



Instytut Biologii Medycznej
Polskiej Akademii Nauk



Autoreferat rozprawy doktorskiej

Iwona Karwaciak

**Działanie szlaku sygnalizacyjnego NF- κ B
w kontekście aktywacji receptora TLR2
w modelu różnicowania monocytu-makrofagi**

Promotor

Dr hab. Łukasz Pułaski, prof. IBM PAN

Łódź 2016



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem Dr hab. Łukasza Pułaskiego, prof. IBM PAN w Pracowni Regulacji Transkrypcyjnej Instytutu Biologii Medycznej PAN.

Opisane prace realizowano w ramach projektu POIG.01.01.02-10-107/09 pt. „Badanie mechanizmów molekularnych na styku organizm ludzki – patogen – czynniki środowiska (InterMolMed)”, współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013.

Życiorys naukowy

Wykształcenie:

- 07.2007 - Uzyskanie tytułu magistra inżyniera biotechnologii, Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności. Praca dyplomowa pt. „Fluorescencyjne znakowanie bakterii gram dodatnich za pomocą białka GFP”.

Publikacje:

- de Boussac H, Ratajewski M, **Sachrajda I**, Köblös G, Tordai A, Pulaski L, Buday L, Váradi A, Arányi T. The ERK1/2-hepatocyte nuclear factor 4alpha axis regulates human ABCC6 gene expression in hepatocytes. *J Biol Chem*. 2010 Jul 23;285(30):22800-8. IF=5.328; Punkty MNiSW=35
- **Sachrajda I**, Ratajewski M. Mithramycin A suppresses expression of the human melanoma-associated gene ABCB8 *Mol Genet Genomics*. 2011 Jan;285(1):57-65. IF=2.728; Punkty MNiSW=25
- Wagner W, **Sachrajda I**, Pułaski L, Hałatek T, Dastych J. Application of cellular biosensors for analysis of bioactivity associated with airborne particulate matter. *Toxicol In Vitro*. 2011 Aug;25(5):1132-42. IF=2.775; Punkty MNiSW=25
- Ratajewski M, de Boussac H, **Sachrajda I**, Bacquet C, Kovács T, Váradi A, Pulaski L, Arányi T. ABCC6 expression is regulated by CCAAT/enhancer-binding protein activating a primate-specific sequence located in the first intron of the gene. *J Invest Dermatol*. 2012 Dec;132(12):2709-17. IF=6.193; Punkty MNiSW=50
- **Karwaciak I**, Pulaski L, Ratajewski M. Regulation of the human ABCB10 gene by E2F transcription factors. *Genomics*. 2014 Dec;104(6 Pt B):520-9. IF=2.284; Punkty MNiSW=30
- Michalski M, St Swierzko A, Lukaszewicz J, Man-Kupisinska A, **Karwaciak I**, Przygodzka P, Cedzynski M. Ficolin-3 activity towards the opportunistic pathogen, *Hafnia alvei*. *Immunobiology*. 2015 Jan;220(1):117-23. IF=3.044; Punkty MNiSW=25
- **Karwaciak I**, Gorzkiewicz M, Ryba K, Dastych J, Pulaski L, Ratajewski M. AC-93253 triggers the downregulation of melanoma progression markers and the inhibition of melanoma cell proliferation. *Chem Biol Interact*. 2015 Jul 5;236:9-18. IF=2.577; Punkty MNiSW=30
- Mankiewicz-Boczek J, **Karwaciak I**, Ratajewski M, Gągała I, Jurczak T, Zalewski M, Pułaski Ł. Application of cellular biosensors for detection of atypical toxic bioactivity in microcystin-containing cyanobacterial extracts. *Aquat Toxicol*. 2015 Nov;168:1-10. IF=3.451; Punkty MNiSW=45

Suma IF=28,38

Suma punktów MNiSW=265

Komunikaty i doniesienia zjazdowe:

- **Sachrajda I**, Gorzkiewicz M, Pułaski Ł. “Protective role of antioxidant systems in human monocytic cell lines during differentiation and stimulation with a TLR2 ligand”. 3 Europejski Kongres Immunologiczny, Glasgow 2012.
- **Sachrajda I**, Gorzkiewicz M, Pułaski Ł. “Consequences of TLR2 activation in monocyte - macrophage differentiation models”. *Mikrobiot*, Łódź 2013.

- **Karwaciak I**, Gorzkiewicz M, Pułaski Ł. “TLR2 stimulation in monocyte - macrophage differentiation models affects antioxidant systems and oxidative stress resistance”. Kongres Brytyjskiego Towarzystwa Immunologicznego, Liverpool 2013.

Udział w projektach badawczych:

- Projekt NCN nr 2013/11/N/NZ6/03097 „Gatunki i szczepy Mycobacterium o różnym składzie ściany komórkowej: rola receptorów wzorców obcości w aktywacji nieswoistej odpowiedzi odpornościowej”. Charakter udziału: kierownik.
- Projekt NCN nr 2012/07/B/NZ8/03991 „Zastosowanie komórkowych biosensorów reporterowych w ekotoksykologii sinic: nowe "tarcze" dla bioaktywności”. Charakter udziału: wykonawca.
- Projekt w ramach programu „Iuventus Plus”, nr IP2011 045171 „Poszukiwanie nowych determinant ekspresji ludzkiego genu *ABCB8*, związanego z opornością wielolekową czerniaków”. Charakter udziału: wykonawca.
- Projekt POIG.01.01.02-10-107/09 „Badania mechanizmów molekularnych na styku organizm ludzki - patogen – czynniki środowiska”. Charakter udziału: wykonawca.
- Projekt PL 0107 finansowany ze środków Mechanizmu Finansowego Europejskiego Obszaru Gospodarczego oraz Norweskiego Mechanizmu Finansowego. „Biosensory komórkowe dla zautomatyzowanego monitoringu zanieczyszczenia środowiska”. Charakter udziału: wykonawca.
- Projekt MNiSW nr 2P04B 001 29 „Komórkowy biosensor stresu oksydacyjnego - opracowanie i walidacja”. Charakter udziału: wykonawca.

Założenia i tezy rozprawy doktorskiej

Monocyty i makrofagi stanowią kluczowy element systemu odporności wrodzonej jako przedstawiciele profesjonalnych komórek fagocytujących, zdolnych do produkcji cytokin, reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu i uczestniczące w aktywacji systemu odporności nabytej. Podczas różnicowania, rozpoznawania patogenów i fagocytozy dochodzi do zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu w wyniku aktywacji oksydazy NADPH. Z jednej strony reaktywne formy tlenu funkcjonują jako cząsteczki sygnałowe i stanowią część mechanizmu obrony przed patogenami, z drugiej strony ich nadmierna produkcja może prowadzić do szeregu niekorzystnych zmian, m.in. do stresu oksydacyjnego, deregulacji szlaków przekazywania sygnału czy uszkodzenia składników komórek. Zatem ze względu na swoją funkcję komórki monocytów i makrofagów mogą być szczególnie narażone na niekorzystne działanie RFT, co wiąże się z powstawaniem uszkodzeń składników komórek: DNA, białek, lipidów. W celu uniknięcia szkodliwego działania reaktywnych form tlenu komórki wykształciły różnorodne mechanizmy antyoksydacyjne.

Celem badań były: ocena poziomu ekspresji elementów szlaków przekazywania sygnału związanych z czynnikiem transkrypcyjnym NF- κ B i ich aktywności w modelach różnicowania „monocyty-makrofagi” oraz po aktywacji receptora TLR2; identyfikacja systemów antyoksydacyjnych aktywnych w komórkach modelowych; weryfikacja zmian ich aktywności w czasie różnicowania „monocyty-makrofagi” i po stymulacji komórek lipopeptydem bakteryjnym - ligandem dla receptora TLR2; ocena znaczenia zidentyfikowanych systemów antyoksydacyjnych dla przeżywalności komórek w warunkach narażenia komórek na stres oksydacyjny przed i po ekspozycji na bodziec różnicujący oraz przed i po aktywacji receptora TLR2; oraz weryfikacja rezultatów otrzymanych dla modelowych linii komórkowych przy użyciu monocytów izolowanych *ex vivo* (z krwi zdrowych dawców).

W badaniach zastosowano dwa modele komórek typu monocytarnego, linie komórkowe THP-1 i Mono Mac 6 (MM6), charakteryzujące się różnym stopniem dojrzałości; różnicowano je dla uzyskania modelu komórek makrofagowych przy użyciu (odpowiednio) PMA lub mieszaniny witaminy D3 i TGF- β 1. Zastosowano również komórki monocytów izolowane z kożuszka leukocytno-płytkowego. Komórki monocytów różnicowano w makrofagi typu M1 i M2 przy użyciu (odpowiednio) GM-CSF lub M-CSF.

Skuteczność różnicowania komórek typu monocytarnego potwierdzono poprzez analizę markerów różnicowania na poziomie RNA i białka.

Analizowano wpływ różnicowania i stymulacji receptora TLR2 na funkcje komórek. Różnicowanie przyczyniało się do wzrostu ilości produkowanego anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach THP-1, wzrostu zdolności do fagocytozy w komórkach monocytów oraz predysponowało komórki typu monocytarnego do szybszego i intensywniejszego wydzielania cytokin w odpowiedzi na czynnik stymulujący. Stymulacja receptora TLR2 skutkowała wzrostem zdolności do fagocytozy (w niezróżnicowanych THP-1 i zróżnicowanych MM6) i wzrostem ilości wydzielanych cytokin (komórki niezróżnicowane i zróżnicowane).

Warunki stresu oksydacyjnego tworzono bezpośrednio przez dodanie nadtlenu wodoru lub pośrednio poprzez ekspozycję komórek na czynniki indukujące powstawanie rodników tlenowych: parakwat generujący anionorodnik ponadtlenkowy lub mieszaninę chlorku żelaza (II) i kwasu askorbinowego (Fe/Asc) generującą rodnik hydroksylowy.

Komórki narażone są na działanie nadtlenu wodoru pochodzącego z różnych źródeł, zarówno wewnątrzkomórkowych (gdy produkowany jest on w cytoplazmie, mitochondriach, peroksysomach), jak i zewnątrzkomórkowych (gdy produkowany jest przez inne komórki). Nadtlenek wodoru zdolny jest do przenikania przez błonę komórkową, dlatego też może przemieszczać się pomiędzy organellami komórkowymi i cytoplazmą i działać w obszarach oddalonych od miejsca produkcji, a dodany egzogenicznie może przenikać do wnętrza komórki. Analiza żywotności komórek i powstawania uszkodzeń oksydacyjnych białek wykazała, że bardziej dojrzałe komórki MM6, w porównaniu z THP-1, charakteryzowały się znacznie wyższą opornością na działanie nadtlenu wodoru. Większa oporność wiązała się z mniejszą ilością generowanych uszkodzeń oksydacyjnych w tych komórkach. Natomiast w komórkach THP-1 do wzrostu oporności na nadtlenek wodoru przyczyniały się: różnicowanie w kierunku komórek typu makrofagowego i aktywacja receptora TLR2 w komórkach niezróżnicowanych. Oba te procesy skutkowały także spadkiem ilości generowanych uszkodzeń oksydacyjnych białek.

Komórki MM6 były również bardziej odporne na działanie parakwatu. W cytotoksycznym działaniu parakwatu wykazano rolę anionorodnika ponadtlenkowego, wyższa oporność może być zatem związana z wyższą aktywnością systemów obronnych komórki, których substrat stanowi anionorodnik ponadtlenkowy, bezpośredni produkt cyklu redoks parakwatu.

Wiele składników komórki jest podatnych na działanie samych metali przejściowych i reaktywnych form tlenu generowanych w obecności zredukowanych metali przejściowych.

Mogą one m.in. prowadzić do peroksydacji lipidów w komórkach makrofagów. Nie zaobserwowano różnic w oporności pomiędzy komórkami mniej dojrzałymi (THP-1) i bardziej dojrzałymi (MM6) w przypadku ich ekspozycji na mieszaninę żelaza (II) i askorbinianu. Ekspozycja komórek na mieszaninę Fe/Asc skutkowała powstawaniem większej liczby uszkodzeń oksydacyjnych białek niż w przypadku ekspozycji na nadtlenek wodoru. Proces różnicowania komórek THP-1 w kierunku komórek makrofagowych zwiększał ich oporność na działanie mieszaniny żelaza (II) i askorbinianu. W komórkach MM6 wykazujących większą oporność na działanie łagodniejszych systemów prooksydacyjnych (nadtlenek wodoru, parakwat), aktywacja receptora TLR2 była wystarczająca do pojawienia się oporności na system generujący silnie reaktywne formy tlenu (Fe/Asc). Zwiększała ona oporność komórek MM6 (zarówno nieodróżnicowanych, jak i zróżnicowanych) oraz prowadziła do spadku ilości generowanych uszkodzeń oksydacyjnych w komórkach nieodróżnicowanych. W komórkach bardziej dojrzałych podstawowy poziom aktywności systemu antyoksydacyjnego wpływa na wyższą oporność komórek na łagodniejsze systemy prooksydacyjne, natomiast w przypadku silnie reaktywnych form tlenu podstawowy poziom obrony antyoksydacyjnej komórek zostaje sforsowany i zwiększenie oporności wymaga dodatkowej aktywacji komórek i ich systemów obronnych, np. poprzez aktywację receptora TLR2.

W regulacji ekspresji szeregu czynników antyoksydacyjnych wykazano uprzednio udział czynnika jądrowego κ B. Reprezentuje on rodzinę czynników transkrypcyjnych odgrywających ważną rolę w aspekcie obrony gospodarza przed patogenami oraz odpowiedzi zapalnej, zaangażowany jest w procesy przekazywania sygnału po aktywacji receptorów z rodziny TLR. Analizowano ekspresję czynnika NF- κ B w komórkach THP-1 i MM6 oraz wpływ różnicowania i aktywacji receptora TLR2 na jego aktywność. Do oceny aktywacji czynnika NF- κ B wykorzystano analizę translokacji do jądra komórkowego białka p65 oraz ekspresji genu reporterowego znajdującego się pod kontrolą elementu odpowiedzi na NF- κ B. W stanie podstawowym monocytarne linie komórkowe THP-1 i MM6 charakteryzowały się podobnym profilem ekspresji składników szlaku NF- κ B, genów kodujących inhibitory, kinazy, białka z rodziny NF- κ B charakterystyczne zarówno dla klasycznej, jak i alternatywnej drogi aktywacji. W obu liniach komórkowych po stymulacji receptora TLR2 zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji składników systemu NF- κ B i jego aktywację. Różnicowanie odgrywa istotną rolę w aktywacji czynnika NF- κ B w komórkach THP-1, dla większości składników systemu wpływa na wzrost ich ekspresji i predysponuje komórki do szybszej i wzmożonej reakcji na rozpoznanie liganda bakteryjnego. Zdolność komórek

zróznicowanych do silniejszej odpowiedzi na zakażenie widoczna jest m.in. we wzroście poziomu TNF- α uwalnianego w komórkach zróznicowanych stymulowanych pam3CSK4 w porównaniu z komórkami niezróznicowanymi. Stymulacja pam3CSK4 skutkowała indukcją translokacji NF- κ B p65 z cytoplazmy do jądra, przy czym w komórkach zróznicowanych dochodziło do nagromadzenia większych ilości białka w jądrze niż w komórkach niezróznicowanych. Zaobserwowano synergistyczny efekt różnicowania i aktywacji receptora TLR2 na aktywność transkrypcyjną czynnika NF- κ B. Po aktywacji receptora TLR2 wzrasta ekspresja składników sygnałowego szlaku klasycznego i alternatywnego i możliwe jest zaangażowanie obu szlaków sygnałowych w odpowiedzi na ligand bakteryjny, co może wpływać na wydłużenie odpowiedzi odpornościowej. Aktywacja czynnika NF- κ B może także przyczyniać się do wzrostu zdolności komórek do rozpoznania patogenu poprzez indukcję ekspresji receptorów rozpoznających wzorce, w szczególności receptora TLR2. Ekspresja składników systemu NF- κ B była znacznie wyższa w komórkach monocytów izolowanych *ex vivo* w porównaniu z monocytarnymi liniami komórkowymi i wzrastała po stymulacji receptora TLR2 w komórkach niezróznicowanych i zróznicowanych.

W celu oceny zaangażowania wybranych składników systemu antyoksydacyjnego we wzrost oporności komórek na stres oksydacyjny podczas różnicowania i aktywacji receptora TLR2 zastosowano analizę ekspresji i aktywności tych elementów.

Zaobserwowano, że profil ekspresji i aktywności enzymów antyoksydacyjnych zależy od stopnia dojrzałości komórek i obecności ligandu TLR2. Anion ponadtlenkowy przekształcany jest przez dysmutazę ponadtlenkową w mniej reaktywną formę - nadtlenek wodoru. W komórkach MM6, w porównaniu z komórkami THP-1, odnotowano znacznie wyższą ekspresję genów *SOD1* i *SOD2*, dwóch form decydujących w głównej mierze o całkowitej aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, przy czym dla *SOD2* potwierdzono ten efekt na poziomie białka. Indukcja ekspresji *SOD2* po aktywacji receptora TLR2 była silnie zależna od aktywności NF- κ B. Wzrost ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej towarzyszący wzrostowi oporności na stres oksydacyjny i spadek oporności komórek po zahamowaniu aktywności *SOD* wskazują na znaczący udział tego enzymu w oporności komórek na stres oksydacyjny.

Dysmutaza ponadtlenkowa przyczynia się do produkcji nadtlenu wodoru, innej reaktywnej formy tlenu zdolnej w wysokich stężeniach do indukcji uszkodzeń w komórkach. Regulacja stężenia i usuwania nadtlenu wodoru stanowi istotny element ochrony przed formowaniem pochodnych reaktywnych form tlenu. Dlatego też analizowano ekspresję i aktywność enzymów antyoksydacyjnych dla których H_2O_2 stanowi substrat: katalazy,

peroksydaz glutationowych i peroksyredoksyn. Wykazano, że aktywność katalazy jest zależna od stężenia nadtlenu wodoru: ze względu na niskie powinowactwo do H_2O_2 skutecznie działa ona tylko przy jego wysokich stężeniach. Natomiast peroksydazy glutationowe oraz peroksyredoksyny są bardziej skuteczne przy niskich stężeniach H_2O_2 . Znacznie wyższy podstawowy poziom aktywności katalazy w komórkach MM6 może być odpowiedzialny za ich oporność na działanie wysokich stężeń nadtlenu wodoru. Zahamowanie aktywności katalazy w komórkach THP-1 prowadziło do wzrostu wrażliwości na H_2O_2 komórek niezróżnicowanych i zróżnicowanych, aktywowanych pam3CSK4.

Działanie peroksydazy glutationowej związane jest z systemem regeneracyjnym obejmującym glutation i reduktazę glutationową. Komórki MM6 charakteryzowały się wyższą podstawową aktywnością peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej, były one następnie indukowane w wyniku różnicowania oraz w wyniku aktywacji receptora TLR2 w niezróżnicowanych komórkach THP-1. W obu liniach komórkowych najwyższy poziom ekspresji odnotowano dla peroksydazy glutationowej 1 i 4 (GPx-1, GPx-4). GPx-4 może stanowić ważny składnik ochrony przed stresem oksydacyjnym wywoływanym przez składniki powodujące uszkodzenia błony komórkowej, tj. H_2O_2 czy mieszaninę Fe/Asc, ze względu na jej zdolność do bezpośredniej redukcji wodoronadtlenków fosfolipidów, dzięki czemu przyczynia się do zahamowania procesu peroksydacji lipidów i ochrony przed uszkodzeniami oksydacyjnymi błony komórkowej. Podobną rolę pełni peroksyredoksyna 6, której ekspresja wzrasta w komórkach stymulowanych pam3CSK4 oraz w zróżnicowanych komórkach THP-1. Dla GPx-1 wykazano rolę w ochronie przed stresem oksydacyjnym wywoływanym przez wysokie stężenia parakwatu.

Podstawowy poziom glutationu w komórkach MM6 był znacznie wyższy niż w komórkach THP-1. Było to związane z wyższą ekspresją podjednostek syntetazy γ -glutamylcysteinowej (γ GLCL): *GCLM* i *GCLC*, wpływającą prawdopodobnie na wzrost aktywności γ GLCL, enzymu decydującego o szybkości reakcji syntezy glutationu. Różnicowanie komórek THP-1 prowadziło do indukcji ekspresji genów kodujących podjednostki γ GLCL i do wzrostu poziomu glutationu w komórkach. Zahamowanie aktywności syntetazy γ -glutamylcysteinowej prowadziło do spadku podstawowej oporności komórek THP-1 na nadtlenek wodoru oraz spadku żywotności w komórkach THP-1 zróżnicowanych i aktywowanych pam3CSK4.

Ważną częścią układu antyoksydacyjnego komórek jest system tioredoksyny obejmujący: tioredoksynę, reduktazę tioredoksyny oraz inne enzymy wykorzystujące tioredoksynę jako donora elektronów, np. peroksyredoksyny. Wskazuje się na ich udział

w ochronie przed stresem oksydacyjnym, a peroksyredoksyna może być bardziej efektywna niż katalaza w usuwaniu nadtlenu wodoru ze względu na wysokie powinowactwo do H_2O_2 . W komórkach THP-1 i MM6 odnotowano podobny poziom aktywności i ekspresji reduktazy tioredoksyny. W wyniku różnicowania i aktywacji TLR2 zaobserwowano indukcję ekspresji form cytoplazmatycznych tioredoksyny, reduktazy tioredoksyny i peroksyredoksyny. Zastosowanie inhibitora aktywności reduktazy tioredoksyny nie wpływało na żywotność komórek narażonych na działanie H_2O_2 , co wskazuje na mniejsze znaczenie tego systemu dla przeżywalności komórek w analizowanych warunkach. Ponieważ ilość tioredoksyny w komórce jest mniejsza w porównaniu z innymi antyoksydantami, jej mechanizm protekcyjny może być bardziej związany z rolą w regulacji procesów przekazywania sygnału niż z bezpośrednim zaangażowaniem w reakcjach oksydacyjno-redukcyjnych pierwszego kontaktu z egzogennymi reaktywnymi oksydantami.

W komórkach MM6 inhibicja żadnego pojedynczego elementu systemu antyoksydacyjnego nie wpływała na ich wrażliwość na H_2O_2 . Prawdopodobnie wiele systemów ma równorzędne znaczenie w ochronie antyoksydacyjnej i aktywne systemy są zdolne zrekompensować brak systemów zdezaktywowanych. Dopiero równoczesna inaktywacja kilku systemów może doprowadzić do widocznych zmian we wrażliwości komórek na stres oksydacyjny.

W komórkach monocytów zaobserwowano znacznie wyższą ekspresję większości analizowanych genów systemu antyoksydacyjnego w porównaniu z liniami komórkowymi. Wzrost ekspresji zaobserwowano w makrofagach M1, w których dochodziło do silniejszej indukcji analizowanych składników systemu antyoksydacyjnego niż w makrofagach M2. W sytuacji rozpoznania liganda bakteryjnego dochodziło do indukcji ekspresji podobnego profilu genów w monocytach i makrofagach, jak w modelowych liniach komórkowych (*GCLM*, *TXN*, *TXNRD1*, *PRDX1*, *SOD2*), co potwierdza istotną rolę tych elementów w regulacji homeostazy redoks.

Wnioski

- W komórkach THP-1 i Mono Mac 6 stymulacja receptora TLR2 ligandem bakteryjnym prowadzi do indukcji ekspresji składników systemu NF- κ B i jego aktywacji. W komórkach zróżnicowanych aktywacja czynnika NF- κ B w odpowiedzi na pam3CSK4 skutkuje nagromadzeniem większych ilości białka w jądrze komórkowym.

- Niezróżnicowane komórki Mono Mac 6 są znacznie bardziej odporne na stres oksydacyjny generowany przez ekspozycję na H_2O_2 i parakwat niż komórki THP-1, prawdopodobnie jest to związane z bardziej dojrzałym fenotypem komórek MM6. Wyższa oporność skutkuje mniejszą ilością powstających uszkodzeń oksydacyjnych w tych komórkach. Wysoki podstawowy poziom ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach MM6 może wpływać na oporność na anionorodnik ponadtlenkowy, bezpośredni produkt cyklu redoks parakwatu. Wysoki podstawowy poziom glutationu i poziom aktywności katalazy, peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej w komórkach MM6 może być odpowiedzialny za wysoką oporność na działanie H_2O_2 .
- Różnicowanie prowadzi do wzrostu oporności na stres oksydacyjny (H_2O_2 , Fe/Asc) w mniej dojrzałych komórkach THP-1. W związonym z różnicowaniem wzroście oporności na nadtlenek wodoru znaczącą rolę wykazano dla systemu glutationu i katalazy.
- W niezróżnicowanych komórkach THP-1 aktywacja receptora TLR2 skutkuje zwiększeniem oporności na stres oksydacyjny (H_2O_2 , parakwat). Za wzrost oporności na H_2O_2 w komórkach THP-1 odpowiada dysmutaza ponadtlenkowa indukowana silnie w wyniku stymulacji receptora TLR2, której inhibicja prowadzi do spadku oporności, a także system glutationu, w obrębie którego dochodzi do wzrostu aktywności peroksydazy i reduktazy glutationowej w komórkach stymulowanych ligandem bakteryjnym, a inhibicja syntezy glutationu prowadzi do wzrostu wrażliwości na nadtlenek wodoru.
- Komórki monocytów w porównaniu z liniami komórkowymi odznaczają się wyższą ekspresją receptorów rozpoznających wzorce (PRR), składników systemu NF- κ B, składników systemu antyoksydacyjnego. W makrofagach M1 w porównaniu z M2 dochodzi do silniejszej indukcji ekspresji elementów systemu antyoksydacyjnego, prawdopodobnie ze względu na ich prozapalny charakter i większe narażenie na działanie reaktywnych form tlenu. W sytuacji rozpoznania liganda bakteryjnego dochodzi do indukcji ekspresji podobnego profilu genów w monocytach i makrofagach (*GCLM*, *TXN*, *TXNRD1*, *PRDX1*, *SOD2*), co może świadczyć o istotnej roli tych elementów w regulacji homeostazy redoks.