

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MILAN SKLEPIČ

RAZVOJ POSTOPKA IZOLACIJE MAKROFAGOV IZ
NEDROBNOCELIČNEGA RAKAVEGA TKIVA IN NJIHOVA
FENOTIPIZACIJA

DEVELOPMENT OF PROCEDURE FOR MACROPHAGE
ISOLATION FROM NON-SMALL CELL LUNG CANCER AND
THEIR PHENOTYPIZATION

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo in na Zavodu za transfuzijsko medicino pod mentorstvom prof. dr. Darka Černeta, spec. med. biokem. in somentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja. Pretočno citometrijo, celično sortiranje in razgrajevanje tkiva z avtomatizirano metodo smo opravili v prostorih Zavoda za transfuzijsko medicino.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Darku Černetu, spec. med. biokem. in somentorju doc. dr. Urbanu Švajgerju za strokovno vodenje, pomoč in nasvete pri izdelavi naloge. Za vložen trud in pomoč pri načrtovanju postopkov se zahvaljujem tudi izr. prof. dr. Matjažu Jerasu. Hvala tudi prof. dr. Mihi Soku za priskrbljeno tkivo za analizo, Matiji Vebru za pomoč pri celičnem sortiranju, Nini Vardjan za pomoč pri avtomatizirani razgradnji tkiva in vsem zaposlenim na Zavodu za transfuzijsko medicino in na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo za prijaznost in pomoč pri delu.

Zahvaljujem se tudi Metki in vsem bližnjim, ki so me podpirali pri študiju in izdelavi diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelal pod vodstvom

mentorja prof. dr. Darka Černeta, spec. med. biokem.

in somentorja doc. dr. Urbana Švajgerja.

VSEBINA

1. Uvod.....	1
1.1. Pljučni rak.....	1
1.1.1. Histološka razdelitev pljučnega raka.....	1
1.1.2. Dejavniki tveganja.....	3
1.1.3. Diagnoza.....	5
1.1.4. Zdravljenje.....	8
1.2. S tumorjem povezani makrofagi (TAM-i)	9
1.2.1. Povezava med vnetjem in rakom.....	9
1.2.2. TAM-i.....	10
1.2.3. TAM-i pri kancerogenezi	13
1.2.4. Možnosti zdravljenja z delovanjem na TAM-e	14
2. Namen dela	16
3. Materiali in metode	17
3.1. Materiali in aparature	17
3.2. Priprava raztopin za nadaljnje delo	18
3.3. Vzorci	20
3.4. Priprava celične suspenzije	21
3.5. Magnetna ločba CD14 pozitivnih od ostalih celic	23
3.6. Pretočna citometrija in fluorescenčno aktivirano celično sortiranje (FACS).....	24
3.7. Analiza rezultatov.....	29
4. Rezultati in razprava	30
5. Sklep.....	48
6. Literatura.....	49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Klinična slika pljučnega tumorja.....	5
Preglednica II: TNM sistem zamejitve	6
Preglednica III: Določitev stadija pljučnega raka.....	7
Preglednica IV: Podatki o bolnikih.....	21
Preglednica V: Podatki tehtanja vzorcev, izračunana masa vzorcev in pridobljeno število celic po razgradnji tkiva iz posameznega vzorca	30
Preglednica VI: Števila in odstotki populacij mononuklearnih celic po magnetni ločbi, glede na molekulo CD14 ter za analizo uporabna števila celic CD14+ po odmrzovanju z odstotki preživelih celic v oklepaju.....	32
Preglednica VII: Na 1 g tkiva standardizirana števila celic iz preglednice VI.....	33
Preglednica VIII: Podatki o odstotkih celic z vsebnostjo molekul CD163 in CD204, pridobljeni s pretočno citometrijo in s celičnim sortiranjem	37
Preglednica IX: Števila celic z vsebnostjo molekul CD204 in CD163	39
Preglednica X: Na 1 g tkiva standardizirana števila preučevanih makrofagov	40
Preglednica XI: V odstotkih izražena povišana gostota posameznih populacij celic v rakavem tkivu, glede na zdravo tkivo	41
Preglednica XII: Odstotki posameznih populacij celic v celični suspenziji po razgradnji tkiva.....	42
Preglednica XIII: V odstotkih izražen porast relativne vrednosti posameznih populacij celic v rakavem tkivu, glede na zdravo tkivo.....	43

KAZALO SLIK

Slika 1: Histološki tipi pljučnih tumorjev	3
Slika 2: Polarizacija makrofagov in njihove lastnosti	11
Slika 3: Prikaz prehoda vzorca v ozek tok s hidrodinamskim fokusiranjem.....	25
Slika 4: Prikaz celičnega sorterja.....	26
Slika 5: Nastavitve in pogoji dela aparature za celično sortiranje.....	28
Slika 6: Grafični rezultati celičnega sortiranja	34
Slika 7: Številčni rezultati celičnega sortiranja.....	35
Slika 8: Rezultati analize s pretočno citometrijo	36

POVZETEK

Za razvoj raka so poleg tumorskih pomembne še druge celice, predvsem imunske, ki kontrolirajo rast, razvoj in metastaziranje raka. V naši raziskavi smo razvili postopek izolacije makrofagov iz nedrobnoceličnega pljučnega raka in okoliškega zdravega tkiva. V rakavem tkivu se namreč nahaja precejšnje število s tumorjem povezanih makrofagov (TAM-ov), ki izkazujejo fenotip M2 in tako varujejo tumor pred vnetnim odzivom ter mu omogočajo lažje napredovanje. Po izolaciji smo s pretočno citometrijo in s celičnim sortiranjem preverili prisotnost molekulskih označevalcev CD163 in CD204 v celični membrani izoliranih makrofagov, ki veljata za označevalca M2 makrofagov. Predvidevali smo, da sta v tumorju večja gostota in delež pozitivnih celic na omenjena označevalca, kot v zdravem tkivu.

V raziskavi smo najprej razvili in optimizirali postopek izolacije makrofagov iz tumorskega in zdravega tkiva. S pretočno citometrijo in celičnim sortiranjem smo nato ovrednotili vzorce, pridobljene od 3 bolnikov z že optimiziranim postopkom izolacije. Za izolacijo makrofagov smo pripravili celično suspenzijo z razgradnjo tkiva. Uporabili smo encimsko metodo s kolagenazo, hialuronidazo in deoksiribonukleazo 1. Celično suspenzijo smo nato gradientno centrifugirali na raztopini fikola in ločili mononuklearne celice od ostalih. Za nadaljnjo izolacijo makrofagov smo uporabili magnetno vezane delce na protitelesa proti CD14, ki se nahaja na večini monocitov in makrofagov, ter makrofage v magnetnem polju ločili od ostalih mononuklearnih celic.

Z analizo izoliranih celic smo ugotovili, da je v rakavem tkivu večja gostota celic vseh preučevanih populacij makrofagov, kot v zdravem tkivu. Čeprav nismo uspeli pridobiti dovolj vzorcev za ustrezno statistično analizo, rezultati nakazujejo precejšnje povečanje deleža in gostote makrofagov CD204⁺ v rakavem, v primerjavi z zdravim tkivom. Pri populacijah makrofagov CD163⁺ in CD163⁺, CD204⁺ smo ugotovili sorazmerno povečanje gostote celic v rakavem tkivu, delež teh celic pa je primerljiv v rakavem in zdravem tkivu. S celičnim sortiranjem smo iz celične suspenzije makrofagov iz tumorskega tkiva uspeli izolirati 13,7 % CD204⁺ makrofagov. Novejši literaturni podatki navajajo, da je molekula CD204 boljši označevalec makrofagov M2 od CD163. Za potrditev rezultatov bi bilo potrebno izvesti študijo z dovolj vzorci za ustrezno statistično analizo in preveriti vpliv prisotnosti makrofagov CD204⁺ na preživetje bolnikov.

ABSTRACT

For tumor development, progression and metastasing, beside tumor cells there are also important some immune cells. In our research we have developed a procedure for macrophage isolation from non-small cell lung cancer and healthy tissue around it. There is a large number of tumor associated macrophages (TAM) in cancer, which predominantly express phenotype M2 and prevent inflammation against tumor. They also contribute to illness progression. After isolation we have checked for molecule markers CD163 and CD204 in the cell membrane of macrophages with flow citometry and fluorescently activated cell sorting. These molecules are characteristic for M2 macrophages, so we assumed that we would find higher density and percentage of positive cells on mentioned markers in tumor, than in healthy tissue.

In the beginning of our research we had to develop and optimize the procedure for macrophage isolation from tumorous and healthy tissue. With flow cytometry and cell sorting we then evaluated samples from 3 patients, which we had isolated with already optimized procedure. For isolation of macrophages, we had to prepare cell suspension first with tissue degradation. We used enzymatic method with collagenase, hyaluronidase and deoxyribonuclease 1. After tissue degradation we added cell suspension on ficoll solution and used density centrifugation to separate mononuclear cells from other cell types. For further isolation of macrophages we used magnetic beads conjugated to antibodies against CD14, which is most common on monocytes and macrophages and separated those cells from other mononuclear cells in magnetic field.

After analysis we found out, that there is higher cell density of all examined populations of macrophages in tumor than in healthy tissue. Although we did not manage to get enough samples for statistical analysis, results showed high increase of density and percentage of CD204+ macrophages in tumor, comparing to healthy tissue. In macrophage populations CD163+ and CD163+, CD204+ we found relatively similar density increase in tumor, but percentage of these cells was similar in tumor and healthy tissue. With cell sorting we established that there are 13,7 % CD204+ macrophages in tumor. This molecule is by newly published researches presented as better marker of M2 macrophages than CD163. For confirmation of these results, a new study with enough samples for statistical analysis should be applied and checked for influence of CD204+ macrophages on patient survival.

SEZNAM OKRAJŠAV

Okrajšava	Pomen
bFGF	bazični fibroblastni rastni dejavnik (ang. basic Fibroblast Growth Factor)
CCL, CXCL	kemokin ligand (ang. Chemokine ligand)
CD	označevalec pripadnosti (ang. Cluster of Differentiation)
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. Deoxyribonucleic Acid)
EGF	epidermalni rastni dejavnik (ang. Epidermal Growth Factor)
GM-CSF	granulocitne-makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (ang. Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor)
IFN	Interferon
IL	Interlevkin
LPL	lipoproteinska lipaza
M-CSF	makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (ang. Macrophage Colony Stimulating Factor)
MMP	matriksna metaloproteinaza
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (ang. Messenger Ribonucleic Acid)
NF-κB	nuklearni dejavnik κ B (ang. Nuclear Factor κ B)
PBS	raztopina fosfatnega pufra (ang. Phosphate Buffered Saline)
PDGF	trombocitni rastni dejavnik (ang. Platelet Derived Growth Factor)
TAM	S tumorjem povezani makrofagi (ang. Tumor Associated Macrophages)
TGF-α	transformirajoči rastni dejavnik α (ang. Transforming Growth Factor α)

TNF-α	tumorje nekrotizirajoči dejavnik α (ang. Tumor Necrosis Factor α)
TNM sistem zamejitve	mednarodni sistem zamejitve rakavih obolenj (ang. Tumor, Node, Metastasis)
VEGF	žilni endotelijski rastni dejavnik (ang. Vascular Endothelial Growth Factor)

1. Uvod

1.1. Pljučni rak

Rakave bolezni ali maligne neoplazme so bolezni, pri katerih se izrojene celice nezadržno množijo in tvorijo nenormalno, nekontrolirano in patološko rast tkiva. Rast je lahko lokalna, lahko pa celice vdirajo v okolico in tvorijo zasevke. Te bolezni so drugi najpogostejši vzrok umiranja v Sloveniji, takoj za boleznimi srca in ožilja (1).

Pljučni rak je primaren ali sekundaren maligni tumor bronhijev ali pljučnega parenhima, za njegov nastanek pa je potrebnih več zaporednih patoloških sprememb. Večina pljučnih tumorjev je malignih, a je med vsemi vzroki smrti ravno raka na pljuči najpogostejše možno preprečiti. Pljučni rak predstavlja 20% vseh malignomov v Sloveniji pri moških, kar je največji delež rakavih obolenj v tej populaciji, medtem ko je pri ženskah na četrtem mestu po pogostosti (5% malignomov). Pri moških je tudi najpogostejši vzrok smrti med bolniki z malignimi boleznimi. Ocenjujejo, da na svetu v enem letu zboli za pljučnim rakom 1,6 milijona ljudi, umre pa jih 1,4 milijona. V Sloveniji v enem letu odkrijejo okoli 1300 primerov te bolezni. Petletno preživetje rakavih bolnikov znaša 8% za moške in 10% za ženske, medtem ko se ob odkritju v prvem stadiju preživetje povzpne na 60% (2, 3, 4). V razvitejših državah, tudi v Sloveniji, je bil vrh epidemije že dosežen in se opaža padanje incidence, kljub temu pa se še vedno večja incidenca pri ženskah, tako v Sloveniji, kot v svetu (1, 5).

1.1.1. Histološka razdelitev pljučnega raka

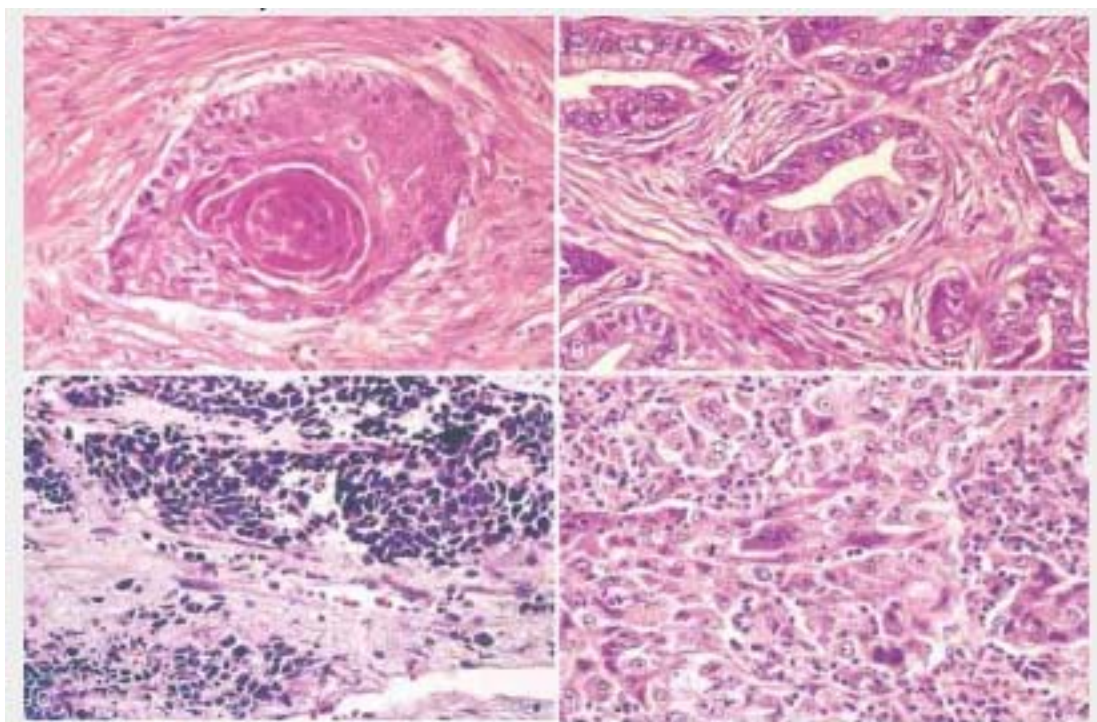
Glavna histološka tipa pljučnega raka sta drobnocelični rak in nedrobnocelični rak. Posamezen histološki tip lahko določimo z mikroskopsko analizo rakavega tkiva, saj se razlikujeta po velikosti in obliki celic. Drobnoceličnega prepoznamo po relativno majhnih celicah s številnimi mitozami. Zanj je značilno, da raste hitreje in tudi prej metastazira, največkrat pa se nahaja v glavnih dihalnih poteh. Pogosto najdemo tudi območja s celicami, značilnimi za nedrobnocelični rak, kar nakazuje na skupno pluripotentno matično celico, zmožno diferenciacije po večih poteh (6).

Nedrobnocelični pljučni rak lahko dalje razdelimo na:

- Ploščatocelični rak ali karcinom skvamoznih celic, ki se najpogosteje razvije v glavnih dihalnih poteh. Tumor raste sorazmerno počasi in pozno zaseva v področne bezgavke. Pogosto obilno nekrotizira, med velikimi tumorskimi celicami pa najdemo medcelične mostičke. Je najpogostejši pljučni tumor, prisoten pri približno 45% bolnikov. Večji delež se razvije pri moških ter pri kadilcih.
- Adenokarcinom ali žlezni rak zraste večinoma na periferiji pljuč, histološko pa ga prepoznamo po oblikovanih žlezah in izločanju sluzi. Zaseva hitreje od ploščatoceličnega raka, a počasneje od drobnoceličnega. Razvije se v približno 25% primerov, pogosteje pa se pojavlja pri ženskah in pri nekadilcih.
- Velikocelični rak ali makrocelularni karcinom je skupina nedrobnoceličnih tumorjev, pri katerih ne moremo dokazati značilnosti ploščatoceličnega ali žleznega raka in se pojavlja v 10% pljučnih tumorjev (4).

Izgled drobnoceličnega in posameznih nedrobnoceličnih rakov pod mikroskopom je prikazan na sliki 1. V novejših razvrstitvah je pri nedrobnoceličnem raku izpostavljen še pleomorfni karcinom, ki je histološko lahko ploščatocelični ali žlezni rak, pri njem pa je več kot 10% tkiva iz vretenastih celic ali celic velikank. Pomemben je zaradi precej slabše napovedi za preživetje pacienta. Nedrobnocelični rak predstavlja preko 80% primerov pljučnega raka. S pomočjo elektronske mikroskopije je sicer dokazano, da je približno 75% tumorjev kombiniranih, v katerih najdemo področja z različnimi histološkimi tipi raka (4, 6, 7).

Redki pljučni tumorji predstavljajo 5-10% vseh pljučnih tumorjev. Ti so heterogena skupina z več kot 50 vrstami, med katerimi so tako maligni, kot benigni. Najpogostejši med njimi so karcinoidi, pri katerih je petletno preživetje 90-100% tudi ob zasevkih v področne bezgavke (4, 5).



Slika 1: Histološki tipi pljučnih tumorjev: ploščatocelični rak levo zgoraj; žlezni rak z oblikovanimi žlezami desno zgoraj; drobnocelični rak levo spodaj; in velikocelični rak desno spodaj (8).

1.1.2. Dejavniki tveganja

Kancerogenezo povzroča stalno okvarjanje respiratornega epitelija. Razvoj bronhialnega raka je počasen in obsega mnogo stopenj. Poskusi na živalih so pokazali, da je potrebno do 10 let od prvih sprememb bazalnih celic respiratornega epitelija do razvoja rakavih celic in invazivnega raka (5).

Po oceni Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) na svetu kadi 47% moških in 12% žensk nad 15. letom starosti. Ravno kajenje je najpomembnejši dejavnik tveganja za nastanek pljučnega raka, saj je približno 90% moških in 80% žensk s pljučnim rakom kadilcev. V večji nevarnosti za razvoj pljučnega raka so že nekadilci, ki so cigaretnemu dimu pogosteje izpostavljeni, pri kadilcih pa je nevarnost lahko tudi do desetkrat večja. Bolj ogroženi so ljudje z daljšim obdobjem, zgodnjim začetkom kajenja in več pokajenimi cigaretami ter ob kajenju manj kakovostnih cigaret (1, 5). V cigaretnem dimu so odkrili preko 3000 različnih snovi, od katerih so mnoge mutagene in kancerogene. Najbolj raziskani so nitrozamini, promotorji kancerogeneze, in policiklični aromatski

ogljikovodiki, iniciatorji kancerogeneze, ki povzročajo mutacije in tako trajno okvarijo deoksiribonukleinsko kislino (DNA). Nekateri kancerogeni v cigaretnem dimu se aktivirajo šele po metabolizmu z encimi faze I, medtem ko nekatere encimi faze II deaktivirajo (4, 6).

Dejavniki tveganja so tudi kancerogene snovi, ki se predvsem pojavljajo na delovnih mestih. Sem uvrščamo azbest, smukec, premogov katran in saje, arzen, kadmij, šestvalentni krom, nikljeve spojine, gorčični plin, bis(klorometilni) eter in klorometil metilni eter, tveganje pa je večje tudi pri nekaterih proizvodnih postopkih, pri katerih pa kancerogeni elementi še niso odkriti. Ob hkratni izpostavljenosti večim kancerogenom se lahko pojavi sinergizem, kjer se tveganje množi in ne le sešteva. Tipičen primer je kombinacija azbesta in cigaretnega dima. Ob hkratni izpostavljenosti obema škodljivima dejavnikoma se tveganje za nastanek raka poveča tudi do sedemdesetkrat. Onesnaženosti ozračja pripisujemo manj kot 1% pljučnih rakov, je pa večje tveganje ob onesnaženosti z radioaktivnim radonom ter njegovimi potomci. Večja možnost nastanka pljučnega raka je tudi ob prisotnosti brazgotinjenja v pljučih in nekaterih genetskih specifičnostih (1, 4, 5).

Kljub prisotnosti omenjenih dejavnikov tveganja, se rak razvije le pri nizkem odstotku ogroženega prebivalstva. Poleg okoljskih so tako pomembni tudi dednostni dejavniki, saj so pri bolnikih s pljučnim rakom pogostejši nekateri fenotipi encimov, ki sodelujejo pri metabolizmu toksičnih substanc (citokrom P450, glutation-S-transferaza, N-acetil transferaza). Ugotovljena pa je bila tudi pomembnost nekaterih drugih genov, predvsem onkogenov *RB* in *MDM2* ter tumor supresorskega gena *TP53* (5, 9).

Pomembno naj bi vplivali na nastanek pljučnega raka tudi hormoni, najbolj estrogeni. To dokazuje nižja možnost razvoja raka pri ženskah z zgodnjim začetkom menopavze ter večja incidenca pljučnega raka pri ženskah, kot pri moških, ko so izpostavljeni enakim okoljskim pogojem. V raziskavah omenjajo tudi vpliv nekaterih zdravil, hrano z veliko maščobami in okužbe z adenovirusi ter papiloma virusi (4, 6). Med vzroki, ki jih lahko najdemo znotraj telesa, so pomembne nekatere kronične pljučne bolezni: kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB), tuberkuloza, idiopatska fibroza in prisotnost kovinskih ostankov v pljučih (4).

1.1.3. Diagnoza

Pljučni rak je na začetku klinično nem in večina bolnikov ima ob pojavu simptomov že napredovalo obliko bolezni. Ob odkritju primarnega tumorja so pogosto že prisotni oddaljeni zasevki, ki so najpogostejši pri drobnoceličnem raku (90%), velikoceličnem in žleznem raku (80%), pri ploščatoceličnem raku pa so prisotni v okoli 50% primerov. Na klinično sliko, predstavljeno v preglednici I, vplivajo lokalna rast tumorja, oddaljeni zasevki in paraneoplastični sindromi, ki niso posledica rasti tumorja ali zasevkov, ampak delovanja snovi, ki jih tumorske celice sproščajo v sistemski krvni obtok (5).

Preglednica I: Klinična slika pljučnega tumorja (5).

Lokalna rast tumorja	Zasevki pljučnega raka	Paraneoplastični sindromi
• suh kašelj • hemoptiza • stridor • hripavost • postobstruktivski pnevmotitis • neopredeljiva bolečina v prsnem košu • pritisk na zgornjo votlo veno povzroča otekanje vratu, obraza in rok	jetra: • povečanje jeter • bolečina pod desnim rebrnim lokom • redko zlatenica • povišani jetrni encimi	• Cushingov sindrom • hiperkalcemija • tromboza • ginekomastija • hipertrofična osteoartropatija • Lambert-Eatonov sindrom • Sindrom neustreznega izločanja antidiuretskega hormona • Diseminirana intravaskularna koagulacija
	centralni živčni sistem: • glavobol • vrtoglavica • dvojni vid • bruhanje • osebnostne spremembe	
	kosti: • bolečina • hiperkalcemija • patološki zlomi • odpoved kostnega mozga	
	redkeje so prizadeti tudi drugi organi	

Z diagnostičnim postopkom postavimo diagnozo pljučnega raka, hkrati pa ocenjujemo tudi njegovo razširjenost, kar imenujemo zamejitev. Ločimo klinično, kirurško in patološko zamejitev bolezni. Pri klinični upoštevamo rezultate slikovnih in endoskopskih metod, pri kirurški izgled tumorja in bezgavk med operacijo, pri patološki pa histološki pregled odstranjenega tkiva (5).

Najprej se uporabi slikovna metoda, rentgenogram ali še boljše računalniška tomografija (CT) prsnih organov, saj nam slednja osnovni tumor in morebitne povečane bezgavke prikaže veliko bolj nazorno. Naslednji postopek, ki ima osrednje mesto v diagnostiki in zamejevanju tumorja, je bronhoskopija, s katero ocenimo razširitev tumorja v velikih dihalnih poteh. Z bronhialno biopsijo odvezamemo koščke tumorja za citološke in histološke preiskave, možne zasevke pljučnega tumorja v druge organe pa iščemo s pomočjo slikovnih metod. Zamejitev pljučnega raka določa prognozo bolezni in možne načine zdravljenja. Najpogosteje se uporablja TNM sistem zamejitve (T-tumor, N-bezgavke, M-oddaljeni zasevki) in je prikazan v preglednici II, iz tega sistema pa se nato določi tudi stadij bolezni, kot je prikazano v preglednici III (5).

Preglednica II: TNM sistem zamejitve (5).

T (primarni tumor)

TX	Primarnega tumorja z bronhoskopskimi in slikovnimi metodami ne moremo dokazati, rakave celice so prisotne v sputumu ali bronhialnem izpirku.
To	Ni znakov primarnega tumorja.
Tis	Karcinom in situ.
T1	Bronhialni tumor v lobarnem bronhiju, manjši od 3 cm.
T2	Tumor večji od 3 cm, ali raste v glavnem bronhiju vsaj 2 cm distalno od glavne karine, ali raste v visceralno plevro, ali povzroča atelektazo oziroma obstruktivski pnevmonitis dela pljuč.
T3	Tumor, ki ne glede na velikost raste v steno prsne votline, mediastinalno, perikardialno, diafragmalno plevro, ali je v glavnem bronhiju manj kot 2 cm od glavne karine, ali povezan s pnevmonitisom oziroma atelektazo celih pljuč.

T4	Tumor, ki ne glede na velikost raste v okolne organe (mediastinum, srce, velike žile, sapnik, požiralnik, hrbtenico, v glavno karino), ali zaseva v isti pljučni reženj, ali povzroča maligni plevralni izliv.
-----------	--

N (bezgavke)

NX	Ocena lokalnih bezgavk ni mogoča.
N0	Ni tumorskih zasevkov.
N1	Zasevki v intrapulmonalne (vključno z direktnim širjenjem tumorja), lobarne, hilusne bezgavke na strani tumorja.
N2	Zasevanje v istostranske mediastinalne ali subkardialne bezgavke.
N3	Zasevanje v hilusne, mediastinalne bezgavke nasprotne strani ali v bezgavke vratne mišice ali supraklavikularne bezgavke v isti ali drugi strani pljuč.

M (oddaljeni zasevki)

MX	Oddaljenih zasevkov ne moremo opredeliti.
M0	Oddaljenih zasevkov ni.
M1	Zasevki v parenhimske organe ali zasevek pljučnega tumorja v drugi pljučni reženj.

Preglednica III: Določitev stadija pljučnega raka (5).

Stadij bolezni	TNM	Petletno preživetje (%)
Okulni (prikriti)	TX, N0, M0	
Stadij 0	Tis, N0, M0	
Stadij IA	T1, N0, M0	61-67
Stadij IB	T2, N0, M0	38-57
Stadij IIA	T1, N1, M0	34-54

Stadij IIB	T2, N1, M0 ali T3, N0, M0	23-38
Stadij IIIA	T1, N2, M0 ali T2, N2, M0 ali T3, N1, M0 ali T3, N2, M0	9-25
Stadij IIIB	Katerikoli T, N3, M0 ali T4, katerikoli N, M0	7
Stadij IV	Katerikoli T, katerikoli N, M1	1

Obstajajo tudi nekateri presejalni testi, kot so citološki pregled sputuma, rentgenogram prsnih organov, spiralna računalniška tomografija in avtofluorescenčna bronhoskopija. Ti testi so večinoma premalo občutljivi, ali pa so preiskave zelo zamudne in invazivne, zaradi česar jih je smiselno izvajati le pri bolj ogroženih posameznikih (5).

1.1.4. Zdravljenje

Pri pljučnem raku je dejansko najboljša preventiva, predvsem s protikadilsko vzgojo ter z ukrepi za zmanjšanje kajenja. Za primerno nizko izpostavljenost kancerogenom na delovnih mestih so pomembni ustrezni zakonski predpisi, ob onesnaženosti stanovanjskih prostorov z azbestom ali drugimi znanimi kancerogeni pa je potrebno redno prezračevanje ali ustrezna sanacija. Pri preprečevanju raka pomaga tudi zaščitna prehrana, bogata s svežo zelenjavo in sadjem (1).

Ob odkritju obolenja odločitev o načinu zdravljenja temelji na histološki vrsti tumorja, stadiju bolezni in klinični oceni bolnikovega stanja. Zdravljenje je lahko radikalno, kjer bolezen skušamo odpraviti, ali simptomatsko, kjer le lajšamo simptome bolezni (5).

Operativno zdravimo bolnike z nedrobnoceličnim rakom pljuč do stadija IIIA, redko pa so operabilni tudi bolniki z drobnoceličnim rakom. Najmanjši možni poseg je odstranitev pljučnega režnja skupaj z bezgavkami v hilusih in mediastinumu. Če to ni možno, odstranimo dva režnja ali celo pljučno krilo (5).

Zdravljenje s citostatiki se uporablja predvsem pri drobnoceličnem rakom pljuč, s čimer želimo delovati na tumor in neodkrita zasevke ter spraviti tumorske celice v celično fazo, ki bi bila bolj občutljiva za obsevanje. Uporablja se kombinacija etopozida in cisplatina, alternativno pa lahko uporabimo tudi kombinacijo ciklofosfamida, doksorubicina in vinkristina. Pri nedrobnoceličnem pljučnem raku se kemoterapija uporablja za zniževanje

stadija bolezni, s čimer se poskuša doseči operabilnost bolnika. Poleg naštetih citostatikov se pri tej diagnozi uporabljata tudi gemcitabin in taksol (5).

Obsevanje uporabljamo pri omejenih oblikah drobnoceličnega raka med krogi kemoterapije in kot simptomatsko zdravljenje osnovnega tumorja ali oddaljenih zasevkov. Kemoterapevtiki ne prehajajo skozi hematoencefalno bariero, zato je po uspešno končani kemoterapiji potrebno obsevati glavo (5).

1.2. S tumorjem povezani makrofagi (TAM-i)

1.2.1. Povezava med vnetjem in rakom

Tumor sestavlja mnogo različnih vrst celic, poleg neoplastičnih tumorskih so najpogostejše še fibroblasti, endotelijske celice in imunske celice. Vse omenjene celične vrste med seboj interagirajo, kar kroji njihove fenotipske in funkcijske lastnosti (10).

Že sredi 19. stoletja je Rudolf Virchow odkril prisotnost levkocitov v neoplastičnem tkivu in rak povezal z vnetjem, oziroma posledičnim imunskim odzivom. Danes imunske celice veljajo za pomemben dejavnik pri napredovanju tumorja, tako lahko tudi pojasnimo, zakaj se rakava obolenja pogosto pojavijo na mestih kroničnega vnetja, ki vodijo v proizvodnjo vnetnih mediatorjev in aktivacijo levkocitov (11). Do kroničnega vnetja lahko privedejo intrinzični genetski vzroki ali ekstrinzični pri avtoimunskih boleznih ter pri okužbah z mikroorganizmi (10). Dobro znane so povezave med okužbami s *Helicobacter pylori* in rakom na želodcu, šistosomo in rakom mehurja ter hepatitisoma B in C pri raku na jetrih (12).

Za napredovanje raka so poleg samih tumorskih celic najbolj pomembni imunosupresivni levkociti, med katere uvrščamo mieloidne supresorske celice, makrofage M2, granulocite, limfocite T_H2 in regulatorne celice T. Preko izločenih dejavnikov vplivajo na značilnosti drugih levkocitov in endotelijskih celic ter so sposobni vzpostaviti delujoče ožilje, zaradi česar jih imenujemo tudi vaskularni levkociti (13). Tumorjevo mikrookolje privede do tolerogenosti imunskih celic, te pa nato omogočajo razgradnjo medceličnega matriksa, ožiljenje tumorja, njegovo rast in pospešujejo zasevanje. To je predvsem posledica lokalnega izločanja dejavnikov, med katerimi so najpomembnejši interlevkin 8 (IL-8), IL-

10, žilni endotelijski rastni dejavnik (VEGF), bazični fibroblastni rastni dejavnik (bFGF) in transformirajoči rastni dejavnik α (TGF- α) (14, 15).

1.2.2. TAM-i

Makrofagi so razporejeni strateško po celotnem telesu, kjer fagocitirajo in obdelujejo telesu tuj material, mrtve celice in njihove ostanke ter po potrebi privabljajo dodatne makrofage. Izvirajo iz monocitov v krvi, ki še niso popolnoma diferencirani in to dosežejo šele po stiku z okoliškimi dražljaji v tkivu (16). Makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (M-CSF) in granulocitne-makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (GM-CSF) sta najpomembnejša znana dejavnika preživetja, proliferacije, diferenciacije in polarizacije makrofagov. Makrofage razdelimo na klasično aktiviran fenotip M1, ki bolj vzpodbuja vnetje in alternativno aktiviran fenotip M2, ki bolj zavira vnetje, razdelitev na tak način pa imenujemo polarizacija. Le redkokaterega makrofaga lahko ovrednotimo nedvoumno kot M1 ali M2, večina jih je razporejenih znotraj širokega spektra med tema fenotipoma. Že samo zorenje lahko vpliva na polarizacijo, saj je pod vplivom M-CSF opažen bolj protivnetni fenotip, medtem ko zorenje z GM-CSF vodi v bolj vnetnega (17).

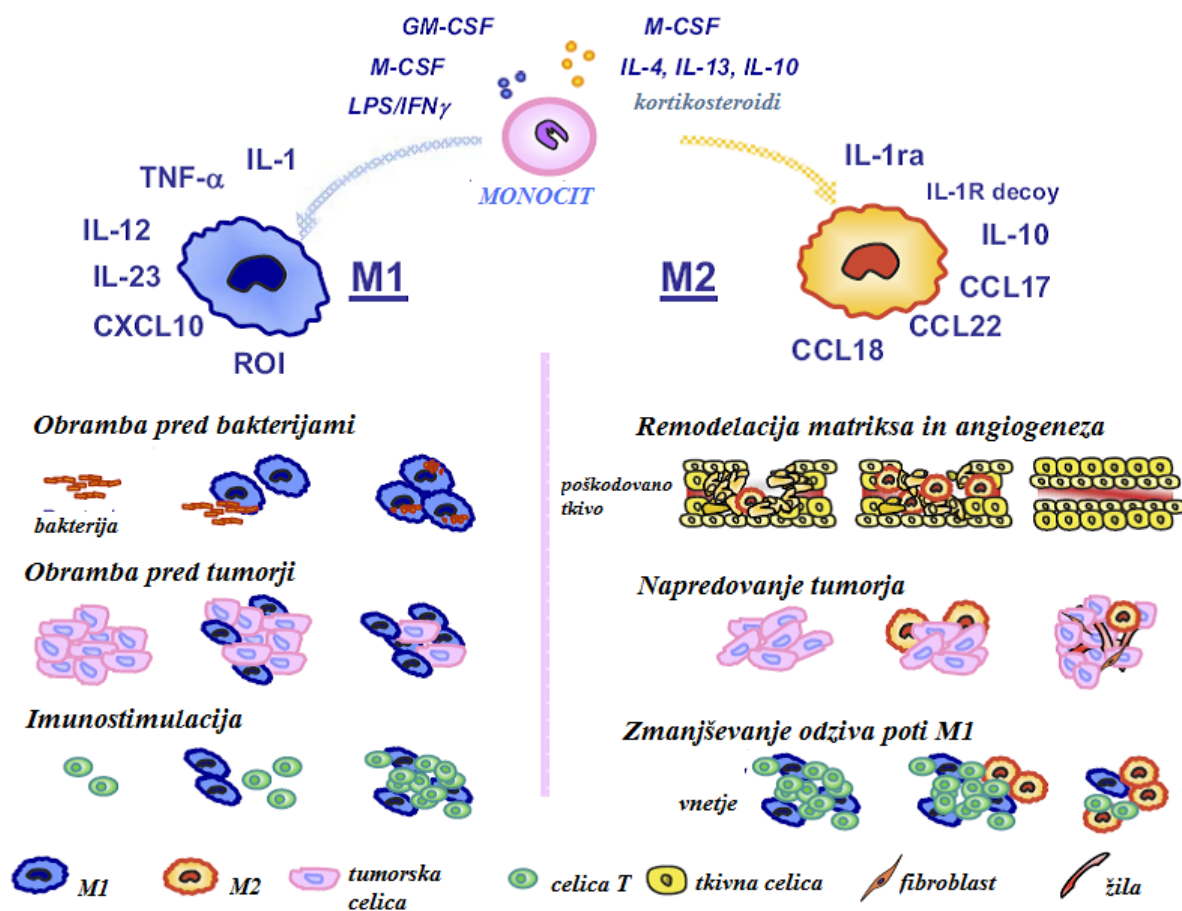
Do fenotipa M1 se makrofagi aktivirajo ob prisotnosti interferona γ (IFN- γ), ali pa produktov mikrobov, ki se vežejo na receptor PRR (ang. Pattern Recognition Receptor). M1 makrofagi izločajo veliko IL-12 in IL-23 ter malo IL-10, proizvajajo reaktivne dušikove intermediate in vnetne citokine IL-1 β , tumorje nekrotizirajoči dejavnik α (TNF- α) ter IL-6 za sprožitev vnetja (18, 19). Prav tako vzpodbujajo T_H1 celični odziv limfocitov in jih uvrščamo med antigen predstavitvene celice. Gostitelja varujejo pred mikrobi in tumorji (11).

M2 makrofage lahko razdelimo na več podenot, najpogosteje na sledeč način:

- M2a nastanejo po izpostavitvi IL-4 ali IL-13;
- M2b nastanejo po stiku z imunskimi kompleksi v kombinaciji z IL-1 β ali lipopolisaharidi;
- M2c nastanejo po izpostavitvi IL-10, TGF- β ali glukokortikoidom (14, 20).

Za makrofage M2 je značilno nizko izražanje IL-23 in IL-12 ter visoko izražanje IL-10, receptorja antagonista IL-1 (IL-1ra), IL-1 decoy receptorja (decoy receptor veže ligand in s tem prepreči vezavo na tarčni receptor tega liganda), manoznih, galaktoznih in receptorjev

čistilcev. Značilno je tudi izločanje kemokin liganda 17 (CCL17), CCL22 in TGF- β . Izkazujejo spremembo v metabolizmu arginina, ki gre v smer proizvodnje ornitina in poliaminov namesto citrulina in dušikovega oksida (10, 18). Njihova aktivacija privede do čiščenja odpadnih snovi, angiogeneze, celjenja poškodovanega tkiva, napredovanja tumorja ter imunskega odziva T_H2. Prav tako negativno regulirajo M1 imunski odziv, so pa pomembni za obrambo pred paraziti (11, 12). Pomembnejše razlike med makrofagi M1 in M2 so predstavljene tudi na sliki 2



Slika 2: Polarizacija makrofagov in njihove lastnosti (10).

Možna je tudi sprememba polarizacije makrofagov iz M1 v M2, kar se lahko zgodi pod vplivom M-CSF, IL-4, IL-10, IL-6, TGF- β in prostaglandina E2. Izguba ravnotežja med M1 in M2 makrofagi tako na eni strani lahko privede do kroničnih vnetij v primeru prevlade M1, na drugi strani pa do pomanjkljivega imunskega odgovora v primeru prevlade M2 makrofagov (10, 17).

Za TAM-e je ob kroničnem vnetju značilen M1 fenotip, ki z izločanjem reaktivnih dušikovih in kisikovih intermediatov povzročajo poškodbe tkiva, DNA in okvarjeno aktivnost proteina p53 v okoliških epitelijskih celicah, kar vodi v predrakave spremembe teh celic. Z izločanjem TNF- α , IL-1 in IL-6 TAM-i nato omogočajo preživetje predtumorskih celic in posledično nastanek raka (21). Z njegovim razvojem preidejo TAM-i v M2 fenotip, za kar je odgovorno predvsem pomanjkanje IFN- γ in komponent bakterij, ki bi polarizirale makrofage proti fenotipu M1 ter prisotnost IL-4, IL-13, TGF- β in IL-10 v tumorju, ki jih tam izločajo limfociti T_H2, neoplastične celice, fibroblasti in že prisotni makrofagi M2 (10, 11). TAM-i so lahko funkcionalno različni, saj obstaja vsaj 6 podenot, vsaka pa opravlja drugačno vlogo pri napredovanju tumorja (19, 20). V malignih tumorjih jih je signifikantno več kot v benignih, sovpadajo pa tudi s stadijem raka (22). Njihovo višje število pogosto pomeni slabšo napoved za preživetje pacienta, predstavljajo pa lahko do 50% tumorskega tkiva (10). TAM-i izločajo vrsto različnih rastnih dejavnikov, proteolitičnih encimov, citokinov in vnetnih mediatorjev in mnogi od teh sodelujejo pri napredovanju tumorja. Na živalskih modelih je bilo dokazano, da manjša infiltracija makrofagov v tumorsko tkivo sovпада z manjšo rastjo tumorja in manjšim pojavom metastaz. Ko so križali miši z genom za spontani razvoj tumorja in miši s pomanjkanjem monocitov/makrofagov, so opazili precejšnje zmanjšanje rasti tumorjev in njihovega zasevanja (10). Raziskave pri raku dojke, jajčnikov in tudi nekaterih drugih malignih spremembah so ugotovile povezavo med povečanim številom TAM-ov in gostoto ožilja, kar je posledica večjega izražanja VEGF in epidermalnega rastnega dejavnika (EGF). Izvedli so tudi preizkus invazivnosti, kjer so dokazali da je mešana kultura makrofagov in tumorskih celic mnogo bolj invazivna od samih tumorskih celic, večja pa je tudi aktivnost razgradnje matriksa (15).

Polarizacijo makrofagov lahko spremljamo s protitelesi proti specifičnim molekulam, ki jih posamezen fenotip izkazuje. Za makrofage M1 je značilno visoko izražanje CD16/32, receptorja za IL-7 in indolamin-pirol 2,3 dioksigenaze, ki jih lahko uporabimo za njihov označevalec (19, 23). Za makrofage M2 je značilno izražanje molekul CD163 in CD204. CD204 z novjšimi spoznanji smatramo za boljši označevalec M2 fenotipa makrofagov in je v literaturi pogosto označen tudi kot receptor čistilec razreda A1 (SR-A1, ang. Scavenger Receptor A1), ali pa MSR1 (ang. Macrophage Scavenger Receptor 1). Znane so 3 izoforme tega receptorja, od katerih sta 2 sposobni ednocitoze modificiranih

lipoproteinov nizke gostote (LDL) (24). CD163 je membranski protein, s cisteinom bogat receptor čistilec, ki veže komplekse hemoglobin/haptoglobin in je s tem pomemben dejavnik homeostaze. Veže lahko tudi TNF- α ter je šibek induktor apoptoze (22). Značilen je za aktivirane makrofage, ki ga začnejo izražati po stimulaciji z IL-10 (14).

1.2.3. TAM-i pri kancerogenezi

Infiltracija makrofagov se začne zgodaj v predinvazivni stopnji tumorja. TAM-i v tumor pridejo s pomočjo izločenih molekul neoplastičnih celic ali celic strome. Najpomembnejši je kemokin CCL2, odkrili pa so še pomembnost CCL3, CCL4, CCL5, citokinov VEGF in trombocitnega rastnega dejavnika (PDGF) ter M-CSF. Lahko jih privabijo tudi fibronektin, fibrinogen in snovi, nastale med čiščenjem medceličnine zaradi delovanja tumorskih in makrofagnih proteaz (10, 11). TAM-i nato proizvajajo in izločajo molekule (primer je EGF), ki neposredno vzpodbujajo rast tumorskih celic. Poleg tega na rast tumorja vplivajo z izločanjem IL-10, CCL17 in CCL22, ki od limfocitov predvsem pritegnejo T_H2 in Treg celice, ki delujejo imunosupresivno (10). M2 makrofagi tudi močno izražajo feroportin, ki izloča železo iz makrofagov, česar pri M1 fenotipu ni opaziti. TAM-i bi lahko bili pomembni za zadostitev visokih potreb tumorskih celic po železu, ki je pomemben kofaktor pri sintezi DNA (25).

TAM-i se razporedijo predvsem v hipoksične predele tumorja ter sodelujejo pri angiogenezi in limfangiogenezi, ki sta ključnega pomena pri rasti tumorja in njegovem zasevanju (11). Hipoksija povzroča povečano izražanje *HIF-1* in *HIF-2*, odsotnost tega izražanja pa privede do zmanjšane giblivosti in citotoksičnega delovanja makrofagov. Izražanje omenjenih genov povzroči večje izločanje rastnih dejavnikov VEGF, TNF- α , PDGF, TGF- β in bFGF. Pri raziskavah na raku dojke so ugotovili, da TAM-i VEGF izločajo skoraj izključno v neožiljenih delih raka dojke (10). Značilno je tudi izražanje nekaterih kemokinov (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8) z glutamat-levcin-arginin aminokislinsko sekvenco na NH₂ koncu, ki omogočajo kemotakso in proliferacijo endotelijskih celic, kar povzročijo z vezavo na CXCR1 in CXCR2 receptorje (26). TAM-i prav tako izločajo ciklooksigenazo-2, angiogeni dejavnik timidin fosforilazo, ki vzpodbuja migracijo endotelijskih celic in encime matriksne metaloproteinaze (MMP): MMP-2, MMP-7, MMP-9 in MMP-12 (10, 11). Slednje so sposobne razgraditi vse vrste zunajceličnih intersticijskih beljakovin in beljakovin v bazalni membrani ter s tem

omogočiti remodeliranje prostora za ožiljenje tumorja, njegovo širjenje in metastaziranje (12).

Tudi za zasevanje je bila ugotovljena pomembnost TAM-ov. Izločena TNF- α in ligand RANKL (ang. Receptor Activator of Nuclear Factor κ B) povzročita indukcijo nuklearnega dejavnika κ B (NF- κ B), kar neposredno stimulira tumorske celice, da izražajo bolj invaziven fenotip (11, 27). To vzpodbudi sintezo različnih proteinov, kot so serinske proteaze, MMP in katepsin, ki omogočajo penetracijo tumorskih celic skozi bazalno membrano (11). Med pomembnejše molekule za zasevanje tumorja verjetno sodi tudi EGF. Pri miših s prirojenim pomanjkanjem makrofagov so spremljali zasevke raka dojke v pljučih, kar je značilno pri napredovali obliki bolezni. A ugotovili so, da kljub normalnemu razvoju tumorskih celic, te niso mogle zasevati v pljuča zaradi pomanjkanja EGF makrofagnega izvora (10).

Za najpomembnejši biokemijski dejavnik pri kancerogenezi velja nuklearni dejavnik NF- κ B, katerega aktivacija je potrebna za sintezo mnogih zgoraj naštetih molekul in tako tudi za procese kancerogeneze. Njegova pomembnost se kaže tako v imunskih celicah, kot tudi pri tumorskih. V tumorskih celicah je značilna konstitutivna aktivacija NF- κ B, ki povzroči signale za rast, transformacijo, odpornost proti apoptozi, angiogenezo in invazivnost (28). V poznejši fazi tumorja pa so pri TAM-ih opazili okvarjen ali pozen odziv NF- κ B, za kar naj bi bilo ključnega pomena povečano nastajanje homodimerov podenote p50, kar zmanjšuje prepisovanje vnetnih citokinov IL-12 in TNF- α (17, 21). To omogoča izražanje fenotipa M2 in zavira imunski odziv proti tumorju.

1.2.4. Možnosti zdravljenja z delovanjem na TAM-e

Značilno za TAM-e je izražanje receptorja čistilca razreda A1 (SR-A1), oziroma molekule CD204. V raziskavi, kjer so v tumorsko tkivo dostavili toksin saporin, vezan na protitelo proti temu receptorju, je ta povzročil znižanje CD204 pozitivnih makrofagov za 80% v tumorju, medtem ko ni imel vpliva na makrofage v vranici. Napredovanje tumorja je bilo precej počasnejše, kot bi bilo sicer, s tem pa makrofagi predstavljajo možno tarčo pri terapiji raka (13).

Coleyev toksin, ki vsebuje ekstrakte bakterij, se že celo stoletje uporablja za upočasnjevanje napredovanja raka in naj bi deloval z usmerjanjem makrofagov v fenotip

M1 (28). Danes že poznamo tudi nekaj sodobnih učinkovin, ki vplivajo na makrofage. Talidomid, linomid in ostale anti-angiogenetske učinkovine zmanjšajo infiltracijo makrofagov in prav tako zmanjšajo rast tumorja pri raku dojke, pantoprazol pa povzroči povečano infiltracijo makrofagov, ki izkazujejo M1 fenotip. Bisfosfonati upočasnijo rast tumorja z inhibicijo MMP-9 in s povečanim nastajanjem imunomodulatorja IL-1, ki polarizira makrofage proti fenotipu M1, v višjih koncentracijah pa so sposobni celo ubiti makrofage (12). Tudi registrirana protitumorna učinkovina rastlinskega izvora trabektedin naj bi citotoksično učinkovala prav na makrofage, v nižjih odmerkih pa zavirala nastajanje CCL2 in tako zmanjšala vstop makrofagov v tumorsko tkivo (10).

Biološke učinkovine ponujajo veliko novih možnosti. Zdravljenje z IL-12 je še sporno, saj samostojno IL-12 zelo malo izboljša napoved za preživetje pacienta, ob sočasni aplikaciji katerih izmed drugih citokinov (IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21, GM-CSF ali IFN- α) pa zdravljenje z IL-12 privede do precej boljših rezultatov (12). Met-CCL5 je antagonist kemokinskega receptorja, ki veže CCL5 ter povzroči nižjo stopnjo infiltracije makrofagov ter posledično manjšo maso tumorja (10). V fazi kliničnih preizkušanj so še inhibitorji M-CSF, protitelesa proti CCL2 in njegovemu receptorju ter VEGF (12). Opaženi so tudi že kompenzatorni mehanizmi, kjer pri miših ob pomanjkanju receptorja za CCL2 makrofagi ne morejo vstopiti v tumor, vendar nevtrofilci v veliki meri začnejo izražati angiogenetske dejavnike (11). Možnosti za zdravljenje je torej veliko, boljše rezultate pa si lahko obetamo, ko bomo dovolj razumeli celoten proces kancerogeneze ter ustrezno uravnali vnetni odziv (18).

2. Namen dela

V okviru diplomskega dela bomo razvili postopek izolacije makrofagov CD14+ iz nedrobnoceličnega pljučnega raka in okoliškega zdravega tkiva ter s pretočno citometrijo določili njihove fenotipe. Zanimalo nas bo izražanje molekulskih označevalcev CD163 in CD204, ki naj bi bila v večji meri prisotna pri makrofagih s fenotipom M2 in ravno ta populacija makrofagov bi lahko bila odgovorna za slabšo prognozo bolnikov. S celičnim sortiranjem bomo poskusili izolirati posamezne populacije makrofagov in tako omogočiti nadaljnje študije na njih.

Dosedanje ugotovitve nas privedejo do hipoteze:

- da je v rakavem tkivu večja gostota in delež makrofagov, ki izražajo CD163 in CD204, kot v okoliškem zdravem tkivu.

Najprej bomo razvili postopek izolacije makrofagov. Iz rakavega in okoliškega zdravega tkiva bomo pripravili celično suspenzijo, kar bomo poskusili z razgradnjo z encimi v petrijevki ter z avtomatizirano metodo. Nato bomo poskusili izolirati makrofage po dveh različnih metodah: z magnetnim ločevanjem ter z adherenco makrofagov na plastiko. Pri obeh postopkih želimo ugotoviti, katera metoda dela daje boljše rezultate. Sledila bo analiza fenotipov dobljenih celic s pretočno citometrijo ter ločevanje makrofagov, ki izražajo molekuli CD163 in CD204, od ostalih s celičnim sortiranjem.

3. Materiali in metode

3.1. Materiali in aparature

- natrijev klorid (NaCl)
- kalijev klorid (KCl)
- dinatrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4)
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4)
- deionizirana voda
- dimetil sulfoksid (DMSO)
- RPMI 1640 z L-glutaminom in HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina) pufrom (PAA, Pasching, Avstrija)
- Ficoll Lympholyte CL 5015
- gentamicin (Invitrogen, Carlsbad, ZDA)
- kolagenaza (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA, kataloška številka C1639)
- hialuronidaza (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA, kataloška številka H3884)
- deoksiribonukleaza 1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA, kataloška številka D4236)
- s fikoeritrinom označena mišja protitelesa proti CD204: anti-hSR-AI/MSR1 Phycoerythrin conjugated mouse IgG
- z Alexa Fluor 488 označena mišja protitelesa proti CD163: anti-hCD163 Alexa Fluor 488 mouse IgG
- mišja protitelesa IgG2a proti človeškemu CD14, konjugirana z magnetnimi delci (CD14 MicroBeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Nemčija)
- fetalni goveji serum
- metilensko modrilo
- injekcijske brizge in igle za 1 mL
- mikroeprovete 0,5 mL
- mikrotitrna plošča
- erlenmajerica 1000 mL
- pipetirke z nastavki za 20, 200 in 1000 μL (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- celična sita: 70 in 100 μm (BD Falcon, San Jose, ZDA)
- filtri 0,2 μm

- centrifugirke 50 mL
- petrijevke 60 x 15 mm
- merilne pipete za 5, 10 in 20 mL
- pasteurjeve pipete
- Buerker-Tuerkova komora
- krioeprovete
- pincete
- škarje
- skalpeli
- hladilna posoda
- komora z laminarnim pretokom zraka Heraeus HBB 2448 (Heraeus, Hanau, Nemčija)
- inkubator HERA cell 150 (Heraeus, Hanau, Nemčija)
- tehnica
- centrifuga Megafuge 1.0 (Heraeus sepatech, Hanau, Nemčija)
- invertni svetlobni mikroskop
- svetlobni mikroskop
- ločevalnik MidiMACS (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Nemčija)
- kolona LD (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Nemčija)
- avtoklav
- magnetno mešalo
- pretočni citometer FacsCALIBUR (Becton Dickinson, Franklin Lakes, ZDA)
- celični sorter BD FACS Aria s pripadajočo programsko opremo FACSDiva version 6.1.2 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, ZDA)

3.2. Priprava raztopin za nadaljnje delo

Za izolacijo celic smo najprej morali iz tkiva pripraviti suspenzijo posameznih celic. Za odločitev o izvedbi razgradnje tkiva smo preverili podatke iz preteklih študij o razgradnji pljučnega in tumorskega tkiva. Poznamo encimske, mehanske in kemične metode razgradnje. Mehanske metode potekajo hitreje, encimske metode pa bolj ohranijo celice od kemičnih, zato smo se odločili za kombinacijo mehanske in encimske razgradnje (29, 30).

V študijah so največkrat uporabljeni encimi za pridobitev celične suspenzije tripsin, kolagenaza, deoksiribonukleaza 1, hialuronidaza in dispaza, razgrajevalnemu mediju pa pogosto dodajo antibiotik ali antimikotik (29-32). Tripsin najhitreje razgradi tkivo, a ni primeren za izolacijo makrofagov. Največ mononuklearnih celic lahko pridobimo pri raztopinah s kolagenazo in deoksiribonukleazo 1, v pljučnem tkivu in pri adenokarcinomu pa še boljše rezultate dosežemo z dodatkom hialuronidaze, zato smo se odločili za slednje tri encime (30).

Kolagenaza je pomembna za razgradnjo kolagenskega vezivnega tkiva, hialuronidaza hidrolizira hialuronsko kislino s cepitvijo vezi med N-acetil- β -D-glukozaminom in D-glukuronatom, deoksiribonukleaza 1 pa cepi fosfodiesterko vez ob pirimidinskih bazah, v vzorcu pa s tem pripomore k manjši viskoznosti zaradi razgradnje DNA gela, ki se ustvari zaradi sproščanja DNA iz mrtvih celic (30).

Kolagenaza se uporablja v koncentracijah 1-7 g/L, ostala encima pa med 0,02 in 0,2 g/L. Pri našem delu smo se odločili za 2 mL razgrajevalnega medija s koncentracijo kolagenaze 2 g/L, hialuronidaze 0,2 g/L in 80 Kunitzovih enot deoksiribonukleaze 1. Tako smo dosegli, da je bilo tkivo v celoti v stiku z razgrajevalnim medijem, koncentracije encimov pa bi lahko spreminjali, če bi opazili, da se tkivo ne razgrajuje, ali pa se razgrajuje prepočasi.

Postopki:

Priprava osnovnega medija:

V 500 mL RPMI 1640 z L-glutaminom in HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina) pufrom smo dodali 0,5 mL gentamicina v komori z laminarnim pretokom zraka. Tako pripravljeno raztopino bomo v nadaljevanju naloge imenovali osnovni medij.

Priprava raztopine fosfatnega pufra (PBS):

Pripravili smo desetkratno raztopino pufra, ki smo jo ob koncu priprave razredčili. V erlenmajerico smo natehtali 8 g natrijevega klorida (NaCl), 2 g kalijevega klorida (KCl), 14,4 g dinatrijevega hidrogenfosfata (Na_2HPO_4) in 2,4 g kalijevega dihidrogenfosfata (KH_2PO_4). Vsebinsko v erlenmajerici smo raztopili v 800 mL deionizirane vode s 30-

minutnim mešanjem na magnetnem mešalu. Z natrijevim hidroksidom smo uravnali pH na 7,2 ter dopolnili z deionizirano vodo do 1 L. Raztopino smo nato prelili v steklenico in avtoklavirali 15 minut pri 121°C. Po ohladitvi smo 100 mL raztopine v komori z laminarnim pretokom zraka razredčili z 900 mL deionizirane vode, dobro premešali in tako dobili raztopino fosfatnega pufra, pripravljenega za uporabo.

Priprava encimov za razgradnjo tkiva:

Encime smo pripravili po navodilih proizvajalca. Celoten postopek smo izvedli v komori z laminarnim pretokom zraka. Najprej smo pripravili medij za raztapljanje encimov, kar je osnovni medij s 3% fetalnim govejim serumom. Pripravili smo 7 mL tega medija tako, da smo v čašo dodali 210 µL seruma in 6790 µL osnovnega medija. Dalje je priprava encimov potekala po sledečih postopkih:

- Raztopino kolagenaze smo pripravili iz 50 mg sterilne liofilizirane kolagenze, ki smo jo raztopili v 2,5 mL osnovnega medija s 3% fetalnim govejim serumom. Nato smo pripravili alikvote po 200 µL ter jih odpipetirali v mikroepruvete ter označili. Raztopine smo nato zamrznili.
- Raztopino hialuronidaze smo pripravili z raztapljanjem 50 mg hialuronidaze v 3,75 mL osnovnega medija s 3% fetalnim govejim serumom. Nato smo pripravljeno raztopino sterilno filtrirali in pripravili alikvote po 200 µL. Te smo spravili v mikroepruvete, jih označili in zamrznili.
- Za pripravo raztopine deoksiribonukleaze 1 smo najprej raztopili 21,9 mg natrijevega klorida v 2,5 mL deionizirane vode in tako dobili 0,15 molarno raztopino. 0,5 mg, oziroma 2000 Kunitzovih enot encima smo raztopili v tako pripravljeni raztopini, jo sterilno filtrirali ter pripravili alikvote po 100 µL. Te smo nato spravili v mikroepruvete, označili in zamrznili ter tako pripravili za nadaljnjo uporabo.

3.3. Vzorci

V okviru diplomske naloge smo za optimizacijo postopka izolacije in analizo vzorcev uporabili tkivo, pridobljeno od skupno desetih pacientov. 2 tkivi histološko nista bili ocenjeni kot nedrobnocelični pljučni rak, zato smo ju zavrgli, 1 tkivo smo poskusili razgrajevati z avtomatizirano metodo, 3 smo uporabili za optimizacijo postopka, iz enega

pa nam tudi z optimiziranim postopkom ni uspelo pridobiti dovolj celic za analizo. Za analizo s pretočno citometrijo in celičnim sortiranjem smo uporabili celice nedrobnoceličnega pljučnega raka in okoliškega zdravega tkiva treh bolnikov, ki smo jih uspeli izolirati z že optimiziranim postopkom. Histološka analiza tumorskega tkiva je bila izvedena po odstranitvi tkiva na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, podatki o vzorcih pa so zbrani v preglednici IV. Pri vzorcih 1 in 2 je patolog ob histološkem tipu tumorja navedel še nevroendokrinost tumorja, kar predstavlja slabšo prognozo za bolnika, pri TNM oceni pa je naveden p, ker je to patološka zamejitev.

Preglednica IV: Podatki o bolnikih.

Vzorec	Histološki tip tumorja	TNM ocena	Stadij	Spol pacienta	Starost pacienta
Vzorec 1	Velikocelični rak, nevroendokrini	pT2N0M0	IB	Moški	75 let
Vzorec 2	Adenokarcinom, nevroendokrini	pT1N1M0	IIA	Moški	73 let
Vzorec 3	Adenokarcinom	pT2N0M0	IB	Moški	60 let

3.4. Priprava celične suspenzije

Sveže odvzete vzorce tkiva iz nedrobnoceličnega pljučnega raka in okoliškega zdravega tkiva smo za prenos do laboratorija shranili v 25 ml osnovnega medija. Prenos smo izvedli v hladilni posodi z ledom. Centrifugirke z medijem smo stekali preden smo dodali vzorec ter po dodatku vzorca in tako z razliko mas določili maso tumorskega in zdravega tkiva.

Nadaljnje delo smo opravili v komori z laminarnim pretokom zraka. Tkivo smo v petrijevkah s skalpelom in s pomočjo pincete razrezali na približno 1 mm³ velike kose, večje preostanke pa smo nato poskusili še zmanjšati s škarpami. S tem smo tkivo nekoliko mehansko razgradili, nato pa je sledilo še encimsko razgrajevanje. Tkivu smo dodali 1670 µL osnovnega medija in odmrznili pripravljene raztopine encimov ter v vsako petrijevko dodali 200 µL raztopine kolagenaze, 30 µL raztopine hialuronidaze in 100 µL raztopine deoksiribonukleaze 1. Sledil je prenos v inkubator, kjer smo tkivo razgrajevali 2 uri pri

37°C. Vsakih 10 minut smo petrijevki nekoliko pretresli ter ob tem občasno spremljali razgradnjo tkiva s pomočjo invertnega svetlobnega mikroskopa.

Zatem smo celice in preostale nerazgrajene ostanke rakavega in zdravega tkiva s polnilno pipeto prenesli v centrifugirki ter petrijevki večkrat sprali z nekaj mililitri osnovnega medija. Vsebinsko centrifugirke smo filtrirali najprej skozi filter z velikostjo por 100 µm, nato pa še skozi 70 mikrometrsko sito. Celični suspenziji smo nato razredčili na 25 mL ter prešteli pridobljene celice s pomočjo Buerker-Tuerkove komore, svetlobnega mikroskopa in metilenskega modrila.

Glede na ocenjeno število celic smo pripravili naslednje mešanice celične suspenzije in metilenskega modrila v mikrotitrski ploščici: 20 µL celic in 180 µL raztopine metilenskega modrila, 20 µL celic in 80 µL metilenskega modrila ter 20 µL celic in 20 µL metilenskega modrila. Ob večjem številu celic smo celično suspenzijo bolj razredčili z metilenskim modrilom. Buerker-Tuerkovo komoro smo pripravili tako, da smo jo sprali z vodo, nato z alkoholom in posušili. Nato smo dodali celice v raztopini metilenskega modrila. Celice smo sešteli iz 12 kvadratkov nad osrednjim delom mreže in skrajno desnim nad temi kvadrati ter 12 pod osrednjim delom mreže, skupaj torej iz 25 polj. Število celic smo določili po enačbi:

$$N = 10000 \times 0,1 \times n \times V \times R,$$

kjer N predstavlja celotno število celic, n število preštetih celic, V je volumen celične suspenzije in R faktor redčenja z metilenskim modrilom.

Naslednji postopek je bil centrifugiranje na osnovi gradienta gostote s pomočjo raztopine fikola. Celični suspenziji smo previdno nanesti na 12,5 mL pripravljene raztopine fikola ter centrifugirali 15 minut pri 950×g, brez uporabe zavore. Na meji med tekočinama se je ustvaril beli obroč mononuklearnih celic, ki smo jih pobrali s pomočjo pasteurjeve pipete. Celice smo prenesli v novi centrifugirki, dopolnili do 50 mL s PBS ter 7 minut centrifugirali pri 400×g, da smo dobili peleton celic. Supernatant smo odlili.

3.5. Magnetna ločba CD14 pozitivnih od ostalih celic

Magnetno smo ločili celice z molekulo CD14 od preostalih celic iz celične suspenzije. Molekula CD14 je glikoprotein, ki se nahaja v serumu in ga izločajo predvsem hepatociti in adipociti, ali pa je zasidran v membrani celic. Kot membranski glikoprotein je močno izražen na večini monocitov in makrofagov, šibko pa je izražen tudi na nevtrofilcih in nekaterih mieloidnih dendritičnih celicah (33). Limfociti predstavljajo večino mononuklearnih celic, ki ne vsebujejo glikoproteina CD14. Molekula CD14 sodeluje pri nespecifičnem imunskem odzivu in je prenašalec ter receptor za bakterijske ligande, predvsem lipopolisaharidne preostanke celične stene, ki veljajo za enega najmočnejših stimulirajočih sredstev (34). CD14 Microbeads so z magnetnimi delci konjugirana protitelesa proti molekuli CD14. Z dodajanjem le teh celični suspenziji smo magnetno označili CD14 pozitivne celice in jih od preostalih ločili na koloni v magnetnem polju.

Postopek:

Celice smo ločevali po protokolu proizvajalca s pomočjo aparature Midi MACS in kolone LD. Pred samim postopkom smo pripravili fosfatni pufer z 0,5% govejega serumskega albumina. To smo dosegli z dodajanjem 0,2 mL seruma v 38,8 mL PBS. Pri pripravi raztopine se vedno poskušamo izogniti nastanku mehurčkov, ki bi lahko zavirali ločbo na koloni. Tako pripravljeni pufer smo ohladili v hladilniku na 2-8°C.

Za uspešno ločbo je bilo potrebno uporabljati predhodno ohlajene raztopine in celice med vezavo protiteles vzdrževati hladne ter s tem preprečiti nespecifično vezavo. Uporabljeni volumni so primerni za 10^7 celic za 80 µL pufra. Peleto celic, ki smo jo dobili ob koncu prejšnjega postopka smo tako resuspendirali v 80 µL pripravljenega ohlajenega fosfatnega pufra s serumom ter dodali 20 µL označenih protiteles proti CD14. Vsebinsko smo nato premešali in inkubirali 20 minut v hladilniku. Celice smo po vezavi protiteles sprali z dodatkom 1-2 mL fosfatnega pufra s serumom in centrifugiranjem 10 minut pri 400×g. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v 500 µL fosfatnega pufra s serumom.

Sledilo je ločevanje v magnetnem polju z ločevalnikom MidiMACS. Kolono smo postavili v magnetno polje in jo sprali z 2 mL fosfatnega pufra s serumom. Nato smo celično suspenzijo nanесли na kolono ter dvakrat po izpraznjenju rezervarja kolone dodali po 1 mL pripravljenega pufra ter zbirali nevezane celice. Kolono smo nato odstranili iz magnetnega

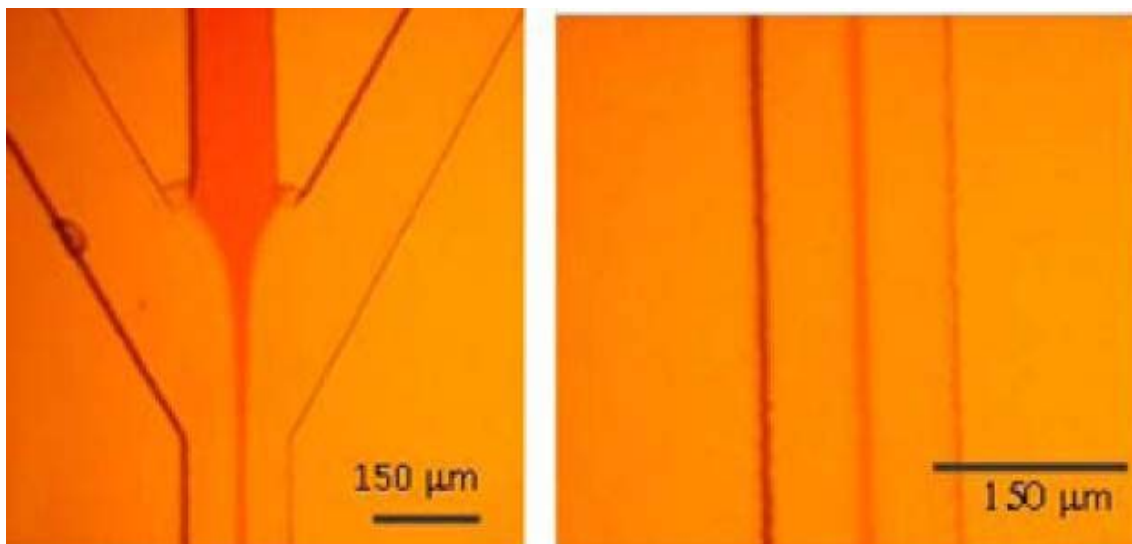
polja in nanjo nanesti 3 mL pripravljenega pufru s serumom. S pomočjo koloni priloženega batka smo iztisnili magnetno označene celice v novo centrifugirko.

Sledilo je zamrzovanje celic v mediju, ki je vseboval 10% DMSO in s tem deloval kot krioprotektant. Za celične suspenzije iz tumorskega in zdravega tkiva smo pripravili in označili krioeprovete ter jih ohladili na -20°C . Za suspenziji celic, ki sta imeli volumen 1 mL smo v centrifugirki pripravili enako količino zamrzovalnega medija z 20% DMSO, 30% seruma in 50% osnovnega medija. Vsebinsko centrifugirko z zamrzovalnim medijem in celično suspenzijo smo ohlajali 15 minut na ledeni kopeli. Po ohladitvi smo s pasteurjevo pipeto po kapljicah dodajali zamrzovalni medij k celični suspenziji ob stresanju. Celično suspenzijo smo shranili v ohlajene krioeprovete ter prenesli v zamrzovalnik na -80°C . Po 24 urah smo celice z deware-jevo posodo prenesli v tekoči dušik.

3.6. Pretočna citometrija in fluorescenčno aktivirano celično sortiranje (FACS)

Pretočna citometrija je optična metoda, ki se uporablja za štetje posameznih populacij celic. Dobljeni podatki so podobni, kot pri mikroskopiranju, le da je metoda avtomatizirana in bolj objektivna. V začetku se je uporabljala za preučevanje mikroorganizmov, danes pa je uporabna predvsem pri klinični diagnostiki in biomedicinskih raziskavah (35). Metoda temelji na tem, da celica sipa žarek svetlobe ene ali več valovnih dolžin različno in v povezavi z njenimi lastnostmi, uporabna pa je predvsem zaradi možnosti analize več tisoč celic v sekundi, katere se med postopkom ne uničijo (35, 36). Pretočni citometer je sestavljen iz tekočinskega, optičnega in računalniškega dela.

Za analizo so potrebne celice v celični suspenziji. Žarek, ki je širok 20-40 μm , je najpogostejše argonski. Ta je usmerjen v tok celic, ki skozi žarek prehajajo posamično, kar je možno zaradi hidrodinamskega fokusiranja v tekočinskem delu pretočnega citometra (36, 37). Pri tem imamo vzorec s celično suspenzijo in okoli njega hitrejšo nosilno tekočino. Zaradi površinske napetosti in laminarnega toka pride do prehoda drobnih kapljic vzorca s celicami v ozek sredinski, najhitrejši tok nosilne tekočine, kot prikazuje slika 3 (37).



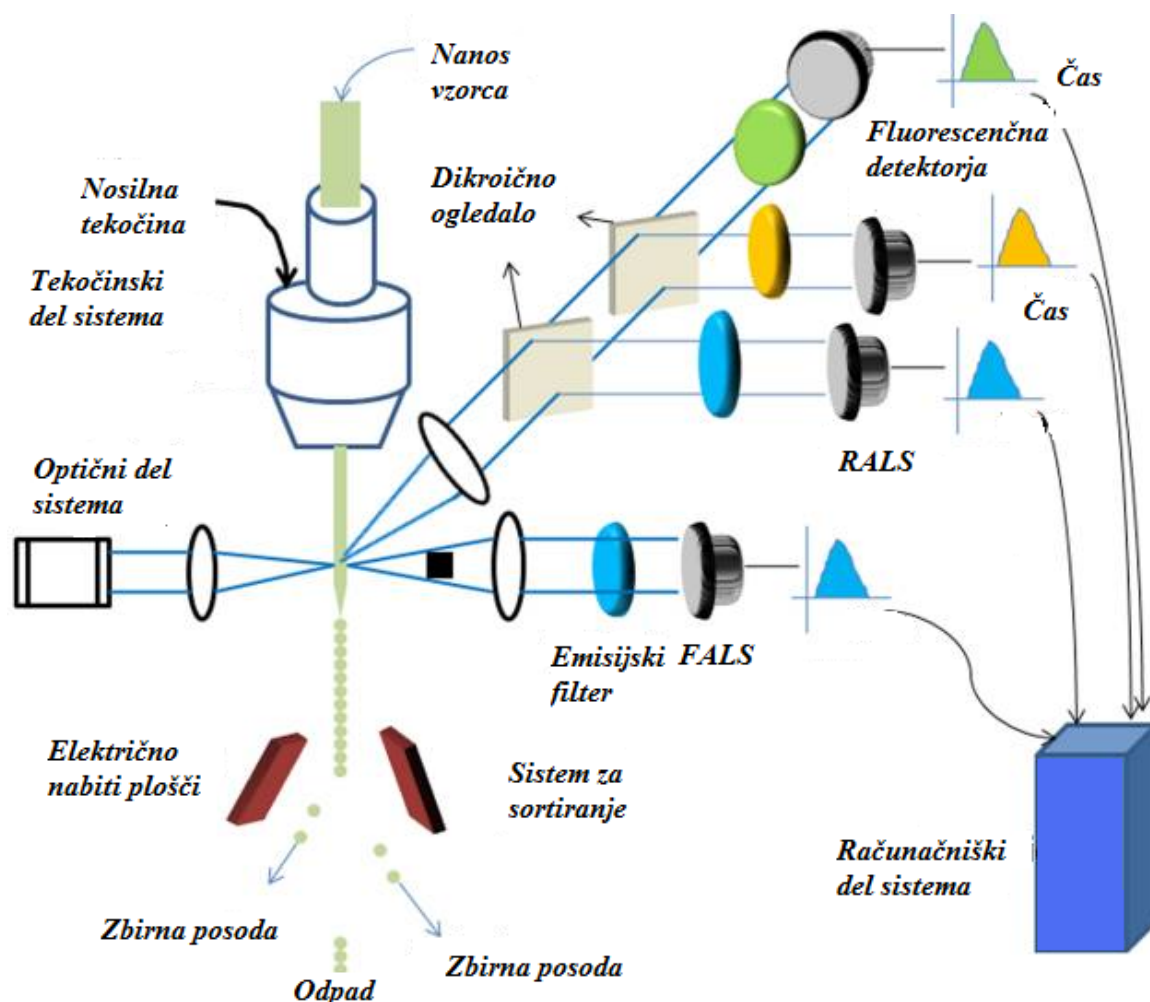
Slika 3: Prikaz prehoda vzorca v ozek tok s hidrodinamskim fokusiranjem (36).

Večina fotonov pri prehodu skozi vzorec ne spremeni svojih lastnosti, medtem ko celice ob prehodu skozi žarek nekatere razpršijo, kar merimo z dvema detektorjema v optičnem sistemu, pojav pa imenujemo sipanje. Pri sipanju merimo enako valovno dolžino, kot je obsevalna svetloba. Prvi detektor je FALS (ang. Forward Angle Light Scatter) in meri sipanje 1° - 10° od ravnine laserskega žarka, ter omogoča merjenje odbite svetlobe, oziroma prednje sipanje, kar je posledica kontakta s celičnimi membranami in je sorazmerno velikosti celice (36, 37). Drugi detektor je RALS (ang. Right Angle Light Scatter), ki se nahaja pravokotno od poti laserskega žarka. Fotoni se namreč ob stiku z jedrom in organeli celice odbijejo pravokotno, s tem pa dobimo podatek o notranji strukturi, oziroma granuliranosti celice. Večji signal tu pomeni več citoplazemskih struktur v celici. Z opisanimi detektorjema torej določimo morfološko zgradbo celice (37).

Pretočni citometer ima lahko tudi dva do štiri fluorescenčne detektorje, ki merijo svetlobo večjih valovnih dolžin od vzbujevalne. Vsak od teh meri različno valovno dolžino fluorescenčne svetlobe, ki jo oddajajo različna fluorescenčna barvila, katera s pomočjo protiteles vežemo na celice. Za fluorescenčna barvila je značilno, da absorbirajo svetlobo določene valovne dolžine in oddajajo svetlobo večje valovne dolžine. Pri uporabi večih različnih barvil je možno medsebojno prekrivanje spektrov, kar sicer lahko privede do lažno pozitivnih rezultatov, a je te z uporabo metode kompenzacije možno preprečiti. Fluorescenčni detektorji nam torej omogočajo podatke o funkcionalnih lastnostih posameznih celic (37).

Fluorescenčno aktiviran celični sorter uporablja za detekcijo zelo podobne metode kot pretočni citometer, po optični detekciji pa je omogočena še izolacija željene populacije celic v določeno posodo v sistemu za sortiranje, ki je dodan v primerjavi s pretočnim citometrom. Večina sorterjev za izolacijo uporablja metodo razbijanja celične suspenzije v drobne kapljice. Takoj za fluorescenčnim merilnim mestom je mesto sortiranja, kjer se tok celic z vibracijami razbije v kapljice, ki večinoma vsebujejo eno celico. Te se nato električno nabijejo, s tem pa jih lahko usmerjamo v željeno posodo z nabitimi električnimi ploščami, ki jim prek nadzornega sistema kontrolirano spreminjamo polariteto (36).

Pri pretočnem citometru in celičnem sorterju je zadnji sistem računalniški. Ta je odgovoren za natančno zbiranje vseh pridobljenih podatkov in njihovo organizacijo v pregledno celoto. Posamezni deli celičnega sorterja so predstavljeni na sliki 4.



Slika 4: Prikaz celičnega sorterja, pretočni citometer pa razlikuje le v tem, da ne vsebuje sistema za sortiranje (36).

Postopek:

Odmrzovanje celic:

Pred izvedbo pretočne citometrije in celičnega sortiranja smo pridobljene celice najprej morali odmrzniti. Pripravili smo 3,2 mL osnovnega medija za vsak vzorec, v katerega smo dodali še 0,8 mL seruma. Tako pripravljen medij smo nato na vodni kopeli ogreli na 37°C. Iz vsebnika za shranjevanje celic v tekočem dušiku smo vzeli zamrznjene vzorce CD14+ celic in jih odtajali, dokler ledu v krioepruveti ni bilo več opaziti. Takoj za tem smo s pasteurjevo pipeto v krioepruveto dodali del ogretega medija, premešali in del te mešanice prenesli v centrifugirko z medijem. Postopek smo ponovili dvakrat, da smo prenesli vso celično suspenzijo. Centrifugirke smo dopolnili do 50 mL z osnovnim medijem in centrifugirali 10 minut pri 400×g. Supernatant smo odlili, celice resuspendirali v 50 mL osnovnega medija in ponovno centrifugirali pri enakih pogojih. Supernatant smo znova odlili in celice resuspendirali v 1 mL osnovnega medija. Celice smo nato prešteli v Buerker-Tuerkovi komori, pri čemer pa smo določili precej nizko število celic v vseh vzorcih. Zaradi potrebe po čimvečjem številu celic pri postopkih celičnega sortiranja in fluorescenčne in situ hibridizacije (FISH), smo se odločili, da vzorec 1 rakavega tkiva izkoristimo za slednja postopka, vse ostale vzorce pa smo okarakterizirali s pretočno citometrijo. 120 µL, oziroma 12% vzorca 1 iz rakavega tkiva smo odstopili raziskovalcem za nadaljnjo analizo s fluorescenčno in situ hibridizacijo, kar smo nato tudi ustrezno upoštevali pri rezultatih, preostanek tega vzorca pa smo sortirali, z ozirom na vsebnost molekule CD204, kot je opisano v nadaljevanju.

Pretočna citometrija:

Za postopek pretočne citometrije smo odmrznjene celice vseh zdravih tkiv in rakavih vzorcev 2 in 3 centrifugirali 7 minut pri 250×g. Nato smo supernatant odlili in celice resuspendirali v 216 µL PBS. 16 µL smo odvzeli od vzorca in nanj nismo vezali označenih protiteles ter te celice uporabili za negativno kontrolo. Preostalim 200 µL smo dodali 20 µL raztopine s fikoeritrinom označenih protiteles proti CD204 in 20 µL z Alexa Fluor 488 označenih protiteles proti CD163. Raztopino smo pustili stati 30 minut v temi pri sobni temperaturi, da so se protitelesa vezala na antigene, nato pa je sledilo spiranje nevezanih protiteles. Dodali smo 3 mL PBS in znova centrifugirali 7 minut pri 250×g. Celice smo nato resuspendirali v 500 µL PBS in okarakterizirali s pretočnim citometrom.

Fluorescenčno aktivirano celično sortiranje:

Za postopek celičnega sortiranja smo odmrznjene celice iz rakavega tkiva vzorca 1 centrifugirali 7 minut pri 250×g. Nato smo supernatant odlili in celice resuspendirali v 216 µL PBS. 16 µL smo odvzeli od vzorca in nanj nismo vezali s fikoeritrinom označenih protiteles proti CD204 ter te celice uporabili za negativno kontrolo. Preostalim 200 µL smo dodali 20 µL raztopine s fikoeritrinom označenih protiteles proti CD204. Raztopino smo pustili stati 30 minut v temi pri sobni temperaturi, da so se protitelesa vezala na antigene, nato pa je sledilo spiranje nevezanih protiteles. Dodali smo 3 mL PBS in znova centrifugirali 7 minut pri 250×g. Celice smo nato resuspendirali v 500 mL PBS in okarakterizirali s celičnim sorterjem, katerega nastavitve so prikazane na sliki 5.

Sort Settings			
Sort Setup	70 micron	Phase Mask	0
Frequency	90.0	Single Cell	Off
Amplitude	21.6	Sweet Spot	On
Phase	0.00	First Drop	246
Drop Delay	49.68	Target Gap	6
Attenuation	Off	Plates Voltage	5,800
Precision	Purity	Voltage Centering	-20
Yield Mask	32	Sheath Pressure	70.00
Purity Mask	32		
Side Stream Voltage (%)			
Far Left	Left	Right	Far Right
0.00	55.00	47.00	0.00
Neighboring Drop Charge (%)			
2nd	3rd	4th	
15.00	8.00	1.00	
Acquisition Counters			
Threshold Count			3130682
Processed Events Count(evt)			3063358
Electronic Aborts Count(evt)			16640
Sort Elapsed Time(h:mm:ss)			00:14:17
Sort Counters			
	Left	Right	
Sort Rate(evt/s)	131	807	
Conflicts Count(evt)	10256	20202	
Conflicts Rate(evt/s)	11	32	
Efficiency(%)	91	96	
Sort Layout			
	Left	Right	
	P3 : 112353	P2 : 760935	

Slika 5: Nastavitve in pogoji dela aparature za celično sortiranje

3.7. Analiza rezultatov

S pretočno citometrijo smo dobili rezultate v odstotkih posameznih populacij CD14+ celic v končni celični suspenziji po odtajanju celic, s celičnim sortiranjem pa število celic CD204+ in število preostalih celic v končni celični suspenziji. Za primerjavo vzorcev med seboj smo morali izvesti ustrezno analizo pridobljenih rezultatov.

Najprej smo želeli ugotoviti, kolikšno je dejansko število celic posamezne populacije v vzorcih. Prvič smo število CD14+ celic določili že na dan odvzema vzorca, takoj po magnetnem ločevanju. S tem številom in z relativnimi vrednostmi posameznih populacij celic, ki smo jih določili z analiznima metodama, smo določili števila posameznih populacij celic v vzorcih. S tem smo izločili vpliv kasnejših postopkov na odmrtnje celic, posebno zamrzovanja, pri katerem je prišlo do velikih izgub. Ob tem smo predpostavili, da v nadaljnjih postopkih do konca analize števila celic, vse populacije ohranimo žive v enakih odstotkih. Sešteli smo tudi vse celice CD204+ in tiste, ki so CD163+ ter jih analizirali na enak način, s čimer smo se želeli izničiti medsebojni vpliv in celice s posameznim molekulskim označevalcem posamezno tudi analizirati.

Posamezni vzorci so bili količinsko precej različni, zato smo v naslednji stopnji standardizirali število celic na količinsko enoto, to je na 1 g tkiva. Predpostavili smo, da je v vsakem vzorcu približno enaka vsebnost krvi, katrana, vezivnega tkiva in drugih neceličnih snovi ter tako določili gostoto posameznih populacij celic. Izračunali smo še povprečne vrednosti števila celic tistih zdravih in rakavih tkiv, ki smo jih analizirali s pretočno citometrijo. Za vse preučevane populacije celic smo ugotovili, da so v rakavem tkivu prisotne v večjem številu, kot v zdravem, zato smo v naslednji stopnji predstavili, za kolikšen odstotek je višja gostota posameznih populacij celic v rakavem tkivu posameznega bolnika, v primerjavi z zdravim tkivom.

Želeli smo še prikazati, kolikšen je delež preučevanih populacij makrofagov med vsemi celicami, ki smo jih uspeli pridobiti iz posameznega vzorca. Število posameznih populacij makrofagov, ki smo ga ocenili pred standardizacijo, smo delili s številom vseh celic, ki smo jih prešteli po razgradnji tkiva. Tudi delež vseh preučevanih makrofagov je bil pri vseh vzorcih večji v rakavem tkivu, kot v zdravem. V nadaljevanju smo znova prikazali, za kolikšen odstotek se poveča delež posameznih populacij makrofagov v rakavem tkivu v primerjavi z zdravim.

4. Rezultati in razprava

V preglednici V so zbrani podatki o masi tkiva in o številu pridobljenih celic po njegovi razgradnji. Mase vzorca nismo mogli določiti neposredno, saj je moralo biti tkivo za ohranitev svojih lastnosti v mediju. Določili smo jo z razliko med tehtanjem centrifugirke brez vzorca, napolnjene le z osnovnim medijem, ter po dodatku vzorca v medij. Število celic v vzorcu smo določili s pomočjo Buerker-Tuerkove komore in svetlobnega mikroskopa po končani encimski razgradnji tkiva.

Preglednica V: Podatki tehtanja vzorcev, izračunana masa vzorcev in pridobljeno število celic po razgradnji tkiva iz posameznega vzorca.

	Masa centri- fugirke brez vzorca (g)	Masa centri- fugirke z vzorcem (g)	Masa vzorca (g)	Število celic po razgradnji tkiva	Število celic po razgradnji v 1 g tkiva
Vzorec 1 zdravo tkivo	38,250	39,495	1,245	95×10^6	76×10^6
Vzorec 1 rakavo tkivo	39,894	42,033	2,139	270×10^6	126×10^6
Vzorec 2 zdravo tkivo	40,140	40,944	0,804	210×10^6	260×10^6
Vzorec 2 rakavo tkivo	40,564	41,082	0,518	100×10^6	190×10^6
Vzorec 3 zdravo tkivo	38,761	39,245	0,484	233×10^6	481×10^6
Vzorec 3 rakavo tkivo	38,968	39,328	0,360	35×10^6	97×10^6

Razvidno je, da so mase vzorcev precej različne, zato smo za lažjo primerjavo rezultatov izvedli standardizacijo števila celic na 1 g tkiva. Iz dobljenega števila celic po razgradnji tkiva bi težko karkoli sklepali, saj je tudi po standardizaciji števila celic opaznih precej razlik med vzorci. Do teh lahko pride tako zaradi samih postopkov izolacije (deli tkiva se

ne razgradijo popolnoma, odmrtnje celic med postopki), lahko pa vzroki izvirajo že iz samega vzorca (prisotnost krvi in katrana v vzorcu, nekroza rakavega tkiva, različna vsebnost veziv v tkivih).

V nalogi smo bili osredotočeni na izolacijo makrofagov, zato smo celice znova prešteli po magnetnem ločevanju CD14⁺ celic od preostalih mononuklearnih celic, ki smo jih izolirali s centrifugiranjem na gradientu gostote. Ti podatki so zbrani v preglednici VI, v katero smo dodali še podatka o skupnem številu mononuklearnih celic, to je seštevek celic CD14⁺ in CD14⁻, in o končnem številu za analizo pridobljenih celic CD14⁺ po odmrzovanju. Pri vzorcu 2 je tako pri rakavem, kot tudi pri zdravem tkivu prišlo do odmrtnja večine CD14 negativnih celic, zato nismo uspeli pridobiti podatka o njihovem številu, posledično pa niti podatka o skupnem številu mononuklearnih celic v tem vzorcu. Preglednica vsebuje še podatek o preštetem številu celic v vzorcu 1 rakavega tkiva pri celičnem sortiranju, ki pa smo ga ustrezno prilagodili, saj smo skupno 20,4% celic odstopili za nadaljnje analize, ali pa jih uporabili za kontrolo pri celičnem sortiranju.

Približno polovico vseh mononuklearnih celic smo ocenili kot CD14⁺, le pri zdravem tkivu tretjega vzorca je delež teh celic nekoliko nižji. Iz preglednic je razvidno, da je pri tumorskem tkivu preživetje pri vseh treh vzorcih okoli 20%, medtem ko pri zdravem tkivu narašča od vzorca 1 proti vzorcu 3. To je verjetno posledica poteka odtajanja, saj smo odtajali najprej vzorca 1, na koncu pa vzorca 3. Sam proces odtajanja je potekal dlje od štetja celic, ki smo ga izvedli naenkrat, po odtajanju vseh vzorcev. Odmiranje celic je potekalo tudi po štetju celic pri vseh vzorcih, kar vidimo iz kasnejših rezultatov celičnega sortiranja in pretočne citometrije, čeprav je bila to deloma tudi posledica dodatnih postopkov, ki jih je priprava nadaljnjih vzorcev zahtevala. Iz preglednic lahko opazimo tudi večje preživetje celic iz zdravega tkiva, kot tistih iz tumorskega. Predvsem je ta razlika opazna pri vzorcih 2 in 3. Možno je, da bi tumor lahko spremenil izražanje nekaterih genov v makrofagih, ki bi lahko vplivali na hitrejšo smrt po procesu zamrzovanja in odtajanja. Iz podatkov sklepamo, da je proces odmiranja celic CD14⁺ po zamrzovanju nekoliko počasnejši pri celicah iz zdravega tkiva, kot pri tistih iz tumorskega, a je končni delež preživelih celic verjetno primerljiv, kar nakazujejo tudi rezultati pretočne citometrije.

Preglednica VI: Števila in v oklepaju odstotki populacij mononuklearnih celic po magnetni ločbi, glede na molekulo CD14 ter za analizo uporabna števila celic CD14+ po odmrzovanju z odstotki preživelih celic v oklepaju.

Tkivo	Skupno število mono- nuklearnih celic	Število celic CD14+ in njihov delež med mononuklearnimi celicami v oklepaju	Število celic CD14- in njihov delež med mononuklearnimi celicami v oklepaju	Število celic CD14+ po odmrzovanju
Vzorec 1 rakavo tkivo	23.100.000	10.100.000 (43,7%)	13.000.000 (56,3%)	2.260.000, pri celičnem sortiranju pa smo jih prešteli 1.120.748 (22,4%)
Vzorec 1 zdravo tkivo	1.300.000	620.000 (48%)	680.000 (52%)	140.000 (23%)
Vzorec 2 rakavo tkivo	/	2.200.000	/	360.000 (16%)
Vzorec 2 zdravo tkivo	/	780.000	/	280.000 (36%)
Vzorec 3 rakavo tkivo	4.540.000	2.160.000 (47,6%)	2.380.000 (52,4%)	480.000 (22%)
Vzorec 3 zdravo tkivo	3.020.000	880.000 (29%)	2.140.000 (70,8%)	820.000 (93%)

V preglednici VII smo nato standardizirali podatke iz preglednice VI v število celic na 1 g tkiva, s čimer smo določili gostoto posameznih populacij celic v tkivu. Pri standardizaciji smo upoštevali tudi poskus adheriranja celic na plastiko pri tumorskem in zdravem tkivu

vzorca 1, za kar smo porabili polovico celic iz teh vzorcev in zato v izračunu uporabili polovico dejanske mase teh tkiv. Pri vseh vzorcih je opazno zvišano število vseh mononuklearnih celic v rakavem tkivu v primerjavi z zdravim. To je tudi pričakovano zaradi vnetnega procesa in posledično kemotaktičnih dejavnikov, ki so prisotni pri kancerogenezi. Ne moremo pa iz teh podatkov določiti porasta ali znižanja deleža CD14+ ali CD14- celic v zdravem ali rakavem tkivu.

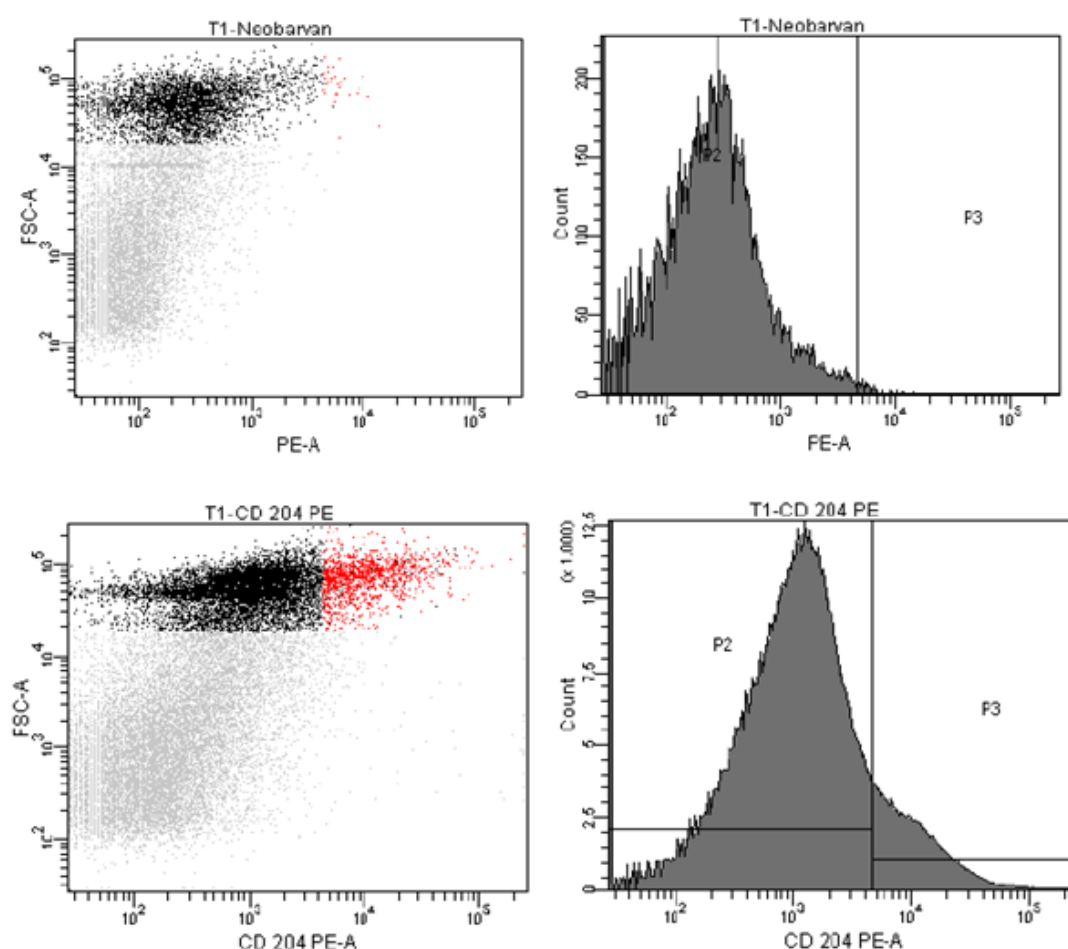
Preglednica VII: Na 1 g tkiva standardizirana števila celic iz preglednice VI.

Tkivo	Skupno število mononuklearnih celic v 1 g tkiva	Število celic CD14+ v 1 g tkiva	Število celic CD14- v 1 g tkiva	Število celic CD14+ po odmrzovanju v 1 g tkiva
Vzorec 1 rakavo tkivo	21.600.000	9.440.000	12.200.000	2.100.000
Vzorec 1 zdravo tkivo	2.100.000	1.000.000	1.100.000	220.000
Vzorec 2 rakavo tkivo	/	4.200.000	/	700.000
Vzorec 2 zdravo tkivo	/	970.000	/	350.000
Vzorec 3 rakavo tkivo	12.60.000	6.000.000	6.610.000	1.300.000
Vzorec 3 zdravo tkivo	6.200.000	1.800.000	4.420.000	1.700.000

Naslednje, kar nas je zanimalo, so posamezne populacije makrofagov v rakavem in zdravem tkivu, oziroma vsebnost molekul CD163 in CD204. To smo preverili s celičnim sortiranjem in pretočno citometrijo. Rezultati celičnega sortiranja so prikazani v grafični in številčni obliki na slikah 6 in 7, pretočne citometrije pa na sliki 8.

S celičnim sortiranjem smo ugotavljali zgolj prisotnost molekule CD204, analizirali pa smo rakavo tkivo iz vzorca 1. Pri grafičnem prikazu sta zgoraj sliki kontrolnega, neobarvanega poskusa, spodaj pa celice z dodanimi protitelesi s fluorescenčnim barvilom.

Levi sliki prikazujeta velikost posamezne celice in jakost fluorescence. Pri neobarvanih celicah skoraj ni opaziti celic s fluorescenco, spodaj pa na obeh slikah opazimo še ogromno delcev, ki niso celice, saj so manjši in smo jih zasenčili. Najverjetneje gre za odmrle celice in ostanke razpadlih celic, nekaj pa je verjetno tudi ostankov magnetnih delcev, ki smo jih uporabili pri magnetni ločbi. Desni sliki prikazujeta število celic v odvisnosti od jakosti fluorescence. Na spodnji sliki je opazna prisotnost dveh vrhov (CD204+ in CD204-), kar se vidi kot rama in dokazuje prisotnost CD204 pozitivnih celic. Na tej podlagi smo določili mejo med posameznima populacijama celic. Meja je označena z navpično črto, na levih slikah pa so CD204+ celice obarvane.



Slika 6: Grafični rezultati celičnega sortiranja.

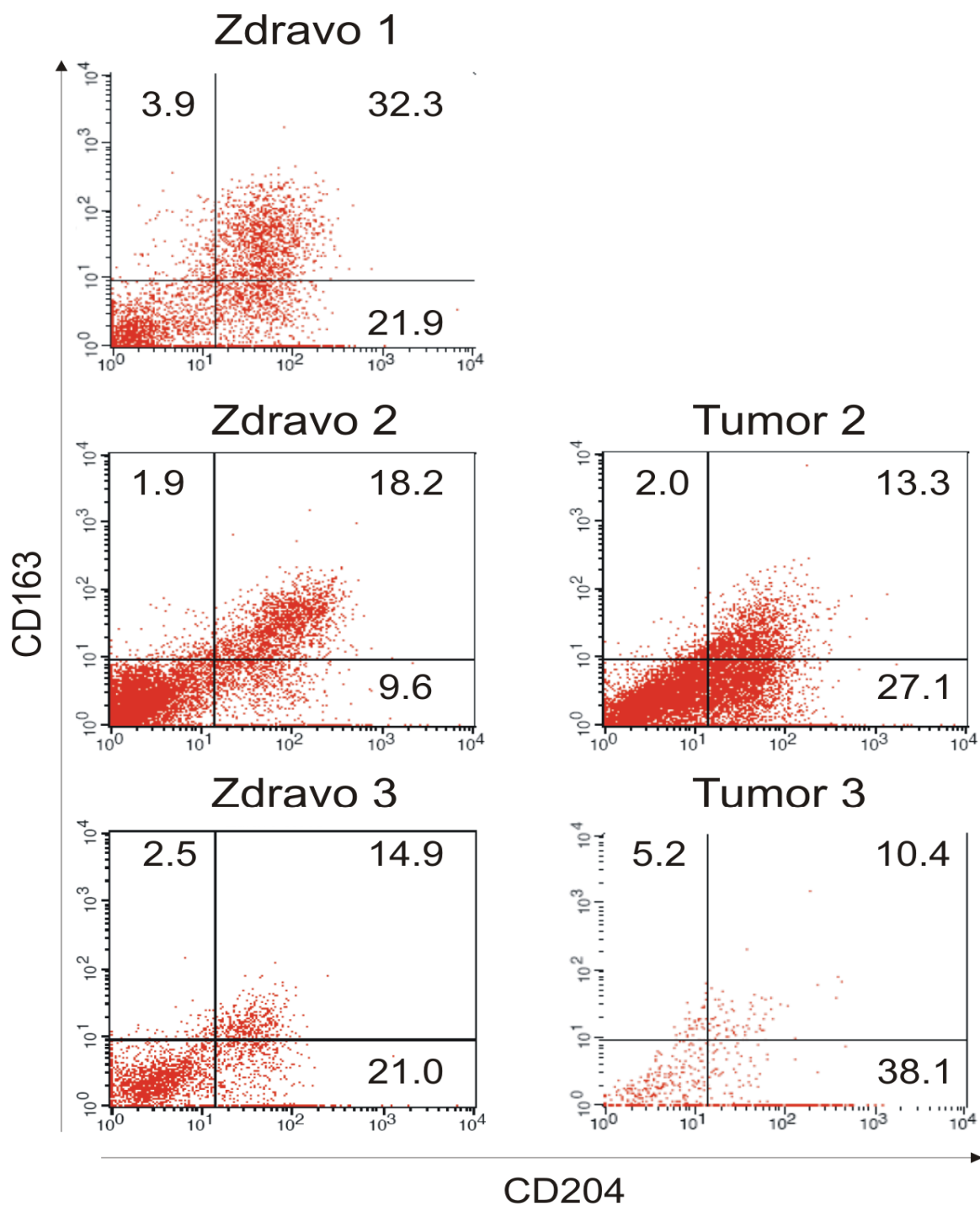
Na sliki 7 smo predstavili še številčne rezultate celičnega sortiranja. Na levi strani je neobarvan, slepi vzorec, desni pa je obarvan in vsebuje rezultate našega vzorca. Zaznane

celice so označene s P1, te pa so nato razdeljene na obarvane s fikoeritrinom pod oznako P3 in neobarvane pod oznako P2.

Tube: Neobarvan				Tube: CD 204 PE			
Population	#Events	%Parent	%Total	Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	60,114	###	100.0	All Events	3,105,029	###	100.0
P1	13,305	22.1	22.1	P1	913,202	29.4	29.4
P2	13,216	99.3	22.0	P2	787,844	86.3	25.4
P3	89	0.7	0.1	P3	125,358	13.7	4.0
Experiment Name: 13092012 - makrofagi Specimen Name: T1 Tube Name: Neobarvan Record Date: Sep 13, 2012 3:42:51 PM \$OP: nneratnr GUID: d1049f5e-4cfd-4998-9cdf-d5c64cc1f310				Experiment Name: 13092012 - makrofagi Specimen Name: T1 Tube Name: CD 204 PE Record Date: Sep 13, 2012 4:03:49 PM \$OP: operator GUID: 916ae7bc-02e7-4b03-99b0-16632ba43b67			
Population	#Events	%Parent		Population	#Events	%Parent	
P1	13,305	22.1		P1	913,202	29.4	
P2	13,216	99.3		P2	787,844	86.3	
P3	89	0.7		P3	125,358	13.7	

Slika 7: Številčni rezultati celičnega sortiranja.

Pri pretočni citometriji smo dobili rezultate o posameznih populacijah celic v odstotkih, vrednotili pa smo obe molekuli, CD163 in CD204. Na abscisah so prikazane jakosti fluorescenčnega signala za fikoeritrin, s katerim so označena protitelesa proti CD204, na ordinati pa za Alexa Fluor 488, s katerim so označena protitelesa proti CD163. Skala je tako kot pri celičnem sortiranju logaritemska, točke na grafih pa predstavljajo posamezne celice.



Slika 8: Rezultati analize s pretočno citometrijo.

Rezultate pretočne citometrije in celičnega sortiranja smo zbrali v preglednici VIII. Zaradi drugačne metode analize, ki je potekala tudi pri drugačnih pogojih ter v drugem laboratoriju, rezultatov vzorca 1 rakavega tkiva, ki so bili narejeni s celičnim sortiranjem in ostalih vzorcev, ki smo jih analizirali s pretočno citometrijo, ne moremo primerjati med seboj in so podani le za lažjo in popolnejšo predstavo o delu. V tej in naslednjih

preglednicah so zaradi tega rezultati, pridobljeni s celičnim sortiranjem, označeni z zvezdico (*) in napisani v poševnem tisku.

V preglednici smo, v primerjavi s sliko, dodali še odstotke celic, ki so negativne na obe molekuli, CD163 in CD204, sešteli pa smo tudi vse celice, ki vsebujejo molekulo CD204 in tiste, ki vsebujejo CD163, s čimer smo pridobili možnost nadaljnje analize celic neodvisno od druge molekule.

Preglednica VIII: Podatki o odstotkih celic z vsebnostjo molekul CD163 in CD204, pridobljeni s pretočno citometrijo in s celičnim sortiranjem.

Tkivo (masa tkiva)	CD204+, CD163+	CD204+, CD163-	CD204+	CD163+	CD163+, CD204-	Preostale celice CD14+
<i>Vzorec 1</i> <i>rakavo</i> <i>tkivo*</i>		13,7 %*			86,3 %*	
Vzorec 1 zdravo tkivo	32,3%	21,9%	54,2 %	36,2%	3,9%	41,9 %
Vzorec 2 rakavo tkivo	13,3 %	27,1%	40,4 %	15,3 %	2,0%	57,6 %
Vzorec 2 zdravo tkivo	18,2 %	9,6%	27,8 %	20,1 %	1,9%	70,3 %
Vzorec 3 rakavo tkivo	10,4 %	38,1%	48,5 %	15,6 %	5,2%	46,3 %
Vzorec 3 zdravo tkivo	14,9 %	21,0%	35,9 %	17,4 %	2,5%	61,6 %

*vrednoteno s celičnim sortiranjem

Opazimo lahko, da je relativno gledano, v zdravem tkivu večje število celic, ki so CD163- in CD204- in bi lahko bile M1 makrofagi, kar je v pričakovanju z našimi začetnimi predvidevanji, saj naj bi tumor usmerjal makrofage v fenotip M2. Pri vzorcu 1 zdravega tkiva je sicer opazno precejšnje odstopanje na obe molekuli negativnih makrofagov v primerjavi z ostalimi zdravimi vzorci, za kar je morda odgovorna poškodba tkiva, ki tudi privede do polarizacije makrofagov proti M2. Prav tako bi lahko bil vzrok kajenje pri pacientih 2 in 3, saj to zvišuje bazalne vrednosti TNF- α in IL-1, ki usmerjata makrofage v fenotip M1 (38). Vzrok bi lahko bil tudi fiziološka prisotnost 2 vrst makrofagov že v zdravih pljučih, alveolarnih in intersticijskih, ki izražajo različne količine posameznih citokinov. Alveolarni makrofagi izločajo večje količine vnetnih citokinov, intersticijski pa proizvedejo večje količine IL-10, značilnih za M2 fenotip (38). Pri posameznih vzorcih zdravega tkiva bi lahko imeli različne deleže posameznih podtipov makrofagov, kar privede do razlik v analizi. Nepričakovano je večji delež celic v zdravem tkivu tudi pri populaciji celic CD163+ in CD204+, ki naj bi bili M2 makrofagi. Celic, ki so CD163+ in CD204-, je relativno približno enako v obeh vrstah tkiv, medtem ko je povsod mogoče opaziti večji delež celic CD204+ in CD163- v rakavem tkivu. Pri analizi molekulskih označevalcev CD163 in CD204 posamezno je razvidno, da je delež celic z molekulo CD163 primerljiv v zdravem in rakavem tkivu, delež celic z molekulo CD204 pa je večji v rakavem tkivu. Potrebno je poudariti, da so to relativne vrednosti, absolutno pa je še vedno večja gostota celic vseh preučevanih populacij v rakavem tkivu, kar je razvidno iz nadaljnje analize.

Podatke iz preglednice VIII smo nato uporabili za oceno števila celic posameznih populacij v tkivu, izračunano število pa je podano v preglednici IX. Poleg zgornje preglednice smo uporabili podatke o številu CD14+ celic po magnetni ločbi. S tem smo določili števila celic v istem dnevu, ko je bil vzorec odvzet in se izognili predvsem vplivu procesov zamrzovanja in odtajanja celic, ki je privedel k precejšnjim razlikam v oceni preživetja celic med vzorci. Pri računanju smo predpostavili, da je preživetje celic po zamrzovanju in odtajanju enako pri vseh populacijah.

Preglednica IX: Števila celic z vsebnostjo molekul CD204 in CD163.

Tkivo	CD204+, CD163+	CD204+, CD163-	CD204+	CD163+	CD163+, CD204-	Preostale celice CD14+
Vzorec 1 rakavo tkivo*	1.380.000*			8.720.000*		
Vzorec 1 zdravo tkivo	200.000	136.000	336.000	220.000	24.000	260.000
Vzorec 2 rakavo tkivo	290.000	600.000	890.000	330.000	44.000	1.300.000
Vzorec 2 zdravo tkivo	140.000	75.000	220.000	160.000	15.000	550.000
Vzorec 3 rakavo tkivo	225.000	823.000	1.050.000	337.000	112.000	1.000.000
Vzorec 3 zdravo tkivo	130.000	180.000	310.000	150.000	22.000	540.000

*vrednoteno s celičnim sortiranjem

Zaradi primerjave vzorcev med seboj smo se odločili, da bomo standardizirali rezultate in ugotovili števila celic v 1 g tkiva za posamezni vzorec ter te podatke primerjali med seboj. Na ta način smo želeli zmanjšati vpliv različnih mas vzorcev. V preglednici X smo zato iz preglednice IX in ugotovljenih mas vzorcev izračunali števila posameznih populacij celic, ki se nahajajo v 1 g tkiva. Pri vzorcu 1 smo pri rakavem in zdravem tkivu uporabili polovico celic pri poskusu njihovega adheriranja na plastiko, zato smo pri računanju upoštevali le polovico dejanske mase vzorca. Na konec preglednice smo dodali še povprečne vrednosti vzorcev zdravega in rakavega tkiva, ki smo jih analizirali s pretočno citometrijo. Tako smo skušali omejiti vpliv procesov med izolacijo, čeprav je bilo vzorcev

veliko premalo, da bi nam to povsem uspelo. Rakavega tkiva vzorca 1 pri povprečju nismo upoštevali zaradi drugačne metode analize in posledično neprimerljivih rezultatov.

Preglednica X: Na 1 g tkiva standardizirana števila preučevanih makrofagov.

Tkivo	CD204+, CD163+	CD204+, CD163-	CD204+	CD163+	CD163+, CD204-	Preostale celice CD14+
Vzorec 1 rakavo tkivo*		1.290.000*			8.150.000*	
Vzorec 1 zdravo tkivo	321.000	218.000	539.000	360.000	39.000	418.000
Vzorec 2 rakavo tkivo	560.000	1.200.000	1.800.000	650.000	85.000	2.500.000
Vzorec 2 zdravo tkivo	170.000	93.000	260.000	190.000	19.000	684.000
Vzorec 3 rakavo tkivo	625.000	2.290.000	2.920.000	936.000	311.000	2.780.000
Vzorec 3 zdravo tkivo	270.000	370.000	640.000	320.000	45.000	1.100.000
Povprečna vrednost vzorcev 2 in 3 rakavega tkiva	590.000	1.700.000	2.360.000	790.000	200.000	2.600.000
Povprečje zdravih tkiv	250.000	230.000	480.000	290.000	34.000	730.000

*vrednoteno s celičnim sortiranjem

Iz preglednice X je razvidno, da je pri vseh preučevanih populacijah v 1 g tkiva več celic v rakavem, kot v zdravem tkivu. V preglednici XI smo dalje primerjali vzorce zdravega in rakavega tkiva istega bolnika. Navedene vrednosti predstavljajo odstotek posameznih populacij CD14+ celic rakavega tkiva v primerjavi z zdravim in smo jih izračunali tako, da smo delili število posamezne populacije celic v 1 g rakavega tkiva s številom celic enake populacije v 1 g zdravega tkiva. Na enak način smo obravnavali tudi povprečne vrednosti. V preglednici XI smo podali vrednosti za vzorec 1 zgolj zaradi preglednosti, saj imamo le podatek o številu CD204 pozitivnih celic, a smo tudi tega dobili z drugačnim in neprimerljivim postopkom.

Preglednica XI: V odstotkih izražena povišana gostota posameznih populacij celic v rakavem tkivu, glede na zdravo tkivo.

Vzorec	CD204+, CD163+	CD204+, CD163-	CD204+	CD163+	CD163+, CD204-	Preostale celice CD14+
1*	239%*			1000%*		
2	330%	1300%	690%	340%	450%	370%
3	230%	619%	460%	290%	580%	250%
Povprečne vrednosti	240%	740%	490%	270%	590%	360%

*vrednoteno s celičnim sortiranjem

Pri vseh populacijah celic je opazno vsaj dvakratno povečanje števila celic CD14+ v rakavem tkivu, še najbolj pa je to izrazito pri celicah CD204+, CD163-, katerih gostota je v povprečju 7,4-krat večja v rakavem tkivu, kot v zdravem, pri vzorcu 2 pa kar trinajstkrat. V nekoliko večjem obsegu se poveča tudi število celic CD163+, CD204-. Zanimivo pa je, da je število celic z obema prisotnima molekulskima označevalcema, CD163 in CD204, doseglo celo nekoliko manjše povečanje, kot je povečanje števila celic CD14+, ki nimajo nobene od teh molekul.

Pri spremljanju vsebnosti molekul CD163 in CD204 posamezno smo dobili podobne rezultate. Obe populaciji makrofagov imata večjo gostoto celic v rakavem tkivu v primerjavi z zdravim. A medtem, ko je gostota celic z molekuljo CD204 izrazito višja od

preostalih populacij, pri celicah CD163+ tega ni opaziti, oziroma je pri naših vzorcih celo nekoliko manjše povišanje od celic, ki ne vsebujejo nobene od preučevanih molekul.

Preglednica XII: Odstotki posameznih populacij celic v celični suspenziji po razgradnji tkiva.

Tkivo (masa tkiva)	CD204+, CD163+	CD204+, CD163-	CD204+	CD163+	CD163+, CD204-	Preostale celice CD14+
Vzorec 1 rakavo tkivo*		1,02%*			6,46%*	
Vzorec 1 zdravo tkivo	0,42%	0,29%	0,71%	0,46%	0,051%	0,55%
Vzorec 2 rakavo tkivo	0,29%	0,60%	0,89%	0,33%	0,044%	1,3%
Vzorec 2 zdravo tkivo	0,067%	0,036%	0,10%	0,076%	0,0071%	0,26%
Vzorec 3 rakavo tkivo	0,64%	2,35%	3,0%	0,96%	0,320%	2,9%
Vzorec 3 zdravo tkivo	0,056%	0,077%	0,13%	0,064%	0,0094%	0,23%
Povprečna vrednost vzorcev 2 in 3 rakavega tkiva	0,47%	1,5%	1,9%	0,65%	0,18%	2,1%
Povprečna vrednost zdravih tkiv	0,18%	0,13%	0,31%	0,20%	0,023%	0,35%

*vrednoteno s celičnim sortiranjem

S pomočjo števila celic po razgradnji tkiva (preglednica V) in s preglednico IX smo izračunali delež posameznih populacij celic v tkivu ter jih zbrali v preglednici XII.

Rezultate lahko primerjamo med seboj, saj smo uporabili enake postopke izolacije celic, a pri tem moramo tako pridobljene rezultate uporabljati pazljivo in upoštevati možne vzroke za razlike, saj vsak postopek uniči različno število celic v posameznem vzorcu, kar je poleg postopka odvisno tudi od stanja celic pred odstranitvijo tkiva.

Pri pregledu preglednice je opazna predvsem podobnost podatkov za zdravo tkivo pri vzorcu 2 in 3, medtem ko je pri vzorcu 1 zdravega tkiva precej večji delež pozitivnih celic pri vseh populacijah, kar precej vpliva tudi na povprečne vrednosti zdravih tkiv. Pri rakavem tkivu vzorca 3 je delež vseh preučevanih populacij za približno trikrat večji od vzorca 2. Vzrok za to bi lahko bila razlika pri preživetju celic med procesom izolacije, še bolj verjetno pa je vzrok razlika v velikosti raka, saj je tumor iz vzorca 3 po TNM klasifikaciji večji od tumorja iz vzorca 2, zaradi česar je najverjetneje starejši in je uspel privedi večje število makrofagov.

Tudi v tej preglednici je mogoče opaziti, da je pri vseh populacijah delež makrofagov večji v rakavem, kot zdravem tkivu pri istem bolniku. V preglednici XIII smo tako znova primerjali vzorce zdravega in rakavega tkiva istega pacienta. Navedene vrednosti predstavljajo odstotek porasta posameznih deležev populacij CD14+ celic rakavega tkiva, v primerjavi z zdravim in smo jih izračunali tako, da smo delili delež posamezne populacije celic rakavega tkiva z deležem celic iste populacije zdravega tkiva pri istem pacientu. Na enak način smo obravnavali tudi povprečne vrednosti.

Preglednica XIII: V odstotkih izražen porast relativne vrednosti posameznih populacij celic v rakavem tkivu, glede na zdravo tkivo.

Vzorec	CD204+, CD163+	CD204+, CD163-	CD204+	CD163+	CD163+, CD204-	Preostale celice CD14+
1*	140%*			640%*		
2	430%	1700%	890%	430%	620%	500%
3	1100%	3100%	2300%	1500%	3400%	1200%
Povprečne vrednosti	260%	1200%	610%	330%	780%	600%

*vrednoteno s celičnim sortiranjem

Tako kot pri primerjavi števila celic, je tudi pri deležu celic opazen večji porast pri celicah CD163+, CD204- in CD204+, CD163-, kot pri preostalih makrofagih, pri celicah z obema molekulama pa je porast znova manjši, kot pri makrofagih brez prisotnih preučevanih molekul. Prav tako je opazno povišanje deleža celic z molekuljo CD204 v rakavem tkivu, medtem ko CD163+ celice niso prisotne v večjem deležu, kot celice brez preučevanih molekul. Pri povprečnih vrednostih je v tej preglednici precej odstopanja v primerjavi z ostalimi rezultati, kar je predvsem zaradi zdravega tkiva vzorca 1, ki se precej razlikuje od preostalih dveh zdravih tkiv, možni vzroki pa so že opisani zgoraj. Tu bi bilo zanimivo primerjati tkivi iz vzorca 1, saj je ta vzorec drugačen histološki tip tumorja od preostalih dveh, a zaradi različnih postopkov analize tega ne moremo.

Naša začetna hipoteza se je glasila, da je v rakavem tkivu večja gostota in delež takšnih makrofagov, ki močneje izražajo CD163 in CD204, kot v okoliškem zdravem tkivu, rezultati pa nakazujejo, da bi oboje lahko držalo le za CD204+ makrofage. Za potrditev bi potrebovali večje število vzorcev za izvedbo statistične analize. Pri makrofagih z molekuljo CD163+ ali istočasno obeh prisotnih molekulah (populacija CD163+, CD204+) rezultati nakazujejo večjo gostoto v rakavem tkivu, kot v zdravem, vendar se ne poveča delež teh celic med makrofagi, če rakavo primerjamo z zdravim tkivom. Izrazitejše povečanje gostote in deleža opazimo tudi pri populacijah celic CD204+, CD163- in CD163+, CD204-. Trenutno še ne poznamo posebne vloge teh dveh populacij, a prvo zajamemo tudi v primeru, če spremljamo samo celice CD204+, druga pa se v naših vzorcih pojavlja v zelo nizkem številu.

V kombinaciji z novejšimi odkritji lahko ugotovimo, da je molekula CD204 boljši označevalec makrofagov M2 od CD163. Pri raziskavi na adenokarcinomu so namreč ugotovili, da je preživetje bolnikov precej krajše v skupini z visokim deležem makrofagov CD204+, medtem ko količina CD68+, ki je splošen označevalec makrofagov, nima tako visoke napovedne vrednosti. Število CD204+ makrofagov prav tako sovпада s stadijem tumorja in izražanjem IL-10 in CCL2, ki polarizirata makrofage v fenotip M2. V isti raziskavi so sicer tudi v posameznih podtipih adenokarcinoma ugotovili odkrili precej razlik tako pri količini celic CD68+, kot tudi celic CD204+, ki označujejo M2 makrofage (39). Študija na nedrobnoceličnem pljučnem raku ni pokazala povezave med številom CD163+ makrofagov in preživetjem pacientov, medtem ko so pri večjem številu M1 makrofagov v tumorju ugotovili daljše preživetje pacientov (40). Pri raziskavi na pacientih

z luskavico pa so ugotovili, da obstaja podpopulacija CD163+ makrofagov, ki so jo zaradi izločanja molekul IL-12, IL-23, TNF in reaktivnih dušikovih intermediatov, značilnih za M1 fenotip, določili celo kot klasično aktivirane makrofage (41).

Študija na nedrobnoceličnem pljučnem raku je pokazala večjo aktivnost lipoproteinske lipaze (LPL) v rakavem tkivu, kot v zdravem pljučnem tkivu, visoka aktivnost LPL v tumorskem tkivu pa je neodvisen napovednik za krajše preživetje pacientov (42). Makrofagi sodijo med celice, ki pomembno izražajo LPL (43). Nadaljnja analiza LPL mRNA je privedla do ugotovitve, da je izražanje v tumorskih in zdravih celicah bazalno, da pa so v tumorju prisotni makrofagi, ki visoko izražajo LPL mRNA in niso prisotni v zdravem tkivu. Predpostavljeno je, da so te celice M2 makrofagi, saj ostali makrofagi iz tumorskega in okoliškega tkiva ne izražajo tako veliko LPL mRNA (44). Rakave celice pogosto potrebujejo vir energije v obliki maščobnih kislin za svoje napredovanje. Za njihov privzem sta potrebna encima LPL ter translokaza maščobnih kislin (CD36), ki je kanal na membrani celice. CD36 se mora nujno izražati na tumorskih celicah, medtem ko se LPL lahko izraža tudi v nemalignih celicah v tumorskem mikrookolju (45). Višje izražanje LPL je največkrat povezano s hitrejšo in agresivnejšo rastjo tumorja, pri kronični limfocitni levkemiji pa celo velja za najboljši napovedni označevalec preživetja (46). Pri raku dojke in pri sarkomu so v večini primerov ugotovili izražanje CD36, medtem ko le redke celične linije močno izražajo gen za LPL. Pri raku prostate tumorske celice tudi nizko izražajo LPL mRNA, čeprav je tumor zelo lipogen. Z imunohistokemijsko analizo so kljub temu ugotovili precejšnjo prisotnost LPL v tumorju (45).

Prav tako bi lahko LPL vplivala na druge celice v tumorju. V dendritičnih celicah so pri miših in ljudeh z mnogimi vrstami tumorjev odkrili izrazito povišane količine lipidov, predvsem trigliceridov, ki so plazemskega izvora. Za povečan privzem lipidov je ugotovljeno, da je odgovorna predvsem molekula CD204. Take celice niso sposobne učinkovito stimulirati limfocitov T in predstavljati tumorskih antigenov, s farmakološkim znižanjem količine lipidov v celicah, pa se je funkcionalnost dendritičnih celic povrnila (47). Po uspešnem utišanju gena za CD204 na dendritičnih celicah so opazili tudi boljše delovanje cepiva proti melanomu z večjo infiltracijo citotoksičnih limfocitov in celic ubijalk ter večjo količino efektorskih v primerjavi z regulatornimi celicami T (48).

V nadaljnjih analizah na izoliranih celicah, predvsem tistih CD204+, ki smo jih izolirali s celičnim sortiranjem, bi bilo zanimivo preveriti, če izražajo LPL mRNA in kolikšna je ta količina. Prav tako bi lahko preverili, če je v izoliranih celicah povečana količina lipidov, tako kot pri dendritičnih celicah. Če bi se izkazalo, da je v celicah CD204+ večja količina lipidov, bi lahko poskusili to količino znižati ali pa blokirati glikoprotein CD204 in preveriti, če bi že to uspelo usmeriti makrofage proti fenotipu M1.

Kot je v namenu dela zapisano, smo poskusili tudi dva alternativna postopka pri izolaciji celic, ki pa sta dajala slabše rezultate od uporabljenih in opisanih. Tkivo smo poskusili razgrajevati z avtomatizirano metodo, makrofage pa smo skušali adherirati na plastiko in jih tako ločiti od preostalih celic.

Za avtomatizirano razgrajevanje smo uporabili aparaturu gentleMACS Dissociator. Poleg aparature je potrebno imeti za posamezna tkiva tudi posebne encime in programe za razgradnjo tkiva, ki jih dobavlja proizvajalec aparature. Razpoložljive smo imeli le encime za razgradnjo možganskega tkiva (MACS Neural Tissue Dissociation Kit), med programi naprave pa je bil poleg razgradnje možganskega tkiva na voljo še program za pljuča, manjkalo pa je program za razgradnjo tumorjev. Kljub temu smo metodo preizkusili.

Zaradi majhnosti vzorca smo izvedli le avtomatizirano razgradnjo. 3500 μ L raztopine encima 1 in 400 μ L raztopine encima 2 smo segreli na sobno temperaturo in jima dodali tkivo. Nato smo tkivo vstavili v aparaturu in uporabili program 1 za razgradnjo možganskega tkiva ter inkubirali 15 minut pri 37°C. Sledilo je dodajanje 40 μ L raztopine encima 3 in 20 μ L raztopine encima 4. Tkivo smo znova vstavili v aparaturu in izbrali program 2 za možgansko tkivo. Ker ni bilo nikakršne spremembe v vzorcu in je tkivo izgledalo še popolnoma nerazgrajeno, smo uporabili še program za razgrajanje pljuč številka 2. Ta program je bil dosti bolj agresiven, kar se je poznalo predvsem na zdravem tkivu, medtem ko je tumorsko ostalo na izgled še skoraj popolnoma nerazgrajeno. Tkivi smo ponovno inkubirali 10 minut pri 37°C. V želji, da bi bolje razgradili tkivo in pridobili več celic, smo še enkrat ponovili program 2 za razgradnjo pljuč ter sledečo inkubacijo. Sledilo je filtriranje skozi 70 μ m filter. Zatem smo nanесли suspenziji celic na fikol in centrifugirali pri 950×g 15 minut, a po tem postopku nismo več zaznali celic v vzorcu zdravega tkiva, v tumorskem pa jih je bilo izredno malo. Poskusili smo jih adherirati na plastiko v gojilni

plastenki v inkubatorju pri 37°C, a po 1 dnevu ni bilo opazne adherence, zato smo tudi ta vzorec zavrgli.

Potrebno bi bilo pridobiti encime za razgradnjo rakavega in pljučnega tkiva ter program za razgradnjo rakavega tkiva na aparaturi, kar bi najverjetneje privedlo do precej boljših rezultatov. Te bi nato lahko primerjali s klasično metodo, ki smo jo v nalogi uporabili, a smo ravno zaradi solidnih rezultatov razgrajevanja s klasično metodo delo s to aparaturo opustili.

Makrofage uvrščamo med adherentne celice, kar pomeni da se ob stiku s plastiko lahko nanjo adherirajo. Pri vzorcu 1 smo znova poskusili adherirati makrofage na plastiko, tokrat s precej večjim številom celic. Polovico celic iz celičnih suspenzij zdravega in rakavega tkiva smo prenesli v gojilno plastenko in inkubirali 90 minut pri 37°C. Tokrat smo opazili na dno gojilne posode pritrjene celice, ki smo jih okarakterizirali kot makrofage. Nato smo plastenko trikrat sprali z osnovnim medijem in trikrat s fosfatnim pufrom ter dodali 5 mL raztopine tripsina v plastenko. Približno polovica adheriranih celic se je odpustila pri tem postopku. Kljub pridobitvi nekaj celic, je bilo teh precej manj kot pri magnetnem ločevanju, zato smo se odločili, da bomo nadaljnje vzorce ločevali z magnetno metodo, saj smo želeli pridobiti čimvečje število celic za analizo. Sledeča vzorca sta bila tudi količinsko precej manjša, kar je še dodatno pripomoglo k odločitvi, da opustimo postopek adherence makrofagov na plastiko.

5. Sklep

V nalogi smo želeli razviti postopek izolacije makrofagov iz nedrobnoceličnega pljučnega raka in okoliškega zdravega tkiva ter okarakterizirati njihove fenotipe s pretočno citometrijo in celičnim sortiranjem. Zanimala nas je prisotnost molekul CD163 in CD204 na makrofagih, ki naj bi se izražali na bolj protivnetnem fenotipu makrofagov M2.

Za izolacijo makrofagov smo najprej pripravili celično suspenzijo z razgradnjo tkiva. Uporabili smo klasično metodo s kolagenazo, hialuronidazo in deoksiribonukleazo 1, ki se je izkazala za ustrezno. Celično suspenzijo smo nato centrifugirali na gradientu gostote in ločili mononuklearne celice od ostalih. Za nadaljnjo izolacijo makrofagov iz celične suspenzije smo uporabili magnetno vezane delce na protitelesa proti CD14, membranskemu glikoproteinu, ki se nahaja na večini monocitov in makrofagov, in makrofage v magnetnem polju ločili od preostalih mononuklearnih celic. Za avtomatizirano razgradnjo tkiva nismo imeli ustreznih encimov in programov, zato s to metodo nismo dobili dovolj celic za nadaljnje delo. Podobno smo makrofage poskusili ločiti od ostalih celic z adherenco na plastiko, a smo s tem pridobili mnogo manj celic, kot z magnetno ločbo in tega postopka nismo dalje uporabljali.

Naša hipoteza je bila, da je v rakavem tkivu večja gostota in delež takšnih makrofagov, ki močneje izražajo CD163 in CD204, a rezultati nakazujejo, da to v celoti drži le za populacijo CD204⁺. Gostota populacij CD163⁺ in CD163⁺, CD204⁺ je v rakavem tkivu večja, kot v zdravem, a ne bolj, kot pri ostalih populacijah in tudi delež teh celic ni večji v rakavem, kot v zdravem tkivu. Za potrditev rezultatov bi potrebovali več vzorcev za statistično analizo. S celičnim sortiranjem smo iz tumorskega tkiva uspeli izolirati makrofage CD204⁺, ki so predstavljali 13,7% od vseh izoliranih makrofagov. Zamrzovanje povzroči izgubo skoraj 80% celic, zato priporočamo izogibanje temu postopku, je pa bilo po odtajanju opazno hitrejše odmiranje celic iz rakavega tkiva, kot pri tistih iz zdravega.

6. Literatura

1. Zaletel-Kragelj L, Eržen I, Premik M: Uvod v javno zdravje. Littera Picta, Ljubljana, 2007: 354-60.
2. Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. *CA-Cancer J Clin*, 2011, 61: 69-90.
3. Rak v Sloveniji 2007, Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2010.
4. Rott T: Epidemiologija, etiopatogeneza in histološka klasifikacija pljučnih tumorjev. *Medicinski razgledi*, 2002, 41: 289-312.
5. Kocjancic A, Mravlje F, Stajer D: Interna medicina. Littera Picta, Ljubljana, 2005: 348-54.
6. Fucic A, Gamulin M, Ferencic Z, Rokotov D, Katic J, Bartonova A, Lovasic I, Merlo D.: Lung Cancer and Environmental Chemical Exposure: A Review of Our Current State of Knowledge With Reference to the Role of Hormones and Hormone Receptors as an Increased Risk for Developing Lung Cancer in Man. *Toxicol Pathol*, 2010, 38: 849-855.
7. Donnem T, Bremnes RM, Busund LT, Andersen S, Pezzella F: Gene expression assays as prognostic and predictive markers in early stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis*, 2012, 4: 212-213.
8. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, Collins T: Pathologic basis of disease 6th. Saunders, Philadelphia, 1999, 741-746.
9. Zhuo W, Zhang L, Zhu B, Ling J, Chen Z: Association of MDM2 SNP309 Variation with Lung Cancer Risk: Evidence from 7196 Cases and 8456 Controls. *Plos ONE* 7: e41546.
10. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P: Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukocyte Biol*, 2009, 86: 1065-1073.

11. Murdoch C, Munthana M, Coffelt SB, Lewis E: The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature*, 2008, 8: 618-629.
12. Baay M, Brouwer A, Pauwels P, Peeters M, Lardon F: Tumor Cells and Tumor-Associated Macrophages: Secreted Proteins as Potential Targets for Therapy. *Clin Dev Immunol*, 2011, článek 565187.
13. Bak SP, Walters JJ, Takeya M, Conejo-Garcia JR, Berwin BL: Scavenger Receptor-A-Targeted Leukocyte Depletion Inhibits Peritoneal Ovarian Tumor Progression. *Cancer Res*, 2007, 67: 4783-4789.
14. Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Muchemwa FC, Yonemura Y, Komohara Y, Takeya M, Mitsuya H, Ihn H: Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12: R128.
15. Chen JW, Lin YC, Yao PL, Yuan A, Chen HY, Shun CT, Tsai MF, Chen CH, Yang PC: Tumor-Associated Macrophages: The Double-Edged Sword in Cancer Progression. *J Clin Oncol*, 2005, 23: 953-964.
16. Murray PJ, Wynn: Protective and pathologic functions of macrophage subsets. *Nature*, 2011, 11: 723-737.
17. Hoeksema MA, Stoger JL, de Winther MPJ: Molecular Pathways Regulating Macrophage Polarization: Implication for Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 2012, 14: 254-263.
18. Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM: Tumour immunity: effector response to tumour and role of microenvironment. *Lancet*, 2008, 371: 771-783.
19. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A: Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J Immunol*, 2006, 177: 7303-7311.
20. Cassetta L, Cassol E, Poli G: Macrophage Polarization in Health and Disease. *TheScientificWorldJo*, 2011, 11: 2391-2402.

21. Biswas SK, Sica A, Lewis CE: Plasticity of Macrophage Function during Tumor Progression: Regulation by Distinct Molecular Mechanisms. *J Immunol*, 2012, 180: 2011-2017.
22. Kawamura K, Komohara Y, Takaishi K, Katabuchi H, Takeya M: Detection of M2 macrophages and colony stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathol Int*, 2009, 59: 300-305.
23. Guerrero AR, Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Nakamura M, Johnson WEB, Baba H: Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *J Neuroinflamm*, 2012, 9: 40.
24. Entrez Gene: MSR1 macrophage scavenger receptor 1 (www.ncbi.nlm.nih.gov).
25. Cairo G, Locati M, Mantovani A: Control of iron homeostasis as a key component of macrophage polarization. *Haematologica*, 2010, 95: 1801-1803.
26. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison C, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM: CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukocyte Biol*, 2000, 68: 1-8.
27. Laoui D, Movahedi K, van Overmeire E, van den Bosche J, Schouppe E, Mommer C, Nikolaou A, Morias Y, de Baetselier P, van Ginderachter JA: Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol*, 2011, 55: 861-867.
28. Aggarwal BB: Nuclear factor- κ B: The enemy within. *Cancer cell*, 2004, 6: 203-208.
29. Hamburger AW, White CP, Tencer K: Effect of enzymatic disaggregation on proliferation of human tumor cells in soft agar. *J Natl Cancer I*, 1982, 68: 945-949.
30. Howard RB, Shroyer KR, Marcell T, Swanson LE, Pagura ME, Mulvin DW, Cowen ME, Johnston MR: Time-Related Effects of Enzymatic Disaggregation on Model Human Lung Carcinomas. *Cytometry*, 1995, 19: 146-153.
31. Walker H, Ahier R, Coultas P: Cell survival assays in a slowly dividing normal tissue. *Brit J Cancer*, 1986, 53: 351-354.

32. Pavelic ZP, Slocum HK, Rustum YM, Creaven PJ, Karakousis C, Takita H: Colony Growth in Soft Agar of Human Melanoma, Sarcoma, and Lung Carcinoma Cells Disaggregated by Mechanical and Enzymatic Methods. *Cancer Res*, 1980, 40: 2160-2164.
33. Fernandez-Real JM, del Pulgar SP, Luche E, Moreno-Navarrete JM, Waget A, Serino M, Sorianello E, Sanchez-Pla A, Pontaque FC, Vendrell J, Chacon MR, Ricart W, Burcelin R, Zorzano A: CD14 Modulates Inflammation-Driven Insulin Resistance. *Diabetes*, 2011, 60: 2179-2186
34. Michael S, Minhas K, Ishaque M, Ahmed F, Ahmed A: Promoter Polymorphisms of the *CD14* Gene Are Associated With Atopy in Pakistani Adults. *J Invest Allerg Clin*, 2011, 21: 394-397.
35. Davey HM: Life, Death, and In-Between: Meanings and Methods in Microbiology. *Appl Environ Microb*, 2011, 77: 5571-5576.
36. Cho SH, Godin JM, Chen CH, Qiao W, Lee H, Lo YH: Recent advancements in optofluidic flow cytometer. *Biomicrofluidics*, 2010, 4: 043001.
37. Lužnik IA, Čelhar T, Kuželički NK, Milek M, Pajič T: Vaje iz klinične kemije I. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Ljubljana, 2010: 21-25.
38. Hoppstaedter J, Diesel B, Zarbock R, Breinig T, Monz D, Koch M, Meyerhans A, Gortner L, Lehr CM, Huwer H, Kiemer AK: Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 in human alveolar and lung interstitial macrophages. *Biomed Central respiratory research*, 2010, 11: 124
39. Ohtaki Y, Ishi G, Nagai K, Ashimine S, Kuwata T, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Takeyoshi I, Ochiai A: Stromal Macrophage Expressing CD204 is Associated with Tumor Aggressiveness in Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 2010, 5: 1507-1515
40. Ma J, Liu L, Che G, Yu N, Dai F, You Z: The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *Biomed Central Cancer*, 2010, 10: 112.

41. Fuentes-Duculan J, Suárez-Fariñas M, Zaba LC, Nograles KE, Pierson KC, Mitsui H, Pensabene CA, Kzhyshkowska J, Krueger JG, Lowes MA: A subpopulation of CD163 positive macrophages is classically activated in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2010, 130: 2412-2422
42. Trost Z, Sok M, Marc J, Cerne D: Increased Lipoprotein Lipase Activity in Non-small Cell Lung Cancer Tissue Predicts Shorter Patient Survival. *Arch Med Res*, 2009, 40: 364-368.
43. Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ: Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res*, 2002, 43: 1997-2006.
44. Podgornik H, Malavasic T, Sok M, Kern I, Smerdu V, Cerne D: LPL mRNA detection in NSCLC tissue. 9th Congress of Slovenian Biochemical Society 2011, Maribor, Slovenia.
45. Kuemmerle NB, Rysman E, Lombardo PS, Flanagan AJ, Lipe BC, Wells WA, Pettus JR, Froelich HM, Memoli VA, Morganelli PM, Swinnen JV, Timmerman LA, Chaychi L, Fricano CJ, Eisenberg BL, Coleman WB, Kinlaw WB: Lipoprotein lipase links dietary fat solid tumor cell proliferation. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10: 427-436.
46. Van Bockstaele F, Pede V, Janssens A, Callewaert F, Offner F, Verhasselt B, Philippe J: Lipoprotein Lipase mRNA Expression in Whole Blood is a Prognostic Marker in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Chem*, 2007, 53: 204-212.
47. Herber DL, Cao W, Nefedova Y, Novitskiy SV, Nagaraj S, Tyurin VA, Corzo A, Cho HI, Celis E, Lennox B, Knight SC, Padhya T, McCaffrey TV, McCaffrey JC, Scott A, Fishman M, Ferris RL, Kagan VE, Gabrilovich DI: Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nat Med*, 2010, 16: 880-886
48. Yu X, Wang XY: Antagonizing the innate pattern recognition receptor CD204 to improve dendritic cell-targeted cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, 2012, 1: 770-772.