

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Charakterizace buněčné linie THP-1  
Bakalářská práce

Ivana Šafářová  
2020

The University of Pardubice  
Fakulty of Chemical Technology

Characterization of the THP-1 cell line  
Bachelor thesis

Ivana Šafářová

2020

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Ivana Šafářová**  
Osobní číslo: **C17220**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Charakterizace buněčné linie THP-1**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši pojednávající o monocytární/makrofágové buněčné linii THP-1. V úvodní části bakalářské práce se zaměřte na popis THP-1 buněk včetně způsobu jejich kultivace.
2. V hlavní části práce tuto buněčnou linii podrobně charakterizujte, uveďte možnosti diferenciaci monocytárních buněk v makrofágy a popište využití buněčné linie THP-1 jako modelu makrofágů pro testování cytotoxicity látek nebo nanomateriálů.
3. Ke studiu tématiky použijte především zahraniční odbornou literaturu. Vyhledávání zdrojů provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod. Informace přehledně zpracujte podle pokynů a doporučení školitele.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jiří Handl**  
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Pavlína Majtnerová**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 15.6.2020

Ivana Šafářová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych chtěla poděkovat Mgr. Pavlíně Majtnerové za cenné rady, připomínky, ochotu a trpělivost při zpracování bakalářské práce. Poděkování také patří Mgr. Jiřímu Handlovi za návrh daného tématu.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zaměřuje na monocyto-makrofágovou buněčnou linii THP-1. První část bakalářské práce je zaměřena na leukocyty a jejich rozdělení, dále je zmíněn monocyto-makrofágový systém a jednotlivé typy leukemií. V hlavní části se zaměřuji na popis buněčné linie THP-1 a jejich kultivaci a diferenciaci. Dále jsem ve své práci popsala vliv některých látek a nanomateriálů na THP-1 buňky. V závěru práce jsem se zaměřila na výhody a nevýhody použití THP-1 buněčné linie.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

buněčná linie THP-1, monocyt, makrofág, monocyto-makrofágový systém, leukemie

## **TITLE**

Characterization of the THP-1 cell line.

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis focuses on the monocyte-macrophage cell line THP-1. The first part of the bachelor thesis is focused on leukocytes and its distribution, the monocyte- macrophage system and types of leukemias. In the main part of my bachelor work I focused on describing the cultivation and differentiation of THP-1 monocytes. At the end I focused on advantages and disadvantages of THP-1 cell line.

## **KEYWORDS**

THP-1 cell line, monocyte, macrophage, monocyte-macrophage system, leukemia

# OBSAH

ÚVOD.....	15
1 Leukocyty .....	16
2 Monocyto-makrofágový systém .....	18
2.1 Progenitory monocytů a granulocytů .....	18
2.2 Monocyt .....	18
2.2.1 Antigen CD14 .....	19
2.2.2 Monocytární buněčné linie .....	20
2.3 Makrofág .....	20
2.3.1 M1 makrofágy.....	22
2.3.2 M2 makrofágy.....	22
2.3.3 Regulační makrofágy .....	22
2.4 Cytokiny .....	22
3 Akutní myeloidní leukémie .....	24
3.1 Akutní promyelocytární leukemie.....	24
3.2 Akutní monocytární leukemie.....	24
4 THP-1.....	26
4.1 Kultivace THP-1 buněk.....	26
4.2 Diferenciace THP-1 monocytů v makrofágy .....	27
4.2.1 Forbol 12-myristát 13-acetát.....	28
4.2.2 Kyselina retinová .....	29
4.2.3 Vitamín D3 .....	30
4.3 Hodnocení diferenciace.....	32
4.3.1 Průtoková cytometrie .....	34
4.3.2 Analýza komparativní genové hybridizace založené na mikročipu .....	34
4.3.3 Analýza exprese genů pro cytokiny THP-1 buněk pomocí polymerázové řetězové reakce .....	34
4.4 Vliv různých látek a nanomateriálů na THP-1 buňky .....	35
4.4.1 Vliv a účinky kyslíku na THP-1 buňky .....	35
4.4.2 Vliv enzymu $\beta$ -hexosaminidázy na THP-1 buňky.....	35
4.4.3 Účinek etoposidu a kurkuminu .....	36
4.4.4 Vliv vitamínu C na THP-1 buňky.....	36
4.4.5 Vliv nanočástic na THP-1 buňky.....	36
4.4.6 <i>Sallmonella Typhimurium</i> a její vliv v THP-1 buňkách .....	38



4.5	Výhody a nevýhody použití buněčné linie THP-1 .....	38
ZÁVĚR	.....	39
5	Seznam použité literatury .....	40

## **SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK**

Obrázek 1: Vývojová stádia monocytů.....	19
Obrázek 2: Dělení makrofágů dle konkrétních subpopulací.....	21
Obrázek 3: Optická a transmisní mikroskopie diferencovaných THP-1 buněk .....	28
Obrázek 4: Chromatinová struktura vitamínu D3.....	31
Obrázek 5: Fluorescenční obrazy THP-1 buněk.....	33
Obrázek 6: Počet lysozomů a mitochondrií v průtokovém cytometru. ....	33
Obrázek 7: Snímky konfokální a transmisní elektronové mikroskopie.....	37
Tabulka 1: Leukocyty .....	16

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AML	akutní myeloidní leukemie
AML-M5	akutní monocytární leukemie
ALOX15	arachidonát 15-lipoxygenáza
Apaf-1	aktivační faktor I apoptické proteázy
APL	akutní promyelocytární leukemie
ATRA	kyselina all - trans retinová
CCL17	C-C chemokinový ligand 17
CCL26	C-C chemokinový ligand 26
CDK2	cyklin dependentní kináza 2
CFU-GM	myeloidní progenitor granulocytů
CFU-M	myeloidní progenitor makrofágů
CGH	komparativní genová hybridizace
CMP	myeloidní progenitor
CSC	nádorové kmenové buňky
CXCL9	C-X-C chemokinový ligand 9
CXCL10	C-X-C chemokinový ligand 10
DC	dendritické buňky
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplazmatické retikulum
FAIRE-seq	izolace regulačních prvků pomocí formaldehydu
FBS	hovězí sérum
FcγR	receptor Fc domény
FcγRI	receptor Fc domény I
FcγRII	receptor Fc domény II
FcγRIII	receptor Fc domény III
FS	přední rozptyl
GMP	progenitor granulocytů a monocytů
HCMV	lidský cytomegalovirus
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan sulfonová kyselina

HLA	lidský leukocytární antigen
HLA-A*02	sérotyp lidského leukocytárního antigenu A*02
HLA-B*15	sérotyp lidského leukocytárního antigenu B*15
HLA-C*03	sérotyp lidského leukocytárního antigenu C*03
HLA-DR	lidský leukocytární antigen izotop DR
HLA-DRB1*01	lidský leukocytární antigen sérotyp DRB1*01
HLA-DRB1*15	lidský leukocytární antigen sérotyp DRB1*15
HLA-DRB5*01/02	lidský leukocytární antigen sérotyp DRB5*01/02
HLA-DQB1*05	lidský leukocytární antigen sérotyp DQB1*05
HLA-DQB1*06	lidský leukocytární antigen sérotyp DQB1*06
HUVEC	humánní imunitní buněčné endoteliální buňky
CHIP-seq	chromatinová imunoprecipitace spojená se sekvenací
ICAM	intracelulární adhezivní molekula
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IL-1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
IRF1	regulační faktor 1
LBP	lipopolysacharidový sérový protein
LPS	lipopolysacharid
LSC	leukemické kmenové buňky
MAPK	mitogenní aktinované kinázy
MFI (Geo mean)	střední intenzita fluorescence geometrického průměru
MDM	monocyt diferencovaný v makrofág
MDPS	progenitor monocytárních a dendrických buněk
MDSCs	myeloidní supresorové buňky
2-Me	2-merkaptotethanol
Mo	monocyt
ND	nanodiamondy

NF- $\kappa$ $\beta$	nukleární transkripční faktor
NK	přirozené zabíječské buňky
NSE	nespecifická esteráza
PAMP	molekulární vzory asociované s patogenem
PCR	polymerázová řetězová reakce
PMA	forbol 12-myristát 13-acetát
PMAr	„rested“ forbol 12-myristát 13-acetát
PtPN	nanočástice platiny
PU.1	„pionýrský“ transkripční faktor
pRb	retinoblastomový protein
RA	kyselina retinová
RAR	receptor retinové kyseliny
RDV	regulační snížený objem
RNAi	interferovaná RNA
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPMI 1640	„Roswell Park Memorial Institute 1640“
RXR	retinoidní receptor X
SP	postranní populace
SSC	boční rozptyl
TAD	topologicky asociovaná doména
TAMs	s nádory asociované makrofágy
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TGF- $\beta$	nádorový růstový faktor $\beta$
TGM2	transglutamináza 2
THP-1	monocytární buněčná linie „tohoku hospital pediatrics 1“
TNF	tumor nekrotizující faktor
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
TNF- $\gamma$	tumor nekrotizující faktor $\gamma$
TLR	„toll like“ receptor
V-ATPáza	vakuolární ATPáza

VCAM	adhezivní molekula vaskulárních buněk
1,25-D3	1,25-dyhydroxyvitamín D3
VD3	vitamín D3
VDR	ligand vitamínu D3
VP16	etoposid
VSOP	velmi malé supermagnetické částice oxidu železa
WBC	bílé krvinky

## ÚVOD

V této práci jsem se zaměřila na monocytární buněčnou linii THP-1. Tato nádorová buněčná linie byla kultivována z krve ročního chlapečka s akutní monocytární leukémií [1], která se řadí mezi akutní myeloidní leukémie (AML).

Leukémie je nádorové onemocnění bílých krvinek. Nádorové buňky napadají zdravé lidské buňky s cílem poškodit jejich funkci. Leukémie má řadu typů, mezi které patří například akutní myeloidní leukémie.

AML je typickou hematopoetickou rakovinou a vzniká při špatné diferenciaci kmenových krvetvorných buněk v kostní dřeni. AML se vyskytuje převážně u starších jedinců. Ti na následky onemocnění umírají během 5 let. Jedna z možností léčby AML je chemoterapie, kterou doprovází i vedlejší účinky. AML má řadu podtypů, ke kterým patří promyelocytární a akutní monocytární leukémie. Akutní monocytární leukémie je onemocnění, které má z 80- 90 % případů dobrou prognózu. Pouze u 30-40 % případů dochází k návratu onemocnění.

K výzkumu, studiu a diagnostice leukémií bývá často využívána buněčná linie THP-1. THP-1 buňky se používají také ve výzkumu dalších onemocnění jako jsou rakovina nebo kardiovaskulární a aterosklerózní choroby.

Před samotnou analýzou jsou monocytické THP-1 buňky kultivovány a následně mohou být diferencovány v makrofágy. Mezi nejpoužívanější diferenciací činidla patří: forbol 12-myristát 13-acetát (PMA), kyselina retinová (RA), vitamín D3 (VD3). Dále jsem v této práci zmínila faktory, které ovlivňují funkci a dělení THP-1 buněk.

# 1 Leukocyty

Tvorba leukocytů neboli bílých krvinek (WBC) začíná v kostní dřeni z kmenové buňky. Fyziologický počet leukocytů v krvi je 4 500 - 10000/ $\mu$ l. Jejich hlavní funkcí je obrana organismu před cizími patogeny, které vniknou do lidského organismu. Při patologických procesech určujeme počet WBC v krvi. Snížená hodnota leukocytů může být způsobena nemocemi jako je např. anémie a leukemie. Naopak zvýšená hodnota se může projevit u pacientů s HIV nebo lymfomem. K identifikaci leukocytů se používá mikroskopická metoda a průtoková cytometrie [2] [3] [4].

K diferenciaci leukocytů dochází v kostní dřeni, kde vznikají imunitní a fagocytární bílé krvinky. Mezi imunitní bílé krvinky se řadí T a B lymfocyty, které v organismu přežívají měsíce až roky a jejich hlavní úlohou je tvorba protilátek. Lymfocyty se řadí mezi agranulocyty, protože jejich jádro spolu s monocyty je nesegmentované. Granulocyty a monocyty patří do fagocytárních leukocytů [2] [4].

Granulocyty se dále dělí na neutrofilly, eozinofily a bazofily. Jejich jádro je rozděleno na několik segmentů a cytoplazma buněk má charakteristická granula. Z granulocytů jsou nejčastěji zastoupenou složkou v krvi neutrofilly. Neutrofilly přežívají v organismu 4 dny a k jejich aktivaci dochází při zánětlivém procesu v organismu. Při alergických reakcích se uvolňují eozinofily a bazofily [2].

Zastoupení jednotlivých leukocytárních buněk v krvi je znázorněno v tabulce č.1.

Tabulka 1: Leukocyty: Zastoupení jednotlivých typů leukocytů v krvi. Převzato a upraveno z [2].

Typy leukocytů	Procenta (%)
Neutrofilly	40-60
Neutrofilly-tyč	0-3
Eozinofily	1-4
Bazofily	0,5-1
Monocyty	2-8
Lymfocyty	20-40

## Receptory leukocytárních buněk

Na povrchu leukocytů se nachází receptory pro lidský imunoglobulin G (IgG). Tyto receptory umožňují vazbu Fc domény (Fc $\gamma$ R). Funkcí receptorů je zprostředkování vazeb imunitních komplexů. Receptory leukocytů jsou charakteristické svojí antigenní



a biochemickou odlišností. U lidí existuje pět typů receptoru Fc $\gamma$ R, ke kterým patří např: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII nebo Fc $\gamma$ RIII [5] [6].

Prvním typem receptoru je sialoprotein Fc $\gamma$ RI (CD64). Tento druh proteinu je schopný rozpoznat monoklonální protilátky a váže monomerní lidský imunoglobulin G (IgG) s vysokou afinitou. Vyskytuje se převážně na makrofázích a leukemických buněčných liniích jako jsou HL60 a U937. Druhým typem je receptor Fc $\gamma$ RII neboli CD32, který můžeme rozdělit na dva druhy CD32a a CD32b. CD32a se vyskytuje na neutrofilech, eozinofilech, makrofázích a krevních destičkách. CD32b můžeme nalézt na bazofilech, B buňkách, makrofázích, dendrických buňkách (DC), endotelu a různých orgánech. Třetím typem je receptor Fc $\gamma$ RIII (CD16), který se vyskytuje na neutrofilech, na přirozeně zabíječských (NK) buňkách a na některých makrofázích [5] [6].

## 2 Monocyto-makrofágový systém

Mezi základní funkce monocyto-makrofágového systému patří fagocytóza, produkce cytokinů, obnova poškozených tkání nebo destrukce starých a poškozených erytrocytů [7].

Monocyty se tvoří z progenitorů dvojího typu: progenitoru granulocytů a monocytů (GMP) a progenitoru monocytárních a dendrických buněk (MDPS) [8].

### 2.1 Progenitory monocytů a granulocytů

Progenitory GMP a MDPS pocházejí z myeloidního progenitoru (CMP), z tohoto progenitoru vznikají myeloidní buňky, ke kterým patří: neutrofil, monocyty, makrofágy a DC. Tvorbu myeloidních buněk řídí mikrobiální složky a zánětlivé cytokiny. Progenitory mohou být použity k přímé detekci mikrobiálních složek [8].

GMP progenitory jsou aktivovány v reakci na infekce. Neutrofil a monocyty při infekci způsobují pohlcení a zabití bakterií [8].

### 2.2 Monocyt

Monocyty zaujímají 2-8 % leukocytů v periferní krvi a v lidském organismu přežívají měsíce až roky. Ve tkáních monocyty dozrávají v makrofágy a označují se jako fagocytární buňky. Při přeměně monocytů na makrofágy se zvyšuje syntéza proteinů a dochází ke zvýšení exprese kyselé fosfatázy v lysozomech [2] [9].

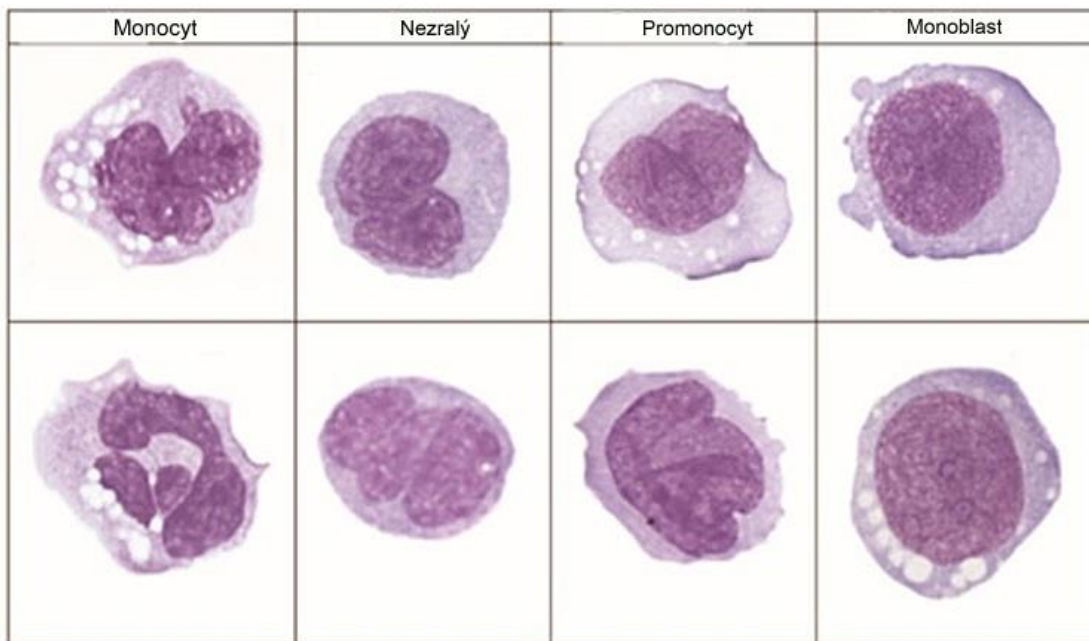
Ke zviditelnění struktur se používá barvivo Giemsa-Romanovský. Po obarvení se v cytoplazmě nachází červeno-růžová granula, která obsahuje kyselou fosfatázu a mají průměrnou velikost 0,2  $\mu\text{m}$  [9].

Monocyty obsahují organely jako jsou ribozomy a jádro. Jádro obsahuje jaderné póry. Organely jsou potřebné pro syntézu bílkovin, tím, že jsou schopné vázat protein na Golgiho aparát a na endoplazmatické retikulum. Monocyty prochází postupnými vývojovými fázemi, ke kterým patří: kmenové buňky, monoblasty, promonocyty, nezralé monocyty a monocyty [7] [9].

Prvním stupněm vývoje monocytů je monoblast. Má kruhové nebo ovalné jádro a jemný chromatin. Po obarvení můžeme pozorovat cytoplazmu, která je bazofilní s azurofilními granuly. Velikost monoblastu je 20-30  $\mu\text{m}$ . Druhým vývojovým stádiem je promonocyt, který je velmi podobný monoblastu až na zavínuté jádro. Třetím vývojovým stádiem je nezralý monocyt, který je menší než zralý monocyt. Tvar jádra je zavínutý nebo stočený. Nezralý monocyt obsahuje kondenzovaný chromatin. Jeho cytoplazma je méně bazofilní

než u promonocyty. Konečným stádiem je monocyt, který má kulaté až oválné jádro. Chromatin je kondenzovaný. Cytoplazma má naředlou barvu s vakuolami a azurofilními granuly. Velikost monocytu je 20-25  $\mu\text{m}$  [10].

Jednotlivá vývojová stádia monocytů jsou znázorněna na obr.1.



Obrázek 1: Vývojová stádia monocytů. Na obrázku můžeme pozorovat jednotlivá vývojová stádia monocytů. Zprava monoblast, promonocyt, nezralý monocyt a monocyt. Převzato a upraveno z [10].

V laboratorní praxi se k identifikaci monocytů používá jednoduché barvení buněk Giemsa-Romanovským barvivem. Monocyty můžeme identifikovat také pomocí cytochemických metod. Mezi nejčastější používanou cytochemickou metodou je reakce nespecifické esterázy (NSE). NSE je přítomna nejen ve všech buňkách mononukleární fagocytární linie, ale i v jiných buňkách např. v T lymfocytech [7].

V posledních letech byly vytvořeny různé typy monoklonálních protilátek. Tyto monoklonální protilátky se používají pro barvení buněk v periferní krvi pro analýzu buněk průtokovou cytometrií. Monocyty mají na svém povrchu charakteristické CD14 antigeny, jejichž značení protilátkou se využívá k detekci monocytů [7].

### 2.2.1 Antigen CD14

Antigen CD14 se pomocí glykoylfosfatidylinositolu váže na povrchový membránový glykoprotein s molekulovou hmotností 53-55 kDa. Je silně vázán na monocytech

a makrofázích, ale slabě je exprimován na neutrofilních granulocytech. U monocytů se tento antigen používá jako marker pro jejich identifikaci. Nevyskytuje se však na lymfocytech, erytrocytech a trombocytech [7].

Molekula CD14 funguje jako receptor pro endotoxin (lipopolysacharid – LPS). LPS se váže na lipopolysacharidový sérový protein (LBP), který usnadňuje vazbu LPS na molekulu CD 14. Když se LPS naváže na monocyty nebo na neutrofilní granulocyty dochází k aktivaci a uvolnění tumor nekrotizujícího faktoru (TNF), interleukin 6 (IL-6) a interleukin (IL-8) [7].

### **2.2.2 Monocytární buněčné linie**

Mezi monocytární buněčné linie patří například THP-1, U937, HL-60, Mono Mac 6 [11]. U-937 je buněčná linie monocytů, která byla získána od nemocného pacienta s histiocytovým lymfomem. Buněčná linie U937 je tedy tkáňového původu. Buňky mají kruhovitý tvar s mikrofiliiemi. Cytoplazma obsahuje velké jádro ve tvaru paprsku. Rozdíl mezi nádorovou buněčnou linií U937 a THP-1 spočívá v počátku zrání buněk [11] [12].

Buněčná linie HL-60 byla získána od pacienta, který trpěl akutní promyelocytární leukémií. Buňky jsou kulatého tvaru. Pokud je buněčná linie HL-60 vystavena hypotonickému prostředí dochází ke snížení regulačního objemu (RDV). Buněčná linie HL-60 je schopna se diferencovat na monocytární fenotyp pomocí VD3. Pokud chceme buněčnou linii HL-60 diferencovat na makrofágy musíme použít činidlo PMA [11] [13] [14].

Buněčná linie Mono Mac 6 byla z periferní krve pacienta, který trpěl monoblastickou leukémií. Mono Mac 6 se používá ke studiu fenotypových a funkčních vlastností zralých monocytů *in vivo*, protože má schopnost fagocytovat erytrocyty s protilátkou [12].

Mezi monocytární buněčné linie patří také THP-1, která byla kultivována z krve ročního chlapečka s akutní monocytární leukémií. Této buněčné linii se budu podrobněji věnovat v dalších kapitolách.

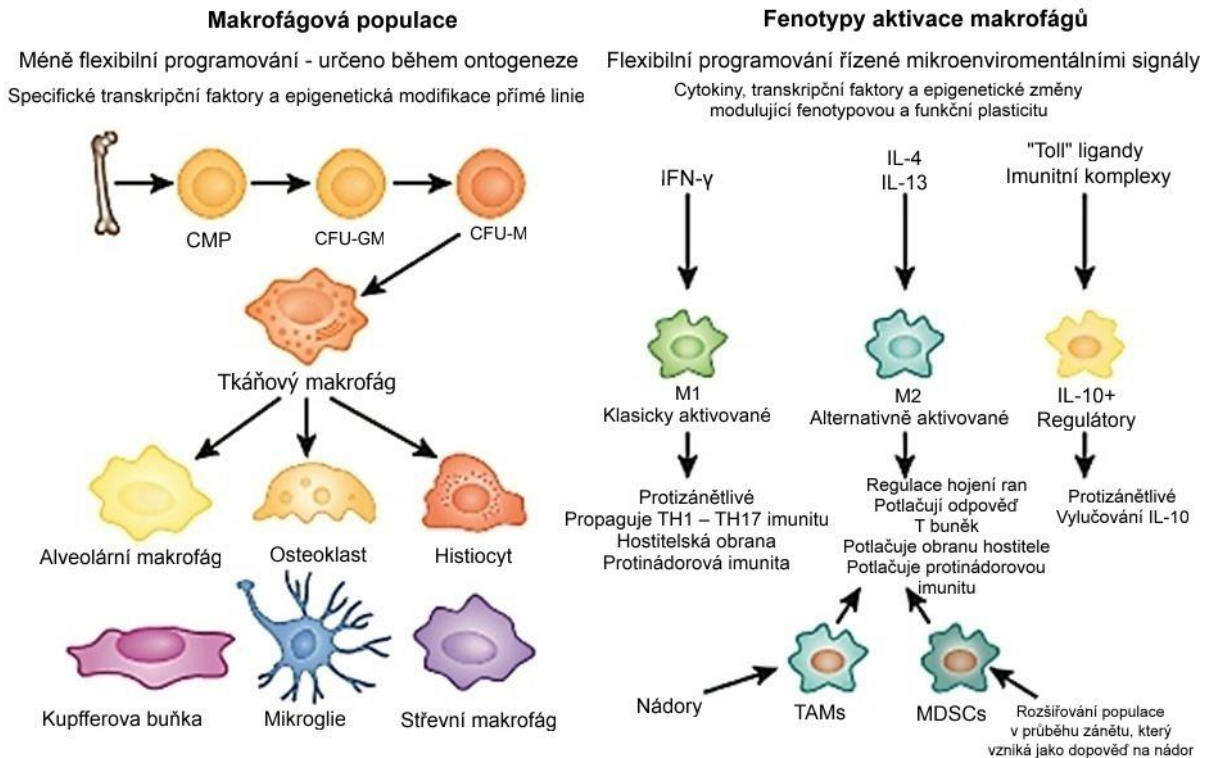
## **2.3 Makrofág**

Makrofágy patří mezi fagocytární buňky. Jejich hlavní funkcí je udržování tkáňové homeostázy a odstraňují staré nebo poškozené erytrocyty, poškozené nekrotické tkáně a toxické molekuly z krevního oběhu [15].

Mezi tkáňové makrofágy patří: osteoklasty, mikroglie, alveolární makrofágy, histiocyty (intersticiální pojivová tkáň) a Kupfferovy buňky (játra). Dále existuje rozdělení makrofágů

z hlediska mononukleárních subpopulací fagocytů v oběhu a ve slezině. Tyto typy makrofágů lze definovat na základě jejich specifických funkčních aktivit [15].

Dělení makrofágů na základě konkrétních subpopulací je znázorněno na obr.2.



Obrázek 2: Dělení makrofágů dle konkrétních subpopulací. Vlevo – rozdělení na základě anatomického umístění; vpravo – na základě funkčního fenotypu (CMP-myeloidní progenitor, CFU-GM-myeloidní progenitor granulocytů, CFU-M-myeloidní progenitor monocytů, „Toll“ ligandy-toll – like receptor, TAMs – asociované makrofágy s nádorem, MDSCs –myeloidní supresorové buňky). Převzato a upraveno z [15].

Makrofágy jsou schopné měnit fagocytární schopnosti a hladinu lidského leukocytárního antigenu izotopu DR (HLA-DR) a adhezivních molekul, ke kterým patří mezibuněčné (ICAM) a vaskulární (VCAM). Dále obsahují markery pro jejich dělení. Mezi klasické aktivační markery makrofágů patří C-X-C chemokinový ligand 9 a 10 (CXCL9 a 10), regulační faktor 1 (IRF1). K alternativním aktivačním markerům patří C-C chemokinový ligand 17 (CCL17), arachidonát 15-lipoxygenáza (ALOX15), C-C chemokinový ligand 26 (CCL26), transglutamináza 2 (TGM2) a další [16] [17].

Makrofágy můžeme rozdělit podle jejich funkčních aktivit na M1 a M2 makrofágy, regulační makrofágy, makrofágy asociované s nádorem a monocytární typy supresorových buněk odvozených od myeloidů. Makrofágy M1 i M2 exprimují myeloidní markery, u M1

makrofágů se jedná o CD11b a CD33, M2 makrofágy exprimují především CD14, CD163 a CD206 [15] [16].

### **2.3.1 M1 makrofágy**

Funkce M1 makrofágů spočívá ve zprostředkování obrany hostitele a protinádorové imunity. Tyto buňky vylučují cytokiny, jako jsou tumor nekrotizující faktor  $\gamma$  (TNF- $\gamma$ ) a tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Z interleukinů M1 makrofágy produkují IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23. M1 makrofágy se také považují za hnací síly chronických zánětlivých a autoimunitních chorob včetně revmatoidní artritidy, aterosklerózy, plicní fibrózy a Crohnovy choroby [15] [16] [18].

### **2.3.2 M2 makrofágy**

M2 makrofágy regulují hojení ran. Přispívají k regulaci metabolismu glukózy tím, že zajišťují citlivost na inzulín a glukózovou toleranci, což brání rozvoji obezity vyvolané dietou. M2 makrofágy podporují progresi nádoru. Vylučují IL-10 a nádorový růstový faktor (TGF- $\beta$ ). Dále také aktivují arginázu, která metabolizuje L-arginin. Tyto buňky jsou induktory různých vrozených buněk produkujících IL-4 a IL-13 nebo IL-10 k těm patří bazofily, neutrocyty a přírodní pomocné buňky [15] [16] [18].

### **2.3.3 Regulační makrofágy**

Úlohou regulačních makrofágů je udržování imunitní homeostázy. U regulačních makrofágů imunitní homeostáza probíhá ve střevě, kde dochází k vývoji regulačních T buněk. Regulační makrofágy vylučují cytokiny IL-10 a TGF- $\beta$ 1. Vývoj regulačních makrofágů je zprostředkován pomocí Toll-like receptoru (TLR) za přítomnosti imunoglobulinu G, apoptických buněk a prostaglandinu [15].

K dalším subtypům makrofágů můžeme zařadit nádorově asociované makrofágy, které potlačují imunitu nádoru a MDSCs [15].

## **2.4 Cytokiny**

Cytokiny jsou malé molekuly, které jsou produkovány T a B lymfocyty, endoteliálními buňkami, fibroblasty, makrofágy, monocyty a žírnými buňkami [19].

Cytokiny se aktivují při migraci, proliferaci a při apoptóze buněk. Hrají důležitou roli pro fungování vrozených i získaných imunitních odpovědí a tím přispívají k vývoji imunitního

systemu. Dále mají důležitou roli při vysílání signálů pomocí signálních drah, například: nukleárního faktoru  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa$ B) [19].

Funkce cytokinů může být apokrinní, parakrinní nebo endokrinní. I přes to, že cytokiny převážně regulují imunitu a zánět, mohou při jejich dlouhodobém uvolňování způsobit chronické onemocnění [19].

Cytokiny mohou být klasifikovány do skupin podle aktivit a mechanismů účinku:

a) Cytokiny vrozené imunity:

IL-1; IL-6; IL-12; IL16; TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  [19].

b) Cytokiny krvetvorby:

M-CSF; IL-3; IL-7; Erythropoetin (Epo) 3 [19].

c) Cytokiny chemotaxe

Chemokinin 4 [19].

d) Cytokiny k aktivaci, proliferaci, diferenciaci a apoptózy T a B lymfocytů

IL-2; TNF- $\alpha$ ; TNF- $\beta$ ; TNF- $\gamma$ ; IFN- $\gamma$  [19].

V kapitole jsem se zaměřila převážně na cytokiny a interleukiny, které jsou produkovány monocyty a makrofágy.

TNF- $\alpha$  patří mezi cytokiny vrozené imunity a je produkován mnoha buněčnými typy včetně makrofágů, které jsou hlavními zdroji, zejména po aktivaci pomocí IFN- $\gamma$ . Cytokin IL-1 $\beta$  je vylučován makrofágy. K aktivaci cytokinu dochází na podnět TNF- $\alpha$ , bakteriálního endotoxinu a IL-1 $\beta$ . Interferon IFN- $\alpha/\beta$  se řadí k interferonům typu I u makrofágů a působí na antivirové cytokiny [19].

IL-1 je hlavním mediátorem zánětu a stimuluje syntézu eikosanoidů v makrofázích, fibroblastech, synoviálních buňkách a chondrocytech. Aktivuje leukocyty a ničí tkáň. Zvýšené hladiny tohoto interleukinu se vyskytují u pacientů s artritidou [20]. IL-2 aktivuje u monocytů jejich mikrobicidní a nádorovou aktivitu. IL-2 usnadňuje dělení B buněk, které produkují IgG imunoglobuliny [21]. IL-6 patří mezi cytokiny vrozené imunity a má charakter prozánětlivé cytokinu. Je produkován při poškození tkáně a infekci [19]. IL-10 inhibuje monocyty a makrofágy, potlačuje aktivitu T a NK buněk inhibicí monocytů a makrofágů, a tím pádem slouží jako deaktivující faktor. Dále snižuje produkci prozánětlivých cytokinů [19] [22]. IL-12 zahajuje produkci makrofágů pomocí IFN- $\gamma$  a uvolňuje IFN- $\gamma$  z T a NK buněk [21]. IL-18 je produkován různými typy buněk. Mezi ně patří makrofágy, dendritické buňky (DC), neutrofil, adipocyty, Kupfferovy buňky a mikroglialní buňky [22].

### **3 Akutní myeloidní leukémie**

AML je charakteristickou hematopoetickou rakovinou, která vzniká při špatném dělení buněk v hematopoéze. Onemocnění způsobuje abnormální proliferaci, potlačuje apoptózu a blokuje diferenciaci v krvetvorných kmenových buňkách. Při AML vznikají klonální populace neoplastických buněk a u maligních hematopoetických buněk dochází ke ztrátě jejich normálních funkcí [23] [24].

AML se vyskytuje u starších jedinců. Ti na následky onemocnění umírají během 5 let. Vhodnou léčbou je chemoterapie, která má i vedlejší účinky na organismus [25].

K významným typům rakovinných buněk AML patří nádorové kmenové buňky (CSC). Buňky mají schopnost sebeobnovy pomocí diferenciaci. Tyto buňky obvykle zůstávají v klidovém stavu a tvoří malou menšinu celkové populace nádorů. Tato malá populace buněk je zodpovědná za rezistenci vůči lékům a za opakování vzniku rakoviny [25].

Buňky postranní populace (SP) u lidské rakoviny mají různý původ, včetně akutní myeloidní leukémie, neuroblastomu a gliomu [25].

AML má řadu podtypů. Mezi ně patří například akutní promyelocytární a monocytární leukemie [23].

#### **3.1 Akutní promyelocytární leukemie**

Akutní promyelocytární leukemie (APL) se vyskytuje převážně u mladých jedinců. U APL dochází k akumulaci neoplastických promyelocytů v kostní dřeni nebo krvi [26].

Pro výzkum promyelocytární leukemie se používá nádorová buněčná linie HL-60, která je izolována od pacientů s tímto onemocněním. U buněk HL-60 dochází k aktivaci mitogenních kináz (MAPK), ke kterým patří p38 / ERK, JNK / ERK a p38 / JNK. Mitogenní kinázy jsou schopny zprostředkovávat signální transdukce v buněčné proliferaci, diferenciaci, transformaci a smrti. K léčbě promyelocytární leukemie se používá kyselina retinová, která blokuje dělení leukemických buněk [23] [24].

#### **3.2 Akutní monocytární leukemie**

Akutní monocytární leukémie (AML-M5) obsahuje zvýšený počet bílých krvinek. Dále se zvyšuje počet chromozomů a AML-M5 je schopná metastazovat do dalších orgánů. U akutní monocytární leukemie dochází z 80–90 % případů k uzdravení. V 30-40 % případů dochází k návratu onemocnění. K terapeutické léčbě tohoto onemocnění se využívá nízká hladina NF- $\kappa$ B p65 [27] [28].



### **Protein p65**

Protein p65 se řadí do rodiny proteinů NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B p65 je transkripční faktor, který hraje důležitou roli při regulaci mnoha biologických funkcí včetně zánětu, imunity, buněčné proliferace, apoptózy a migrace nádorů [27].

NF- $\kappa$ B p65 se nachází v cytoplazmě v inaktivní formě. V cytoplazmě se váže na inhibiční proteiny (IB $\kappa$  $\alpha$ , IB $\kappa$  $\beta$  a IB $\kappa$  $\epsilon$ ) [27].

Vysoká hladina aktivity NF- $\kappa$ B p65 se vyskytuje v mnoha lidských rakovinových buňkách např. hepatocelulárního karcinomu, sporadického kolorektálního karcinomu, rakoviny vaječníků, karcinomu žaludku atd. Dále je považován za marker progresu nádoru [27].

Několik inhibitorů p65 je v současné době studováno, což může vést k zahájení vhodné terapeutické léčby. Ve výzkumu se využívá interferovaná RNA (RNAi). V této technice se využívá snížení exprese genů v buňkách [27].

## 4 THP-1

THP-1 buněčná linie neboli „tohoku hospital pediatrics 1“, vznikla na klinice pediatrie ve městě Tohoku [29]. Jedná se o monocytární buněčnou linii, která byla kultivovaná z krve ročního chlapce s akutní monocytární leukémií, jak již bylo v mé práci zmíněno [1]. THP-1 buňky jsou z hlediska morfologie a diferenciaci podobné monocytům a makrofágům [30] [31].

THP-1 buněčná linie je jednou z nejpoužívanějších buněčných linií, která se využívá ve výzkumu biologických vlastností buněk a regulace monocytů/makrofágů v imunitním systému, rakovině, kardiovaskulárních a aterosklerózních onemocněních. THP-1 buňky mají na rozdíl od jiných myeloidních buněk diploidní karyotyp tj. diploidní sadu chromozomů a větší množství fenotypových charakteristik. Dále neobsahují žádné povrchové a cytoplazmatické imunoglobuliny. THP-1 buňky reagují v hypotonickém prostředí pomocí RDV [1] [14] [32].

K obarvení THP-1 buněk se používá barvivo Wright-Giemsa, Po obarvení mají buňky kulatý nebo polygonální tvar. Cytoplazma je bazofilní a obsahuje azurofilní granula. Jádro buněk obsahuje jadérka s lipidovými kapénkami a dalšími cytoplazmatickými složkami jako jsou: Golgiho aparát, mitochondrie, hrubé endoplazmatické retikulum (ER). Při cytochemickém testu buňky obsahují  $\alpha$ -butyrát esterázu [33].

THP-1 buňky jsou schopny reagovat na prozánětlivé podněty zvýšením adheze buněk, expresí makrofágových markerů, zvýšenou fagocytární schopností a sekrecí prozánětlivých mediátorů např. superoxidu a TNF za pomoci např. LPS. THP-1 buňky, které jsou stimulované LPS se používají k aktivaci humánních miniaturních buněčných endoteliálních buněk (HUVEC). Dále jsou THP-1 buňky schopny exprese receptorů: Fc $\gamma$ RI a Fc $\gamma$ RII a zvyšují transkripční aktivitu NF- $\kappa$ B. THP-1 buňky obsahují lidské leukocytární antigeny (HLA), ke kterým patří sérotyp lidského leukocytárního antigenu A\*02 (HLA-A\*02). Mezi další sérotypy lidského leukocytárního antigenu patří (B\*15; C\*03; DRB1\*01; DRB1\*15; DRB5\*01/02; DQB1\*05; DQB1\*06) [5] [27] [34] [35] [36].

### 4.1 Kultivace THP-1 buněk

THP-1 buňky se obvykle kultivují v médiu „Roswell Park Memorial Institute 1640“ (RPMI 1640) spolu s inaktivovaným fetálním hovězím sérem (FBS, 10%, obj./obj.), (4- (2- hydroxyethyl)-1-piperazinethanem sulfonové kyseliny (HEPES, 10 mM), pyruvátém sodným (1 mM), 100 nM penicilínem a streptomycínem. Při některých stanoveních se přidává  $\beta$ -merkaptóethanol [1] [31] [35].

Za normálních okolností se buňky inkubují za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Ideální hustota buněk by měla dosahovat 1-8 x 10<sup>5</sup> buněk/ml. Nejčastěji pro analýzy se používá hustota mezi 5-10 x 10<sup>5</sup> buněk/ml. Buňky se za standardních podmínek inkubují 24-48 hodin, ale mohou být inkubovány až 5 dnů [1] [34].

Životaschopnost buněk se stanovuje mikroskopicky za použití trypanové modři nebo pomocí průtokové cytometrie, kde se používá barvivo sytaxová modř [34].

## 4.2 Diferenciace THP-1 monocytů v makrofágy

Při diferenciaci THP-1 monocytů na makrofágy dochází ke snížení nukleo- cytoplazmatického prostoru a zároveň se zvyšuje cytoplazmatický objem. Diferencované makrofágy obsahují zvýšený počet lysozomů a mitochondrií [13].

Lysozom se vyskytuje v tělních tekutinách jako jsou slzy, sliny a jiné. Nachází se v monocytech a makrofázích. V lymfocytech se nevyskytuje. Jeho hlavní úlohou je antivirová a protinádorová aktivita. Kromě THP-1 buněk lysozom obsahují i další nádorové buněčné linie monocytů, ke kterým patří U-937 a HL-60 [11].

Makrofágy obsahují řadu proteáz, které jsou schopné degradovat částice. Částice jsou likvidovány v kyselém prostředí lysozomu. Kyselé prostředí lysozomu je závislé na energii především na protonové ATPázy vakuolárního typu (V-ATPáza) a vodíkových pump. Tyto vodíkové pumpy jsou důležité pro aktivaci proteáz. Mitochondrie potřebují k degradaci částic více energie než lysozomy [13].

Mezi další rysy diferenciace makrofágů patří zvýšení granularity, která se prokazuje zvýšením postranního rozptylu (SSC) na průtokovém cytometru. Na průtokovém cytometru tak můžeme pozorovat zvýšené množství organel, které jsou navázané na membráně makrofágů. U alveolárních makrofágů je diferenciačním rysem autofluorescence, která je velmi nízká u monocytů a dendrických buněk [13].

Při diferenciaci tkáňových makrofágů se vyvíjí rezistence na konstitutivní apoptózu. Konstitutivní apoptóza je děj, který vzniká při odběru séra nebo kultury buněk v nepřítomnosti cytokinů. Monocyty jsou velmi citlivé na tuto apoptózu, protože při jejich migraci do tkáně se nesetkají se stimuly jako je např. LPS, růstové faktory, cytokiny (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) [13].

K diferenciaci THP-1 monocytů na makrofágy se používají diferenciační činidla, ke kterým patří: PMA, RA, VD3 nebo cytokiny (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) [37].

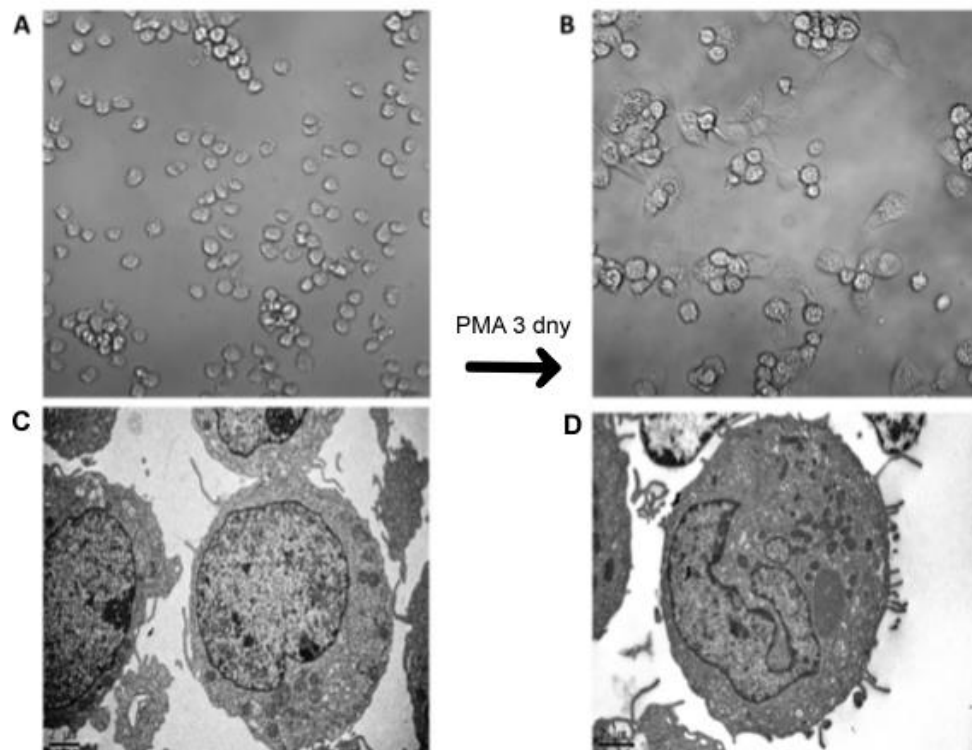
#### 4.2.1 Forbol 12-myristát 13-acetát

PMA je nejčastější činidlo, které se používá k diferenciaci monocytů THP-1 buněk na makrofágy. Po přidání PMA k THP-1 buňkám dochází ke vzniku typických znaků makrofágů, jako je například buněčná adheze, morfologie a zvýšená granularita s typicky nepravidelným jádrem. Fenotyp THP-1 buněk se po přidání PMA liší, což může být ovlivněno také dobou inkubace a použitou koncentrací PMA [31] [38].

Buňky THP-1 jsou obvykle vystaveny účinku PMA 3-72 hodin. Koncentrace potřebná k diferenciaci THP-1 buněk se obvykle pohybuje kolem 6-500 nM, ale záleží na konkrétním výzkumu. Při vysokých koncentracích PMA je u THP-1 výraznější fenotyp a zvyšuje se sekrece prozánětlivých cytokinů jako jsou například TNF, IL-8. Nízká koncentrace PMA u THP-1 buněk indukuje dělení, nestačí ale k diferenciaci buněk [34] [37].

Změny u THP-1 buněk po přidání diferenciačního činidla lze pozorovat v optickém nebo elektronovém mikroskopu [38].

Fotky THP-1 buněk z optického a elektronového mikroskopu jsou znázorněny na obr.3. THP-1 buňky byly inkubovány s 50 ng/ml PMA po dobu 3 dnů.



Obrázek 3: Optická a transmisní mikroskopie diferencovaných THP-1 buněk. Horní část optická mikroskopie. Dolní část transmisní mikroskopie. (A) zobrazuje optickou mikroskopii nediferencovaných THP-1 buněk, (B) zobrazuje optickou mikroskopii diferencovaných THP-1 buněk, (C) zobrazuje transmisní mikroskopii nediferencovaných THP-1 buněk, (D) zobrazuje transmisní mikroskopii diferencovaných THP-1 buněk. Převzato a upraveno z [38].

Dále se při přidání PMA k THP-1 buňkám zvyšuje exprese antigenu CD14. Dalším antigenem, který zvyšuje expresi je CD11b. Při diferenciaci THP-1 buněk se však antigen CD 14 příliš nepoužívá. Detekce tohoto antigenu se využívá především u detekce diferenciaci monocytů HL-60 [31].

Dále se při použití PMA zvyšuje syntéza lysozomu v THP-1 buňkách [11].

## **4.2.2 Kyselina retinová**

Jako další diferenciací činidlo pro THP-1 monocyty se používá kyselina retinová. Kyselina retinová neboli vitamín A má důležitou roli v obranyschopnosti organismu [39].

RA působí jako růstový a diferenciací faktor myeloidních a lymfoidních buněk. Dále RA obsahuje deriváty, které se nazývají retinoidy. Retinoidy regulují růst buněk a podporují buněčnou proliferaci. Jsou také důležité pro vznik vrozené a adaptivní imunitní reakce. Retinoidy jsou používány k terapeutické léčbě u leukémií a jiných typů rakovin [40].

### **4.2.2.1 Buněčný cyklus THP-1 buněk při přidání kyseliny retinové**

Diferenciaci THP-1 buněk začíná v G1 fázi buněčného cyklu a je závislá na čase, dávce a na koncentraci RA. V pozdní fázi G1 buněčného cyklu se uplatňuje cyklin E. Jedná se o regulační podjednotku komplexu cyklin E/cyklin dependentní kináza 2 (CDK2). Cyklin E je důležitý pro přechod buněk z G1 do S fáze a CDK2 je podjednotka, která zodpovídá za enzymatickou aktivitu [40].

Mezi fázemi G1 a S se vyskytuje regulační protein pRb, který může mít vliv na růst buněk. V S fázi buněčného cyklu dochází ke snížení proliferace THP-1 buněk. V této fázi se však zvyšuje exprese povrchového markeru makrofágů CD11b [40].

V THP-1 buňkách dochází ke zvýšení inhibitoru cyklin kinázy p27, který může inhibovat cyklin dependentní kinázy [40].

Aktivní formou kyseliny retinové, je kyselina all-trans retinová (ATRA), která reguluje růst a expresi genu pomocí dvou transkripčních faktorů: receptor retinové kyseliny (RAR) a retinoidní receptor X (RXR) [39].

ATRA má důležitou roli v imunitním systému jako je např. migrace a diferenciaci T lymfocytů, tvorba imunoglobulinu A (IgA) a jeho vylučování z B buněk. V THP-1 buňkách ATRA snižuje syntézu IL-12 a TNF- $\alpha$ , ale zvyšuje produkci IL-10. Dále ATRA zvyšuje imunitní odpověď monocytů a makrofágů na bakteriální složky v organismu [39].

#### **4.2.2.2 Retinoidní receptor**

Jedná se o ligand transkripčního aktivátoru jaderných hormonálních receptorů. Má schopnost vytvářet heterodimery s několika jadernými receptory, které jsou hlavními regulátory signálních drah [41].

RXR má také důležitý vliv na metabolické poruchy, ke kterým se řadí diabetes mellitus 2. typu, hyperlipidémie a ateroskleróza. RXR se podílí na buněčných fyziologických procesech jako jsou proliferace, diferenciaci a apoptóza [41].

#### **4.2.3 Vitamín D3**

VD3 je dalším diferenciacním činidlem THP-1 buněk. Toto diferenciacní činidlo vyvolává diferenciaci a inhibuje proliferaci monocytárních buněk, ke kterým patří THP-1 buňky. Při diferenciaci diferenciacním činidlem VD3 se zvyšuje cytoplazmatický objem THP-1 buněk [13] [42].

THP-1 buňky se vyznačují vysokou expresí ligandu vitamínu D (VDR) a dobře reagují s 1,25-dihydroxyvitamínem D3 (1,25-D3). Expresní VDR je používán jako biomarker pro prognózu různých rakovin jako je například AML. Při diferenciaci THP-1 buněk pomocí VD3 se zvyšuje exprese CD14 a CD11b. Exprese CD14 je indukována na úrovni genové transkripce a vyžaduje syntézu nového proteinu. Exprese CD14 a CD11b se zvyšuje během 6 hodin po ošetření 1,25-D3. 1,25-D3 nestimuluje produkci cytokinů [42] [43] [44] [45].

1,25-D3 se liší od PMA diferenciacním fenotypem. 1,25-D3 obsahuje fenotyp střední diferenciaci, který je typický pro zralý monocyt. PMA obsahuje diferencovaný fenotyp pro zralé makrofágy. 1,25-D3 podporuje replikaci cytomegaloviru (HCMV) v THP-1 monocytech [46].

Při diferenciaci THP-1 buněk se používá koncentrace cca 100 nM 1,25-D3. THP-1 buňky jsou obvykle inkubovány v kultivačním růstovém médiu po dobu 72 hodin [43].

##### **4.2.3.1 Tvorba vitamínu D3**

Vitamín D3 se tvoří z vitamínu D. V lidské kůži dochází ke vzniku 7-dehydrocholesterolu, který je dále přeměněn na pre-vitamín D3. Při hydroxylaci vitamínu D3 vzniká 25-hydroxyvitamín D3 (25 (OH) D3) a poté vzniká 1,25-D3 [47].

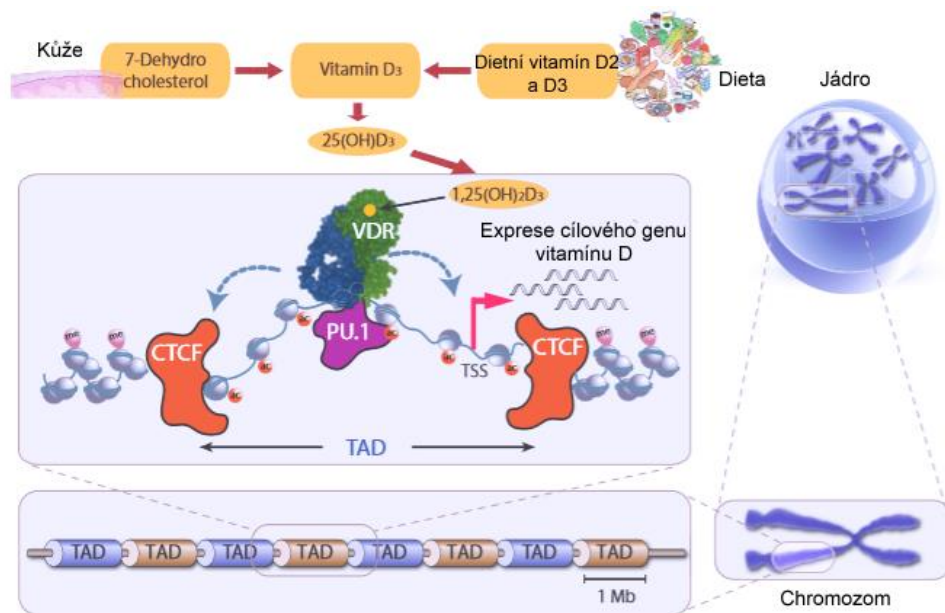
1,25-D3 reguluje homeostázu vápníku a podílí se na obranyschopnosti organismu. Tvoří se v ledvinách a rozklad probíhá v ledvinách a ve střevě, kde sterol indukuje expresi 24-hydroxylázy. Nadprodukce 1,25-D3 způsobuje onemocnění hyperkalcémii, která je spojená

se sarkoidózou, tuberkulózou a různými granulomatózními a revmatoidními artritidami [48] [43]

#### 4.2.3.2 Struktura vitamínu D3

Struktura vitamínu D3 a jeho metabolitů se skládá z lipofilní struktury, která umožňuje molekulám procházet biologickými membránami. Dále se skládá z receptoru, který je aktivován pomocí malých lipofilních molekul. Vzniká doména, která obsahuje 40 aminokyselin nepolárního charakteru a váže ligand VDR. VDR je schopný fixovat 1,25-D3. U VDR dochází ke změně struktury z interakce protein-protein na aktivátor. VDR tím přitahuje jaderné proteiny jako jsou kofaktory a enzymy modifikující chromatin a dochází ke změně na genomických lokusech [47].

Chromatinová struktura vitamínu D3 je znázorněna na obr.4.



Obrázek 4: Chromatinová struktura vitamínu D3: Nahoře je znázorněna produkce vitamínu D3 a jeho metabolitů (25 (OH) D3 a 1,25 (OH)<sub>2</sub> D3). Uprostřed obrázku je receptor vitamínu D3 (VDR), který váže genomovou DNA do komplexu s dalšími proteiny. Spodní a pravá část obrázku znázorňuje velikost topologicky asociované domény (TAD) ve vztahu k chromozomům a jádru. (VDR – receptor vitamínu D, PU.1 – průkopnický faktor, CTCF – proteiny omezující genomové oblasti a definují levou a pravou hranici TAD). Převzato a upraveno z [47].

#### 4.2.3.3 Receptor transkripčního faktoru *in vitro*

VDR udržuje homeostázu vápníku. Expresse VDR je nejvyšší v metabolických tkání jako je střevo, ledviny a kost [48]. Pro popis VDR se používají metody: sekvenování chromatinové imunoprecipitace (ChIP-seq) a metoda nediferencovaných THP-1 lidských

monocytárních buněk [47]. ChIP-seq metoda se dříve používala k detekci kultury *in vitro* a touto metodou se stanovovaly B lymfocyty a buňky kolorektálního karcinomu [47].

V dnešní době se používá spíše metoda nediferencovaných THP-1 lidských monocytárních buněk. THP-1 buněčná kultura má výhodu v neomezeném růstovém potencionálu. Aby nedocházelo k zastavení růstu THP-1 buněk, tak se ke kultuře se přidává diferenciační činidlo 1,25-D3. Při přidání činidla vitamínu D3 dochází ke zvýšení počtu genomických vazeb. Nejvíce genomických změn obsahují THP-1 buňky po 24hodinové stimulaci 1,25-D3 [47].

Pokud chceme získat změny THP-1 buněk z celého genomu, používáme metodu izolace regulačních elementů pomocí formaldehydu (FAIRE-seq). Při použití této metody se zjistilo, že THP-1 buňky obsahují 62 000 chromatinových lokusů, z nichž 9000 lokusů bylo modulováno pomocí 1,25-D3 [47].

### 4.3 Hodnocení diferenciac

K vyhodnocení diferenciac se používají živé THP-1 buňky konkrétně jejich fenotyp. Buňky jsou obarveny sytoxovou modří a jsou pozorovány v mikroskopu s fázovým kontrastem při zvětšení 400x [34].

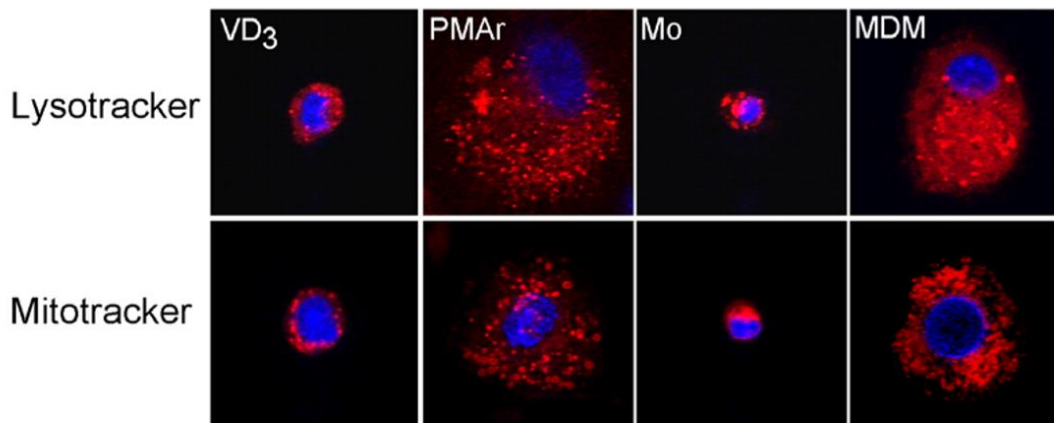
U THP-1 buněk se především stanovuje jejich přilnavost, tj. adherence buněk. Pokud zjišťujeme adherenci THP-1 buněk, tak musí proběhnout kultivace v 6 jamkových destičkách po dobu 48 hodin. K THP-1 buňkám  $2 \times 10^5$  buněk/ml se přidává diferenciační činidlo s koncentrací. Při vysokých koncentracích diferenciačního činidla se zvyšuje přilnavost THP-1 buněk. Přilnavost buněk se počítá po jejich diferenciaci jako podíl adherentních buněk [34].

Dále se u THP-1 buněk hodnotí jejich objem cytoplazmy. Ke zvýšení objemu cytoplazmy dochází po inkubaci s diferenciačním činidlem PMA o koncentraci 8-200 nM [34].

Ve studii Daigneault M. a Julie A. Preston z roku 2010 byly u THP-1 buněk hodnoceny také lysozomy a mitochondrie. Stav lysozomů a mitochondrií byl hodnocen u THP-1 buněk, které byly vystaveny účinkům diferenciačních činidel VD3 a „rested“ PMA (PMAr). PMAr je diferenciační činidlo, ve kterém se THP-1 buňky inkubují po nějakou určitou dobu. Poté u nich dochází k výměně média za médium čisté, které už neobsahuje diferenciační činidlo PMA. Dále lysozomy a mitochondrie byly hodnoceny u monocytů (Mo) a u monocytů diferencovaných v makrofágy (MDM). Ve všech typech buněk byly lysozomy obarveny LysoTrackerem a mitochondrie MitoTrackerem [13].

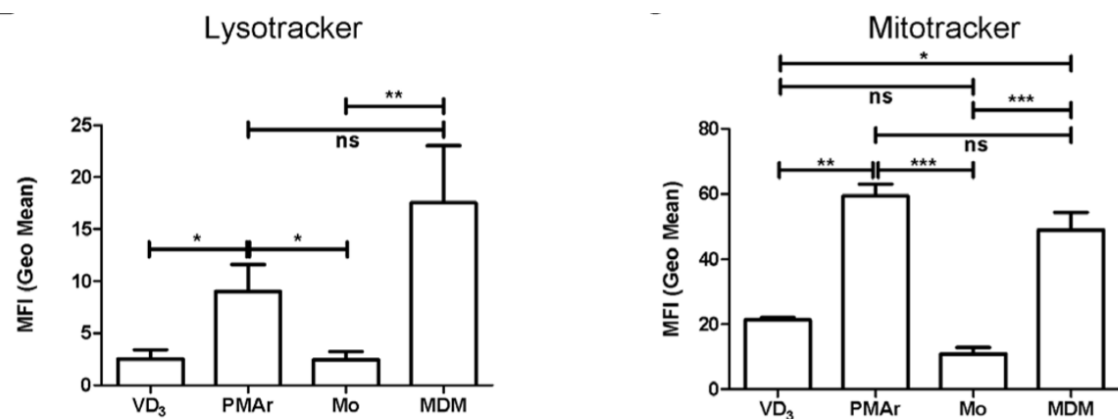


Fluorescenční obrazy THP-1 buněk, které byly obarveny barvivem LysoTracker na lysozomy a barvivem MitoTracker na mitochondrie je znázorněno na obr.5.



Obrázek 5: Fluorescenční obrazy THP-1 buněk. Modrá barva znázorňuje jádro v buňkách. Červená zobrazuje u barviva LysoTracker lysozomy a u barviva MitoTracker mitochondrie. Vitamin (VD3), „rested“ PMA (PMAr), monocyt (Mo), monocyt diferencovaný v makrofág (MDM). Převzato z [13].

Rostoucí počet lysozomů a mitochondrií s makrofágovou diferenciací na průtokovém cytometru je znázorněno na obr.6.



Obrázek 6: Počet lysozomů a mitochondrií v průtokovém cytometru: Na levém grafu se zobrazuje střední intenzita fluorescence geometrického průměru buněk (MFI-Geo mean) po obarvení LysoTrackerem v závislosti na použitém diferenciačním činidle a na pravém grafu je zobrazená střední intenzita fluorescence po obarvení MitoTrackerem v závislosti na použitém diferenciačním činidle. Převzato z [13].

K hodnocení diferenciaci THP-1 buněk se používají metody jako průtoková cytometrie, technika komparativní genové hybridizace (CGH) na mikročipu a polymerázová řetězová reakce (PCR).

### **4.3.1 Průtoková cytometrie**

Průtokový cytometr je přístroj, který měří intenzitu fluorescence buněk. Průtokovým cytometrem prochází signál na fotodiodu, která jej zesiluje a vyhodnocuje strukturu buněk [49].

Průtokový cytometr má dva rozptyly: přední (FS) a boční (SSC). Přední rozptyl nám popisuje množství laserového paprsku, který prochází kolem buňky a popisuje nám relativní velikost buňky. Boční rozptyl měří množství laserového paprsku, který odráží částice a popisuje nám vlastnosti buněk [49].

THP-1 makrofágy se v průtokové cytometrii využívají při měření volného cholesterolu a ke zjištění povrchových markerů [50].

Chceme-li detekovat povrchové markery u THP-1 buněk musíme je nejdříve inkubovat s primární protilátkou. Následuje fixace formaldehydem. Poté dochází k permeabilizaci buněk a v poslední fázi se buňky promývají PBS puftrem. Ke znázornění struktury buněk jsou přidávány značené sekundární protilátky [16].

### **4.3.2 Analýza komparativní genové hybridizace založené na mikročipu**

Technika komparativní genové hybridizace (CGH) je založena na mikročipech, zejména se jedná o techniku oligonukleotidů s vysokou hustotou, čímž se zvýší rozlišení mapování chromozomálních aberací. Dále slouží k identifikaci malých homozygotních delecí a k určování možných umístění tumor-supresorových genů. Geny pro např. apolipoprotein E, matricovou metaloproteinázu 9 a 2 makroglobulin. THP-1 buňky jsou diferencovány pomocí PMA o koncentraci 0,2  $\mu$ m. THP-1 makrofágy reagují při koncentraci 5 ng/ml PMA zvýšenou expresí genů. Koncentrace 10 ng/ml LPS ovlivňuje expresi genů v makrofázích [1].

### **4.3.3 Analýza exprese genů pro cytokiny THP-1 buněk pomocí polymerázové řetězové reakce**

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda, která slouží k detekci nukleové kyseliny. Z nukleové kyseliny můžeme detekovat gen pro cytokiny u ošetřených a neošetřených THP-1 buněk [16] [36].

Při identifikaci cytokinů izolujeme celkovou RNA z THP-1 buněk. Jako izolační činidlo se uvádí Trizol. Pufr se skládá z 1  $\mu$ g celkové RNA a 13  $\mu$ l (1  $\mu$ l oligo-dT, 1  $\mu$ l dNTP a vody bez přítomnosti nukleáz). Poté dochází k zahřívání pufru na 65 °C. Zahřívání probíhá cca 5 minut a poté následuje ochlazení ledem cca 1 minutu. Dále se Trizol pufr smíchá s puftrem pro reverzní transkripci, který obsahuje 4  $\mu$ l 5x First-Stand Buffer, 1  $\mu$ l DTT, 1  $\mu$ l inhibitoru

RNAsy a 1  $\mu$ l reverzní transkriptázy. Jeden mikrolitr komplementární DNA (cDNA) byl amplifikován pomocí PCR a pomocí primerů. Každý cyklus cDNA pro cytokiny působil 30 s při 94 ° C. Dále dochází k nasedání primerů po 30 s při 55 ° C a 1 minutu probíhala extenze při 72 °C. Konečný produkt byl zpracován na agarózovém gelu [16].

Funkce a diferenciací THP-1 buněk může být ovlivňována řadou faktorů jako jsou např. kyslík, enzymy a nanočástice.

## **4.4 Vliv různých látek a nanomateriálů na THP-1 buňky**

### **4.4.1 Vliv a účinky kyslíku na THP-1 buňky**

Při zjišťování účinků kyslíku na THP-1 buňky byla ve studii Grodzki a kolektivu z roku 2013 použita jejich nediferencovaná forma. Nediferencované THP-1 monocyty byly izolovány v kultuře, která obsahovala 18-21 % O<sub>2</sub> bez přítomnosti živin, redukční činidlo 2-merkaptoethanol (2-ME) a sérum. Sérum se do kultury přidává pro zlepšení životaschopnosti buněk. Kultivace THP-1 buněk probíhala 48 hodin [51].

Při samostatném výzkumu byli THP-1 buňky vystaveny různým tlakům kyslíku. Bylo zjištěno, že tlak kyslíku neovlivňuje proliferaci THP-1 buněk, ale změny nastávají při přechodu O<sub>2</sub> z hyperoxického do normoxického prostředí a dochází ke změnám v metabolické aktivitě u nediferencovaných a diferencovaných THP-1 buněk [51].

Při přidání diferenciačního činidla PMA dochází u diferencovaných THP-1 buněk ke zvýšení jejich metabolické aktivity [51].

Kromě THP-1 buněk jsou vlastnosti ostatních myeloidních buněk nejvíce ovlivněny v hypoxickém prostředí. Změny v tomto prostředí nastávají při expresi chemokininových receptorů, sekreci cytokinů, adhezi, migraci, při fagocytóze a životnosti buněk [51].

### **4.4.2 Vliv enzymu $\beta$ -hexosaminidázy na THP-1 buňky**

Enzym  $\beta$ -hexosaminidáza se uvolňuje z makrofágů. Reakce tohoto enzymu spočívá v degradaci okolní tkáně vlivem zánětlivé odpovědi organismu. Tento enzym se uvolňuje tlakem kyslíku, 2-ME a sérem [51].

Při zjišťování hladiny  $\beta$ -hexosaminidázy byli THP-1 buňky vystaveny kyslíku. Při hodnotě kyslíku 5 % se snižuje množství  $\beta$ -hexosaminidázy. Ke snížení množství enzymu, také dochází při odstranění 2-ME a séra z kultury. Nejvyšší hladiny enzymu byly dosaženy v kulturách s 18 % kyslíkem a s 24hodinovou inkubací [51].

### 4.4.3 Účinek etoposidu a kurkuminu

Etoposid (VP16) patří mezi protinádorová léčiva a používá se k léčbě chemoterapií u maligních onemocnění. Účinek etoposidu spočívá ve zlomu dvouřetězové DNA. Mitochondrie reagují na toto poškození uvolněním cytochromu C. Uvolněný cytochrom C váže faktor, který aktivuje apoptickou proteázu (Apaf-1). Proteáza následně aktivuje kaspázu-9 a postupně jsou takhle aktivovány další kaspázy až ke kaspázám-3 a 2. Dále dochází k aktivaci NF- $\kappa$ B a TNF- $\alpha$  [52].

Léčivo kurkumin při apoptóze u THP-1 buněk aktivuje mitogenní aktinové kinázy JNK, ERK a také spouští mediátory proteinů c-Jun a Jun B. Protein Jun B potlačuje nádor u chronické myeloidní leukémie [23].

### 4.4.4 Vliv vitamínu C na THP-1 buňky

Vitamín C má antioxidantní účinky. Snižuje riziko mozkové mrtvice a kardiovaskulárních chorob. Vitamín C reguluje imunitní odpověď, prezentaci antigenu, chemokininů, transkripční regulace a transport cholesterolu. V THP-1 buňkách se vitamín C akumuluje uvnitř buněk a ovlivňuje jejich buněčný cyklus, a to především replikaci DNA a organizaci chromozomů [53].

Intracelulární koncentrace vitamínu C v THP-1 buňkách se pohybuje mezi 20-80  $\mu$ M během 8 až 48 hodin [53].

### 4.4.5 Vliv nanočástic na THP-1 buňky

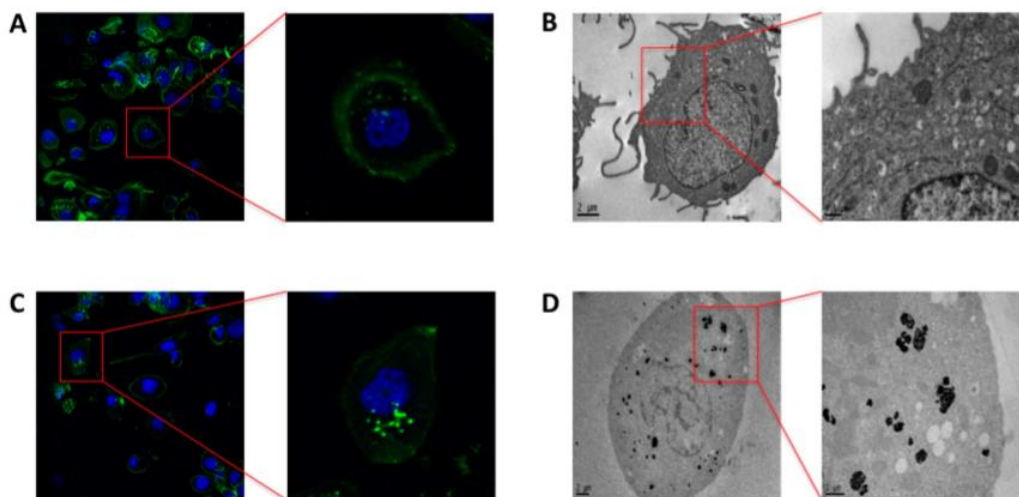
#### 4.4.5.1 Nanočástice platiny

Nanočástice platiny (PtPN) mají antioxidantní účinek a jsou schopny vyladit reaktivní formy kyslíku (ROS). Nanočástice vykazují omezenou toxicitu. Toxicita u buněk se může projevit např. oxidačním stresem, poškozenou DNA nebo zastavením buněčného cyklu. Nanočástice platiny u THP-1 buněk zvyšují adhezi a fagocytózu. Pokud jsou nanočástice potažené citrátem, tak se u PtPN zvyšuje jejich cytocompatibilita, ale nenarušuje se průběh indukce u diferencovaných THP-1 makrofágů *in vitro* [38] [54].

Ve studii Gatto Francesca a Roberta Cagliani z roku 2017 byl popsán účinek PtPN na THP-1 buňkách. THP-1 buňky byly kultivovány, a poté bylo přidáno ke kultuře činidlo PMA 50  $\mu$ g/ml. THP-1 buňky se po přidání diferenciačního činidla pokrývaly 5 nm vrstvičkou PtNP po dobu 24 hodin. Diferenciace THP-1 buněk probíhala po dobu 3 dnů v PMA. V konečném stádiu se THP-1 buňky pozorovaly pomocí konfokální mikroskopie a transmisní elektronové

mikroskopie (TEM). Kde se zjistilo, že PtNP neovlivňují vnitrobuněčnou strukturu u THP-1 buněk [38].

Konfokální a transmisní obrazy THP-1 buněk jsou znázorněny na obr.7.



Obrázek 7: Snímky konfokální a transmisní elektronové mikroskopie snímky neošetřených a ošetřených diferencovaných THP-1 buněk. Ošetření buněk se provádí pomocí PMA. Neošetřené buňky (A), ošetřené buňky (C). Barvení pomocí faloidinu (zeleně) zvýrazňuje cytoskelet po diferenciaci makrofágů indukované PMA (A, C). TEM ukazuje intracelulární strukturu v neošetřených buňkách THP-1 (B) a ošetřených PtNP (D). Převzato z [38].

Nanočástice platiny (PtNP) mají význam v automobilovém, chemickém, biomedicínském a zpracovatelském průmyslu. Katalýza Pt se používá v hydrogenačních reakcích, při oxidaci organických kyselin a oxidu uhelnatého [54].

#### 4.4.5.2 Karboxylové nanodiamondy

Mezi další nanočástice patří karboxylové nanodiamondy. Ve studii Knotigova Pavlína Turanek a Josef Masek z roku 2019 se sledoval vliv karboxylových nanočástic na THP-1 buňky. Nanodiamondy (ND) se používají jako nosiče léčiv a sond pro aplikace *in vitro* / *in vivo*. THP-1 buňky se zjišťuje toxický vliv nanočástic ND [55].

ND mohou způsobit změnu v konformaci proteinů jako jsou: receptory, enzymy, strukturální proteiny, hormony a buněčné signalizační molekuly. Při zvýšení koncentrace ND v orgánech jako jsou plíce, slezina, ledviny a játra, mohou způsobit zánět až patologický stav tkání a orgánů [55].

#### **4.4.5.3 Velmi malé superparamagnetické částice oxidu železa**

Velmi malé superparamagnetické částice oxidu železa (VSOP) mohou být intracelulárně vázány v THP-1 monocytech a makrofázích. U proteoglykanových GAG řetězců se VSOP používá ke zkoumání toxických účinků těchto nanočástic, které jsou pokryté vrstvičkou citrátu [56].

Extracelulární a membránové proteoglykany jsou syntetizovány v THP-1 buňkách. VSOP u THP-1 buněk nezpůsobuje apoptózu ani zhoršení životaschopnosti buněk [56].

#### **4.4.6 *Salmonella Typhimurium* a její vliv v THP-1 buňkách**

*Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* je bakterie, která způsobuje gastroenteritidu. Makrofágy detekují salmonelu pomocí molekulárních vzorů asociovaných s patogenem (PAMP) a LPS. LPS je součástí vnější membrány salmonel. Dalším znakem salmonel je flagelin a složky sekrečního systému [57].

Salmonely jsou schopné v THP-1 buňkách vyvolat buněčnou smrt. Buněčná smrt nastává při vysokých koncentracích PMA tj. 50 ng/ml. Při použití koncentrace (20 ng/ml) PMA nedochází u THP-1 k buněčné smrti. Při použití vitamínu D3, dochází k aktivaci NADPH oxidázy, která omezuje růst salmonel v THP-1 buňkách [57] [58].

Pro hodnocení smrti buněk THP-1 se používá barvivo propidium jodid. Toto barvivo je nepropustné pro membrány, tím nám umožňuje rozlišit životaschopné buňky od umírajících buněk [57].

### **4.5 Výhody a nevýhody použití buněčné linie THP-1**

Mezi výhody buněčné linie THP-1 patří např. homogenní genetické pozadí, které minimalizuje variabilitu ve fenotypu buněk, umožňuje genetickou modifikaci transfekcí genů, sjednocuje protokoly pro dělení buněk na různé typy makrofágů. Další výhodou je doba diferenciací a kultivace buněk. Buněčná linie může být kultivovaná *in vitro* až měsíce beze změny jejich aktivity. Průměrná doba zdvojnásobení buněk se uvádí 35-50 hodin. Buňky se mohou i ztrojnásobit do 3 dnů v přítomnosti média RPMI 1640 s 10% FBS. Velkou výhodou THP-1 buněk je, že neobsahují žádné infekční viry, a proto je jejich použití bezpečné [12] [31].

Negativní vliv na testování THP-1 buněk mají bioaktivní sloučeniny v potravě, léky a chemické sloučeniny, tyto látky mohou způsobit zvýšenou citlivost na LPS. THP-1 buňky jsou velmi citlivé na kultivaci. Monovrstvy buněk v suspenzi mohou podléhat dělení buněk v důsledku neúplnosti kultivačních podmínek, a tím ovlivňují výsledek reakce [12] [31].

## ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce je popis charakterizace, kultivace a diferenciaci buněčné linie THP-1. Je zde popsána i problematika monocytů a makrofágů.

Dále zde popisují změny, které nastávají v THP-1 buňkách při jejich diferenciaci z monocytů na makrofágy. Diferenciaci THP-1 buněk probíhá při přidání diferenciacních činidel jako jsou např. PMA, RA, vitamín D3. Změny jsou patrné v cytoplazmě, adhezi a morfologii buněk. Zmiňuji, zde i vliv některých faktorů, které ovlivňují funkci, morfologii a diferenciaci. Mezi takové faktory patří apoptóza, O<sub>2</sub>, enzymy, nanočástice a bakterie *Salmonella Typhimurium*.

K detekci diferenciaci THP-1 buněk se používají měřicí přístroje, ke kterým patří průtoková cytometrie, CGH založená na mikročipu, PCR v reálném čase. Nejpoužívanější metodou je průtoková cytometrie. Průtoková cytometrie u THP-1 buněk se používá ke stanovení volného cholesterolu z makrofágů a při vyšetření povrchových markerů. Metodou PCR v reálném čase je možné detekovat změny v expresi genů pro cytokiny v THP-1 buňkách.

V závěru bakalářské práce jsou zmíněny výhody a nevýhody THP-1 buněk. Výhodou je, že THP-1 buněčná linie vytváří homogenní genetické pozadí. Může být kultivována *in vitro* až měsíce beze změn její aktivity a používání buněčné linie je bezpečné, protože THP-1 buňky neobsahují infekční viry a produkty. Jejich obrovskou nevýhodou je výrazná citlivost na kultivační podmínky, čímž může docházet k ovlivnění výsledků reakce.

## 5 Seznam použité literatury

- [1] ADATI, Naoki. *High-resolution analysis of aberrant regions in autosomal chromosomes in human leukemia THP-1 cell line*. United Kingdom, London: BioMed Central, 2009, , 153.
- [2] WILSON, Denise D. *Laboratory and Diagnostic Tests - White Blood Cell Count and Differential (Basophil Count, Eosinophil Count, Leukocyte Count, Lymphocyte Count, Monocyte Count, Neutrophil Count, WBC Count and Differential)*. New York, 2008. ISBN 978-0-07-148152-6.
- [3] SAFUAN, Syadia Nabilah Mohd a Mohd Razali Md TOMARI. *White blood cell (WBC) counting analysis in blood smear images using various color segmentation methods*. ENGLAND: ELSEVIER SCI LTD, 2018, , 543-555. ISSN 0263-2241.
- [4] BILLS, Matthew, V, Brandon T NGUYEN a Jeong-Yeol YOON. *Simplified White Blood Cell Differential: An Inexpensive, Smartphone- and Paper-Based Blood Cell Count*. USA: IEEE-INST ELECTRICAL ELECTRONICS ENGINEERS INC, 2019, (18), 7822-7828. ISSN 1530-437X.
- [5] FLEIT, HB a CD KOBASIUK. *THE HUMAN MONOCYTE-LIKE CELL-LINE THP-1 EXPRESSES FC-GAMMA-RI AND FC-GAMMA-RII*. USA: FEDERATION AMER SOC EXP BIOL, 1991, (6), 556-565. ISSN 0741-5400.
- [6] PATEL, Kashyap R, Jacob T ROBERTS a Adam W BARB. *Multiple Variables at the Leukocyte Cell Surface Impact Fc gamma Receptor-Dependent Mechanisms*. SWITZERLAND: FRONTIERS MEDIA SA, 2019, (10). ISSN 1664-3224.
- [7] MOONSOM, Seangdue a Watchara KASINRERK. *Production of Anti-CD14 Monoclonal Antibodies Using CD14 Expressing COS Cells as Immunizing Antigen*. Bangkok: Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology, 2000, (1), 53-61. ISSN 0125877X.
- [8] YÁÑEZ, Alberto, Simon G COETZEE a et AL. *Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes*. United States, Cambridge: Elsevier Limited, 2017, (5), 890-902. ISSN 10747613.
- [9] SUTTON, Jerry S a Leon WEISS. *TRANSFORMATION OF MONOCYTES IN TISSUE CULTURE INTO MACROPHAGES EPITHELIOID CELLS AND MULTINUCLEATED GIANT CELLS - AN ELECTRON MICROSCOPE STUDY*. New York, USA: ROCKEFELLER UNIV PRESS, 1966, (2). ISSN 0021-9525.
- [10] GOASGUEN, Jean E, John M BENNETT a ET AL. *Morphological evaluation of monocytes and their precursors*. Italy: FERRATA STORTI FOUNDATION, 2009, (7), 994-997. ISSN 0390-6078.



- [11] HELAL, Racha a Matthias F MELZIG. *New aspects in the synthesis and secretion of lysozyme by cultured human monocyte cell lines*. Heidelberg, USA: Society for In Vitro Biology, 2010, (6), 492-6. ISSN 10712690.
- [12] CHANPUT, Wasaporn, Jurriaan J, MES a Harry J, WICHERS. *THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach*. AMSTERDAM, NETHERLANDS: ELSEVIER SCIENCE BV, 2014, (1), 37-45. ISSN 1567-5769.
- [13] DAIGNEAULT, Marc a Julie A, PRESTON. *The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages*. United States, San Francisco: Public Library of Science, 2010, (1). DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>.
- [14] GALLIN, ELAINE K, TONI M MASSON a ARIE MORAN. *CHARACTERIZATION OF REGULATORY VOLUME DECREASE IN THE THP-1 AND HL-60 HUMAN MYELOCYTIC CELL-LINES*. New York, USA: WILEY-LISS, 1994, (3), 573-581. ISSN 0021-9541.
- [15] GALLI, Stephen J, Niels BORREGAARD a Thomas A WYNN. *Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils*. United States, New York: Nature Publishing Group, 2011, (11), 1035-44. ISSN 15292908.
- [16] WU, Tsung-Han, Ying-Ying LI a ET AL. *Culture supernatants of different colon cancer cell lines induce specific phenotype switching and functional alteration of THP-1 cells*. SAN DIEGO, USA: ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE, 2014, (1), 107-115. ISSN 0008-8749.
- [17] BAXTER, E.W., A.E. GRAHAM a ET AL. *Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN gamma plus LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes*. AMSTERDAM, NETHERLANDS: ELSEVIER, 2020. ISSN 0022-1759.
- [18] ACEDO, Simone Coghetto. *Participation of leptin in the determination of the macrophage phenotype: an additional role in adipocyte and macrophage crosstalk*. United States, Heidelberg: Society for In Vitro Biology, 2013, (6), 473-8. ISSN 10712690.
- [19] COONDOO, Arijit. *The role of cytokines in the pathomechanism of cutaneous disorders*. Kolkata: Medknow Publications & Media Pvt. Ltd., 2012, (2), 90-96. ISSN 00195154.
- [20] BIENKOWSKI, MJ a TE EESSALU. *PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF INTERLEUKIN-1 RECEPTOR LEVEL ANTAGONIST PROTEINS FROM THP-1 CELLS*. USA: AMER SOC BIOCHEMISTRY MOLECULAR BIOLOGY INC, 1990, (24), 14505-14511. ISSN 0021-9258.

- [21] MASZTALERZ, Agnieszka a Nico VAN ROOIJEN. *Mechanisms of macrophage cytotoxicity in IL-2 and IL-12 mediated tumour regression*. Heidelberg, Netherlands: Springer Nature B.V., 2003, (4), 235-42. ISSN 03407004.
- [22] DIAS-MELICIO, Luciane Alarcão a Reginaldo KELLER FERNANDES. *Interleukin-18 Increases TLR4 and Mannose Receptor Expression and Modulates Cytokine Production in Human Monocytes*. New York: Hindawi Limited, 2015. ISSN 09629351.
- [23] CHU-WEN, Yang, Chang, CHI-LUN a et AL. *Curcumin induces the apoptosis of human monocytic leukemia THP-1 cells via the activation of JNK/ERK Pathways*. United Kingdom, London: BioMed Central, 2012, (12). DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-12-22>.
- [24] ZENG, Chengwu, Wentao WANG a et AL. *Pathways related to PMA-differentiated THP1 human monocytic leukemia cells revealed by RNA-Seq*. Beijing: Springer Nature B.V., 2015, (12), 1282-1287. ISSN 16747305.
- [25] WANG, Yingchao. *Sorting, identification and enrichment of side population cells in THP-1 acute monocytic leukemia cells*. ATHENS, Greece: SPANDIDOS PUBL LTD, 2013, (5), 1923-1931. ISSN 1021-335X.
- [26] STEFFENELLO-DURIGON, Giovanna a Alisson BIGOLIN. *Follow-up and outcome of the twelve-year experience in adult patients with acute promyelocytic leukemia*. Florianópolis, Brazil: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2019. ISSN 2531-1379.
- [27] WANG, Chunmei. *Effect of RNAi-induced down regulation of nuclear factor kappa-B p65 on acute monocytic leukemia THP-1 cells in vitro and vivo*. Netherlands, New York: Springer Nature B.V., 2012, (1-2), 125-33. ISSN 03008177.
- [28] WU, Yingying a Xiujin YE. *Clinical Characterization and Prognostic Factors of 144 Adult Acute Monocytic Leukemia*. WASHINGTON DC, USA: AMER SOC HEMATOLOGY, 2016, (21). ISSN 0006-4971.
- [29] SAGAI, Shun a Mitsuko SUETAKE. *Relationship between respiratory syncytial virus infection and acute otitis media in children*. OXON, ENGLAND: ELSEVIER SCI LTD, 2004, (4), 341-345. ISSN 0385-8146.
- [30] BOSSHART, Herbert a Michael HEINZELMANN. *THP-1 cells as a model for human monocytes*. HONG KONG, CHINA: AME PUBL CO, 2016, (4). ISSN 2305-5839.
- [31] ALDO, Paulomi B a Vinicius CRAVEIRO. *Effect of Culture Conditions on the Phenotype of THP-1 Monocyte Cell Line*. United States, New Haven: Wiley Subscription Services, Inc., 2013, (1), 80-6. ISSN 10467408.
- [32] DELANNOY, Clement P a Yoann ROMBOUTS. *Glycosylation Changes Triggered by the Differentiation of Monocytic THP-1 Cell Line into Macrophages*. Washington, USA: AMER CHEMICAL SOC, 2017, (1), 156-169. ISSN 1535-3893.

- [33] TSUCHIA, Shigeru, Michiko YAMABE a ET AL. *ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF A HUMAN ACUTE MONOCYTIC LEUKEMIA-CELL LINE (THP-1)*. New York: WILEY-LISS, 1980, (2), 171-176. ISSN 0020-7136.
- [34] LUND, Maria E., Joyce TO a et AL. *The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus*. NETHERLANDS: ELSEVIER SCIENCE BV, 2016, , 64-70. ISSN 0022-1759.
- [35] SCHILDBERGER, Anita a Eva ROSSMANITH. *Monocytes, Peripheral Blood Mononuclear Cells, and THP-1 Cells Exhibit Different Cytokine Expression Patterns following Stimulation with Lipopolysaccharide*. London: HINDAWI LTD, 2013. ISSN 0962-9351.
- [36] BATTLE, Richard a Katherine POOLE. *Molecular characterisation of the monocytic cell line THP-1 demonstrates a discrepancy with the documented HLA type*. USA: WILEY-BLACKWELL, 2013, (1), 246-247. ISSN 0020-7136.
- [37] PARK, E, K a H, S JUNG. *Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli*. New York: Springer Nature B.V., 2007, (1), 45-50. ISSN 10233830.
- [38] GATTO, Francesca a Roberta CAGLIANI. *PMA-Induced THP-1 Macrophage Differentiation is Not Impaired by Citrate-Coated Platinum Nanoparticles*. Basel, Switzerland: MDPI AG, 2017, (10).
- [39] HOANG, Thi Xoan, Jong Hyeok JUNG a Jae Young KIM. *All-Trans Retinoic Acid Enhances Bacterial Flagellin-Stimulated Proinflammatory Responses in Human Monocyte THP-1 Cells by Upregulating CD14*. London: HINDAWI LTD, ADAM HOUSE, 2019, (8059312). ISSN 2314-6133.
- [40] CHEN, Qiuyan a A Catharine, ROSS. *Retinoic acid regulates cell cycle progression and cell differentiation in human monocytic THP-1 cells*. SAN DIEGO, USA: ELSEVIER INC, 2004, (1), 68-81. ISSN 0014-4827.
- [41] ZHOU, Lei a Ling-hong SHEN. *Retinoid X receptor agonists inhibit phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-induced differentiation of monocytic THP-1 cells into macrophages*. NETHERLANDS: SPRINGER, 2010, , 283-289. ISSN 0300-8177.
- [42] GUO, Hao a Sheng-yan LIN. *Enhanced Response of Acute Monocytic Leukemia Cells to Low-dose Cytarabine by 1, 25-dihydroxyvitamin D3*. New York, USA: SPRINGER, 2018, (1), 35-42. ISSN 2096-5230.
- [43] IZBAN, Michael G, Bogdan J NOWICKI a Stella NOWICKI. *1,25-Dihydroxyvitamin D3 Promotes a Sustained LPS-Induced NF-kappa B-Dependent Expression of CD55 in Human Monocytic THP-1 Cells*. San Francisco, USA: PUBLIC LIBRARY SCIENCE, 2012, (11). ISSN 1932-6203.

- [44] HMAMA, Zakaria a Devki NANDAN. *1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3-induced myeloid cell differentiation is regulated by a vitamin D receptor-phosphatidylinositol 3-kinase signaling complex*. New York, USA: ROCKEFELLER UNIV PRESS, 1999, (11), 1583-1594. ISSN 0022-1007.
- [45] VEY, E, J H ZHANG a J M DAYER. *IFN-GAMMA AND 1,25(OH)2D3 INDUCE ON THP-1 CELLS DISTINCT PATTERNS OF CELL-SURFACE ANTIGEN EXPRESSION, CYTOKINE PRODUCTION, AND RESPONSIVENESS TO CONTACT WITH ACTIVATED T-CELLS*. ROCKVILLE PIKE: AMER ASSOC IMMUNOLOGISTS, 1992, (6), 2040-2046. ISSN 0022-1767.
- [46] WU, Shu-En a William E MILLER. *The human cytomegalovirus lytic cycle is induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in peripheral blood monocytes and in the THP-1 monocytic cell line*. SAN DIEGO, USA: ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE, 2015, , 83-95. ISSN 0042-6822.
- [47] CARLBERG, Carsten. *Vitamin D Genomics: From In Vitro to In Vivo*. SWITZERLAND: FRONTIERS MEDIA SA, 2018, (9). ISSN 1664-2392.
- [48] DUSSO, AS, S, KAMIMURA a et AL. *Gamma-interferon-induced resistance to 1,25-(OH)(2)D-3 in human monocytes and macrophages: A mechanism for the hypercalcemia of various granulomatoses*. USA: ENDOCRINE SOC, 1997, (7), 2222-2232. ISSN 0021-972X.
- [49] SANJAYA, K.C., Andrea RANZONI a ET AL. *Flow-cytometry detection of fluorescent magnetic nanoparticle clusters increases sensitivity of dengue immunoassay*. AMSTERDAM, NETHERLANDS: ELSEVIER, 2020, , 85-91. ISSN 0003-2670.
- [50] HASSALL, David G. a Annette GRAHAM. *CHANGES IN FREE-CHOLESTEROL CONTENT, MEASURED BY FILIPIN FLUORESCENCE AND FLOW-CYTOMETRY, CORRELATE WITH CHANGES IN CHOLESTEROL-BIOSYNTHESIS IN THP-1 MACROPHAGES*. New York, USA: WILEY-LISS, 1995, (4), 352-362. ISSN 0196-4763.
- [51] GRODZKI, Ana Cristina, Cecilia GIULIVI a Pamela J LEIN. *Oxygen Tension Modulates Differentiation and Primary Macrophage Functions in the Human Monocytic THP-1 Cell Line*. SAN FRANCISCO, USA: PUBLIC LIBRARY SCIENCE, 2013, (1). ISSN 1932-6203.
- [52] SATO, Keiko a Takahiro TANIGUCHI. *Dual role of NF-kappa B in apoptosis of THP-1 cells during treatment with etoposide and lipopolysaccharide*. ENGLAND: PERGAMON-ELSEVIER SCIENCE LTD, 2004, (1), 63-69. ISSN 0145-2126.
- [53] BATRA, Sakshi Dhingra a Malobi NANDI. *Genome-wide expression profiling establishes novel modulatory roles of vitamin C in THP-1 human monocytic cell line*. London, England: BIOMED CENTRAL LTD, 2017, (252). ISSN 1471-2164.

- [54] GURUNATHAN, Sangiliyandi a Muniyandi JEYARAJ. *The Effects of Apigenin-Biosynthesized Ultra-Small Platinum Nanoparticles on the Human Monocytic THP-1 Cell Line*. SWITZERLAND: MDPI, 2019, (5). ISSN 2073-4409.
- [55] KNOTIGOVA, Pavlina Turanek a Josef MASEK. *Application of Advanced Microscopic Methods to Study the Interaction of Carboxylated Fluorescent Nanodiamonds with Membrane Structures in THP-1 Cells: Activation of Inflammasome NLRP3 as the Result of Lysosome Destabilization*. Washington, USA: AMER CHEMICAL SOC, 2019, (8), 3441-3451. ISSN 1543-8384.
- [56] LUDWIG, Antje a Wolfram C POLLER. *Rapid binding of electrostatically stabilized iron oxide nanoparticles to THP-1 monocytic cells via interaction with glycosaminoglycans*. HEIDELBERG, GERMANY: SPRINGER HEIDELBERG, 2013, (2). ISSN 0300-8428.
- [57] STARR, Tregel a Timothy J BAULER. *The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with Salmonella Typhimurium*. San Francisco, USA: PUBLIC LIBRARY SCIENCE, 2018, (3). ISSN 1932-6203.
- [58] VALLE, Eulalia a Donald G GUINEY. *Characterization of Salmonella-induced cell death in human macrophage-like THP-1 cells*. Washington, USA: AMER SOC MICROBIOLOGY, 2005, (5), 2835-2840. ISSN 0019-9567.