

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TOMAŽ LOKAR

**RAZVOJ IMUНОHISTOKEMIČNE METODE ZA CELIČNI
OZNAČEVALEC CD163 NA CELICAH Z VISOKIM IZRAŽANJEM
LIPOPROTEINSKE LIPAZE V NEDROBNOCELIČNEM PLJUČNEM
RAKAVEM TKIVU**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TOMAŽ LOKAR

**RAZVOJ IMUНОHISTOKEMIČNE METODE ZA CELIČNI
OZNAČEVALEC CD163 NA CELICAH Z VISOKIM IZRAŽANJEM
LIPOPROTEINSKE LIPAZE V NEDROBNOCELIČNEM PLJUČNEM
RAKAVEM TKIVU**

**DEVELOPMENT OF IMMUNOHISTOCHEMICAL METHOD FOR
CELL MARKER CD163 ON CELLS WITH HIGH EXPRESSION OF
LIPOPROTEIN LIPASE IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER
TISSUE**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko naložko sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž. in somentorstvom asist. dr. Jasne Omersel, mag. farm.

Imunohistokemično analizo in fluorescenčno *in situ* hibridizacijo sem izvedel na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo. Obdelana tkiva so pregledali v Specializiranem hematološkem laboratoriju, KO za hematologijo, UKC Ljubljana, pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž.

ZAHVALE

Iskreno se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Heleni Podgornik in somentorici asist. dr. Jasni Omersel za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se izr. prof. dr. Darku Černetu za strokovne nasvete. Posebna zahvala Specializiranemu hematološkemu laboratoriju UKC Ljubljana za pomoč pri izvedbi magistrske naloge. Zahvaljujem se zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za pomoč pri delu v laboratoriju. Zahvaljujem se tudi zasl. prof. dr. Jani Lukač Bajalo, družini in prijateljem.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko naložko izdelal samostojno pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Helene Podgornik, univ. dipl. inž. kem. inž. in somentorice asist. dr. Jasne Omersel, mag. farm.

Ljubljana, 2016

Predsednik komisije: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Simon Žakelj, mag. farm.

VSEBINSKO KAZALO

VSEBINSKO KAZALO	I
POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
SEZNAM SLIK.....	VII
SEZNAM PREGLEDNIC.....	VII
1. UVOD.....	1
1.1 Potencialni novi označevalci makrofagov fenotipa M2	2
1.2 Odstranjevalni receptor CD163 in njegove biološke vloge.....	6
2. NAMEN DELA.....	12
3. MATERIALI IN METODE.....	13
3.1 Priprava histoloških rezin	13
3.2 Čiščenje komplementarnih nukleotidov	13
3.3 Označevanje komplementarnih nukleotidov	15
3.4 Imunohistokemična analiza CD163 pozitivnih celic.....	17
3.5 Analiza LPL mRNA s postopkom FISH.....	20
3.6 Analiza kolokalizacije fluorescence	24
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	25

4.1 Imunohistokemična analiza CD163 pozitivnih celic.....	25
4.2 Analiza LPL mRNA s postopkom FISH.....	28
4.3 Analiza kolokalizacije fluorescence	31
5. SKLEP	33
6. LITERATURA	34

POVZETEK

Tumorsko mikrookolje in različni fenotipi makrofagov imajo pomemben vpliv na razvoj in napoved poteka bolezni različnih tumorjev. Celice v rakavem tkivu z izjemno velikim izražanjem in visoko aktivnostjo lipoproteinske lipaze (LPL) korelirajo z nižjo stopnjo preživetja rakavih bolnikov. Na podlagi preteklih raziskav na tem področju ugotavljam, da ima pri tem pomembno vlogo predvsem fenotip tumorskih makrofagov M2. Z eksperimentalnim delom smo preverili hipotezo, da imajo celice z velikim izražanjem LPL tudi celični receptor CD163.

Za dokazovanje hipoteze smo razvili imunohistokemični postopek označevanja histoloških rezin nedrobnocešnega pljučnega rakavega tkiva. Po predhodni obdelavi tkiva v različnih raztopinah smo na tkivo nanesli specifična, fluorescenčno označena protitelesa proti CD163. Emitirano svetlobo smo opazovali s fluorescenčnim mikroskopom, močnejšo fluorescenco smo opazili pri celicah z membranskimi receptorji CD163. Za dokazovanje ekspresije LPL mRNA smo izvedli fluorescenčno in situ hibridizacijo (FISH). Po predhodni obdelavi tkiva v različnih raztopinah smo na tkivo nanesli specifično označene sonde, komplementarne LPL mRNA, ki smo jih sintetizirali s pomočjo izolirane mRNA. Po vezavi z rodaminom označenih protiteles na sonde smo pod fluorescenčnim mikroskopom opazovali emitirano svetlobo. Dokazana kolokalizacija obeh fluorescenc bi pomenila potrditev hipoteze.

V našem delu nam ni uspelo potrditi hipoteze, da imajo celice z velikim izražanjem LPL tudi celični receptor CD163. Sklopitev postopkov je bila sicer uspešna, našli smo tako CD163 kot tudi LPL mRNA pozitivne celice, vendar ocena kolokalizacije fluorescence ni bila možna. Strukturne spremembe tkiva med izvedbo eksperimenta so onemogočile nedvoumno oceno celic in s tem potrditev oz. zavrnitev hipoteze.

ABSTRACT

Tumor microenvironment and various phenotypes of macrophages have a strong impact on the development and prognosis of different tumors. Cells in cancer tissue with an extremely high expression level and a high LPL activity correlate with lower survival rates of cancer patients. Based on previous research in this field, our findings indicate that the M2 phenotype of tumor macrophages plays an important role in this respect. In the experimental part of the thesis, we tested the hypothesis stating that cells with a high LPL expression level also have the CD163 cell receptor.

To support the hypothesis, we developed an immunohistochemical procedure for marking histological slices of non-small cell lung cancer tissue. Following prior treatment of the tissue in different solutions, we applied specific fluorescently tagged anti-CD163 antibodies on the tissue. The emitted light was observed using a fluorescent microscope. The fluorescence was stronger in cells with a higher expression level of the CD163 receptor. As for demonstrating mRNA LPL expression, we employed the FISH method. Following prior treatment of the tissue in different solutions, we applied specifically marked probes that were synthesised on the basis of isolated mRNA from the tissue. The probes were stained with specific fluorescently tagged antibodies. We observed the emitted light with a fluorescent microscope. If the colocalization of fluorescence was proved, the hypothesis would have been supported.

We have been unable to confirm the hypothesis stating that cells with a high LPL expression level also have the CD163 cell receptor. Although the coupling of procedures was successful and both CD163- and mRNA LPL-positive cells could be found, the colocalization of fluorescence was impossible to determine. Structural changes in the tissue during the experimental part disabled an unambiguous assessment of the cells and thus a confirmation or rejection of the hypothesis.

SEZNAM OKRAJŠAV

Okrajšava	Pomen / razлага okrajšave
cDNA	Komplementarna DNA
CHP	Celični hibridizacijski pufer
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpirokarbonat
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
DNAze	Deoksiribonukleaze
EMP	Eritroblast-makrofagni protein
FISH	Fluorescenčna <i>in situ</i> hibridizacija
GM-CSF	Granulocitne makrofagne kolonije stimulirajoči faktor
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interlevkin
iNOS	Inducibilna sintaza dušikovega oksida
LPL	Lipoproteinska lipaza
M-CSF	Makrofagne kolonije stimulirajoči faktor
mRNA	Obveščevalna RNA
LPL mRNA	Zapis za lipoproteinsko lipazo na mRNA
MSR1	Makrofagni odstranjevalni receptor 1
NOS2	Sintaza dušikovega oksida 2
NSCLC	Nedrobnocelični pljučni rak
PBS	Fosfatni spiralni pufer
PBT	Posthibridizacijski spiralni pufer
RNA	Ribonukleinska kislina
RNAze	Ribonukleaze
sCD163	Topna oblika receptorja CD163

SRCR-SF	Družina odstranjevalnih receptorjev, bogatih s cisteinom
SSC	Standardni citratni pufer
ST	Sobna temperatura
TAM	Tumorski makrofagi (angl. Tumor-associated macrophages)
TEA	Trietilamin
TLR	Toll-u podoben receptor (angl. Toll-like receptor)
TNF- α	Dejavnik tumorske nekroze
VCAM-1	Žilna adhezijska molekula tipa 1

SEZNAM SLIK

Slika 1: Razvoj in diferenciacija makrofagov	2
Slika 2: Vloga receptorja CD163 v presnovi hemoglobina	9
Slika 3: Prikaz avtofluorescence v pljučnem rakavem tkivu	26
Slika 4: Prikaz CD163 pozitivnih celic po postopku imunohistokemične analize CD163 v različnih vzorcih pljučnega rakavega tkiva	28
Slika 5: Prikaz LPL mRNA pozitivnih celic po postopku FISH v vzorcu pljučnega rakavega tkiva (T5a).....	30
Slika 6: Tkivo po izvedbi postopka IHC (A) ter po sklopitevi s postopkom FISH (B)	32

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Izkoristek čiščenja PCR produkta glede na velikost oligonukleotidov	14
Preglednica II: Primer reakcijske mešanice za označevanje oligonukleotidov z digoksigeninom (DIG).....	17

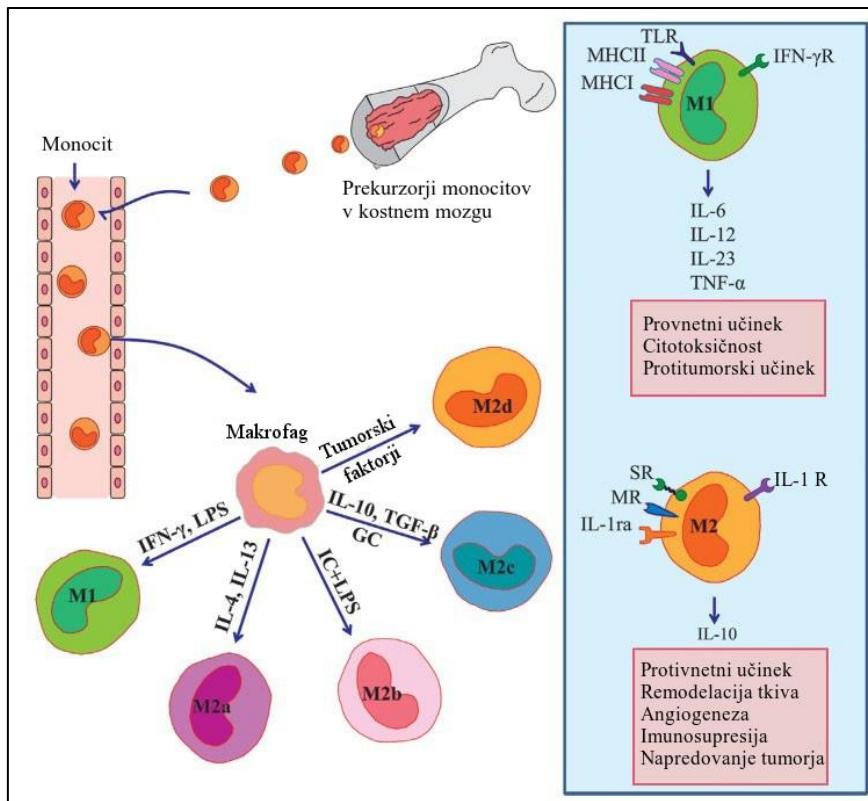
1. UVOD

Tumorskega mikrookolja ne sestavljajo le maligne celice, ampak tudi druge vrste celic ter migrirajoče hematopoetske celice, predvsem makrofagi, nevtrofilci in mastociti. Skupaj ustvarjajo edinstveno okolje, ki spremeni neoplastične lastnosti tumorskih celic [1]. Te celice imajo ključno vlogo pri razvoju in metastazi tumorjev [1]. Najdemo jih praktično v vseh vrstah tumorjev, največji delež pa predstavlja tumorski makrofagi (angl. "tumor associated macrophages" - TAM) [1].

Makrofagi so imunske celice, ki imajo pomembno vlogo v obrambnem sistemu organizma ter ohranjanju homeostaze tkiva in izvirajo iz krvnih monocitov [2]. Monociti se po prehodu v tkiva diferenciirajo in polarizirajo v različne podvrste celic z različno izraženimi fenotipi, na kar vpliva mikrookolje tkiva [2]. Makrofage delimo na dve podvrsti celic in sicer na "klasično aktivirane makrofage" (M1) ter "alternativno aktivirane makrofage" (M2) [1].

Makrofagi M1 se aktivirajo preko interferona- γ , bakterijskih delov kot so lipopolisaharidi in agonistov Tollu podobnih receptorjev (TLR). Zanje je značilna tvorba provnetnih faktorjev kot so IL-6, IL-12, IL-23 in dejavnik tumorske nekroze (TNF- α) [2]. Poleg tega pa makrofagi M1 izražajo visoko raven pomembnih histokompatibilnih kompleksov razreda I in razreda II, ki so potrebni za predstavitev tumor-specifičnih antigenov. Zato so makrofagi M1 pomembni tako za imunski odgovor kot tudi protitumorsko imunost [2].

V nasprotju z makrofagi M1 pa makrofagi M2 izkazujejo protivnetne in protumorogene aktivnosti [2]. Makrofage M2 lahko nadalje delimo na fenotipe M2a, M2b, M2c in M2d. Poročila zadnjih raziskav kažejo na to, da TAM delujejo kot makrofagi M2 in jih lahko označimo kot fenotip M2d [2]. Makrofagi M2 proizvajajo visoko raven IL-10 in izražajo visoko raven odstranjevalnih receptorjev, manoznega receptorja in antagonista receptorja IL-1 [2].



Slika 1: Razvoj in diferenciacija makrofagov (prirejeno po [24])

Med razvojem tumorja se v tkivo infiltrirajo M1-polarizirani makrofagi, ki spodbujajo imunski odziv in tako motijo razvoj tumorskih celic. V poznih fazah napredovanega tumorja pa TAM izražajo predvsem fenotip M2, ki ima nizko protitumorno aktivnost [2]. Za ta fenotip se je pokazalo, da ustvarja ugodno mikrookolje za rast in razvoj tumorja ter angiogenezo [2]. Čeprav v več študijah poročajo o tem, da TAM izražajo protivnetni fenotip, pa so v zadnjih letih odkrili, da aktivirani TAM izločajo tudi provnetne citokine kot je IL-6, ki so vključeni v indukcijo pomembnih genov v celičnem ciklu tumorskih celic in supresijo apoptoze [2]. Študije kažejo, da imajo bolniki z višjo gostoto TAM značilno nižjo stopnjo preživetja brez ponovitve bolezni ter splošno stopnjo preživetja. Zato so TAM lahko pomemben dejavnik napovedi poteka bolezni in potencialno uporaben označevalci pri rakavih bolnikih [2].

1.1 Potencialni novi označevalci makrofagov fenotipa M2

Pljučni rak je najpogostejša oblika rakavih obolenj z najvišjo smrtnostjo v ZDA [3]. Kljub

znižanju števila kадilcev v zadnjih letih je cigaretni dim še vedno najpomembnejši dejavnik tveganja za razvoj pljučnega raka [4]. Izpostavljenost cigaretнемu dimu vzbudi mutagenezo, kar lahko vodi do razvoja pljučnega raka, nadaljevanje kajenja pa poviša stopnjo smrtnosti in ponovitve bolezni že v zgodnji stopnji bolezni [4]. Kljub dostopnim terapijam za zdravljenje nedrobnoceličnega pljučnega raka (NSCLC) pride pri mnogih bolnikih do ponovnega razvoja bolezni zaradi izjemno invazivne narave bolezni [4]. Zato potrebujemo nove strategije in pristope za zgodnjo napoved napredka in poteka bolezni.

V nadaljevanju bomo pregledali nekaj potencialnih označevalcev, katere so v nekaterih študijah predstavili kot makrofagne označevalce M2 in sicer: CD163, CD204, CD1a, CD1b, CD93, CD226. Poleg njih bomo omenili tudi CD68, ki je sicer splošni makrofagni označevalec, vendar se pogosto omenja v povezavi z označevalci makrofagov M2.

CD68 (Cluster of Differentiation 68) je transmembranski glikoprotein z neznano funkcijo, ki ga izražajo človeški monociti in tkivni makrofagi [5].

Leta 2013 je bila objavljena študija, v kateri so poskušali razumeti vlogo skupkov mieloičnih celic v regionalnih bezgavkah iz tkiva zgodnjega nedrobnoceličnega pljučnega raka [4]. Ugotovili so prisotnost CD68+ mieloičnih celic, ki so izražale imunosupresivni protumorogeni fenotip. CD68+ mieloične celice so bile kolokalizirane z metastazami. Ti skupki mieloičnih celic so bili tudi CD163 pozitivni, kar kaže na polarizacijo v smeri fenotipa M2.

V študiji iz leta 2010 so ugotavljali povezavo med tumorskimi makrofagi in stopnjo preživetja pri klasičnem Hodgkinovem limfomu [6]. Uporabili so tkivo, pridobljeno z biopsijo bezgavk bolnikov s Hodgkinovim limfomom. Naredili so profil genske ekspresije tumorskih makrofagov in prepoznali gen, za katerega so ugotovili povezavo s predhodnimi neuspešnimi terapijami. Ugotovili so, da je povišano število CD68+ makrofagov sovpadalo s skrajšanim preživetjem brez napredovanja bolezni in z večjo verjetnostjo ponovitve bolezni [6]. Prišli so do zaključka, da število CD68+ makrofagov predstavlja bio-označevalec s klinično uporabnostjo pri vseh stopnjah klasičnega Hodgkinovega limfoma, tako v času postavitve diagnoze kot tudi v primeru ponovitve bolezni [6].

CD163 (Cluster of Differentiation 163) je odstranjevalni receptor za kompleks hemoglobina s haptoglobinom [7]. Izraža se samo v monocitih in makrofagih [8].

Normalno se ekspresija poveča v akutnih fazah bolezni, saj makrofagi preko CD163 odstranjujejo kompleks hemoglobina in haptoglobina z endocitozo in tako varujejo okoliško tkivo pred oksidativnimi poškodbami, ki jih lahko povzroči prosti hemoglobin [8].

V študiji leta 2012 [9] so ugotavliali porazdelitev makrofagov s fenotipom M1 ali M2 v povezavi z molekularnimi lastnostmi kolorektalnega raka in napovedjo poteka bolezni. Za ugotavljanje stopnje infiltracije makrofagov z izraženim fenotipom M1 ali M2 v tkivu kolorektalnega raka so uporabili imunohistokemijski pristop. Kot označevalci fenotipa M1 so uporabili sintazo dušikovega oksida 2 (NOS2, tudi iNOS) in receptor CD163 kot označevalci fenotipa M2. V tkivu so prepoznali makrofage z izraženima fenotipoma tako M1 (NOS2+) kot tudi M2 (CD163+). Ugotovili so povezavo med NOS+ in CD163+ celicami. Za oba označevalca so ugotovili močno povezavo med infiltracijo makrofagov M1 in M2 in stopnjo razvitosti tumorja. Poleg tega so ugotovili tudi, da je bila napoved poteka bolezni pri pacientih s prevladajočim fenotipom M1 bistveno boljša kot pri pacientih z nizkim številom makrofagov M1. Zaključili so, da večja infiltracija makrofagov M1, kateri sočasno sledi tudi povišanje števila makrofagov M2, pomeni boljšo napoved poteka bolezni pri pacientih s kolorektalnim rakom.

V nedavni študiji [10] so analizirali, ali sta število makrofagov in razmerje makrofagov M2 proti celokupnemu številu makrofagov diskriminativna označevalca za uspešnost zdravljenja po operaciji malignega plevralnega mezotelioma ter ugotavliali napovedno vrednost teh celic. Uporabili so označevalca CD68 (splošni makrofagni označevalci) in CD163 (TAM M2 označevalci). Ugotovili so, da sta bili števili CD68+ in CD163+ celic primerljivi med tkivi operiranih in neoperiranih bolnikov in v nobeni skupini posamezno nista bili povezani s splošno stopnjo preživetja. Nasprotno pa je razmerje teh celic CD163/CD68 koreliralo s splošno stopnjo preživetja v obeh skupinah bolnikov. Tako je lahko razmerje CD163/CD68 potencialni prognostični označevalci pri bolnikih z epiteloidnim mezoteliomom in je neodvisno od načina zdravljenja, vendar ne more biti napovedni označevalci za uspešnost operativnega zdravljenja.

V študiji iz leta 2009 [11] so raziskovalci poskušali ovrednotiti ekspresijo makrofagov fenotipa M2 v ovarijskih epitelnih tumorjih. V eksperimentih so uporabili naslednje označevalce: CD68, CD163 in CD204. Ugotovili so, da je bilo število CD68+ makrofagov

v obrobnem in malignem tumorskem tkivu občutno višje kot pri benignih tumorjih. Čeprav je bilo število teh makrofagov za odtenek višje v malignem tkivu v primerjavi z obrobnim malignim tkivom, razlike vseeno niso bile tako občutne. Ugotovili pa so, da se je število CD68+ makrofagov občutno povečevalo s histološko stopnjo malignosti. Ugotovili so tudi, da sta bili števili CD163+ in CD204+ makrofagov v obrobnem in malignem tkivu občutno višji kot v benignem tkivu. Tako število CD163+ kot tudi število CD204+ sta dobro korelirali s histološko stopnjo malignosti.

CD204 (Cluster of Differentiation 204) ali makrofagni odstranjevalni receptor 1 (MSR1) je receptor, ki skrbi za endocitozo modificiranih lipoproteinov nizke gostote (acetil-LDL) [13]. Poznamo 3 izoforme receptorja. Izoformi tipa 1 in tipa 2 sta funkcionalna receptorja in skrbita za endocitozo modificiranih LDL. Izoforma tipa 3 pa ne privzema modificiranega LDL, čeprav ima domeno za to funkcijo, saj je ujeta znotraj endoplazmatskega retikuluma. Izoforma tipa 3 lahko inhibira funkcijo izoform tipa 1 in 2, kadar so sočasno ekspresirane, zato ima dominanten negativen učinek na aktivnost receptorja v makrofagih.

V študiji, objavljeni leta 2010 [12], so ugotavliali povezavo med ekspresijo označevalca CD204 in agresivnostjo tumorja pri pljučnem adenokarcinomu. Ugotovili so, da število CD204+ makrofagov dobrosovпадa z drugimi napovednimi dejavniki poteka bolezni. Statistične analize so pokazale, da je število CD204+ makrofagov povezano s slabšo napovedjo poteka bolezni, medtem ko število CD68+ makrofagov nima takšne napovedne vrednosti. Zaključili so, da več kot očitno CD204+ makrofagi odražajo protumorski fenotip TAM pri pljučnem adenokarcinomu.

Leta 2007 je bila objavljena študija [14], v kateri so poskušali ustaviti razvoj ovarijskega tumorja. Na tumorskih vaskularnih levkocitih so identificirali odstranjevalni receptor A (SR-A – CD204), ki se pojavlja tako pri miših kot pri človeku. Na miših s peritonealnimi tumorji ID8 so izvedli eksperiment in sicer so uporabili imunotoksin anti-CD204. Imunotoksin je uničil tumorske vaskularne levkocite in upočasnil razvoj peritonealnega tumorja ter akumulacijo ascitesa. Ugotovili so tudi, da mora biti toksin usmerjen proti CD204 receptorju, saj se pri miših, katerim so aplicirali breztarčni toksin, razvoj tumorja ni upočasnil. Zaključili so, da je receptor CD204 lahko specifična tarča za učinkovito imunoterapevtsko zdravljenje peritonealnega ovarijskega tumorja.

Leta 2012 je skupina raziskovalcev proučevala transkriptom človeških makrofagov visoke ločljivosti [15]. Želeli so odkriti nove potencialne označevalce makrofagov fenotipa tako M1 kot tudi M2. Njihov pristop je med drugim omogočil tudi odkritje novih površinskih označevalcev M2 makrofagov in sicer CD1a, CD1b, CD93 in CD226. CD1a in CD1b imata vlogo predstavitev antigenov celicam T. Ugotovili so, da polarizacija makrofagov v smeri fenotipa M2 občutno poviša ekspresijo CD1a in CD1b, kar lahko kaže na to, da je lahko njuna ekspresija povečana na tkivnih makrofagih v mikrookolju, naklonjenem razvoju makrofagov v smeri fenotipa M2. Podobno velja tudi za CD93, ki je pomemben dejavnik pri procesih adhezije, migracije in fagocitoze. Celice lahko CD93 odpuščajo s svoje površine. Za topno obliko CD93 se domneva, da je vključena v proces diferenciacije monocitov v makrofage fenotipa M2. Odkrili so tudi diferencialno ekspresijo označevalca CD226 med makrofagi M1 in M2. Možno je tudi, da ima CD226 tudi druge funkcije, med drugim regulacijo migracije monocitov med endotelijskimi celicami. Tudi o tem novem označevalcu zaenkrat vemo še zelo malo. Potrebne bi bile nadaljne raziskave za razumevanje njegove vloge v makrofagih.

1.2 Odstranjevalni receptor CD163 in njegove biološke vloge

CD163 (Cluster of Differentiation 163) je kot že rečeno odstranjevalni receptor za kompleks hemoglobina s haptoglobinom [7]. Prvič so ga prepoznali in opisali leta 1987, z oznako CD pa so ga označili leta 1996 [16]. V našem telesu ima več bioloških vlog, katere bomo povzeli v nadaljevanju. CD163 je lahko uporaben kot biooznačevalec različnih bolezenskih stanj kot so vnetja in rak ali kot diagnostični parameter aktivacije makrofagov.

CD163 uvrščamo v B razred družine odstranjevalnih receptorjev, bogatih s cisteinom (SRCR-SF). SRCR-SF je družina strukturno sorodnih transmembranskih glikoproteinov. SRCR domena je ekstracelularna domena, ki je sestavljena iz 100-110 aminokislinkih ostankov. Za B razred je značilnih 8 SRCR domen, ki so kodirane v eksonu 1 in so medsebojno povezane po vzorcu 1-4, 2-7, 3-8 in 5-6. Razred B se naprej deli v 2 podrazreda glede na odsotnost ali prisotnost ekstracelularnih domen, različnih od SRCR. CD163 pripada prvemu podrazredu, ker je njegova ekstracelularna regija zgrajena le iz

SRCR domen [16].

Osnovni prepis gena za CD163 vsebuje zapis za beljakovino s 1076 aminokislinami. Ekstracelularni del vsebuje 1003 aminokisline, transmembranski del 24 aminokislin, citoplazemski del pa je sestavljen iz 49 aminokislin [17]. Poznamo več izoform receptorja CD163, ki se razlikujejo v dolžini citoplazemskega dela receptorja in v domnevnih mestih fosforilacije. Tri opisane izoforme se razlikujejo v citoplazemskem delu, ki lahko vsebuje 49, 84 ali 89 aminokislin. Prvih 42 aminokislin je enakih pri vseh treh izoformah. Opaženi sta še 2 izoformi, ki se razlikujeta v ekstracelularnem delu receptorja. Prva izoforma je okrnjena, saj vsebuje le prve tri SCRC domene. Druga izoforma pa vsebuje dodatnih 33 aminokislin v 5 in 6 SRCR domeni [17].

Ekspresija CD163 je omejena le na monocite in makrofage. Zreli tkivni makrofagi, ki vsebujejo najvišjo koncentracijo CD163, so Kupfferjeve celice v jetrih, makrofagi v vranici, makrofagi v skorji priželjca, zreli makrofagi v kostnem mozgu, makrofagi v osrednjem živčevju in tudi makrofagi, razpršeni v drugih tkivih. Ti zreli tkivni makrofagi imajo bistveno večjo ekspresijo CD163 v primerjavi s krvnimi monociti, kar kaže na to, da je CD163 diferencijacijski označevalec makrofagov. CD163 pozitivne makrofage najdemo tako med fazo celjenja akutnega vnetja kot tudi pri kroničnem vnetju ali celjenju ran. Sveže infiltrirani makrofagi pa so CD163 negativni, zato se domneva, da imajo CD163 pozitivni makrofagi pomembno vlogo pri vnetju, saj jih v vnetem tkivu najdemo v bistveno višjem številu [16].

Ekspresija CD163 mRNA in same beljakovine je regulirana z "makrofagnim kolonije stimulirajočim faktorjem" (M-CSF), ki regulira diferenciacijo človeških krvnih monocitov. Če pa monocitne celice izpostavimo "granulocitne makrofagne kolonije stimulirajočim faktorju" (GM-CSF) in interlevkinu 4, se ekspresija CD163 zniža. To so opazili v primeru dendritičnih celic [16].

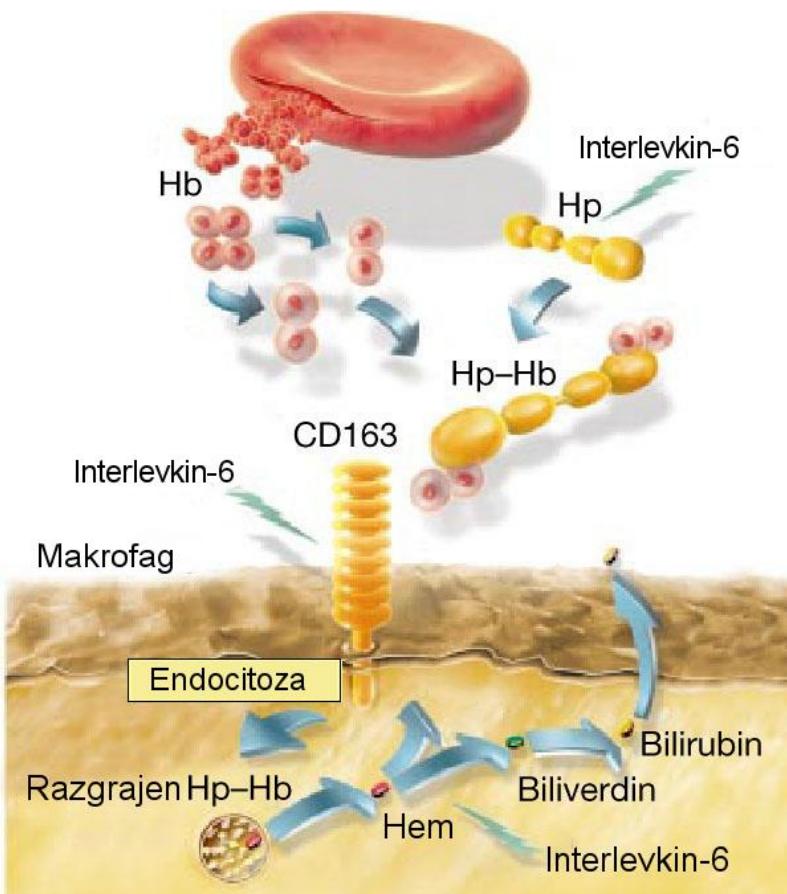
Na ekspresijo CD163 vpliva tudi več drugih dejavnikov. Tako se v primeru obdelave celic s forbolnim estrom ali ciklosporinom A ekspresija CD163 na površini celic zniža. Ekspresijo CD163 uravnava tudi provnetni in protivnetni mediatorji. TNF- α , interferon gama (IFN- γ), lipopolisaharidi in transformirajoči rastni faktor B vodijo do znižanja ekspresije tega receptorja. Ravno nasprotno pa glukokortikoidi, IL-6, IL-10 in steroidni hormoni inducirajo ekspresijo CD163. Izločanje IL-10 in IL-6 pa pospešujejo tudi INF- γ in

lipopolisaharidi, zato ti citokini sodelujejo tudi pri mediaciji visoke ekspresije CD163 v protivnetnem podtipu makrofagov [17].

Bioški vlogi CD163 sta predvsem dve, ki sta morda medsebojno povezani, in sicer odstranjevanje hemoglobina v prosti obliki in protivnetna vloga. Poleg teh dveh, ki sta najbolj poznani, pa ima CD163 potencialno lahko tudi druge vloge v telesu.

Prosti hemoglobin se lahko sprosti iz eritrocitov po dveh poteh in sicer z ekstravaskularno ali intravaskularno hemolizo. Ekstravaskularna hemoliza je mehanizem, pri katerem makrofagne celice vranice in kostnega mozga fagocitirajo stare ali poškodovane eritrocite. Lahko pa del eritrocitov razпадa že v krvnih žilah, kar imenujemo intravaskularna hemoliza. Iz eritrocitov se sprosti hemoglobin, ki se veže na plazemske beljakovine haptoglobin in tako nastane kompleks haptoglobin/hemoglobin [18].

Haptoglobin je beljakovina, ki jo kodirata 2 alela, označena kot alel 1 in alel 2. Zaradi genetskega polimorfizma se lahko izrazijo 3 fenotipi in sicer 1-1 (homozigot za alel 1), 2-1 (heterozigot) in 2-2 (homozigot za alel 2). CD163 ima največjo afiniteto do kompleksa haptoglobin/hemoglobin, pri katerem je fenotip haptoglobina 2-2. V primeru, da CD163 veže kompleks s haptoglobinom-1, se stimulira produkcija protivnetnih citokinov, kot je IL-10. Če pa veže kompleks s haptoglobinom-2, se produkcija protivnetnih citokinov ne stimulira. Za vezavo kompleksa haptoglobin/hemoglobin na CD163 pa je potreben tudi kalcij, saj pomaga ohraniti terciarno strukturo receptorja CD163 [17].



Slika 2: Vloga receptorja CD163 v presnovi hemoglobina (prirejeno po [25])

Kompleks haptoglobin/hemoglobin po vezavi na receptor CD163 preide v notranjost makrofaga z endocitozo. Hem, ki je podenota hemoglobina, se v lizosomu pretvori v biliverdin s hem oksigenazo, ki je pomemben protivnetni in antioksidativni encim. Biliverdin se nato pretvori v bilirubin preko biliverdin reduktaze. Nastali bilirubin se prenese v kri, kjer se veže na albumin ali hemopeksin, v jetrih se konjugira ter izloči v žolč [17]. Ta mehanizem je zelo pomemben, saj preprečuje oksidativne poškodbe, preprečuje glomerulno filtracijo hemoglobina in s tem izgubo dragocenega železa ter poškodbe ledvic zaradi odlaganja hema in prostega železa. Zmanjšajo se oksidativni stres, nastajanje reaktivnih kisikovih spojin in poškodbe celic.

Poleg funkcije odstranjevanja kompleksa haptoglobin/hemoglobin so ugotovili tudi povezano aktivnosti receptorja CD163 in protivnetnega odziva. Ta povezava temelji na naslednjih opažanjih. Makrofagi z visoko ekspresijo CD163 prevladujejo med pozno fazo vnetnega procesa. Poleg tega pa je ekspresija CD163 močno povečana preko delovanja protivnetnih mediatorjev kot so glukokortikoidi, IL-6 in IL-10, kar vodi do nastanka

populacije "alternativno aktiviranih makrofagov". Ti sodelujejo v procesih celjenja ran, angiogeneze in varovanja pred premočnim vnetnim odzivom [16].

Kot smo že omenili, ima CD163 vlogo internalizacije kompleksa haptoglobin/hemoglobin z endocitozo. Pri presnovi hema ima pomembno vlogo encim hem oksigenaza. Zanj je znano, da ga inducira med drugim tudi IL-6. IL-6 je tudi znan stimulator sinteze haptoglobina in receptorja CD163, kar kaže na koregulacijo haptoglobina, CD163 in hem oksigenaze. Zato CD163 pozitivni makrofagi učinkovito presnavljajo toksični hem, hkrati pa imajo protivnetni učinek tudi preko sproščanja IL-10 in presnovkov hema [16].

Poleg protivnetnega učinka pa ima CD163 vlogo tudi pri tvorbi provnetnih citokinov. Ugotovili so, da se pri blokadi receptorja CD163 s specifičnimi protitelesi proti CD163 poveča sproščanje dušikovega oksida (NO), IL-1 β , IL-6 in TNF- α . IL-1 β in TNF- α sta provnetna citokina, medtem ko imata NO in IL-6 tako provnetne kot tudi protivnetne učinke. Zato se za CD163 domneva, da je imunomodulator, ki lahko pospeši ali zavre imunski odziv [16].

Receptor CD163 sodeluje tudi pri regulaciji eritropoeze. Osnovna enota za eritropoezo v kostnem mozgu je eritroblastni otoček, ki ga sestavljajo centralno umeščeni makrofagi, obkrožen z eritroblasti v različnih zrelostnih stopnjah. Neposreden stik med makrofagom in eritroblastom vpliva na rast in diferenciacijo eritroblastov ter omogoča fagocitozo sproščenih eritroidnih jeder. Poznane so štiri adhezijske molekule za eritroblaste na makrofagih in sicer žilna adhezijska molekula tipa 1 (VCAM-1), α_v integrin, eritroblast-makrofagni protein (EMP) in sialoadhezin. Poleg njih pa vezavo ojača tudi CD163 in sicer s 13 aminokislinskim delom druge SRCR domene. Interakcija tega dela domene CD163 z eritroblasti vpliva na rast in samo preživetje eritroblastov. Zato ima CD163 verjetno regulatorno vlogo v procesu eritropoeze [16].

Poleg membranskega receptorja CD163 pa je v plazmi in drugih telesnih tekočinah prisotna tudi topna različica molekule CD163. Topni CD163 (sCD163) se aktivno izloča iz plazemske membrane z metaloproteinazami, sam potek cepitve pa je še precej slabo poznan. Znano je, da se lahko CD163 odceplja iz membrane monocitov, stimuliranih z glukokortikoidi, po vnetnem stimulusu, in da je CD163 običajna komponenta v plazmi zdravih posameznikov. CD163 se v plazmi nahaja kot topna beljakovina (1-3 mg/L) in ima enako velikost kot membranski receptor – ima tudi 9 zunajceličnih SRCR domen [16].

Topna oblika CD163 je biooznačevalec različnih bolezenskih stanj. Predstavlja nov razred specifičnih označevalcev makrofagov pri detekciji koronarne arterijske bolezni, transplantaciji, aterosklerozi, revmatoidnem artritisu, Gaucherjevi bolezni in različnih oblikah raka [17]. Topni CD163 ima tudi vlogo v zaznavanju vnetnih odzivov, sepse, bakteriemije, mononukleoze, leishmaniaze, Crohnove bolezni, celiakije, spondilarthropatije, sinovitisa, skleroze, hepatitisa in fulminantne jetrne odpovedi [17]. Povišanje sCD163 v plazmi zaznamo tudi pri imunohematoloških boleznih, kot so limfom, reaktivni fagocitni sindrom, histiocistoza, mieloproliferativne bolezni in mielo-monocitna levkemija. Povišan je tudi pri drugih vnetnih boleznih, za katere je značilna infiltracija monocitov v tkivo. Najzanimivejše pa je, da se pri teh boleznih poviša raven tega receptorja in da korelira z razpletom teh bolezni [17].

2. NAMEN DELA

Tumorsko mikrookolje in različni fenotipi makrofagov imajo pomemben vpliv na razvoj in prognozo različnih tumorjev. Celice v rakavem tkivu z izjemno velikim izražanjem in visoko aktivnostjo LPL korelirajo z nižjo stopnjo preživetja rakavih bolnikov [19]. Na podlagi preteklih raziskav na tem področju ugotavljam, da ima pri tem pomembno vlogo predvsem fenotip M2 tumorskih makrofagov. Zato ocenujemo, da imajo označevalci TAM fenotipa M2 velik potencial tako v klinični diagnostiki kot morda tudi v usmerjeni imunoterapiji.

Z eksperimentalnim delom bomo preverili hipotezo, da imajo celice z velikim izražanjem LPL tudi celični receptor CD163. Postopek FISH, ki smo ga predhodno uporabili za dokazovanje celic z velikim izražanjem LPL, je v primerjavi z imunohistokemijo časovno in finančno zahtevnejši, zato bi v prihodnosti imunohistokemijska analiza receptorja CD163 močno olajšala dokazovanje prisotnosti celic z velikim izražanjem LPL.

Za dokazovanje hipoteze bomo razvili imunohistokemični postopek označevanja histoloških rezin tkiva NSCLC. Po predhodni obdelavi tkiva v različnih raztopinah bomo na tkivo nanesli specifična, fluorescenčno označena protitelesa proti CD163. Emitirano svetlobo bomo opazovali s fluorescenčnim mikroskopom, predvideno močnejšo fluorescenco bomo opazili pri celicah z večjo ekspresijo receptorja CD163. Za dokazovanje ekspresije mRNA LPL bomo izvedli FISH. Po predhodni obdelavi tkiva v različnih raztopinah bomo na tkivo nanesli z digoksigeninom označene sonde, komplementarne LPL mRNA, ki smo jih sintetizirali s pomočjo iz tkiva izolirane mRNA. Na z digoksigeninom označene sonde bomo vezali specifična z rodaminom označena protitelesa, emitirano svetlobo bomo opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom. Dokazana kolokalizacija obeh fluorescenc bo pomenila potrditev hipoteze.

3. MATERIALI IN METODE

Naše eksperimentalno delo je obsegalo pripravo histoloških rezin, sintezo, čiščenje in označevanje komplementarnih nukleotidov, izvedbo imunohistokemične analize CD163 ter izvedbo analize mRNA LPL s postopkom fluorescenčne *in situ* hibridizacije (FISH).

3.1 Priprava histoloških rezin

Tumorsko tkivo je bilo odvzeto bolnikom, ki so soglašali s postopkom, za katerega je bilo pridobljeno mnenje etične komisije. Pripravo rezin in fiksacijo so opravili na Inštitutu za anatomijsko Medicinske fakultete v Ljubljani. Poskuse smo izvedli na devetih različnih tkivih sedmih bolnikov.

Odvzeto tumorsko tkivo v roku 15 minut zamrznemo v tekočem dušiku in ga v njem tudi do nadaljnega shranjujemo. Tkivne rezine pripravimo iz zamrznjenega tkiva takoj po odvzemu iz tekočega dušika, ki ga predhodno ne smemo odtaliti. Tkvne rezine debeline 10 µm prenesemo na polilizinska objektna stekelca SuperFrost® Plus (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Nemčija). Sledi dehidracija rezin z etanolnimi raztopinami naraščajoče koncentracije. Stekelca posušimo na zraku in jih zložimo v škatlo ter shramimo v zamrzovalnik do izvedbe eksperimenta.

3.2 Čiščenje komplementarnih nukleotidov

Naše izhodišče je bila zmes cDNA, ki so jo sintetizirali v predhodnih raziskavah na podlagi iz tkiva izolirane mRNA [20]. Reakcijska zmes vsebuje poleg sintetiziranih oligonukleotidov tudi številne druge primesi, ki bi lahko vplivale na potek nadaljnjih postopkov, zato moramo PCR produkt predhodno očistiti.

Za čiščenje uporabimo Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Wisconsin, ZDA). Princip sistema temelji na vezavi DNA fragmentov na membrano v prisotnosti kaotropnih soli. Maksimalna vezavna kapaciteta kolone je 40 µg. S kolono lahko očistimo do 1 mL vzorca. Izkoristek v postopku čiščenja je odvisen od

velikosti nukleotidov, kar je razvidno iz preglednice II.

Preglednica I: Izkoristek čiščenja PCR produkta glede na velikost oligonukleotidov

<u>Velikost sonde</u>	<u>Izkoristek po čiščenju</u>
85 bp	55%
100 bp	84%
500 bp	89%
1000 bp	92%
3199 bp	95%
9416 bp	95%
23130 bp	47%

Reagenti:

- Vezavni pufer (Promega Corporation, Wisconsin, ZDA);
- Spiralni pufer (Promega Corporation, Wisconsin, ZDA);
- DEPC voda (Ambion, Austin, ZDA);
- RNase Zap čistilna raztopina (Ambion, Austin, ZDA);

DEPC je okrajšava za spojino dietilpirokarbonat (dietil dikarbonat po IUPACu). Vodi se dodaja z namenom inaktivacije RNaz in s tem znižanja tveganja razgradnje molekul RNA z RNazami.

Aparature in pripomočki:

- Lateks rokavice;
- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5430R (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- Kolona (Promega Corporation, Wisconsin, ZDA);

- Pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- Nastavki za pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- Stresalnik Biosan Bio Vortex V1 (Biosan, Riga, Latvija);
- Sterilne epice 1,5 mL;

Postopek:

Pri delu uporabljamo rokavice. Pipete in delovno površino očistimo z RNase Zap čistilno raztopino. Nato sestavimo kolono in 2 mL zbiralno epruveto. Zmešamo enak volumen vzorca in vezavnega pufra ter nanesemo na kolono. Pustimo inkubirati 1 minuto pri sobni temperaturi. Nato centrifugiramo 1 minuto pri 16000x g. Filtrat zavržemo in kolono ponovno vstavimo v zbiralno epruveto. Na kolono nanesemo 700 µL spiralnega pufra in centrifugiramo 1 minuto pri 16000x g. Filtrat ponovno zavržemo in kolono vstavimo nazaj v zbiralno epruveto. Nato dodamo 500 µL spiralnega pufra in 5 minut centrifugiramo pri 16000x g. Filtrat zavržemo, kolono vstavimo nazaj v zbiralno epruveto in centrifugiramo 1 minuto pri 16000x g, da izpari preostali etanol. Zbirno epruveto zavržemo. Kolono vstavimo v sterilno 1,5 mL epico. Na kolono nanesemo 50 µL DEPC vode in inkubiramo 1 minuto pri sobni temperaturi. Centrifugiramo 1 minuto pri 16000x g. Kolono zavržemo, 1,5 mL epico z vsebino pa shranimo v hladilnik pri 4°C ali zamrznemo na -20°C.

3.3 Označevanje komplementarnih nukleotidov

Za označevanje oligonukleotidov smo uporabili DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd generation (Roche, Mannheim, Nemčija). Vsebuje vse potrebne reagente za encimsko označevanje oligonukleotidov na 3' koncu z encimom terminalno transferazo. Detekcijo sonde s protitelesi omogoča vezava deoksiuridin trifosfata (dUTP), označenega z digoksigeninom (DIG), na 3' konec oligonukleotida.

Reagenti:

- DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd generation (Roche, Mannheim, Nemčija);
- 0,2 M EDTA (pH=8,0);

- DEPC voda (Ambion, Austin, ZDA);

Aparature in pripomočki:

- Lateks rokavice;
- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5430R (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- Termostat Biosan CH-100 (Biosan, Riga, Latvija);
- Pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- Nastavki za pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- Stresalnik Biosan Bio Vortex V1 (Biosan, Riga, Latvija);
- Sterilne epice 1,5 mL

Postopek:

Vse reagente predhodno centrifugiramo, da zberemo raztopino na dnu epruvete, saj so reagenti v majhnih količinah. Vse reagente in reakcijske epice damo na led, da se prepreči delovanje encima pred inkubacijo. V reakcijsko epico odmerimo 9 µL raztopine oligonukleotidov. V primeru, da je količina oligonukleotidov večja od 100 pmol, redčimo ustrezен volumen raztopine nukleotidov (vsebnost 100 pmol) do 9 µL. V epico odmerimo reagente: 4 µL reakcijskega pufra, 4 µL raztopine CoCl₂, 1 µL raztopine DIG-dUTP, 1 µL raztopine dATP in 1 µL 400 U terminalne transferaze (preglednica III). Premešamo in centrifugiramo. Vzporedno pripravimo tudi kontrolno reakcijsko epico (namesto raztopine encima terminalne transferaze dodaj 1 µL DEPC vode). Reakcijske epice inkubiramo 15 minut pri 37°C, nato jih damo nazaj na led. Reakcijo prekinemo z dodatkom 2 µL 0,2 M EDTA (pH = 8,0).

Preglednica II: Primer reakcijske mešanice za označevanje oligonukleotidov z digoksigeninom (DIG)

Reagent	Volumen
Vzorec	9 µL
Reakcijski pufer	4 µL
Raztopina CoCl ₂	4 µL
Raztopina DIG-dUTP	1 µL
Raztopina dATP	1 µL
400 U terminalna transferaza	1 µL

3.4 Imunohistokemična analiza CD163 pozitivnih celic

Imunohistokemija je proces detekcije celičnih antigenov (beljakovin) v tkivnih rezinah, ki temelji na principu specifične vezave protiteles na želene antigene v biološkem tkivu. V našem delu smo uporabili specifična protitelesa proti antigenu CD163, označena z Alexa Fluor® 488. Označene rezine tkiv pregledamo pod fluorescenčnim mikroskopom.

Reagenti:

- DEPC voda (Ambion® Inc., Austin, ZDA);
- Etanolne raztopine, pripravljene iz absolutnega etanola (Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA) in DEPC vode (Ambion® Inc., Austin, ZDA): 100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 30% etanolna raztopina;
- 1x PBS fosfatni pufer: 100 mL 10 × PBS zlijemo v 1000 mL bučko. Dolijemo DEPC vodo in preverimo pH vrednost in po potrebi uravnamo na 7,4.
 - Priprava 10 × PBS: matična raztopina
 - 80 g NaCl (Gram-Mol, Zagreb, Hrvaška);
 - 2 g KCl (Fluka Chemica, Seelze, Nemčija);
 - 2 g KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA);
 - 28,97 g Na₂HPO₄ × 12H₂O (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA)

Vse kemikalije raztopimo v 1000 mL bučki. Uravnamo pH vrednost na 7,4 in prefiltriramo skozi 0,22 µm filter. Hranimo pri sobni temperaturi in po 6-ih mesecih ali v primeru motne raztopine zavrzemo.

- 0,2 M HCl: V 100 mL bučko odmerimo manjši volumen 1x PBS, dodamo 20 mL 1 M HCl in dopolnimo do oznake z 1x PBS ;
- PBT pufer: V 1000 mL bučko pripravimo 4 mL 7% BSA in 1 mL Tween 20 (Fluka, Seelze, Nemčija). Dopolnimo do oznake z 1x PBS pufom. Pustimo stati čez noč in prefiltriramo skozi 0,22 µm filter. Hranimo v hladilniku.
 - 7% BSA: 0,7 g BSA (albumin from bovine serum, A2153, (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA)) v 10 ml 1 xPBS.
- Protitelesa anti-CD163 (EDHu-1) označena z [Alexa Fluor® 488]: NB110-40686AF488 (Novus Biologicals, Littleton, ZDA);
- DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol): Hoechst 33342, trihidroklorid, trihidrat, Invitrogen™ (Life Technologies, Carlsbad, ZDA);
- Glicerol

Aparature in pripomočki:

- Lateks rokavice;
- Sterilne kivete s pokrovom;
- Sterilni merilni valj;
- Sterilne bučke s pokrovom;
- Čaša;
- Pinceta;
- Pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- Nastavki za pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- Centrifuga Minispin (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- Tesnilo FixoGum (Marabo, Bietigheim-Bissingen, Nemčija);
- Krovno stekelce;
- Stojalo;
- Inkubator Enviro-Gene® (Scientific Industries, New York, ZDA);

- Filtritni sistem TPP® Filtermax (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA);
- Fluorescenčni mikroskop Olympus BX 41 (Olympus, Pensilvanija, ZDA)

Postopek:

1. Segrejemo rezine tkiva, ki so bile shranjene v zamrzovalniku na -75°C: 3 minute na sobni temperaturi. Nato stekelca obrišemo in tkivo obkrožimo z diamantnim pisalom;
2. Rezine rehidriramo v padajočih koncentracijah etanolnih raztopin: 100%, 95%, 85%, 70%, 50% in 30% etanol 2 minuti pri sobni temperaturi;
3. Stekelca prenesemo v kiveto z 0,2 M HCl: 20 minut;
4. Spiramo v DEPC vodi: 3 minute, sobna temperatura;
5. Spiramo v 1× PBS: 3 minute, sobna temperatura;
6. Nanesemo protitelesa proti CD163: 10 µL. Stekelca prenesemo v vlažno komoro in damo v inkubator.
7. Inkubiramo pri temperaturi 37°C, 70 minut: pazimo, da stekelca niso izpostavljeni svetlobi;
8. Spiramo v 1× PBS, 3 minute na sobni temperaturi: kiveta naj ne prepušča svetlobe, da preprečimo bledenje fluorescenčno označenega protitelesa;
9. Nanesemo 10 µL DAPI;
10. Inkubiramo pri temperaturi 37°C, 10 minut: pazimo, da stekelca niso izpostavljeni svetlobi;
11. Spiramo v 1x PBS, 2 minuti;
12. Stekelca osušimo, nanesemo 10 µL glicerola, pokrijemo s krovnim stekelcem in zamrznemo;
13. Preparat pregledamo pod fluorescenčnim mikroskopom (pred pregledom odmrznemo na sobni temperaturi);

3.5 Analiza LPL mRNA s postopkom FISH

FISH je citogenetska tehnika, ki se uporablja za detekcijo in lokalizacijo specifičnih DNA sekvenc na kromosomih, lahko pa tudi za detekcijo in lokalizacijo specifičnih RNA sekvenc v celicah ali vzorcih tkiva. Uporabljam označene sonde, ki jih v našem primeru hibridiziramo na mRNA in preparat pregledamo s fluorescenčnim mikroskopom.

Pri izvedbi postopka moramo preprečiti dostop RNAAZ v raztopine in s tem na našo vzorčno tkivo, saj le te lahko razgradijo iskano mRNA. Zato moramo posebno pozornost nameniti pripravi delovnega okolja, pripomočkov, raztopin ter samemu rokovaju z vzorci. RNAAZE moramo pred izvedbo eksperimentalnega dela odstraniti s površin uporabljenih aparatur in pripomočkov (avtoklaviranje ali prebrisanje površine z raztopino za odstranjevanje RNAAZ). Za pripravo reagentov uporabljam vodo brez RNAAZ (DEPC voda). Med samo izvedbo eksperimenta večkrat zamenjam rokavice.

Reagenti:

- DEPC voda (Ambion® Inc., Austin, ZDA);
- Etanolne raztopine, pripravljene iz absolutnega etanola (Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA) in DEPC vode (Ambion® Inc., Austin, ZDA): 100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 30% etanolna raztopina;
- 0,2 M HCl;
- 1x PBS fosfatni pufer;
- 2x SSC citrati pufer: V 1000 mL bučko odmerimo 100 mL 20× SSC in dolijemo 850 mL DEPC vode. pH vrednost uravnamo na $7,0 \pm 0,2$ z 1 M NaOH ali 1 M HCl. Dopolnimo z DEPC vodo do oznake.
 - Priprava 20× SSC: matična raztopina
 - 175,3 g NaCl (Gram-Mol, Zagreb, Hrvaška);
 - 88,25 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$, natrijev citrat dihidrat (Fluka, Seelze, Nemčija);

Stresemo v 1000 mL bučko, dolijemo DEPC vodo (malo pod oznako), uravnamo pH vrednost na 6,3 z 1 M HCl ali 1 M NaOH in dopolnimo

do oznake z DEPC vodo. Prefiltriramo preko 0,22 µm filtra. Hranimo pri sobni temperaturi in zavрžemo po 6-ih mesecih ali v primeru motne raztopine.

- 1 M HCl : 8,32 ml HCl do 100 mL z DEPC vodo.
- 1 M NaOH: 4 g NaOH na 100 mL DEPC voda
- Raztopina pepsina (pripravljena iz pepsina iz prašičje želodčne sluznice, 3200-4500 enot/mg, encimska aktivnost: 3411, (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA)): V 1,5 mL epico odmerimo 970 µL DEPC vode, 10 µL 1 M HCl in 20 µL 2,5% pepsina
 - Priprava 2,5% pepsina: Natehtamo 250 mg pepsina in raztopimo v 10 ml DEPC vode (če je aktivnost 3200-4500 enot) ali v 6,7 ml DEPC vode (če je aktivnost 2500-3000 enot). Pripravljeno raztopino razdelimo po 1 mL v avtoklavirane 1,5 mL epice in zamrznemo. Pred uporabo odmrznemo in nato hranimo v hladilniku.
- Raztopina formaldehida (pripravimo svežo raztopino): V 100 mL bučko odmerimo 5 mL 1 M MgCl₂ in 2,5 mL 37% formaldehida (Sigma-Aldrich, Nemčija), dopolnimo do oznake z 2x SSC.
 - 1 M Mg Cl₂: 20,33 g MgCl₂ x 6 H₂O (Fluka BioChemica, Nemčija) v 100 mL DEPC vode.
- Raztopina NP-40: Zatehtamo 0,9 g detergenta NP-40 (Igepal CA-630, Sigma, St. Louis, ZDA), pretresemo v primerno posodo, dodamo 60 mL 20x SSC (pH = 6,3) in 240 mL DEPC vode. Raztopino pustimo stati čez noč, da se detergent zanesljivo raztopi, nato prefiltriramo preko 0,22 µm filtra v prej sterilizirano reagenčno steklenico. Hranimo v hladilniku in v primeru nastanka motne usedline zavрžemo.
- PBT pufer;
- Trietanolamin (TEA) z anhidridom ocetne kisline: Odmerimo 2 mL TEA (Sigma, Nemčija) in dopolnimo do 150 mL z DEPC vodo. Tik pred uporabo dodamo 750 µL anhidrida ocetne kisline (Merck, Darmstadt, Nemčija).
- DAPI: Hoechst 33342, trihidroklorid, trihidrat, InvitrogenTM (Life Technologies, Carlsbad, ZDA);
- Anti-digoksigenin-rodamin protitelesa (kat. št. 11 207 750 910, (Roche, Basel, Švica));

- Raztopimo v 1 mL DEPC vode, $c = 200 \mu\text{g/mL}$, stabilno 2 meseca v hladilniku, razdelimo na alikvote in zamrznemo (zaščiteno pred svetlobo).
- Protitelo je potrebno pred nanosom redčiti na $20 \mu\text{g/ml}$ po priporočilu proizvajalca z 0,5% BSA v 1x PBS pufru. Količino prilagodi številu stekelc. Za 5 stekelc redčimo $5 \mu\text{L}$ matične raztopine ($200 \mu\text{g/mL}$) + $45 \mu\text{L}$ 0,5% BSA v 1x PBS.
 - 0,5% BSA v 1x PBS za redčenje Anti-digoksiigenin-rodamin protiteles: 0,05 g BSA v 10 mL 1x PBS (shranjevanje v hladilniku, v primeru motne raztopine zavrzemo);
- Hibridizacijski pufer KBI-FHB 100 μL (Leica Biosystems, Nussloch, Nemčija);

Aparature in pripomočki:

- Lateks rokavice
- Sterilne kivete s pokrovom;
- Sterilni merilni valj;
- Sterilne bučke s pokrovom;
- Čaša;
- Pinceta;
- Pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- Nastavki za pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- Centrifuga Minispin (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- Magneti za mešanje raztopin;
- Magnetno mešalo;
- Tesnilo FixoGum (Marabo, Bietigheim-Bissingen, Nemčija);
- Krovno stekelce;
- Stojalo;
- Inkubator Enviro-Gene® (Scientific Industries, New York, ZDA);
- Filtritni sistem TPP® Filtermax (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA);
- Vodna kopel s termostatom WB-4MS (Biosan, Riga, Latvija);
- Fluorescenčni mikroskop Olympus BX 41 (Olympus, Pensilvanija, ZDA)

Postopek:

1. Segrejemo rezine tkiva, ki so bile shranjene v zamrzovalniku na -75°C: 3 minute na sobni temperaturi. Nato obrišemo stekelca in obkrožimo tkivo z diamantnim pisalom;
2. Rezine rehidriramo v padajočih koncentracijah etanolnih raztopin: 100%, 95%, 85%, 70%, 50% in 30% etanol 2 minuti pri sobni temperaturi;
3. Stekelca prenesemo v kiveto z 0,2 M HCl: 20 minut;
4. Spiramo v DEPC vodi: 3 minute, sobna temperatura;
5. Spiramo v 1× PBS: 3 minute, sobna temperatura;
6. Nanešemo raztopino pepsina. Na vsako stekelce nanešemo 10 µL raztopine, damo v vlažno komoro in inkubiramo v inkubatorju 20 minut pri 37°C;
7. Spiramo v 2× SSC, 2 minuti, sobna temperatura;
8. Spiramo v 2× SSC, 2 minuti, sobna temperatura;
9. Prenesemo v raztopino formaldehida, 10 minut, sobna temperatura;
10. Spiramo v 2× SSC, 2 minuti, sobna temperatura;
11. Spiramo v 2× SSC, 2 minuti, sobna temperatura;
12. Acetiliramo v raztopini TAE z anhidridom ocetne kisline: TAE nalijemo v kiveto in postavimo na magnetno mešalo. V kiveto damo nekaj magnetkov in tik preden pomočimo stekelca dodamo še anhidrid ocetne kisline. Stekelca pustimo v raztopini 10 minut;
13. Spiramo v 2× SSC, 2 minuti, sobna temperatura;
14. Spiramo v 2× SSC, 2 minuti, sobna temperatura;
15. Prenesemo v 70% EtOH, 2 minuti, sobna temperatura;
16. Prenesemo v 90% EtOH, 2 minuti, sobna temperatura;
17. Prenesemo v 100% EtOH, 2 minuti, sobna temperatura;
18. Stekelca osušimo;
19. Pripravimo označene sonde. Sonde pred denaturacijo zmešamo s celičnim hibridizacijskim pufrom (CHP). 1 µL označene sonde dodamo 11 µL CHP. Sonde denaturiramo v vodni kopeli s temperaturo 80°C 10 minut;
20. Na stekelca nanešemo 10 µL označene sonde in pokrijemo s krovnim stekлом ter zatesnimo s tesnilom FixoGum;
21. Hibridiziramo 16 ur (čez noč) pri 37°C;

22. Odstranimo krovno steklo;
23. Spiramo v NP-40 pri 73°C, 4 minute;
24. Spiramo v PBT, sobna temperatura 4 minute;
25. Ponovno spiramo v PBT, sobna temperatura 4 minute;
26. Nanesemo 10 µL redčenega komercialnega protitelesa proti digoksiigeninu, označena z rodaminom;
27. Inkubiramo pri temperaturi 37°C, 70 minut: Stekelca damo v vlažni komori v inkubator. Preprečiti moramo dostop svetlobe;
28. Spiramo v raztopini PBT 3 minute, sobna temperatura;
29. Ponovno spiramo v raztopini PBT 3 minute, sobna temperatura;
30. Nanesemo 10 µL DAPI;
31. Inkubiramo 10 minut pri sobni temperaturi;
32. Spiramo v 1x PBS, sobna temperatura, 2 minuti;
33. Stekelce osušimo, nanesemo 10 µL glicerola, pokrijemo s krovnim stekelcem in zlepimo rob s Fixogumom;
34. Stekelca zamrznemo in hranimo v zamrzovalniku do mikroskopiranja;
35. Preparate pregledamo pod fluorescenčnim mikroskopom;

3.6 Analiza kolokalizacije fluorescence

Za analizo kolokalizacije fluorescence zaporedno izvedemo imunohistokemično analizo CD163 in analizo mRNA LPL s postopkom FISH na istih rezinah tkiva.

Postopek:

- Izvedemo postopek imunohistokemične analize CD163.
- Vzorce tkiva pregledamo pod fluorescenčnim mikroskopom in označimo lokacijo CD163 pozitivnih celic v tkivu (narišemo skico tkiva ter vanjo umestimo CD163 pozitivne celice). Po pregledu vzorce tkiva zamrznemo do nadaljnje obdelave.
- Vzorce tkiva odmrznemo in izvedemo postopek FISH. Ker so rezine že rehidrirane, postopek FISH pričnemo s korakom 5.
- Po končanem postopku FISH vzorce pregledamo pod fluorescenčnim mikroskopom in označimo lokacijo mRNA LPL pozitivnih celic.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Tumorsko mikrookolje in različni fenotipi makrofagov imajo pomemben vpliv na razvoj in napoved poteka bolezni različnih tumorjev. Celice v rakavem tkivu z izjemno velikim izražanjem in visoko aktivnostjo LPL korelirajo z nižjo stopnjo preživetja rakavih bolnikov [19]. V praksi se izražanje LPL mRNA v celicah zazna s postopkom FISH, sama izvedba tega postopka pa je relativno draga in časovno zamudna. Zato smo v raziskavi žeeli ugotoviti, ali celice z velikim izražanjem LPL izražajo tudi celični receptor CD163. Potrditev naše hipoteze bi omogočila vpeljavo imunohistokemične analize CD163 za detekcijo celic z velikim izražanjem LPL. To bi olajšalo nadaljnje raziskave na tem področju, saj je imunohistokemična analiza v primerjavi s postopkom FISH enostavnejša, cenejša in manj občutljiva na vpliv zunanjih dejavnikov ter tako primernejša za rutinsko delo.

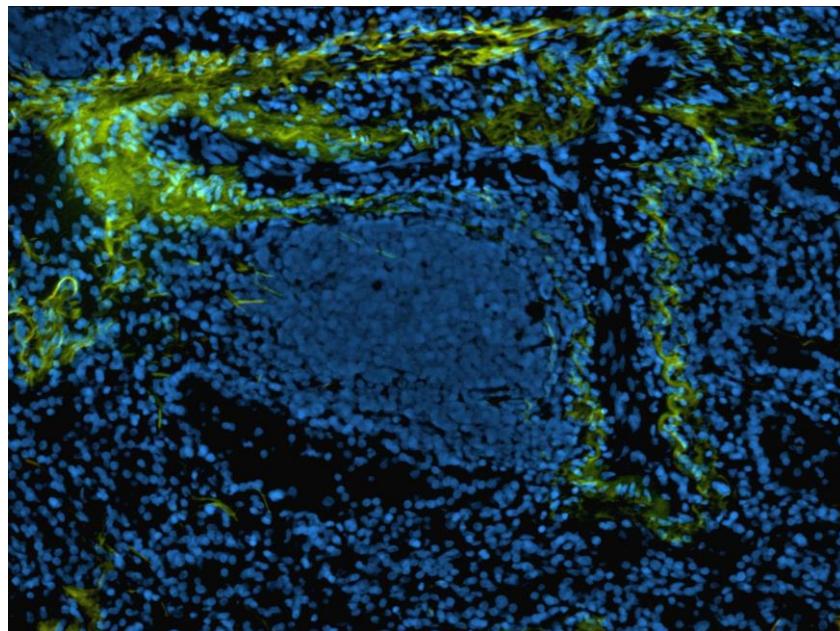
4.1 Imunohistokemična analiza CD163 pozitivnih celic

Razvoj našega postopka za imunohistokemično analizo CD163 je temeljal na imunohistokemičnem postopku, uporabljenem v predhodnih raziskavah na fakulteti za farmacijo v Ljubljani [21]. Naše izhodišče so bile zamrznjene rezine nedrobnoceličnega pljučnega rakava tkiva. Zamrznjene rezine so dehidrirane, zato moramo v prvem koraku opraviti rehidracijo rezin z raztopinami etanola padajočih koncentracij. Vse raztopine pripravimo iz absolutnega etanola, ki ga redčimo z DEPC vodo. Sledi obdelava rezin v raztopini HCl, ki služi za zmanjšanje avtofluorescence. Za detekcijo iskanih antigenov CD163 smo uporabili mišja protitelesa proti CD163 označena s fluoroforom Alexa Fluor® 488, ki omogočajo vizualno zaznavo antigenov s pomočjo uporabe fluorescenčnega mikroskopa. Za lažjo prepoznavo celic oziroma celične strukture tkiva uporabimo fluorescenčno barvilo DAPI, ki prosto prehaja skozi membrano in se veže na jedrno DNA, zato se jedra pod fluorescenčnim mikroskopom obarvajo modro.

Vizualna zaznavna antiga CD163 je pogojena z visoko specifičnostjo uporabljenih protiteles proti antigenu CD163. To nam omogoča razlikovanje CD163 pozitivnih celic in celic, ki tega antiga na svoji površini ne izražajo, saj nevezana protitelesa po inkubaciji

speremo s spiralno raztopino. V primeru nespecifične vezave bi pod fluorescenčnim mikroskopom videli razpršene točkaste signale, zato iskanje CD163 pozitivnih celic ne bi bilo mogoče.

Na uspešnost zaznave CD163 pozitivnih celic pa lahko vplivajo tudi drugi dejavniki, izpostavili bi predvsem morebitno avtofluorescenco tkiva. Pod fluorescenčnim mikroskopom presvetlimo rezino tkiva s svetlobo določene valovne dolžine, s katero ekscitiramo fluorofor vezan na protitelesa in opazujemo fluorescenco. Lahko pa se zgodi, da pri tej valovni dolžini fluorescirajo tudi nekatere tkivne ali celične strukture, kar lahko prekrije signal CD163 pozitivnih celic. V zelenem področju spektra svetlobe lahko opazimo močno avtofluorescenco žilja [22]. Odgovorna sta predvsem dva gradnika žilne stene, in sicer elastin ter kolagen. Ti dve molekuli vsebujejo več fluoroforov, ki jih zaznamo kot avtofluorescenco v tkivu. Ti signali niso točkasti, kot so v primeru signalov vezave protiteles proti CD163, ampak jih vidimo kot močne zeleno obarvane lise v tkivu. Zato tkiva v področju žilja niso primerna za oceno. Primer avtofluorescence v tkivu je prikazan na sliki 3.

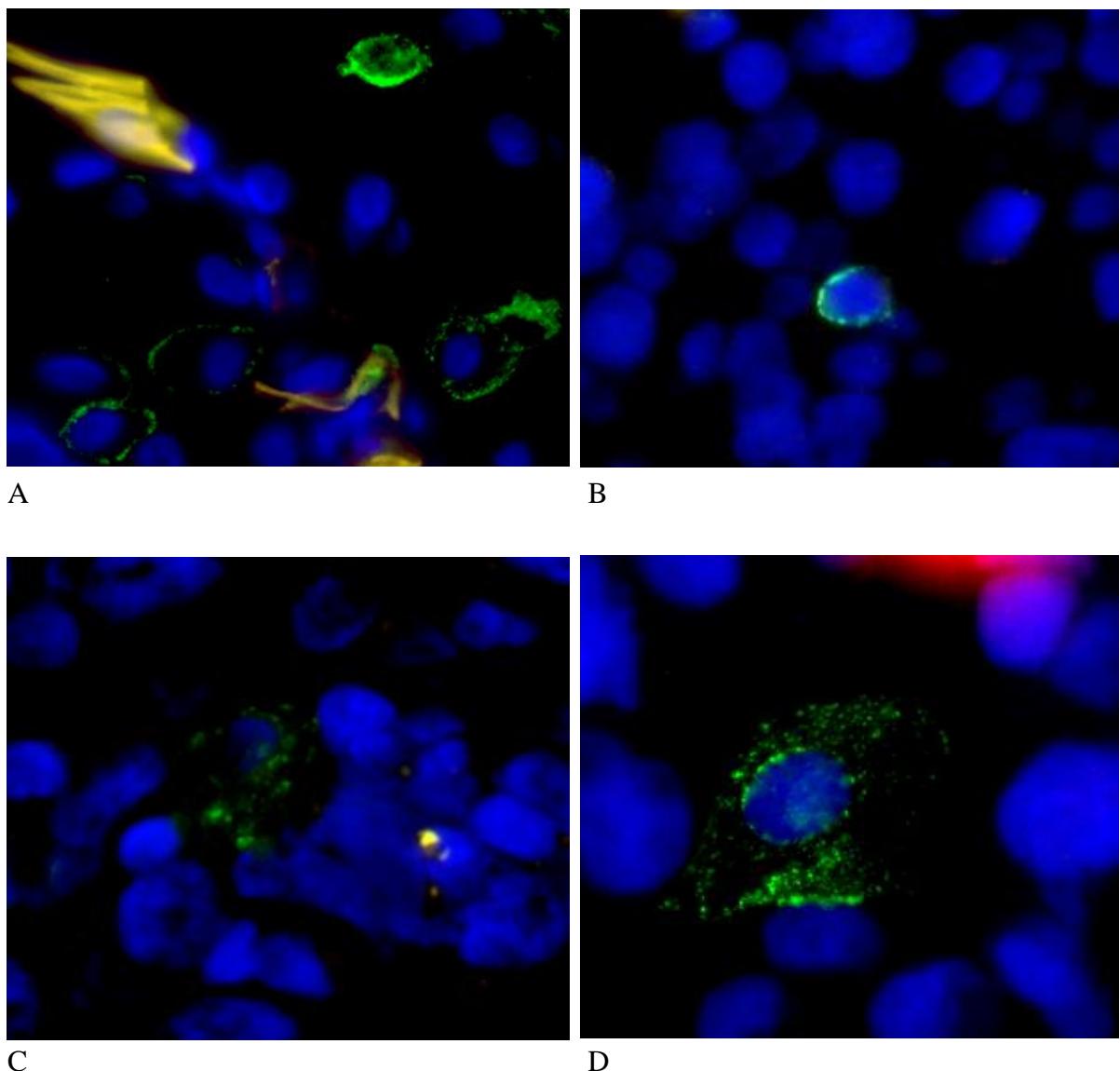


Slika 3: Prikaz avtofluorescence v pljučnem rakavem tkivu, 100-kratna povečava

Za uspešno izvedbo imunohistokemične analize CD163 je zelo pomembna koncentracija protiteles. Prenizka koncentracija protiteles ne omogoča vidne zaznave CD163 pozitivnih celic, previsoka koncentracija protiteles pa lahko povzroči slabše spiranje tkiva po

inkubaciji, kar se lahko kaže kot povečano število nespecifičnih signalov v tkivu. Proizvajalec v dokumentaciji ne navaja optimalne koncentracije protiteles, zato smo jo morali določiti sami s serijo imunohistokemičnih poskusov na naših rezinah tkiva. Izkazalo se je, da je bilo v našem primeru optimalno redčenje protitelesa s pufrom v razmerju 1:100.

Na sliki 4 je predstavljen prikaz CD163 pozitivnih celic po uspešno zaključenem imunohistokemičnem postopku analize antigenov CD163. S fluorescenčnim mikroskopom smo posneli več slik z različnimi filtri, ki prepuščajo le svetlobo določene valovne dolžine, odvisno od izbranega fluorofora. Programska oprema fluorescenčnega mikroskopa omogoča združitev teh slik v sklopljeno sliko. Modro obarvane strukture predstavljajo jedra, ki nam omogočajo vizualni pregled nad strukturo tkiva ter določitev lokacije posamezne celice v tkivu; zelenorumene lise v tkivu so posledica autofluorescence nekaterih struktur v tkivu; svetlo zeleni točkasti signali okrog jeder predstavljajo fluorescenco protiteles, vezanih na receptorje CD163 na membrani celice. Iz slike je razvidno, da le nekatere celice v tkivu emitirajo zeleno fluorescenco, kar kaže na visoko specifičnost vezave naših protiteles. Poleg tega smo za negativno kontrolo po enakem postopku analizirali dodatno rezino tkiva, na katero nismo nanesli označenega protitelesa proti CD163. Zeleno obarvanih celic v tem tkivu nismo našli. S tem smo potrdili ustreznost/specifičnost vezave naših označenih protiteles na antigene CD163 v ostalih pozitivnih tkivih, kar se je kazalo v zelenih točkastih signalih v okolini celičnih jeder.



Slika 4: Prikaz CD163 pozitivnih celic po postopku imunohistokemične analize CD163 v različnih vzorcih pljučnega rakavega tkiva; A), B) in C) 600-kratna povečava, D) 1000-kratna povečava

4.2 Analiza LPL mRNA s postopkom FISH

Za analizo mRNA LPL smo izvedli postopek FISH, ki so ga v ta namen razvili v predhodnih raziskavah na Fakulteti za farmacijo v sodelovanju s Specializiranim hematološkim laboratorijem v UKC Ljubljana. V prvih poskusih smo postopek izvedli samostojno na zamrznjenih rezinah nedrobnoceličnega pljučnega rakavega tkiva, saj smo

želeli preveriti kakovost in specifičnost naših sond ter uspešnost izvedbe samega postopka. Po samostojno izvedenem postopku FISH, ki je potrdil, da so naše sonde specifične, smo postopek FISH sklopili z imunohistokemično analizo CD163 pozitivnih celic.

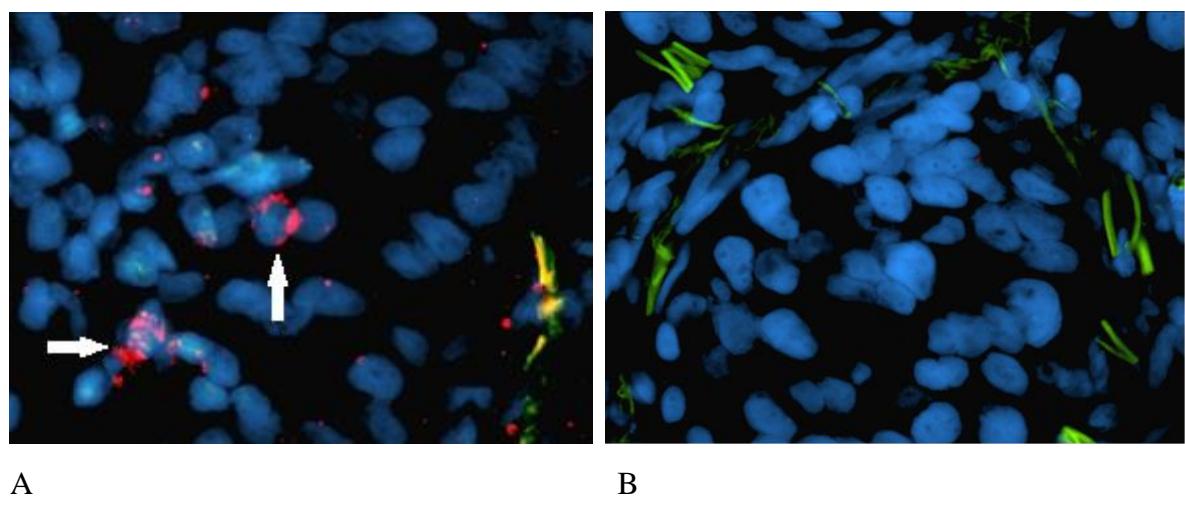
Postopek FISH traja dva dni. Prvi dan se izvedejo koraki, ki so nujni za uspešno hibridizacijo sond z mRNA LPL. Dehidrirane rezine je potrebno rehidrirati v padajočih koncentracijah etanolnih raztopin in jih nato obdelati v raztopini HCl za zmanjšanje avtofluorescence. S pepsinizacijo v raztopini pepsina dosežemo perforacijo membrane celic, kar olajša prehajanje označenih komplementarnih nukleotidov (sond) v notranjost celice in hibridizacijo z mRNA LPL. Po pepsinizaciji celične strukture refiksiramo v raztopini formaldehida. Z acetilacijo v raztopini TAE dosežemo blokado polarnih skupin tkiva, ki bi lahko povzročile nespecifično vezavo sond v tkivu. Sonde je pred nanosom potrebno denaturirati, saj se le enoverižni nukleotidi hibridizirajo s tarčno mRNA, naše sonde pa so dvojerižne. Hibridizacija mora potekati 16-18 ur, nato pa sledi še izvedba korakov, ki so potrebni za detekcijo mRNA LPL pod fluorescenčnim mikroskopom. Prikaz mRNA LPL pozitivnih celic nam omogočajo sonde, označene z digoksigeninom, na katere vežemo protitelesa proti digoksigeninu, označena z rodaminom. Pod fluorescenčnim mikroskopom opazujemo itenzitetu fluorescence rodamina [20].

Na uspešnost izvedbe postopka FISH lahko vplivajo zunanji dejavniki, ki pa se jim lahko s skrbnim načrtovanjem in izvedbo samega poskusa v večji meri izognemo. Eden izmed najpomembnejših dejavnikov je kontaminacija raztopin reagentov z mRNAze-ji. mRNAze so encimi, ki razgrajujejo mRNA. Uspešnost našega poskusa je pogojena z ohranitvijo mRNA molekul v celicah, saj se le tako lahko sonde prilegajo mRNA v tkivu. V primeru razgradnje LPL mRNA hibridizacija sond ne bi bila uspešna in bi jih izprali iz celic, zato bi bil rezultat lažno negativen. Za preprečitev kontaminacije je potrebnih več ukrepov: med rokovanjem z vzorci moramo vedno uporabljati rokavice in jih tekom izvedbe poskusa tudi večkrat zamenjati; pred izvedbo poskusa moramo delovno površino temeljito očistiti z raztopino za deaktivacijo mRNAz; vse pripomočke je potrebno avtoklavirati ali prebrisati z raztopino za deaktivacijo mRNAz. Vse raztopine, ki jih v poskusu uporabljamo, je potrebno pripraviti z DEPC vodo.

Drugi pomemben zunanji dejavnik, ki vpliva predvsem na zaznavanje pozitivnih celic pod fluorescenčnim mikroskopom, pa je svetloba. Svetloba povzroči bledenje

fluorescenčnega barvila in s tem oteži ali onemogoči zaznavanje pozitivnih celic pod mikroskopom. Svetlobi se težko popolnoma izognemo, lahko pa uvedemo nekaj preventivnih ukrepov. Med izvedbo poskusa stremimo k temu, da so vzorci čim manj izpostavljeni svetlobi. Zato moramo kadičke, ki jih uporabljam za spiranje vzorcev, zaščititi pred svetlobo. Prav tako moramo poskrbeti, da inkubacija s fluorescenčno označenimi protitelesi poteka v temi. Zunanja okenska stekla zastremo s senčili oziroma poskus izvedemo v temnejšem prostoru.

Slika 5 prikazuje mRNA LPL pozitivne celice (A) po uspešno zaključeni izvedbi postopka FISH. Nastanek slike je omogočila programska oprema povezana s fluorescenčnim mikroskopom, ki združi posnetke pridobljene z različnimi filtri v sklopljeno sliko. Modro obarvane strukture so celična jedra. Rumeno-zelene lise so posledica avtofluorescence v tkivu, najverjetneje v področju žilja. Močna rdeča fluorescencija v citoplazmi celice, ki obdaja jedro, pa predstavlja LPL mRNA pozitivno celico.



Slika 5: Prikaz LPL mRNA pozitivnih celic po postopku FISH v vzorcu pljučnega rakavega tkiva (T5a); A) uporabljena sonda z označenim repkom, B) uporabljena sonda brez označenega repka

Uspešnost poskusa lahko ocenimo le primerjalno z negativno kontrolo. V ta namen smo na zaporedno rezino istega tkiva namesto sonde z označenim repkom nanesli sondi brez označenega repka, na katero se specifična protitelesa proti digoksigeninu ne vežejo, zato jih po inkubaciji speremo iz celic. Našo negativno kontrolo na sliki 5 predstavlja desna

slika (B), na kateri ni moč opaziti rdeče fluorescence, kar potrjuje specifičnost našega postopka. Na levi sliki (A) pa lahko opazimo več LPL mRNA pozitivnih celic. Opazimo lahko tudi več posameznih rdečih obarvanih točk, ki so lahko posledica nepopolnega izpiranja označenih sond iz tkiva. Lahko pa kažejo tudi na to, da tudi druge celice v rakavem tkivu v manjši meri izražajo LPL mRNA, kot so ugotovili v eni izmed preteklih študij [23].

4.3 Analiza kolokalizacije fluorescence

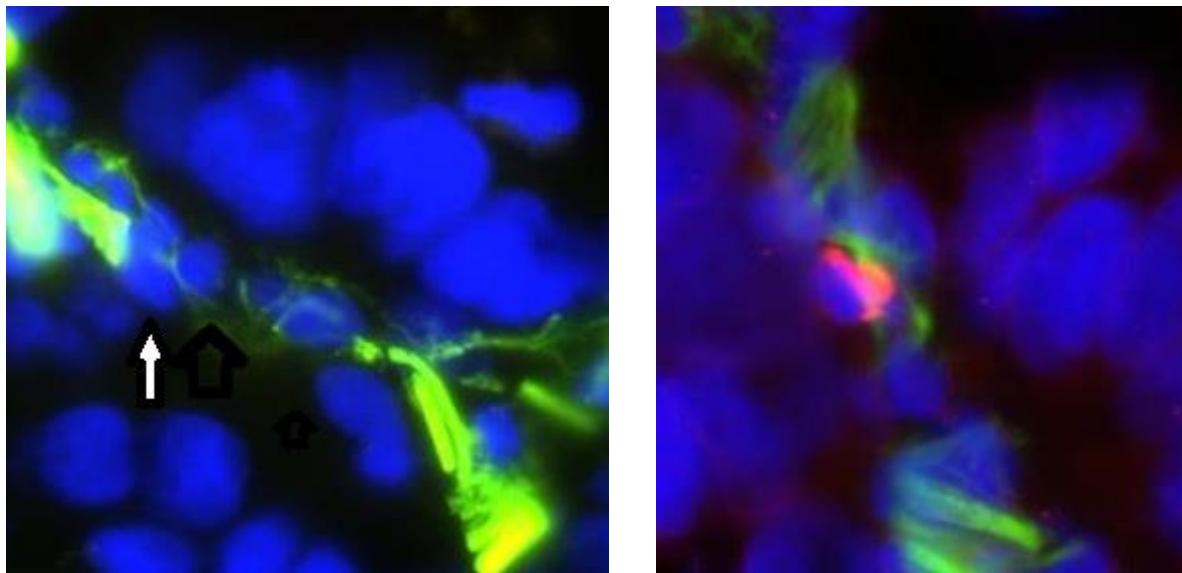
Za analizo kolokalizacije fluorescence smo sklopili postopek imunohistokemične analize CD163 s postopkom FISH za analizo LPL mRNA. Tako kot pri samostojnih postopkih smo tudi to analizo izvedli na rezinah NSCLC rakavega tkiva. Poskusili smo potrditi hipotezo, da celice z velikim izražanjem LPL izražajo tudi membranski receptor CD163.

Postopka IHC ter FISH smo sklopili tako, da smo najprej izvedli postopek IHC ter po pregledu tkiva pod fluorescenčnim mikroskopom na istih rezinah tkiva izvedli še postopek FISH. Obratna sklopitev postopkov (pričetek izvedbe analize s postopkom FISH) ni možna, saj bi s pepsinizacijo tkiva poškodovali oziroma razgradili tudi iskane antigene CD163 na površini celic.

Analiza kolokalizacije fluorescence v večji meri ni bila uspešna. Po izvedbi postopka IHC smo brez težav našli celice z intenzivno zeleno fluorescenco, ki smo jih opredelili kot CD163 pozitivne celice. Ravno tako smo v nadaljevanju po sklopitvi s postopkom FISH našli celice z intenzivno rdečo fluorescenco, ki smo jih opredelili kot LPL mRNA pozitivne celice. Težava pa se pojavi pri oceni, ali smo v obeh primerih našli isto celico. Ugotovili smo, da tkivo po izvedbi postopka FISH niti na ravni arhitekture tkiva, še manj pa na ravni posameznih celic, ne ohrani enake strukture, kot smo jo opisali po izvedbi postopka IHC. Postopek FISH tako spremeni tkivo, da nedvoumna lokalizacija istih celic ni mogoča.

Primer spremembe tkiva je razviden na sliki 6. Glede na širšo oceno strukture vzorčnega tkiva nam je uspelo najti isti predel tkiva. V tkivu se sicer najlažje orientiramo glede na področja z visoko avtofluorescenco. Če primerjamo levo sliko (A) z desno sliko (B),

vidimo, da se je področje strukturno spremenilo. Močno rdeče obarvana celica na sliki (B) je verjetno tudi CD163 pozitivna, vendar tega zaradi strukturnih sprememb ni moč z gotovostjo trditi.



Slika 6: Tkivo po izvedbi postopka IHC (A) ter po sklopitevi s postopkom FISH (B)

Kljub neuspešni analizi kolokalizacije fluorescence smo po pregledu vzorčnega tkiva prišli do nekaj pomembnih zaključkov. Prva ugotovitev se nanaša na samo razmerje med CD163 pozitivnimi in LPL mRNA pozitivnimi celicami. CD163 pozitivnih celic je v tkivu bistveno več kot LPL mRNA pozitivnih celic. To razmerje je vsaj desetkratno v prid CD163 pozitivnih celic. Te celice so tudi morfološko nekoliko različne, jedra so nekoliko manjša. Druga ugotovitev pa se nanaša na lokacijo CD163 pozitivnih ter LPL mRNA pozitivnih celic v tkivu. CD163 pozitivne celice se večinoma nahajajo v področju žilja in veziva, v manjši meri pa jih najdemo tudi v centralnih homogenih predelih skupkov tumorskih celic. LPL mRNA pozitivne celice pa se nahajajo izključno v področju žilja, večinoma znotraj teh struktur. Kot smo ugotovili pa je v področju žilja prisotno tudi veliko autofluorescence predvsem na zelenem filtru fluorescenčnega mikroskopa, pod katerim opazujemo CD163 pozitivne celice. Zato celice v področju žilja težko ocenjujemo in še težje dokumentiramo.

5. SKLEP

- Razvili smo imunohistokemično metodo za analizo antigenov CD163 na rezinah nedrobnoceličnega pljučnega rakavega tkiva. Postopek bi potencialno lahko uporabili tudi na rezinah drugih tipov rakavega tkiva.
- Potrdili smo uspešnost sinteze označenih oligonukleotidov in celotne metode FISH za analizo LPL mRNA na rezinah nedrobnoceličnega pljučnega rakavega tkiva.
- Sklopili smo postopka IHC in FISH za analizo kolokalizacije fluorescence CD163 pozitivnih ter LPL mRNA pozitivnih celic.
- Sklopitev postopkov je bila uspešna, našli smo tako CD163 kot tudi LPL mRNA pozitivne celice, vendar ocena kolokalizacije fluorescence ni mogoča zaradi strukturnih sprememb tkiva med izvedbo postopka FISH.
- CD163 pozitivne celice se nahajajo pretežno v področju žilja in veziva, vendar jih najdemo tudi v centralnih predelih tumorskih skupkov.
- LPL mRNA pozitivne celice se nahajajo izključno v področju žilja.
- Ugotovili smo, da je CD163 pozitivnih celic bistveno več kot LPL mRNA močno pozitivnih celic. To razmerje je vsaj desetkratno ali več v prid CD163 pozitivnim celicam.
- V našem delu nam ni uspelo potrditi hipoteze, da imajo celice z velikim izražanjem LPL tudi membranski receptor CD163. Strukturne spremembe tkiva med izvedbo eksperimentalnega dela so onemogočile nedvoumno oceno celic in s tem potrditev oz. zavrnitev hipoteze.

6. LITERATURA

1. Ramanathan S, Jagannathan N. Tumor Associated Macrophage. A Phenotype Review, Traits and Functions. *Iran J Cancer Prev* 2014; 7:1-8
2. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers* 2014; 6: 1670-1690
3. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemla A. Cancer Statistics. *Cancer J Clin* 2014; 64:9-29
4. Zhang W, Pal SK, Liu X, Yang C, Allahabadi S, et al. Myeloid Clusters Are Associated with a Pro-Metastatic Environment and Poor Prognosis in Smoking-Related Early Stage non-Small Cell Lung Cancer. *PloS ONE* 2013; 8: e65121.
5. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 1993; 81: 1607–13
6. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2010; 362:875-85
7. Lau SK, Chu PG, Weiss LM. CD163. A Specific Marker of Macrophages in Paraffin-Embedded Tissue Samples. *Am J Clin Pathol* 2004; 122:794-801.
8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9332> , dostopno 18.11.2014
9. Edin S, Wikberg ML, Dahlin AM, Rutegard J, Oberg A, Oldenborg PA, Palmqvist R, et al. The Distribution of Macrophages with a M1 or M2 Phenotype in Relation to Prognosis and the Molecular Characteristics of Colorectal Cancer. *PloS ONE* 2012; 7: e47045.
10. Cornelissen R, Lievense LA, Maat AP, Hendriks RW, Hoogsteden HC, et al. Ratio of Intratumural Macrophage Phenotypes Is a Prognostic Factor in Epithelial Malignant Pleural Mesothelioma. *PloS ONE* 2014; 9: e106742.
11. Kawamura K, Komohara Y, Takaishi K, Katabuchi H, Takeya M. Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous epithelial tumors. *Pathol Int* 2009; 59: 300-305
12. Ohtaki Y, Ishii G, Nagai K, Ashimine S, Kuwata T, et al. Stromal macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2010; 5:1507-15
13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd>ShowDetailView&TermToSearch=4481> , dostopno 18.11.2014

14. 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; 67:4783-9.
15. Beyer M, Mallmann MR, Xue J, Staratschek-Jox A, Vorholt D, et al. High-Resolution Transcriptome of Human Macrophages. *PLoS ONE* 2012; 7:e45466
16. Akila P, Prashant V, Suma MN, Prashant SN, Chaitra TR. CD163 and its expanding functional repertoire. *Clin Chim Acta* 2012; 413:669-74.
17. Onofre G, Kolácková M, Jankovicová K, Krejsek J. Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica* 2009; 52:57-61
18. http://www.merckmanuals.com/professional/hematology_and_oncology/anemias_caused_by_hemolysis/overview_of_hemolytic_anemia.html, dostopno 18.11.2014
19. Trost Z, Sok M, Marc J, Černe D. Increased lipoprotein lipase activity in non-small cell lung cancer tissue predicts shorter patient survival. *Arch Med Res* 2009; 40: 364-368.
20. Malavašič T. Sinteza mRNA LPL v makrofagih nedrobnoceličnega pljučnega rakavega tkiva. Diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2011.
21. Malavašič T. Prikaz makrofagno specifičnih membranskih označevalcev na celicah z visokim izražanjem mRNA LPL v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu. Magistrska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2014.
22. <http://www.uhnres.utoronto.ca/facilities/wcif/PDF/Autofluorescence.pdf>, dostopno 7.10.2015
23. Podgornik H, Sok M, Kern I, Marc J, Černe D. Lipoprotein lipase in non-small cell lung cancer tissue is highly expressed in a subpopulation of tumor-associated macrophages. *Pathol Res Pract* 2013; 209:516-520.
24. http://www.mdpi.com/cancers/cancers-06-01670/article_deploy/html/images/cancers-06-01670-g001-1024.png, dostopno 15.12.2015
25. http://static.sdu.dk/mediafiles//8/1/7/%7B8175EF73-B714-4D10-B2BB-B2914C3866A1%7DGraversen_CD163function.jpg, dostopno 15.12.2015