



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Villamosmérnöki és Informatikai Kar
XXX Tanszék

Tudományos Diákköri dolgozat

Novák Szabolcs

**EGYEDI IMMUNSEJTEK ELLENANYAG
KÖZVETÍTETT ADHÉZIÓS EREJÉNEK
VIZSGÁLATA SZÁMÍTÓGÉPPEL
VEZÉRELT MIKROPIPETTA ÉS
FLUIDFM SEGÍTSÉGÉVEL**

KONZULENSEK

Dr. Bonyár Attila

Egyetemi docens, Elektronikai Technológia Tanszék

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Dr. Szittner Zoltán

ELKH-EK MFA, Nanobioszenzorika Lendület
Kutatócsoport

Dr. Horváth Róbert

ELKH-EK MFA, Nanobioszenzorika Lendület
Kutatócsoport

BUDAPEST, 2022

Tartalomjegyzék

Absztrakt	4
Abstract	5
1 Rövidítések	6
2 Célkitűzés	7
3 Bevezetés	8
3.1 Számítógép vezérelt mikropipetta	8
3.2 FluidFM	10
3.3 Immunrendszer	11
3.3.1 Immunoglobulinok	14
3.3.2 Fc receptorok	16
3.3.3 Intravénás immunglobulin	17
3.4 Frusztrált fagocitózis.....	17
3.5 THP-1 Sejtek.....	19
4 Anyagok és használt módszerek	20
4.1 Sejtenyészet	20
4.2 Használt oldatok, eszközök.....	20
4.3 Mérés menete	21
4.3.1 Sejtek izolálása	21
4.3.2 Felületek előkészítése	22
4.3.3 Megfelelő koncentrációjú BSA oldat megtalálása.....	22
4.4 Mérés a mikropipettával	23
4.5 Mérés FluidFM-mel.....	24
5 Eredmények és értékelésük	25
5.1 IVIG blokk specificitásának ellenőrzése	25
5.2 Mérési technika pontosságának ellenőrzése során felmerült kérdések.....	26
5.2.1 Számít-e, hogy a sejteket PBS vagy RF oldatban tároljuk-e?	26
5.2.2 Az IVIG éjszakán át történő ikubucációja hat-e a mérésre?.....	27
5.2.3 Számít-e, hogy mérés közben a mérő közegünk PBS vagy RF oldat?	28
5.2.4 FCS hatása a sejtadhézióra	29
5.2.5 Mennyire reprodukálhatóak a mérések.....	30
5.2.6 Megnövelt offset alkalmazása	31

5.2.7 Mérés 96 lyukú mikrotitrálólemezen.....	32
5.2.8 Sejtszám hatása.....	33
5.3 Mérés BSA oldattal.....	34
5.4 FluidFM mérések.....	36
5.4.1 FluidFM és mikropipetta által mért adhéziós erők összehasonlítása.....	37
6 Összefoglalás.....	39
Irodalomjegyzék.....	40

Absztrakt

Az antitestek az immunrendszer által termelt glikoproteinek. A legfőbb feladatuk a szervezetbe került idegen anyagok felismerése, azáltal, hogy egyedi molekulamintázathoz specifikusan kötődnek. Az így megjelölt kórokozókhoz az Fc receptorral rendelkező immunsejtek tudnak kapcsolódni, amely kiváltja az adott sejt effektor funkcióját. Ezen funkciók egyike a fagocitózis, amely során monociták, neutrofil granulociták bekebelezik és elpusztítják az idegen anyagot. Egyes esetekben azonban, amelyeket frusztrált fagocitózisnak neveznek, a célpont túl nagy ahhoz, hogy egyetlen fagocita teljesen elnyelje. Ezen találkozások során az immunsejtek arra törekszenek, hogy maximalizálják a célfelülettel való érintkezési területet, ami vékonyan elterülő sejteket eredményez. Ha az antitestek egy felületre vannak immobilizálva, akkor ez a fagocita és a célfelület közötti érintkezés cipzárszerű tapadást eredményez[1]. A biofizikai módszerek fejlődése lehetővé tette ezen adhéziós kölcsönhatás vizsgálatát egyedi sejteken. Nem csak arra van lehetőségünk, hogy az egyedi aktivációt nyomon kövessük, hanem a tapadás erőssége is mérhető a sejtek megőrzése mellett. Kutatómunkám során THP-1 sejtekkel dolgoztam, amelyek emberi monociták modellezésére alkalmasak. Ezek adhéziós tulajdonságait vizsgáltam immunglobulin indukált frusztrált fagocitózis során. A számítógép vezérelt mikropipetta lehetővé tette a sejtek egyedi aktivációjának a megfigyelését és az adhéziós erejük relatív ábrázolását[2]. A sejtek adhézióját különböző körülmények között vizsgáltam, hogy a mérés technikát minél jobban pontosítsam. Emellett különböző koncentrációjú reagensek mellett is elvégeztem a kísérletet. A méréseket nanofluidikai atomerő mikroszkóp (FluidFM) készülékkel kapott eredményekkel is összehasonlítottam. A FluidFM egy olyan mikrofluidikával ellátott, robotizált Atomerő-mikroszkóp, amely alkalmas egyedi sejtek adhéziós kinetikájának közvetlen rögzítésére[3]. Eredményeik alapján e két módszer lehetővé teszi a sejtek roncsolása nélkül azok manipulálását és jellemzését komplex mintákban. Ez a roncsolásmentes kísérleti megközelítés lehetővé teszi a sejtek kiválogatását és további analizését a különböző stimulusok hatásra bekövetkező aktivációjuk során.

Abstract

Antibodies are glycoproteins produced by the immune system. Their main task is to recognize foreign substances that have entered the body, by specifically binding to a unique molecular pattern. Immune cells with an Fc receptor can connect to the pathogens identified in this way, which triggers the effector function of the given cell. One of these functions is phagocytosis, during which monocytes and neutrophil granulocytes engulf and destroy the foreign material. However, in some cases the target is too large to be completely engulfed by a single phagocyte. During this process called frustrated phagocytosis, immune cells seek to maximize the area of contact with the target surface, resulting in a thin spread of cells. When antibodies are immobilized on a surface, this contact between the phagocyte and the target surface results in a zipper-like adhesion[1]. The development of biophysical methods made it possible to study this adhesion interaction on individual cells. Not only we can monitor the activation of individual cells, but the strength of adhesion can also be measured without damaging the cells. In my research, I worked with THP-1 cells, which are suitable for modeling human monocytes. I investigated their adhesion properties during immunoglobulin-induced frustrated phagocytosis. The computer-controlled micropipette made it possible to observe the individual activation of the cells and to display their relative adhesion strength[2]. I examined the adhesion of the cells under different conditions to make the measurement technique as precise and reproducible as possible. In addition, I also performed the experiment with different concentrations of reagents. I also compared the measurements with the results obtained with a Fluidic force microscope (FluidFM). FluidFM is a robotic Atomic Force microscope equipped with microfluidics that is suitable for direct recording of the adhesion kinetics of individual cells[3]. Based on our results, these methods enable the careful handling, characterization and manipulation of complex samples containing various cell types. This nondestructive approach allows for the downstream analysis of the investigated cells in response to various stimuli.

1 Rövidítések

AFM	Atomic force microscopy	atomerőmikroszkópia
BSA	Bovine Serum Albumin	Szarvasmarha szérum albumin
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Dulbecco féle foszfáttal pufferelt sóoldat
FcR	Fc receptor	Fc receptor
FCS	fetal calf serum	magzati borjúsérum
FluidFM	Fluidic force microscopy	Folyadékérfő-mikroszkópia
Ig	Immunoglobulin	Immunglobulin
IVIG	Intravenous immunoglobulin	Intravénás immunglobulin
PBS	Phosphate-Buffered Saline	Foszfáttal pufferelt sóoldat
PSD	position sensitive detector	pozícióérzékeny detektor
RPMI medium	Roswell Park Memorial Institute medium	Roswell Park Emlékintézet médium

2 Célkitűzés

A munkám célja, hogy számítógép vezérelt mikropipettával és FluidFM technikával vizsgáljam a THP-1 sejtek frusztrált fagocitózis által kiváltott adhéziós tulajdonságait különböző felszíneken és különböző körülmények között.

Elsősorban a szakirodalommal ismerkedem meg. Mivel a THP-1 sejtek monocitoid jellegű sejtek ezért az immunválasz veleszületett ágában kell elmélyülnöm. Az immunsejtek adhéziós képességeit figyelembe véve és hogy a témában eddig milyen felfedezéseket végeztek. Különös figyelmet kell szentelnem az ellenanyagok által kiváltott folyamatokra.

Mivel élő sejtekkel fogok dolgozni így azok kezelését és fenntartását is meg kell ismernem. Így pedig a steril munkakörülmények betartásával kell végezni a feladataimat a sejtekkel és ennek szabályait is el kell sajátítanom.

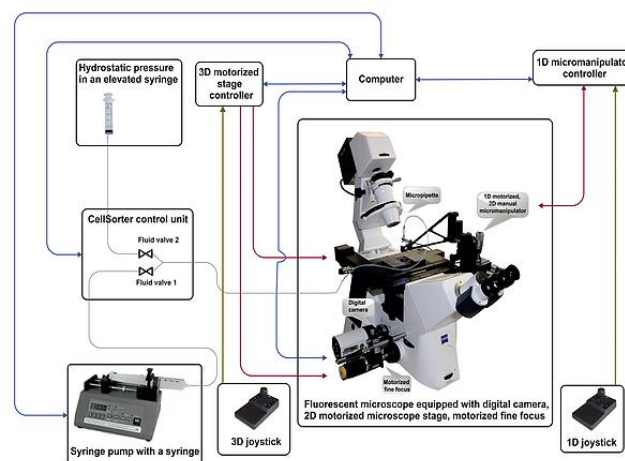
Megismerkedem a használt eszközök elméleti hátterével. Elsajátítom a működtetésüket, helyes használatukat és megtanulom a kapott adatok kiértékelését, a szükséges programok használatát. A két módszerre kísérleti protokollt tervezek, hogy a sejt adhéziót megfelelőképpen tudjam meghatározni. A kapott eredmények alapján pedig majd tudom a két technikát értékelni alkalmasságuk szempontjából és összehasonlítani őket.

3 Bevezetés

3.1 Számítógép vezérelt mikropipetta

A sejtek adhéziójának mérésére a CellSorter Kft. által kifejlesztett sejtválogató mikropipetta rendszert használjuk. Ez a kapilláris alapú mikrofluidikai módszer egyedi sejtek válogatását teszi lehetővé folyamatos vizuális kontroll mellett. Ezért a folyamat teljesen irányítható, és szinte valós időben befolyásolható annak minden lépése. További előnye, hogy a technika jelölésmentes, azaz a sejteket nem feltétlenül kell megjelölni a méréshez.

A rendszer fő eleme a Zeiss Axio Observer egy invertált fluoreszcens mikroszkóp, hozzá kapcsolódik egy Olympus U-CMAD3 kamera. A tárgyasztala motorizált és két dimenzióban mozgatható. Maga a sejteket felszívó mikropipetta egy mikromanipulátor állványhoz csatlakozik. A mikropipettát, illetve a mintatartót is egy-egy joystick segítségével lehet manuálisan vezérelni és amelyek a Märzhäuser cég termékei. A szeleprendszer irányításáért a központi Cellsorter irányító egység felelős. A rendszer minden eleme csatlakozik a számítógéphez és ott vezérelhető a Cellsorter Kft. által készített szoftverrel[4], [5].



3.1. ábra Mérőrendszer vázlatos felépítése (<https://www.cellsorter-scientific.com>)

A letapadt sejtek felszedése szeleprendszer által keltett nyomás segítségével történik. A rendszerre két fecskendő van csatlakoztatva és MQ vízzel van feltöltve. A két fecskendő

egyike felfüggesztve van a mérés síkja fellett, ez biztosítja a magas nyomást a sejtek kinyomásakor. Számunkra a másik fecskendő a lényeges, itt hozzuk létre a vákuumot, amit a sejtek felvételére használunk. A fecskendőt mindig 40ml állásban csatlakoztatjuk a rendszerbe. Azért 40 ml-re állítjuk mert ilyenkor 1.01325 bar nyomás van a fecskendőben. Ha csatlakoztatva növeljük a fecskendő térfogatát nyomáskülönbséget hozunk létre a rendszerben. Ez kiszámítható a következő képlet alapján:

$$p_1V_1 = p_2V_2$$
$$\Delta p = p_2 - p_1$$

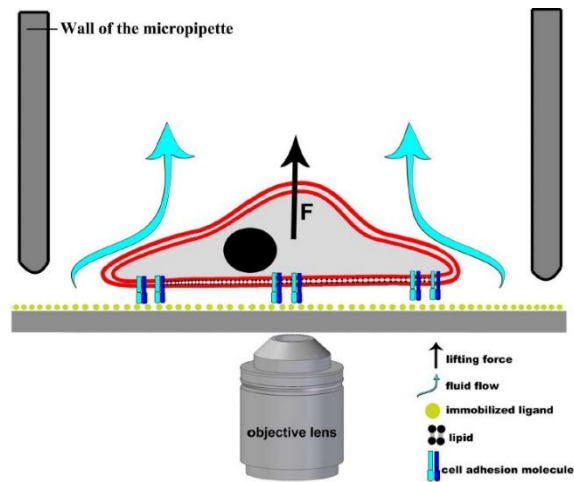
3.1. Egyenlet Boyle–Mariotte-törvény

Ha a fecskendőt 40 ml-ről 50 ml-re állítjuk a fecskendőt a keletkező nyomás különbség 202,65 mbar lesz. Ügyelni kell, hogy a mérések során a fecskendőbe bejutó vizet eltávolítsuk, a nyomás változtatások között.

A sejtek felismerését a Cellsorter program automatikusan végzi. A kijelölt mérési területet megadjuk és a program beszkeneli. A Petri-csésze esetleges egyenetlenségének esetére a program kompenzációs algoritmust kínál, ha beállítjuk a mérési terület négy sarkának a fókuszát, akkor a program egy döntött síkot illeszt a területre. Ez megakadályozza, hogy a mikropipetta beleütközzön a Petri-csésze aljába. A sejtek felismerésére két automatikus algoritmus áll rendelkezésre a hisztogram medián metódus és a lokális variancia módszer. Mi a lokális variancia módszert alkalmaztuk. Állítható a minimális és maximális sejt méret valamint az észlelés érzékenysége. Az értékeket optimalizálni kell, hogy minél kevesebb legyen a hamis detektálások száma. A sejtek közötti legrövidebb utat a program egy utazó ügynök probléma szimuláció alapján számolja ki[5].

Az általunk használt mikropipetta nyílása 70 μm nagyságú. A mérés során a pipetta helyzetét a programban meg kell adnunk, hogy a mikromanipulátor képes legyen az

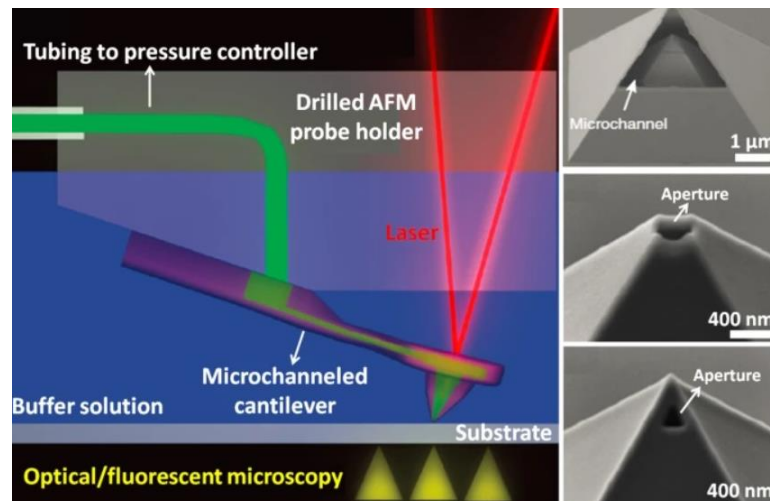
automatikus sejt válogatásra. A pipettának legalább 10 μm -re kell megközelítenie a felszín az optimális működéshez. Mérés közben figyelni kell, hogy ne ütközzön a felszínbe.



3.2. ábra A mérés közben a mikropipetta által egy sejtre ható erők sematikus ábrázolása [4]

3.2 FluidFM

A folyadékérfő-mikroszkópia az atomerőmikroszkóp egy tovább gondolt változata melyben a rugólapkában mikrosatorna található, amelyet nyomásszabályozó rendszerhez csatlakozik. Így létrehozva egy erőérzékeny nanopipettát, amely képes vizes körülmények között működni[6].

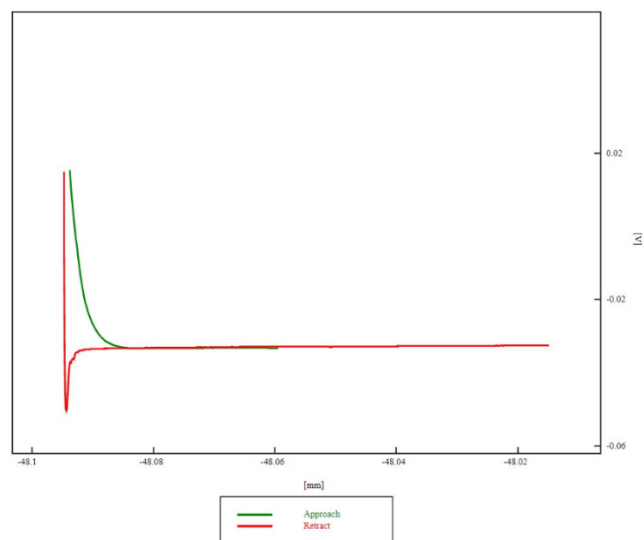


3.3. ábra A FluidFM rugólapjának sematikus rajza és a tûhegyek elektronmikroszkópos képei[6]

Működése az AFM-en alapul, melyben a felszín egy hajlékony rugólapkára rögzített piramidális hegy 'szkenneli' le és maga a rugólapka egy piezoelektromos kristályhoz van rögzítve. Az elmozdulását egy lézer fény segítségével tudjuk megfigyelni, amely a rugólapkáról visszaverődve egy négykvadráns pozícióérzékeny detektoron

(PSD) keresztül tájékoztat a rugólapka elmozdulásairól. Az X-Y scanning során a PSD a jelek változásait a jelfeldolgozó egység elemzi, és a visszacsatoló modulba viszi be, amely vezérli a piezoelektromos csőmeghajtó Z (függőleges) mozgását, hogy a visszacsatolási paraméterek állandóak legyenek, így a minta háromdimenziós topográfiáját kapjuk. Elterjedt biológiai mérésekben élő sejtek elektromechanikai tulajdonságait tudja nyomon követni, így például a sejt adhéziót is vizsgálni. Előnye, hogy a vizes közegben való működése miatt a mintákat fiziológias környezetben lehet tanulmányozni, nagyfokú preparáció nélkül[6], [7].

A FluidFM egy folytonos és zárt csatornával rendelkezik, amely tetszőlegesen kiválasztott folyadékkal tölthető meg, ami a konzol végén található nanométeres nyíláson keresztül lokálisan adagolható. Ez lehetővé teszi az egyedi sejtek precíz manipulációját, szállítását, injektálását. az által, hogy a nyomást változtatjuk. Ha a FluidFM szondát kontakt módban egy sejthez közelítjük és a folyadékcsatornában negatív nyomást alkalmazunk, a sejt függőleges irányban szorosan a rugólapka nyílásához húzható, így a felületről leválva a sejt felvehető. A nyomás megfordításával a sejt a kívánt helyre tehető[8].



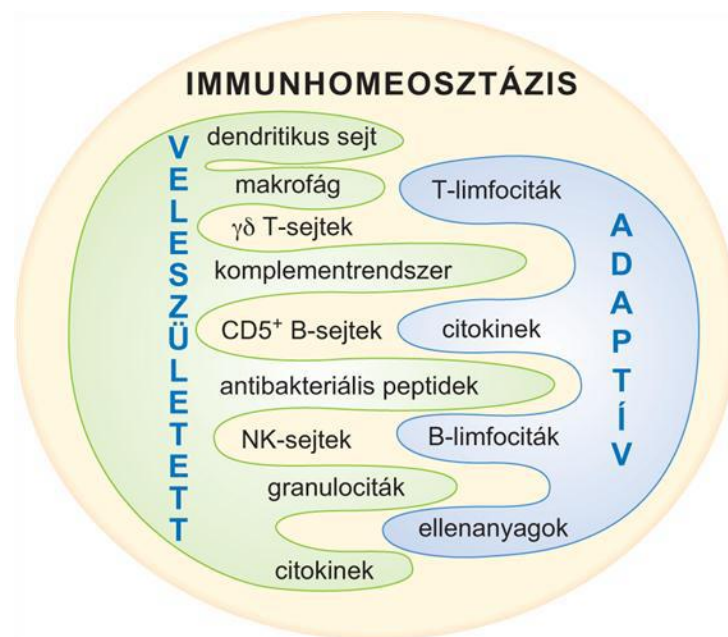
3.4. ábra Általam mért erő-elhajlás görbe egyedi THP-1 sejtén

3.3 Immunrendszer

Az élőlények bonyolult kapcsolatokat alakítanak ki egymással és ezek közül nem mind jó indulatú. Minden élőlény jelentős energiát fektet más fajok fenyegetéseinek azonosítására és semlegesítésére. A fennmaradásuk sikeressége a világban kéz a kézben

jár egy hatékony immunrendszer jelenlétével. Ezért részletes ismerete számunkra elengedhetetlen.

Az immunrendszer fő feladata a szervezetbe behatoló patogének, például baktériumok, gombák vagy vírusok elleni küzdelem. De az is kulcsfontosságú, hogy megvédje magát a mérgeanyagoktól és a megváltozott saját sejtektől, például előregedő vagy rákos sejtektől. Szervezetünk kémiai és szerkezeti gátak komplex hálózatát használja, mint például a bőr vagy a nyálkahártya a homeosztázis fenntartásának érdekében. Az immunrendszer sejtes és humorális elemei biztosítják szervezetünk további védelmét [9], [10].



3.5. ábra A veleszületett és az adaptív immunrendszer együttműködése az immunhomeosztázis fenntartása érdekében.[10]

Az immunhomeosztázis összetevői, ahogy 3.6 ábrán is látható, két alapvető csoportba sorolhatóak; veleszületett és adaptív immunitás. A strukturális akadályok mellett a veleszületett immunitás az invazív fertőzésekkel szembeni kezdeti védelmi vonalként szolgál. Gyors, nem antigén-specifikus reakció, hanem konzervált molekuláris mintázatokra specifikus, a veleszületett immunitás akár azonnal reagálhat. Ennek a gyors válasznak az alapja, hogy a veleszületett immunsejtek receptorai, melyek a csírvonalban kódoltak, felismernek különböző patogén asszociált struktúrákat. Az adaptív immunitás lassabban lép működésbe és biztosítja például az invazív kórokozók teljes felszámolását, valamint az adott patogénre specifikus limfocita populációk megjelenésével, illetve és így az immunológiai memória kialakítását. Az adaptív immunitásként ismert antigén-

specifikus válasz több időt vesz igénybe a fertőzés elleni küzdelemhez.[9] Az antigén-specifikus antitestek plazmasejtek általi létrehozása kulcsfontosságú az adaptív immunitás szempontjából [11].

Az immunrendszer fő sejtjei a monociták, granulociták és limfociták mind különböző fajta fehérvérsejtek. A neutrofil granulociták, makrofágok, monociták, dendritikus sejtek, oszteoklasztok és eozinofilek tartoznak a professzionális fagociták közé. Olyan mintázatfelismerő receptoraik vannak, amelyek felismerik a gazdaszervezetben nem jelenlévő kórokozó-asszociált molekulák (immunstimulánsok) mintázatait, beleértve a mikrobiális DNS-t, a lipideket és a poliszacharidokat, valamint például a bakteriális flagellumokat alkotó fehérjéket. A fagociták a felismert kórokozót képesek bekebelezni majd megemészteni és antigén egyes epitópjait más immunsejteknek prezentálni. A veleszületett immunrendszer antigénprezentáló sejtjei közvetlenül mutatják be a mikrobiális antigéneket a T-sejteknek, hogy adaptív immunválaszt indítsanak el. Ebben a folyamatban kiemelt szerepe van a dendritikus sejteknek.

A limfociták felelősek az adaptív immunválasz elképesztő specifitásáért. Az antigénprezentáló sejtek a patogén bekebelezése után egy közeli perifériás nyirokszervbe vándorolnak ott közvetlenül aktiválják a T-sejteket, hogy reagáljanak a mikrobiális antigénekre. Ez immunológiai választ vált ki, és kölcsönhatásba lépve a keletkező antitestekkel és a T-limfocitákkal (a csecsemőmirigyből származó limfociták) amik fontos effektorsejtek a sejt által közvetített immunitásban. A limfocitáknak másik fajtája a B-limfociták, amelyek a humorális immunitás kulcsfontosságú összetevői, és a csecsemőmirigyől függetlenül a csontvelőből keletkeznek. A humorális immunrendszer elemei, például komplement fehérjék, citokinek vagy antitestek, effektor funkcióik és immunmoduláló hatásuk kifejtésével segítik elő az immunválasz irányítását, finomhangolását a szervezetet érő kihívásnak megfelelően[12].

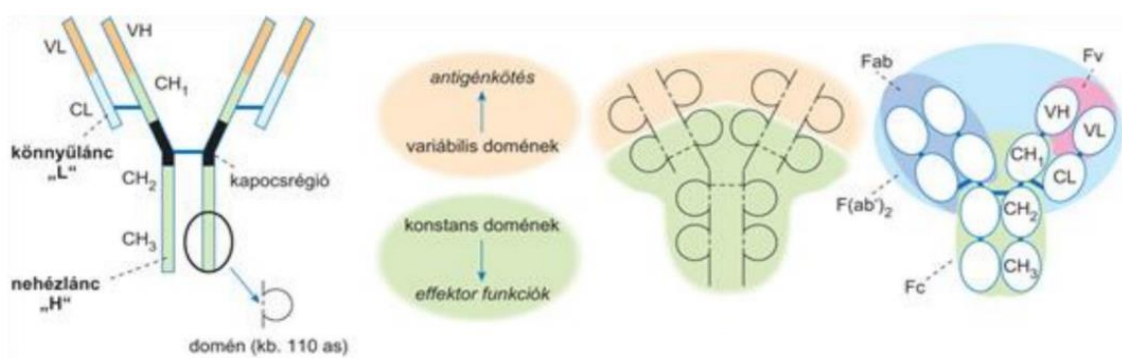
Az immunrendszernek, hogy hatékony maradjon többféle kihívással is szembe kell néznie. A legfontosabb, hogy felismerje a szervezetre káros új anyagokat, amelyek belekerülnek, akár olyanokat is, amelyekkel még soha nem találkozott. Kritikus, hogy képes legyen idomulni a változásokhoz, miközben fertőzésekkel, rákos elváltozásokkal harcol. Ezért fontos, hogy felismerje a hibásan működő saját sejtjeinket is és azokat pusztítsa el mielőtt kárt okoznának. Fontos tulajdonsága továbbá, hogy memóriát

alakítson ki, hogy képes legyen gyorsabban reagálni az általa ismert veszélyes kórokozókra [13].

Annak ellenére, hogy a veleszületett és az adaptív immunitás két külön tárgyalt folyamat, szorosan együtt működnek. A neutrofil granulocita egyik példája ennek a kölcsönhatásnak. A keringő leukociták többsége, vagyis az összes fehérvérsejt 60%-a neutrofil granulocita. A veleszületett immunitás kezdeti védelmi vonalaként működnek az invazív kórokozók ellen. Ezenkívül azáltal, hogy például antitestekkel kölcsönhatásba lépnek, az adaptív immunitás fontos aspektusait közvetítik[10].

3.3.1 Immunoglobulinok

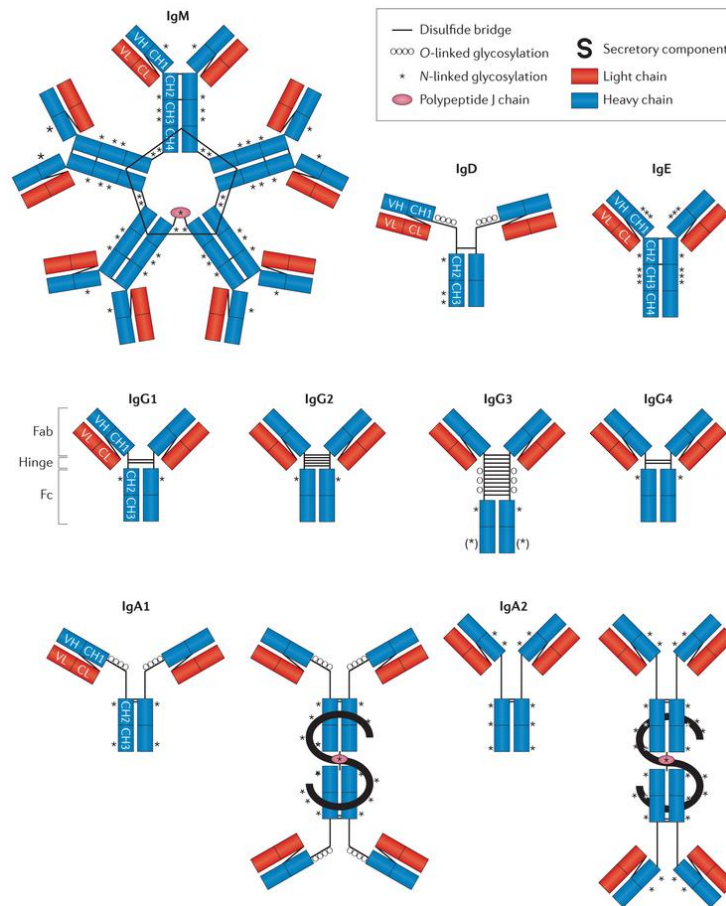
Az adaptív immunitás a behatoló organizmusokra adott válaszként jön létre. A kórokozó-specifikus antigéneket a B-sejtek akár közvetlenül, akár antigénprezentáló sejtekkel (APC) való kölcsönhatás révén ismerhetik fel. Ezután a T-helper sejtek elősegítik a sejtosztódást és az antitestszintézist. Az ellenanyagok, vagyis



3.6. ábra Az immunoglobulin molekula általános szerkezeti felépítése[10]

immunoglobulinok (Ig) glikoprotein molekulák. Általános szerkezetét két könnyű lánc és két nehéz polipeptid lánc alkotja. A láncokat diszulfid hidak kötik össze. N-terminálisán, ahol az antigénekhez kötődik, található az Fv variábilis régió. Ez a 110-130 aminosavból álló variábilis régió adja az antitest specifitását az antigén megkötésére. A változó régió tartalmazza a könnyű és nehéz láncok végeit. Az antitest proteázzal történő kezelése lehasíthatja ezt a régiót, és Fab- vagy fragmens antigénkötődést eredményez, amely magában foglalja az antitest variábilis végeit. A C-terminálisban található nehéz láncok pedig egy konstans szerkezetű régiót alkotnak, amelyet Fc régiónak nevezünk. Ez a régió felelős az effektor funkciók ellátásáért.[10]

Négy elsődleges hatás van, amelyen keresztül az antitestek működnek. A neutralizáció során az antitestek kórokozókhoz vagy toxinokhoz kötődnek, hogy



3.7. ábra A humán immunglobulin izotípusok és alosztályaik sematikus rajza[15]

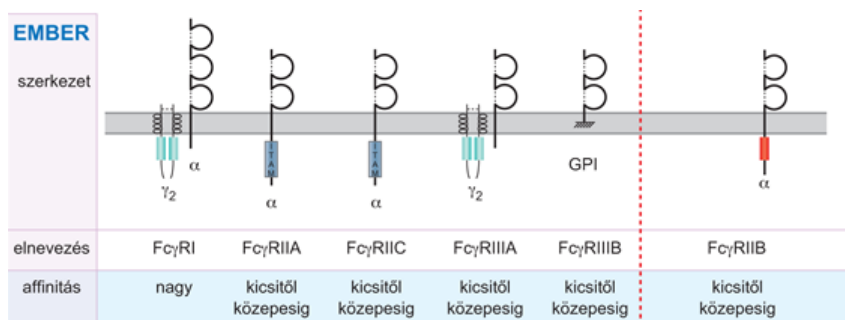
megakadályozzák, hogy a kórokozók sejteket fertőzzenek meg. Az opsonizáció folyamata alatt a megjelölt idegen patogéneket fagociták eliminálják. A komplement rendszer aktiválását is képesek megindítani. A komplement kaskád egy fehérjekomplex képződéséhez vezet a baktériumokon, amelyek képesek azt elpusztítani vagy fagocitákat is aktiválhat, hogy elpusztítsa azokat a baktériumokat, amelyeket egyébként az immunrendszer nem ismerne fel. Az utolsó az antitest-dependens sejt-közvetített citotoxicitás (ADCC). Az ADCC akkor fordul elő, amikor egy antitest egy sejt felszínéhez kötött Fc része kölcsönhatásba lép az immunsejteken, például makrofágokon, NK-sejteken és neutrofileken található Fc-receptorral. Ez arra készíti az immunsejtet, hogy az antitesttel bevont sejtet a lízálja[14].

A B-sejtekből differenciálódó plazmasejtek képesek öt antitest izotípus kiválasztására, amelyek konstans régiójukban és effektor funkciójukban különböznek.

Mindegyik osztályt egy betű jelöli, amely az immunglobulin szó rövidítéséhez kapcsolódik: IgG, IgM, IgA, IgD és IgE. Az IgG osztályú antitestek négy alosztályra (IgG1-4), az IgA osztályú antitestek pedig két altípusra (IgA1-2) bonthatók. A négy humán Ig G-alsztály globális szerkezete nagyon hasonló, de az egyes alosztályok között jelentős különbségek vannak, amelyek befolyásolják kötődésüket a molekulákhoz és receptorokhoz, befolyásolva a funkcionalitásukat[15], [16]. Az ellenanyag alosztályok aminosav-szekvenciája több mint 90%-ban azonos, és főként kapocsrégiójukban különböznek egymástól[16]. Az antigénnel, Fc receptorokkal vagy komplement rendszerrel való kölcsönhatás változó, ami az IgG alosztályok közötti minimális szerkezeti változások jelentősen befolyásolják az általuk kiváltott effektor funkciókra. Az IgG1 antitestek a legszélesebb körben kutatott és a kutatásban használt ellenanyag-izotípusok elterjedtségük és nagy stabilitásuk miatt. Funkcionálisan az IgG3 rendelkezik a legnagyobb hatással, ezt követi az IgG1, az IgG2 és IgG4 pedig kevésbé képes aktiválni az immunsejteket. A rugalmasabb forma nagyobb interakciót tesz lehetővé az antigénnel vagy az FcR-rel, ami javítja az effektor funkciókat a jelenség molekuláris magyarázata szerint[17], [18].

3.3.2 Fc receptorok

Fc-részükön keresztül az antitestek számos receptorhoz kötődhetnek, beleértve az Fc-receptorokat (FcR), a C-típusú lektinreceptorokat, a TRIM21-et vagy a Polimer immunglobulin receptort. Ezek közül az FcR kiemelkedő szerepet tölt be a celluláris immunválasz (FcR-t hordozó immunsejtek által közvetített) és a humorális immunológiai válasz (antitestek által közvetített) áthidalásával. A leukociták többsége, mint a B-sejtek, NK-sejtek, makrofágok, neutrofilek, hízósejtek vagy vérlemezkék, legalább egy osztályú FcR-t expresszálnak[19]–[21]. Az FcR által közvetített effektor funkciók a receptor típusától és az antitest-kölcsönhatás aviditásától függenek[15].



3.8. ábra Ig G-t kötő Fc receptorok[10]

Az IgG-Fc γ R hat altípusra (Fc γ RI, Fc γ RIIA, B, C és Fc γ RIIIA, B) és három osztályra (Fc γ RI [CD64], Fc γ RII [CD32] és Fc γ RIII [CD16]) oszlik. A változatos immunsejtek felületén különböző számú Fc γ R található. Az Fc γ RIIB a neutrofilek által leggyakrabban expresszált fehérje, ezt követi az Fc γ RIIA, Fc γ RI és Fc γ RIIB[22]. Az Fc γ RIIB kivételével az összes IgG-Fc γ R olyan aktiváló receptor, amely az immunreceptor tirozin alapú aktivációs motívuma révén kommunikál. fordulat a gyulladáisos effektor mechanizmusok aktiválódását váltja ki. Ezzel szemben az Fc γ RIIB egy gátló immunreceptor tirozin alapú gátlási motívumon hat, amely az immunsejtek aktivációját gátolja[23].

3.3.3 Intravénás immunglobulin

Az intravénás immunglobulin (IVIG) több mint 1000 véradó plazmájából származó poliklonális IgG antitestekből álló gyógyszer. Eredetileg antitest- kiegészítésre, antitest hiány esetén alkalmazzák, mint például hipogammaglobulinémia, vagy csontvelő-transzplantáció után[24].

Az aggregált vagy felületre rögzített IVIG képes kötődni a makrofágok aktiváló Fc γ receptorához, melyeket keresztköve kiváltja a sejtek aktivációját, például fagocitózist vagy citokin termelést. Kimutatták továbbá, hogy az immunglobulin gátló hatást fejt ki makrofágokon gátló Fc γ RIIB-n, illetve a nagy affinitású Fc γ RI telítésén keresztül és így gyulladáscsökkentő szerepe van. Az intravénás immunglobulin modulálja a veleszületett és adaptív immunválasz különböző sejtjeit, beleértve a dendritikus sejteket, monocitákat és makrofágokat, granulocitákat, természetes ölüsejteket, B-sejteket és a T-sejtek különböző alcsoportjait. Növeli a szabályozó T-sejtek számát, amelyek kritikus szerepet játszanak az immuntolerancia fenntartásában, és gátolja a T-helper sejtek differenciálódását és működését, amelyek számos autoimmun betegségben szerepet játszanak. Az intravénás immunglobulin megváltoztatja a B- és T-sejtek kölcsönhatásait, és csökkenti a patogén antitest-termelést, gyorsítja a patológiás, például autoantitestek kiürülését a szervezetből[25].

3.4 Frusztrált fagocitózis

A fagocitózis egy aktinfüggő, receptor által közvetített mechanizmus, amelyet a sejtek alkalmaznak idegen anyagok (például patogén baktériumok és környezeti hulladékok) és 0,5 μ m-nél nagyobb átmérőjű apoptotikus sejtek elnyelésére és

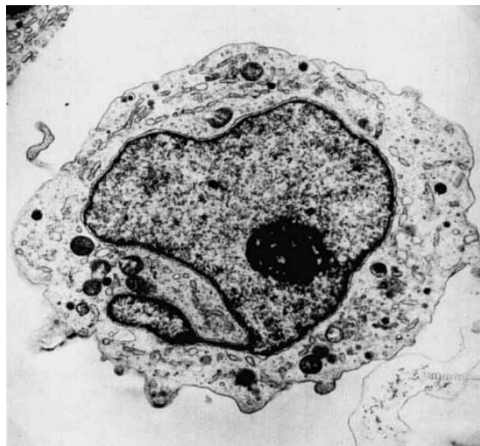
elpusztítására[26]. A professzionális fagocitákként ismert sejtek, amelyek magukban foglalják a makrofágokat, neutrofil granulocitákat és dendritikus sejteket, nagy hatékonysággal képesek fagocitózisa. Ezek a sejtek számos fagocita receptort expresszálnak, amelyek aktiválják a fagocitózist eredményező jelátviteli útvonalakat. Elsősorban a veleszületett immunválasz részeként működik, hogy elpusztítsa a kórokozókat, és elősegítse az adaptív immunológiai választ beindulását a későbbi fertőzések leküzdésére[27].

A fagociták különböző receptorokon keresztül ismerhetik fel a különböző antigéneket. Ide tartoznak az opsonin receptorok, a scavenger receptorok és a Toll-like receptorok. Csak néhány receptorról bizonyították következetesen, hogy alkalmasak a fagocitózis elindítására, ha önmagában expresszálnak olyan sejtekben, amelyek normális esetben nem fagocitálók. Ezek például az antitesttel opsonizált részecskéket felismerő Fc-receptorok vagy a gomba poliszacharidokat felismerő dektin-1-mintázatfelismerő receptorok[26]. A receptorok a célpontokhoz való kötődése lehet közvetlen vagy közvetett, opsoninként ismert közvetítő molekulák segítségével. Az opsoninok, amelyek a vérben és az intersticiális folyadékokban keringenek, és az opsonizációnak nevezett folyamat révén lerakódnak a célpontok felszínére, magukban foglalják például az antitesteket, illetve a komplement kaskád elemeit. A legelterjedtebb antitest izotípus az IgG. Az IgG-vel bevont részecskék FcR-ek általi elnyelése a fagocitózis legjobban ismert modellje[28].

Az aktivált receptorok hatására elindul egy receptor-specifikus intracelluláris jelátvitel, amely a fagociták membránjának fokozatos kiterjedését okozza a célpont felületén. A sejtek membránjának terjedése a hagyományos fagocitózisan véget ér amikor a fagocita membrán bezárul, és egy fagoszóma alakul ki, mely később lizoszómával egyesülve, létrehozza a fagolizozómát, ahol a bekebelezett célpont elpusztítására kerül sor. A célpont egyes esetekben túl nagy ahhoz, hogy egyetlen fagocita teljesen elnyelje, ezt a jelenséget frusztrált fagocitózisnak nevezzük. Az immunsejtek a frusztrált fagocitózis során igyekeznek a lehető legnagyobb mértékben érintkezni a célfelülettel, ami ellaposodott, adheráló sejtekhez vezet, amelyek csak részben fedik a célpontot[1].

3.5 THP-1 Sejtek

A THP-1 egy immortalizált humán monocitoid-sejtvonal. Eredetileg egy gyermekkori akut monocita leukémiás beteg perifériás véréből nyerték ki. A sejtek felszínén találhatóak Fc és C3b receptorok, azonban nincsenek immunoglobulinok. Mivel nehéz nagyszámú humán monocitához jutni és kevés monocitoid sejtvonal ismert ezért izolálása jelentős lépés volt[29]. A THP-1 sejtek, beleértve a génmanipulált származékjaikat, értékes eszközöket jelentenek a monocita szerkezetének és működésének vizsgálatához mind az egészség, mind a betegségek szempontjából[30].



3.7. ábra THP-1 sejt[30]

4 Anyagok és használt módszerek

4.1 Sejtenyészet

A mérések során THP-1 humán monocitoid sejt vonalat használtam, THP-1 (ATCC® TIB-202™), amely akut leukémiás betegből származik. A sejteket 37°C-on 5% CO₂ atmoszférában, RPMI+10% FCS és 100 I.U./mL penicillin és 100 µg/mL streptomycin tartalmú médiumban tartottam fenn 500000-1500000/ml között tartva a sejtek koncentrációját

4.2 Használt oldatok, eszközök

- 1xDPBS oldat (Corning, Corning, New York, Egyesült Államok)
- 5%-os hypoklorit (Avantor, Radnor Township, Pennsylvania, Egyesült Államok)
- 6 lyukú mikrotitrálólemez (6 well, Not- Treated, Polytyrene Costar®; Corning, Corning, New York, Egyesült Államok)
- 70 µm-es mikropipetta hegy (BioMedical Instruments, Zöllnitz, Németország)
- 70%-os Etanol (Molar Chemicals Kft., Halásztelek, Magyarország)
- 96 lyukú mikrotitrálólemez (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Németország)
- Allegra X-30R Centrifuga (Beckman Coulter, Brea, Kalifornia, Egyesült Államok)
- Amphotericin B (Biowest, Nuaille, Franciaország)
- BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok)
- Bürker-kamra
- Cytosurge FluidFM (Cytosurge AG, Zürich, Svájc)
- FBS (Biowest, Nuaille, Franciaország)
- FluidFM konzol #14548 (Cytosurge AG, Zürich, Svájc)
- Humán normál immunglobulin (IVIg) (Bayer, Leverkusen, Németország)
- Kezeletlen felületű Petri-csésze (627161, Greiner bio-one, Hungary)
- Kezelt felszínű Tissue Culture (TC) Petri-csésze (Cellstar 627160, Greiner bio-one, Hungary)
- Kezelt felületű 6 lyukú mikrotitrálólemez (6 well, TC, Polytyrene Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Németország)
- Penicillin-Streptomycin Mixture (Lonza Group AG, Bázél, Svájc)
- RPMI+GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok)
- Sejtválogató mikropipetta rendszer (CellSorter Kft, Budapest, Magyarország)
- Zeiss Axio Observer (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország)

4.3 Mérés menete

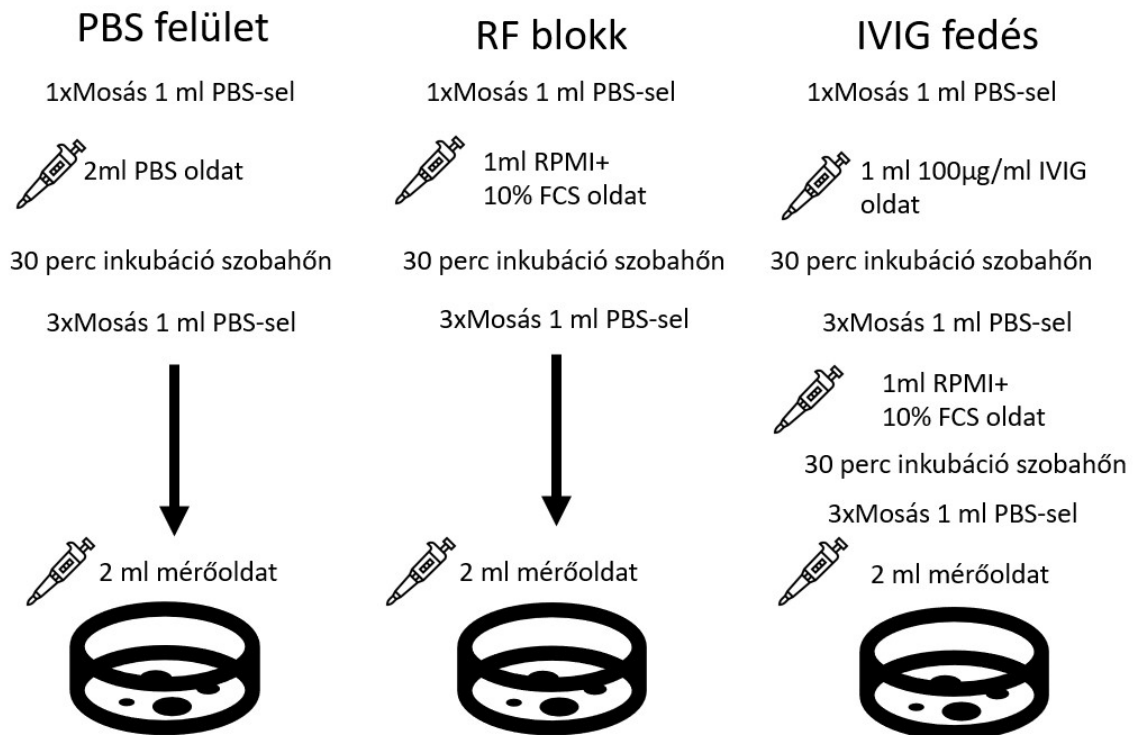
4.3.1 Sejtek izolálása

A THP-1 sejtuszpenzió inkubátorban van tárolva (37,5°C; 5 % CO₂) innen kivéve először fénymikroszkóp alatt megvizsgálom 10x nagyításon. Ellenőrzöm a sejtek morfológiáját.

Mivel oldatban növő sejtek nem kell felületkezelést végeznem, csak 1 ml sejtuszpenziót centrifugacsőbe helyezek és lecentrifugálom 300 relatív centrifugális erőn (RCF) 5 percig 9 gyorsulás és 5 lassulás érték mellett az 1015-ös számú centrifuga betétben. A felülúszót leöntöm majd, a sejteket 3-5 ml PBS oldatban reszuszpendálom, megmosom. Ismét lecentrifugálom azonos beállításokon, majd a sejteket reszuszpendálom 1-5 ml PBS vagy RPMI oldatban, amely 10%-ban tartalmaz magzati borjúsérumot (FCS), továbbiakban RF oldat, az adott kísérlettől függően. A sejtszám meghatározásához két 10-szeres hígítású 100µl-es sejtoldatot készítek, ezekből 10 µl-t pipettázok Bürker-kamrába és megszámlalom a sejteket. A mérések során az egyes 35mm-es Petri-csészékbe, 6 lyukú mikrotitrálólemezen egy lyukba 40000 sejtet pipettázok. A kapott sejtszámok alapján, a sejtuszpenzió hígításának mértékét úgy kell meghatároznom, hogy körülbelül mindig ennyit juttassunk egy Petri-csészébe, wellbe. A 96-os lyukú mikrotitrálólemez esetén egy lyukba körülbelül 1000 sejtet pipettázok be.

4.3.2 Felületek előkészítése

Mind a Petri-csészéket, mind a mikrotitrálólemezt először 1ml PBS oldattal mosom át, majd a megalkotott protokoll szerint készítem el őket.



4.1. ábra Fedési protokollok Petri-csészékben

A méréshez a Petri-csészéket legalább 2ml mérő oldattal kell feltölteni, a lemezen a lyukakat pedig legalább 300 µl oldattal, hogy legyen elegendő folyadék, amely lehetővé teszi a pipetta offset beállítását.

4.3.3 Megfelelő koncentrációjú BSA oldat megtalálása

A szarvasmarha szérum albuminnal (BSA) történő mérések során, azt az RF oldat helyett alkalmaztam blokkolóként. A szilárd BSA-t PBS-ben oldottam fel. Egy 96 lyukú mikrotitrálólemezen egy 4x4 lyukú területen 1, 0,2, 0,04 és 0 %-os BSA oldatot alkalmaztam az IVIG kezelt felület blokkolására és hasonló koncentrációjú oldatokat használtam mérőoldatként. Minden lyukba azonos sejtoldatot helyeztem, majd 10 perc inkubálás után azokat lefotóztam mikroszkóp segítségével és a területek adatait is lementem. Ezután a lemez lyukakból lepipettáztam a mérőoldatot és egy új adag oldatot pipettáztam rá. Majd 10 perc inkubálás után ismét lefotóztam ugyan ott az elmentett terület segítségével. A mérőoldat csere előtti és utáni képeken meghatároztam mennyi sejt maradt a felületen.

4.4 Mérés a mikropipettával

A mérőrendszert felkészítem a mérésre. A pumpa rendszert feltöltöm MQ vízzel, a kettes szelepen lévő fecskendővel, majd a 70 μm -es mikropipettát felszerelem a csatlakozóhoz és azt is feltöltöm MQ vízzel. A fecskendőben azért marad víz, mert ezt fogom a sejtek kimosására használni a hegyből.

A mérésekhez a mikroszkóp 10x objektívjét használom és a kondenzor Ph1 szűrőjét. A Petri-csésze, mikrotitrálólemez behelyezése után a számítógépen beállítom a mérési paramétereket a Cellsorting programmal. A képkészítés paraméterei 4x4 binning, 2048x2048 ROI, 1067 px/mm felbontás és 20 ms expozíciós idő. A scanning ablakban kijelölöm a mérni kívánt területet és beállítom az egyes sarkokon a fókuszpontot. A képek elkészülte után a program a beállításaim alapján automatikusan felismeri a sejteket. Változtatható a minimális és maximális sejterületet, a mérés érzékenysége és az, hogy milyen közel lehet két sejt egymáshoz. Mivel a használt mikropipetta hegye 70 μm -es nyílással rendelkezik csak ennél nagyobb távolság lehet a vizsgált sejtek között. A beállításokat úgy változtatom, hogy közel 100 sejtet vizsgáljak az adott területen, ha lehetséges.

A program ezután megszerkeszti a kiválasztott sejtekre az utat, amelyen végig megy, ezután a következőképpen beállítom a mikropipetta offsetjét:

1. A pipettát az objektív fölé helyezem, majd lassan közelítem a Petri-csésze aljához, közben kocogtatva a mikroszkópot.
2. A szoftver mikromanipulátor ablakában finoman tudom irányítani a mozgást akár 1 μm lépésekben.
3. Ahogy lassan engedem le figyelem a rezgését a pipettának és amint azt abbahagyja megállítom, majd 1 μm -ként emelem a pipettát, közben kocogtatva a mikroszkópot. Amikor elkezd rezegni, az a nullpont.
4. Innen 5 μm -t emelek még a pipettán, és a 'set micropipette offset' gombbal kijelölöm a mikropipetta közepét a kamera képén.

A mérést 6 fecskendő álláson végezem 40/41; 40/43; 40/45; 40/47; 40/49; 40/51 ml, vagyis egyre nagyobb szívóerővel az egyes szelepen található 60 ml-es fecskendővel. A vákuum kialakulása miatt a csőrendszerben van folyadék, de a fecskendőben nem lehet. A keletkező vákuum értékek az 1 képlettel kiszámolva 0,0247, 0,0707, 0,1125, 0,1510, 0,1864 és 0,2189 bar nyomásnak adódnak. Ezek a szívóerők hatnak a letapadt sejtekre.

A mérések során legtöbbször gyárilag kezeletlen felületű Petri-csészéket használtam, de az utóbbi időben 96 lyukú mikrotitrálólemezekre próbáltam a módszert átvinni ezzel csökkentve a szükséges anyagmennyiségeket.

4.5 Mérés FluidFM-mel

Az első lépés a mérőrendszer felkészítése a mérésre. Fontos a bekapcsolási sorrend. Először a Cytosurge rendszer pumparendszerét kapcsolom be majd a mikroszkópot és annak fényforrásait, a rezgésmentes, optikai asztalt, amin a mikroszkóp foglal helyet és végül a számítógépet. A műszer kezelését az ARYA programmal kell végezni. Használat után mindig egy védő konzol van felhelyezve csak ezt eltávolítva tudjuk a mérési konzolt felrakni. Először azonban egy mosó lemezt készítünk mivel a konzol nem állhat a levegőben folyadék tér nélkül beszárad az üreges rugólapka. Ez tartalmaz 5%-os hipoklorit oldatot, 70 %-os alkoholt, MQ vizet és mérési puffert is. Legalább 4 ml-t mérünk be ezekből, hogy a konzolt biztos ellepje.

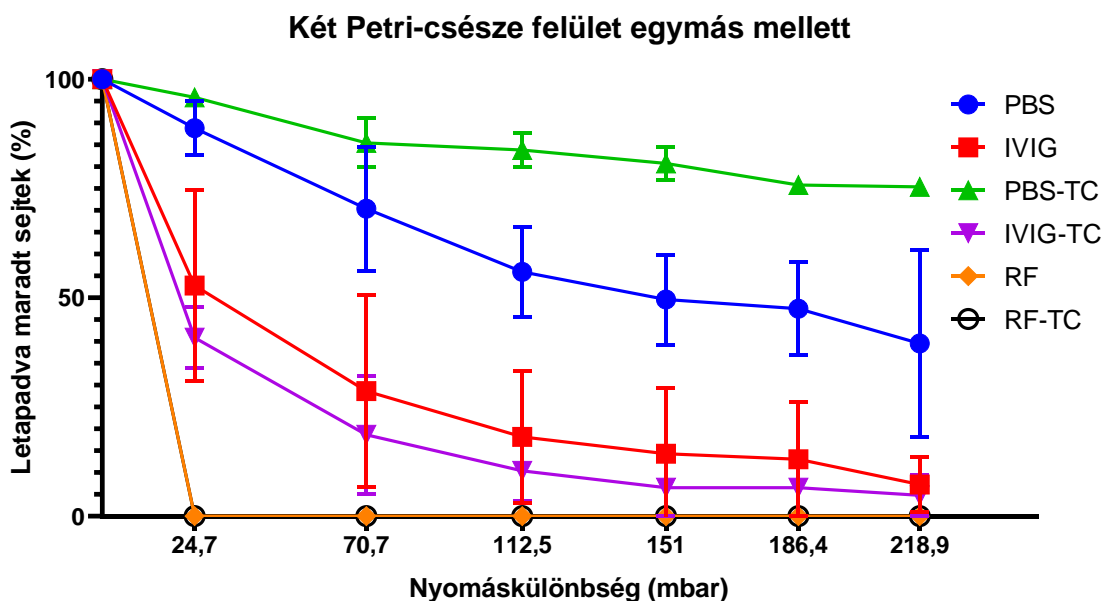
Ezután a mosó lemezt és a konzol tartót behelyezem a mérőtérbe. A program segítségével ledobom a régi konzolt és felhelyezem az újat megkeresve a rugólapkát a mikroszkóp képén. Ezután a lézer szűrőt távolítom el és a lézer fényt a rugólapka közepére állítom. Visszahelyezem a lézerszűrőt és a programban maximalizálom a szignált. Ha új konzolt használok akkor azt ezután a föltöltöm folyadékkal és megmérem a rugó állandóját és ezután ismét maximalizálom a lézer szignálját. Ezután a puffert oldatban megmérem a szenzitivitást és a konzol hegyét középre állítom. A szenzitivitást minden mérés előtt meg kell határozni az üres mérőfelületen 20 mV feszültségen, legalább 3 mérés átlagából. Ügyelni kell, hogy amíg a konzol a levegőben mozog pozitív nyomásérték legyen rajta, hogy ne kerüljön buborék a rendszerbe. A konzolt tartó lemezt ezután már kicserélhetem a mérő lemezemre, amikor készen állok elkezdni a munkát.

A mosási folyamatot minden sejt után el kell végezni, nehogy a rendszer elduguljon. Először magas pozitív nyomáson MQ vízbe majd hipoklorit oldatba helyezem a rugólapkát, majd kétszer mosom két külön MQ vizes lyukban és végül a mérő puffert. A hipokloritos, vizes mosást addig végzem míg az összes sejttörmelék nem távozott a rendszerből. Makacsabb szennyeződés esetén a 70 %-os alkoholban is megmosom. Ügyelek rá, hogy az alkoholos és hipokloritos lyukból sose menjek rögtön a sejtes lyukba, mert ez a sejtek halálát okozza.

5 Eredmények és értékelésük

5.1 IVIG blokk specificitásának ellenőrzése

Annak igazolására, hogy az adhézión értékek az Fc receptor és az IVIG molekula között létrejött kölcsönhatásból származnak. Gyárilag kezelt és kezeletlen Petri-csészék felületét vontam be a protokoll szerint PBS-sel, RF oldattal és 100 μ g/ml IVIG oldattal. A fecskendő állások közötti változásokat feljegyeztem, mennyi sejtet sikerült az adott nyomáskülönbséggel felszedni az egyes körökben, és kiszámoltam, hogy a sejtek hány százalék maradt letapadva a Petri-csésze felszínére. Két féle Petri-csészét használtam, egyet melynek felülete gyárilag kezeletlen, polisztirol volt és egy szövettenyészet kezelt (TC) felületű csészét, melyet gázipárával kezelnek, hogy a hidrofób műanyag felületet hidrofílebbé tegyék. A kiértékelés itt még manuálisan történt. Az RF oldattal kezelve a sejtek adhéziója a felületre nagyon gyenge, ezért már az első mérés során az összes sejtet felszívja a mikropipetta.



5.1. ábra Két féle Petri-csésze felületének összehasonlítása PBS, IVIG+RF és RF kezelés mellett

A PBS és IVIG oldattal kezelt felületek már sokkal érdekesebbek voltak hiszen ott már létrejött sejtadhézió. A csak PBS-sel kezelt felületeken, elektrosztatikus kölcsönhatás történik a sejtek és a Petri-csésze fala között. Ezek a polisztirolból készült Petri-csészék jó adszorbens réteget biztosítanak, ami segíti sejtek felszíni fehérjéinek kihorgonyzását a felülethez. Az eloszlásokon is látható, hogy a gyárilag kezeletlen felület

sokkal nagyobb szórást okoz a mért értékekben, ezen egyenetlenségek miatt, így nem garantált a jó kötőhelyek létrejötte. A TC felületen látható is, hogy több sejt maradt letapadva és a szórás is kisebb. Ez mutatja nekünk, hogy a sejtek különleges kezelés nélkül is képesek kitapadni a Petri-csésze aljára. Viszont kitűnik, ha az RF-et csak magában használjuk akkor az blokkolja a teljes felszín tapadását, ha pedig IVIG mellett alkalmazzuk akkor csak az IVIG-re specifikus kötések maradnak meg a Petri-csésze felületén. Az IVIG-et a THP-1 sejtek Fc receptorai ismerik fel, mely egy többek között fagocitózist is kiváltó receptor, és kiváltja sejtek adhézióját. Látható, hogy ez a specifikus kapcsolat létrejött, hiszen a TC felülettől függetlenül a sejtek hasonlóan reagálnak a növekvő szívóerőre.

5.2 Mérési technika pontosságának ellenőrzése során felmerült kérdések

A mikropipetta bár számítógép vezérelt sok manuális lépése van egy mérés beállítása során. Ez rengeteg hibalehetőséget hordoz magában. A biztosított szoftver nem a legtokéletesebb, sokszor lefagy, ami növeli a kísérleti időt, a sejtek túl sok időt töltenek a nem inkubált környezetben.

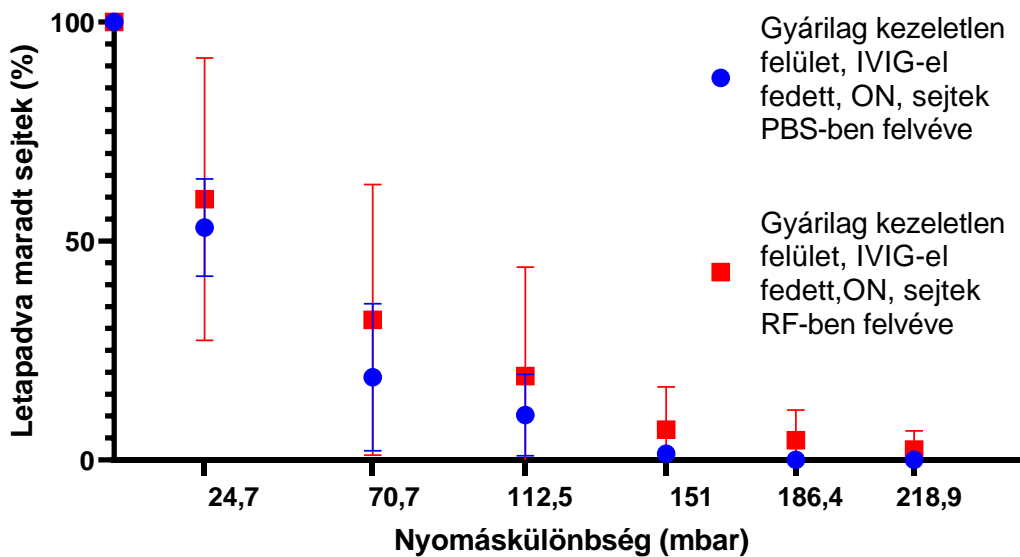
A pipetta hegy magasságát manuálisan kell beállítani az offset beállítás során, amely maga egy nagyon szubjektív folyamat, más- más egyén mást ítél meg tökéletes magasságnak. A mikropipetta irányítója sajnos nem különálló egység így a legkisebb rázóadás is elmozdíthatja pár nm-t, ami nagy távolságokká adódhat össze. Ezért az offsetet nyomásnövelések között szükséges sokszor újra állítani, ami ismét csak növeli a kísérleti időt.

Ezen és még több okból kifolyólag a mérések nehéz reprodukálhatóságát a sejtek biológiai varianciája mellett. Ezért sok mérést végeztem, hogy megnézzem miként lehet a legjobban reprodukálható eredményeket végezni, hogy lehet a mérési módszerünket javítani.

5.2.1 Számít-e, hogy a sejteket PBS vagy RF oldatban tároljuk-e?

A sejteket eleinte, mindig PBS oldatban vizsgáltam és hogy ellenőrizzem ez milyen hatással van a sejtek adhéziójára, RF oldatban is megvizsgáltam. A méréseket olyan Petri-csészében készítettem, amelyeket egy éjszakán át a hűtőben fedtem IVIG

oldattal, egy éjszakán át (ON), és csak mérés előtt RF oldattal. Az RF oldatos mérésből 11, míg a PBS-ből 4 mérést hasonlítottam össze.



5.2. ábra PBS és RF oldatban felvett sejtek összehasonlító diagrammja

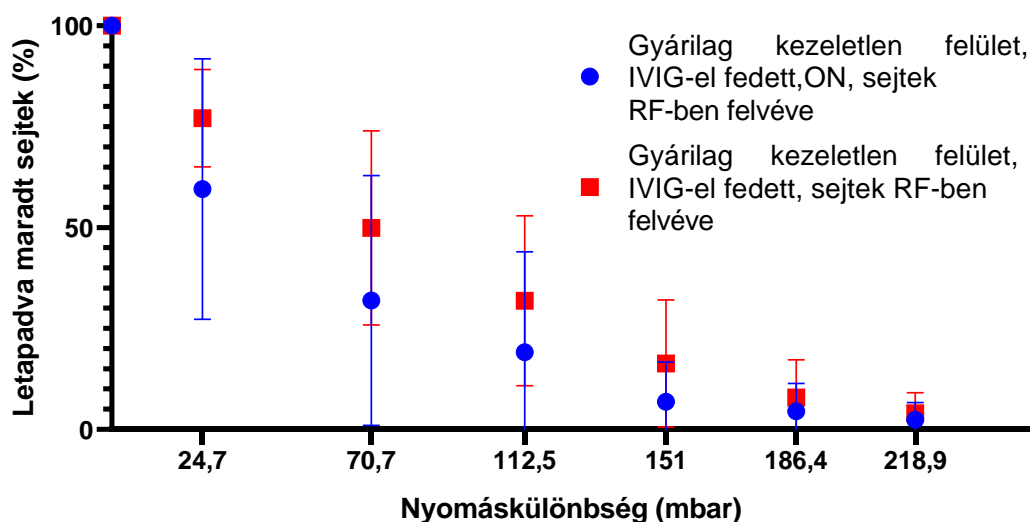
Az 5.2 ábrán látható, hogy bár az RF oldatban nagyobb a szórás egy multitesztes t próba (1. táblázat) szerint nincs szignifikáns különbség.

Szignifikáns?	P érték	PBS-ben felvettsejtek átlaga	RF-ben felvett sejtek átlaga	Különbség	SE különbség	t arány	df	Korrigált P érték
		100	100	0	0			
Nem	0,742299	53,05	59,58	-6,533	19,42	0,3365	12	0,889885
Nem	0,502088	18,88	31,97	-13,1	18,93	0,692	12	0,889885
Nem	0,56516	10,27	19,15	-8,876	15,01	0,5915	12	0,889885
Nem	0,367784	1,427	6,897	-5,471	5,845	0,9359	12	0,889885
Nem	0,294698	0	4,503	-4,503	4,109	1,096	12	0,876902
Nem	0,356766	0	2,405	-2,405	2,509	0,9584	12	0,889885

1. táblázat Multitesztes t próba soronként a PBS és RF oldatban felvett sejtek között

5.2.2 Az IVIG éjszakán át történő ikubucációja hat-e a mérésre?

Következőnek azokat a méréseket vettem össze, amelyeket éjszakai fedéssel készítettem, a protokoll szerinti mérésekkel, megnézni, hogy okoz-e különösebb eltérést a sejtek tapadásába. A méréseket RF oldatban kivett sejtekben végeztem, gyárilag kezeletlen felületű Petri-csészékben. Az ON mérésekből tizenegyet míg a protokoll szerinti mérésekből tizennégyet vettem össze.



5.3. ábra Aznapi és éjszakan át tartó IVIG blokkolás összevetése

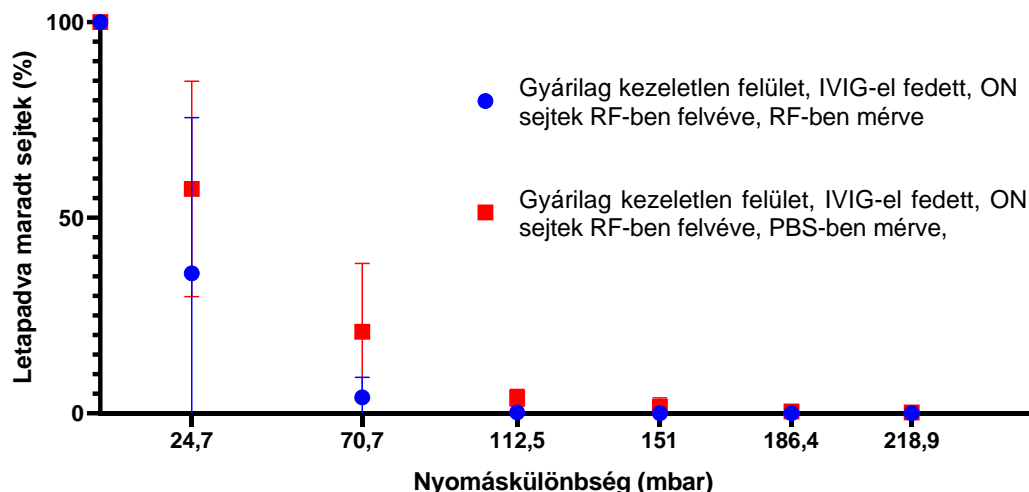
A 5.3-es ábrán látható, hogy az ON mérések szórása sokkal nagyobb, azonban a multitesztes t próba (2. táblázat) itt sem talált szignifikáns különbséget.

Szignifikáns?	P érték	ON felület mérés átlaga	Nem ON felület mérés átlaga	Különbség	SE különbség	t arány	df	Korrigált P érték
		100	100	0	0			
Nem	0,072543	59,58	77,11	-17,53	9,317	1,882	23	0,234376
Nem	0,116028	31,97	49,92	-17,95	10,99	1,633	23	0,234376
Nem	0,17886	19,15	31,89	-12,75	9,192	1,387	23	0,270973
Nem	0,094901	6,897	16,37	-9,476	5,44	1,742	23	0,234376
Nem	0,327325	4,503	7,89	-3,387	3,384	1,001	23	0,396717
Nem	0,405382	2,405	4,019	-1,615	1,905	0,8476	23	0,409436

2. táblázat Multitesztes t próba soronként az asznapi és éjszakan át tartó IVIG fedés között

5.2.3 Számít-e, hogy mérés közben a mérő közegünk PBS vagy RF oldat?

A mérések során legtöbbször a mérő közeg az az oldat volt, amiben a sejteket kivettem. Felvetődött, hogy ellenőrzöm melyik jobb mérőközeg a szórás szempontjából. Ebből a célból négy-négy mérést végeztem ON IVIG felülettel és a sejteket RF oldatban vettem fel, majd így mértem be a 40000 sejt/ml sejtszámot a feltöltött Petri-csészékbe és a mérés előtt a sejteket RF vagy PBS-be tettem az adhézión vizsgálat idejére.



5.4. ábra Mérés összehasonlítása RF-ben és PBS-ben

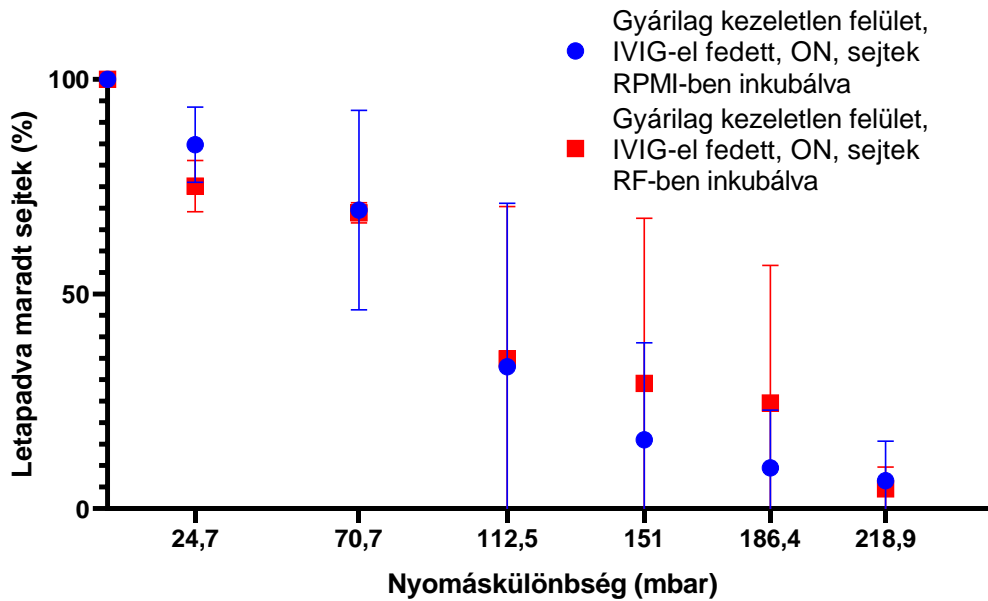
A tapadás a kísérletek során ismeretlen okok miatt nem volt teljesen megfelelő a sejtek hamar feljöttek. Az látható a 5.4-os diagrammon, hogy a szórás RF oldatban sokkal nagyobb, de a t próba, 3. táblázat, szerint nincs szignifikáns különbség a két mérés között.

Szignifikáns?	P érték	RF-ben mérés átlaga	PBS-ben mérés átlaga	Különbség	SE különbség	t arány	df	Korrigált P érték	
Nem	0,406601	100	100	0	0	24,19	0,8923	6	0,410667
Nem	0,116294	4,093	20,83	-16,74	9,125	1,834	6	0,35237	
Nem	0,015252	0,2425	3,973	-3,73	1,111	3,359	6	0,092426	
Nem	0,179415	0	1,703	-1,703	1,12	1,52	6	0,362418	
Nem	0,355918	0	0,5	-0,5	0,5	1	6	0,410667	
Nem	0,355918	0	0,25	-0,25	0,25	1	6	0,410667	

3. Táblázat Multitesztes t próba soronként az RF és PBS mérések összehasonlítására

5.2.4 FCS hatása a sejtadhézióra

A sejteket eddig mindig RF oldatban inkubáltam, ami 10%-os FCS tartalmazott. Megvizsgáltam, hogy tiszta RPMI tápoldatban is hasonlóan viselkednek-e majd a sejtek. Egyes sejteket egy éjszakán át RPMI-ben inkubáltam míg egy másik adagot RF oldatban. Két-két mérést végeztem ON IVIG-nal kezelt Petri-csésze felszíneken.



5.5. ábra Sejtek inkubálása egy éjszakán át RF és RPMI oldatban

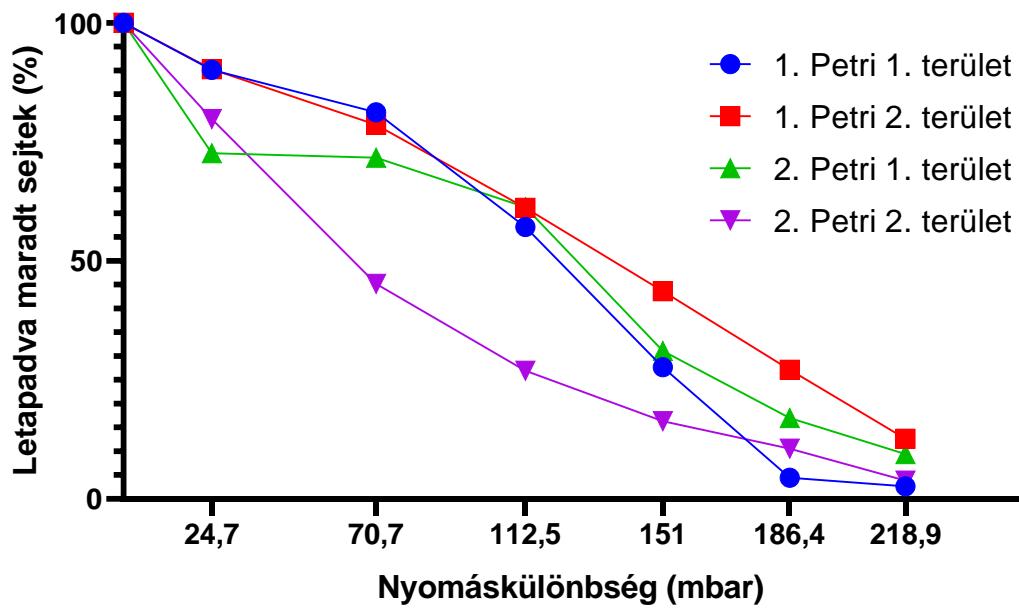
Az adhéziós képességek között nem látható számottevő különbség és ezt a t próba is igazolja.

Szignifikáns?	P érték	RPMI inkubálás átlaga	RF inkubálás átlaga	Különbség	SE különbség	t arány	df	Korrigált P érték
		100	100	0	0			
Nem	0,329424	84,79	75,16	9,625	7,529	1,278	2	0,984122
Nem	0,974378	69,53	68,93	0,6	16,55	0,03625	2	0,984122
Nem	0,964687	33,06	34,9	-1,84	36,82	0,04997	2	0,984122
Nem	0,71716	16	29,16	-13,16	31,56	0,417	2	0,984122
Nem	0,601056	9,5	24,62	-15,12	24,57	0,6153	2	0,984122
Nem	0,820259	6,5	4,58	1,92	7,43	0,2584	2	0,984122

4. Táblázat Multitesztes t próba soronként az RF és RPMI oldat inkubálás között

5.2.5 Mennyire reprodukálhatóak a mérések

Ahhoz, hogy megtudjam mennyire reprodukálhatóak a mérések ugyanazon Petri-csészén mértem le két külön területet azonos felületen Gyárilag kezeletlen Petri-csészén végeztem a méréseket ON IVIG-nal kezelt felszínen és RF oldatban.

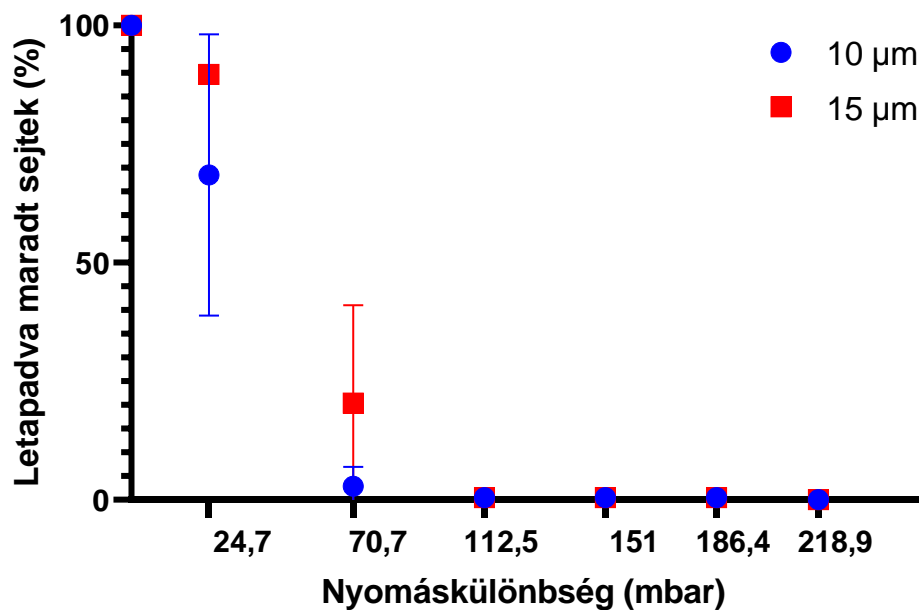


5.6. ábra Egyedi mérési sorok azonos Petri-csészéken

A területek között nincs szignifikáns eltérés párosítatlan t-próba alapján, vagyis hasonló eredményeket kaphatunk, ha egy Petri-csészén több területet is megmérünk. Azonban figyelni kell az időt mivel túl sok idő elteltével a sejtek elkezdhetnek elpusztulni.

5.2.6 Megnövelt offset alkalmazása

Az offset beállítása során ideális esetben 10 μm távolságra van a mikropipetta, megnéztem mi történik, ha a vélt beállítás után még 5 μm emelek a pipetta nulla pontján.

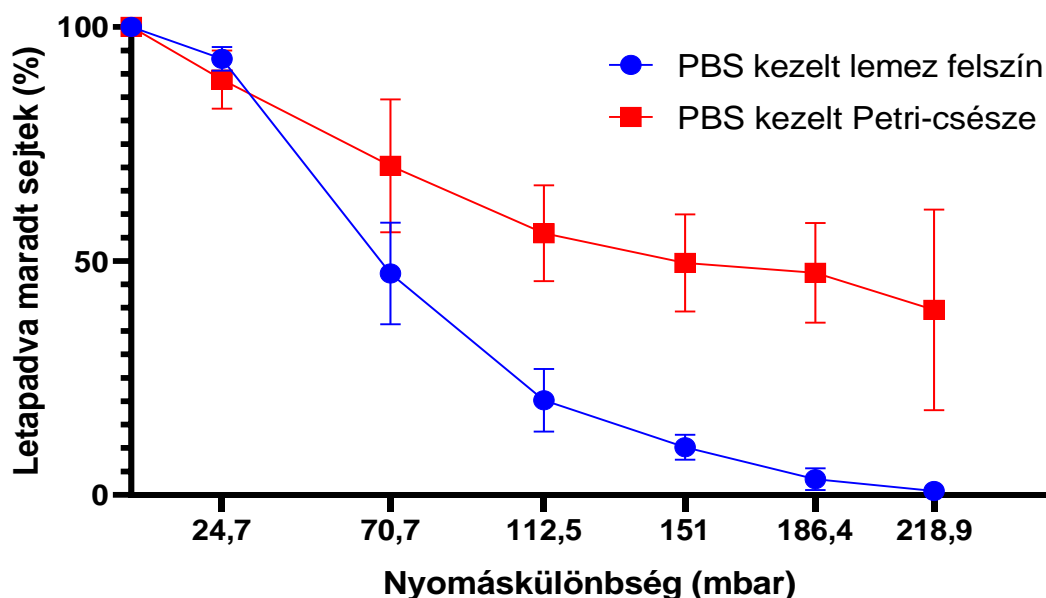


5.7. ábra Offset növelésének hatása

A kísérlet nem volt teljesen sikeres mivel a sejtek adhéziós ereje nem volt megfelelő és így nem sikerült elég adatot felvenni, hogy biztos következtetést tudjak levonni.

5.2.7 Mérés 96 lyukú mikrotitrálólemezen

Azért, hogy csökkentsem a használt vegyszermennyiséget és sejtszámot elkezdtem az eddigi mérések elvét átültetni 96 lyukú mikrotitrálólemezen történő mérésre. A pipetta beállításánál itt sokkal óvatosabbnak kell lennem és kevesebb sejtet tudok mérni egyszerre, de kezeletlen felületen biztató eredményeket kaptam. Három Petri-csészés mérést hasonlítottam össze két lemezen történt méréssel.



5.8. ábra Petri-csésze és mikrotitrálólemez nonspecifikus adhéziójának összehasonlítása

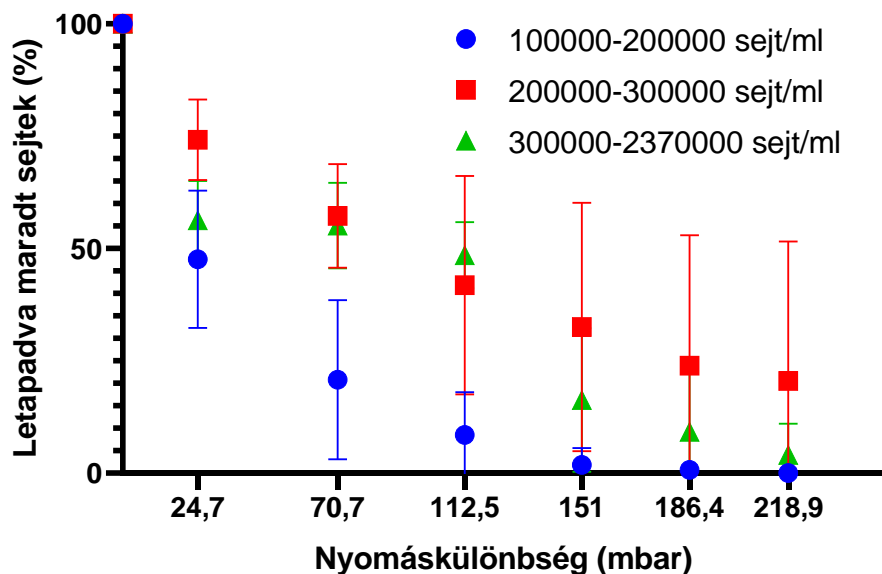
A lemezen az adhézió kisebb, de multisoros párosítatlan t-próba alapján, ahogy a táblázatban látható nincs szignifikáns különbség a két módszer között.

Szignifikáns?	P érték	PBS kezelt lemez átlaga	PBS kezelt Petri-csésze átlaga	Különbség	SE különbség	t arány	df	Korrigált P érték
		100	100	0	0			
Nem	0,432602	93,19	88,8	4,387	4,852	0,9041	3	0,432602
Nem	0,151553	47,33	70,37	-23,05	12,04	1,914	3	0,280137
Nem	0,02403	20,26	55,92	-35,66	8,412	4,239	3	0,092711
Nem	0,015201	10,19	49,58	-39,4	7,844	5,023	3	0,073731
Nem	0,011805	3,36	47,48	-44,12	8,017	5,504	3	0,068774
Nem	0,094407	0,86	39,52	-38,66	16	2,417	3	0,257323

5. Táblázat Multitesztes t próba soronként a PBS kezelt Petri-csésze és mikrotitrálólemez között

5.2.8 Sejtszám hatása

A véletlenszerűen jelentkező sejtadhézió csökkenést magyarázhatja az, hogy amikor a THP-1 sejtpopulációja túl nagy számot ér el és ekkor megnő az Fc γ RIIb receptor expresszációja, ami gátolja a sejtek fagocitáló képességét. Így az IVIG felületre nem tapadnak ki.[31] A vizsgálat során három sejtenyészetet tartottam fenn egy 6 lyukú TC mikrotitrálólemezen. Egy 570000 sejt/ml koncentrációjú törzsoldatból hígítottam sejteket, úgy, hogy a lyukakban a kezdeti koncentráció 500000 sejt/ml 250000 sejt/ml 175000 sejt/ml legyen. Ezután több napon keresztül mértem mintákat a lyukakból a sejtszám meghatározása mellett.



5.9. ábra Sejtszám hatásának vizsgálata a sejt adhéziós képességére

Szignifikáns?	P érték	100000-200000 átlaga	200000-300000 átlaga	Különbség	SE különbség	t arány	df	Korrigált P érték
		100	100	0	0			
Nem	0,023783	47,6	74,2	-26,6	8,843	3,007	6	0,113393
Nem	0,013754	20,78	57,22	-36,45	10,59	3,443	6	0,079738
Nem	0,043357	8,528	41,85	-33,32	13,06	2,552	6	0,16247
Nem	0,070284	1,865	32,55	-30,68	13,96	2,198	6	0,196379
Nem	0,161057	0,7475	23,94	-23,2	14,51	1,598	6	0,296175
Nem	0,234312	0	20,51	-20,51	15,51	1,322	6	0,296175
Szignifikáns?	P érték	200000-300000 átlaga	300000-2370000 átlaga	Különbség	SE különbség	t arány	df	Korrigált P érték
		100	100	0	0			
Nem	0,045693	74,2	56,27	17,93	6,778	2,645	5	0,244683
Nem	0,809171	57,22	55,12	2,099	8,245	0,2546	5	0,928357
Nem	0,67341	41,85	48,48	-6,633	14,83	0,4472	5	0,928357
Nem	0,409752	32,55	16,28	16,27	18,09	0,8992	5	0,928357
Nem	0,457442	23,94	9,23	14,71	18,28	0,8049	5	0,928357
Nem	0,417949	20,51	4,04	16,47	18,66	0,8824	5	0,928357
Szignifikáns?	P érték	100000-200000 átlaga	300000-2370000 átlaga	Különbség	SE különbség	t arány	df	Korrigált P érték
		100	100	0	0			
Nem	0,424762	47,6	56,27	-8,668	9,978	0,8687	5	0,564641
Nem	0,030187	20,78	55,12	-34,35	11,46	2,997	5	0,142092
Igen	0,001823	8,528	48,48	-39,96	6,641	6,017	5	0,01089
Nem	0,132013	1,865	16,28	-14,42	8,015	1,798	5	0,432386
Nem	0,242093	0,7475	9,23	-8,483	6,396	1,326	5	0,564641
Nem	0,285591	0	4,04	-4,04	3,38	1,195	5	0,564641

6. táblázat Multitesztes t-próba a különböző sejtszám tartományok között

A sejtszámokat csak olyan tartományban tartottam fenn, mint amelyekkel az eddigi mérések során találkoztam. A kapott eredmények alapján egy ponton 112,5 mbar nyomáson volt szignifikáns eltérés a legkisebb és a legnagyobb koncentrációjú mérések között.

5.3 Mérés BSA oldattal

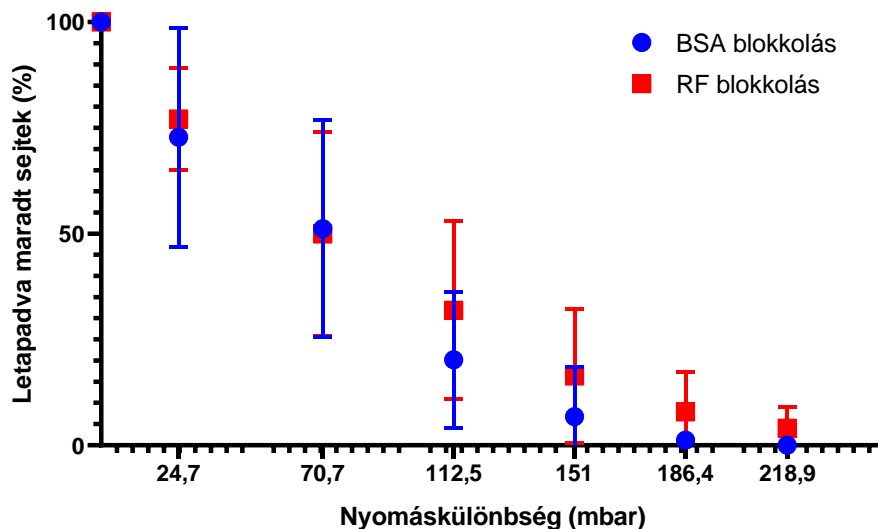
Eddig minden felületkezeléshez RF oldatot használtam az IVIG kezelés utáni blokkolásra. Megvizsgáltam, hogy lecserélhető lenne-e PBS-ben feloldott BSA oldatra. Először egy 96 lyukú mikrotitrálólemezen különböző koncentrációjú blokkoló és

mérőoldatot alkalmazva megnéztem, melyik kombinációkat lenne érdemes a mikropipettát alkalmazva megvizsgálni. Ezt a vizsgálatot háromszor végeztem el és az eredményeket átlagoltam.

BSA sejt oldat		BSA felület blokk			
		1%	0,2%	0,04%	0%
1%	55,84%	49,68%	40,63%	8,85%	
0,2%	73,84%	46,76%	33,40%	8,03%	
0,04%	44,93%	49,66%	44,03%	4,39%	
0%	45,59%	43,63%	40,02%	9,16%	

7. táblázat BSA koncentráció vizsgálati mérések során a letapadva maradt sejtek átlaga

A 7. táblázatban látható, hogy nagyobb százalékokban alkalmazva a BSA-t jobb adhéziós eredményeket kapunk és egy bizonyos összeállítás a 0,2%-os felületi blokk az 1%-os mérőoldattal alkalmazva nagyobb relatív adhéziót idéz elő. Ezt az összeállítást tovább mértem mikropipettás rendszer segítségével., öt eredményt feldolgozva Az 5.10 ábrán bemutattam, hogy a két blokkolása közel hasonló, nincs szignifikáns eltérés a kapott eredmények között.



5.10. ábra Az RF és a BSA blokkolás összehasonlítása

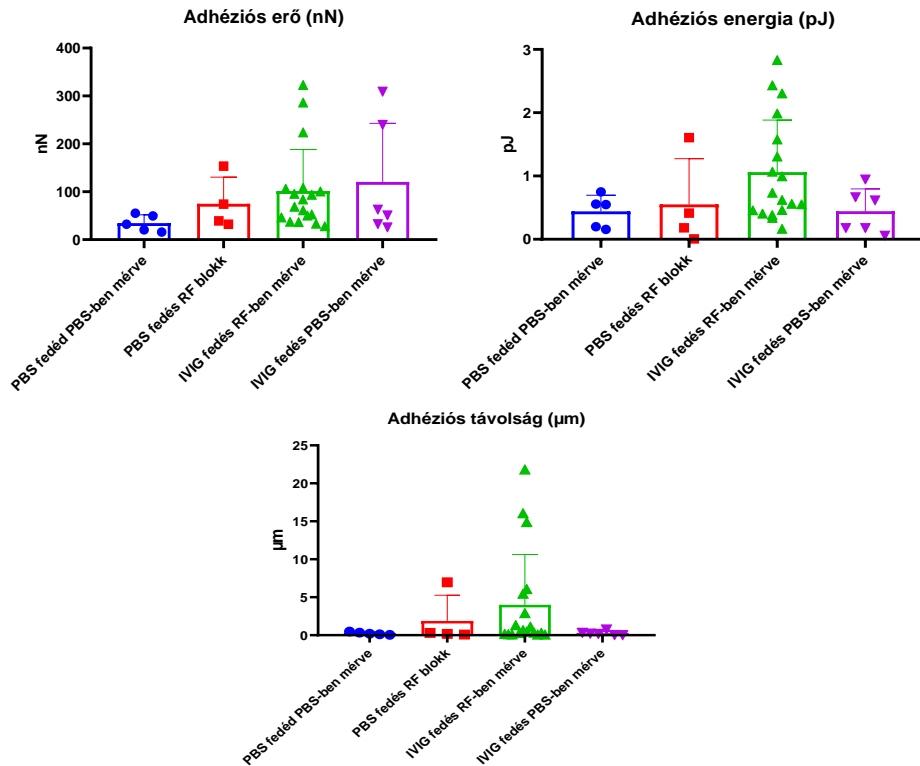
Szignifikáns?	P érték	BSA blokkolás átlaga	RF blokkolás átlaga	Különbség	SE különbség	t arány	df	Korrigált P érték
		100	100	0	0			
Nem	0,619411	72,8	77,11	-4,314	8,528	0,5059	17	0,855152
Nem	0,921243	51,2	49,92	1,279	12,74	0,1003	17	0,921243
Nem	0,277998	20,2	31,89	-11,69	10,43	1,121	17	0,656504
Nem	0,234438	6,8	16,37	-9,573	7,765	1,233	17	0,656504
Nem	0,137852	1,2	7,89	-6,69	4,296	1,557	17	0,523669
Nem	0,100837	0	4,019	-4,019	2,317	1,735	17	0,471517

8. Táblázat Multitesztes t-próba a két blokkolási módszer összehasonlítására

5.4 FluidFM mérések.

A FluidFM technikával is úgy kezdtem a munkát, mint a mikropipetta esetében. Először a PBS-sel kezelt, RF-fel blokkolt, és IVIG-gel kezelt felületeket hasonlítottam össze. Ezen felül PBS-ben és RF oldatban is elvégeztem az IVIG-es méréseket. A felületeket a már leírt módon készítettem itt is és a méréseket 4 ml RF oldatban végeztem. Egyedi sejteket mértem így a nyers adatok ábrázolása túl sok helyet foglalna el ezért kiemelem a fontosabb értékeket. A használt rugólapka rugóállandója $1,81 \text{ N/m}$ volt. A felület szenzitivitását többször megmértem 20 mV -os közelítéssel. Amikor sejtadhéziót mérünk több beállítást tudunk szabályozni és sok próba után az ideális beállítások lett az, hogy a sejtet a rugólap 50 mV -ra közelíti meg $5 \mu\text{m/s}$ -os sebességgel. A sejtten 10s -ig 300mbar -os szívóerőt fejt ki, majd folyamatos szívás mellett megemeli a sejtet $80 \mu\text{m}$ -re. Ennek a beállításnak a használatával a legtöbb sejt feljött, azonban IVIG-gel kezelt felületen előfordult, hogy a paramétereket meg kellett változtatni a sikeres adhézió mérés reményében.

A kapott adatokat a FluidFM_GUI nevű Matlab programmal értékeltem ki, amelyet Nagy Ágoston készített. Segítségével a kapott erő-görbékből a rugó állandó és szenzitivitás ismeretében meghatározható az adhéziós erő, az adhéziós energia és az adhéziós távolság. Az eredményeket 5.11 ábrán foglaltam össze, észrevehető, hogy az IVIG-nal kezelt felszínnél sokkal nagyobb adhéziós erőket sikerült mérni, mint a kezeletlen felszíneken.



5.11. ábra FluidFM mérések eredménye különböző felületi kezelések mellett

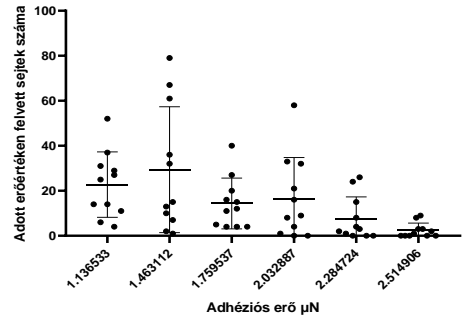
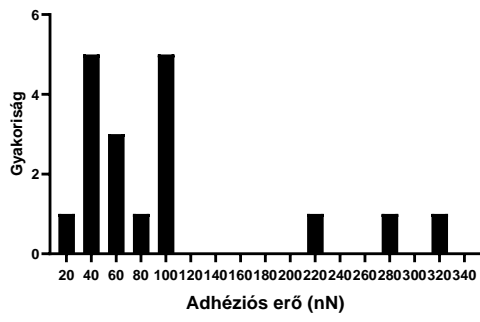
5.4.1 FluidFM és mikropipetta által mért adhézión erők összehasonlítása

A FluidFM képes a sejtadhézión közvetlen mérésére, így az már a rendelkezésemre állt a mérés után. A mikropipetta esetén azonban csak közvetett meghatározásra van lehetőség szimulációs mérések által.[2] Az alábbi egyenlet által:

$$F_L = 0.071 \frac{nN}{Pa} \cdot V Pa + 961 [nN]$$

5.1. Egyenlet kísérleti vákuumértékek becsült emelőerővé konvertálásához.[2]

ahol, F_L hidrodinamikusan felhajtóerő és V a fecskendőben beállított vákuum mértéke, kiszámolható, hogy adott vákuum mellett $10 \mu m$ pipettahegy távolság esetén mekkora hidrodinamikusan felhajtóerők hatnak egy sejtre. Ezt meghatároztam a készített IVIG-nal fedett felületekre és ezt összevettem a kapott FluidFM-es mérések eredményeivel. A két mérés eredményei nagyon eltérőek mivel az eredmények teljesen más skála egyégen mozognak. Mivel a FluidFm közvetlenül méri a sejtadhézión így ez tekinthető a biztosabb meghatározási módnak



5.12. ábra FluidFM és mikropipetta mérések adhéziós erejének összehasonlítása IVIG felületen

6 Összefoglalás

A számítógép vezérelt mikropipettával történő sejtadhéziós erő meghatározásokhoz a mérések többszöri megismétlése szükséges ahhoz igényli, hogy pontos eredményeket szolgáltatson. A legnagyobb változót a mérés során a mikropipetta offset beállítása, vagyis a helyzetének ismertetése a számítógép számára, szolgáltatja hiszen ez az egy lépés, amelynek beállítása automatikusan nem lehetséges. A magassága nagy hatással van a sejtekre ható erőnek. Ennek konzisztens beállítása fontos a reprodukálhatóság szempontjából. Azonban így is csak közvetett adhéziós erőt szolgáltat és ahogy ezt bemutattam a jelenlegi szimulációk alapján nem közelíti meg a valóságos értékeket. Azonban a kidolgozott és beállított paraméterek használatával, nagy áteresztőképessége és gyors munkavégzése miatt értékes eszköz kísérletek kezdetén. Gyorsan és sok sejten ellenőrizhetünk rajta különböző reagensek, felszínek sejtadhézióra gyakorolt hatását, majd az ígéretes anyagokkal a FluidFM-ben pontos adatokat kaphatunk.

A szimulációs módszer további kidolgozásával akár pontosabb értékeket is szolgáltathat a mikropipetta. Tervezek kísérleteket végezni a mikropipetta másik szerelékével, amely Piezoelektromos kristályt használ vákuum generálására fecskendő helyett. További terveim között szerepel a két módszer együttes használata friss vérből vett leukociták vizsgálatára. A rendszer kiválóan alkalmas sejtek válogatására és szeparálására, ezért a jövőben tervezek kísérletet ennek kihasználására, akár fluoreszcensen jelölt sejtek különválasztására szeparált tenyésztésre. Már vannak folyamatban lévő kísérletek, amelyekben a mikropipettát bioszenzorokkal együtt alkalmazzák és ezekben a mérésekben én is tervezek részt venni.

Irodalomjegyzék

- [1] E. Francis, H. Xiao, L. H. Teng, and V. Heinrich, “Mechanisms of frustrated phagocytic spreading of human neutrophils on antibody-coated surfaces,” *bioRxiv*, p. 2022.02.18.481104, Jan. 2022, doi: 10.1101/2022.02.18.481104.
- [2] R. Salá Nki *et al.*, “Single cell adhesion assay using computer controlled Micropipette,” *PLoS One*, vol. 9, no. 10, Oct. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0111450.
- [3] M. Sztilkovics *et al.*, “Single-cell adhesion force kinetics of cell populations from combined label-free optical biosensor and robotic fluidic force microscopy,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, p. 61, 2020, doi: 10.1038/s41598-019-56898-7.
- [4] R. Salánki *et al.*, “Automated single cell sorting and deposition in submicroliter drops,” *Appl Phys Lett*, vol. 105, no. 8, Aug. 2014, doi: 10.1063/1.4893922.
- [5] Z. Környei *et al.*, “Cell sorting in a Petri dish controlled by computer vision,” *Sci Rep*, vol. 3, Jan. 2013, doi: 10.1038/srep01088.
- [6] M. Li, L. Liu, and T. Zambelli, “FluidFM for single-cell biophysics,” *Nano Research*. Tsinghua University, 2021. doi: 10.1007/s12274-021-3573-y.
- [7] M. Y. Amarouch, J. el Hilaly, and D. Mazouzi, “AFM and FluidFM Technologies: Recent Applications in Molecular and Cellular Biology,” *Scanning*, vol. 2018. Hindawi Limited, 2018. doi: 10.1155/2018/7801274.
- [8] P. Saha, T. Duanis-Assaf, and M. Reches, “Fundamentals and Applications of FluidFM Technology in Single-Cell Studies,” *Advanced Materials Interfaces*, vol. 7, no. 23. Wiley-VCH Verlag, Dec. 01, 2020. doi: 10.1002/admi.202001115.
- [9] J. S. Marshall, R. Warrington, W. Watson, and H. L. Kim, “An introduction to immunology and immunopathology,” *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, vol. 14. BioMed Central Ltd., Sep. 12, 2018. doi: 10.1186/s13223-018-0278-1.
- [10] A. Erdei, G. Sármay, and J. Prechl, *Immunológia*. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt, 2012.
- [11] L. B. Nicholson, “The immune system,” *Essays Biochem*, vol. 60, no. 3, pp. 275–301, Oct. 2016, doi: 10.1042/EBC20160017.

- [12] P. Eter, J. D. Elves, and V. M. R. Oitt, “THE IMMUNE SYSTEM First of Two Parts,” 2000.
- [13] D. D. Chaplin, “Overview of the immune response,” *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 125, no. 2 SUPPL. 2, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.
- [14] G. J. v Nossal, “The double helix and immunology,” *Nature*, vol. 421, no. 6921, pp. 440–444, 2003, doi: 10.1038/nature01409.
- [15] L. L. Lu, T. J. Suscovich, S. M. Fortune, and G. Alter, “Beyond binding: Antibody effector functions in infectious diseases,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 18, no. 1. Nature Publishing Group, pp. 46–61, Jan. 01, 2018. doi: 10.1038/nri.2017.106.
- [16] G. Vidarsson, G. Dekkers, and T. Rispens, “IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions,” *Front Immunol*, vol. 5, no. OCT, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.
- [17] C. Napodano *et al.*, “Immunological Role of IgG Subclasses,” *Immunological Investigations*. Taylor and Francis Ltd, pp. 1–18, 2020. doi: 10.1080/08820139.2020.1775643.
- [18] H. W. Schroeder and L. Cavacini, “Structure and function of immunoglobulins,” *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 125, no. 2 SUPPL. 2, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- [19] L. Koenderman, “Inside-out control of Fc-receptors,” *Frontiers in Immunology*, vol. 10, no. MAR. Frontiers Media S.A., 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.00544.
- [20] C. Rosales, “Fcγ receptor heterogeneity in leukocyte functional responses,” *Frontiers in Immunology*, vol. 8, no. MAR. Frontiers Research Foundation, Mar. 20, 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.00280.
- [21] P. M. Hogarth and G. A. Pietersz, “Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 11, no. 4. pp. 311–331, Apr. 2012. doi: 10.1038/nrd2909.
- [22] C. Kerntke, F. Nimmerjahn, and M. Biburger, “There Is (Scientific) Strength in Numbers: A Comprehensive Quantitation of Fc Gamma Receptor Numbers on

- Human and Murine Peripheral Blood Leukocytes,” *Front Immunol*, vol. 11, Feb. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00118.
- [23] L. T. C. Vogelpoel, D. L. P. Baeten, E. C. de Jong, and J. den Dunnen, “Control of cytokine production by human Fc gamma receptors: Implications for pathogen defense and autoimmunity,” *Frontiers in Immunology*, vol. 6, no. FEB. Frontiers Media S.A., 2015. doi: 10.3389/fimmu.2015.00079.
- [24] L. K. Kozicky *et al.*, “IVIg and LPS co-stimulation induces IL-10 production by human monocytes, which is compromised by an FcγRIIA disease-associated gene variant,” *Front Immunol*, vol. 9, no. NOV, Nov. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02676.
- [25] L. Gilardin, J. Bayry, and S. v. Kaveri, “Intravenous immunoglobulin as clinical immune-modulating therapy,” *CMAJ*, vol. 187, no. 4, pp. 257–264, Mar. 2015, doi: 10.1503/cmaj.130375.
- [26] D. M. Underhill and H. S. Goodridge, “Information processing during phagocytosis,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 12, no. 7. pp. 492–502, Jul. 2012. doi: 10.1038/nri3244.
- [27] Urja. Naik and R. E. Harrison, *Phagocytosis*. Morgan & Claypool, 2013.
- [28] A. Aderem and D. M. Underhill, “MECHANISMS OF PHAGOCYTOSIS IN MACROPHAGES,” 1999.
- [29] S. Tsuchiya, M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, and K. Tada, “ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF A HUMAN ACUTE MONOCYTIC LEUKEMIA CELL LINE (THP-1),” 1980.
- [30] H. Bosshart and M. Heinzelmann, “THP-1 cells as a model for human monocytes,” *Annals of Translational Medicine*, vol. 4, no. 21. AME Publishing Company, Nov. 01, 2016. doi: 10.21037/atm.2016.08.53.
- [31] S. Tridandapani, K. Siefker, J. L. Teillaud, J. E. Carter, M. D. Wewers, and C. L. Anderson, “Regulated expression and inhibitory function of FcγRIIb in human monocytic cells,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 7, pp. 5082–5089, Feb. 2002, doi: 10.1074/jbc.M110277200.