povrchovými znaky TLR-2, TLR-4, CD80, CD86, iNOS a MHC-II. Tyto buňky uvolňují různé cytokiny a chemokiny (např.: TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, CXCL9 a CXCL10), které poskytují pozitivní zpětnou vazbu nepolarizovaným makrofágům. Tyto faktory mění více nepolarizovaných makrofágů do stavu M1. Exprese M1 genů reguluje klíčové transkripční faktory, jako jsou STAT1, STAT5, IRF3 a IRF5 (Chanput et al., 2013; Kadomoto et al., 2022; Mantovani et al., 2005; Yao et al., 2019). M1 makrofágy se tak podílí na udržování homeostáze v těle pomocí podpory zánětu, což zajišťuje obranu proti infekci, ale i proti nádorovými buňkám (Belgiovine et al., 2016; Qiu et al., 2019).

1.2.2.2 Makrofágy M2

K polarizaci M2 dochází v reakci na Th2 cytokiny IL-4, IL-13, IL-10, IL-33 a TGF- β . Makrofágy M2 lze identifikovat podle exprese povrchových molekul, jako jsou manitolový receptor, CD206, CD163, CD209, FIZZ1. M2 makrofágy vykazují vyšší expresi cytokinů a chemokinů, jako jsou IL-10, TGF- β , CCL1, CCL17, CCL18 a CCL22, které dále směřují nepolarizované makrofágy k polarizaci do stavu M2. Klíčové jsou transkripční faktory STAT6 a IRF4, regulující expresi M2 genů. M2 makrofágy přispívají k procesu prevence infekcí, obnově tkání, angiogenezi a imunomodulaci, hrají roli při infekci parazity, tlumí zánět, alergii a mají vliv na progresi nádorů (Bashir et al., 2016; Biswas & Mantovani, 2010; Chanput et al., 2013; Yao et al., 2019)

Makrofágy M2 lze dále rozdělit do několika dalších podskupin M2a, M2b, M2c a M2d, které mají specifické funkce v těle organismu (Obr.5).



Obr.5: Shrnutí rozdílů mezi subpopulacemi M2 makrofágů – M2a, M2b, M2c a M2d, na základě povrchových markerů, produkce cytokinů a funkce, upraveno podle Yao et al., 2019

1.2.2.3 Makrofágy M2a

Diferenciace na tuto populaci je stimulace cytokiny IL-4 nebo IL-13 a vyznačuje se zvýšenou expresí cytokinů TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12 a chemokinů CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11. M2a makrofágy zvyšují endocytickou aktivitu, podporují růst buněk, obnovu tkání a mají obecně protizánětlivé účinky (Shapouri-Moghaddam et al., 2018; Yao et al., 2019).

1.2.2.4 Makrofágy M2b

Makrofágy M2b jsou aktivovány pomocí kombinované expozice imunokomplexu a agonistů TLR a IL-1 β (Wang et al., 2019). Uvolňují pro- i proti- zánětlivé cytokiny jako jsou TNF - α , IL-1 β , IL-6 a IL-10. Na základě exprese cytokinů a chemokinů M2b makrofágy regulují intenzitu imunitní a zánětlivé reakce. Podporují diferenciaci Th2 buněk, rozvoj nádorů a parazitárních, bakteriálních a plísňových infekcí tím, že inhibují imunitní a zánětlivou reakci (Shapouri-Moghaddam et al., 2018; Wang et al., 2019; Yao et al., 2019).

1.2.2.5 Makrofágy M2c

Makrofágy M2c jsou známé jako inaktivované makrofágy jsou indukované glukokortikoidy, IL-10 a TGF- β . Tyto buňky vylučují IL-10, TGF- β , CCL16, CCL18 a se podílejí především na fagocytóze apoptotických buněk. Mají silně protizánětlivé účinky, a to vlivem uvolňováním velkého množství IL-10 (Shapouri-Moghaddam et al., 2018; Wang et al., 2019; Yao et al., 2019).

1.2.2.6 Makrofágy M2d

Makrofágy M2d jsou indukované agonisty TLR uvolňují IL-10 a vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), díky jejich přítomnosti v nádorovém mikroprostředí jsou nazývané jako tumor-asociované makrofágy (TAM) a přispívají k angiotenzi a metastázování nádorů (Shapouri-Moghaddam et al., 2018; Yao et al., 2019).

1.2.2.7 Makrofág M4

Jedná se poměrně nově klasifikovanou subpopulaci makrofágů, vznikající indukcí chemokinem CXCL4, která mění svůj fenotyp a produkují některé prozánětlivé cytokiny konkrétně IL-6 a TNF- α . M4 makrofágy se vyskytují v aterosklerotických placích, exprimují matrixovou metaloproteinázu 7 (MMP), na základě, které byly identifikovány (Chanput et al., 2013; De Paoli et al., 2014; De Sousa et al., 2018).

1.3 Buněčná linie THP-1

Monocytární buněčná linie THP-1 byla derivovaná z periferního krevního oběhu jednoletého chlapce s akutní monocytární leukémií (Tsuchiya et al., 1980). Linie reaguje na lipopolysacharid (LPS) a má většinu signálních drah jako zánětlivé monocyty (Adati et al., 2009; Baxter et al., 2020). Diferencované makrofágy mají znaky podobné jako makrofágy rezidentní tkáně a buňky přirozené imunitní odpovědi. K diferenciaci linie na makrofágy se používají stimulační látky phorbol 12-myristát 13-acetát (PMA) nebo dihydroxyvitamin D3 (VD3), které indukují jejich diferenciaci (Daigneault et al., 2010). Samotné přidání PMA nebo VD3 vede k tomu, že se buňky přichytí na dno kultivační lahve a přijmou morfologii hvězdičky. Tyto buňky pak mohou exprimovat některé

makrofágové markery (např. CD14 nebo CD36), mohou fagocytovat či uvolňovat vyšší hladiny TNF, než nediferencované buňky bez působení PMA. Pro diferenciaci makrofágových subpopulací z THP-1 buněk se používají konkrétní stimulanty (viz kapitola 1.2.2 Subpopulace makrofágů).

1.3.1 Povrchové markery

Lidské makrofágy dělíme do dvou aktivačních stavů na základě jejich reakcí na podněty.

Makrofágy M1 vykazují fenotyp, který silně reaguje na molekulární vzory asociované s patogeny (PAMPs) nebo na Th1 cytokiny. M1 fenotyp je charakterizován také vysokou produkcí prozánětlivých cytokinů, dále pak expresí PRR jako jsou TLR a NLR (Chanput et al., 2013; Kadomoto et al., 2022).

Makrofágy M2 jsou derivovány pomocí Th2 cytokinů. Existují čtyři podskupiny makrofágů M2 – M2a, M2b, M2c a M2d (viz kapitola 1.2.2.2). Tyto třídy lze identifikovat na základě produkce různých povrchových znaků a chemokinů (Baxter et al., 2020; Chanput et al., 2013; Kurygina et al., 2018). Charakteristické znaky jsou vypsány v tabulce 1.

Tabulka 1: Klasifikace molekul, upraveno podle (Huang et al., 2018; Martinez et al., 2006)

Makrofágy	Látka	Zkratka	
M1	<i>Cytokin/chemokin</i> CXCL 9	CXCL-9	
	<i>Cytokin/chemokin</i> CXCL 10	CXCL-10	
	<i>DNA binding faktor</i> Interferon regulační faktor 1	IRF-1	
	<i>Transkripční faktor</i> Přenašeč signálu a aktivátor transkripce 1	STAT-1	
M2a	<i>Enzym</i> Arachidonát 15 - lipoxygenáza	ALOX-15	
	<i>Membránový receptor</i> Manózoový receptor C typ 1	MRC-1	
	<i>Cytokin/chemokin</i> CCL-17	CCL-17	
	<i>Enzym</i> Transglutamináza 2	TGM-2	
	<i>Membránový glykoprotein</i> CD200 receptor	CD200R	
	M2c	<i>Membránový receptor</i> Diferenciační klastr/cluster of differentiation 163	CD-163
		<i>Součást komplementu</i> Řetězec A komplementu C1q	C1QA
<i>Extracelulární mediátor</i> Selenoprotein P1		SEPP1	

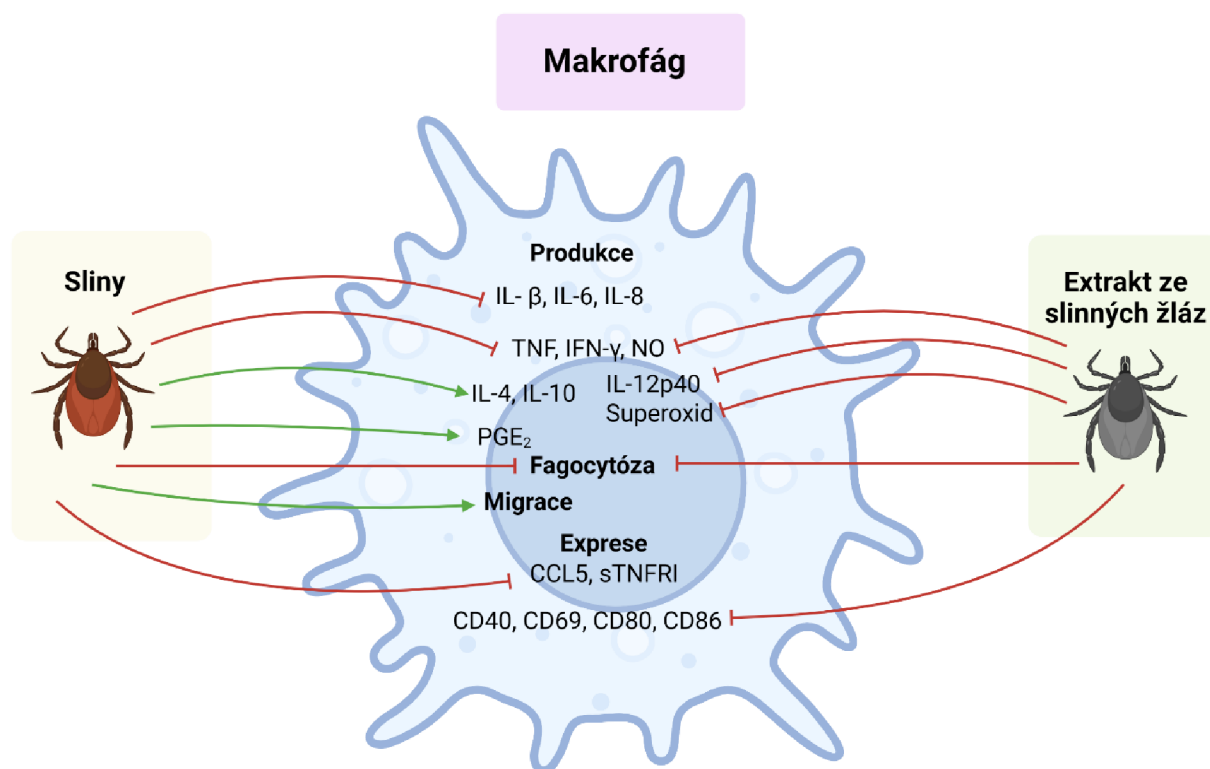
1.4 Interakce klíště x hostitel

Klíště je krev sající ektoparazit, který se pomocí hypostomu přichytí na svého hostitele a je schopen se několik dní krmit až do nasycení. Infikovaná klíšťata jsou vektory celé škály virových a bakteriálních onemocnění, ale mohou být také přenašeči hub, prvoků či helmintů (Kotál et al., 2015). Mezi epidemiologicky významné choroby přenášené klíšťaty patří klíšťová encefalitida, borelióza, klíšťaty způsobená skvrnitá horečka a babezióza (Kazimírová et al., 2017; Kotál et al., 2015).

Kůže je prvním hostitelským orgánem, se kterým se klíště setká během svého sání. Kožní imunitní buňky hrají klíčovou roli v počáteční reakci klíště-hostitel. Klíště potřebuje relativně dlouhou dobu k tomu, aby se plně nasytilo krví hostitele, proto se u něj vyvinuly mechanismy, které potlačují obranné imunitní reakce (Abbas et al., 2022). Průnik kůže a její mechanické poškození vyvolává hostitelovu imunitní, zánětlivou, hemostatickou a hojivou reakci vedoucí k odstranění nebo odmítnutí klíštěte. Klíšťata se tomu brání tím, že sekretují koktejl bioaktivních molekul ve svých slinách, které působí proti různým složkám obranných reakcí hostitele, jako je hemostáze, vznik zánětu nebo hojení ran (Kazimírová et al., 2017; Poole et al., 2013). Tyto imunomodulační vlastnosti klíštěte, pomáhají překonat první linii obrany, proti poranění a časné interakci klíště-hostitel v kožním rozhraní a mohou tak být zásadní pro úspěšný přenos infekcí (Kazimírová et al., 2017).

Bylo prokázáno, že sliny klíšťat regulují aktivní migraci mnoha buněčných typů a aktivitu chemokinových proteinů. Složky klíštěcích slin mají supresivní účinky na vrozenou imunitu a to tím, že regulují počet neutrofilů a fagocytů, dále vliv na adherenci, apoptózu a aktivitu NK buněk (Kotál et al., 2015). Sliny klíšťat obsahují molekuly, které řídí angiogenezi hostitele a hojení ran po krmení. Ve vysoké koncentraci se ve slinách vyskytují prostaglandiny, např. prostaglandin E2 (PGE2), který zvyšuje vazodilataci a zmírňuje zánět pomocí regulace produkce cytokinů (Poole et al., 2013).

Mezi makrofágy a klíštěcími slinami bylo identifikováno mnoho interakcí, což naznačuje, že makrofágy hrají roli v obraně hostitele. Účinky slin nebo extraktu ze slinných žláz (SGE) na makrofágy jsou shrnuty v Obr.6. Sliny i SGE inhibují produkci TNF, INF- γ , NO a schopnost fagocytózy. Sliny samotné inhibují produkci IL- β , IL-6, IL8 a expresi CCL5 a sTNFR1, zvyšují však produkci IL-4, IL-10 a PGE₂ a podporují migraci makrofágů. SGE inhibuje, kromě výše zmíněného, produkci IL-12p40, superoxidu, a expresi CD40, CD69, CD80 a CD86.



Obr.6: Interakce mezi makrofágem, extraktem ze slinných žláz a slinami klíštěte, upraveno podle Kotál et al., 2015.

Studium slin na molekulární úrovni ukázalo, že inhibitory serinových proteáz tzv. serpiny hrají klíčovou roli v interakci klíště-hostitel. Jedná se především o inhibici hemostatických procesů hostitele a modulaci vrozené a adaptivní imunitní reakce u obratlovců (Abbas et al., 2022; Kotál et al., 2015).

1.5 Serpiny

Jeden z mechanismů homeostáze v těle jedince je regulace proteolytických enzymů ve tkáních pomocí endogenních inhibitorů. Tyto proteiny se nacházejí v krevní plazmě, kde existuje několik tříd inhibitorů proteáz, nejvíce zastoupeny jsou inhibitory z nadrodiny označované jako serpiny (zkratka anglického serine protease inhibitors). Serpiny byly nalezeny u zvířat, rostlin, virů, bakterií a archeí (Law et al., 2006; Potempa et al., 1994) Celkem bylo identifikováno více jak 18 000 serpinů (Spence et al., 2021).

Serpiny hrají důležitou roli v regulaci fyziologických drah řízených serinovými proteázami, jak už napovídá jejich název, a to jak v obratlovcích, tak u bezobratlých. Jedná se o procesy jako koagulace hemolymfy a krve, fibrinolýza, zánět nebo aktivace komplementu. Jsou ale i serpiny,

které jsou neinhibiční, jako například některé přenašeče hormonů, nádorové supresory nebo hormony modulující biologické procesy jako je regulace krevního tlaku (Abbas et al., 2022; Law et al., 2006; Potempa et al., 1994; Silverman et al., 2010).

U klíšťat jsou serpiny exprimovány v různých vývojových stádiích a tkáních, což může ukazovat na jejich roli ve fyziologii klíštěte nebo v interakci mezi klíštětem a hostitelem. Různé úrovně exprese v tkáních naznačují, že by se mohly serpiny podílet na vývoji (přítomnost ve vaječnicích) nebo v regulaci trávení krve (přítomnost ve střevě). Jejich exprese a přítomnost ve slinných žlázách nebo slinách ukazuje, že by mohly hrát roli při sání klíšťat a tím ovlivňovat mechanismus rezistence hostitele a usnadňovat tak přenos patogenů (Abbas et al., 2022).

1.5.1 Iripin-3

Iripin-3 je serpin exprimovaný ve slinných žlázách klíštěte *Ixodes ricinus*, který silně inhibuje proteolytickou aktivitu kallikreinu a matriptázy. Nukleotidová sekvence Iripinu-3 má 1182 bp a kóduje protein o 377 aminokyselinách s předpokládanou mol. hmotností přibližně 42 kDa. Iripin-3 je schopen modulovat adaptivní imunitní odpověď. Snižuje produkci prozánětlivého cytokinu IL-6 u makrofágů z kostní dřeně stimulovaných LPS. Dále potlačuje proliferaci CD4⁺ T buněk a inhibuje Th1 imunitní reakci (Chlastáková et al., 2021).

1.5.2 Iripin-5

Iripin-5 je serpin vyskytující se ve slinných žlázách klíšťat *Ixodes ricinus*, kde působí jako modulátor obranných mechanismů hostitele. Narušuje migraci neutrofilů a potlačuje produkci nitricoxidu a mění funkce komplementu. Iripin-5 vykázal nejvyšší inhibiční specifitu vůči dvěma neutrofilním proteázám: lidské neutrofilní elastáze a proteináze 3 (Kascakova et al., 2021).

2 Cíle práce

- Ověřit metody diferenciací makrofágů z THP-1 linie lidských monocytů pomocí detekce exprese markerů specifických pro jednotlivé subpopulace.
- Provést morfologické porovnání subpopulací makrofágů.
- Otestovat vliv vybraných klíčících serpinů na zánětlivou aktivaci různých makrofágových subpopulací.

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie a materiál

Chemikálie	Výrobce	Katalogové číslo
Kultivace a stimulace		
THP-1 linie	ATCC	TIB-202
RPMI 1640 medium	Gibco	11875093
BOFES	Biotech	FB-1001B/500
L-glutamin	Biotech	LM-D1102/500
antibiotika	Sigma-Aldrich	A5955
BSA	Thermo Fisher Scientific	37525
2-merkaptoethanol	Sigma- Aldrich	444203
trypanová modř	Thermo Fisher Scientific	A18600.14
PMA	Thermo Fisher Scientific	J63916.MCR
LPS	Thermo Fisher Scientific	L23352
Rekombinantní lidský IL-4	Bio-techne	204-IL/CF
Rekombinantní lidský IL-10	Bio-techne	1064-IL/CF
Rekombinantní lidský INF- γ	Bio-techne	285-IF
Iripin -3	Vlastní výroba	
Iripin -5	Vlastní výroba	
Izolace RNA		
<i>NucleoSpin® RNA, Mini kit for RNA purification</i>	Macherey-Nagel	740955.250
β -mercaptoethanol	Sigma- Aldrich	444203
ethanol	Sigma- Aldrich	1085430250
Příprava cDNA		
<i>Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Roche	04 896 866 001
RT-PCR		
<i>FastStart Universal SYBR® Green Master (ROX)</i>	Roche Diagnostics	43671200
DNA/RNAse free voda	Invitrogen	10977-035

3.2 Buněčná kultura THP-1

THP-1 je suspenzní lidská monocytární leukemická buněčná linie, derivovaná z pacienta s akutní monocytární leukémií. K pokusům byla použita 11.-13. pasáž linie, která byla uložena v tekutém dusíku na pracovišti školitele.

3.2.1 Kultivace, pasážování

Kultivace těchto buněk probíhala v kultivačních lahvích T-25 při koncentraci 300-500 tisíc buněk/ml. Obsahem kultivačního média bylo: RPMI 1640 + 10 % BOFES + 1 % L-glutamin + 1 % antibiotika (ATB) + 0,1 % 2-merkapt ethanol (ME). Buňky byly pravidelně pasážovány, každé dva až tři dny, a to pouze odebráním přebytečného materiálu a doplněním čerstvého média.

3.3 THP-1 diferenciac

3.3.1 Diferenciac makrofágů

THP-1 buňky byly nejprve diferenciovány pomocí PMA (phorbol 12-myristát 13-acetát) na M0 makrofágy. Kultivace probíhala ve 12-ti jamkových panelech v koncentraci 500 tis. buněk/ml a objemu 1 ml. Pokus byl ještě 1x opakován, celkem tedy proběhla dvě měření a nich byly vybrány reprezentativní výsledky k vyhodnocení.

Úvodním pokusem bylo zjištěno, že při koncentraci 300 tisíc buněk/ml vycházející z dostupných protokolů (Baxter et al., 2020; Smith et al., 2015), bylo vyizolováno nedostatečné množství RNA. Do jamek byla proto přidána suspenze buněk, aby výsledná koncentrace byla 500 tis. buněk v 1 ml.

Proces stimulace probíhal 72 hodin. Nejprve byla vytvořena suspenze kultivovaných buněk, ke kterým bylo přidáno PMA v koncentraci 20 ng/ml a to bezsérovém médiu (100 ml RPMI + 1% ATB, 0,1% ME + 1% BSA). Po uplynutí doby 72 hodin, bylo vyměněno médium za kultivační a buňky se inkubovaly dalších 72 hodin. Buňky působením PMA získaly schopnost adherence ke dnu jamek. Tímto procesem byly vytvořeny buňky M0 – čili neaktivované makrofágy.

3.3.2 Diferenciac makrofágových subpopulací

Po uplynutí stimulační a inkubační doby byly buňky znovu stimulovány nyní už podle konkrétní subpopulace. Celkem byly použity čtyři 12-ti jamkové panely pro populace M1, M2a a M2c, populace M0 nebyla již ničím stimulována a tvořila kontrolní vzorek, této skupině bylo jen vyměněno médium. Stimulace trvala 48 hodin. Výsledkem této stimulace byly čtyři skupiny makrofágů, kontrolní skupina M0 a subpopulace M1, M2a a M2c. Příslušný stimulant a jeho koncentrace jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Rozdělení subpopulací podle typu stimulace

Subpopulace	Stimulace	Koncentrace
M1	IFN- γ	20 ng/ml
	LPS	250 ng/ml
M2a	IL-4	20 ng/ml
M2c	IL-10	20 ng/ml

3.3.3 Stimulace LPS, Iripinem-3 a Iripinem-5

Po 48 hodinách diferenciaci buněk na jednotlivé subpopulace bylo všem testovaným buňkám vyměněno médium za médium bez séra. Po pěti hodinách bylo přidáno médium se stimulanty. Celkem bylo 12 vzorků ve 4 skupinách po třech opakováních, jedna skupina zůstala kontrolní, druhá byla stimulována 100 ng/ml LPS, třetí LPS a 3 μ M Iripinem-3 a čtvrtý LPS a 3 μ M Iripinem-5. Aktivace zánětu trvala 24 hodin a před uplynutím doby byly ještě všechny vzorky vyfotografovány pod mikroskopem k následné morfologické analýze. Po 24 hodinách byla vyizolována RNA, která byla dále zpracována a analyzována.

3.3.4 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byla použita souprava *NucleoSpin® RNA, Mini kit for RNA purification* od Macherey-Nagel, izolace probíhala pomocí kolonek dle návodu výrobce. Hodnoty koncentrace vyizolované RNA byly změřeny na microplate readeru Synergy H1 (Biotech) za použití Take3-trio modulu. Hodnoty koncentrace RNA se u prvního pokusu pohybovaly v rozmezí od 90 ng/ μ l do 200 ng/ μ l a lišily se podle typu stimulace. Nejméně RNA bylo v obou případech vyizolováno ze vzorků buněk subpopulace M1. Konečné množství RNA pro reverzní transkripci bylo 1 μ g, případně bylo upraveno podle vzorku s nejnižší koncentrací. V případě prvního pokusu bylo použito 1 μ g RNA a v případě druhého pokusu 600 ng, z důvodu nízké koncentrace RNA u M1 subpopulace, kdy nejnižší naměřená koncentrace RNA byla 47 ng/ μ l.

Vyizolovaná RNA byla přepsána reverzní transkripcí do cDNA podle protokolu výrobce *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche). Reverzní transkripce probíhala v gradientovém PCR cyklu Biometra Tone, po dobu 60 minut při teplotě 50 °C. Inaktivace proběhla zvýšením teploty na 85 °C po dobu 5 minut, a před vyjmutím z cyklu byly vzorky udržovány při teplotě 4 °C. Vzorky cDNA byly uchovány při -20 °C a před analýzou qRT-PCR byly 10x zředěny pomocí RNase free H₂O.

3.3.5 Kvantitativní RT-PCR

Kvantitativní RT-PCR analýza byla použita jak k analýze několika markerů, subpopulací makrofágů tak genů zánětlivých cytokinů. Použit byl *FastStart Universal SYBR® Green Master (ROX)* od Roche. Vyhodnocení probíhalo 384 jamkových destičkách a cykleru CFX384 (BioRad).

Koncentrace jednotlivých složek byla použita podle tabulky 3.

Vlastní reakční podmínky qRT-PCR byly nastaveny podle tříkrokového protokolu a upraveny následovně: počáteční denaturace 95°C/5 min, následovalo 40 cyklů (95 °C/10 s, 60 °C/15 s, 72 °C/10 s) a dále denaturace 95°C/10 s a analýza křivky tání, která začínala na 65°C, zvyšovala se po 0,5 °C probíhala do 95 °C a každý jednotlivý krok trval 5 s . Na každé reakční desce byla vždy přítomna také negativní kontrola. Základní vyhodnocení dat probíhalo v programu Bio-Rad MAESTRO. Úvodní pokus sloužil k výběru vhodného referenčního genu, který byl pak používán k normalizaci výsledků. V průběhu vyhodnocování pokusů byla také kontrolována křivka tání, aby byla odhalena případná syntéza více produktů. Na základě této analýzy bylo zjištěno, že u zánětlivého cytokinu IL-6 docházelo ke vzniku dvou produktů. Z tohoto důvodu pak byly testovány dva další páry primerů IL-6 a pro další testování byl vybrán pouze jeden, který netvořil více produktů.

Tabulka 3: Množství a seznam použitých látek na qRT-PCR

Látka	Množství/jamka
SYBR Green	7,5 µl
10 µM primer forward + reverse	0,3 µl + 0,3 µl
H ₂ O	4,9 µl
cDNA (template)*	2 µl
celkem	15 µl

* pro první pokus byla koncentrace cDNA v roztoku 100 ng/µl (celkem tedy 200 ng v reakci), pro druhý pokus byla koncentrace cDNA v roztoku 60 ng/µl (celkem tedy 120 ng v reakci)

Tabulka 4: Použité sekvence primerů (Baxter et al., 2020; Kurycina et al., 2018; Martinez et al., 2006)

Zánětlivé markery		
Human IL-6	GGTACATCCTCGACGGCATCT	forward
	GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC	reverse
Human IL-6_02	GGTACATCCTCGACGGCATCT	forward
	GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC	reverse
Human IL-6_04	CCAGCTATGAACTCCTTCTC	forward
	GCTTGTTCCCTCACTACTCTC	reverse
Human IL-8	GAGAGTGATTGAGAGTGGACCAC	forward
	CACAACCCTCTGCACCCAGTTT	reverse
Human TNF-α	CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG	forward
	ATGGGCTACAGGCTTGCTACTC	reverse
Human IL-1β	CCACAGACCTTCCAGGAGAATG	forward
	GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG	reverse
Markery k určení subpopulace M1		
Human CXCL-9	GCTGGTTCTGATTGGAGTGC	forward
	GAAGGGCTTGGGGCAAATTG	reverse
Human CXCL-10	CCTTATCTTTCTGACTCTAAGTGG	forward
	CTAAAGACCTTGGATTAACAGG	reverse
Human IRF-1	GGAAGGGAAATTACCTGAGG	forward
	CTCCAGGTTTCATTGAGTAGG	reverse
Human STAT-1	CAATGCTTGCTTGGATCAGC	forward
	GTGATAGGGTCATGTTGCTAGG	reverse
Markery k určení subpopulace M2		
Human ALOX-15	CAGATGTCCATCACTTGGCAG	forward
	CTCCTCCCTGAACTTCTTCAG	reverse
Human CCL-17	CTTCTCTGCAGCACATCCAC	forward
	CAGATGTCTGGTACCACGTC	reverse
Human MRC-1	CGAGGAAGAGGTTCCGGTTCACC	forward
	GCAATCCCGGTTCTCATGGC	reverse
Human CD200R	CTGTACATAGAGCTACTTCTGTTC	forward

	GCATTTCATCCTCCTCAACAACCTGG	reverse
Human TGM-2	GCAGTGACTTTGACGTCTTTGCC	forward
	GTAGCTGTTGATAACTGGCTCCACG	reverse
Markery k určení subpopulace M2c		
Human CD-163	GAGGAGACCTGGATCACATGTGA	forward
	GACCACAGCCAAGTTGTTGACACAC	reverse
Human C1QA	GAGCATCCAGTTGGAGTTGAC	forward
	CAAGTCCTCGGTCACCATAGA	reverse
Human SEPP-1	GTGGAGCTGCCAGAGTAAAAG	forward
	CCAGGCTTCTCCACATTGCTG	reverse
Markery referenčních genů		
Human RPL-37	TTCCGCTCGTCCGCCTAATAC	forward
	GGCCAGTGATGTCTCAAAGAG	reverse
Human RPL-32	ACAAAGCACATGCTGCCCAGTG	forward
	TTCCACGATGGCTTTGCGGTTTC	reverse
Human GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	forward
	GAAGATGGTGATGGGATTTC	reverse
Human ACTB	TGGCACCCAGCACAATGAA	forward
	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	reverse
Human HPRT-1	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT	forward
	AGACGTTTCAGTCCTGTCCATAA	reverse

3.3.6 Vyhodnocení výsledků

Fotografie z mikroskopu byly vyfotografovány pomocí mikroskopu Nikon Eclipse TsR2 s invertovanou kamerou DFK 33UX174 dále zpracovány v programu NIS-Elements L. Grafické zobrazení výsledků bylo vytvořeno v programu BIORAD Meastro a Microsoft Office 365 – Excel. Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu GraphPad Prism pomocí metody jednocestná ANOVA. K porovnání skupin mezi sebou byl použit post-hoc Tukey test. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou v grafech označeny hvězdičkami (* pro $p < 0,05$, ** pro $p < 0,01$, *** pro $p < 0,001$). Všechny grafy ve výsledcích zobrazují aritmetické průměry ze stanovených hodnot a chybové úsečky v grafech představují střední chybu průměru (SEM).

4 Výsledky

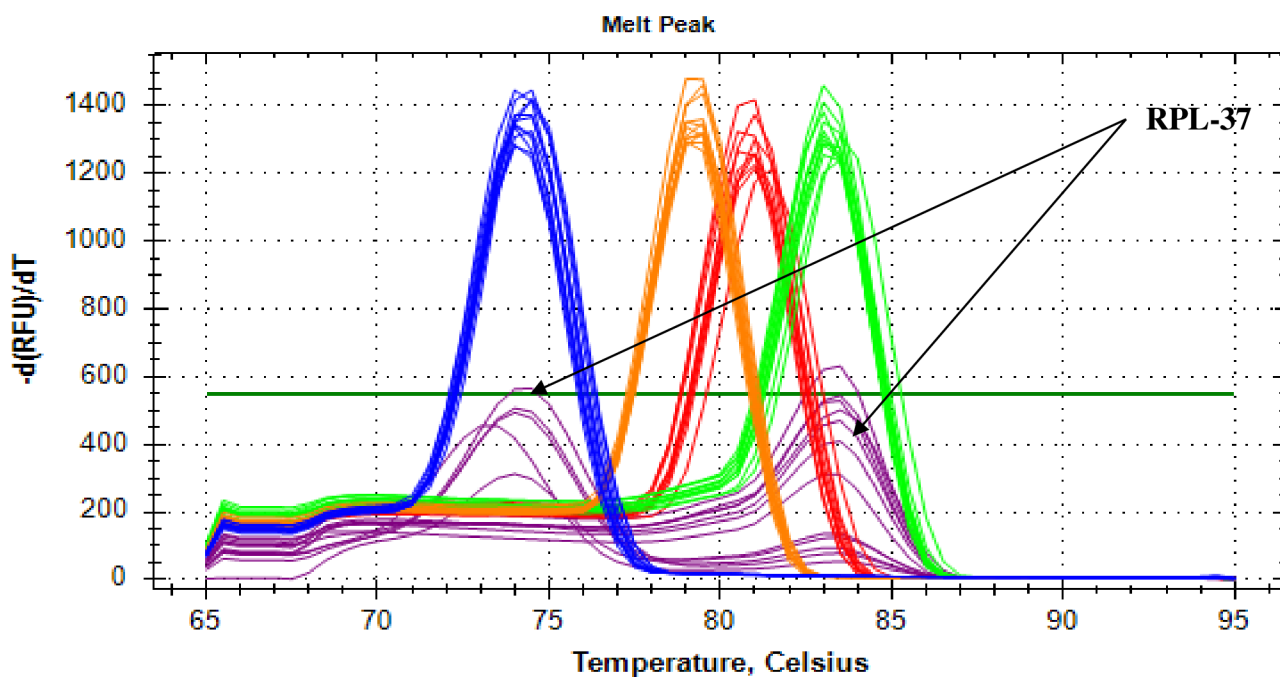
4.1 Výsledky qRT-PCR

4.1.1 Výběr vhodných primerů a referenčního genu

4.1.1.1 Výběr referenčního genu

Cílem tohoto pokusu bylo vybrat vhodný referenční gen pro analýzu. Na základě publikace Baxter et al., 2020, byly jako referenční otestovány geny pro RPL-37 a RPL-32, dále pak GAPDH, ACTB a HPRT-1, jejichž primery byly přítomny v laboratoři školitele.

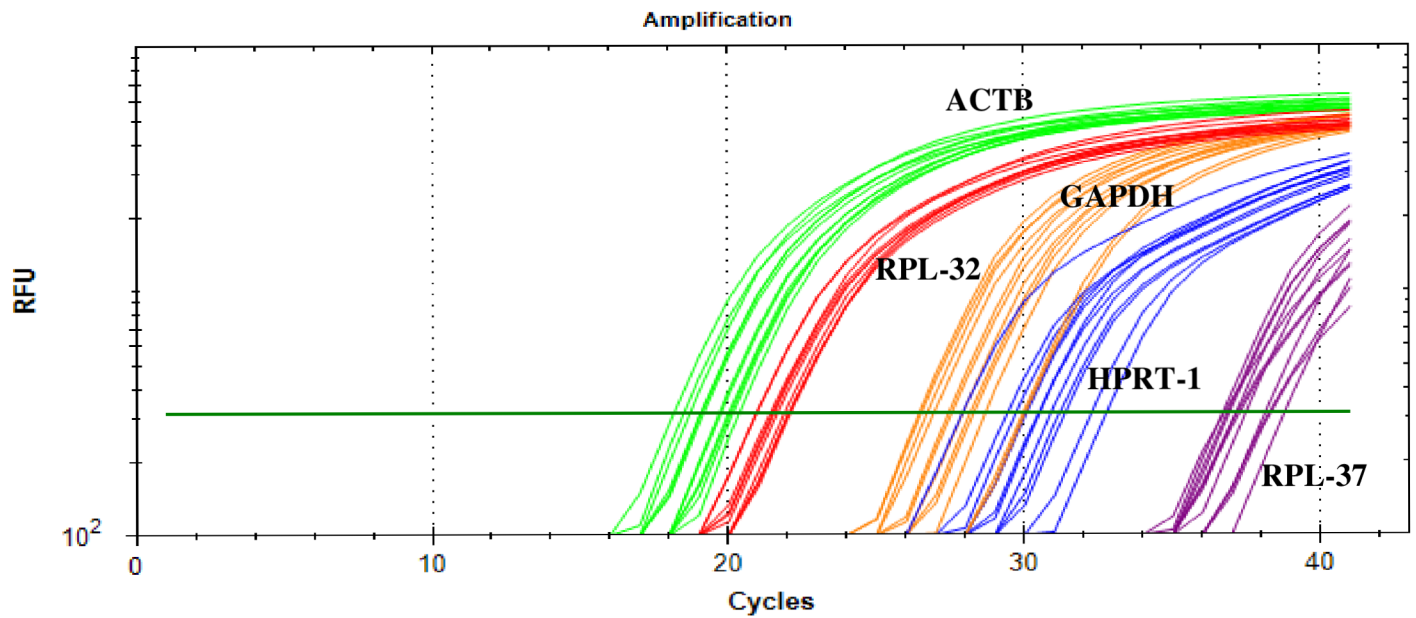
Na základě křivky tání byl vyřazen gen pro RPL-37, který tvořil dvojitý produkt (Obr. 7) a nebyl tedy pro analýzu vhodný.



Obr.7: Křivka tání pro pět párů primerů referenčních genů, obrázek vytvořen v programu BIORAD Meastro

Na základě kvantifikace byly vyřazeny také geny pro HPRT-1 a GAPDH (Obr.8), protože měly vysoké hodnoty Ct, které navíc byly dost variabilní.

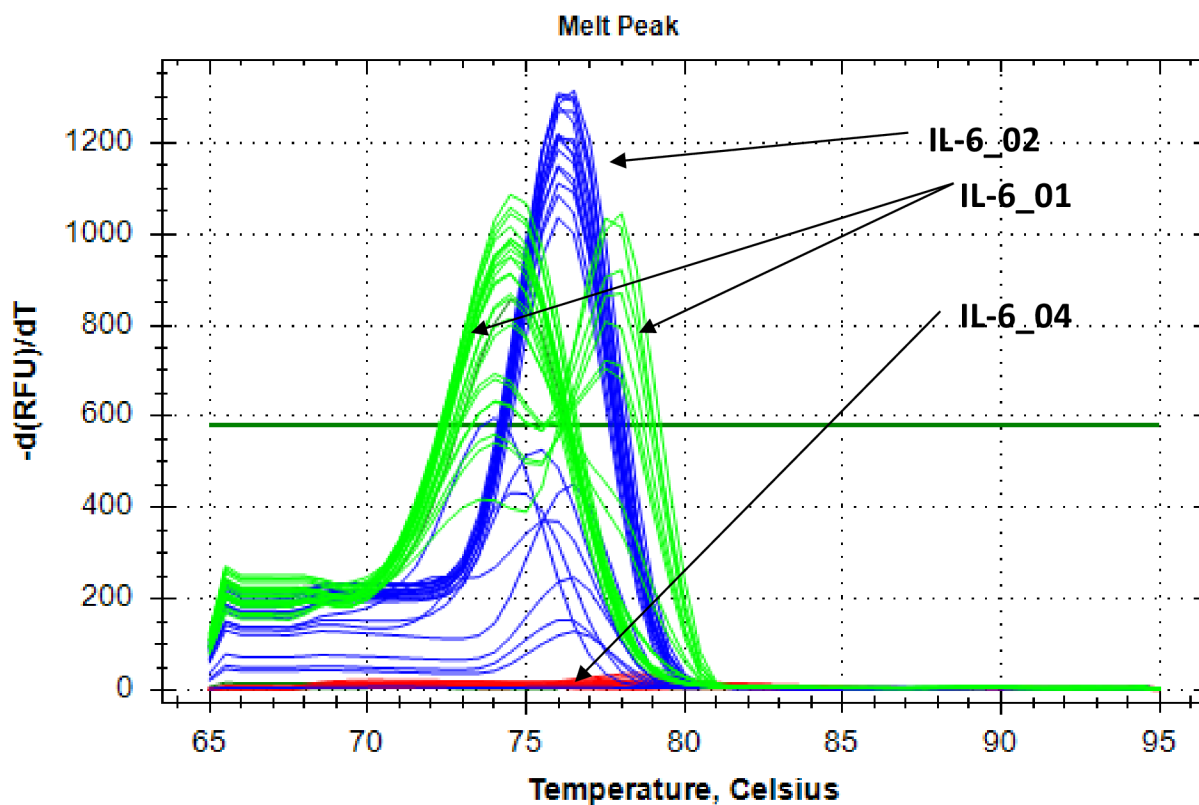
V úvahu tak připadaly geny pro ACTB a RPL-32, které měly hodnoty Ct kolem 20. cyklu (Obr.8). Jako nejvhodnější byl zvolen gen RPL-32, jehož hodnoty Ct vykazovaly největší homogenitu.



Obr.8: Výsledky analýzy křivek qRT-PCR obrázek vytvořen v programu BIORAD Meastro

4.1.1.2 Výběr primerů pro IL-6

V průběhu prvních analýz došlo k opakované detekci dvojitého produktu u důležitého genu pro prozánětlivý cytokin IL-6. Na základě literatury byly vybrány a otestovány další dva páry primerů, z nichž byl vybrán ten, který tvořil jen jeden produkt. Z výsledků křivky tání (Obr.9) je vidět dvojitý produkt původního IL-6_01, výsledky IL-6_04 nevedly k syntéze požadovaného produktu a tento pár primerů byl tedy vyřazen. Jediný vhodný pár primerů se nakonec ukázal IL-6_02, který vedl k produkci jediného produktu.



Obr.9: Analýza křivky tání pro tři páry primerů, obrázek vytvořen v programu BIORAD Meastro

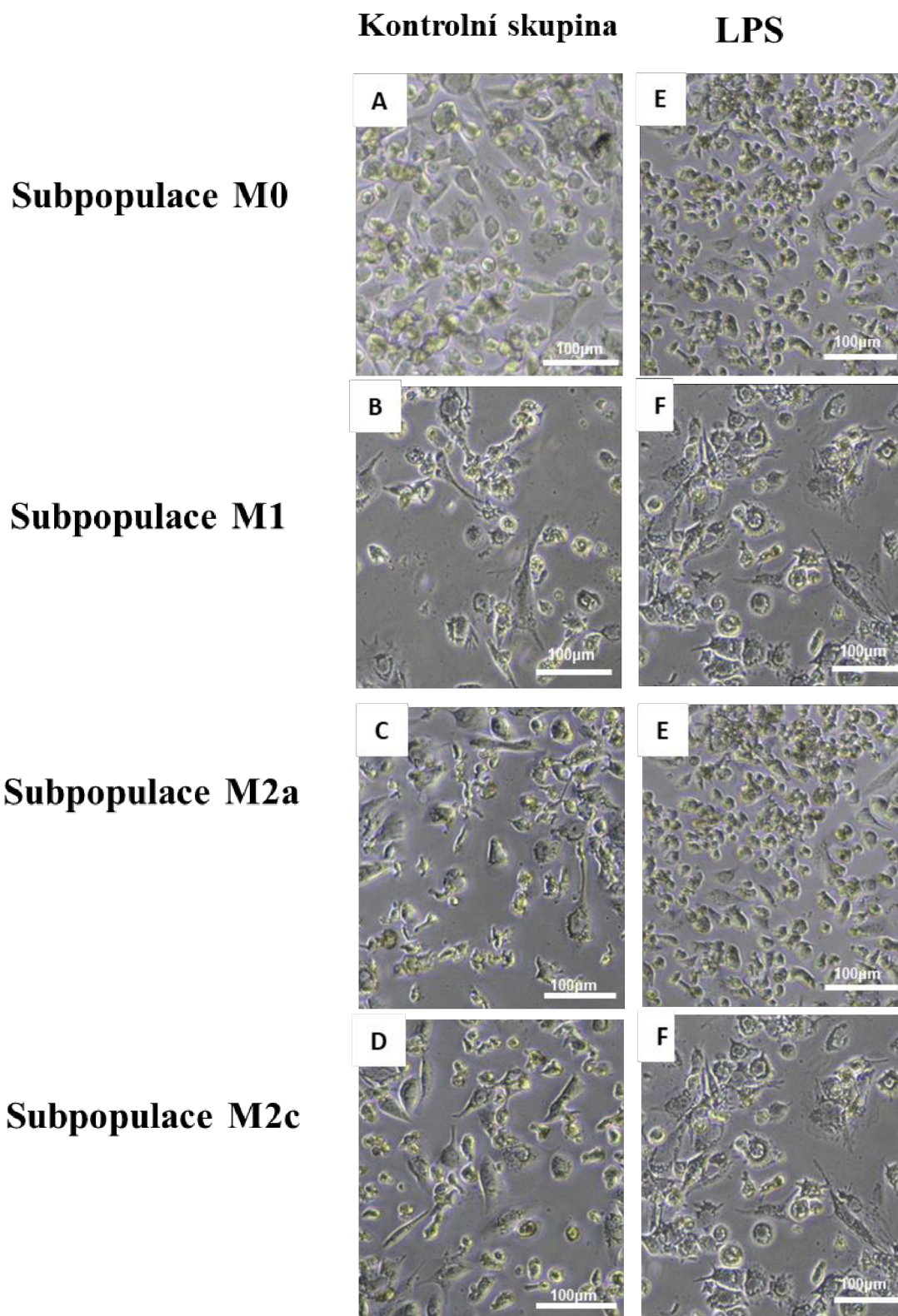
4.2 Morfologie subpopulací buněk

Cílem tohoto pokusu bylo orientačně porovnat morfologii jednotlivých subpopulací pomocí světelného mikroskopu. Získané fotografie tvoří pouze ilustrativní doplnění analýzy.

Z tohoto pokusu nejsou jednoznačné závěry, protože rozdíly mezi jednotlivými subpopulacemi makrofágů byly minimální. K rozlišení subpopulací je proto nutné použít specifické molekulární markery.

Jednotlivé buňky byly stimulovány po dobu 72 hodin PMA, po tzv. rest time, který trval 72 hodin došlo ke stimulaci buněk dle subpopulace (48 hodin) a následně k zánětlivé aktivaci 100 ng/ml LPS, po níž buňky byly ponechány v inkubátoru po dobu 24 hodin. Před izolací RNA došlo k vyfotografování buněk pomocí mikroskopu Nikon Eclipse TsR2 s invertovanou kamerou DFK 33UX174 a zpracovány v programu NIS-Elements L. Výsledky obsažené v Obr. 10 tvoří reprezentativní vzorek dané subpopulace – nestimulované (A, B, C, D) a stimulované LPS (E,F,G,H).

Z obrázků lze soudit, že subpopulace makrofágů M1 tvoří více pseudopodií a tvoří hvězdicovitou morfologii než subpopulace ostatní. Stimulace LPS neměla na subpopulace viditelný vliv, kromě subpopulace M0, kde se buňky jevíly menší a protáhlejší s výběžky. Jednoznačné závěry však není možné v této analýze udělat.



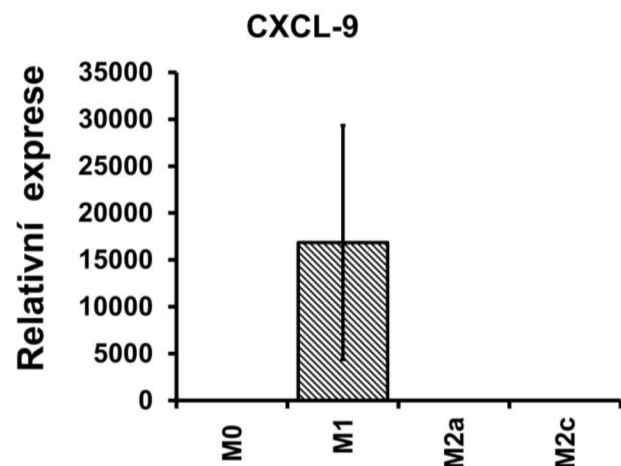
Obr.10: Obrazové porovnání morfologie subpopulací makrofágů. Kontrolní vzorky: A) M0 nestimulovaná populace, B) subpopulace M1 stimulovaná 20ng/ml IFN- γ a 250 ng/ml LPS, C) M2a subpopulace stimulovaná 20 ng/ml IL-4, D) subpopulace M2c stimulovaná 20 ng/ml IL-10, stimulace probíhala po dobu 48 hodin. Vzorky obsahující LPS (E,F,G,H) byly vystaveny stimulaci po dobu 24 hodin. Snímky byly pořízeny po 24 hodinách stimulace LPS.

4.3 Výsledky qRT-PCR analýzy exprese znaků subpopulací

Cílem tohoto pokusu bylo ověřit, zda stimulace makrofágů byla úspěšná a došlo k vytvoření konkrétní subpopulace. Ověřování bylo založeno na expresi konkrétních markerů pro subpopulace podle protokolu Baxter et al., 2020, Použity byly nestimulované kontrolní vzorky každé subpopulace (M0 K, M1 K, M2a K a M2c K). Výsledky byly vždy vztaženy k nestimulované kontrolní subpopulaci M0. Bohužel, ne pro všechny geny se podařilo získat nějaká data.

4.3.1 Výsledky exprese pro určení subpopulace M1

Pro určení subpopulace M1 byly testovány markery CXCL-9, CXCL-10, IRF-1 a STAT-1. Jako kontrolní vzorek byla použita nestimulovaná subpopulace M0, ke které byly vztaženy výsledky exprese všech testovaných markerů. Použitelné výsledky vyšly pouze u markeru CXCL-9 (Obr. 11), kde je vidět několikatisícinásobně vyšší exprese než u ostatních subpopulací makrofágů. U ostatních markerů pro určení subpopulace M1 (CXCL10, IRF-1 a STAT-1) nebyla naměřena téměř žádná exprese, a proto nebyly zahrnuty do výsledků analýzy.



Obr.11: Výsledek qRT-PCR analýzy exprese markeru CXCL-9 pro určení subpopulace M1, testovány byly všechny subpopulace – M0, M1, M2a a M2c, kdy výsledky jsou porovnávány s kontrolní skupinou M0.

4.3.2 Výsledky exprese pro určení subpopulace M2a

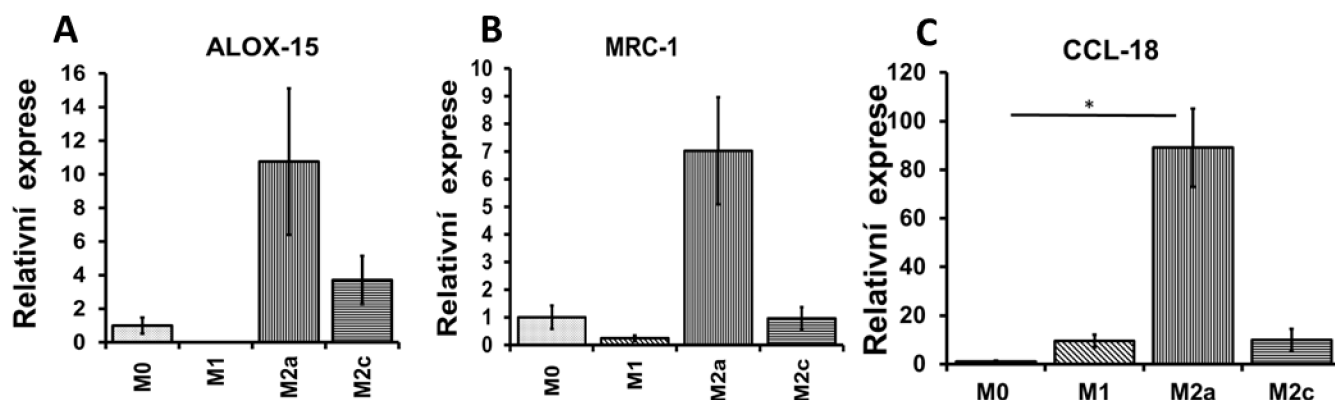
Pro určení subpopulace M2a byly testovány markery CCL-17, CCL-18, TGM-2, MRC-1, ALOX-15 a CD200R. Jako kontrolní vzorek byla použita nestimulovaná subpopulace M0, ke které byly vztaženy výsledky exprese všech testovaných markerů. Výsledky pro určení subpopulace M2a vyšly pouze u markerů ALOX-15, MRC-1 a CCL-18.

U genu pro ALOX-15 (Obr.12A) byla měřitelná exprese i u kontrolní skupiny M0, u subpopulace M1 měřitelná nebyla. U subpopulace M2a je vidět téměř 10x vyšší exprese oproti kontrolní skupině, zároveň je měřitelná exprese u subpopulace M2c.

Výsledky exprese genu pro MRC-1 (Obr. 12B) ukazují určitou expresi u každé subpopulace, kdy subpopulace M1 má nejnižší expresi a subpopulace M0 a M2c velmi podobnou. I přesto je exprese u subpopulace M2a asi 6x vyšší, než u ostatních subpopulací.

Výsledky exprese genu pro CCL-18 (Obr. 12C) nám ukazují, že došlo k minimální expresi u kontrolní subpopulace M0 a ke zvýšené expresi u subpopulací M1 a M2c, exprese u subpopulace M2a byla přibližně 80x vyšší, než u ostatních subpopulací. Z výsledků měření exprese M2 znaků lze říci, že se jedná o subpopulaci M2a.

U dalších testovaných markerů M2a: CCL-17, TGM-2 a CD200R nebyla naměřena žádná exprese, proto výsledky nejsou prezentovány.



Obr.12: Výsledek qRT-PCR analýzy exprese markerů A) ALOX-15, B) MRC-1, C) CCL-18 pro určení subpopulace M2a, testovány byly všechny subpopulace – M0, M1, M2a a M2c, výsledky jsou u všech testovaných markerů porovnávány s kontrolní skupinou M0.

4.3.3 Výsledky exprese pro určení subpopulace M2c

Jako markery subpopulace M2c byly testovány geny pro C1QA, CD-163 a SEPP1. Jako kontrolní vzorek byla použita nestimulovaná subpopulace M0, ke které byly vztaženy výsledky exprese všech testovaných markerů. Výsledky pro určení subpopulace M2c vyšly pouze u markerů CD-163 a C1QA (Obr. 13).

U testovaného genu pro C1QA (Obr. 13A) je vidět zvýšená exprese u všech testovaných subpopulací. U kontrolní subpopulace M0 byla exprese vyšší, podobně jako u subpopulace M1. Zároveň byla nejnižší exprese subpopulace M2a, nicméně vzhledem k velkým rozptylům i u výsledků exprese subpopulace M2c, nebyl žádný rozdíl statisticky průkazný.

U genu pro CD-163 (Obr. 13B) je měřitelná exprese u všech testovaných subpopulací. Rozdíly v expresi u tohoto testovaného markeru nejsou tak vysoké jako u ostatních, ale i přesto je vidět nejvyšší exprese

u subpopulací M2a a

M2c. Z výsledků

exprese markeru

CD-163 lze říci, že se

jedná o subpopulaci M2

s inklinací

k subpopulaci M2c.

Bohužel tato data

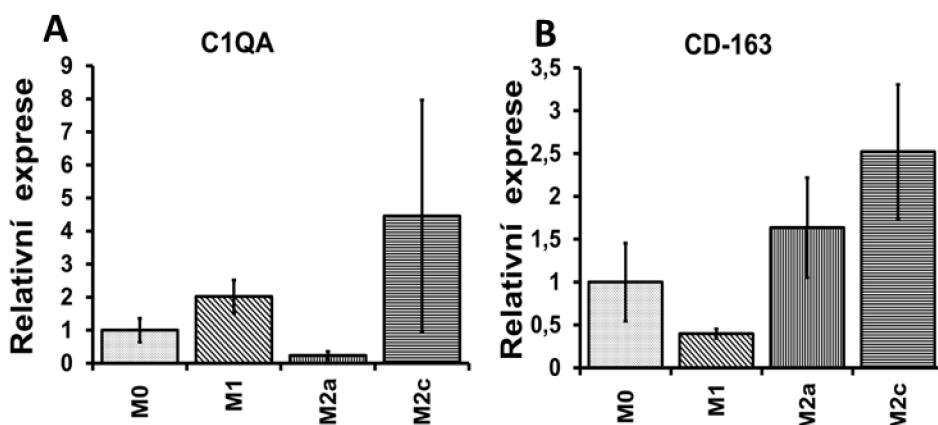
nejsou statisticky

průkazná. U dalšího

testovaného genu pro

SEPP1 nebyla naměřena

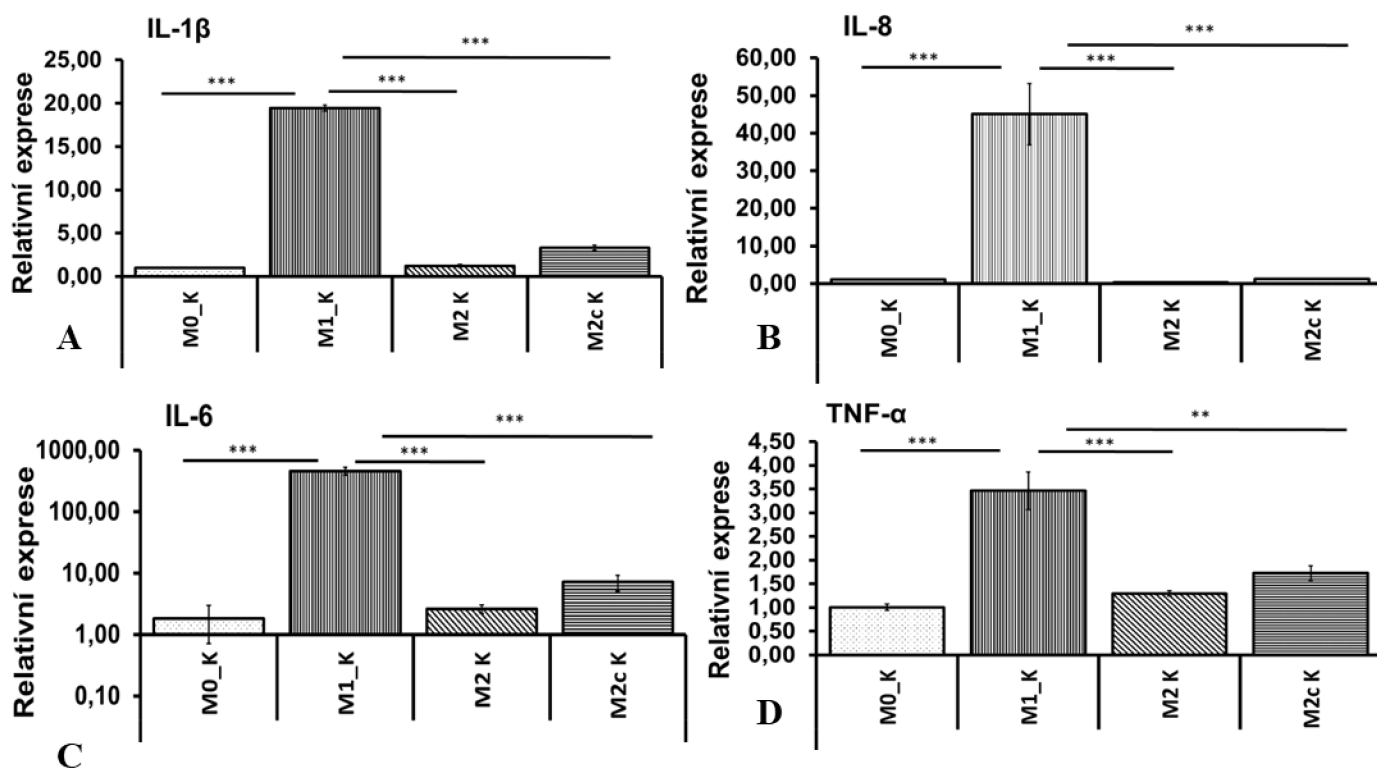
žádná exprese, proto nebyl zahrnut do výsledků.



Obr.13: Výsledek qRT-PCR analýzy exprese markeru A) C1QA, B) CD-163 pro určení subpopulace M2c, testovány byly všechny subpopulace – M0, M1, M2a a M2c, kdy výsledky jsou u všech testovaných markerů porovnávány s kontrolní skupinou M0.

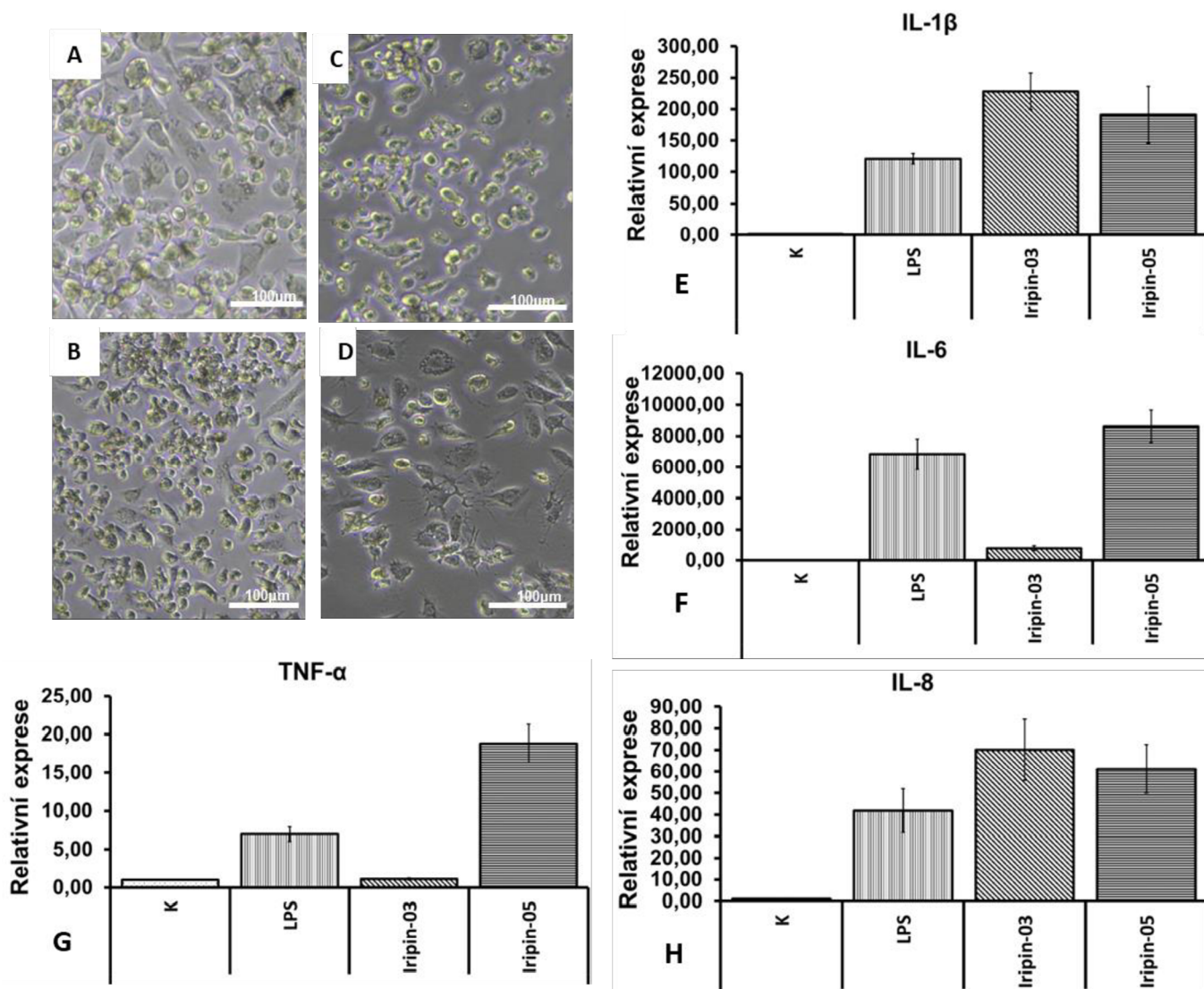
4.3.4 Expresa zánětlivých markerů v nestimulovaném stavu u kontrolních vzorků

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit bazální stav exprese markerů zánětu v neindukovaném stavu. Jako kontrolní vzorek byla použita nestimulovaná subpopulace M0, ke které byly vztaženy výsledky exprese všech testovaných markerů (Obr.14). Na základě výsledků exprese zánětlivých markerů bylo zjištěno, že vzorky subpopulace M1 vykazují daleko vyšší expresi prozánětlivých cytokinů, už v nestimulovaném stavu, než ostatní subpopulace makrofágů. U genu pro TNF- α několiknásobně, u genů pro IL-1 β a IL-8 desetinásobně a u genu pro IL-6 až stonásobně (u Obr. 14C byly z tohoto důvodu výsledky logaritmovány funkcí log10). Z těchto výsledků by se dalo říci, že míra exprese zánětlivých markerů se dá považovat za subpopulační marker buněk M1. Zároveň se tím potvrzuje, že buňky M1 vykazují zvýšenou expresi na zánětlivé markery už v nestimulovaném stavu.



Obr.14: Výsledek exprese zánětlivých cytokinů IL-1 β (A), chemokinů IL-8 (B) a cytokinů IL-6 (C), TNF- α (D).

4.3.5 Porovnání výsledků exprese zánětlivých markerů u subpopulace buněk M0



Obr.15: Morfologické srovnání subpopulace M0 po 24hodinové stimulaci: LPS (B), a inkubaci Iripinu-3 a LPS (C) a Iripinu-5 a LPS (D). Kontrolní vzorky (A) bez stimulace. Grafy ukazují výsledky exprese zánětlivých cytokinů IL-1 β (E), IL-6 (F), chemokinu IL-8 (H) a cytokinu TNF- α (G).

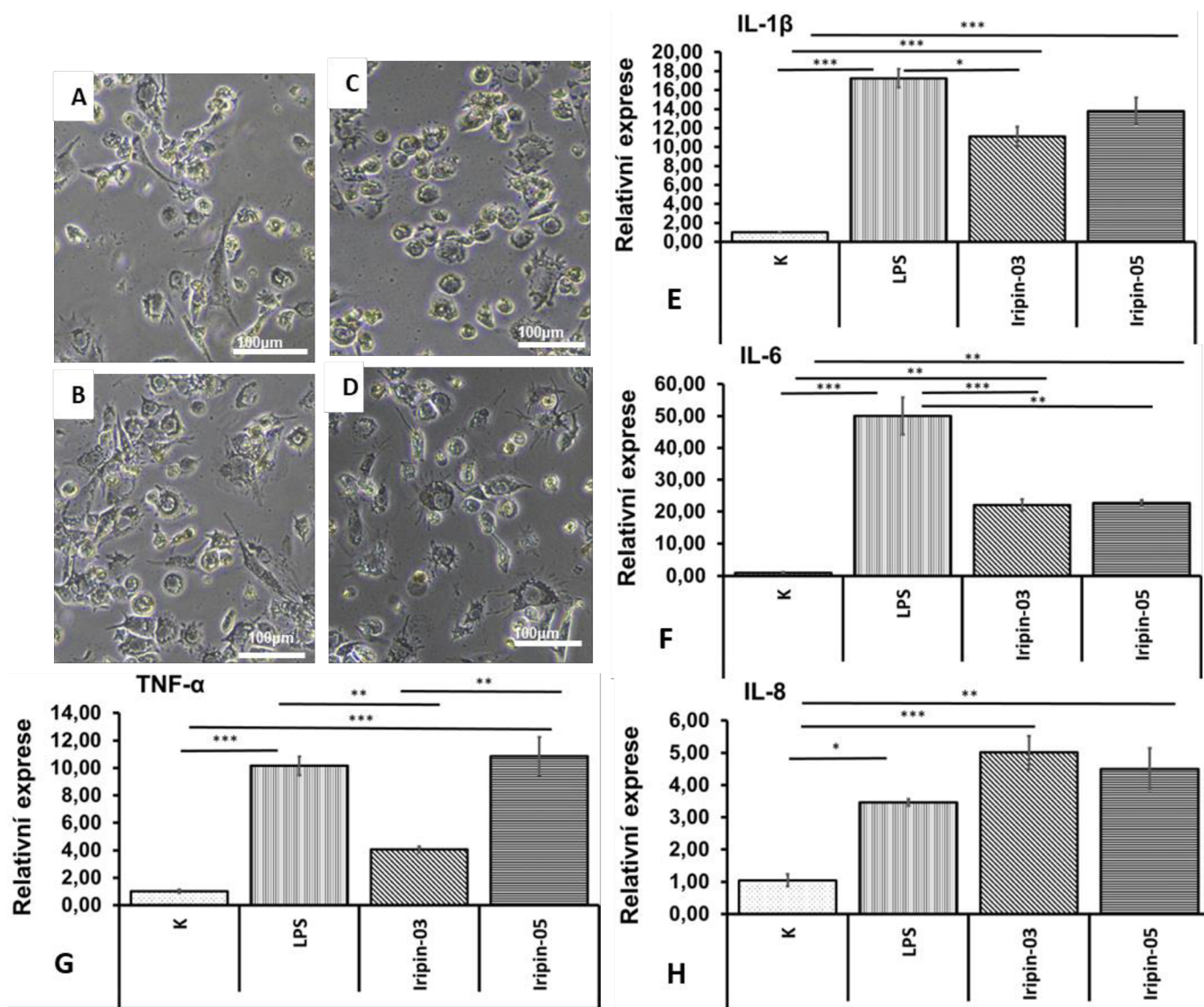
Obrazová dokumentace slouží jako doplnění analýzy a je pouze ilustrativní, nelze z ní vyvodit jednoznačné závěry. Můžeme ale říct, že u stimulace LPS u buněk populace M0 (Obr. 15B) se buňky jeví menší, oválnější, granulárnější, stejně jako buňky inkubované Iripinem-3 a LPS (Obr. 15C), na rozdíl od buněk inkubovaných Iripinem-5 a LPS, kde mají buňky více pseudopodií a jeví se na první pohled větší. Fotky byly pořízeny po 24hodinové stimulaci, předtím, než došlo k vyzolování RNA.

Výsledky exprese zánětlivých markerů jsou vztaženy ke kontrolní nestimulované skupině (K). U analýzy exprese cytokinu IL-1 β (Obr. 15E) je vidět největší zvýšení po ošetření Iripinem-3 a LPS. Vyšší exprese je i u vzorků ošetřených Iripinem-5 a LPS. Podobný trend je vidět i u výsledků exprese chemokinu IL-8 (Obr. 15H), kde je nejvyšší exprese u vzorků ošetřených Iripinem-3 s LPS. Stejně tak je vyšší exprese u vzorků ošetřených Iripinem-5 s LPS. Mezi těmito dvěma testovanými markery se liší míra exprese, kdy u IL-1 β (Obr. 15E) je rozdíl v řádu stovek a u IL-8 (Obr. 15H) je v řádu desítek.

Největší rozdíly jsou jednoznačně u exprese cytokinu IL-6 (Obr. 15F), kde se rozdíly hodnot exprese pohybují v řádu tisíců. Nejvyšší odpověď je ve skupině ošetřené Iripinem-5 a LPS, vysoká exprese vyšla i u vzorků stimulovaných jen LPS. U vzorků ošetřených Iripinem-3 a LPS došlo k velkému poklesu v porovnání s ostatními. Naopak nejvyšší je exprese u vzorků, ke kterým byl přidán Iripin-5 a LPS, téměř 8000x vyšší, než u kontrolního vzorku.

Obdobný trend je i u výsledků exprese cytokinu TNF- α (Obr. 15G), kde je ale velký rozdíl v míře exprese. Zde se pohybuje v řádu jednotek až desítek, nicméně opět je nevyšší exprese u vzorků ošetřených Iripinem-5 a LPS a poměrně vysoký pokles u vzorků ošetřených Iripinem-3 a LPS. Jako u jediných výsledků je zde vidět i mírná exprese u kontrolního vzorku, která není u žádného předchozího testovaného markeru.

4.3.6 Porovnání výsledků exprese zánětlivých markerů u subpopulace buněk M1



Obr. 16: Morfologické srovnání subpopulace M1 po 24hodinové stimulaci: LPS (B), a inkubaci Iripinu-3 a LPS (C) a Iripinu-5 a LPS (D). Kontrolní vzorky (A) bez stimulace. Grafy ukazují výsledky exprese zánětlivých cytokinů IL-1 β (E), IL-6 (F), chemokinu IL-8 (H) a cytokinu TNF- α (G). Výsledky exprese zánětlivých markerů jsou vztaženy ke kontrolní nestimulované skupině (K).

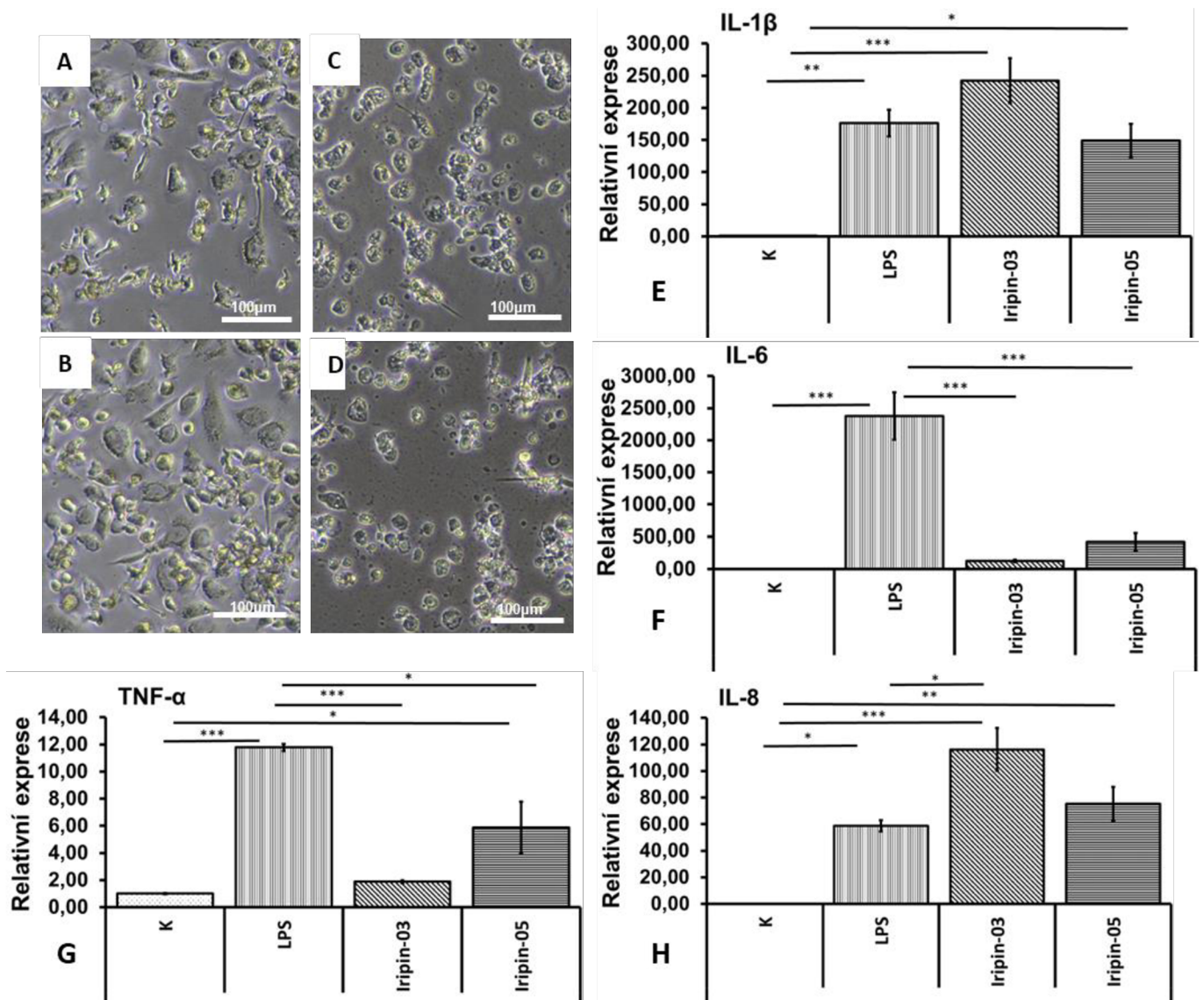
Buňky kontrolní skupiny (Obr. 16A) a buňky stimulované LPS (Obr. 16B) mají v porovnání s ostatními více pseudopodií a zaujímají hvězdicovitou morfologii, na rozdíl od buněk inkubovaných Iripinem-3 a LPS (Obr. 16C) a Iripinem-5 a LPS (Obr. 16D), u těchto skupin se buňky jeví menší.

U těchto výsledků je třeba brát v potaz i výsledky z Obr.14, kdy byly porovnávány jednotlivé subpopulace mezi sebou a to u kontrolních vzorků (K). Ač rozdíly v expresi mezi stimulovanými a nestimulovanými buňkami nejsou tak vysoké, absolutní hodnoty exprese jsou u M1 subpopulace nejvyšší, protože M1 makrofágy vykazují vysokou bazální expresi zánětlivých markerů.

U výsledků exprese cytokinu IL-1 β (Obr. 16E) je vidět nejvyšší exprese na stimulaci LPS. Exprese Iripinu-3 s LPS je nižší, než exprese na stimulaci LPS. Obdobně nižší exprese je i u buněk ošetřených Iripinem-5 s LPS. U cytokinu IL-6 (Obr. 16F) buňky stimulované LPS mají nejvyšší expresi, ale buňky ošetřené Iripiny-3 a 5 a LPS mají obdobnou odpověď, která snižuje expresi IL-6. U chemokinu IL-8 (Obr. 16H) je zvýšená exprese u všech testovaných skupin. Nejvyšší vykazují buňky ošetřené Iripinem-3 a 5 a LPS. Tyto výsledky se tak liší od ostatních tím, že je zde vyšší exprese u obou testovaných skupin se serpiny Iripin-3 a 5, na rozdíl od testovaných markerů IL-1 β a IL-8, kde je nejvyšší exprese u buněk stimulovaných pouze LPS.

U buněk testovaných na expresi cytokinu TNF- α (Obr. 16G) je vidět, že zánětlivou aktivaci snižuje ošetření Iripinem-3 a LPS, podobně jako u cytokinu IL-1 β . U ošetření Iripinem-5 a LPS je naopak vidět vyšší exprese, než po stimulaci samotným LPS.

4.3.7 Porovnání výsledků exprese zánětlivých markerů u subpopulace buněk M2a

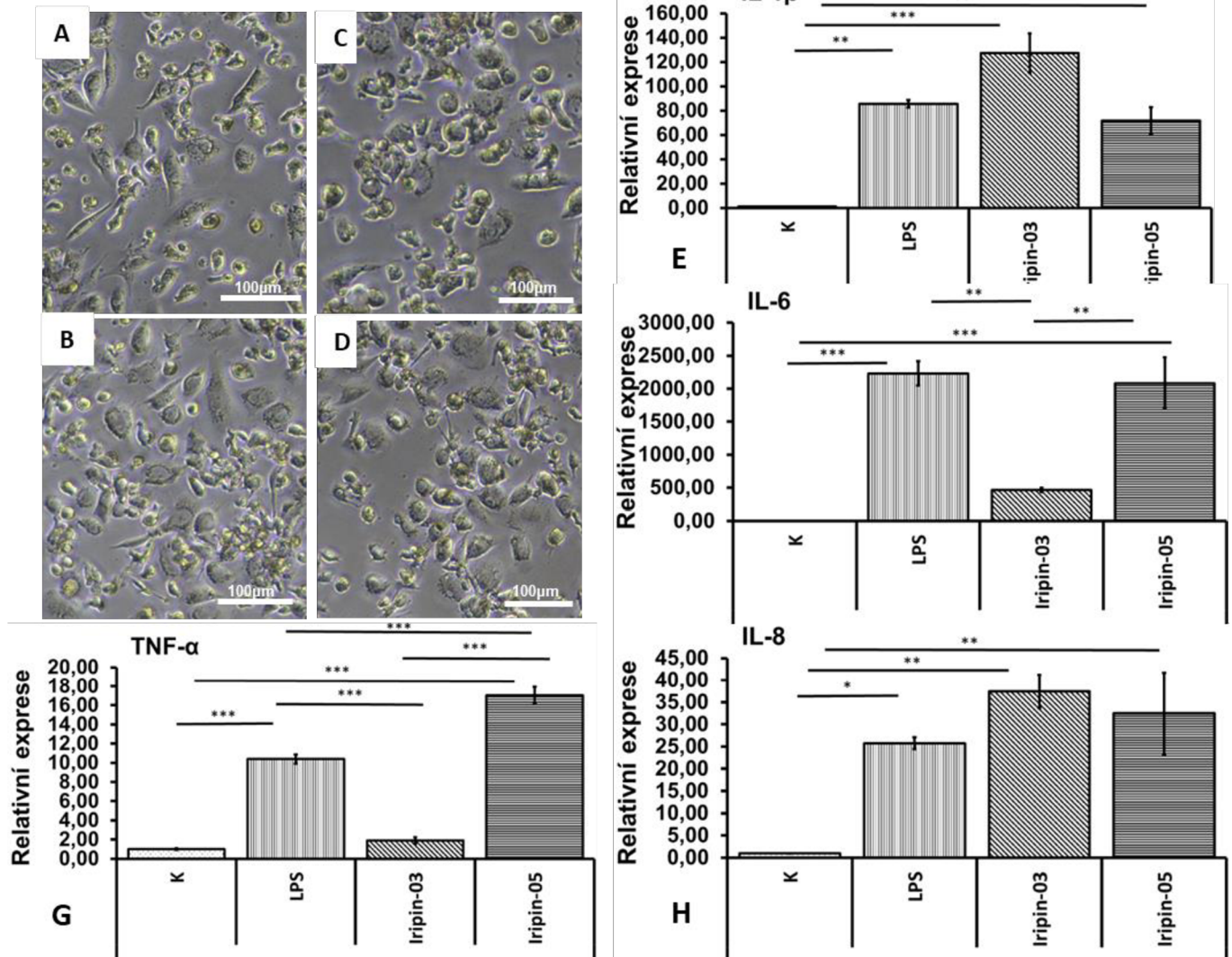


Obr. 17: Morfologické srovnání subpopulace M2a po 24hodinové stimulaci: LPS (B), a inkubaci Iripinu-3 a LPS (C) a Iripinu-5 a LPS (D). Kontrolní vzorky (A) bez stimulace. Grafy ukazují výsledky exprese zánětlivých cytokinů IL-1 β (E), IL-6 (F), chemokinu IL-8 (H) a cytokinu TNF- α (G). Výsledky exprese zánětlivých markerů jsou vztaženy ke kontrolní nestimulované skupině (K).

Buňky kontrolní skupiny (Obr. 17A) a buňky inkubované Iripinem-3 a LPS (Obr. 17C), Iripinem-5 a LPS (Obr. 17D) nevykazují zásadní rozdíly. Buňky stimulované LPS (Obr. 17B) se v porovnání s ostatními jeví podlouhlejší a mají více pseudopodií.

U výsledků exprese cytokinu IL-1 β (Obr. 17E) je vidět nejvyšší exprese na ošetření Iripinu-3 a LPS. Exprese u buněk stimulovaných LPS je vyšší, než výsledky exprese u buněk ošetřených a Iripinem-5 a LPS. Zde je vidět, že nedochází k výraznému poklesu zánětlivé aktivace. Obdobný trend je vidět i u výsledků exprese chemokinu IL-8 (Obr. 17H), tedy nejvyšší expresi u buněk ošetřených Iripinem-3 a LPS. Zde je i vidět vyšší exprese u buněk ošetřených serpiny, než u buněk stimulovaných LPS. U cytokinu IL-6 (Obr. 17F) je vidět snížení zánětlivé aktivace u obou skupin ošetřených Iripinem-3 a 5 a LPS. U cytokinu TNF- α (Obr. 17G) je vidět nejvyšší exprese u buněk stimulovaných LPS, zároveň je vidět, že k vyššímu snížení exprese dochází po ošetření Iripinem-3 a LPS, než po ošetření Iripinem-5 a LPS.

4.3.8 Porovnání výsledků exprese zánětlivých markerů u subpopulace buněk M2c



Obr. 18: Morfologické srovnání subpopulace M2c po 24hodinové stimulaci: LPS (B), a inkubaci Iripinu-3 a LPS (C) a Iripinu-5 a LPS (D). Kontrolní vzorky (A) bez stimulace. Grafy ukazují výsledky exprese zánětlivých cytokinů IL-1β (E), IL-6 (F), chemokinu IL-8 (H) a cytokinu TNF-α (G). Výsledky exprese zánětlivých markerů jsou vztaženy ke kontrolní nestimulované skupině (K).

Buňky kontrolní skupiny (Obr. 18A), buňky stimulované LPS (Obr. 18B), buňky inkubované Iripinem-3 a LPS (Obr. 18C) a Iripinem-5 a LPS (Obr. 18D) nevykazují zásadní rozdíly, které by bylo možné identifikovat na základě fotografií ze světelného mikroskopu.

U výsledků exprese cytokinu IL-1 β (Obr. 18E) je vidět nejvyšší exprese po ošetření Iripinu-3 s LPS, na rozdíl u buněk ošetřených Iripinem-5 a LPS, kdy došlo k mírnému snížení zánětlivé aktivace. U cytokinu IL-6 (Obr. 18F) došlo ke snížení exprese po ošetření Iripinem-3 a LPS, ale ne u buněk ošetřených Iripinem-5 a LPS. U cytokinu TNF- α (Obr. 18G) je vidět snížení exprese po ošetření Iripinem-3 a LPS, nicméně u ošetření Iripinem-5 a LPS je vidět vyšší exprese než po stimulaci LPS. U chemokinu IL-8 (Obr. 18H) je vyšší exprese po ošetření Iripinem-3 a 5 a LPS, než po stimulaci LPS. Tento trend se opakuje u všech subpopulací buněk.

5 Diskuse

Lidské monocyty z buněčné kultury THP-1 jsou běžně používanými prekurzory pro vytvoření makrofágových populací *in vitro*. Prvním cílem bylo stimulovat buněčnou kulturu THP-1 tak, aby vykazovala fenotyp podobný klasifikovaným subpopulacím primárních makrofágů. Problematikou polarizace makrofágů se zabýval Murray et al., 2014, který shrnoval potíže v terminologii, postupech, nejasném rozdělení M1 a M2 makrofágů. Existují publikace věnující se pouze stimulaci buněčné kultury THP-1 pomocí PMA k vytvoření populace makrofágů (Hirsch & Krug, 2014; Lund et al., 2016) a nicméně existují i publikace, které se věnují polarizaci makrofágů, jejich rozdělení a funkcím (De Paoli et al., 2014; Shapouri-Moghaddam et al., 2018; Tedesco et al., 2018).

Experimentální pokus vycházel ze standardizovaného protokolu pro diferenciaci THP-1 buněk dle Baxter et al., 2020, který shrnuje poznatky posledních let do jednoho protokolu. V průběhu prvních experimentů bylo zjištěno, že doporučené množství buněčné suspenze pro základní stimulaci 300 000 buněk/ml (Baxter et al., 2020) není dostatečné pro získání potřebného množství RNA. Publikace Hirsch & Krug, 2014 definovala ideální množství buněčné suspenze na 250 000 - 500 000 buněk/ml. Z toho důvodu byla zvolena nejvyšší doporučená koncentrace na 500 000 buněk/ml. Koncentrace PMA (20 ng/ml), dle Baxter et al., 2020 byla zachována a osvědčila se.

První porovnání mezi subpopulacemi bylo pomocí morfologických znaků, které byly viditelné pod mikroskopem. U kontrolních skupin na Obr.10 je vidět, že buňky začaly vykazovat vyšší adhezenci a zvětšení svého objemu, což je v souladu s jinými autory (Daigneault et al., 2010). Dále je vidět rozdíl mezi M0 a ostatními subpopulacemi, kdy nestimulovaná subpopulace M0 má nejvyšší koncentraci protáhlých buněk s výběžky a oválnými jádry, což potvrzují předchozí práce (Kuryrnina et al., 2018). Buňky s hvězdíkovitou nebo vřetenovitou morfologií jsou specifikovány jako M1 (Baxter et al., 2020). U subpopulace M2a existuje publikace zabývající se rozdílnou morfologií mezi M0, M1 a M2a subpopulací ověřenou na základě fluorescence (P. Li et al., 2021). Bohužel na základě pouhého pozorování světelným mikroskopem je obtížné kvantifikovat rozdíly mezi buňkami, proto nelze vyvodit jednoznačné závěry, které by potvrzovaly morfologické rozdíly mezi skupinami M1, M2a a M2c.

Výběr referenčních genů byl v souladu s publikacemi, které se věnovaly stimulaci THP-1 a jejímu vyhnocení pomocí qRT-PCR. Geny pro ATCB, GAPDH (Kuryrnina et al., 2018), RPL-37 (Baxter et al., 2020), RPL-32 a HPRT-1 byly v laboratoři školitele již testovány jako referenční geny pro

jiné lidské buněčné kultury, proto byly do testování vhodného referenčního genu zahrnuty. Z testovaných genů byl nakonec zvolen gen pro RPL-32 z důvodů popsanych v kapitole 4.1.1.1.

Pro úspěšné určení makrofágových subpopulací bylo využito genové exprese specifických povrchových markerů, cytokinů a chemokinů, které vycházely z publikací (Baxter et al., 2020; Huang et al., 2018; Martinez et al., 2006; Murray et al., 2014), jsou shrnuté v tabulce 1.

U subpopulace M0 nebyly testovány specifické povrchové markery, protože se jednalo o kontrolní skupinu, která nebyla ničím stimulována, jednalo se monocyty diferencované na makrofágy. Proto všechny výsledky byly vztaženy k této skupině jako ke kontrolní.

Subpopulace M1 byla charakterizována pomocí několika markerů, viz tabulka 1. Jednalo se o chemokiny CXCL-9 a CXCL-10 dále IRF-1 a transkripční faktor STAT-1. Navzdory tomu, že CXCL-10 byl zmíněn jako marker pro M1 několikrát (Baxter et al., 2020; Genin et al., 2015) jeho exprese byla tak nízká, že nebylo možné ji vyhodnotit. Jediný marker, u kterého byla exprese mnohonásobně vyšší, než u ostatních byl chemokin CXCL-9. Ten je zmíněn jako chemokin reprezentující specifickou M1 subpopulaci (Chanput et al., 2013; Mantovani et al., 2004). U ostatních testovaných genů pro IRF-1 a STAT-1 nebyla naměřena detekovatelná exprese, a proto nebyly zahrnuty do výsledků této práce.

U subpopulace M2a byla ověřena vysoká exprese MRC-1, což odpovídá publikacím (Baxter et al., 2020; Chanput et al., 2013). Expese chemokinů CCL-18 byla také nejvyšší u buněk subpopulace M2a, kdy publikace (Genin et al., 2015) hovoří o THP-1 buněčné linii stimulované cytokiny IL-4 a IL-13, což odpovídá stimulaci M2a subpopulaci. Vysoká expese genu pro ALOX-15 byla zmíněna u standardizovaného protokolu (Baxter et al., 2020). U ostatních testovaných markerů byla expese nízká nebo nedetekovatelná, proto výsledky expese genů pro TGM-2 a CD200R nejsou zahrnuty ve výsledcích této práce. Jediné statisticky významné výsledky pro charakterizaci M2a subpopulaci, vyšly u expese chemokinů CCL-18.

Subpopulace M2c byla charakterizována expresí genů pro C1QA a CD-163. CD-163 je klasifikován jako charakteristický znak M2c (Baxter et al., 2020), přesto je v některých publikacích uváděn jako M2a (Genin et al., 2015; Mantovani et al., 2004). V publikaci Huang et al., 2018 je expese CD-163 definovaná jak pro M2a, tak pro M2c subpopulace. Což by vysvětlovalo vyšší expresi buněk subpopulace M2a. Gen pro C1QA byl v publikaci (Baxter et al., 2020) klasifikován jako M2c, což odpovídá získaným výsledkům. Marker SEPP1 nebyl zahrnut do výsledků, protože jeho expese nebyla detekovatelná.

Výsledky měření zánětlivých genů pro TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-8 u kontrolních vzorků v Obr.14 ukazují, že exprese subpopulace M1 jsou nejvyšší, což je v souladu s publikacemi (Chanput et al., 2013; Genin et al., 2015). Odpovídá to i obecně přijímané klasifikaci M1 subpopulace jako prozánětlivých makrofágů (Chanput et al., 2013; Kadomoto et al., 2022; Yao et al., 2019). Stejně tak bylo potvrzeno, že M2 buňky jsou charakterizovány nízkou produkcí prozánětlivých cytokinů.

Opakovaně bylo prokázáno, že serpiny z klíšťat mají protizánětlivé účinky (Chmelar et al., 2012; Chmelař et al., 2017; Prevot et al., 2009) také bylo prokázáno, že několik klíštěcích serpinů má antiagregační, antikoagulační, a/nebo imunomodulační vlastnosti (Chlastáková et al., 2021). Snížení zánětlivé aktivace pomocí serpinů bylo ověřeno u několika studií, u hovězích makrofágů se jedná o markery TNF – α a INF- γ (Brake & Pérez De León, 2012) a u myších makrofágů odvozených z kostní dřeně (BMDM) se jedná o cytokin IL-6 (Chlastáková et al., 2021 Abbas et al., 2022).

V tomto pokusu se podařilo ověřit, že dochází ke snížení zánětlivé aktivace u cytokinu IL-6 u obou testovaných serpinů (Iripin-3, Iripin-5) a to u subpopulací M1, M2a, které byly ošetřeny Iripinem-3 a 5 a LPS. Tento rozdíl byl statisticky průkazný. Částečně to potvrzuje hypotézu z publikace (Kascakova et al., 2021), že Iripin-5 vykazuje protizánětlivou aktivitu, kdy bylo zjištěno, že Iripin-5 vedl k poklesu migrace neutrofilů a produkce NO makrofágy (IC-21 buněčná linie). Zároveň došlo ke snížení zánětlivé aktivace u buněk M2c ošetřených Iripinem-3 a LPS. Iripin-3 snižoval expresi cytokinu IL-6 u buněk BMDM (Chlastáková et al., 2021) , což je v souladu s výsledky prezentovanými v této práci.

Serpiny Iripin-3 a Iripin-5 pocházejí z klíštěte *Ixodes ricinus* , ze kterého byl vyizolován také serpin Iris, který se váže na monocyty nebo makrofágy a potlačuje produkci TNF – α (Prevot et al., 2009). Ke snížení exprese TNF- α došlo u všech testovaných subpopulací ošetřených Iripinem-3 a LPS, včetně kontrolní skupiny M0 makrofágů. Signifikantní výsledky jsou však jen u subpopulací M1, M2a a M2c. Ke snížení exprese došlo i u testovaných buněk BMDM v publikaci (Chlastáková et al., 2021). O obdobném snížení zánětlivé aktivace u TNF – α u hovězích makrofágů hovoří i studie (Brake & Pérez De León, 2012), která však testovala extrakt ze slinných žláz klíštěte *Rhipicephalus microplus*, nikoliv jednotlivé molekuly. U Iripinu-5 došlo k opačnému jevu u subpopulací M0, M1 a M2c, kdy byla zvýšena exprese zánětlivého cytokinu TNF- α .

V případě dalšího testovaného zánětlivého cytokinu IL-1 β došlo u subpopulace M1 došlo ke snížení zánětlivé aktivity u obou testovaných serpinů, u Iripinu-3 se jedná o signifikantní výsledek. V případě Iripinu-3 odpovídají výsledky publikaci (Chlastáková et al., 2021), kdy došlo ke snížení transkripce genů IL-1 β u buněk BMDM.

Výsledky u zánětlivého markeru IL-8, ukazují zvýšenou aktivaci u všech tří subpopulací po stimulaci Iripinem-3 s LPS i Iripinem-5 s LPS. Ve studii (Zhou et al., 2020) se zabývali vlivem klíštěcích exosomů na zánětlivou stimulaci lidských keratinocytů pomocí LPS. Zde bylo ověřeno, že tyto exosomy inhibují hojení tkání právě prostřednictvím upregulace molekul jako je IL-8, což odpovídá získaným výsledkům především u Iripinu-3. Podobné výsledky jsou i v publikaci (Chlastáková et al., 2023), kde byl testován Iripin-1 izolovaný z *Ixodes ricinus*, kdy bylo ověřeno, že Iripin-1 zesiluje sekreci chemokinu pro neutrofilů (KC), což je myší analog IL-8 (Hol et al., 2009), u myších peritonálních buněk in vitro.

Z výsledků analýzy lze říci, že Iripin-3 by mohl mít vliv na zánětlivou aktivaci u subpopulace makrofágů M1. Signifikantní výsledky vyšly u tří (IL-1 β , IL-6 a TNF- α) ze čtyř testovaných zánětlivých markerů. Tyto zánětlivé cytokiny byly také testovány v předchozích studiích věnovaných serpinům z klíštěte *Ixodes ricinus* (Chlastáková et al., 2021), kde došlo také ke snížení exprese u všech tří testovaných genů, ovšem pouze u Iripinu-3 nikoliv u Iripinu-1. V publikaci je zánětlivá aktivace měřena nejen pomocí qRT-PCR, ale i imunodetekční metodou ELISA, který stanovuje přímo koncentraci daných cytokinů, produkovaných do média. V případě testování metodou ELISA bylo ověřeno, že Iripin-3 je účinným inhibátorem u syntézy i sekrece cytokinu IL-6. V této práci byla data ověřována pouze metodou qRT-PCR.

6 Závěr

V praktické části této práce se podařilo diferencovat tři různé subpopulace makrofágů. Zánětlivé M1 a protizánětlivé M2a a M2c, což bylo ověřováno na základě exprese povrchových markerů. Ve většině případů však výsledky nejsou statisticky významné. Obrazová analýza neukázala žádné viditelné rozdíly mezi jednotlivými subpopulacemi, ale spíše mezi jednotlivými stimulacemi. Rozdíly mezi buňkami, které byly pozorovány jsou v souhlasu s publikovanými výsledky. Z analýzy však nelze vyvodit žádné jednoznačné závěry.

Bylo ověřeno, že zánětlivé makrofágy M1 jsou aktivované ještě před samotnou stimulací a vykazují silnou expresi zánětlivých markerů. Na základě výsledků by se dalo říci, že zánětlivý cytokin IL-6 lze považovat za specifický pro populaci M1.

Výsledky zánětlivé aktivace a jejich reakce na klíštěcí serpiny Iripin-3 a Iripin-5 ukázaly jednoznačné výsledky u testovaného serpinu Iripinu-3. Podařilo se ověřit, že snižuje zánětlivou aktivaci u subpopulace makrofágů M1 a to v případě tří ze čtyř testovaných zánětlivých markerů. Do budoucna by jistě stálo za to ověřit, jestli lze pomocí Iripinu-3 snížit zánětlivou aktivaci, jak v tkáňových kulturách, tak v tkáních modelových zvířat *in vivo*. Pokud se podaří objasnit princip jeho funkce na modelových organismech, mohl by být kandidátem pro další výzkum v lidské medicíně.

Tato práce si kladla za cíl vytvořit subpopulace makrofágů z lidských liniových THP-1 buněk. Otestovat vliv klíštěcích serpinů Iripinu-3 a Iripinu-5 na zánětlivou aktivaci těchto vytvořených subpopulací makrofágů. Tyto cíle byly splněny.

7 Seznam použité literatury

- Abbas, M. N., Chlastáková, A., Jmel, M. A., Iliaki-Giannakoudaki, E., Chmelař, J., & Kotsyfakis, M. (2022). Serpins in Tick Physiology and Tick-Host Interaction. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.892770>
- Adati, N., Huang, M. C., Suzuki, T., Suzuki, H., & Kojima, T. (2009). High-resolution analysis of aberrant regions in autosomal chromosomes in human leukemia THP-1 cell line. *BMC Research Notes*, 2. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-153>
- Barton, G. M. (2008). A calculated response: Control of inflammation by the innate immune system. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 118, Issue 2, pp. 413–420). <https://doi.org/10.1172/JCI34431>
- Bashir, S., Sharma, Y., Elahi, A., & Khan, F. (2016). Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. In *Inflammation Research* (Vol. 65, Issue 1, pp. 1–11). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0874-1>
- Baxter, E. W., Graham, A. E., Re, N. A., Carr, I. M., Robinson, J. I., Mackie, S. L., & Morgan, A. W. (2020). Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *Journal of Immunological Methods*, 478. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112721>
- Belgiovine, C., D'Incalci, M., Allavena, P., & Frapolli, R. (2016). Tumor-associated macrophages and anti-tumor therapies: complex links. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 73, Issue 13, pp. 2411–2424). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2166-5>
- Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. In *Nature Immunology* (Vol. 11, Issue 10, pp. 889–896). <https://doi.org/10.1038/ni.1937>
- Brake, D. K., & Pérez De León, A. A. (2012). Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. *Parasites and Vectors*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-38>
- Brannon, E. R., Guevara, M. V., Pacifici, N. J., Lee, J. K., Lewis, J. S., & Eniola-Adefeso, O. (2022). Polymeric particle-based therapies for acute inflammatory diseases. In *Nature Reviews Materials* (Vol. 7, Issue 10, pp. 796–813). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41578-022-00458-5>
- Chanput, W., Mes, J. J., Savelkoul, H. F. J., & Wichers, H. J. (2013). Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food and Function*, 4(2), 266–276. <https://doi.org/10.1039/c2fo30156c>
- Chlastáková, A., Kaščáková, B., Kotál, J., Langhansová, H., Kotsyfakis, M., Kutá Smatanová, I., Tirloni, L., & Chmelař, J. (2023). Iripin-1, a new anti-inflammatory tick serpin, inhibits leukocyte recruitment in vivo while altering the levels of chemokines and adhesion molecules. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1116324>

- Chlastáková, A., Kotál, J., Beránková, Z., Kaščáková, B., Martins, L. A., Langhansová, H., Prudnikova, T., Ederová, M., Kutá Smatanová, I., Kotsyfakis, M., & Chmelař, J. (2021). Iripin-3, a New Salivary Protein Isolated From *Ixodes ricinus* Ticks, Displays Immunomodulatory and Anti-Hemostatic Properties In Vitro. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.626200>
- Chmelař, J., Calvo, E., Pedra, J. H. F., Francischetti, I. M. B., & Kotsyfakis, M. (2012). Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. In *Journal of Proteomics* (Vol. 75, Issue 13, pp. 3842–3854). <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.026>
- Chmelař, J., Kotál, J., Langhansová, H., & Kotsyfakis, M. (2017). Protease inhibitors in tick saliva: The role of serpins and cystatins in tick-host-pathogen interaction. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 7, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00216>
- Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B., & Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>
- Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., & Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. In *Nature Immunology* (Vol. 14, Issue 10, pp. 986–995). <https://doi.org/10.1038/ni.2705>
- De Paoli, F., Staels, B., & Chinetti-Gbaguidi, G. (2014). Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis. In *Circulation Journal* (Vol. 78, Issue 8, pp. 1775–1781). Japanese Circulation Society. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-14-0621>
- De Sousa, J. R., Lucena Neto, F. D., Sotto, M. N., & Quresma, J. A. S. (2018). Immunohistochemical characterization of the M4 macrophage population in leprosy skin lesions. *BMC Infectious Diseases*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3478-x>
- Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D. W., Fasano, A., Miller, G. W., Miller, A. H., Mantovani, A., Weyand, C. M., Barzilai, N., Goronzy, J. J., Rando, T. A., Effros, R. B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., & Slavich, G. M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine*, 25(12), 1822–1832. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., & Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1546-9>
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 3(1), 23–35. <https://doi.org/10.1038/nri978>
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 5, Issue 12, pp. 953–964). <https://doi.org/10.1038/nri1733>
- Hirsch, C., & Krug, H. (2014). *Culturing and differentiating THP-1 cells* AUTHORED BY: DATE. www.atcc.org

- Hol, J., Wilhelmsen, L., & Haraldsen, G. (2009). The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(3), 501–508. <https://doi.org/10.1189/jlb.0809532>
- Hou, P., Fang, J., Liu, Z., Shi, Y., Agostini, M., Bernassola, F., Bove, P., Candi, E., Rovella, V., Sica, G., Sun, Q., Wang, Y., Scimeca, M., Federici, M., Mauriello, A., & Melino, G. (2023). Macrophage polarization and metabolism in atherosclerosis. In *Cell Death and Disease* (Vol. 14, Issue 10). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06206-z>
- Huang, X., Li, Y., Fu, M., & Xin, H. B. (2018). Polarizing macrophages in vitro. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1784, pp. 119–126). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_12
- Kadomoto, S., Izumi, K., & Mizokami, A. (2022). Macrophage Polarity and Disease Control. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010144>
- Kascakova, B., Kotal, J., Martins, L. A., Berankova, Z., Langhansova, H., Calvo, E., Crossley, J. A., Havlickova, P., Dycka, F., Prudnikova, T., Kutny, M., Kotsyfakis, M., Chmelar, J., & Smatanova, I. K. (2021). Structural and biochemical characterization of the novel serpin Iripin-5 from *Ixodes ricinus*. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 77, 1183–1196. <https://doi.org/10.1107/S2059798321007920>
- Kazimírová, M., Thangamani, S., Bartíková, P., Hermance, M., Holíková, V., Štibrániová, I., & Nuttall, P. A. (2017). Tick-borne viruses and biological processes at the tick-host-virus interface. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(JUL). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00339>
- Kevin J. Tracey. (2002). *The inflammatory reflex*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nature01321>
- Kotál, J., Langhansová, H., Lieskovská, J., Andersen, J. F., Francischetti, I. M. B., Chavakis, T., Kopecký, J., Pedra, J. H. F., Kotsyfakis, M., & Chmelař, J. (2015). Modulation of host immunity by tick saliva. In *Journal of Proteomics* (Vol. 128, pp. 58–68). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.005>
- Kurygina, A. V., Erokhina, M. V., Makarevich, O. A., Sysoeva, V. Y., Lepekha, L. N., Kuznetsov, S. A., & Onishchenko, G. E. (2018). Plasticity of Human THP-1 Cell Phagocytic Activity during Macrophagic Differentiation. *Biochemistry (Moscow)*, 83(3), 200–214. <https://doi.org/10.1134/S0006297918030021>
- Law, R. H. P., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., Wong, W., Rosado, C. J., Langendorf, C. G., Pike, R. N., Bird, P. I., & Whisstock, J. C. (2006). An overview of the serpin superfamily. In *Genome Biology* (Vol. 7, Issue 5). <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-5-216>
- Li, C., Xu, M. M., Wang, K., Adler, A. J., Vella, A. T., & Zhou, B. (2018). Macrophage polarization and meta-inflammation. In *Translational Research* (Vol. 191, pp. 29–44). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.10.004>

- Li, P., Hao, Z., Wu, J., Ma, C., Xu, Y., Li, J., Lan, R., Zhu, B., Ren, P., Fan, D., & Sun, S. (2021). Comparative Proteomic Analysis of Polarized Human THP-1 and Mouse RAW264.7 Macrophages. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.700009>
- Liu, C. H., Abrams, N. D., Carrick, D. M., Chander, P., Dwyer, J., Hamlet, M. R. J., Macchiarini, F., Prabhudas, M., Shen, G. L., Tandon, P., & Vedamony, M. M. (2017). Biomarkers of chronic inflammation in disease development and prevention: Challenges and opportunities. *Nature Immunology*, *18*(11), 1175–1180. <https://doi.org/10.1038/ni.3828>
- Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A., & Donnelly, S. (2016). The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *Journal of Immunological Methods*, *430*, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.01.012>
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. In *Nature* (Vol. 454, Issue 7203, pp. 436–444). <https://doi.org/10.1038/nature07205>
- Mantovani, A., Sica, A., & Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. In *Immunity* (Vol. 23, Issue 4, pp. 344–346). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.10.001>
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. In *Trends in Immunology* (Vol. 25, Issue 12, pp. 677–686). <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., & Mantovani, A. (2006). Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *The Journal of Immunology*, *177*(10), 7303–7311. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7303>
- Mass, E., Nimmerjahn, F., Kierdorf, K., & Schlitzer, A. (2023). Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 23, Issue 9, pp. 563–579). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00848-y>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. In *Nature* (Vol. 454, Issue 7203, pp. 428–435). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, *8*(12), 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J. L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., ... Wynn, T. A. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. In *Immunity* (Vol. 41, Issue 1, pp. 14–20). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
- Pei, Y., & Yeo, Y. (2016). Drug delivery to macrophages: Challenges and opportunities. *Journal of Controlled Release*, *240*, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.014>

- Poole, N. M., Mamidanna, G., Smith, R. A., Coons, L. B., & Cole, J. A. (2013). *Prostaglandin E 2 in tick saliva regulates macrophage cell migration and cytokine profile*. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Potempa, J., Korzus, E., & Travis, J. (1994). The serpin superfamily of proteinase inhibitors: Structure, function, and regulation. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 269, Issue 23, pp. 15957–15960). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)33954-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)33954-6)
- Prevot, P. P., Beschin, A., Lins, L., Beaufays, J., Grosjean, A., Bruys, L., Adam, B., Brossard, M., Brasseur, R., Zouaoui Boudjeltia, K., Vanhamme, L., & Godfroid, E. (2009). Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS Journal*, 276(12), 3235–3246. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07038.x>
- Qiu, P., Liu, Y., & Zhang, J. (2019). Review: the Role and Mechanisms of Macrophage Autophagy in Sepsis. In *Inflammation* (Vol. 42, Issue 1, pp. 6–19). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0890-8>
- Schett, G., & Neurath, M. F. (2018). Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. In *Nature Communications* (Vol. 9, Issue 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05800-6>
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S. A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 233, Issue 9, pp. 6425–6440). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
- Silverman, G. A., Whisstock, J. C., Bottomley, S. P., Huntington, J. A., Kaiserman, D., Luke, C. J., Pak, S. C., Reichhart, J. M., & Bird, P. I. (2010). Serpins flex their muscle: I. Putting the clamps on proteolysis in diverse biological systems. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24299–24305. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.112771>
- Smith, M., Young, H., Hurlstone, A., & Wellbrock, C. (2015). Differentiation of THP1 Cells into Macrophages for Transwell Co-culture Assay with Melanoma Cells. *Bio-Protocol*, 5(21), 1–7. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1638>
- Spence, M. A., Mortimer, M. D., Buckle, A. M., Minh, B. Q., & Jackson, C. J. (2021). A Comprehensive Phylogenetic Analysis of the Serpin Superfamily. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 2915–2929. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab081>
- Suzuki, K. (2019). Chronic inflammation as an immunological abnormality and effectiveness of exercise. *Biomolecules*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/biom9060223>
- Tedesco, S., De Majo, F., Kim, J., Trenti, A., Trevisi, L., Fadini, G. P., Bolego, C., Zandstra, P. W., Cignarella, A., & Vitiello, L. (2018). Convenience versus biological significance: Are PMA-differentiated THP-1 cells a reliable substitute for blood-derived macrophages when studying in vitro polarization? *Frontiers in Pharmacology*, 9(FEB), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00071>

- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF A HUMAN ACUTE MONOCYTIC LEUKEMIA CELL LINE (THP-1). In *J. Cancer* (Vol. 26).
- Wang, L. xun, Zhang, S. xi, Wu, H. juan, Rong, X. lu, & Guo, J. (2019). M2b macrophage polarization and its roles in diseases. In *Journal of Leukocyte Biology* (Vol. 106, Issue 2, pp. 345–358). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU1018-378RR>
- Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. In *Nature* (Vol. 496, Issue 7446, pp. 445–455). <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- Yao, Y., Xu, X. H., & Jin, L. (2019). Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00792>
- Zhou, W., Tahir, F., Wang, J. C. Y., Woodson, M., Sherman, M. B., Karim, S., Neelakanta, G., & Sultana, H. (2020). Discovery of Exosomes From Tick Saliva and Salivary Glands Reveals Therapeutic Roles for CXCL12 and IL-8 in Wound Healing at the Tick–Human Skin Interface. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00554>