

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

In vitro metody rekrutace a migrace leukocytů a
jejich použití při studiu vlivu proteinů
z klíštěcích slin na imunitní systém hostitele

Bakalářská práce

Tomáš Kašpar

Vedoucí práce: RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

České Budějovice 2017

Kašpar T., 2017: *In vitro* metody rekrutace a migrace leukocytů a jejich použití při studiu vlivu proteinů z klíštěcích slin na imunitní systém hostitele.

[*In vitro* methods of recruitment and migration of leukocytes and their use in studying the effect of tick saliva proteins on the host immune system. Bc. Thesis, in Czech.] – 56 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

In this work, I managed to optimize *in vitro* method of static migration of neutrophils. This method included isolation of the neutrophils, specifically optimizing the concentrations of the individual layers of the Percoll gradient and identifying the optimal concentration of fMLP to stimulate neutrophil migration.

This optimized method was used to test the effect of five tick protease inhibitors, from *Ixodes ricinus* saliva on neutrophil migration.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 19. 4. 2017

.....

Tomáš Kašpar

Poděkování:

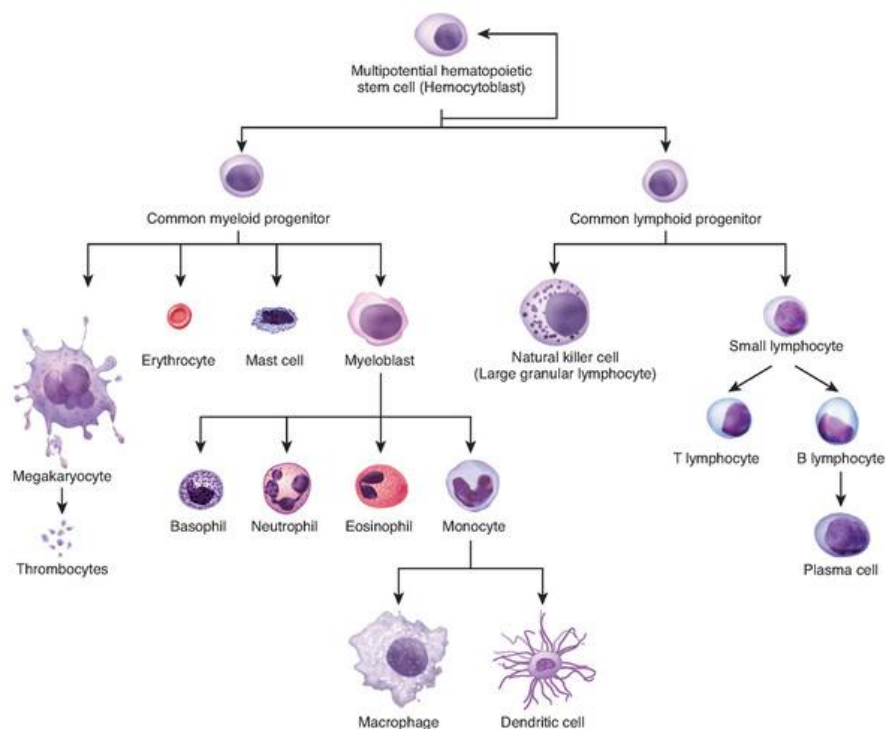
Tímto bych chtěl poděkovat zejména svému školiteli Dr. Jindřichu Chmelařovi za odborné vedení práce, trpělivost, ochotu, cenné rady a čas, který mi během mé práce věnoval. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Janu Kotálovi za pomoc, čas a ochotu při práci v laboratoři.

Obsah

1. ÚVOD	1
1.1. ROLE NEUTROFILŮ, MAKROFÁGŮ A DALŠÍCH LEUKOCYTŮ V ZÁNĚTU	3
1.1.1. <i>Role neutrofilů</i>	3
1.1.2. <i>Role monocytů a makrofágů</i>	7
1.2. PRŮBĚH TRANSMIGRACE	9
1.3. MOLEKULY DŮLEŽITÉ PRO MIGRACI	12
1.3.1. <i>Integriny</i>	12
1.3.2. <i>Imunoglobulinová nadrodina</i>	13
1.3.3. <i>Selektiny</i>	14
1.4. CHEMOTAXE	16
1.4.1. <i>Chemokiny</i>	16
1.4.2. <i>Chemokinové receptory</i>	18
1.5. INHIBITORY MIGRACE A JEJICH VYUŽITÍ V KLINICKÉ PRAXI	19
1.6. METODY STUDIA MIGRACE BUNĚK	20
2. CÍLE PRÁCE	22
3. MATERIÁLY A METODY	23
3.1. POMŮCKY A CHEMIKÁLIE	23
3.2. METODY	24
3.2.1. <i>Pokusná zvířata</i>	24
3.2.2. <i>Izolace buněk kostní dřeně</i>	24
3.2.3. <i>Izolace neutrofilů pomocí diskontinuitního gradientu Percollu</i>	25
3.2.4. <i>Měření čistoty neutrofilův průtokovém cytometru</i>	26
3.2.5. <i>Nastavení průtokového cytometru</i>	27
3.2.6. <i>Migrace neutrofilů</i>	29
3.2.7. <i>Počítání buněk v komůrce</i>	30
3.2.8. <i>Statistika, vyhodnocení</i>	31
4. VÝSLEDKY	32
4.1. OPTIMALIZACE PERCOLLOVÉHO GRADIENTU	32
4.2. OPTIMALIZACE MIGRACE NEUTROFILŮ	34
4.3. MIGRACE NEUTROFILŮ A VLIV KLÍŠTĚČÍCH INHIBITORŮ NA MIGRACI	35
5. DISKUZE	39
6. ZÁVĚR	42
7. SEZNAM ZKRATEK	43
8. LITERATURA	45

1. Úvod

Pohyb leukocytů z krve do extracelulárních tkání je nezbytný jak pro nemocnou, tak i pro zdravou tkáň, neboť umožňuje dostat tyto buňky přesně tam, kde jsou potřeba, aby mohly vykonávat své specifické funkce. Termín leukocyt zahrnuje všechny typy bílých krvinek (Obr. 1). Do leukocytů myeloidní linie patří monocyty, makrofágy, dendritické buňky, neutrofil, eosinofil a bazofil. Do lymfoidní linie pak patří T lymfocyty, B lymfocyty a NK (natural killers) buňky.



Obr. 1: Přehled vývoje buněk krevního řečiště.

Zdroj: Anatomy of the Immune System, 2013

Pohyb leukocytů z krve do tkáně je jednou ze základních funkcí zdravého organismu, což lze ilustrovat na příkladu cirkulace lymfocytů mezi krví, lymfou, lymfatickými a nelymfatickými orgány, kde se setkávají s cizími antigeny, aby je mohli rozpoznat a následně zničit. Leukocyty hrají také důležitou roli v obraně hostitele a v odstranění škodlivých látek při zánětu (Furie, 2014). Migrace leukocytů do místa zranění nebo zánětu je klíčovou součástí, jak přirozené, tak adaptivní imunity. Transmigrace leukocytů přes stěnu cév je poslední fází několika stupňové kaskády leukocytární odpovědi, zprostředkované sérií po sobě jdoucích buněčných a molekulárních interakcí (Yadav et al., 2003). Nahromadění leukocytů v poškozené tkáni může být rozsáhlé a může být považováno za charakteristickou známku zánětlivé odpovědi. Ve většině tkání migrace leukocytů probíhá v postkapilárních cévách

zřejmě proto, že spojení endotelialních buněk v cévách je perforované (paracelulární cesta). Dalším způsobem je průchod buněk přes těla endotelialních buněk (transcelulární), ale u velké většiny tkání převažuje první způsob transmigrace (Furie, 2014).

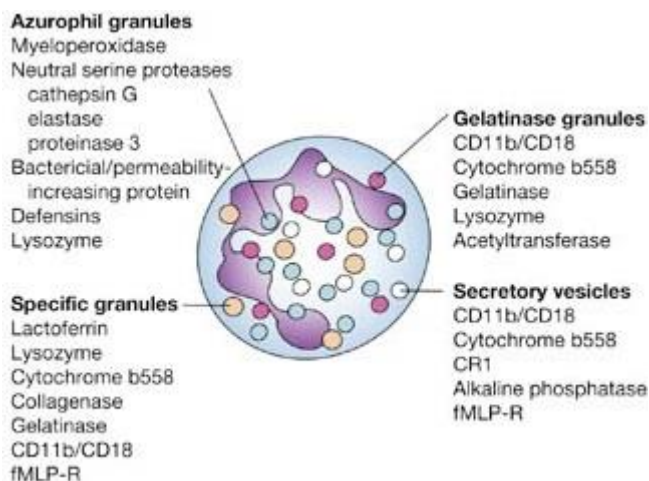
1.1. Role neutrofilů, makrofágů a dalších leukocytů v zánětu

Zánět je součástí složitě biologické odpovědi tělesných tkání na škodlivé podněty, jako jsou patogeny, poškozené buňky nebo dráždivé látky (Ferrero-Miliani et al., 2006). Zánět můžeme hodnotit jako akutní a chronický. Akutní je charakterizován přesunem granulárních buněk především neutrofilů z krve do infikované nebo poraněné tkáně. Prodloužený zánět je známý jako chronický, který v místě zánětu vede k progresivním změnám leukocytů, jako jsou mononukleární buňky, podílející se na destrukci a hojení tkáně v zánětlivém procesu (Kumar et al., 2004; Abbas et al., 2009). Hlavní funkcí zánětu je odstranit původní příčinu poškození buněk, odstranit odumřelé buňky a tkáně, které byly poškozeny zánětlivým procesem, a zajistit opravu tkáně. Klasické příznaky zánětlivé reakce jsou teplo, bolest, zarudnutí, otok a ztráta funkce. Ve srovnání s adaptivní imunitou, specifickou pro každý patogen, je zánět považován za mechanismus přirozené, nespecifické imunity (Abbas et al., 2009). Buněčné zánětlivé procesy jsou regulovány řadou specifických buněčných signálů, které stimulují různé typy buněk, což vede ke kaskádě dějů, která zahrnuje rekrutaci a aktivaci leukocytů (Butterfield et al., 2006).

1.1.1. Role neutrofilů

Neutrofilové nebo-li polymorfonukleární leukocyty (PMNs,), se řadí mezi granulocyty a nejvýznamnější účastníky zánětlivé reakce. Jsou to obvykle první leukocyty, které jsou rekrutovány do místa zánětu a jsou schopny zlikvidovat patogeny různými způsoby (Kolaczowska et al., 2013). Funkce PMNs zahrnuje pohyb na endoteliu, transport z krevního řečiště, pohlcení a trávení bakterií a produkci kyslíkových radikálů. Tyto funkce jsou životně důležité pro obranu hostitele, ale stejně významná je i jejich role v aktivaci imunitní odpovědi (např.: rekrutace a aktivace antigen prezentujících buněk). Neutrofilové obsahují granulární proteiny, které se nachází v primárních (azurofilní), sekundárních (specifické) a terciálních (gelatináza) granulech (Obr. 2). Během migrace neutrofilů z krve do místa zánětu jsou tato granula postupně mobilizována. Zatímco rychle mobilizovaná primární a sekundární granula obsahují hlavně receptory důležité pro adhezi a rozpoznání cizích částic, tak obsah terciálních granul je uvolňován během transendoteliální migrace a obsahuje především proteázy. Neutrofilové také obsahují sekreční váčky, které jsou schopny rychle transportovat svůj obsah na buněčný povrch. Při aktivaci neutrofilů jsou jako první transportovány právě tyto váčky, jež jsou potřebné pro buněčnou adhezi. Pokud se neutrofil dostane do extravaskulárního prostoru, tak primární a sekundární granula uvolňují antimikrobiální peptidy, které přispívají

k ničení bakterií a chemoatraktanty, jenž lákají ostatní imunitní buňky do místa zánětu. Granulární proteiny vyvolávají rekrutaci monocytů, tím že zvyšují expresi CAM (Cell Adhesion Molecule) molekul na endoteliu, které přispívají k adhezi monocytů. Dále mohou fungovat jako chemoatraktanty a zvyšovat antimikrobiální aktivitu makrofágů (Soehnlein et al., 2009).



Obr. 2: Mediátory obsažené v granulách neutrofilů.

Zdroj: Eyles et al., 2006

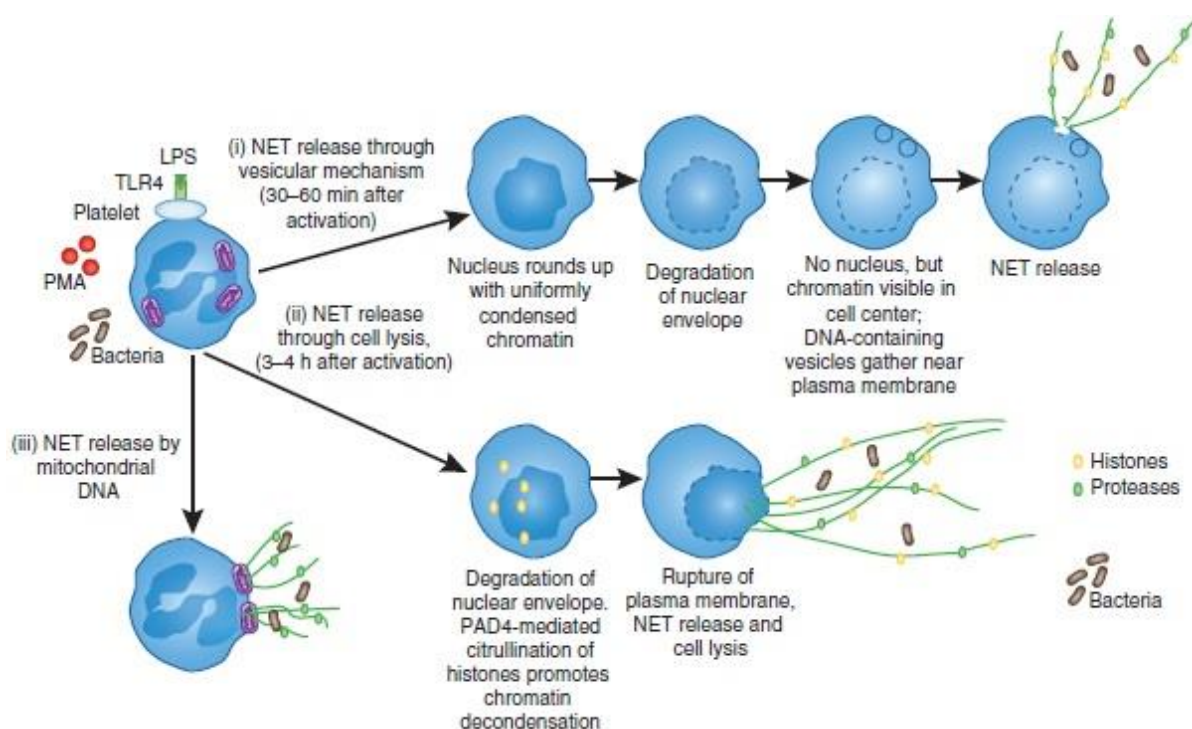
Neutrofilové disponují více způsoby, jak se zbavit patogenů. Pokud neutrofilové najdou a rozpoznají patogen, dojde k fagocytóze a následné eliminaci ve fagolizozómu. K eliminaci může dojít třemi způsoby: na kyslíku závislý mechanismus, na kyslíku nezávislý mechanismus a neutrophil extracellular traps (NET) (Nauseef et al., 2007).

Mechanismus závislý na kyslíku je zprostředkován ROS (reactive oxygen species), které jsou tvořeny NADPH oxidázovým komplexem (Babior, 1999). Tento komplex přenáší elektron z cytosolového NADPH přes membránu ke konečnému akceptoru (molekulární kyslík) a vytváří superoxidový anion, který se ve fagozómu metabolizuje na vysoce baktericidní finální produkty, jako je například peroxid vodíku, hydroxylový radikál a kyselina chlornou (Leliefeld et al., 2016).

Mechanismus, nezávislý na kyslíku je zprostředkován pomocí granul a jejich obsahu (Borregaard et al., 1997). Azurofilní granula jsou zásobárnou serinových proteáz jako jsou elastáza, proteináza 3, katepsin G a azurocidin. Tyto enzymy se dostávají do fagolizozómu až po fúzi granul s fagozómem, ve kterém je bakterie nebo jiný patogen. Během doby, kdy dochází k vytváření fagolizozómu, se jeho vnitřní pH zásadně mění. Ze začátku se pH mění

směrem k alkalickým hodnotám (8,5-9,5), což je způsobeno vznikajícím kyslíkem, který poskytuje prostředí pro správnou aktivaci proteáz, která vede k ideální antimikrobiální a trávicí funkci (Levine et al., 2015). Po fúzi fagozómu s granuly dochází ke změně pH do kyselých hodnot. Tato změna je způsobena V-ATPázou, která je zodpovědná za přečerpávání protonů do fagozómu (Nanda et al., 1996).

Dalším způsobem, jak neutrofilů dokáží zabíjet bakterie, je prostřednictvím mechanismu NET (Obr. 3). NET je síť extracelulárních vláken složených z jaderných složek (chromatin), některých cytoplazmatických a granulárních proteinů, které ničí bakterie extracelulárně, na rozdíl od předchozích zmiňovaných způsobů (Brinkmann, 2004). K tomu, aby mohly být uvolněny NETs, musí projít aktivované neutrofilů výraznou změnou. Po několika minutách od stimulace aktivované neutrofilů pevně přilnou k povrchu substrátu. Během hodiny dojde k dekonduzaci chromatinu a k oddělení vnitřního a vnějšího obalu jádra, současně s tím dochází k rozpadu granul. Asi po hodině dojde k rozpadu jaderného obalu do váčků a nukleoplazma a cytoplazma vytváří homogenní směs. Poté, co se membrána protrhne, dojde k uvolnění NETs do extracelulárního prostoru. Enzymy neutrofilní elastáza (NE) a myeloperoxidáza (MPO), hrají významnou roli při tvorbě NETs, protože se podílí na rozpadu jádra (Brinkmann et al., 2012). V NETs je během poslední fáze okolo 30 proteinů, většina z nich je z granul, několik pochází z jádra a vzácně se zde vyskytují složky z cytoplazmy (Urban et al., 2009). Byly pozorovány dva další mechanismy uvolnění NETs, u kterých nedochází k lýzi neutrofilů. Prvním mechanismem neutrofilů vytlačují mitochondrie, jež následně uvolňují svou DNA do extracelulárního prostoru a zachytávají bakterie (Pilszczek et al., 2010). Druhý mechanismus spočívá v rozpadu jaderného obalu, dále se vytvoří váčky s DNA, které jsou v blízkosti plazmatické membrány. Po fúzi váčku s membránou dochází k uvolnění NETs (Phillipson et al., 2011). Aby mohlo dojít k tvorbě NETs, je nutná produkce ROS. NADPH oxidázový komplex vytváří z molekulárního kyslíku superoxid, ten se poté mění na peroxid vodíku, jenž dále slouží jako substrát pro nejhojnější enzym v granulích neutrofilů MPO. Peroxid vodíku spolu s MPO vytváří kyselinu chlornou. NETs může být vyvolána mnoha faktory například bakteriální a houbovou infekcí a HIV parazity (Brinkmann et al., 2012).



Obr. 3: Tři možné způsoby uvolnění NETs neutrofilů.

Zdroj: Phillipson et al., 2011

Neutrofilů kromě produkce antimikrobiálních látek a různých proteáz, také produkují mnoho cytokinů a růstových faktorů snižující riziko infekce, a přispívají k hojení rány. Některé geny, které jsou důležité v hojení rány, zvyšují svou transkripční aktivitu poté, co neutrofilů opouštějí krevní řečiště a dostávají se do místa zranění. Tyto proteiny jsou zodpovědné za rekrutaci a aktivaci dalších neutrofilů, a ostatních zánětlivých buněk, podporují angiogenezi a stimulují keratinocyty a fibroblasty k proliferaci (Theilgaard-Monch et al., 2004). U normálně se hojící rány poté, co neutrofilů splní svůj úkol, dochází k jejich apoptóze. Tyto mrtvé buňky jsou dále pohlceny makrofágy. Proto může pokračující rekrutace a hromadění mrtvých neutrofilů prodloužit zánětlivou reakci a vést k rozvoji chronického zánětu. Neutrofilů také hrají dvojí roli při hojení rány. Na jedné straně mohou zabíjet cizí organismy a stimulovat ostatní buňky, aby odstranili riziko infekce a na straně druhé, produkují proteázy (nespecifické k patogenům) a mediátory, které mohou způsobit ještě větší škody v hostitelské tkáni a oddálit proces opravy (Wilgus et al., 2013).

1.1.2. Role monocytů a makrofágů

Monocyty jsou bílé krvinky vznikající v kostní dřeni z monoblastů, které diferenciovaly z hematopoetických kmenových buněk. Monocyty cirkulují v krevním oběhu a poté, co migrují do tkání, diferenciují na makrofágy a dendritické buňky (Auffray et al., 2009). Na povrchu lidských monocytů a makrofágů jsou exprimovány CD14 antigeny v hojném počtu, a proto se využívají jako markery pro monocyty. Při srovnání CD14⁺ CD16⁻ monocytů s CD14⁺ CD16⁺ monocyty, mají CD14⁺ CD16⁺ monocyty sníženou fagocytickou aktivitu, produkují menší počet reaktivní formy kyslíku (ROS), exprimují nižší počet chemokinového receptoru CCR2, který zprostředkovává chemotaxi monocytů během zánětu, a dále exprimují vyšší množství chemokinového receptoru CX3CR1, který přispívá k akumulaci rezidentních monocytů (Geissmann et al., 2003).

Lidské monocyty jsou klasifikované do tří tříd (Yang et al., 2014). Do první třídy řadíme klasické monocyty (CD14⁺⁺ CD16⁻) mající na svém povrchu velké množství chemokinového receptoru CCR2 a L-selektinu a malé množství chemokinového receptoru CX3CR1. Jejich hlavní funkcí je fagocytóza. Vykazují vysokou peroxidázovou aktivitu, produkují velké množství IL-10 a malé množství TNF α jako odpověď na LPS (Geissmann et al., 2003). V druhé třídě jsou intermediární monocyty (CD14⁺⁺ CD16⁺), které představují zánětlivé funkce a mají nízkou peroxidázovou aktivitu, ale za to produkují vyšší množství IL-1 β a TNF α v odpovědi na LPS (Cros, 2010). Během zánětu obě tyto třídy monocytů jsou zachyceny a invadují do tkáně prostřednictvím interakce mezi CCR2/CCL2 nebo CCR5/CCL5. Do třetí třídy řadíme neklasické monocyty (CD14⁺ CD16⁺⁺). Ty uvolňují IL-1 β a TNF α jako odpověď na DNA nebo RNA částice, které způsobují patologickou roli v autoimunních onemocnění jako je revmatoidní artritida (Cros et al., 2010).

Makrofágy jsou přítomny ve všech tkáních a jsou pojmenovány podle toho, kde se vyskytují. V mozku jsou to mikroglie, v játrech Kupfferovi buňky, v plicích alveolární makrofágy a v kostech jsou to osteoklasty. Existují dva základní typy makrofágů. Klasicky aktivované M1 makrofágy, mohou zvyšovat zánětlivou reakci a stimulovat imunitní systém, a alternativně aktivované M2 makrofágy, mohou hrát významnou protizánětlivou roli a také snižovat imunitní reakci prostřednictvím uvolněných cytokinů. Tyto makrofágy se liší různým metabolismem argininu, kdy M1 z něj vytváří oxid dusnatý (zabíjecí složka), zatímco M2 vytváří ornitin (uzdravovací složka) (Mills, 2012).

Makrofágy mají tři hlavní funkce, mezi které se řadí prezentování antigenu, fagocytóza a produkce cytokinů a růstových faktorů. Funkční odpověď makrofágů se skládá z rekrutace buněk do místa zánětu, rozpoznání cizích mikroorganismů, fagocytózy a jejich eliminace (Fujiwara et al., 2005). Makrofágy spolu s dendritickými buňkami a B lymfocyty patří mezi antigen prezentující buňky. Jejich úkolem je rozpoznat mikroby, pohltnout je a následně vystavit jejich části na svém povrchu. Takto prezentované antigeny jsou rozpoznávány T lymfocyty, což způsobí jejich aktivaci, proliferaci a diferenciaci na efektorové T buňky, které dále mohou opět aktivovat makrofágy, prostřednictvím cytokinů, k zabíjení mikrobů. Další funkcí makrofágů je fagocytóza, při níž dochází k pohlcení a eliminaci cizích patogenů ve speciálních váčcích nazývaných fagolizozómy. Makrofágy exprimují na svém povrchu různé receptory, které dokáží rozpoznat částice na povrchu mikrobů, což je prvním krokem fagocytózy. Jsou to například manosové receptory, jenž váží terminální manosové a fukosové zbytky glykoproteinů a glykolipidů na buněčné stěně mikrobů nebo Toll-like receptory (TLR), které slouží k rozpoznávání celé řady mikrobiálních molekul. Poslední hlavní funkcí je produkce cytokinů a růstových faktorů jako je například IL-1, 6, TNF a IFN α , β a další, které způsobují aktivaci a proliferaci T a NK buněk a hrají důležitou roli v přesunu leukocytů z krve do tkáně (Fujiwara et al., 2005). Kromě toho, že makrofágy jsou důležité v obraně hostitele před cizorodými látkami, tak jsou úzce zapojeny i do opravy a léčení tkáně (Ricardo et al., 2008; Wynn et al., 2010). Jsou to především M2 makrofágy stimulující opravu a léčení tkáně produkcí růstových faktorů, které podporují epiteliální buňky a fibroblasty, například transformující růstový faktor β 1 (TGF β 1) a destičkový růstový faktor (PDGF). TGF β 1 podporuje diferenciaci fibroblastů do myofibroblastů tím, že zvyšuje expresi tkáňových inhibitorů metaloproteináz, čímž přispívá k regeneraci a hojení tkáně. Metaloproteinázy blokují odbourání extracelulární matrix (ECM) a přímo podporují tvorbu fibrilárního kolagenu v myofibroblastech. PDGF má podobnou funkci (Murray et al., 2011).

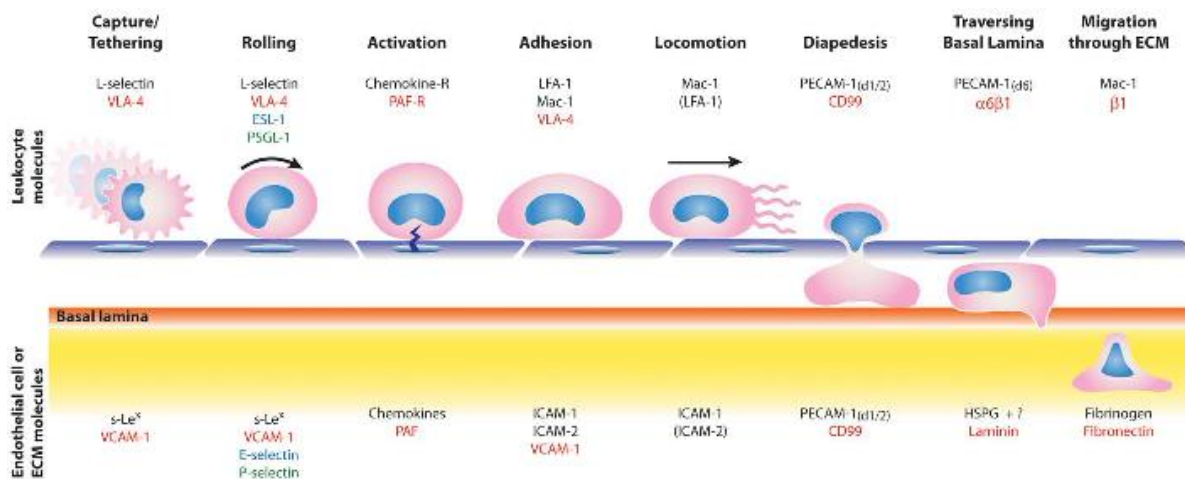
Dendritické buňky (DCs) jsou antigen prezentující buňky schopné fagocytózy. Jejich hlavní funkcí je zpracovat cizí antigen a jeho části vystavit a prezentovat T buňkám na svém povrchu a tím je aktivovat. DCs produkují velké množství různých chemokinů, které lákají různé typy buněk v různých fázích imunitní odpovědi (Piqueras et al., 2006). Dendritické buňky se nacházejí ve všech tkáních včetně krve a lymfatických orgánů. V periferních tkáních se DCs nacházejí v nezralém stádiu a specializují se na zachycení antigenů. V reakci na mikroby podstoupí proces zrání vedoucí k vytvoření buněk prezentujících antigen. Proces zrání probíhá během migrace lymfatickými cévami z periferie do lymfatických uzlin. V

ustáleném stavu DCs také migrují v malém počtu, aniž by došlo k aktivaci. Poté prezentují vlastní antigeny lymfocytům bez kostimulačních signálů, to vede k periferní toleranci.

Existují dvě hlavní cesty ontogeneze DCs z hematopoetické progenitorové buňky. Jedna vytváří myeloidní DCs a druhá plazmacytoidní DCs. Liší se od sebe povrchovými antigeny (CD11b, CD8a a CD11c) a také svou funkcí (Blanco et al., 2008). Myeloidní DCs se vyskytují na třech místech, mezi které patří periferní tkáň, sekundární lymfatické orgány a krev. V kůži jsou dva odlišné typy myeloidních DCs, které se nacházejí ve dvou různých vrstvách. V epidermis se nacházejí Langerhansovy buňky, kdežto v dermis se nacházejí intersticiální DCs (Valladeau et al., 2005). Plasmacytoidní DCs produkují velké množství IFN- α v reakci na viry a cirkulují v krvi a sekundárních lymfatických orgánech tím, že prochází vysokými endotheliálními venuly (Blanco et al., 2008).

1.2. Průběh transmigrace

Během zánětlivé reakce dochází k uvolnění leukocytů z kostní dřeně do krevního řečiště a následně k jejich průchodu skrz endotelium krevních cév. Tento proces nazýváme transmigrace neboli diapedéza a je tvořen několika kroky: zachycení (capture), rolování (rolling), pomalé rolování (slow rolling), pevná adheze (firm adhesion), pohyb (locomotion) a transmigrace (diapedéza, extravazace). Po transmigraci buňky na základě chemokinového gradientu dále migrují do místa zánětu nebo poškození, kde likvidují cizí patogeny (Dimasi et al., 2013). Endoteliální buňky, které jsou aktivovány zánětlivými cytokiny (IL-1, IL-6, TNF α a další), uvolňují velké množství dalších mediátorů, které vedou ke zvýšení exprese adhezivních molekul na povrchu těchto buněk (Krishnaswamy et al., 1999).



Obr. 4: Průběh adhezivní kaskády a transmigrace leukocytů. Na obrázku můžeme vidět jednotlivé kroky průchodu leukocytů z krve do tkáně a zúčastněné molekuly důležité pro tento proces.

Zdroj: Muller, 2013

Prvním krokem adhezivní kaskády je zachycení (capture). To je charakterizováno jako první fyzická interakce mezi leukocyty a krevní cévou, což je zprostředkováno pomocí adhezivních molekul. Významnou roli na počátku této kaskády hraje rodina povrchových transmembránových glykoproteinů – P, L a E selektiny. L-selektiny jsou exprimovány skoro na všech leukocytech, zatímco P a E-selektiny jsou exprimovány na aktivovaných endoteliálních buňkách (Kansas, 1996). Předem vytvořený P-selektin uložený ve Weibel-Paladových granulích je přesunut na povrch endoteliálních buněk po stimulaci histaminem a dalších mediátorů. P-selektiny se váží na selektinové ligandy na povrchu leukocytů, kterými jsou sialyzované fukosylované sacharidové zbytky Lewis X krevní skupiny (sialyl-Lewis X). Nejlépe charakterizován je selektinový ligand P-selektin glykoprotein 1 (PSG1) (McEver et al., 1997).

Po zachycení, následuje další krok adhezivní kaskády, který označujeme jako rolování (rolling). V této fázi dochází k valivému pohybu leukocytů podél endotelu směrem k místu infekce a při tomto pohybu jsou leukocyty stále navázány na endotel. E-selektin exprimovaný aktivovanými endoteliálními buňkami podporuje tzv. pomalé rolování (slow rolling) leukocytů z důvodu částečné aktivace integrinů na povrchu leukocytů. Hlavní účelem rolování je přivést leukocyty do styku s endotelem, aby mohly být dále aktivovány chemokiny a dalšími prozánětlivými látkami, které jsou vystaveny na povrchu endoteliálních buněk. Chemokiny

zapojené do leukocytární rekrutace zahrnují monocyto-*chemotaktický protein (MCP)-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8), KC (NAP-3) (CXCL1), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5), fractalkine (CX3CL1) IL-8 (CXCL8), složky komplementu (C3 a C5), fMLP a další (Hansson, 2005; Charo et al., 2006). Navázáním chemokinů na receptory leukocytů, dojde k transdukcii signálu, která vede k aktivaci leukocytárních integrinů (Muller, 2013). Integriny jsou rodina heterodimerických adhezivních receptorů, které se vyskytují v inaktivní konformaci. Jejich aktivace vede ke konformačním změnám, to má za následek navázání integrinů k jejich ligandům (Hynes, 1992). Leukocyty nesou β 2 integriny, jejichž ligandy jsou vystaveny na povrchu endoteliálních buněk. Zejména se jedná o intracelulární adhezivní molekuly 1 a 2 (ICAM-1, 2) (Dustin et al., 1988; Hynes, 1992). Monocyty a lymfocyty nesou β 1 integriny (VLA4-very late antigen 4), které se vážou na vaskulární buněčné adhezivní molekuly 1 (VCAM-1) (Muller, 2013). Poté, co jsou integriny aktivovány, vytváří pevnou vazbu s jejich ligandy, což umožní leukocyty zastavit na endoteliálním povrchu. Tato fáze se nazývá pevná adheze (firm adhesion).*

Dalším krokem je pohyb (locomotion), při němž se leukocyty navázané na endoteliální povrch posunují směrem k nejbližší endoteliální hranici v souvislosti s přípravou na transmigraci. Pohyb (locomotion) je zprostředkován podskupinou leukocytárních integrinů a endoteliálních adhezivních molekul jako je makrofágový receptor 1 - Mac-1 (CD11b/CD18), který se váže na ICAM-1 (Phillipson et al., 2006; Schenkel et al., 2004). U monocytů je to lymphocyte function-associated antigen 1 - LFA-1 (CD11a/CD18) a ICAM-2 (Schenkel et al., 2004).

Posledním krokem adhezivní kaskády je konečná migrace leukocytů z krevních cév do tkáně a nazývá se transmigrace (diapedéza, extravazace) (Dimasi et al., 2013). Leukocyty mohou migrovat z cévního lumen tím, že projdou mezi endoteliálními buňkami (paracelulární) nebo skrz ně (transcelulární). Paracelulární cesta je převládající a nejlépe charakterizovaná forma transmigrace a týká se přibližně 85-95 % neutrofilů, které projdou z krve do tkáně (Carman et al., 2004; Phillipson, 2008). Oproti tomu je transcelulární cesta omezena pouze na specifické tkáně, jako je kostní dřeň, pankreas nebo tymus (Phillipson et al., 2006; Carman, 2009). Předchozí kroky adhezivní kaskády zahrnovaly heterofilní adhezi, kdy jedna molekula na leukocyту se vážala s odlišnou molekulou na endoteliální buňce, zatímco u transmigrace je požadována homofilní adheze, při níž jedna molekula na leukocyту interaguje se stejnou molekulou na povrchu endotelu, kterou je platelet/endotelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1; CD31). PECAM je vystaven na povrchu většiny leukocytů a také na hranici

endoteliálních buněk. Podobné rozmístění a důležitost v transmigraci jako PECAM-1 má i CD99 antigen. Postkapilární cévy jsou obaleny vrstvou bazální membrány a přerušovanou vrstvou pericytů. Jakmile leukocyt projde přes hranici endoteliálních buněk, musí ještě projít přes tyto další vrstvy, aby se mohl dostat do tkáně (Muller, 2013). Monocyty a neutrofile migrují přes místo v bazální membráně, kde jsou kolagen IV a laminin exprimovány relativně nízkou hustotou, což může být cesta s nejmenším odporem (Voisin et al., 2009) (Wang et al., 2006). V tomto procesu se molekuly CD11a na neutrofilech váží na ICAM-1, které jsou na pericytech, což umožňuje hledání těchto nízkodenzitních míst (Proebstl et al., 2012). Když leukocyty opouštějí krevní řečiště, dochází k prodlužování jejich konců. Interakce LFA-1 (CD11a/CD18) k ICAM-1 udržuje zadní část relativně nepohyblivou, přičemž přední část se neustále pohybuje vpřed pomocí integrinu VLA-3, ten se váže na složky extracelulární matrix (Hyun et al., 2012).

1.3. Molekuly důležité pro migraci

Existuje velký počet adhezivních molekul. Ovšem, většina z nich spadá pouze do tří rodin strukturně příbuzných proteinů – integriny, selektiny a imunoglobulinová nadrodina (Furie, 2014).

1.3.1. Integriny

Integriny jsou velká nadrodina adhezivních molekul skládajících se ze dvou nekovalentně vázaných odlišných řetězců – α a β . U lidí je 8 β -řetězců, jenž se mohou spojovat s 18 α -řetězci a vytvářet tak 24 různých heterodimerických kombinací. Většina integrinů zprostředkovává interakci mezi buňkami a složkami extracelulární matrix (Hynes, 2002). Máme tři důležité integriny, které hrají významnou roli při adhezi: LFA-1 (α L β 2; CD11a/CD18), Mac-1 (α M β 2; CD11b/CD18), VLA-4 (α 4 β 1; CD49d/CD29) (Muller, 2013). Integriny na leukocytech interagují s členy imunoglobulinové nadrodiny, přesněji řečeno s ICAM-1, ICAM-2 a VCAM-1, na apikální straně aktivovaného endotelu. Tyto interakce zajišťují pevnou adhezi mezi leukocyty a endoteliálními buňkami. Jak LFA-1, tak Mac-1 se váže na ICAM-1, ovšem každý k jiné imunoglobulinové doméně. LFA-1 se také může vázat na ICAM-2 a JAM-A (junctional adhesion molecule), zatímco Mac-1 se pojí s JAM-C. Hlavním ligandem pro VLA-4 je VCAM-1 a tento integrin se může vázat na JAM-B, pouze pokud je v přítomnosti JAM-C. Různé leukocyty mají různě zastoupené integriny na jejich

povrchu. Například, monocyty, neutrofilů a T lymfocytů exprimují všechny LFA-1, ale jen neutrofilů a monocyty mají Mac-1. Monocyty a T lymfocytů exprimují VLA-4, neutrofilů nikoli. Je důležité zdůraznit, že leukocytární integriny mají i jiné funkce. Například aktivace T lymfocytů zahrnuje vazbu LFA-1 na ICAM-1, který je na antigen-prezentující buňce. Integrin Mac-1 slouží také jako receptor pro C3b složku komplementu (Furie, 2014).

1.3.2. Imunoglobulinová nadrodina

Pro členy imunoglobulinové nadrodiny jsou charakteristické domény, podobně jako je tomu u protilátkových molekul. Imunoglobulinová doména se skládá ze dvou β skládaných listů, které jsou stabilizovány disulfidickými můstky. Některé molekuly z této nadrodiny jsou exprimovány na endoteliálních buňkách, kde fungují jako proti-receptory leukocytárních integrinů (Rivera-Nieves et al., 2008).

ICAM-1

ICAM-1 je homodimerická molekula, která se podílí na pevné adhezi a je exprimovaná na různých typech buněk, zahrnující klidové endoteliální buňky. Vyskytuje se v nízkých koncentracích výrazně se zvyšujících po cytokinové stimulaci. ICAM-1 je jedním z hlavních ligandů pro $\beta 2$ integriny (LFA-1 a Mac-1), ačkoli v kontextu migrace se zdá, že LFA-1 se převážně váže k ICAM-1, zatímco Mac-1 se váže k více ligandům (Diamond et al., 1991). Za klidových podmínek je afinita LFA-1 a Mac-1 k ICAM-1 nízká, ale aktivace leukocytů způsobuje konformační změny těchto integrinů a tím výrazně zvyšuje jejich afinitu k ICAM-1 (Luo et al., 2007). Aktinová vlákna cytoskeletu se podílejí na buněčné migraci, především fosforylace aktin-vázacího proteinu kortaktinu (cortical actin), který je důležitý při shlukování ICAM-1 na endoteliálních buňkách (Yang et al., 2005).

ICAM-2

ICAM-2 je to další ligand LFA-1 a je to také homodimerická molekula, stejně jako ICAM-1, ale s tím rozdílem, že ICAM-2 má dvě imunoglobulinové domény a ICAM-1 jich má pět. Je exprimován na endoteliálních buňkách a na některých leukocytech, megakaryocytech a krevních destičkách (Diacovo et al., 1994). Zdá se, že v porovnání s ICAM-1, hraje ICAM-2 menší roli v procesu migrace leukocytů (Muller, 2013).

VCAM-1

VCAM-1 je to transmembránový protein, který obsahuje 6 nebo 7 domén a je exprimovaný na endoteliálních buňkách. Podílí se na pevné adhezi monocytů, lymfocytů, eosinofilů a basofilů. které nesou na svém povrchu integrin VLA-4. Exprese VCAM-1 na endotelu je za klidového stavu velice nízká nebo chybí a zvyšuje se po cytokinové stimulaci (Muller, 2013; Rivera-Nieves et al., 2008).

JAM

JAM-A, B, C jsou exprimovány na povrchu endoteliálních a epiteliálních buněk, kde pomáhají vytvářet a udržovat pevnou adhezi (Furie, 2014). JAM-A je koncentrován na hranicích endotelu, a zatímco v normálních podmínkách vytváří homofilní adhezi v místě spojení endotelových buněk, tak během zánětu se může vázat na LFA-1 na leukocytech a usnadnit tak jejich transmigraci (Ostermann et al., 2002). Endoteliální buňky aktivované zánětlivými mediátory způsobují redistribuci některých JAM-A molekul z místa spojení na apikální povrch, což znamená, že interakce mezi JAM-A a leukocyty nemusí být omezená pouze na intracelulární prostor (Furie, 2014). JAM-C je rovněž soustředěn na hranicích endotelu a může vytvářet homofilní adhezi s další molekulou JAM-C nebo se může vázat s JAM-B nebo Mac-1 a vytvářet tak heterofilní adhezi. Molekula JAM-B se může vázat na VLA-4 pouze v případě, že je přítomen i JAM-C (Muller, 2013).

PECAM-1

PECAM-1 je členem imunoglobulinové nadrodiny, který je soustředěn na hranicích endotelu, stejně jako je exprimován na povrchu leukocytů a krevních destiček. Vytváří homofilní interakci mezi endotelem a leukocyty, která je nezbytná pro transmigraci (Muller, 2013).

1.3.3. Selektiny

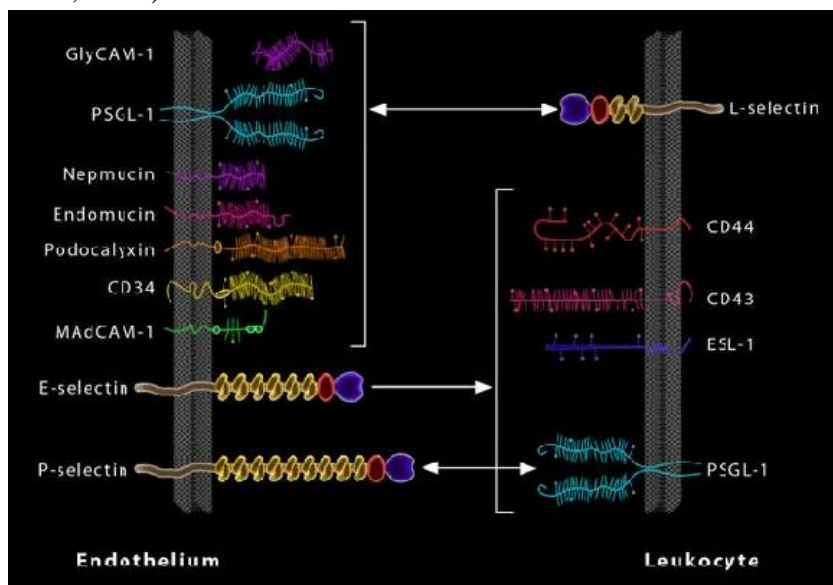
Selektiny jsou jednořetězcové transmembránové glykoproteiny, které mají podobné vlastnosti jako lektiny typu C, protože mají podobný N-konec a jejich vazba na sacharidové skupiny je závislá na vápníku (Cotran et al., 1999). Rozeznáváme tři hlavní typy: E-selektin (CD62E), který je exprimován na endotelu, P-selektin (CD62P), který je na destičkách a endotelu a L-selektin (CD62L) se nachází na leukocytech zahrnujících neutrofile, eosinofily, monocyty a lymfocyty (Patel et al., 2002). Všechny tyto selektiny zprostředkovávají interakce

mezi buňkami (např. leukocyt a endotelová buňka), které hrají důležitou roli při rekrutaci leukocytů. Jejich konkrétním cílem je zachytit leukocyty ke stěně cévy, kde se pohybují valivým pohybem, než přijde signál k pevnější adhezi (Furie, 2014).

P-selektin je nejdelší, obsahuje 9 SCR (short consensus repeat) domén a díky své délce je velmi účinný při zachytávání leukocytů z proudící krve. P-selektin se váže na P-selektin glykoprotein ligand 1 (PSGL1), který je primárně exprimovaný na myeloidních, lymfoidních a dendritických buňkách (Patel et al., 2002).

E-selektin obsahuje 6 SCR domén, a na rozdíl od P-selektinu se exprimuje až po stimulaci TNF α a IL-1. Hlavním ligandem pro E-selektin je E-selektin ligand 1, ale také se může vázat na PSGL1 nebo L-selektin (Ley, 2003).

L-selektin je nejmenší, obsahuje 2 SCR domény. L-selektin je důležitý, protože se jedná o jediný selektin, který se podílí na rekrutaci lymfocytů do lymfatické tkáně. I když L-selektin je stále exprimován leukocyty, po buněčné aktivaci se rychle oddělí od povrchu. U některých modelů zánětu, L-selektin slouží jako důležitý prostředník při rekrutaci neutrofilů v pozdějších fázích zánětu. Čtyři ligandy L-selektinu byly objeveny v cévách s vysokým endotelem (HEV) lymfatických uzlin – GlyCAM-1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule), MAdCAM-1 (Mucosal addressin cell adhesion molecule), CD34 a Sgp200 (Patel et al., 2002).



Obr. 5: Selektiny a jejich ligandy.

Zdroj: Rivera-Nieves et al., 2008

1.4. Chemotaxe

Chemotaxe je pohyb buněk či organismů ve směru chemického gradientu. Přilákání leukocytů do tkáně je nezbytné při zánětu nebo reakci hostitele na infekci a tento proces je řízen chemokiny (Epstein et al., 1998).

1.4.1. Chemokiny

Chemokiny tvoří rodinu, do které se řadí něco kolem 50 chemotaktických cytokinů s molekulovou hmotností 8-14 kD. Tyto molekuly se vážou na receptory spojené s G proteiny, které jsou exprimovány na povrchu leukocytů a ostatních buněk (Zlotnik et al., 2000). Chemokiny mají homologní sekvence a můžou být rozděleny do čtyř hlavních rodin v závislosti na orientaci konzervovaných cysteinových zbytků na N-konci: C-C, C-X-C, C-XXX-C a C (Johnston et al., 2002).

Největší rodinu tvoří C-C chemokiny (β -chemokiny), které jsou pojmenovány podle pozice prvních dvou cysteinových zbytků ze čtyř, které jsou vedle sebe. Tyto molekuly lákají mononukleární buňky do místa chronického zánětu. Nejlépe popsán chemokin této skupiny je monocytární chemotaktický protein 1-3 (MCP-1, 2, 3; CCL2). Je to silný agonista pro monocyty, paměťové lymfocyty a bazofily. Ostatní C-C chemokiny zahrnují makrofágový zánětlivý protein-1 α (MIP-1 α ; CCL3), MIP-1 β (CCL4), I-309 (CCL1) a RANTES (CCL5) (Charo et al., 2006).

Další rodinou chemokinů jsou C-X-C (α -chemokiny), které mají zbytek aminokyseliny vložený mezi první dva cysteiny. Tato rodina se dále dělí na dvě skupiny. Do první spadají chemokiny, které obsahují specifickou aminokyselinovou sekvenci (kyselina glutamová-leucin-arginin) a do druhé spadají ty, který tuto sekvenci nemají. Chemokiny s touto specifickou sekvencí slouží jako chemoatraktanty pro neutrofile a patří sem například IL-8, který vyvolává migraci neutrofilů z krve do tkáně, naopak chemokiny bez sekvence fungují jako chemoatraktanty pro lymfocyty a patří sem například CXCL13 známý také jako B-lymphocyte chemoattractant (BLC) (Epstein et al., 1998).

Třetí rodinou chemokinů jsou C-3X-C (δ -chemokiny), které mají tři aminokyseliny mezi dvěma cysteiny. Jediným členem této rodiny je fractalkine (CX3CL1), jehož doména fúzuje k mucinu, ten funguje jako "opora" a k transmembránovým a cytoplazmatickým oblastem. Po jeho štěpení TNF α konvertujícím enzymem se uvolní rozpustný chemokin, a tudíž fractalkine má roli jak adhezivní molekuly, tak i chemokin (Charo et al., 2006).

Poslední rodinou chemokinů jsou C (γ -chemokiny), které mají pouze jeden cystein a dva členy lymphotactin α (XCL1) a lymphotactin β (XCL2), který rekrutují T a NK buňky (Crockett-Torabi et al., 1996).

Tab. 1: Seznam chemokinů a jejich receptorů.

CC chemokines		
Name	Other name(s)	Receptor
CCL1	I-309, TCA-3	CCR8
CCL2	MCP-1	CCR2
CCL3	MIP-1a	CCR1
CCL4	MIP-1 β	CCR1, CCR5
CCL5	RANTES	CCR5
CCL6	C10, MRP-2	CCR1
CCL7	MARC, MCP-3	CCR2
CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2B, CCR5
CCL9/CCL10	MRP-2, CCF18, MIP-1?	CCR1
CCL11	Eotaxin	CCR2, CCR3, CCR5
CCL12	MCP-5	
CCL13	MCP-4, NCC-1, Ck β 10	CCR2, CCR3, CCR5
CCL14	HCC-1, MCIF, Ck β 1, NCC-2, CCL	CCR1
CCL15	Leukotactin-1, MIP-5, HCC-2, NCC-3	CCR1, CCR3
CCL16	LEC, NCC-4, LMC, Ck β 12	CCR1, CCR2, CCR5, CCR8
CCL17	TARC, dendrokine, ABCD-2	CCR4
CCL18	PARC, DC-CK1, AMAC-1, Ck β 7, MIP-4	
CCL19	ELC, Exodus-3, Ck β 11	CCR7
CCL20	LARC, Exodus-1, Ck β 4	CCR6
CCL21	SLC, 6Ckine, Exodus-2, Ck β 9, TCA-4	CCR7
CCL22	MDC, DC/ β -CK	CCR4
CCL23	MPIF-1, Ck β 8, MIP-3, MPIF-1	CCR1
CCL24	Eotaxin-2, MPIF-2, Ck β 6	CCR3
CCL25	TECK, Ck β 15	CCR9
CCL26	Eotaxin-3, MIP-4a, IMAC, TSC-1	CCR3
CCL27	CTACK, ILC, Eskine, PESKY, skinkine	CCR10
CCL28	MEC	CCR3, CCR10
CXC chemokines		
Name	Other name(s)	Receptor
CXCL1	Gro-a, GRO1, NAP-3, KC	CXCR2
CXCL2	Gro- β , GRO2, MIP-2a	CXCR2
CXCL3	Gro- γ , GRO3, MIP-2 β	CXCR2
CXCL4	PF-4	CXCR3B
CXCL5	ENA-78	CXCR2
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2, CTAPIII, β -Ta, PEP	
CXCL8	IL-8, NAP-1, MDNCF, GCP-1	CXCR1, CXCR2
CXCL9	MIG, CRG-10	CXCR3
CXCL10	IP-10, CRG-2	CXCR3
CXCL11	I-TAC, β -R1, IP-9	CXCR3, CXCR7
CXCL12	SDF-1, PBSF	CXCR4, CXCR7
CXCL13	BCA-1, BLC	CXCR5
CXCL14	BRAK, bolekin	
CXCL15	Lungkin, WECH	
CXCL16	SRPSOX	CXCR6
CXCL17	DMC, VCC-1	
C chemokines		
Name	Other name(s)	Receptor
XCL1	Lymphotactin α , SCM-1a, ATAC	XCR1
XCL2	Lymphotactin β , SCM-1 β	XCR1
CX3C chemokines		
Name	Other name(s)	Receptor
CX3CL1	Fractalkin, Neurotactin, ABCD-3	CX3CR1

Zdroj: Abbas et al., 2012

1.4.2. Chemokinové receptory

Navzdory diverzitě ve složení a velikosti se všechny chemokiny váží na proteiny, patřící do velké rodiny signál transdukujících G proteinů spojených s receptory. Receptory spojené s G proteiny jsou jednořetězcové molekuly, které 7krát prochází membránou tam a zpět. Jejich N konec je umístěn na extracelulární části membrány a účastní se vazby ligandu, kdežto C konec je na intracelulární části membrány a váže se na G protein, který je složen ze tří podjednotek (α , β , γ). Po navázání ligandu na receptor dojde ke konformačním změnám receptoru, které umožní interagovat s G proteinem, což má za následek, že se navázaný GDP uvolní z α podjednotky a nahradí ho GTP. Následně dojde k rozdělení G proteinu na α podjednotku s GTPázovou aktivitou a $\beta\gamma$ podjednotku. Obě podjednotky vyvolávají řadu signalizačních pochodů zahrnující aktivaci inositol-3-trifosfátu, uvolnění intracelulárního vápníku a aktivaci protein kinázy C. Chemokinové receptory jsou rozdělené do několika rodin: CXC chemokinové receptory mají 7 známých členů, CC chemokinové receptory mají 10 známých členů, CX3C a XC chemokinové receptory mají oba pouze jednoho známého člena (Furie, 2014). Navíc, zde existují nejméně tři tzv. “decoy“ nebo “scavenger“ receptory (Duffy antigen receptor pro chemokiny – DARC, D6 a CCX-CKR), které nejsou spojeny s G proteiny, a tudíž se nepodílejí na transdukci signálu (Borroni et al., 2014). Tyto receptory hrají roli při tlumení imunitní odpovědi, tím že brání chemokinům v jejich funkci (Turner et al., 2014).

Zajímavé je, že dva chemokinové receptory - CCR5 a CXCR4 jsou využívány virem HIV ke vstupu do hostitelských buněk. Hlavní buněčný receptor pro virus HIV je CD4, nicméně virus nemůže vstoupit do hostitelské buňky, dokud není přítomen jeden z těchto koreceptorů. CCR5 je koreceptor, který je potřebný pro invazi makrofágů tzv. M-tropickými kmeny HIV obvykle zahajující infekci (Alkhatib, 2009). Odhaduje se, že lidé, kteří nemají receptor CCR5 jsou chráněni před infekcí HIV na 97 %, na druhou stranu jsou vystaveni zvýšenému riziku vzniku encefalitidy zapříčiněné západonilským virem (Furie, 2014). CXCR4 je koreceptor potřebný pro invazi CD4⁺ T buněk T-tropickými kmeny HIV, které mají tendenci vyvíjet se později v procesu onemocnění (Alkhatib, 2009).

1.5. Inhibitory migrace a jejich využití v klinické praxi

Inhibitory migrace jsou látky nebo molekuly, které zpomalují nebo zastavují proces, při kterém leukocyty migrují z krevního řečiště do místa zánětu.

Pro COPD (chronická obstrukční plicní onemocnění) je charakteristický zánět sliznice dýchacích cest, ve kterém se vyskytují převážně neutrofilů a také zvýšená hladina neutrofilů ve sputu a plicní tkáni. Na neutrofilech je exprimován převážně CXCR2 receptor, který zprostředkovává migraci neutrofilů do místa zánětu. Malá molekula **AZD5069** funguje jako antagonist CXCR2 a je schopna inhibovat migraci neutrofilů do tkáně dýchacích cest u pacientů s COPD. V klinických studiích bylo zjištěno, že AZD5069 byl celkově dobře snášen u pacientů, jež dokončili léčbu (Kirsten et al., 2015).

Další látkou, která má inhibiční účinky na migraci leukocytů, je **CID16020046**. Tato látka inhibuje GPR55 (receptor spojený s G proteinem-55), citlivý k určitým kanabinoidům. V testech bylo zjištěno, že farmakologická blokáda GPR55 inhibitorem CID16020046 snižuje experimentální střevní zánět prostřednictvím snížení migrace a aktivace leukocytů, zejména makrofágů. Z tohoto důvodu, CID16020046 představuje možný lék k léčbě zánětu tlustého střeva (Stančić et al., 2015).

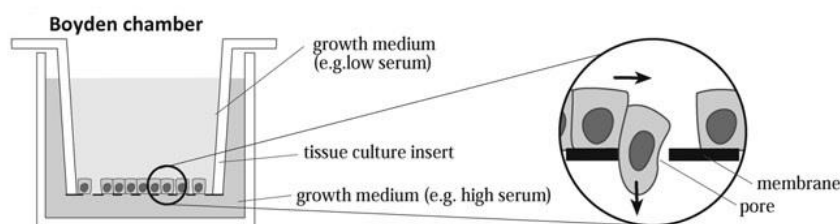
Nesteroidní protizánětlivé léky jako je například ibuprofen, naproxen a oxaprozin mají inhibiční účinek na migraci neutrofilů, které se pohybují za chemoatraktanty IL-8 nebo C5a. Inhibice zprostředkovaná ibuprofenem snižuje expresi integrinů, zatímco naproxen a oxaprozin inhibují PI3K/Act dráhu (Bertolotto et al., 2014).

V svém pokusu jsem používal některé inhibitory ze slin *Ixodes ricinus* na migraci neutrofilů. Jedná se o 4 zástupce rodiny serpinů (serinové proteázové inhibitory). **Serpiny** jsou největší a velmi široce distribuovaná nadrodina proteázových inhibitorů. Většina serpinů inhibuje serinové proteázy chymotrypsinového typu (dále existují trypsin-like, trombin-like, elastáza-like proteázy), avšak některé serpiny inhibují kaspázy a papain-like cysteinové proteázy (Law et al., 2006). Tyto enzymy se liší od serinových proteáz používáním nukleofilního cysteinového zbytku v aktivním místě, zatímco serinové proteázy používají nukleofilní serinový zbytek (Barrett et al., 2001). Vzácně můžou některé serpiny vykonávat nepotlačující funkci, například několik lidských serpinů funguje jako hormonální transportéry, molekulární chaperony nebo nádorové supresory (Law et al., 2006). Serpiny jsou pozoruhodné pro svůj neobvyklý mechanismus účinku, ve kterém nevratně inhibují cílovou proteázu tím,

že podstoupí velkou konformační změnu, a uvězní enzym v komplexu, určeném k degradaci. Co se týče struktury, mají serpiny společnou strukturu, všichni mají 3 β -skládané listy (pojmenované A-C) a 8-9 α -šroubovic. Nejdůležitější oblast pro jejich funkci je β -skládaný list A a reaktivní centrální smyčka (RCL), ta vytváří počáteční interakci s proteázou. Následné konformační změny mají za následek přechod serpínů ze stresového stavu do uvolněného stavu a finální inhibici proteáz (Whisstock et al., 2010).

1.6. Metody studia migrace buněk

Pro analýzu migrace buněk existuje několik metod. Jednou z nejčastěji používaných je díky jednoduchému použití, migrace buněk pomocí Transwell destiček. Jedná se o zařízení, které je podobné Boydenově komůrce, kde endoteliální buňky rostou na povrchu pórovitého filtru, který rozděluje dva kompartmenty obsahující médium. Leukocyty se přidávají do horní části komory (inzert), zatímco chemoatraktant se přidává do spodní části. Poté leukocyty migrují v důsledku chemotaktického gradientu přes endoteliální buňky a pórovitý filtr do spodní části komory, kde jsou následně vyjmuty a spočítány. Nevýhodou této metody je její finanční náročnost při větším počtu vzorků. Bylo také zjištěno, že při dlouhodobé kultivaci endoteliálních buněk, tyto buňky rostou do pórů, což tuto analýzu komplikuje (Muller et al., 2008).

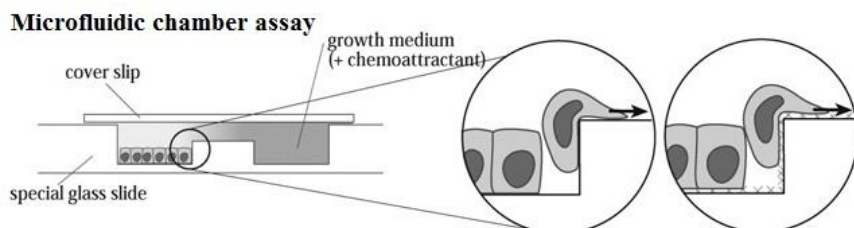


Obr. 6: Proces migrace leukocytů pomocí Boydenovy komůrky.

Zdroj: Kramer et al., 2013

Další metodou může být tzv. microfluidic chamber assay. V této metodě jsou dvě sousedící komory ve vodorovné pozici a jsou spojeny úzkým spojovacím kanálkem. Jedna komora je naplněna buňkami, rozsuspendovanými v médiu a druhá je naplněna médiem, obsahujícím chemoatraktanty. Celý systém je zakryt sklíčkem. Stablní koncentrační gradient se vytváří mezi oběma komorami ve spojovací kapilární oblasti a počet migrujících buněk je počítán na povrchu spojovací části pomocí světelného mikroskopu. Tato horizontální kapilární

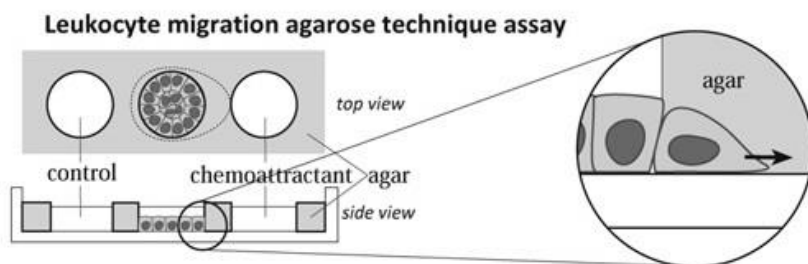
komorová migrace byla dále vylepšena a je součástí μ Slide Chemotaxis assay. Tato metoda je založena na dvou komorách a kolmém kanálku. Komory se naplní médiem, do jedné z komor se přidá chemoatraktant a do kolmého kanálu se uloží buňky. Pohyb buněk je pozorován mikroskopicky. Tyto metody jsou často využívány pro studium migrace leukocytů (Kramer et al., 2013).



Obr. 7: Proces migrace leukocytů pomocí horizontální kapilární migrace.

Zdroj: Kramer et al., 2013

Metoda známá už od roku 1968 se nazývá Leukocyte migration agarose technique assay (LMAT assay). Využívá tenkou vrstvu agarózy na misce pro tkáňové kultury, do níž se vyřežou jamky v definovaných vzdálenostech. Leukocyty se přidají do jedné z těchto jamek a sousední jamky jsou naplněny chemoatraktanty, inhibitory nebo kontrolou. Leukocyty migrují pod agarovou vrstvou směrem k různým jamkám. Vzdálenost pohybu směrem testované definuje index migrace. Výhoda této metody je její levný a jednoduchý postup, jakož i jednoduchý způsob detekce (Kramer et al., 2013).



Obr. 8: Proces migrace leukocytů pomocí LMAT metody.

Zdroj: Kramer et al., 2013

2. Cíle práce

Cíle této práce jsou:

- 1) Zpracovat rešerši na téma rekrutace a migrace leukocytů.
- 2) Optimalizovat metodu statické migrace neutrofilů *in vitro*.
- 3) Pomocí této optimalizované metody analyzovat vliv několika proteázových inhibitorů ze slin klíštěte *Ixodes ricinus* na migraci neutrofilů.

3. Materiály a metody

3.1. Pomůcky a chemikálie

Tab. 2: Seznam chemikálií.

Název	Složení	Firma + kat. číslo
1 x PBS (Fosfátový pufr)	10 x PBS + deion H ₂ O	
10 x PBS - Gibco ®		ThermoFisher, 70011044
Pokusné médium	RPMI 1640 + 0,5% BSA	
RPMI 1640	w/Stabilní Glutamin w/25mM Hepes	Biowest, L0496-500
RBC (Red Blood Cell) lyzační pufr		eBioscience, 00-4333-57
BSA (Bovinní sérový albumin) 30%		Biosera, SA-296/100
Percoll TM		GE Healthcare, 17-0891-01
fMLP (N-Formyl-Met-Leu-Phe)		Sigma-Aldrich, 59880-97-6
FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) pufr	0,5l PBS + 1% BSA + 0,1% NaN ₃	Sigma-Aldrich
Ly6G (PE Rat Anti-Mouse Ly-6G Klon 1A8 RUO)		BD Pharmingen TM , 561104
F4/80 (PE-Cy7 Anti-Mouse F4/80 Klon BM8)		eBioscience, 25-4801-82
CD11b (FITC Rat Anti-Mouse CD11b Klon M1/70 RUO)		BD Pharmingen TM , 553310
Trypanová modř 0,5%	Trypanová modř + H ₂ O	Sigma-Aldrich, T6146-5G
IRS 1		Mgr. Jan Kotál
IRS 2		Mgr. Jan Kotál
S8K (S8K serpin LPS free)		Mgr. Jan Kotál
20314 (20314 serpin LPS free)		Mgr. Jan Kotál
44530 (44530 Kunitz inhibitor LPS free)		Mgr. Jan Kotál
Myši – C57bl/6N		Velaz, 027
Corning 24 a 96 Transwell TM destičky		Sigma-Aldrich, CLS3421-48EA

3.2. Metody

3.2.1. Pokusná zvířata

Pro experimenty jsem použil inbrední kmen myši C57bl/6N z firmy Velaz. Pro pokusy jsem používal samice, které byly staré 8-14 týdnů. Tato pokusná zvířata byla chována v bariérovém IVC (individually ventilated cages) chovu na Katedře medicínské biologie.

3.2.2. Izolace buněk kostní dřeně

Před začátkem izolace buněk kostní dřeně jsem si připravil dvě Petriho misky, pitvací nástroje (nůžky, pinzeta a skalpel) a nádobu s ledem. Všechny buňky, s kterými jsem pracoval, jsem vždy uchovával na ledu po celou dobu experimentu. Do jedné z Petriho misek jsem nalil PBS a do druhé médium (RPMI) a obě jsem uložil na led. Po usmrcení myši zlomením vazy jsem myš dezinfikoval pomocí etanolu. Na hřbetě myši jsem nůžkami nastříhl kůži, kterou jsem stáhl přes dolní končetiny. Po odstranění kůže z dolní části myši, jsem nůžkami odstříhl obě dolní končetiny v místě kyčelního kloubu (*articulatio coxae*). Z každé končetiny jsem odstranil chodidlo a oddělil od sebe kost stehenní (*femur*) a kost holenní (*tibii*) v místě kolenního kloubu (*articulatio genus*). Tyto dvě kosti jsem následně vložil do Petriho misky s roztokem PBS. V další misce jsem pak jednotlivé kosti pomocí skalpelu očistil od svalové tkáně a uložil do Petriho misky s RPMI. U všech kostí jsem z obou stran odstříhl kloubní hlavice pomocí nůžek tak, aby injekční stříkačka s jehlou velikosti 27G mohla proniknout do kostní dřeně. Následně jsem přibližně 6-ti ml RPMI vypláchl z kostí kostní dřev do 50ml centrifugační zkumavky. Pomocí serologické pipety jsem rozsuspendoval kostní dřev a filtrací přes 70 μ m cell-strainer jsem se zbavil zbytků kostí a dalších nečistot. Výslednou suspenzi jsem zcentrifugoval v centrifuze s výkyvným rotorem (Sigma 3-30KS) při přetížení 250g, 4°C po dobu 5 minut. Po centrifugaci jsem odstranil supernatant a pelet jsem rozsuspendoval v 1ml Red Blood Cell Lysis Buffer (RBCLB), díky kterému došlo k lýzi červených krvinek (erytrocytů) z důvodu hypotonického prostředí. Po 1 minutě působení RBCLB jsem přidal 15ml PBS, který navodil opět izotonické prostředí. Zkumavku s buňkami jsem opět centrifugoval při přetížení 250g při 4°C po dobu 5 minut, supernatant jsem odstranil a pelet rozsuspendoval s 15ml PBS. Proces jsem ještě jednou opakoval. Výsledný pelet jsem rozsuspendoval v 3ml PBS. Z takto připravené suspenze jsem vyizoloval neutrofilů pomocí Percollového gradientu.

3.2.3. Izolace neutrofilů pomocí diskontinuitního gradientu Percollu

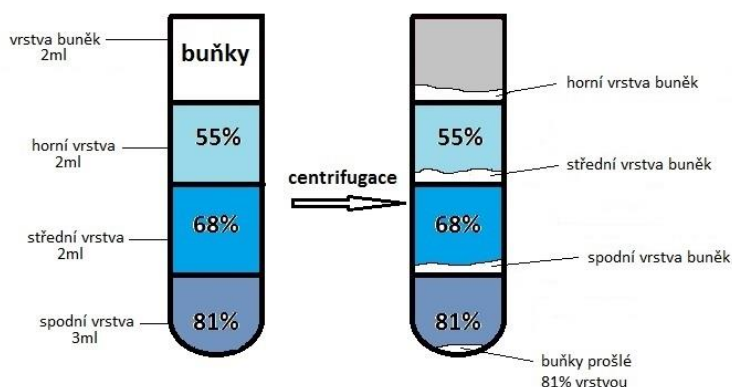
Na začátku této metody jsem musel nejprve zjistit optimální složení Percollového gradientu pro izolaci neutrofilů. Jako první krok jsem si připravil různé koncentrace Percollu 100, 81, 70, 68, 66, 55%. 100% Percoll jsem připravil smícháním 45ml zásobního Percollu a 5ml 10x koncentrovaného PBS. Zbývající koncentrace jsem připravil v objemu 10ml podle tabulky 3.

Tab. 3: Příprava různých koncentrací Percollu.

Percoll (%)	100% Percoll (ml)	PBS (ml)
55	5,5	4,5
66	6,6	3,4
68	6,8	3,2
70	7,0	3,0
81	8,1	1,9

Pro optimalizaci gradientu jsem si připravil tři 15ml centrifugační zkumavky. Do každé jsem napipetoval 3ml 81% Percollu pomocí serologické pipety. V dalším kroku jsem do první zkumavky napipetoval 2ml 66% Percollu, do druhé 2ml 68% Percollu a do poslední jsem napipetoval 2ml 70% Percollu. Následně jsem do každé zkumavky napipetoval 2ml 55% Percollu a pak 2ml suspenze s buňkami. Překrývání jednotlivých vrstev bylo prováděno velice opatrně tak, aby nedošlo ke smíchání jednotlivých fází. Takto připravené zkumavky jsem centrifugoval v centrifuze s výkyvným rotorem při 1200g při 5°C po dobu 30 minut. Centrifuga byla nastavena na nejmenší akceleraci a deceleraci, aby se jednotlivé fáze gradientu nesmíchaly. Po centrifugaci se ve zkumavkách na rozhraní fází 81 % a 66-70 % vytvořila vrstva buněk, bohatá na populaci neutrofilů. 1ml pipetou jsem danou vrstvu buněk odsál a napipetoval do dalších 15ml centrifugačních zkumavek, kterou jsem doplnil do 14ml roztokem PBS, abych buňky promyl od Percollu. Zkumavku jsem vložil do centrifugy a zcentrifugoval při 350g na 5 minut. Ze zkumavky jsem pipetou odsál supernatant, aby ve zkumavce zůstaly 2ml PBS, kterými jsem rozsuspendoval pelet a opět doplnil do 14ml roztokem PBS a zcentrifugoval. Po centrifugaci jsem supernatant opět odsál a pelet rozsuspendoval v 100 μ l PBS. Následně jsem změřil čistotu testovaných buněk (viz. 3.2.4. Měření čistoty

v průtokovém cytometru) a výsledek vyhodnotil. Pro izolaci neutrofilů jsem dále v pokusu používal 81, 68, 55% Percollový gradient (Obr. 9). Postup přípravy se shodoval s postupem uvedeným výše pouze s tím rozdílem, že jsem buňky v posledním kroku nerozsuspendoval v 100 μ l PBS, ale v 1ml RPMI + 0,5% BSA.



Obr. 9: Percollový gradient před a po centrifugaci. Na obrázku jsou znázorněny jednotlivé vrstvy, přechod mezi vrstvami a buňky, které byly rozděleny na základě jejich hustoty a jsou umístěné na rozhraní dvou vrstev.

3.2.4. Měření čistoty neutrofilův průtokovém cytometru

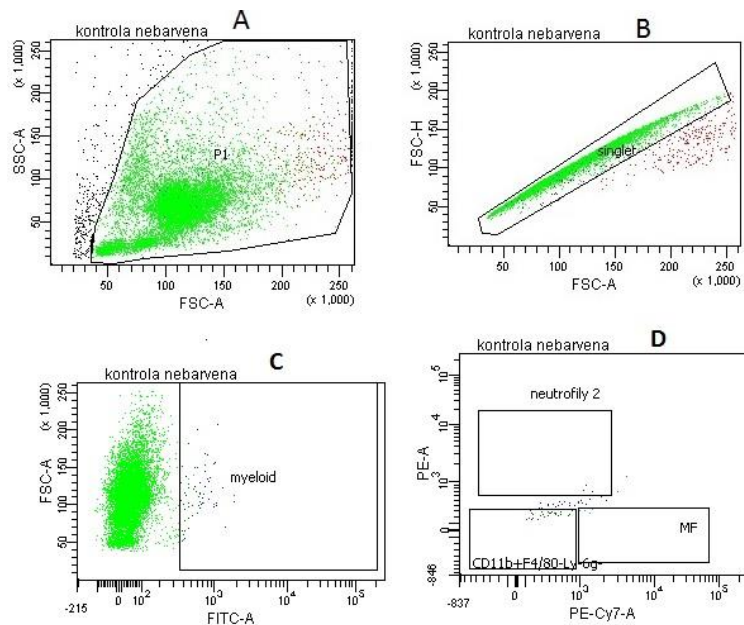
Z buněk rozpuštěných v 1ml RPMI (nebo 100 μ l PBS) jsem odebral 100 μ l, které jsem napipetoval do zkumavky se 100 μ l FACS pufru a tento roztok jsem rozdělil do dvou zkumavek, kdy jedna byla použita jako negativní kontrola a druhá jako měřený vzorek. Obě zkumavky jsem centrifugoval v centrifuze při 250g na 5 minut. Supernatant jsem odstranil a pelet rozsuspendoval ve 125 μ l FACS pufru. Do měřené zkumavky jsem dále přidal po 5 μ l od každé protilátky – Ly6-g, F4/80, a CD11b (Tab. 4). Suspenzi s protilátkami jsem inkuboval po dobu 30 minut na chladném (4°C) a tmavém místě (v lednici). Po uplynutí doby jsem nenavázané protilátky promyl přidáním 1ml FACS pufru a nechal jsem je centrifugovat při 500g na 5 minut. Supernatant jsem odstranil a pelet rozmíchal pomocí vortexu. Poté jsem do zkumavek přidal 250 μ l FACS pufru a změřil čistotu v průtokovém cytometru (BD FACS Canto II Flow Cytometer).

Tab. 4: Použité protilátky a jejich koncentrace a fluorochromy.

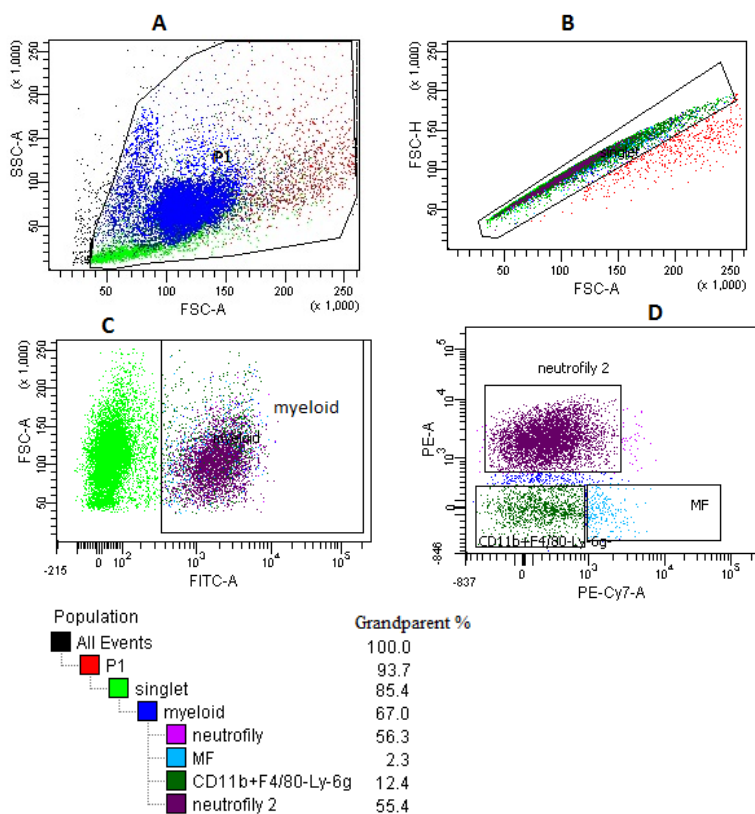
Protilátky	Koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	Fluorochromy
Ly6-g	0,4	Phycoerythrin (PE)
F4/80	0,4	Phycoerythrin-Cyanin 7 (PE-Cy7)
CD11b	1	Fluoresceinisothiocyanate (FITC)

3.2.5. Nastavení průtokového cytometru

Nastavení průtokového cytometru spočívá v separování (gatování) jednotlivých populací myeloidních buněk. Toto nastavení jsem prováděl v softwaru BD FASC Diva Software. V prvním kroku jsem analyzoval vzorek buněk, který nebyl fluorescenčně značený (negativní kontrola). Po analýze vzorku jsem hodnoty vynesl do grafu (Obr. 10 A), který ukazuje závislost velikosti buněk (FSC-A – Forward scatter area) na granularitě (SSC-A – Side scatter area). V tomto grafu jsem oddělil živé buňky od mrtvých a dalších nečistot pomocí gatování. Hodnoty oddělené populace jsem dále použil do dalšího grafu (Obr. 10 B), který ukazuje závislost FSC-H (Forward scatter height) a FSC-A. V tomto grafu jsem separoval jednotlivé buňky-singlety a zdvojené buňky-duplety. Hodnoty ze singletů jsem použil v grafu (Obr. 10 C), který ukazuje závislost FSC-A a CD11b-FITC. V tomto grafu jsem poté separoval populaci buněk, kde ohraničená populace představuje myeloidní buňky. Z hodnot myeloidní populace jsem vytvořil poslední graf (Obr. 10 D), který ukazuje závislost Ly6-g – PE a F4/80-PE-Cy7. V tomto grafu jsem od sebe oddělil populaci neutrofilů, makrofágů a ostatních myeloidních buněk, což bylo možné, až po analýze barveného vzorku (Obr. 11 A-D). Po navázání fluorescenčně značených protilátek na povrch neutrofilů, makrofágů a ostatních myeloidních buněk jsem tento označený vzorek podrobil analýze v průtokovém cytometru. Na povrch neutrofilů se váže protilátka Ly6G označená PE, na makrofágy se váže F4/80 označená PE-Cy7 a na ostatní myeloidní buňky CD11b označená FITC (viz. Tab.4). Výsledné hodnoty populace neutrofilů jsem nakonec zpracoval do grafů pomocí MS Excel.



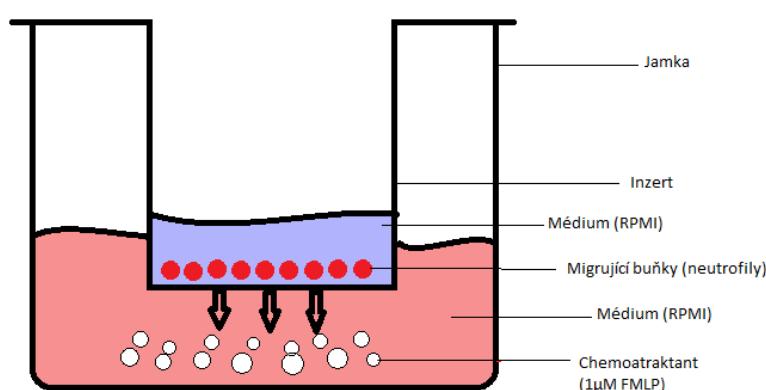
Obr. 10 A-D: Fluorescenčně neznačený vzorek (negativní kontrola). Na obrázku můžeme vidět čtyři různé grafy A-D, které znázorňují různé závislosti.



Obr. 11 A-D: Fluorescenčně značený vzorek s hierarchickým uspořádáním jednotlivých populací. Na tomto obrázku můžeme vidět kromě označeného vzorku také tabulku s hierarchickým uspořádáním, ve kterém jsou použity procenta ze singletů (grandparent %).

3.2.6. Migrace neutrofilů

Pro analýzu migrace neutrofilů jsem používal 24 nebo 96 jamkové Transwell[™] destičky (Corning) s velikostí pórů 5 μ m. Buňky rozpuštěné v 1ml RPMI + 0,5% BSA jsem spočítal pomocí Bürkerovy nebo Neubauerovy komůrky a následně jsem objem upravil (zředil) tak, že jsem do každého inzertu (Obr. 12) přidal právě 500 000 buněk ve 100 μ l média. Podle počtu testovaných inhibitorů (v mém případě 5, viz. Tab. 5) jsem připravil požadovaný počet zkumavek (5) a další dvě zkumavky pro negativní a pozitivní kontrolu. Do každé zkumavky jsem napipetoval 300 μ l suspenze, protože jsem pokus prováděl v triplicacích. Poté, co jsem přidal inhibitory o koncentraci 3 μ M do suspenze s buňkami, jsem nechal zkumavky inkubovat v CO₂ inkubátoru po dobu 1 hodiny při 37°C. Do 15ml centrifugační zkumavky jsem si připravil roztok RPMI 1640 + fMLP o koncentraci 1 μ M. Z destičky jsem opatrně vyndal inzerty. Do každé jamky kromě negativní kontroly (čisté RPMI) jsem napipetoval 600 μ l RPMI + fMLP. Po napipetování jsem inzerty opatrně vrátil zpět. Po preinkubaci buněk s inhibitory jsem do každého inzertu napipetoval 100 μ l buněk a opět nechal inkubovat na 1 hodinu při 37°C. Po inkubaci jsem opatrně poklepal destičku ze všech stran. Následně jsem odstranil inzerty a rozpipetoval roztok ve všech jamkách. Z každé jamky jsem odpipetoval 500 μ l suspenze a napipetoval ji do 1,5ml zkumavek, které jsem následně centrifugoval při 500g na 7 minut. Ze zcentrifugovaných zkumavek jsem pipetou odebral 400 μ l supernatantu a pelet rozsuspendoval ve zbylých 100 μ l. Buňky jsem spočítal v Bürkerově nebo Neubauerově komůrce.



Obr. 12: Transwell destička s inzerty.

Tab. 5: Použité klíčící inhibitory a jejich zařazení, molekulární hmotnost a specifická.

Název	Popis	Koncentrace (μM)	Specifická
IRS 1	serpin	52,08	plasmin, kalikrein, matriptáza, elastáza, trypsin
IRS 2	serpin	147	katepsin G, trombin, chymáza, α-chymotrypsin
S8K	serpin	58,3	proteináza 3, elastáza
20314	serpin	93,5	matriptáza, kalikrein, trypsin
44530	Kunitz inhibitor	70	kalikrein

3.2.7. Počítání buněk v komůrce

Pro počítání buněk, v mém případě neutrofilů, jsem používal Bürkerovu nebo Neubauerovu komůrku. Během jednoho experimentu jsem buňky počítal dvakrát – poprvé po Percollovém gradientu, abych zjistil počet vyizolovaných neutrofilů a podruhé na konci migrace neutrofilů, abych mohl vyhodnotit celý experiment. Prvním krokem byla příprava 0,5ml zkumavky, do které jsem napipetoval 90μl trypanové modři 0,5% a z centrifugační zkumavky obsahující suspenzi s buňkami, jsem pipetou odebral 10μl, napipetoval do trypanové modři a pomocí pipety promíchal. Z výsledné suspenze jsem pipetou odebral 10μl a aplikoval je na komůrku. Poté jsem pod světelným mikroskopem spočítal buňky, které se nacházely v rohových čtvercích komůrky, toto je vidět na obrázku (Obr. 13). Výsledný počet buněk jsem spočítal pomocí vzorce (1):

$$n = \frac{\text{počet buněk}}{4} * 10\,000 * a * b$$

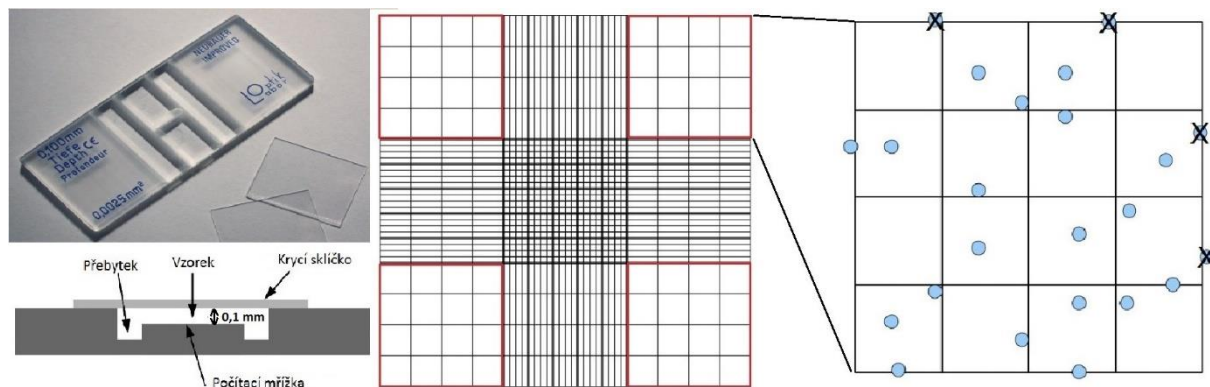
n...výsledný počet buněk

10 000....koeficient přepočtu na 1ml (1mm² * 0,1mm = 0,1mm³; 0,1mm³ * **10 000** = 1000mm³ => 1ml)

a...počet ředění

b...objem roztoku, ve kterém byly buňky rozpuštěny (ml)

Buňky byly naředěny 10krát, proto byl faktor a roven 10. Po migraci jsem buňky spočítal bez naředění v trypanové modři, faktor a byl roven 1.



Obr. 13: Neubauerova počítací komůrka. Na obrázku můžeme vidět Neubauerovu komůrku, počítací mřížku a buňky, které jsou v jednom ze čtyř počítaných rohových čtverců mřížky.

Zdroj: The Hemocytometer, 2016

3.2.8. Statistika, vyhodnocení

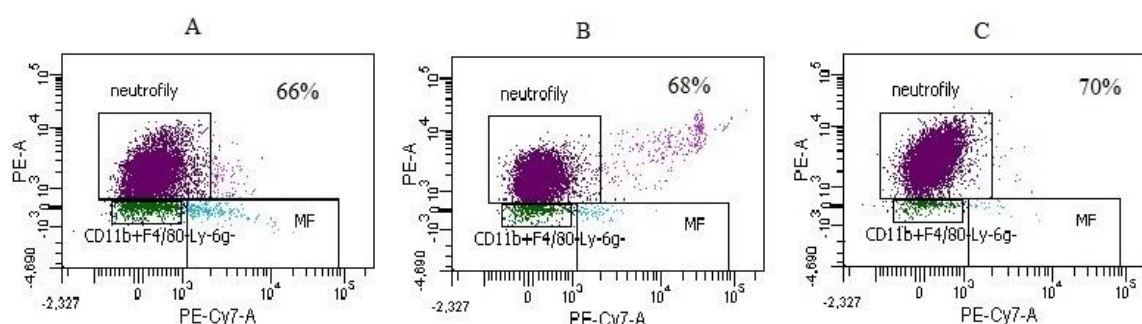
Data z migrace neutrofilů jsem získal spočítáním buněk v Neubauerově nebo Bürkerově komůrce a dosazením tohoto počtu do vzorce (1), jsem zjistil počet buněk v 1ml. V programu MS Excel jsem tyto hodnoty přepočítal na počet buněk na jamku, z které jsem následně zjistil procento z původního počtu neutrofilů. Z těchto hodnot jsem dále stanovil průměr, směrodatnou odchylku a standartní chybu průměru. Průkaznost hodnot jsem ověřil pomocí metody jednocestná ANOVA v programu GrapPhad Prism.

Data, potřebná ke zjištění optimální koncentrace Percollového gradientu pro izolaci neutrofilů, jsem získal analýzou fluorescenčně značeného vzorku v průtokovém cytometru prostřednictvím softwaru BD FASC Diva Software a dále spočítáním buněk v Neubauerově nebo Bürkerově komůrce. Z těchto hodnot jsem následně v programu MS Excel vypočítal počet neutrofilů. Hodnoty z počtu buněk a procento čistoty jsem zanesl do grafu.

4. Výsledky

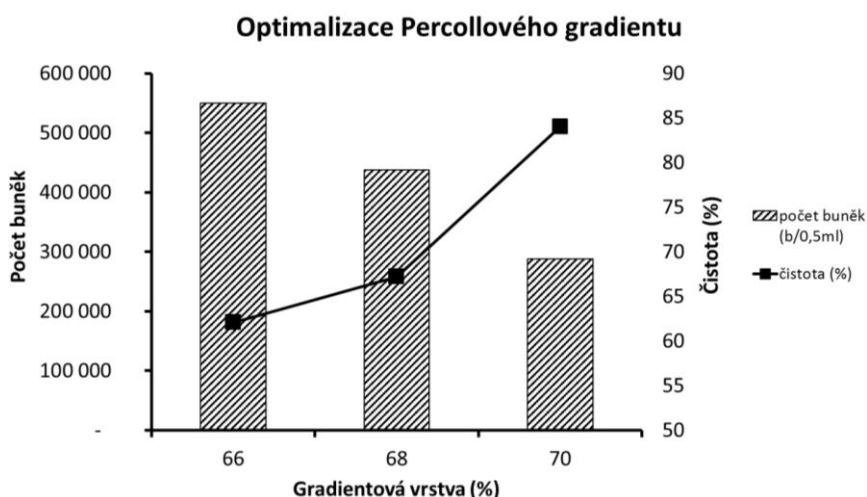
4.1. Optimalizace Percollového gradientu

Prvním krokem bylo zjištění optimální koncentrace gradientu pro izolaci neutrofilů z kostní dřeně, z níž bylo potřeba získat co nejvyšší počet buněk s co nejvyšší čistotou. Pro tento pokus jsem použil tři různé koncentrace střední vrstvy gradientu a to 66, 68, 70 %. Po získání dat z průtokového cytometru a jejich vyhodnocení bylo prokázáno, že optimální koncentrace střední vrstvy gradientu pro izolaci neutrofilů je 68 %. Proto v dalších experimentech jsem používal právě tuto koncentraci.



Obr. 14 A-C: Čistota neutrofilů při použití 66, 68 a 70% koncentrace střední vrstvy.

Na obrázcích (Obr. 14 A-C) můžeme vidět oddělené populace neutrofilů, makrofágů a ostatních myeloidních buněk. Také můžeme pozorovat, že se zvětšující se koncentrací Percollu, se zvyšuje podíl neutrofilů, zatímco procento ostatních buněk klesá.

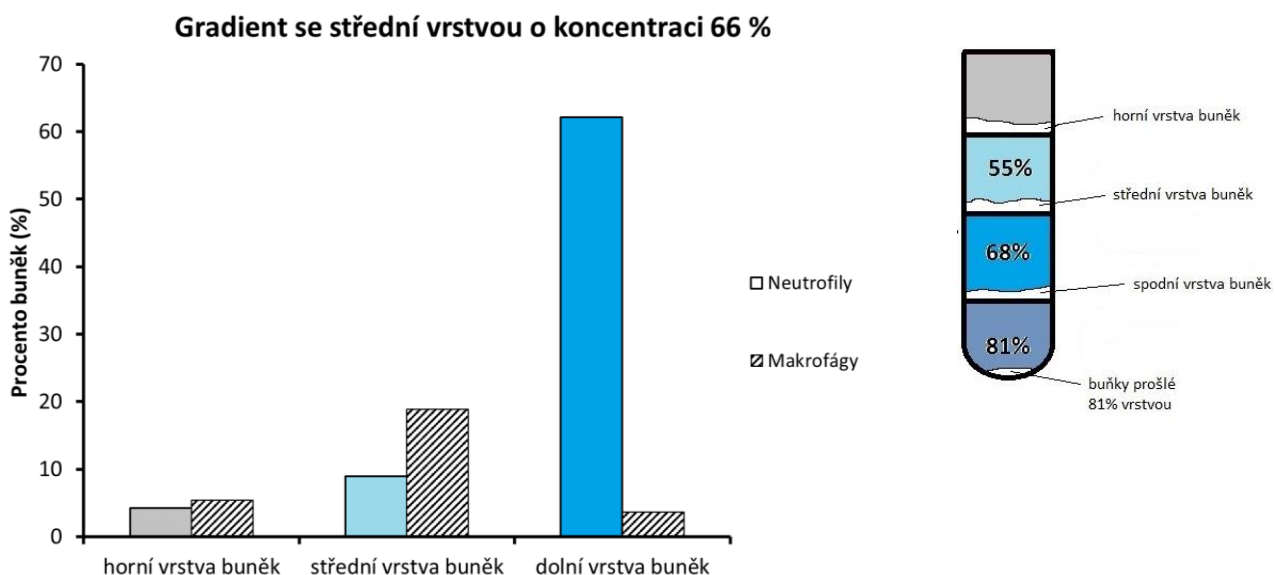


Obr. 15: Optimalizace Percollového gradientu. S rostoucím počtem buněk se snižuje čistota a se snižujícím se počtem se zase čistota zvyšuje.

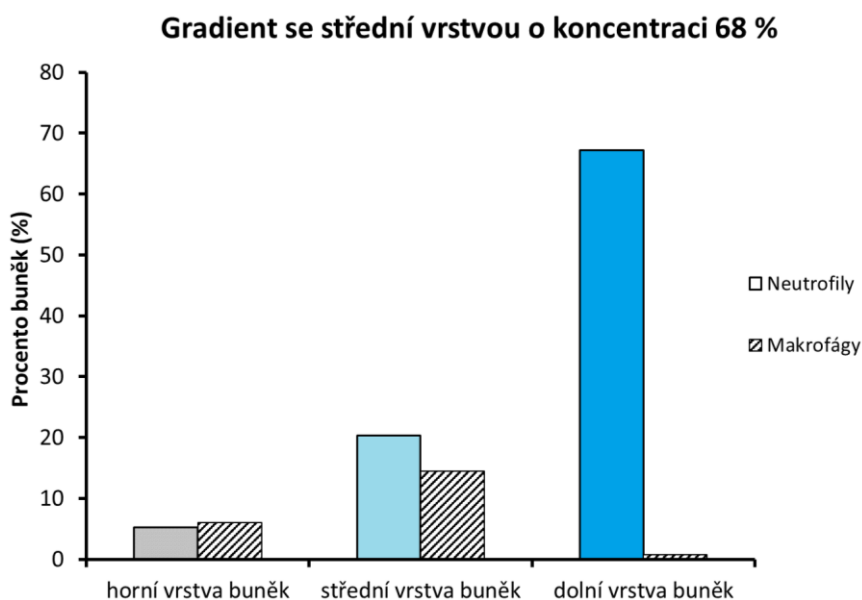
Z obrázku (Obr. 15) je zřejmé, že při použití 66% vrstvy získáme sice vysoký počet buněk, ale čistota neutrofilů je malá. U 70% vrstvy dostaneme nízký počet buněk s vysokou

čistotou, proto jako optimální koncentrace pro další izolace byla vybrána 68% vrstva, která je kompromisem obou parametrů.

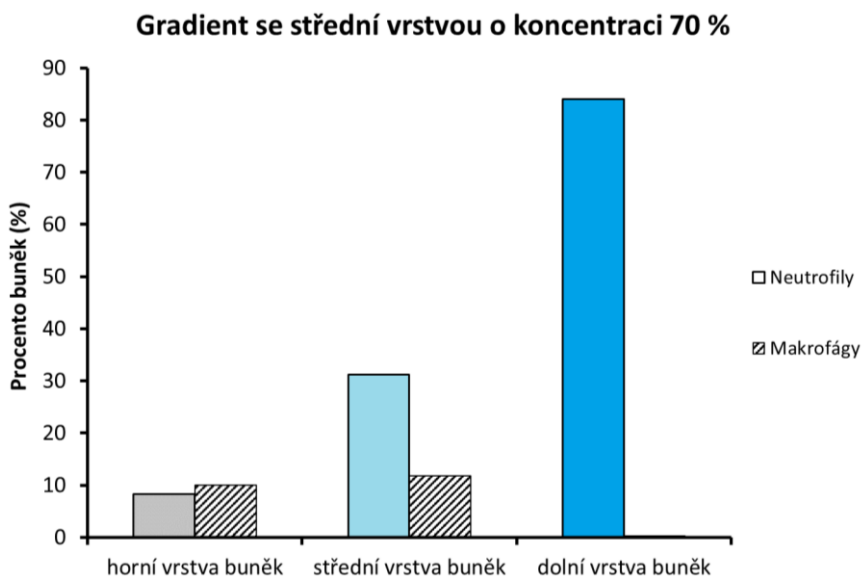
Při optimalizaci gradientu jsem spolu se spodní vrstvou buněk odebral také horní a střední vrstvu z důvodů určení procentuálního zastoupení dalších buněk, především makrofágů.



Obr. 16: Procentuální zastoupení buněk v různých vrstvách po Percollovém gradientu se střední vrstvou gradientu o koncentraci 66 %.



Obr. 17: Procentuální zastoupení buněk v různých vrstvách po Percollovém gradientu se střední vrstvou gradientu o koncentraci 68 %.

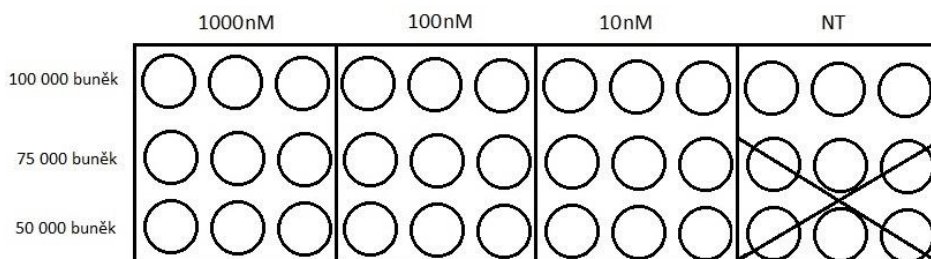


Obr. 18: Procentuální zastoupení buněk v různých vrstvách po Percollovém gradientu se střední vrstvou gradientu o koncentraci 70 %.

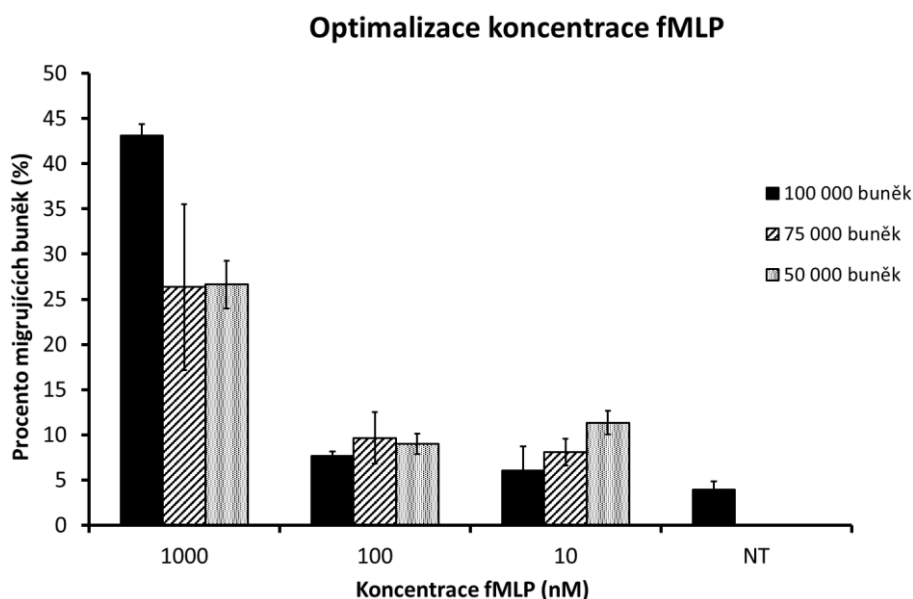
Z obrázků (Obr. 16-18), můžeme vyčíst, že s rostoucí koncentrací Percollu stoupá procento neutrofilů. Makrofágy jsou nejvíce zastoupeny ve střední vrstvě buněk, zatímco v dolní vrstvě buněk je jejich počet minimální.

4.2. Optimalizace migrace neutrofilů

Pro migraci neutrofilů bylo důležité nejprve zjistit koncentraci fMLP (který slouží jako aktivátor a chemoatraktant neutrofilů), při níž se aktivuje největší počet (nebo procento) buněk. Pro náš experiment byly zvoleny tři koncentrace fMLP – 1000nM, 100nM a 10nM. Experiment byl proveden v triplikacích v Corning 96 Transwell™ destičce a byly zde použity tři rozdílné počty buněk na jamku 100 000, 75 000 a 50 000 (viz. Obr. 19).



Obr. 19: Aplikace různých koncentrací fMLP a různého počtu buněk do 96 jamkové destičky.

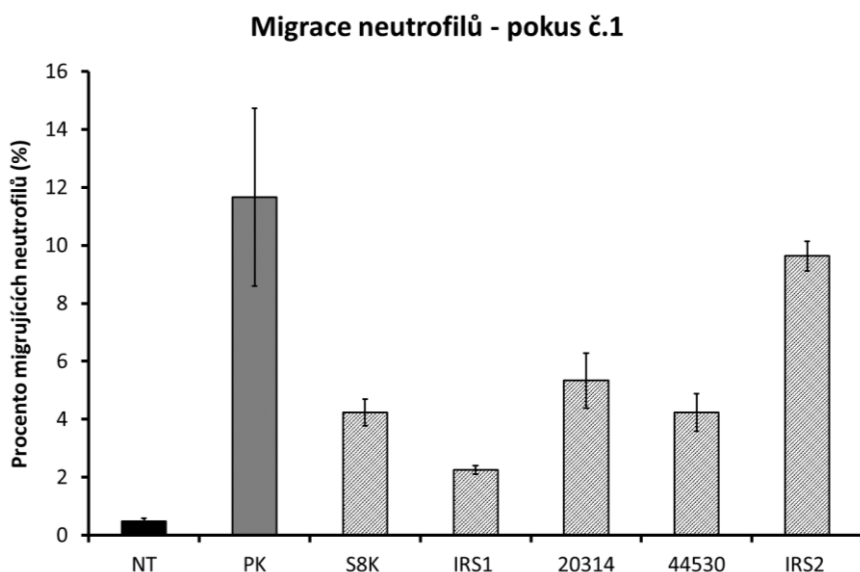


Obr. 20: Optimalizace koncentrace fMLP. Hodnoty použité v grafu jsou aritmetickým průměrem procenta migrujících buněk. V grafu je také zaznamenána standartní chyba průměru. NT- negativní kontrola.

Z tohoto grafu (Obr. 20) lze vyčíst, že největší počet (nebo procento) migrujících buněk je při koncentraci 1000nM fMLP a při počtu 100 000 buněk na jamku.

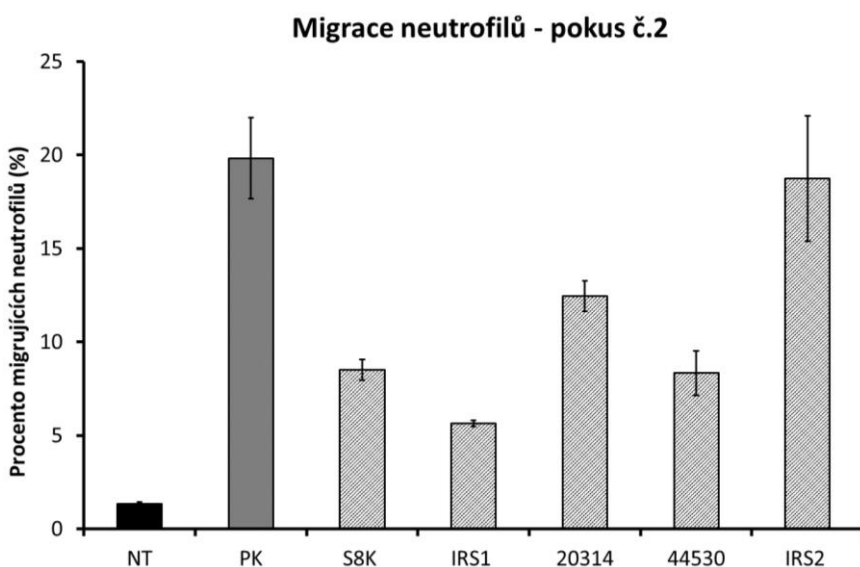
4.3. Migrace neutrofilů a vliv klíštěcích inhibitorů na migraci

Dále jsem testoval některé klíštěcí proteázové inhibitory, které se nacházejí ve slinách druhu *Ixodes ricinus*, a jejich vliv na migraci neutrofilů *in vitro*. Pro tento pokus bylo testováno 5 inhibitorů, které se řadí do skupiny inhibitorů serinových proteáz - 4 serpiny a 1 Kunitz inhibitor. Tyto proteázové inhibitory byly připraveny Mgr. Janem Kotálem a Dr. Michaiem Kotsyfakisem a dále byly zbaveny LPS firmou ARVYS PROTEINS. Každý experiment byl proveden ve třech opakováních a z těchto opakování byl vyhotoven výsledný graf.



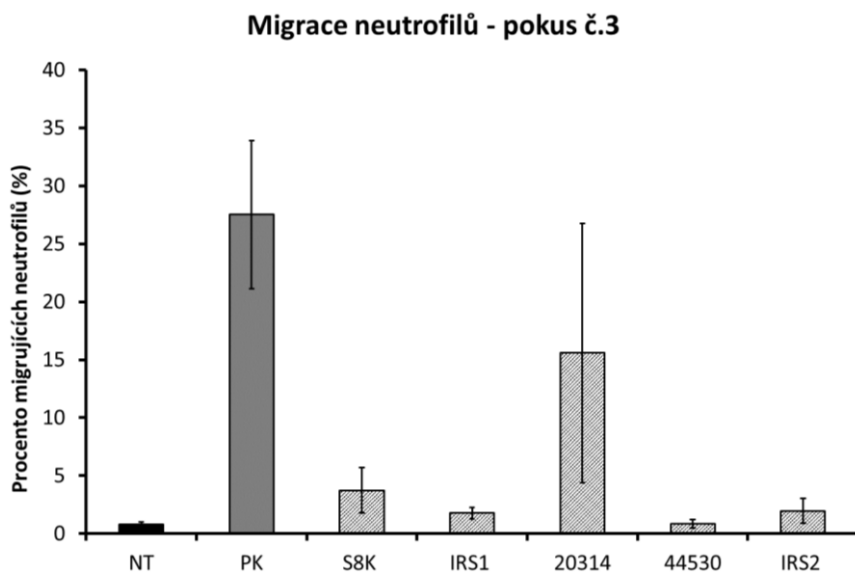
Obr. 21: Migrace neutrofilů. Byl změřen počet migrujících neutrofilů aktivovaných $1\mu\text{M}$ fMLP přes $5\mu\text{m}$ póry destičky. Buňky byly pre-inkubovány a inkubovány 1h. Koncentrace inhibitorů byla $3\mu\text{M}$. V grafu (Obr. 21) jsou zaznamenány hodnoty, které jsou aritmetickým průměrem procenta neutrofilů z původního množství. V grafu je také zaznamenána standardní chyba průměru. NT-negativní kontrola, PK-pozitivní kontrola.

V tomto grafu (Obr. 21) můžeme vidět, že největší inhibiční účinek na migraci neutrofilů má serpin IRS1, zatím co nejnižší představuje IRS2.



Obr. 22: Migrace neutrofilů. Byl změřen počet migrujících neutrofilů aktivovaných $1\mu\text{M}$ fMLP přes $5\mu\text{m}$ póry destičky. Buňky byly pre-inkubovány a inkubovány 1h. Koncentrace inhibitorů byla $3\mu\text{M}$. V grafu jsou zaznamenány hodnoty, které jsou aritmetickým průměrem procenta neutrofilů z původního množství. V grafu je také zaznamenána standardní chyba průměru. NT-negativní kontrola, PK-pozitivní kontrola.

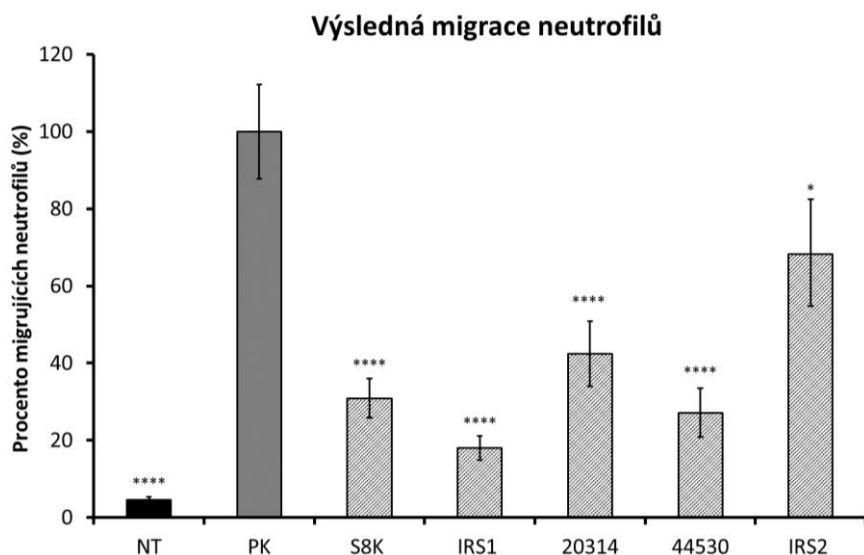
Z grafu (Obr. 22) je zřejmé, že největší inhibiční účinek na migraci neutrofilů má serpin IRS1, zatím co nejnižší představuje IRS2.



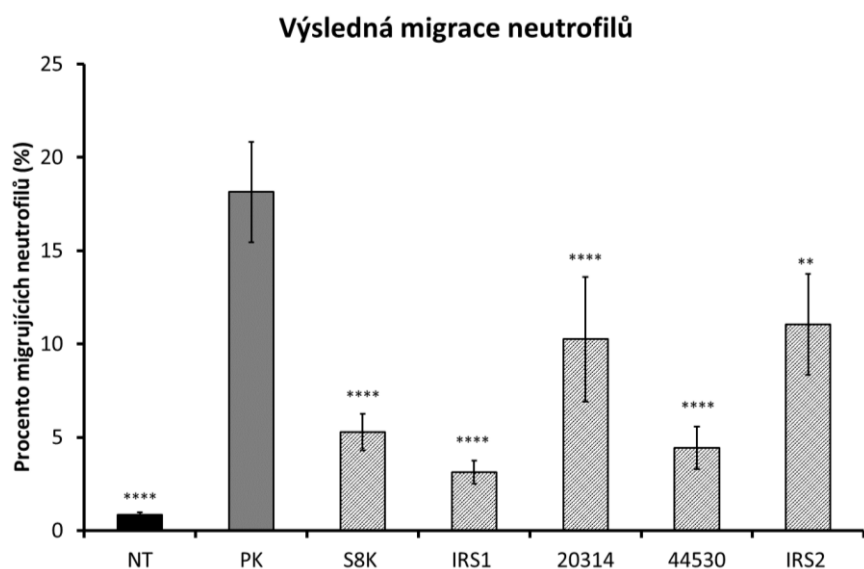
Obr. 23: Migrace neutrofilů. Byl změřen počet migrujících neutrofilů aktivovaných 1 μ M fMLP přes 5 μ m póry destičky. Buňky byly pre-inkubovány a inkubovány 1h. Koncentrace inhibitorů byla 3 μ M. V grafu jsou zaznamenány hodnoty, které jsou aritmetickým průměrem procenta neutrofilů z původního množství. V grafu je také zaznamenána standartní chyba průměru. NT-negativní kontrola, PK-pozitivní kontrola.

V tomto grafu (Obr. 23) můžeme vidět, že největší inhibiční účinek na migraci neutrofilů má serpin 44530, zatím co nejnižší představuje 20314.

Pro porovnání dvou rozdílných způsobů zpracování konečných výsledků byly vyhotoveny dva grafy. U jednoho byly hodnoty ze všech tří pokusů transformovány tak, že PK představovala 100 % a z těchto hodnot byl vytvořen aritmetický průměr (obr. 24 A). V druhém způsobu byly hodnoty ve všech třech pokusech přepočítány na procento z původního množství neutrofilů a následně se z těchto hodnot vytvořil aritmetický průměr (obr. 24 B).



Obr. 24 A: Výsledná migrace neutrofilů.



Obr. 24 B: Výsledná migrace neutrofilů. Na obrázku (24 A a B) byl změřen počet migrujících neutrofilů aktivovaných 1 μ M fMLP přes 5 μ m póry destičky. Buňky byly pre-inkubovány s inhibitory a následně inkubovány s fMLP po dobu 1h. Koncentrace inhibitorů byla 3 μ M. NT-negativní kontrola, PK-pozitivní kontrola. Hodnoty, které byly použity na vyhotovení grafu (Obr. 24 A), představují aritmetický průměr ze všech třech pokusů a byly přepočítány tak, aby PK představovala právě 100%. Hodnoty, které byly použity na vyhotovení grafu (Obr. 24 B), jsou aritmetickým průměrem ze tří pokusů, v každém pokusu se vypočítal aritmetický průměr procenta neutrofilů z původního množství neutrofilů. V grafech je také zaznamenána standardní chyba průměru. Statistická průkaznost byla prokázána pomocí metody jednocestná ANOVA, kde všechny skupiny byly porovnávány se skupinou PK pomocí Tukeyho post-hoc testu (****= $p < 0,0001$; **= $p < 0,01$; *= $p < 0,05$).

Z obou výsledných grafů můžeme zjistit, že nejaktivnější inhibiční účinek na migraci neutrofilů má IRS1 a nejmenší IRS2 jak tomu bylo i u prvního výsledného grafu.

5. Diskuze

Transmigrace a migrace neutrofilů jsou jedny z posledních kroků procesu rekrutace neutrofilů do místa poranění nebo infekce, kde nejvíce přispívají ke vzniku a rozvoji zánětlivé odpovědi. Zánět hraje důležitou roli v obraně proti cizím patogenům a dále aktivuje další větve imunitního systému, prostřednictvím cytokinů produkovaných buňkami, a proto zaujímá důležité postavení v imunitní obraně hostitele. Existuje několik metod, jak migraci leukocytů analyzovat (viz 1.6. Metody studia migrace buněk). Cílem mé práce bylo zavést a optimalizovat jednu z těchto metod, konkrétně *in vitro* statickou migraci neutrofilů pomocí Transwell destiček. Optimalizovaný postup této metody byl následně použit k otestování vlivu několika klíčících inhibitorů na migraci neutrofilů.

Prvním krokem bylo najít optimální metodu pro izolaci neutrofilů. Byla vybrána metoda, při níž byly neutrofilily vyizolovány z kostní dřeně *femuru* a *tibie* a purifikovány pomocí Percollového gradientu, kde dalším dílčím úkolem bylo zajistit optimální koncentraci vrstev gradientu pro izolaci neutrofilů, která byla finálně stanovena na 55, 68, 81 %. Při této koncentraci byla u pokusů naměřena čistota ± 67 %, která byla uznána jako dostačující vzhledem k počtu buněk potřebných ke zjištění migrace. V těchto optimalizačních pokusech byly použity rozdílné koncentrace střední vrstvy gradientu (66-70%), kdy 66% střední vrstva vykazovala příliš nízkou čistotu ale vysoký počet buněk, zatímco 70% vrstva vykazovala vysokou čistotu ale malý počet buněk, který nebyl dostatečný pro následující migrační pokusy. A proto byla vybrána taková koncentrace (68%), která měla dostatečnou čistotu a počet buněk. V obdobném protokolu z práce jiných autorů je použita koncentrace vrstev 55, 65, 75 %, a čistota vyizolovaných neutrofilů je vyšší než 90 % (Kim et al., 2006). V porovnání s touto prací, není čistota neutrofilů, dosažená v mé práci ideální. Podle jiné práce může být hlavní chybou nízké čistoty rozsuspendování vyizolovaných buněk kostní dřeně ve větším objemu PBS (3ml), protože v tomto protokolu je zaznamenána čistota buněk větší než 90 % pokud jsou buňky rozsuspendovány v 1ml PBS, zatímco když jsou rozsuspendovány v 3ml PBS tak se čistota buněk snižuje na 80 % (Swamydas et al., 2013). Další z možností, jak zlepšit čistotu vyizolovaných neutrofilů se jeví metoda hustotní gradientové centrifugace za použití dvou hustotně odlišných vrstev Histopaque 1077 a 1119. Touto metodou byla dosažena čistota neutrofilů větší než 90 % (Swamydas et al., 2001). Při této metodě je důležité, aby Histopaque 1077 tak i 1119 měly teplotu 18-26°C a byly centrifugovány při 25°C, kdežto purifikace pomocí Percollu probíhá při 4°C. Zatím nejúčinnější, ovšem také nejdražší, metodou pro

izolaci neutrofilů se zdá být imunomagnetická separace (Cotter et al., 2001), díky níž čistota dosahuje téměř 100 % a počet neutrofilů se pohybuje okolo 4-5 milionů z jedné myši. A proto po uvážení bude tato metoda použita i v budoucích pokusech.

Dále jsem se soustředil na zjišťování koncentrace fMLP, která by byla optimální ke stimulaci (aktivaci) neutrofilů pro *in vitro* migraci. Tato hodnota byla stanovena podle výsledků na 1 μ M, kdy vykazovala největší procento aktivovaných buněk (viz Obr. 20). Shodná koncentrace fMLP, tedy 1 μ M, byla použita jinými autory (Yuen et al., 2016), ale není to jediná používaná koncentrace, v jiné studii byla použita 0,1 μ M koncentrace fMLP (Lindemann et al., 2015). Dvě uvedené koncentrace fMLP byly porovnávány v rámci jedné studie, která ukázala, že neutrofilů, izolované z dospělého člověka jsou nejlépe aktivovány koncentrací 1 μ M, zatímco u novorozenců je vhodnější koncentrace 0,1 μ M fMLP (Stålhammar et al., 2017). Kromě fMLP jsem testoval i jiné chemoatraktanty, konkrétně chemokiny IL-8 a MIP-2 α , u kterých jsem testoval různé koncentrace, ale bohužel testování těchto chemoatraktantů nepřineslo potřebné výsledky, neboť hodnoty vzorků s IL-8 a MIP-2 byly téměř shodné s negativními kontrolami, a proto je v této práci neuvádím. Stålhammar et al. (2017) v již dříve zmíněné studii uvádí kromě fMLP také koncentraci a míru aktivace neutrofilů chemokinem IL-8, které ukazují, že nejoptimálnější koncentrace v obou případech je 1 μ M. S touto koncentrací také pracujeme v dalších částech této práce. Spolu s koncentrací fMLP byl zjišťován též nejvhodnější počet buněk pro pokusy v 96-ti jamkových Transwell destičkách. Testovány byly tři různé počty (100, 75, 50 tisíc) buněk a procento migrujících buněk se zvyšovalo se zvyšujícím se počtem počátečních neutrofilů. Pro 24-jamkové panely nebylo optimální množství neutrofilů zjišťováno. Dále byly zjišťovány dvě délky inkubace (1 a 2h), při kterých byly neutrofilů vystaveny účinku 1 μ M fMLP. Ve výsledcích nebyl patrný žádný rozdíl mezi těmito časy, a proto byl inkubační čas stanoven na 1 hodinu, což se shoduje s jiným migračním protokolem (Glogauer et al., 2003).

Na počátku optimalizačních pokusů bylo používáno kompletní kultivační médium (RPMI 1640 + 1% ATB +10% Fetální Bovinní Sérum). Obsažené sérum však bylo zdrojem narušení aktivace neutrofilů, a proto bylo nahrazeno 0,5% BSA. Sérum obsahuje řadu proteinových složek (plazmatické bílkoviny, růstové faktory a další), které mohou interferovat s neutrofilů a narušit jejich aktivaci. Například α 1-antitrypsin má inhibiční účinky zvláště na neutrofilovou elastázu, což může mít za následek snížení aktivace.

Při používání 96 jamkových Transwell destiček jsem se během migračních pokusů potýkal s problémem, kdy všechny migrační pokusy vycházely negativně. Poté, co tyto destičky byly nahrazeny za 24 jamkové, experimenty začaly vycházet. Jediný rozdíl mezi těmito destičkami spočívá ve velikosti jamky, a tedy i počtem aplikovaných buněk. Ovšem nepodařilo se mi zjistit, v čem tkvěl problém při používání 96 jamkových Transwell destiček.

Dalším krokem mé práce bylo otestovat vliv proteázových inhibitorů ze slin klíštěte na migraci neutrofilů. Testovány byly serpiny IRS-1 (*Ixodes ricinus* serpin), IRS-2, IRS-3 (20314), IRS-5 (S8K) a Kunitz inhibitor označený číslem 44530 (viz. Tab. 5). Nejvýznamnější inhibiční vliv na migraci neutrofilů byl pozorován u IRS-1, zatímco IRS-2 vykazoval nejmenší vliv. Toto zjištění je v souladu s nepublikovanými výsledky Mgr. Adély Chlastákové, která popisuje vliv IRS-1 na rekrutaci zánětlivých buněk v *in vivo* modelu peritonitidy. IRS-1 vykazoval v tomto modelu inhibiční účinek na rekrutaci neutrofilů a monocytů. Na druhou stranu vliv toho inhibitoru na eosinofily je opačný, má tedy aktivační účinek a jejich procento se v přítomnosti tohoto inhibitoru zvýšilo trojnásobně vzhledem k negativní kontrole. Podobně se shoduje i malý vliv IRS-2 na migraci. Serpiny byly popsány jako inhibitory migrace neutrofilů do místa zánětu i v jiných pracích. Práce jiných autorů, ve které byl použit α 1-antitrypsin na experiment pro migraci neutrofilů, uvádí, že počet migrujících neutrofilů je značně nižší v porovnání s pozitivní kontrolou (Mulgrew et al., 2004). α 1-antitrypsin je glykosylovaný protein primárně syntetizovaný v játrech a sekretovaný do plazmy. Jedná se o inhibitor široké škály proteáz, zvláště neutrofilové elastázy. Při procesu rekrutace neutrofilů do místa zánětu uvolňují aktivované neutrofilové elastázu, která je inhibovaná α 1-antitrypsinem, a proto elastáza dále nemůže stimulovat makrofágy k produkci chemoatraktantů, které by následně stimulovaly migraci dalších neutrofilů do místa zánětu (Stockley, 1999). Celkově můžu konstatovat, že získané výsledky z optimalizačních a migračních experimentů se shodují s použitou literaturou.

6. Závěr

V této práci se podařilo optimalizovat metodu statické migrace neutrofilů. Tato metoda zahrnovala izolaci neutrofilů, konkrétně optimalizaci koncentrace jednotlivých vrstev Percollového gradientu, a také zjišťování optimální koncentrace fMLP pro stimulaci migrace neutrofilů. Tato koncentrace byla stanovena na $1\mu\text{M}$.

Takto optimalizovaná metoda byla použita k otestování vlivu pěti klíčících proteázových inhibitorů ze slin *Ixodes ricinus* na migraci neutrofilů. Čtyři testované proteiny patřily do proteinové rodiny serpinů a jeden protein byl Kunitz inhibitor. U serpinu IRS-1 byla zaznamenána největší inhibiční aktivita.

7. Seznam zkratek

PMN – polymorfonukleární leukocyty

ROS – reactive oxygen species

NET – neutrophil extravascular traps

NE – neutrofilní elastáza

MPO – myeloperoxidáza

IL – interleukin

TNF – tumor necrosis factor

LPS – lipopolysacharid

TLR – Toll-like receptory

INF – interferon

TGF – transformující růstový faktor

PDGF – destičkový růstový faktor

ECM – extracelulární matrix

DCs – dendritické buňky

PSG1 – P selektin glykoprotein 1

MCP-1 – monocytární chemotaktický protein 1

MIP – makrofágový zánětlivý protein

NAP-3 – neutrofil aktivující protein 3

fMLP – N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine

ICAM – intracelulární adhezivní molekuly

VLA 4 – very late antigen 4

VCAM – vaskulární buněčné adhezivní molekuly

Mac-1 - makrofág receptor 1

LFA-1 - lymphocyte function-associated antigen 1

PECAM – platelet/endothelial cell adhesion molecul

JAM – junctional adhesion molecule

SCR – short consensus repeat

HEV – cévy s vysokým endotelem

GlyCAM-1 - glycosylation-dependent cell adhesion molecule

MAdCAM-1 - mucosal addressin cell adhesion molecule

BLC – B-lymphocyte chemoattractant

DARC – Duffy antigen receptor pro chemokiny

COPD – chronické obstrukční plicní onemocnění

RLC – reaktivní centrální smyčka

LMAT – leukocyte migration agarose technique

PBS – Phosphate Buffered Saline

RBCLB – Red Blood Cell Lysis Buffer

BSA – Bovine Serum Albumin

FACS – Fluorescent Activated Cell Sorting

IRS – *Ixodes ricinus* serpin

IVC – individually ventilated cages

PE – phycoerythrin

PE-Cy7 – phycoerythrin-Cyanin 7

FITC – fluoresceinisothiocyanate

FSC-A/H – forward scatter area/height

SSC-A – side scatter area

8. Literatura

ABBAS, Abul K. a Andrew H. LICHTMAN. *Basic immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2009. ISBN 9781416046882.

ALKHATIB, Ghalib. The Biology of CCR5 and CXCR4. *Current Opinion in HIV and AIDS* [online]. 2009, **4**(2), 96-103pp [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.1097/COH.0b013e328324bbec. ISSN 1746630x. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=01222929-200903000-00005>

AUFFRAY, Cedric, Michael H. SIEWEKE a Frederic GEISSMANN. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* [online]. 2009, **27**(1), 669-692pp [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557. ISSN 07320582. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>

BABIOR, Bernard M. NADPH Oxidase: An Update. *Blood* [online]. 1999, **93**(5), 1464-76pp [cit. 2017-02-22]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/93/5/1464.long?sso-checked=true>

BARRETT, Alan J. a Neil D. RAWLINGS. Evolutionary Lines of Cysteine Peptidases. *Biological Chemistry* [online]. 2001, **382**(5), 727-733pp [cit. 2017-03-21]. DOI: 10.1515/BC.2001.088. ISSN 14316730. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2001.382.issue-5/bc.2001.088/bc.2001.088.xml>

BERTOLOTTO, Maria, Paola CONTINI, Luciano OTTONELLO, Aldo PENDE, Franco DALLEGRI a Fabrizio MONTECUCCO. Neutrophil Migration Towards C5a and CXCL8 is Prevented by Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs via inhibition of different pathways. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2014, **171**(14), 3376-3393pp [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1111/bph.12670. ISSN 00071188. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/bph.12670>

BLANCO, Patrick, Karolina A. PALUCKA, Virginia PASCUAL a Jacques BANCHEREAU. Dendritic Cells and Cytokines in Human Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews* [online]. 2008, **19**(1), 41-52pp [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2007.10.004. ISSN 13596101. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610107001049>

BORREGAARD, Niels a Jack B. COWLAND. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood* [online]. 1997, **89**(10), 3503-3521pp [cit. 2017-02-22]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/89/10/3503.long>

BORRONI, Elena Monica a Raffaella BONECCHI. Shaping the Gradient by Nonchemotactic Chemokine Receptors. *Cell Adhesion & Migration* [online]. 2014, **3**(2),

146-147pp [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.4161/cam.3.2.8280. ISSN 19336918. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cam.3.2.8280>

BRINKMANN, Volker. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* [online]. 2004, **303**(5663), 1532-1535pp [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1126/science.1092385. ISSN 00368075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1092385>

BRINKMANN, Volker a Arturo ZYCHLINSKY. Neutrophil Extracellular Traps: Is Immunity the Second Function of Chromatin? *The Journal of Cell Biology* [online]. 2012, **198**(5), 773-783pp [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1083/jcb.201203170. ISSN 00219525. Dostupné z: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201203170>

BUTTERFIELD, Timothy A., Thomas M. BEST a Mark A. MERRICK. The Dual Roles of Neutrophils and Macrophages in Inflammation: A Critical Balance Between Tissue Damage and Repair. *Journal of Athletic Training* [online]. Dallas, 2006, **41**(4), 457-465pp [cit. 2017-02-22]. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/206655199?pq-origsite=gscholar>

CARMAN, Christopher V. Mechanisms for Transcellular Diapedesis: Probing and Pathfinding by 'Invadosome-like Protrusions'. *Journal of Cell Science* [online]. 2009, **122**(17), 3025-3035pp [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1242/jcs.047522. ISSN 00219533. Dostupné z: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.047522>

CARMAN, Christopher V. a Timothy A. SPRINGER. A Transmigratory Cup in Leukocyte Diapedesis Both Through Individual Vascular Endothelial Cells and Between Them. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2004, **167**(2), 377-388pp [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1083/jcb.200404129. ISSN 00219525. Dostupné z: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200404129>

COTRAN, Ramzi S., Vinay KUMAR, Tucker. COLLINS a Stanley L. ROBBINS. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6th ed. Philadelphia: Saunders, 1999. ISBN 072167335X.

COTTER, Matthew J., Keith E. NORMAN, Paul G. HELLEWELL a Victoria C. RIDGER. A Novel Method for Isolation of Neutrophils from Murine Blood Using Negative Immunomagnetic Separation. *The American Journal of Pathology* [online]. 2001, **159**(2), 473-481pp [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)61719-1. ISSN 00029440. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010617191>

CROCKETT-TORABI, Elahe a Peter A. WARD. The Role of Leukocytes in Tissue Injury. *European Journal of Anaesthesiology* [online]. 1996, **13**(3), 235-246pp [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1046/j.1365-2346.1996.00982.x. ISSN 02650215. Dostupné z: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046%2Fj.1365-2346.1996.00982.x>

CROS, Jérôme, Nicolas CAGNARD, Kevin WOOLLARD, Natacha PATEY, Shen-Ying ZHANG, Brigitte SENECHAL, Anne PUEL, Subhra K. BISWAS, Despina MOSHOUS, Capucine PICARD, Jean-Philippe JAIS, David D'CRUZ, Jean-Laurent CASANOVA, Céline TROUILLET, and Frédéric GEISSMANN. Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* [online]. 2010, **33**(3),

375-386pp [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.08.012. ISSN 10747613.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761310003171>

DIACOVO, Thomas G., Antonin R. DE FOUGEROLLES, Dorothy F. BAINTON a Timothy A. SPRINGER. A Functional Integrin Ligand on the Surface of Platelets: Intercellular Adhesion Molecule-2. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1994, **94**(3), 1243-1251pp [cit. 2017-03-04]. DOI: 10.1172/JCI117442. ISSN 00219738. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/117442>

DIAMOND, Michael S., Donald E. STAUNTON, Steven D. MARLIN a Timothy A. SPRINGER. Binding of the Integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the Third Immunoglobulin-like Domain of ICAM-1 (CD54) and Its Regulation by Glycosylation. *Cell* [online]. 1991, **65**(6), 961-971pp [cit. 2017-03-04]. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90548-D. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009286749190548D>

DIMASI, David, Wai Y. SUN a Claudine S. BONDER. Neutrophil Interactions with the Vascular Endothelium. *International Immunopharmacology* [online]. 2013, **17**(4), 1167-1175pp [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/j.intimp.2013.05.034. ISSN 15675769. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576913002804>

DUSTIN, Michael L. a Timothy A. SPRINGER. Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 (LFA-1) Interaction with Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) is One of at Least Three Mechanisms for Lymphocyte Adhesion to Cultured Endothelial Cells. *The Journal of Cell Biology* [online]. 1988, **107**(1), 321-331pp [cit. 2017-03-01]. Dostupné z: <http://jcb.rupress.org/content/107/1/321>

EPSTEIN, Franklin H. a Andrew D. LUSTER. Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *New England Journal of Medicine* [online]. 1998, **338**(7), 436-445pp [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1056/NEJM199802123380706. ISSN 00284793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199802123380706>

EYLES, Jo L., Andrew W. ROBERTS, Donald METCALF a Ian P. WICKS. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Neutrophils—Forgotten Mediators of Inflammatory Disease. *Nature Clinical Practice Rheumatology* [online]. 2006, **2**(9), 500-510pp [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1038/ncprheum0291. ISSN 17458382. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/ncprheum0291>

FERRERO-MILIANI, Laura, Ole. H. NIELSEN, Paal S. ANDERSEN a Stephen E. GIRARDIN. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in Interleukin-1B Generation. *Clinical and Experimental Immunology* [online]. 2006, **147**(2), 227–235pp [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2006.03261.x. ISSN 00099104. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2006.03261.x>

FUJIWARA, Nagatoshi a Kazuo KOBAYASHI. Macrophages in Inflammation. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy* [online]. 2005, **4**(3), 281-286pp [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.2174/1568010054022024. ISSN 1568010x. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-010X&volume=4&issue=3&page=281>

FURIE, Martha B. Recruitment of Leukocytes: Adhesion Molecules and Chemoattractants. *Pathobiology of Human Disease* [online]. Elsevier, 2014, 275-288pp [cit. 2017-02-20]. DOI: 10.1016/B978-0-12-386456-7.01806-2. ISBN 9780123864574. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864567018062>

GEISSMANN, Frederic, Steffen JUNG a Dan R. LITTMAN. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* [online]. 2003, **19**(1), 71-82pp [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.1016/S1074-7613(03)00174-2. ISSN 10747613. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761303001742>

GLOGAUER, Michael, Christophe C. MARCHAL, Fei ZHU, Aelaf WORKU, Björn E. CLAUSEN, Irmgard FOERSTER, Peter MARKS, Gregory P. DOWNEY, Mary DINAUER and David J. KWIATKOWSKI. Rac1 Deletion in Mouse Neutrophils Has Selective Effects on Neutrophil Functions. *The Journal of Immunology* [online]. 2003, **170**(11), 5652-5657pp [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.4049/jimmunol.170.11.5652. ISSN 00221767. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.170.11.5652>

HANSSON, Göran K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine* [online]. 2005, **352**(16), 1685-1695pp [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1056/NEJMra043430. ISSN 00284793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra043430>

HYNES, Richard O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* [online]. 2002, **110**(6), 673-687pp [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00971-6. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867402009716>

HYNES, Richard O. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* [online]. 1992, **69**(1), 11-25pp [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90115-S. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009286749290115S>

HYUN, Young-Min, Ronen SUMAGIN, Pranita P. SARANGI, Elena LOMAKINA, Michael G. OVERSTREET, Christina M. BAKER, Deborah J. FOWELL, Richard E. WAUGH, Ingrid H. SARELIUS, Minsoo KIM. Uropod Elongation is a Common Final Step in Leukocyte Extravasation Through Inflamed Vessels. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2012, **209**(7), 1349-1362pp [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1084/jem.20111426. ISSN 00221007. Dostupné z: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20111426>

CHARO, Israel F. a Richard M. RANSOHOFF. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *New England Journal of Medicine* [online]. 2006, **354**(6), 610-621pp [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1056/NEJMra052723. ISSN 00284793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra052723>

JOHNSTON, Brent a Eugene C. BUTCHER. Chemokines in Rapid Leukocyte Adhesion Triggering and Migration. *Seminars in Immunology* [online]. 2002, **14**(2), 83-92pp [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1006/smim.2001.0345. ISSN 10445323. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044532301903458>

KANSAS, Geoffrey S. Selectins and Their Ligands: Current Concepts and Controversies. *Blood* [online]. 1996, **88**(9), 3259-3287pp [cit. 2017-03-01]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/88/9/3259.long?sso-checked=true>

KELNER, Gregory S., Jacqueline KENNEDY, Kevin B. BACON, Sarah KLEYENSTEUBER, David A. LARGAESPADA, Nancy A. JENKINS, Neal G COPELAND, J. Fernando BAZAN, Kevin W. MOORE, Thomas J SCHALL a Albert ZLOTNIK. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* [online]. 1994, **266**(5189), 1395-1399 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1126/science.7973732. ISSN 00368075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.7973732>

KIM, Nancy D., Richard C. CHOU, Edward SEUNG, Andrew M. TAGER a Andrew D. LUSTER. A Unique Requirement for the Leukotriene B 4 Receptor BLT1 for Neutrophil Recruitment in Inflammatory Arthritis. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2006, **203**(4), 829-835pp [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1084/jem.20052349. ISSN 00221007. Dostupné z: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20052349>

KIRSTEN, Anne Marie, Karin FÖRSTER, Eva RADECZKY, Anneliese LINNHOFF, Beatrix BALINT, Henrik WATZ, Heather WRAY, Lynette SALKELD, Marie CULLBERG a Bengt LARSSON. The Safety and Tolerability of Oral AZD5069, a Selective CXCR2 antagonist, in Patients with Moderate-to-severe COPD. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2015, **31**(1), 36-41pp [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1016/j.pupt.2015.02.001. ISSN 10945539. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1094553915000206>

KOLACZKOWSKA, Elzbieta a Paul KUBES. Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2013, **13**(3), 159-175pp.

KRAMER, Nina, Angelika WALZL, Christine UNGER, Margit ROSNER, Georg KRUPITZA, Markus HENGSTSCHLÄGER a Helmut DOLZNIG. In Vitro Cell Migration and Invasion Assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. 2013, **752**(1), 10-24pp [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1016/j.mrrev.2012.08.001. ISSN 13835742. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574212000464>

KRISHNASWAMY, Guha, Jim KELLEY, Lakshminarayan YERRA, J. Kelly SMITH a David S. CHI. Human Endothelium as a Source of Multifunctional Cytokines: Molecular Regulation and Possible Role in Human Disease. *Journal of Interferon & Cytokine Research* [online]. 1999, **19**(2), 91-104pp [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1089/107999099314234. ISSN 10799907. Dostupné z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/107999099314234>

KUMAR, Rukmini, Gilles CLERMONT, Yoram VODOVOTZ a Carson C. CHOW. The Dynamics of Acute Inflammation. *Journal of Theoretical Biology* [online]. 2004, **230**(2), 145-155pp [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/j.jtbi.2004.04.044. ISSN 00225193. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022519304001845>

LAW, Ruby HP, Qingwei ZHANG, Sheena MCGOWAN, Ashley M. BUCKLE, Gary A SILVERMAN, Wilson WONG, Carlos J. ROSADO, Chris G. LANGENDORF, Rob N. PIKE, Philip I. BIRD and James C. WHISSTOCH. An Overview of the Serpin Superfamily.

Genome Biology [online]. 2006, **7**(5), 1-11pp [cit. 2017-03-21]. DOI: 10.1186/gb-2006-7-5-216. ISSN 14656906. Dostupné z: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2006-7-5-216>

LELIEFELD, Pieter H. C., Catharina M. WESSELS, Luke P. H. LEENEN, Leo KOENDERMAN a Janesh PILLAY. The Role of Neutrophils in Immune Dysfunction During Severe Inflammation. *Critical Care* [online]. 2016, **20**(1), 1-9pp [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1186/s13054-016-1250-4. ISSN 13648535. Dostupné z: <http://ccforum.com/content/20/1/73>

LEVINE, Adam P., Michael R. DUCHEN, Simon DE VILLIERS, Peter R. RICH, Anthony W. SEGAL a Amit GAGGAR. Alkalinity of Neutrophil Phagocytic Vacuoles Is Modulated by HVCN1 and Has Consequences for Myeloperoxidase Activity. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(4), 1-20pp [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1371/journal.pone.0125906. ISSN 19326203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0125906>

LEY, Klaus. The Role of selectins in Inflammation and Disease. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 2003, **9**(6), 263-268pp [cit. 2017-03-04]. DOI: 10.1016/S1471-4914(03)00071-6. ISSN 14714914. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491403000716>

LINDEMANN, Otto, Christoph STRODTHOFF, Malte HORSTMANN, Nikolaj NIELSEN, Franz JUNG, Sandra SCHIMMELPFENNIG, Marianne HEITZMANN a Albrecht SCHWAB. TRPC1 Regulates fMLP-stimulated Migration and Chemotaxis of Neutrophil Granulocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. 2015, **1853**(9), 2122-2130pp [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.12.037. ISSN 01674889. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488915000063>

LUO, Bing-Hao, Christopher V. CARMAN a Timothy A. SPRINGER. Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annual Review of Immunology* [online]. 2007, **25**(1), 619-647pp [cit. 2017-03-04]. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618. ISSN 07320582. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618>

MCEVER, Rodger P. a Richard D. CUMMINGS. Perspectives Series: Cell Adhesion in Vascular Biology. Role of PSGL-1 Binding to Selectins in Leukocyte Recruitment. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1997, **100**(3), 485-491pp [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1172/JCI119556. ISSN 00219738. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/119556>

MILLS, Charles. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Critical Reviews in Immunology* [online]. 2012, **32**(6), 463-488pp [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1615/CritRevImmunol.v32.i6.10. ISSN 10408401. Dostupné z: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/2ff21abf44b19838,03b91cfa635b86ee,7acd81f604dc8b0c.html>

MULGREW, Alan T., Clifford C. TAGGART, Matthew W. LAWLESS, Catherine M. GREENE, Mark L. BRANTLY, Shane J. O'NEILL a Noel G. MCELVANEY. Z α 1-Antitrypsin Polymerizes in the Lung and Acts as a Neutrophil Chemoattractant. *Chest*

[online]. 2004, **125**(5), 1952-1957pp [cit. 2017-04-05]. DOI: 10.1378/chest.125.5.1952. ISSN 00123692. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369215321991>

MULLER, William A. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Veterinary Pathology* [online]. 2013, **50**(1), 7-22pp [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1177/0300985812469883. ISSN 03009858. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985812469883>

MULLER, William A. a William F. LUSCINSKAS. Assays of Transendothelial Migration In Vitro. *Methods Enzymol* [online]. 2008, **443**, 155-176pp [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)02009-0. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2759874/pdf/nihms124507.pdf>

MURRAY, Peter J. a Thomas A. WYNN. Protective and Pathogenic Functions of Macrophage Subsets. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2011, **11**(11), 723-737pp [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1038/nri3073. ISSN 14741733. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3073>

NANDA, Arvind., John H. BRUMELL, Tommy NORDSTROM, Lars KJELDSEN, Henrik SENGELOV, Niels BORREGAARD, Ori D. ROTSTEIN a Sergio GRINSTEIN. Activation of Proton Pumping in Human Neutrophils Occurs by Exocytosis of Vesicles Bearing Vacuolar-type H⁺-ATPases. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1996, **271**(27), 15963-15970 [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1074/jbc.271.27.15963. ISSN 00219258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.271.27.15963>

NAUSEEF, William M. How Human Neutrophils Kill and Degrade Microbes: An Integrated View. *Immunological Reviews* [online]. 2007, **219**(1), 88-102 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x. ISSN 01052896. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x>

NOURSHARGH, Sussan a Ronen ALON. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity* [online]. 2014, **41**(5), 694-707pp [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.10.008. ISSN 10747613. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761314003847>

OSTERMANN, Georg, Kim S. C. WEBER, Alma ZERNECKE, Andreas SCHRÖDER a Christian WEBER. JAM-1 is a Ligand of the β 2 Integrin LFA-1 Involved in Transendothelial Migration of Leukocytes. *Nature Immunology* [online]. 2002, **3**(2), 151-158pp [cit. 2017-03-04]. DOI: 10.1038/ni755. ISSN 15292908. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni755>

PATEL, Kamala D, Susan L CUVELIER a Shahina WIEHLER. Selectins: Critical Mediators of Leukocyte Recruitment. *Seminars in Immunology* [online]. 2002, **14**(2), 73-81pp [cit. 2017-03-04]. DOI: 10.1006/smim.2001.0344. ISSN 10445323. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044532301903446>

PHILLIPSON, Mia, Bryan HEIT, Pina COLARUSSO, Lixin LIU, Christie M. BALLANTYNE a Paul KUBES. Intraluminal Crawling of Neutrophils to Emigration Sites: A Molecularly Distinct Process From Adhesion in the Recruitment Cascade. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2006, **203**(12), 2569-2575pp [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1084/jem.20060925. ISSN 00221007. Dostupné z: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20060925>

PHILLIPSON, Mia, Bryan HEIT, Pina COLARUSSO, Lixin LIU, Christie M. BALLANTYNE a Paul KUBES. Intraluminal Crawling of Neutrophils to Emigration Sites: A Molecularly Distinct Process from Adhesion in the Recruitment Cascade. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2006, **203**(12), 2569-2575pp [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1084/jem.20060925. ISSN 00221007. Dostupné z: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20060925>

PHILLIPSON, Mia, Jaswinder KAUR, Pina COLARUSSO, Christie M. BALLANTYNE, Paul KUBES a Graham POCKLEY. Endothelial Domes Encapsulate Adherent Neutrophils and Minimize Increases in Vascular Permeability in Paracellular and Transcellular Emigration. *PLoS ONE* [online]. 2008, **3**(2), 1-8pp [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1371/journal.pone.0001649. ISSN 19326203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0001649>

PHILLIPSON, Mia a Paul KUBES. The Neutrophil in Vascular Inflammation. *Nature Medicine* [online]. 2011, **17**(11), 1381-1390 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1038/nm.2514. ISSN 10788956. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.2514>

PILSCZEK, Florian H., Davide SALINA, Karen K. H. POON, Candace FAHEY, Bryan G. YIPP, Christopher D. SIBLEY, Stephen M. ROBBINS, Francis H. Y. GREEN, Mike G. SURETTE, Motoyuki SUGAI, M. Gabriela BOWDEN, Muzaffar HUSSAIN, Kunyan ZHANG and Paul KUBES. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology* [online]. 2010, **185**(12), 7413-7425 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.4049/jimmunol.1000675. ISSN 00221767. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1000675>

PIQUERAS, Bernard, John CONNOLLY, Heidi FREITAS, Anna Karolina PALUCKA a Jacques BANCHEREAU. Upon Viral Exposure, Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells Produce 3 Waves of Distinct Chemokines to Recruit Immune Effectors. *Blood* [online]. 2006, **107**(7), 2613-2618pp [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.1182/blood-2005-07-2965. ISSN 00064971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2005-07-2965>

PROEBSTL, Doris, Mathieu-Benoît VOISIN, Abigail WOODFIN, James WHITEFORD, Fulvio D'ACQUISTO, Gareth E. JONES, David ROWE a Sussan NOURSHARGH. Pericytes Support Neutrophil Subendothelial Cell Crawling and Breaching of Venular Walls in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2012, **209**(6), 1219-1234pp [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1084/jem.20111622. ISSN 00221007. Dostupné z: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20111622>

RICARDO, Sharon D., Harry VAN GOOR a Allison A. EDDY. Macrophage Diversity in Renal Injury and Repair. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2008, **118**(11), 3522-3530pp [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1172/JCI36150. ISSN 00219738. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/36150>

RIVERA-NIEVES, Jesús, Gezahegn GORFU a Klaus LEY. Leukocyte Adhesion Molecules in Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* [online]. 2008, **14**(12), 1715-1735pp [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1002/ibd.20501. ISSN 10780998. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00054725-200812000-00014>

SCHENKEL, Alan R., Zahra MAMDOUH a William A. MULLER. Locomotion of Monocytes on Endothelium is a Critical Step During Extravasation. *Nature Immunology* [online]. 2004, **5**(4), 393-400pp [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1038/ni1051. ISSN 15292908. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/ni1051>

SOEHNLEIN, Oliver, Christian WEBER a Lennart LINDBOM. Neutrophil Granule Proteins Tune Monocytic Cell Function. *Trends in Immunology* [online]. 2009, **30**(11), 538-546 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1016/j.it.2009.06.006. ISSN 14714906. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147149060900129X>

STÅLHAMMAR, Maria E., Lena DOUHAN HÅKANSSON, Anders JONZON a Richard SINDELAR. Differential Neutrophil Chemotactic Response Towards IL-8 and Bacterial N-formyl peptides in Term Newborn Infants. *Uppsala Journal of Medical Sciences* [online]. 2017, **122**(1), 35-42pp [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1080/03009734.2016.1228721. ISSN 03009734. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03009734.2016.1228721>

STANČIĆ, Angela, Katharina JANDL, Carina HASENÖHRL, Florian REICHMANN, Gunther MARSCHE, Rufina SCHULIGOI, Akos HEINEMANN, Martin STORR and Rudolf SCHICHO. The GPR55 Antagonist CID16020046 Protects Against Intestinal Inflammation. *Neurogastroenterology & Motility* [online]. 2015, **27**(10), 1432-1445pp [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1111/nmo.12639. ISSN 13501925. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/nmo.12639>

STOCKLEY, Robert A. Neutrophils and Protease/Antiprotease Imbalance. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. 1999, **160**(1), 49-52pp [cit. 2017-04-05]. DOI: 10.1164/ajrccm.160.supplement_1.13. ISSN 1073449x. Dostupné z: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.160.supplement_1.13

SWAMYDAS, Muthulekha a Michail S. LIONAKIS. Isolation, Purification and Labeling of Mouse Bone Marrow Neutrophils for Functional Studies and Adoptive Transfer Experiments. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2013, (77), 1-7pp [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.3791/50586. ISSN 1940087x. Dostupné z: <http://www.jove.com/video/50586/isolation-purification-labeling-mouse-bone-marrow-neutrophils-for>

SWAMYDAS, Muthulekha, Yi LUO, Martin E. DORF a Michail S. LIONAKIS. Isolation of Mouse Neutrophils. *Current Protocols in Immunology* [online]. 110. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2001, 3.20.1–3.20.15. [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1002/0471142735.im0320s110. ISBN 9780471142737. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142735.im0320s110>

THEILGAARD-MONCH, K., S. KNUDSEN, P. FOLLIN a N. BORREGAARD. The Transcriptional Activation Program of Human Neutrophils in Skin Lesions Supports Their Important Role in Wound Healing. *The Journal of Immunology* [online]. 2004, **172**(12), 7684-7693 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.4049/jimmunol.172.12.7684. ISSN 00221767. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.172.12.7684>

TURNER, Mark D., Belinda NEDJAI, Tara HURST a Daniel J. PENNINGTON. Cytokines and Chemokines: At the Crossroads of Cell Signalling and Inflammatory Disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. 2014, **1843**(11), 2563-2582pp [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014. ISSN 01674889. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488914001967>

URBAN, Constantin F., David ERMERT, Monika SCHMID, Ulrike ABU-ABED, Christian GOOSMANN, Wolfgang NACKEN, Volker BRINKMANN, Peter R. JUNGBLUT, and Arturo ZYCHLINSKY. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* [online]. 2009, **5**(10), 1-18pp [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000639. ISSN 15537374. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000639>

VALLADEAU, Jenny a Sem SAELAND. Cutaneous Dendritic Cells. *Seminars in Immunology* [online]. 2005, **17**(4), 273-283pp [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.1016/j.smim.2005.05.009. ISSN 10445323. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044532305000400>

VOISIN, Mathieu-Benoît, Abigail WOODFIN a Sussan NOURSHARGH. Monocytes and Neutrophils Exhibit Both Distinct and Common Mechanisms in Penetrating the Vascular Basement Membrane In Vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2009, **29**(8), 1193-1199pp [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.187450. ISSN 10795642. Dostupné z: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.109.187450>

WANG, Shijun, Mathieu-Benoit VOISIN, Karen Y. LARBI, John DANGERFIELD, Christoph SCHEIERMANN, Maxine TRAN, Patrick H. MAXWELL, Lydia SOROKIN, Sussan NOURSHARGH. Venular Basement Membranes Contain Specific Matrix Protein Low Expression Regions That Act as Exit Points for Emigrating Neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 2006, **203**(6), 1519-1532pp [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1084/jem.20051210. ISSN 00221007. Dostupné z: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20051210>

WHISSTOCK, James C., Gary A. SILVERMAN, Phillip I. BIRD, Stephen P. BOTTOMLEY, Dion KAISERMAN, Cliff J. LUKE, Stephen C. PAK, Jean-Marc REICHHART, and James A. HUNTINGTON. Serpins Flex Their Muscle: II. Structural

Insights Into Target Peptidase Recognition, Polymerization, and Transport Functions. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2010, **285**(32), 24307-24312pp [cit. 2017-03-21]. DOI: 10.1074/jbc.R110.141408. ISSN 00219258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.R110.141408>

WILGUS, Traci A., Sashwati ROY a Jodi C. MCDANIEL. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Advances in Wound Care* [online]. 2013, **2**(7), 379-388pp [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1089/wound.2012.0383. ISSN 21621918. Dostupné z: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/wound.2012.0383>

WYNN, Thomas a Luke BARRON. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Seminars in Liver Disease* [online]. 2010, **30**(03), 245-257pp [cit. 2017-02-26]. DOI: 10.1055/s-0030-1255354. ISSN 02728087. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0030-1255354>

YADAV, Rashmi, Karen Y. LARBI, Rebecca E. YOUNG a Sussan NOURSHARGH. Migration of Leukocytes Through the Vessel Wall and Beyond. *Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2003, **90**, 598–606pp [cit. 2017-02-20]. DOI: 10.1160/TH03-04-0220. ISSN 03406245. Dostupné z: http://www.schattauer.de/index.php?id=1214&doi=10.1160/TH03-04-0220&no_cache=1

YANG, Jiyeon, Lixiao ZHANG, Caijia YU, Xiao-Feng YANG a Hong WANG. Monocyte and Macrophage Differentiation: Circulation Inflammatory Monocyte as Biomarker for Inflammatory Diseases. *Biomarker Research* [online]. 2014, **2**(1), 1-9pp [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.1186/2050-7771-2-1. ISSN 20507771. Dostupné z: <http://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/2050-7771-2-1>

YANG, Lin, Richard M. FROIO, Tracey E. SCIUTO, Ann M. DVORAK, Ronen ALON a Francis W. LUSCINSKAS. ICAM-1 Regulates Neutrophil Adhesion and Transcellular Migration of TNF- α -Activated Vascular Endothelium under Flow. *Blood* [online]. 2005, **106**(2), 584-592pp [cit. 2017-03-04]. DOI: 10.1182/blood-2004-12-4942. ISSN 00064971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2004-12-4942>

YUEN, Joshua, Fred G. PLUTHERO, David N. DOUDA, Magdalena RIEDL, Ahmed CHERRY, Marina ULANOVA, Walter H. A. KAHR, Nades PALANIYAR, and Christoph LICHT. NETosing Neutrophils Activate Complement Both on Their Own NETs and Bacteria via Alternative and Non-alternative Pathways. *Frontiers in Immunology* [online]. 2016, **7**, 1-14pp [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00137. ISSN 16643224. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00137/abstract>

ZLOTNIK, Albert a Osamu YOSHIE. Chemokines: A New Classification System and their Role in Immunity. *Immunity* [online]. 2000, **12**(2), 121-127pp [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80165-X. ISSN 10747613. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107476130080165X>

Obrázky:

Obr. 1: Anatomy of the Immune System. *Penn Med Ed* [online]. 2013 [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <http://highresmed.weebly.com/anatomy-of-the-immune-system.html>

Obr. 2: EYLES, Jo L., Andrew W. ROBERTS, Donald METCALF a Ian P. WICKS. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Neutrophils—Forgotten Mediators of Inflammatory Disease. *Nature Clinical Practice Rheumatology* [online]. 2006, **2**(9), 500-510pp [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1038/ncprheum0291. ISSN 17458382. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncprheum0291>

Obr. 3: PHILLIPSON, Mia a Paul KUBES. The Neutrophil in Vascular Inflammation. *Nature Medicine* [online]. 2011, **17**(11), 1381-1390 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1038/nm.2514. ISSN 10788956. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.2514>

Obr. 4: MULLER, William A. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Veterinary Pathology* [online]. 2013, **50**(1), 7-22pp [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1177/0300985812469883. ISSN 03009858. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985812469883>

Obr. 5: RIVERA-NIEVES, Jesús, Gezahegn GORFU a Klaus LEY. Leukocyte Adhesion Molecules in Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* [online]. 2008, **14**(12), 1715-1735pp [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1002/ibd.20501. ISSN 10780998. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00054725-200812000-00014>

Obr. 6-8: KRAMER, Nina, Angelika WALZL, Christine UNGER, Margit ROSNER, Georg KRUPITZA, Markus HENGSTSCHLÄGER a Helmut DOLZNIG. In Vitro Cell Migration and Invasion Assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. 2013, **752**(1), 10-24pp [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1016/j.mrrev.2012.08.001. ISSN 13835742. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574212000464>

Obr. 13: The Hemocytometer. *Microbehunter microscopy magazine* [online]. Germany, 2016 [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber/>

Tab. 1: ABBAS, Abul K., Andrew H. LICHTMAN a Shiv. PILLAI. *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2012. ISBN 9781437715286.