MASARYKOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Funkční vlastnosti subpopulací neutrofilů

Diplomová práce

VOJTĚCH KUNČICKÝ

Vedoucí práce: Mgr. Marcela Vlková, Ph.D.

Ústav biochemie
Program Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví – Bioanalytik

Brno 2024

MUNI
SCI

Bibliografický záznam

Autor: Vojtěch Kunčický
Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Ústav biochemie

Název práce: Funkční vlastnosti subpopulací neutrofilů

Studijní program: Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví – Bioanalytik

Vedoucí práce: Mgr. Marcela Vlková, Ph.D.

Rok: 2024

Počet stran: 133

Klíčová slova: zralé neutrofily, nezralé neutrofily, mitochondrie, mitochondriální obsah, mitochondriální membránový potenciál, mitochondriální superoxid, oxidační vzplanutí

Bibliographic record

Author: Vojtěch Kunčický
Faculty of Science
Masaryk University
Department of Biochemistry

Title of Thesis: Functional characteristics of neutrophils subpopulations

Degree Programme: Bioanalytical laboratory diagnostics in medicine - Bioanalyst

Supervisor: Mgr. Marcela Vlková, Ph.D.

Year: 2024

Number of Pages: 133

Keywords: mature neutrophils, immature neutrophils, mitochondria, mitochondrial content, mitochondrial membrane potential, mitochondrial superoxide, oxidative burst

Abstrakt

Výskyt nezralých neutrofilů v periferní krvi je velmi nízký, u zdravých dospělých tvoří tato populace méně než 1 % ze všech leukocytů. Zvýšené vyplavování nezralých neutrofilů je popisováno u bakteriálních zánětů, septických stavů, ale může se vyskytovat i u nebakteriálních zánětů, např. u kolitidy a pankreatitidy, může být také ovlivněno metabolickými změnami, traumatem a dalšími stavy. Méně je však známo o tom, jaké jsou funkční schopnosti nezralých neutrofilů v porovnání se zralými.

Diplomová práce se zabývá měřením exprese aktivačních a mitochondriálních markerů u zralých a nezralých neutrofilů před a po stimulaci oxidačního vzplanutí metodou průtokové cytometrie. K zjištění mitochondriálního obsahu, mitochondriálního membránového potenciálu a mitochondriálního superoxidu u obou populací neutrofilů byly použity fluorescenční sondy MitoTracker Green FM, MitoTracker Red CMXRos a MitoSOX. Dále byla hodnocena exprese CD16, CD11b a CD66b, jakožto markery aktivace, před i po stimulaci oxidačního vzplanutí. Diplomová práce pak hodnotí rozdíly mezi zralými a nezralými neutrofily po stránce stimulační, kinetické a v reakci na inhibitory metabolismu.

Výsledky diplomové práce ukázaly zásadní rozdíly mezi populacemi zralých a nezralých neutrofilů, a to jak v expresi aktivačních markerů, schopnosti oxidačního vzplanutí, tak i v mitochondriálních vlastnostech.

Abstract

The presence of immature neutrophils in the peripheral blood is very low, in healthy adults this population constitutes less than 1 % of all leukocytes. An increased release of immature neutrophils is observed in bacterial inflammations, septic conditions, but it can also occur in non-bacterial inflammations, such as colitis and pancreatitis, and can be influenced by metabolic changes, trauma, and other conditions. However, less is known about the functional capabilities of immature neutrophils compared to mature neutrophils.

The thesis focuses on measuring the expression of activation and mitochondrial markers in mature and immature neutrophils before and after stimulation of oxidative burst using flow cytometry. Fluorescent probes MitoTracker Green FM, MitoTracker Red CMXRos, and MitoSOX were used to determine mitochondrial content, mitochondrial membrane potential, and mitochondrial superoxide in both neutrophil populations. Furthermore, the expression of CD16, CD11b and CD66b, as activation markers, was evaluated before and after stimulation of the oxidative burst. The thesis then evaluates the differences between mature and immature neutrophils in terms of stimulation, kinetics, and in response to inhibitors of metabolism.

The results of the thesis demonstrated significant differences between populations of mature and immature neutrophils, both in the expression of activation markers, the ability of oxidative burst, and also in mitochondrial properties.

MUNI
SCI

MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KOTLÁŘSKÁ 2, 611 37 BRNO
IČ: 00216224
DIČ: CZ00216224

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2023/2024

Ústav:	Ústav biochemie
Student:	Bc. Vojtěch Kunčický
Program:	Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví - Bioanalytik
Specializace:	Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví - Bioanalytik

Ředitel *ústavu* PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce:	Funkční vlastnosti subpopulací neutrofilů
Název práce anglicky:	Functional characteristics of neutrophils subpopulations
Jazyk závěrečné práce:	čeština

Oficiální zadání:
Neutrofily hrají ústřední roli v reakcích nespecifické imunity. V krvi představují nejpočetnější populaci leukocytů. Při poškození tkáně nebo infekci neutrofily putují z krevního řečiště postupnými kroky až do cílové tkáně, kde vykonávají své funkce. Neutrofily mají různé metody k zabíjení napadajících mikroorganismů, včetně degranulace, fagocytózy, respiračního vzplanutí neutrofilních a tvorby extracelulárních pastí (NETs).

Mitochondrie jsou jednou z nejdůležitějších organel v eukaryotických buňkách. Jsou elektrárnou eukaryotických buněk, protože zde se efektivně vyrábí adenosintrifosfát oxidativní fosforylací. Použitím specifických barviv bylo zjištěno, že mitochondrie v neutrofilech vytvářejí komplexní sítě procházející cytoplazmou. Nyní je známo, že mitochondrie mají v neutrofilech několik důležitých funkcí, a to: vývoj/diferenciace, adheze/migrace, respirační vzplanutí, tvorba NETs a smrt.

Naše předchozí výzkumy ukázaly, že nezralé neutrofily, které se ve velmi nízkém počtu nacházejí v periferní krvi, nejsou schopny oxidačního vzplanutí. Abychom lépe pochopili příčinu tohoto chování, bude student sledovat pomocí mitochondriálních barviv na zralých a nezralých neutrofilech obsah mitochondrií, potenciál mitochondriální membrány a mitochondriální superoxid pomocí průtokové cytometrie u funkčních testů neutrofilů. Měření bude vyhodnoceno v souvislosti se změnami povrchových markerů, jejichž exprese se na obou populacích neutrofilů liší. Práce bude zahrnovat kromě zvládnutí teoretického základu, také vlastní provedení měření, včetně jeho vyhodnocení a statistického zpracování výsledků.

Literatura: Plucarová, Terezie. Funkční vlastnosti LDN. Brno, 2021. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská Fakulta, Ústav klinické imunologie a alergologie. Vedoucí práce Mgr. Marcela Vlková, Ph.D.

Blažková, Gabriela. Sledování změn exprese povrchových markerů zralých a nezralých neutrofilů při oxidačním vzplanutí u pacientů po traumatu nebo chirurgickém zákroku. Brno, 2022. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská Fakulta, Ústav klinické imunologie a alergologie. Vedoucí práce Mgr. Marcela Vlková, Ph.D.

Monteiro LB, Davanzo GG, de Aguiar CF, Moraes-Vieira PMM. Using flow cytometry for mitochondrial assays. MethodsX. 2020 May 28;7:100938. doi: 10.1016/j.mex.2020.100938. PMID: 32551241; PMCID: PMC7289760.

Vedoucí práce:	Mgr. Marcela Vlková, Ph.D.
Datum zadání práce:	10. 11. 2022
V Brně dne:	8. 5. 2024

Bc. Vojtěch Kunčický, 10. 11. 2022
Mgr. Marcela Vlková, Ph.D., 17. 4. 2024
RNDr. Jitka Kašparovská, Ph.D., 17. 4. 2024

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Poděkování

Chtěl bych především poděkovat Mgr. Marcele Vlkové, Ph.D. za její odborné vedení, trpělivost, cenné rady, ochotu a všechen čas, který mi věnovala při psaní této diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat všem mým blízkým za nekonečnou podporu po celou dobu studia.

Obsah

Seznam obrázků 15

Seznam tabulek 17

Seznam pojmů a zkratek 18

1 Úvod 23

2 Neutrofilní granulocyty 25

2.1 Vývoj neutrofilů 25
2.2 Efektorové funkce neutrofilů 26
2.3 Subpopulace neutrofilů 30
2.4 Povrchové receptory a fenotypové znaky neutrofilů 32
2.5 Metabolismus neutrofilů 38
2.6 Mitochondrie a obecná role v energetickém metabolismu 40
2.7 Role mitochondrií neutrofilů 43
2.8 Měření vlastností neutrofilů pomocí průtokové cytometrie 47

3 Průtoková cytometrie 49

4 Praktická část 51

4.1 Zaměření a cíl práce 51
4.2 Použité roztoky 51
4.3 Použité přístroje a pomůcky 52
4.4 Pracovní postup 52
4.5 Charakteristika jednotlivých populací neutrofilů a jejich mitochondrií 57
4.6 Gatovací strategie 57
4.7 Základní analýza sledovaných znaků 59
4.8 Výsledky aktivace neutrofilů s odlišnými stimulancii 63
4.9 Výsledky aktivace neutrofilů s různou dobou stimulace S. aureus (kinetický pokus) 74
4.10 Základní analýza sledovaných znaků při metabolickém testování 86
4.11 Výsledky aktivace neutrofilů při metabolickém testování 91

5 Diskuse **105**

6 Závěr **122**

Použité zdroje **124**

Seznam obrázků

Obr. 1: Schéma Krebsova cyklu včetně glykolýzy, glutaminolýzy a FAO 42
Obr. 2: Schéma elektronového transportního řetězce s OXPHOS 42
Obr. 3: Shrnutí významu mitochondrií neutrofilů 47
Obr. 4: Gatovací strategie u nestimulovaného vzorku s MTS 58
Obr. 5: Gatovací strategie u vzorku stimulovaného pomocí S. aureus s MTS 58
Obr. 6: Srovnání exprese MFI CD16, CD11b a CD66b mezi zralými a nezralými neutrofily po použití různých stimulancií 60
Obr. 7: Srovnání exprese MFI MTG, MTR a MTS mezi zralými a nezralými neutrofily po použití různých stimulancií 62
Obr. 8: Srovnání změn exprese CD16 u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia 63
Obr. 9: Srovnání změn exprese CD16 u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia 64
Obr. 10: Srovnání změn exprese CD11b u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia 65
Obr. 11: Srovnání změn exprese CD11b u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia 66
Obr. 12: Srovnání změn exprese CD66b u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia 67
Obr. 13: Srovnání změn exprese CD66b u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia 68
Obr. 14: Srovnán změn exprese MTS u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia 69
Obr. 15: Srovnání změn exprese MTS u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia 70
Obr. 16: Srovnání změn exprese MTG u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia 71
Obr. 17: Srovnání změn exprese MTG u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia 72
Obr. 18: Srovnání změn exprese MTR u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia 73
Obr. 19: Srovnání změn exprese MTR u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia 74
Obr. 20: Srovnání změn exprese CD16 u zralých živých neutrofilů v čase 75
Obr. 21: Srovnání změn exprese CD16 u nezralých živých neutrofilů v čase 76
Obr. 22: Srovnání změn exprese CD11b u zralých živých neutrofilů v čase 77
Obr. 23: Srovnání změn exprese CD11b u nezralých živých neutrofilů v čase 78
Obr. 24: Srovnání změn exprese CD66b u zralých živých neutrofilů v čase 79
Obr. 25: Srovnání změn exprese CD66b u nezralých živých neutrofilů v čase 80
Obr. 26: Srovnání změn exprese MTG u zralých živých neutrofilů v čase 81
Obr. 27: Srovnání změn exprese MTG u nezralých živých neutrofilů v čase 82

Obr. 28: Srovnání změn exprese MTR u zralých živých neutrofilů v čase 83
Obr. 29: Srovnání změn exprese MTR u nezralých živých neutrofilů v čase 84
Obr. 30: Srovnání změn exprese MTS u zralých živých neutrofilů v čase 85
Obr. 31: Srovnání změn exprese MTS u nezralých živých neutrofilů v čase 86
Obr. 32: Srovnání exprese CD16, CD11b a CD66b mezi zralými a nezralými neutrofily při metabolickém testování 88
Obr. 33: Srovnání exprese MTG, MTR a MTS u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování 90
Obr. 34: Srovnání exprese CD16 u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování 92
Obr. 35: Srovnání exprese CD11b u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování 94
Obr. 36: Srovnání exprese CD66b u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování 96
Obr. 37: Srovnání exprese MTG u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování 98
Obr. 38: Srovnání exprese MTR u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování 100
Obr. 39: Srovnání exprese MTS u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování 102
Obr. 40: Srovnání oxidačního vzplanutí u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování 104
Obr. 41: Procentuální srovnání změn exprese CD16, CD11b a CD66b mezi zralými a nezralými neutrofily po použití různých stimulancií 107
Obr. 42: Procentuální srovnání změn exprese MTG, MTR a MTS mezi zralými a nezralými neutrofily po použití různých stimulancií 110
Obr. 43: Procentuální srovnání změn exprese CD16, CD11b a CD66b mezi zralými a nezralými neutrofily po stimulaci SA v čase 112
Obr. 44: Procentuální srovnání změn exprese MTG, MTR a MTS mezi zralými a nezralými neutrofily po stimulaci SA v čase 114
Obr. 45: Procentuální srovnání exprese CD16, CD11b a CD66b mezi zralými a nezralými neutrofily při metabolickém testování 120
Obr. 46: Procentuální srovnání exprese MTG, MTR a MTS mezi zralými a nezralými neutrofily při metabolickém testování 121

Seznam tabulek

Tab. 1: Pipetovací protokol MTG+MTR 56
Tab. 2: Pipetovací protokol MTS 56
Tab. 3: Pipetovací protokol DHR 56

Seznam pojmů a zkratek

2DG	–	2-deoxy-D-glukóza
2DG6P	–	2-deoxy-D-glukóza-6-fosfát
ACKRs	–	atypical chemokine receptors
ADP	–	adenosindifosfát
AF700	–	Alexa Fluor 700
APC	–	allophycocyanin
APC-Cy™7	–	allophycocyanin-cynanine Cy™7
ATP	–	adenosintrifosfát
BLT	–	leukotrien B4 receptor
BPTES	–	bis-2-(5-phenylacetamido-1, 3, 4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulphide
C3aR	–	complement component 3a receptor
C5aR1	–	complement component 5a receptor 1
CCR	–	CC chemokine receptor
CCRL2	–	CC chemokine receptor-like 2
CD	–	cluster of differentiation
CEA	–	carcinoembryonic antigens
CFU-G	–	colony forming unit – granulocytes
CFU-M	–	colony forming unit – monocytes
CLEC2	–	C-type lectin-like receptor 2
CLRs	–	C-type lectin receptors
CoA	–	koenzym A
CpG	–	cytosin-fosfát-guanin
CSF	–	colony-stimulating factor
CVID	–	common variable immunodeficiency
CXCL	–	C-X-C chemokine ligand
CXCR	–	C-X-C chemokine receptor

DHR – dihydrorhodamin
DMSO – dimethylsulfoxid
DNA – deoxyribonukleová kyselina
DNP – 2,4-dinitrofenol
dsRNA – dvouvláknová ribonukleová kyselina
ER – endoplazmatické retikulum
ETC – electron transfer chain
FAD/$FADH_2$ – flavinadenindinukleotid
FAO – fatty acid oxidation
FCCP – karbonylkyanid-p-trifluormethoxyfenylhydrazon
fMLP – N-formyl-methionin-leucil-phenylalanin
FPR – formyl peptide receptor
FSC – forward scatter
G-CSF – granulocyte colony-stimulating factor
GLC – glukóza
GLUT – glucose transporters
GM-CSF – granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GPI – glykosilfosfatidylinositol
HDN – high density neutrophils
HIV – human immunodeficiency virus
HLA – human leukocyte antigens
ICAM-1 – intercellular adhesion molecule-1
IFN – interferon
IgG – imunoglobulin G
IL – interleukin
iNOS – inducibilní NO synthasa
ITAM – immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
JAK3 – Janus kináza 3

JAM	–	juncitonal adhesion molecule
LCA	–	leukocyte common antigen
LDG	–	low density granulocytes
LDNs	–	low density neutrophils
LFA-1	–	leukocyte function associated molecule-1
LPS	–	lipopolysacharid
LRR	–	leucine rich repeat
LTB_4	–	leukotrien B_4
Mac-1	–	macrophage-1 antigen
MCL	–	macrophage C-type lectin
MCU	–	mitochondrial calcium uniporter
MDL-1	–	myeloid DAP12-associating lectin-1
MDSCs	–	myeloid-derived suppressor cells
MFI	–	mean fluorescence intensity
MFN2	–	mitofusin 2
MHC	–	major histopatibility complex
MICU1	–	mitochondrial calcium uptake 1
MPA	–	3-mercaptopicolinic acid
MPL	–	monoklonální protilátky
MPO	–	myeloperoxidáza
mtDNA	–	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
MTG	–	MitoTracker Green FM
mTOR	–	mamalian target of rapamycin
MTR	–	MitoTracker Red CMXRos
mtROS	–	mitochondriálních ROS
MTS	–	MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator
N/C	–	nukleocytoplazmatický poměr
NADPH	–	nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NDNs	–	normal density neutrophils
NETs	–	neutrophil extracellular traps
NLRP3	–	NLRs family pyrin domain containing 3
NLRs	–	NOD-like receptors
NO	–	oxid dusnatý
NOD	–	nucleotide-binding oligomerization domain
OXPHOS	–	oxidative phosphorylation
PB	–	Pacific Blue
PO	–	Pacific Orange
PAF	–	platelet-activating factor
PAFR	–	platelet activating factor receptor
PBMCs	–	peripheral blood mononuclear cells
PBS	–	posphate buffered saline
PC7	–	R phycoerythrin cyanin 7
PE	–	phycoerythrin
PECAM-1	–	platelet endothelial cellular adhesion molecule-1
PKC	–	proteinkináza C
PMA	–	forbol-12-myristát-13-acetát
PMN-MDSC	–	polymorphonuclear-myeloid-derived suppressor cells
PPP	–	pentóza fosfátový cyklus
PRRs	–	pattern recognition receptors
PSGL-1	–	P-selectin glycoprotein ligand-1
RLRs	–	RIG-like receptors
RPMI	–	Roswell Park Memorial Institute
SA	–	Staphylococcus aureus
SkQ1	–	10-(6´-plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium
SLE	–	systémový lupus erythematosus
SSC	–	side scatter

ssRNA	–	jednovláknová ribonukleová kyselina
TANs	–	tumor-associated neutrophils
TCA	–	tricarboxylic acid
TLRs	–	toll-like receptors
TNF-α	–	tumor necrosis factor α

1 Úvod

Neutrofilní granulocyty jsou nejpočetnější populací leukocytů a důležitou součástí vrozené imunity. Neutrofilní granulocyty můžeme z vývojového hlediska rozdělit na dvě subpopulace, a to zralé a nezralé neutrofily. Nezralé neutrofily za fyziologických podmínek tvoří v periferní krvi velmi malé množství z celkového počtu neutrofilů. Ačkoli je jejich výskyt v periferní krvi dobře znám, tak je velmi málo známo ohledně chování jejich aktivačních markerů a mitochondrií po stimulaci oxidačního vzplanutí.

U zralých neutrofilů je dobře zdokumentováno jejich chování při stimulaci oxidačního vzplanutí včetně změn aktivačních markerů i chování mitochondrií včetně tvorby mitochondriálního superoxidu. Naopak tomu je u nezralých neutrofilů, kdy tyhle informace nejsou dobře zdokumentovány a existuje velmi málo odborných publikací zabývajících se tím, jak se mění jejich aktivační markery před a po stimulaci oxidačního vzplanutí, jaká je kinetika těchto změn a jak se odlišují od zralých neutrofilů. Stejně tomu je i u mitochondrií, kdy v odborné literatuře existuje velmi málo informací o rozdílech v tvorbě mitochondriálního superoxidu mezi zralými a nezralými neutrofily včetně dalších mitochondriálních vlastností u nezralých neutrofilů po stimulaci oxidačního vzplanutí.

V diplomové práci se zabýváme měřením aktivačních markerů neutrofilů před a po stimulaci oxidačního vzplanutí pomocí průtokové cytometrie, kdy byla hodnocena exprese CD16, CD11b a CD66b, a dále měřením mitochondriálních markerů, konkrétně mitochondriálního obsahu, mitochondriálního membránového potenciálu a mitochondriálního superoxidu pomocí fluorescenčních sond MitoTracker Green, MitoTracker CMXRos a MitoSOX. V neposlední řadě byla také měřena schopnost oxidačního vzplanutí obou populací neutrofilů a pomocí různých inhibitorů a média s glukózou jsme měřili změny všech výše uvedených markerů při ovlivnění metabolických pochodů. Pro rozpoznání a porozumění rozdílů chování aktivačních markerů a mitochondrií populací zralých a nezralých neutrofilů před a po stimulaci oxidačního vzplanutí jsme si vytyčili 8 hypotéz, na které se tato práce snaží odpovědět. Hypotézy jsou tyto:

1. **Nezralé neutrofily nemají schopnost reagovat na stimulaci různými stimulancii jako zralé neutrofily.**
2. **Kinetika změn sledovaných znaků zralých i nezralých neutrofilů po stimulaci je pro obě populace srovnatelná.**
3. **U zralých a nezralých neutrofilů je před i po stimulaci srovnatelný obsah mitochondrií.**
4. **Nezralé i zralé neutrofily reagují srovnatelně na stimulaci různými stimulancii zvýšením mitochondriálního potenciálu.**
5. **Nezralé i zralé neutrofily reagují srovnatelně na stimulaci různými stimulancii zvýšenou produkcí mitochondriálního superoxidu.**

6. **Zralé i nezralé neutrofily reagují při oxidačním vzplanutí za přítomnosti různých inhibitorů a glukózy stejným způsobem.**
7. **Pro mitochondrie zralých i nezralých neutrofilů je při aktivaci rozhodující dostupnost glukózy.**
8. **Změna exprese všech tří zkoumaných aktivačních markerů po stimulaci neutrofilů je ovlivněna dostupností glukózy.**

2 Neutrofilní granulocyty

Neutrofilní granulocyty nebo také neutrofily jsou nejsilnější obrannou složkou vrozené imunity a tvoří za fyziologických podmínek nejpočetnější populaci leukocytů v krevním oběhu. Tvoří 50-70 % z celkového počtu cirkulujících leukocytů, absolutní počet je pak 2-7 x 10^9/l. Jsou převažujícím druhem buněk při akutním zánětu. Jejich hlavním úkolem je ochrana před mikrobiálními infekcemi, především bakteriálními a houbovými.[1–4]

Jakákoli dysfunkce neutrofilů včetně poruch vývoje na kterékoli úrovni způsobuje těžké poruchy imunity.[1]

2.1 Vývoj neutrofilů

Neutrofily vznikají v kostní dřeni, kde probíhá i jejich kompletní vývoj. Během infekce může být produkce neutrofilů až 10x navýšena. Fyziologicky tvoří neutrofilní vývojová řada až 60 % všech jaderných elementů v kostní dřeni.[2]

Neutrofilní granulocyty mají původ v pluripotentní kmenové buňce v kostní dřeni.[3] Z té se následně diferencují kmenové buňky pro granulopoézu CFU-G (colony forming unit – granulocytes) a monocytodendritický prekurzor CFU-M (colony forming unit – monocytes). Morfologicky odlišujeme několik buněčných elementů během vývoje neutrofilů, a to v pořadí myeloblast → promyelocyt → myelocyt → metamyelocyt → tyč → segmentovaný neutrofil. V krevním řečišti se fyziologicky nacházejí pouze segmentované neutrofily a v určitém počtu i tyče.[4]

Myeloblast, první morfologicky odlišitelné stadium vývoje, je 10-18 µm velký element s vysokým N/C (nukleocytoplazmatickým) poměrem a jemným chromatinem. V cytoplazmě můžeme nacházet azurofilní neboli primární granula vykazující pozitivní reakci na myeloperoxidázu(MPO).[4] Primární granula kromě MPO obsahují také membránové receptory CD63 (cluster of differentiation), CD68, CD66c nebo stomatin a také serinové proteázy včetně proteinázy 3, elastázy, katepsinu G a defensiny.[4–6]

Promyelocyt je větší než myeloblast s průměrem 12-20 µm. Jádro mívá excentricky uložené s jedním či více jadérky a hrubším chromatinem. Bývá patrné i projasnění cytoplazmy v blízkosti jádra v Golgiho zóně. V cytoplazmě nacházíme četná primární granula.[4]

U myelocytu dochází ke snížení N/C poměru s hrubším chromatinem a výskytu specifické sekundární granulace v cytoplazmě (neutrofilní, bazofilní, eosinofilní). Sekundární granula jsou negativní na myeloperoxidázu, ale jsou pozitivní na znaky CD15, CD66b a CD66a. Obsahují např. kolagenázu, lysozym, heparinázu, histaminázu, resistin, NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfát) oxidázu a laktoferin, který při uvolnění aktivuje katepsin G a serinové proteinázy a aktivuje tak nespecifické

imunitní reakce. Zároveň dochází k výskytu i terciálních granul obsahujících především lysozym, želatinázu a membránové receptory CD11b/CD18, CD67.[3–6] Želatinázový protein je tvořen mimo jiné arginázou 1, enzymem rozkládajícím arginin.[6]

Metamyelocyty jsou menší než myelocyty a jádro má ledvinovitý tvar. Jedná se o poslední vývojové stadium granulocytů vyskytující se fyziologicky pouze v kostní dřeni.[4]

Tyče a segmenty se postupně uvolňují do krevní cirkulace a morfologický rozdíl mezi nimi je dle různých autorů odlišný. Někteří autoři definují rozdíl mezi tyčemi a segmenty jako poměr nejtlustší a nejtenčí části jádra, který musí být u segmentu menší než 1/3.[4] Všeobecně ale obě formy neutrofilů obsahují primární, sekundární a terciární granula s tím, že segmenty obsahují navíc sekreční granula (vesikly), která se nepovažují za pravá neutrofilní granula, nýbrž slouží jako důležitý rezervoár membránových receptorů (např. CD10, CD11b/CD18).[6]

Zralé buňky setrvávají v kostní dřeni ještě přibližně 5 dní před uvolněním do krevní cirkulace, kde je poločas jejich života asi 6 hodin. Přesný mechanismus uvolňování granulocytů do krve není přesně znám. Denní obrat neutrofilů se odhaduje na $1{,}7 \times 10^9$ buněk na kilogram, jedná se o proces s přísnou regulací.[2–4]

Celý vývoj neutrofilů (granulocytů) je řízen pomocí CSF (colony-stimulating factor), IL (interleukinů) a dalších cytokinů, receptorů a stromatálních buněk hemopoetických orgánů (kostní dřeň). Ty tvoří především makrofágy, endotelie, retikulocyty a další.[4]

V průběhu vývoje dochází jak ke zmenšení celkového objemu buňky, tak i ke kondenzaci jádra, a především k tvorbě granulace, kdy jednotlivé druhy granul obsahují substance esenciální pro správné fungování neutrofilů.[4,6]

Fenotypově můžeme rozdělit neutrofily v periferní krvi na zralé a nezralé pomocí exprese znaků CD16, CD11b nebo také CD10 či CD62L.[7–9] U zralých neutrofilů očekáváme vysokou expresi CD10, CD11b a CD16, kdy především exprese znaku CD16 se zvyšuje s vyzráváním neutrofilu související se segmentací jádra. Tyče mohou tedy mít nižší expresi znaku CD16.[8] Exprese těchto znaků také podléhá rozdílům dle aktivačního stavu buňky.[8,10]

Při bakteriálních infekcích a obzvlášť u sepse můžeme pozorovat tzv. posun doleva, kdy dochází k navýšení granulopoézy v kostní dřeni a vyplavování nezralých neutrofilů do periferní krve. K posunu doleva také dochází při arteficiálním podávání G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor).[11]

2.2 Efektorové funkce neutrofilů

Mezi hlavní efektorové funkce neutrofilů patří fagocytóza, vytvoření fagolysozomu, tvorba ROS (reactive oxygen species – reaktivní metabolity kyslíku), degranulace

a v neposlední řadě netóza. S tím souvisí i funkce neutrofilu dostat se do místa zánětu pomocí chemotaxe, adheze a diapedézy.[1,3]

2.2.1 Chemotaxe a adheze

V místě zánětu dochází ke zvýšené expresi adhezivních receptorů na endotelu cév. To je způsobeno uvolňováním prozánětlivých cytokinů, které zprostředkovávají chemotaxi neutrofilů (i dalších leukocytů) a následně dochází k jejich adhezi ke stěně endotelu.[5]

V první fázi adheze dochází ke zvýšení exprese selektinů (P, L a E) na povrchu endotelu působením prozánětlivých cytokinů. Cirkulující leukocyty pod vlivem chemotaktických signálů reagují s takto exprimovanými selektiny skrze sacharidové struktury na svém povrchu, zde se uplatňuje především PSGL-1 (P-Selectin glycoprotein ligand-1). Tím dochází v první fázi adheze ke zpomalení pohybu neutrofilu a tzv. rollingu, kdy se neutrofil kutálí po povrchu endotelu.[5]

V druhé fázi adheze dochází k vazbě neutrofilních integrinů, především LFA-1 (leukocyte function associated molecule-1), exprimovaných na jejich povrchu k endoteliálnímu glykoproteinu ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). Tím dojde k pevnému přilnutí neutrofilu k endotelu. Následuje proces diapedézy, kdy dojde k rozrušení pevné vazby endotelových buněk a průniku neutrofilu skrze endotel. Zde hrají role molekuly endotelu PECAM-1 (platelet endothelial cellular adhesion molecule-1), JAM (juncitonal adhesion molecule) a kadheriny.[1,5]

Neutrofil následně cestuje tkání ve směru chemotaktického gradientu, což je spojeno s aktivní přestavbou cytoskeletu buňky. Neutrofil takto cestuje až do místa zánětu, kde se snaží zachytit pomocí svých receptorů molekuly a reagovat na ně fagocytózou. Jako chemoatraktanty můžou působit např. IL-8, složka komplementu C5a a bakteriální peptid fMLP (N-formyl-methionin-leucil-phenylalanin).[5,12]

2.2.2 Fagocytóza a tvorba ROS

Fagocytóza je evolučně velmi starý proces, kdy dochází k pohlcení extracelulární částice vchlípením cytoplazmatické membrány. Fagocytózu ovládají kromě neutrofilů také makrofágy (monocyty) a dendritické buňky.[1]

Samotný proces fagocytózy začíná tím, že neutrofil identifikuje antigenní strukturu nebo opsoniny pomocí receptorů (PRRs – pattern recognition receptors) na svém povrchu. Následně dochází k rozvolnění cytoplazmy a obejmutí částice výběžky cytoplazmy (pseudopodiemi) až je částice kompletně obklopena, dostává se dovnitř neutrofilu a vzniká tak fagozom. Neutrofil následně pomocí dvou mechanismů se snaží zlikvidovat (usmrtit) fagocytovanou částici, a to na kyslíku nezávislými mechanismy a na kyslíku závislými mechanismy.[1,5]

Po vzniku fagozomu dochází k jeho fúzi s lysozomem, který obsahuje četné mikrobicidní látky (např. defenziny) a hydrolytické enzymy (např. lysozym či katepsiny),

za vzniku fagolysozomu. Cílem těchto látek je degradace a narušení mikrobiální stěny a degradace bílkovin obsažených ve fagolysozomu. Zároveň dochází ke snížení pH k vytvoření optimálního prostředí pro funkci proteináz. Jedná se o na kyslíku nezávislém mechanismu.[1,5]

Při na kyslíku závislém mechanismu zabíjení dochází k vysoké spotřebě kyslíku v aktivovaném neutrofilu nazývané jako oxidační (respirační) vzplanutí. Vznikají tak reaktivní metabolity kyslíku, které eliminují částice uvnitř fagolysozomu, ale mohou být uvolňovány i mimo buňku. ROS jsou velmi účinnou a jednou z hlavních složek vrozené imunity při boji proti bakteriím a houbám.[1] ROS způsobují peroxidace lipidů buněčné stěny mikrobů a tím dochází postupně k jejich usmrcení.[13] Ústředním enzymem oxidačního vzplanutí je NADPH oxidáza, taktéž označována jako NOX2, která zajišťuje tvorbu superoxidového aniontu $O_2^{\cdot -}$. Následnými reakcemi dochází k tvorbě dalších ROS jako je peroxidu vodíku H_2O_2, hydroxylový radikál $OH^{\cdot}$, hydroxylový aniont OH^- a singletový kyslík $^1O_2$.[5,12,14] Důležitým enzymem je myeloperoxidáza, která umožňuje reakci mezi H_2O_2 a chlorem (Cl^-) za vzniku kyseliny chlorné (HClO), hydroxylových radikálů a chloraminů, které přispívají k mikrobicidní kapacitě neutrofilu.[6]

Ústřední enzym tvorby ROS NADPH oxidáza je multimolekulární komplex skládající se z několika jednotek, přičemž část je membránově vázaná a část volně v cytoplazmě. Membránově vázaná část je tvořena katalytickou jednotkou gp91phox (NOX2) se dvěma hemy a FAD (flavinadenindinukleotid) a dále regulační jednotkou p22phox, dohromady tvoří flavocytochrom B558. Cytoplazmatická část je tvořena komplexem čtyř regulačních proteinů p47phox, p67phox, p40phox a Rac2. Regulační protein p47phox působí jako organizátor a p67phox jako aktivační podjednotka, a dohromady jsou svázány pomocí proteinu p40phox. Ke spojení cytoplazmatické s membránově vázanou částí dochází pouze při příslušné aktivaci fagocytu. Po stimulaci (např. patogenními nebo chemickými molekulami) je p47phox fosforylován proteinkinázou C (PKC), a to umožní jeho vazbu na membránově vázaný p22phox. p47phox a p67phox jsou spolu svázány, tudíž nově vzniklá vazba mezi p22phox a p47phox vede k propojení všech jednotek NADPH oxidázy. p67phox se přímo váže na Rac, čímž usnadňuje transport Rac do plazmatické membrány.[14,15]

Po úplném sestavení přenáší komplex elektrony jako hydridové ionty H^- z NADPH na FAD. Tento krok je zprostředkován za účasti p67phox. Z FAD jsou elektrony přenášeny dvěma molekulami hemu jednotky gp91phox přes membránovou část komplexu a na druhé straně membrány se elektrony přenášejí na molekulární kyslík za vzniku superoxidového aniontu.[14,15]

Rozložení na dva komplexy zabraňuje spontánní aktivaci NADPH oxidázy, a tedy nechtěnému poškození vlastních buněk. Umožňuje tak regulovat tvorbu ROS na několika úrovních.[5,14]

V místě infekce tedy dochází k rozpoznání patogenu pomocí různých receptorů na povrchu neutrofilu, což způsobí aktivaci různých antimikrobiálních signálních kas-

kád vedoucí k jejich odstranění. Z pohledu tvorby ROS můžeme odlišit dva stupně aktivace, a to priming, který připraví buňku k mohutnější aktivaci NADPH oxidázy, a samotnou aktivaci signální dráhy vedoucí k tvorbě ROS.[14]

2.2.3 Degranulace

Další možnou efektorovou funkcí neutrofilů je degranulace. Při degranulaci dochází k uvolnění mediátorů pocházejících z granul neutrofilu do okolí. Vzhledem k tomu, že složky granul jsou silně cytotoxické, je potřeba, aby byl celý proces degranulace silně regulován. Neutrofily cirkulující v krvi jsou v klidovém stavu a k degranulaci dochází až v místě zánětu, kde neutrofil může získat patřičné signály potřebné k aktivaci. Problém může ale nastat např. při sepsi, kdy dochází k předběžné aktivaci neutrofilů a ty následně vykazují 10 až 20násobné zvýšení reakce po obdržení sekundárního stimulu v místě zánětu. Tím dochází k většímu poškození tkáně v místě zánětu a poškození zdravé tkáně.[2]

Degranulace vyžaduje dva sety binárních signálů. První je závislý na adhezi a druhý je závislý na ligandu při aktivaci imunních receptorů. V prvním kroku při adhezi je nutné, aby β2-integriny aktivovaly Src, Fgr a Hck kinázy, a tím i signálovou kaskádu. V druhém kroku je nutné, aby došlo k interakci receptor-ligand, konkrétně k vazbě formylovaných peptidů na receptor pro formylované peptidy. Tím dojde k aktivaci Src kináz a uvolnění Ca^{2+} z intracelulárních zásob.[2]

Proces degranulace je postupný, a to tak že se uvolňují v pořadí jako první sekreční váčky → terciární granula → sekundární granula → a primární granula jako poslední. Posloupnost uvolňování granul je důležitá pro správné fungování degranulace, tedy zneschopnit a usmrtit patogen při co nejmenším možném poškození vlastních buněk.[2]

2.2.4 NETóza

NETs (neutrophil extracellular traps) neboli neutrofilní extracelulární pasti jsou velké struktury podobné pavučině tvořeny z rozvolněného chromatinu a v něm vložených cytosolových a granulárních komponentů. NETs tedy obsahují četné mikrobicidní látky jako jsou proteázy či elastáza apod. Chromatin má původ jak z jaderné DNA (deoxyribonukleová kyselina), tak i z mitochondriální DNA. Tvorba NETs je nazývána NETózou a jedná se o druh buněčné smrti, při které dochází k uvolnění těchto pastí.[2,16]

NETózou dochází k zachycení, neutralizování a zabiti bakterií, hub, virů a parazitů. NETóza je považována za určitou funkci neutrofilů k zabránění šíření bakterií a hub. Dysregulovaná NETóza se uplatňuje také v autoimunitních onemocněních, kde mohou uvolněné tělu vlastní struktury sloužit jako antigenní stimul.[16]

Při samotném procesu NETózy dochází k depolarizaci buňky, zabránění působení aktinové dynamiky, rozvolnění jaderné membrány, dekondenzaci jaderného chromatinu a prostoupení takového chromatinu do cytoplazmy, kde dochází k jeho spojení

s cytoplazmatickými a granulárními komponenty. Následně dojde k permeabilizaci plazmatické membrány a k uvolnění NETs do extracelulárního prostoru. Proces NETózy trvá 3-8 hodin od začátku aktivace neutrofilu.[16]

Existuje i druh NETózy, při kterém nedojde k úmrtí neutrofilu, ale dochází k rapidnímu uvolnění chromatinu s granulárními komponenty, přičemž vzniká anukleární cytoplast se zachovanou funkcí fagocytózy.[16]

Stimulací LPS (lipopolysacharid), PMA (forbol-12-myristát-13-acetát) nebo také Staphylococcus aureus můžeme u neutrofilů vyvolat NETózu.[17]

2.3 Subpopulace neutrofilů

Neutrofily můžeme rozdělit hned do několika subpopulací dle jejich funkce a fenotypu a také dle výskytu u specifických onemocnění, jako jsou nádorová onemocnění, autoimunitní či zánětlivá onemocnění.[11,18]

2.3.1 LDNs (low-density neutrophils)

Populace LDNs získala svůj název dle toho, že při rozdělení krve v hustotním gradientu sedimentují společně s PBMC (peripheral blood mononuclear cells) frakcí, kdežto většina neutrofilů sedimentuje společně s erytrocyty a označují se jako NDNs (normal density neutrophils) nebo jako HDNs (high density neutrophils).[18] LDNs se nachází jak u nemocných jedinců, tak i u zdravých, avšak v odlišném počtu a složení.[19] Funkčně mohou být LDNs jak prozánětlivé, tak i imunosupresivní.[18]

Fenotyp této populace neutrofilů je značně rozdílný, stejně tak i jejich funkce, zralost a aktivační stav. Při zánětlivých stavech můžeme najít v této populaci jak zralé, $CD16^{+}$ a $CD11b^{+}$ neutrofily, tak i nezralé $CD16^{low/-}$ a $CD11b^{low/-}$ neutrofily.[18] Nezralé neutrofily mají také nízkou expresi znaku CD62L a redukovanou expresi CD66b a CD45.[20] Co se týče morfologie, tak ve frakci LDNs můžeme najít jak segmentované neutrofily a tyče, tak za určitých okolností i metamyelocyty a mladší vývojová stádia jako myelocyty.[18]

Tato značná heterogenita populace LDNs je také dána tím, že jak nezralé, tak i zralé aktivované neutrofily vykazují odlišné denzitní hodnoty oproti běžným zralým neutrofilům.[18] Tyče a segmenty mají hustotu většinou dosahující přes 1,08 g/ml, kdežto nezralejší formy jako metamyelocyty a myelocyty mají hustotu pod 1,08 g/ml.[21] Přítomnost zralých aktivovaných neutrofilů se dá vysvětlit tím, že u těchto neutrofilů došlo k degranulaci, a tím i ke snížení jejich denzity.[22]

Počet LDNs se zvyšuje při stavech doprovázených imunosupresí a chronickým zánětem. Jsou asociovány s různými onemocněními jako je rakovina, SLE, astma, ale také při infekcích HIV (human immunodeficiency virus) nebo Mycobacterium tuberculosis.[19] Obzvláště při sepsi můžeme pozorovat tzv. posun doleva, kdy dochází ke zvýšení počtu nezralých neutrofilů v krevním oběhu, a s tím i často zvýšené LDNs.[21]

Mezi hlavní funkčně odlišitelné populace neutrofilů tvořící LDN patří imunosupresivní PMN-MDSCs (polymorphonuclear-myeloid-derived suppressor cells), vyskytující se především při těhotenství, rakovině a některých infekcí, a prozánětlivé LDNs označované někdy také jako LDGs (low density granulocytes), vyskytující se převážně u autoimunitních onemocnění jako je SLE (systémový lupus erythematosus), revmatoidní artritida.[11,18]

Prozánětlivé LDNs vykazují zvýšenou schopnost produkce prozánětlivých cytokinů TNF-α (tumor necrosis factor), IFN-γ, IFN-α, IL-17 a zvýšenou tvorbu extracelulárních pastí (NETs). Studie prokázaly, že pro tvorbu NETs jsou pro tyto LDNs esenciální mitochondriální ROS, a nikoli ROS vytvořené enzymem NADPH-oxidáza.[18]

2.3.2 TANs (tumor-associated neutrophils)

Neutrofily zastávají důležité ale i protichůdné role během rakoviny. Jejich fenotypové změny během rakoviny jsou dobře popsány.[22]

Během nádorového onemocnění došlo u myších modelů k vysokému vzrůstu neutrofilů v periferní krvi způsobeného nejspíše produkcí G-CSF a interleukinů tumorem.[22,23] U některých typů rakoviny je zvýšený počet neutrofilů jak v periferní krvi, tak i v nádorovém ložisku, špatný prognostický faktor. I z toho důvodu se může využívat u různých typů rakoviny poměr neutrofilů k lymfocytům v periferní krvi jako určitý prognostický marker rakoviny. Obecně nacházíme tento poměr vyšší u pacientů s agresivním typem rakoviny.[22]

Naopak ale např. u rakoviny žaludku je vyšší poměr neutrofilů k lymfocytům dobrým prognostickým faktorem. Tahle protichůdnost ukazuje, že neutrofily vykazují plasticitu a mohou působit jak proti nádorově, tak i pro nádorově.[22]

TANs můžeme tedy rozdělit na protinádorové TAN1 a pronádorové TAN2. Neutrofily se vyvíjejí v TAN1 nebo TAN2 dle působících cytokinů. Pokusy in vitro bylo také dokázáno, že TAN2 se může změnit v TAN1 pod působením IFN-γ a TNF-α.[24]

TAN2 se podílí na všech stádiích tumorové bujení, včetně tumorové iniciace, proliferace nádoru, metastázování nádoru, nádorovou angiogenezi a imunosupresi.[24]

Protinádorové mechanismy působení neutrofilů zahrnují protilátkově závislou buněčnou cytotoxicitu, přímou cytotoxicitu a aktivaci specifické protinádorové imunity.[24]

2.3.3 MDSCs (myeloid derived suppressor cells)

MDSCs je heterogenní populace imunosupresivních nezralých buněk myeloidní linie. Hrají významnou roli především u rakoviny, ale také u těhotenství a zánětlivých onemocnění (SLE). Můžeme je najít v periferní krvi, slezině, nádorové tkáni anebo v lymfatických orgánech. Počet MDSCs u nádorového onemocnění odpovídá klinickému stádiu onemocnění. Ačkoli je fenotypově podobná populace buněk přítomná i v krvi zdravého jedince, jejich fyziologický význam zůstává v tomhle ohledu neznámý. Můžeme je

rozdělit na dvě skupiny, a to PMN-MDSCs neboli polymorfonukleární skupinu tvořenou granulocyty a M-MDSCs neboli monocytární skupinu.[25,26] MDSCs potlačují nespecifickou imunitou modulováním tvorby cytokinů makrofágy i specifickou imunitní reakci supresí T-buněčné odpovědi.[27]

Fenotypově jsou velmi heterogenní populací. Společné fenotypové znaky pro MDSCs jsou $CD33^+$ $CD11b^+$ $CD14^-$ $HLA\text{-}DR^-$ (human leukocyte antigens) a také bývají $CD15^+$. U pacientů s rakovinou krku a karcinomem ledvin má tato populace také silně exprimovaný znak $CD66b^+$. Všeobecně se dá říct, že MDSCs nevykazují typické fenotypové známky vyzrálých buněk.[26,27]

Studie prokázaly, že MDSCs pro supresi imunitních funkcí vyžadují přímý buněčný kontakt, a tedy působí buď pomocí povrchových receptorů anebo solubilních mediátorů s krátkým poločasem.[27]

Je několik mechanismů, kterými MDSCs potlačují imunitní funkce. Jedním z nich je tvorba enzymu arginázy, který rozkládá v okolním prostředí buňky arginin. Arginin je důležitou aminokyselinou pro proliferaci T-lymfocytů. Nedostatek argininu v prostředí způsobuje inhibici proliferace T-lymfocytů a snižuje jejich expresi CD3. Dále MDSCs exprimují vysoké hodnoty enzymu iNOS (inducibilní NO synthasa), která dává vzniku NO (oxid dusnatý). NO působí na T-lymfocyty jako inhibitor JAK3 (Janus kináza 3), inhibuje expresi MHC (major histopatibility complex) II. třídy a navozuje jejich apoptózu. Dalším imunosupresivní faktorem je produkce ROS, čímž dochází také k inhibici T-lymfocytů.[27]

2.4 Povrchové receptory a fenotypové znaky neutrofilů

Během vývoje prochází neutrofil značnými změnami nutnými ke správnému fungování zralého stádia. S tím je spojená i rozdílná exprese povrchových CD znaků a receptorů jednotlivých stádií vývoje neutrofilu.[10]

Různé druhy povrchových receptorů neutrofilu jsou zahrnuty v buněčné aktivaci a intracelulární signalizaci. To zahrnuje chemoatraktantové receptory, adhezní receptory, cytokinové receptory, a především Fc receptory a PRRs (pattern recognition receptors) jako jsou TLRs (toll-like receptors), NLRs (NOD-like receptors), CLRs (C-type lectin receptors) a RLRs (RIG-like receptors).[28]

Z fenotypových znaků jsou zahrnuty ty znaky, které byly měřeny v praktické části diplomové práce.

2.4.1 Fc receptory

Jedná se o membránově vázané receptory schopné vázat Fc části imunoglobulinů a tím zahájit efektorové mechanismy buněk. Fc receptory se dělí také podle toho, jakou třídu Ig jsou schopné navázat.[29]

Neutrofily exprimují 3 typy Fcγ receptorů, a to FcγRI (CD64), vysoko afinitní receptor exprimován aktivovanými neutrofily, FcγRIIa (CD32a) a FcγRIIIb (CD16b), které jsou nízko afinitní a exprimovány konstantně.[28,30]

FcγRIIa je složen z transmembránové struktury obsahující extracelulární doménu podobnou struktuře imunoglobulinu a intracelulární signalizační složky ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs).[28]

FcγRIIa je aktivační receptor s intracelulární ITAM sekvencí, naopak signalizační kaskáda FcγRIIIb je nejasná, neobsahuje intracelulární ITAM sekvence a je přichycen k membráně pomocí GPI (glykosilfosfatidylinositol) kotvy. Je předpokládáno, že FcγRIIIb zahajuje prvotní kontakt s imunokomplexy následovaný komplexní aktivací buňky způsobenou navázáním i FcγRIIa receptoru k imunokomplexu a že zprostředkovává signalizaci do jádra.[28,30]

Aktivované neutrofily exprimují FcγRI, vysoko afinitní receptor. K expresi dochází v místě zánětu, kde jsou neutrofily vystaveny působení IFN-γ.[31] FcγRI je tedy využíván především jako aktivační marker neutrofilů.[32]

Fcγ receptory jsou esenciální pro fagocytózu patogenů s navázanými IgG (imunoglobulin třídy G) na povrchu. Tato role neutrofilů je velmi důležitá pro obranu hostitele, jak dokazují zjištění u pacientů s CVID (common variable immunodeficiency), kteří mají defektní produkci imunoglobulinů a trpí zvýšenou náchylností k infekcím.[28]

Neutrofily exprimují také FcαR (CD89) receptor pro IgA, který je asociován s Fcγ receptory.[28,30]

Za určitých okolností jsou schopny neutrofily exprese i FcεRI, čímž se můžou podílet na alergických reakcích anebo při určitých onemocněních. Jejich role je ale diskutabilní.[30]

2.4.2 TLRs

Skupina receptorů TLRs rozpoznává jak DAMPs (damage associated molecular patterns), tak i PAMPs (patogen associated molecular patterns). Je velmi důležitou skupinou, co se týče rozpoznávání exogenních mikrobiálních struktur. Existují membránově vázané i intracelulární v endolysozomech. Všechny TLRs jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu, posléze přemístěny do Golgiho komplexu a odtud jsou transportovány buď na buněčnou membránu anebo do endolysozomu.[1,33] Intracelulární TLRs hrají také důležitou roli při tvorbě autoprotilátek u SLE.[33]

Po navázání ligandu na receptor TLRs dochází k tvorbě signálního komplexu označovaného jako signalisom, který aktivuje kaskádu dalších kinázových reakcí jejichž výsledkem je aktivace transkripčních faktorů a následná tvorba cytokinů, aktivace buněčných mechanismů a rozvoj zánětu. Struktura signalisomu a následná aktivace kaskádových reakcí se odlišuje dle třídy TLRs a s tím spojeným ligandem. Schopnost TLRs reagovat na své ligandy může být zesílena koreceptory a tvořením vzájemných funkčních heterodimerů.[5]

Dnes je popsáno 10 různých typů TLRs u lidí, 13 u myší.[33]

Toll-like receptory můžeme nalézt jak na povrchu neutrofilu, tak intracelulárně v endolysozomech. TLRs primárně rozpoznávají PAMPs spojené s bakteriemi, viry a houbami. Mezi povrchové neutrofilní TLRs se řadí TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 a k endolysozomálním se řadí TLR7, TLR8 a TLR9.[34]

TLR2 tvoří heterodimery buď s TLR1 nebo TLR6. Tvorba heterodimeru je závislá na ligandu. TLR2 hraje roli při infekci Gram+ bakteriemi, mykobakteriemi a houbami. Ligandem pro TLR2 jsou lipoproteiny, lipopeptidy, zymosan (kvasinky) a lipoteichová kyselina.[35] Ligandem pro TLR1 je tracylovaný lipopeptid (bakterie a mykobakterie) a pro TLR6 diacylovaný lipopeptid a zymosan.[33]

TLR4 je jedním z nejdůležitějších TLRs během infekce bakteriemi. Jeho ligandem je LPS nacházející se na buněčné stěně Gram− bakterií.[35] Mezi jeho další ligandy patří i endogenní molekuly jako jsou např. heat-shock proteiny nebo fibrinogen.[33] Neregulovaná stimulace TLR4 ovšem vede k nadměrnému zánětlivému stavu doprovázeným endotoxickým šokem a poškozením hostitelských tkání.[36] TLR2 a 4 také hrají roli v patogenezi SLE.[37]

Ligandem TLR5 je flagellin vyskytující se u bakterií s bičíkem (např. Escherichia coli.[33]

Ligandem endolysozomálních TLR7 a TLR8 jsou virové ssRNA (jednovláknová ribonukleová kyselina).[33,35] Ligandem TLR9 je DNA obsahující nemethylované CpG (cytosin-fosfát-guanin) sekvence (bakterie, viry, malárie).[33,37]

2.4.3 CLRs

CLRs nebo také lektinové receptory obsahují ve své struktuře lektinové domény, které jsou schopné specificky vázat určité sacharidové zbytky glykoproteinů a polysacharidů bakterií, plísní a kvasinek.[5]

Nejvýznamnějšími jsou zejména receptory Dectin-1 a Dectin-2 rozeznávající β-glukan a manan na povrchu hub.[1]

CLRs mají omezenou možnost rozpoznávání DAMPs, ale některé z nich jsou schopné vyvazovat určité mediátory zánětu a tím negativně ovlivňovat zánětlivou reakci, např. receptor BDCA (CD303). Tyto receptory se nacházejí především na dendritických buňkách.[5]

Z rodiny C-type lektin receptorů neutrofily exprimují Dectin-1, Mincle, MDL-1 (myeloid DAP12-associating lectin-1), MCL (macrophage C-type lectin) a CLEC2 (C-type lectin-like receptor 2). Signalizace probíhá u většiny CLRs přes ITAM sekvence podobně jako u Fc receptorů. Při aktivaci těchto receptorů dochází ke kompletní aktivaci buňky a efektorových funkcí neutrofilů zahrnující fagocytózu, degranulaci a tvorbu ROS.[30,34]

Dectin-1 je receptorem pro β-glukany vyskytujících se na povrchu hub. Mincle je receptorem pro mykobakteriální struktury, houbu Malassezia (lipofilní kvasinky) a pro některé DAMPs. MDL-1 se účastní nejspíše rozpoznávání virů.[30]

Role CLEC2 a MCL u neutrofilů je nejasná. U CLEC2 je ligandem protein podoplanin, u MCL je ligand neznámý.[30]

2.4.4 NLRs

Jedná se o početně velkou skupinu intracelulárních receptorů, v současnosti je jich identifikováno 22. Jsou velmi důležité při identifikaci intracelulárně parazitujících mikrobů skrze PAMPs. Důležitou roli hrají i při identifikaci DAMPs, které se mohou do nitra buňky uvolnit při ruptuře fagolysosomu.[1,5]

Jejich název je odvozen od jejich centrální strukturní domény NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) usnadňující oligomerizaci. Samotná struktura těchto receptorů je velmi složitá, můžeme rozlišit N terminální část, centrální doménu a C terminální část. C terminální část u většiny těchto receptorů nese sekvenci LRR (leucine rich repeat) pomocí které rozeznávají různé množství PAMPs a DAMPs. V N terminální části se jednotlivé receptory odlišují v doménách určující interakce s dalšími signálními molekulami.[1,5]

U neutrofilů můžeme najít NOD1, NOD2 a NLRP3 (NLRs family pyrin domain containing 3).[30]

NOD1 a NOD2 jsou senzitivní vůči degradačním produktům proteoglykanu bakterií a při ligaci dochází v buňce k aktivaci signalizační kaskády, která končí tvorbou prozánětlivých cytokinů.[30,34]

NLRP3 je taktéž senzitivní vůči bakteriálním produktům a endogenním produktům buněčného poškození jako je ATP (adenosintrifosfát), kyselina močová anebo deplece intracelulárního K^+. NLRP3 ovšem nezpůsobuje tvorbu prozánětlivých cytokinů, ale při ligaci dochází k tvorbě NLRP3 inflamozomu, který vede k proteolytickému štěpení pro-IL-1β a pro-IL-18 zprostředkovaným kaspázou 1.[30]

2.4.5 RLRs

Mezi další intracelulární receptory patří skupina RLRs. Jejich hlavním úkolem je identifikace nukleových kyselin. Po identifikaci PAMPs nebo DAMPs dochází k jejich aktivaci a signální kaskádě, která ve výsledku vede k expresi antivirových genů a k produkci IFN-α (interferon α) a IFN-β (interferon β).[1,5,30]

Neutrofily exprimují intracelulární RIG-1 a MDA5 receptory. Jejich ligandy jsou virové dsRNA (dvouvláknová ribonukleová kyselina).[30]

2.4.6 Chemoatraktantové receptory

Chemoatraktantové molekuly mohou být rozděleny do 4 skupin: chemotaktické lipidy (leukotrieny), formylované peptidy (bakteriální produkty, např. fMLP), komplementové anafylatoxiny (C3a, C5a) a chemokiny (CXCL1 až CXCL3, CXCL5 až CXCL8). Všechny aktivují receptory spřažené s G proteinem. Exprese těchto chemoatraktantových receptorů závisí na zralosti a aktivačním stavu neutrofilu.[38]

Stejně jako se rozdělují chemoatraktanty, tak se i rozdělují chemoatraktantové receptory na 4 skupiny dle jejich ligandů.

2.4.6.1 Receptory pro chemotaktické lipidy

Zde patří BLT1 (leukotrien B4 receptor), BLT2 (leukotrien B4 receptor 2) a PAFR (platelet activating factor receptor). BLT1 je vysoko afinitní receptor pro LTB_4 (leukotrien B_4). BLT2 je naopak nízko afinitní receptor pro LTB_4, ale přítomný ve větší míře na povrchu buněk. Funkce BLT2 není úplně známa, ale signalizace ligandem LTB_4-BLT2 se nejspíš účastní migrace neutrofilů.[38]

PAFR je aktivován molekulou PAF (platelet-activating factor), vysoce prozánětlivý fosfolipid, který je schopný způsobit chemotaxi a aktivaci neutrofilů i v pikomolárních koncentracích. PAFR nejspíše tak plní i obranné funkce díky silnému aktivačnímu potenciálu neutrofilů.[38]

2.4.6.2 Komplementové receptory

Mezi komplementové receptory patří C3aR (complement component 3a receptor) a C5aR1 (complement component 5a receptor 1).[38]

C3aR je aktivován svým ligandem C3a, ale nedochází tak přímo k indukci chemotaxe neutrofilů. Účinek C3a na neutrofily je s největší pravděpodobností sekundární, kdy dochází k aktivaci chemotaxe pomocí eozinofilů, na které působí C3a.[38]

C5aR1 je aktivován ligandem C5a, který působí jako velmi silný zánětlivý mediátor a způsobuje silnou chemotaxi neutrofilů. Neutrofily také mají receptor C5aR2, který ale nepůsobí jako chemoatraktantový receptor, ale nejspíš působí jako důležitý regulátor C5aR1 signalizace.[38]

2.4.6.3 Receptory pro formylované peptidy

Neutrofily exprimují FPR1 a FPR2 (formyl peptide receptor).[38]

FPR1 je vysoce afinitní receptor pro fMLP, který se vyskytuje při bakteriálních infekcích, a především pak při infekcích E. coli. Formylované peptidy jsou brány i jako PAMPs. fMLP indukuje silnou chemotaxi, která může být zvýšena přítomností LPS, který zvyšuje expresi FPR1.[38] Formylované peptidy včetně fMLP mimo chemotaktického potenciálu také aktivují oxidační vzplanutí a tvorbu ROS neutrofily prostřednictvím aktivace FPR.[17]

FPR dokáží mimo jiné také rozpoznat mitochondriální DAMPs a trvalá aktivace neutrofilů tedy umožňuje stabilní udržování zánětu pomocí uvolňování mitochondriálních DAMPs. Mitochondriální DAMPs indukují signalizaci prostřednictvím Ca^{2+} a aktivují MAPK (mitogen-activated protein kinase – řetězec proteinů zprostředkovávající signalizaci z receptoru do jádra), zprostředkovávají chemotaxi a aktivují tvorbu ROS. Mezi další ligandy FPR patří annexin A1 s potenciální protizánětlivou aktivitou.[38]

Vzhledem k různorodosti ligandů mají tedy FPR jak prozánětlivou tak protizánětlivou funkci, dle aktivace patřičným ligandem.[38]

2.4.6.4 Chemokinové receptory

Mezi hlavní receptory důležité pro správný přesun a chemotaxi neutrofilů je CXCR1 (C-X-C chemokine receptor 1) receptor. Jeho exprese není konstantní po čas životního cyklu neutrofilů. Naivní neutrofily vykazují silnou expresi CXCR1, ale aktivované a fagocytující neutrofily vykazují redukovanou expresi CXCR1.[38]

Během vykonávání efektorových funkcí v místě zánětu může neutrofil migrovat mimo zánětlivé místo případně i vejít zpátky do cév. Jedná se o fenomén zvaný reverzní transendoteliální migrace a neutrofily vykonávající tuto migraci mají sníženou expresi CXCR1. Exprese CXCR1 může být ale také snížena reakcí na prozánětlivé podněty, jako je TNF-α a ligandy TLR.[38]

Nejpočetnějším chemokinovým receptorem exprimovaným neutrofily je CXCR2. Je aktivován skrze 7 chemokinů, a to CXCL1 až CXCL3 a CXCL5 až CXCL8 (C-X-C chemokine ligand). Kromě zprostředkovávání migrace neutrofilů do místa zánětu, zprostředkovává signalizace CXCR2 také uvolňování neutrofilů z kostní dřeně. Při aktivaci neutrofilu dochází k snížení exprese CXCR2.[38]

CXCR3 je dalším receptorem z rodiny chemokinových receptorů. Jeho exprese na neutrofilech ovšem není typická a naivní neutrofily z periferní krve jej neexprimují. Exprese CXCR3 byla ale nalezena u neutrofilů izolovaných z plic u pacientů s chronickým zápalem plic a ze synoviální tekutiny u pacientů s revmatoidní artritidou.[38]

CXCR4 je s proteinem G spřažený receptor pro kontinuálně produkovaný chemokin CXCL12. Počet exprimovaných receptorů CXCR4 na neutrofilech závisí na extracelulárních podmínkách, např. při stimulaci LPS došlo k navýšení exprese, a také na stáří neutrofilů, u starších neutrofilů byla větší exprese. Důležitou vlastností reakce CXCR4-CXCL12 je regulace homeostáze neutrofilů. CXCR4 je důležitý regulátor neutrofilních zásob v kostní dřeni a zajišťuje tzv. homing neutrofilů zpět do kostní dřeně, kde dochází k jejich fagocytóze makrofágy, která způsobí uvolňování G-CSF. G-CSF snižuje selektivně expresi CXCR4 v buňkách myeloidní linie v kostní dřeni, a tím způsobuje jejich uvolňování do krevního oběhu.[38]

Dalšími chemokinovými receptory jsou CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 (CC chemokine receptor), ACKRs (atypical chemokine receptors) a CCRL2 (CC chemokine receptor-like 2). Na neutrofilech se vyskytují za fyziologických podmínek CCR1, CCR2, CCR5 a CCRL2. Při pokusech bylo zjištěno, že exprese CCR3 na neutrofilech je podmíněna

působením určitého množství IFN-γ. CCRL2 tvoří heterodimery s CXCR2 a reguluje tak jeho expresi a signalizaci zprostředkovanou aktivací CXCR2.[38]

Neutrofily sice neexprimují receptory ACKRs, ale ACKRs ovlivňují jejich migraci a podílejí se na regulaci zánětu, jelikož fungují jako scavengery pro ligandy chemokinových receptorů.[38]

2.4.7 Vybrané fenotypové CD znaky

V praktické části byly měřeny tyto CD znaky neutrofilů: CD45, CD11b, CD16, CD64, CD66b a CD33.

CD45 nebo také LCA (leukocyte common antigen) je glykoprotein nacházející se na všech jaderných hematopoetických buňkách.[10,39] U neutrofilů se podílí především na chemotaxi a také při rozeznávání antigenních struktur hub.[39]

CD11b je integrinový polypeptid také označovaný jako komplementový receptor 3, který společně s integrinem CD18 tvoří Mac-1-integrin (macrophage-1 antigen). Dohromady zprostředkovává Mac-1-integrin fagocytózu patogenů či apoptických buněk označených iC3b částí komplementu. Je také zapojen do adheze, kdy zprostředkovává vazbu na endoteliální ligand ICAM.[40] Během vývoje neutrofilu dochází k jeho expresi ve stádiu myelocytu a zůstává exprimován s mírně rostoucí tendencí až do finálního stádia vývoje. Větší expresi můžeme vidět u novorozenců anebo starších lidí.[10]

CD16 je Fcγ receptor III s nízkou afinitou. Má dvě formy CD16A a CD16B, z nichž na neutrofilech je exprimována forma CD16B. CD16 je exprimován až na zralejších stádiích vývoje neutrofilu. První exprese začíná ve stádiu metamyelocytu a největší exprese dosahuje ve stádiu segmentu.[10]

CD64 je Fcγ receptor I s vysokou afinitou. Během vývoje je konstantě exprimován až do stádia metamyelocytu a následně dochází k postupnému snížení exprese.[10]

CD66b je glykosylovaný protein patřící do rodiny CEA (carcinoembryonic antigens). Exprese u granulocytů začíná ve stádiu promyelocytu a je exprimován až do zralého stádia segmentu, ale v menší míře než u promyelocytu a myelocytu.[10,41] Jedná se také o aktivační (degranulační) marker granulocytů, účastní se adheze, produkce ROS a degranulace.[41,42]

CD33 je znak fyziologicky exprimován na hematopoetických buňkách monocytární a myeloidní linie.[10] Během vývoje je jeho exprese snížena na zralých granulocytech, ale na monocytech přetrvává.[43]

2.5 Metabolismus neutrofilů

Neutrofily jsou velmi mobilní buňky a s tím souvisí i značné rozdíly v dostupnosti živin v odlišném prostředí. Zprvu bylo předpokládáno, že neutrofily jakožto terminální vývojové stádium využívají pouze jednoduché metabolické procesy jako je glykolýza

pro tvorbu ATP. Později bylo prokázáno, že neutrofily jsou schopné přepínat mezi odlišnými metabolickými cestami dle dostupnosti živin, ale také dle toho, jakým způsobem došlo k jejich aktivaci a jakou efektorovou funkci zrovna vykonávají.[44] Jsou schopné využívat sacharidy, tuky a aminokyseliny a zvyšovat svůj příjem těchto živin pomocí různých membránových transportérů, jejichž exprese se odlišuje dle látek přítomných v prostředí, a také dle toho zda je neutrofil aktivován či nikoli.[45]

Mezi základní metabolické cesty neutrofilů patří glykolýza, glykogenolýza, pentóza fosfátový cyklus (PPP), glukoneogeneze, oxidace mastných kyselin, glutaminolýza a tvorba mastných kyselin. Všechny procesy probíhají buď v cytosolu anebo v mitochondriích.[45]

2.5.1 Glykolýza, glykogenolýza a PPP

Glykolýza je esenciální metabolickou cestou pro většinu imunitních buněk. Začíná příjmem extracelulární glukózy transportéry GLUT (glucose transporters). Neutrofily exprimují transportéry třídy GLUT1, GLUT3 a GLUT4 v rozdílném množství dle jejich aktivace a přítomnosti inzulínu, přičemž při aktivovaném stavu dochází ke zvýšení exprese všech tříd GLUT (za přítomnosti inzulínu) a tím i k zvýšení příjmu glukózy.[45,46] Po vstupu glukózy do nitra buňky dochází okamžitě k její fosforylaci pomocí enzymu hexokináza na glukóza-6-fosfát, čímž se zabrání úniku glukózy z buňky.[47] Při glykolýze dochází ke konverzi glukózy-6-fosfát v pyruvát a vzniku 2 ATP. Následně za dostatečného přístupu kyslíku dochází ke konverzi pyruvátu v acetyl-koenzym A (acetyl-CoA), který je následně oxidován v Krebsově cyklu (citrátový cyklus) v mitochondriích za vzniku redukovaných kofaktorů $FADH_2$ (flavinadenindinukleotid) a $NADH+H^+$. V případě zralých neutrofilů ve větším množství dochází k redukci pyruvátu na laktát a jeho extracelulární sekreci a k menšinové tvorbě acetyl-CoA.[45,47]

Redukované kofaktory, vznikající v Krebsově cyklu, následně vstupují do dýchacího řetězce na vnitřní membráně mitochondrií a dochází ke vzniku velkého množství ATP, sloužícího jako zdroj energie.[48] Za anaerobních podmínek dochází k formování laktátu z pyruvátu enzymem laktátdehydrogenáza.[45] Pokud neutrofil nemá v prostředí přístup ke glukóze, spoléhá se na vlastní zásobní glykogen, který využije ke glykolýze. Zásobní glykogen si tvoří pokud je v prostředí bohatém na glukózu.[44,49]

Další metabolickou cestou glukózy je i PPP. Při PPP dochází ke tvorbě redukovaného kofaktoru NADPH a pětiuhlíkatých sacharidů (pentóz), přičemž NADPH je esenciální pro funkci cytosolové NADPH oxidázy a tvorbu ROS.[44,49]

2.5.2 β-oxidace mastných kyselin

Pokud se neutrofil vyskytne v prostředí bez přístupu ke glukóze a nemá zásoby glykogenu, je schopen se adaptovat k metabolické cestě β-oxidace mastných kyselin (FAO – fatty acid oxidation) probíhající v mitochondriích. Tento proces je dobře popsán v ná-

dorovém prostředí, kde glukóza není dostupná pro neutrofily.[47] Při tomto procesu dochází k oxidaci mastných kyselin za vzniku acetyl-CoA, který vstupuje do Krebsova cyklu.[45] Neutrofily ovšem využívají metabolismus mastných kyselin jako zdroj energie pouze výjimečně. FAO je dále esenciální metabolickou cestou pro správnou efektorovou funkci neutrofilu, kdy například oxidované lipoproteiny navozují formaci NETs.

Neutrofily jsou také schopné tvorby a uvolňování derivátů kyseliny arachidonové jako jsou např. leukotrieny a podporují tak zánětlivou reakci. Role FAO při chemotaxi a apoptóze neutrofilů zůstává zatím nejasná. Neutrofily jsou schopné i syntézy mastných kyselin a fosfolipidů, a to především během diferenciace a také při poškození vlastní cytoplazmatické membrány v místě zánětu.[44,49]

FAO hraje největší roli především při diferenciaci a vývoji neutrofilů v kostní dřeni, kdy neutrofily často využívají proces autofagie jako zdroj mastných kyselin, které následně využívají k tvorbě energie (ATP) procesem FAO s následnou oxidativní fosforylací v mitochondriích. Neutrofily tak udržují energetickou stabilitu, jelikož při vývoji dochází k velké spotřebě energie ve formě ATP.[47,50]

2.5.3 Metabolismus glutaminu

Další možnou metabolickou cestou neutrofilu k získání energie bez přístupu ke glukóze je glutaminolýza. Při tomto procesu vstupuje glutamin do buňky skrze transportéry a v cytosolu dochází k jeho přeměně na glutamát pomocí enzymu glutamináza. Ten následně vstupuje do mitochondrie, kde dochází k přeměně za přítomnosti enzymu glutamátdehydrogenázy na 2-oxoacetát, který vstupuje do Krebsova cyklu, a ke vzniku NADH.[45,51] Glutamin hraje také svou roli při tvorbě ROS a apoptóze.[49]

Glutaminolýza slouží mimo jiné také jako alternativní dráha k tvorbě NADPH. Jedná se tedy o důležitou alternativní cestu ke tvorbě NADPH pro případ, že tvorba NADPH pomocí PPP je nedostatečná.[44]

2.6 Mitochondrie a obecná role v energetickém metabolismu

Mitochondrie jsou esenciální organelou pro eukaryotní buňky. Bývají často označovány jako buněčné elektrárny, jelikož produkují většinu energie ve formě ATP. Jedná se o semiautonomní organelu, obsahující vlastní genetickou informaci mtDNA (mitochondriální deoxyribonukleová kyselina).[52] Mitochondrie jsou převážným konzumentem kyslíku, kdy spotřebují až 98 % vdechnutého kyslíku. Kyslík využívají především k oxidativní fosforylaci, ale také k tvorbě mitochondriálních ROS.[53] Jedná se o dynamickou organelu, která prochází neustálými změnami jako je fragmentace, fúze, elongace nebo také přemisťování v cytoplazmě.[54]

Mitochondrie je organela s dvěma membránami, vnější a vnitřní, kdy každá plní odlišnou roli. Vnější membrána je prostupná pro malé molekuly a ionty. Vnitřní membrána odděluje matrix mitochondrie, není tak permeabilní jako vnější a nacházejí se

na ni transportéry pro různé molekuly jako je ADP (adenosindifosfát), ATP a jiné důležité metabolity. Vnitřní membrána tvoří tzv. kristy, které zvětšují povrch membrány a nacházejí se na nich proteiny respiračního řetězce. Prostor mezi membránami, tzv. mezimembránový prostor, obsahuje proteiny, které při uvolnění do cytoplazmy buňky spouštějí apoptózu. V matrix mitochondrie probíhá Krebsův cyklus, syntéza mitochondriálních proteinů a replikace mtDNA.[55]

Jak již bylo zmíněno, mitochondrie produkují většinu ATP v buňce. K tomu dochází díky oxidativní fosforylaci (OXPHOS – oxidative phosphorylation) v procesu označovaném jako dýchací řetězec.[55,56]

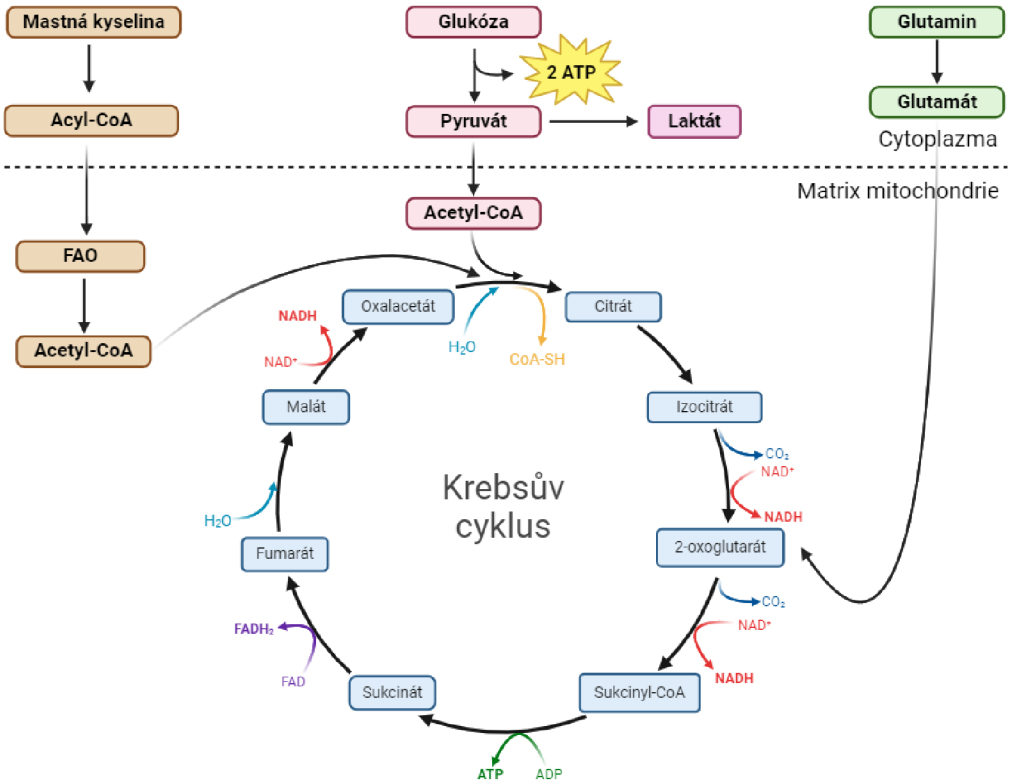
Krebsův cyklus, také znám jako TCA (tricarboxylic acid) cyklus, je centrální metabolickou dráhou využívající acetyl-CoA jako zdroj elektronů pro redukci kofaktorů. Během jednoho cyklu dochází k přenosu 6 elektronů (3 iontů vodíku) na tři NAD^+ a 2 elektronů na jeden FAD. Tím dochází ke vzniku tří redukovaných kofaktorů $NADH+H^+$ a jednoho $FADH_2$. Ty dále vstupují do elektronového řetězce při následné oxidativní fosforylaci za vzniku velkého množství ATP. Krebsův cyklus jako takový ovšem produkuje minimum ATP. Při Krebsově cyklu dochází jak ke katabolismu, tak i částečně k anabolismu, kdy některé meziprodukty mohou být využity jinými systémy, považuje se tedy za amfibolickou dráhu.[57] Meziprodukty se podílejí např. na aktivaci, proliferaci, diferenciaci a také buněčné smrti.[55]

Systém dýchacího řetězce je lokalizován na vnitřní membráně mitochondrií a je složen z enzymového multimerového komplexu nazývaným jako ETC (electron transfer chain), dvou nosičů elektronů (koenzymu Q a cytochromu *c*) a v neposlední řadě enzymu ATP-synthasa. ETC se skládá ze 4 komplexů cytochromů označovaných jako I-IV.[58]

Během procesu dýchacího řetězce dochází postupně k přenosu elektronů mezi jednotlivými cytochromy a nosiči, čímž zajišťují energii potřebnou k přenosu protonů (ve formě H^+) z matrix mitochondrie do mezimembránového prostoru. Tím dochází ke vzniku protonového gradientu, označovaného také jako proton-motivní síla. Zároveň tímhle procesem dochází k měřitelnému rozdílu elektrických potenciálů, tzv. mitochondriální membránový potenciál (MMP). Jako donor elektronů a protonů H^+ slouží redukované kofaktory NADH a $FADH_2$ a finálním akceptorem elektronů je kyslík, který společně s protony H^+ dává vzniku vodě.[59]

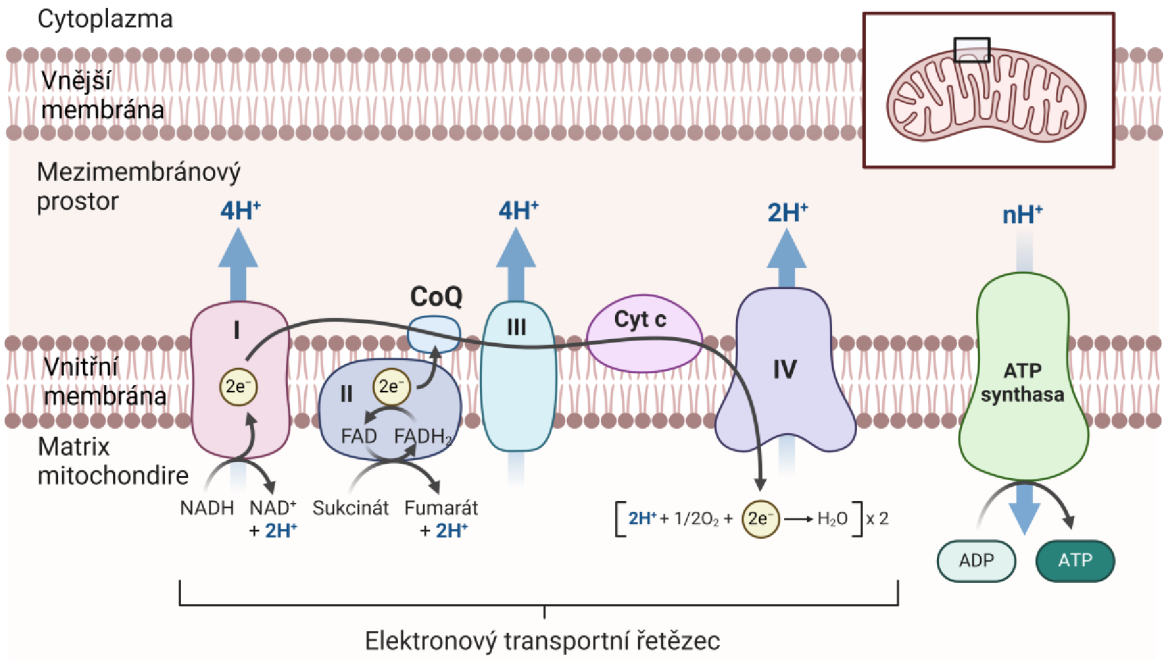
Proton-motivní síla je využita k syntéze ATP pomocí OXPHOS, kde hraje ústřední roli enzym ATP-synthasa. Při tomto procesu dochází k přesunu protonů skrz enzym ATP-synthasa a vzniku ATP z $ADP+P_i$. ATP je následně skrz přenašeče přesunuto do cytosolu, kde je využíváno jako zdroj energie.[59]

V obrázku č. 1 je znázorněno schéma Krebsova cyklu včetně příkladů možných substrátů. V obrázku č. 2 je znázorněno schéma elektronového transportního řetězce na vnitřní membráně mitochondrií.



Obr. 1: Schéma Krebsova cyklu včetně glykolýzy, glutaminolýzy a FAO

Vytvořeno pomocí BioRender.com (created with BioRender.com).



Obr. 2: Schéma elektronového transportního řetězce s OXPHOS

Vytvořeno pomocí BioRender.com (created with BioRender.com).

2.7 Role mitochondrií neutrofilů

Funkce mitochondrií neutrofilů zůstává z velké části neprozkoumaná. Původně se předpokládalo, že neutrofily neobsahují anebo mají velmi málo mitochondrií, které nemají podstatnou roli pro jejich fungování. Tato teorie byla podporována především dvěma důkazy. Prvním je, že mitochondriální jedy, jako jsou kyanidy, neovlivnily funkce neutrofilů a druhou, že pomocí elektronové mikroskopie nebyly identifikovány klasické mitochondrie u zralých neutrofilů, a pokud ano, tak byly velmi malé bez znatelné metabolické aktivity. Až pomocí fluorescenčního barvení a konfokální laserové mikroskopie bylo v roce 2003 zjištěno, že neutrofily obsahují komplexní mitochondriální síť.[55,60,61]

Dále je také známo, že neutrofily spoléhají především na glykolýzu jako zdroj energie, a ne na oxidativní fosforylaci. To je výhodné zejména pro jejich správnou funkci v zánětlivém prostředí, kde může být nízká koncentrace O_2. Neutrofily spotřebovávají kyslík především pro tvorbu ROS enzymem NADPH oxidázou během oxidačního vzplanutí.[60]

U neaktivovaných klidových neutrofilů mají mitochondrie tubulární charakter a procházejí celou cytoplazmou. Naopak při aktivaci neutrofilů byly pozorovány translokace mitochondrií, jejich fragmentace a fúze.[55]

Mitochondrie u neutrofilů nemají nejspíš nijak velký význam, co se týče energetického metabolismu, nýbrž se postupně zjišťuje, že mají význam především u efektorových funkcí, ve vývoji, diferenciaci a apoptóze.[17,61]

2.7.1 Mitochondriální ROS

Mitochondrie jsou schopné tvorby mitochondriálních ROS (mtROS) independentních na NADPH-oxidázu. K tvorbě mtROS dochází při uvolnění elektronů z elektronového transportního systému na molekulární kyslík O_2, především komplexy cytochrom I a III. mtROS se podílejí u neutrofilů také na NETóze.[54,55]

Neutrofily více produkují mtROS při hypoxii ex vivo a také mají větší membránový potenciál než ty vyskytující se v normální hladině kyslíku. Po přidání mitochondriálního antioxidantu MitoTEMPO dochází k akcelerované apoptóze neutrofilů. Z toho se dá vyvodit závěr, že mtROS jsou nutné pro přežití neutrofilu.[17]

Studie ukázaly, že při použití inhibitoru komplexu III ETC (cytochrom c reduktáza) antimycinem A došlo ke znatelnému snížení produkce superoxidového radikálu neutrofily, a tím i ke snížené schopnosti likvidace bakterií Staphylococcus aureus. Při použití MitoTEMPO (mitochondriální antioxidant) došlo u neutrofilů také ke snížené schopnosti likvidace bakterií Staphylococcus aureus. Při použití obou inhibitorů zároveň ale nedošlo k zesílení tohoto jevu. Z toho se dá vyvodit, že právě komplex III je zdrojem mtROS.[62]

Mitochondriální ROS nejspíš přímo nepřispívají jako součást ROS určených k likvidaci fagocytovaných mikrobů, ale spíše slouží jako signální molekuly rozhodující o adekvátní reakci neutrofilů vůči infekčnímu agens v místě zánětu.[55,63] Tenhle fakt potvrzuje studie od Vorobjeva et al.[63]

Tato studie ovšem také zjistila, že antioxidant SkQ1(10-(6´-plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium), který se selektivně akumuluje v mitochondriích a působí zde jako antioxidant a zamezuje tvorbu mtROS, mimo jiné také inhibuje degranulaci neutrofilů podložené sníženou expresí markeru primární granulace CD63 a specifické granulace CD66b. Z tohoto výsledku se dá usoudit, že mtROS se podílejí také na degranulaci neutrofilů.[17,63]

Pro pochopení, jakým přesným způsobem mtROS působí při oxidačním vzplanutí a degranulaci jsou nutné další studie.

2.7.2 Účast na migraci a adhezi

Mitochondrie neutrofilů hrají významnou roli při migraci (chemotaxi) a adhezi. Jedním z důkazů o aktivní účasti mitochondrií při chemotaxi je, že při narušení membránového potenciálu mitochondrií dojde k inhibici chemotaxe.[55]

Při chemotaxi a lokomoci buňky dochází k deformaci jejího tvaru a zároveň přesunu mitochondrií k vedoucímu okraji buňky. Zde dochází k uvolňování ATP neutrofilem do extracelulárního prostoru blízko purinergních receptorů P2Y2, které zachycují toto ATP. Jedná se o autokrinní působení ATP. P2Y2 dále aktivuje signální dráhu mTOR (mamalian target of rapamycin). Tím dochází k silnější aktivaci mitochondrií vepředu buňky, zvýšení jejich potenciálu, zvýšení příjmu vápníku mitochondriemi a větší tvorby ATP. Výsledkem tohoto procesu je větší aktivace neutrofilu a tedy i silnější polarizace a chemotaxe.[17,55,64]

Role mitochondrií při chemotaxi byla potvrzena i dalšími studiemi. V jedné z nich byl využit inhibitor mTOR komplexu, čímž došlo ke snížení příjmu vápníku mitochondriemi, snížení jejich potenciálu a aktivace, a tím i ke snížení chemotaxe neutrofilu. Mitochondriální vápník tedy také hraje důležitou roli při chemotaxi neutrofilů.[17,65]

Další studie potvrdila, že homeostáze vápníku je důležitá pro chemotaxi a adhezi. V této studii byl použit inhibitor Mitofusinu 2 (MFN2). MFN2 zajišťuje stabilní kontakt mezi mitochondriemi a endoplazmatickým retikulem. Endoplazmatické retikulum (ER) slouží jako hlavní ukladatel vápníku v buňce a mitochondrie se nacházejí právě v blízkosti ER, tato pozice je důležitá vzhledem k nízké afinitě MCU (mitochondrial calcium uniporter) pro vápník. Při inhibici MFN2 došlo ke snížené chemotaxi a neúspěšné adhezi neutrofilů in vivo ve zvířecím modelu dánie pruhované (zebrafish).[17,66]

Bylo ale také zjištěno, že při silné stimulaci neutrofilů pomocí LPS dochází k nadměrné produkci ATP mitochondriemi způsobující narušení chemotaxe z důvodu nedostatečné polarity buňky. Stimulace neutrofilů pomocí LPS vede k neorganizovanému intracelulárnímu přesunu mitochondrií, výsledkem čehož je generalizované nadměrné

uvolňování ATP v okolí buňky, a tedy narušení purinergní signalizace a polarizace buňky. Naopak tomu je u stimulace fMLP, kdy dochází k přesunu mitochondrií k vedoucímu okraji buňky ve směru gradientu fMLP, a tedy účinné chemotaxi. Tento jev by mohl vysvětlovat fakt, že u septických pacientů bývá zjištěna snížená chemotaxe neutrofilů oproti zdravým kontrolám.[17,36] U bakterie Escherichia coli je tento jev dobře popsaný. E. coli využívá uvolňování LPS z buněčné stěny, aby spustila zánětlivou kaskádu, dezorientovala neutrofily a vyhnula se tak obrannému systému hostitele.[36]

2.7.3 Role při diferenciaci neutrofilů

Mitochondrie podléhají změnám související s diferenciací a vývojem neutrofilů. Při diferenciaci hematopoetické kmenové buňky na myeloidní prekurzor dochází ke změně metabolismu z anaerobní glykolýzy na mitochondriální dýchání. Dochází ke zvýšení exprese pyruvát dehydrogenázy, která zajišťuje přeměnu pyruvátu na acetyl-CoA, substrát Krebsova cyklu.[55]

Důležitým prvkem diferenciace neutrofilů je také proces autofagie, který dodává buňce volné mastné kyseliny, které jsou následně metabolizovány právě v mitochondriích pomocí FAO. Tímto procesem nakonec dochází k tvorbě ATP pomocí OXPHOS v dýchacím řetězci mitochondrií neutrofilu.[55]

Další důležitou rolí během diferenciace neutrofilů je udržování mitochondriální proteostázy. Většina mitochondriálních proteinů je kódována nukleární DNA, jejichž translace probíhá normálně v cytosolu. Mitochondriální proteiny jsou posléze neposkládané přesunuty do mitochondrií a teprve v mitochondriích dochází k jejich poskládání do aktivní konformace. Bylo zjištěno, že právě neutrofily jsou velmi citlivé vůči jakýmkoli změnám v mitochondriálním proteomu při jejich diferenciaci.[55,67]

2.7.4 Role při NETóze

Mitochondrie neutrofilů, a především mtROS a signalizace Ca^{2+} hrají klíčovou roli při NOX-independentní NETóze.[17]

Mitochondriální rozpojovače DNP (2,4-dinitrofenol) a FCCP (karbonylkyanid-p-trifluormethoxyfenylhydrazon) narušují protonový gradient a inhibují mitochondriální syntézu ATP a tím i tvorbu mtROS, přičemž tak způsobují inhibici NOX-independentní NETózy neutrofilů stimulovanou A23187.[17,68]

Zvláštností je, že při stimulaci PMA dochází k tvorbě mtROS, ale tyto mtROS nejsou schopné vyvolat NOX-independentní NETózu. Není už ale jasné, proč mtROS vznikající za odlišných stimulací mají na NETózu odlišný efekt.[17]

Přesto, že NETs tvoří především jaderná DNA, tak za určitých podmínek mohou být NETs tvořeny také mitochondriální DNA např. při stimulaci GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) a C5a.[17]

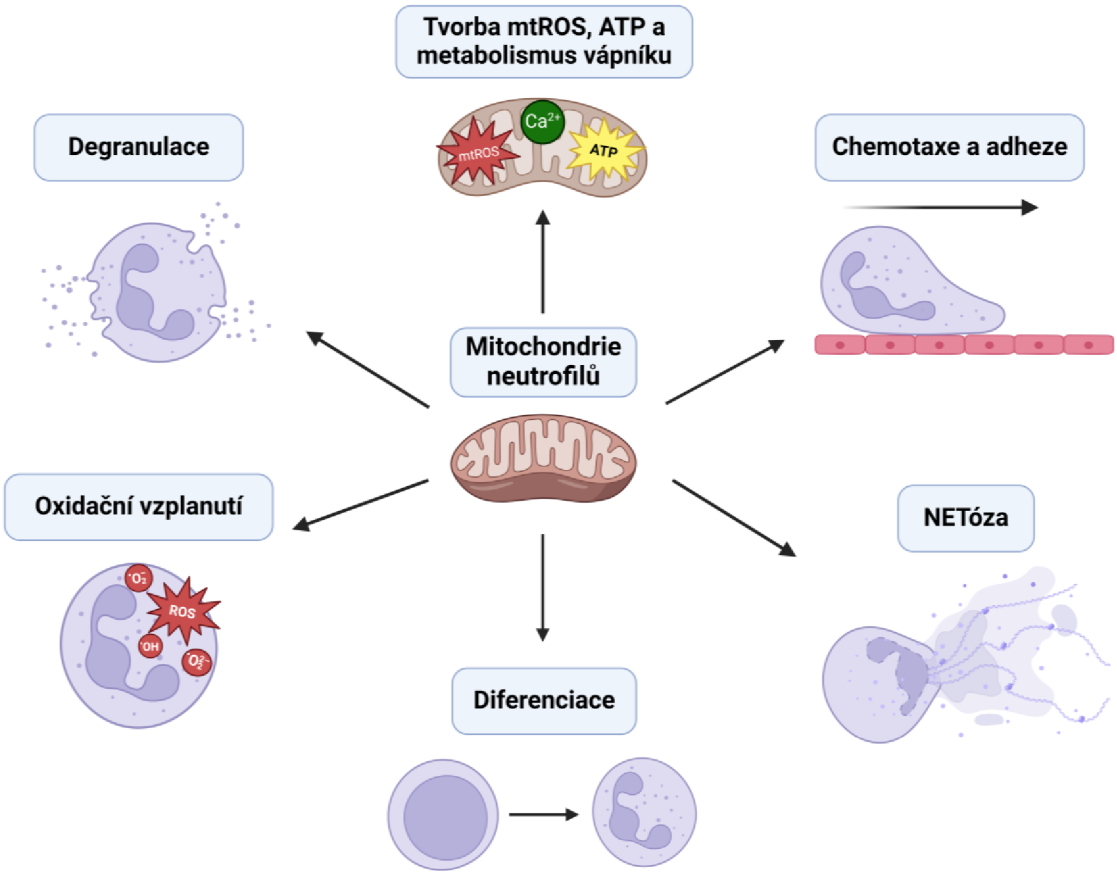
2.7.5 Role při metabolismu vápníku

Mitochondrie hrají podstatnou roli v metabolismu vápníku v buňce, klíčový prvek v mnoha funkcích buňky.[55]

Změny koncentrací vápníku v mitochondriích jsou důležitým prvkem přispívajícím jak k osudu buňky, jelikož změny koncentrací můžou inhibovat nebo indukovat apoptózu, tak i ke správné funkci buňky včetně efektorových funkcích jako je NETóza a také chemotaxe. Mitochondriální vápník se podílí i na tvorbě buněčné energie.[17,55]

Změny potenciálu mitochondriální membrány způsobené např. dýchacím řetězcem zvyšují příjem vápníku mitochondriemi. Pro správnou homeostázu vápníku a udržování jeho cytosolové hladiny využívají mitochondrie vápníkové kanály MCU lokalizované na vnitřní mitochondriální membráně.[17,55]

Zvýšení příjmu vápníku MCU je řízeno pomocí proteinu s dvěma motivy EF-ruky MICU1 (mitochondrial calcium uptake 1) nacházejícím se také na vnitřní membráně.[69] Při nízké cytoplazmatické koncentraci vápníku uzavře MICU1 kanál MCU a naopak při vysoké koncentraci způsobí MICU1 strukturální změny MCU a dojde k jeho otevření a průchodu vápníku do mitochondrií.[55]



Obr. 3: Shrnutí významu mitochondrií neutrofilů

Na obrázku je shrnuto, v jakých důležitých funkcích se uplatňují mitochondrie neutrofilů včetně metabolických pochodů (tvorba ATP, metabolismus vápníku), efektorových funkcí a při diferenciaci. Vytvořeno pomocí BioRender.com (created with BioRender.com).

2.8 Měření vlastností neutrofilů pomocí průtokové cytometrie

V této kapitole budou probrány možnosti měření mitochondriálních a funkčních vlastností neutrofilů, které byly využity v praktické části diplomové práce.

2.8.1 Měření mitochondriálních vlastností

U mitochondrií můžeme měřit mitochondriální obsah pomocí MitoTracker Green FM (MTG), membránový potenciál mitochondrií pomocí MitoTracker Red CMXRos (MTR) a mitochondriální superoxid pomocí MitoSOX Red (MTS).

MTG funguje ukazatel mitochondriálního obsahu, kdy se váže uvnitř mitochondrií na mitochondriální proteiny a díky fluorescenci sondy tak můžeme znázornit obsah

mitochondrií. MTR je lipofilní kationtové fluorescenční barvivo, které se v buňce koncentruje uvnitř mitochondrií díky negativnímu mitochondriálnímu potenciálu.[70,71]

MTS je derivát dihydroethidium, který nese kladně nabitý trifenylfosfonium. To zajišťuje, že MTS rychle proniká membránou do buňky a selektivně se akumuluje v mitochondriích, díky čehož může být použit jako specifický ukazatel tvorby mitochondriálních ROS. Při tvorbě mitochondriálního superoxidu dochází k oxidaci MTS a k fluorescenci.[70,72]

2.8.2 Měření oxidačního vzplanutí pomocí DHR (dihydrorhodamin 123)

DHR při inkubaci s neutrofily snadno permeabilizuje skrz buněčnou membránu díky své lipofilitě a lokalizuje se v buněčných organelách včetně fagosomu. Při tvorbě ROS (oxidační vzplanutí), dochází k oxidaci dihydrorhodaminu 123 peroxidem vodíku na vysoce fluorescentní rhodamin 123. Tato reakce je účinnější v přítomnosti peroxidáz. Rhodamin 123 stejně jako dyhidrorhodamin 123 je schopný permeabilizovat membrány včetně fagosomu a má tendenci se akumulovat v organelách s negativním nábojem, především pak v mitochondriích. Z toho se dá vyvodit, že místo, ve kterém se rhodamin 123 akumuluje, nemusí být místem jeho vzniku. Fluorescenci rhodaminu 123 můžeme měřit pomocí průtokové cytometrie.[73–75]

3 Průtoková cytometrie

V praktické části diplomové práce jsem používal k analýze vzorků průtokovou cytometrii, a proto je jí zde věnována kapitola.

Průtoková nebo také flow cytometrie je technika využívající rychlou kvantitativní i kvalitativní analýzu buněk, ale i jiných různých částic ve vzorku. Při průtokové cytometrii se pohybují jednotlivé buňky či částice v proudu nosné kapaliny a procházejí jednotlivě měřící celou cytometru. Průtokový cytometr se tradičně skládá ze 3 částí: fluidika, optika a elektronika.

Fluidika nebo také fluidní systém se skládá z nosné kapaliny, kterou často bývá pufrovaný fyziologický roztok, a měřeného roztoku, který je pod tlakem pomocí peristaltické pumpy nasáván kapilárou. Pro analýzu vzorku je velmi důležité, aby buňky procházely měřící celou samostatně za sebou a nedošlo k jejich překrývání. Nosná kapalina se vzorkem v kapilárách je pod tlakem, aby došlo ke správnému přenosu vzorku do průtokové cely, kterou prochází buňky a částice jednotlivě za sebou díky principu hydrodynamické fokusace. Při průchodu měřící celou dochází k ozáření buněk laserem a k následné absorpci a rozptylu světla, a v případě použití monoklonálních protilátek s konjugovanými fluorochromy i k emisi světla.

Optický systém se skládá z excitační optiky, do které řadíme lasery, a sběrné optiky (detektory), do které patří fotonásobiče a fotodiody. Dále k optickému systému patří dichroická zrcadla, filtry a čočky, které směřují fluorescenční světlo dle jeho vlnové délky ke specifickým detektorům a zajišťují tak detekci jednotlivých fluorochromů.

U buněk můžeme hodnotit jejich velikost, granularitu a lobularitu jádra na základě úbytku a rozptylu světla při průchodu buňkou měřící celou. Velikost buněk hodnotíme pomocí FSC (forward scatter), kdy je detektor umístěn v přímé rovině laseru při 0°. Granularitu a lobularitu hodnotíme pomocí SSC (side scatter), kdy je detektor typicky umístěn v 90° vůči laserovému paprsku.

Pomocí monoklonálních protilátek s konjugovanými fluorochromy můžeme hodnotit také povrchové i vnitřní znaky (antigeny) buněk. Jedná se o tzv. imunofenotypizaci. Většina těchto antigenů má své CD číslo. Díky imunofenotypizace jsme schopni rozdělit jednotlivé buněčné populace od sebe, případně můžeme využít expresi daných znaků ke stanovení diagnózy i prognózy. Množství znaků, které můžeme současně v jednom vzorku měřit, závisí na počtu laserů a kanálů, kterými cytometr disponuje.

Principem tohoto měření je, že při průchodu buňky měřící celou dochází k jejímu ozáření světlem o určité vlnové délce, čímž dochází k excitaci fluorochromu a následné emisi světla o vyšší vlnové délce, než byla vlnová délka světla excitačního. Tento jev je dobře definován a nazývá se jako Stokesův posun. Emitované světlo je dále optickým systémem směřováno a filtrováno k danému detektoru.

Elektronika následně převádí optické signály přijímané detektory do elektrických signálů, které zpracovává software v počítači. Výsledek měření je vyjádřen graficky typicky v podobě dvouparametrových dot plotů anebo jednoparametrového histogramu.

Histogram nám slouží k znázornění rozložení exprese jednoho parametru napříč buněčnou populací vzorku, kdy na ose x je námi sledovaný parametr a na ose y je počet buněk.

Dvouparametrový dot plot nám naopak znázorňuje vzájemný vztah dvou měřených parametrů na buněčné populaci. V dot plotu jsou jednotlivé buňky znázorněny jako tečky. Pokud se buňka nachází v pravé polovině grafu je pozitivní pro znak sledovaný na ose x a pokud se nachází v horní polovině grafu je pozitivní pro znak sledovaný na ose y. Můžeme tak rozdělit buňky na 4 populace vůči námi dvěma sledovaným znakům, a to dvojitě pozitivní (vpravo nahoře), dvojitě negativní (vlevo dole) a pozitivní pro jeden znak (vpravo dole nebo vlevo nahoře).

Pro správné hodnocení buněčných populací je také nutné mít vhodně zvolený protilátkový protokol a vhodně zvolenou gatovací strategii. Při ní dochází k označení regionu buněk (gate), které se využijí v dalším hodnocení s jinými parametry.[76–78]

4 Praktická část

4.1 Zaměření a cíl práce

Diplomová práce je zaměřena na populaci zralých a nezralých neutrofilů s cílem zjistit, jakým způsobem reagují jejich mitochondrie ve srovnání s expresí aktivačních markerů na různá stimulancia a inhibitory.

U mitochondrií bylo sledovány tyto vlastnosti:

- Mitochondriální obsah – pomocí sondy MitoTracker Green FM
- Mitochondriální superoxid – pomocí sondy MitoSOX Red
- Mitochondriální membránový potenciál – pomocí sondy MitoTracker Red CMXRos.

Jako aktivační znaky neutrofilů byly sledovány tyto CD znaky:

- CD16 – marker aktivace
- CD11b – marker aktivace
- CD66b – marker degranulace.

4.2 Použité roztoky

- PBS (posphate buffered saline)
- Destilovaná voda
- Směsné opsonizační sérum
- Ficoll-Paque
- Lyzační roztok A
- Lyzační roztok B
- exbio EXCELLYSE Live, Lysing solution, 10x concentrated
- DMSO (dimethylsulfoxid)
- MitoTracker Red CMXRos
- MitoTracker Green FM
- MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator
- Směsné opsonizační sérum
- SIGMA Lipopolysaccharides (LPS), from Salmonella abortus equi
- Sigma-Aldrich fMLP
- Sigma-Aldrich PMA
- Roztok opsonizované Escherichia coli kmen K12 ROW, Biologický ústav MU
- Invitrogen Staphylococcus aureus (SA)
- Sigma-Aldrich DHR (dihydrorhodamin)
- Invitrogen Staphylococcus aureus BioParticles™ opsonizing reagent
- EXBIO anti-human CD16 APC-Cy™7 (allophycocyanin-cynanine Cy™7)

- EXBIO anti-human CD193 PE (phycoerythrin)
- EXBIO anti-human CD11b Pacific Blue™ (PB)
- EXBIO anti-human CD45 Pacific Orange™ (PO)
- EXBIO anti-human CD64 APC (allophycocyanin)
- SONY anti-human CD66b AF700 (Alexa Fluor 700)
- Beckman Coulter anti-human CD33 PC7 (R phycoerythrin cyanin 7)
- Sigma-Aldrich 2-deoxy-D-glukóza 1 g
- Sigma-Aldrich BPTES (bis-2-(5-phenylacetamido-1, 3, 4-thiadiazol-2-yl) ethyl sulphide) 5 mg
- BLDpharm MPA (3-mercaptopicolinic acid) 100 mg
- Sigma-Aldrich RPMI (Roswell Park Memorial institute) 1640 medium R7509

4.3 Použité přístroje a pomůcky

- Automatické pipety Finnpipette
- Pausterovy pipety
- Cytometrické zkumavky
- Zkumavky o objemu 15, 20 a 50 ml
- Zkumavky pro analyzátor buněčné viability
- Mikrozkumavky Eppendorf o objemu 1,5 ml
- Vortex Heidolph REAX top
- Inkubátor Julabo TW12
- Centrifuga Hettich ROTINA 420R
- Analyzátor buněčné viability Beckman Coulter Vi-CELL XR
- Průtokový cytometr Beckman Coulter Navios EX

4.4 Pracovní postup

Pracovní postup je rozdělen do několika částí. První část je zaměřena na přípravu pracovních roztoků, druhá část je zaměřena na proces izolace granulocytů a třetí část je zaměřena na proces aktivace a značení neutrofilů.

Pracovní postup pro aktivaci a značení neutrofilů byl upravován v závislosti na daných odlišných aktivačních postupech. Byly provedeny tyto odlišné postupy:

- aktivace neutrofilů pomocí odlišných stimulancií
- časové pokusy s různou dobou stimulace neutrofilů pomocí SA
- aktivace neutrofilů se substancemi ovlivňující metabolismus neutrofilů a měření oxidačního vzplanutí.

4.4.1 Příprava pracovních roztoků

- **Příprava PBS:** navážit 0,4 g KH_2PO_4, 4,32 g Na_2HPO_4, 0,4 g KCl, 16 g NaCl, 1 g NaN_3 a následně rozpustit v 1600 ml destilované vody, doplnit do 2000 ml destilovanou vodou a upravit pH na hodnotu 7,2 – 7,4. Skladovat v lednici.
- **Příprava roztoku A:** smíchat 0,7 ml 85% kyseliny mravenčí s 500 ml destilované vody, roztok by měl mít pH=2,62. Skladovat v lednici.
- **Příprava roztoku B:** navážit 12 g Na_2CO_3, 29 g NaCl, 62,6 g Na_2SO_4, 1 g NaN_3 a následně rozpustit ve skleněné kádince v 1600 ml destilované vody. Posléze roztok přivést k varu, odstavit a nechat vychladit. Po vychlazení doplnit do 2000 ml destilovanou vodou. Skladovat v lednici. Před použitím přefiltrovat roztok přes filtrační papír.
- **Příprava MitoTracker Green FM:** zásobní vialku s 50 µg MTG rozpustit v 7,5 µl DMSO, z toho následně odebrat 0,15 µl do 1000 µl PBS. Z takto připraveného roztoku použít na jednu zkumavku 10 µl.
- **Příprava MitoTracker Red CMXRos:** zásobní vialku s 50 µg MTR rozpustit v 9,5 µl DMSO, z toho následně odebrat 0,43 µl do 1000 µl PBS. Z takto připraveného roztoku použít na jednu zkumavku 10 µl.
- **Příprava MitoSOX Red:** zásobní vialku s 50 µg MTS rozpustit v 13,1 µl DMSO, z toho následně odebrat 1,3 µl do 1000 µl PBS. Z takto připraveného roztoku použít na jednu zkumavku 10 µl.
- **Příprava roztoku LPS:** ze zásobního roztoku LPS o koncentraci 5 mg/ml odebrat 1 µl do 250 µl PBS. Takto připravený pracovní roztok o c=20 µg/ml použít k aktivaci granulocytů.
- **Příprava roztoku fMLP:** ze zásobního roztoku fMLP o koncentraci 5 mg/ml odebrat 1 µl do 250 µl PBS. Takto připravený pracovní roztok o c=20 µg/ml použít k aktivaci granulocytů.
- **Příprava roztoku PMA:** ze zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml odebrat 10 µl do 490 µl PBS. Zásobní roztok o c=20 µg/ml rozpipetovat po 50 µl do vialek, jednu použít k aktivaci granulocytů, zbytek zamrazit a použít při dalším měření.
- **Příprava roztoku DHR:** použít zásobní roztok o koncentraci 1 mg/ml. K zásobnímu roztoku DHR o objemu 30 µl přidat 250 µl PBS. Takto připravený roztok použít ke značení granulocytů.
- **Příprava roztoku BPTES:** zmražený BPTES o m=5 mg byl rozpuštěn 530 µl DMSO. Z takto připraveného zásobního roztoku bylo odebráno 5 µl do 45 µl PBS. Takto připravený pracovní roztok BPTES o c=1,8 mmol/l použít jako inhibitor granulocytů.
- **Příprava roztoku MPA:** zmražený MPA o m=100 mg byl rozpuštěn 1000 µl DMSO. Z takto připraveného zásobního roztoku bylo odebráno 5 µl do 45 µl PBS. Takto připravený pracovní roztok MPA o c=52,2 mmol/l použít jako inhibitor granulocytů.

- **Příprava roztoku 2DG:** k 1 g 2DG bylo přidáno 11 ml sterilního PBS. Takto připravený pracovní roztok 2DG o c=554 mmol/l uchovávat v lednici a použít jako inhibitor granulocytů.
- **Příprava opsonizovaného roztoku SA:** ke zkumavce se S. aureus o hmotnosti 100 mg (obsah bakterií $3x10^8$/mg) přidat 5 ml sterilního PBS a důkladně promíchat na vortexu. Poté rozplnit po 500 µl do zkumavek. Rekonstituvat Bioparticles opsonizing reagent přidáním 500 µl vody pro injekce. K 500 µl roztoku SA přidat 500 µl připraveného opsonizačního roztoku, důkladně promíchat a inkubovat 1 hodinu při 37 °C. Po ukončení inkubace přidat 2 ml PBS a dvakrát centrifugovat při 300 g po dobu 20 minut při teplotě 4 °C. Po ukončení centrifugace slít supernatant, naředit 10 ml PBS, rozpipetovat po 50 µl do mikrozkumavek a uchovávat v mrazáku. Takto připravený roztok opsonizovaného SA použít k aktivaci granulocytů.

4.4.2 Pracovní postup izolace granulocytů

1. Navrstvit krev odebranou do heparinu na 4 ml Ficollu v 20 ml zkumavce.
2. Krev navrstvenou na izolačním médiu centrifugovat při 350 g po dobu 25 minut bez brzdy při 20 °C.
3. Po ukončení centrifugace odebrat plazmu, PBMC a Ficoll do odpadu.
4. Sediment granulocytů s erytrocyty naředit 2 ml PBS, rozsuspendovat a převést do 50 ml zkumavky.
5. K suspenzi granulocytů s erytrocyty přidat 12 ml roztoku A za současného třepání na vortexu.
6. Po 15 sekundách třepání přidat 4 ml roztoku B a nechat třepat dalších 15 sekund.
7. Přidat 6 ml PBS.
8. Zkumavku centrifugovat při 300 g po dobu 5 minut při 20°C.
9. V mezičase připravit lyzační roztok EXCELLYSE Live: k 1 ml lyzačního roztoku přidat 9 ml destilované vody.
10. Po ukončení centrifugace slít supernatant do odpadu a přidat k sedimentu připravený lyzační roztok.
11. Sediment rozsuspendovat a inkubovat 10 minut při pokojové teplotě.
12. Po inkubaci centrifugovat při 300 g po dobu 5 minut při 20 °C.
13. Po ukončení centrifugace slít supernatant do odpadu, k sedimentu přidat 2 ml PBS a rozsuspendovat, doplnit do 8 ml přidáním PBS a centrifugovat při 300 g po dobu 5 minut při 20 °C.
14. Po ukončení centrifugace slít supernatant do odpadu, k sedimentu přidat cca 1200 µl PBS (doplnit do 1,5 ml) a rozsuspendovat.
15. Takto připravenou suspenzi buněk použít k měření viability buněk. Dle výsledků viability a počtu buněk naředit suspenzi na koncentraci 5 mil. buněk na 1 ml pomocí PBS. Z takto připravené suspenze použít vždy 100 µl na zkumavku.

4.4.3 Pracovní postup aktivace a značení neutrofilů

Postup pro aktivaci neutrofilů odlišnými stimulancii:

1. Nachystat 12 zkumavek, 6 pro měření MTG+MTR, 6 pro měření MTS.
2. Do nachystaných zkumavek pipetovat 100 µl buněčné suspenze granulocytů a ke každé přidat 10 µl směsného opsonizačního séra.
3. Ke zkumavce č. 1 přidat 10 µl PBS.
   Ke zkumavce č. 2 přidat 10 µl opsonizované E. coli.
   Ke zkumavce č. 3 přidat 10 µl opsonizovaného SA.
   Ke zkumavce č. 4 přidat 10 µl ředěného LPS.
   Ke zkumavce č. 5 přidat 10 µl ředěného fMLP.
   Ke zkumavce č. 6 přidat 10 µl ředěného PMA.
4. Zkumavku s PBS inkubovat v lednici, ostatní inkubovat ve vodní lázni při 37 °C 30 minut.
5. Po ukončení inkubace přidat do každé zkumavky 2 ml vychlazeného PBS a centrifugovat při 300 g po dobu 5 minut.
6. Po ukončení centrifugace slít supernatant do odpadu, sediment rozmíchat na vortexu.
7. K sedimentu přidat monoklonální protilátky (MPL) a roztoky MTG, MTR a MTS dle příslušného pipetovacího protokolu, inkubovat 30 minut v lednici ve tmě.
8. Po ukončení inkubace přidat do každé zkumavky 2 ml PBS a centrifugovat při 300 g po dobu 5 minut.
9. Po ukončení centrifugace slít supernatant do odpadu, přidat 200 µl PBS do každé zkumavky, rozmíchat na vortexu.
10. Měřit na průtokovém cytometru dle příslušného protokolu.

Postup pro aktivaci neutrofilů s různou dobou stimulace pomocí SA (body č. 5-10 totožné jako u postupu popsaného výše):

1. Nachystat 22 zkumavek, 11 pro měření MTG+MTR, 11 pro měření MTS.
2. Do nachystaných zkumavek pipetovat 100 µl buněčné suspenze granulocytů a uchovat zkumavky na ledu.
3. Do dvou zkumavek pipetovat PBS (jedna pro MTG+MTR, druhá pro MTS), do zbylých pipetovat 10 µl roztoku SA, až do počátku inkubace uchovat na ledu.
4. Inkubovat zkumavky s PBS v lednici po dobu 30 min, zbylé zkumavky se SA inkubovat ve vodní lázni při 37 °C dle příslušného času:

Zk. č. 1 inkubovat 30 s	Zk. č. 6 inkubovat 3 min
Zk. č. 2 inkubovat 1 min	Zk. č. 7 inkubovat 5 min
Zk. č. 3 inkubovat 1 min 30 s	Zk. č. 8 inkubovat 10 min
Zk. č. 4 inkubovat 2 min	Zk. č. 9 inkubovat 15 min
Zk. č. 5 inkubovat 2 min 30 s	Zk. č. 10 inkubovat 30 min.

Postup pro aktivaci neutrofilů pomocí S. aureus s testováním oxidačního vzplanutí a metabolismu pomocí inhibitorů a média RPMI 1640 s obsahem glukózy:

1. Nachystat 30 zkumavek, 10 pro měření MTG+MTR, 10 pro měření MTS a 10 pro měření DHR.
2. Do nachystaných zkumavek pipetovat 100 µl buněčné suspenze granulocytů.
3. Ke zk. č. 1 a 6 přidat 10 µl PBS
   Ke zk. č. 2 a 7 přidat 10 µl BPTES
   Ke zk. č. 3 a 8 přidat 10 µl 2DG
   Ke zk. č. 4 a 9 přidat 10 µl MPA.
4. Zkumavky č. 5 a 10 se suspenzí granulocytů centrifugovat při 300 g po dobu 5 minut.
5. Po ukončení centrifugace opatrně odebrat pipetorem 50 µl supernatantu a poté přidat 50 µl média RPMI 1640.
6. Ke zkumavkám č. 5-10 přidat 10 µl SA.
7. Ke zkumavkám určené pro měření DHR přidat 10 µl připraveného roztoku DHR.
8. Zkumavky s SA inkubovat ve vodní lázni při 37 °C po dobu 30 minut, ostatní v lednici po dobu 30 minut.
9. Dále postupovat jako podle bodů č. 5-10 u postupů popsaných výše.

Tab. 1: Pipetovací protokol MTG+MTR

MTG	**CD193**	**MTR**		**CD33**	**CD64**	**CD66b**	**CD16**	**CD11b**	**CD45**
FITC	PE	ECD	PerCP-Cy 5.5	PC7	APC	AF700	APC-Cy7	PB	PO
10	5	10		3	2	2	2	3	3

Tab. 2: Pipetovací protokol MTS

	CD193		**MTS**	**CD33**	**CD64**	**CD66b**	**CD16**	**CD11b**	**CD45**
FITC	PE	ECD	PerCP-Cy 5.5	PC7	APC	AF700	APC-Cy7	PB	PO
	5		10	3	2	2	2	3	3

Tab. 3: Pipetovací protokol DHR

DHR	**DHR**	**DHR**		**CD33**	**CD64**	**CD66b**	**CD16**	**CD11b**	**CD45**
FITC	PE	ECD		PC7	APC	AF700	APC-Cy7	PB	PO
				3	2	2	2	3	3

Tabulky 1, 2 a 3 ukazují množství objemu MPL v µl proti konkrétnímu antigenu značené konkrétním fluorochromem a množství mitochondriálních značících chemikálií v µl. Vyznačené množství je pro 1 vzorek (zkumavku).

4.5 Charakteristika jednotlivých populací neutrofilů a jejich mitochondrií

Pro správné zagatování neutrofilů je zapotřebí oddělení populace monocytů a eozinofilů pomocí rozdílné exprese znaků CD16, CD33 a CD45. Takto odseparovanou populaci neutrofilů můžeme dále rozdělit podle jejich exprese CD16 a CD11b na populaci zralých $CD16^{hi}$ a $CD11b^{hi}$ a nezralých $CD16^{low}$ a $CD11b^{low}$ neutrofilů. K hodnocení exprese zkoumaných markerů byly použity populace živých zralých neutrofilů a živých nezralých neutrofilů s dostatečně vysokým FSC a SSC.

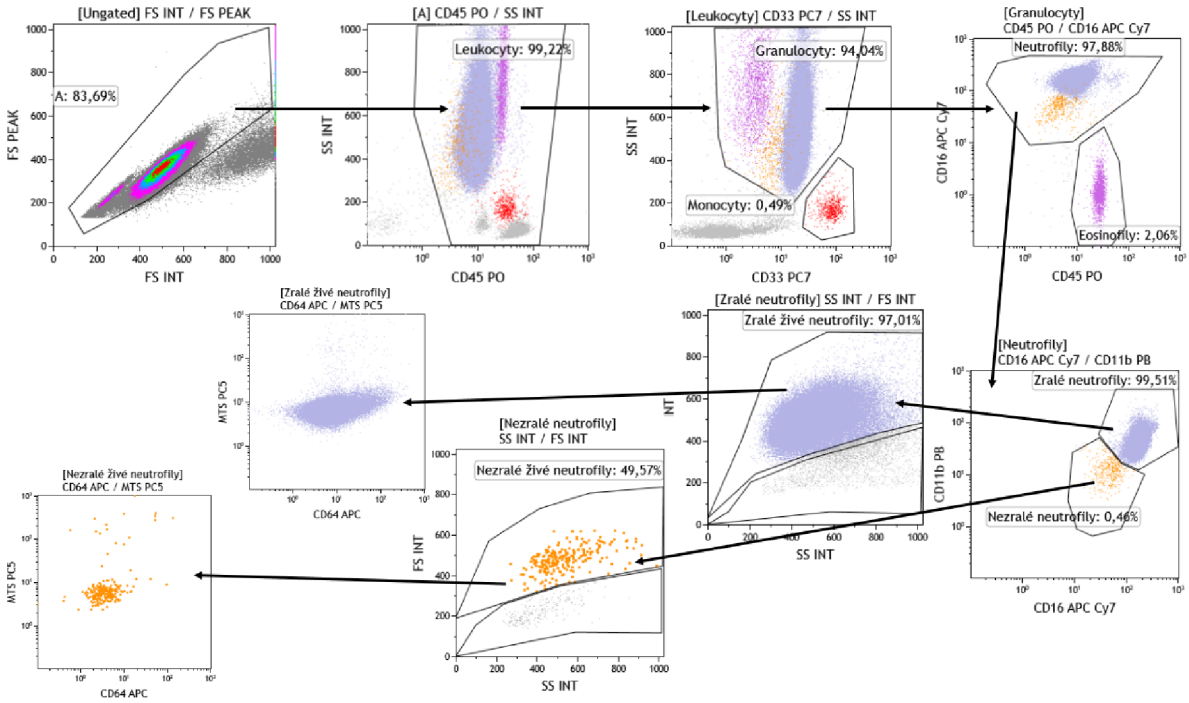
Na těchto dvou populacích neutrofilů byla hodnocena exprese znaku CD16, CD11b a CD66b před a po stimulaci. Dále byly hodnoceny mitochondriální změny před a po stimulaci, a to pomocí barev MTG, MTR a MTS. MTG se selektivně akumuluje v matrix mitochondrie a znázorňuje tak mitochondriální obsah (tj. i velikost mitochondrií). MTR znázorňuje mitochondriální potenciál. MTS je specifický ukazatel produkce mitochondriálního superoxidu, a tedy mtROS. Po inkubaci při stimulaci suspenze buněk lze předpokládat, že dojde u populací neutrofilů ke změnám jak fenotypickým, tak i mitochondriálním oproti nestimulované negativní kontrole. Lze očekávat změny všech tří mitochondriálních vlastností měřených pomocí MTG, MTR a MTS. Byly použity stimulancia S. aureus, E. coli, LPS, fMLP a PMA.

V neposlední řadě byly sledovány také metabolické vlastnosti a oxidační vzplanutí neutrofilů související s jejich aktivací pomocí S. aureus. Pro toto testování byly použity inhibitory metabolismu glutaminu BPTES (inhibitor glutaminázy), inhibitor glukoneogeneze 3-MPA (inhibitor fosfoenolpyruvátkarboxykinázy), kompetitivní inhibitor glykolýzy (inhibitor hexokinázy) 2-deoxy-D-glukóza (2DG) a médium RPMI 1640 s obsahem glukózy.

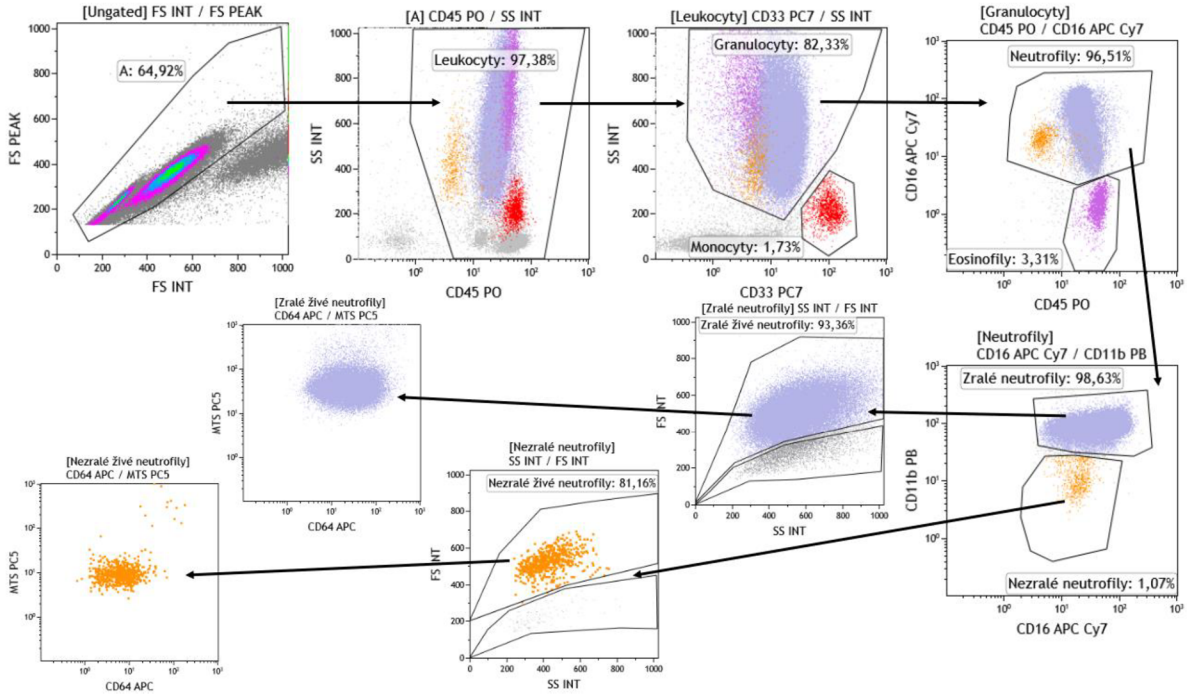
K testování byly použity vzorky zdravých dárců z řad dobrovolníků.

4.6 Gatovací strategie

V prvním kroku gatovací strategie byly odděleny singlety od dubletů. V druhém kroku byly gatovány leukocyty dle pozitivity CD45. Ve třetím kroku byly odděleny granulocyty a monocyty dle exprese CD33 a SSC. Ve čtvrtém kroku byly granulocyty rozděleny na neutrofily a eozinofily dle rozdílné exprese CD45 a CD16. V pátém kroku byly neutrofily rozděleny dle exprese CD16 a CD11b na zralé a nezralé neutrofily. Z populace zralých a nezralých neutrofilů byly následně odděleny neutrofily s nízkým FSC a SSC (zřejmě mrtvé či apoptické neutrofily). Populace živých zralých neutrofilů a živých nezralých neutrofilů byly následně použity k vyhodnocení MFI (mean fluorescence intensity) MTS, MTG, MTR, CD16, CD11b, CD66b a DHR. Pro názornou ukázku jsou předloženy 2 obrázky s gatovací strategií u nestimulovaného vzorku s MTS (obrázek č. 4) a vzorku s MTS stimulovaného pomocí S. aureus (obrázek č. 5).



Obr. 4: Gatovací strategie u nestimulovaného vzorku s MTS



Obr. 5: Gatovací strategie u vzorku stimulovaného pomocí S. aureus s MTS

4.7 Základní analýza sledovaných znaků

Na populacích zralých a nezralých živých neutrofilů byla sledována exprese CD16, CD11b, CD66b a mitochondriální markery MTG, MTR a MTS před stimulací (vzorek PBS) a po stimulaci různými stimulancii.

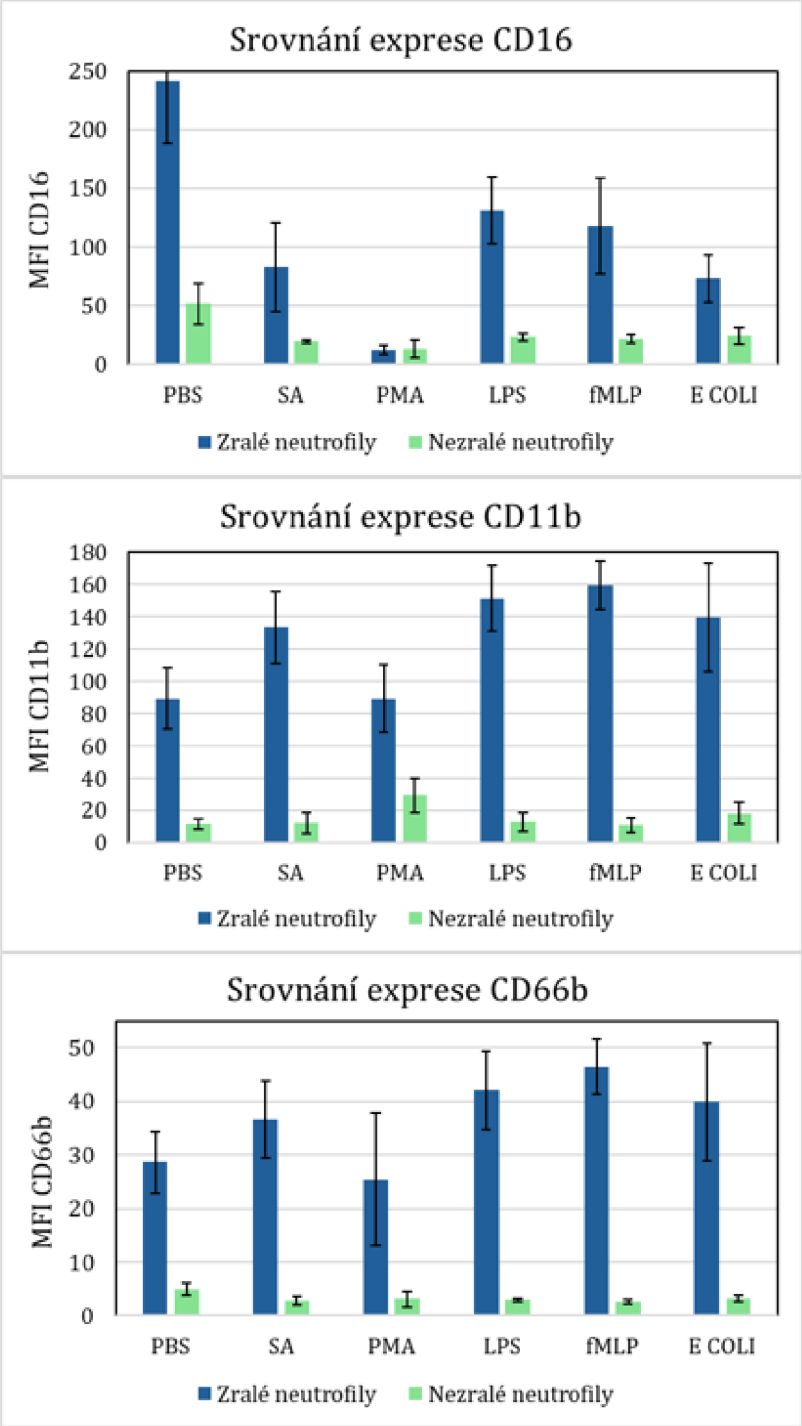
Pro tuto analýzu bylo hodnoceno 6 vzorků zdravých dárců. Jako stimulancia byly použity SA, PMA, LPS, fMLP a E. coli. Koncentrace PMA, LPS a fMLP ve vzorcích byla 1,67 µg/ml.

4.7.1 Rozdíl MFI CD16, CD11b a CD66b mezi zralými a nezralými neutrofily po použití různých stimulancií

Výsledky v obrázku č. 6 v horním grafu ukazují, že exprese CD16 u zralých neutrofilů je výrazně vyšší, a to i po stimulaci různými stimulancii, kdy došlo ke snížení exprese CD16.

Výsledky v obrázku č. 6 v prostředním grafu ukazují, že exprese CD11b u zralých neutrofilů je výrazně vyšší než u nezralých neutrofilů a po stimulaci dochází k navýšení exprese CD11b u zralých neutrofilů. U nezralých neutrofilů došlo po stimulaci k výraznému zvýšení exprese CD11b pouze při stimulaci PMA a E. coli.

Výsledky v obrázku č. 6 v dolním grafu ukazují, že exprese CD66b u zralých neutrofilů je výrazně vyšší než u nezralých neutrofilů, přičemž po stimulaci došlo u zralých neutrofilů k navýšení exprese CD66b a u nezralých neutrofilů ke snížení exprese CD66b.



Obr. 6: Srovnání exprese MFI CD16, CD11b a CD66b mezi zralými a nezralými neutrofily po použití různých stimulancií

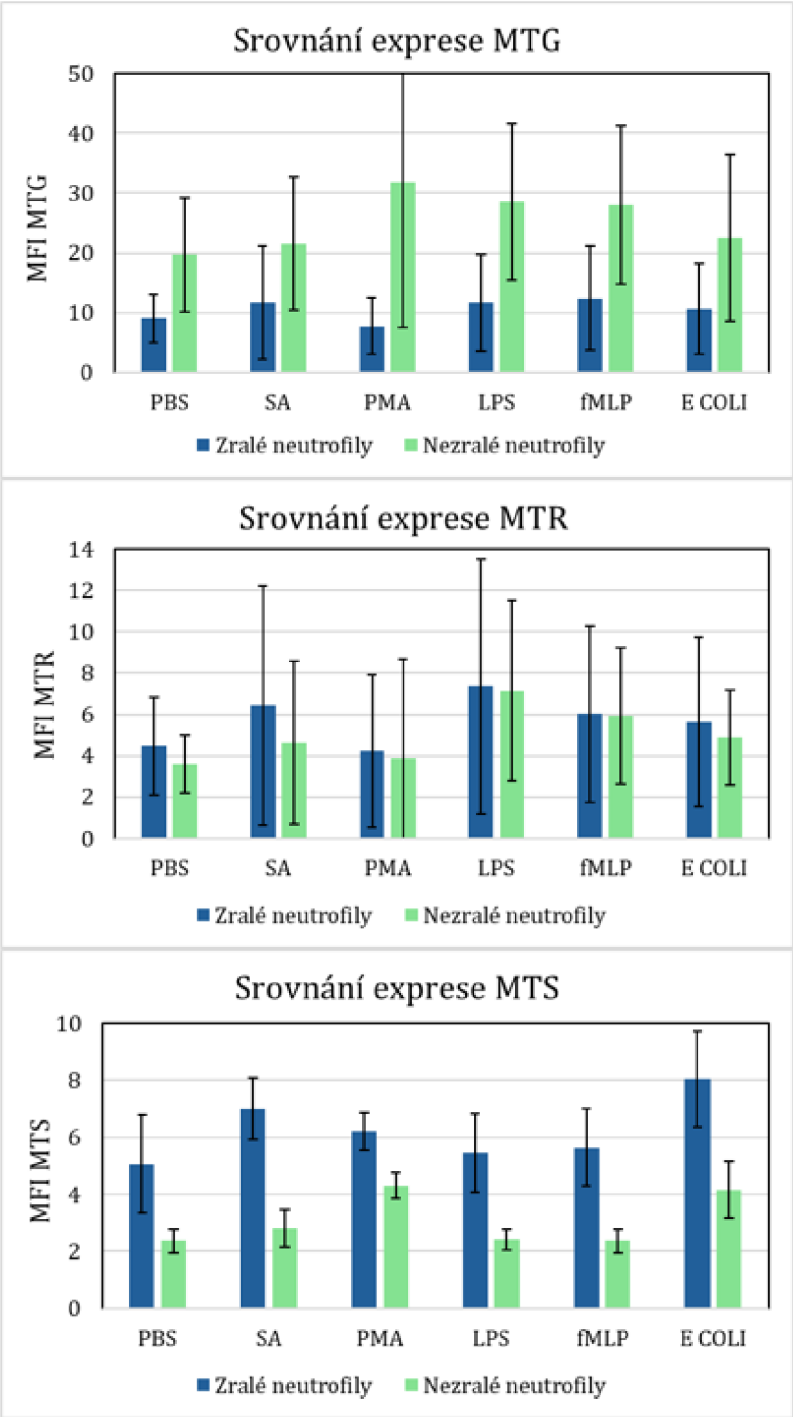
V obrázku jsou 3 grafy se znázorněným průměrem a SD pro naměřené hodnoty MFI CD16, CD11b a CD66b jednotlivých vzorků nestimulovaných s PBS i stimulovaných různými stimulancii označenými na ose x. Na ose y je stupnice MFI jednotlivých znaků.

4.7.2 Rozdíl MFI MTG, MTR a MTS mezi zralými a nezralými neutrofily po použití různých stimulancií

Výsledky v obrázku č. 7 v horním grafu ukazují, že nezralé neutrofily vykazují výrazně vyšší expresi MTG před i po stimulaci. Z rozptylu SD můžeme také říct, že exprese MTG byla mezi jednotlivými vzorky výrazně rozdílná.

Výsledky v obrázku č. 7 v prostředním grafu ukazují, že zralé neutrofily vykazují mírně vyšší expresi MTR před i po stimulaci. Z rozptylu SD můžeme také říct, že exprese MTR byla mezi jednotlivými vzorky výrazně rozdílná.

Výsledky v obrázku č. 7 v dolním grafu ukazují, že zralé neutrofily vykazují větší expresi MTS jak před stimulací, tak i po stimulaci. Z rozptylu SD můžeme říct, že oproti MFI MTG a MTR byl rozptyl hodnot MFI MTS výrazně menší a neutrofily vykazovaly velmi podobné chování MTS i mezi jednotlivými vzorky.



Obr. 7: Srovnání exprese MFI MTG, MTR a MTS mezi zralými a nezralými neutrofily po použití různých stimulancií

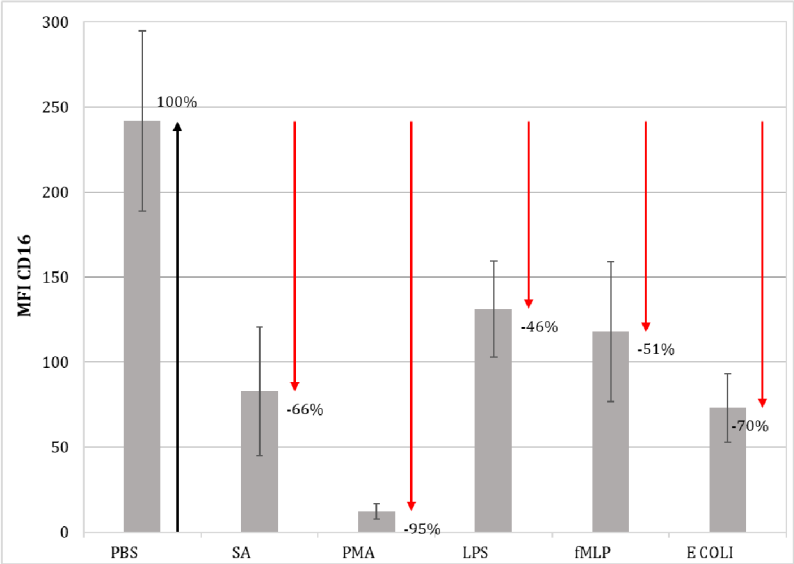
V obrázku jsou 3 grafy se znázorněným průměrem a SD pro naměřené hodnoty MFI MTG, MTR a MTS jednotlivých vzorků nestimulovaných s PBS i stimulovaných různými stimulancii označenými na ose x. Na ose y je stupnice MFI jednotlivých znaků.

4.8 Výsledky aktivace neutrofilů s odlišnými stimulancii

Pro tento pokus bylo vyhodnoceno 6 odebraných vzorků zdravých dárců. Jako stimulancia byly použity S. aureus (SA), PMA, LPS, fMLP a E. coli. Koncentrace PMA, LPS a fMLP ve vzorcích byla 1,67 µg/ml. Jako negativní kontrola byl použit vzorek inkubovaný s PBS.

4.8.1 Srovnání exprese CD16 u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

Výsledky v obrázku č. 8 ukazují, že po stimulaci došlo ke snížení exprese CD16 u zralých živých neutrofilů při použití všech stimulancií. K největšímu poklesu došlo po stimulaci PMA, následuje stimulace pomocí E. coli a SA. Po stimulaci fMLP a LPS došlo k nejmenšímu poklesu exprese CD16 u zralých živých neutrofilů.

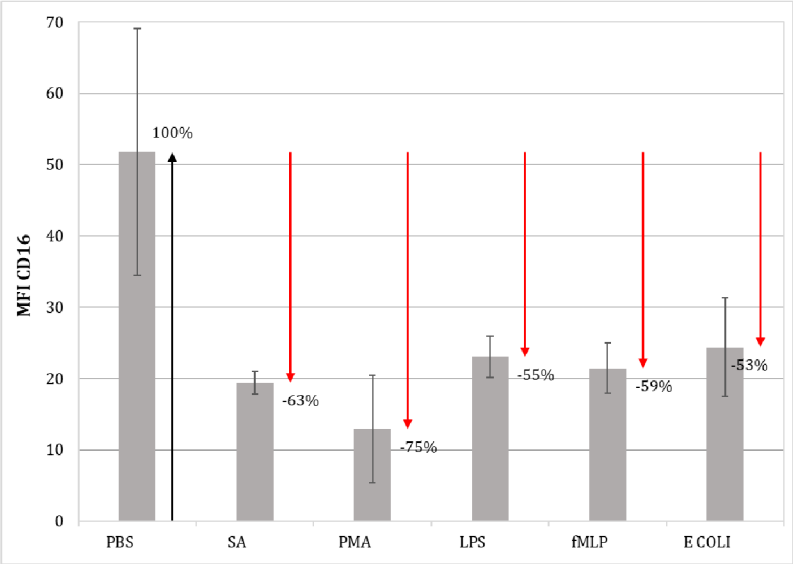


Obr. 8: Srovnání změn exprese CD16 u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI CD16 jednotlivých vzorků stimulovaných různými stimulancii označenými na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro CD16. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.8.2 Srovnání exprese CD16 u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

Výsledky v obrázku č. 9 ukazují, že po stimulaci došlo ke snížení exprese CD16 u nezralých živých neutrofilů při použití všech stimulancií. K největšímu poklesu došlo po stimulaci PMA. Po stimulaci SA, fMLP, LPS a E. coli došlo k srovnatelnému poklesu exprese CD16 u nezralých živých neutrofilů.

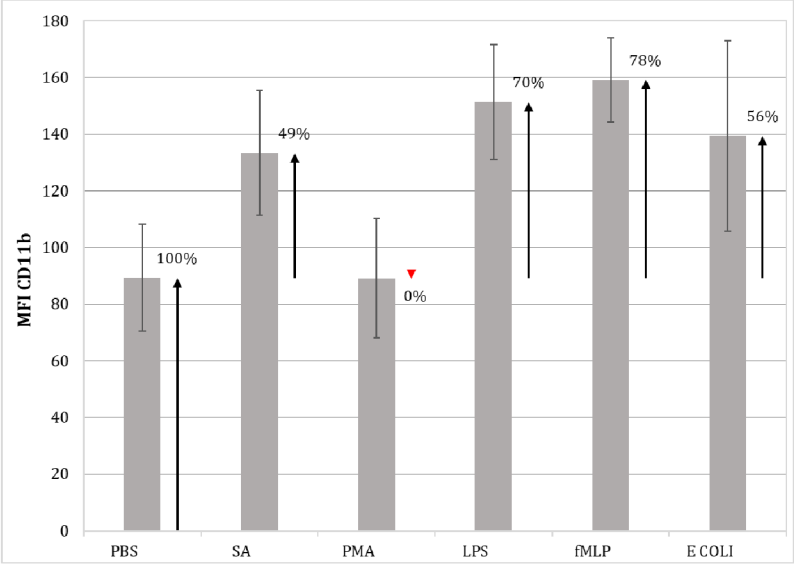


Obr. 9: Srovnání změn exprese CD16 u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI CD16 jednotlivých vzorků stimulovaných různými stimulancii označenými na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro CD16. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.8.3 Srovnání exprese CD11b u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

Výsledky v obrázku č. 10 ukazují, že po stimulaci došlo ke zvýšení exprese CD11b u zralých živých neutrofilů pro všechny stimulancia kromě PMA. Po stimulaci PMA nedošlo ke změnám v expresi CD11b. K největšímu nárůstu exprese CD11b došlo po stimulaci fMLP, následovanou stimulací LPS. Po stimulaci SA a E. coli došlo ke srovnatelnému nárůstu exprese CD11b.

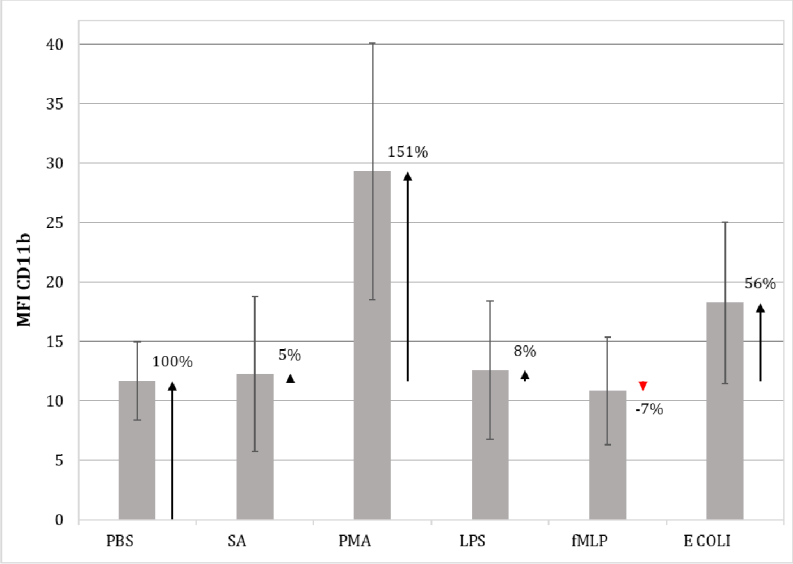


Obr. 10: Srovnání změn exprese CD11b u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI CD11b jednotlivých vzorků stimulovaných různými stimulancii označenými na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro CD11b. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst a pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.8.4 Srovnání exprese CD11b u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

Výsledky v obrázku č. 11 ukazují, že po stimulaci došlo k výraznému zvýšení exprese CD11b u nezralých živých neutrofilů při stimulaci PMA a E. coli. Po stimulaci SA a LPS došlo k mírnému zvýšení exprese CD11b u nezralých živých neutrofilů. Po stimulaci fMLP došlo k mírnému snížení exprese CD11b u nezralých živých neutrofilů.

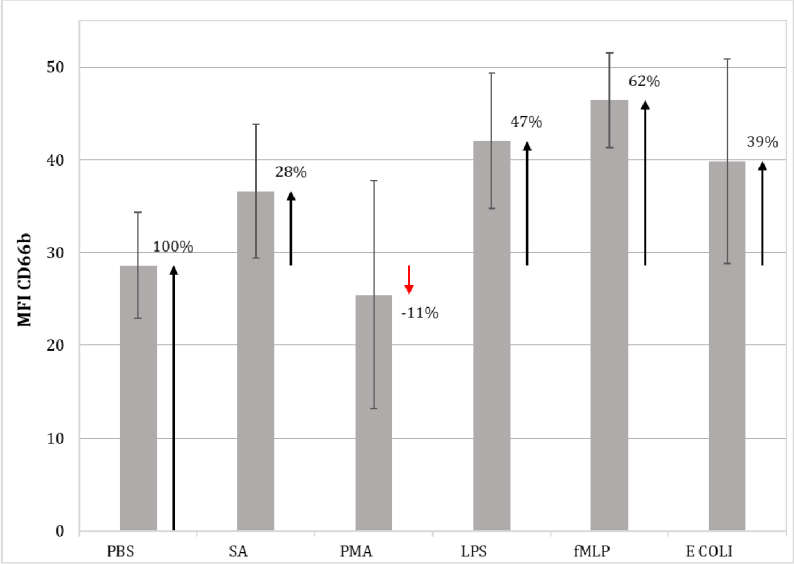


Obr. 11: Srovnání změn exprese CD11b u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI CD11b jednotlivých vzorků stimulovaných různými stimulancii označenými na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro CD11b. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst a pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.8.5 Srovnání exprese CD66b u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

Výsledky v obrázku č. 12 ukazují, že po stimulaci došlo ke zvýšení exprese CD66b u zralých živých neutrofilů po použití všech stimulancií, kromě PMA, u kterého došlo ke snížení exprese CD66b. K největšímu nárůstu exprese CD66b u zralých živých neutrofilů došlo po stimulaci fMLP, následují stimulancia LPS a E. coli. Po stimulaci SA došlo k nejmenšímu zvýšení exprese CD66b u zralých živých neutrofilů.

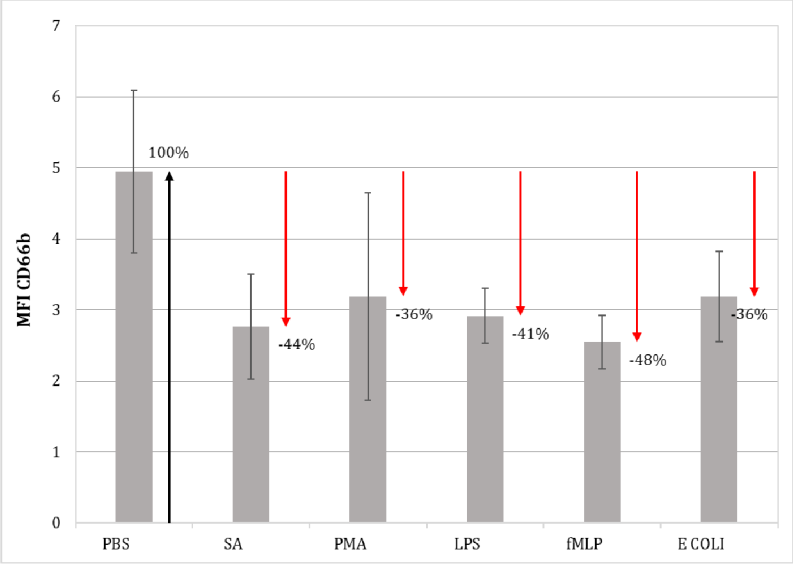


Obr. 12: Srovnání změn exprese CD66b u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI CD66b jednotlivých vzorků stimulovaných různými stimulancii označenými na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro CD66b. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst a pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.8.6 Srovnání exprese CD66b u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

Výsledky v obrázku č. 13 ukazují, že po stimulaci došlo ke srovnatelnému snížení exprese CD66b u nezralých živých neutrofilů po použití všech stimulancií.

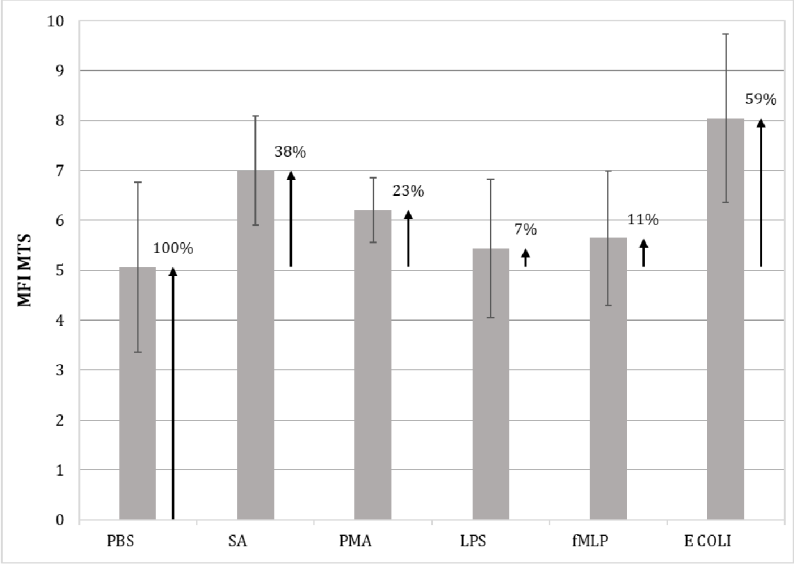


Obr. 13: Srovnání změn exprese CD66b u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI CD66b jednotlivých vzorků stimulovaných různými stimulancii označenými na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro CD66b. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.8.7 Srovnání exprese MTS u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

Výsledky v obrázku č. 14 ukazují, že po stimulaci došlo k významnému zvýšení exprese MTS, tedy k tvorbě mitochondriálního superoxidu, u zralých živých neutrofilů po stimulaci SA, PMA a E. coli. Po stimulaci LPS a fMLP došlo k mírnému zvýšení exprese MTS u zralých živých neutrofilů. K největšímu zvýšení exprese MTS u zralých živých neutrofilů došlo po stimulaci E. coli, následuje SA a poté PMA.

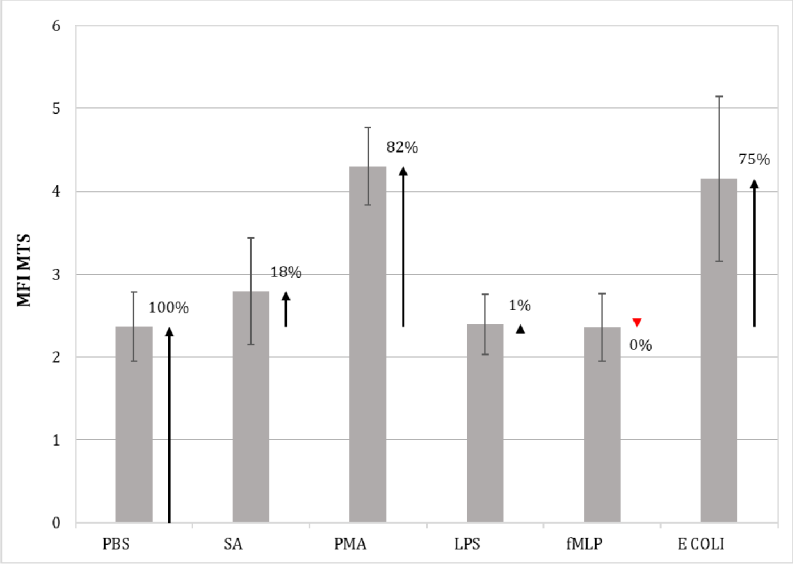


Obr. 14: Srovnán změn exprese MTS u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI MTS jednotlivých vzorků stimulovaných různými stimulancii označenými na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro MTS. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.8.8 Srovnání exprese MTS u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

Výsledky v obrázku č. 15 ukazují, že po stimulaci došlo ke zvýšení exprese MTS u nezralých živých neutrofilů při stimulaci PMA, E. coli a SA. Po stimulaci LPS a fMLP nedošlo ke změně v expresi MTS u nezralých živých neutrofilů. K největšímu zvýšení exprese MTS u nezralých živých neutrofilů došlo po stimulaci PMA, následuje E. coli a poté SA.

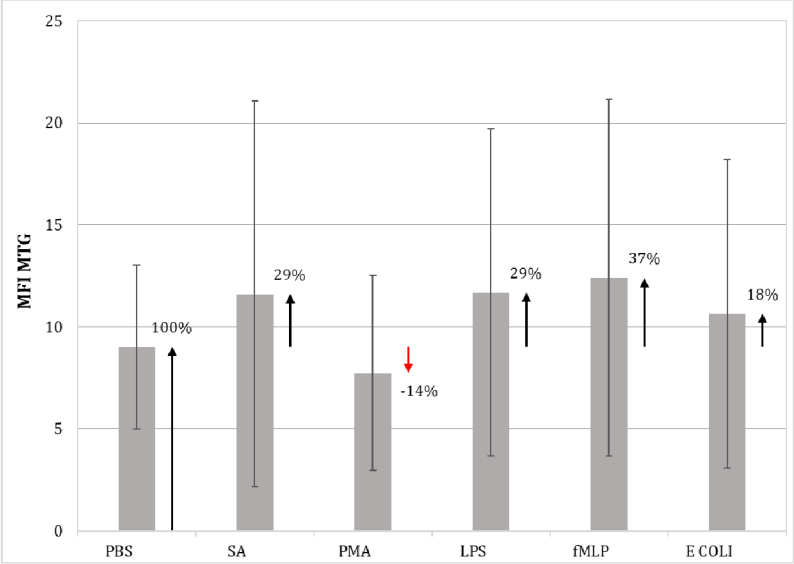


Obr. 15: Srovnání změn exprese MTS u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI MTS jednotlivých vzorků stimulovaných různými stimulancii označenými na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro MTS. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst a pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.8.9 Srovnání exprese MTG u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

Výsledky v obrázku č. 16 ukazují, že po stimulaci došlo k významnému zvýšení exprese MTG, tedy zvětšení mitochondriálního obsahu, u zralých živých neutrofilů po stimulaci fMLP, LPS, SA a E. coli. Po stimulaci PMA došlo ke snížení exprese MTG u zralých živých neutrofilů.

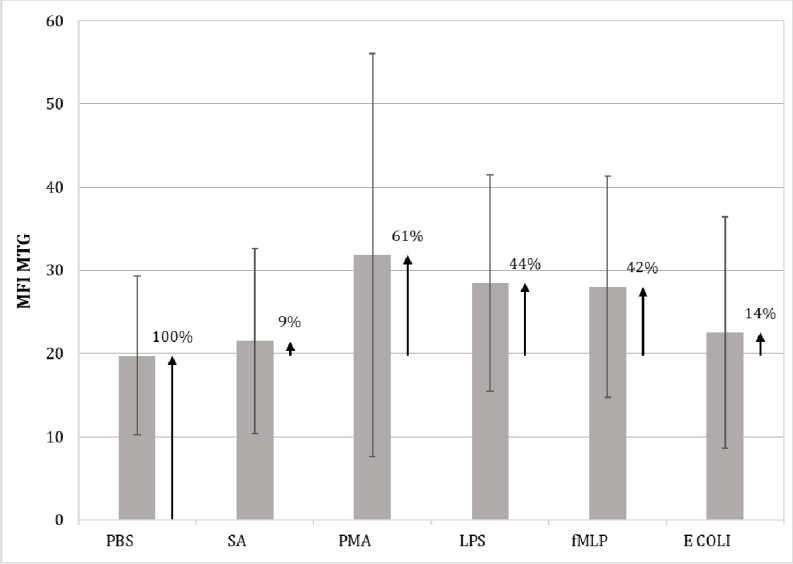


Obr. 16: Srovnání změn exprese MTG u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI MTG jednotlivých vzorků stimulovaných různými stimulancii označenými na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro MTG. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst a pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.8.10 Srovnání exprese MTG u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

Výsledky v obrázku č. 17 ukazují, že po stimulaci došlo k výraznému zvýšení exprese MTG u nezralých živých neutrofilů po stimulaci PMA, LPS a fMLP. Po stimulaci SA a E. coli došlo k mírnému zvýšení exprese MTG u nezralých živých neutrofilů.

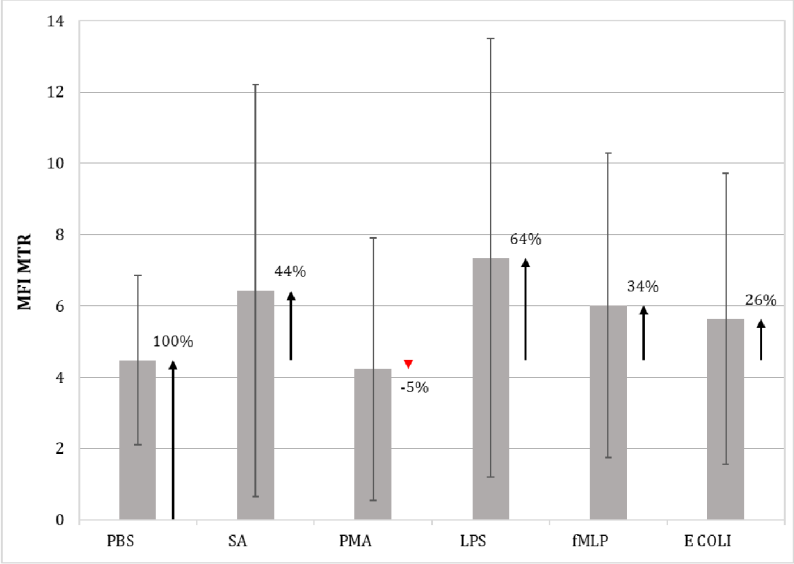


Obr. 17: Srovnání změn exprese MTG u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI MTG jednotlivých vzorků stimulovaných různými stimulancii označenými na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro MTG. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.8.11 Srovnání exprese MTR u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

Výsledky v obrázku č. 18 ukazují, že po stimulaci došlo ke zvýšení exprese MTR, tedy mitochondriálního potenciálu, u zralých živých neutrofilů při stimulaci LPS, fMLP, SA a E. coli. Po stimulaci PMA došlo k mírnému snížení exprese MTR u zralých živých neutrofilů.

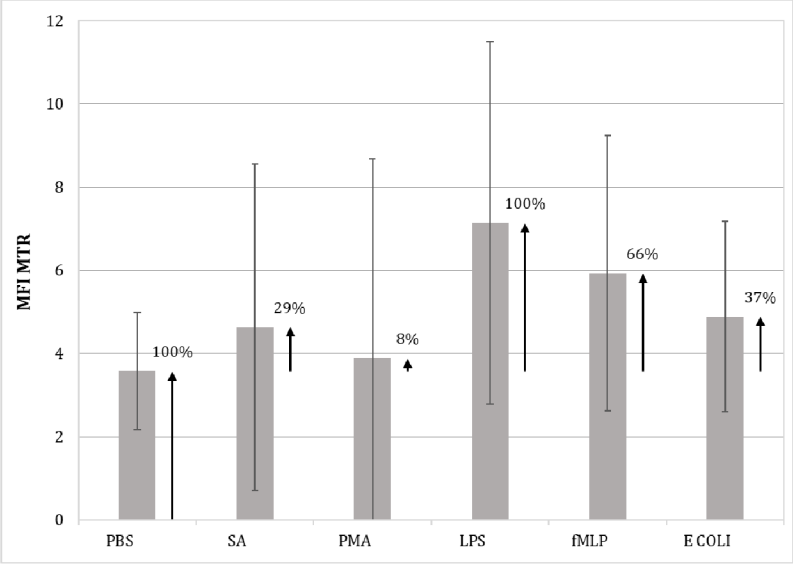


Obr. 18: Srovnání změn exprese MTR u zralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI MTR jednotlivých vzorků stimulovaných různými stimulancii označenými na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro MTR. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst a pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.8.12 Srovnání exprese MTR u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

Výsledky v obrázku č. 19 ukazují, že po stimulaci došlo k významnému zvýšení exprese MTR u nezralých živých neutrofilů po stimulaci SA, LPS, fMLP a E. coli. K největšímu zvýšení exprese MTR došlo po stimulaci LPS, následuje fMLP, E. coli a SA. Po stimulaci PMA došlo k mírnému zvýšení exprese MTR u nezralých živých neutrofilů.



Obr. 19: Srovnání změn exprese MTR u nezralých živých neutrofilů pro různá stimulancia

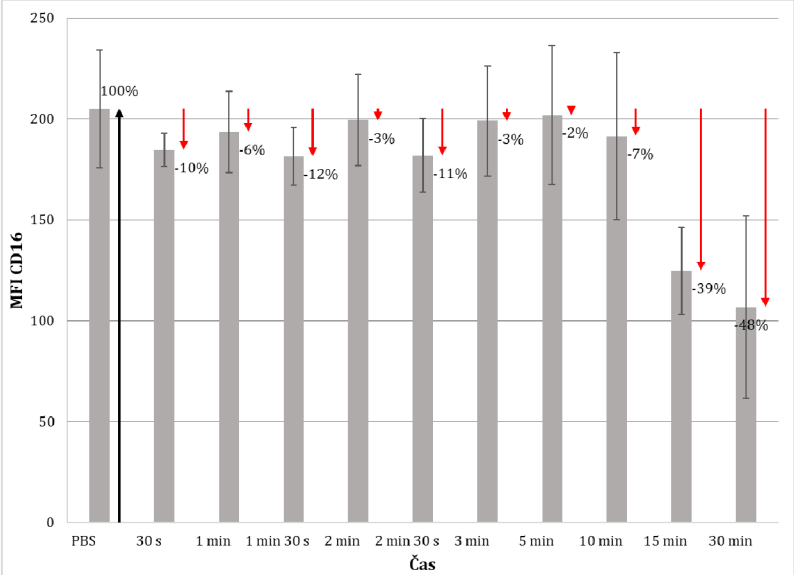
V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI MTR jednotlivých vzorků stimulovaných různými stimulancii označenými na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro MTR. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.9 Výsledky aktivace neutrofilů s různou dobou stimulace S. aureus (kinetický pokus)

Pro tento kinetický pokus byly hodnoceny celkem vzorky od 4 zdravých dárců. Jako stimulans byl použit roztok opsonizovaného Staphylococcus aureus (SA), jako negativní kontrola byl hodnocen vzorek s PBS inkubovaný v lednici na ledu.

4.9.1 Srovnání exprese CD16 u zralých živých neutrofilů v čase od začátku stimulace

Výsledky v obrázku č. 20 ukazují, že u zralých živých neutrofilů ke snížení exprese CD16 již po 30 sekundách stimulace SA. Poté hodnota MFI CD16 oscilovala okolo hodnoty MFI CD16=180. Po 15 minutách stimulace došlo k výraznému snížení exprese CD16 u zralých živých neutrofilů. Největší pokles exprese byl zaznamenán v čase 30 minut, kdy exprese CD16 klesla téměř o polovinu oproti nestimulované kontrole s PBS.

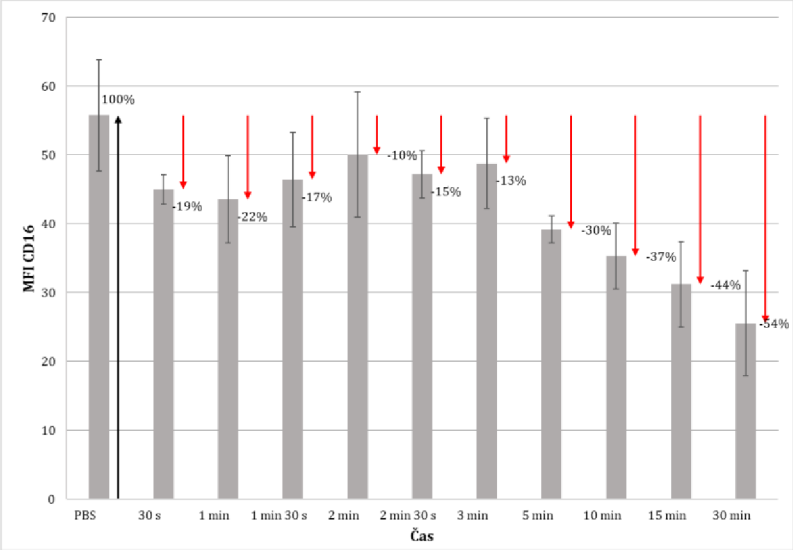


Obr. 20: Srovnání změn exprese CD16 u zralých živých neutrofilů v čase

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI CD16 jednotlivých vzorků stimulovaných různě dlouhý časový interval vyznačený na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro CD16. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.9.2 Srovnání exprese CD16 u nezralých živých neutrofilů v čase od začátku stimulace

Výsledky v obrázku č. 21 ukazují, že u nezralých živých neutrofilů ke snížení exprese CD16 již po 30 sekundách stimulace SA. Poté hodnoty oscilovaly okolo hodnoty MFI CD16=45. Po 5 minutách stimulace SA pak docházelo k postupnému snížení exprese CD16 u nezralých živých neutrofilů. K největšímu snížení exprese CD16 u nezralých živých neutrofilů došlo po 30 minutách stimulace SA.

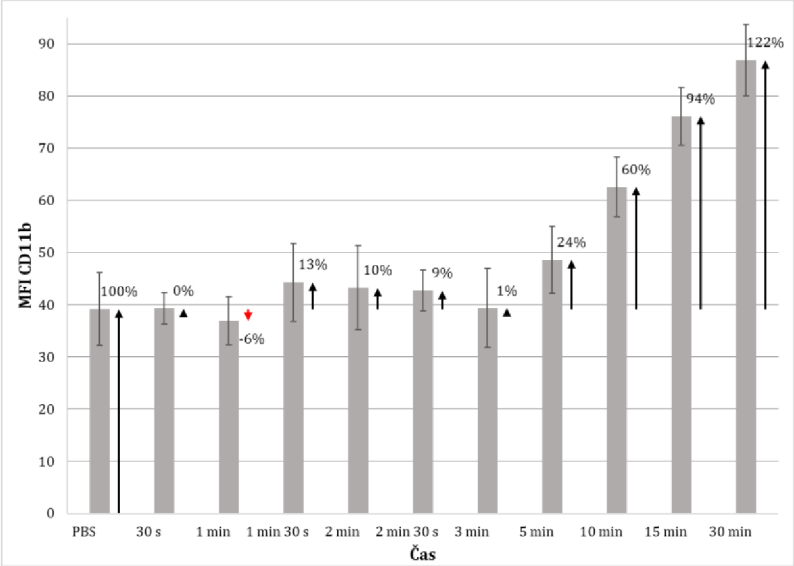


Obr. 21: Srovnání změn exprese CD16 u nezralých živých neutrofilů v čase

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI CD16 jednotlivých vzorků stimulovaných různě dlouhý časový interval vyznačený na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro CD16. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.9.3 Srovnání exprese CD11b u zralých živých neutrofilů v čase od začátku stimulace

Výsledky v obrázku č. 22 ukazují, že u zralých živých neutrofilů došlo k nárůstu exprese CD11b po 1 minutě a 30 sekundách stimulace SA, hodnota MFI CD11b poté oscilovala okolo hodnoty MFI CD11b=40. Po 5 minutách stimulace SA došlo k výraznému nárůstu exprese CD11b u zralých živých neutrofilů. K největším zvýšení exprese CD11b u zralých živých neutrofilů došlo po 30 minutách stimulace SA.

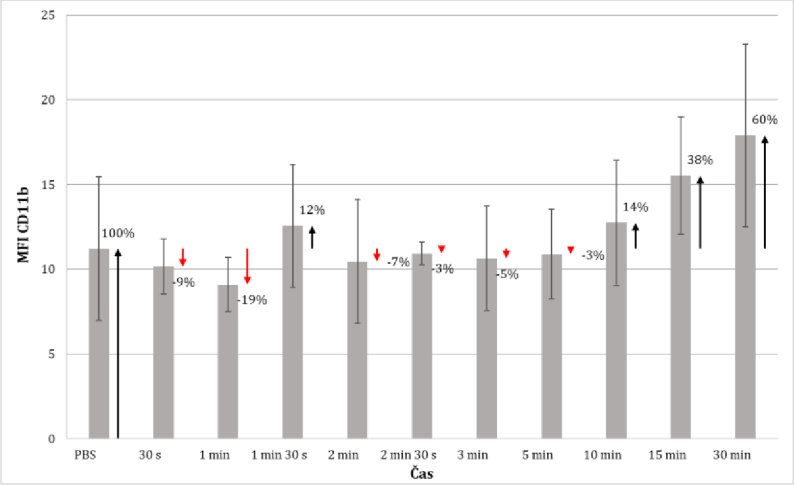


Obr. 22: Srovnání změn exprese CD11b u zralých živých neutrofilů v čase

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI CD11b jednotlivých vzorků stimulovaných různě dlouhý časový interval vyznačený na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro CD11b. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst a pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.9.4 Srovnání exprese CD11b u nezralých živých neutrofilů v čase od začátku stimulace

Výsledky v obrázku č. 23 ukazují, že u nezralých živých neutrofilů došlo nejdříve k poklesu exprese CD11b po 30 sekundách stimulace SA a poté hodnota MFI CD11b oscilovala okolo hodnoty MFI CD11b=10. K výraznému nárůstu exprese CD11b u nezralých živých neutrofilů došlo po 5 minutách stimulace SA. K největšímu zvýšení exprese CD11b u nezralých živých neutrofilů došlo po 30 minutách stimulace SA.

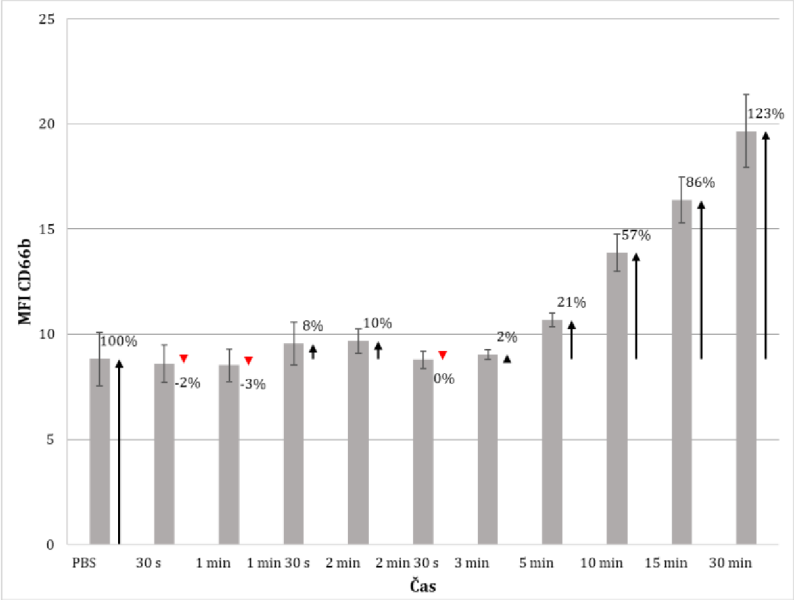


Obr. 23: Srovnání změn exprese CD11b u nezralých živých neutrofilů v čase

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI CD11b jednotlivých vzorků stimulovaných různě dlouhý časový interval vyznačený na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro CD11b. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst a pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.9.5 Srovnání exprese CD66b u zralých živých neutrofilů v čase od začátku stimulace

Výsledky v obrázku č. 24 ukazují, že u zralých živých neutrofilů došlo k výraznému nárůstu exprese CD66b po 5 minutách stimulace SA. Exprese CD66b u zralých živých neutrofilů poté narůstala s maximem po 30 minutách stimulace SA.

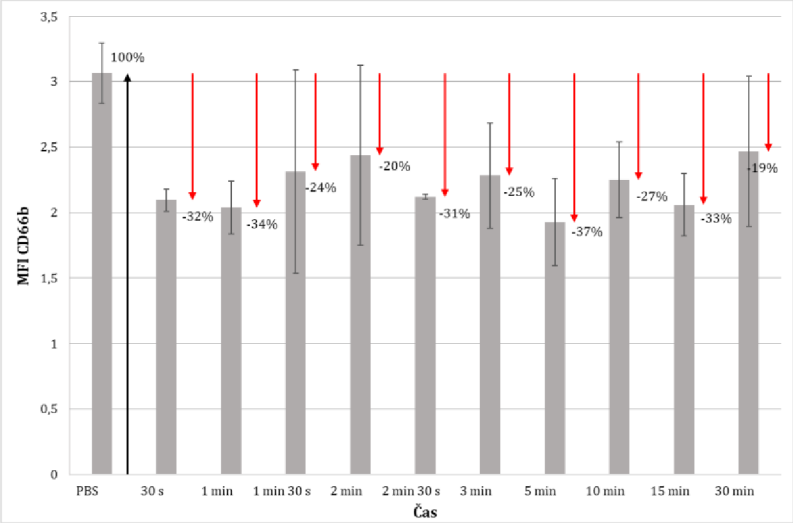


Obr. 24: Srovnání změn exprese CD66b u zralých živých neutrofilů v čase

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI CD66b jednotlivých vzorků stimulovaných různě dlouhý časový interval vyznačený na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro CD66b. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst a pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.9.6 Srovnání exprese CD66b u nezralých živých neutrofilů v čase od začátku stimulace

Výsledky v obrázku č. 25 ukazují, že u nezralých živých neutrofilů došlo k poklesu CD66b již po 30 sekundách stimulace SA. Posléze MFI CD66b nezralých živých neutrofilů oscilovala okolo hodnoty MFI CD66b=2,1.



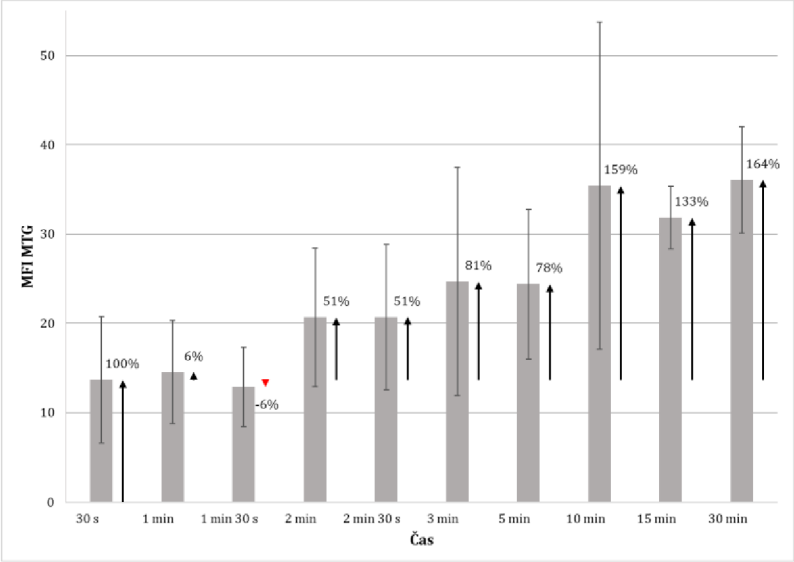
Obr. 25: Srovnání změn exprese CD66b u nezralých živých neutrofilů v čase

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI CD66b jednotlivých vzorků stimulovaných různě dlouhý časový interval vyznačený na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro CD66b. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.9.7 Srovnání exprese MTG u zralých živých neutrofilů v čase od začátku stimulace

Jako výchozí hodnotu 100 % pro daný soubor (měření MTG) měření, je uveden vzorek stimulovaný po dobu 30 sekund. U nestimulovaných vzorků s PBS, které byly inkubovány v lednici a na ledu došlo k nespecifickému zvýšení exprese MTG, které neumíme vysvětlit, a z toho důvodu nebyly nestimulované vzorky s PBS hodnoceny.

Výsledky v obrázku č. 26 ukazují, že u zralých živých neutrofilů došlo k výraznému nárůstu exprese MTG po 2 minutách stimulace SA. K největší expresi MTG u zralých živých neutrofilů došlo po 30 minutách stimulace SA.



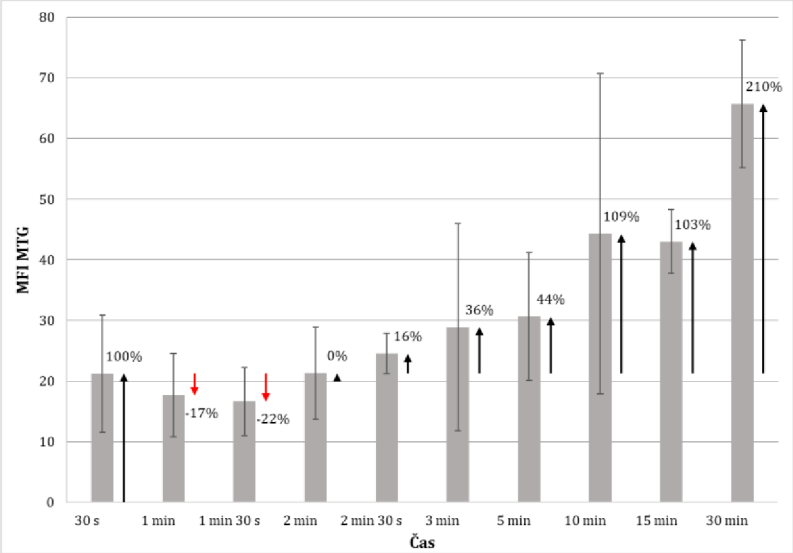
Obr. 26: Srovnání změn exprese MTG u zralých živých neutrofilů v čase

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI MTG jednotlivých vzorků stimulovaných různě dlouhý časový interval vyznačený na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro MTG. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst a pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.9.8 Srovnání exprese MTG u nezralých živých neutrofilů v čase od začátku stimulace

Jako výchozí hodnotu 100 % pro daný soubor (měření MTG) měření, je uveden vzorek stimulovaný po dobu 30 sekund. U nestimulovaných vzorků s PBS, které byly inkubovány v lednici a na ledu došlo k nespecifickému zvýšení exprese MTG, které neumíme vysvětlit a z toho důvodu nebyly nestimulované vzorky s PBS hodnoceny.

Výsledky v obrázku č. 27 ukazují, že u nezralých živých neutrofilů došlo nejdříve ke snížení exprese MTG a poté po 2 minutách stimulace SA k opětovnému nárůstu exprese MTG. Exprese MTG poté narůstala u nezralých živých neutrofilů s maximem po 30 minutách stimulace SA.



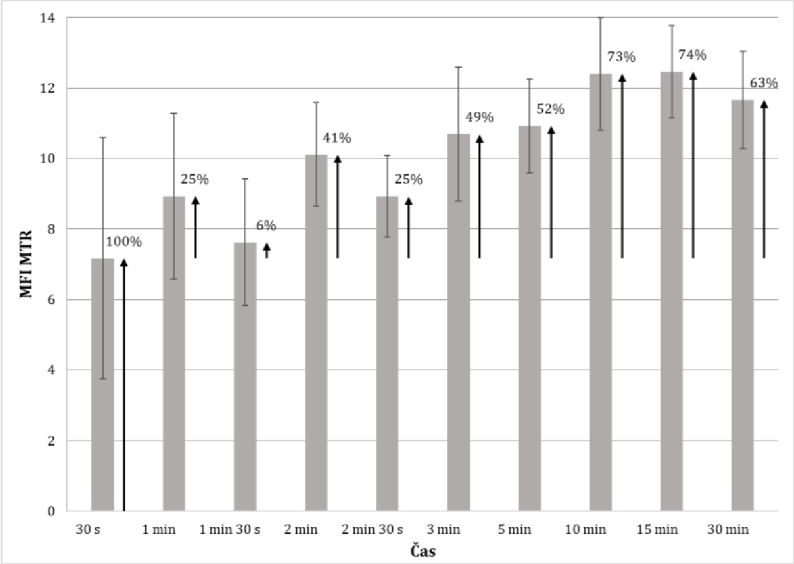
Obr. 27: Srovnání změn exprese MTG u nezralých živých neutrofilů v čase

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI MTG jednotlivých vzorků stimulovaných různě dlouhý časový interval vyznačený na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro MTG. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst a pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.9.9 Srovnání exprese MTR u zralých živých neutrofilů v čase od začátku stimulace

Jako výchozí hodnotu 100 % pro daný soubor (měření MTR) měření, je uveden vzorek stimulovaný po dobu 30 sekund. U nestimulovaných vzorků s PBS, které byly inkubovány v lednici a na ledu došlo k nespecifickému zvýšení exprese MTR, které neumíme vysvětlit a z toho důvodu nebyly nestimulované vzorky s PBS hodnoceny.

Výsledky v obrázku č. 28 ukazují, že u zralých živých neutrofilů došlo k výraznému nárůstu exprese MTR již po 1 minutě stimulace SA. Hodnota MFI MTR zralých živých neutrofilů poté oscilovala okolo MFI MTR=9 až do času 3 minut stimulace SA, kdy došlo k nárůstu exprese MTR. Exprese MTR zralých živých neutrofilů poté postupně narůstala s maximem v 15 minutách stimulace SA.



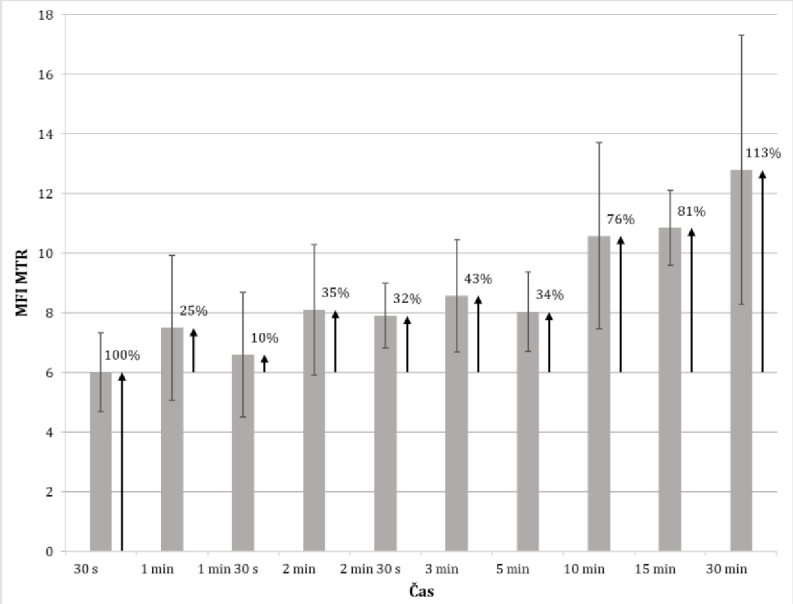
Obr. 28: Srovnání změn exprese MTR u zralých živých neutrofilů v čase

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI MTR jednotlivých vzorků stimulovaných různě dlouhý časový interval vyznačený na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro MTR. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.9.10 Srovnání exprese MTR u nezralých živých neutrofilů v čase od začátku stimulace

Jako výchozí hodnotu 100 % pro daný soubor (měření MTR) měření, je uveden vzorek stimulovaný po dobu 30 sekund. U nestimulovaných vzorků s PBS, které byly inkubovány v lednici a na ledu došlo k nespecifickému zvýšení exprese MTR, které neumíme vysvětlit a z toho důvodu nebyly nestimulované vzorky s PBS hodnoceny.

Výsledky v obrázku č. 29 ukazují, že u nezralých živých neutrofilů došlo k nárůstu exprese MTR již po 1 minutě stimulace SA. Hodnota MFI MTR nezralých živých neutrofilů poté oscilovala okolo hodnoty MFI MTR=8. Po 10 minutách stimulace SA došlo k nárůstu exprese MTR u nezralých živých neutrofilů a poté postupně exprese MTR narůstala s maximem po 30 minutách stimulace SA.

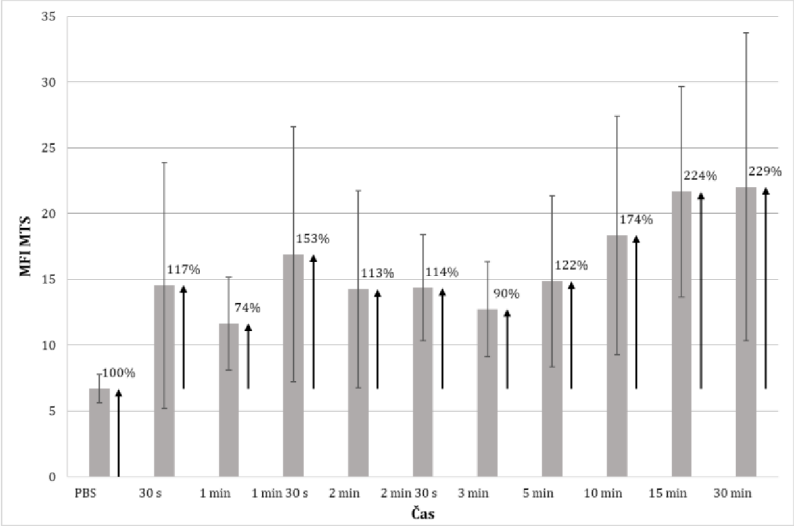


Obr. 29: Srovnání změn exprese MTR u nezralých živých neutrofilů v čase

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI MTR jednotlivých vzorků stimulovaných různě dlouhý časový interval vyznačený na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro MTR. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.9.11 Srovnání exprese MTS u zralých živých neutrofilů v čase od začátku stimulace

Výsledky v obrázku č. 30 ukazují, že u zralých živých neutrofilů došlo k nárůstu exprese MTS již po 30 sekundách stimulace SA. Hodnota MFI MTS zralých živých neutrofilů poté oscilovala okolo hodnoty MFI MTS=14,5. Poté po 10 minutách stimulace SA došlo k výraznému nárůstu exprese MTS zralých živých neutrofilů s maximem po 30 minutách stimulace SA.

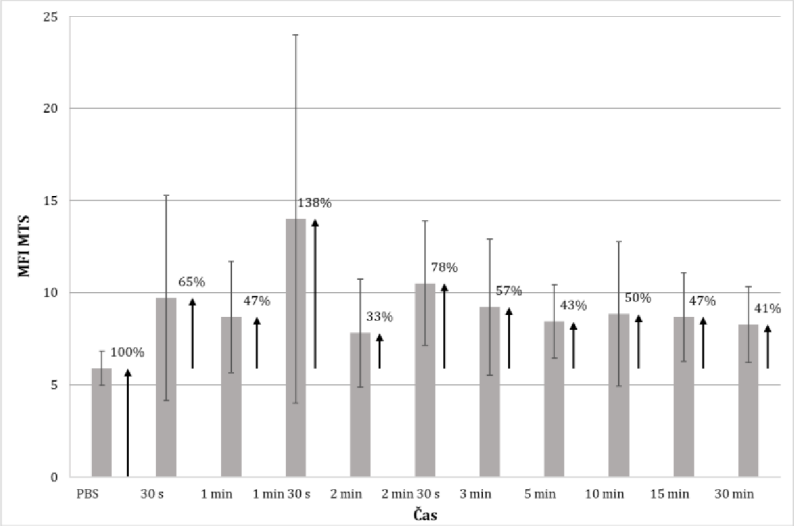


Obr. 30: Srovnání změn exprese MTS u zralých živých neutrofilů v čase

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI MTS jednotlivých vzorků stimulovaných různě dlouhý časový interval vyznačený na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro MTS. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.9.12 Srovnání exprese MTS u nezralých živých neutrofilů v čase od začátku stimulace

Výsledky v obrázku č. 31 ukazují, že u nezralých živých neutrofilů došlo k výraznému nárůstu exprese MTS již po 30 sekundách stimulace SA. Hodnota MFI MTS nezralých živých neutrofilů poté oscilovala okolo hodnoty MFI MTS=9 až do 30 minut stimulace SA.



Obr. 31: Srovnání změn exprese MTS u nezralých živých neutrofilů v čase

V obrázku jsou znázorněny průměr a SD pro naměřené hodnoty MFI MTS jednotlivých vzorků stimulovaných různě dlouhý časový interval vyznačený na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro MTS. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.10 Základní analýza sledovaných znaků při metabolickém testování

Pro tento pokus bylo hodnoceno celkem 5 vzorků zdravých dárců. Jako stimulans byl použit roztok opsonizovaného S. aureus (SA). Jako inhibitory metabolismu byly použity BPTES, MPA, 2DG. Jako stimulátor metabolismu bylo použito médium RPMI 1640 s obsahem glukózy (GLC) o c=10-12,2 mmol/l.

Koncentrace inhibitorů a glukózy ve vzorcích:

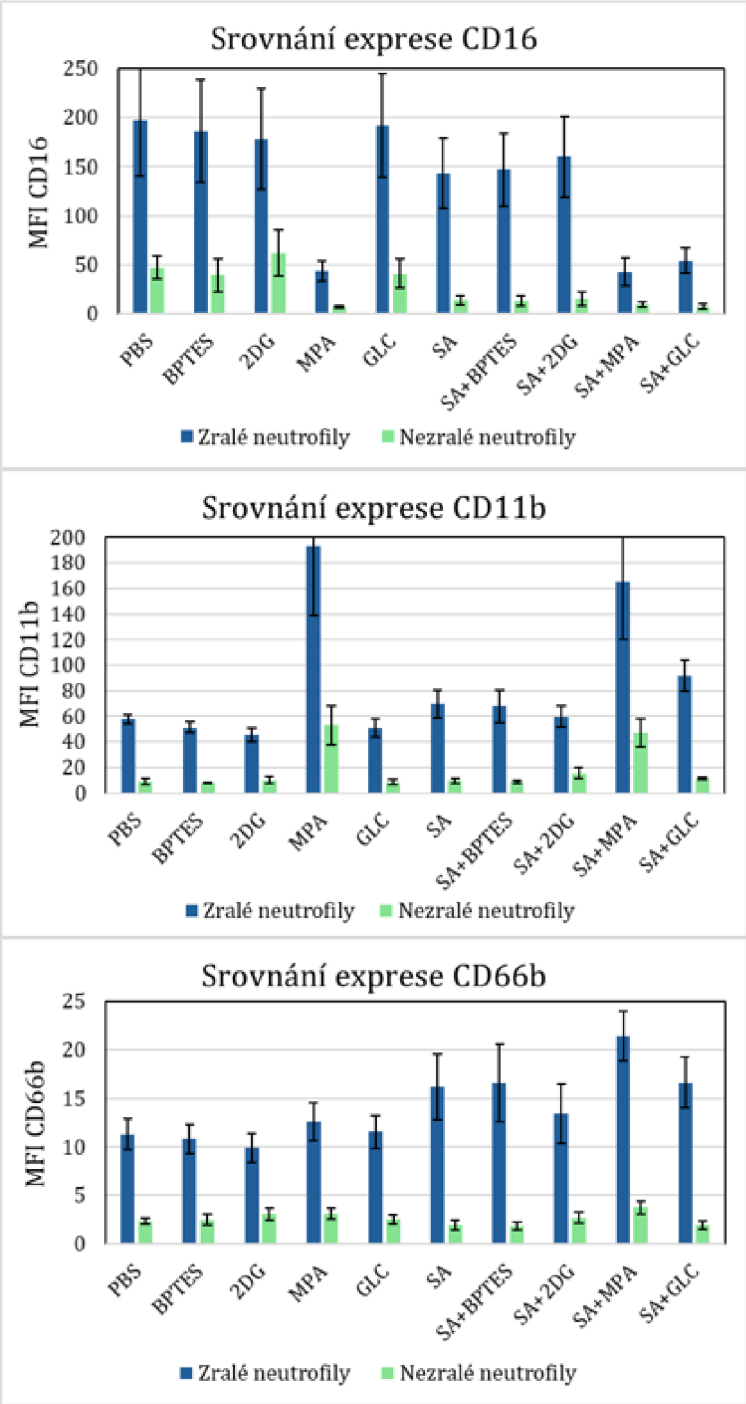
- BPTES c=0,16 mmol/l
- MPA c=5 mmol/l
- 2DG c=50,4 mmol/l
- GLC c=5-6,1 mmol/l

4.10.1 Rozdíl MFI CD16, CD11b a CD66b mezi zralými a nezralými neutrofily při metabolickém testování

Výsledky v obrázku č. 32 v horním grafu ukazují, že MFI CD16 je výrazně vyšší u zralých neutrofilů, a to jak před, tak i po stimulaci včetně použití inhibitorů i média s GLC. Při použití inhibitoru MPA došlo ovšem k nespecifickému výraznému snížení exprese CD16 u obou populací u nestimulovaného vzorku, které neumíme vysvětlit.

Výsledky v obrázku č. 32 v prostředním grafu ukazují, že MFI CD11b je výrazně vyšší u zralých neutrofilů, a to jak před stimulací, tak i po stimulaci včetně použití inhibitorů i média s GLC. Při použití inhibitoru MPA došlo ovšem k nespecifickému výraznému zvýšení exprese CD11b u obou populací u nestimulovaného i stimulovaného vzorku, které neumíme vysvětlit.

Výsledky v obrázku č. 32 v dolním grafu ukazují, že MFI CD66b je výrazně vyšší u zralých neutrofilů, a to jak před stimulací, tak i po stimulaci včetně použití inhibitorů i média s GLC. Hodnota MFI CD66b nebyla výrazně ovlivněna inhibitorem MPA jako tomu bylo u exprese CD16 a CD11b.



Obr. 32: Srovnání exprese CD16, CD11b a CD66b mezi zralými a nezralými neutrofily při metabolickém testování

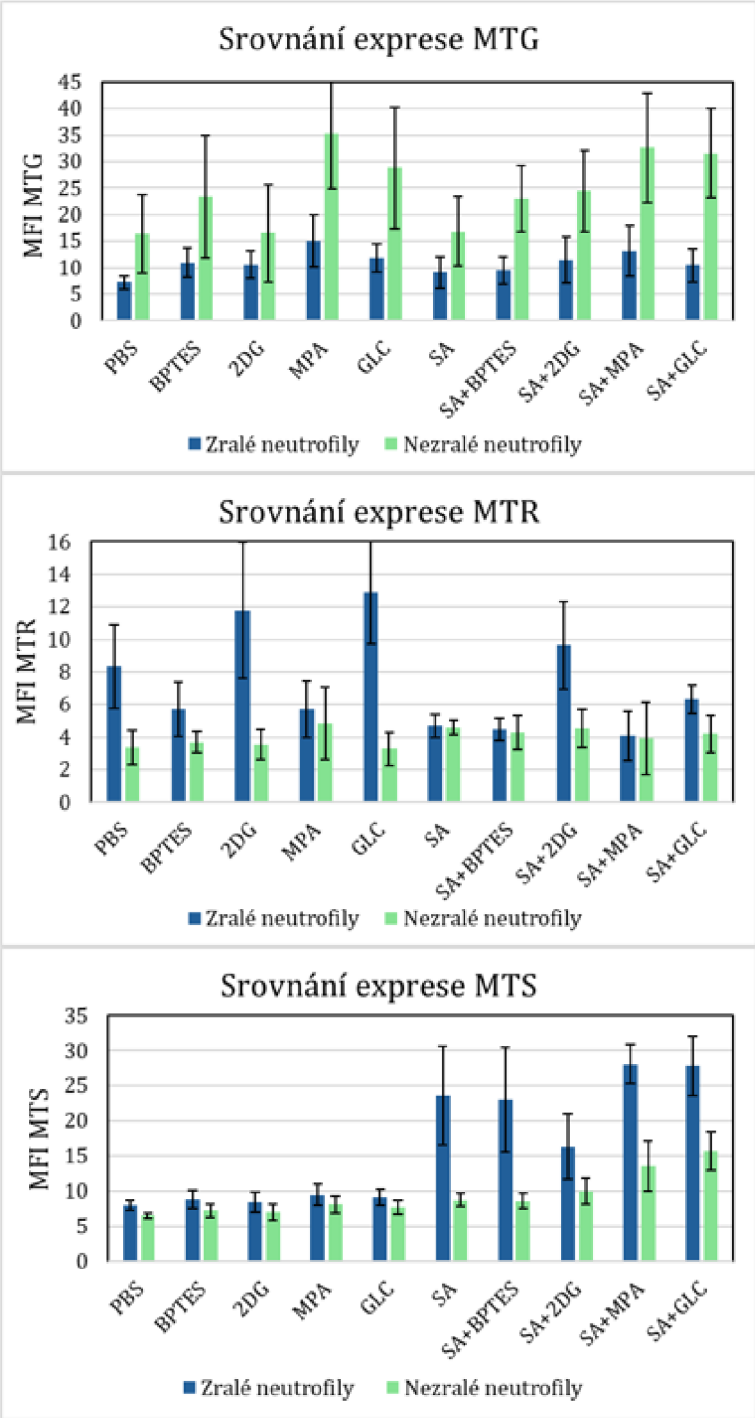
V obrázku jsou 3 grafy se znázorněným průměrem a SD pro naměřené hodnoty MFI CD16, CD11b a CD66b jednotlivých vzorků nestimulovaných i stimulovaných pomocí SA s přídavkem substancí označených na ose x. Na ose y je stupnice MFI jednotlivých znaků.

4.10.2 Rozdíl MFI MTG, MTR a MTS mezi zralými a nezralými neutrofily při metabolickém testování

Výsledky v obrázku č. 33 v horním grafu ukazují, že nezralé neutrofily mají výrazně vyšší expresi MTG před i po stimulaci, a to včetně použití inhibitorů. Při použití inhibitorů i média s GLC došlo ovšem ke zvýšení exprese MTG u obou populací u nestimulovaných vzorků.

Výsledky v obrázku č. 33 v prostředním grafu ukazují, že zralé neutrofily mají vyšší expresi MTR před stimulací než nezralé neutrofily, přičemž po stimulaci došlo u některých inhibitorů ke srovnání exprese MTR mezi oběma populacemi neutrofilů. Exprese MTR u nestimulovaných vzorků zralých neutrofilů byla ale výrazně ovlivněna použitými inhibitory i médiem s GLC.

Výsledky v obrázku č. 33 v dolním grafu ukazují, že exprese MTS je vyšší u zralých neutrofilů před i po stimulaci. Exprese MTS u nestimulovaných vzorků nebyla nijak ovlivněna použitím inhibitorů u obou populací neutrofilů.



Obr. 33: Srovnání exprese MTG, MTR a MTS u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování

V obrázku jsou 3 grafy se znázorněným průměrem a SD pro naměřené hodnoty MFI MTG, MTR a MTS jednotlivých vzorků nestimulovaných a stimulovaných pomocí SA a s přídavkem substancí označených na ose x. Na ose y je stupnice MFI jednotlivých znaků.

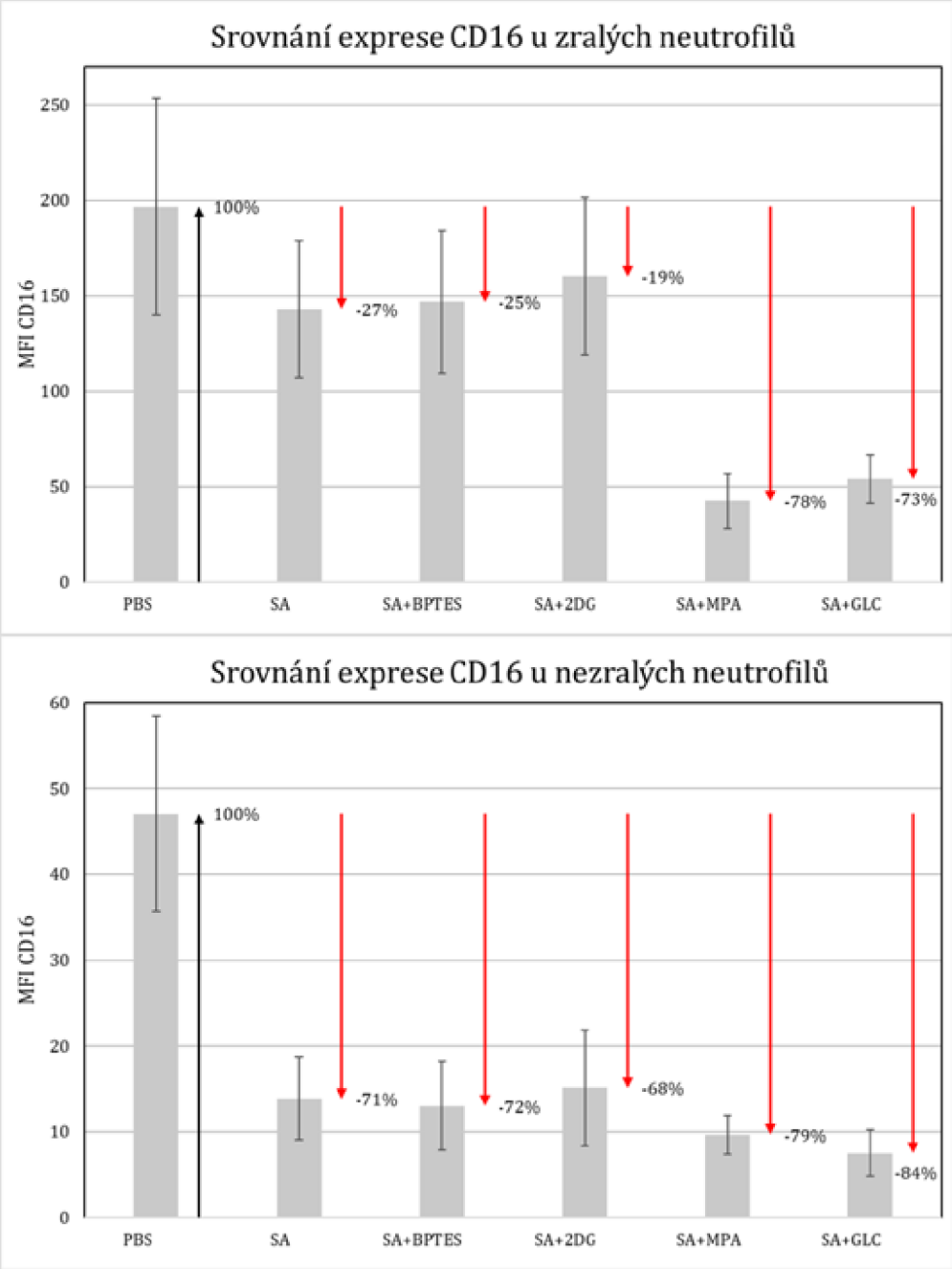
4.11 Výsledky aktivace neutrofilů při metabolickém testování

Pro tento pokus bylo hodnoceno celkem 5 vzorků zdravých dárců. Jako stimulans byl použit roztok opsonizovaného S. aureus (SA). Jako inhibitory metabolismu byly použity BPTES, MPA, 2DG. Jako stimulátor metabolismu bylo použito médium RPMI 1640 s obsahem glukózy (GLC).

4.11.1 Srovnání exprese CD16 u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování

Výsledky v obrázku č. 34 v horním grafu ukazují, že po stimulaci SA došlo ke snížení exprese CD16. Toto snížení se navýšilo při současném přidání inhibitoru MPA a média s GLC. Snížení exprese CD16 u zralých neutrofilů nebylo ovlivněno inhibitorem BPTES a inhibitor 2DG pouze mírně inhiboval snížení CD16.

Výsledky v obrázku č. 34 v dolním grafu ukazují, že po stimulaci SA došlo ke snížení exprese CD16 u nezralých neutrofilů. Toto snížení se mírně navýšilo přidáním inhibitoru MPA a výrazněji navýšilo při přidání média s GLC. Snížení exprese CD16 u nezralých neutrofilů nebylo ovlivněno inhibitorem BPTES a 2DG.



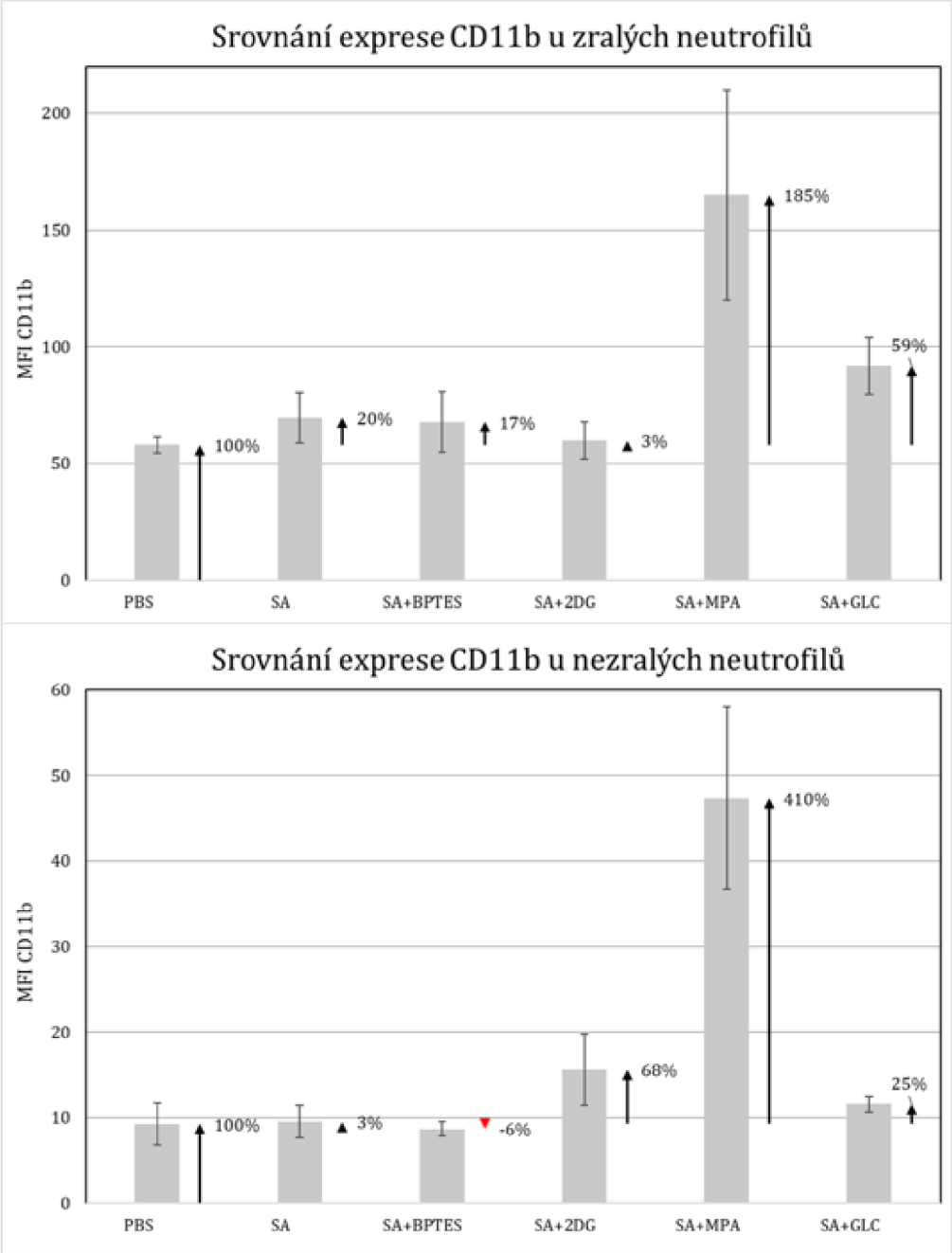
Obr. 34: Srovnání exprese CD16 u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování

V obrázku jsou 2 grafy se znázorněným průměrem a SD pro naměřené hodnoty MFI CD16 jednotlivých vzorků nestimulovaných a stimulovaných SA a za přítomnosti substancí označených na ose x a negativní kontroly PBS. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro CD16. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.11.2 Srovnání exprese CD11b u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování

Výsledky v obrázku č. 35 v horním grafu ukazují, že po stimulaci SA došlo u zralých neutrofilů ke zvýšení exprese CD11b. Tento nárůst exprese byl inhibován inhibitorem 2DG, kdy nedošlo k navýšení exprese CD11b při použití tohoto inhibitoru. Exprese CD11b nebyla nijak ovlivněna inhibitorem BPTES. Při použití inhibitoru MPA došlo k velmi výraznému zvýšení exprese CD11b u zralých neutrofilů. Při přidání média s GLC došlo také ke zvýšení exprese CD11b při stimulaci SA.

Výsledky v obrázku č. 35 v dolním grafu ukazují, že po stimulaci SA nedošlo k navýšení exprese CD11b u nezralých neutrofilů. Při stimulaci SA a použití inhibitoru 2DG a MPA ale došlo k výraznému zvýšení exprese CD11b u nezralých neutrofilů, přičemž při použití MPA došlo k masivnímu navýšení exprese. Exprese CD11b u nezralých neutrofilů se zvýšila také po stimulaci SA s médiem s GLC. Inhibitor BPTES nijak výrazně neovlivnil expresi CD11b u nezralých neutrofilů.



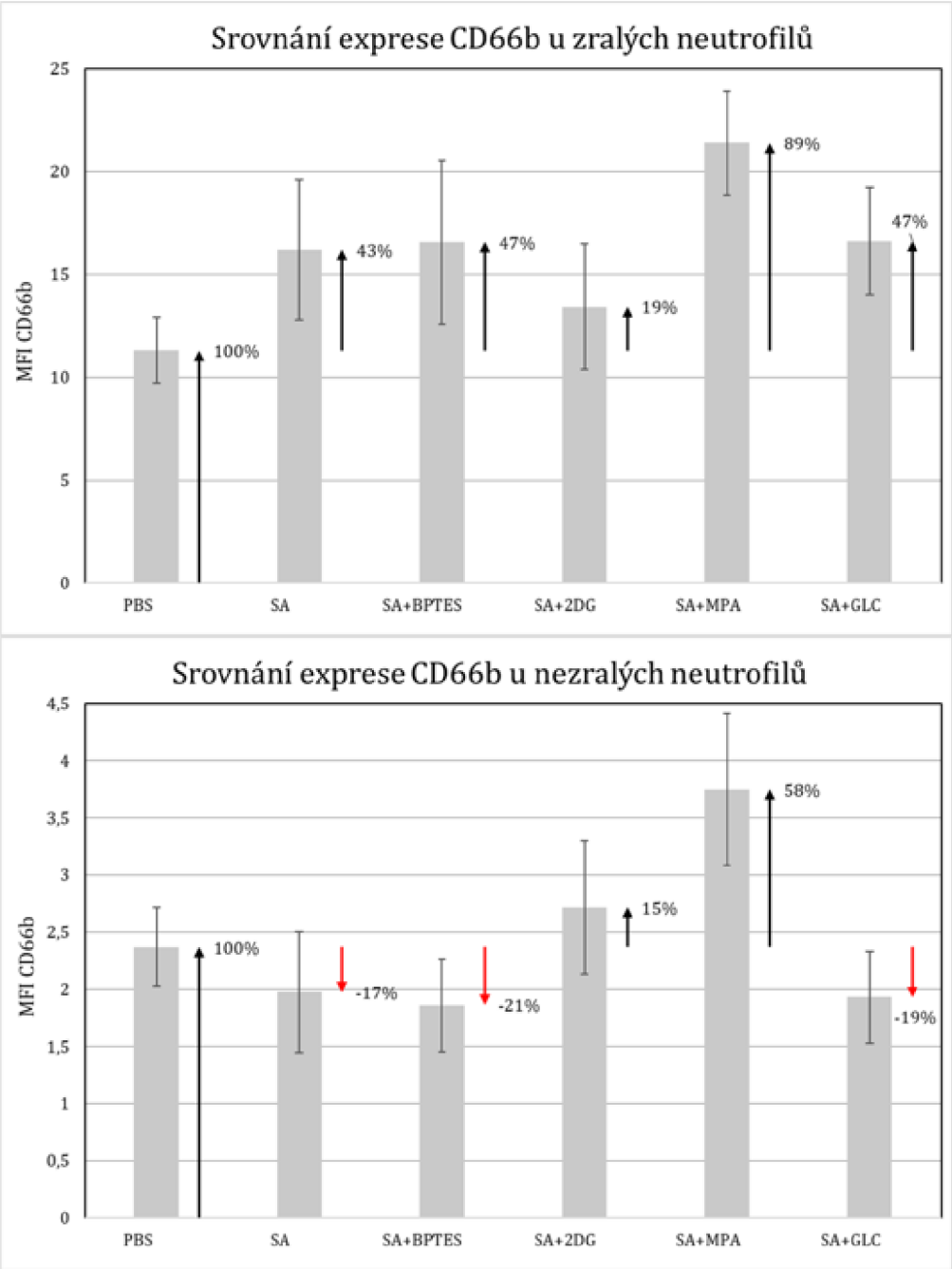
Obr. 35: Srovnání exprese CD11b u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování

V obrázku jsou 2 grafy se znázorněným průměrem a SD pro naměřené hodnoty MFI CD11b jednotlivých vzorků nestimulovaných a stimulovaných SA a za přítomnosti substancí označených na ose x a negativní kontroly PBS. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro CD11b. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst a pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.11.3 Srovnání exprese CD66b u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování

Výsledky v obrázku č. 36 v horním grafu ukazují, že po stimulaci SA došlo k navýšení exprese CD66b u zralých neutrofilů. Toto navýšení nebylo ovlivněno inhibitorem BPTES ani médiem s GLC. Při použití inhibitoru 2DG došlo po stimulaci SA k menšímu nárůstu exprese CD66b u zralých neutrofilů. Naopak tomu je při použití inhibitoru MPA, kdy po stimulaci došlo k většímu výraznému nárůstu exprese CD66b u zralých neutrofilů.

Výsledky v obrázku č. 36 v dolním grafu ukazují, že po stimulaci SA došlo ke snížení exprese CD66b u nezralých neutrofilů. Toto snížení nebylo ovlivněno inhibitorem BPTES ani médiem s GLC. Při použití inhibitoru 2DG a MPA došlo po stimulaci naopak k nárůstu exprese CD66b u nezralých neutrofilů.



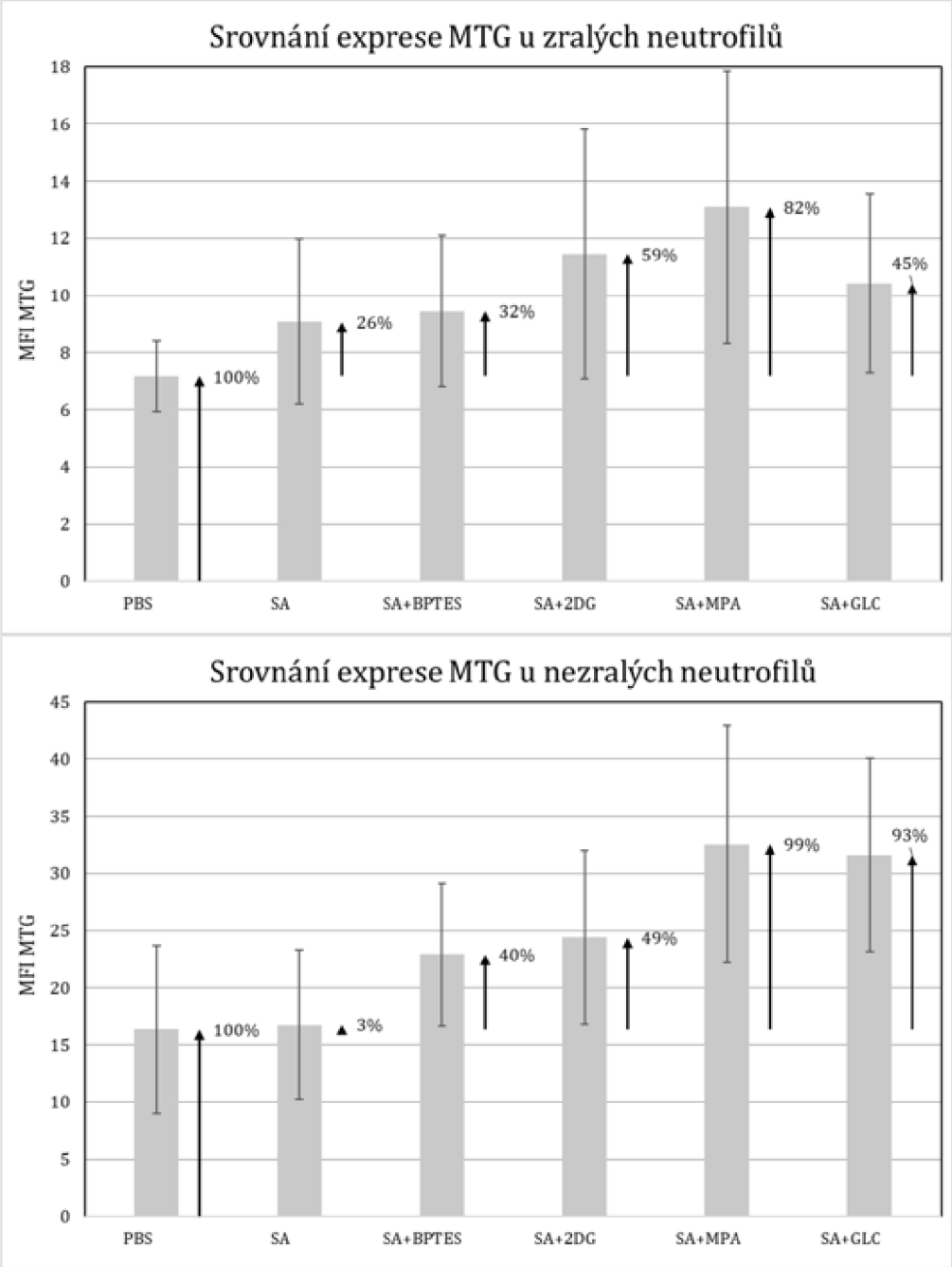
Obr. 36: Srovnání exprese CD66b u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování

V obrázku jsou 2 grafy se znázorněným průměrem a SD pro naměřené hodnoty MFI CD66b jednotlivých vzorků nestimulovaných a stimulovaných SA a za přítomnosti substancí označených na ose x a negativní kontroly PBS. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro CD66b. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst a pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.11.4 Srovnání exprese MTG u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování

Výsledky v obrázku č. 37 v horním grafu ukazují, že po stimulaci SA došlo u zralých neutrofilů ke zvýšení exprese MTG. Při použití inhibitoru BPTES nedošlo po stimulaci SA k výraznějšímu ovlivnění exprese MTG u zralých neutrofilů. Při použití inhibitoru 2DG, MPA a média s GLC došlo po stimulaci SA k výraznému nárůstu exprese MTG u zralých neutrofilů.

Výsledky v obrázku č. 37 v dolním grafu ukazují, že po stimulaci SA nedošlo k nárůstu exprese MTG u nezralých neutrofilů. Při použití všech inhibitorů a média s GLC došlo po stimulaci SA ale k výraznému zvýšení exprese MTG u nezralých neutrofilů, přičemž tohle navýšení bylo nejvyšší při použití inhibitoru MPA a média s GLC.



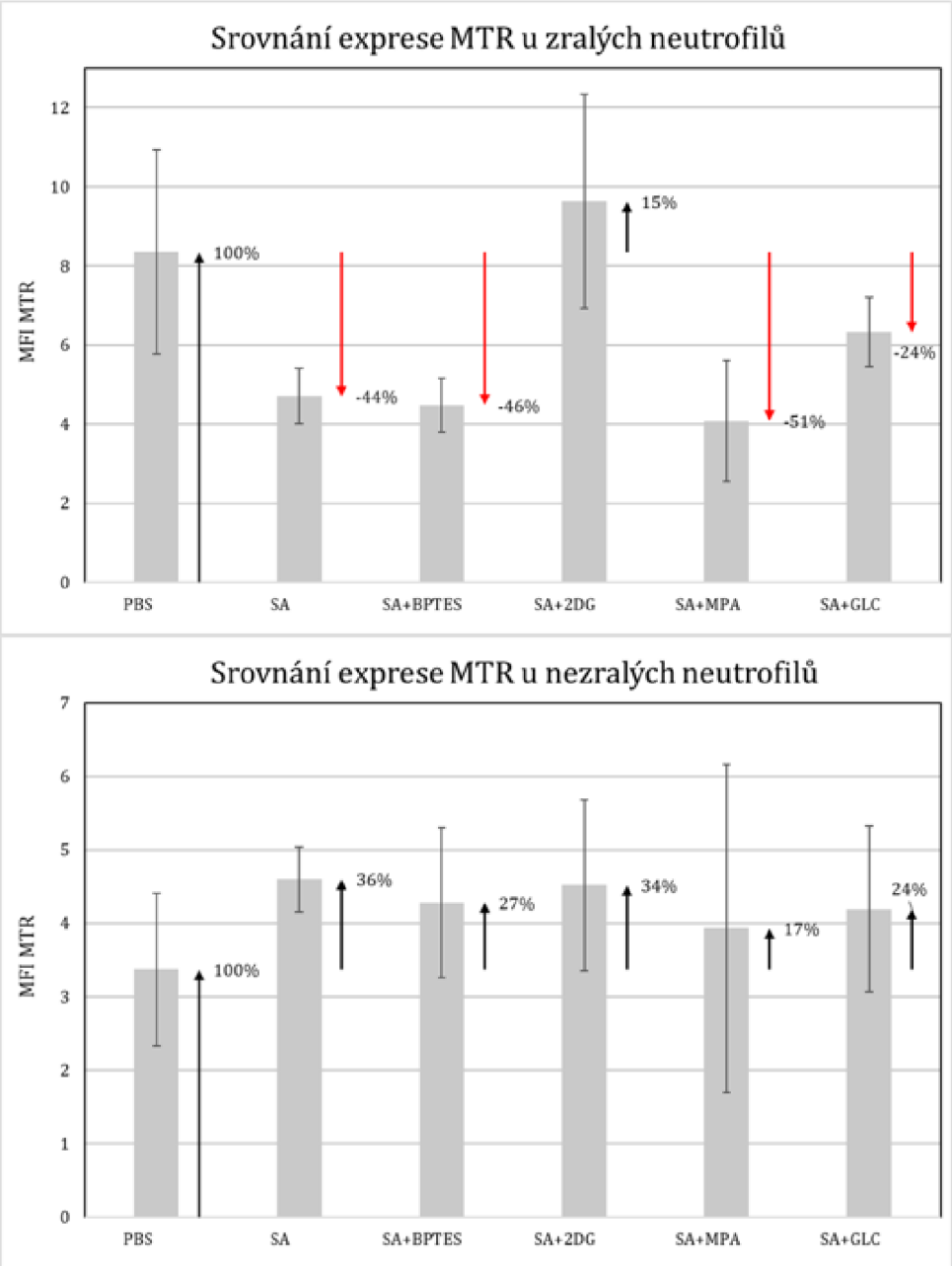
Obr. 37: Srovnání exprese MTG u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování

V obrázku jsou 2 grafy se znázorněným průměrem a SD pro naměřené hodnoty MFI MTG jednotlivých vzorků nestimulovaných a stimulovaných SA a za přítomnosti substancí označených na ose x a negativní kontroly PBS. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro MTG. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.11.5 Srovnání exprese MTR u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování

Výsledky v obrázku č. 38 v horním grafu ukazují, že po stimulaci SA došlo ke snížení exprese MTR u zralých neutrofilů. Toto snížení nebylo ovlivněno inhibitorem BPTES. Při použití inhibitoru MPA došlo po stimulaci SA k mírně většímu poklesu exprese MTR u zralých neutrofilů. Při použití inhibitoru 2DG došlo naopak k nárůstu exprese MTR u zralých neutrofilů po stimulaci SA. Při použití média s GLC došlo k menšímu poklesu exprese MTR u zralých neutrofilů po stimulaci SA.

Výsledky v obrázku č. 38 v dolním grafu ukazují, že po stimulaci SA došlo u nezralých neutrofilů k nárůstu exprese MTR. Tento nárůstu nebyl ovlivněn inhibitorem 2DG. Při použití inhibitoru BPTES, MPA a média s GLC došlo k menšímu nárůstu exprese MTR po stimulaci SA.



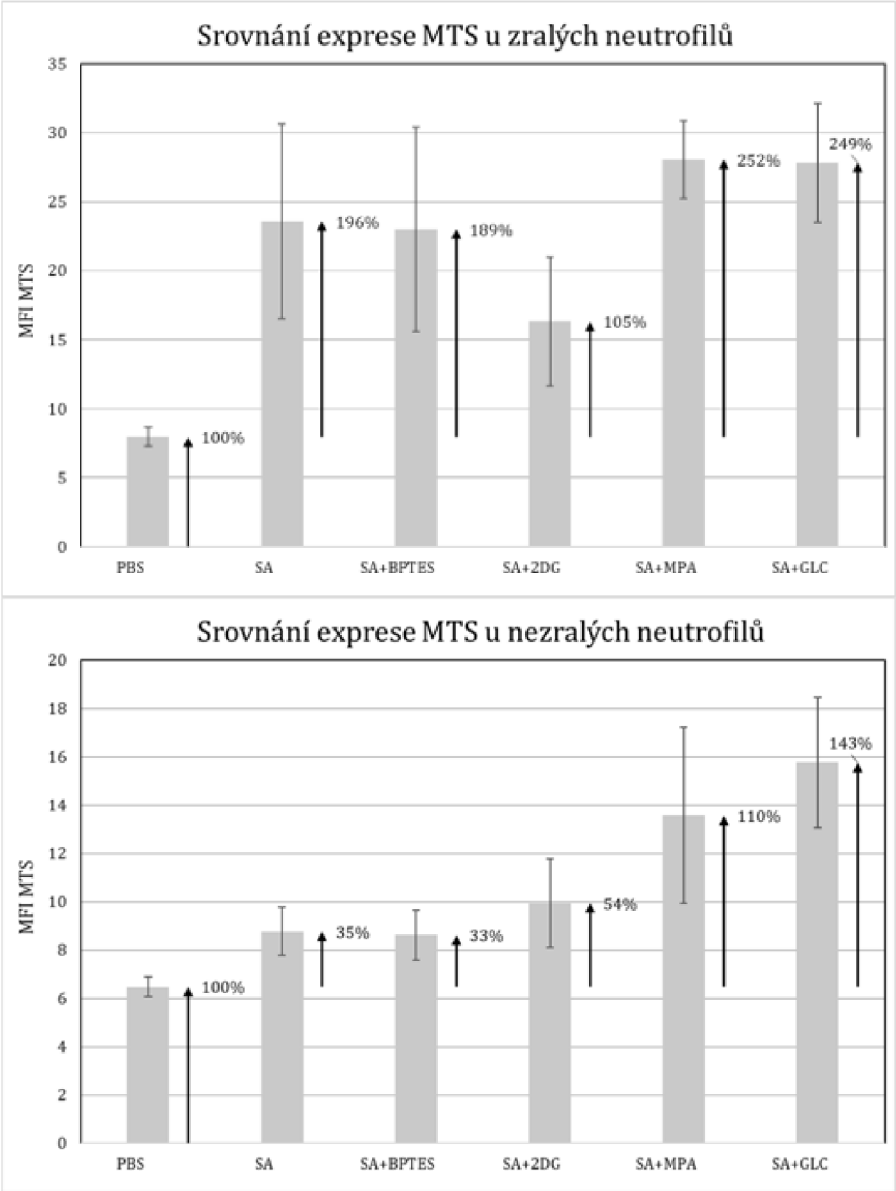
Obr. 38: Srovnání exprese MTR u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování

V obrázku jsou 2 grafy se znázorněným průměrem a SD pro naměřené hodnoty MFI MTR jednotlivých vzorků nestimulovaných a stimulovaných SA a za přítomnosti substancí označených na ose x a negativní kontroly PBS. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro MTR. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst a pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.11.6 Srovnání exprese MTS u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování

Výsledky v obrázku č. 39 v horním grafu ukazují, že po stimulaci SA došlo u zralých neutrofilů k výraznému nárůstu exprese MTS. Tento nárůstu nebyl významně ovlivněn inhibitorem BPTES. Při použití inhibitoru 2DG došlo k menšímu nárůstu exprese MTS po stimulaci SA. Při použití inhibitoru MPA a média s GLC došlo k výrazně většímu nárůstu exprese MTS po stimulaci SA u zralých neutrofilů.

Výsledky v obrázku č. 39 v dolním grafu ukazují, že po stimulaci SA došlo k nárůstu exprese MTS u nezralých neutrofilů. Tento nárůstu nebyl ovlivněn inhibitorem BPTES. Při použití inhibitoru 2DG a MPA došlo ke zvýšení exprese MTS u nezralých neutrofilů, přičemž u MPA bylo toto navýšení výraznější. Při použití média s GLC došlo po stimulaci SA k největšímu nárůstu exprese MTS u nezralých neutrofilů.



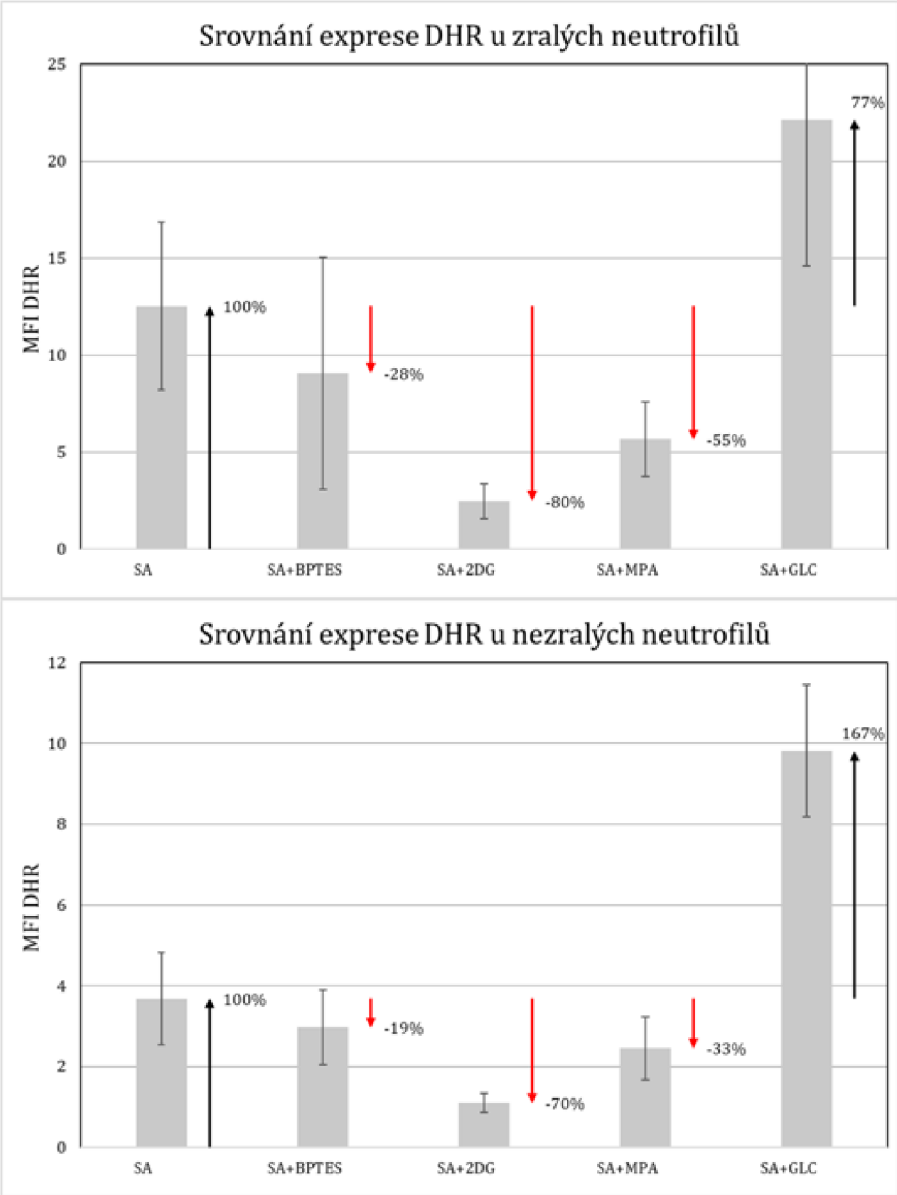
Obr. 39: Srovnání exprese MTS u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování

V obrázku jsou 2 grafy se znázorněným průměrem a SD pro naměřené hodnoty MFI MTS jednotlivých vzorků nestimulovaných a stimulovaných SA a za přítomnosti substancí označených na ose x a negativní kontroly PBS. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro MTS. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k negativní kontrole (PBS), kde byla MFI PBS přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

4.11.7 Srovnání oxidačního vzplanutí u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování

Výsledky v obrázku č. 40 v horním grafu ukazují, že při použití všech inhibitorů došlo k poklesu míry oxidačního vzplanutí u zralých neutrofilů po stimulaci SA. Největší pokles míry oxidačního vzplanutí po stimulaci SA byl zaznamenán při použití inhibitoru 2DG, následuje MPA a BPTES. Při použití média s GLC došlo u zralých neutrofilů po stimulaci SA k výraznému zvýšení míry oxidačního vzplanutí.

Výsledky v obrázku č. 40 v dolním grafu ukazují, že při použití všech inhibitorů došlo k poklesu míry oxidačního vzplanutí u nezralých neutrofilů po stimulaci SA. Největší pokles míry oxidačního vzplanutí po stimulaci SA byl zaznamenán při použití inhibitoru 2DG, následuje MPA a BPTES. Při použití média s GLC došlo u nezralých neutrofilů po stimulaci SA k velmi vysokému a významnému zvýšení míry oxidačního vzplanutí.



Obr. 40: Srovnání oxidačního vzplanutí u zralých a nezralých neutrofilů při metabolickém testování

V obrázku jsou 2 grafy se znázorněným průměrem a SD pro naměřené hodnoty MFI DHR jednotlivých vzorků stimulovaných SA a za přítomnosti substancí označených na ose x. Na ose y je vyznačená hodnota MFI pro DHR. Pro každý vzorek byla navíc přepočítána průměrná hodnota MFI na procentuální hodnotu vztaženou k vzorku stimulovaného SA, kde byla MFI SA přiřazena hodnota 100 %. Šipky znázorněné v grafu pak ukazují procentuální nárůst a pokles naměřených hodnot vzhledem k zjištěné hodnotě PBS.

5 Diskuse

Ve své diplomové práci jsem se zabýval porovnáváním chování aktivačních a mitochondriálních markerů zralých a nezralých neutrofilů pomocí průtokové cytometrie. Na těchto populacích neutrofilů byly sledovány markery degranulace sekundárních granul (CD66b), aktivace (CD16, CD11b) a mitochondriální markery MTG, MTR a MTS před a po aktivaci různými stimulancii. Ve výsledkové části diplomové práce jsem uvedl, jak se jednotlivé neutrofilní a mitochondriální markery měnily při jednotlivých měřeních. V diskusi dále srovnávám změny exprese těchto znaků mezi populacemi zralých živých neutrofilů a nezralých živých neutrofilů a zároveň tuto problematiku v této kapitole diskutuji. Toto uspořádání jsem zvolil i z toho důvodu, že o změnách mitochondriálních charakteristik nezralých neutrofilů není dosud dostatečné množství publikací, a tak mohu některé naměřené výsledky porovnat jen z hlediska publikovaných výsledků u zralých neutrofilů.

Znak CD16 je Fcγ receptor III s nízkou afinitou vyskytující se ve dvou formách, FcγRIIIB a FcγRIIIA, z nichž je na povrchu neutrofilů exprimován především FcγRIIIB. Při jeho aktivaci dochází k signální kaskádě vedoucí k mobilizaci Ca^{2+}, buněčné adhezi a degranulaci. Hlavním úkolem CD16 je odstraňování spontánně se tvořících imunokomplexů z oběhu. Důležitým faktorem je, že CD16 je proteolyticky štěpen z povrchu aktivovaných či apoptických neutrofilů a uvolňován do oběhu. Takto uvolňovaný sérový FcγRIIIB si zanechává svou kapacitu vázat Fc domény imunokomplexů.[79]

Exprese CD16 klesá po působení všech použitých stimulancií u zralých i nezralých neutrofilů. Míra poklesu exprese CD16 se ale pro jednotlivá stimulancia u obou populací od sebe liší. Protože jsme přidávali před začátkem stimulací ke každému vzorku sérum pro opsonizaci, je pravděpodobné, že míra aktivace neutrofilů závisí na opsonizaci imunoglobuliny a dalšími opsoniny, tak také na dalších ligandech daného stimulancia, které se účastní aktivace neutrofilů. Pokles exprese CD16 u aktivovaných neutrofilů po stimulaci fMLP a PMA popisuje publikace Huizinga et al.[80]

Znak CD11b je integrin, který společně s integrinem CD18 tvoří funkční Mac-1-integrin CD11b/CD18. Mac-1-integrin zprostředkovává vazbu na ICAM exprimovaný endotelem, čímž zprostředkovává adhezi neutrofilů a účastní se tak i chemotaxe. Váže se také na iC3b část komplementu a zprostředkovává fagocytózu iC3b opsonizovaných částic jako jsou např. apoptické buňky.[40] V klidovém stavu je lokalizován především v sekrečních vesiklech neutrofilů a terciárních granulích, jedná se o aktivační marker neutrofilů.[6,81]

Exprese CD11b zralých neutrofilů stoupá u všech použitých stimulancií, kromě PMA, u kterého nedošlo ke změně v expresi CD11b. Zvýšení exprese CD11b po stimulaci LPS, fMLP a Mycobacterium bovis je také popsáno v publikacích Fermino et al., Suttmann et al. a Bhattacharya et al.[82–84] V publikaci Bhattacharya et al. oproti

námi naměřeným výsledkům došlo ke zvýšení exprese CD11b i po stimulaci neutrofilů pomocí PMA, přičemž my jsme nezaznamenali žádné změny.[84]

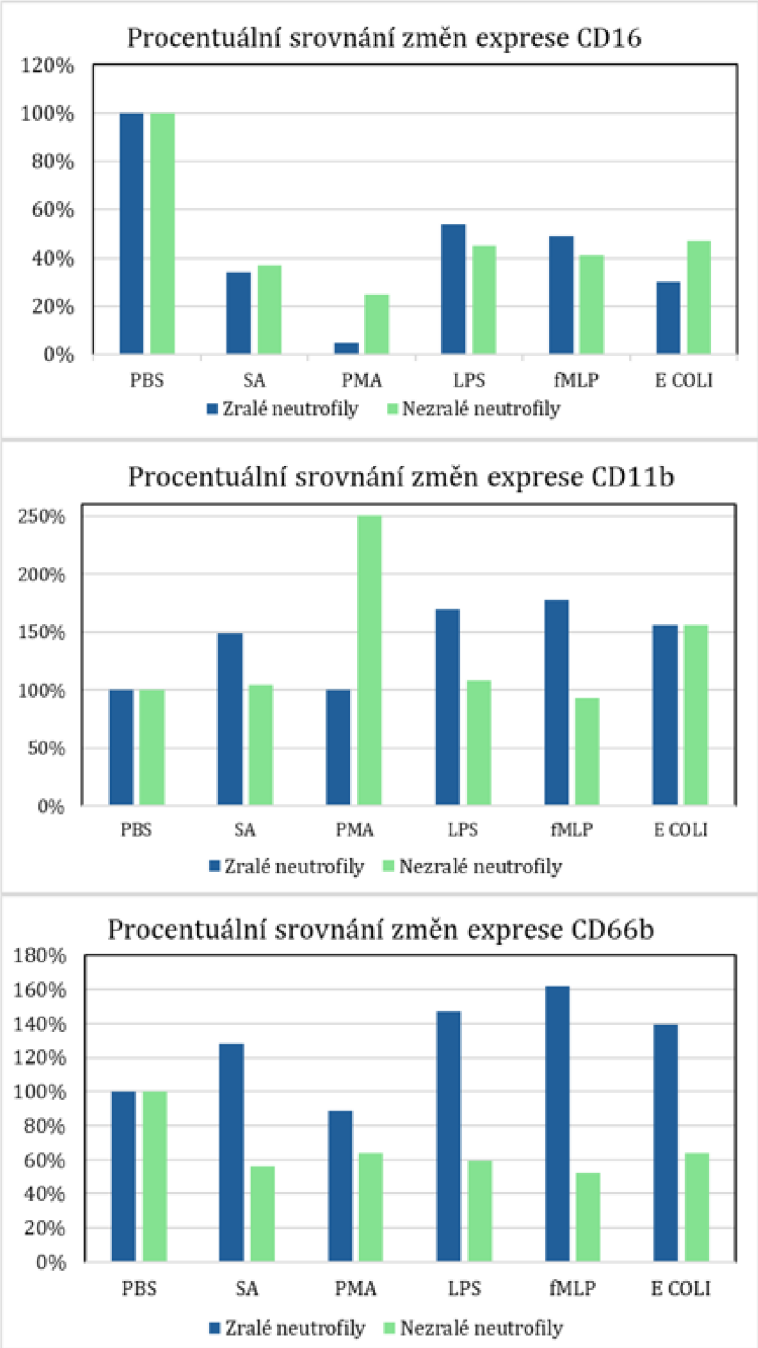
U nezralých neutrofilů jsme zjistili podobné zvýšení exprese CD11b jako u zralých po stimulaci E. coli, avšak u dalších stimulancií v porovnání se zralými neutrofily jsme zjistili zásadní změnu v chování exprese CD11b. Po stimulaci SA a LPS došlo k mírnému vzestupu exprese CD11b u nezralých neutrofilů, po stimulaci fMLP došlo naopak k mírnému poklesu exprese CD11b a po stimulaci PMA došlo k významnému nárůstu CD11b u nezralých neutrofilů. Na základě námi naměřených výsledků je zřejmé, že na stimulaci PMA reagují zralé a nezralé neutrofily naprosto odlišně, co se týče exprese CD11b. Důvodem, proč zralé neutrofily exprimují po stimulaci ve větší míře CD11b, může být i ten, že důležitý rezervoár CD11b, sekreční vesikly, se tvoří u segmentovaných neutrofilů, tedy u plně vyvinutých neutrofilů.[6]

Znak CD66b je glykosylovaný protein patřící do rodiny CEA. Jedná se o aktivační marker neutrofilů a je ve vysokém množství lokalizován ve specifických (sekundárních) granulích neutrofilů. Při aktivaci neutrofilu dochází k vyšší expresi CD66b na jeho povrchu související s degranulací sekundárních granul. Funkce CD66b na povrchu neutrofilů je asociována s agregací neutrofilů.[81]

Exprese CD66b u zralých neutrofilů se chová podobně jako exprese CD11b, kdy jsme zaznamenali nárůst u všech použitých stimulancií kromě PMA, kdy došlo ke snížení exprese CD66b. Zvýšení exprese CD66b a změna lokalizace z intracelulárních granul na povrch membrány po stimulaci fMLP, S. aureus a PMA je popsáno také v publikaci Schmidt et al. a Zhao et al.[81,85]

Naprosto opačné chování CD66b jsme zaznamenali u nezralých neutrofilů, kdy po všech použitých stimulancií došlo k výraznému poklesu exprese CD66b. Jak již bylo výše popsáno, CD66b je marker degranulace a je uložen v sekundárních granulích. Vzhledem k tomu, že exprese CD66b u nezralých neutrofilů se se stimulací výrazně snížila, zůstává otázkou, zda u nezralých neutrofilů dochází k degranulaci sekundárních granul anebo zda nedochází postupem vývoje neutrofilů k nárůstu CD66b v sekundárních granulí, a tím i k zvýšení exprese CD66b u zralých neutrofilů po stimulaci. Pro podporu těchto tvrzení jsme v literatuře nenašli žádné související publikace.

V obrázku č. 41 jsou názorně ukázány procentuální změny exprese znaků CD16, CD11b a CD66b u zralých a nezralých neutrofilů po použití různých stimulancií.



Obr. 41: Procentuální srovnání změn exprese CD16, CD11b a CD66b mezi zralými a nezralými neutrofily po použití různých stimulancií

V obrázku jsou 3 grafy se znázorněnými procentuálními rozdíly průměrných hodnot MFI CD16, CD11b a CD66b jednotlivých vzorků stimulovaných různými stimulancii vyznačenými na ose x pro zralé a nezralé neutrofily. Na ose y je procentuální stupnice. MFI PBS negativní kontroly byla přiřazena procentuální hodnota 100 % a vůči této hodnotě byly přepočítány na procenta i průměrné hodnoty MFI ostatních stimulovaných vzorků.

Měření mitochondriálního obsahu pomocí barvy MTG ukázalo podobné chování u zralých i nezralých neutrofilů. Po použití všech stimulancií, kromě PMA, došlo k navýšení mitochondriálního obsahu. Míra navýšení MTG se ovšem lišila u jednotlivých stimulancií. Po stimulaci SA a E. coli došlo k většímu navýšení mitochondriálního obsahu u zralých neutrofilů, zatímco po stimulaci LPS a fMLP došlo k většímu navýšení u nezralých neutrofilů. Po stimulaci PMA reagovaly zralé neutrofily mírným snížením mitochondriálního obsahu, zatímco nezralé neutrofily reagovaly zvýšením mitochondriálního obsahu o 60 %.

V porovnání vykazovaly nezralé neutrofily obecně vyšší expresi MTG, tedy buď větší obsah mitochondrií anebo větší počet mitochondrií než zralé neutrofily. Tohle zjištění je v souladu s publikací Rice et al., kde zjistili, že nezralé neutrofily mají vyšší expresi MTG a s maturací neutrofilů dochází ke ztrátě funkčnosti mitochondrií.[86]

Publikace Vorobjeva et al. popisuje, že po aktivaci dochází u neutrofilů k fragmentaci mitochondrií, která může souviset s nárůstem cytosolového Ca^{2+}.[63] Zvýšení mitochondriálního obsahu by tak mohlo být použito i jako aktivační marker neutrofilů.

Měření membránového potenciálu mitochondrií (MMP) pomocí barvy MTR u zralých neutrofilů ukázalo obdobné chování jako u mitochondriálního obsahu, a to zvýšení mitochondriálního potenciálu po použití všech stimulancií kromě PMA, kde byl zaznamenán mírný pokles MTR. U nezralých neutrofilů jsme naměřili nárůst exprese MTR pro všechny použitá stimulancia a tento nárůst exprese byl u všech stimulancií kromě SA vyšší než u zralých neutrofilů. Zvýšení fluorescence MTR neutrofilů po fagocytóze opsonizovaných částic je popsáno také v publikaci Bassøe et al.[87] MMP je generován protonovým gradientem, který je produkován cytochromy I-IV respiračního řetězce (ETC) lokalizovanými na vnitřní mitochondriální membráně, přičemž poslední komplex (komplex V) dýchacího řetězce ATP-synthasa dává vzniku ATP. Je tedy zřejmé, že MMP se bude měnit v závislosti na míře aktivace neutrofilů.

Nižší nárůst exprese MTG u nezralých neutrofilů pro SA může značit, že nezralé neutrofily nedisponují dostatečným množstvím aktivačních receptorů a nejsou schopné adekvátní aktivace mitochondrií jako zralé neutrofily na komplexní stimulancia. S tím souvisí i nižší schopnost tvorby mitochondriálního superoxidu nezralými neutrofily, a také nižší exprese aktivačních markerů. Oproti tomu dochází u nezralých neutrofilů k výraznějšímu nárůstu MMP, který může souviset s poptávkou po vyšší tvorbě ATP oxidativní fosforylací, a tedy větším využití ETC. U zralých neutrofilů dochází k větší míře k tvorbě ATP anaerobní glykolýzou, přičemž kyslík využívají především k tvorbě ROS včetně mtROS. Je možné, že nezralé neutrofily nemají dostatečné zásoby glukózy, aby pokryly poptávku po ATP a dalších meziproduktech glykolýzy při aktivaci buňky a využívají tak oxidativní fosforylaci s vyšší výtěžností ATP.

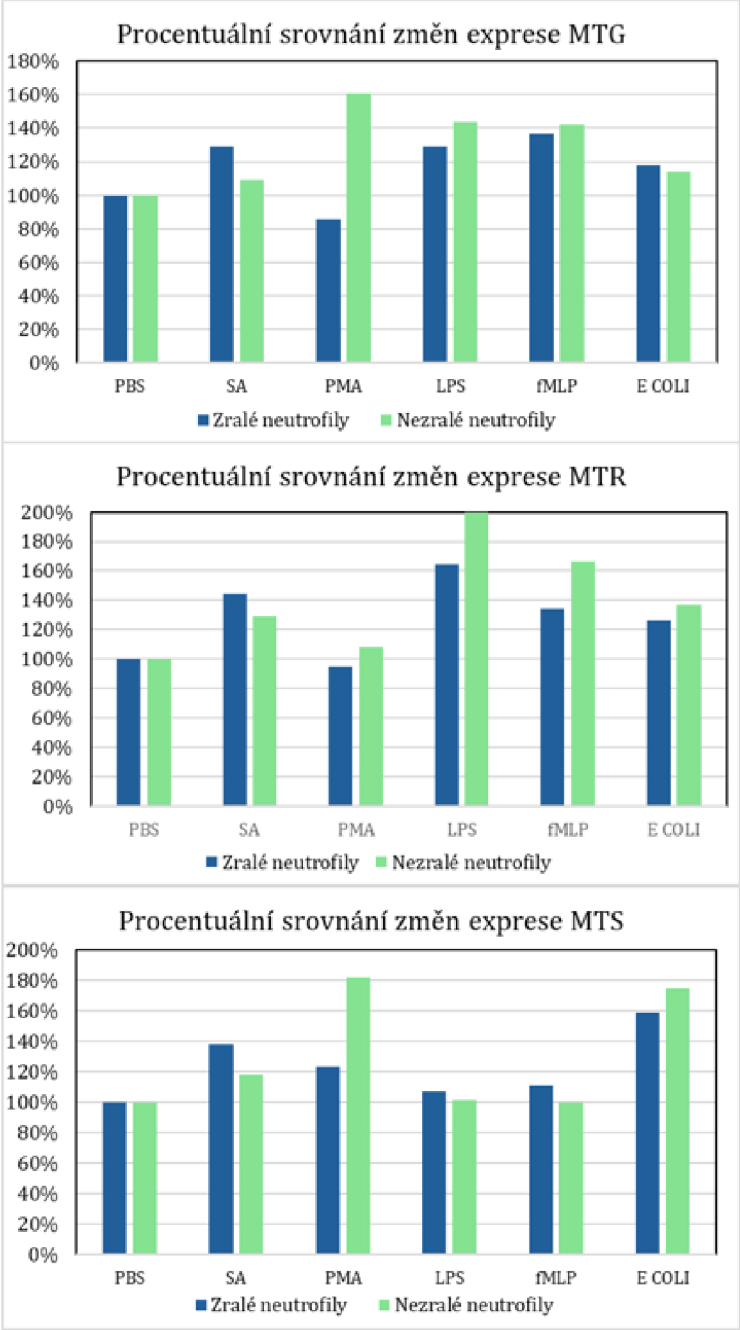
Nárůst exprese MTS, a tedy nárůst produkce mitochondriálního superoxidu byl zaznamenán u zralých neutrofilů po použití všech stimulancií, přičemž největší produkci mitochondriálního superoxidu jsme zaznamenali po stimulaci E. coli. U nezralých neutrofilů jsme rovněž zaznamenali nárůst MTS, avšak míra zvýšení MTS se pro různá

stimulancia lišila u obou populací neutrofilů. Na stimulaci opsonizovaným SA reagovaly nezralé neutrofily v porovnání se zralými menším nárůstem exprese MTS, zato po stimulaci opsonizovanou E. coli to bylo obráceně. Největší změny byly zaznamenány po stimulaci PMA, kdy nezralé neutrofily zvýšily expresi MTS více než zralé neutrofily. Na stimulaci LPS reagovaly nezralé neutrofily pouze mírným zvýšením exprese MTS a na stimulaci fMLP nereagovaly žádnou změnou exprese MTS. Oproti tomu zralé neutrofily na stimulaci LPS i fMLP reagovaly zvýšením exprese MTS. Zvýšení exprese MTS u neutrofilů popisuje také publikace Vorobjeva et al., ve které po stimulaci PMA a fMLP došlo také ke zvýšení exprese MTS u neutrofilů.[63]

Z našich výsledků vyplývá, že nezralé neutrofily disponují nižší tvorbou mitochondriálního superoxidu, a také že jejich schopnost reagovat na různá stimulancia se odlišuje. To bude nejspíš zapříčené expresí jednotlivých PRRs na jejich povrchu a s tím spojenou omezenou možností dostatečné aktivace na různé podněty. S tím koreluje i odlišná exprese CD16, CD11b a CD66b na nezralých neutrofilech. Mitochondriální superoxid a obecně mtROS jsou důležitým prvkem při náležité aktivaci neutrofilních efektorových funkcí včetně oxidačního vzplanutí, přičemž mitochondriální superoxid vzniká především uvolněním elektronů z ETC na molekulární kyslík, a to cytochromem I a III.[55,63]

Vorobjeva et al. popsali, že mitochondriální superoxid a obecně mtROS slouží jako sekundární poslové a při blokaci tvorby mtROS pomocí SkQ1 (selektivní mitochondriální antioxidant) nedošlo u neutrofilů k degranulaci (pokles exprese CD66b po stimulaci fMLP) a k dostatečné tvorbě ROS pomocí NADPH oxidázy.[63] Otázkou zůstává, zda snížená exprese CD66b nemůže souviset s nepřítomnou tvorbou mitochondriálního superoxidu nezralých neutrofilů po stimulaci fMLP. Pro ostatní stimulancia jsme nenašli v dostupné literatuře potřebné informace. Stimulace LPS ukazuje podobné výsledky chování nezralých neutrofilů pro MTS a CD66b jako po stimulaci fMLP. Stimulace PMA ukázala, že nezralé neutrofily jsou schopny tvorby mitochondriálního superoxidu, a to ve větší míře než zralé neutrofily, což může být dáno i větším obsahem mitochondrií nezralých neutrofilů. Z chování změn exprese MTS a CD11b pro nezralé neutrofily po stimulaci E. coli můžeme usoudit, že nezralé neutrofily disponují dostatkem některého z PRRs pro antigeny přítomné na E. coli. Přítomnost těchto receptorů na membráně nezralých neutrofilů by bylo dobré v budoucnosti ověřit. Pokles CD66b u nezralých neutrofilů po stimulaci E. coli nejsme ale schopni vysvětlit. Po stimulaci SA došlo u nezralých neutrofilů k nižší produkci MTS a k nižší expresi CD11b, z toho můžeme usoudit, že nezralé neutrofily nedisponují dostatkem PRRs pro antigeny přítomné na SA.

V obrázku č. 42 jsou názorně ukázány procentuální změny exprese MTG, MTR a MTS u zralých a nezralých neutrofilů po použití různých stimulancií.



Obr. 42: Procentuální srovnání změn exprese MTG, MTR a MTS mezi zralými a nezralými neutrofily po použití různých stimulancií

V obrázku jsou 3 grafy se znázorněnými procentuálními rozdíly průměrných hodnot MFI MTG, MTR a MTS jednotlivých vzorků stimulované různými stimulancii vyznačenými na ose x pro zralé a nezralé neutrofily. Na ose y je procentuální stupnice. MFI PBS negativní kontroly byla přiřazena procentuální hodnota 100 % a vůči těmto hodnotám byly přepočítány na procenta i průměrné hodnoty MFI ostatních stimulovaných vzorků.

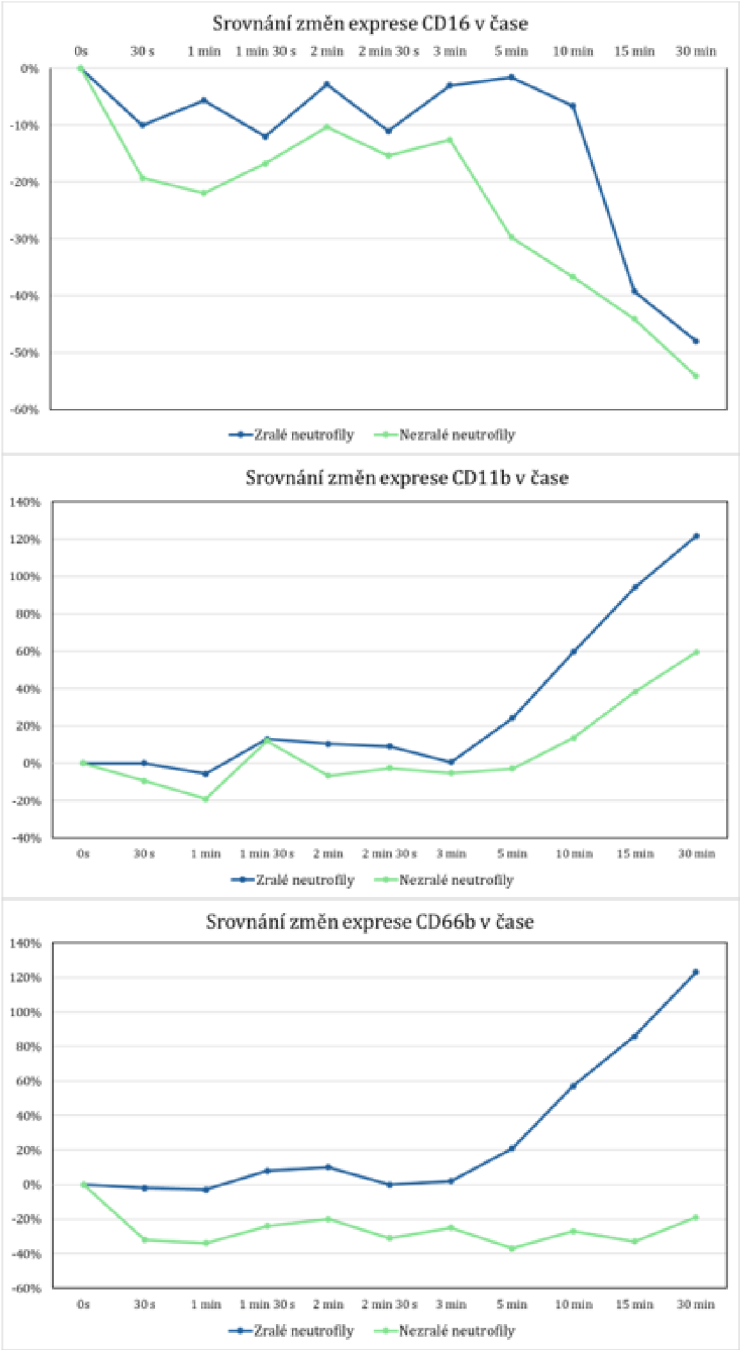
V další části diskuse se budu zabývat kinetickým pokusem. K těmto výsledkům jsme nenalezli odpovídající informace v odborných publikacích.

Nezralé neutrofily se liší od zralých výrazně nízkou expresí CD16 (FcγRIIIB). Obě populace reagují na stimulaci SA velmi podobným chováním, kdy již po 30 sekundách dochází ke snížení exprese CD16, tzn. že neutrofily reagují na předkládaný antigen. Poté u obou populací hodnoty kolísají a po 5 minutách stimulace dochází u nezralých neutrofilů k výraznému poklesu exprese CD16. Lze tedy předpokládat, že došlo k vyčerpání všech receptorů na povrchu nezralých neutrofilů. U zralých neutrofilů došlo k výraznému poklesu exprese CD16 až po 15 minutách stimulace. To může souviset s vyšším obsahem CD16 na povrchu zralých neutrofilů. Pokles exprese CD16 u neutrofilů po stimulaci fMLP a PMA je popsáno v publikaci Huizinga et al.[80]

Exprese CD11b se v průběhu stimulace SA začala výrazně zvyšovat dříve u zralých neutrofilů, a to již po 1 minutě a 30 sekundách stimulace. Oproti tomu u nezralých neutrofilů došlo k významnému nárůstu exprese CD11b až po 10 minutách stimulace. Přičemž u zralých neutrofilů došlo i k masivnějšímu zvýšení exprese CD11b, což může být způsobeno přítomností sekrečních vesiklů u zralých segmentovaných neutrofilů.[6]

Při srovnání exprese CD66b u zralých a nezralých neutrofilů došlo k zásadním rozdílům. V průběhu stimulace SA došlo u zralých neutrofilů k výraznému nárůstu exprese CD66b, a tedy k degranulaci, po 5 minutách stimulace. Oproti tomu u nezralých neutrofilů došlo ke snížení exprese CD66b, a to již po 30 sekundách stimulace. Pro toto chování nezralých neutrofilů jsme nenašli v literatuře žádné vysvětlení.

V obrázku č. 43 jsou názorně ukázány procentuální změny exprese CD16, CD11b a CD66b u zralých a nezralých neutrofilů v čase po stimulaci SA.



Obr. 43: Procentuální srovnání změn exprese CD16, CD11b a CD66b mezi zralými a nezralými neutrofily po stimulaci SA v čase

V obrázku jsou 3 grafy se znázorněnými procentuálními rozdíly průměrných hodnot MFI CD16, CD11b a CD66b jednotlivých vzorků stimulovanými SA po různou dobu vyznačenou na ose x pro zralé a nezralé neutrofily. Na ose y je procentuální stupnice. MFI PBS negativní kontroly byla přiřazena procentuální hodnota 0 % a vůči těmto hodnotám byly přepočítány na procenta i průměrné hodnoty MFI ostatních stimulovaných vzorků.

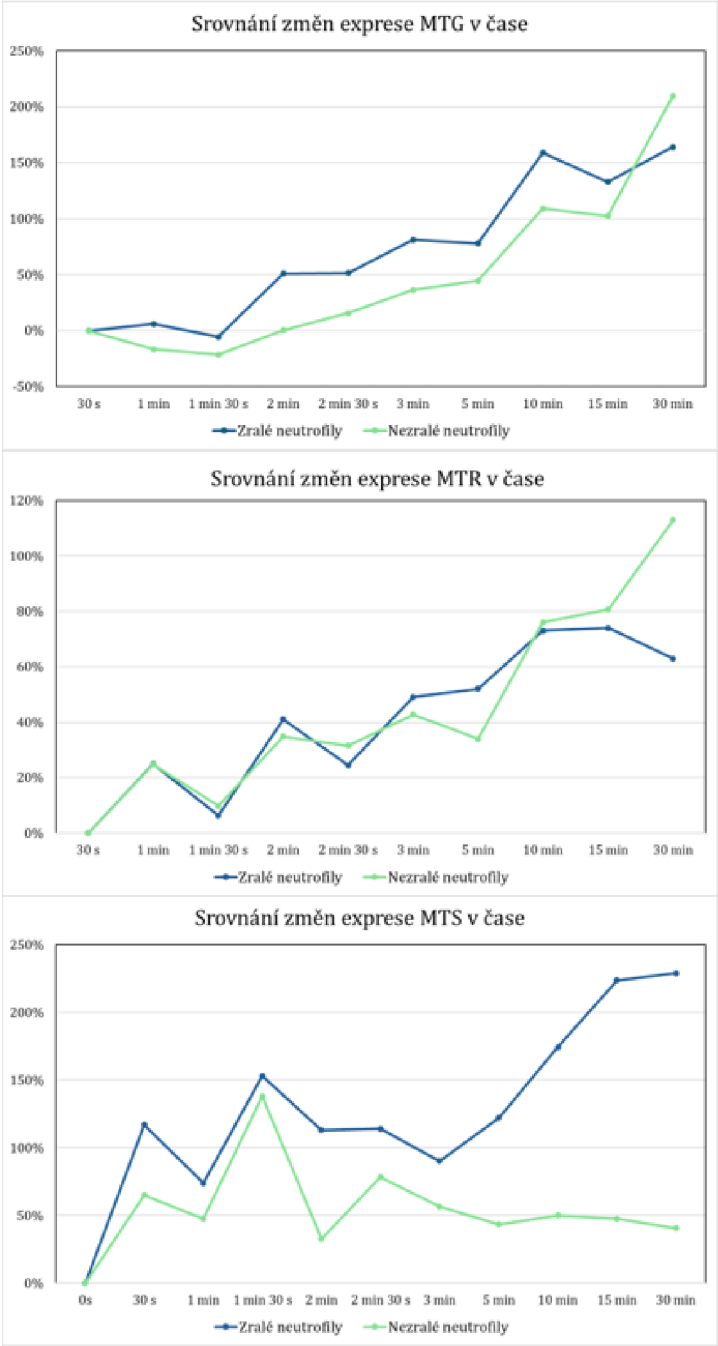
Při srovnání exprese MTG v čase došlo u zralých neutrofilů již po 2 minutách stimulace SA k zvětšení exprese MTG, tedy k zvětšení mitochondriálního obsahu, zatímco u nezralých neutrofilů došlo nejdříve ke snížení exprese MTG po minutě stimulace a poté po 2 minutách k nárůstu exprese MTG. U obou populací došlo k nejvyšší expresi MTG po 30 minutách stimulace, přičemž nezralé neutrofily vykazují masivnější nárůst exprese MTG, a tedy větší navýšení mitochondriálního obsahu. Tohle zjištění je v souladu s publikací Rice et al., kde popisují, že nezralé neutrofily mají větší expresi MTG než zralé neutrofily.[86]

Při srovnání exprese MTR v čase reagují zralé a nezralé neutrofily velmi podobně. U obou populací došlo k nárůstu exprese MTR již po minutě stimulace SA, přičemž u zralých neutrofilů došlo k největší expresi MTR po 15 minutách stimulace, zatímco u nezralých po 30 minutách stimulace. U nezralých neutrofilů došlo také k masivnějšímu nárůstu exprese MTR. U obou populací se tedy velmi rychle zvětšuje MMP při stimulaci, což může souviset s nutností tvorby většího množství energie ve formě ATP získaného oxidativní fosforylací a taky s tvorbou mtROS. Zvýšení exprese MTR neutrofilů po fagocytóze opsonizovaných částic je popsáno také v publikaci Bassøe et al.[87]

Při srovnání exprese MTS v čase došlo u zralých neutrofilů k masivnímu nárůstu exprese MTS již po 30 sekundách stimulace SA, přičemž poté se až do 10 minut stimulace nijak výrazně exprese MTS neměnila a poté narůstala až do maxima po 30 minutách stimulace. U nezralých neutrofilů taktéž došlo k nárůstu exprese MTS již po 30 sekundách stimulace SA, oproti zralým neutrofilům došlo ale k menšímu nárůstu a v průběhu stimulace došlo ke snížení exprese MTS, přičemž maximální hodnota MTS byla naměřena po 1 minutě a 30 sekundách stimulace. Zvýšení exprese MTS u neutrofilů popisuje také publikace Vorobjeva et al., ve které po stimulaci PMA a fMLP došlo při aktivaci neutrofilů ke zvýšení exprese MTS.[63]

Naměřené výsledky nám tedy říkají, že velmi rychle po začátku stimulace dochází u obou populací neutrofilů k tvorbě mitochondriálního superoxidu, přičemž u zralých neutrofilů tato tvorba průběhem času narůstá a u nezralých neutrofilů po počátečním nárůstu v průběhu stimulace SA naopak exprese MTS klesá. Nezralé neutrofily tedy jsou schopny tvorby mtROS, ale jsou schopné této produkce MTS jen po omezenou dobu.

V obrázku č. 44 jsou názorně ukázány procentuální změny exprese MTG, MTR a MTS u zralých a nezralých neutrofilů po stimulaci SA v čase.



Obr. 44: Procentuální srovnání změn exprese MTG, MTR a MTS mezi zralými a nezralými neutrofily po stimulaci SA v čase

V obrázku jsou 3 grafy se znázorněnými procentuálními rozdíly průměrných hodnot MFI MTG, MTR a MTS jednotlivých vzorků stimulovanými SA po různou dobu vyznačenou na ose x pro zralé a nezralé neutrofily. Na ose y je procentuální stupnice. MFI PBS negativní kontroly byla přiřazena procentuální hodnota 0 % u vzorků MTS, u vzorků MTG a MTR byla přiřazena hodnota 0 % MFI 30 s. Vůči těmto hodnotám byly přepočítány na procenta i průměrné hodnoty MFI ostatních stimulovaných vzorků.

V poslední částí diskuse se budu zabývat metabolickým testováním zralých a nezralých neutrofilů. Po stimulaci SA jsme zaznamenali v této sérii měření pokles exprese MTR, což neodpovídá naším předchozím kinetickým měřením ani měřením s různými stimulancii, kdy došlo k nárůstu exprese MTR po stimulaci SA. Tuto odchylku si vysvětlujeme velkým rozptylem hodnot MFI MTR u jednotlivých vzorků a tedy tím, že každý pacient reaguje odlišným způsobem. Pro exaktnější hodnocení by bylo potřeba provést měření MTR s větším počtem pacientů.

BPTES je selektivní inhibitor glutaminázy, zabraňuje tak metabolismu a degradaci glutaminu.[88]

Sadiku et al. zjistili, že po stimulaci neutrofilů pomocí LPS a současnému použití BPTES došlo ke snížení zásob glykogenu a ke snížené baktericidní schopnosti neutrofilů, přičemž použili S. aureus. Metabolismus glutaminu a meziprodukty vznikající při degradaci glutaminu jsou tedy důležité pro správné udržování hladin glykogenu a efektivní zabíjení bakterií neutrofily.[88]

Naše měření ukázala, že při použití inhibitoru BPTES nedošlo k žádným rozdílům jak u zralých, tak i nezralých neutrofilů v expresi CD16, CD11b i CD66b po stimulaci SA. Z toho můžeme tedy vyvodit, že enzym glutamináza a metabolismus glutaminu nezasahuje do procesu aktivace CD16, CD11b a degranulace (CD66b) neutrofilů po stimulaci opsonizovaným SA.

Při použití inhibitoru BPTES jsme nezaznamenali žádné výrazné změny v chování MTG, MTR a MTS u zralých neutrofilů po stimulaci SA. Z toho vyvozujeme, že inhibitor glutaminázy BPTES nemá významný vliv na mitochondriální chování u zralých neutrofilů.

U nezralých neutrofilů ovšem BPTES měl vliv na chování MTG a částečně i MTR, neměl ale vliv na expresi MTS. Po stimulaci SA při použití BPTES došlo k výraznému zvýšení exprese MTG a k mírnému snížení exprese MTR. BPTES tedy u nezralých neutrofilů navýšil mitochondriální obsah a snížil MMP. Toto navýšení obsahu mitochondrií u nezralých neutrofilů může souviset s akumulací glutaminu v mitochondriích, přičemž jeho degradace je působením BPTES inhibována.

Při sledování oxidačního vzplanutí došlo při použití BPTES ke snížení oxidačního vzplanutí u obou populací neutrofilů po stimulaci SA, přičemž u zralých neutrofilů bylo tohle snížení výraznější. Z toho můžeme vyvodit, že BPTES snižuje baktericidní schopnost obou populací neutrofilů a metabolismus glutaminu je tedy důležitou součástí oxidačního vzplanutí neutrofilů. Metabolismus glutaminu slouží i jako alternativní cesta tvorby NADPH potřebné pro oxidační vzplanutí. Inhibicí metabolismu glutaminu tedy může dojít k tvorbě NADPH v menší míře, a tak ke snížení oxidačního vzplanutí. Tyto údaje jsou v souladu s publikací Sadiku et al., ve které popisují sníženou baktericidní schopnost neutrofilů po použití inhibitoru BPTES.[88]

2-deoxy-D-glukóza je kompetitivní inhibitor hexokinázy. Dostává se do buňky přes glukózové transportéry stejně jako D-glukóza. Inhibuje glykolýzu kvůli akumulaci 2-deoxy-D-glukóza-6-fosfátu (2DG6P), vznikající z 2DG enzymem hexokináza, uvnitř

buňky, jelikož 2DG6P není schopný podstoupit izomeraci na fruktózu-6-fosfát kvůli chybějící 2-OH skupině. 2DG6P tak inhibuje funkci hexokinázy a glukóza-6-fosfát izomerázy a zastavuje glykolýzu a neumožňuje tak ani průběh PPP a tvorbu NADPH.[89]

Při použití inhibitoru 2DG došlo ke změnám v expresi CD16, CD11b i CD66b u obou populací neutrofilů, přičemž u obou populací došlo k rozdílným změnám.

Při srovnání exprese CD16 po použití inhibitoru 2DG a následné stimulaci SA došlo u zralých i nezralých neutrofilů k mírně menšímu poklesu exprese CD16 po stimulaci SA. Z toho můžeme odvodit, že metabolismus glukózy zasahuje do aktivace FcγRIIIB.

Při srovnání exprese CD11b došlo k rozdílným změnám u obou populací po použití inhibitoru 2DG a následné stimulaci SA. Zatímco u zralých neutrofilů došlo ke snížení exprese CD11b, u nezralých neutrofilů došlo k výraznému vzestupu exprese CD11b. U zralých neutrofilů tedy inhibicí glykolýzy došlo ke snížení exprese CD11b, a tedy i snížení aktivace neutrofilů, zatímco u nezralých neutrofilů inhibice glykolýzy způsobila navýšení exprese aktivačního markeru neutrofilů CD11b.

Při srovnání exprese CD66b došlo také k rozdílným změnám u obou populací po použití inhibitoru 2DG a následné stimulaci SA. U zralých neutrofilů po použití 2DG a stimulaci SA došlo ke snížení exprese CD66b, a tedy degranulace proběhla v menší míře při inhibici glykolýzy. U nezralých neutrofilů ale naopak došlo po stimulaci SA při použití 2DG k vzestupu exprese CD66b, a tedy k degranulaci. Inhibice glykolýzy tedy vyvolala u nezralých neutrofilů degranulaci. Z našich výsledků tedy vyplývá, že zvýšení CD11b a CD66b po stimulaci SA u nezralých neutrofilů je ovlivněno inhibicí glykolýzy. Vzhledem k tomu, že nezralé neutrofily využívají při své diferenciaci β-oxidaci mastných kyselin z procesu autofagie, je možné, že energie pro spuštění aktivačních cest pro zvýšení exprese těchto obou markerů je u nezralých neutrofilů získávána z metabolismu mastných kyselin. Tuto domněnku však bude třeba v budoucnosti ověřit.

Po stimulaci SA při použití inhibitoru 2DG jsme zaznamenali výraznější změny chování mitochondrií u zralých neutrofilů. Při stimulaci SA a použití 2DG jsme u zralých neutrofilů zaznamenali vyšší obsah mitochondrií, vyšší MMP a nižší tvorbu mitochondriálního superoxidu. Zralé neutrofily spoléhají především na glykolýzu jako zdroj energie, je tedy pravděpodobné, že inhibicí glykolýzy došlo ke změně metabolismu s upřednostněním oxidativní fosforylace. S tím souvisí i zvýšení mitochondriálního obsahu a potenciálu mitochondriální membrány. Snížení tvorby mitochondriálního superoxidu při inhibici glykolýzy nám říká, že glykolýza je zásadní pro udržení tvorby mtROS. Naše zjištění o snížení tvorby mtROS u neutrofilů při použití 2DG po stimulaci jsou v souladu s publikací Quiroga et al.[90]

U nezralých neutrofilů po stimulaci SA při použití inhibitoru 2DG jsme zaznamenali také zvýšení mitochondriální obsahu, které může být stejné příčiny jako u zralých neutrofilů. Nezaznamenali jsme ovšem výrazný rozdíl v MMP, což může značit,

že i bez použití inhibitoru 2DG dochází při stimulaci SA k nasycení membránového potenciálu mitochondrií nezralých neutrofilů. Oproti zralým neutrofilům jsme ale zaznamenali u nezralých neutrofilů nárůst tvorby mitochondriálního superoxidu. Vzhledem k tomu, že nezralé neutrofily využívají při své diferenciaci β-oxidaci mastných kyselin z procesu autofagie, jak bylo zmíněno výše, je možné, že vyšší exprese MTS, a tedy tvorba mitochondriálního superoxidu, je u nezralých neutrofilů zprostředkována metabolismem mastných kyselin. Tuto domněnku však bude třeba v budoucnosti ověřit.

Při sledování oxidačního vzplanutí došlo při použití 2DG k nejvýraznějšímu snížení oxidačního vzplanutí z námi použitých inhibitorů, přičemž u zralých neutrofilů bylo toto snížení větší. Zastavení glykolýzy, a tím i zamezení průběhu PPP (zdroj NADPH), velmi výrazně inhibuje oxidační vzplanutí, a tedy mikrobicidní schopnost neutrofilů. Rice et al. popsali, že neutrofily bohaté na mitochondrie si udržují schopnost tvorby ROS za podmínek, kdy je omezené využití glukózy, a tedy i omezená tvorba NADPH pomocí PPP, přičemž také popsali, že nezralé neutrofily mají větší obsah mitochondrií.[86] Je tedy možné, že zvýšení exprese MTS u nezralých neutrofilů při inhibici glykolýzy je způsob, kterým se snaží nezralé neutrofily zprostředkovat tvorbu ROS. Dá se předpokládat, že vytvořený mitochondriální superoxid vytvořený po stimulaci SA při použití 2DG u nezralých neutrofilů může působit jako aktivační posel pro CD11b a CD66b, avšak na druhou stranu po stimulaci SA a použití média s GLC došlo k vyšší tvorbě mitochondriálního superoxidu, který expresi výše uvedených znaků neovlivnil v takové míře.

3-merkaptopikolinová kyselina (MPA) je inhibitor enzymu glukoneogeneze fosfoenolpyruvátkarboxykinázy, který zajišťuje přeměnu oxalacetátu na fosfoenolpyruvát. Tento enzym se vyskytuje ve dvou izoformách, cytosolové a mitochondriální, přičemž MPA inhibuje obě dvě.[91]

Sadiku et al. zjistili, že při stimulaci LPS neutrofily využívají glykogenezi a glukoneogenezi a navyšují tak své zásoby glykogenu. Nejspíš proto, aby si udrželi dostatečné zásoby glukózy a meziproduktů vznikající při glykolýze pro účinné a déle trvající efektorové funkce. Mimoto také zjistili, že při použití MPA, a tedy při inhibici glukoneogeneze, došlo u neutrofilů ke snížené schopnosti likvidace bakterií, přičemž použili S. aureus, a také použití MPA vedlo ke sníženému přežití neutrofilů.[88]

Při použití inhibitoru MPA došlo u obou populací k výrazným změnám v expresi CD16, CD11b a CD66b, a to jak u stimulovaných i u nestimulovaných vzorků. MPA tedy určitým mechanismem způsobuje komplexní aktivaci zralých i nezralých neutrofilů i bez stimulace, přičemž po stimulaci SA při použití MPA došlo k masivnější aktivaci obou populací neutrofilů než po stimulaci SA bez přídavku inhibitoru. Je možné, že jakmile zabráníme neutrofilu připravovat zásoby glykogenu, začne se samovolně aktivovat, což odpovídá změnám markerů CD11b a CD16 za přídavku MPA bez přítomnosti SA. Pro toto chování neutrofilů jsme nenašli v literatuře žádné vysvětlení.

Po stimulaci SA při použití inhibitoru MPA došlo u obou populací k výraznému zvýšení exprese MTG a MTS, přičemž exprese MTR se u zralých neutrofilů výrazně nezměnila a u nezralých došlo k mírnému poklesu exprese MTR. Obě populace neutrofilů reagují na MPA tedy zvýšením mitochondriálního obsahu i tvorbou mitochondriálního superoxidu. Zvýšení mitochondriálního obsahu může být způsobeno akumulací metabolitů potřebných ke glukoneogenezi, ke které nedochází z důvodu inhibice pomocí MPA.

Při sledování oxidačního vzplanutí došlo při použití MPA k výraznému snížení oxidačního vzplanutí u zralých i nezralých neutrofilů, přičemž u zralých bylo toto snížení výraznější. Z toho můžeme vyvodit, že glukoneogeneze je důležitým procesem pro správnou baktericidní funkci neutrofilů, co se týče oxidačního vzplanutí. Tyto údaje jsou v souladu s publikací Sadiku et al., ve které popisují sníženou baktericidní schopnost neutrofilů po použití inhibitoru MPA.[88] Navýšení MTS u obou populací tedy může souviset se snahou mitochondrií kompenzovat inhibovanou tvorbu ROS NADPH oxidázou.

Médium RPMI 1640 s obsahem glukózy (GLC) bylo použité při testování jako stimulans, přičemž jsme se snažili dosáhnout podobné koncentrace glukózy ve vzorku jako je fyziologicky v krevním oběhu.

Po stimulaci SA při použití média s GLC došlo ke změnám v expresi CD16 a CD11b u obou populací. Na expresi CD66b, a tedy na degranulaci neutrofilů, ovšem nemělo významný vliv, z toho můžeme usoudit, že vyšší obsah glukózy v prostředí a nasycení metabolismu glukózy nemá žádný významný vliv na degranulaci obou populací neutrofilů.

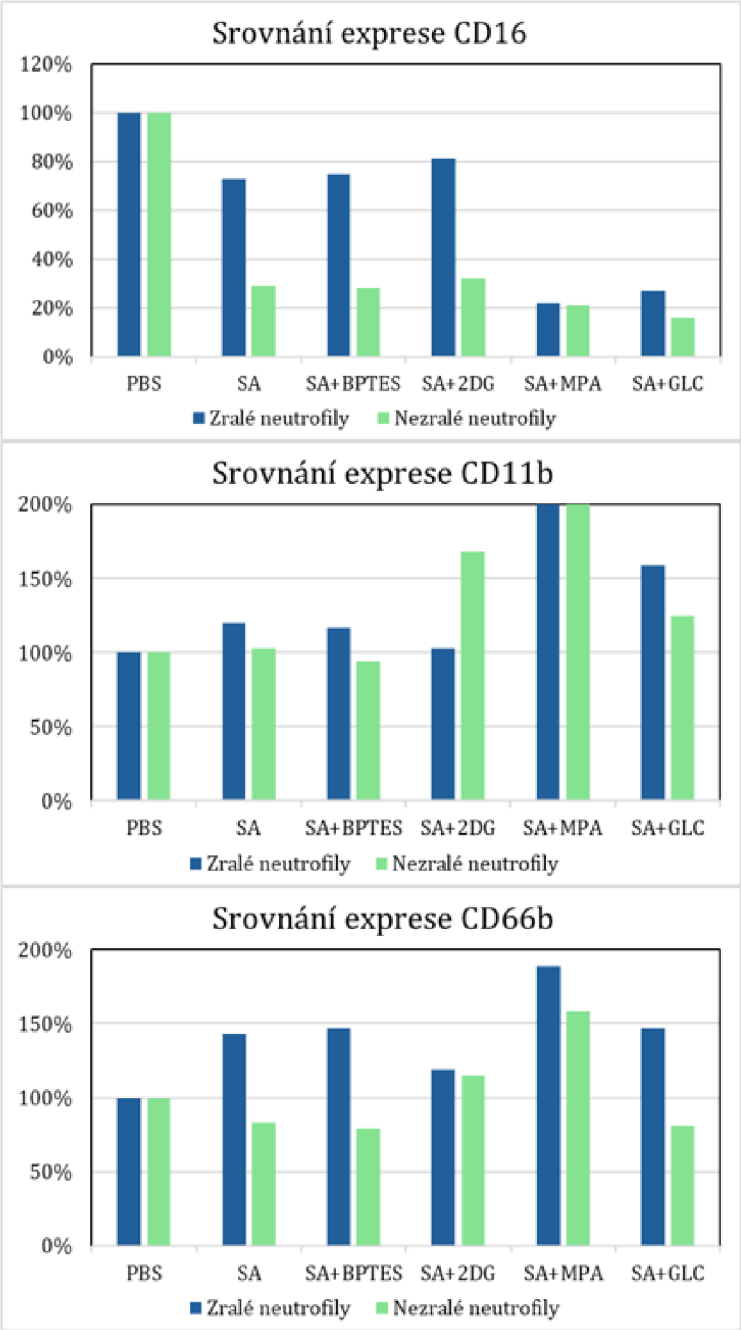
Při srovnání exprese CD16 a CD11b po stimulaci SA při přídavku média s GLC došlo u obou populací k srovnatelnému chování, a to ke zvýšení exprese CD11b a většímu snížení exprese CD16. Z těchto výsledků můžeme usoudit, že při vyšším obsahu glukózy v prostředí dochází k masivnější a účinnější aktivaci zralých i nezralých neutrofilů. Je tedy možné, že nezralé neutrofily nemají dostatečné zásoby energie ve formě glukózy (glykogenu), a z toho důvodu bez přídavku glukózy nejsou schopné zvýšit expresi CD11b, a tedy aktivovat se.

Při srovnání exprese MTG, MTR a MTS po stimulaci SA při přídavku média s GLC došlo u obou populací ke stejnému chování, a to ke zvýšení exprese všech tří mitochondriálních markerů, až na MTR u nezralých neutrofilů, které nevykazovalo významnější změny. Mitochondrie zralých i nezralých neutrofilů reagují na přítomnost glukózy v prostředí navýšením svého obsahu, zvýšenou tvorbu mitochondriálního superoxidu a zvýšením MMP u zralých neutrofilů. Zvýšení obsahu, MMP i mitochondriálního superoxidu bude nejspíš způsobeno výraznější energetickou aktivitou mitochondrií spojenou s oxidativní fosforylací a tvorbou potřebných metabolitů, vznikajících při metabolismu glukózy, díky dostupnosti glukózy v prostředí, a tedy možností efektivnější funkce neutrofilů.

Při srovnání oxidačního vzplanutí došlo u obou populací neutrofilů k výraznému zvýšení oxidačního vzplanutí po stimulaci SA při přídavku média s GLC, přičemž u nezralých neutrofilů došlo k masivnímu navýšení schopnosti oxidačního vzplanutí, kdy se MFI DHR blížilo hodnotě zralým neutrofilů po stimulaci SA bez přídavku GLC. Nezralé neutrofily tedy jsou schopné dostatečného oxidačního vzplanutí při dostupnosti glukózy v prostředí. To může značit, že nezralé neutrofily nedisponují dostatečnou zásobou glykogenu, jako zralé neutrofily, a proto nejsou schopné bez přítomnosti glukózy v prostředí dostatečné aktivace a tvorby NADPH, a tím i oxidačního vzplanutí.

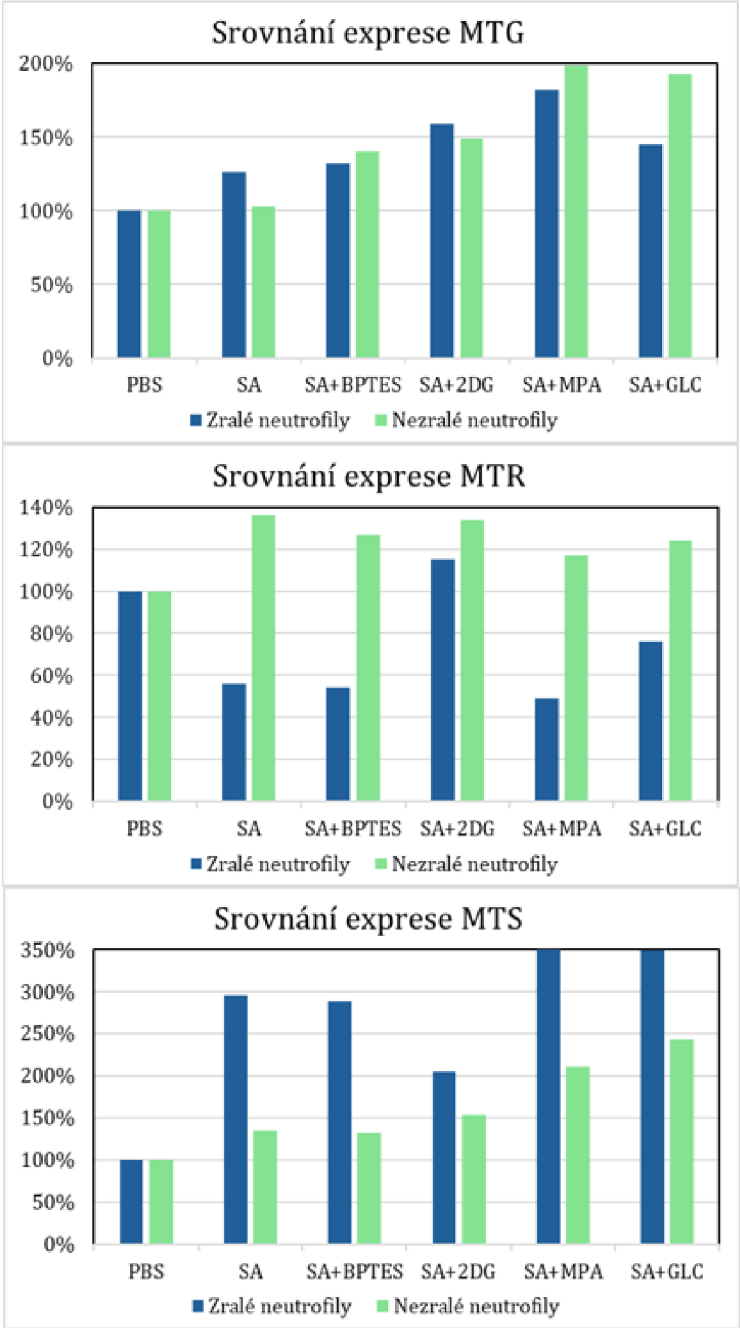
Obsah glykogenu v nezralých neutrofilech bude zapotřebí v budoucnu vyhodnotit.

V obrázku č. 45 a 46 jsou názorně srovnány procentuální změny exprese CD16, CD11b, CD66b, MTG, MTR a MTS mezi zralými a nezralými neutrofily při metabolickém testování. Graf Srovnání exprese CD11b je ukončen pro přehlednější srovnání hodnotou 200 %, jelikož procentuální hodnoty MFI CD11b po stimulaci SA při použití MPA byly v řádu vyšších stovek procent. Graf Srovnání exprese MTS je ukončen pro přehlednější srovnání hodnotou 350 %, jelikož procentuální hodnoty MFI MTS po stimulaci SA při použití MPA a GLC byly v řádu vyšších stovek.



Obr. 45: Procentuální srovnání exprese CD16, CD11b a CD66b mezi zralými a nezralými neutrofily při metabolickém testování

V obrázku jsou 3 grafy se znázorněnými procentuálními rozdíly průměrných hodnot MFI CD16, CD11b aCD66b jednotlivých vzorků nestimulovaných a stimulovaných SA za přítomnosti různých substancí označených na ose x. Na ose y je procentuální stupnice. MFI PBS negativní kontroly byla přiřazena procentuální hodnota 100 % a vůči těmto hodnotám byly přepočítány na procenta i průměrné hodnoty MFI ostatních stimulovaných vzorků.



Obr. 46: Procentuální srovnání exprese MTG, MTR a MTS mezi zralými a nezralými neutrofily při metabolickém testování

V obrázku jsou 3 grafy se znázorněnými procentuálními rozdíly průměrných hodnot MFI MTG, MTR a MTS jednotlivých vzorků nestimulovaných a stimulovaných SA za přítomnosti různých substancí označených na ose x. Na ose y je procentuální stupnice. MFI PBS negativní kontroly byla přiřazena procentuální hodnota 100 % a vůči těmto hodnotám byly přepočítány na procenta i průměrné hodnoty MFI ostatních stimulovaných vzorků.

6 Závěr

Výsledky diplomové práce porovnávají schopnost aktivace zralých a nezralých neutrofilů pomocí exprese CD11b, CD16 a CD66b a chování jejich mitochondrií za různých podmínek. Pracovali jsme celkem s 8 hypotézami.

Hypotézy:

1. **Nezralé neutrofily nemají schopnost reagovat na stimulaci různými stimulancii jako zralé neutrofily.**

   Tato hypotéza byla potvrzena. Nezralé neutrofily sice snižují expresi CD16 podobně jako zralé neutrofily, ale mají rozdílné chování v expresi CD11b a CD66b po stimulaci.

2. **Kinetika změn sledovaných znaků zralých i nezralých neutrofilů po stimulaci je pro obě populace srovnatelná.**

   Tato hypotéza byla vyvrácena. Při kinetickém testování jsme zaznamenali rozdíly v expresi CD16, CD11b i CD66b mezi oběma populacemi neutrofilů. Stejně tomu bylo i u mitochondriálních markerů, kdy kinetika MTG a MTR obou populací byla podobná, ale kinetika MTS vykazovala zásadní rozdíly.

3. **U zralých a nezralých neutrofilů je před i po stimulaci srovnatelný obsah mitochondrií.**

   Tato hypotéza byla vyvrácena. Nezralé neutrofily mají před i po stimulaci větší obsah mitochondrií než zralé neutrofily, přičemž na různá stimulancia reagují obě populace odlišným navýšením mitochondriálního obsahu.

4. **Nezralé i zralé neutrofily reagují srovnatelně na stimulaci různými stimulancii zvýšením mitochondriálního potenciálu.**

   Tato hypotéza byla částečně potvrzena. Zralé i nezralé neutrofily po stimulaci různými stimulancii reagovaly zvýšením MMP, kromě stimulancia PMA, kdy u zralých neutrofilů jsme nezaznamenali změny v MMP. Je nutné ale podotknout, že rozptyl hodnot MFI MTR byl velmi rozsáhlý, a proto jsme zaznamenali u některých měření i pokles MMP.

5. **Nezralé i zralé neutrofily reagují srovnatelně na stimulaci různými stimulancii zvýšenou produkcí mitochondriálního superoxidu.**

   Tato hypotéza byla vyvrácena. Obě populace reagují na stimulaci zvýšenou produkcí mitochondriálního superoxidu, ale na různé stimulancia reagují odlišným nárůstem mitochondriálního superoxidu.

6. **Zralé i nezralé neutrofily reagují při oxidačním vzplanutí za přítomnosti různých inhibitorů a glukózy stejným způsobem.**

   Tato hypotéza byla potvrzena. Chování obou populací při oxidačním vzplanutí za přítomnosti různých inhibitorů bylo velmi podobné, kdy reagovaly sníženou schopností oxidačního vzplanutí při použití různých inhibitorů. Naopak za přítomnosti glukózy reagovaly obě populace výrazně zvýšenou schopností oxidačního vzplanutí. Je nutné ale podotknout, že nezralé neutrofily vykazují mnohem menší schopnost oxidačního vzplanutí oproti zralým neutrofilům.

7. **Pro mitochondrie zralých i nezralých neutrofilů je při aktivaci rozhodující dostupnost glukózy.**

   Tato hypotéza byla potvrzena. Při stimulaci a současném použití média s glukózou jsme zaznamenali nárůst mitochondriálního obsahu u obou populací neutrofilů, přičemž nárůst obsahu mitochondrií u nezralých neutrofilů byl masivnější. Dále jsme zaznamenali při použití média s glukózou největší nárůst tvorby mitochondriálního superoxidu u obou populací neutrofilů, přičemž tento nárůst byl masivnější u nezralých neutrofilů. Co se týče MMP, tak při použití média s glukózou jsme zaznamenali navýšení MMP u zralých neutrofilů, zatímco u nezralých neutrofilů jsme nezaznamenali výraznější změny v chování MMP.

8. **Změna exprese všech tří zkoumaných aktivačních markerů po stimulaci neutrofilů je ovlivněna dostupností glukózy.**

   Tato hypotéza byla vyvrácena. Dostupnost glukózy v prostředí sice měla pozitivní vliv na expresi CD16 a CD11b u obou populací neutrofilů, ale neměla žádný vliv na marker degranulace CD66b.

Z našich výsledků vyplývá, že nezralé neutrofily a jejich mitochondrie vykazují významné rozdílné funkční vlastnosti oproti zralým neutrofilům: jejich schopnosti aktivace, oxidačního vzplanutí a tvorba mitochondriálního superoxidu je značně snížená nejen v kvantitě oxidačních produktů, ale i v kinetice po jejich aktivaci a závisí nejspíš na expresi rozpoznávacích PRRs. Poznání funkčních schopností nezralých neutrofilů nám může pomoci pochopit, jak mohou tyto buňky reagovat, když jsou ve větší míře vyplavovány např. při septických stavech. Vzhledem k tomu, že naše měření byla prováděna na relativně malém množství vzorků, bude potřeba v budoucnu pro lepší porozumění těchto rozdílů provést měření s větším počtem vzorků a zaměřit se i na další vlastnosti mitochondrií a metabolismu nezralých neutrofilů.

Použité zdroje

1. Hořejší V, Bartůňková J, Brdička T, Špísek R. *Základy imunologie*. 6. vydání. Triton; 2017.

2. Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev*. 2019;99(2):1223-1248. doi:10.1152/physrev.00012.2018

3. Stites DP, Aubrechtová P, Barnet K, Terr AI. *Základní a klinická imunologie*. Victoria Publishing; 1994.

4. Penka M, Slavíčková E. *Hematologie a transfuzní lékařství. I, Hematologie*. 1. vyd. Grada; 2011.

5. Krejsek J, Andrýs C, Krčmová I. *Imunologie člověka*. 1. vydání. Garamon s.r.o.; 2016.

6. Lawrence SM, Corriden R, Nizet V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2018;82(1):e00057-17. doi:10.1128/MMBR.00057-17

7. Fujimoto H, Sakata T, Hamaguchi Y, et al. Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations. *Cytometry*. 2000;42(6):371-378. doi:10.1002/1097-0320(20001215)42:6<371::AID-CYTO1004>3.0.CO;2-G

8. Van Grinsven E, Textor J, Hustin LSP, Wolf K, Koenderman L, Vrisekoop N. Immature Neutrophils Released in Acute Inflammation Exhibit Efficient Migration despite Incomplete Segmentation of the Nucleus. *J Immunol*. 2019;202(1):207-217. doi:10.4049/jimmunol.1801255

9. Liu M, Wang G, Wang L, et al. Immunoregulatory functions of mature CD10+ and immature CD10– neutrophils in sepsis patients. *Front Med*. 2023;9:1100756. doi:10.3389/fmed.2022.1100756

10. Elghetany MT. Surface Antigen Changes during Normal Neutrophilic Development: A Critical Review. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;28(2):260-274. doi:10.1006/bcmd.2002.0513

11. Silvestre-Roig C, Fridlender ZG, Glogauer M, Scapini P. Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends Immunol*. 2019;40(7):565-583. doi:10.1016/j.it.2019.04.012

12. El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Marie J, Gougerot-Pocidalo M, Dang PM. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev*. 2016;273(1):180-193. doi:10.1111/imr.12447

13. Auten RL, Davis JM. Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. *Pediatr Res*. 2009;66(2):121-127. doi:10.1203/PDR.0b013e3181a9eafb

14. Nguyen GT, Green ER, Mecsas J. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:373. doi:10.3389/fcimb.2017.00373

15. Herb M. NADPH Oxidase 3: Beyond the Inner Ear. *Antioxidants*. 2024;13(2):219. doi:10.3390/antiox13020219

16. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(2):134-147. doi:10.1038/nri.2017.105

17. Cao Z, Zhao M, Sun H, Hu L, Chen Y, Fan Z. Roles of mitochondria in neutrophils. *Front Immunol*. 2022;13:934444. doi:10.3389/fimmu.2022.934444

18. Scapini P, Marini O, Tecchio C, Cassatella MA. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol Rev*. 2016;273(1):48-60. doi:10.1111/imr.12448

19. Blanco-Camarillo C, Alemán OR, Rosales C. Low-Density Neutrophils in Healthy Individuals Display a Mature Primed Phenotype. *Front Immunol*. 2021;12:672520. doi:10.3389/fimmu.2021.672520

20. Slanina P, Stichova J, Bosakova V, et al. Phenotype and oxidative burst of low-density neutrophil subpopulations are altered in common variable immunodeficiency patients. *Cytometry B Clin Cytom*. Published online November 23, 2023:cyto.b.22150. doi:10.1002/cyto.b.22150

21. Hassani M, Hellebrekers P, Chen N, et al. On the origin of low-density neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2020;107(5):809-818. doi:10.1002/JLB.5HR0120-459R

22. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol*. 2018;9:113. doi:10.3389/fphys.2018.00113

23. McGary CT, Miele ME, Welch DR. Highly metastatic 13762NF rat mammary adenocarcinoma cell clones stimulate bone marrow by secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3 activity. *Am J Pathol*. 1995;147(6):1668-1681.

24. Que H, Fu Q, Lan T, Tian X, Wei X. Tumor-associated neutrophils and neutrophil-targeted cancer therapies. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2022;1877(5):188762. doi:10.1016/j.bbcan.2022.188762

25. Pawelec G, Picard E, Bueno V, Verschoor CP, Ostrand-Rosenberg S. MDSCs, ageing and inflammageing. *Cell Immunol*. 2021;362:104297. doi:10.1016/j.cellimm.2021.104297

26. Jiang J, Guo W, Liang X. Phenotypes, accumulation, and functions of myeloid-derived suppressor cells and associated treatment strategies in cancer patients. *Hum Immunol*. 2014;75(11):1128-1137. doi:10.1016/j.humimm.2014.09.025

27. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):162-174. doi:10.1038/nri2506

28. Van Rees DJ, Szilagyi K, Kuijpers TW, Matlung HL, Van Den Berg TK. Immunoreceptors on neutrophils. *Semin Immunol*. 2016;28(2):94-108. doi:10.1016/j.smim.2016.02.004

29. Delves PJ, Roitt IM, eds. *Encyclopedia of Immunology*. 2nd ed. Academic Press; 1998.

30. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(3):638-650. doi:10.1016/j.intimp.2013.06.034

31. Rivas-Fuentes S, García-García E, Nieto-Castañeda G, Rosales C. Fcγ receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils. *Cell Immunol*. 2010;263(1):114-121. doi:10.1016/j.cellimm.2010.03.006

32. Sack U. CD64 expression by neutrophil granulocytes. *Cytometry B Clin Cytom*. 2017;92(3):189-191. doi:10.1002/cyto.b.21216

33. Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *Int Immunopharmacol*. 2018;59:391-412. doi:10.1016/j.intimp.2018.03.002

34. Thomas CJ, Schroder K. Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol*. 2013;34(7):317-328. doi:10.1016/j.it.2013.02.008

35. Knapp S. Update on the role of Toll-like receptors during bacterial infections and sepsis. *Wien Med Wochenschr*. 2010;160(5-6):107-111. doi:10.1007/s10354-010-0765-6

36. Kondo Y, Ledderose C, Slubowski CJ, et al. Frontline Science: *Escherichia coli* use LPS as decoy to impair neutrophil chemotaxis and defeat antimicrobial host defense. *J Leukoc Biol*. 2019;106(6):1211-1219. doi:10.1002/JLB.4HI0319-109R

37. Lorenz G, Anders HJ. Neutrophils, Dendritic Cells, Toll-Like Receptors, and Interferon-α in Lupus Nephritis. *Semin Nephrol*. 2015;35(5):410-426. doi:10.1016/j.semnephrol.2015.08.003

38. Metzemaekers M, Gouwy M, Proost P. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(5):433-450. doi:10.1038/s41423-020-0412-0

39. Rheinländer A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol Lett*. 2018;196:22-32. doi:10.1016/j.imlet.2018.01.009

40. Fagerholm S, MacPherson M, James M, Sevier-Guy C, Lau C. The CD11b-integrin (ITGAM) and systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2013;22(7):657-663. doi:10.1177/0961203313491851

41. Yoon J, Terada A, Kita H. CD66b Regulates Adhesion and Activation of Human Eosinophils. *J Immunol*. 2007;179(12):8454-8462. doi:10.4049/jimmunol.179.12.8454

42. Opasawatchai A, Amornsupawat P, Jiravejchakul N, et al. Neutrophil Activation and Early Features of NET Formation Are Associated With Dengue Virus Infection in Human. *Front Immunol*. 2019;9:3007. doi:10.3389/fimmu.2018.03007

43. Maakaron JE, Rogosheske J, Long M, Bachanova V, Mims AS. CD33-Targeted Therapies: Beating the Disease or Beaten to Death? *J Clin Pharmacol*. 2021;61(1):7-17. doi:10.1002/jcph.1730

44. Jeon JH, Hong CW, Kim EY, Lee JM. Current Understanding on the Metabolism of Neutrophils. *Immune Netw*. 2020;20(6):e46. doi:10.4110/in.2020.20.e46

45. Kumar S, Dikshit M. Metabolic Insight of Neutrophils in Health and Disease. *Front Immunol*. 2019;10:2099. doi:10.3389/fimmu.2019.02099

46. Maratou E, Dimitriadis G, Kollias A, et al. Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. *Eur J Clin Invest*. 2007;37(4):282-290. doi:10.1111/j.1365-2362.2007.01786.x

47. Toller-Kawahisa JE, O'Neill LAJ. How neutrophil metabolism affects bacterial killing. *Open Biol*. 2022;12(11):220248. doi:10.1098/rsob.220248

48. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun*. 2020;11(1):102. doi:10.1038/s41467-019-13668-3

49. The Critical Role of Cell Metabolism for Essential Neutrophil Functions. *Cell Physiol Biochem*. 2020;54(4):629-647. doi:10.33594/000000245

50. Jiang J, Tu H, Li P. Lipid metabolism and neutrophil function. *Cell Immunol*. 2022;377:104546. doi:10.1016/j.cellimm.2022.104546

51. Injarabian L, Devin A, Ransac S, Marteyn BS. Neutrophil Metabolic Shift during Their Lifecycle: Impact on Their Survival and Activation. *Int J Mol Sci*. 2019;21(1):287. doi:10.3390/ijms21010287

52. Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in Health and Disease. *Cells*. 2019;8(7):680. doi:10.3390/cells8070680

53. Kausar S, Wang F, Cui H. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases. *Cells*. 2018;7(12):274. doi:10.3390/cells7120274

54. Breda CNDS, Davanzo GG, Basso PJ, Saraiva Câmara NO, Moraes-Vieira PMM. Mitochondria as central hub of the immune system. *Redox Biol*. 2019;26:101255. doi:10.1016/j.redox.2019.101255

55. Peng S, Gao J, Stojkov D, Yousefi S, Simon H. Established and emerging roles for mitochondria in neutrophils. *Immunol Rev*. 2023;314(1):413-426. doi:10.1111/imr.13158

56. Šípal Z. *Biochemie*. 1. vydání. Státní pedagogické nakladatelství; 1992.

57. Arnold PK, Finley LWS. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. *J Biol Chem*. 2023;299(2):102838. doi:10.1016/j.jbc.2022.102838

58. Fernandez-Vizarra E, Zeviani M. Mitochondrial disorders of the OXPHOS system. *FEBS Lett*. 2021;595(8):1062-1106. doi:10.1002/1873-3468.13995

59. Kodíček M, Valentová O, Hynek R. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. 2. přepracované vydání. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; 2018.

60. Fossati G, Moulding DA, Spiller DG, Moots RJ, White MRH, Edwards SW. The Mitochondrial Network of Human Neutrophils: Role in Chemotaxis, Phagocytosis, Respiratory Burst Activation, and Commitment to Apoptosis. *J Immunol*. 2003;170(4):1964-1972. doi:10.4049/jimmunol.170.4.1964

61. Maianski NA, Geissler J, Srinivasula SM, Alnemri ES, Roos D, Kuijpers TW. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. *Cell Death Differ*. 2004;11(2):143-153. doi:10.1038/sj.cdd.4401320

62. Dunham-Snary KJ, Surewaard BGj, Mewburn JD, et al. Mitochondria in human neutrophils mediate killing of Staphylococcus aureus. *Redox Biol*. 2022;49:102225. doi:10.1016/j.redox.2021.102225

63. Vorobjeva N, Prikhodko A, Galkin I, et al. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils in vitro. *Eur J Cell Biol*. 2017;96(3):254-265. doi:10.1016/j.ejcb.2017.03.003

64. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, et al. ATP Release Guides Neutrophil Chemotaxis via P2Y2 and A3 Receptors. *Science*. 2006;314(5806):1792-1795. doi:10.1126/science.1132559

65. Bao Y, Ledderose C, Graf AF, et al. mTOR and differential activation of mitochondria orchestrate neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol*. 2015;210(7):1153-1164. doi:10.1083/jcb.201503066

66. Zhou W, Hsu AY, Wang Y, et al. Mitofusin 2 regulates neutrophil adhesive migration and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*. 2020;133(17):jcs248880. doi:10.1242/jcs.248880

67. Fan Y, Murgia M, Linder MI, et al. HAX1-dependent control of mitochondrial proteostasis governs neutrophil granulocyte differentiation. *J Clin Invest*. 2022;132(9):e153153. doi:10.1172/JCI153153

68. Douda DN, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(9):2817-2822. doi:10.1073/pnas.1414055112

69. Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, et al. MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca2+ uptake. *Nature*. 2010;467(7313):291-296. doi:10.1038/nature09358

70. Neikirk K, Marshall AG, Kula B, Smith N, LeBlanc S, Hinton A. MitoTracker: A useful tool in need of better alternatives. *Eur J Cell Biol*. 2023;102(4):151371. doi:10.1016/j.ejcb.2023.151371

71. Pendergrass W, Wolf N, Poot M. Efficacy of MitoTracker Green™ and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry A*. 2004;61A(2):162-169. doi:10.1002/cyto.a.20033

72. Kauffman M, Kauffman M, Traore K, et al. MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *React Oxyg Species*. Published online 2016. doi:10.20455/ros.2016.865

73. Henderson LM, Chappell JB. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur J Biochem*. 1993;217(3):973-980. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18328.x

74. Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods*. 2005;65(2-3):45-80. doi:10.1016/j.jbbm.2005.10.003

75. Yeung T, Touret N, Grinstein S. Quantitative fluorescence microscopy to probe intracellular microenvironments. *Curr Opin Microbiol*. 2005;8(3):350-358. doi:10.1016/j.mib.2005.04.004

76. Dastych M, Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant*. Masarykova univerzita; 2014.

77. Givan AL. Flow Cytometry: An Introduction. In: Hawley TS, Hawley RG, eds. *Flow Cytometry Protocols*. Vol 699. Methods in Molecular Biology. Humana Press; 2011:1-29. doi:10.1007/978-1-61737-950-5_1

78. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120(1). doi:10.1002/cpim.40

79. Wang Y, Jönsson F. Expression, Role, and Regulation of Neutrophil Fcγ Receptors. *Front Immunol*. 2019;10:1958. doi:10.3389/fimmu.2019.01958

80. Huizinga TW, De Haas M, Kleijer M, Nuijens JH, Roos D, Von Dem Borne AE. Soluble Fc gamma receptor III in human plasma originates from release by neutrophils. *J Clin Invest*. 1990;86(2):416-423. doi:10.1172/JCI114727

81. Schmidt T, Brodesser A, Schnitzler N, et al. CD66b Overexpression and Loss of C5a Receptors as Surface Markers for Staphylococcus aureus-Induced Neutrophil Dysfunction. Akiyama T, ed. *PLOS ONE*. 2015;10(7):e0132703. doi:10.1371/journal.pone.0132703

82. Fermino ML, Polli CD, Toledo KA, et al. LPS-Induced Galectin-3 Oligomerization Results in Enhancement of Neutrophil Activation. Gorvel JP, ed. *PLoS ONE*. 2011;6(10):e26004. doi:10.1371/journal.pone.0026004

83. Suttmann H, Lehan N, Böhle A, Brandau S. Stimulation of Neutrophil Granulocytes with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Induces Changes in Phenotype and Gene Expression and Inhibits Spontaneous Apoptosis. *Infect Immun*. 2003;71(8):4647-4656. doi:10.1128/IAI.71.8.4647-4656.2003

84. Bhattacharya A, Wei Q, Shin JN, et al. Autophagy Is Required for Neutrophil-Mediated Inflammation. *Cell Rep*. 2015;12(11):1731-1739. doi:10.1016/j.celrep.2015.08.019

85. Zhao L, Furebring M, Xu S, Venge P. Subcellular localization and mobilization of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8 in human neutrophils. *Br J Haematol*. 2004;125(5):666-673. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04963.x

86. Rice CM, Davies LC, Subleski JJ, et al. Tumour-elicited neutrophils engage mitochondrial metabolism to circumvent nutrient limitations and maintain immune suppression. *Nat Commun*. 2018;9(1):5099. doi:10.1038/s41467-018-07505-2

87. Bassøe C, Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Robinson JP. Investigations of phagosomes, mitochondria, and acidic granules in human neutrophils using fluorescent probes. *Cytometry B Clin Cytom*. 2003;51B(1):21-29. doi:10.1002/cyto.b.10003

88. Sadiku P, Willson JA, Ryan EM, et al. Neutrophils Fuel Effective Immune Responses through Gluconeogenesis and Glycogenesis. *Cell Metab*. 2021;33(2):411-423.e4. doi:10.1016/j.cmet.2020.11.016

89. Pajak B, Siwiak E, Sołtyka M, et al. 2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents. *Int J Mol Sci*. 2019;21(1):234. doi:10.3390/ijms21010234

90. Quiroga J, Alarcón P, Manosalva C, et al. Glycolysis and mitochondrial function regulate the radical oxygen species production induced by platelet-activating factor in bovine polymorphonuclear leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol*. 2020;226:110074. doi:10.1016/j.vetimm.2020.110074

91. Brearley MC, Daniel ZCTR, Loughna PT, Parr T, Brameld JM. The phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) inhibitor, 3-mercaptopicolinic acid (3-MPA), induces myogenic differentiation in C2C12 cells. *Sci Rep*. 2020;10(1):22177. doi:10.1038/s41598-020-79324-9