

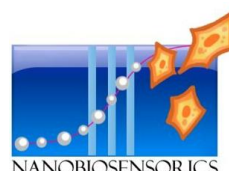


M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Villamosmérnöki és Informatikai Kar
Elektronikai Technológia Tanszék



BMEETT
ELEKTRONIKAI TECHNOLÓGIA TANSZÉK



Joó Péter

**Patogén asszociált molekuláris mintázatok szerepének vizsgálata
jelölésmentes optikai bioszenzorokkal immunsejtek
aktivációjában**

Tudományos Diákköri Dolgozat

Konzulensek

Dr. Szittner Zoltán – Dr. Horváth Róbert

Dr. Bonyár Attila

2023

Budapest

Tartalomjegyzék

Abasztrakt	4
Abstract	6
1 Bevezetés	8
2 Célkitűzés	9
3 Irodalmi áttekintés	9
3.1 Immunrendszer	9
3.2 A természetes (veleszületett) immunitás	10
3.3 Mintázatfelismerő receptorok (PRR – Pattern Recognition Receptors).....	11
3.3.1 Toll-szerű receptorok (TLR)	12
3.4 A szerzett (adaptív) immunitás.....	13
3.5 Monociták.....	13
3.6 THP-1 sejtek.....	14
3.7 Immunglobulinok	14
3.7.1 Immunglobulinok effektor funkciói	15
3.7.2 Intravénás immunglobulin (IVIG).....	17
3.8 Optikai bioszenzorok.....	18
3.8.1 Epic Cardio.....	18
3.8.2 HoloMonitor M4 élő sejt képalkotó mikroszkóp	19
4 Felhasznált anyagok és módszerek	22
4.1 Felhasznált anyagok	22
4.1.1 Ligandok beoldása és tárolása	22
4.2 Monocita sejttenyészet	22
4.3 Mérés menete	23
4.3.1 LPS és flagellin ligandumok rövidtávú hatásának vizsgálata, THP-1 sejtekre, Epic Cardioval	23
4.3.2 Zymosan ligandum rövidtávú hatásának vizsgálata, THP-1 sejtekre, Epic Cardioval	23
4.3.3 TLR ligandok rövidtávú hatásának vizsgálata, egészséges ember fehérvérsejtjeire, Epic Cardioval.....	23
4.3.4 IVIG hosszútávú hatásának vizsgálata a monocita sejtvonal aktivációjára, HoloMonitor M4 segítségével.....	24
4.3.5 TLR ligandok hosszútávú hatásának vizsgálata a monocita sejtvonal aktivációjára, HoloMonitor M4 segítségével.....	25
5 Eredmények és értékelésük	27
5.1 LPS és flagellin ligandumok rövidtávú hatásának vizsgálata, THP-1 sejtekre, Epic Cardioval	27

5.1.1	Flagellin és LPS.....	27
5.2	Zymosan	39
5.3	TLR ligandok rövidtávú hatása vérrel.....	42
	44	
5.4	IVIG hosszútávú hatásának vizsgálata a monocita sejtvonal aktivációjára, HoloMonitor M4 segítségével.....	46
5.4.1	Sejtterület.....	46
5.4.2	Sejtek optikai vastagsága.....	50
5.4.3	Maximális optikai sejtvastagság.....	51
5.4.4	Optikai sejttérfogat	53
5.4.5	Felületi konvexitás (Hull convexity).....	54
5.4.6	Sejtalak szabálytalanság (Irregularity)	55
5.5	TLR ligandok hosszútávú hatásának vizsgálata a monocita sejtvonal aktivációjára, HoloMonitor M4 segítségével.....	58
5.5.1	Sejtterület.....	58
5.5.2	Optikai sejttérfogat	63
5.5.3	Maximális optikai sejtvastagság.....	67
5.5.4	Optikai sejttérfogat	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
5.5.5	Felületi konvexitás	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
5.5.6	Sejtalak szabálytalanság	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
5.5.7	Motilitás.....	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
6	Összefoglalás	72
7	Köszönetnyilvánítás.....	73
8	Irodalomjegyzék	74

Abstrakt

A klasszikus szerológiai módszerek nem teszik lehetővé az immunsejtek immunrendszerben betöltött funkciójának vizsgálatát. Erre a problémára nyújthatnak megoldást az optikai bioszenzorok, melyek alkalmasak a sejtek egyes biofizikai paramétereinek nagy időbeli és térbeli felbontású vizsgálatára, ezzel dinamikus információt adhatnak az ellenanyagok által közvetített effektor funkcióról. Ezen eszközök kompakt kialakítása hosszútávú, akár több napos, inkubátorban végzett méréseket is lehetővé tesz [1], [2].

Segítségükkel a sejtek aktivációja személyre szabottan, jelölésmentes, nem-invazív módon vizsgálható. Mindez elősegítheti az emberi szervezetben lejátszódó mechanizmusok modellezését, vizsgálatát, jellemzését és megértését. A sejtaktiváció biofizikai paramétereit diagnosztikai szempontból is értékelhetőek.

Hipotézisünk szerint a kísérleteink során alkalmazott patogén ligandok eltérően hatnak a sejtek aktivációjára a megfigyelés hosszától és az ellenanyag jelenlététől függően.

A Toll-szerű receptorok (TLR), melyek a patogén felismerő receptorok közé tartoznak (PRR), képesek egyes mikrobákban megjelenő konzervált struktúrákat, úgynevezett patogén asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) felismerésére [3], [4]. A patogén ligand kötődése a receptorhoz jelátviteli kaszkádokat indukálnak, melyek a sejtekben gyulladáshoz vezető válaszokban részt vevő gének transzkripcióját indítja el, ezáltal a citokintermelést és fagocitákban a kostimulátor molekulák expresszióját váltja ki [5], [6]. A kísérletek során ezen TLR receptorokat expresszáló, humán monocitákat vizsgáltam.

Az immunjelenségek (monocita sejt vonal aktivációja és differenciációja vagy annak hiánya) rövid és hosszútávú nyomon követése élősejtes képalkotásra alkalmas optikai bioszenzorokkal történt. Rezonáns hullámvezető rácsos (RWG) bioszenzor és holografikus elven működő mikroszkóp segítségével, melyek egyedi sejt szinten, jelölésmentesen tették lehetővé a biofizikai paraméterek nyomon követését. Az RWG optikai bioszenzorok, amilyen az Epic Cardio is, a molekuláris kölcsönhatások, valamint a sejtek tömegének újraeloszlása során kiváltott törésmutató-változások kimutatásán alapulnak [7]. A kvantitatív fázis képalkotás (QPI) elvén működő HoloMonitor M4 holografikus mikroszkóp kezdeti lézernyalábját végső soron egy mintán áthaladó tárgynyalábbá és egy referencia lézernyalábbá választódik szét. A minta és a referenciasugár utólagos egyesítésével létrejön egy interferenciamintázat, ez a hologram.

Ezt egy képérzékelő rögzíti, majd numerikusan rekonstruálja az úgynevezett fázisképet, amelyet megjelenít és elemez [8].

RWG bioszenzorral végzett rövidtávú vizsgálatok során az intravénás immunglobulinnal (IVIG) funkcionizált felületen a TLR ligandok a sejtek frusztrált fagocitózisát váltja ki (adhézióját), míg azon mérések esetén, ahol a felületekre kizárólag ligandot rögzítünk, nem várunk ilyen jelenséget. A holografikus mikroszkópos méréseknél az IVIG-gel kezelt felületek esetében vártuk leginkább, hogy a sejtek nagyobb mértékben differenciálódjanak. A sejtalk szabálytalansága, a növekvő területi eloszlás, csökkenő vastagságuk és konvexitásuk mellett, sejttérfogatuk nőtt a kontroll és az oldott IVIG-et tartalmazó mintákkal szemben. A TLR ligandokkal és PGN-nel végzett kísérlet során megfigyelhetőek voltak a sejtek differenciálódására utaló változások, melyek mértéke kezelésenként eltér.

Az eredmények alapján pusztán a ligand jelenléte rövidtávon nincs hatással a sejtek aktivációjára. Hosszútávú hatás IVIG bevonattal ellátott és ligandot tartalmazó minták esetében tapasztalható volt.

Abstract

Classical serological methods do not allow the investigation of the function of immune cells in the immune system. Optical biosensors can provide a solution to this problem by enabling the investigation of specific cellular biophysical parameters with high temporal and spatial resolution, thus providing dynamic information on antibody-mediated effector functions. The compact design of these systems allows long-term measurements in incubators, even over several days[1], [2].

They allow a personalised, label-free, non-invasive assessment of cell activation. This could help to model, study, characterise and understand the mechanisms at work inside the human body. The biophysical parameters of cell activation can also be analysed for diagnostic purposes.

Our hypothesis is that the pathogenic ligands used in our experiments have different effects on cell activation depending on the length of the observation and the presence of the antibody.

Toll-like receptors (TLRs), which belong to the class of pathogen recognition receptors (PRRs), are able to recognize conserved structures in certain microbes, called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [3], [4]. Binding of the pathogenic ligand to the receptor induces signalling cascades that trigger transcription of genes involved in inflammatory responses in cells, thereby triggering cytokine production and expression of costimulatory molecules in phagocytes[5], [6]. In these experiments, I investigated human monocytes that express these TLR receptors.

Short and long term monitoring of immune phenotypes (monocyte cell line activation and differentiation or lack of it) was performed using optical biosensors for live cell imaging. A resonant waveguide grating (RWG) biosensor and a holographic imaging microscope, which allowed the label-free monitoring of biophysical parameters at the single cell level. RWG optical biosensors, such as Epic Cardio, would be based on the detection of molecular interactions and refractive index changes induced by the redistribution of cell mass [7]. The initial laser beam of the HoloMonitor M4 holographic microscope, which works on the principle of quantitative phase imaging (QPI), is ultimately separated into an object beam passing through a sample and a reference laser beam[1]. The sample and the reference beam are subsequently combined to create an interference pattern, the hologram. This is recorded by an image sensor and then numerically reconstructed into a so-called phase image, which is displayed and analysed[8].

In short-term assays with an RWG biosensor, TLR ligands on a surface functionalized with intravenous immunoglobulin (IVIG) induce frustrated phagocytosis (adhesion) of cells, compared to measurements where only ligand is attached to the surfaces, where no such event is expected. For holographic microscopy measurements, we expected to see the greatest differentiation of cells on surfaces treated with IVIG. In addition to the irregularity of the cell shapes, their increasing areal distribution, decreasing thickness and convexity, their cell volume increased compared to control and solubilized IVIG containing wells. In the experiment with TLR ligands and PGN, changes indicative of cell differentiation were observed, the extent of which varied between treatments.

The results suggest that the presence of ligand alone has no effect on cell activation in the short term. Long-term effects were observed in IVIG-coated and ligand-containing samples.

1 Bevezetés

Az immunrendszer szervezetünk védekező mechanizmusainak összessége a környezetből érkező potenciálisan fertőző mikrobákkal szemben. A fertőző ágensek, leggyakrabban baktériumok, vírusok, gombák, elleni védekezésre kétféle immunrendszer fejlődött ki, a veleszületett és a szerzett immunrendszer, melyek egymásra épülve és együttműködve tartják fenn az immunhomeosztázist. Ezzel együtt szervezetünk már nem vagy nem megfelelően működő, daganatos sejteinek felismerésében és eliminálásában is részt vesznek.

Az immunrendszer molekuláinak, sejteinek, mechanizmusainak tanulmányozása lehetőséget biztosíthat többek között az autoimmun betegségek kezelésére, felismerésére, valamint megakadályozására. Az immunsejtek nem-invazív vizsgálatában egyre nagyobb szerepe lehet az optikai bioszenzoroknak. Segítségükkel a sejtek különböző környezeti változásra adott válaszai jelölésmentesen nyomon követhetőek.

Az olyan kvantitatív fázis képalkotás (QPI) elvén működő szenzorok, mint a HoloMonitor M4 nem igényel jelölőmolekulát, mivel irányított fénynyalábok által képes a vizsgálat során jelenlévő sejtek időbeli viselkedésének, sejtmorfológia változásának, motilitásának, vagy akár proliferációjának nyomon követésére.

Esetünkben a HoloMonitor M4 készülékkel monocita sejtvonal differenciációjának rövid, illetve hosszútávú vizsgálatát végeztük. A mérések során a sejtek aktivációjához intravénás immunglobulint alkalmaztunk, rögzített és oldatban lévő formájában, mely mérések majd kontrollként fognak szolgálni a későbbi, TLR specifikus ligandokkal végzett mérésekhez.

2 Célkitűzés

A mérés célja, a patogén asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) hatásának vizsgálata, humán eredetű, Toll-szerű (TLR) mintázatfelismerő receptorokat expresszáló monocitákra.

Epic Cardio bioszenzor segítségével a vizsgált TLR ligandumok hatásának rövidtávú megfigyelése monocitákon.

HoloMonitor M4 holografikus mikroszkóp segítségével a különböző, rögzített és oldatban lévő, adott ligandumok által, sejtekre kiváltott hatás, rövid- és hosszútávú nyomon követése.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 Immunrendszer

Az immunrendszer nyirokszervek, sejtek, humorális faktorok és citokinek interaktív szerveződése, amelyeknek speciális szerepe van a fertőzések elleni védekezésben. Mind a veleszületett, mind adaptív immun mechanizmusok részt vesznek a patogén mikrobák felismerésében és eliminálásában [9]. A saját és nem saját sejt megkülönböztetésének képessége minden élő szervezet kulcsfontosságú jellemzője, és ez képezi az alapját a veleszületett védelmi mechanizmusok aktiválásának a mikrobiális fertőzéssel szemben [6]. Az immunválasz során aktiválódnak például a fagociták (neutrofileket, monocitákat és makrofágokat), továbbá olyan sejteket, amelyek aktiváció hatására gyulladáshoz vezető mediátorokat termelnek (bazofilek, hízósejtek és eozinofilek), valamint természetes ölüsejtek. A veleszületett válasz humorális összetevői közé tartozik a komplement rendszer, az akut fázisú fehérjék és a citokinek, például az interferonok. Az adaptív immunválasz az antigénspecifikus B- és T-sejtek szaporodását foglalja magába, ami akkor következik be, amikor a sejtek felszíni receptorai antigénhez kötődnek [10].

A veleszületett immunitás kutatása gyorsan fejlődő terület, ahol új sejtpopulációkat és molekuláris útvonalakat fedeznek fel. A veleszületett és az adaptív immunválasz átfedik egymást és szoros kölcsönhatásban vannak egymással. A közelmúltban felfedezett sejtpopulációk, különösen a veleszületett limfoid sejtek és a myeloid eredetű szuppresszor sejtek egyre nagyobb figyelmet kapnak [11].

3.2 A természetes (veleszületett) immunitás

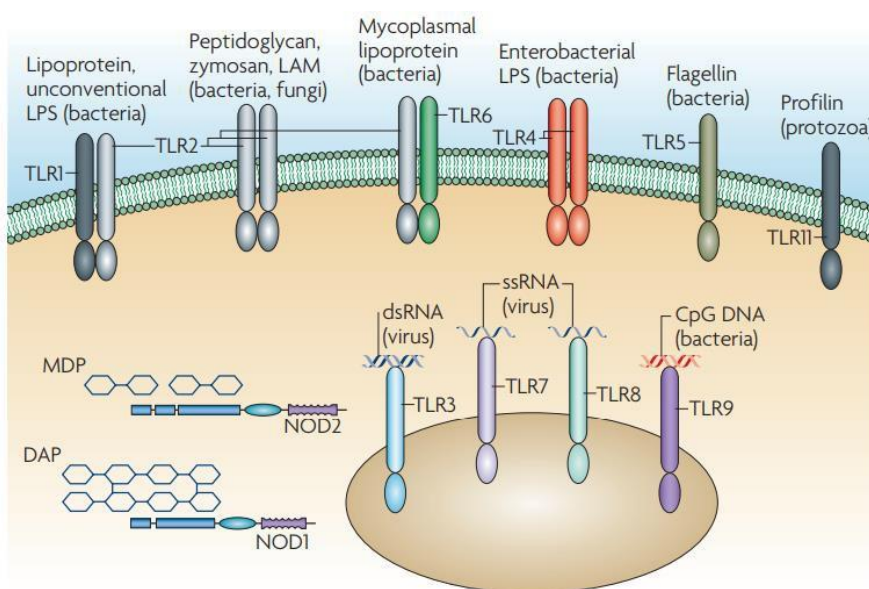
A veleszületett immunrendszer egy evolúciósan konzerválódott gazdaszervezeti védelmi rendszer, amelynek fő jellemzői közösek a növények, gerinctelenek és emlősök között. Az emlősök veleszületett immunvédelme gyakorlatilag minden szövetre kiterjed, különösen az olyan határfelületekre, mint a bőr vagy a légzőszervek és a gyomor-bélrendszer nyálkahártya felszíne. A specializált mieloid és limfoid sejtek, de nem hemopoetikus sejtek is képesek veleszületett védekezési mechanizmusokat kezdeményezni és kifejteni, aktiválódnak szövetkárosodásra, fertőzésre válaszul vagy genotoxikus stressz hatására [11].

Tág értelemben véve a veleszületett immunrendszer magában foglalja a gazdaszervezet immunvédelmi mechanizmusainak minden olyan aspektusát, amelyet a szervezet csírvonalbeli génjei kódolnak érett funkcionális formájukban. Ezek közé tartoznak a fizikai gátak, mint például a szoros sejt-sejt kapcsolatokat kifejező hámsejtrétegek a szekretált nyálkaréteg, amely a légző-, a gyomor-, bél- és a húgyuti traktusok hámját borítja; a hám csillószőrök, amelyek lesöprik ezt a nyálkaréteget, lehetővé téve annak folyamatos frissítését, miután az belélegzett vagy lenyelt részecskékkel szennyeződött. A veleszületett válaszhoz tartoznak még az oldható fehérjék és a bioaktív kisméretű molekulákat, amelyek vagy konstitutívan jelen vannak a biológiai folyadékokban (pl. a komplementfehérjék, a defenzinek és a fikolinok), vagy amelyek a sejtekből aktiválódásuk során szabadulnak fel (beleértve a más sejtek működését szabályozó citokineket, a gyulladást leközítő leukocitákat vonzó kemokineket, a gyulladást lipidmediátorokat, a reaktív szabadgyökfajokat, valamint a szöveti gyulladáshoz szintén hozzájáruló bioaktív aminokat és enzimeket). Végül, a veleszületett immunrendszerhez tartoznak azok a membránhoz kötött receptorok és citoplazmatikus fehérjék, amelyek a behatoló mikrobák felszínén kifejeződő molekuláris mintázatokat ismerik fel [9].

A veleszületett immunitás egyes szereplői konstitutívan aktívak (pl. a számos hámsejtet borító nyálkahártya), mások pedig a gazdasejtek vagy a gazdafehérjék olyan kémiai struktúrákkal való kölcsönhatása után aktiválódnak, amelyek a behatoló mikrobákra jellemzőek, de a gazdasejteken nem találhatóak [9].

3.3 Mintázatfelismerő receptorok (PRR – Pattern Recognition Receptors)

A veleszületett immunrendszer az adaptív immunitás aktiválásában is lényeges szerepet tölt be. Bár a veleszületett immunsejtek, beleértve a makrofágokat és a dendritikus sejteket (DC-k) fontos szerepet játszanak, a nem hivatásos immunsejtek, például a hámsejtek, az endotélsejtek és a fibroblasztok is hozzájárulnak a veleszületett immunitáshoz. A csírvonalban kódolt mintázatfelismerő receptorok (PRR) felelősek a mikroorganizmusok jelenlétének érzékeléséért. Ezt úgy teszik, hogy különböző mikrobákban megjelenő konzervált struktúrákat ismernek fel, amelyeket patogén-asszociált molekuláris mintázatoknak (PAMP) neveznek (1. ábra) [3].



1. ábra: Mintázatfelismerő receptorok (PRR): TLR-ek és NOD-ok [3]

A legújabb kutatások arra utalnak, hogy a PRR-ok a károsodott sejtekből felszabaduló endogén molekulák, a károsodással összefüggő molekuláris mintázatok (DAMP-ok) felismeréséért is felelősek. Jelenleg a PRR-családok négy különböző osztályát azonosították. Ezek a családok transzmembrán fehérjék, mint a Toll-szerű receptorok és a C-típusú lektin receptorok (CLR), valamint citoplazmatikus fehérjéket, mint a retinsav-indukálható gén (RIG)-I-szerű receptorok (RLR) és a NOD-szerű receptorok (NLR) [3], [12]. Ezek a PRR-ok nemcsak a makrofágokban és a DC-kben fejeződnek ki, hanem különböző nem professzionális immunsejtekben is. Néhány NLR kivételével a PAMP-ok vagy DAMP-ok PRR-ok általi érzékelése a gyulladós válaszokban részt vevő gének transzkripcióját indítja el. Ezen gének proinflammatorikus citokineket, I. típusú interferonokat (IFN-eket), kemokineket és antimikrobiális fehérjéket, a PRR jelátvitel modulációjában részt vevő fehérjéket és számos

nem jellemzett fehérjét kódolnak. Az egyes PRR-ek által indukálható gének expressziós mintázata eltérhet [12].

3.3.1 Toll-szerű receptorok (TLR)

A veleszületett immunitás legfontosabb szereplői a fagociták, mint például a makrofágok, neutrofilek és dendritikus sejtek (DC). E sejtek a kórokozók széles spektrumát ismerik fel anélkül, hogy előzetes expozícióra lenne szükség [13]. Elsődleges szerepüket korábban a kórokozók nem specifikus módon történő fagocitózisában, emésztésében és a kórokozóból származó antigének T-sejtek számára történő prezentálásában vélték. Ezt a választ nem specifikus immunválasznak is nevezték. A Toll-szerű receptorok közelmúltbeli azonosítása azonban megváltoztatta ezt a felfogást. Kiderült, hogy a veleszületett immunitás az immunsejtek sejtfelszínén expresszálandó TLR-eken keresztül konzervált, kórokozóval kapcsolatos molekuláris mintázatokat képes felismerni. A behatoló kórokozók felismerése ezután citokintermelést és a fagocitákban a kostimulátor molekulák expresszióját váltja ki, ami a T-sejtek aktiválásához vezet. Így a veleszületett immunitás szorosan kapcsolódik a szerzett immunitáshoz [5].

A Toll-szerű receptorok a mintázatfelismerő receptorok családjának tagjai. Érzékelik a kórokozóból származó molekulákat, a kórokozóval összefüggő molekuláris mintázatokat (PAMP), valamint az elhalt és neurotikus sejtekből felszabaduló, endogén molekulákat, a károsodással összefüggő molekuláris mintázatokat (DAMP). A TLR jelátviteli útvonalak aktiválása a veleszületett immunsejtekben, például a dendritikus sejtekben, az adaptív immunitást segíti azáltal, hogy fokozza a DC-k antigénprezentáló sejt-ként való működésének képességét és elősegíti a különböző T-sejt altípusok indukcióját irányító proinflammatorikus citokinek termelését [14]. Az emlősök Gram-negatív baktériumokra adott veleszületett immunválaszát a TLR4 (amely LPS-t ismer fel), a TLR5 (amely flagellint ismer fel) és a TLR9 (amely bakteriális CpG-oligonukleotid motívumokat köt) váltja ki. Amint azt a közelmúltban kimutatták, a mintázatfelismerés repertoárja (azaz a felismert PAMP-ok száma) jelentősen bővíthető a különböző TLR-ek közötti együttműködés révén. A TLR-ek gyakran molekuláris komplexekben találhatóak, amelyekben szolubilis receptorok és különböző, membránhoz kötött vagy transzmembrán fehérjék kapcsolódnak [6], [15].

3.4 A szerzett (adaptív) immunitás

A gazdaszervezet védekezésének veleszületett mechanizmusaitól eltérően az adaptív immunrendszer válasza az adott fertőzésnek való ismételt kitettség esetén javul. Az adaptív immunválasz elsősorban a T- és B-limfociták felszínén kifejeződő antigénspecifikus receptorokon alapul. A veleszületett immunválasz csíravonalban kódolt felismerő molekuláival ellentétben az adaptív válasz antigénspecifikus receptorait olyan gének kódolják, amelyek csíravonalbeli génelemek szomatikus átrendeződésével T-sejt receptor (TCR) és immunglobulin (B-sejt antigén receptor) génekké állnak össze. Az antigénreceptorok néhány száz csíravonalban kódolt génelem gyűjteményéből történő összeállítása lehetővé teszi több millió különböző antigénreceptor kialakulását, amelyek mindegyike potenciálisan egyedi specificitással rendelkezik egy-egy különböző antigénre. A veleszületett és az adaptív immunrendszer együttműködnek, a veleszületett válasz képviseli a gazdaszervezet védelmének első vonalát, az adaptív válasz szerepe pedig néhány nap múlva válik kiemelkedővé, amikor az antigénspecifikus T- és B-sejtek klonális expanzió mennek keresztül. A veleszületett rendszer összetevői hozzájárulnak az antigénspecifikus sejtek aktiválásához. Ezenkívül az antigénspecifikus sejtek a veleszületett effektor sejtek toborzásával, illetve effektor mechanizmusokon keresztül felerősítik az immunválaszt, hogy a behatoló mikrobák teljes kontrollját elérjék. Így bár a veleszületett és az adaptív immunválasz alapvetően különbözik hatásmechanizmusában, a köztük lévő szinergia elengedhetetlen az ép, teljesen hatékony immunválaszhoz [6].

3.5 Monociták

A fehérvérsejteken (vagy leukocitákon) belül sejttypusokat különböztetünk meg, funkcionális és leszármazási szempontok alapján. A leukociták a szervezet immunválaszát közvetítik. A véren és a nyirokrendszeren keresztül keringenek és a szövetkárosodás, valamint fertőzés helyére toborzódnak [16]. A leukocita alcsoportokat funkcionális és fizikai jellemzők különböztetik meg. Az érett csontvelőben fejlődnek ki vérképző őssejtek (HSC) differenciálódásából a közös myeloid progenitor (CMP) sejtekké, majd granulocita myeloid progenitor (GMP) sejtekké; ezek viszont bipotens makrofág-dendritikus sejt progenitorok (MDP) lesznek, végül az unipotens közös monocita progenitor (cMoP) szakaszba jutnak [17]. Az osztódó, myeloid progenitor közös az eritrocitákkal, trombocitákkal, cDC-vel és granulocitákkal [18].

A monociták a mononukleáris fagocitarendszer tagjai, a mieloid sejtek egy családja, amely monocitákat és két másik fő altípust, melyek belőle differenciálódnak, nevezetesen a

dendritikus sejteket és a makrofágokat tartalmaz. A csontvelő elhagyását követően a monociták 1-3 napig keringenek a véráramban, ahol a leukociták 4-10%-át teszik ki, ezt követően a szövetekbe kerülnek, itt makrofágokká és dendritikus sejtekké differenciálódnak, hogy ellássák funkciójukat, melyek közül a legfőbbek a fagocitózis, az antigén prezentáció, valamint a citokintermelés [19]–[21]. A szövetekbe történő vándorlást és a gyulladással DC-kké és makrofágokká történő differenciálódást valószínűleg a gyulladással környezet és a kórokozóval kapcsolatos mintázatfelismerő receptorok határozzák meg [16].

3.6 THP-1 sejtek

A THP-1 sejtvonal akut myeloid leukémia (AML) szenvedő betegek véréből származik és az elmúlt évtizedek alatt monocita és makrofág aktivitások modulációjának becslésére szolgáló általános modellé vált, amelyet széles körben alkalmaznak a monocita/makrofág funkciók, mechanizmusok, jelátviteli útvonalak, valamint a tápanyag- és gyógyszer-transzport tanulmányozására [22], [23]. Régióta úgy gondolják, hogy a gyulladással monociták a fertőzés helyén szerveződnek és differenciálódnak makrofágokká. In vitro kísérletekben ezeket a sejteket gyakran úgy írják le, mint aktivált állapotban lévő sejtek, amit például a THP-1 sejtek gyulladással aktivátorokkal történő stimulálásával érhetünk el [23].

3.7 Immunglobulinok

Az immunglobulinok (Ig) vagy antitestek az adaptív humorális immunválasz fő szereplői. Heterodimer fehérjék, amelyek 2 nehéz és 2 könnyű láncból állnak. Funkcionálisan szétválaszthatók variábilis doménekre (Fab), amelyek az antigénkötést közvetítik, és egy állandósult doménekre (Fc), amelyek a (veleszületett) immunsejtek Fc-receptoraival vagy a komplementrendszer felismerő molekulájával, a C1q-vel való kölcsönhatáson keresztül közvetíti az effektor funkciókat [24], [25].

Az Fc-receptorokkal való kölcsönhatás a vírushatározott sejtek elpusztításához vezethet különböző immunhatású mechanizmusokon keresztül, beleértve az antitestfüggő sejtközvetített citotoxicitást (ADCC). Az antitest-közvetített komplement-aktiváció komplement-függő citotoxicitáshoz (CDC) vezethet. Ezenkívül mind az Fc-receptor kölcsönhatások, mind a komplement aktiváció immunmoduláló funkciók széles skáláját gyakorolhatja [25].

A variábilis domének bonyolult génátrendeződési események sorozatával jönnek létre, majd az antigénnel való érintkezés után szomatikus hipermutációnak lehetnek kitéve, hogy elősegítsék az affinitás érését. Minden egyes variábilis domén 3 szekvencia-variábilis régióra, a komplementaritást meghatározó régiókra (CDR-ek) és 4 viszonylag állandó szekvenciájú

régióra, vázszekvenciákra osztható. A nehézlánc 3 CDR-je a könnyűlánc 3 CDR-jével párosulva alkotja az antigénkötő helyet, a klasszikus definíció szerint. A nehézlánc állandó doménjei felcserélhetők, hogy az antigénspecificitás fenntartása mellett megváltozott effektorfunkciót tegyenek lehetővé. A nehézlánc állandó doméneknek 5 fő osztálya létezik. Mindegyik osztály meghatározza az IgM, IgG, IgA, IgD és IgE izotípusokat [24]. Az IgG 4 alosztályra osztható, IgG1, IgG2, IgG3 és IgG4, amelyek mindegyike saját biológiai tulajdonságokkal rendelkezik, az IgA pedig hasonlóképpen IgA1 és IgA2 alosztályokra osztható. A betöltött biológiai funkciótól függően, más szerkezettel rendelkeznek az antigén felismeréséhez, kicsapódáshoz, agglutinációhoz, fagocitózishoz (IgG1/3 és IgA), citotoxicitáshoz (IgG1/3), nyálkahártyán (IgA és IgM) és placentán (IgG1/3) keresztüli szállításhoz, komplementaktiváláshoz (IgG1/3 és IgM) és a gyulladáshoz (IgG1/3) keresztüli felszabadításához (IgE) [24], [26]. Az engedélyezett terápiás antitestek többsége jelenleg a humán IgG1 formátumú, amely immunhatás kiváltására alkalmas (pl. antitestfüggő sejt-közvetített citotoxicitás, antitest-függő sejt-fagocitózis és komplement-függő citotoxicitás) [27].

3.7.1 Immunglobulinok effektor funkciói

Az antitestek a mikroorganizmusok vagy fertőzött sejtek felismerésével alapvető szerepet játszanak a kórokozók elleni védekezésben. Bár a kórokozók behatolásának megakadályozása a védelem egyik lehetséges mechanizmusa, az antitestek számos más mechanizmuson keresztül is képesek a fertőzések ellenőrzésére és felszámolására [25], [28].

A kórokozók megkötésén és közvetlen semlegesítésén túl az antitestek alapvető kapcsolatot képeznek a veleszületett és az adaptív immunrendszerrel, melynek révén a baktériumok, vírusok, gombák és paraziták eliminálását is elősegítik [25], [28]. Az antitestek együttműködve olyan immunkomplexekeket alkotnak, amelyek a kórokozók elkülönítését, a toxinok eltávolítását, a fertőzött sejtek eliminálását, az antigén prezentáció fokozását és a gyulladás szabályozását segítik elő. Az antitestek által kifejtett különféle effektor funkciókat dinamikusan szabályozzák az antitestek állandó doménjének differenciált módosítása révén, amely specifikus utasításokat ad az immunrendszernek [28]. A legtöbb effektor funkciót az antitest állandó (Fc) régiója indukálja, amely kölcsönhatásba léphet a komplementfehérjékkel és a speciális Fc-receptorokkal. Ez utóbbiak a receptor típusától függően aktiváló vagy gátló útvonalakat indukálhatnak, és különböző kombinációkban megtalálhatók a B-sejteken és a legtöbb veleszületett immunsejtben. A legismertebb Fc-közvetített antitest-effektorfunkciók az antitestfüggő sejt-közvetített citotoxicitás (ADCC), az antitestfüggő sejt-fagocitózis (ADCP)

és a komplementfüggő citotoxicitás (CDC). Ezenkívül az antitestek a sejtdifferenciálódás és -aktiváció indukcióján keresztül gyulladást és immunmodulációt közvetítenek [25].

Az ADCC akkor indul be, amikor a veleszületett effektorsejtek Fc-gamma receptorai (Fc γ R) a vírusfertőzött sejtek felszínén lévő vírusfehérjékhez kötődő antitestek Fc-doménjéhez kapcsolódnak. Ez a kölcsönhatás citotoxikus (perforinokat és granzimeket tartalmazó) granulomok felszabadulását indukálja, ami a fertőzött sejtek elpusztítását eredményezi, valamint a későbbi adaptív immunválaszok stimulálására az antigén prezentáció elősegítése vagy a gyulladáshoz vezető mediátorok szekréciójának serkentése révén [29]. Több veleszületett effektorsejt, köztük természetes ölősejtek (NK), neutrofilek, monociták és makrofágok képesek az ADCC-re *in vitro*. *In vivo* körülmények között legfontosabb résztvevőinek azonban az NK-sejteket tartják, amelyek csak az Fc γ RIIIA-t expresszálják [25].

Az ADCP a vírus-antitest-komplexek vagy antitesttel bevont vírusfertőzött sejtek fagocitikus sejtek általi felvétele. A fagocitáló sejtek, beleértve a monocitákat, makrofágokat, neutrofileket, eozinofileket és dendritikus sejteket (DC-k), Fc γ RI-t, Fc γ RII-t és Fc α RI-t expresszálnak, amelyek mind képesek közvetíteni az immunkomplex felvételét. Az effektor leukociták fagocitáló képessége pontosan a sejtípustól, a differenciálódási stádiumtól és az Fc γ R expresszió szintjétől függ. Az ADCP az immunkomplexek eltávolítását eredményezi a fertőzött gazdaszervezetből azáltal, hogy a komplexek a lizoszómákba kerülnek lebontás és antigénfeldolgozás céljából, hogy a sejt felszínén lévő Major Histocompatibility Complex (MHC)-molekulákon prezentálódjanak [25].

Az ADCC és az ADCP mellett az antitestek komplementaktivációt is kiválthatnak. A komplement kaskád vagy közvetlenül, a komplementfüggő citotoxicitás (CDC) révén, vagy közvetve, a komplementtel borított célpontok fagocitikus úton történő eltávolítása és a gyulladáshoz vezető válasz indukálása révén járul hozzá a kórokozó eliminációjához. A klasszikus komplement útvonal aktiválódása a C1q felismerő molekulának a vírusfertőzött sejtekhez kötött antitestek Fc-doménjéhez való kötődéséből ered. A C1q kötődését követően a klasszikus útvonal proteázai aktiválódnak, ami a C2 és C4 hasításához vezet. A keletkező hasadási termékek együttesen alkotják a C3-konvertázt (C4bC2a), amely a C3-at C3a-ra és C3b-re hasítja. A komplement kaskád szabályozásának egyik mechanizmusa az aktív C4b hasadása, amely a komplement aktiváció markereként szolgál. Az anafilatoxinok C3a és C5a felszabadulása pro-inflammatorikus környezetet serkent azáltal, hogy az immunhatású sejtek toborzását és a leukociták, endothelsejtek, epithelsejtek és vérlemezkék aktiválódását indukálja. Az erősen reaktív C3b a kórokozókhoz és a fertőzött sejtekhez kötődik, ami az immunsejteken található komplementreceptorokon keresztül az immunkomplexek kiürítéséhez és fagocitózishoz vezet. A terminális komplement komponensek a membrántámadási komplexbe (MAC) állnak össze, ami a fertőzött sejt lízisét eredményezi. A közvetlen vírusellenes aktivitás mellett a komplementrendszer a B-sejtes válaszokat is szabályozhatja [25].

3.7.2 Intravénás immunglobulin (IVIG)

Az intravénás immunglobulin több ezer egészséges donortól származó polispecifikus, polireaktív immunglobulin molekulák egyesített készítménye [30]. Az IgG monomerek (>96%) mellett az IgG dimerek, IgM és IgA kis százaléka megtalálható az IVIG készítményekben. Szubsztitúciós terápiaként primer és szekunder immunhiányos betegségekben alacsony dózisban, valamint számos autoimmun és gyulladáshoz vezető betegség immunterápiájában nagy dózisban alkalmazzák [31]. Mivel az IVIG-et több donorból állítják elő, számos antitestet tartalmaz, amelyek antigének széles köre ellen irányulnak, következésképpen az immunglobulin Fab-fragmensek variábilis régiói az IVIG készítményekben változatosak [30].

A variábilis régió kötődhet nem saját antigénekhez (idegen antigének), saját antigénekhez és anti-idiotípusos antitestekhez. Az IVIG a bakteriális, vírusos, parazita és mikoplazma antigének elleni antitestek széles spektrumát tartalmazza, amelyek képesek a mikrobák, valamint toxinok opsonizálására és semlegesítésére [30]. Az Ig-terápia engedélyezett autoimmun alkalmazásai közé tartozik például a Guillain-Barré-szindróma, a Kawasaki-kór és a krónikus gyulladáshoz vezető demielinizáló polineuropátia (CIDP) [32].

3.8 Optikai bioszenzorok

Az optikai bioszenzorok a bioszenzorok leggyakrabban előforduló osztálya. Az optikai detektálás az evaneszcens tér és a biofelismerő elem kölcsönhatásának kihasználásával történik. Az optikai bioérzékelés nagyjából két általános módra osztható: jelölésmentes („label-free”) és jelöléses („label-based”). Jelölésmentes mérés során a detektált jel közvetlenül az elemzett anyag és a jelátalakító kölcsönhatása révén jön létre. Ezzel szemben a jelölésen alapuló érzékelő az optikai jelet kolorimetriás, fluoreszcens vagy lumineszcens módszerrel állítja elő [33].

Az optikai bioszenzorok nagy előnyöket kínálnak a hagyományos analitikai technikákkal szemben, mivel lehetővé teszik számos biológiai és kémiai anyag közvetlen, valós idejű és jelölésmentes kimutatását. Előnyeik közé tartozik a nagyfokú specificitás, érzékenység, gyors válaszidő, a szerves oldószerek csökkentett felhasználása csökkenti a költségeket, kis méretéből adódóan a kompaktság, valamint a könnyű kezelhetőség, amely nem igényel szakképzett személyzetet [33], [34]. Az optikai bioszenzorok kutatása és technológiai fejlesztése az elmúlt évtizedben exponenciális növekedésen ment keresztül. A hozzá kapcsolódó kutatások és fejlesztések főként az egészségügyre, a környezetvédelmi alkalmazásokra és a biotechnológiai iparra irányult [33].

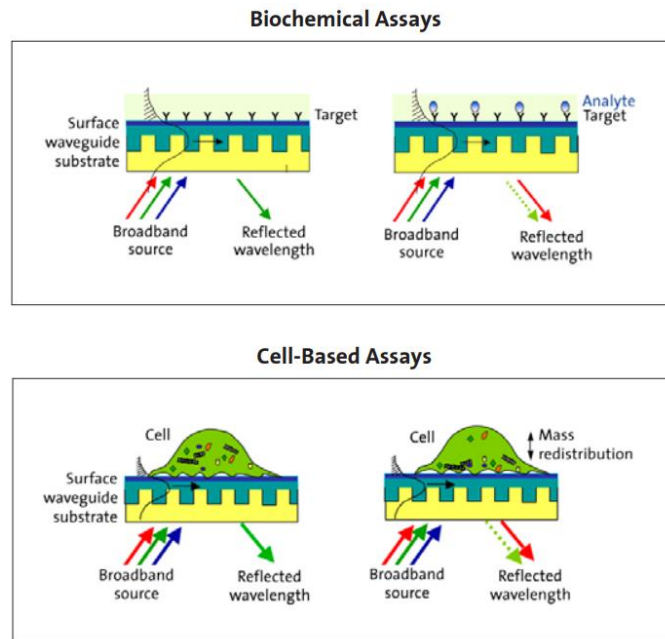
3.8.1 Epic Cardio

Az Epic Cardio (Corning Inc., Corning, NY, USA) egy nagy felbontású, jelölésmentes optikai bioszenzor, amely 384 lyukú Society of Biomolecular Screening (SBS) szabvány formátumú szenzorlemezrel ellátott mikrolemezeket fogad, melyek megfelelő (nióbbium-pentoxid – Nb_2O_5) bevonattal rendelkeznek az eltérő felhasználáshoz [35], [36].

Az fényforrásból érkező széles spektrumú fény a mikrotiter lemez alján egy nagy törésmutatójú, vékony hullámvezető rétegbe csatolódik (2. ábra). A beeső fénysugarak a hullámvezető réteg felületén teljes visszaverődésen mennek keresztül, minden ilyen alkalommal a fáziseltolódást szenvednek el. A fáziseltolódások a beeső fény egy adott hullámhossz komponensét felerősítik, konstruktív interferenciát hozva létre, ezáltal a hullámhossz komponens rövid ideig a hullámvezető rétegben terjed tovább. Mindemellett a rács monokromatikus tükröként viselkedik a fény rezonáns frekvenciájú komponensével szemben, következésképpen a megvilágító fénynek csak egy rezonáns komponensét veri vissza a hullámvezető rétegből [7], [37].

Az érzékelés elve azon alapul, hogy a teljes visszaverődések során felerősített és terjedő hullámhossz komponens a hullámvezető réteg felületének közvetlen közelében lévő törésmutatótól függ, az így kialakuló zónát az evaneszcens mező kiterjedése határozza meg.

Az említett evaneszcens teret befolyásolja a hullámvezető réteg és a fölötte elhelyezkedő folyadékréteg határfelületéről visszaverődő fény által kialakított, csökkenő elektromágneses mező. Törésmutató változás esetén változik a rezonancia frekvencia, mely következtében a kiérkező hullámhossz komponens módosul [38]. Tulajdonságai révén biomolekuláris interakciók elemzésére, valamint sejtalapú vizsgálatokra egyaránt alkalmas [37].



2. ábra: Biokémiai vizsgálatok (felül): a biokémiai kötődési folyamatok törésmutató-változást okoznak, ami pikométeres hullámhosszeltolódást eredményez.

Sejt-alapú vizsgálatok (alul): a sejten belüli tömegváltozások szintén a törésmutató változását okozzák, ami pikométeres hullámhosszeltolódást eredményez (LINK1)

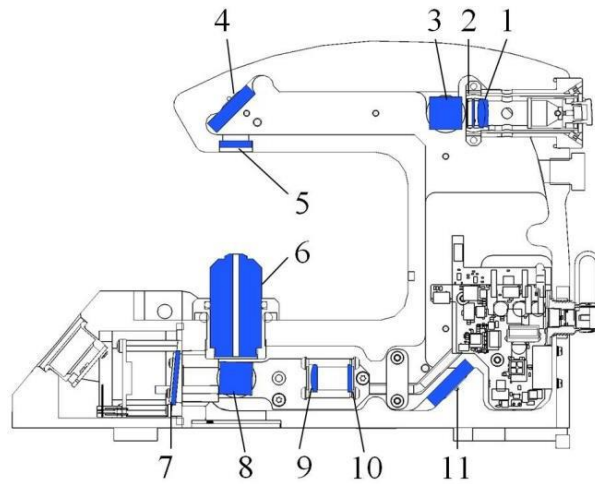
3.8.2 HoloMonitor M4 élő sejt képalkotó mikroszkóp

Az elmúlt évtizedben a kvantitatív fázis képalkotás (QPI – Quantitative Phase Imaging) gyorsan növelte jelentőségét az orvosbiológiai képalkotásban, mivel számos különböző alkalmazásban bizonyított, mint például az élő sejtek képalkotása, a sejtomográfia, a vérsejtek és a spermiumok elemzése. A QPI számos alkalmazásban alapvető fontosságú a kvantitatív adatok nem invazív kinyerése végett, mivel egyre több kutató értékeli a sejtek viselkedését potenciálisan megváltoztató jelölési technikák alternatíváját. Ez különösen fontos az olyan alkalmazásokban, mint a hosszú távú sejt dinamika elemzése, az in vitro megtermékenyítés vagy a sejtherápia, ahol a jelölésmentes technikák elengedhetetlenek [1], [33].

A digitális holográfiával a kvantitatív fázisképek létrehozásának számos módja van, ezért egyre intenzívebben kutatott terület. A digitális holográfia minden változata kvantitatív fázisképeket hoz létre egy tárgy hologramjának digitális érzékelőn történő rögzítésével és a képadatok numerikus rekonstruálásával [1].

Az élősejtes képalkotás lehetővé teszi olyan dinamikus sejtfolymatok tanulmányozását, amelyek a rögzített sejtes vizsgálatokban nem vizualizálhatók. A tudományos életben és a gyógyszeriparban egyre több tudós választja az élősejtes elemzést a hagyományos fixált sejteken végzett vizsgálatok helyett vagy mellett. A HoloMonitor M4 segíti a kutatókat a fluoreszcens analízis alapvető hátrányainak kiküszöbölésében, különösen például a kémiai jelölések vagy a genetikai módosítások hatásainak leküzdésében, amelyek megváltoztathatják a sejtek viselkedését. Emellett a jelölésmentes elemzés egyszerű, és kiküszöböli a festési eljárásokkal járó költségeket [1]. A sejtek mozgásának és morfológiai paramétereinek hosszabb időn keresztül, fiziológiás körülmények között történő in situ megfigyelése kritikus fontosságú az alap kutatásban és az orvosi biológiai alkalmazásokban egyaránt [2].

A HoloMonitor M4 optikai felépítése az 3. ábrán látható. A 635 nm-es lézert fényt egy polarizációfenntartó szálcsatlakozó kábelen keresztül juttatják a HoloMonitor M4 készülékhez, és egy lezárt FC/APC (Ferrule Connector/Angle Polished Connector) szálcsatlakozón keresztül jut be a műszerbe. A lézert fényt egy akromatikus lencse (1) kollimálja párhuzamos sugárrá, amelynek intenzitását egy abszorpciós semleges sűrűségű szűrő (2) korlátozza. A sugárnyalábot egy 50:50 arányú sugárelosztó segítségével tárgynyalábra és referenciasugárra osztja, és a tárgynyalábot egy tükör (4) egy lezárt ablakon (5) keresztül a mintára irányítja. A mintán áthaladó fényt ezután egy Olympus PLN 20x 20x mikroszkóp objektív (6) gyűjti össze, majd egy sugárelosztó (8) egy polarizációs szűrőn (7) keresztül egy 1,3 MP-es CMOS (Complementary Metal-Oxide Semiconductor) globális záras USB 2.0 kamerába irányítja. A referenciasugárat egy tükör (11) egy semleges sűrűségű szűrőn (10) és egy akromatikus lencsén (9) keresztül irányítja, majd a sugárelosztó (8) egyesíti a tárgyfénnyel. A sugárelosztó (8) az optikai tengelyhez képest kis szögben meg van döntve, hogy tengelyen kívüli konfigurációt hozzon létre. Minden optika vagy optikai részegység az alvázhoz van rögzítve. A külső rezgések hatásának minimalizálása és az optikai robusztusság maximalizálása érdekében a teljes optikai konfigurációban csak két igazítási pont van [1].



3. ábra: HoloMonitor M4 optikai kialakítása [31].

- (1. Kollimátor lencse 2. Neutrális denzitású szűrő
3. Sugárelosztó 4. Tükör 5. Ablak, 6. Mikroszkóp objektív
7. Polarizációs szűrő 8. Nyalábosztó
9. Akromatikus lencse
10. Neutrális denzitású szűrő 11. Tükör)

4 Felhasznált anyagok és módszerek

4.1 Felhasznált anyagok

Dulbecco's foszfát pufferelt sóoldatot (DPBS) (Corning, Corning, New York, Egyesült Államok), RPMI + GlutaMAX (Thermo Fischer Scientific, Waltham Massachusetts, Egyesült Államok), FCS (Biowest, Nuaille, Franciaország), Amphotericin B (Biowest, Nuaille, Franciaország), Penicillin-Streptomycin Mixture (Lonza Group AG, Bázél, Svájc), IVIG (Bayer AG, Leverkusen, Németország). *Escherichia coli*-ből származó LPS (L2880), a *Saccharomyces cerevisiae*-ből származó zymosan (Z4250), a *Salmonella typhimurium*-ból származó flagellin, *Staphylococcus aureus*-cól származó peptidoglükán (77140), a poly(I:C) (P9582), valamint a Millipore, UFC510008 szűrő a Sigma-Aldrich-től állt rendelkezésre.

4.1.1 Ligandok beoldása és tárolása

A zymosan csomós por formájában érkezett, melyet PBS-ben oldottunk fel 50 mg/ml koncentrációra. Felhasználásig 4-8 °C-on tároltuk. Liofilizált porként érkező LPS-t PBS-ben oldottuk 1 mg/ml koncentrációig, felhasználásig 4-8 °C-on tároltuk. A *Salmonella* sejtekből származó, tisztított filamentumokat 10 mM DPBS-ben oldottuk be 5 mg/ml koncentráción. Hőkezelés alatt (15 perc, 70 °C) a szál depolimerizálódik és monomerikus flagellin egységek keletkeznek. Az oldatot 100 kDa szűrőn (Millipore, UFC510008) keresztül centrifugáltuk, hogy eltávolítsuk a mintában maradt aggregátumokat vagy filamentum töredékeket [39]. A flagellint 5mg/ml koncentrációig hígítottuk és felhasználásig -20 °C-on tároltuk. PGN és poly(I:C) esetében a liofilizált port 10 mg/ml és 5 mg/ml koncentrációig PBS-ben hígítottuk, felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

4.2 Monocita sejtenyészet

A mérés során THP-1 humán monocitoid sejtvonallal dolgoztunk (ATCC® TIB- 202™). A sejteket 10% magzati borjú szérumot (FCS) tartalmazó RPMI 1640 tápfolyadékban tenyésztettük

37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában, 100 I.U./ml penicillin és 100 µg/ml streptomycin tartalmú médiumban tartottuk fenn, a sejtkoncentrációt 500.000 – 1.500.000/ml között tartva

4.3 Mérés menete

4.3.1 LPS és flagellin ligandumok rövidtávú hatásának vizsgálata, THP-1 sejtekre, Epic Cardioval

Az Epic Cardio mérések minden esetben a 50 µl PBS/lyuk alapvonal felvételével kezdődtek, majd ezt követte az 50 µl PBS-ben oldott LPS és flagellin. Mosást követően 50 µl RPMI + 10% FCS-sel blokkoltuk a szenzorlemez felületét, hogy a későbbiekben hozzáadott IVIG kizárólag az LPS-hez vagy flagellinhez tudjon kötődni, valamint, hogy a monociták ne a szenzorlemez szabad helyeivel kerüljenek kölcsönhatásba, ezután az Epic Cardiora helyeztük. A mosott lyukakba ezt követően 50 µl PBS-ben oldott IVIG került. Mérés utáni mosást a 25 µl RPMI + 10% FCS-t tartalmazó sejtes alapvonal felvétele követi, ehhez adtuk hozzá az 1000 sejt/25 µl koncentrációjú sejtszuszpenziót, melyet Bürker-kamrával számlált sejttenyészetből hígítottunk. A sejtek aktivációját 1 órán keresztül vizsgáltuk. A mérések során alapvető különbséget az alkalmazott LPS, flagellin és IVIG koncentrációja jelentette.

4.3.2 Zymosan ligandum rövidtávú hatásának vizsgálata, THP-1 sejtekre, Epic Cardioval

A kísérletek során karbonát-bikarbonát (0,05M Na₂CO₃ + NaHCO₃) pufferben oldva pipettáztuk az 50 µl zymosan oldatot a lyukakba, majd centrifugálás után (10 sec, 300 x g) 12 órán keresztül hűtőben, lefedve tároltuk [40]. Az alapvonal felvételét a pihentetés után kezdtük meg. A mosás és az 50 µl RPMI + 10% FCS blokkolás, centrifugálás után (10 sec, 300 x g) újból a Cardio bioszenzorra helyeztük a mikrotiter lemezt. Újabb mosás után kerül az 50 µl IVIG a lyukakba, majd centrifugálást követően (10 sec, 300 x g) a lemez a Cardiora került. Ezt követte egy újabb mosás és a sejtes alapvonal felvétele 25 µl RPMI + 10% FCS-t tartalmazó lyukakkal. A sejteket RPMI + 10% FCS médiumban vettük fel, 1000 sejt/25 µl koncentrációt alkalmaztunk. Az expozíció, melynek során a sejtek aktivációját vizsgáltuk, 1 órán keresztül tartott.

4.3.3 TLR ligandok rövidtávú hatásának vizsgálata, egészséges ember fehérvérsejtjeire, Epic Cardioval

A mérés az 50 µl PBS/lyuk alapvonal felvételével kezdődött, majd ezt követte, kezelt kamrák esetén, az 50 µl, 100 µg/ml koncentrációjú IVIG oldat, mely 30 percig alakíthatta ki a fleszint. Háromszori PBS-es mosást követően 50 µl RPMI + 10% FCS-sel blokkoltuk a szenzorlemez felületét, ezután az Epic Cardiora helyeztük. Az oldat gyors mozdulattal történő eltávolítása után a 20 µl-t pipettáztunk az hígított ligandokból, mind az IVIG-gel kezelt és kezeletlen felszín

esetében. Cardiora helyezést követően megkezdtük a vér levételét. Az 50 µl, 0,5 mM-os EDTA-t tartalmazó csőbe csepegtettem néhány csepp vért, melyet közben az EDTA-val szuszpendáltam, a véralvadás megelőzéséért. Az összegyűjtött, alvadékmentes vér térfogata minimum 100 µl. Az 50 µl EDTA-val kevert vért 200 µl lízis pufferhez adtuk, melyet 10 percig kézben billegtettünk. Centrifugába helyezük (3000 rpm, 5 perc). Majd leszívtuk a felülúszót, a maradék pelletet 200 µl lízis pufferban feloldottuk. Ezt a folyamatot még kétszer elvégeztük. A maradék pelletet 500 µl RPMI + 10% FCS-ben feloldottuk. A sejtszámot 5000 sejt/µl sejtkoncentrációval számítottuk, kalkulálva az 50 µl EDTA hígító hatásával. A sejtszuszpenziót az oldott ligandokkal hígítottuk a kívánt koncentrációra. A sejt-ligand szuszpenzióból 20 µl-t pipettáztunk a lyukakba. A sejtek aktivációját 1 órán keresztül vizsgáltuk.

4.3.4 IVIG hosszútávú hatásának vizsgálata a monocita sejtvonal aktivációjára, HoloMonitor M4 segítségével

Különböző koncentrációban jelenlévő rögzített, illetve oldott IVIG jelenlétében vizsgáltuk a THP-1 sejtek aktivációját, HoloMonitor segítségével.

A lyukakba 100 µl-nyi 100, 10, és 1 µg/ml koncentrációjú PBS-ben oldott IVIG került 1. táblázat (A-D) szerint. A 0-val jelölt helyekre PBS került. A platet az 1 órás pihentetést követően 3-szor mossuk PBS-sel, majd 100 µl RPMI + 10% FCS -sel blokkoljuk az IVIG által nem fedett felszíneket. Oldott IVIG esetében a beoldás RPMI + 10% FCS -ben történt, szintén 100, 10, 1 µg/ml koncentrációkat készítve. A lyukakba Bürker-kamrás sejtszámlálást követően 100 µl, 2×10^5 sejt/2ml koncentrációjú sejtszuszpenziót pipettáztunk, majd a wellket Hololiddel lefedve a HoloMonitorba helyeztem, 5% CO₂, 37°C – on inkubálva 96 órán keresztül folyt a mérés.

1. táblázat: IVIG koncentrációk a bevonat kialakításához, valamint az oldott IVIG koncentrációk

	1	2	IVIG BEVONAT (µg/ml)
A	100	100	
B	10	10	
C	1	1	
D	0	0	
E	100	100	oldott IVIG (µg/ml)
F	10	10	
G	1	1	
H	0	0	

4.3.5 TLR ligandok hosszútávú hatásának vizsgálata a monocita sejtvonal aktivációjára, HoloMonitor M4 segítségével

A mérés előkészítése során IVIG bevonatot, valamint oldott IVIG-et tartalmazó lyukba a TLR ligandok valamelyike került a 2. táblázat szerint (zymosan, LPS, flagellin, poly(I:C), PGN). Az bevonatot képző IVIG-et PBS-ben oldva, 100 µg/ml koncentrációban alkalmaztam. A 30 perces felületi kezelést követően a lyukak tartalmát határozott mozdulattal eltávolítottam, majd 3-szor mostam PBS-sel. Ezt követte egy blokkolási fázis, ahol RPMI + 10% FCS-t tartalmazó oldat alkalmaztam. Az oldatot eltávolítva hozzáadtam a lyukakhoz a hígított ligandokat, majd ezután a sejtuszpenziót majd a wellket Hololiddel lefedve a HoloMonitorba helyeztem, 5% CO₂, 37°C – on inkubálva 96 órán keresztül folyt a mérés.

2. táblázat: A mérés során alkalmazott elrendezés és az alkalmazott TLR ligandok mennyisége

	zymosan	LPS	flagellin	poly(I:C)	PGN
oldott IVIG	10 µg/ml	100 ng/ml	100 ng/ml	50 µg/ml	20 µg/ml
IVIG coat	10 µg/ml	100 ng/ml	100 ng/ml	50 µg/ml	20 µg/ml

Az alkalmazott koncentrációkat irodalomkutatás során gyűjtöttem. Zymosan esetén a 10 µg/ml koncentrációnál látványos változásokat tapasztaltak, megfelelő citokin és kemokin felszabadulás mellett. Ugyanakkor magasabb koncentrációnál citotoxikus változások figyeltek meg [41]. Hasonlóan a PGN-hez, ahol koncentráció függő apoptózisról számoltak be 20 µg/ml felett, emellett adhéziós vizsgálatok során meglepő módon azt találták, hogy a PGN dóziszfüggő módon elősegíti a THP-1 sejtek tapadását a tenyésztőedény falához, ahogy az érett monocitákra jellemző [42]. Mindkét esetben úgy láttam, hogy ezen koncentrációk hatását érdemes kísérleteim során nyomon követnem, melyeknél még nem számottevő a sejthalálozás, de már szembetűnő változásokat tapasztalhatunk. 100 ng/ml-es LPS koncentrációnál aktiválatlan THP-1 sejtek indukált morfológiai változását írták le, mely differenciálódott sejteket, makrofágokat, eredményezett [43]. A bakteriális flagellin hatását főként sejtaktivátorokkal egyidejű alkalmazása során figyelték meg, melynek során a megnövekedett fehérje expresszióját tapasztalták [44]. A leggyakoribb alkalmazott koncentráció 100 ng/ml volt, melyet ideálisnak véltem a hosszútávú hatások vizsgálatához. Humán monocita, valamint THP-1 sejteken végzett kísérlet során 50 µg/ml poly(I:C) sejtenyészetbe juttatása után megnövekedett citokin termelődést tapasztaltak, mely érdekesnek tűnt arra, hogy

kísérleteimben tüzetesebben megvizsgáljam ennek a koncentráció hatását a sejtek morfológiájára [45].

5 Eredmények és értékelésük

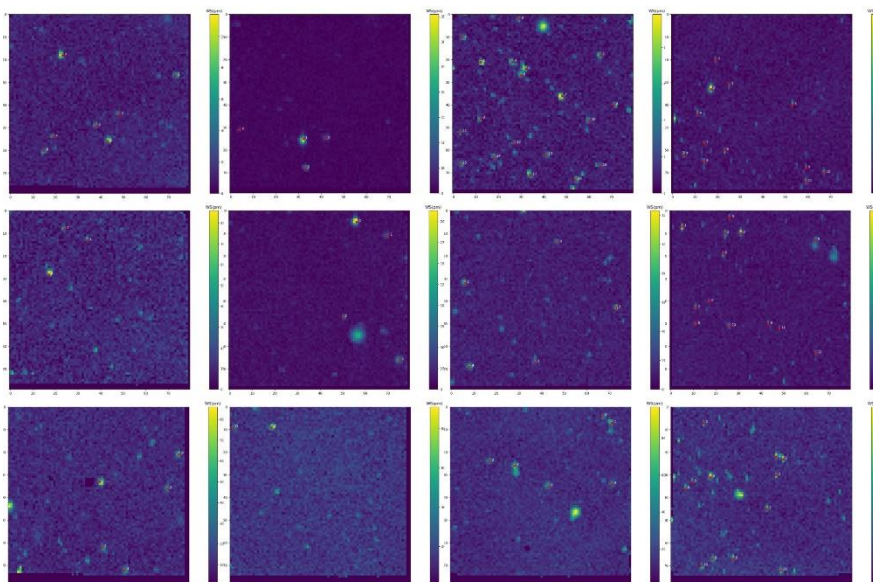
5.1 LPS és flagellin ligandumok rövidtávú hatásának vizsgálata, THP-1 sejtekre, Epic Cardioval

5.1.1 Flagellin és LPS

Az értékelés Béres Bálint által készített Python program segítségével zajlott (későbbiekben Python program). Az Cardio képe megegyezik a platemap kiosztásával, ami a továbbiakban is igaz lesz. Állandó IVIG koncentráció mellett változó koncentrációjú LPS-t és flagellint alkalmaztunk (3. táblázat). A 4. ábrán jól látható, hogy a wellek többségében nagyszámú sejtadhézió volt jellemző.

3. táblázat: Platemap, az IVIG bevonattal ellátott wellek, LPS és flagellin koncentrációjával

100 µg/ml IVIG coat			
LPS		Flagellin	
0,2 µg/ml	20 ng/ml	2 µg/ml	0,2 µg/ml
2 ng/ml	0,2 ng/ml	20 ng/ml	2 ng/ml
0,02 ng/ml	0 ng/ml	0,2 ng/ml	0 ng/ml

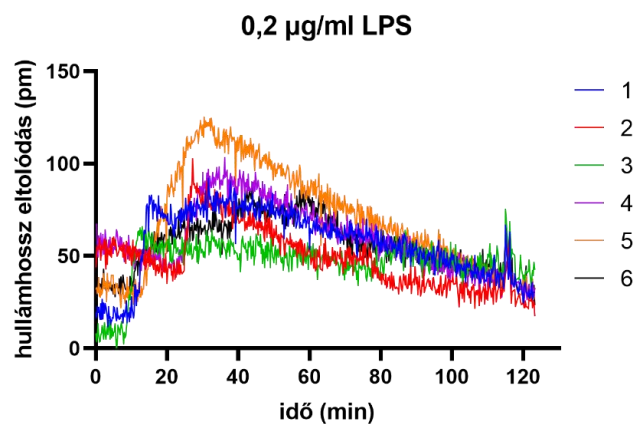


4. ábra: Epic Cardio képe Python programban. IVIG coatot, valamint oldott LPS-t (bal oldal) vagy flagellint (jobb oldal) tartalmazó wellek.

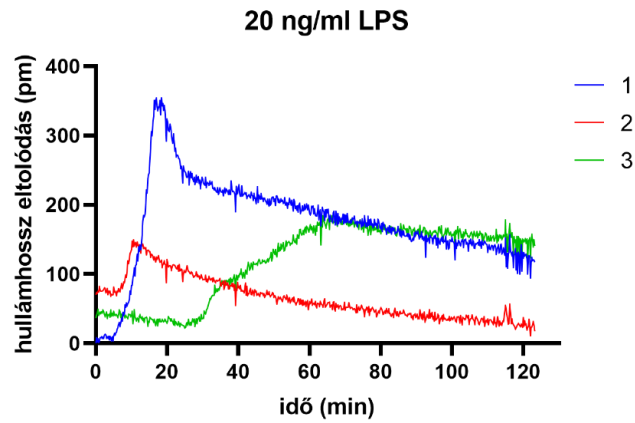
A következő ábrák az egyes wellekben, a szenzorlemez felületére kitapadó, sejtek hullámhossz eltolódás értékeit tartalmazzák. Igyekeztem az egyedi sejteket vizsgálni, tehát ahol több sejt kitapadásából adódó értékeket véltem, azokat az adatokat figyelmen kívül hagytam, ugyanezt tettem az irreálisan kiugró értékeket tartalmazó, továbbá a kép szélein lévő adatsorokkal is. Emellett a könnyebb átláthatóság érdekében 10 sejt adataiban maximalizáltam a közölt értékeket.

Az adatokat koncentrációként szemléltetem, a 0,2 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú LPS-t tartalmazó welltől kezdve (5. ábra). A wellék mindegyike IVIG kezeléson esett át, ezért az ábrákon csak a wellék közti koncentráció különbségeket tüntetem fel. Mindegyik ábrán megfigyelhetőek a szenzorlemezre kitapadt sejtek által okozott hullámhossz eltolódás, mely az adhéziónövekedésével egyre nagyobb jelet ad (5-9. ábra). Látható, hogy sejtek nagy hányadára a 60. percben már az alacsonyabb, csökkenő affinitás a jellemző.

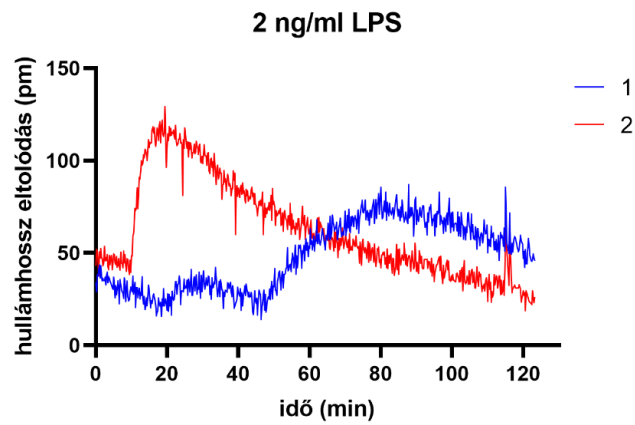
Mivel ezen mérés mindegyik görbájén 120 perc környékén feltűnik egy kiugró jel, így ezt zajként értelmeztem és nem vettem figyelembe.



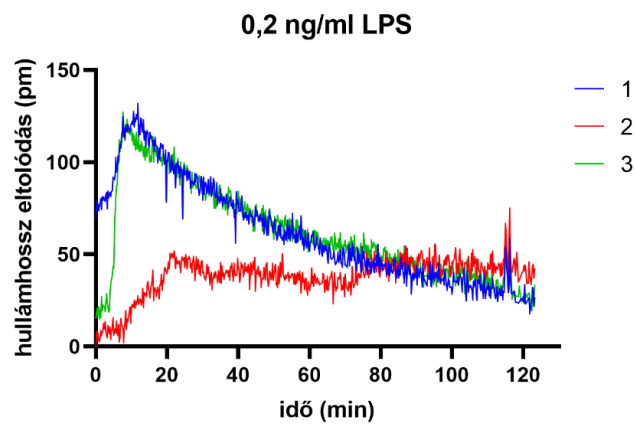
4. ábra: IVIG bevonattal ellátott, 0,2 $\mu\text{g/ml}$ LPS-t tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



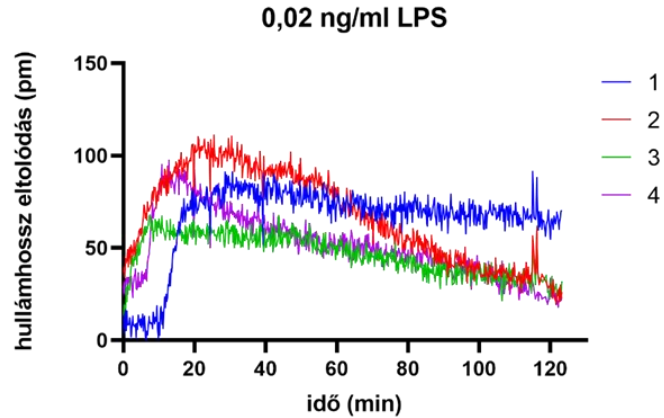
5. ábra: IVIG bevonattal ellátott, 20 ng/ml LPS-t tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



7. ábra: IVIG bevonattal ellátott, 2 ng/ml LPS-t tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi

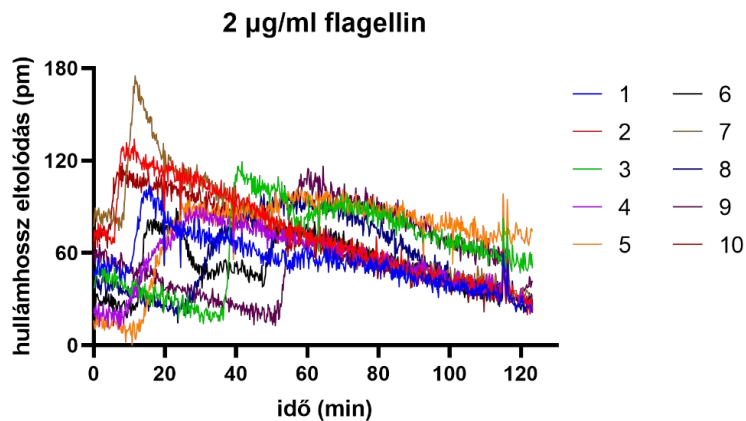


6. ábra: IVIG bevonattal ellátott, 0,2 ng/ml LPS-t tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi

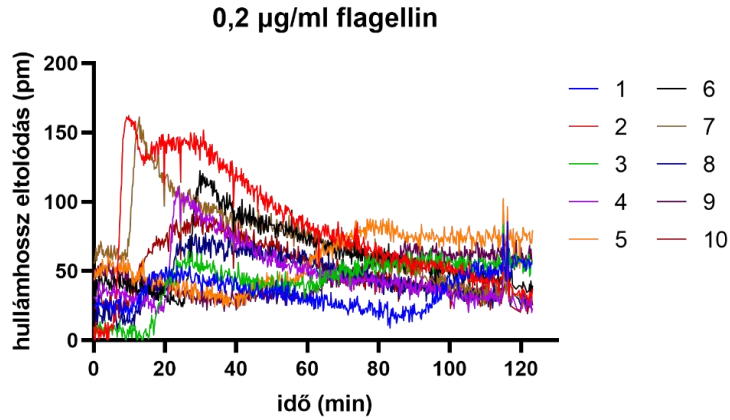


9. ábra: IVIG bevonattal ellátott, 0,02 ng/ml LPS-t tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi

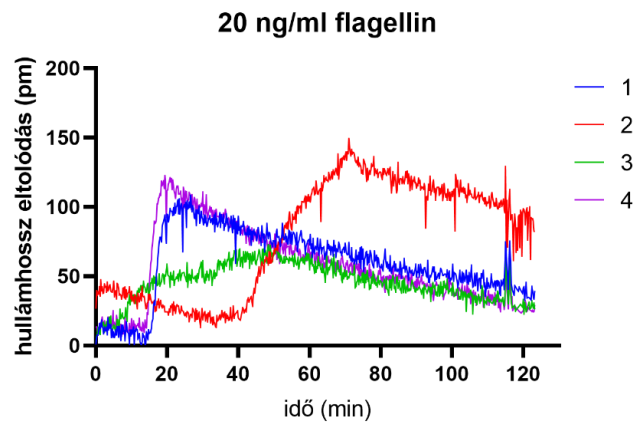
A következő ábrákon ugyanezen mérés során vizsgált IVIG bevonatra és eltérő flagellin koncentrációra adott hullámhossz értékek láthatóak (10-14. ábra). Összességében több sejtről sikerült adatot gyűjtenem. Észrevehető, hogy az LPS-sel ellentétben ezeknél az well-eknél a vizsgálat későbbi perceiben is történt kitapadás.



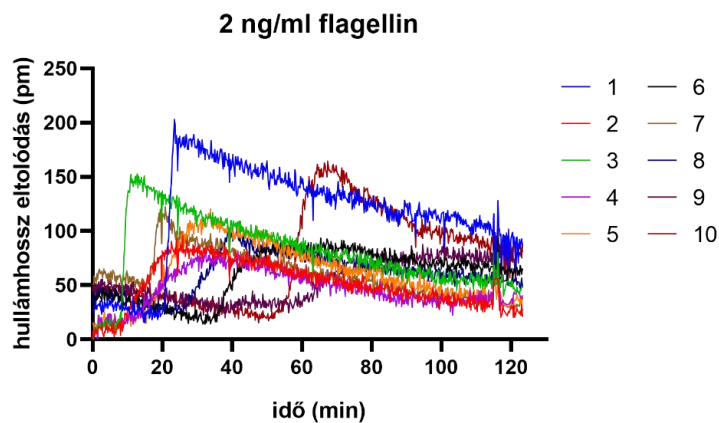
10. ábra: IVIG bevonattal ellátott, 2 µg/ml flagellint tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



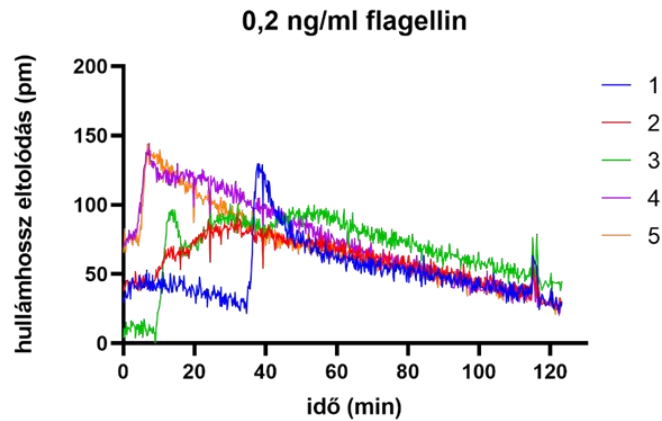
11. ábra: IVIG bevonattal ellátott, 0,2 µg/ml flagellint tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



12. ábra: IVIG bevonattal ellátott, 20 ng/ml flagellint tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi

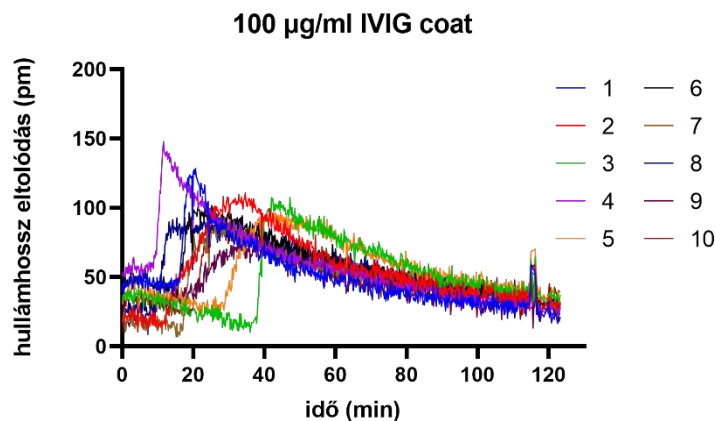


13. ábra: IVIG bevonattal ellátott, 2 ng/ml flagellint tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



14. ábra: IVIG bevonattal ellátott, 0,2 ng/ml flagellint tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi

A 0 ng/ml LPS és flagellint tartalmazó wellék lényegében megegyeznek, csak IVIG bevonatot tartalmaztak, ezért egy ábrán tüntetem fel az adatokat. A vártnak megfelelő mennyiségű sejt tapadt ki a szenzorlemez felületére, nagy részük hasonló karakterisztikát mutatva (15. ábra).



15. ábra: Kizárólag IVIG bevonattal ellátott well hullámhossz eltolódás görbéi

A görbék alapján kijelenthető, hogy a mérés során minden ligand koncentrációnál, LPS és flagellin esetén, valamint a tisztán IVIG felületkezelt lyukakban is sejtek kitapadása által létrejövő hullámhossz eltolódás detektálható. Így az LPS-nek és falgellinnak rövidtávú hatása kizárólag IVIG jelenlétében tapasztalható.

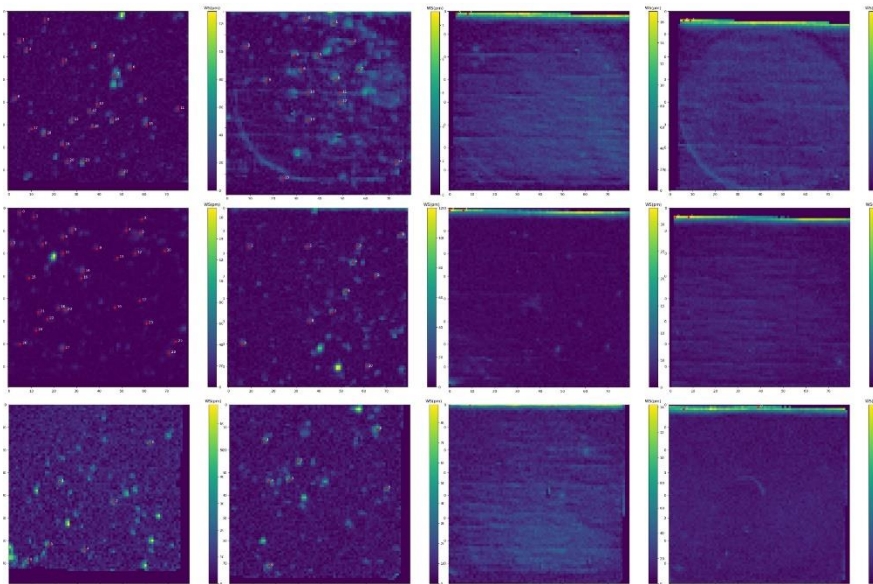
Következő mérés során IVIG kezelt és kezeletlen wellek hatásának különbségét vizsgáltam LPS jelenlétében. Előzetesen arra szerettem volna választ kapni, ha a fentebb bemutatott kísérletet megismétlem, tapasztalható-e LPS rövidtávú hatása az IVIG elhagyásával.

Az adatok gyűjtése során igyekeztem, a korábban ismertetett módon, egyedi sejteket kijelölni és annak adatait közölni. IVIG bevonattal nem rendelkező wellek esetén a program széli értékeket ismert fel, ezeket emiatt nem vettem figyelembe.

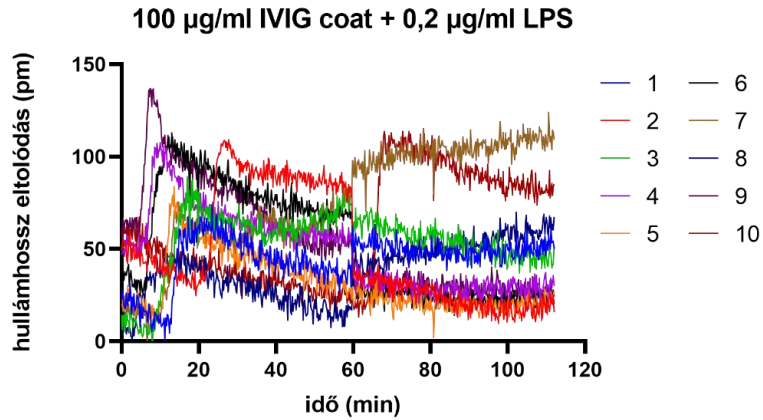
Kiértékelése során megfigyelhető volt, hogy a kép baloldalán lévő lyukakban, melyek IVIG bevonatot tartalmaztak, sejtek jelentek meg, ellentétben a bevonatot nem tartalmazó lyukakkal szemben (4.táblázat, 16. ábra). Mivel kizárólag kezelt lyukak esetében sikerült sejtadatot kapnom, a továbbiakban ezeket tüntettem fel (17-22. ábra). Várt módon, sejtekre jellemző hullámhossz eltolódás értékeket figyelhetünk meg.

4. táblázat: Platema, az IVIG-gel kezelt és kezeletlen wellek LPS koncentrációjával

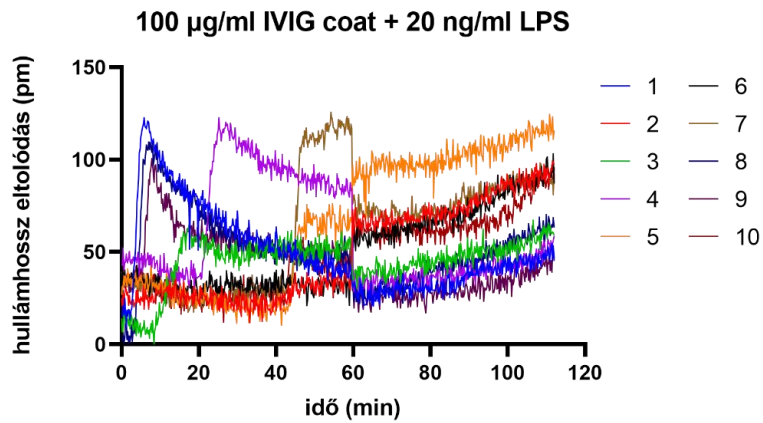
100 µg/ml IVIG coat + LPS		LPS	
0,2 µg/ml	20 ng/ml	0,2 µg/ml	20 ng/ml
2 ng/ml	0,2 ng/ml	2 ng/ml	0,2 ng/ml
0,02 ng/ml	0 ng/ml	0,02 ng/ml	0 ng/ml



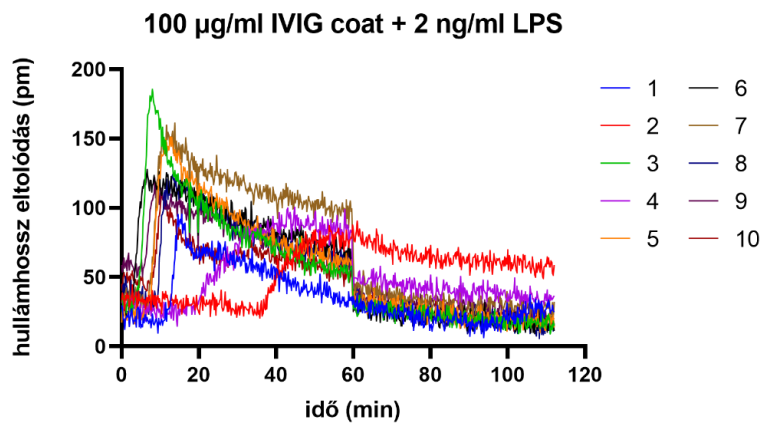
16. ábra: Epic Cardio képe Python programban. IVIG coatot és oldott LPS-t (bal oldal), és IVIG-et nem tartalmazó (jobb oldal).



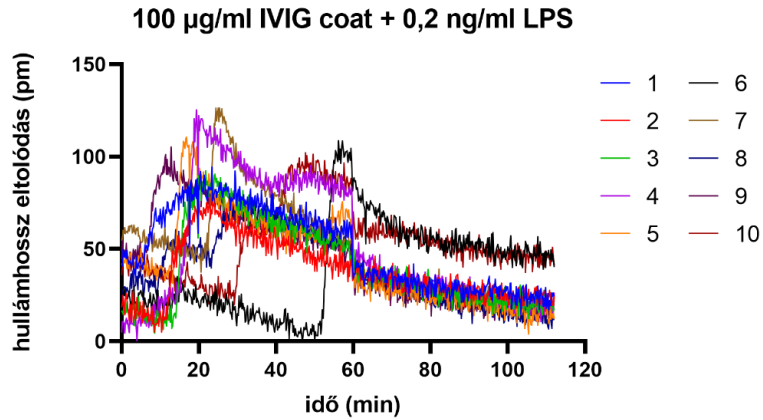
17. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 0,2 µg /ml LPS-t tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



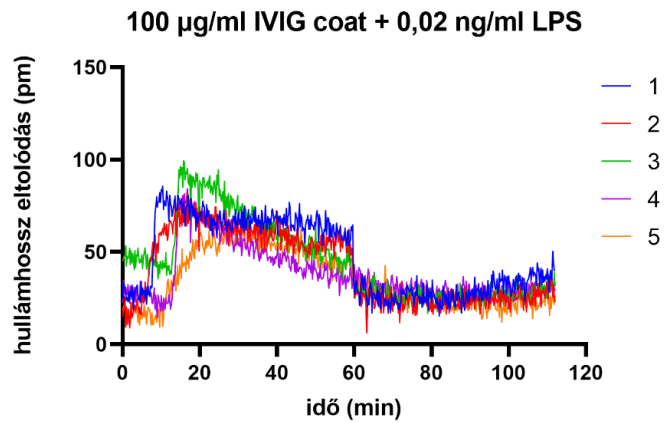
18. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 20 ng /ml LPS-t tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



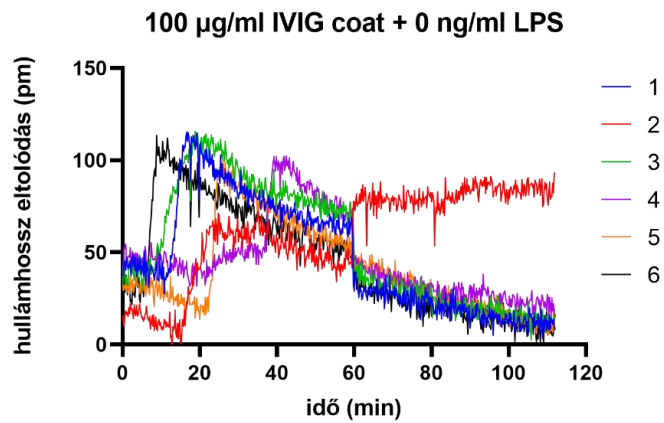
19. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 2 ng /ml LPS-t tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



20. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 0,2 ng /ml LPS-t tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



21. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 0,02 ng /ml LPS-t tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



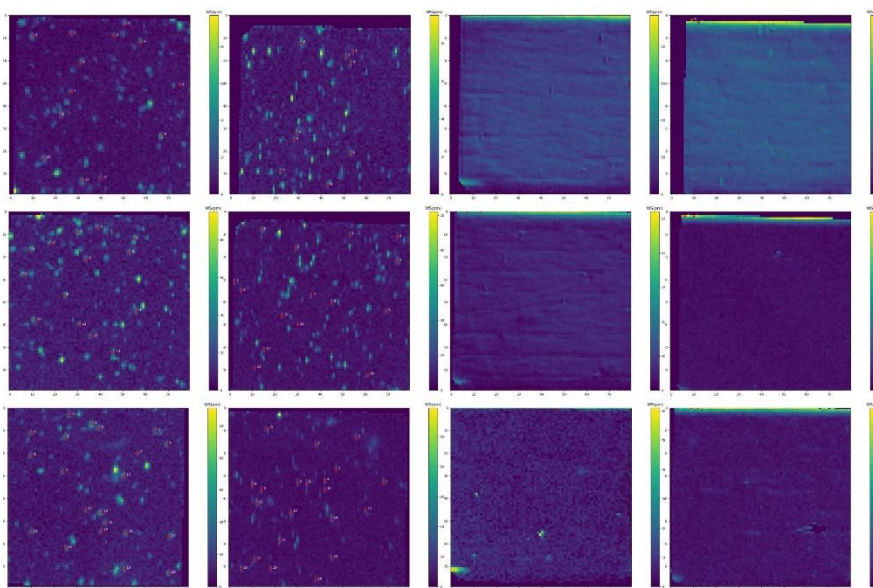
22. ábra: Kizárólag IVIG bevonattal ellátott well hullámhossz eltolódás görbéj

Ezen adatok ismeretében elmondhatjuk, hogy IVIG-et nem tartalmazó wellek esetén, nem tapasztaltunk rövidtávú hatást a THP-1 sejtekre. Így nem jelenthető ki, hogy az LPS-nek rövidtávú hatása volt az adott kísérleti elrendezésben.

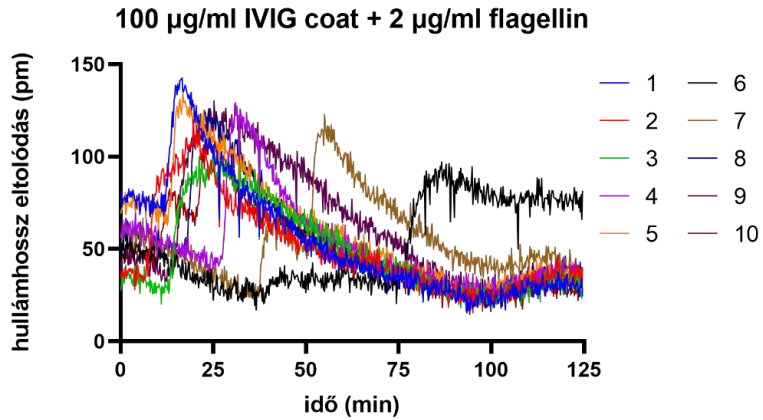
Ugyanezen célok érdekében LPS helyett flagellinnel is elvégeztem ezt a kísérletet, hasonló eredményekre számítva (5. táblázat, 23. ábra). A sejtek nagy számban kizárólag az IVIG bevonattal rendelkező lyukakban adtak jelet (24-29. ábra). Nem tapasztaltunk rövidtávú hatást a tisztán flagellin tartalmazó lyukak esetében sem.

5. táblázat: Platemap, az IVIG-gel kezelt és kezeletlen wellek flagellin koncentrációjával

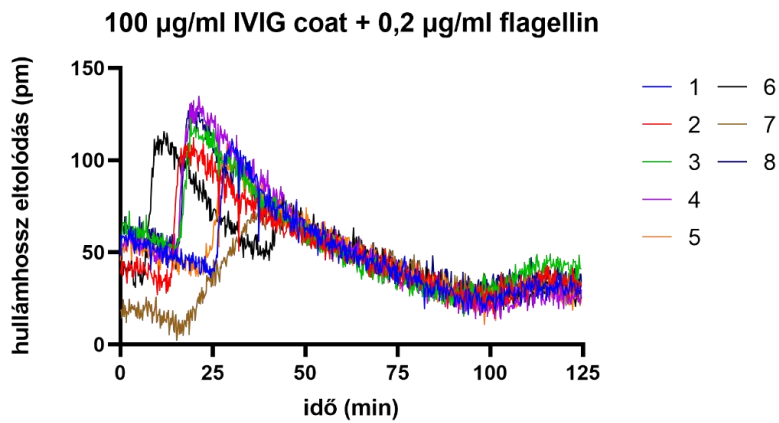
100 µg/ml IVIG coat + flagellin		flagellin	
2 µg/ml	0,2 µg/ml	2 µg/ml	0,2 µg/ml
20 ng/ml	2 ng/ml	20 ng/ml	2 ng/ml
0,2 ng/ml	0 ng/ml	0,2 ng/ml	0 ng/ml



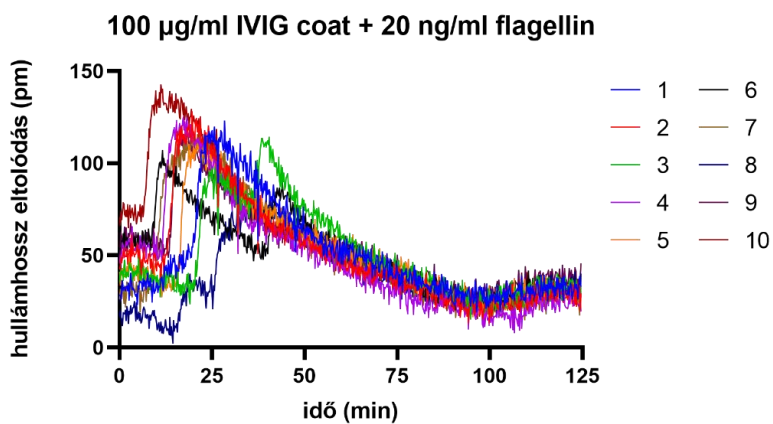
23. ábra: Epic Cardio képe Python programban. IVIG coatot és oldott flagellint (bal oldal), és IVIG-et nem tartalmazó (jobb oldal) wellek képe.



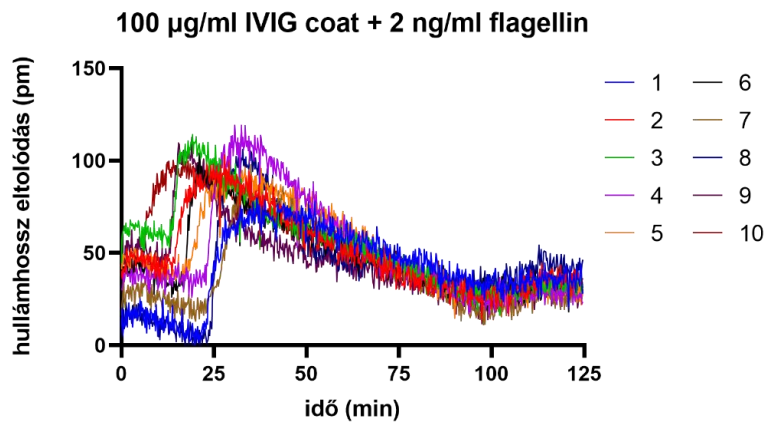
24. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 2 µg /ml flagellint tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



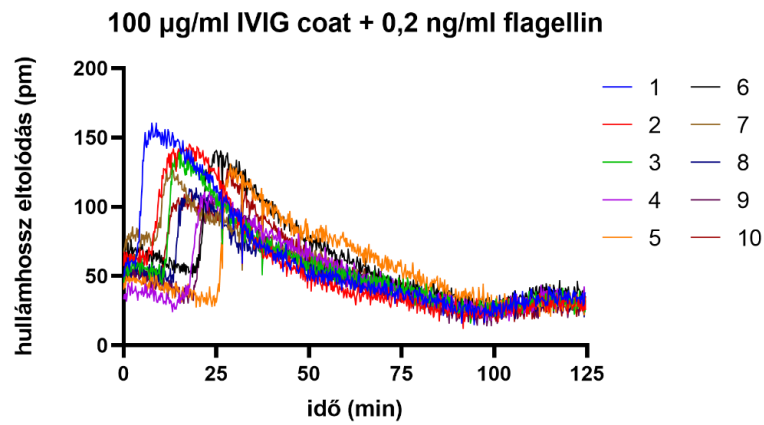
25. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 0,2 µg /ml flagellint tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



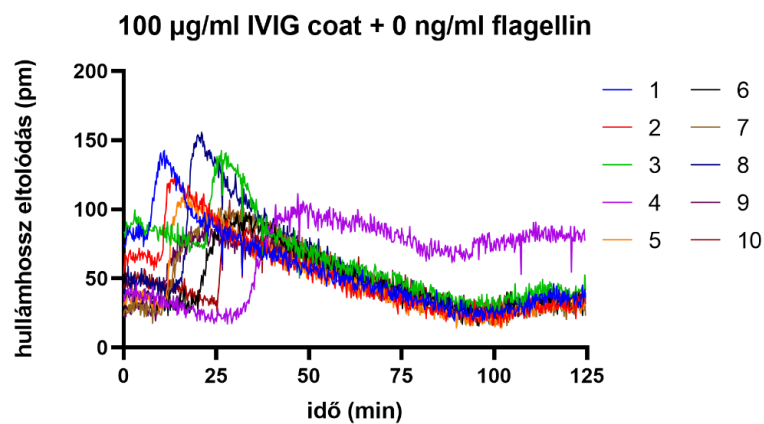
26. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 20 ng /ml flagellint tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



27. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 2 ng /ml flagellint tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



28. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 2 µg /ml flagellint tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



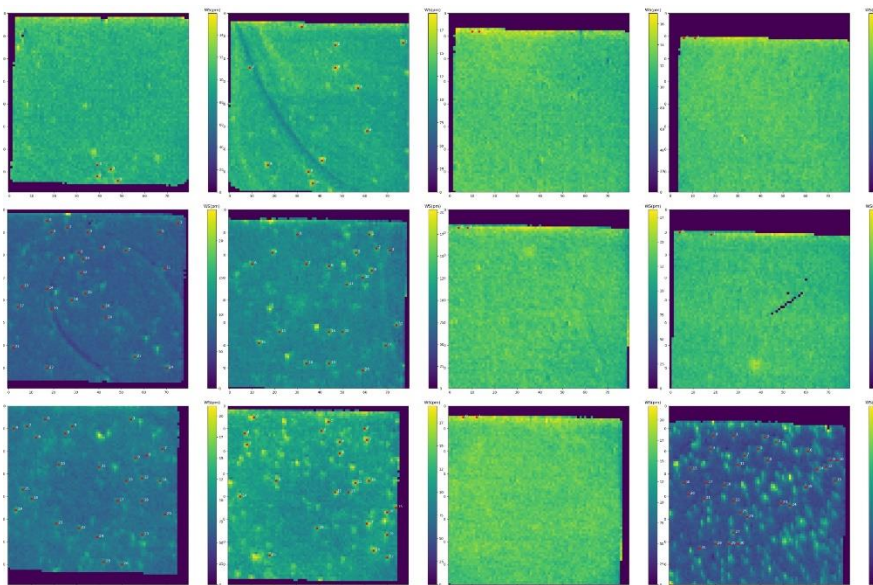
29. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 2 µg /ml flagellint tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi

5.2 Zymosan

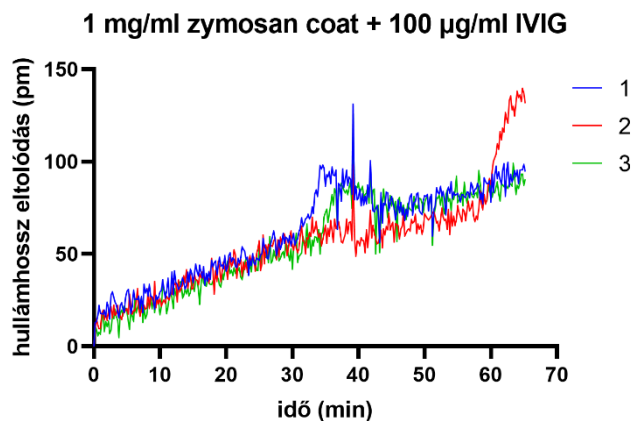
Magasabb zymosan koncentráció (1 mg/ml és 100 µg/ml) esetében nem tapasztaltunk olyan mennyiségű kitapadást, mint vártuk (6. táblázat, 30. ábra), feltételezhetően a vastag coat akadályozta ebben a sejteket (31., 32. ábra). Kisebb koncentrációknál a nagyszámú sejt kitapadás figyelhető meg a szenzorlemezen (33., 34., 35. ábra). A rövid expozíciós idő és a magas IVIG koncentráció mellett, jelezheti, hogy az IVIG tartalmaz olyan antitesteket, melyek a zymosanhoz kötve gyorsítják a monociták válaszát. Az IVIG-et nem tartalmazó lyukaknál egyikben sem detektálható szenzorlemezhez tapadt sejt. A kizárólag IVIG-et, valamint a karbonát puffert tartalmazó wellekben is számos sejt tapadt ki a felszínre (36., 37. ábra).

6. táblázat: Platemap, a zymosan bevonat koncentrációja a wellekben, valamint a karbonát puffer és IVIG kontroll.

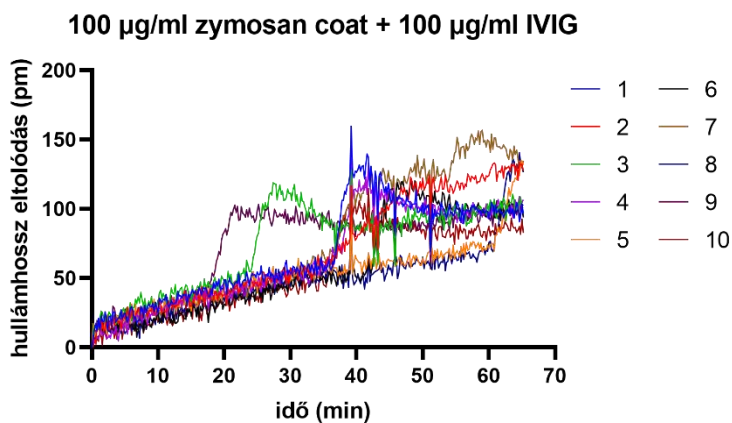
Zymosan coat + 100 µg/ml IVIG		Zymosan coat	
1 mg/ml	100 µg/ml	1 mg/ml	100 µg/ml
10 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
0,1 µg/ml	Karbonát puffer kontroll	0,1 µg/ml	IVIG ontroll 100 µg/ml



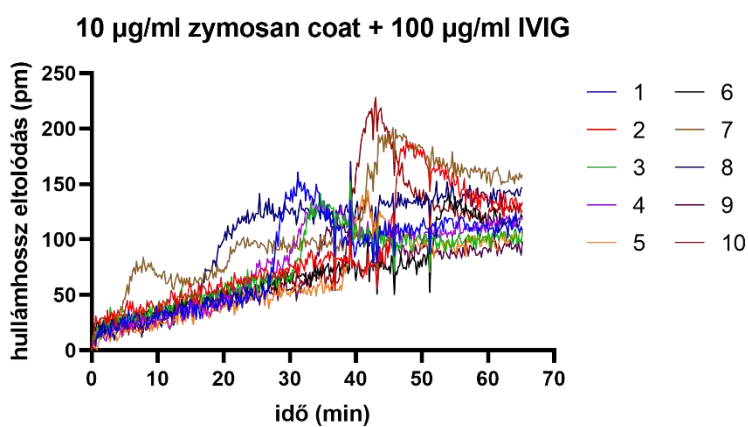
30. ábra: Epic Cardio képe Python programban. Zymosan coatolt, valamint a kontroll wellek képe.



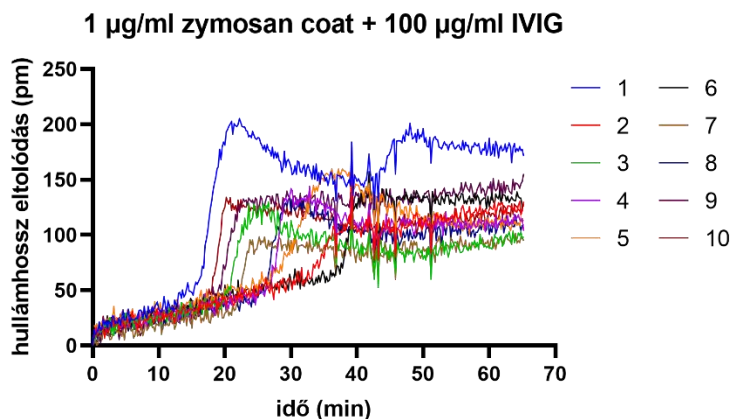
31. ábra: 1 mg/ml zymosan bevonatot és 100 µg/ml oldott IVIG-et tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



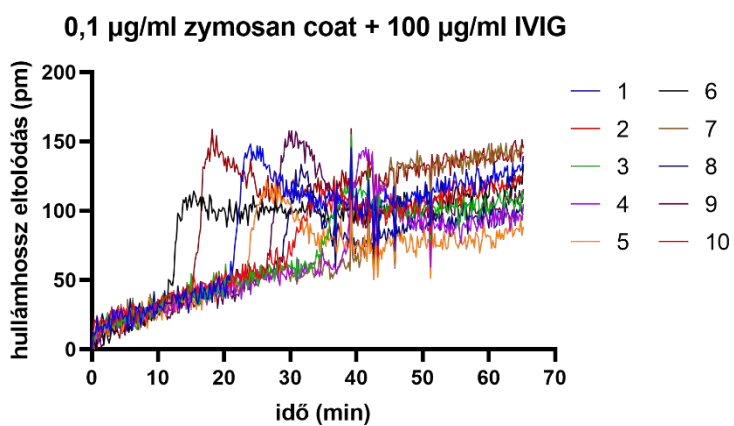
32. ábra: 100 µg/ml zymosan bevonatot és 100 µg/ml oldott IVIG-et tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



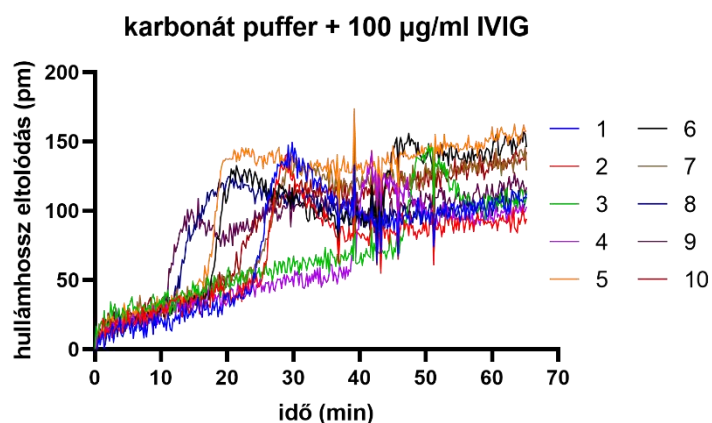
33. ábra: 10 µg/ml zymosan bevonatot és 10 µg/ml oldott IVIG-et tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



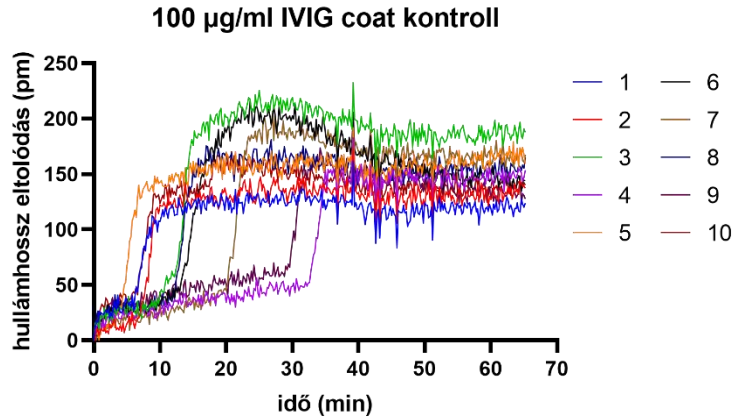
34. ábra: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zymosan bevonatot és 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oldott IVIG-et tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



35. ábra: 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zymosan bevonatot és 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oldott IVIG-et tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



36. ábra: Kizárólag bikarbonát puffert tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



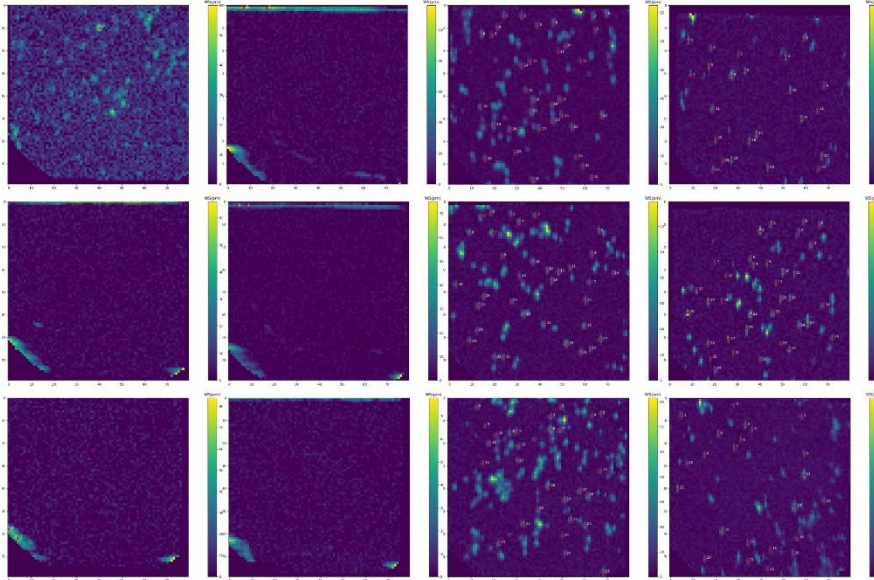
37. ábra: Kizárólag IVIG bevonattal ellátott well hullámhossz eltolódás görbéi

5.3 TLR ligandok rövidtávú hatása vérrel

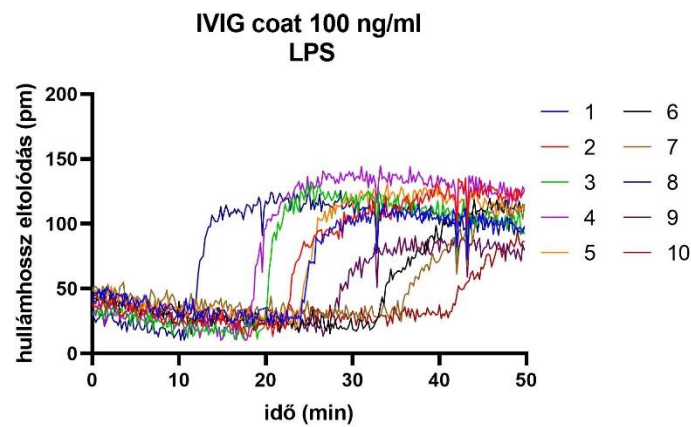
A ligandok rövidtávú hatásását vérrel is megvizsgáltam, IVIG-gel kezelt, valamint kezeletlen wellekben, hasonló eredményt várva (7. táblázat). A 100 ng/ml LPS tartalmú, IVIG coattal nem rendelkező wellben tapasztaltam egyetlen sejt megjelenését (38. ábra). A bevonat nélküli lyukakban nem tűntek fel detektálható sejtek. Ezzel szemben a kezelt wellekben nagyszámú kitapadás volt jellemző, melyek a korábbi, THP-1 sejtekkel folytatott mérések hullámhossz eltolódás görbéikkel összevetve, eltérő karakterisztikát mutatnak (39-44. ábra). Az, hogy ez a karakterisztika mennyire jellemző a vérrel történő mérések során, további kutatást igényel.

7. táblázat: TLR ligandok alkalmazott koncentrációja vérrel történt kísérletben

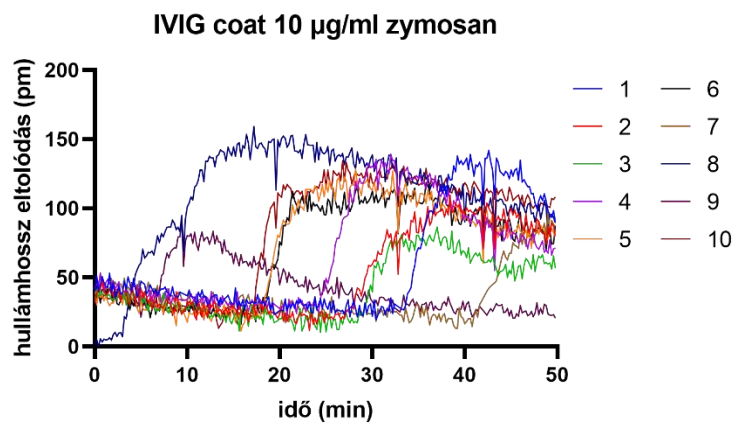
IVIG nélkül		IVIG coat (100 µg/ml)	
LPS 100 ng/ml	Zymosan 10 µg/ml	LPS 100 ng/ml	Zymosan 10 µg/ml
Flagellin 100 ng/ml	PGN 50 µg/ml	Flagellin 100 ng/ml	PGN 50 µg/ml
Poly(I:C) 20 µg/ml	vér	Poly(I:C) 20 µg/ml	vér



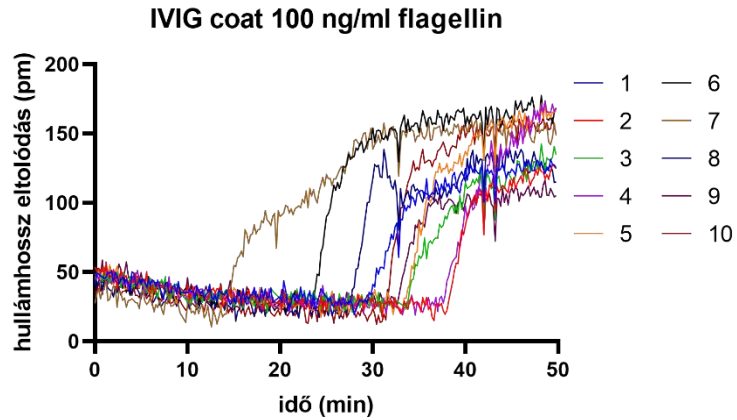
38. ábra: Epic Cardio képe Python programban. IVIG kezelt, valamint kezletlen, TLR ligandokat tartalmazó wellek képe.



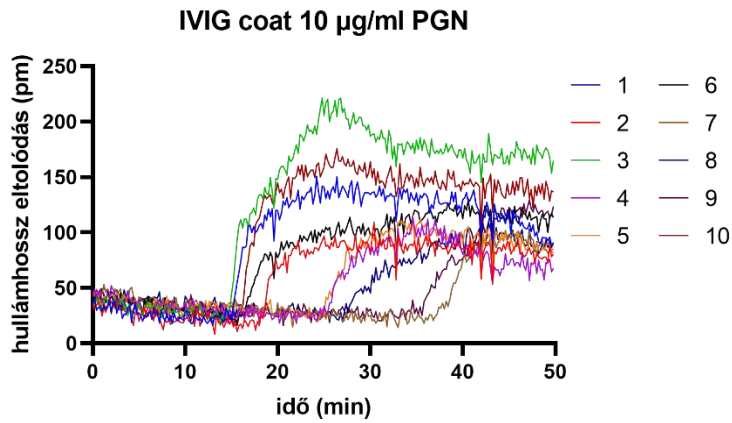
39. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 100 ng /ml LPS-t tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



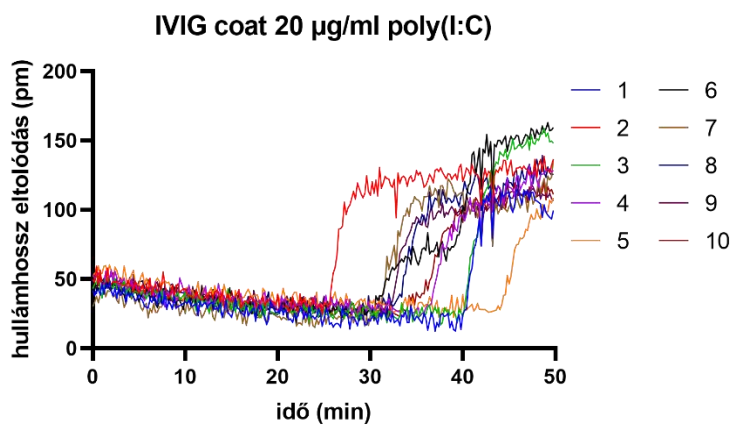
40. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 10 µg /ml zymosant tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



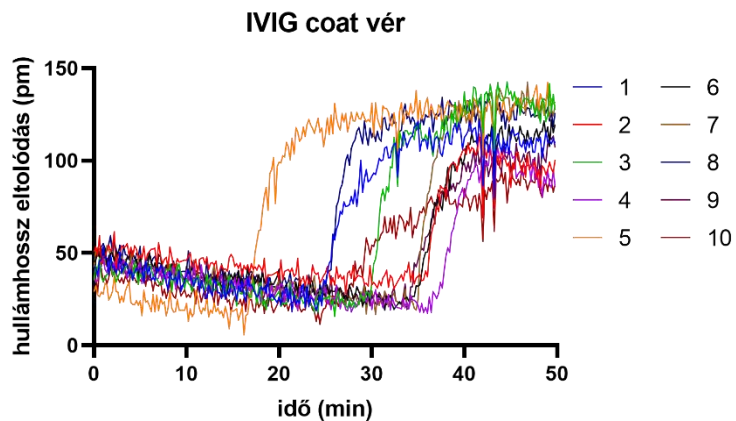
41. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 100 ng /ml flagellint tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



42. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 10 µg /ml PGN-t tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



43. ábra: IVIG bevonattal ellátott és 20 µg /ml poly(I:C)-t tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi



44. ábra: Kizárólag IVIG bevonatot tartalmazó well hullámhossz eltolódás görbéi

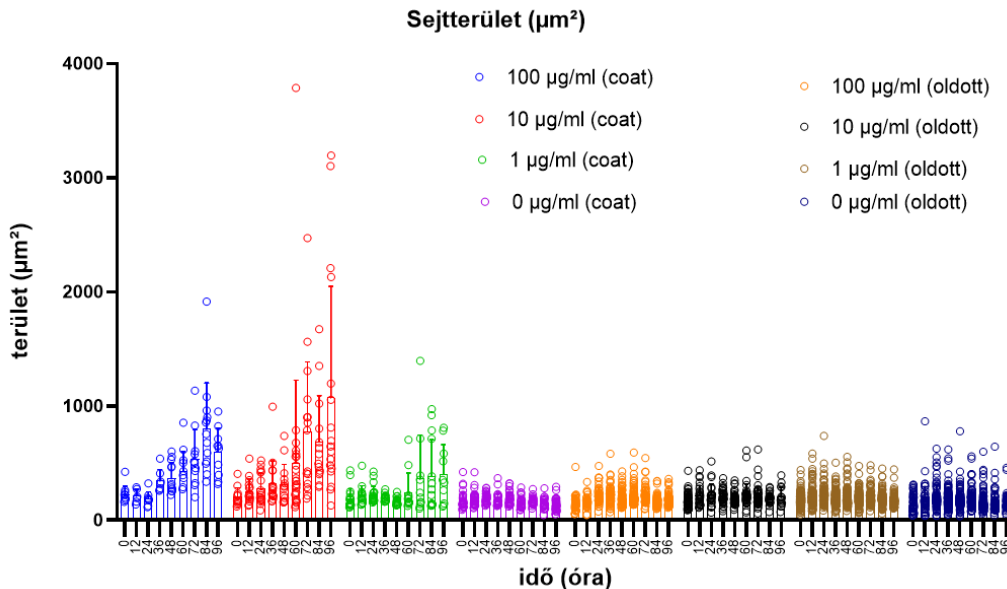
Összegzésképp elmondható, hogy az elvégzett kísérletek során sem a TLR ligandok (zymosan, LPS, flagelli, poly(I:C), sem a PGN esetében nem tapasztaltunk rövidtávú hatást, IVIG jelenléte nélkül. Hogy ezt a megállapítást miként befolyásolná az, ha a kísérletet 37 °C körüli hőmérsékleten végeznénk, további kutatást igényel.

5.4 IVIG hosszútávú hatásának vizsgálata a monocita sejtvonal aktivációjára, HoloMonitor M4 segítségével

A 96 órás mérésből, 12 óránként vett adatokat vettem össze az alábbi paraméterek alapján: sejterület, átlag optikai sejtvastagság, maximális optikai sejtvastagság, optikai sejttérfogat, felületi konvexitás (hull convexity) és sejtalak szabálytalanság (irregularity).

5.4.1 Sejterület

Először a sejtek területének változását hasonlítottam össze (45. ábra). Megfigyelhető, hogy a 100 µg/ml koncentrációjú, rögzített IVIG esetében folyamatos a sejtnövekedés, a 10 µg/ml koncentrációval ellentétben kisebb szórással.

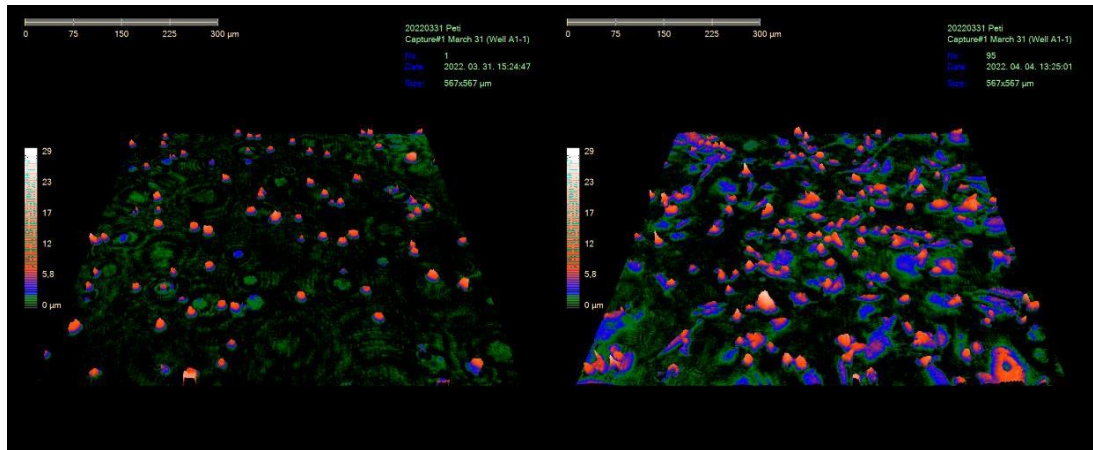


45. ábra: Eltérő koncentrációban jelen lévő rögzített és oldott IVIG hatása a sejt terület változására

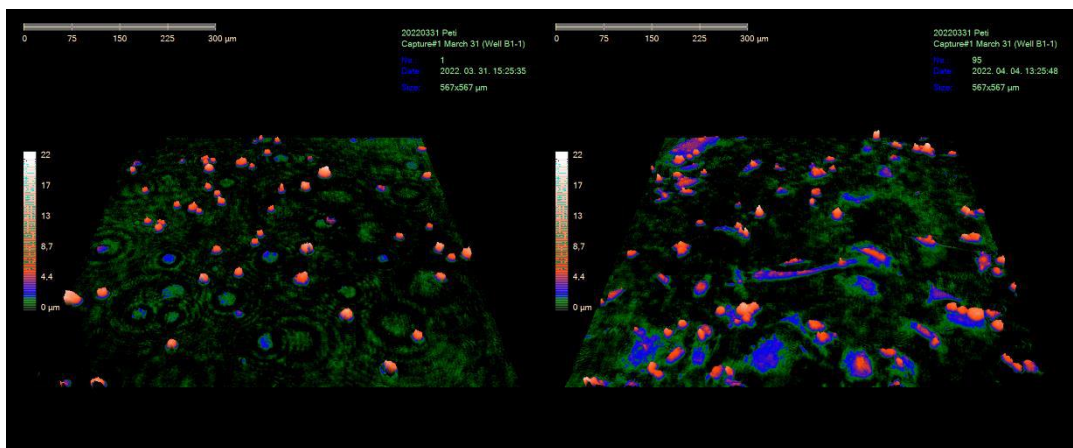
10 µg/ml koncentrációnál, rögzített IVIG esetében is tapasztaltunk sejtnövekedést, viszont néhány kiugró értéktől eltekintve nem jelenthető ki, hogy a sejtek területének eloszlás minimuma növekedett volna.

1 µg/ml rögzített IVIG koncentrációnál szintén látható sejtnövekedés, azonban nem olyan mértékben, mint az előző két esetben. A további lyukakban, melyekben oldott formában, illetve a kontrollnál, nem tapasztaltunk nagymértékben eltérő sejtméretet. Azok, melyek lyuk átlagához képest nagy mérettel rendelkeztek, aggregálódott sejtek lehetnek.

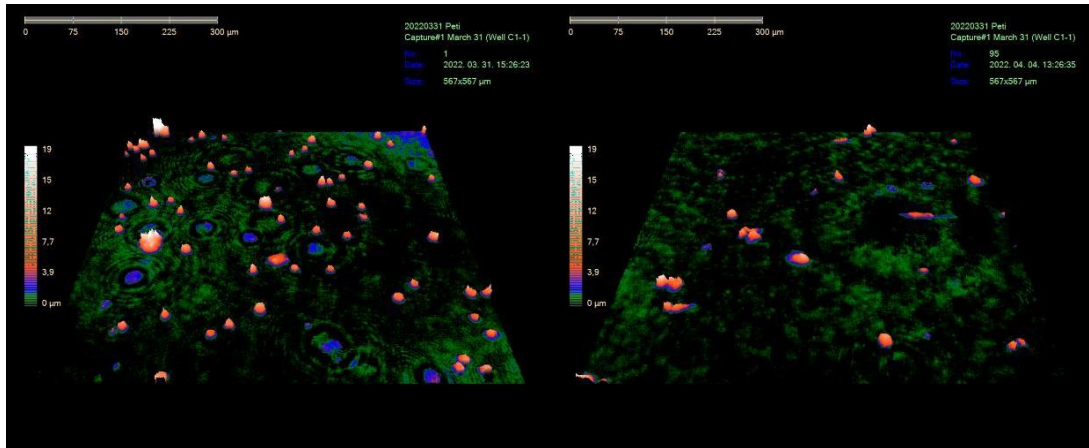
A további összehasonlításokat a mérés kezdetén és végén gyűjtött adatokkal végeztem. Az ezekben az időpontokban készült HoloMonitor M4 felvételek a 46-52. ábrán láthatóak.



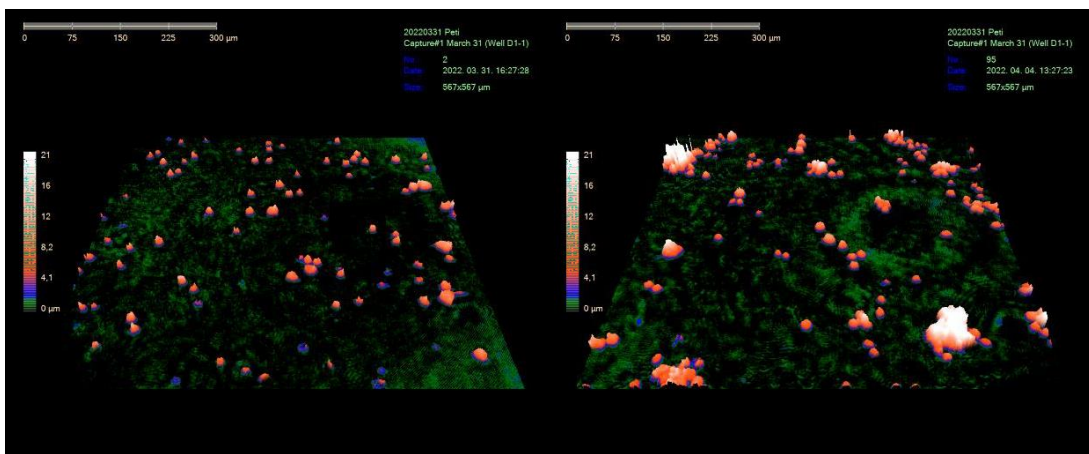
46. ábra: 100 µg/ml koncentrációjú rögzített IVIG lyuk a mérés elején és végén



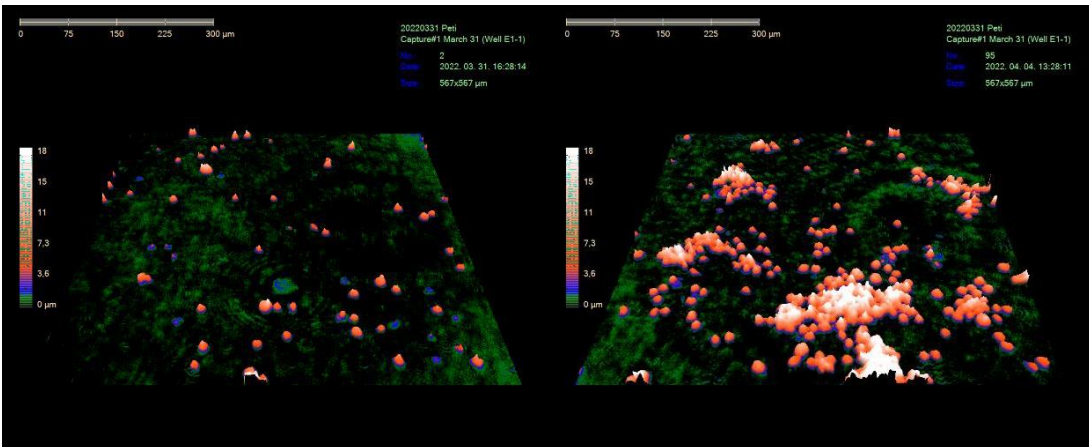
47. ábra: 10 µg/ml koncentrációjú rögzített IVIG lyuk a mérés elején és végén



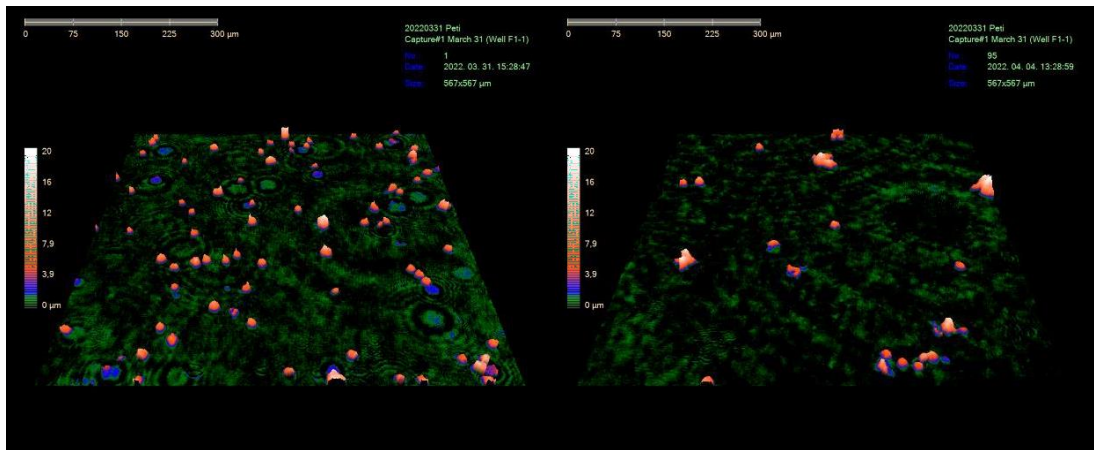
48. ábra: 1 µg/ml koncentrációjú rögzített IVIG lyuk a mérés elején és végén



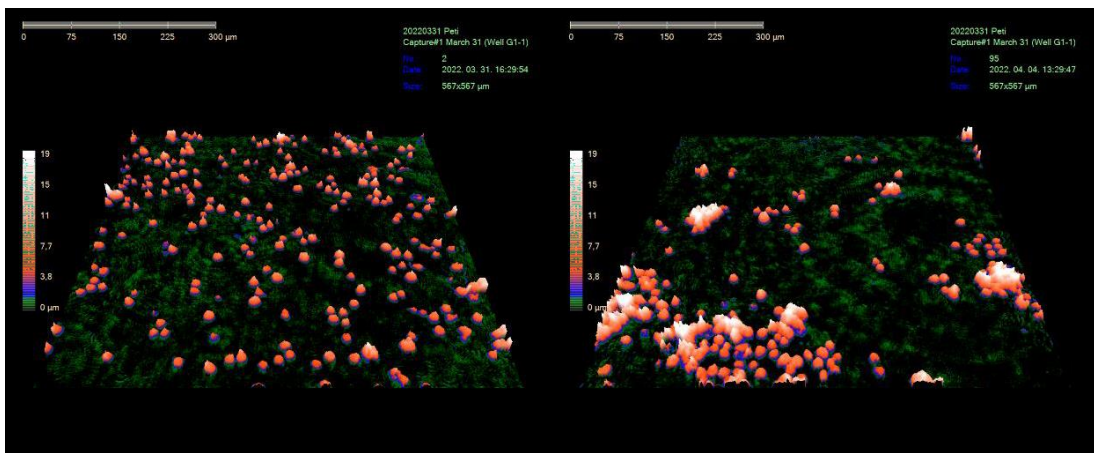
49. ábra: 0 µg/ml koncentrációjú IVIG lyuk a mérés elején és végén



50. ábra: 100 µg/ml koncentrációjú oldott IVIG lyuk a mérés elején és végén



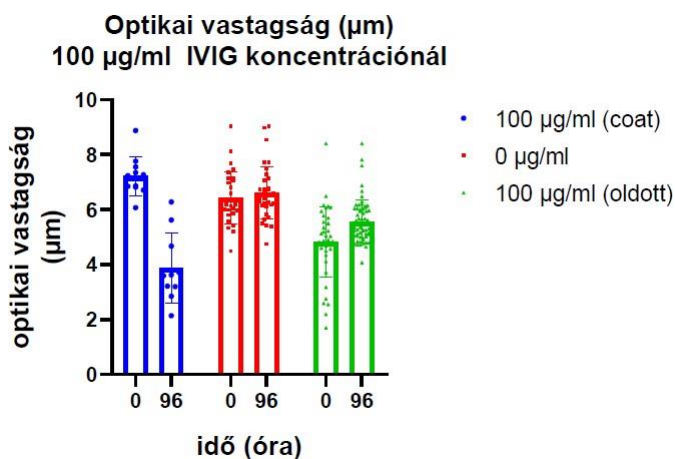
51. ábra: 10 µg/ml koncentrációjú oldott IVIG lyuk a mérés elején és végén



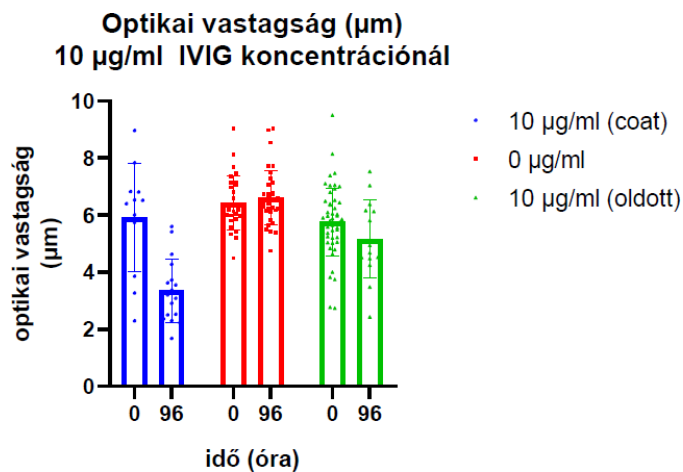
52. ábra: 1 µg/ml koncentrációjú oldott IVIG lyuk a mérés elején és végén

5.4.2 Sejtek optikai vastagsága

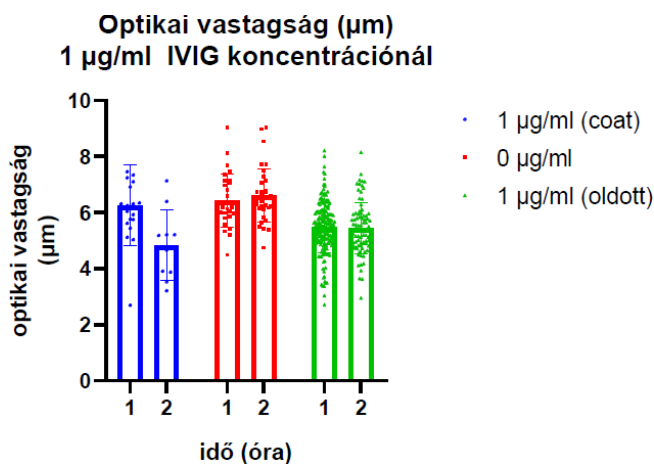
A 53., 54. és 55. ábrán az optikai sejt vastagság változása figyelhető meg, koncentráció szerinti összehasonlításban. A rögzített IVIG-es lyukaknál minden esetben csökkent a sejtek vastagsága a mérés végére. A kontrollnál és a 100 µg/ml koncentrációjú oldott IVIG-nél növekedést tapasztaltunk.



53. ábra: 100 µg/ml koncentrációjú, rögzített (coat) és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint a kontroll lyukak sejtjeinek optikai vastagsága (µm)



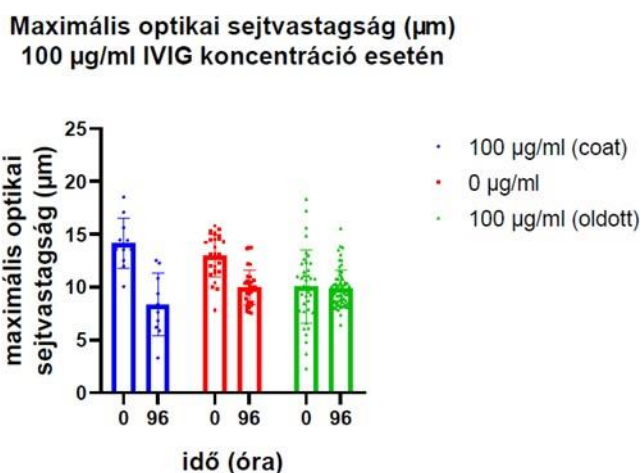
54. ábra: 10 µg/ml koncentrációjú, rögzített (coat) és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint a kontroll lyukak sejtjeinek optikai vastagsága (µm)



55. ábra: 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú, rögzített (coat) és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint a kontroll lyukak sejtjeinek optikai vastagsága (μm)

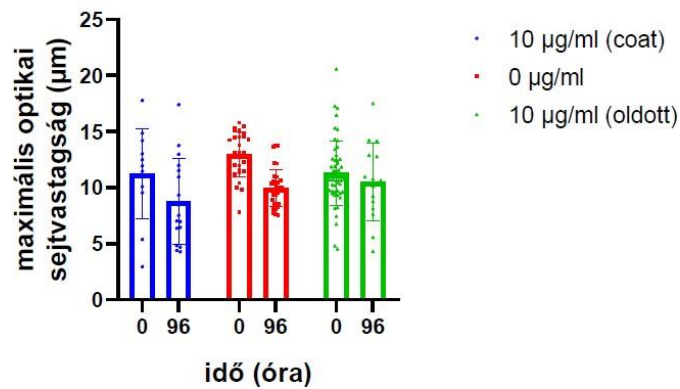
5.4.3 Maximális optikai sejtvastagság

A maximális optikai sejtvastagság tekintetében minden koncentrációnál csökkenést tapasztaltunk a mérés végére, amely az oldott IVIG-et tartalmazó lyukak estében nem volt számottevő (56., 57., 58. ábra).



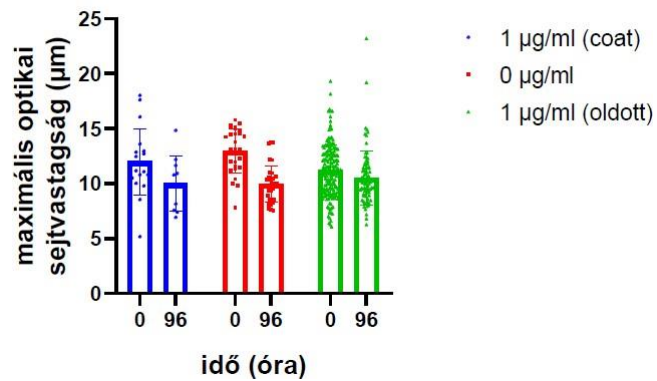
56. ábra: 100 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú, rögzített (coat) és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint a kontroll lyukak sejtjeinek maximális optikai sejtvastagsága (μm)

**Maximális optikai sejtvastagság (μm)
10 $\mu\text{g/ml}$ IVIG koncentráció esetén**



57. ábra: 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú, rögzített (coat) és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint a kontroll lyukak sejtjeinek maximális optikai sejtvastagsága (μm)

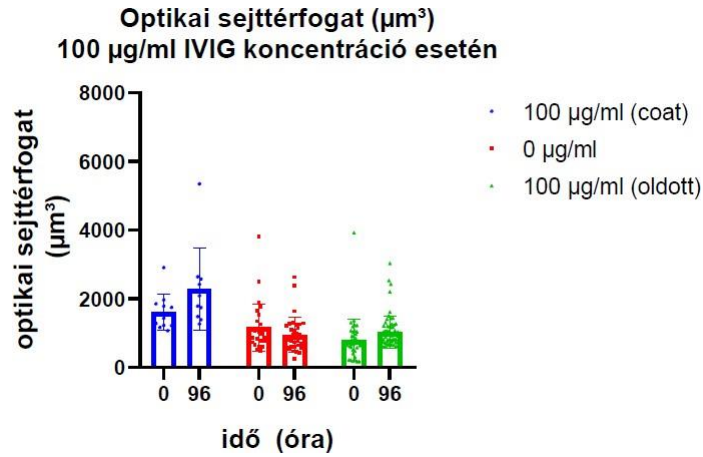
**Maximális optikai sejtvastagság (μm)
1 $\mu\text{g/ml}$ IVIG koncentráció esetén**



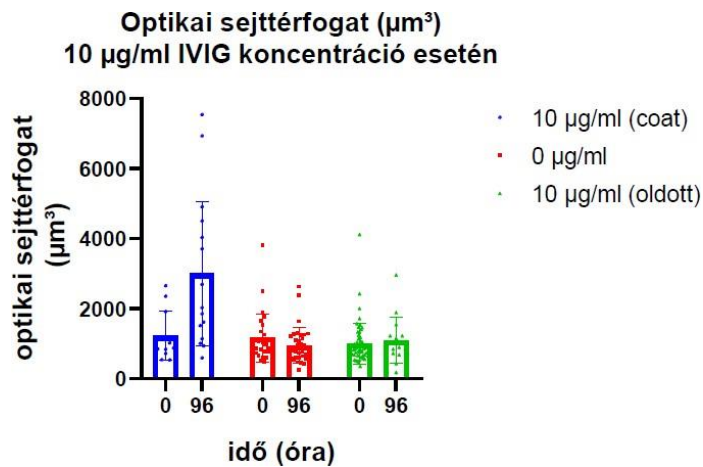
58. ábra: 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú, rögzített (coat) és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint a kontroll lyukak sejtjeinek maximális optikai sejtvastagsága (μm)

5.4.4 Optikai sejttérfogat

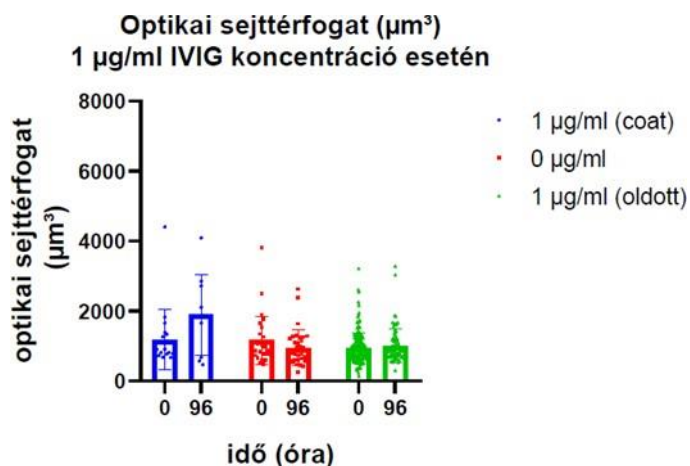
Az optikai sejttérfogat a rögzített IVIG-nél változott leginkább, a kontroll esetében csökkenést tapasztaltunk (59., 60., 61. ábra).



59. ábra: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációjú, rögzített (coat) és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint a kontroll lyukak sejtjeinek optikai sejttérfogata (μm^3)



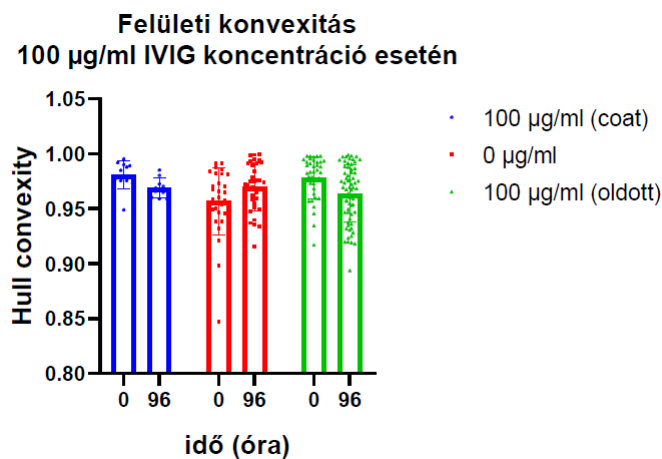
60. ábra: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációjú, rögzített (coat) és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint a kontroll lyukak sejtjeinek optikai sejttérfogata (μm^3)



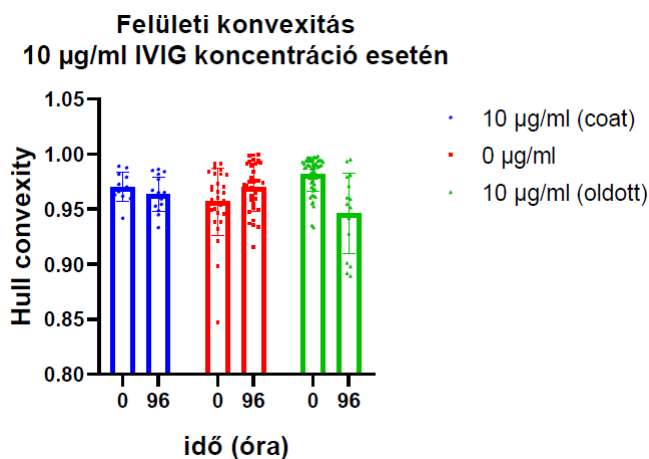
61. ábra: 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú, rögzített (coat) és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint a kontroll lyukak sejtjeinek optikai sejttérfogata (μm^3)

5.4.5 Felületi konvexitás (Hull convexity)

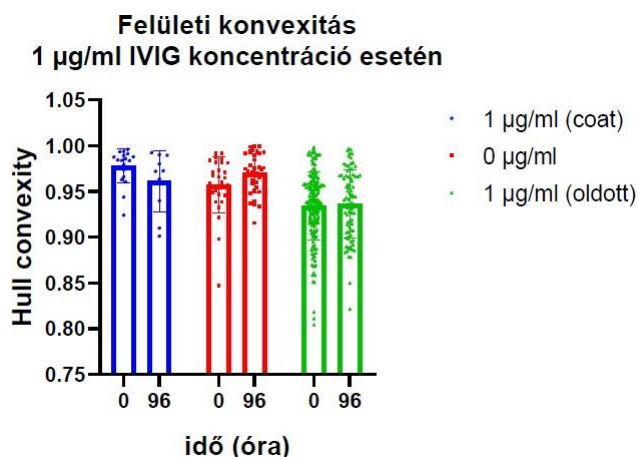
A felületi konvexitás annak mérőszáma, hogy a 3D sejtek alakja mennyire tér el a tökéletes konvex formától. Egy sejt általában meglehetősen sima 3D-ben. A magasabb érték kisebb mélyedéseket jelent a sejt vastagságában, azaz tökéletesebb formát. A THP-1 sejtek sejtalak konvexitás változása a mérés során, különböző IVIG koncentráció jelenlétében a 62., 63. és 64. ábrán láthatóak.



62. ábra: Felületi konvexitás a 100 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú, rögzített (coat) és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint a kontroll lyukak esetében



63. ábra: Felületi konvexitás a 10 µg/ml koncentrációjú, rögzített (coat) és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint a kontroll lyukak esetében



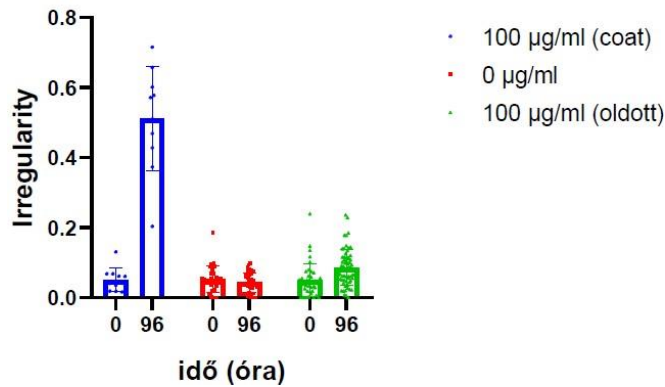
64. ábra: Felületi konvexitás a 1 µg/ml koncentrációjú, rögzített (coat) és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint a kontroll lyukak esetében

5.4.6 Sejtalak szabálytalanság (Irregularity)

Az irregularity annak a mérőszáma, hogy a sejt kerülete mennyire tér el a tökéletes körtől. A 0 érték azt jelenti, hogy a sejt kör alakú, a magasabb értékek pedig hosszabb, szabálytalanabb körvonalat jelentenek. A számítások egy küszöbérték-beállításon alapulnak, amely megkülönbözteti a háttérrel a sejttől.

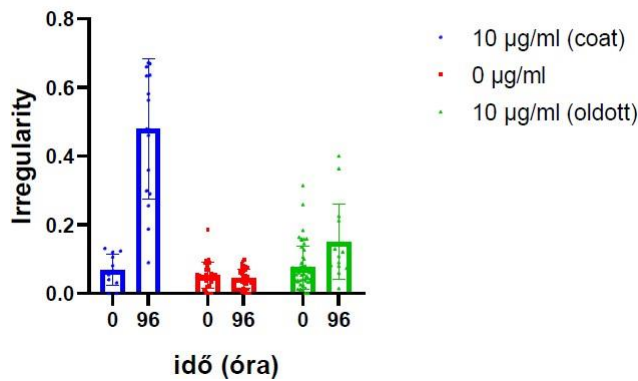
A 65., 66., 67. ábrán egyértelműen látható, hogy a rögzített IVIG-es eljárás hatására a sejtek, a mérés végére szabálytalanabb alakot vettek fel, mely minden koncentrációra igaz, azonban csökkenő jelleggel. Az 1 µg/ml koncentrációnál (26. ábra (kék)) már kevésbé szabálytalanok a sejtek.

**Sejtalak szabálytalanság
100 µg/ml IVIG koncentráció esetén**



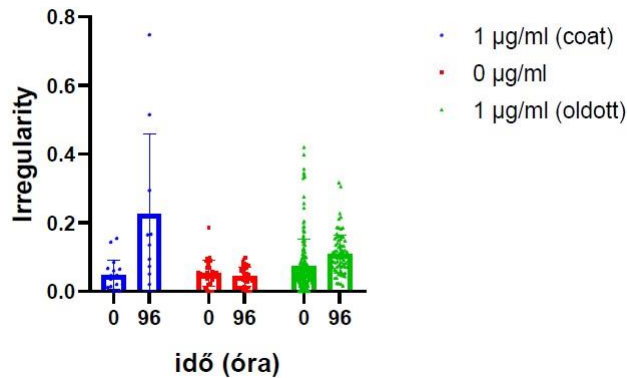
65. ábra: Sejtalak szabálytalanság a 100 µg/ml koncentrációjú, rögzített (coat) és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint a kontroll lyukak esetében

**Sejtalak szabálytalanság
10 µg/ml IVIG koncentráció esetén**



66. ábra: Sejtalak szabálytalanság a 10 µg/ml koncentrációjú, rögzített (coat) és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint a kontroll lyukak esetében

**Sejtalak szabálytalanság
1 µg/ml IVIG koncentráció esetén**



67. ábra: Sejtalak szabálytalanság a 1 µg/ml koncentrációjú, rögzített (coat) és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint a kontroll lyukak esetében

A kísérletet megelőzően azt vártuk, hogy oldott IVIG esetében a sejtek nem vagy kevésbé mutatnak differenciációra utaló morfológiai változást, mint az IVIG coat esetén. Valamint, hogy a nagyobb koncentrációknál a sejtek morfológiai változásai is jelentősebbek. Vagyis a 100 µg/ml koncentrációjú IVIG bevonattal ellátott wellek sejtjei fogják, a vizsgált paraméterek alapján, a monocita differenciációra utaló értékeket biztosítani.

A vártaknak megfelelően a sejtek területi változása, kis szórással, egyenletesen növekvő volt. Az optikai vastagság és a maximális optikai vastagság csökkenése is ennél a koncentrációnál tapasztaltuk leginkább. Az optikai térfogat növekedése is az elvárt módon növekedett. A sejtek szabálytalanságának változása szintén ezeknél a welleknél volt a legkiemelkedőbb. Ezen adatok együttes értékelése során megállapítható, hogy a vártakkal megegyező volt, 100 µg/ml IVIG kezelt wellek esetén, a sejtek differenciációja.

5.5 TLR ligandok hosszútávú hatásának vizsgálata a monocita sejtvonal aktivációjára, HoloMonitor M4 segítségével

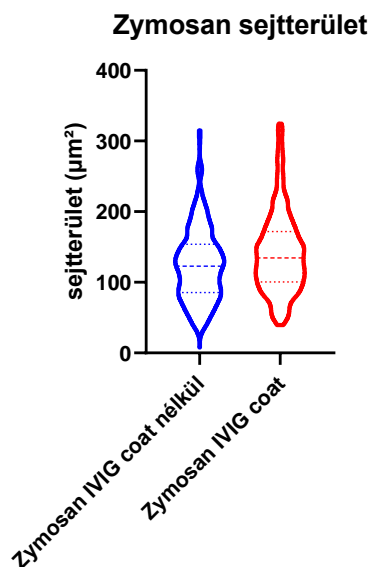
Az 5.4 pontban leírtakhoz hasonlóan a 96 órás mérésből, 12 óránként vett adatokat, sejterület, átlag optikai sejtvastagság, optikai sejttérfogat, felületi konvexitás (hull convexity), valamint sejthalak szabálytalanság (irregularity) hasonlítottam össze. Az egyes mintahalmazok a 12 óránként vizsgált adatok összessége, ebben az esetben nem követem nyomon a sejtek időbeli morfológiai változásait, hanem a az adatok eloszlását és az egyes kezelések közötti különbségeket mutatom be.

5.5.1 Sejterület

A sejterület változása lényeges információ a monociták aktivációjának, differenciációjának detektálására. A makrofággá differenciálódott sejtek területe a mérés előrehaladtával várhatóan nagyobb lesz. Így a differenciálódott sejtek számának függvényében a nagyobb sejterület értékeknél várhatjuk az eloszlásfüggvények kiszélesedését.

5.5.1.1 Sejterület változása IVIG kezelt és kezeletlen minták esetében, zymosan ligand jelenlétében

A 68. ábrán látható violin plot az IVIG bevonattal rendelkező, valamint bevonatot nem tartalmazó, wellek sejteinek sejterület eloszlását mutatja, zymosan ligand jelenlétében. Látható, hogy IVIG kezelés mellett a sejtek területe a mérés során nagyobbak bizonyult.

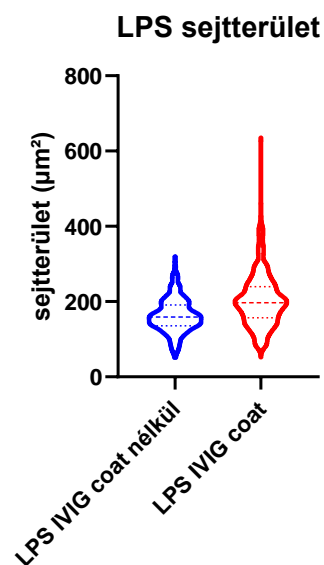


68. ábra: Monociták sejterület eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen sejteknél, zymosan jelenlétében

Az adatokon párosítatlan, kétmintás t – próbát végezve ($P = 0.05$) szignifikáns különbséget kaptam arra a nullhipotézisre, hogy a mintahalmazok szórása megegyezik. Így elmondható, hogy a két kezelés között, 95%-os konfidencia intervallum mellett, különbség van.

5.5.1.2 Sejterület változása IVIG kezelt és kezeletlen minták esetében, LPS ligand jelenlétében

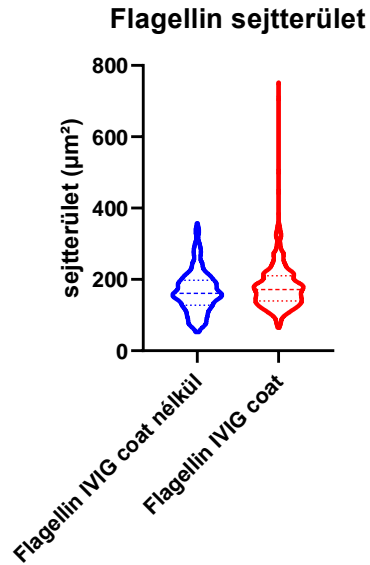
Ugyanezen paraméterek mellett, viszont zymosan helyett LPS ligand alkalmazásával szembevetendő eltérést figyelhetünk meg az IVIG bevonattal rendelkező minták esetében (69.ábra). Az előbbieken ismertetett statisztikai próbát elvégezve a vár módon szignifikáns különbséget tapasztalunk a két kezelés között.



69. ábra: Monociták sejterület eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen sejteknél, LPS jelenlétében

5.5.1.3 Sejterület változása IVIG kezelt és kezeletlen minták esetében, flagellin ligand jelenlétében

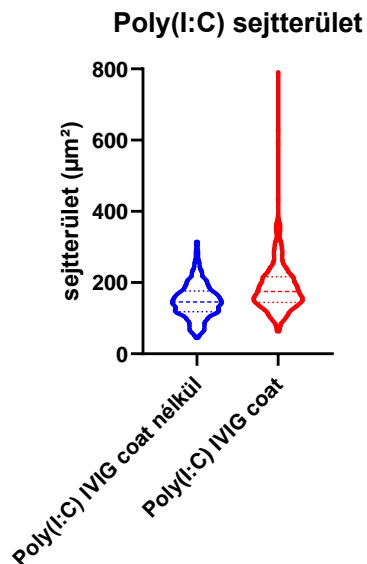
Flagellin jelenlétében még az LPS-nél is nagyobb kiugrást tapasztalunk a sejterület növekedésére (70. ábra). Így a vártak megfelelően a statisztikai próbánk is szignifikáns különbséget feltételez a kezeléseket között.



70. ábra: Monociták sejterület eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen sejteknél, LPS jelenlétében

5.5.1.4 Sejterület változása IVIG kezelt és kezeletlen minták esetében, poli(I:C) ligand jelenlétében

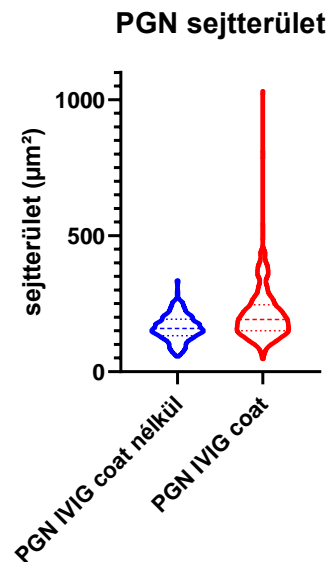
A fentebb bemutatott kezelésekhez hasonlóan poli(I:C) jelenlétében szintén az IVIG bevonattal rendelkező mintáknál tapasztaltunk nagymértékű változást a sejterület tekintetében (71. ábra). A statisztikai próbánk is szignifikáns különbséget állapított meg.



71. ábra: Monociták sejterület eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen sejteknél, LPS jelenlétében

5.5.1.5 Sejtterület változása IVIG kezelt és kezeletlen minták esetében, PGN jelenlétében

Mivel a PGN-t egyéb kísérleteknél a monociták aktivációjának indukálására szokták alkalmazni, így előzetesen ennek jelenlétében számíhattunk leginkább a sejtterület növekedésére. Az elvárásoknak megfelelően valóban tapasztaltuk a mérés során, az előzőekhez képest nagyobb sejtek jelenlétét (72. ábra). Így a t-próba szerinti szignifikáns különbség sem volt váratlan.



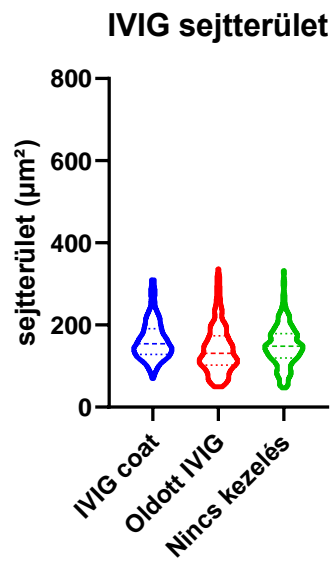
72. ábra: Monociták sejtterület eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen sejteknél, LPS jelenlétében

5.5.1.6 Sejtterület változása IVIG bevonatot és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint kezelést egyáltalán nem kapott monociták esetében

A 73. ábrán feltüntetett minták sem ligandot, sem PGN-t nem tartalmaztak. Így a sejtterület változása a csak az IVIG kezelés vagy annak hiányának függvénye. Egytényezős varianciaanalízist (One-way ANOVA) végezve ($P=0,05$) már elmondható, hogy ezen mintahalmazok között szignifikáns eltérés van.

A sejtterület adatok alapján, az eddigi tapasztalatok szerint az IVIG coat, az oldott IVIG és a kezelés hiánya nem okoz olyan mértékű sejtterület növekedést, mint az IVIG kezelt és ligandot vagy PGN-t tartalmazó minták esetén. Ebből adódóan a sejtek aktivációját és differenciációját sem indukálja pusztán az IVIG jelenléte.

Vagyis a korábban, 5.4 pontban bemutatott adatok és kiértékelésük hibásnak bizonyult, feltételezhetően egy, a minta előkészítése során, vagy a mérés folyamán bekövetkezett fertőzés hatására.



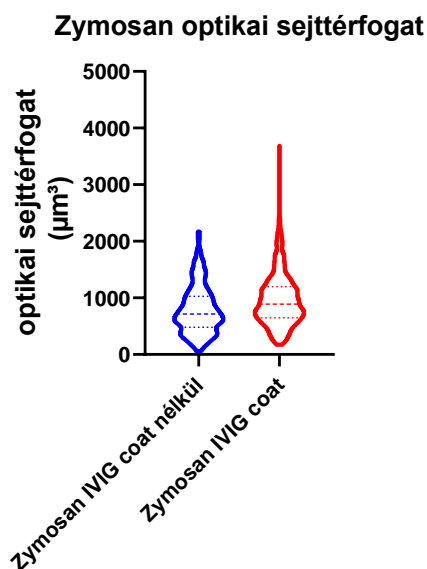
73. ábra: Monociták sejterület eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen, valamint oldott IVIG-et tartalmazó mintáknál

5.5.2 Optikai sejttérfogat

Fontos adat lehet a sejtek differenciációjának megállapítására az optikai sejttérfogat és annak növekedése. A differenciálódott monocitákra, ahogyan fentebb említve van, a nagyobb sejterület, ezáltal a nagyobb sejttérfogat jellemző.

5.5.2.1 Optikai sejttérfogat változása IVIG kezelt és kezeletlen minták esetében, zymosan ligand jelenlétében

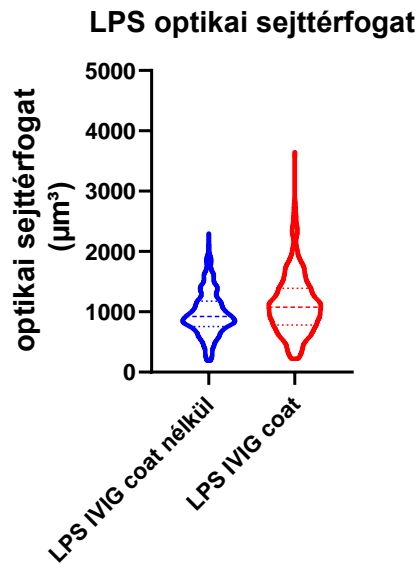
Ahogyan a sejterületeknél is tapasztaltuk az IVIG kezelt és zymosan ligandot tartalmazó mintáknál tapasztalható nagyobb mértékű sejttérfogat változás (74. ábra). Párosítatlan kétmintás t – próbát alkalmazva ($P=0,05$) csakugyan szignifikáns eltérés van az IVIG kezelt és kezeletlen mintahalmaz között.



74. ábra: Monociták optikai sejttérfogat eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen sejteknél, LPS jelenlétében

5.5.2.2 Optikai sejttérfogat változása IVIG kezelt és kezeletlen minták esetében, LPS ligand jelenlétében

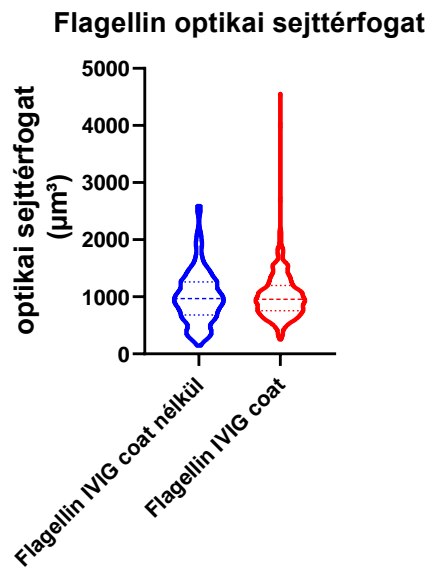
Szintén az optikai vastagság növekedése tapasztalható LPS jelenlétében is (75. ábra). A statisztikai próbánk 5%-os szignifikancia szint mellett szignifikáns különbséget jelez a kezelések között.



75. ábra: Monociták optikai sejttérfogat eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen sejteknél, LPS jelenlétében

5.5.2.3 Optikai sejttérfogat változása IVIG kezelt és kezeletlen minták esetében, flagellin ligand jelenlétében

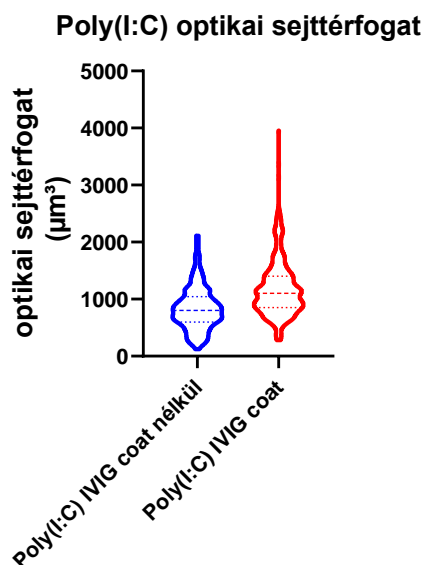
Flagellin jelenléte mellett, az adatokból következtethetünk, néhány sejt nagymértékű térfogatváltozáson esett át, ám ez nem bizonyult elég gyakorinak, hogy t – próba során állított 5%-os szignifikancia szint mellett a mintahalmazok különbsége szignifikáns legyen (76. ábra).



76. ábra: Monociták optikai sejttérfogat eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen sejteknél, flagellin jelenlétében

5.5.2.4 Optikai sejttérfogat változása IVIG kezelt és kezeletlen minták esetében, poly(I:C) ligand jelenlétében

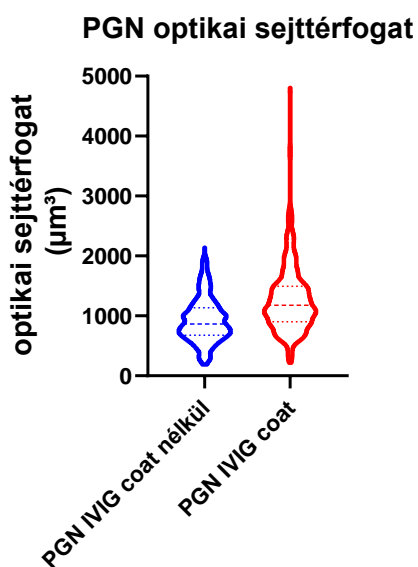
Poli(I:C) tekintetében viszont már a próba szerinti szignifikáns eltérést tapasztaljuk, vagyis a sejtek morfológiai változáson estek át (77. ábra).



78. ábra: Monociták optikai sejttérfogat eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen sejteknél, poli(I:C) jelenlétében

5.5.2.5 Optikai sejttérfogat változása IVIG kezelt és kezeletlen minták esetében, PGN jelenlétében

A poli(I:C)-ez hasonlóan a PGN-t tartalmazó mintáknál is szignifikáns különbség látható az 78. ábrán, valamint a statisztikai próba során is ezt tapasztaljuk.

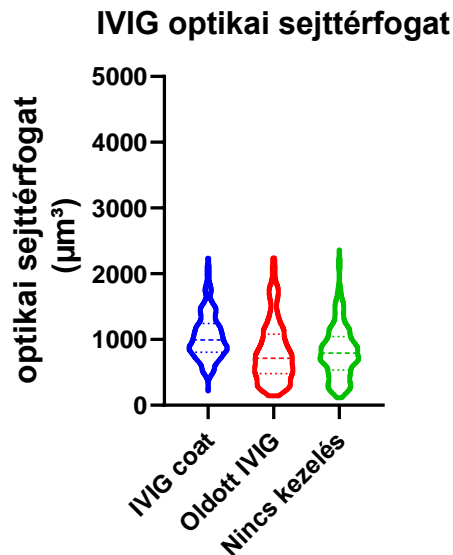


79. ábra: Monociták optikai sejttérfogat eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen sejteknél, PGN

jelenlétében

5.5.2.6 Optikai sejttérfogat változása IVIG bevonatot és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint kezelést egyáltalán nem kapott monociták esetében

A kontroll minták esetében nem tapasztalunk ez előbbieken fellelhető kiemelkedő térfogatokat (80. ábra). Ugyanakkor egytényezős varianciaanalízist végezve ($P=0,05$) ezen mintahalmazok között szignifikáns eltérés van.



80. ábra: Monociták optikai sejttérfogat eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen, valamint oldott IVIG-et tartalmazó mintáknál

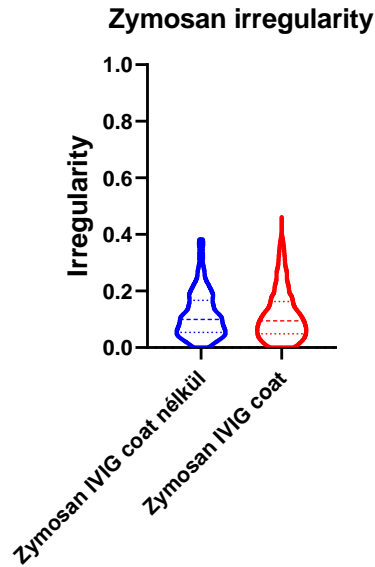
Összességében a sejtek optikai térfogatváltozása jó indikátor lehet a differenciálódott sejtek kimutatására. Flagellellin esetében viszont ez nem mondható el.

5.5.3 Sejtalak szabálytalanság

A differenciálódott monocitákat zömmel a rendezetlen sejtalak jellemzi, ezért talán az egyik legfontosabb jelzés értékű adat a sejtalak szabálytalanság. A THP-1 sejtek többnyire szabályos kör alapterületűek, míg a későbbiekben megnyúlt, rendezetlen alak jellemző rájuk.

5.5.3.1 Sejtalak szabálytalanság változása IVIG kezelt és kezeletlen minták esetében, zymosan ligand jelenlétében

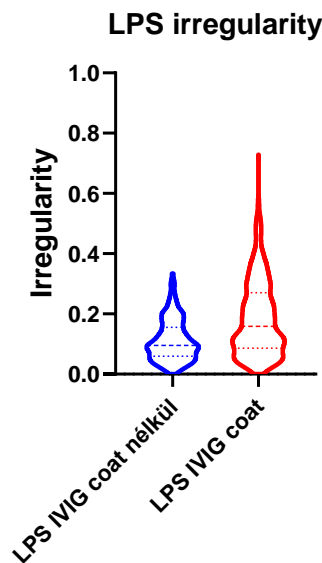
A 81. ábrán megfigyelhető zymosan ligandot is tartalmazó minták sem az ábra alapján, sem a kétmintás t – próba szerint sem különböznek szignifikánsan.



81. ábra: Monociták sejtalak szabálytalanság eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen sejteknél, zymosan jelenlétében

5.5.3.2 Sejtalak szabálytalanság változása IVIG kezelt és kezeletlen minták esetében, LPS ligand jelenlétében

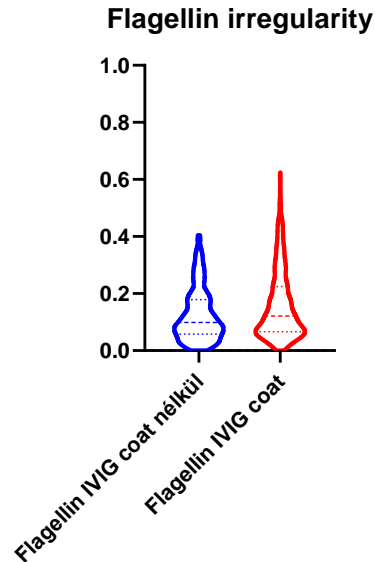
IVIG kezelés mellett az LPS-t tartalmazó wellek sejtei már szembevető változást mutatnak (82. ábra). Nagyobb mennyiségű és szabálytalanabb sejtalak jellemezte ezen sejteket az IVIG kezelést nem tartalmazó mintával szemben. Mely különbséget a statisztikai próba is szignifikánsnak ír le.



82. ábra: Monociták sejtalak szabálytalanság eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen sejteknél, LPS jelenlétében

5.5.3.3 Sejtalak szabálytalanság változása IVIG kezelt és kezeletlen minták esetében, flagellin ligand jelenlétében

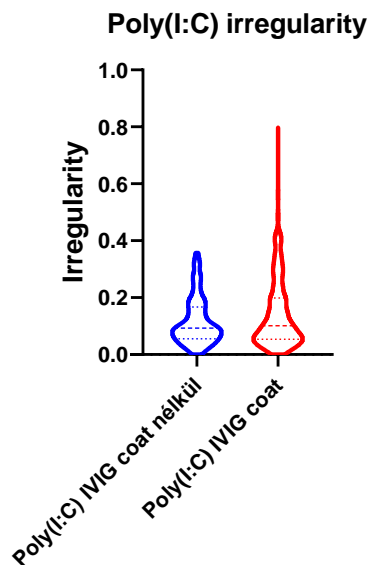
Flagellin jelenlétében is a kezelt mintánál tapasztalunk sejtalak szabálytalanságot, valamint a kezeletlen minta adataival összehasonlítva szignifikáns különbséget kapunk (83. ábra).



83. ábra: Monociták sejtalak szabálytalanság eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen sejteknél, flagellin jelenlétében

5.5.3.4 Sejtalak szabálytalanság változása IVIG kezelt és kezeletlen minták esetében, poli(I:C) ligand jelenlétében

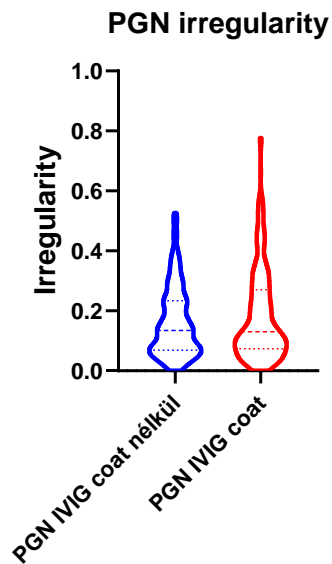
Hasonló a helyzet a poli(I:C) ligandot tartalmazó mintánál is, melyet jól szemléltet a 84. ábra. Ugyanakkor itt is szignifikáns eltérés van a kezelt és kezeletlen minták között.



84. ábra: Monociták sejtalak szabálytalanság eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen sejteknél, poli(I:C) jelenlétében

5.5.3.5 Sejtalak szabálytalanság változása IVIG kezelt és kezeletlen minták esetében, PGN jelenlétében

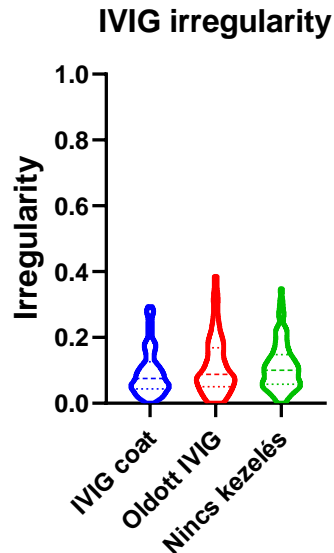
Mivel a PGN-t önmagában szokták alkalmazni, mint sejtaktivátor, így nem meglepő, hogy a ligandokkal szemben, az IVIG kezelést nem kapott sejtekre is jellemző a sejtalak szabálytalansága (85. ábra). Viszont a két mintahalmazt így is szignifikáns különbség jellemzi.



84. ábra: Monociták sejtalak szabálytalanság eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen sejteknél, PGN jelenlétében

5.5.3.6 Sejtalak szabálytalanság változása IVIG bevonatot és oldott IVIG-et tartalmazó, valamint kezelést egyáltalán nem kapott monociták esetében

A ligandokat és PGN-t nem tartalmazó mintáknál nem tapasztalunk az eddigiekhez hasonló szabálytalanságot a sejtalakra nézve (85. ábra). Szignifikáns különbség viszont itt is van.



85. ábra: Monociták sejtalak szabálytalanság eloszlása IVIG kezelt és kezeletlen, valamint oldott IVIG-et tartalmazó mintáknál

Összegzésképp valamennyi paraméter vizsgálat során megfigyelhetőek voltak a sejtek differenciálódására utaló változások. Sejterület növekedés, optikai sejttérfogat növekedése, a sejtalak szabálytalanságának növekedése is a differenciált sejtekre jellemző. Észrevehető, hogy ezen a morfológiai változások mértéke kezelésenként eltér. Míg a ligandokat és PGN-t nem tartalmazó mintáknál nem tapasztaltunk kiugró értékeket, addig az IVIG kezelést és ligandot vagy PGN-t tartalmazó mintáknál ez jellemzőbb volt.

6 Összefoglalás

Az immunrendszer molekuláinak, sejtjeinek, mechanizmusainak tanulmányozása lehetőséget biztosíthat az autoimmun betegségek felismerésére, valamint kezelésére. Az immunsejtek nem-invazív vizsgálatában nagy szerepe lehet az optikai bioszenzoroknak. Segítségükkel a sejtek különböző környezeti változásra adott válaszaik nyomon követhetőek. Nem igényelnek jelölőmolekulát, mivel irányított fénynyalábok által képes a mikrotiterlemez lyukaiban jelenlévő sejtjeinek időbeli viselkedésének, sejt morfológia változásának, motilitásának, vagy akár proliferációjának nyomon követésére.

Az Epic Cardio-val végzett kísérleteknél rövidtávú hatást, IVIG jelenléte nélkül, a vizsgált ligandoknál (zymosan, LPS, flagellin, poly(I:C) és PGN tekintetében sem tapasztaltunk. Azonban, ha különféle antigéneket szérummal inkubálunk, a TLR természete rövidtávon várhatóan nem befolyásolja majd a sejtaktivációt, csak az ellenanyagok jelenléte.

Méréseink során holografikus mikroszkóppal a monocita sejt vonal differenciációjának rövid, illetve hosszútávú vizsgálatát végeztük. Ennek során rögzített vagy oldatban lévő IVIG-gel mellett TLR ligandok hatását is megfigyeltük.

A monociták aktivációjuk során makrofágokká differenciálódnak, mely változást optikai bioszenzor segítségével, nem-invazív módon detektáljuk. Az IVIG-gel bevont lyukak esetében vártuk leginkább, hogy a sejtek nagyobb mértékben differenciálódjanak. A vizsgált paraméterek szempontjából a 100 µg/ml koncentrációjú, bevont lyukaknál tapasztaltuk az erre utaló változásokat a sejteken. Mely az újabb mérésekből következően a mérés során fellépő fertőzésre utal.

A Toll-szerű receptor ligandokkal és PGN-nel végzett kísérlet során voltak megfigyelhetőek leginkább a sejtek differenciálódására utaló változások. A vizsgált paraméterek alapján a morfológiai változások mértéke kezelésenként eltér. Elmondható, hogy az IVIG kezelést, valamint ligandot vagy PGN-t tartalmazó minták sejtjei makrofágokká differenciálódtak. A továbbiakban érdemes lehet hosszútávú, 168 órás mérést végezni, több differenciálódott sejt reményében.

7 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Szittner Zoltánnak, hogy munkám során szakmai segítséget és útmutatást nyújtott a mérések elvégzésében és kiértékeléshez alkalmazott programok használatában.

Köszönöm Dr. Horváth Róbertnek, a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport vezetőjének és Dr. Bonyár Attila egyetemi docensnek, hogy útmutatásukkal és szakértelmükkel támogattak a munkám elkészítésében.

Valamint köszönöm a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport minden dolgozójának és ott kísérletező valamennyi diáknak, akik észrevételeikkel, szakértelmükkel, támogatásukkal és hasznos tanácsaikkal nagymértékben hozzájárultak ismereteim bővítéséhez.

8 Irodalomjegyzék

- [1] Mikael Sebesta, Peter J. Egelberg, Anders Langberg, Jens-Henrik Lindskov, Kersti Alm, és Birgit Janicke, „HoloMonitor M4: holographic imaging cytometer for real-time kinetic label-free live-cell analysis of adherent cells”, előadás Proc.SPIE, márc. 2016, o. 971813. doi: 10.1117/12.2216731.
- [2] B. Peter és mtsai., „Incubator proof miniaturized Holomonitor to in situ monitor cancer cells exposed to green tea polyphenol and preosteoblast cells adhering on nanostructured titanate surfaces: validity of the measured parameters and their corrections”, *J Biomed Opt*, köt. 20, sz. 6, o. 067002, jún. 2015, doi: 10.1117/1.JBO.20.6.067002.
- [3] S. H. E. Kaufmann, „The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines”, *Nat Rev Microbiol*, köt. 5, sz. 7, Art. sz. 7, júl. 2007, doi: 10.1038/nrmicro1688.
- [4] T. Oda és mtsai., „Activation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation”, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, köt. 291, sz. 1, o. C104–C113, júl. 2006, doi: 10.1152/ajpcell.00614.2005.
- [5] S. Akira és H. Hemmi, „Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family”, *Immunology Letters*, köt. 85, sz. 2, o. 85–95, jan. 2003, doi: 10.1016/S0165-2478(02)00228-6.
- [6] T. Nürnberger és F. Brunner, „Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns”, *Current Opinion in Plant Biology*, köt. 5, sz. 4, o. 318–324, aug. 2002, doi: 10.1016/S1369-5266(02)00265-0.
- [7] I. Sallai, „Resonant Waveguide Grating Biosensors Based on Label-free Optical Principle”, *Periodica Polytechnica Electrical Engineering and Computer Science*, szept. 2023, doi: 10.3311/PPee.22878.
- [8] A. Mölder, M. Sebesta, M. Gustafsson, L. Gisselson, A. G. Wingren, és K. Alm, „Non-invasive, label-free cell counting and quantitative analysis of adherent cells using digital holography”, *Journal of Microscopy*, köt. 232, sz. 2, o. 240–247, 2008, doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.02095.x.
- [9] D. D. Chaplin, „Overview of the immune response”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, köt. 125, sz. 2, Supplement 2, o. S3–S23, febr. 2010, doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.
- [10] P. J. Delves és I. M. Roitt, „The Immune System”, *New England Journal of Medicine*, köt. 343, sz. 1, o. 37–49, júl. 2000, doi: 10.1056/NEJM200007063430107.
- [11] G. Gasteiger, A. D’Ossualdo, D. A. Schubert, A. Weber, E. M. Bruscia, és D. Hartl, „Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players”, *Journal of Innate Immunity*, köt. 9, sz. 2, o. 111–125, dec. 2016, doi: 10.1159/000453397.
- [12] O. Takeuchi és S. Akira, „Pattern Recognition Receptors and Inflammation”, *Cell*, köt. 140, sz. 6, o. 805–820, márc. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- [13] I. Kokkinopoulos, W. J. Jordan, és M. A. Ritter, „Toll-like receptor mRNA expression patterns in human dendritic cells and monocytes”, *Molecular Immunology*, köt. 42, sz. 8, o. 957–968, máj. 2005, doi: 10.1016/j.molimm.2004.09.037.
- [14] K. H. G. Mills, „TLR-dependent T cell activation in autoimmunity”, *Nat Rev Immunol*, köt. 11, sz. 12, Art. sz. 12, dec. 2011, doi: 10.1038/nri3095.
- [15] L. de Oliveira Nascimento, P. Massari, és L. Wetzler, „The Role of TLR2 in Infection and Immunity”, *Frontiers in Immunology*, köt. 3, 2012, Elérés: 2023. október 9. [Online]. Elérhető: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00079>
- [16] F. Geissmann, M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, és K. Ley, „Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells”, *Science*, köt. 327, sz.

- 5966, o. 656–661, 2010, doi: 10.1126/science.1178331.
- [17] A. Robinson, C. Z. Han, C. K. Glass, és J. W. Pollard, „Monocyte Regulation in Homeostasis and Malignancy”, *Trends in Immunology*, köt. 42, sz. 2, o. 104–119, febr. 2021, doi: 10.1016/j.it.2020.12.001.
- [18] M. Williams, A. Mildner, és S. Yona, „Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes”, *Immunity*, köt. 49, sz. 4, o. 595–613, okt. 2018, doi: 10.1016/j.immuni.2018.10.005.
- [19] C. V. Jakubzick, G. J. Randolph, és P. M. Henson, „Monocyte differentiation and antigen-presenting functions”, *Nat Rev Immunol*, köt. 17, sz. 6, Art. sz. 6, jún. 2017, doi: 10.1038/nri.2017.28.
- [20] A. Yáñez és mtsai., „Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes”, *Immunity*, köt. 47, sz. 5, o. 890-902.e4, 2017, doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.021.
- [21] N. Germic, Z. Frangez, S. Yousefi, és H.-U. Simon, „Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation”, *Cell Death & Differentiation*, köt. 26, sz. 4, o. 715–727, ápr. 2019, doi: 10.1038/s41418-019-0297-6.
- [22] W. Chanput, J. J. Mes, és H. J. Wichers, „THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach”, *International Immunopharmacology*, köt. 23, sz. 1, o. 37–45, nov. 2014, doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002.
- [23] Z. Qin, „The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature”, *Atherosclerosis*, köt. 221, sz. 1, o. 2–11, márc. 2012, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.003.
- [24] H. W. Schroeder és L. Cavacini, „Structure and function of immunoglobulins”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, köt. 125, sz. 2, Supplement 2, o. S41–S52, febr. 2010, doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- [25] E. A. van Erp, W. Luytjes, G. Ferwerda, és P. B. van Kasteren, „Fc-Mediated Antibody Effector Functions During Respiratory Syncytial Virus Infection and Disease”, *Front Immunol*, köt. 10, o. 548, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.00548.
- [26] E. Mix, R. Goertsches, és U. K. Zett, „Immunoglobulins—Basic considerations”, *J Neurol*, köt. 253, sz. 5, o. v9–v17, szept. 2006, doi: 10.1007/s00415-006-5002-2.
- [27] R. J. Brezski és G. Georgiou, „Immunoglobulin isotype knowledge and application to Fc engineering”, *Current Opinion in Immunology*, köt. 40, o. 62–69, jún. 2016, doi: 10.1016/j.coi.2016.03.002.
- [28] L. L. Lu, T. J. Suscovich, S. M. Fortune, és G. Alter, „Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases”, *Nature Reviews Immunology*, köt. 18, sz. 1, o. 46–61, jan. 2018, doi: 10.1038/nri.2017.106.
- [29] M. Z. Tay, K. Wiehe, és J. Pollara, „Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis in Antiviral Immune Responses”, *Frontiers in Immunology*, köt. 10, 2019, Elérés: 2023. október 9. [Online]. Elérhető: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00332>
- [30] S. V. Kaveri, M. Lecerf, C. Saha, M. D. Kazatchkine, S. Lacroix-Desmazes, és J. Bayry, „Intravenous immunoglobulin and immune response”, *Clin Exp Immunol*, köt. 178, sz. Suppl 1, o. 94–96, dec. 2014, doi: 10.1111/cei.12526.
- [31] C. Galeotti, S. V. Kaveri, és J. Bayry, „IVIG-mediated effector functions in autoimmune and inflammatory diseases”, *International Immunology*, köt. 29, sz. 11, o. 491–498, dec. 2017, doi: 10.1093/intimm/dxx039.
- [32] A. Durandy és mtsai., „Intravenous immunoglobulins – understanding properties and mechanisms”, *Clinical and Experimental Immunology*, köt. 158, sz. Supplement_1, o. 2–13, dec. 2009, doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.04022.x.

- [33] P. Damborský, J. Švitel, és J. Katrlík, „Optical biosensors”, *Essays Biochem*, köt. 60, sz. 1, o. 91–100, jún. 2016, doi: 10.1042/EBC20150010.
- [34] R. Peltomaa, B. Glahn-Martínez, E. Benito-Peña, és M. C. Moreno-Bondi, „Optical Biosensors for Label-Free Detection of Small Molecules”, *Sensors*, köt. 18, sz. 12, Art. sz. 12, dec. 2018, doi: 10.3390/s18124126.
- [35] M. Sztilkovics és mtsai., „Single-cell adhesion force kinetics of cell populations from combined label-free optical biosensor and robotic fluidic force microscopy”, *Sci Rep*, köt. 10, sz. 1, Art. sz. 1, jan. 2020, doi: 10.1038/s41598-019-56898-7.
- [36] Y. Fang, „Label-free receptor assays”, *Drug Discovery Today: Technologies*, köt. 7, sz. 1, o. e5–e11, márc. 2010, doi: 10.1016/j.ddtec.2010.05.001.
- [37] Y. Fang, „Non-invasive Optical Biosensor for Probing Cell Signaling”, *Sensors*, köt. 7, sz. 10, Art. sz. 10, okt. 2007, doi: 10.3390/s7102316.
- [38] B. Peter és mtsai., „Green tea polyphenol tailors cell adhesivity of RGD displaying surfaces: multicomponent models monitored optically”, *Scientific Reports*, köt. 7, sz. 1, o. 42220, febr. 2017, doi: 10.1038/srep42220.
- [39] B. Kovacs és mtsai., „Kinetics and Structure of Self-Assembled Flagellin Monolayers on Hydrophobic Surfaces in the Presence of Hofmeister Salts: Experimental Measurement of the Protein Interfacial Tension at the Nanometer Scale”, *J. Phys. Chem. C*, köt. 122, sz. 37, o. 21375–21386, szept. 2018, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b05026.
- [40] K. Paréj és mtsai., „Cutting Edge: A New Player in the Alternative Complement Pathway, MASP-1 Is Essential for LPS-Induced, but Not for Zymosan-Induced, Alternative Pathway Activation”, *The Journal of Immunology*, köt. 200, sz. 7, o. 2247–2252, ápr. 2018, doi: 10.4049/jimmunol.1701421.
- [41] K. Itoh, H. Shigemi, K. Chihara, K. Sada, T. Yamauchi, és H. Iwasaki, „Caspofungin suppresses zymosan-induced cytokine and chemokine release in THP-1 cells: possible involvement of the spleen tyrosine kinase pathway”, *Translational Research*, köt. 227, o. 53–63, jan. 2021, doi: 10.1016/j.trsl.2020.07.005.
- [42] D. Wang és mtsai., „Peptidoglycans Promotes Human Leukemic THP-1 Cell Apoptosis and Differentiation”, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, köt. 13, sz. 12, o. 6409–6413, 2012, doi: 10.7314/APJCP.2012.13.12.6409.
- [43] N. Foster, S. R. Lea, P. M. Preshaw, és J. J. Taylor, „Pivotal Advance: Vasoactive intestinal peptide inhibits up-regulation of human monocyte TLR2 and TLR4 by LPS and differentiation of monocytes to macrophages”, *Journal of Leukocyte Biology*, köt. 81, sz. 4, o. 893–903, ápr. 2007, doi: 10.1189/jlb.0206086.
- [44] H.-Y. Cho és mtsai., „All-trans retinoic acid induces TLR-5 expression and cell differentiation and promotes flagellin-mediated cell functions in human THP-1 cells”, *Immunology Letters*, köt. 136, sz. 1, o. 97–107, ápr. 2011, doi: 10.1016/j.imlet.2011.01.001.
- [45] Z. K. Pan, C. Fisher, J.-D. Li, Y. Jiang, S. Huang, és L.-Y. Chen, „Bacterial LPS up-regulated TLR3 expression is critical for antiviral response in human monocytes: evidence for negative regulation by CYLD”, *International Immunology*, köt. 23, sz. 6, o. 357–364, jún. 2011, doi: 10.1093/intimm/dxr019.

LINK1: <https://www.corning.com/media/worldwide/cls/documents/CLS-ES-038REV3.pdf>