

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Analýza imunitních buněk v kloubních výpotečích pacientů s totální endoprotézou kolena

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Miluše Chalupková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Zuzana Mikulková, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Mgr. Zuzany Mikulkové, Ph.D., s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 11. 5. 2020

Bc. Miluše Chalupková

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí své diplomové práce Mgr. Zuzaně Mikulkové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady. Dále děkuji Mgr. Markétě Trajerové, Mgr. Gabriele Gabčové, Mgr. Martinu Dihelovi a Mgr. Ondřeji Jančovi za poskytování konzultací a všestrannou pomoc při vypracování experimentální části. Dále bych chtěla poděkovat vedoucí laboratoře doc. Dr. Ing. Evě Kriegové a celému kolektivu Laboratoře molekulární imunologie Ústavu imunologie (přednosta prof. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.) Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za možnost vypracovat diplomovou práci na tomto pracovišti, za jejich pozitivní přístup a ochotu. Také bych chtěla poděkovat prof. MUDr. Jiřímu Gallovi, Ph.D. z Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc za poskytnutí biologického materiálu a klinických dat. Výjimečné poděkování patří mému manželovi Janu Chalupkovi, bez něhož by tato práce nikdy nevznikla, neboť ve mne nikdy nepřestal věřit.

Tato práce vznikla za podpory grantu Agentury pro zdravotnický výzkum Ministerstva zdravotnictví České republiky (AZV MZ ČR VES16-31852A) a Interní grantové agentury LF UP (LF UP_2019_014, LF UP 2020 016).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Miluše Chalupková
Název práce	Analýza imunitních buněk v kloubních výpotcích pacientů s totální endoprotézou kolena
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav imunologie, Laboratoř molekulární imunologie
Vedoucí práce	Mgr. Zuzana Mikulková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Totální endoprotéza (TEP) kolena představuje operaci, při níž je celý kloub nebo jeho část nahrazena protetickým implantátem. Cílem je obnovit stabilitu a funkci postiženého kloubu. Tato operace se nejčastěji provádí u pacientů trpících poškozením kloubů v důsledku osteoartrózy (OA) nebo revmatoidní artritidy (RA) v konečném stádiu. Vzácným, ale závažným problémem po TEP je vznik kloubního výpotku. Zastoupení populací imunitních buněk v kloubních výpotcích se u pacientů s TEP liší. Fenotypová analýza těchto buněk by mohla pomoci identifikovat příčinu tvorby kloubního výpotku.

Cílem diplomové práce bylo porovnání imunitního mikroprostředí v kloubních výpotcích pacientů s OA a pacientů s TEP kolena a kyčle. K tomuto účelu byla použita metoda imunofenotypizace hlavních populací imunitních buněk a jejich analýza pomocí průtokového cytometru. V obou skupinách pacientů byly identifikovány stejné hlavní populace imunitních buněk, a to populace neutrofilů, lymfocytů a buněk monocyt/makrofágové linie. Porovnáním procentuálního zastoupení jsme zjistili významné rozdíly mezi buňkami makrofágů a CD3⁺ T-lymfocytů mezi pacienty s TEP kolena a kyčle. Dále byly porovnávány populace imunitních buněk ve výpotcích pacientů s TEP kolena a OA kolena. Zaznamenali jsme významné rozdíly v populacích buněk monocyt/makrofágové linie a CD4⁺ regulačních T-lymfocytů.

Metodou ELISA byly stanoveny a porovnány hladiny myeloperoxidasy, matrix metalopeptidasy-9, monocytárního chemoatraktivního proteinu-1, RANTES a interleukinu 17 ve vzorcích pacientů s TEP kolena a OA kolena. V případě

myeloperoxidasy byla u obou typů vzorků zaznamenána korelace mezi hladinami analytů a procentuálním zastoupením neutrofilů. Hladiny monocytárního chemoatraktivního proteinu-1, RANTES a interleukinu 17 se významně lišily mezi pacienty s TEP kolena a OA kolena.

Pomocí imunocytochemického fluorescenčního barvení cytospinů byly vizualizovány znaky CD14 a CD68 buněk monocyt/makrofágové linie.

Detailní popis imunitního prostředí kloubního výpotku u kloubů s TEP by mohl přispět k odhalení příčiny jeho vzniku a následnému léčebnému či profylaktickému přístupu.

Klíčová slova	Totální endoprotéza kolena, kloubní výpotek, imunofenotypizace, imunitní buňky, průtoková cytometrie, ELISA, cytospiny
Počet stran	86
Počet příloh	-
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Miluše Chalupková
Title	Analysis of immune cells in joint exudates of patients with total knee endoprosthesis
Type of thesis	Diploma
Department	Institute of Immunology, Laboratory of Molecular Immunology
Supervisor	Mgr. Zuzana Mikulková, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

Total knee arthroplasty (TKA) is a surgery in which all or part of a joint is replaced with a prosthetic implant. The goal is to restore the stability and function of the affected joint. This surgery approach is the most often performed in patients suffering from joint damage due to end-stage of osteoarthritis (OA) or rheumatoid arthritis (RA). A rare but serious problem after TKA is the development of joint effusion. The proportion of immune cell populations in joint effusions varies in patients with TKA. Phenotypic analysis of these cells could help identify the cause of joint effusion.

The aim of the diploma thesis was to compare the immune microenvironment in the joint effusions of patients with OA and patients with TKA and total hip arthroplasty. For this purpose, the method of immunophenotyping of the main populations of immune cells and their analysis using a flow cytometer was used. In both groups of patients, the same major immune cell populations were identified, namely neutrophils, lymphocytes, and monocyte/macrophage lineage. By comparing the percentages, we found significant differences between macrophage cells and CD3⁺ T-lymphocytes between patients with TKA and total hip arthroplasty. Furthermore, immune cell populations in the effusions of patients with TKA and knee OA were compared. We observed significant differences in populations of monocyte/macrophage lineage and CD4⁺ regulatory T-lymphocytes.

Levels of myeloperoxidase, matrix metalloproteinase-9, monocyte chemoattractant protein-1, RANTES and interleukin 17 in samples from patients with TKA and knee OA were determined and compared by ELISA. In the case of myeloperoxidase, a

correlation between analyte levels and the percentage of neutrophils was observed in both types of samples. Levels of monocyte chemoattractant protein-1, RANTES, and interleukin 17 differed significantly between patients with TKA and knee OA.

Using immunocytochemical fluorescent staining of cytopins were visualized characters CD14 and CD68 cells of monocyte/macrophage lineage.

A detailed description of the immune environment of joint effusion in the joints of TKA could help to reveal the causes of its origin and subsequent therapeutic or prophylactic approach.

Keywords	Total knee endoprosthesis, synovial fluid, immunophenotyping, immune cells, flow cytometry, ELISA, cytopins
Number of pages	86
Number of appendices	-
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	11
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	12
2.1 Kolenní kloub	12
2.2 Synoviální tekutina	13
2.2.1 Odběr synoviální tekutiny	13
2.3 Osteoartróza.....	16
2.4 Totální endoprotéza kolena	19
2.5 Imunitní systém v kloubním prostředí	21
2.5.1 Náhrada kloubů a vrozený imunitní systém	25
2.5.2 Role makrofágů v procesu rozpoznávání otěrových částic endoprotéz	25
2.6 Průtoková cytometrie	28
2.7 Imunocytochemie	31
2.8 ELISA	33
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
3.1 Materiál a metody	36
3.1.1 Biologický materiál.....	36
3.1.2 Použité chemikálie	37
3.1.3 Použité soupravy	37
3.1.4 Použité roztoky	38
3.1.5 Přístroje	38
3.1.6 Zpracování kloubních výpotků	39
3.1.7 Imunofenotypizace kloubních výpotků	40
3.1.8 ELISA.....	41
3.1.8.1 Stanovení hladiny matrix metalopeptidasy-9	41
3.1.8.2 Stanovení hladiny myeloperoxidasy	42
3.1.8.3 Stanovení hladiny monocytárního chemoatraktivního proteinu-1...43	
3.1.8.4 Stanovení hladiny RANTES.....	43
3.1.8.5 Stanovení hladiny interleukinu 17	44
3.1.9 Příprava cytospinů.....	45
3.1.10 Imunocytochemické barvení cytospinů	45
3.1.10.1 Fluorescenční barvení cytospinů.....	45
3.1.11 Statistické zpracování dat	47

4 VÝSLEDKY	48
4.1 Zastoupení hlavních populací imunitních buněk v kloubních výpotcích pacientů s totální endoprotézou.....	48
4.2 Zastoupení pacientů s totální endoprotézou v rámci imunitních fenotypů	49
4.3 Rozdíly v zastoupení hlavních populací imunitních buněk mezi muži a ženami	51
4.4 Rozdíly v zastoupení hlavních populací imunitních buněk mezi pacienty s totální endoprotézou kolena a kyčle	52
4.5 Zastoupení subpopulací buněk monocyt/makrofágové linie u pacientů s totální endoprotézou kolena a kyčle	54
4.6 Zastoupení subpopulací buněk lymfocytární linie u pacientů s totální endoprotézou kolena a kyčle	55
4.7 Zastoupení pacientů s osteoartrózou kolena v rámci imunitních fenotypů	57
4.8 Rozdíly v zastoupení hlavních populací imunitních buněk mezi pacienty s totální endoprotézou kolena a osteoartrózou kolena	60
4.9 Zastoupení subpopulací buněk monocyt/makrofágové linie u pacientů s totální endoprotézou kolena a osteoartrózou kolena	61
4.10 Zastoupení subpopulací buněk lymfocytární linie u pacientů s totální endoprotézou kolena a osteoartrózou kolena	62
4.11 ELISA	64
4.12 Imunocytochemické barvení cytospinů	67
5 DISKUSE	69
6 ZÁVĚR	76
7 LITERATURA	77
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	85

CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši zaměřenou na charakteristiku:

- 1) kloubního výpotku a patologických stavů vedoucích ke vzniku poškození kloubu a jejich radikální léčbě, jako je totální endoprotéza (TEP) kolena;
- 2) kloubního imunitního mikroprostředí.

V experimentální části bylo cílem diplomové práce zpracování vzorků kloubních výpotků a jejich příprava pro analýzu:

- 1) imunitních buněk - průtokovou cytometrií, fluorescenční mikroskopií;
- 2) supernatantů pro stanovení hladin myeloperoxidasy, matrix metalopeptidasy-9, monocytárního chemoatraktivního proteinu-1, RANTES chemokinů a interleukinu 17 pomocí metody ELISA.

1 ÚVOD

Totální endoprotéza (TEP) kolena je operace, při které dochází k náhradě celého kloubu nebo jeho části protetickým implantátem. Představuje významný pokrok v léčbě porušené funkce kloubů. V jejím důsledku dochází k úlevě od bolesti, obnovení funkce postiženého kloubu a celkovému zlepšení kvality života. Nejčastěji tuto operaci podstupují pacienti trpící poškozením kloubů v konečném stádiu v důsledku osteoartrózy (OA) nebo revmatoidní artritidy (RA). V důsledku těchto onemocnění dochází k postupné degeneraci a ztrátě kloubní chrupavky projevující se bolestí a ztuhlostí postižených kloubů. Tyto degenerativní změny postihují nejčastěji právě kolenní kloub.

Vznik kloubního výpotku po TEP je vzácným, avšak závažným problémem. Příčiny jeho vzniku je nutné co nejdříve odstranit, protože mohou způsobit následné selhání TEP. Při tvorbě výpotku dochází k přestupu populací buněk leukocytů z periferní krve do synoviální tekutiny. Fenotypová analýza těchto buněk by mohla pomoci identifikovat příčinu vzniku kloubního výpotku. O zastoupení populací imunitních buněk v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena je však zatím známo jen velmi málo.

V experimentální části diplomové práce byly charakterizovány hlavní populace imunitních buněk v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena nebo kyčle pomocí průtokové cytometrie. Získané výsledky byly porovnávány s procentuálním zastoupením hlavních populací imunitních buněk v kloubních výpotcích pacientů s OA kolena. V supernatantech kloubních výpotků byly pomocí sendvičové ELISA metody stanovovány hladiny myeloperoxidasy, matrix metalopeptidasy-9, monocytárního chemoatraktivního proteinu-1, RANTES a interleukinu 17. Z vybraných vzorků byly připraveny cytospiny, které byly následně barveny pomocí imunocytochemického fluorescenčního barvení. Pro barvení byly vybrány znaky CD14 a CD68 exprimované buňkami monocyt/makrofágové linie.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Kolenní kloub

Kolenní kloub je největší kloub v lidském těle sestávající z kosti stehenní (lat. *femur*), holenní (lat. *tibia*) a česky (lat. *patella*) (Obr. 1). Kolenní kloub je velmi složitý a snadno může dojít k jeho poranění. Podílí se na pohybech, jako je chůze běh a skok, a jeho hlavní funkcí je především tlumení nárazů a poskytování stability. Anatomická funkce a stabilita kolenního kloubu je závislá především na svalech, kostech, vazech, chrupavkách, synoviální tkáni, synoviální tekutině a dalších pojivových tkáních.

Stehenní kost je největší a nejsilnější kost v těle. Mohutný tvar stehenní kosti poskytuje mnoho bodů pro připojení silných svalů kyčle a kolena, které se podílejí na chůzi a jiných hnacích pohybech.

Holenní kost je velká dlouhá kost dolních končetin, která spojuje kolenní kloub s kloubem kotníku. Holenní kost vytváří společně s kostí stehenní tzv. tibiofemorální kloub kolena. Primární funkcí holenní kosti je přijímat a rozdělovat váhu těla mezi koleno a kotník.

Česka je plochá kost trojúhelníkového tvaru umístěná na přední straně kolenního kloubu. Zadní plocha česky je potažena kloubní chrupavkou o tloušťce 4–5 mm. Česka vytváří se stehenní kostí tzv. patelofemorální kloub. Česka funguje především jako anatomická kladka pro čtyřhlavý stehenní sval, umožňuje účinnější flexi kolena a zvyšuje sílu čtyřhlavého svalu (Neumann, 2010; Moore *et al.*, 2011).



Obr. 1 Kolenní kloub (převzato a upraveno dle radiopaedia.org).

2.2 Synoviální tekutina

Synoviální tekutina (ST) je ultrafiltrát krevní plazmy, který mimo jiné obsahuje látky vylučované samotnými kloubními buňkami. Relativně vysoké procento z těchto látek zaujímá kyselina hyaluronová (HA). Tato kyselina je považována za sekreční produkt synoviálních výstelkových buněk typu B. HA polymeruje s proteiny přítomnými v ST a dochází ke vzniku komplexu kyselina hyaluronová – protein, který v kloubu plní funkci viskózního lubrikantu. Při snižování teploty okolního prostředí dochází ke zvyšování viskozity ST, které může souviset s tzv. tuhostí kloubů, což je jev, který pociťuje značné množství lidí v chladnějším počasí. Naopak, v případě zánětlivých stavů dochází ke snižování viskozity ST. Polymerace HA a proteinů ST je snížena lysozomálními enzymy produkovanými převážně neutrofily, ale také buňkami synoviální výstelky a buňkami chrupavky. Při vysoké produkci těchto lysozomálních enzymů může dojít ke zničení kloubní chrupavky v intervalu několika dní (Ward, 1980; Berg, 1984; Hogan a Pritzker, 1985; Terčič a Božič, 2001).

ST plní v kloubech dvě hlavní funkce. První funkcí je mazání kloubních povrchů a snižování tření, čímž napomáhá správné mechanické funkci kloubu. Druhou funkcí ST je pomoc při výživě kloubní chrupavky. ST plní funkci transportního média pro živiny, jako je např. glukosa. ST má antibakteriální vlastnosti, které pomáhají udržovat sterilní prostředí kloubu (přehledně shrnuto v Brannan a Jerrard, 2006).

Množství ST se v jednotlivých kloubech lidského těla liší převážně v závislosti na jejich velikosti, od několika kapek v malých kloubech až po několik mililitrů v těch velkých. V případě kolenního kloubu se může jednat až o 4 mililitry tekutiny. Zdravá ST by měla obsahovat méně než 200 bílých krvinek na mililitr a mnohem menší množství proteinů než krevní plazma (hodnota činí přibližně 25 % hodnoty krevní plazmy). Složení zdravé ST zahrnuje velké synoviální buňky, monocyty, makrofágy, lymfocyty a neutrofily. Běžně se zde nachází také glukosa a kyselina močová v množství srovnatelném s krevní plazmou (Ward, 1980, Benjamin, 1998).

2.2.1 Odběr synoviální tekutiny

ST se získává punkcí postiženého kloubu (Obr. 2). Získaný vzorek bývá označován jako výpotek a je dále analyzován pro identifikaci počtu a typu přítomných buněk. Odstranění co největšího množství ST pomáhá zmírnit bolesti kloubů a může pomoci s identifikací případné infekce (Berg, 1984; Siva *et al.*, 2003). V rámci rutinní analýzy

bývá vzorek analyzován na počet a typ bílých krvinek, přítomnost krystalů, Gramovo barvení a kultivaci bakterií. V případech chronicky nemocných nebo imunokompromitovaných pacientů mohou být indikovány houbové a bakteriální kultury. Vzhledem k tomu, že se zánětlivé výpotky mohou srážet, měly by se vzorky odebírat do zkumavek s antikoagulačními činidly, jako je kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) nebo heparin sodný (Freemont, 1996; přehledně shrnuto v Brannan a Jerrard, 2006).



Obr. 2 Punkce kolenního kloubu (převzato a upraveno dle mendmyknee.com).

Vzhled kloubního výpotku se může značně lišit v závislosti na diagnóze. Ve zdravém kloubu se nachází vysoce viskózní ST slámově žlutého čirého zabarvení. Čírost ST je přímo úměrná počtu leukocytů v ní obsažených. Čím větší počet leukocytů ST obsahuje, tím je zakalenější, a tudíž méně průhledná. Dle stupně zákalu lze usuzovat na zánět či infekci v daném kloubu. V případech hemoragických vzorků lze pozorovat difúzi červených krvinek v celém objemu vzorku, na rozdíl od traumatické punkce kloubu, kdy lze pozorovat krvavé proužky v jinak čistém vzorku (přehledně shrnuto v Brannan a Jerrard, 2006; Gallo, 2014). Přehled základních diagnostických nálezů kloubních výpotků je shrnut v Tab. 1.

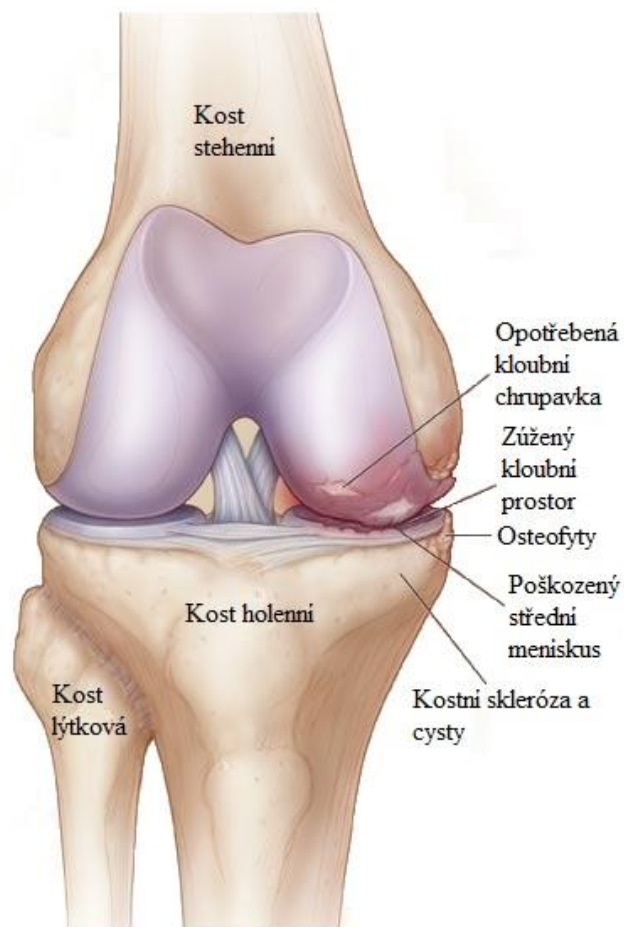
Tab. 1 Přehled základních nálezů v kloubních výpotcích; ery = erytrocyty, leu = leukocyty, PMN = polymorfonukleární leukocyty (převzato a upraveno dle Gallo *et al.*, 2014).

Typ	Diagnóza	Barva/vzhled výpotku	Počet buněk/mm ³	Glukosa
Nezánětlivý	Trauma	Vzhled krve + různé stupně odbarvení	Převaha Ery, Leu ≤ v krvi PMN < 25 %	= glykemii
	Neartrótické nemoci kloubů	Nažloutlá čirá	Ery minimum, Leu 200–2 000 PMN < 25 %	= glykemii
	Osteoartróza	Slámově žlutá	Leu do 4 000 PMN < 25 %	= glykemii
Zánětlivý	Zánětlivé nemoci kloubů	Žlutá až bíložlutá, různý stupeň zakalení, přítomnost vloček	Ery minimum Leu < 50 000 PMN < 70 %	< glykemie
Infekční	Septická artritida	Šedobílá, vysoký stupeň zakalení až vzhled hnisu	Leu > 50 000 PMN > 80 %	< glykemie
	Tuberkulózní zánět kloubu	Žlutobílá s přítomností zákalu	Leu < 40 000 PMN < 50 %	< glykemie
Normální	Zdravý kloub	Čirá lehce nažloutlá, malé množství tekutiny	Ery minimum, Leu 50–200	= glykemii

Požadavky na objem odebraného výpotku se mezi jednotlivými laboratoři liší, obvykle však 2–3 ml plně postačují na provedení všech potřebných laboratorních testů. V případě, že se punkcí kloubu podaří získat pouze několik kapek, bývá vzorek odeslán primárně na analýzu krystalů a kultivaci, které mají největší diagnostickou hodnotu (Siva *et al.*, 2003). Aby nedocházelo k nesprávnému diagnostikování hraničních hodnot převážně u zánětlivých vzorků, je velmi důležité, aby byl výpotek analyzován v co nejkratším časovém úseku po odběru. Především analýza počtu přítomných buněk a analýza krystalů ztrácejí na přesnosti již během několika hodin. Kerolus *et al.* (1989) uvádí, že množství bílých krvinek a procento PMN ve vzorku klesá již během několika hodin od aspirace. Následující den jsou zde krystaly zastoupeny v mnohem menší míře a jsou hůře rozpoznatelné. Rychlost rozpadu vzorku je závislá na době, která uplynula od aspirace, a je rychlejší u vzorků skladovaných při laboratorní teplotě, než u vzorků chlazených (Kerolus *et al.*, 1989).

2.3 Osteoartróza

Osteoartróza (OA) je stále častěji považována za vysoce heterogenní skupinu onemocnění charakterizovanou proměnlivými klinickými fenotypy (Castañeda *et al.*, 2014, Lauwerys *et al.*, 2015). Jedná se o nejčastější kloubní onemocnění na světě, které postihuje přibližně 10 % mužů a 18 % žen starších 60 let (Woolf a Pfleger, 2003). Výskyt OA celosvětově stoupá převážně v důsledku rostoucí obezity a stárnutí populace. Rizikovými faktory jsou věk, pohlaví, obezita, genetické predispozice a rasa. Roli v tomto procesu mohou hrát také zranění kloubů, malignity a abnormální zatížení kloubů (Johnson a Hunter, 2014). Patogeneze OA není přesně definována. Předpokládá se ovšem, že zahrnuje spolupráci mezi mechanickými, biochemickými, buněčnými, genetickými a imunologickými vlivy (Creamer a Hochberg, 1997). Mezi první příznaky OA patří bolest kloubů a jejich ztuhlost. Patologie kloubu zahrnuje především poškození a následnou ztrátu kloubní chrupavky, remodelaci kostí, vznik osteofytů (výrůstků na okrajích kloubů) a ochabnutí svalů v okolí postižených kloubů. Radiografické rysy OA zahrnují především zúžení kloubního prostoru, osteofytózu, kostní sklerózu a tvorbu cyst a abnormality kloubního obrysu (Obr. 3) (Hutton, 1989). Léčba OA spočívá tradičně v tlumení bolesti, a v případě konečného stádia tohoto onemocnění, v náhradě postiženého kloubu (Bijlsma *et al.*, 2011; Carr *et al.*, 2012; Pivec *et al.*, 2012).



Obr. 3 Osteoartróza kolenního kloubu (převzato a upraveno dle Felson, 2006).

OA se tradičně rozlišuje na primární a sekundární. Posttraumatické, infekční, zánětlivé a biochemické příčiny jsou charakterizovány pro sekundární OA. Příčiny primární OA zůstávají nadále nedefinovány. Ví se však, že důležitou roli v tomto procesu hrají genetické faktory, fyziologické změny související s věkem či národností (Altman *et al.*, 1986; Johnson a Hunter, 2014).

Pro klasifikaci kolenní OA (KOA) je nejčastěji využíván radiografický systém dle Kellgreen-Lawrence. Tento systém přiřadí každému pacientovi stupeň OA od 0 do 4, přičemž stupeň 0 znamená pacienta bez OA, a stupeň 4 znamená závažnou OA (Kellgren a Lawrence, 1957). Jednotlivé stupně OA dle Kellgreen-Lawrence jsou znázorněny na Obr. 4.

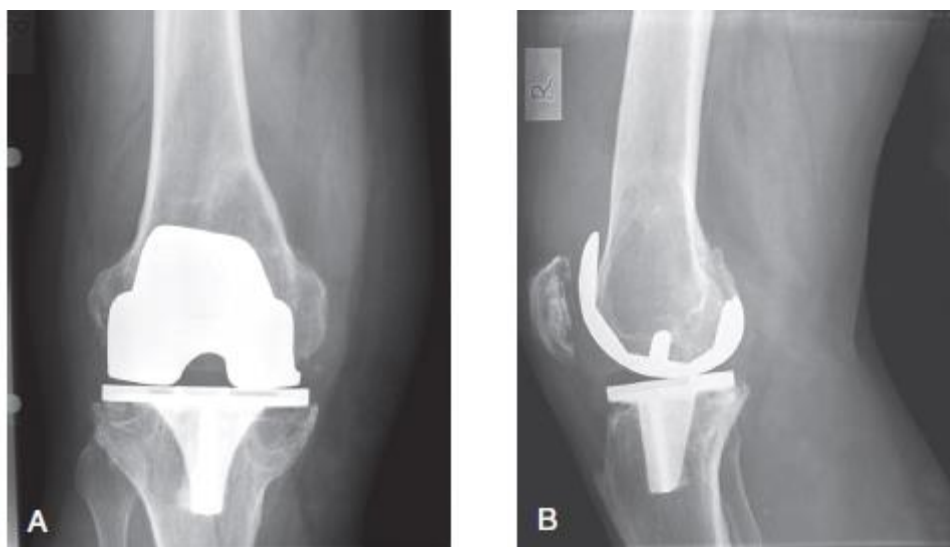


Obr. 4 Klasifikační systém dle Kellgren-Lawrence; A) stupeň 1 – možné zúžení kloubního prostoru a možná přítomnost osteofytů, B) stupeň 2 – přítomnost osteofytů a možné zúžení kloubního prostoru, C) stupeň 3 – zúžený kloubní prostor a středně početné osteofyty, D) stupeň 4 – vysoká četnost osteofytů, výrazné zúžení kloubního prostoru, těžká kostní skleróza a přítomnost deformity kostních obrysů (převzato a upraveno dle Liao *et al.*, 2018).

V současnosti roste počet důkazů o zásadní úloze imunitních buněk při progresi a vzniku chronického onemocnění. Imunitní buňky mohou velmi významně ovlivnit vývoj daného onemocnění a dále přispět ke vzniku konkrétního fenotypu. Komplexní buněčné složení ST KOA však doposud nebylo přesně charakterizováno. Přestože byla OA tradičně považována za nezápětivé onemocnění, v poslední době se objevuje stále více výzkumů, které naznačují, že se jedná o zánětlivé onemocnění, alespoň u některých pacientů (Li *et al.*, 2017). Zvýšené hladiny C-reaktivního proteinu (CRP), jakožto systémového zánětlivého markeru, korelují s výskytem a stupněm KOA a do určité míry tak indikují lokální synoviální zánět (Sowers *et al.*, 2002; Stürmer *et al.*, 2004; Pearle *et al.*, 2007). Pacienti s OA často vykazují zánětlivou infiltraci synoviálních membrán především makrofágy, dendritickými buňkami, granulocyty T- a B-lymfocyty, NK buňkami a žírnými buňkami (Sakkas a Platsoucas, 2007, Ponchel *et al.*, 2015). Zejména lymfocyty pak exprimují aktivační znaky (např. CD69) a, jak již bylo prokázáno, aktivované synoviální makrofágy se poté podílí na procesu degradace chrupavky (Bondeson *et al.*, 2006; Rollin *et al.*, 2008). Modely testované na myších dokonce prokázaly účast synoviálních makrofágů na tvorbě osteofytů (Van Lent *et al.*, 2004). OA v konečném stádiu dnes představuje hlavní příčinu operací kloubů a jejich náhrady totální endoprotézou, a to ve více než 90 % případů (Robertsson *et al.*, 2010).

2.4 Totální endoprotéza kolena

Totální endoprotéza (TEP) kolena neboli artroplastika kolenního kloubu je operace, při níž je protetickými implantáty nahrazena pouze část poškozeného kloubu. TEP dnes představuje významný pokrok v léčbě porušené funkce kloubů. Je indikována u pacientů s nesnesitelnou bolestí a závažnými funkčními poruchami, u nichž došlo k selhání konzervativní léčebné terapie. Časté je provádění u pacientů s pokročilými stavy kloubní degenerace, a dále u pacientů po traumatologických a onkologických stavech. Účelem TEP je obnovit funkčnost a pohyblivost postiženého kloubu, redukce bolesti a získání vnitřní stability kloubů. Jedná o tzv. trojkompartmentální artroplastiku, jelikož při ní dochází k náhradě kloubních povrchů kosti stehenní, holenní a česky (Obr. 5). Kloubní povrch česky bývá často obnoven, pokud došlo k nadměrné erozi chrupavky. V případech, kdy chrupavka nejeví velké známky opotřebení, se patelární implantát vynechává (Paz a West, 2014).



Obr. 5 Rentgenový snímek pravého kolena po TEP. A) Přímý pohled; B) Boční pohled (převzato a upraveno dle Paz a West, 2014).

TEP je dnes běžnou operací, v jejímž důsledku dochází ke zvýšení kvality života pacientů s poruchami kolena. Kromě OA patří k dalším stavům vedoucím k TEP především zlomenina, dysplazie, zánětlivá artritida či malignity. Vzhledem k současnému trendu stárnutí obyvatelstva dochází k nárůstu výskytu artritid a selhání kloubů, a v důsledku toho také k nárůstu provedených TEP. S rostoucími zkušenostmi lékařů dochází ke snižování pooperačních komplikací, což vede ke zlepšení funkce protetických implantátů. Přesto mohou po TEP kolena nastat komplikace, mezi které patří tromboembolická nemoc, infekce, nestabilita protetických kloubů, prasknutí patelární šlachy, zlomeniny, nestabilita patelofemorálního kloubu, selhání nebo uvolnění implantované komponenty a poranění peroneálního nervu (Paz a West, 2014). Po operaci je nutná důkladná rehabilitace společně s krátkodobou ochranou protetického kloubu (Gallo *et al.*, 2014). Po TEP vykazuje většina pacientů významné dlouhodobé zlepšení (Kroll *et al.*, 1989, Ethgen *et al.*, 2004, Niki *et al.*, 2007).

Mezi nejčastěji používané materiály pro výrobu umělých kloubních povrchů patří především kovové slitiny, jako chrom-kobaltové a slitiny titanu, polymery včetně polymethylmethakrylátu a polyethylenu a keramika. S vývojem nových biomateriálů a zlepšením konstrukce implantátů se opotřebení protetického kloubu a jeho následky staly primárním omezením životnosti TEP (Kurtz *et al.*, 2007; Kurtz *et al.*, 2009). K fixaci protetických součástí ke kostnímu lůžku po TEP lze použít cement (cementové endoprotézy), nebo může být jejich povrch opatřen biologicky aktivním materiálem, který umožňuje vrůstání kostních buněk do porózního materiálu protézy (osteointegrace u necementových implantátů). Další možností je také kombinace cementové a necementové komponenty (Gallo *et al.*, 2014; Paz a West, 2014).

Celkový počet náhrad kloubů dolních končetin se v posledních desetiletích dramaticky zvýšil a nyní tyto operace podstupují jak starší, tak i stále mladší pacienti. Mezi hlavní příčiny patří především obezita a poškození kloubů z důvodu jejich nadměrné fyzické zátěže. Zatímco dříve bylo prováděno mnoho revizních operací kyčlí a kolen z důvodů opotřebení protetických implantátů, v současné době převládají problémy jako suboptimální poloha implantátu, nestabilita, ztuhlost, infekce a chronická bolest kloubů (Lau *et al.*, 2000; Kurtz *et al.*, 2007; Kurtz *et al.*, 2009).

Během časného pooperačního období po TEP se můžeme setkat se zvýšeným objemem kloubního výpotku v reakci na chirurgické trauma. Ačkoliv je kloubní výpotek po TEP relativně vzácnou záležitostí a vykazuje se u <3 % pacientů, je potřeba příčiny jeho vzniku co nejdříve odstranit, protože mohou způsobit následné selhání

TEP. K příčinám vzniku výpotku patří především hluboké infekce, citlivost organismu k implantovaným kovům, biologické reakce na polyethylen nebo kovové částice (např. synovitida vyvolaná částicemi), akutní zvýšení aktivity RA a nespecifická synovitida (historicky považována za nezářetlivou artropatii). Populace buněk lymfocytů, které u protetikého kloubu přecházejí z periferní krve do výpotku, se mohou lišit u jednotlivých příčin výpotku a fenotypová analýza těchto leukocytů může pomoci definovat příčinu vzniku kloubního výpotku. Fenotypové charakteristiky leukocytů kloubního výpotku tak mohou přispět k určení správné diagnózy. O zastoupení populací imunitních buněk v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena je zatím známo jen velmi málo (Freemont *et al.*, 1991; Willert a Buchhorn, 1993; Greis *et al.*, 1994; Niki *et al.*, 2003; Niki *et al.*, 2007; Hallab *et al.*, 2010; Carossino *et al.*, 2016).

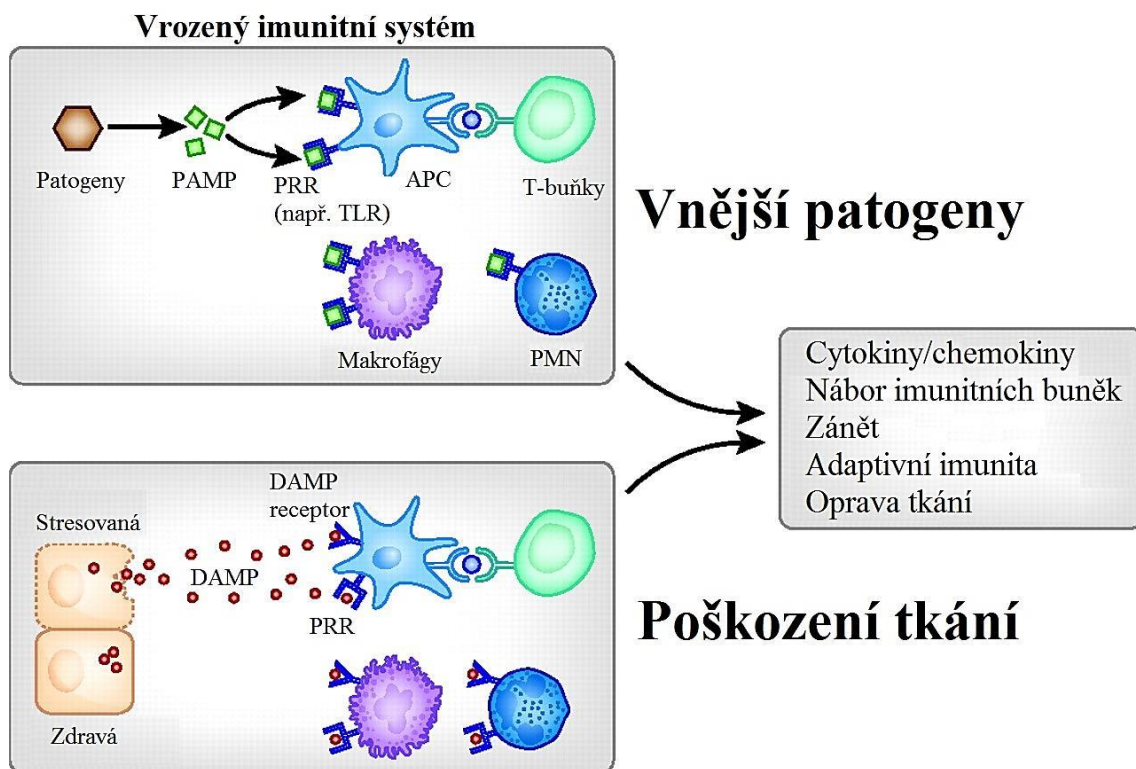
2.5 Imunitní systém v kloubním prostředí

Vrozený imunitní systém je řada předem naprogramovaných antigen nespecifických událostí, které jsou spouštěny jakýmkoliv potenciálně poškozujícím stimulem. Tyto podněty se mohou vyskytovat v mnoha různých formách, jako je invaze mikroorganismů, nepříznivé fyzikální/mechanické, chemické, tepelné a elektrické podněty, přerušeni toku živin atd. Všechny tyto události mohou narušit homeostatické regulační mechanismy, které pomáhají zajistit přežití organismu (přehledně shrnuto v Goodman *et al.*, 2014).

Vrozená imunita byla primárně vyvinuta pro boj s vnějšími patogeny v první obranné linii organismu. Buňky imunitního systému (leukocyty) vznikají z pluripotentních kmenových buněk, které jsou přítomny v kostní dřeni. Leukocyty zahrnují jak buňky vrozené imunity, kam patří neutrofilý, eosinofily, basofily, monocyty, makrofágy; tak buňky získané imunity, jako jsou T- a B-lymfocyty a NK (z angl. Natural Killer) buňky. Neutrofilý patří mezi fagocytující leukocyty. Mají důležitou roli při odstraňování mikrobiálních patogenů a opravě tkáňového poškození. Jedná se o primární buňky akutního zánětu. Eosinofily jsou účinné proti různým druhům parazitů a zároveň se účastní hypersenzitivních reakcí prostřednictvím cytotoxicity díky toxickým molekulám, které obsahují ve svých cytoplazmatických granulích. Buňky basofilů produkují cytokiny, které pomáhají bránit organismus před parazity a také vyvolávají alergickou reakci. Ve svých cytoplazmatických granulích obsahují molekuly heparinu

a histaminu, ty se při degranulaci uvolňují do okolí a stimulují zánět tkáně nebo hypersenzitivní reakci. Monocyty a makrofágy jsou stejně jako neutrofilny fagocytující buňky, které odstraňují z těla patogenní mikroorganismy a částice. Slouží také jako antigen prezentující buňky a mohou regulovat jiné buňky imunitního systému, např. T-lymfocyty. Jsou mobilizovány krátce po nábore neutrofilů a po dlouhou dobu zůstávají v místech chronického zánětu a infekce. Monocyty se diferencují v makrofágy po přestupu z krevního řečiště do tkání. NK buňky jsou velké granuloované lymfocyty. Nespecificky ničí určité typy nádorových buněk a buněk infikovaných virem. B-lymfocyty exprimují na svých vnějších membránách vnitřně produkované imunoglobuliny, plní roli antigen prezentujících buněk a po stimulaci příslušným antigenem se diferencují na plazmatické buňky, které poté produkují a vylučují velké množství molekul protilátek. T-lymfocyty se dělí do dvou hlavních tříd na $CD4^+$ pomocné T-lymfocyty, a $CD8^+$ cytotoxické T-lymfocyty. $CD4^+$ T-lymfocyty se účastní regulace imunitních odpovědí prostřednictvím makrofágů nebo B-lymfocytů. $CD8^+$ T-lymfocyty ničí virem infikované buňky a určité typy nádorových buněk antigen-specifickým způsobem (Goldman a Prabhakar, 1996).

Vrozený imunitní systém zahrnuje mechanismus, pomocí kterého dochází při mikrobiálním stimulu k jeho zaznamenání prostřednictvím povrchových a intracytoplazmatických receptorů specifických imunitních buněk, které rozeznávají jednoduché molekuly a pravidelné vzorce molekulární struktury známé jako „Pathogen-Associated Molecular Pattern“ (PAMP). PAMP jsou přítomny na povrchu mnoha mikroorganismů, ale nikoliv na hostitelských buňkách. Dané struktury jsou rozpoznávány pomocí tzv. receptorů rozpoznávajících molekulové vzory (PRR, z angl. Pattern Recognition Receptor), nacházejících se na povrchu bílých krvinek. Mezi hlavní typy buněk, které na svém povrchu exprimují PRR patří makrofágy, neutrofilny a dendritické buňky. Důležitou rodinou PRR receptorů jsou tzv. Toll-Like Receptory (TLR). Imunitní reakce mohou být spuštěny nejen v odpovědi na mikrobiální infekci, ale také při poškození tkáně a její degeneraci. Tento fakt poprvé popsal Matzinger (1994). Jedná se především o fyzikálně-chemické a tepelné podněty, při nichž dochází k uvolňování vedlejších buněčných produktů, které obsahují určité molekulární struktury. Jde o tzv. „Damage (Danger)-Associated Molecular Patterns“ (DAMP) neboli molekulární vzory typické pro poškození vlastních buněk organismu (Obr. 6) (přehledně shrnuto v Goodman *et al.*, 2014).



Obr. 6 Mechanismy působení vrozeného imunitního systému v procesu rozpoznávání specifických antigenů pomocí PAMP a DAMP. APC – antigen prezentující buňky, DAMP – Damage (Danger)-Associated Molecular Patterns, PAMP – Pathogen-Associated Molecular Pattern, PMN – polymorfonukleární leukocyty, PRR – Pattern Recognition Receptor, TLR – Toll-Like Receptor (převzato a upraveno dle Rosin a Okusa, 2011).

Mechanismy, podle kterých dochází při přestupu z periferní krve do výpotku k rozdílnému zastoupení jednotlivých typů leukocytů, jsou doposud neznámé. Tento fakt lze částečně vysvětlit rozdílnou mírou exprese chemokinů ve vaskulárních endoteliálních nebo synoviálních buňkách. Chemokiny jsou malé sekretované proteiny schopné řídit přesun leukocytů z periferní krve do místa zánětu. Silným chemoatraktantem pro neutrofile je interleukin 8 (IL-8). Nábor neutrofilů je doprovázen zvýšenou hladinou markerů neutrofilové aktivace, matrix metalopeptidasy-9 (MMP-9) a myeloperoxidasy (MPO). Chemoatraktanty makrofágů jsou monocytární-chemoatraktivní protein-1 (MCP-1) a makrofágový zánětlivý protein-1a (MIP-1a). Paměťové T-lymfocyty exprimující CD45RO jsou přitahovány chemoatraktantem označovaným jako „regulovaný po aktivaci“. Normální T-lymfocyty exprimují a sekretují druh chemokinů tzv. RANTES (z angl. Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted), Th-17 lymfocyty pak interleukin 17 (IL-17). S příčinami vzniku kloubního výpotku v protetickém kloubu po TEP se tedy

mohou chemokinové profily kromě dominantních buněčných fenotypů značně lišit (Schall *et al.*, 1990; Baggiolini *et al.*, 1994; Lind *et al.*, 1999; Niki *et al.*, 2007).

MMP-9 patří do rodiny endopeptidas odpovědných za fyziologické i patologické remodelace tkání. MMP-9 má širokou specifitu pro proteinový substrát extracelulární matrix. Může tedy účinně degradovat mnoho proteinů extracelulární matrix tvořících kloubní chrupavky. MMP-9 tak hraje významnou roli v progresi patologie kloubních onemocnění, jako je především RA a OA. Mezi buňky, které syntetizují a vylučují MMP-9 patří neutrofilů, makrofágy, fibroblasty a endoteliální buňky. MMP-9 odvozené od neutrofilů zhoršuje zánětlivou odpověď organismu, proto jsou jeho hladiny zvýšeny u mnoha zánětlivých poruch (Xu *et al.*, 2011; Malemud *et al.*, 2016; přehledně shrnuto v Huang, 2018).

MPO je hojný glykoprotein neutrofilů a monocytů. Neutrofilní MPO je uložen v cytoplazmatických azurofilních granulích. Po aktivaci neutrofilů a jejich degranulaci je MPO dodáván do fagosomů, kde dochází k usmrcení fagocytovaných bakterií. Aktivované neutrofilů také uvolňují obsah granulí extracelulárně. Zvýšené hladiny MPO v plazmě byly spojeny s řadou klinických stavů, včetně systémového zánětu organismu (přehledně shrnuto v Klebanoff, 2005).

MCP-1 je členem rodiny C-C chemokinů. MCP-1 může být produkován různými typy buněk, monocytů/makrofágy jsou však jeho hlavním zdrojem. Produkce může být konstitutivní nebo indukovaná např. oxidativním stresem, cytokiny nebo růstovými faktory. MCP-1 reguluje migraci a infiltraci buněk monocytů, paměťových T-lymfocytů a NK buněk. Bylo prokázáno, že přispívá k náboru monocytů do ložisek aktivního zánětu. Jedná se o potenciální intervenční bod pro léčbu různých nemocí včetně RA (Yoshimura *et al.*, 1989a,b; Ajuebor *et al.*, 1998; Hayashida *et al.*, 2001; Palframan *et al.*, 2001)

RANTES jsou produkovány aktivovanými T-lymfocyty a dalšími typy buněk jako jsou např. fibroblasty, chondrocyty a osteoblasty. Jsou silným chemoatraktantem pro T-lymfocyty, monocytů, makrofágy a eosinofily. Také aktivují eosinofily a basofily k uvolňování obsahu svých granulí. Zvýšená exprese RANTES je spojena s mnoha zánětlivými poruchami a patologiemi, včetně artritidy. Předpokládá se, že RANTES podporují infiltraci leukocytů do místa zánětu (Meurer *et al.*, 1993; Pulsatelli *et al.*, 1999; Alaaeddine *et al.*, 2001; Lisignoli *et al.*, 2002).

IL-17 je prozánětlivý cytokin vylučovaný výhradně aktivovanými Th17-lymfocyty. Tyto imunitní buňky se podílí na iniciaci akutní zánětlivé odpovědi, ve které dominují

buňky neutrofilů. IL-17 se podílí na zánětu tkáně stimulací exprese prozánětlivých cytokinů, především interleukinu 6 (IL-6), tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF- α), kolonie stimulujícího faktoru granulocytů a makrofágů (GM-CSF) a dalších. Zvýšené hladiny IL-17 je možné detekovat také v synoviální tekutině pacientů s RA, kde indukuje celou řadu faktorů přispívajících k degradaci kloubní chrupavky a erozi kostní hmoty (Kotake *et al.*, 1999; Ziolkowska *et al.*, 2000).

2.5.1 Náhrada kloubů a vrozený imunitní systém

Přesto, že je chirurgie TEP vysoce efektivní postup, který pomáhá zmírnit bolest a zlepšit funkci kloubů, zůstávají nepříznivými komplikacemi především mikrobiální infekce, aseptické uvolnění endoprotézy, osteolýza a periprotetické záněty vyvolané uvolněnými kovovými částicemi. Existují proto rostoucí obavy týkající se úlohy vrozeného imunitního systému v souvislosti s vedlejšími produkty kovových částí. V případě TEP kloubů může dojít ke stimulaci vrozeného imunitního systému událostmi, jako je akutní nebo indolentní infekce, setrvalé uvolňování otěrových částic, kovových iontů a dalších vedlejších produktů použitých materiálů. To může vést k nepříznivému klinickému výsledku. Tkáňové studie, stejně jako modely *in vitro* a *in vivo* ukázaly, že výše uvedené dráhy vrozeného imunitního systému jsou aktivovány právě těmito stimuly. Bylo rovněž prokázáno, že kovové ionty a vedlejší produkty polymerů mohou stimulovat TLR (Maitra *et al.*, 2008; Maitra *et al.*, 2009; Lahdeoja *et al.*, 2010; Pajarinen *et al.*, 2010; Pearl *et al.*, 2011).

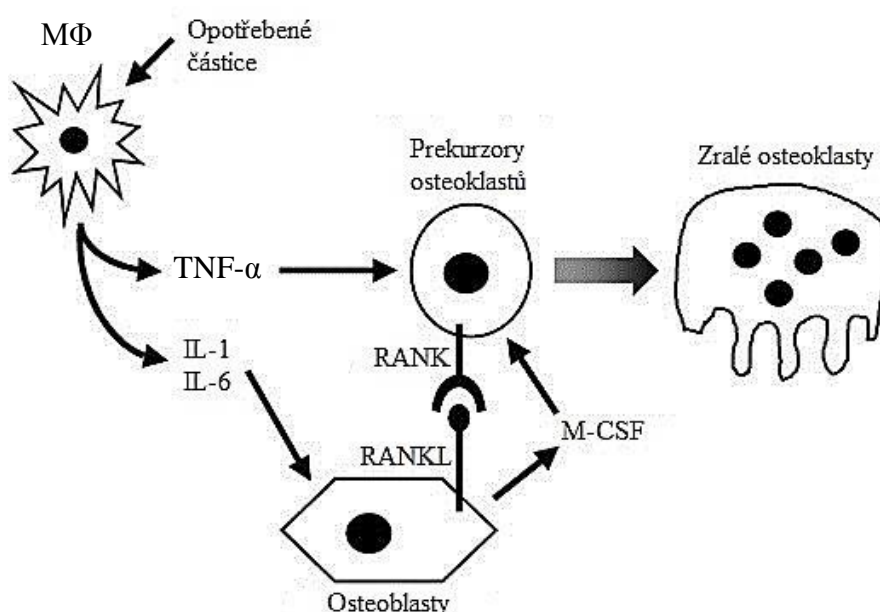
Nežádoucí postchirurgické komplikace ohrožují substituční kloubní chirurgii. Z tohoto důvodu je důležitý výzkum týkající se ortopedických implantátů a imunitního systému, aby mohly implantáty fungovat i po celou dobu života pacienta (Tamaki *et al.*, 2009; Hirayama *et al.*, 2011).

2.5.2 Role makrofágů v procesu rozpoznávání otěrových částic endoprotéz

V procesu rozpoznávání otěrových částic endoprotéz a v následné kaskádě biologických událostí, které mohou vést až k selhání implantátu, hrají makrofágy klíčovou roli. Biologická reakce na částice implantátu je komplexní. Malé částice uvolňované z protetického implantátu stimulují makrofágy k expresi prozánětlivých, pro-osteoklastických cytokinů, povrchových receptorů a dalších látek, které zvyšují

tvorbu, akumulaci, aktivitu a přežití osteoklastů a inhibují osteogenní aktivitu osteoblastů. Výsledkem těchto dějů je převaha kostní resorpce nad osteogenezí na rozhraní kost-implantát (přehledně shrnuto v Nich a Goodman, 2014).

Makrofágy přispívají k periprotetické resorpci kostní hmoty pomocí dvou základních funkcí. Otěrové částice mohou být fagocytovány pomocí monocytů/makrofágů, a to buď s, nebo bez endogenních proteinů. Částice, které obsahují na svém povrchu navázané proteiny, jako jsou PAMP, konkrétně lipopolysacharidy (LPS) stimulují zánětlivé reakce organismu na přítomnost cizorodých těles. Díky této stimulaci dochází k efektivnější fagocytóze otěrových částic než v případě částic bez navázaných endogenních proteinů. Tento fakt podporuje hypotézu, že subklinický bakteriální film na protetických površích může přispívat k osteolýze. Makrofágy následně produkují zánětlivé cytokiny, jako jsou TNF- α , interleukin 1 (IL-1), IL-6, interferon gama (IFN- γ) a další (Obr. 7) (přehledně shrnuto v Nich a Goodman, 2014).



Obr. 7 Diferenciace osteoklastů vyvolaná otěrovými částicemi ortopedických implantátů. Otěrové částice zvyšují produkci prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-1, IL-6 a TNF- α . TNF- α přímo stimuluje diferenciaci prekuzorů osteoklastů, zatímco IL-1 a IL-6 stimuluje diferenciaci osteoklastů nepřímo zvýšenou regulací produkce cytokinů odvozených od osteoblastů, jako jsou RANKL (receptorový aktivátor jaderného faktoru kappa- β ligand) a M-CSF (faktor stimuluje kolonie makrofágů). M Φ – makrofágy (převzato a upraveno dle Greenfield *et al.*, 2004).

V procesu fagocytózy otěrových částic je zapojena celá řada povrchových receptorů, mezi nimi také makrofágový receptor se strukturou podobnou kolagenu, tzv. MARCO (z angl. MAcrophage Receptor with COllagenous structure). MARCO se za běžných podmínek v buňkách lidských monocytů nenachází. Bývá exprimován pouze ve velmi omezeném množství, např. při chronickém zánětu způsobeném přítomností cizího tělesa (Van Der Laan *et al.*, 1997; 1999). MARCO je významným členem rodiny povrchových receptorů třídy A, a slouží jako PRR (Elomaa *et al.*, 1995). V závislosti na TLR je exprese MARCO v makrofázích silně upregulována v závislosti na přítomnosti různých mikrobiálních stimulů (Doyle *et al.*, 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2004). MARCO je schopen vázat rozpustné LPS a také intaktní Gram+ a Gram- bakterie (Elomaa *et al.*, 1995; Sankala *et al.*, 2002). Bylo zjištěno, že v případě přítomnosti otěrových částic implantátů je exprese MARCO indukována *in vitro* i *in vivo*, což může hrát důležitou roli v obraně hostitele proti neopsonizovaným a opsonizovaným částicím u makrofágů v periprotetických tkáních. MARCO dále přispívá ke zvýšené expresi IL-12 a produkci oxidu dusnatého (NO) (Chen *et al.*, 2005; Józefowski *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2010).

U pacientů s polyethylenovou kloubní náhradou jsou často pozorovány volné částice polyethylenu o velmi vysoké molekulové hmotnosti (UHMWPE). V současné době roste počet důkazů o tom, že nepříznivé reakce pacientů na uvolňované částice způsobují periprotetickou kostní resorpci, kontinuální synovitidu a reakce na přítomnost cizorodých těles. Uvolňované částice jsou fagocytovány pomocí makrofágů, čímž dochází k indukci uvolňování cytokinů resorbujících kost, a dále prostaglandinu E2. Obě látky se pak po TEP mohou podílet na periprotetické osteolýze. Míra patogenity uvolňovaných částic se liší v závislosti na jejich velikosti, tvaru, složení a koncentraci. Za nejvíce patogenní jsou považovány především submikrometrické částice, zejména kvůli snadné fagocytóze (Olson *et al.*, 1988; Goodman *et al.*, 1990; Schmalzried *et al.*, 1992; Horowitz *et al.*, 1993; Glant a Jacobs, 1994; Greis *et al.*, 1994; Shanbhag *et al.*, 1995; Matthews *et al.*, 2000; Niki *et al.*, 2003).

Kovové ionty uvolňované v důsledku opotřebení kolenních protetických implantátů se hromadí v periartikulárních tkáních a přes krevní oběh jsou přenášeny do orgánů zajišťujících detoxikaci těla, převážně tedy do jater a ledvin (Michel *et al.*, 1991; Urban *et al.*, 2000; Carossino *et al.*, 2016). Kovové ionty se váží na sérové proteiny a spolu s nimi vytvářejí hapténové komplexy, které mohou být imunitním systémem identifikovány jako antigeny a ty poté aktivují lokální nebo systémové reakce aktivací zánětlivých buněk. Tyto reakce jsou zprostředkovány především antigen-prezentujícími

buňkami a T-lymfocyty. Synovitida vyvolaná částicemi je výsledkem fagocytózy otěrových částic protetického kloubu synoviocyty a makrofágy. V průběhu fagocytózy tyto buňky produkují značné množství prozánětlivých a osteoklastogenních cytokinů, což vede k perzistentní synovitidě a následné periprotetické osteolýze. Malá množství kovových iontů, která se uvolňují z kovových protéz v důsledku jejich používání, potenciálně indukují synoviocyty a makrofágy k produkci zánětlivých cytokinů prostřednictvím redoxních mechanismů (Freemont *et al.*, 1991; Willert a Buchhorn, 1993; Greis *et al.*, 1994; Niki *et al.*, 2003; Niki *et al.*, 2007; Hallab *et al.*, 2010; Carossino *et al.*, 2016).

2.6 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je velice výkonným nástrojem pro analýzu buněčných parametrů v heterogenních populacích. Používá se v řadě vícebarevných aplikací v biologických nebo funkčních studiích a také v mnoha výzkumných aplikacích, včetně imunofenotypizace, multiparametrické analýzy DNA, počítání buněk atd. Princip této metody je založen na vlastnostech rozptylu světla analyzovaných buněk, mezi něž patří především emise fluorescence. Tato fluorescence může být buď to spojena s barvivy, nebo konjugována s monoklonálními protilátkami, které jsou specifické pro molekuly na povrchu nebo uvnitř buněk. Pomocí průtokové cytometrie lze identifikovat různé populace buněk v heterogenní suspenzi. Současné přístroje jsou schopny analyzovat 11 a více fluorescenčních kanálů (Macey, 2007; přehledně shrnuto v Picot *et al.*, 2012).

Průtoková cytometrie je metoda, při které tisíce buněk v suspenzi izotonického pufru prochází za sekundu skrz laserový paprsek (paprsky) jedna po druhé pro individuální analýzu. Tato tzv. hydrodynamická fokusace je založena na dynamických vlastnostech koaxiálního laminárního proudění. Buněčná suspenze je nejprve natlakována a poté vstříkována do proudu nosné kapaliny. Čím je tlak vzorku vyšší, tím více buněk se pohybuje v proudu nosné kapaliny, což vede ke snížení přesnosti hydrodynamické fokusace a následně k poklesu kvality analýzy vzorku. Pomocí principu fluorescence a excitace světelné energie lze touto metodou kvantifikovat vlastnosti buněk, jako je jejich velikost, granularita, obsah DNA/RNA, genová exprese nebo povrchové a intracelulární receptory. Průtokový cytometr se skládá ze tří systémů – fluidiky, optiky a elektroniky (Obr. 8) (Macey, 2007; přehledně shrnuto v Picot *et al.*, 2012).

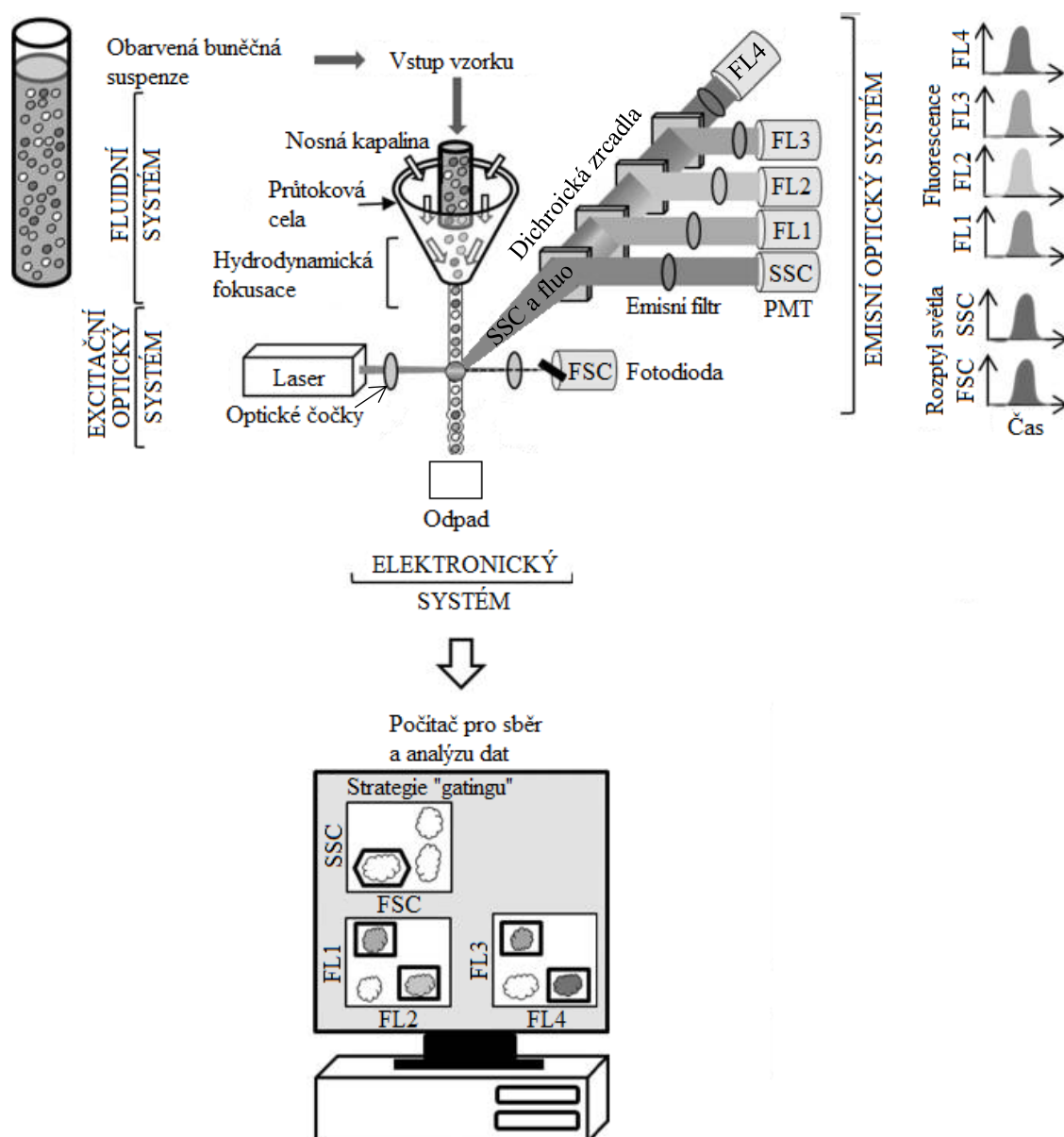
Fluidní systém se skládá z nosné kapaliny, která proudí systémem pod tlakem, čímž dochází k zaostření vzorku na laser, kde je vzorek analyzován. Suspenze buněk, získaných obvykle z krve, tkáně či nádoru je značena monoklonálními protilátkami konjugovanými s fluorochromem. Protilátky jsou proteiny rozpoznávající specifické struktury antigenu na povrchu nebo uvnitř buněk. Vazbou protilátky na antigen dochází k identifikaci požadovaného měření. Fluorochromy jsou sloučeniny vázané na protilátky, které po ozáření světlem určité vlnové délky absorbují energii tohoto záření a téměř ihned ji ztratí emisí záření o delší vlnové délce. Buňky značené fluorochromem v suspenzi pak procházejí jednotlivě a rychle přes laserový paprsek (Macey, 2007; přehledně shrnuto v Picot *et al.*, 2012).

Optický systém sestává z excitační (lasery) a sběrné optiky (fotonásobiče). Lasery emitují světlo určitých vlnových délek, ty pak excitují specifické fluorochromy. Nejčastěji používané lasery jsou 488 nm (modrý laser), 405 nm (fialový laser), 532 nm (zelený laser), 552 nm (zelený laser), 561 nm (zelený-žlutý laser), 640 nm (červený laser) a 355 nm (ultrafialový laser). Použití více excitačních zdrojů zvyšuje počet současně detekovatelných fluorochromů. Osvětlení buněk pomocí zdroje excitačního světla poskytuje rozptýlené (přímý a boční rozptyl) a fluorescenční světlo. Přímý rozptyl (FSC = Forward Scatter) je světlo rozptýlené v přímém směru, stejně jako laser, a podává informace o morfologii a velikosti buněk. Boční rozptyl (SSC = Side Scatter) je světlo rozptýlené pod úhlem 90° od směru laseru a je úměrné granularitě (struktura uvnitř buňky) nebo hustotě buněk. SSC a fluorescenční světla jsou filtrována pomocí dichroických zrcadel a odpovídajících emisních filtrů do emisního optického systému, který směřuje světla různých vlnových délek k příslušným detektorům (Macey, 2007; přehledně shrnuto v Picot *et al.*, 2012).

Systém elektroniky zahrnuje převod světelných signálů (fotonů) na interpretovatelná data. Fotonásobiče (PMT = photomultiplier tubes) průtokového cytometru jsou polovodiče, které při detekci světla generují elektrický proud. PMT tak převádí detekované fotony na elektrické signály, které je možno dále interpretovat pomocí počítačového rozhraní. Každý signál, který cytometr zaznamená, je označen jako „událost“ a všechny události daného vzorku jsou ukládány do počítače. Počítač zároveň reguluje funkce průtokového cytometru. Průtokový cytometr analyzuje současně výšku, šířku a plochu pulsu každé jednotlivé buňky. Tyto parametry poté umožňují vyloučení tzv. dubletů, což jsou dvě a více spojených buněk. Grafická analýza vzorků pak může

být interpretována pomocí softwarů speciálně navržených pro analýzu dat pomocí průtokové cytometrie (Macey, 2007; přehledně shrnuto v Picot *et al.*, 2012).

Speciálním typem průtokového cytometru je třídič buněk (FACS = Fluorescent Activated Cell Sorting). FACS cytometry umožňují s vysokým stupněm čistoty izolování subpopulací buněk z heterogenních buněčných směsí. Buňky jsou identifikovány na základě rozptylu světla a jejich fluorescenčních vlastností (Macey, 2007; přehledně shrnuto v Picot *et al.*, 2012).

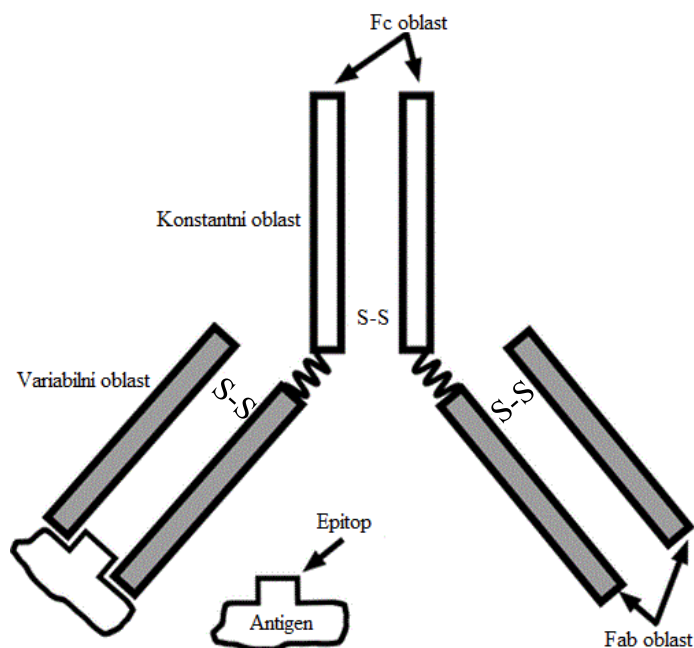


Obr. 8 Princip průtokové cytometrie. FSC - Forward Scatter, SSC - Side Scatter, PMT - fotonásobiče, FL, fluo - fluorescence (převzato a upraveno dle Picot *et al.*, 2012).

2.7 Imunocytochemie

Imunocytochemie (ICC) je laboratorní metoda používaná pro stanovení přítomnosti, subcelulární lokalizace a relativního množství antigenu, nejčastěji proteinu, v buňkách. Tato metoda využívá schopnosti protilátek vázat se specificky na unikátní sekvence aminokyselin v proteinech. Je nezbytné, aby se protilátky vázaly pouze na odpovídající místa, a aby byl umožněn jejich přístup k antigenům uvnitř buněk. Protilátky se mohou na buňky vázat také nespecificky, čímž dochází k chybnému označení, jako by se protilátky vázaly na odpovídající antigen. Důležitým krokem ICC je tedy blokáce těchto nespecifických míst. K zablokování nabitých skupin molekul je nejčastěji používán hovězí sérový albumin (BSA), který pokrývá jakékoliv nabitě skupiny a tím nedochází k vazbě protilátky na tyto skupiny. Dále je potřeba, aby se protilátky byly schopny dostat dovnitř buňky skrz cytoplazmatickou membránu. K tomu je zapotřebí ošetřit buňky pomocí detergentů, tzv. permeabilizace buněk. Mezi nejpoužívanější detergenty v ICC patří neionogenní detergenty Triton X-100 a Tween 20; a ionogenní detergenty dodecylsulfát sodný (SDS), kyselina deoxycholová a 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylamonio]-1-propansulfonát (CHAPS) (Marchenko a Flanagan, 2007; Burry, 2010).

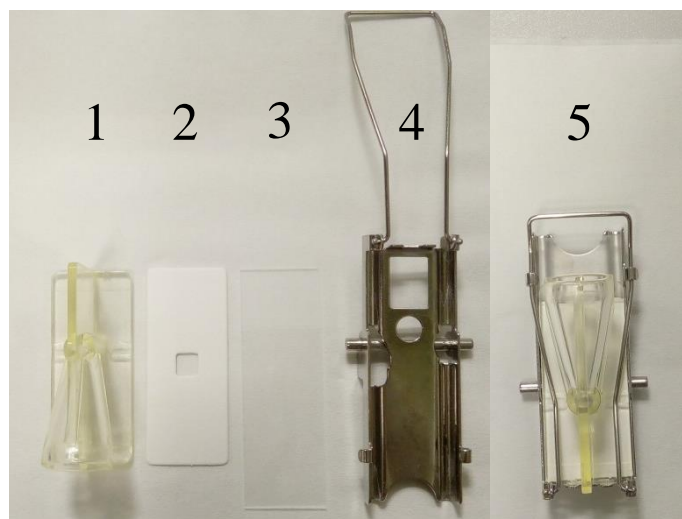
Nejčastějším typem protilátek používaných v ICC je imunoglobulin G (IgG) (Obr. 9). Protilátka se skládá z variabilní oblasti (Fab oblast), která váže epitopovou část antigenu, a konstantní oblasti (Fc oblast), která je specifická pro organismus, ve kterém byla protilátka vyvinuta. Protilátka, která váže požadovaný antigen, se označuje jako primární protilátka; protilátka, která váže Fc část primární protilátky pak jako sekundární protilátka. Sekundární protilátka je konjugována se značkou, která slouží k následné vizualizaci protilátky v buňkách a tkáních. Mezi tyto značky patří fluorescenční značky, enzymy a značené částice zlata a stříbra. V ICC se nejčastěji používají protilátky s fluorescenčními značkami (Burry, 2010).



Obr. 9 Struktura imunoglobulinu G (převzato a upraveno dle Burry, 2011).

Pro ověření specifčnosti označeného antigenu se používají 3 typy kontrolních experimentů: kontroly primárních a sekundárních protilátek a kontrola značek. Kontrola primárních protilátek je kontrolou specificity, která potvrzuje, že primární protilátka se váže na správný epitop na očekávaném antigenu. Kontrola sekundární protilátky, tzv. negativní kontrola, ukazuje specifickou vazbu sekundární protilátky na primární protilátku. Kontroly značek pomáhají identifikovat příspěvek endogenní fluorescence k pozorované značce (Burry, 2010).

Jako materiál se v ICC používají cytologické vzorky, jako jsou nátěry, cytocentrifugační preparáty (tzv. cytopiny), buněčné bloky a cytologické preparáty z tekutého média (LBC). Cytopiny jsou připravovány v cytologických centrifugách centrifugací buněčné suspenze při nízkých otáčkách, čímž dochází k rovnoměrnému nanesení tenké vrstvy buněk na mikroskopické sklíčko s minimální lýzí buněk. Cytospinové preparáty jsou připravovány z buněčných suspenzí v roztocích jako je fosfátový pufr (PBS) nebo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) médium. Aparatura pro přípravu preparátů zahrnuje cytotunel, do kterého je pipetována suspenze, filtrační kartu pro absorpci tekutiny, mikroskopické sklíčko a cytoclip pro fixaci filtrační karty a sklíčka k cytotunelu (Obr. 10) (Martínez Sanchis a Pascual, 2005; Burry, 2010; přehledně shrnuto v Skoog a Tani, 2011; Krishnamurthy a Doreswan, 2015).



Obr. 10 Aparatura pro přípravu cytospinů. 1 – cytotunel, 2 – filtrační karta, 3 – mikroskopické sklíčko, 4 – cytoklip, 5 – složená aparatura pro přípravu cytospinů.

K fixaci vzorků se používá více typů fixačních postupů v závislosti na použití cytologického barvení. Mezi nejpoužívanější fixativa patří ethanol, methanol, aceton a formaldehyd. Volba správného fixativa je velice důležitá pro optimální provedení barvení. Zároveň během fixace nesmí dojít k vymytí požadovaných buněk ze vzorku (Martínez Sanchis a Pascual, 2005; Burry, 2010; přehledně shrnuto v Skoog a Tani, 2011).

2.8 ELISA

ELISA (angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je imunologická technika, která se používá k prokázání přítomnosti protilátky nebo antigenu ve vzorku pomocí enzymů. Princip ELISA metody je založen na interakci protilátka-antigen. V organismu se jedná o chemickou reakci mezi protilátkami produkovanými B-lymfocyty a antigeny, která představuje vysoce specifickou imunitní odpověď a hraje důležitou roli při ochraně organismu, zejména proti toxinům a patogenům (přehledně shrnuto v Sakamoto *et al.*, 2018).

ELISA umožňuje vysoce citlivou a selektivní kvalitativní i kvantitativní analýzu mnoha antigenů, včetně proteinů, peptidů, hormonů a nukleových kyselin. K detekci těchto molekul se používá značení antigenů nebo protilátek pomocí enzymů, nejčastěji s využitím alkalické fosfatasy (EC 3.1.3.1), křenové peroxidasy (EC 1.11.1.7), β -galaktosidasy (EC 3.2.1.23) a glukosaoxidasy (EC 1.1.3.4). Antigen v tekuté fázi je imobilizován na povrchu pevné fáze, nejčastěji mikrotitrační destičky. Následně

dochází k reakci antigenu se specifickou protilátkou, která je detekována pomocí enzymaticky značené sekundární protilátky. Dochází k vývoji barvy nebo fluorescence pomocí chromogenního (fluorogenního) substrátu, jejíž intenzita odpovídá množství daného antigenu. Reakce enzym-substrát probíhají obvykle v rozsahu 30-60 minut a vývoj zbarvení se zastaví přidáním vhodného roztoku, např. hydroxidu sodného, kyseliny chlorovodíkové, kyseliny sírové apod. Vzniklé barevné produkty jsou následně detekovány. Byla vynalezena celá řada typů ELISA metody, mezi nejčastěji používané patří přímá, nepřímá, sendvičová a kompetitivní ELISA (Nakane a Kawaoi, 1974; Comoglio a Celada, 1976; Avrameas *et al.*, 1978; Crowther, 2009; přehledně shrnuto v Sakamoto *et al.*, 2018).

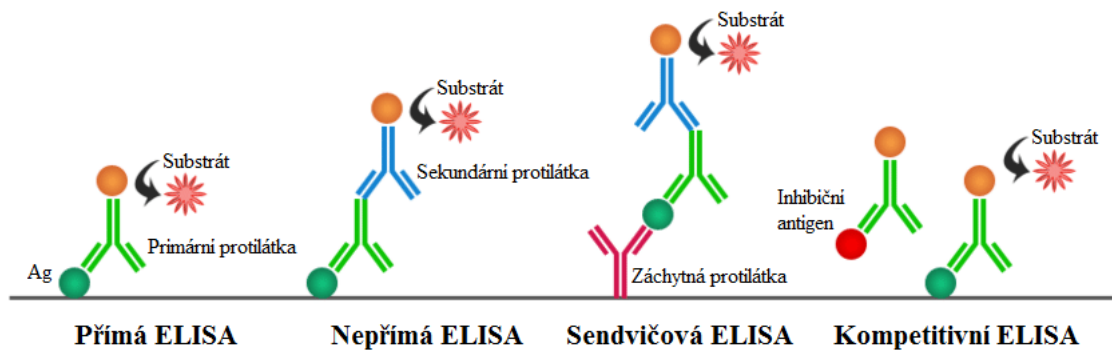
U přímé ELISA metody dochází k reakci protilátky nebo antigenu imobilizovaném na povrchu mikrotitrační destičky s enzymem značenou protilátkou nebo antigenem. Při reakci enzymu s vhodným substrátem dochází k vývoji zbarvení (Van Weemen a Schuurs, 1971; Crowther, 2009; přehledně shrnuto v Gan a Patel, 2013; průvodce metodou ELISA – Abcam, 2018; Bio-Rad antibodies, 2020).

Nepřímá ELISA metoda využívá dvou protilátek. Cílový antigen je detekován nepřímo pomocí sekundární protilátky značené enzymem, který kvantifikuje primární protilátku změnou barvy substrátu (průvodce metodou ELISA – Abcam, 2018; Bio-Rad antibodies, 2020).

V případě sendvičové ELISA metody je antigen vázán mezi tzv. záchytnou a detekční protilátkou. Záchytná protilátka je imobilizována na povrchu mikrotitrační destičky. Po blokaci nespecifických vazebných míst dochází k nanesení vzorku obsahujícího požadovaný antigen. Přídavek specifické primární protilátky vede k vazbě na antigen a vytvoření tzv. sendviče. Na primární protilátku se poté váže sekundární (detekční) protilátka. Detekční protilátka může být spojena s enzymem nebo může na sebe vázat konjugát (enzymově spojená protilátka). Tento konjugát pak může vést ke vzniku biochemické reakce (Goldsby *et al.*, 2003; průvodce metodou ELISA – Abcam, 2018; Bio-Rad antibodies, 2020).

Hlavním znakem kompetitivní ELISA metody je proces kompetitivní reakce mezi antigenem přítomným ve vzorku a antigenem vázaným na povrchu mikrotitrační destičky o vazbu na primární protilátku (Goldsby *et al.*, 2003; průvodce metodou ELISA – Abcam, 2018; Bio-Rad antibodies, 2020).

Základní principy výše popsaných ELISA metod jsou znázorněny na Obr. 11.



Obr. 11 Princip přímé, nepřímé, sendvičové a kompetitivní ELISA metody, Ag – antigen (převzato a upraveno dle biosciencenotes.com).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Biologický materiál

V této práci bylo použito celkem 120 vzorků kloubních výpotků. 47 vzorků kloubních výpotků bylo získáno od pacientů s TEP kolena, 22 vzorků od pacientů s TEP kyčle a 51 vzorků od pacientů s OA kolena. Vzorky byly získány ve spolupráci s Ortopedickou klinikou Fakultní nemocnice Olomouc. Základní charakteristika vybraného souboru pacientů a vzorků je shrnut v Tab. 2. Celkový počet vzorků v Tab. 2 je vyšší než počet zpracovaných vzorků z důvodu různých kombinací vzhledů u jednotlivých výpotků.

Tab. 2 Základní charakteristika vybraného souboru pacientů a vzorků s TEP kolena a kyčle a OA kolena.

	TEP		OA kolena	
	Koleno	Kyčel		
Počet pacientů	47	22	51	
(muži/ženy)	27/20	5/17	31/20	
Průměrný věk	70,8	66,5	65,7	
(rozmezí)	(50–85)	(41–82)	(48–92)	
Průměrný objem (ml)	6,8	10,0	14,8	
(rozmezí)	(2,0–22,0)	(2,0–23,0)	(3,0–57,0)	
Vzhled (počet vzorků)	čirý, nažloutlá barva	4	-	15
	žlutá barva	13	2	27
	čirý s bílými shluky	1	-	6
	čirý, viskózní	-	-	1
	zakalený	16	3	9
	zakalený s přítomností shluků	1	5	8
	zakalený s přítomností precipitátů	1	1	4
	oranžová barva	16	6	5
	lehce krvavý vzhled	7	11	2
	lehce krvavý vzhled s přítomností shluků	2	2	1
	přítomen bílý sediment	1	-	-
	přítomny malé částičky	6	2	4
	nahnědlá barva	2	-	-

3.1.2 Použité chemikálie

- pufr pro imunofluorescenční barvení (BD Biosciences, USA)
- kvantifikační cytometrické kuličky CountBright™ (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Fluoromount-G™ montovací médium, s DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- methanol (Mikrochem, Česká republika)
- monoklonální myší protilátky proti lidským znakům: CD3 (klon OKT3), CD3 (klon UCHT1), CD4 (klon RPA-T4), CD8 (klon SK1), CD11b (klon ICRF44), CD14 (klon M5E2), CD15 (klon W6D3), CD16 (klon 3G8), CD25 (klon M-A251), CD45 (klon 2D1), CD56 (klon MEM-188), CD127 (klon A019D5), HLA-DR (klon L243), IgG1 izotypová kontrola (klon MOPC-21), IgG2a izotypová kontrola (klon MOPC-173); konjugované s fluorochromy: fluorescein isothiokyanát (FITC), fykoerytrin (PE), peridin-chlorofyl-protein-cyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5), allofykocyanin (APC), Alexa Fluor 700, Brilliant Violet 421, Brilliant Violet 510, Brilliant Violet 605, Brilliant Violet 650, Brilliant Violet 711, Brilliant Violet 785 (BioLegend, USA)
- primární monoklonální myší protilátka proti lidskému znaku CD68 (klon Y1/82A) (BioLegend, USA)
- primární polyklonální králičí protilátka proti lidskému znaku CD14 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- proteinový blokovací roztok bez séra (DAKO, USA)
- saponin (Serva, Německo)
- sekundární polyklonální kozí protilátka proti králičí protilátce IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ABCAM, Velká Británie)
- sekundární polyklonální kozí protilátka proti myší protilátce IgG H&L (Cy5®) (ABCAM, Velká Británie)

3.1.3 Použité soupravy

- komerční souprava pro stanovení lidské matrix metalopeptidasy-9 (MMP-9) (R&D Systems, USA)
- komerční souprava pro stanovení lidské myeloperoxidasy (MPO) (R&D Systems, USA)

- komerční souprava pro stanovení lidského interleukinu 17 (IL-17) (R&D Systems, USA)
- komerční souprava pro stanovení lidského monocytárního chemoatraktivního proteinu-1 (MCP-1) (R&D Systems, USA)
- komerční souprava pro stanovení lidských RANTES (R&D Systems, USA)
- souprava doplňkových činidel DuoSet pro stanovení metodou ELISA (R&D Systems, USA)

3.1.4 Použité roztoky

- fetální bovinní sérum (1% FBS) – 500 µl FBS doplnit PBS pufrem (pH 7,4) do 50 ml
- fosfátový pufr (PBS) – 8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,24 g KH₂PO₄; 1,44 g Na₂PO₄; doplnit destilovanou vodou do 1000 ml; pH 7,4
- lyzační roztok – 8,3 g NH₄Cl, 1,0 g KHCO₃, 0,04 g EDTA, doplnit destilovanou vodou do 1000 ml; pH 7,29
- permeabilizační roztok (PBS-0,5% BSA-0,1% saponin) – 0,05 g BSA, 0,01 g saponinu rozpustit v 10 ml PBS pufru
- promývací roztok (PBS-0,5% BSA) – 0,05 g BSA rozpustit v 10 ml PBS pufru

3.1.5 Přístroje

- absorbanční (ELISA) reader EPOCH (BioTek, USA)
- analytické předvážky (BEL Engineering, Itálie)
- automatické pipety 1000; 200; 100; 20; 10; 2,5 µl (Eppendorf, Německo)
- centrifuga 3K30 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Německo)
- cytocentrifuga CytospinTM 4 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- digestoř N/900 M2 (MERCY, s.r.o., Česká republika)
- inkubovaná třepačka ES-20 (BioSan, Lotyšsko)
- inverzní mikroskop CK2 (Olympus, Japonsko)
- laminární box MSC 1.2 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- minicentrifuga Combi-Spin FVL-2400N (BioSan, Lotyšsko)
- minitřepačka V-1 plus (BioSan, Lotyšsko)
- multidetekční reader Cytation5 (BioTek, USA)
- promývačka mikrotitračních destiček 50TS8V (BioTek, USA)
- průtokový cytometr BD FACSAriaTM Fusion (BD Biosciences, USA)

3.1.6 Zpracování kloubních výpotků

Vzorky kloubních výpotků byly pečlivě zkontrolovány a byl zaznamenán jejich objem, vzhled, přítomnost částic a viskozita. Vzorek byl ve zkumavce důkladně promíchán a do 5ml cytometrické zkumavky bylo pipetováno 75 μ l nativního výpotku s 200 μ l roztoku 1% FBS a 1,5 μ l monoklonální protilátky CD45. V případě vysoce viskózních vzorků bylo přidáváno 400 μ l roztoku 1% FBS. Vzorek byl inkubován 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Poté bylo ke vzorku přidáno 39 μ l důkladně promíchané suspenze kvantifikačních cytometrických kuliček předem vytemperovaných na laboratorní teplotu. Vzorek byl změřen pomocí průtokového cytometru BD FACSAria Fusion. Následně byla vypočítána buněčnost vzorku v nativním stavu (tzv. nativní buněčnost n) dle vztahu:

$$n = \frac{\text{počet živých imunitních buněk} \times \text{číslo šarže kvantifikačních cytometrických kuliček}}{\text{počet kvantifikačních cytometrických kuliček} \times \text{přidaný objem výpotku (75 } \mu\text{l)}}$$

Celková nativní buněčnost (N) pak byla získána vynásobením hodnot nativní buněčnosti (n) celkovým objemem výpotku. Zbytek nativního výpotku byl přenesen do jedné, popř. více 12ml zkumavek a centrifugován 10 minut při 10 °C a 1 700 g. Do 3 mikrozkušavek bylo odebráno po 1 ml supernatantu a tyto zkumavky byly poté uloženy do mrazicího boxu při -80 °C. Zbytek supernatantu byl opatrně odsán Pasteurovou pipetou a odstraněn. Pelet s cca 0,5 ml zbylého supernatantu byl resuspendován. Do zkumavky byly přidány 2 ml roztoku PBS, promíchány, a byl pozorován vzhled vzorku. V případě nažloutlého, žlutého či světle oranžového zbarvení byl vzorek přefiltrován přes 70 μ m filtr do nové 12ml zkumavky. V případě tmavě oranžového, krvavého či hnědého zbarvení bylo do zkumavky přidáno 5 ml lyzačního roztoku. Vzorek byl lyzován po dobu 5 minut a poté přefiltrován přes 70 μ m filtr do nové 12ml zkumavky. Následně byly u obou případů do původní zkumavky přidány 2 ml roztoku PBS a tento objem byl přes filtr přidán k přefiltrovanému vzorku. Poté byl do zkumavky přidán roztok PBS (u vzorků s vysokou buněčností až cca 1 cm pod okraj zkumavky). Vzorek ve zkumavce byl centrifugován 10 minut při 10 °C a 600 g. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a pelet resuspendován ve zbylém objemu cca 50 μ l. Dále byl přidán přesný objem roztoku 1% FBS dle výpočtu celkové nativní buněčnosti tak, aby výsledná koncentrace buněk nepřesahovala 10 000 buněk na 1 μ l suspenze (Tab. 3).

Tab. 3 Přidávané objemy 1% roztoky FBS dle hodnot celkové nativní buněčnosti; mil. – milion.

Celková nativní buněčnost (N)	Objem 1% roztoku FBS (μl)
< 1 mil.	50
1–2,5 mil.	150
2,5–4 mil.	250
4–5,5 mil.	350
5,5–7 mil.	450
7–8,5 mil.	550
8,5–10 mil.	650
10–15 mil.	1 000
15–25 mil.	1 500
25–50 mil.	4 000
> 50 mil.	10 000

3.1.7 Imunofenotypizace kloubních výpotků

Do 5ml cytometrických zkumavek bylo pipetováno 25 μl pufru pro imunofluorescenční barvení buněk a po 1 μl fluorescenčně značených monoklonálních protilátek proti specifickým CD znakům přítomným na povrchu imunitních buněk (Tab. 4). Pouze v případě směsi protilátek CD3 FITC/(CD16+CD56) PE byly pipetovány 4 μl.

Následně byla do cytometrických zkumavek přidána buněčná suspenze v množství závisícím na hodnotě celkové nativní buněčnosti. Pokud byla hodnota N menší než 10 milionů, bylo ke směsi protilátek přidáváno 100 μl buněčné suspenze. Pokud byla hodnota N mezi 10 a 50 miliony, pak bylo k protilátkám přidáváno 50 μl buněčné suspenze. V případě, že byla hodnota N větší než 50 milionů, bylo přidáváno pouze 20 μl buněčné suspenze. Směs byla inkubována 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě a poté změřena na průtokovém cytometru BD FACSAria Fusion. Před samotným měřením bylo vždy potřeba obsah zkumavek důkladně promíchat, protože buněčná suspenze mohla během inkubace vytvořit na dně zkumavky pelet, což mohlo způsobit ucpání průtokového cytometru a následně nepřesné měření. Od každé buněčné populace bylo získáno minimálně 2 000 buněk.

Zároveň se vzorky byla vždy měřena tzv. izotypová kontrola, která sloužila k určení fluorescenčního pozadí.

Tab. 4 Kombinace CD znaků pro jednotlivé populace imunitních buněk.

Populace imunitních buněk	CD znaky
Leukocyty	CD45 ⁺
T-lymfocyty	CD3 ⁺
CD4 ⁺ T-lymfocyty	CD3 ⁺ CD4 ⁺
CD8 ⁺ T-lymfocyty	CD3 ⁺ CD8 ⁺
Regulační T-lymfocyty (T _{reg})	CD3 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻
NK buňky	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺
Monocyty	HLA-DR ⁺ CD11b ⁺ CD14 ⁺ CD16 ⁻
Makrofágy	HLA-DR ⁺ CD11b ⁺ CD14 ⁺ CD16 ⁺
Myeloidní dendritické buňky	HLA-DR ⁺ CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD16 ⁻
Neutrofilly	HLA-DR ⁻ CD11b ⁺ CD15 ⁺ CD16 ⁺

3.1.8 ELISA

V této diplomové práci jsme se zaměřili především na stanovení matrix metalopeptidasy-9 (MMP-9), myeloperoxidasy (MPO), monocytárního chemoatraktivního proteinu-1 (MCP-1), RANTES a interleukinu 17 (IL-17). Pro stanovení hladiny vybraných látek v supernatantech kloubních výpotků byla použita sendvičová ELISA metoda s využitím komerčně dostupných souprav. Po přidavku substrátu (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin a H₂O₂) dochází v přítomnosti křenové peroxidasy k oxidaci substrátu a tvorbě modrého zbarvení. Po reakci se stop roztokem (kyselina sírová) dochází ke vzniku 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin diiminu a přeměně na žluté zbarvení. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství analytu vázaného na protilátku.

3.1.8.1 Stanovení hladiny matrix metalopeptidasy-9

Ze zásobního roztoku standardu o koncentraci 20 ng.ml⁻¹ byla pomocí ředění dvojkovou řadou vytvořena osmi bodová kalibrační řada v rozsahu 20,0–0,0 ng.ml⁻¹. Ředění probíhalo vždy v calibrator diluentu. Zásobní roztok sloužil jako nejvyšší bod řady, jako nejnižší bod byl použit samotný calibrator diluent. Senzitivita této metody byla stanovena na 0,156 ng.ml⁻¹.

Použité mikrotitrační destičky byly již předem potaženy monoklonální protilátkou specifickou pro MMP-9. Do jamek mikrotitrační destičky bylo nejprve pipetováno 100 µl assay diluentu pro vyrovnání rozdílů mezi matricemi vzorku a calibrator diluentem použitým pro vytvoření kalibrační křivky. Poté bylo přidáno do příslušných jamek po 100 µl standardu nebo vzorku, destička byla zakryta a inkubována 2 hodiny při laboratorní teplotě na třepače při 150 RPM. Po uplynutí inkubace byl obsah jamek

odstraněn a jamky byly promyty 400 μl promývacího pufru. Promývací krok byl zopakován celkem 4x. Následně bylo přidáno 200 μl konjugátu MMP-9 do každé jamky, destička byla zakryta a inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě na třepačce při 150 RPM. Poté byl opět obsah jamek odstraněn a jamky byly 4x promyty 400 μl promývacího pufru. Dále bylo do jamek přidáno 200 μl roztoku substrátu a destička byla inkubována 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubace bylo do jamek přidáno 50 μl stop roztoku. Nakonec byla na absorbančním (ELISA) readeru EPOCH změřena absorbance vzorků při 450 nm s korekcí při 540 nm. Vzorky byly měřeny vždy v jednom opakování. Z rovnice kalibrační křivky byly vypočítány hodnoty koncentrací MMP-9 ve vzorcích.

3.1.8.2 Stanovení hladiny myeloperoxidasy

Ze zásobního roztoku standardu o koncentraci 4000 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla pomocí ředění dvojkovou řadou vytvořena sedmi bodová kalibrační řada v rozsahu 4000–62,5 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ředění probíhalo vždy v calibrator diluentu (ředění 1:10 v destilované vodě). Zásobní roztok sloužil jako nejvyšší bod řady.

Záchytná protilátka byla naředěna pomocí roztoku PBS na pracovní koncentraci 4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a do každé jamky bylo pipetováno 100 μl připraveného roztoku. Destička byla zakryta a inkubována přes noc při laboratorní teplotě. Následující den byl obsah jamek odstraněn a jamky byly 3x promyty 400 μl promývacího pufru. Dále byla destička blokována přidáním 300 μl reagent diluentu do každé jamky a inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace byl obsah jamek odstraněn a jamky byly 3x promyty 400 μl promývacího pufru. Poté bylo pipetováno 100 μl standardu nebo vzorků do příslušných jamek, destička byla zakryta a inkubována 2 hodiny při laboratorní teplotě. Obsah jamek byl opět odstraněn a jamky promyty promývacím pufrem. Následně bylo do každé jamky pipetováno 100 μl detekční protilátky (koncentrace 50 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ředěné v reagent diluentu), destička byla zakryta a inkubována 2 hodiny při laboratorní teplotě. Obsah jamek byl opět odstraněn a jamky promyty promývacím pufrem. Dále bylo do jamek pipetováno 100 μl roztoku streptavidinu konjugovaného s křenovou peroxidasou (ředění zásobního roztoku 1:200 v reagent diluentu), destička byla zakryta a inkubována 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Obsah jamek byl opět odstraněn a jamky promyty promývacím pufrem. Poté bylo do jamek pipetováno 100 μl roztoku substrátu a destička byla inkubována 20 minut ve tmě

při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubace bylo do jamek přidáno 50 μl stop roztoku a byla změřena absorbance vzorků při 450 nm s korekcí při 540 nm pomocí absorbančního (ELISA) readeru EPOCH. Vzorky byly měřeny vždy v jednom opakování. Z rovnice kalibrační křivky byly vypočítány hodnoty koncentrací MPO ve vzorcích.

3.1.8.3 Stanovení hladiny monocytárního chemoatraktivního proteinu-1

Ze zásobního roztoku standardu o koncentraci 2000 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla pomocí ředění dvojkovou řadou vytvořena osmi bodová kalibrační řada v rozsahu 2000–0 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ředění probíhalo vždy v calibrator diluentu (ředění 1:5 v destilované vodě). Zásobní roztok sloužil jako nejvyšší bod řady, jako nejnižší bod byl použit samotný calibrator diluent. Senzitivita této metody byla stanovena na 10 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Použité mikrotitrační destičky byly již předem potaženy monoklonální protilátkou specifickou pro MCP-1. Do příslušných jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 200 μl standardu nebo vzorku, destička byla zakryta a inkubována 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubace byl obsah jamek odstraněn a jamky byly promyty 400 μl promývacího pufru. Promývací krok byl zopakován celkem 3x. Následně bylo přidáno 200 μl konjugátu lidského MCP-1 do každé jamky, destička byla zakryta a inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byl opět obsah jamek odstraněn a jamky byly 3x promyty 400 μl promývacího pufru. Dále bylo do jamek přidáno 200 μl roztoku substrátu a destička byla inkubována 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubace bylo do jamek přidáno 50 μl stop roztoku a byla změřena absorbance vzorků při 450 nm s korekcí při 540 nm pomocí absorbančního (ELISA) readeru EPOCH. Vzorky byly měřeny vždy v jednom opakování. Z rovnice kalibrační křivky byly vypočítány hodnoty koncentrací MCP-1 ve vzorcích.

3.1.8.4 Stanovení hladiny RANTES

Ze zásobního roztoku standardu o koncentraci 2000 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla pomocí ředění dvojkovou řadou vytvořena osmi bodová kalibrační řada v rozsahu 2000–0 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ředění probíhalo vždy v calibrator diluentu (ředění 1:5 v destilované vodě). Zásobní

roztok sloužil jako nejvyšší bod řady, jako nejnižší bod byl použit samotný calibrator diluent. Senzitivita této metody byla stanovena na $6,6 \text{ pg.ml}^{-1}$.

Použité mikrotitrační destičky byly již předem potaženy monoklonální protilátkou specifickou pro RANTES. Do jamek mikrotitrační destičky bylo nejprve pipetováno $100 \mu\text{l}$ assay diluentu pro vyrovnání rozdílů mezi matricemi vzorku a calibrator diluentem použitým pro vytvoření kalibrační křivky. Poté bylo přidáno do příslušných jamek po $100 \mu\text{l}$ standardu nebo vzorku, destička byla zakryta a inkubována 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubace byl obsah jamek odstraněn a jamky byly promyty $400 \mu\text{l}$ promývacího pufu. Promývací krok byl zopakován celkem 3x. Následně bylo přidáno $200 \mu\text{l}$ konjugátu RANTES do každé jamky, destička byla zakryta a inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byl opět obsah jamek odstraněn a jamky byly 3x promyty $400 \mu\text{l}$ promývacího pufu. Dále bylo do jamek přidáno $200 \mu\text{l}$ roztoku substrátu a destička byla inkubována 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubace bylo do jamek přidáno $50 \mu\text{l}$ stop roztoku a byla změřena absorbance vzorků při 450 nm s korekcí při 540 nm pomocí absorbančního (ELISA) readeru EPOCH. Vzorky byly měřeny vždy v jednom opakování. Z rovnice kalibrační křivky byly vypočítány hodnoty koncentrací RANTES ve vzorcích.

3.1.8.5 Stanovení hladiny interleukinu 17

Ze zásobního roztoku standardu o koncentraci $20\,000 \text{ pg.ml}^{-1}$ byla pomocí ředění dvojkovou řadou vytvořena osmi bodová kalibrační řada v rozsahu $2000-0 \text{ pg.ml}^{-1}$. Ředění probíhalo vždy v calibrator diluentu. Zásobní roztok sloužil jako nejvyšší bod řady, jako nejnižší bod byl použit samotný calibrator diluent. Senzitivita této metody byla stanovena na 15 pg.ml^{-1} .

Použité mikrotitrační destičky byly již předem potaženy monoklonální protilátkou specifickou pro IL-17. Do jamek mikrotitrační destičky bylo nejprve pipetováno $100 \mu\text{l}$ assay diluentu pro vyrovnání rozdílů mezi matricemi vzorku a calibrator diluentem použitým pro vytvoření kalibrační křivky. Poté bylo přidáno do příslušných jamek po $100 \mu\text{l}$ standardu nebo vzorku, destička byla zakryta a inkubována 3 hodiny při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubace byl obsah jamek odstraněn a jamky byly promyty $400 \mu\text{l}$ promývacího pufu. Promývací krok byl zopakován celkem 3x. Následně bylo přidáno $200 \mu\text{l}$ konjugátu IL-17 do každé jamky, destička byla zakryta

a inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byl opět obsah jamek odstraněn a jamky byly 3x promyty 400 μ l promývacího pufru. Dále bylo do jamek přidáno 200 μ l roztoku substrátu a destička byla inkubována 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubace bylo do jamek přidáno 50 μ l stop roztoku a byla změřena absorbance vzorků při 450 nm s korekcí při 540 nm pomocí absorbančního (ELISA) readeru EPOCH. Vzorky byly měřeny vždy v jednom opakování. Z rovnice kalibrační křivky byly vypočítány hodnoty koncentrací IL-17 ve vzorcích.

3.1.9 Příprava cytospinů

Z vybraných vzorků kloubních výpotků byly připraveny cytospiny. Cytospiny byly připravovány pouze ze vzorků s dostatečnou buněčností a nejméně 30% zastoupením buněk monocyt/makrofágové linie z hodnoty celkové nativní buněčnosti.

Zbylý objem vzorku po měření na průtokovém cytometru byl před přípravou cytospinů nejprve promyt. Zkumavka se vzorkem byla doplněna do plna roztokem PBS a centrifugována 10 minut při laboratorní teplotě a 800 g. Poté byla tekutina odstraněna a pelet resuspendován přidáním roztoku PBS v množství rovnajícím se objemu původního vzorku. Suspenze vzorku byla pomocí PBS naředěna na vhodnou koncentraci buněk (500–1 000 buněk/ μ l). Aparatura pro přípravu cytospinů skládající se z cytoklipu, mikroskopického sklíčka, filtrační karty a cytotunelu byla sestavena a vložena do cytocentrifugy. Do každého cytotunelu bylo pipetováno 200 μ l připravené buněčné suspenze. Vzorky byly centrifugovány při 72 g po dobu 4 minut. Poté byla sklíčka opatrně vyjmuta z cytoklipů a ponechána schnout přes noc při laboratorní teplotě. Po uschnutí byla sklíčka fixována ponořením do vychlazeného methanolu (4 °C) po dobu 6 minut v digestoři. Sklíčka byla nechána schnout po dobu 10 minut. Následně byla zkontrolována přítomnost buněk pomocí světelného mikroskopu a sklíčka byla uskladněna v mrazicím boxu při -20 °C a ponechána pro následné imunocytochemické barvení.

3.1.10 Imunocytochemické barvení cytospinů

3.1.10.1 Fluorescenční barvení cytospinů

Připravené cytospinové preparáty byly barveny pomocí imunocytochemického fluorescenčního barvení. Barvení probíhalo vždy ve dvou dnech. Pro barvení byly zvoleny následující kombinace primárních a sekundárních protilátek:

- primární polyklonální králičí protilátka proti lidskému znaku CD14 + sekundární polyklonální kozí protilátka proti králičí protilátce IgG H&L (Alexa Fluor ® 488);
- primární monoklonální myší protilátka proti lidskému znaku CD68 + sekundární polyklonální kozí protilátka proti myší protilátce IgG H&L (Cy5 ®).

První den byla cytospinová sklička vyjmuta z mrazicího boxu a přítomnost buněk byla zkontrolována pomocí světelného mikroskopu. Pomocí olejového pera byl naznačen kruh kolem buněk a poté byly aplikovány 2 kapky promývacího roztoku po dobu 5 minut. Poté byl přidán roztok odstraněn odsátím do buničiny. Dále byly přidány 2 kapky permeabilizačního roztoku a cytospiny byly inkubovány po dobu 15 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce. Poté byl přidán roztok odstraněn odsátím do buničiny. Následně byly přidány 2 kapky proteinového blokovacího roztoku bez séra a sklička byla inkubována 25 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce. Poté byl přidán blokovací roztok odstraněn pomocí buničiny. Posléze byly opět přidány 2 kapky permeabilizačního roztoku a sklička byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce. Přidaný roztok byl opět odstraněn odsátím do buničiny. Nakonec bylo přidáno 50 µl roztoku primární polyklonální králičí protilátky proti lidskému znaku CD14 (ředění 1:100 v promývacím roztoku) a 50 µl roztoku primární monoklonální myší protilátky proti lidskému znaku CD68 (ředění 1:100 v promývacím roztoku). Výsledné koncentrace obou primárních protilátek pak byly 1:200. Cytospinová sklička byla inkubována přes noc při 4 °C ve vlhké komůrce.

Následující den byl roztok primárních protilátek ze sklíček odstraněn pomocí buničiny. Sklička byla promyta 2 kapkami promývacího roztoku a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Poté byl přidán roztok odstraněn odsátím do buničiny. Tento postup byl poté ještě 2x zopakován. Následně bylo přidáno 50 µl roztoku sekundární polyklonální kozí protilátky proti králičí protilátce IgG konjugované s fluorochromem Alexa Fluor 488 (ředění 1:500 v promývacím roztoku) a 50 µl roztoku sekundární polyklonální kozí protilátky proti myší protilátce IgG konjugované s fluorochromem Cy5 (ředění 1:1 000 v promývacím roztoku). Výsledné koncentrace sekundárních protilátek na sklíčkách tedy byly 1:1 000 (Alexa Fluor 488) a 1:2 000 (Cy5). Sklička byla inkubována 60 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce. Poté byla sklička promyta 2 kapkami promývacího roztoku a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Poté byl přidán roztok odstraněn do buničiny. Tento postup byl poté ještě jednou zopakován. Dále byla sklička 2x promyta 2 kapkami destilované vody, vysušena

a zkontrolována pod mikroskopem. Posléze bylo přidáno 100 μ l montovacího média Fluoromount G s DAPI, sklíčka byla přikryta krycími sklíčky a ponechána zaschnout. Poté byla cytospinová sklíčka pozorována pomocí multidetekčního readeru Cytation5.

3.1.11 Statistické zpracování dat

Pro statistické zpracování dat byl použit statistický program GraphPad Prism 8.0.1. Normalita dat byla testována pomocí Shapirova-Wilkova testu. V případě, že se jednalo o normální rozdělení dat, byl využit nepárový parametrický t-test. Pokud se jednalo o data bez normálního rozdělení, byl pro analýzu využit nepárový neparametrický test Mann-Whitney. Pro korelační analýzu dat byl využit Spearmanův korelační koeficient. Za signifikantní rozdíl byla považována hodnota $P < 0,05$.

4 VÝSLEDKY

V této diplomové práci bylo zpracováno celkem 120 vzorků kloubních výpotků pacientů s TEP kolena, kyčle a OA kolena. Průměrný objem výpotků pacientů s TEP kolena byl 6,8 ml (rozsah 2,0–22,0 ml), pacientů s TEP kyčle 10,0 ml (rozsah 2,0–23,0 ml) a pacientů s OA kolena 14,8 ml (3,0–57,0 ml). V případě pacientů s TEP kolena byly vzhledy výpotků nejčastěji oranžové až lehce krvavé zakalené s přítomností shluků, u pacientů s TEP kyčle oranžové a zakalené žluté výpotky, a v případě pacientů s OA kolena žluté čiré a zakalené žluté vzorky.

Neparametrickým testem Mann-Whitney byly zaznamenány statisticky významné rozdíly v objemech kloubních výpotků mezi pacienty s TEP kolena a kyčle ($P = 0,025$) a mezi pacienty s TEP kolena a OA kolena ($P < 0,001$).

4.1 Zastoupení hlavních populací imunitních buněk v kloubních výpotcích pacientů s totální endoprotézou

Celkový počet imunitních buněk (leukocytů) v jednotlivých vzorcích kloubních výpotků byl stanoven pozitivitou znaku CD45 pomocí čtrnáctibarevné průtokové cytometrie. Průměrná hodnota činila 14,4 % s konfidenčním intervalem (KI) v rozsahu 7,5–21,3 %. Průměrná koncentrace leukocytů v kloubních výpotcích byla $5,6 \times 10^9$ leukocytů/l s KI v rozsahu $0,4$ – $10,7 \times 10^9$ leukocytů/l. Ostatní buňky, které byly přítomny v kloubních výpotcích, byly buňky neimunitního původu (fibroblasty, epiteliální buňky), buněčné elementy (erytrocyty) a jiné částice (např. otěrové částice).

Hlavní populace imunitních buněk detekované v kloubních výpotcích byly neutrofilů, lymfocytů a buněk monocyt/makrofágové linie. V malém množství zde byly přítomny také žírné buňky, eosinofily a plazmacytoidní dendritické buňky (pDC). Procentuální zastoupení jednotlivých populací, se v rámci souboru získaných vzorků značně lišilo.

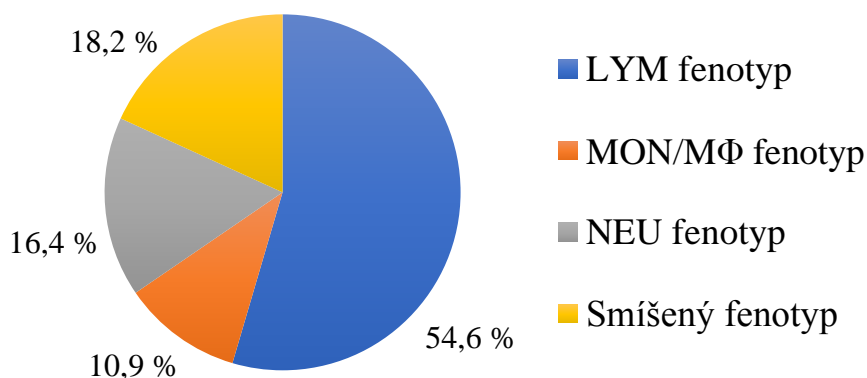
Ve zpracovaném souboru vzorků pacientů s TEP se vyskytovala skupina 14 pacientů s infekcí. U těchto pacientů převažovala populace neutrofilů s průměrným zastoupením 84,7 % (KI v rozsahu 75,5–93,8 %). Průměrná hodnota imunitních buněk činila 42,9 % s konfidenčním intervalem -13,0–98,8 % a průměrná koncentrace leukocytů v těchto vzorcích byla $30,3 \times 10^9$ leukocytů/l s KI $2,6$ – $58,1 \times 10^9$ leukocytů/l. Z důvodu velkého procentuálního zastoupení neutrofilů a vysoké hodnoty CRP ($> 5 \text{ mg.l}^{-1}$) byly tyto vzorky pacientů vyřazeny z následné analýzy buněčných populací.

4.2 Zastoupení pacientů s totální endoprotézou v rámci imunitních fenotypů

Skupina celkem 55 pacientů s TEP byla rozdělena do imunitních fenotypů na základě převažující (> 50 %) populace imunitních buněk v kloubních výpotcích. Jednalo se o lymfocytární, monocyt/makrofágový, neutrofilový a smíšený fenotyp. V případě smíšeného fenotypu nebylo možno určit převažující populaci imunitních buněk. Nacházely se zde 2 typy vzorků:

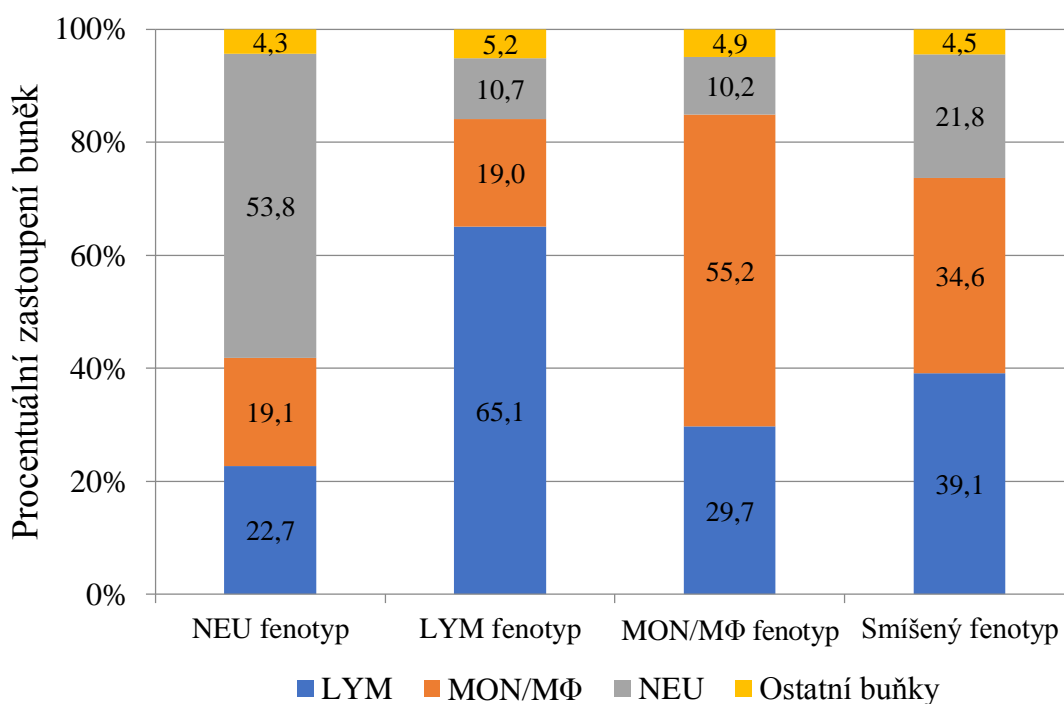
- s rovnoměrným procentuálním zastoupením všech hlavních populací imunitních buněk;
- s převahou buněk lymfocytů a monocyt/makrofágové linie, které se zde vyskytovaly se srovnatelným procentuálním zastoupením; buňky neutrofilů se zde nacházely v minoritním zastoupení.

Lymfocytární fenotyp se u pacientů s TEP nacházel nejvíce, a to z 54,6 %. Druhým nejvíce zastoupeným fenotypem byl smíšený fenotyp, a to z 18,2 %. Neutrofilový fenotyp se zde vyskytoval u 16,4 % pacientů, monocyt/makrofágový pak u 10,9 % (Obr. 12).



Obr. 12 Procentuální zastoupení pacientů s TEP v rámci jednotlivých imunitních fenotypů. LYM fenotyp – lymfocytární fenotyp, MON/MΦ fenotyp – monocyt/makrofágový fenotyp, NEU fenotyp – neutrofilový fenotyp.

Dále jsme se zaměřili na zastoupení hlavních populací imunitních buněk v rámci jednotlivých imunitních fenotypů. V případě lymfocytárního fenotypu (n = 30) byla nejvíce zastoupena populace lymfocytů (65,1 %), následovaly buňky monocyt/makrofágové linie a populace neutrofilů. Monocyt/makrofágový fenotyp (n = 6) byl charakteristický převažujícím zastoupením populace buněk monocyt/makrofágové linie (55,2 %). Druhou nejvíce zastoupenou populací byla populace lymfocytů následovaná populací neutrofilů. U neutrofilového fenotypu (n = 9) převažovala populace neutrofilů (53,8 %), následovaná populací lymfocytů a buněk monocyt/makrofágové linie. V případě smíšeného fenotypu (n = 10) nebylo možno určit převažující populaci imunitních buněk, proto byly do grafu spojeny oba typy vzorků. Tento fenotyp vykazoval podobné zastoupení populace lymfocytů a buněk monocyt/makrofágové linie, následované populací neutrofilů. Ostatní buňky byly u všech imunitních fenotypů přítomny v minoritním zastoupení (Obr. 13).



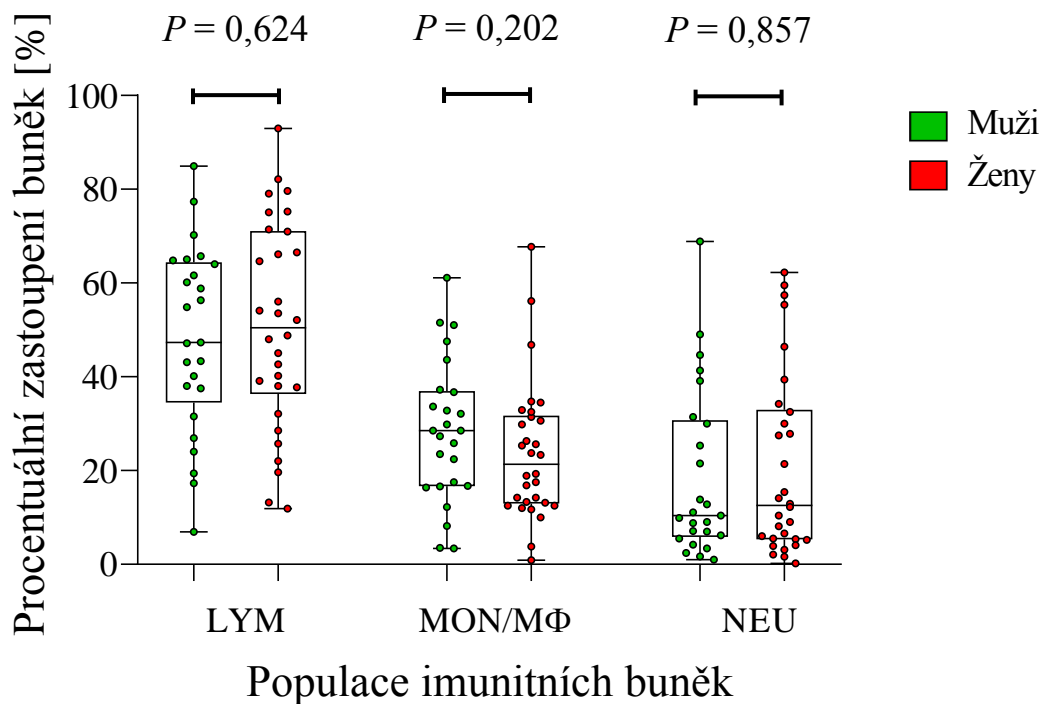
Obr. 13 Procentuální zastoupení hlavních populací imunitních buněk v jednotlivých imunitních fenotypech ve vzorcích kloubních výpotků pacientů s TEP. LYM – lymfocyty, MON/MΦ – monocyt/makrofágová linie, NEU – neutrofilů.

4.3 Rozdíly v zastoupení hlavních populací imunitních buněk mezi muži a ženami

Dále jsme se zaměřili na porovnání hlavních populací imunitních buněk mezi muži a ženami. Z vybraného souboru vzorků se jednalo o 25 mužů a 30 žen.

U obou pohlaví byla nejvíce zastoupena populace lymfocytů. U mužů bylo průměrné zastoupení 48,2 % (KI 40,0–56,4 %), u žen pak 51,1 % (KI 42,8–59,3 %). Populace buněk monocyt/makrofágové linie byla u mužů zastoupena v průměru z 28,3 % (KI 22,1–34,5 %). U žen se tato populace vyskytovala v průměru z 23,7 % (KI 18,3–29,2 %). Nejméně zastoupenou populací byla u obou pohlaví populace neutrofilů. U mužů se vyskytovala v průměru z 18,6 % (KI 11,2–26,0 %), u žen pak z 20,7 % (KI 13,4–27,9 %).

Pomocí parametrického t-testu nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi populacemi lymfocytů ($P = 0,624$) mezi muži a ženami. Neparametrickým testem Mann-Whitney nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi populacemi neutrofilů ($P = 0,857$) a buněk monocyt/makrofágové linie ($P = 0,202$) mezi muži a ženami (Obr. 14). Z tohoto důvodu jsme se v následné analýze zaměřili pouze na rozdíly v populacích imunitních buněk mezi klouby bez ohledu na pohlaví pacientů.

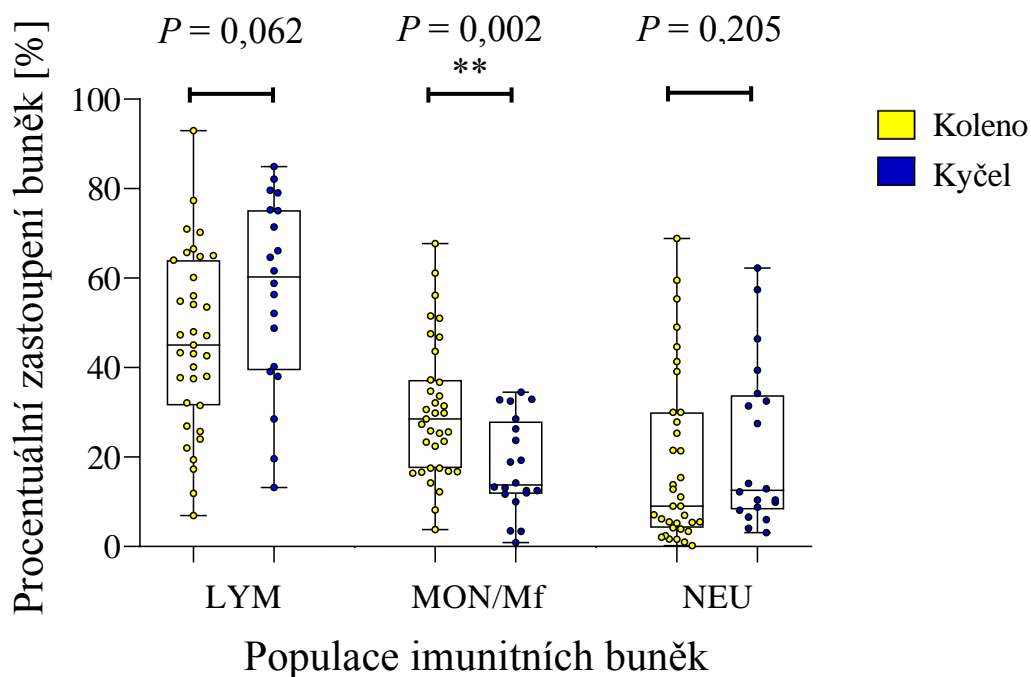


Obr. 14 Srovnání procentuálního zastoupení buněk lymfocytů, monocyt/makrofágové linie a neutrofilů v kloubních výpotcích mezi muži a ženami. Středová čára grafu představuje medián, krabicová část grafu 1. a 3. kvartil, vousy pak minimum a maximum všech dat. LYM – lymfocyty, MON/MΦ – monocyt/makrofágová linie, NEU – neutrofilů.

4.4 Rozdíly v zastoupení hlavních populací imunitních buněk mezi pacienty s totální endoprotézou kolena a kyčle

Z celkového souboru zpracovaných kloubních výpotků bylo 35 vzorků od pacientů s TEP kolena a 20 vzorků od pacientů s TEP kyčle. U obou kloubů byla nejvíce zastoupenou populací imunitních buněk populace lymfocytů s průměrným zastoupením 45,8 % (KI 39,0–52,6 %) v případě kolena, a 56,7 % (KI 46,7–66,7 %) v případě kyčle. Druhou nejvíce zastoupenou populací imunitních buněk u pacientů s TEP kolena byla populace buněk monocyt/makrofágové linie, a to v průměru z 30,4 % (KI 25,2–35,6 %). U pacientů s TEP kyčle byla tato populace zastoupena pouze z 17,8 % (KI 12,9–22,8). Populace buněk neutrofilů pak byla u pacientů s TEP kolena zastoupena nejméně, a to z 18,5 % (KI 12,0–25,0 %). U pacientů s TEP kyčle se jednalo o druhou nejvíce zastoupenou populací imunitních buněk, v průměru se zde tyto buňky nacházely z 21,9 % (KI 13,3–30,4 %).

Parametrickým t-testem byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi populací buněk monocyt/makrofágové linie ($P = 0,002$) a statisticky nevýznamné rozdíly mezi populací lymfocytů ($P = 0,062$) u pacientů s TEP kolena a kyčle. Pomocí neparametrického testu Mann-Whitney byly zaznamenány statisticky nevýznamné rozdíly mezi populacemi neutrofilů ($P = 0,205$) u pacientů s TEP kolena a kyčle (Obr. 15).



Obr. 15 Srovnání procentuálního zastoupení buněk lymfocytů, monocyt/makrofágové linie a neutrofilů v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena a kyčle. Středová čára grafu představuje medián, krabicová část grafu 1. a 3. kvartil, vousy pak minimum a maximum všech dat. LYM – lymfocyty, MON/MΦ – monocyt/makrofágová linie, NEU – neutrofilily.

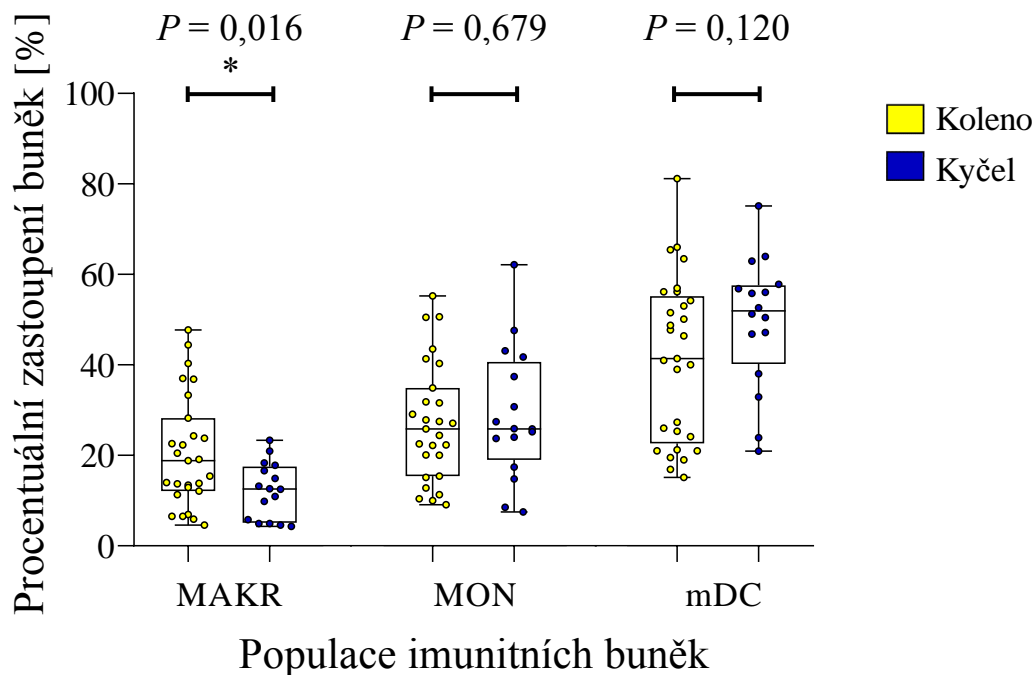
V rámci porovnání kloubů jsme se zaměřili také na dobu, která uplynula mezi operací náhrady kloubu a tvorbou výpotku, jako na parametr, který by mohl ovlivnit imunofenotypové složení výpotku. Informace o datu operace jsme získali celkem u 40 pacientů, 11 z nich jsme však museli ze souboru vyřadit, protože důvodem tvorby výpotku byla probíhající infekce. Celkem jsme tedy srovnávali 19 pacientů s TEP kolena a 10 s TEP kyčle. Průměrná doba vzniku výpotku byla 86,0 měsíců (KI 44,1–127,9 měsíců) u pacientů s TEP kolena. U pacientů s TEP kyčle byla průměrná doba 103,9 měsíců (KI 43,1–164,7). Neparametrickým testem Mann-Whitney nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ($P = 0,761$) v době vzniku výpotku mezi kolenním a kyčelním kloubem.

4.5 Zastoupení subpopulací buněk monocyt/makrofágové linie u pacientů s totální endoprotézou kolena a kyčle

V rámci buněk monocyt/makrofágové linie jsme se zaměřili především na analýzu subpopulací buněk monocytů, makrofágů a myeloidních dendritických buněk (mDC) v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena nebo kyčle.

V případě obou kloubů byla nejvíce zastoupena subpopulace mDC. U kolena se jednalo o průměrné zastoupení 41,2 % (KI 34,4–48,0 %), u kyčle 49,5 % (KI 41,8–57,2 %). Subpopulace monocytů byla u obou kloubů druhou nejpočetnější skupinou. V případě kolenního kloubu byla ve vzorcích zastoupena v průměru z 27,1 % (KI 22,0–32,3 %), v případě kyčle pak z 28,9 % (KI 21,2–36,7 %). Nejméně zastoupená byla ve vzorcích subpopulace makrofágů. U vzorků kloubních výpotků z kolenních kloubů se jednalo v průměru o 20,6 % (KI 15,7–25,5 %), u vzorků z kyčelních kloubů pak o 12,2 % (KI 8,9–15,5 %).

Neparametrickým testem Mann-Whitney byly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi subpopulacemi makrofágů v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena a kyčle ($P = 0,016$). Pomocí parametrického t-testu nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi populacemi monocytů ($P = 0,679$) a mDC ($P = 0,120$) v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena a kyčle (Obr. 16).



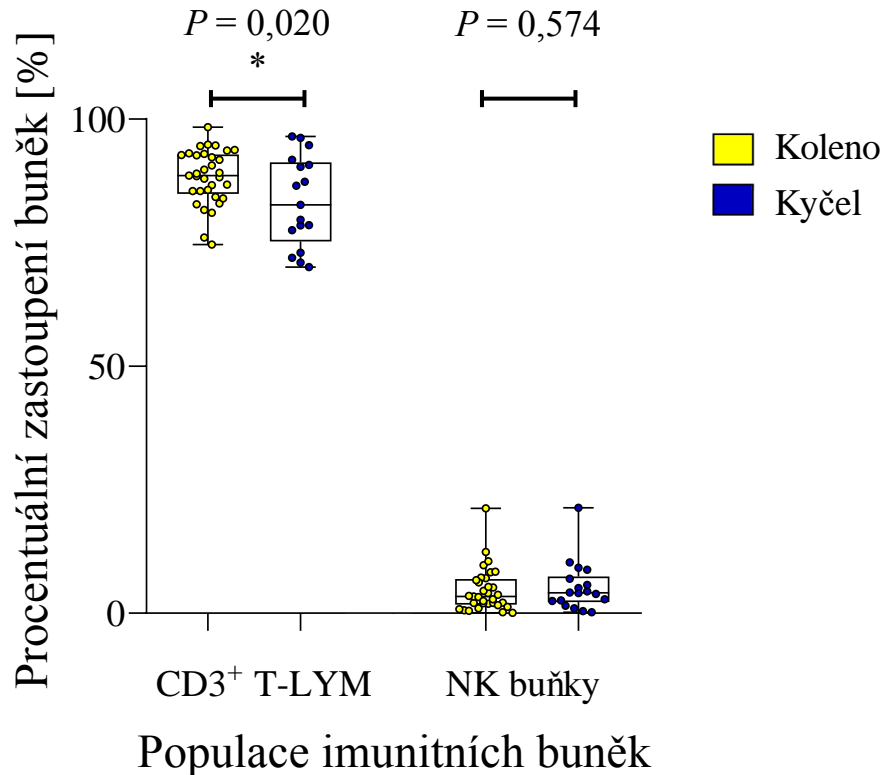
Obr. 16 Srovnání procentuálního zastoupení subpopulací buněk makrofágů, monocytů a myeloidních dendritických buněk v rámci populace buněk monocyt/makrofágové linie v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena a kyčle. Středová čára grafu představuje medián, krabicová část grafu 1. a 3. kvartil, vousy pak minimum a maximum všech dat. MAKR – makrofágy, MON – monocyty, mDC – myeloidní dendritické buňky.

4.6 Zastoupení subpopulací buněk lymfocytární linie u pacientů s totální endoprotézou kolena a kyčle

V případě lymfocytární linie imunitních buněk jsme se zaměřili na populace buněk T-lymfocytů a NK buněk, a v rámci populace T-lymfocytů také na subpopulace $CD4^+$ T-lymfocytů, $CD8^+$ T-lymfocytů a $CD4^+$ regulačních T-lymfocytů.

Převažující populací v rámci srovnání lymfocytární linie byla populace T-lymfocytů s průměrným zastoupením 88,3 % (KI 86,3–90,2 %) v případě kolena, a s 83,3 % průměrným zastoupením (KI 78,6–88,0 %) v případě kyčle. Populace NK buněk se u kolen vyskytovala v průměru ze 4,6 % (KI 3,1–6,2 %). U kyčlí se jednalo o průměrnou hodnotu 5,3 % (KI 2,8–7,8 %).

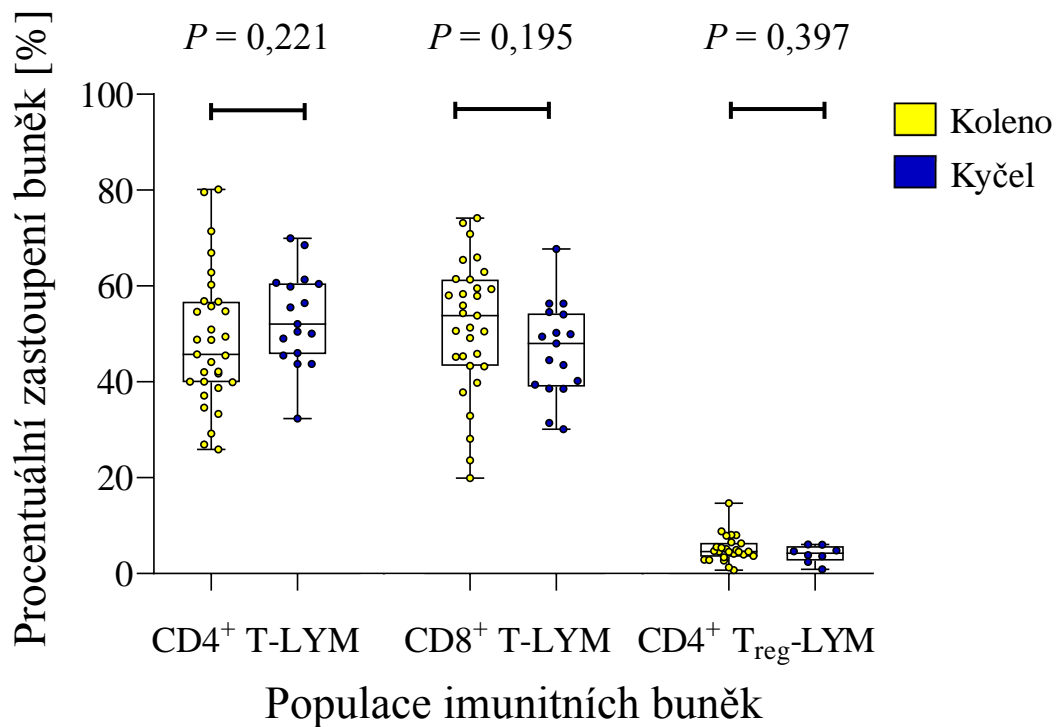
Pomocí parametrického t-testu byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi populacemi T-lymfocytů ($P = 0,020$). Neparametrickým testem Mann-Whitney byly zaznamenány statisticky nevýznamné rozdíly mezi populacemi NK buněk ($P = 0,574$) v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena a kyčle (Obr. 17).



Obr. 17 Srovnání procentuálního zastoupení populací T-lymfocytů a NK buněk v rámci buněk lymfocytární linie v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena a kyčle. Středová čára grafu představuje medián, krabicová část grafu 1. a 3. kvartil, vousy pak minimum a maximum všech dat. T-LYM – T-lymfocyty.

Subpopulace CD4⁺ T-lymfocytů se ve vzorcích pacientů s TEP kolena vyskytovala v průměru ze 48,5 % (KI 43,4–53,6 %), u pacientů s TEP kyčle byl zaznamenán výskyt v 53,2 % (KI 48,2–58,2 %). Subpopulace CD8⁺ T-lymfocytů se vyskytovala v průměru z 51,6 % (KI 46,5–56,6 %) v případě vzorků kolena, a ze 46,6 % (KI 41,6–51,6 %) v případě vzorků kyčlí. Parametrickým t-testem nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi subpopulacemi CD4⁺ T-lymfocytů ($P = 0,221$) a CD8⁺ T-lymfocytů ($P = 0,195$) v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena a kyčle (Obr. 18).

V rámci subpopulace CD4⁺ T-lymfocytů byla zkoumána populace CD4⁺ regulačních T-lymfocytů. Ty se ve vzorcích pacientů s TEP kolena vyskytovaly v průměru z 5,2 % (KI 4,0–6,4 %). Ve vzorcích pacientů s TEP kyčle bylo průměrné zastoupení těchto buněk 4,0 % (KI 2,6–5,5 %). Neparametrickým testem Mann-Whitney nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi subpopulacemi CD4⁺ regulačních T-lymfocytů ($P = 0,397$) v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena a kyčle (Obr. 18).



Obr. 18 Srovnání procentuálního zastoupení subpopulací CD4⁺, CD8⁺ T-lymfocytů a CD4⁺ regulačních T-lymfocytů v rámci populace buněk T-lymfocytů v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena a kyčle. Středová čára grafu představuje medián, krabicová část grafu 1. a 3. kvartil, vousy pak minimum a maximum všech dat. T-LYM – T-lymfocyty, T_{reg}-LYM – regulační T-lymfocyty.

4.7 Zastoupení pacientů s osteoartrózou kolena v rámci imunitních fenotypů

Z celkového souboru zpracovaných kloubních výpotků bylo 51 vzorků od pacientů s OA kolena. Průměrná hodnota imunitních buněk v kloubních výpotcích pacientů s OA činila 40,1 % (KI 30,8–49,5 %). Průměrná koncentrace leukocytů v kloubních výpotcích byla $3,7 \times 10^9$ leukocytů/l s KI v rozsahu $0,9$ – $6,5 \times 10^9$ leukocytů/l.

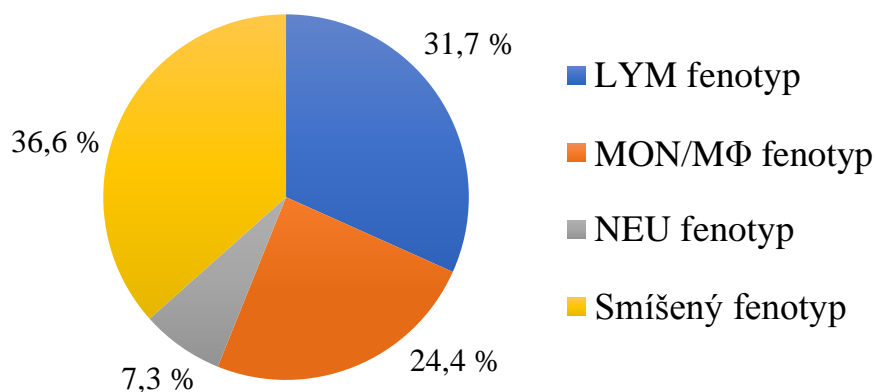
Také v tomto zpracovaném souboru vzorků se vyskytovala skupina pacientů s infekcí (n = 10). U těchto pacientů převažovala populace neutrofilů s průměrným zastoupením 78,9 % (KI 67,8–89,9 %). Průměrná hodnota imunitních buněk činila 70,2 % s konfidenčním intervalem 54,6–85,8 % a průměrná koncentrace leukocytů v těchto vzorcích byla $14,7 \times 10^9$ leukocytů/l s KI $3,3$ – $26,1 \times 10^9$ leukocytů/l. Tento soubor pacientů byl tedy z následné analýzy buněčných populací vyloučen.

Skupina 41 pacientů s OA kolena byla rozdělena do imunitních fenotypů na základě převažující populace imunitních buněk v kloubních výpotcích. I v tomto případě

se jednalo o lymfocytární, monocyt/makrofágový, neutrofilový a smíšený fenotyp. Ve smíšeném fenotypu se nacházely 4 typy vzorků:

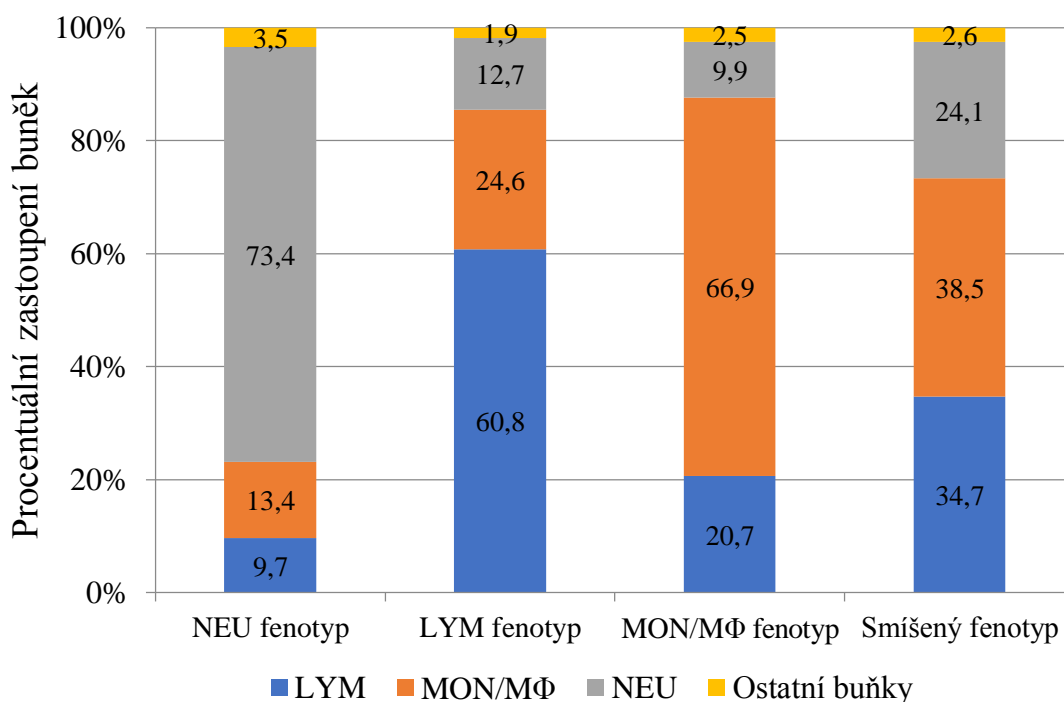
- s rovnoměrným procentuálním zastoupením všech hlavních populací imunitních buněk;
- s převahou buněk lymfocytů a monocyt/makrofágové linie, které se zde vyskytovaly se srovnatelným procentuálním zastoupením; buňky neutrofilů se zde nacházely v minoritním zastoupení;
- s převahou buněk neutrofilů a monocyt/makrofágové linie, které se zde vyskytovaly se srovnatelným procentuálním zastoupením; buňky lymfocytů se zde nacházely v minoritním zastoupení;
- s převahou buněk lymfocytů a neutrofilů, které se zde vyskytovaly se srovnatelným procentuálním zastoupením; buňky monocyt/makrofágové linie se zde nacházely v minoritním zastoupení.

U pacientů s OA kolena byl nejvíce zastoupen smíšený fenotyp, a to z 36,6 %. Druhým nejvíce zastoupeným byl lymfocytární fenotyp, z 31,7 %. Monocyt/makrofágový fenotyp se zde nacházel z 24,4 %, neutrofilový fenotyp pak ze 7,3 % (Obr. 19).



Obr. 19 Procentuální zastoupení pacientů s OA kolena v rámci jednotlivých imunitních fenotypů. LYM fenotyp – lymfocytární fenotyp, MON/MΦ fenotyp – monocyt/makrofágový fenotyp, NEU fenotyp – neutrofilový fenotyp.

Dále jsme se zaměřili na zastoupení hlavních populací imunitních buněk v rámci jednotlivých imunitních fenotypů. V případě lymfocytárního fenotypu (n = 13) byla nejvíce zastoupena populace lymfocytů (60,8 %), následovaly buňky monocyt/makrofágové linie a populace neutrofilů. Monocyt/makrofágový fenotyp (n = 10) byl charakteristický převažujícím zastoupením populace buněk monocyt/makrofágové linie (66,9 %) následované populací lymfocytů a nízkým zastoupením populace neutrofilů. U neutrofilového fenotypu (n = 3) převažovala populace neutrofilů (73,4 %) následovaná populací lymfocytů, buňky monocyt/makrofágové linie byly zastoupeny v nízkém procentu. V případě smíšeného fenotypu (n = 15) nebylo možno určit převažující populaci imunitních buněk, proto byly do grafu spojeny všechny typy vzorků. Tento fenotyp vykazoval podobné zastoupení populace lymfocytů a buněk monocyt/makrofágové linie, následované populací neutrofilů. Ostatní buňky byly u všech imunitních fenotypů přítomny v minoritním zastoupení (Obr. 20).

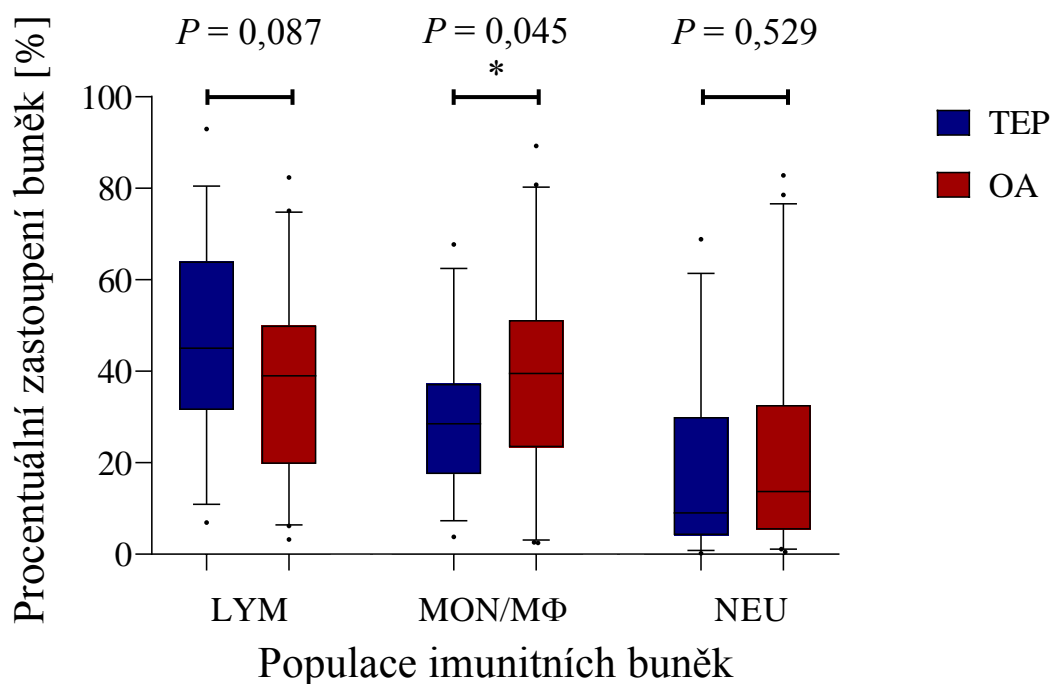


Obr. 20 Procentuální zastoupení hlavních populací imunitních buněk v jednotlivých imunitních fenotypech ve vzorcích kloubních výpotků pacientů s OA kolena. LYM – lymfocyty, MON/MΦ – monocyt/makrofágová linie, NEU – neutrofilů.

4.8 Rozdíly v zastoupení hlavních populací imunitních buněk mezi pacienty s totální endoprotézou kolena a osteoartrózou kolena

Po vyloučení všech pacientů s infekcí jsme tedy srovnávali 35 pacientů s TEP kolena a 41 pacientů s OA kolena. U obou skupin byla nejvíce zastoupenou populací populace lymfocytů, a to ze 45,8 % (KI 39,0–52,6 %) u pacientů s TEP kolena a z 37,7 % (KI 31,2–44,2 %) u pacientů s OA kolena. Druhou nejpočetnější populací byla populace buněk monocyt/makrofágové linie. V případě pacientů s TEP kolena se vyskytovala v průměru z 30,4 % (KI 25,2–35,6 %), u pacientů s OA kolena z 39,2 % (KI 32,5–45,9 %). Nejméně byla zastoupena populace neutrofilů, a to s průměrným zastoupením 18,5 % (KI 12,0–25,0 %) u pacientů s TEP kolena a 20,7 % (KI 14,3–27,0 %) u pacientů s OA kolena.

Pomocí parametrického t-testu byly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi populacemi buněk monocyt/makrofágové linie ($P = 0,045$) a statisticky nevýznamné rozdíly mezi populacemi lymfocytů ($P = 0,087$) u pacientů s TEP kolena a OA kolena. Neparametrickým testem Mann-Whitney nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly u populací neutrofilů ($P = 0,529$) pacientů s TEP kolena a OA kolena (Obr. 21).



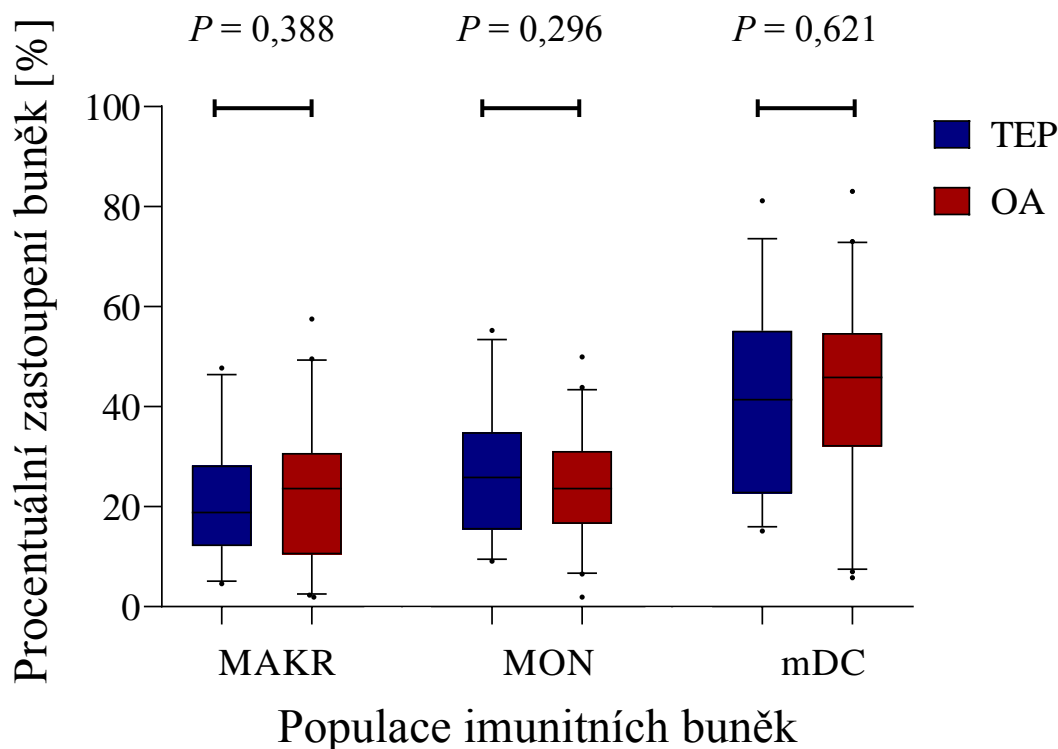
Obr. 21 Srovnání procentuálního zastoupení buněk lymfocytů, monocyt/makrofágové linie a neutrofilů v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena a OA kolena. Středová čára grafu představuje medián, krabicová část grafu 1. a 3. kvartil, vousy vymezují hodnoty 5. a 95. percentilu, odlehlé body jsou vyjádřeny jako jednotlivé body. LYM – lymfocyty, MON/MΦ – monocyt/makrofágová linie, NEU – neutrofilů.

4.9 Zastoupení subpopulací buněk monocyt/makrofágové linie u pacientů s totální endoprotézou kolena a osteoartrózou kolena

V případě tohoto srovnání jsme se opět zaměřili především na subpopulace buněk monocytů, makrofágů a mDC v kloubních výpotcích pacientů s TEP nebo OA kolena.

U obou skupin pacientů byla nejvíce zastoupena subpopulace mDC. U pacientů s TEP kolena v průměru ze 41,2 % (KI 34,4–48,0 %), u pacientů s OA kolena pak ze 43,4 % (KI 37,7–49,1 %). Populace monocytů se v kloubních výpotcích vyskytovala s průměrným zastoupením 27,1 % (KI 22,0–32,3 %) u pacientů s TEP kolena a 24,2 % (KI 20,9–27,4 %) u pacientů s OA kolena. V průměru nejméně zastoupenou populací byla populace makrofágů, a to z 20,6 % (KI 15,7–25,5 %) u pacientů s TEP kolena a z 22,9 % (KI 18,6–27,2 %) u pacientů s OA kolena.

Parametrickým t-testem nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi populacemi monocytů ($P = 0,296$) a mDC ($P = 0,621$) u pacientů s TEP kolena a OA kolena. Pomocí neparametrického testu Mann-Whitney nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ani mezi populacemi makrofágů ($P = 0,388$) u pacientů s TEP kolena a OA kolena (Obr. 22).

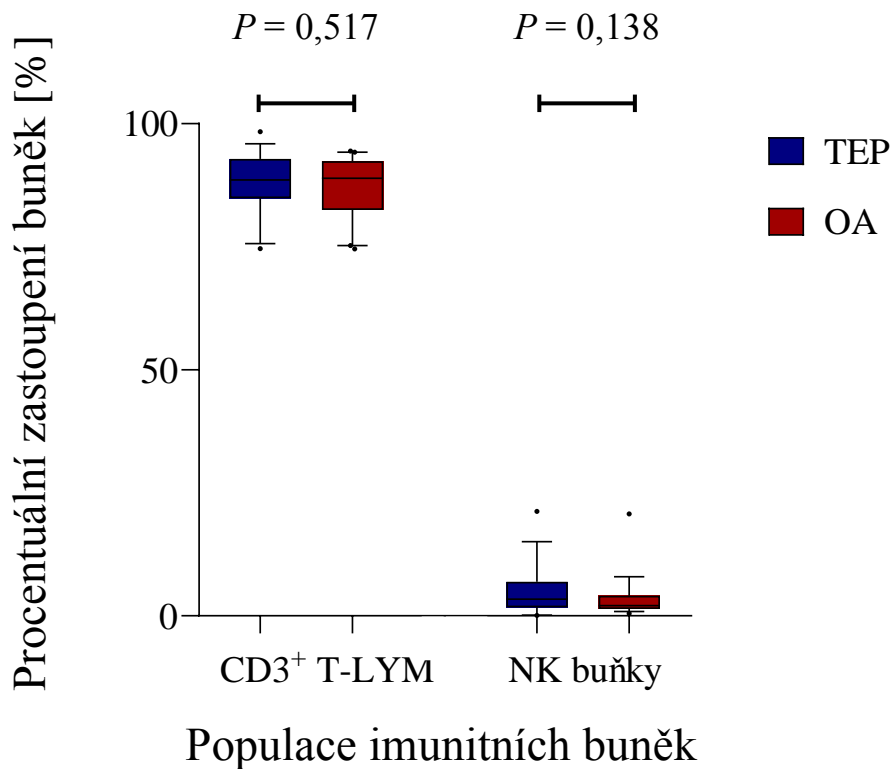


Obr. 22 Srovnání procentuálního zastoupení subpopulací buněk makrofágů, monocytů a myeloidních dendritických buněk v rámci populace buněk monocyt/makrofágové linie v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena a OA kolena. Středová čára grafu představuje medián, krabicová část grafu 1. a 3. kvartil, vousy vymezují hodnoty 5. a 95. percentilu, odlehlé body jsou vyjádřeny jako jednotlivé body. MAKR – makrofágy, MON – monocyty, mDC – myeloidní dendritické buňky.

4.10 Zastoupení subpopulací buněk lymfocytární linie u pacientů s totální endoprotézou kolena a osteoartrózou kolena

V rámci srovnávaných subpopulací buněk lymfocytární linie byla převažující populací populace T-lymfocytů, a to s průměrným zastoupením 88,3 % (KI 86,3–90,2 %) u pacientů s TEP kolena a 87,1 % (KI 85,2–89,0 %) u pacientů s OA kolena. Populace NK buněk byla přítomna ze 4,6 % (KI 3,1–6,2 %) ve vzorcích pacientů s TEP kolena a z 3,3 % (KI 2,1–4,4 %) u pacientů s OA kolena.

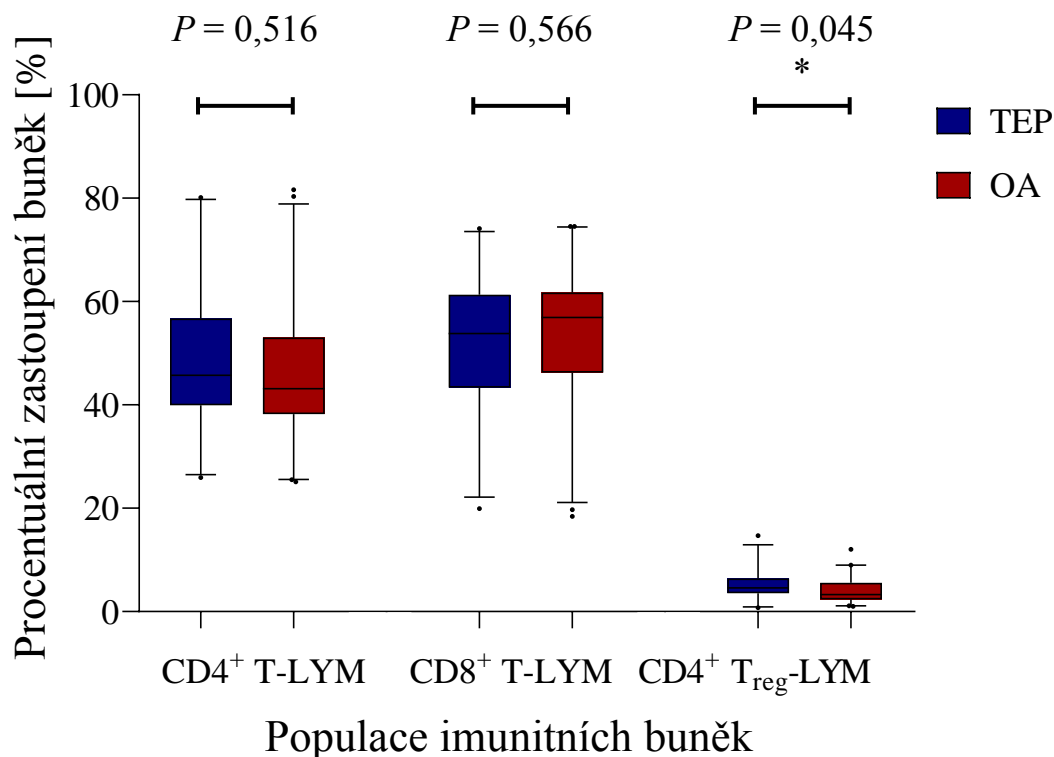
Neparametrickým testem Mann-Whitney nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly u populací T-lymfocytů ($P = 0,517$) a NK buněk ($P = 0,138$) mezi pacienty s TEP a OA kolena (Obr. 23).



Obr. 23 Srovnání procentuálního zastoupení populací T-lymfocytů a NK buněk v rámci buněk lymfocytární linie v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena a OA kolena. Středová čára grafu představuje medián, krabicová část grafu 1. a 3. kvartil, vousy vymezují hodnoty 5. a 95. percentilu, odlehlé body jsou vyjádřeny jako jednotlivé body. T-LYM – T-lymfocyty.

Subpopulace CD4⁺ T-lymfocytů byla ve vzorcích pacientů s TEP kolena zastoupena v průměru ze 48,5 % (KI 43,4–53,6 %), u pacientů s OA kolena pak ze 46,4 % (KI 42,3–50,6 %). Subpopulace CD8⁺ T-lymfocytů měla průměrné zastoupení 51,6 % (KI 46,5–56,6 %) u pacientů s TEP kolena a 53,4 % (KI 49,3–57,5 %) u pacientů s OA kolena. Pomocí parametrického t-testu nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly v populacích CD4⁺ T-lymfocytů ($P = 0,516$) a CD8⁺ T-lymfocytů ($P = 0,566$) mezi pacienty s TEP kolena a OA kolena (Obr. 24).

V rámci subpopulace CD4⁺ T-lymfocytů jsme porovnávali také populace CD4⁺ regulačních T-lymfocytů. Tato populace se vyskytovala v průměru z 5,2 % (KI 4,0–6,4 %) ve vzorcích pacientů s TEP kolena a ze 4,1 % (KI 3,3–4,9 %) u pacientů s OA kolena. Neparametrickým testem Mann-Whitney byly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi populacemi CD4⁺ regulačních T-lymfocytů ($P = 0,045$) mezi pacienty s TEP a OA kolena (Obr. 24).



Obr. 24 Srovnání procentuálního zastoupení subpopulací CD4⁺, CD8⁺ T-lymfocytů a CD4⁺ regulačních T-lymfocytů v rámci populace buněk T-lymfocytů v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena a OA kolena. Středová čára grafu představuje medián, krabicová část grafu 1. a 3. kvartil, vousy vymezují hodnoty 5. a 95. percentilu, odlehle body jsou vyjádřeny jako jednotlivé body. T-LYM – T-lymfocyty, T_{reg}-LYM – regulační T-lymfocyty.

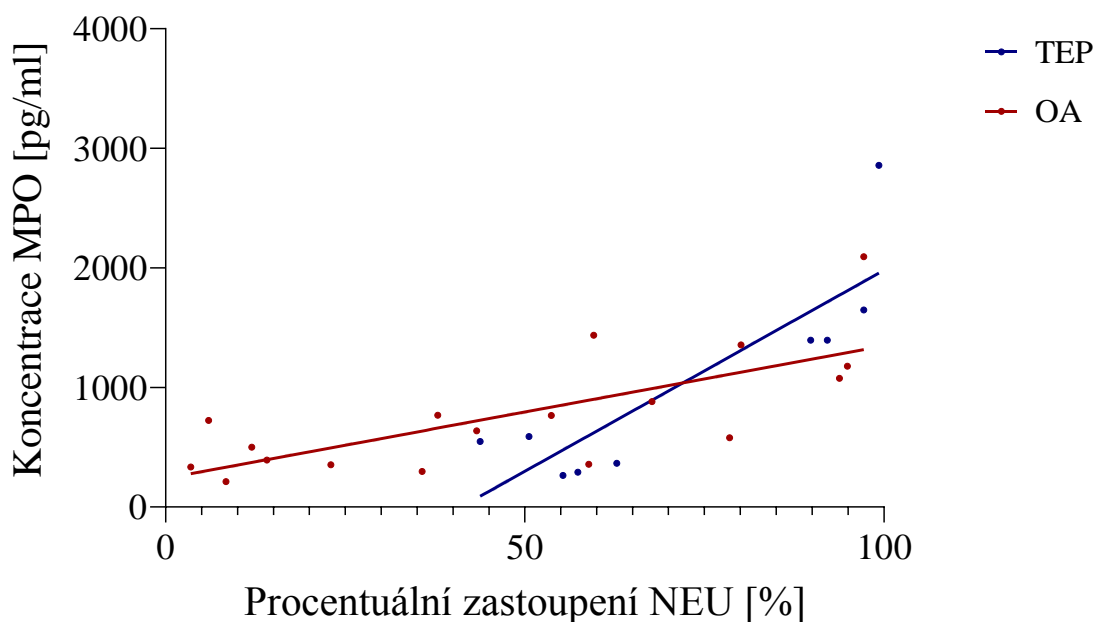
4.11 ELISA

V této diplomové práci jsme se u několika vybraných pacientů zaměřili na stanovení hladiny MMP-9, MPO, MCP-1, RANTES a IL-17 pomocí sendvičové ELISA metody. Pro stanovení MMP-9 a MPO bylo použito celkem 9 vzorků supernatantů kloubních výpotků od pacientů s TEP kolena a 18 vzorků od pacientů s OA kolena. Jednalo se převážně o vzorky s vysokým procentuálním zastoupením neutrofilů z důvodu probíhající infekce, ale nacházely se zde také vzorky bez infekce. Pro stanovení MCP-1, RANTES a IL-17 pak bylo použito 8 vzorků od pacientů s TEP kolena a 18 vzorků od pacientů s OA kolena. Jednalo se o vzorky bez infekce.

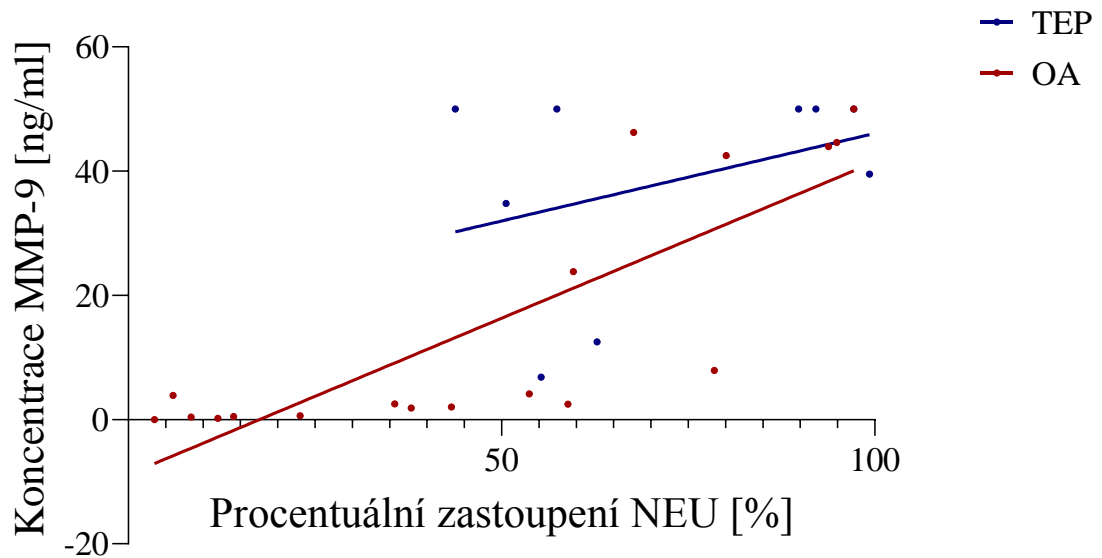
U vybraného souboru vzorků pacientů s TEP kolena a OA kolena pro analýzu hladiny MPO a MMP-9 jsme zaznamenali rozdílné procentuální zastoupení buněk neutrofilů. U pacientů s TEP kolena byla průměrná hodnota populace neutrofilů 72,0 % (KI 55,0–89,1 %), u pacientů s OA kolena 48,2 % (KI 32,1–64,4 %). MPO a MMP-9 jsou markery neutrofilové aktivace, z tohoto důvodu jsme se zaměřili na korelační analýzu procentuálního zastoupením neutrofilů a hladin MPO a MMP-9 ve vzorcích.

Se zvyšujícím se procentem neutrofilů ve vzorcích docházelo k nárůstu hladiny zkoumaného analytu.

Pomocí Spearmanova korelačního koeficientu byla zaznamenána korelace mezi procentem neutrofilů a hladinou MPO ve vzorcích pacientů s TEP kolena ($r = 0,745$; $P = 0,026$) i pacientů s OA kolena ($r = 0,759$; $P < 0,001$) (Obr. 25). Zároveň byla zaznamenána korelace mezi procentem neutrofilů a hladinou MMP-9 ve vzorcích pacientů s OA kolena ($r = 0,880$; $P < 0,001$) (Obr. 26). Korelace mezi procentem neutrofilů a hladinou MMP-9 ve vzorcích pacientů s TEP kolena zaznamenaná nebyla ($r = 0,219$; $P = 0,569$).



Obr. 25 Korelační analýza a rovnice lineární regrese procentuálního zastoupení neutrofilů a koncentrace MPO v supernatantech kloubních výpotků pacientů s TEP kolena a OA kolena měřené pomocí sendvičové ELISA metody. MPO – myeloperoxidasa, NEU – neutrofilů.



Obr. 26 Korelační analýza a rovnice lineární regrese procentuálního zastoupení neutrofilů a koncentrace MMP-9 v supernatantech kloubních výpotků pacientů s TEP kolena a OA kolena měřené pomocí sendvičové ELISA metody. MMP-9 – matrix metalopeptidasa-9, NEU – neutrofilů.

V případě analytů MCP-1, RANTES a IL-17 jsme se již zaměřili na porovnání hladin mezi pacienty s TEP kolena a OA kolena. Průměrná hodnota hladiny MCP-1 u vzorků pacientů s TEP kolena byla $496,4 \text{ pg.ml}^{-1}$ (KI $302,9\text{--}689,8 \text{ pg.ml}^{-1}$), u pacientů s OA kolena pak $194,3 \text{ pg.ml}^{-1}$ (KI $141,1\text{--}247,5 \text{ pg.ml}^{-1}$). V případě RANTES byla u pacientů s TEP kolena zaznamenána průměrná hodnota jejich hladiny $109,0 \text{ pg.ml}^{-1}$ (KI $-10,4\text{--}228,4 \text{ pg.ml}^{-1}$). U pacientů s OA kolena byla zjištěna průměrná hodnota $41,4 \text{ pg.ml}^{-1}$ (KI $31,2\text{--}51,6 \text{ pg.ml}^{-1}$). Průměrná hodnota hladiny IL-17 ve vzorcích pacientů s TEP kolena byla stanovena na $0,5 \text{ pg.ml}^{-1}$ (KI $-0,6\text{--}1,6 \text{ pg.ml}^{-1}$), ve vzorcích pacientů s OA kolena pak na $16,0 \text{ pg.ml}^{-1}$ (KI $8,2\text{--}23,8 \text{ pg.ml}^{-1}$).

Neparametrickým testem Mann-Whitney byly zaznamenány statisticky významné rozdíly v hladinách MCP-1 ($P < 0,001$), RANTES ($P = 0,012$) a IL-17 ($P = 0,002$) mezi pacienty s TEP kolena a OA kolena (Tab. 5).

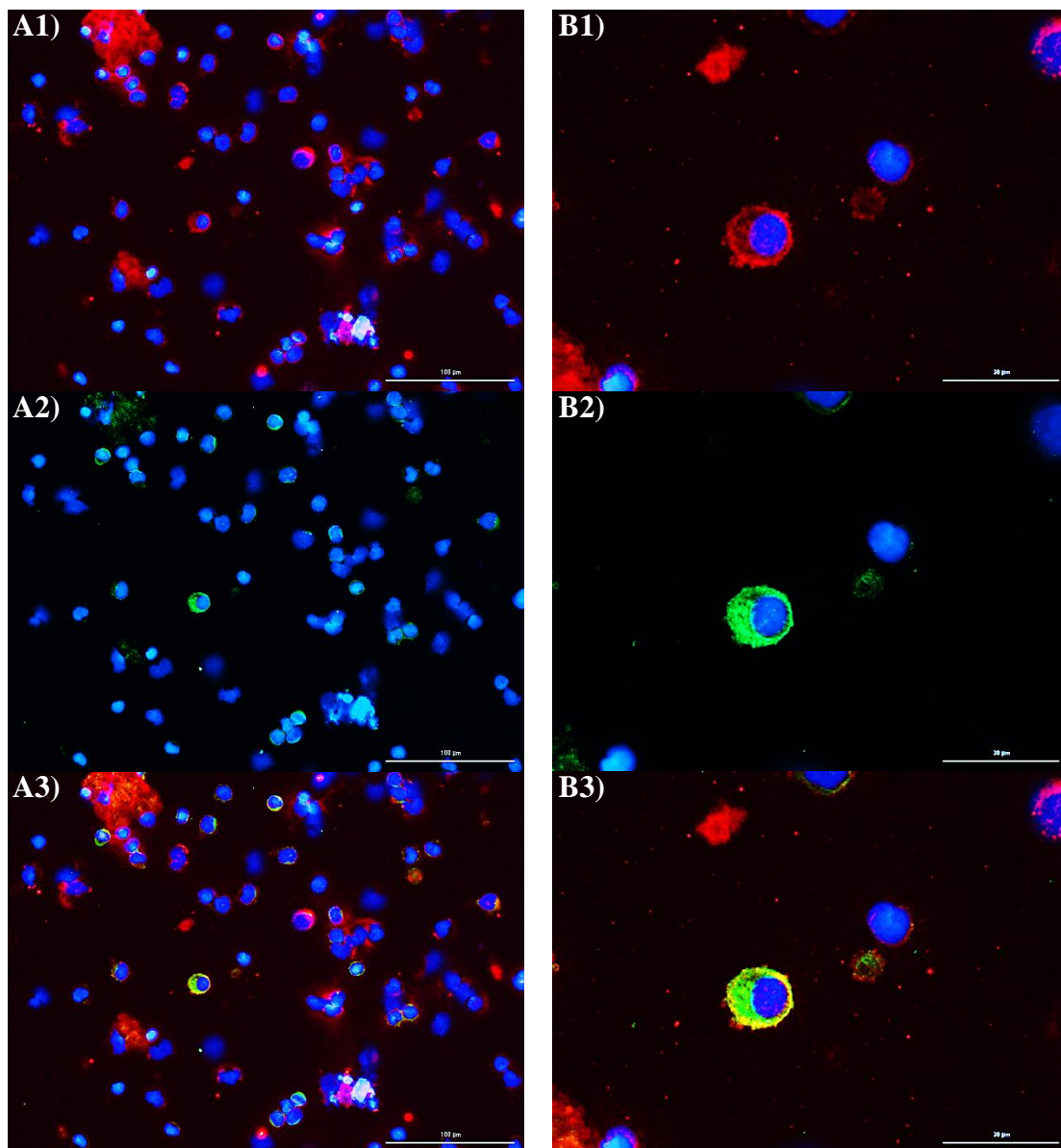
Tab. 5 Hladiny MCP-1, RANTES a IL-17 v supernatantech kloubních výpotků pacientů s TEP kolena a OA kolena měřené pomocí sendvičové ELISA metody. MCP-1 – monocytární chemoatraktivní protein-1, RANTES – „Regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted“ chemokiny, IL-17 – interleukin 17.

	TEP kolena	OA kolena	<i>P</i>
MCP-1 (pg.ml ⁻¹)	496,4 (KI 302,9–689,8)	194,3 (KI 141,1–247,5)	< 0,001 ***
RANTES (pg.ml ⁻¹)	109,0 (KI -10,4–228,4)	41,4 (31,2–51,6)	0,012 *
IL-17 (pg.ml ⁻¹)	0,5 (KI -0,6–1,6)	16,0 (KI 8,2–23,8)	0,002 **

4. 12 Imunocytochemické barvení cytospinů

Z vybraných vzorků kloubních výpotků byly připraveny cytospiny, které byla následně barveny pomocí imunocytochemického fluorescenčního barvení.

Pro barvení byly vybrány znaky CD14 a CD68, které jsou exprimovány buňkami monocyt/makrofágové linie. Znak CD14 je exprimován v membránách buněk, znak CD68 v cytoplazmatických granulích. Cytospiny byly inkubovány s primárními protilátkami proti lidským znakům CD14 a CD68 a sekundárními fluorescenčními protilátkami proti primárním protilátkám. Pro vizualizaci buněčných jader bylo použito fluorescenční barvivo DAPI (Obr. 27). Je patrné, že buňky monocyt/makrofágové linie se barví oběma znaky zároveň. Na základě exprese pouze těchto dvou znaků jsme však nebyli schopni rozlišit, zda se jednalo konkrétně o buňky monocytů, makrofágů nebo mDC. Mohli jsme však pozorovat, že jednotlivé buňky této linie se mezi sebou lišily svou velikostí a také velikostí a morfologií jádra.



Obr. 27 Cytospinové preparáty barvené pomocí imunocytochemického fluorescenčního barvení. Znak CD68 barvený sekundární protilátkou s fluorochromem Cy5 (červená barva); znak CD14 barvený sekundární protilátkou s fluorochromem Alexa Fluor 488 (zelená barva), jádra barvená pomocí DAPI (modrá barva). Bílá úsečka reprezentující definovanou velikost na fotografiích označených A) představuje 100 μm , u fotografií B) 30 μm .

5 DISKUZE

Cílem předložené diplomové práce bylo pomocí analýzy imunitního mikroprostředí v kloubních výpotcích objasnit příčinu jejich tvorby u pacientů, kteří podstoupili artroplastiku kolena. Vzorky těchto pacientů jsme poté porovnávali se vzorky pacientů trpícími OA kolena. Rovněž bylo získáno poměrně velké množství vzorků od pacientů s TEP kyčle, proto jsme se zaměřili také na porovnání imunitního mikroprostředí mezi jednotlivými klouby. Zároveň jsme se zaměřili na porovnání vzorků mezi pohlavími. Pomocí sendvičové ELISA metody byly dále stanoveny hladiny MPO, MMP-9, MCP-1 RANTES a IL-17 v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena a OA kolena. Z vybraných vzorků s vysokým podílem buněk monocyt/makrofágové linie byly připraveny cytopspiny, které byly následně barveny pomocí imunocytochemického fluorescenčního barvení pro detekci znaků CD14 a CD68.

U každého vzorku byl vždy nejprve zaznamenán jeho objem a vzhled. Průměrný objem kloubních výpotků pacientů s TEP kolena byl určen na 6,8 ml s rozsahem 2–22 ml. Tato hodnota odpovídá průměrnému objemu synoviální tekutiny ve zdravých kolenních kloubech, který zaznamenal Heilmann *et al.* (1996). U vzorků pacientů s OA kolena byl průměrný objem 14,8 ml (rozsah 3–57 ml). O'Neill *et al.* (2016) zaznamenali hodnotu 8–10 ml u pacientů s bolestivou OA kolena na počátku terapie kortikosteroidy. U pacientů s TEP kyčle byl průměrný objem kloubního výpotku 10 ml (rozsah 2–23 ml). V práci Moss *et al.* (1998) byly na základě magnetické rezonance popsány průměrné objemy u asymptotických pacientů (2,7 ml) a u pacientů s poraněním kyčle (6,1 ml). Trend zvýšeného objemu kloubního výpotku je shodný jak u OA kolena, tak kyčle, přímá studie objemu kloubních výpotků u pacientů po TEP kolena nebo kyčle však dosud nebyla v literatuře popsána. U jednotlivých kloubních onemocnění se objemy výpotků mohou výrazně lišit. I v této práci jsme zaznamenali velké rozdíly v odebraných objemech. Pokles objemu z patologicky zvýšených hodnot do fyziologických je příznivý a bývá pozorován u pacientů dobře reagujících na léčbu (např. léčba steroidy; O'Neill *et al.*, 2016) nebo operativní intervenci, kdy může docházet k poklesu objemu ze 45 ml až na 17 ml (např. synovektomie kolenního kloubu; Østergaard *et al.*, 2001).

Objem kloubního výpotku není jedinou charakteristikou, v níž se jednotliví pacienti lišili. Barva a případná přítomnost zakalení je také důležitým ukazatelem stavu kloubu nebo kloubní náhrady. U pacientů s OA kolena převládaly výpotky žluté až už čiré či

zakalené, a tyto vzhledy odpovídají typickému nálezu OA (Gallo *et al.*, 2014). U pacientů po TEP kolena byly zastoupeny výpotky žluté čiré i zakalené, ale také oranžové až lehce krvavé zakalené, u pacientů po TEP kyčle zakalené žluté až oranžové vzorky. Vysoký stupeň zákalu může indikovat rozsáhlejší zánětlivé procesy, oranžový až krvavý vzhled výpotku ukazuje na traumatickou punkci nebo hemoragické poškození kloubu (Gallo *et al.*, 2014).

Ve vzorcích pacientů s TEP byl nejprve stanoven celkový počet imunitních buněk, který dosahoval v průměru $5,6 \times 10^9$ leukocytů/l. Tato hodnota koresponduje s hodnotami u zánětlivých nebo infekčních pochodů v postiženém kloubu (Gallo *et al.*, 2014).

Pacienti s TEP kolena a kyčle byli pomocí metody imunofenotypizace rozděleni do lymfocytárního, monocyt/makrofágového, neutrofilového a smíšeného fenotypu dle převažující populace imunitních buněk v kloubních výpotcích. Ve smíšeném fenotypu nebylo možno určit převažující populaci buněk. Nejvíce byl u těchto pacientů zastoupen lymfocytární fenotyp. Převaha lymfocytů je obvykle spojována s pokročilou imunologickou reakcí organismu. V práci Perino *et al.* (2014) byly u pacientů s TEP kyčle nalezeny podobné imunitní fenotypy: makrofágový, makrofágový se smíšenou infiltrací lymfocytů s nebo bez germinálních center a granulomatózní fenotyp. Imunohistochemická analýza synoviálních membrán pacientů také prokázala zánětlivou infiltraci $CD4^+$ T-lymfocytů a GATA-3. V některých případech byly potvrzeny zvýšené alergické reakce na kovové části kloubních náhrad. U některých implantátů kyčle byl nalezen výrazný lymfocytární fenotyp, který byl spojen s hypersenzitivní reakcí na přítomnost kovu. Přestože se alergie na kovové implantáty nevyskytuje příliš často, měly by být alergické reakce zahrnuty jako diferenciální diagnóza u selhání TEP (Thomas *et al.*, 2009). V případě, že klinické nálezy nejsou dostatečné pro jednoznačnou diagnózu, mohou fenotypové charakteristiky leukocytů v kloubních výpotcích přispět k určení správné diagnózy.

Dále byl v této práci studován rozdíl v zastoupení hlavních populací imunitních buněk v kloubních výpotcích pacientů s TEP mezi muži a ženami. U obou pohlaví byla nejvíce zastoupenou populací populace lymfocytů následovaná populací buněk monocyt/makrofágové linie a neutrofilů, rozdíl mezi jednotlivými pohlavími však zaznamenán nebyl. Podobné porovnání v dostupné literatuře dosud nebylo popsáno. V kloubních výpotcích pacientů s OA kolena bylo zaznamenáno rozdílné procentuální zastoupení buněk monocyt/makrofágové linie mezi muži a ženami. Výpotky mužů s OA

kolena obsahovaly výrazně méně buněk monocyt/makrofágové linie (Kriegová *et al.*, 2018). Ve studii Lim *et al.* (2015) zaznamenali rozdíl mezi muži a ženami v předoperačním stavu a prevalenci u pacientů podstupujících TEP kolena pro OA v konečném stádiu. Prevalence byla vyšší u žen než u mužů a celkově měly ženy horší předoperační stav ve srovnání s muži. Zároveň však po artroplastice dosahovaly výraznějšího fyzického i duševního zlepšení než muži.

V další části práce jsme se zaměřili na srovnání hlavních populací imunitních buněk v kloubních výpotcích mezi pacienty s TEP kolena a TEP kyčle. Zaznamenali jsme rozdíl v buňkách monocyt/makrofágové linie. Ve vzorcích pacientů s TEP kolena bylo významně více těchto buněk než ve vzorcích pacientů s TEP kyčle. Detailní analýzou buněk monocyt/makrofágové linie jsme zjistili, že se jednalo konkrétně o rozdíl v buňkách makrofágů. Analýza buněk lymfocytární linie prokázala také rozdíl v zastoupení CD3⁺ T-lymfocytů, které se u pacientů s TEP kolena vyskytovaly ve významně větším množství než u pacientů s TEP kyčle. Zvýšené hladiny makrofágů byly pozorovány také u pacientů s TEP kolena trpících synovitidou vyvolanou otěrovými částicemi endoprotéz. Pacienti s citlivostí organismu k implantovaným kovům naopak vykazují zvýšené hladiny CD3⁺ T-lymfocytů v kloubních výpotcích (Niki *et al.*, 2006). Ve studii Niki *et al.* (2007) byly porovnávány populace imunitních buněk u pacientů, kteří podstoupili TEP kolena pro diagnózu RA nebo OA. Nejčastější příčinou tvorby výpotku u pacientů s OA byla synovitida vyvolaná otěrovými částicemi, která byla charakteristická zvýšenými hladinami buněk monocyt/makrofágové linie. Zvýšené hladiny makrofágů pravděpodobně souvisí s jejich schopností fagocytovat otěrové částice kloubních náhrad.

Hlavní populace imunitních buněk identifikované ve vzorcích pacientů s OA kolena byly shodné jako u pacientů s TEP. Celkový počet imunitních buněk stanovený ve vzorcích pacientů s KOA dosahoval v průměru $3,7 \times 10^9$ leukocytů/l. Tato hodnota koresponduje s hodnotami pro typický nález OA (Gallo *et al.*, 2014).

Kontrolní skupina pacientů s OA kolena byla také rozdělena do imunitních fenotypů dle převažující populace imunitních buněk. Jednalo se o stejné fenotypy jako u pacientů s TEP. V této skupině byl nejvíce zastoupen smíšený fenotyp, ve kterém byly hlavní populace imunitních buněk přítomny v různých kombinacích. Zastoupení populace lymfocytů a buněk monocyt makrofágové linie ve smíšeném fenotypu poukazuje na chronický zánět v postižených kloubech. Goméz-Aristizábal *et al.* (2019) analyzovali kloubní výpotky pacientů s KOA. Nejvíce zastoupenou populací zde byla populace

buněk monocyt/makrofágové linie následovaná populací lymfocytů. Buňky monocyt/makrofágové linie vykazovaly aktivovaný fenotyp, který je spojen s modulací aktivace CD4⁺ T-lymfocytů. Imunohistochemická analýza synoviální tkáně pacientů s OA kolena prokázala významnou infiltraci T-lymfocytů. T-lymfocyty byly nalezeny také v synoviální tekutině těchto pacientů, kde exprimovaly aktivovaný fenotyp. Tato data tedy podporují hypotézu, že T-lymfocyty hrají významnou úlohu v progresi a chroničnosti onemocnění OA (Haynes *et al.*, 2002).

V další části této práce jsme se zabývali porovnáním populací imunitních buněk v kloubních výpotcích mezi pacienty s TEP kolena a OA kolena. OA je nejčastější diagnóza pacientů indikovaných pro TEP kolena. Srovnáním hlavních populací imunitních buněk bylo zjištěno, že v kloubních výpotcích pacientů s TEP kolena bylo významně méně buněk monocyt/makrofágové linie než u pacientů s OA kolena. Pacienti s OA často vykazují zánětlivou infiltraci synoviálních membrán především makrofágy, dendritickými buňkami, lymfocyty a žírnými buňkami (Sakkas a Platsoucas, 2007, Ponchel *et al.*, 2015). Zejména lymfocyty pak exprimují aktivační znaky a aktivované synoviální makrofágy se poté podílí na procesu degradace chrupavky (Bondeson *et al.*, 2006; Rollin *et al.*, 2008). Modely testované na myších dokonce prokázaly účast synoviálních makrofágů na tvorbě osteofytů (Van Lent *et al.*, 2004).

Analýza buněk lymfocytární linie dále prokázala významně vyšší procentuální zastoupení T_{reg}-lymfocytů ve vzorcích pacientů s TEP kolena ve srovnání s pacienty s OA kolena. Procentuální zastoupení T_{reg}-lymfocytů ve výpotcích pacientů s OA kolena se shodovalo s výsledky, které zaznamenali Kriegová *et al.* (2018). Populace T_{reg}-lymfocytů je známa pro svůj imunosupresivní účinek, díky němuž je schopna regulovat zánětlivé procesy v organismu. Nízké hladiny T_{reg}-lymfocytů byly pozorovány také v synoviálních membránách pacientů s RA nebo OA, což naznačuje, že snížení hladiny může vyvolat snížení tolerance T-lymfocytů a zhoršit zánětlivou odpověď (Yudoh *et al.*, 2000).

Dále jsme pomocí sendvičové ELISA metody stanovili hladiny MPO, MMP-9, MCP-1, RANTES a IL-17 v supernatantech kloubních výpotků pacientů s TEP kolena a OA kolena. Jedná se o znaky, které hrají významnou roli při přestupu různých populací leukocytů z periferní krve do místa zánětu. V případě MPO a MMP-9 jsme se zaměřili na korelační analýzu mezi procentuálním zastoupením neutrofilů a hladinami jednotlivých analytů. Hladiny MPO i MMP-9 se zvyšovaly s rostoucím

procentuálním zastoupením neutrofilů ve vzorcích pacientů s TEP kolena i OA kolena. Oba analyty jsou známy jako markery neutrofilové aktivace. Hladiny MPO vykazovaly vyšší korelaci s procentem neutrofilů, proto by se mohlo jednat o lepší marker ve srovnání s MMP-9.

Ve studii Steinbeck *et al.* (2008) autoři porovnávali hladiny MPO v kloubních výpotcích pacientů s KOA v raném a konečném stádiu OA. Pacienti s raným stádiem OA prokazovali výrazně zvýšené hladiny MPO. Hladiny MPO u pacientů s OA v konečném stádiu byly srovnatelné s námi naměřenými hodnotami MPO u pacientů s OA kolena. Tento výsledek ukazuje, že MPO by mohlo sloužit jako diagnostický marker pro detekci OA také v časném stádiu onemocnění. Deberg *et al.* (2008) zkoumali hladiny MPO v séru pacientů s OA kolena před operací náhrady kloubu, a poté po 3 měsících a 1 roce od operace TEP. Po náhradě kloubů byly zaznamenány snížené hladiny sérového MPO, což naznačuje, že k aktivaci neutrofilů v kloubech pacientů s OA dochází také v pozdním stádiu onemocnění.

Chu *et al.* (2004) porovnávali hladiny pro-MMP-9 ve výpotcích pacientů se zánětlivou, septickou a aseptickou artritidou. Ve skupině se septickou artritidou se nacházeli také pacienti s TEP kolena. Autoři zaznamenali významně vyšší hladiny pro-MMP-9 u pacientů se septickou artritidou (u neoperovaných i nahrazených kloubů) oproti pacientům s aseptickou artritidou. Hladiny pro-MMP-9 také korelovaly s počtem neutrofilů ve vzorcích. Úroveň MMP-9 může pomoci rozlišit septickou a aseptickou artritidu, a to i v případech nízkého počtu neutrofilů ve vzorcích pacientů s TEP. V další práci byla studována hladina pro-MMP-9 ve výpotcích pacientů s RA a OA. Zjištěná koncentrace pro-MMP-9 ve vzorcích OA pacientů byla velmi vysoká ($> 600 \text{ ng.ml}^{-1}$), ve vzorcích pacientů s RA byla zaznamenána ještě mnohem vyšší koncentrace ($> 4\,000 \text{ ng.ml}^{-1}$) (Seki *et al.*, 2014). MMP-9 se aktivně podílí na destrukci kloubů prostřednictvím exprese neutrofilů a buněk monocyt/makrofágové linie.

Srovnáním jsme zaznamenali významně vyšší koncentraci MCP-1 ve vzorcích pacientů s TEP kolena ($496,4 \text{ pg.ml}^{-1}$) oproti pacientům s OA kolena ($194,3 \text{ pg.ml}^{-1}$). Ve studii Ren *et al.* (2018) byla studována hladina MCP-1 v séru a kloubních výpotcích pacientů s OA kolena/kyčle. Autoři zaznamenali u pacientů s OA kolena koncentraci MCP-1 $> 4\,000 \text{ pg.ml}^{-1}$ ve vzorcích výpotků, u pacientů s OA kyčle koncentraci MCP-1 obdobnou námi získané hodnotě MCP-1 ve výpotcích pacientů s TEP kolena. Shodná koncentrace byla zaznamenána také v séru obou skupin pacientů. Ellingsen *et al.* (2001) zkoumali hladinu MCP-1 v plazmě a synoviální tekutině RA pacientů se synovitiidou

kolena. Také v této práci byla zaznamenána významně vyšší hladina MCP-1 ve vzorcích výpotků než ve vzorcích plazmy. MCP-1 se podílí na procesech zánětlivých kloubních onemocnění a studium jeho hladiny může pomoci monitorovat průběh zánětu.

V případě RANTES jsme opět zaznamenali významně vyšší hladinu ve vzorcích pacientů s TEP kolena ($109,0 \text{ pg.ml}^{-1}$) ve srovnání se vzorky pacientů s OA kolena ($41,4 \text{ pg.ml}^{-1}$). Ve studii Stanczyk *et al.* (2005) byla zkoumána hladina RANTES v kloubních výpotcích pacientů s RA a OA. U vzorků pacientů s RA byla zaznamenána vysoká exprese RANTES (145 pg.ml^{-1}), zatímco ve vzorcích pacientů s OA bylo zaznamenáno pouze stopové množství tohoto chemokinu (2 pg.ml^{-1}). Pierzchala *et al.* (2011) zaznamenali naopak velmi vysokou hladinu RANTES ve výpotcích pacientů s KOA ($690,6 \text{ pg.ml}^{-1}$). Tyto chemokiny jsou schopny indukovat uvolňování enzymů podílejících se na degradaci kloubní chrupavky. Díky nadměrné expresi RANTES v kloubních výpotcích se může jednat o potenciální mediátor ovlivňující intenzitu a složení infiltrovaných buněk v postižených kloubech.

Naopak významně nižší koncentrace IL-17 byla zaznamenána ve vzorcích pacientů s TEP kolena ($0,5 \text{ pg.ml}^{-1}$) ve srovnání s pacienty s OA kolena ($16,0 \text{ pg.ml}^{-1}$). V práci Rübenhagen *et al.* (2012) zaznamenali obdobně nízké hladiny IL-17 ($< 2,8 \text{ pg.ml}^{-1}$) ve výpotcích pacientů, kteří podstoupili některý z chirurgických zákroků kolenního kloubu. Liu *et al.* (2015) studovali vztah mezi hladinou IL-17 a stupněm KOA dle Kellgren-Lawrence. Koncentrace IL-17 ve výpotcích pacientů s KOA se pohybovala okolo 6 pg.ml^{-1} bez významného rozdílu mezi jednotlivými stupni. IL-17 hraje klíčovou roli v patogenezi OA a úzce souvisí s bolestivostí tohoto onemocnění. Blokáce signální dráhy by tedy mohla vést ke zmírnění bolestí pacientů trpících OA.

Přítomnost buněk monocyt/makrofágové linie byla potvrzena také vizuálně pomocí dvojitého imunocytochemického fluorescenčního barvení cytospinů. Z této linie nás zajímaly převážně buňky makrofágů. Tyto buňky se mezi sebou liší svou velikostí a také velikostí a morfologií jádra. Pro barvení byl vybrán membránový znak CD14 a cytoplazmatický znak CD68, oba znaky jsou specifické pro tuto linii buněk. Na základě exprese pouze těchto dvou znaků jsme však nebyli schopni rozlišit, zda se jednalo konkrétně o monocyty, makrofágy nebo mDC. K tomu by bylo zapotřebí dalších znaků specifických pro jednotlivé typy buněk, např. znak CD16. Ambarus *et al.* (2012) potvrdil přítomnost buněk monocyt/makrofágové linie také v synoviálních membránách pacientů se spondyloartritidou a RA.

Detailní popis imunitního prostředí kloubních výpotku u pacientů s TEP kloubů by mohl přispět k odhalení příčiny jeho vzniku a následně usnadnit cílený léčebný či profylaktický přístup.

6 ZÁVĚR

V této diplomové práci bylo zkoumáno imunitní mikroprostředí v kloubních výpotcích pacientů po operaci náhrady kloubu a byly srovnávány vzorky pacientů s TEP kolena a TEP kyčle. Zároveň byly porovnávány vzorky výpotků pacientů s TEP kolena a OA kolena. K tomuto účelu byla použita metoda imunofenotypizace hlavních populací imunitních buněk a jejich analýza pomocí průtokového cytometru.

Ve vzorcích pacientů s TEP kolena i kyčle byly identifikovány hlavní populace imunitních buněk, a to populace lymfocytů, buněk monocyt/makrofágové linie a neutrofilů. Porovnáním procentuálního zastoupení byly zjištěny významné rozdíly mezi buňkami makrofágů a $CD3^+$ T-lymfocytů mezi pacienty s TEP kolena a TEP kyčle. Dále byly porovnávány populace imunitních buněk ve výpotcích pacientů s TEP kolena a OA kolena. Zaznamenali jsme významné rozdíly v populacích buněk monocyt/makrofágové linie a $CD4^+$ T_{reg}-lymfocytů.

Pomocí metody ELISA byly stanoveny a porovnány hladiny MPO, MMP-9, MCP-1, RANTES a IL-17 ve vzorcích pacientů s TEP kolena a OA kolena. V případě MPO byla v obou typech vzorků zaznamenána korelace mezi hladinou analytu a procentuálním zastoupením neutrofilů ve vzorcích. V případě MMP-9 byla korelace mezi hladinou analytu a procentuálním zastoupením neutrofilů ve vzorcích zaznamenána pouze u vzorků pacientů s OA kolena. Hladiny MCP-1, RANTES a IL-17 se významně lišily mezi pacienty s TEP kolena a OA kolena.

Tato diplomová práce ukazuje, že zastoupení imunitních buněk v kloubních výpotcích se liší nejen u pacientů před a po operaci náhrady kloubů, ale také v rámci různých kloubů. Také naznačuje, že hladiny MCP-1, RANTES a IL-17 jsou rozdílné v nativních a nahrazených kloubech. Tyto nálezy však bude potřeba hlouběji studovat pro pochopení imunopatologických procesů probíhajících v kloubech pacientů podstupujících operaci náhrady kloubů.

7 LITERATURA

- Abcam home page: http://docs.abcam.com/pdf/kits/elisa-guide.pdf?elqTrackId=3d38d5a7bc734010b1347789bfb97e6a&elqaid=632&elqat=2&_ga=2.250632838.1015168673.1586410945-179842807.1586410945 (9. 4. 2020).
- Ajuebor M. N., Flower R. J., Hannon R., Christie M., Bowers K., Verity A., Perretti M. (1998): Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. *Journal of Leukocyte Biology* **63**, 108–116.
- Alaaeddine N., Olee T., Hashimoto S., Creighton-Achermann L., Lotz M. (2001): Production of the chemokine RANTES by articular chondrocytes and role in cartilage degradation. *Arthritis&Rheumatology* **44**, 1633–1643.
- Altman R., Asch E., Bloch D., Bole G., Borenstein D., Brandt K., Christy W., Cooke T. D., Greenwald R., Hochberg M., Howell D., Kaplan D., Koopman W., Longley S., Mankin H., McShane D. J. Medsger T. Jr., Meenan R., Mikkelsen W., Moskowitz R., Murphy W., Rothschild B., Segal M., Sokoloff L, Wolfe F. (1986): Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis and Rheumatology* **29**, 1039–1049.
- Ambarus C. A., Noordenbos T., de Hair M. J. H., Tak P. P., Baeten D. L. P. (2012): Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display an IL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis. *Arthritis research&therapy* **14**, <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar3796>.
- Avrameas S., Ternynck T., Guesdon J. L. (1978): Coupling of enzymes to antibodies and antigens. *Scandinavian Journal of Immunology* **8**, 7–23.
- Baggiolini M., Dewald B., Moser B. (1994): Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. In: *Advances in Immunology*. Vol 55 (Dixon F. J. ed.), U. S. A., 97–179.
- Benjamin G. C. (1998): Arthrocentesis. In: *Clinical procedures in emergency medicine*. 3rd ed. (Roberts J. R., Hedges J. R., eds.), WB Saunders Co, Philadelphia, U. S. A., 919-932.
- Berg E. (1984): The acutely swollen joint, first impressions may mislead. *Postgraduate Medicine* **75**, 62-75.
- Bijlsma J. W., Berenbaum F., FP Lafeber F. P. (2011): Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *The Lancet* **377**, 2115-2126.
- Bio-Rad-antibodies home page: <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html> (9. 4. 2020).
- Biosciencenotes home page: <http://www.biosciencenotes.com/elisa-enzyme-linked-immunosorbent-assay> (8. 4. 2020).
- Bondeson J., Wainwright S. D., Lauder S., Amos N. Hughes C. E. (2006): The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* **8**, R187. doi:10.1186/ar2099.
- Brannan S. R., Jerrard D. A. (2006): Synovial fluid analysis. *The Journal of Emergency Medicine* **30**, 331–339.
- Burry W. (2010): *Immunocytochemistry*. Springer, New York, U. S. A., 225.
- Carossino A. M., Carulli C., Ciuffi S., Carossino R., Zappoli Thyrión G. D., Zonefrati R., Innocenti M., Brandi M. L. (2016): Hypersensitivity reactions to metal implants: laboratory options. *BMC* **17**, 486–500.
- Carr A. J., Robertsson O., Graves S., Price A. J., Arden N. K., Judge A., Beard D. J. (2012): Knee replacement. *The Lancet* **379**, 1331-1340.
- Castañeda S., Roman-Blas J. A., Largo R., Herrero-Beaumont G. (2014): Osteoarthritis: a progressive disease with changing phenotypes. *Rheumatology* **53**, 1-3.
- Comoglio S., Celada F. (1976): An immuno-enzymatic assay of cortisol using *E. coli* β -galactosidase as label. *Journal of Immunological Methods* **10**, 161–170.
- Creamer P., Hochberg M. C. (1997): Osteoarthritis. *The Lancet* **350**, 503–508.

- Crowther J. R. (2009): *The ELISA Guidebook*. 2nd ed., Humana Press, New Jersey, U.S.A., 566 stran.
- Deberg M., Dubuc J., Labasse A., Sanchez C., Quettier E., Bosseloir A., Crielaard J.-M., Henrotin Y. (2008): One-year follow-up of Coll2-1, Coll2-1NO2 and myeloperoxidase serum levels in osteoarthritis patients after hip or knee replacement. *Annals of the Rheumatic Diseases* **67**, 168-174.
- Doyle S. E., O'Connell R. M., Miranda G. A., Vaidya S. A., Chow E. K., Liu P. T., Suzuki S., Suzuki N., Modlin R. L., Yeh W.-C., Lane T. F., Cheng G. (2004): Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *Journal of Experimental Medicine* **199**, 81–90.
- Ellingsen T., Buus A., Stengaard-Pedersen K. (2001): Plasma monocyte chemoattractant protein 1 is a marker for joint inflammation in rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* **28**, 41-46.
- Elomaa O., Kangas M., Sahlberg C., Tuukkanen J., Sormunen R., Liakka A., Thesleff I., Kraal G., Tryggvason K. (1995): Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell* **80**, 603–609.
- Ethgen O., Bruyère O., Richy F., Dardennes Ch., Reginster J.-Y. (2004): Health-Related Quality of Life in Total Hip and Total Knee Arthroplasty. *The Journal of Bone & Joint Surgery* **86**, 963-974.
- Felson D. T. (2006): Osteoarthritis of the knee. *The New England Journal of Medicine* **354**, 841-848.
- Freemont A. J. (1996): Microscopic analysis of synovial fluid—the perfect diagnostic test?. *Annals of Rheumatic Diseases* **55**, 695-697.
- Freemont A. J., Denton J., Chuck A., Holt P. J., Davies M. (1991): Diagnostic value of synovial fluid microscopy: A reassessment and rationalisation. *Annals of Rheumatic Diseases* **50**, 101–107.
- Gallo J. (2014): Osteoartróza průvodce pro každodenní praxi. 1st ed., Maxdorf, Praha, Česká republika, 150 stran.
- Gallo J., Holibka R., Kalina R., Kamínek P., Šos Z., Špička J., Uvízl M. (2014): *Ortopedie pro studenty lékařských a zdravotnických fakult.* 1st ed, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká republika, 212 stran.
- Gan S. D., Patel K. R. (2013): Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology* **133**, doi:10.1038/jid.2013.287
- Glant T. T., Jacobs J. J. (1994): Response of three murine macrophage populations to particulate debris: bone resorption in organ cultures. *Journal of Orthopaedic Research* **12**, 720-731.
- Goldman A. S., Prabhakar B. S. (1996): Immunology Overview. In: *Medical Microbiology*. 4th ed., (Baron S. ed.) University of Texas Medical Branch, Texas, U.S.A., 1273.
- Goldsby R. A., Kindt T. J., Osborne B. A., Kuby J. (2003): Enzyme-linked immunosorbent assay. In: *Immunology*. 5th ed., (Noe J., Ryan M., Mergen K., Hadler G. L., Kudlacik A. Villamora N., eds), W.H. Freeman, & Company, New York, U.S.A., 148-150.
- Gómez-Aristizábal A., Gandhi R., Mahomed N. N., Marshall K. W., Viswanathan S. (2019): Synovial fluid monocyte/macrophage subsets and their correlation to patient-reported outcomes in osteoarthritic patients: a cohort study. *Arthritis Research & Therapy* **21**, <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-018-1798-2>.
- Goodman S., Kontinen Y. T., Takagi M. (2014): Joint Replacement Surgery and the Innate Immune System. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants* **24**, 253-257.
- Goodman S. B., Fornasier V. L., Lee J., Kei J. (1990): The histological effects of the implantation of different sizes of polyethylene particles in the rabbit tibia. *Journal of Biomedical Materials Research* **24**, 517-524
- Greenfield E. M., Bi Y., Ragab A. A., Goldberg V. M., Nalepka J. L., Seabold J. M. (2004): Does endotoxin contribute to aseptic loosening of orthopedic implants?. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* **72B**, 179-185.
- Greis P. E., Georgescu H. I., Fu F. H., Evans C. H. (1994): Particle-induced synthesis of collagenase by synovial fibroblasts: An immunocytochemical study. *Journal of Orthopaedic Research* **12**, 286–293.

- Hallab N. J., Caicedo M., Epstein R., McAllister K., Jacobs J. J. (2010): In vitro reactivity to implant metals demonstrates a person dependant association with both T-cell and B-cell activation. *Journal of Biomedical Materials Research* **92**, 667–682.
- Hayashida K., Nanki T., Girschick H., Yavuz S., Ochi T., Lipsky P. E. (2001): Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. *Arthritis Research & Therapy* **3**, 118–126.
- Haynes M. K., Hume E. L., Smith J. B. (2002): Phenotypic Characterization of Inflammatory Cells from Osteoarthritic Synovium and Synovial Fluids. *Clinical Immunology* **105**, 315–325.
- Heilmann H.-H., Lindenhayn K., Walther H.-U. (1996): Das Synovia-Volumen gesunder und arthrotischer menschlicher Kniegelenke. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* **134**, 144–148.
- Hirayama T., Tamaki Y., Takakubo Y., Iwazaki K., Sasaki K., Ogino T., Goodman S. B., Kontinen Y. T., Takagi M. (2011): Toll-like receptors and their adaptors are regulated in macrophages after phagocytosis of lipopolysaccharide-coated titanium particles. *Journal of Orthopaedic Research* **29**, 984–992.
- Hogan D. B., Pritzker K. P. H. (1985): Synovial fluid analysis: another look at the mucin clot test. *The Journal of Rheumatology* **12**, 242–244.
- Horowitz S. M., Doty S. B., Lane J. M., Burstein A. H. (1993): Studies of the mechanism by which the mechanical failure of polymethylmethacrylate leads to bone resorption. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **75A**, 802–813.
- Hutton C. W. (1989): Osteoarthritis: the cause not result of joint failure? *Annals of the Rheumatic Diseases* **48**, 958–961.
- Huang H. (2018): Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. *Sensors (Basel)* **18**:10.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6211011/>.
- Chen Y., Pikkarainen T., Elomaa O., Soininen R., Kodama T., Kraal G., Tryggvason K. (2005): Defective microarchitecture of the spleen marginal zone and impaired response to a thymus-independent type 2 antigen in mice lacking scavenger receptors MARCO and SR-A. *The Journal of Immunology* **175**, 8173–8180.
- Chu S.-C., Yang S.-F., Lue K.-H., Hsieh Y.-S., Lin Z.-I., Lu K.-H. (2004): Clinical Significance of Gelatinases in Septic Arthritis of Native and Replaced Knees. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **427**, 179–183.
- Johnson V. L., Hunter D. J. (2014): The epidemiology of osteoarthritis. *Best Practise and Research Clinical Rheumatology* **28**, 5–15.
- Józefowski S., Arredouani M., Sulahian T., Kobzik L. (2005): Disparate regulation and function of the class A scavenger receptors SR-AI/II and MARCO. *The Journal of Immunology* **175**, 8032–8041.
- Kellgren J. H., Lawrence J. S. (1957): Radiological Assessment of Osteo-Arthrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **16**, 494–502.
- Kerolous G., Clayburne G., Schumacher Jr H. R. (1989): Is it mandatory to examine synovial fluids promptly after arthrocentesis?. *Arthritis & Rheumatology* **32**, 271–278.
- Klebanoff S. J. (2005): Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology* **77**, 598–625.
- Kotake S., Udagawa N., Takahashi N., Matsuzaki K., Itoh K., Ishiyama S., Saito S., Inoue K., Kamatani N., Gillespie M. T., Martin T. J., Suda T. (1999): IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* **103**, 1345–1352.
- Kriegová E., Manukyan G., Mikulková Z., Gabčová G., Kudelka M., Gajdoš P., Gallo J. (2018): Gender-related differences observed among immune cells in synovial fluid in knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* **26**, 1247–1256.
- Kroll M. A., Otis J. C., Sculco T. P., Lee A. C., Paget S. A., Bruckenstein R., Jensen D. A. (1989): The relationship of stride characteristics to pain before and after total knee arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **239**, 191–195.

- Kurtz S., Ong K., Lau E., Mowat F., Halpern M. (2007): Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **89**, 780–785.
- Kurtz S. M., Ong K. L., Schmier J., Zhao K., Mowat F., Lau E. (2009): Primary and revision arthroplasty surgery caseloads in the United States from 1990 to 2004. *The Journal of Arthroplasty* **24**, 195–203.
- Lahdeoja T., Pajarinen J., Kouri V. P., Sillat T., Salo J., Kontinen Y. T. (2010): Toll-like receptors and aseptic loosening of hip endoprosthesis—a potential to respond against danger signals? *Journal of Orthopaedic Research* **28**, 184–90.
- Lau E. C., Cooper C., Lam D., Chan V. N., Tsang K. K., Sham A. (2000): Factors associated with osteoarthritis of the hip and knee in Hong Kong Chinese: obesity, joint injury, and occupational activities. *American Journal of Epidemiology* **152**, 855–862.
- Lauwerys B. R., Hernández-Lobato D., Gramme P., Ducreux J., Dessy A., Focant I., Ambroise J., Bearzatto B., Nzeusseu Toukap A., Van den Eynde B. J., Elewaut D., Gala J-L., Durez P., Houssiau F. A., Helleputte T., Dupont P. (2015): Heterogeneity of Synovial Molecular Patterns in Patients with Arthritis. *PLOS ONE* **10**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122104>.
- Li Y. S., Luo W., Zhu S. A., Lei G. H. (2017): T cells in osteoarthritis: alterations and beyond. *Frontiers in Immunology* **8**, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00356>.
- Liao W., Li Z., Li T., Zhang Q., Zhang H., Wang X. (2018): Proteomic analysis of synovial fluid in osteoarthritis using SWATH-mass spectrometry. *Molecular Medicine Reports* **17**, 2827–2836.
- Lim J. B. T., Chi C. H., Lo L. E., Lo W. T., Chia S.-L., Yeo S. J., Chin P. L., Tay K. J. D., Lo N. N. (2015): Gender difference in outcome after total knee replacement. *Journal of Orthopaedic Surgery* **23**, 194–197.
- Lind M., Trindade M. C. D., Nakashima Y., Schurman D. J., Goodman S. B., Smith R. L. (1999): Chemotaxis and activation of particle-challenged human monocytes in response to monocyte migration inhibitory factor and C-C chemokines. *Journal of Biomedical Materials Research* **48**, 246–250.
- Lisignoli G., Toneguzzi S., Grassi F., Piacentini A., Tschon M., Cristino S., Gualtieri G., Facchini A. (2002): Different chemokines are expressed in human arthritic bone biopsies: IFN-gamma and IL-6 differently modulate IL-8, MCP-1 and rantes production by arthritic osteoblasts. *Cytokine* **20**, 231–238.
- Liu Y., Peng H., Meng Z., Wei M. (2015): Correlation of IL-17 Level in Synovia and Severity of Knee Osteoarthritis. *Medical Science Monitor* **21**, 1732–1736.
- Macey M. G. (2007): Principles of Flow Cytometry. In: *Flow cytometry: Principles and applications*. (Macey M. G. Ed.), Humana Press, New Jersey, U. S. A, 1–15.
- Maitra R., Clement C. C., Crisi G. M., Cobelli N., Santambrogio L. (2008): Immunogenicity of modified alkane polymers is mediated through TLR1/2 activation. *PloS one* **3**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002438>.
- Maitra R., Clement C. C., Scharf B., Crisi G. M., Chitta S., Paget D., Purdue P. E., Cobelli N., Santambrogio L. (2009): Endosomal damage and TLR2 mediated inflammasome activation by alkane particles in the generation of aseptic osteolysis. *Molecular Immunology* **47**, 175–184.
- Marchenko S., Flanagan L. (2007): Immunocytochemistry: Human Neural Stem Cells. *Journal of Visualized Experiments* **7**. doi:10.3791/267.
- Malemud C. J., Meszaros E. C., Wylie M. A., Dahoud W., Skomorovska-Prokvolit Y., Mesiano S. (2016): Matrix Metalloproteinase-9 Production by Immortalized Human Chondrocyte Lines. *Journal of Clinical & Cellular Immunology* **7**:3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4937998/#R10>.
- Martínez Sanchis A, Pascual E. (2005): Intracellular and extracellular CPPD crystals are a regular feature in synovial fluid from uninfamed joints of patients with CPPD related arthropathy. *Annals of the Rheumatic Diseases* **64**, 1769–1772.
- Matthews J. B., Besong A. A., Green T. R., Stone M. H., Wroblewski B. M., Fisher J., Ingham E. (2000): Evaluation of the response of primary human peripheral blood mononuclear

- phagocytes to challenge with in vitro generated clinically relevant UHMWPE particles of known size and dose. *Journal of Biomedical Materials Research* **52**, 296-307.
- Matzinger P. (1994): Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Reviews Immunology* **12**, 991–1045.
- Mend my knee home page: <http://www.mendmyknee.com/arthritis-of-the-knee/knee-osteoarthritis-information.php> (19. 12. 2019).
- Meurer R., Van Riper G., Feeney W., Cunningham P., Hora D. Jr., Springer M. S., MacIntyre D. E., Rosen H. (1993): Formation of eosinophilic and monocytic intradermal inflammatory sites in the dog by injection of human RANTES but not human monocyte chemoattractant protein 1, human macrophage inflammatory protein 1 alpha, or human interleukin 8. *Journal of Experimental Medicine* **178**, 1913-1921.
- Michel R., Nolte M., Reich M., Loer F. (1991): Systemic effect of implanted prostheses made of cobalt-chromium alloys. *Archives of Orthopaedic Trauma Surgery* **110**, 61–74.
- Moore K. L., Agur A. M., Dalley A. F. (2011): *Essential Clinical Anatomy*. 4th ed. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, U.S.A., 686 stran.
- Mukhopadhyay S., Peiser L., Gordon S. (2004): Activation of murine macrophages by *Neisseria meningitidis* and IFN- γ in vitro: distinct roles of class A scavenger and Toll-like pattern recognition receptors in selective modulation of surface phenotype. *Journal of Leukocyte Biology* **76**, 577–584.
- Nakane P. K., Kawaoi A. (1974): Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **22**, 1084–1091.
- Neumann D. A. (2010): Ankle and Foot. In: *Kinesiology of the musculoskeletal system: Foundations for rehabilitation*. 2nd ed., (Neumann D. A., Falk K., Kuster Deutsch M. eds.), Mosby Elsevier, St. Louis, U.S.A., 573-626.
- Neumann D. A. (2010): Knee. In: *Kinesiology of the musculoskeletal system: Foundations for rehabilitation*. 2nd ed., (Neumann D. A., Falk K., Kuster Deutsch M. eds.), Mosby Elsevier, St. Louis, U.S.A., 520-571.
- Nich C., Goodman S. B. (2014): The role of macrophages in the biological reaction to wear debris from joint replacements. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants* **24**, 259-265.
- Niki Y., Matsumoto H., Otani T., Suda Y., Yatabe T., Yoshimine F., Kondo M., Toyama Y. (2003): Flow cytometric technique for the detection of phagocytosed wear particles in patients with total joint arthroplasty. *Biomaterials* **24**, 3715-3724.
- Niki Y., Matsumoto H., Otani T., Tomatsu T., Toyama Y. (2007): Five types of inflammatory arthritis following total knee arthroplasty. *Journal of Biomedical Materials Research* **81A**, 1005-1010.
- Niki Y., Matsumoto H., Otani T., Yatabe T., Funayama A., Maeno S., Tomatsu T., Toyama Y. (2006): Phenotypic characteristics of joint fluid cells from patients with continuous joint effusion after total knee arthroplasty. *Biomaterials* **27**, 1558-1565.
- Niki Y., Matsumoto H., Suda Y., Otani T., Fujikawa K., Toyama Y., Hisamori N., Nozue A. (2003): Metal ions induce bone-resorbing cytokine production through the redox pathway in synoviocytes and bone marrow macrophage. *Biomaterials* **24**, 1447–1457.
- Olson E. J., Kang J. D., Fu F. H., Georgescu H. I., Mason G. C., Evans C. H. (1988): The biochemical and histological effects of artificial ligament wear particles: in vitro and in vivo studies. *The American Journal of Sports Medicine* **16**, 558-570.
- O'Neill T. W., Parkes M. J., Maricar N., Marjanovic E. J., Hodgson R., Gait A. D., Cootes T. F., Hutchinson C. E., Felson D. T. (2016): Synovial tissue volume: a treatment target in knee osteoarthritis (OA). *Annals of the Rheumatic Diseases* **75**, 84-90.
- Østergaard M., Ejbjerg B., Stoltenberg M., Gideon P., Volck B., Skov K., Hjorth Jensen C., Lorenzen I. (2001): Quantitative magnetic resonance imaging as marker of synovial membrane regeneration and recurrence of synovitis after arthroscopic knee joint synovectomy: a one year follow up study. *Annals of the Rheumatic Diseases* **60**, 233-236.
- Pajarinen J., Cenni E., Savarino L., Gomez-Barrena E., Tamaki Y., Takagi M., Salo J., Kontinen Y. T. (2010): Profile of toll-like receptor-positive cells in septic and aseptic

- loosening of total hip arthroplasty implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **94**, 84–92.
- Palframan R. T., Jung S., Cheng G., Weninger W., Luo Y., Dorf M., Littman D. R., Rollins B. J., Zweerink H., Rot A., von Andrian U. H. (2001): Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *Journal of Experimental Medicine* **194**, 1361–1373.
- Paz J. C., West M. P. (2014): Acute care handbook for physical therapists. 4th ed., Elsevier, St. Louis, U.S.A, 509 stran.
- Pearl J. I., Ma T., Irani A. R., Huang Z., Robinson W. H., Smith R. L., Goodman S. B. (2011): Role of the Toll-like receptor pathway in the recognition of orthopedic implant wear-debris particles. *Biomaterials* **32**, 5535–5542.
- Pearle A. D., Scanzello C. R., George S., Mandl L. A., DiCarlo E. F., Peterson M., Sculco T. P., Crow M. K. (2007): Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* **15**, 516–523.
- Perino G., Ricciardi B. F., Jerabek S. A., Martignoni G., Wilner G., Maass D., Goldring S. R., Purdue P. E. (2014): Implant based differences in adverse local tissue reaction in failed total hip arthroplasties: a morphological and immunohistochemical study. *BMC Clinical Pathology* **14**,
<https://bmcclinpathol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6890-14-39#Abs1>.
- Picot J., Guerin C. L., Le Van K. C., Boulanger C. M. (2012): Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* **64**, 109–130.
- Pierzchala A. W., Kusz D. J., Hajduk G. (2011): CXCL8 and CCL5 Expression in Synovial Fluid and Blood Serum in Patients with Osteoarthritis of the Knee. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **59**, 151–155.
- Pivec R., Johnson A. J., Mears S. C., Mont M. A. (2012): Hip arthroplasty. *The Lancet* **380**, 1768-1777.
- Ponchel F., Burska A. N., Hensor E. M., Raja R., Campbell M., Emery P., Conaghan P. G. (2015): Changes in peripheral blood immune cell composition in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* **23**, 1870–1878.
- Pulsatelli L., Dolzani P., Piacentini A., Silvestri T., Ruggeri R., Gualtieri G., Meliconi R., Facchini A. (1999): Chemokine production by human chondrocytes. *The Journal of Rheumatology* **26**, 1992–2001.
- Radiopaedia home page: <https://radiopaedia.org/cases/normal-knees-x-rays?lang=gb> (13. 1. 2019).
- Ren G., Lutz I., Railton P., Wiley J. P., McAllister J., Powell J., Krawetz R. J. (2018): Serum and synovial fluid cytokine profiling in hip osteoarthritis: distinct from knee osteoarthritis and correlated with pain. *BMC Musculoskelet Disorders* **19**,
<https://bmcmusculoskeletdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12891-018-1955-4>.
- Robertsson O., Bizjajeva S., Fenstad A. M., Furnes O., Lidgren L., Mehnert F., Odgaard A., Pedersen A. B., Havelin L. I. (2010): Knee arthroplasty in Denmark, Norway and Sweden. A pilot study from the Nordic Arthroplasty Register Association. *Acta Orthopaedica* **81**, 82-89.
- Rollin R., Marco F., Jover J. A., J. A. García-Asenjo J. A., Rodríguez L., López-Durán L., Fernández-Gutiérrez B. (2008): Early lymphocyte activation in the synovial microenvironment in patients with osteoarthritis: comparison with rheumatoid arthritis patients and healthy controls. *Rheumatology International* **28**, 757– 764.
- Rosin D. L., Okusa M. D. (2011): Dangers Within: DAMP Responses to Damage and Cell Death in Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **22**, 416-425.
- Rübenhagen R., Schuttrumpf J. P., Sturmer K. M., Frosch K.H. (2012): Interleukin-7 levels in synovial fluid increase with age and MMP-1 levels decrease with progression of osteoarthritis. *Acta Orthopaedica* **83**, 59–64.
- Sakamoto S., Putalun W., Vimolmangkang S., Phoolcharoen W., Shoyama Y., Tanaka H., Morimoto S. (2018): Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines* **72**, 32-42.

- Sakkas L. I., Platsoucas C. D. (2007): The role of T cells in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology* **56**, 409–424.
- Sankala M., Brännström A., Schulthess T., Bergmann U., Morgunova E., Engel J., Tryggvason K., Pikkarainen T. (2002): Characterization of recombinant soluble macrophage scavenger receptor MARCO. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 33378–33385.
- Seki M., Uzuki M., Ohmoto H., Yoshino K., Maeda S., Kokubun S., Sakurai M., Sawai T. (2014): Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in patients with rheumatoid arthritis. *Japanese Journal of Rheumatology* **7**, 197-209.
- Shanbhag A. S., Jacobs J. J., Black J., Galante J. O., Glant T. T. (1995): Human monocyte response to particulate biomaterials generated in vivo and in vitro. *Journal of Orthopaedic Research* **13**, 792-801.
- Schall T. J., Bacon K., Toy K. J., Goeddel D. V. (1990): Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* **347**, 669–671.
- Schmalzried T. P., Jasty M., Harris W. H. (1992): Periprosthetic bone loss in total hip arthroplasty. *The Journal of Bone and Joint Surgery (American Volume)* **74A**, 849-863.
- Siva C., Velazquez C., Mody A. (2003): Diagnosing acute monoarthritis in adults: a practical approach for the family physician. *American Family Physician*, **68**, 83-90.
- Skoog L., Tani E. (2011): Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology* **22**, 215-229.
- Sowers M., Jannausch M., Stein E., Jamadarc D., Hochbergd M., Lachancea L. (2002): C-Reactive protein as a biomarker of emergent osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* **10**, 595–601.
- Stanczyk J., Kowalski M. L., Grzegorzczuk J., Szkudlinska B., Jarzebska M., Marciniak M., Synder M. (2005): RANTES and Chemotactic Activity in Synovial Fluids From Patients With Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Mediators of Inflammation* **6**, 343-348.
- Steinbeck M. J., Nesti L. J., Sharkey P. F., Parvizi J. (2008): Myeloperoxidase and chlorinated peptides in osteoarthritis: potential biomarkers of the disease. *Journal of Orthopaedic Research* **25**, 1128-1135.
- Stürmer T., Brenner H., Koenig W., Gunther K. P. (2004): Severity and extent of osteoarthritis and low grade systemic inflammation as assessed by high sensitivity C reactive protein. *Annals of the Rheumatic Diseases* **63**, 200–205.
- Tamaki Y., Takakubo Y., Goto K., Hirayama T., Sasaki K., Konttinen Y. T., Goodman S. B., Takagi M. (2009): Increased expression of toll-like receptors in aseptic loose periprosthetic tissues and septic synovial membranes around total hip implants. *The Journal of Rheumatology* **36**, 598–608.
- Terčič D., Božič B. (2001): The basis of the synovial fluid analysis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **39**, 1221-1226.
- Thomas P., Braathen L. R., Dörig M., Auböck J., Nestle F., Werfel T., Willert H. G. (2009): Increased metal allergy in patients with failed metal-on-metal hip arthroplasty and periprosthetic T-lymphocytic inflammation. *Allergy* **64**, 1157-1165.
- Urban R. M., Jacobs J. J., Tomlinson M. J., Gavrilovic J., Black J., Peoc'h M. (2000): Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymphnodes of patients with hip or knee replacement. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **82**, 457–476.
- Vaianti E., Scita G., Ceccarelli F., Pogliacomì F. (2017): Understanding the human knee and its relationship to total knee replacement. *Acta Biomedica* **88**, 6-16.
- Van Der Laan L. J., Dopp E. A., Haworth R., Pikkarainen T., Kangas M., Elomaa O., Dijkstra C. D., Gordon S., Tryggvason K., Kraal G. (1999): Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. *The Journal of Immunology* **162**, 939–947.
- Van Der Laan L. J., Kangas M., Dopp E. A., Broug-Holub E., Elomaa O., Tryggvason K., Kraal G. (1997): Macrophage scavenger receptor MARCO: in vitro and in vivo regulation and involvement in the anti-bacterial host defense. *Immunology Letters* **57**, 203–208.
- Van Lent P. L., Blom A. B., Van der Kraan P., Holthuysen A. E. M., Vitters E., Van Rooijen N, Smeets R. L., Nabbe K. C. A. M., Van Den Berg W. B. (2004): Crucial role of synovial

- lining macrophages in the promotion of transforming growth factor beta-mediated osteophyte formation. *Arthritis & Rheumatology* **50**, 103–111.
- Van Weemen B. K., Schuurs A. H. W. M. (1971): Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters* **15**, 232–236.
- Ward P. (1980): Interpretation of synovial fluid data. *Postgraduate Medicine* **68**, 175-184.
- Willert H. G., Buchhorn G. H. (1993): Particle disease due to wear of ultrahigh molecular weight polyethylene. In: Biological, Material, and Mechanical Considerations of Joint Replacement. (Morrey B. F. ed.), Raven Press, New York, U. S. A., 87–102.
- Woolf A. D., Pfleger B. (2003): Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization* **81**, 646-656.
- Xu X., Jackson P. L., Tanner S., Hardison M. T., Roda M. A., Blalock J. E., Gaggar A. (2011): A Self-Propagating Matrix Metalloprotease-9 (MMP-9) Dependent Cycle of Chronic Neutrophilic Inflammation. *Plos One* **6**, doi.org/10.1371/journal.pone.0015781.
- Yoshimura T., Robinson E. A., Tanaka S., Appella E., Leonard E. J. (1989a): Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *The Journal of Immunology* **142**, 1956–1962.
- Yoshimura T., Yuhki N., Moore S. K., Appella E., Lerman M. I., Leonard E. J. (1989b): Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen- stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Letters* **244**, 487–493.
- Yudoh K., Matsuno H., Nakazawa F., Yonezawa T., Kimura, T. (2000): Reduced expression of the regulatory CD4+ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis&Rheumatology* **43**, 617–627.
- Zhao D.-S., Ma G.-F., Selenius M., Salo J., Pikkarainen T., Kontinen Y. T. (2010): Ectopic expression of macrophage scavenger receptor MARCO in synovial membrane-like interface tissue in aseptic loosening of total hip replacement implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **92**, 641–649.
- Ziolkowska M., Koc A., Luszczkiewicz G., Ksiezopolska-Pietrzak K., Klimczak E., Chwalinska-Sadowska H., Maslinski W. (2000): High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *The Journal of Immunology* **164**, 2832-2838.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APC	Allofykocyanin
APC	Antigen prezentující buňky (pozn. rozlišení dle kontextu)
BSA	Hovězí sérový albumin
CRP	C-reaktivní protein
DAMP	Vzory opakující se na vlastních, ale poškozených buňkách
DAPI	4',6-diamidin-2-fenyldiol
Ery	Erytrocyty
FACS	Třídíč buněk
FBS	Fetální bovinní sérum
FITC	Fluorescein isothiokyanát
FL	Fluorescence
FSC	Přímý rozptyl
HA	Kyselina hyaluronová
ICC	Imunocytochemie
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulin G
IL	Interleukin
KI	Konfidenční interval
KOA	Kolenní osteoartróza
LBC	Tekuté médium
Leu	Leukocyty
LPS	Lipopolysacharidy
LYM	Lymfocyty
MAKR	Makrofágy
MARCO	Makrofágový receptor se strukturou podobnou kolagenu
MCP-1	Monocytární chemoatraktivní protein-1
M-CSF	Faktor stimulující kolonie makrofágů
mDC	Myeloidní dendritické buňky
MIP-1a	Makrofágový zánětlivý protein-1a
MMP-9	Matrix metalopeptidasa-9
MON	Monocyty
MON/M Φ	Monocyt/makrofágová linie
MPO	Myeloperoxidasa
M Φ	Makrofágy
NEU	Neutrofil
NO	Oxid dusnatý
OA	Osteoartróza
PAMP	Molekuly typické pro povrch patogenních organismů
PBS	Fosfátový pufr
pDC	Plazmacytoidní dendritické buňky
PE	Fykoerytrin
PerCP-Cy5.5	Peridin-chlorofyl-protein-cyanin 5.5
PMN	Polymorfonukleární leukocyty
PMT	Fotonásobiče
PRR	Receptory rozpoznávající molekulové vzory
RA	Revmatoidní artritida
RANKL	Receptorový aktivátor jaderného faktoru kappa- β ligand

RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted
RPMI	Roswell Park Memorial Institute médium
SSC	Boční rozptyl
ST	Synoviální tekutina
TEP	Totální endoprotéza
TKA	Total knee arthroplasty
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor alfa
TLR	Receptory podobné „Toll“
T-LYM	T-lymfocyty
T _{reg} -LYM	Regulační T-lymfocyty
UHMWPE	Částice polyethylenu o velmi vysoké molekulové hmotnosti