

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Daša Jarc

**IZRAŽANJE "TOLL-LIKE" RECEPTORJA IN PRODUKCIJA
CITOKINOV IZ DENDRITIČNIH CELIC PO STIMULACIJI Z
RAZLIČNIMI SEVI BAKTERIJE *HELICOBACTER PYLORI***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**TOLL-LIKE RECEPTOR EXPRESSION AND DENDRITIC CELL
CYTOKINE PRODUCTION AFTER STIMULATION WITH
DIFFERENT *HELICOBACTER PYLORI* STRAINS**

GRADUATION THESIS

University studies

LJUBLJANA, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za citometrijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija biologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Alojza Ihana, dr. med., za somentorico asist. dr. Andrejo Natašo Kopitar, univ. dipl. biol. in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčič, univ. dipl. biol.

Mentor: prof. dr. Alojz IHAN, dr. med.

Somentorica: asist. dr. Andreja Nataša KOPITAR, univ. dipl. biol.

Recenzentka: prof. dr. Kristina SEPČIČ, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Polona ZALAR, univ. dipl. biol., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIČ, univ. dipl. biol., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Alojz IHAN, dr. med., Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: asist. dr. Andreja Nataša KOPITAR, univ. dipl. biol., Medicinska fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora: 09.02.2012

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Daša Jarc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	6:579.61:632.938(043.2)=163.6
KG	<i>Helicobacter pylori</i> /"toll-like" receptor/dendritične celice/citokini
AV	JARC Daša
SA	IHAN Alojz (mentor)/KOPITAR Andreja Nataša (somentorica)/SEPČIĆ Kristina (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija biologije
LI	2011
IN	IZRAŽANJE "TOLL-LIKE" RECEPTORJA IN PRODUKCIJA CITOKINOV IZ DENDRITIČNIH CELIC PO STIMULACIJI Z RAZLIČNIMI SEVI BAKTERIJE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 65 str., 2 preg., 22 sl., 68 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Za uspešno odstranitev okužbe z bakterijo <i>Helicobacter pylori</i> je poleg antibiotičnega zdravljenja potreben tudi učinkovit imunski odziv. V diplomskem delu smo želeli razjasniti, kateri antigeni pri določenih sevi <i>H. pylori</i> sprožijo zadosten imunski odziv na okužbo in s tem pripomorejo k odstranitvi <i>H. pylori</i> iz organizma. Dendritične celice (DC) smo pripravili iz levkocitnega koncentrata zdravega prostovoljca in jih <i>in vitro</i> spodbujali z bakterijskimi lizati <i>H. pylori</i>, ki smo jih izolirali iz dveh skupin bolnikov. V prvi skupini so bili bolniki, pri katerih je bila predhodna antibiotična terapija uspešna, zato smo te seve <i>H. pylori</i> označili kot SOT (sevi, občutljivi na terapijo). Drugo skupino so predstavljali bolniki, pri katerih predhodna antibiotična terapija ni uspela, zato smo seve <i>H. pylori</i>, izolirane iz teh posameznikov, označili kot SNT (sevi, neobčutljivi na terapijo). Rezultati raziskave so pokazali, da je odstranitev okužbe s <i>H. pylori</i> povezana z učinkovito antigensko predstavitvijo in s povečanim vnetnim odgovorom. DC, spodbujene s <i>H. pylori</i> SOT, so povečale izražanje površinskih molekul CD86 in HLA-DR ter sproščanje vnetnega kemokina IL-8 v primerjavi s <i>H. pylori</i> SNT. DC, spodbujene s <i>H. pylori</i> SNT, pa so sproščale več regulatornega citokina IL-10, ki je z zniževanjem aktivnosti vnetnih citokinov in ekspresijo molekul HLA-DR pri bolnikih preprečil učinkovit imunski odziv. Posledica je bila obstoj bakterije v želodčni sluznici in s tem povezan nastanek kronične infekcije. Naravni imunski odziv DC na različne antigene <i>H. pylori</i> smo preverjali na podlagi izražanja "toll-like" receptorjev (TLR). Uspešna odstranitev okužbe je bila povezana s povečanim izražanjem TLR2, iz česar smo sklepali, da je različica lipopolisaharida (LPS) s tetraacilnim lipodom A tista, ki je uspešno aktivirala DC in z njimi povezan imunski odziv. Različni sevi <i>H. pylori</i> tvorijo različne oblike LPS, zato je tudi aktivacija DC prek TLR različna. Antigene, ki se izkažejo za uspešne aktivatorje imunskega odziva, bi lahko uporabili kot dodatke cepiv in tako izboljšali imunske odgovore na okužbo s <i>H. pylori</i>.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 6:579.61:632.938(043.2)=163.6
CX *Helicobacter pylori*/toll-like receptor/dendritic cells/cytokines
AU JARC Daša
AA IHAN Alojz (supervisor)/KOPITAR Andreja Nataša (co-supervisor)/SEPČIĆ Kristina (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental programme in biology
PY 2011
TI TOLL-LIKE RECEPTOR EXPRESSION AND DENDRITIC CELL CYTOKINE PRODUCTION AFTER STIMULATION WITH DIFFERENT *HELICOBACTER PYLORI* STRAINS
DT Graduation thesis (university studies)
NO XIII, 65 p., 2 tab., 22 fig., 68 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Effective immune response is required for successful *Helicobacter pylori* eradication besides antibiotic treatment. The aim of our study was to test different *H. pylori* strains antigens capability of triggering effective immune response for *H. pylori* eradication. We prepared dendritic cells (DC) from leukocyte buffy coat from healthy blood donor. DC were *in vitro* stimulated with different *H. pylori* strains isolated from two groups of patients, patients with previous successful *H. pylori* eradication (therapy susceptible strains -TSS) and patients with previous eradication failure (therapy resistant strains -TRS). Comparison of DC stimulated with *H. pylori* TRS and TSS demonstrated increased expression of surface molecules (CD86, HLA-DR) and increased production of inflammatory chemokine IL-8 from *H. pylori* TSS stimulated DC. *H. pylori* TRS stimulated DC increased production of regulatory cytokine IL-10 which causes decreased activity of inflammatory cytokines and decreased HLA-DR molecule expression and therefore prevents effective immune response in patients. We examined innate immune response to *H. pylori* antigens based on toll-like receptor (TLR) expression. Successful *H. pylori* eradication correlated with increased TLR2 expression on *H. pylori* TSS stimulated DC. *H. pylori* lipopolysaccharide (LPS) with tetraacylated lipid A is TLR2 agonist, therefore we suggested that type of LPS was responsible for successful DC activation. Different *H. pylori* strains possess different LPS types therefore TLR-dependent DC activation is different. The results of our study demonstrate that successful *H. pylori* eradication correlates with efficient DC antigen presentation and increased inflammatory response. *H. pylori* antigens which trigger immune response efficiently may be used as vaccine adjuvants.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
SLOVARČEK	XIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 NARAVNA IN PRIDOBLJENA IMUNOST	4
2.1.1 Naravna imunost	4
2.1.2 Specifična imunost.....	5
2.2 DENDRITIČNE CELICE	5
2.2.1 Tipi dendritičnih celic	6
2.2.2 Zorenje dendritičnih celic	6
2.2.3 "Toll-like" receptorji	7
2.2.3.1 "Toll-like" receptorji pri prepoznavanju virusov	10
2.2.3.2 Signaliziranje "toll-like" receptorjev	10
2.3 AKTIVACIJA IN DIFERENCIACIJA CELIC T POMAGALK	12
2.3.1 Spominske celice	14
2.4 CITOKINI	14
2.4.1 Opis bistvenih citokinov	15
2.4.1.1 Citokini, ki posredujejo in uravnavajo naravne imunske odzive.....	15
2.4.1.2 Citokini, ki posredujejo in uravnavajo specifične imunske odzive	18
2.4.1.3 Citokini, ki spodbujajo hematopoezo	19
2.5 <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	19
2.5.1 Mikrobiologija bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	19
2.5.2 Virulenčni dejavniki	20
2.5.3 Izmik gostiteljskemu imunskemu odzivu	21
2.6 NAMEN NALOGE	25
3 MATERIALI IN METODE	26
3.1 IZOLACIJA SEVOV BAKTERIJE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	26
3.2 PRIPRAVA BAKTERIJSKIH ANTIGENOV	26
3.2.1 Določanje koncentracije proteinov v suspenziji bakterijskih antigenov	27
3.3 PRIPRAVA DENDRITIČNIH CELIC.....	27
3.3.1 Izolacija mononuklearnih celic	27
3.3.2 Preverjanje koncentracije mononuklearnih celic in uravnavanje do zelene koncentracije	28

3.3.3	Izolacija monocitov iz mononuklearnih celic.....	29
3.3.4	Priprava in dozorevanje dendritičnih celic z rastnimi faktorji ter spodbujanje z bakterijskimi lizati.....	31
3.4	ANALIZA VZORCEV S PRETOČNIM CITOMETROM	32
3.4.1	Priprava celičnih suspenzij za analizo s pretočnim citometrom	32
3.4.1.1	Preverjanje zrelosti dendritičnih z merjenjem prisotnosti površinskih molekul CD14, CD80, CD83, CD86 in HLA-DR.....	32
3.4.1.2	Določanje proizvodnje citokinov IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70 v dendritičnih celicah z Becton Dickinson Cytometric Bead Array tehniko	33
3.4.2	Analiza s pretočnim citometrom	35
3.4.2.1	Princip delovanja pretočnega citometra	35
3.4.2.2	Nastavitve pretočnega citometra	36
3.4.2.3	Analiza vzorcev	37
3.5	STATISTIČNA OBDELAVA.....	39
4	REZULTATI.....	40
4.1	DOZOREVANJE DENDRITIČNIH CELIC	41
4.2	IZRAŽANJE POVRŠINSKIH MOLEKUL CD80, CD83, CD86, HLA-DR, TLR2 IN TLR4 NA DENDRITIČNIH CELICAH	44
4.3	PRODUKCIJA CITOKINOV IZ DENDRITIČNIH CELIC	46
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	48
5.1	RAZPRAVA.....	48
5.1.1	Uvod	48
5.1.2	Analiza rezultatov.....	50
5.1.2.1	Dozorevanje dendritičnih celic	50
5.1.2.2	Izražanje površinskih molekul CD80, CD83, CD86, HLA-DR, TLR2 in TLR4 na dendritičnih celicah ter sproščanje vnetnih in regulatornih citokinov	51
5.1.3	Možnosti za nadaljnje delo	55
5.2	SKLEPI.....	57
6	POVZETEK.....	58
7	VIRI	60

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Izražanje površinskih molekul na dendritičnih celicah, po spodbujanju z različnimi sevi bakterije <i>Helicobacter pylori</i> 44
Preglednica 2:	Sproščanje vnetnih in regulatornih citokinov iz dendritičnih celic po spodbujanju z različnimi sevi bakterije <i>Helicobacter pylori</i> 46

KAZALO SLIK

Slika 1:	Ključni "Toll-like" receptorji in njihovi ligandi (prirejeno po Takeda in Akira, 2003)	10
Slika 2:	Signalne poti "toll-like" receptorjev, ki so odvisne ali neodvisne od mieloidnega diferenciacijskega dejavnika 88 (Takeda in Akira, 2003)	11
Slika 3:	Molekule, vključene v antigensko predstavitev celicam T pomagalkam s pomočjo antigen predstavitvenih celic (prirejeno po Abbas in Lichtman, 2006)	13
Slika 4:	Shematični prikaz ločitve krvi z metodo Ficoll-Hypaque	28
Slika 5:	Prikaz bispecifičnega tetramernega kompleksa (Prirejeno po protokolu EasySep negative selection, STEMCELL).....	30
Slika 6:	Protokol izolacije monocitov iz mononuklearnih celic z metodo EasySep negative selection (STEMCELL)	31
Slika 7:	Shematski prikaz Becton Dickinson Cytometric Bead Array tehnike (Prirejeno po BD Biosciences)	33
Slika 8:	Becton Dickinson Cytometric Bead Array tehnika (BD Biosciences)	34
Slika 9:	Shematični prikaz pretočnega citometra FACS Calibur	36
Slika 10:	Točkovni diagram, ki prikazuje morfologijo celic	37
Slika 11:	Točkovni diagram, ki prikazuje celice, označene z monoklonskimi protitelesi CD80 FITC in HLA-DR PE. Na sliki so prikazane nespodbujene dendritične celice (negativna kontrola) in dendritične celice po spodbujanju z antigeni bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	38
Slika 12:	Primerjava svetilnosti dendritičnih celic in monocitov, na podlagi izražanja površinske molekule CD14	38
Slika 13:	Dozorevanje dendritičnih celic, prikazano z izražanjem površinske molekule CD14 na izoliranih monocitih pred gojenjem, nezrelih dendritičnih celicah in nespodbujenih dendritičnih celicah (negativna kontrola)	41
Slika 14:	Dozorevanje dendritičnih celic, prikazano z izražanjem površinske molekule CD80 na izoliranih monocitih pred gojenjem, nezrelih dendritičnih celicah, nespodbujenih dendritičnih celicah (negativna kontrola) in po spodbujanju dendritičnih celic z različnimi sevi bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	42

Slika 15: Aktivacija dendritičnih celic, prikazana z izražanjem površinske molekule CD83 na izoliranih monocitih pred gojenjem, nezrelih dendritičnih celicah, nespodbujenih dendritičnih celicah (negativna kontrola) in po spodbujanju dendritičnih celic z različnimi sevi bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	42
Slika 16: Dozorevanje dendritičnih celic, prikazano z izražanjem površinske molekule CD86 na izoliranih monocitih pred gojenjem, nezrelih dendritičnih celicah, nespodbujenih dendritičnih celicah (negativna kontrola) in po spodbujanju dendritičnih celic z različnimi sevi bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	43
Slika 17: Dozorevanje dendritičnih celic, prikazano z izražanjem površinske molekule HLA-DR na izoliranih monocitih pred gojenjem, nezrelih dendritičnih celicah, nespodbujenih dendritičnih celicah (negativna kontrola) in po spodbujanju dendritičnih celic z različnimi sevi bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	43
Slika 18: Izražanje kostimulatorne molekule CD86 na dendritičnih celicah po spodbujanju z različnimi sevi bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	45
Slika 19: Izražanje površinske molekule HLA-DR na dendritičnih celicah po spodbujanju z različnimi sevi bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	45
Slika 20: Izražanje "toll-like" receptorja 2 na dendritičnih celicah po spodbujanju z različnimi sevi bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	45
Slika 21: Sproščanje interlevkina 8 iz dendritičnih celic po spodbujanju z različnimi sevi bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	47
Slika 22: Sproščanje interlevkina 10 iz dendritičnih celic po spodbujanju z različnimi sevi bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	47

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AP-1	aktivacijski protein 1 (angl. activated protein-1)
APC	antigen predstavitvene celice
BabA2	adhezin, ki se veže na krvne antigene (angl. blood group antigen-binding adhesin 2)
<i>babA2</i>	gen za adhezijski protein BabA2
BCR	B-celični receptor
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
CagA	citotoksični protein (angl. cytotoxin-associated gene A protein)
CagE	citotoksični protein E (angl. cytotoxin-associated gene E protein)
<i>cagPAI</i>	<i>cag</i> -patogeni otoček (angl. cytotoxin-associated gene pathogenicity island)
CD	angl. cluster of differentiation
CLIP	invariantna polipeptidna veriga PHK razreda II (angl. class II-associated invariant polypeptide)
DC	dendritične celice
dsRNA	dvovijačna ribonukleinska kislina
<i>dupA</i>	gen, ki spodbuja nastanek ulkusa dvanajstnika (angl. duodenal ulcer-promoting gene A)
ER	endoplazemski retikel
GM-CSF	granulocitne in makrofagne kolonije spodbujajoči faktor (angl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
HLA-DR	humani poglavitni histokompatibilnostni antigen razreda II
HSP	stresni protein (angl. "heat shock" protein)
IceA	protein, ki nastane ob stiku z epitelom (angl. protein induced by contact with epithelium)
<i>iceA</i>	gen za protein IceA
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interlevkin
IRAK	kinaza, povezana z receptorjem IL-1(angl. IL-1 receptor associated kinase)
IRF	interferon regulatorni faktor

JNK	c-jun N-terminalna kinaza (angl. c-jun N-terminal kinase)
LPS	lipopolisaharid
MD-2	molekula, ki se veže na TLR4 in prispeva k odzivnosti na lipopolisaharid
MALT	limfatično tkivo sluznice (angl. mucosa associated lymphoid tissue)
mDC	mieloidne dendritične celice
MNC	mononuklearne celice
MyD88	mieloidni diferenciacijski dejavnik 88 (angl. myeloid differentiation factor 88)
NF- κ B	jedrni dejavnik κ B (angl. nuclear factor κ B)
NK	naravne ubijalke (angl. natural killers)
NLR	"NOD-like" receptorji (angl. nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors)
PAMP	molekulski motivi patogenih mikroorganizmov (angl. pathogen-associated molecular patterns)
PBS	fosfatni pufer s soljo (angl. phosphate buffered saline)
pDC	plazmatoidne dendritične celice
PE	fikoeritrin (angl. phycoerythrin)
PHK	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
PRR	receptor, ki prepozna mikrobne PAMP (angl. pattern recognition receptors)
RPTP	receptor proteinsko-tirozinske fosfataze (angl. protein tyrosine phosphatase receptor)
SHP-2	tirozinska fosfataza 2, ki vsebuje src homologno domeno 2 (angl. src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase 2)
SNT	sevi, neobčutljivi na terapijo
SOT	sevi, občutljivi na terapijo
Tc	citotoksični limfociti T
TCR	T-celični receptor
TGF- β	transformirajoči rastni dejavnik- β (angl. transforming growth factor- β)
Th	T pomagalke (angl. T helper)
Th1	T pomagalke podskupine 1 (angl. T helper 1 subset)
Th2	T pomagalke podskupine 2 (angl. T helper 2 subset)

THP-1	človeška makrofagna celična linija (angl. human acute monocytic leukemia cell line)
TIR	"toll"/interlevkin-1 receptorska domena (angl. toll-interelukin-1 receptor domain)
TLR	"toll-like" receptorji (angl. toll-like receptors)
TNF	tumor nekrotizirajoči faktor (angl. tumor necrosis factor)
TRAF6	dejavnik, povezan z receptorjem za TNF (angl. TNF receptor-associated factor 6)
Treg	regulatorne celice T
TRIF	adapterski protein, ki vsebuje "toll"/interlevkin-1 receptorsko domeno (angl. toll-interelukin-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing interferon- β)
VacA	vakuolizirajoči citotoksin A (angl. vacuolating cytotoxin A)
<i>vacA</i>	gen za VacA

SLOVARČEK

Antigen	Izraz antigen opisuje katerokoli biološko molekulo, ki se specifično veže z molekulo protitelesa (Vozelj, 1996).
CD	Okr. angl. Cluster of Differentiation. Izraz CD označuje različne membranske molekule, kot so receptorji, encimi in diferenciacijski antigeni limfocitov, levkocitov in monocitov. Njihovo odkrivanje poteka s pomočjo monoklonskih protiteles (Vozelj, 1996).
CD74	CD74 je veriga, ki povezuje α in β verigi molekule poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa razreda II po njuni sintezi v endoplazemskem retiklu (ER). Veže se v brazdo novonastale molekule PHK razreda II in tako preprečuje vezavo peptidov, ki so morda prisotni v ER. Ima tudi funkcijo šaperona in omogoča prehod α in β verig v golgijev aparat, kjer se proteolitično razgradi s pomočjo katepsina S in L (endosomalni proteazi) in tako omogoči vezavo tujih peptidov v brazdo. Po proteolitični razgradnji CD74 verigi povezuje invariantna polipeptidna veriga PHK razreda II (CLIP) (Beswick in sod., 2006; Coico in Sunshine, 2009). CD74 deluje kot regulator procesiranja antigenov in zavira gibljivost dendritičnih celic (Faure-André in sod., 2008).
HLA-DR	Izraz HLA-DR označuje humani poglobitni histokompatibilnostni antigen razreda II (Roitt, 2001). Kompleks HLA-DR in njegov ligand predstavlja ligand za T-celični receptor.
Imunoglobulin	Imunoglobulin (Ig) je glikoprotein z lastnostjo protiteles, sestavljen iz enakega števila težkih in lahkih verig. Njihova funkcija je vezava antigena, posledica česar je antigenska odstranitev.
Interlevkini	Interlevkini so skupina citokinov s pleotropnim delovanjem, ki jih sproščajo različne celice (Vozelj, 1996).
Kemokini	Kemokini so družina strukturno homolognih citokinov, ki spodbujajo naključno gibanje (kemokinezo) in usmerjenjo potovanje levkocitov (kemotakso). Ime je sestavljeno iz <u>kemotaktični citokini</u> (Vozelj, 1996).
PHK	Izraz PHK je okrajšava za poglobitni histokompatibilnostni kompleks oziroma poglobitni kompleks tkivne skladnosti in je izraz za skupino genov v genomu večine vretenčarjev, katerih produkti sodelujejo pri medceličnem spoznavanju in razločevanju lastnega od nelastnega. PHK ima ključni pomen pri razvoju humoralnega in celično posredovanega imunskega odziva. Pri človeku ga označujemo s HLA.

1 UVOD

Bakterija *Helicobacter pylori* kolonizira želodčno sluznico 50–80 % svetovne populacije. Igra ključno vlogo pri razvoju kroničnega gastritisa, želodčnega ulkusa, ulkusa dvanajstnika, imunske trombocitopenične purpуре in limfoma limfatičnega tkiva želodčne sluznice (želodčni MALT limfom) ter povečuje tveganje za razvoj želodčnega raka (Velin in Michetti, 2006; Hasni, Ippolito in Illei, 2011).

Okužbo s *H. pylori* najuspešneje ozdravimo z inhibitorjem protonske črpalke in kombinacijo dveh antibiotikov, običajno z nitroimidazolom (metronidazol ali tinidazol) in amoksisicilinom ali klaritromicinom. Takšna terapija pa je kljub vsemu še vedno neuspešna pri najmanj 10–25 % bolnikov, čeprav pri njih bakterija sicer ni odporna na izbrane antibiotike. Največjo terapevtsko učinkovitost proti *H. pylori* je težko doseči zaradi dejstva, da uspešnost *in vitro* testiranja slabo sovпада z *in vivo* učinkovitostjo. Čeprav je rezistenca na antimikrobne agense večinoma razlog za neuspelo zdravljenje, je še vedno precej neuspešnih poskusov zdravljenja neznanih (Kopitar in sod., 2007).

Za uspešno odstranitev infekcije s *H. pylori* zgolj antibiotično zdravljenje ne zadostuje. Potreben je tudi učinkovit imunski odziv, ki pripomore k odstranitvi bakterije iz organizma (Kopitar in sod., 2007). Čeprav *H. pylori* izzove tako naravni kot specifični imunski odziv, je običajni rezultat te infekcije neučinkovit imunski odziv, ki onemogoča gostitelju odstranitev bakterije iz želodčne sluznice (Guiney, Hasegawa in Cole, 2003).

Ključno vlogo pri usmerjanju imunskega odziva imajo dendritične celice (DC). DC so antigen predstavitvene celice (APC), aktivirajo pa se prek "toll-like" receptorjev (TLR), ki jih izražajo na svoji površini. S TLR prepoznavajo različne strukture, prisotne na mikroorganizmih (Coico in Sunshine, 2009). TLR družino predstavlja 11 članov. TLR4 prepozna lipopolisaharide in stresne proteine (HSP), TLR5 prepozna flagelin, na TLR1, TLR2 in TLR6 pa se vežejo bakterijski lipoproteini, lipotehoične kisline in zimosan. Ligand za TLR9 je CpG DNA bakterij in virusov, ligand za TLR3 je dvovijačna virusna RNA, TLR7 in TLR8 pa prepoznavata enovijačno RNA (Rad in sod., 2007). Vezava antigena na TLR povzroči aktivacijo nezrelih DC na mestu infekcije, ki nato

fagocitirajo antigen in ga povežejo z molekulami PHK (poglavitni histokompatibilnostni kompleks) na svoji površini. DC potujejo v limfne vozle, kamor prispejo kot zrele DC, ki na svoji površini izražajo veliko molekul PHK in kostimulatornih molekul. V limfnih vozlih predstavijo antigen "naivnim" celicam T, ki na svoji površini izražajo T-celične receptorje (TCR). TCR prepoznavajo mikrobne antigene, ki so povezani z molekulami PHK na površini DC. Prepoznavanje kompleksa antigen-PHK povzroči razmnoževanje in diferenciacijo "naivnih" celic T v spominske celice T in efektorske celice T, celice T pomagalk (Th), citotoksične limfocite T (Tc) in regulatorne celice T (Treg). Zrele DC vplivajo na diferenciacijo celic T tudi z izražanjem kostimulatornih molekul in z izločanjem citokinov. Tudi aktivirane efektorske celice sproščajo citokine, ki modulirajo aktivnost drugih imunskih celic, spominske celice pa si "zapomnijo" specifičen antigen in ob naslednjem stiku z istim antigenom povzročijo hiter in močan imunski odziv (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007; Coico in Sunshine, 2009).

V raziskavi smo izvedli *in vitro* spodbujanje dendritičnih celic s sevi *H. pylori*, ki so bili izolirani iz biopsijskih vzorcev dveh skupin bolnikov. V prvi skupini so bili bolniki, pri katerih je predhodna antibiotična terapija uspela, drugo skupino pa so predstavljali bolniki, pri katerih je bila predhodna antibiotična terapija neuspešna.

Naravni imunski odziv dendritičnih celic na različne antigene *H. pylori* smo preverjali na podlagi izražanja TLR. Ugotavljali smo, katere TLR izražajo, in iz tega sklepali, kateri so tisti antigeni *H. pylori*, ki vplivajo na aktivacijo DC.

Dendritične celice delujejo tudi kot APC, ki predstavljajo antigene *H. pylori* celicam T in tako povezujejo naravni in specifični imunski odziv (Kranzer in sod., 2004). Med skupinama smo želeli primerjati vse ključne komponente, ki sodelujejo pri predstavitvi antigena celicam T in tako pri posredovanju specifičnega imunskega odziva. Opazovali smo razlike med izražanjem površinskih molekul PHK razreda II (HLA-DR) in kostimulatornih molekul ter sproščanjem vnetnih in regulatornih citokinov.

Z raziskavo smo želeli razjasniti, kateri antigeni pri določenih sevih *H. pylori* sprožijo zadosten imunski odziv na okužbo in s tem pripomorejo k odstranitvi *H. pylori* iz organizma.

Zaradi neuspešnega specifičnega imunskega odgovora in posledično nezmožnosti odstranitve infekcije s *H. pylori*, je treba preučiti različne možnosti izboljšanja takšnih imunskih odgovorov. To bi lahko dosegli s pomočjo različnih dodatkov (Kopitar in sod., 2007) in z boljšim poznavanjem mehanizma imunskega odziva.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NARAVNA IN PRIDOBLJENA IMUNOST

Imunost, ki vretenčarjem omogoča obrambo pred mikroorganizmi in njihovimi produkti, se deli na dve glavni obliki: naravno (prirojeno) in specifično (pridobljeno) imunost (Coico in Sunshine, 2009).

2.1.1 Naravna imunost

Naravna imunost predstavlja prvo obrambno linijo proti mikroorganizmom. Vključuje nespecifične fizične in kemične ovire (epitel in antimikrobne snovi, ki jih izloča na površini), celične ovire (fagociti), krvne proteine (vključujejo komponente komplementnega sistema in druge vnetne posrednike) in citokine (uravnavajo in usmerjajo številne aktivnosti celic v procesu naravnega imunskega odziva). Mehanizmi naravne imunosti prepoznavajo specifične strukture, ki so skupne skupini mikroorganizmov, natančnejših razlik med tujimi molekulami pa ne zaznavajo (Coico in Sunshine, 2009; Abbas, Lichtman in Pillai, 2007). Temelji na prepoznavanju različnih molekulskih motivov patogenih mikroorganizmov (PAMP), ki so prisotni na mikroorganizmih, in tako predstavlja prvo obrambno linijo gostitelja. Te strukture vključujejo lipopolisaharide (LPS), lipoproteine, peptidoglikan, flagelin, dvovijačno RNA in zimosan, ki jih prepozna družina večinoma na površini izraženih proteinov (PRR). Prepoznavanje poteka prek ponavljajočih, leucinsko bogatih motivov, na C-terminalnem koncu teh proteinov. Najbolje opredeljeni PRR so "toll-like" receptorji (TLR), ki predstavljajo enajstčlansko družino proteinov z visoko stopnjo specifičnosti (Takeda in Akira, 2003; Ferrero, 2005).

Linija med pridobljeno in naravno imunostjo je pogosto zamegljena zaradi tesnih interakcij med signalnimi potmi, kot so stimulacija antigen predstavitevni makrofagov in DC, kar pa vodi v aktivacijo in rekrutacijo limfocitov in v razvoj specifičnih odgovorov celic Th (Wilson in Crabtree, 2007).

2.1.2 Specifična imunost

Specifična imunost vključuje nastanek antigensko specifičnih limfocitov (efektorske celice) in spominskih celic, ki preprečujejo ponovno okužbo z enakim mikroorganizmom. Specifični imunski odziv posredujejo celice B in T, ki na svoji površini nosijo receptorje, specifične za določen antigen. Raznolikost T-celičnega receptorja (TCR) in B-celičnega receptorja (BCR) je ogromna in omogoča prepoznavo številnih tujih molekul. Ob stiku specifičnega antigena s specifičnim antigenskim receptorjem na površini limfocitov se začeta delitev in namnožitev limfocitov. Specifična imunost se razvije nekaj dni po začetni okužbi, saj morajo APC najprej predstaviti antigen limfocitom T, nato pa se morajo celice B in T namnožiti, preden se diferencirajo v efektorske celice, ki sodelujejo pri odstranitvi infekcije. Tak odgovor je specifičen za določen patogen in vključuje imunološki spomin (Coico in Sunshine, 2009).

Specifični imunski odzivi se delijo na humoralno in celično posredovano imunost. Humoralno imunost posredujejo limfociti B, ki s protitelesi specifično prepoznajo antigen, navtralizirajo infektivnost mikroba in ga označijo za odstranitev s številnimi efektorskimi mehanizmi. Celično posredovano imunost pa posredujejo limfociti T, ki s pomočjo T-celičnih receptorjev prepoznajo antigen, vezan z membranskimi proteini, imenovanimi molekule poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (PHK), na APC (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007).

2.2 DENDRITIČNE CELICE

Dendritične celice so heterogena celična družina, ki se nahaja v limfoidnih organih, v epitelu kože, gastrointestinalnega in respiratornega trakta ter v intersticiju večine parenhimalnih organov. Izvirajo iz prekurzorjev v kostnem mozgu, večina pa se jih uvršča v skupino mononuklearnih fagocitov (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007; Coico in Sunshine, 2009). Aktivirajo se prek TLR in so ključne APC, ki predstavljajo antigene naivnim limfocitom T. Pomembne so za sprožitev specifičnih imunskih odzivov na antigen, njihov nastanek pa je odvisen od učinkovitosti polarizacije naivnih celic T s strani DC (Mazzoni in Seagal, 2004; Abbas in Lichtman, 2006).

2.2.1 Tipi dendritičnih celic

Na podlagi izražanja površinskih molekul in funkcije ločimo dva glavna tipa DC, plazmacitoidne DC (pDC) in mileoidne DC (mDC). pDC se nahajajo v krvnem obtoku in v manjšem številu v limfoidnih organih. Morfološko so podobne plazmatkam in pridobijo morfologijo DC šele po aktivaciji. V zgodnjih fazah imunskega odziva sproščajo interferone tipa I in tako močno prispevajo k naravnemu imunskemu odzivu na virusne okužbe. mDC se večinoma nahajajo v perifernih tkivih, čeprav jih je mogoče najti tudi v krvnem obtoku. Njihova ključna funkcija je antigenska predstavitev in sprožitev odziva celic T. mDC, ki se nahajajo v epidermisu, so Langerhansove celice. Imajo dolge izrastke, s katerimi prekrivajo več kot 25 % površinskega področja epidermisa, in so specializirane za lovljenje antigenov. Običajno so epitelijske in tkivne DC v nezrelem stanju. Te DC lovijo mikrobnne antigene in jih nosijo v limfne vozle. Številne DC v limfatičnih organih izhajajo iz Langerhansovih DC, ki so ujele antigen in pripotovale v tkiva (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007; Coico in Sunshine, 2009).

2.2.2 Zorenje dendritičnih celic

Dendritične celice delimo na dve razvojni stopnji, nezrele in zrele DC. Nezrele DC imajo visoko sposobnost fagocitoze in na svoji površini izražajo posebne receptorje, ki omogočajo prepoznavanje neustreznih signalov. Signali so lahko zunanji, ki vključujejo produkte mikroorganizmov, ali notranji, ki vključujejo produkte lastnih razpadlih celic (Kaisho in Akira, 2002; Coico in Sunshine, 2009). Ti receptorji spadajo v skupino receptorjev PRR, ki vključujejo TLR, lektine tipa C in znotrajcelične "NOD-like" receptorje (NLR). PRR prepoznavajo mikrobnne PAMP, ki so značilni za širšo skupino patogenih organizmov. PAMP nastanejo v metabolnih poteh in so nujno potrebni za preživetje organizma, zato so evolucijsko tudi dobro ohranjeni (Kaisho in Akira, 2006; Coico in Sunshine, 2009).

Lektini tipa C prepoznavajo ogljikove hidrate na mikroorganizmih in imajo ključni pomen pri migraciji DC in pri stiku DC z naivnimi celicami T. Sodelujejo pri adheziji DC na endotelij žil in s tem pripomorejo k njihovi migraciji iz krvi v periferna tkiva. Po aktivaciji DC pa sodelujejo tudi pri njihovi migraciji v regionalne limfne vozle. S prepoznavanjem

lastnih glikoziliranih antigenov imajo ključno funkcijo pri vzpostavitvi imunske tolerance (Geijtenbeek in sod., 2002).

Nezrele dendritične celice so strateško razporejene na mestih, kjer patogeni vstopajo v telo, to pa so koža, dihala in gastrointestinalna sluznica. Na teh mestih s fagocitozo, pinocitozo ali s specifično receptorsko endocitozo privzamejo antigene, nastale pri vnetju ali okužbi, in začnejo sproščati različne citokine. Na izločanje citokinov iz DC vplivajo trije bistveni dejavniki, poreklo DC, zoritveni dražljaj in vnetni mediatorji, prisotni na mestu infekcije (Mazzoni in Seagal, 2004; Tsan, 2004). Citokini nato avtokrino ali parakrino spodbujajo zorenje DC in njihovo migracijo v regionalne limfne vozle. Poleg tega aktivirajo efektorske celice naravne imunosti, kot so nevtrofilci in makrofagi, na mestu infekcije, ki izvajajo močne antimikrobne aktivnosti (Geissman in sod., 2003). Vezava antigena na TLR povzroči aktivacijo DC na mestu infekcije. Aktivirane DC fagocitirajo antigen, ga procesirajo (preoblikujejo v peptidne fragmente) in povežejo z molekulami PHK na svoji površini. Sledi njihovo potovanje v limfne vozle, kamor prispejo kot zrele DC, ki izgubijo endocitotsko zmogljivost. Izguba endocitotske zmogljivosti jim omogoča, da obdelajo in predstavijo le antigene na mestu infekcije. Izražajo več molekul PHK razredov I in II, kostimulatornih molekul CD40, CD80, CD83, CD86 in HLA-DR in izločajo nekatere citokine. V limfnih vozlih predstavijo antigen "naivnim" celicam T, ki na svoji površini izražajo TCR. TCR prepozna mikrobne antigene, ki so povezani z molekulami PHK na površini DC. Dozorevanje DC je odvisno od različnih tipov receptorjev, kot so TLR, receptorji za Fc del protiteles, CD40 in receptorji za stresne proteine (Guermonprez in sod., 2002; Mazzoni in Seagal, 2004; Coico in Sunshine, 2009).

2.2.3 "Toll-like" receptorji

"Toll-like" receptorji so evolucijsko ohranjena skupina PRR, ki je izražena na številnih tipih celic in ima ključno vlogo pri mehanizmi naravne imunosti. Prepoznajo molekularne strukture na patogenih organizmih, v nekaterih primerih pa lahko prepoznajo tudi določene endogene ligande. Izražajo se na imunskih celicah in pripomorejo k imunskemu odzivu (Kaisho in Akira, 2006).

Strukturno so TLR integralni membranski glikoproteini tipa I. Imajo zunanjo domeno, ki je sestavljena iz leucinsko bogatih zaporedij in ustvarja PAMP vezavna mesta, na citoplazemski strani pa so "toll"-interlevkin-1 receptorske domene (TIR), ki so homologne signalnim domenam receptorjev interlevkina 1 (IL-1). Kot odgovor na vezavo patogena TIR domene aktivirajo adaptorske molekule (prav tako vsebujejo TIR domene) na citoplazemski strani aktiviranih TLR. To sporoži signalno kaskado, ki vodi v aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (NF- κ B), aktivacijskega proteina 1 (AP-1) in drugih transkripcijskih dejavnikov, ki omogočajo nastanek proteinov na celični površini in topnih vnetnih mediatorjev (Takeda, Kaisho in Akira, 2003; Coico in Sunshine, 2009).

Družino TLR predstavlja 11 članov z visoko stopnjo specifičnosti (Coico in Sunshine, 2009).

"Toll-like" receptorji 1, 2, 4, 5 in 6 so specializirani za prepoznavanje bakterijskih produktov ali produktov kvasovk (Rad in sod., 2007).

"Toll-like" receptor 4 (TLR4) prepozna LPS, vendar pa so v prepoznavo vključene še številne dodatne komponente. LPS se v serumu veže v kompleks z LPS vezavnim proteinom, kompleks LPS- LPS vezavni protein pa se nato veže na membranski receptor CD14, ki ga večinoma izražajo monociti in makrofagi. Za prenos signala prek TLR4 je potrebna še molekula MD-2, ki se poveže s TLR4 na ekstracelularni strani celične membrane in izboljša odzivnost na LPS (Kaisho in Akira, 2006).

"Toll-like" receptor 5 (TLR5) prepozna flagelin Gram pozitivnih in Gram negativnih bakterij (Rad in sod., 2007).

"Toll-like" receptor 2 (TLR2) je odgovoren za prepoznavanje komponent zelo različnih patogenov. Te komponente so lipotehoična kislina Gram pozitivnih bakterij, lipoarabinomanan mikobakterij, zimosan gliv in podobno, najbolj bistvena vloga TLR2 pa je prepoznavanje peptidoglikana in lipoproteinov različnih patogenov. Pri prepoznavanju različnih mikrobnih komponent je TLR2 funkcionalno povezan s TLR1 in TLR6. TLR2

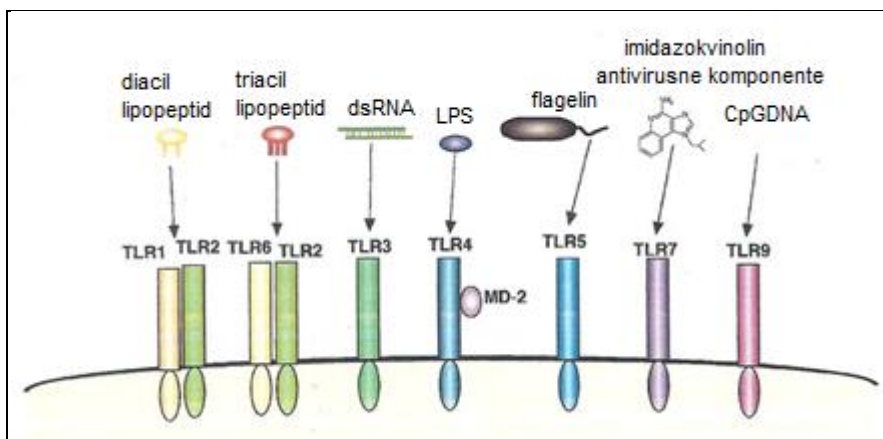
prepozna tako diacilne kot tudi triacilne lipopeptide, zato k ločevanju med njimi prispevata TLR1, ki prepozna diacilne lipopeptide, in TLR6, ki prepozna triacilne lipopeptide (Takeda in Akira, 2003).

"Toll-like" receptorji 3, 7, 8 in 9 so specializirani za prepoznavanje nukleinskih kislin (Rad in sod., 2007).

Toll-like receptor 3 (TLR3) prepozna dvovijačno virusno RNA (dsRNA), ki jo proizvajajo številni virusi med replikacijo. Dvovijačna RNA inducira sintezo interferonov tipa I (IFN- α/β), ki izzovejo antivirusno in imunostimulatorno aktivnost (Takeda in Akira, 2003).

Bistvena vloga "toll-like" receptorja 9 (TLR9) je prepoznavanje CpG DNA. TLR9 se pojavlja le v endosomih, vakuolah in veziklih, posledica tega pa je drugačen mehanizem prepoznavanja CpG DNA, kot ga imajo ostali TLR ligandi. Bakterijska DNA vsebuje nemetilirane CpG motive, ki sprožijo imunostimulatorno aktivnost. Pri vretenčarjih je frekvenca CpG motivov močno zavrta, citozinski ostanki CpG motivov pa so močno metilirani, kar ustavi imunostimulatorno aktivnost. CpG DNA bi se tako lahko uporabljala za številna cepiva proti infekcijskim boleznim, raku in alergijam (Takeda in Akira, 2003).

"Toll-like" receptorja 7 in 8 prepoznavata enovijačno RNA. TLR7 je vključen v imunske odgovore na sintetične komponente, ki se uporabljajo za zdravljenje bolezni, ki so povezane z virusnimi infekcijami. Sestavina z antivirusno aktivnostjo so recimo imidazokvinolini, ki prek TLR7 inducirajo produkcijo vnetnih citokinov, še posebno interferon- α (IFN- α). Sintetične sestavine, ki aktivirajo TLR družino, bi tako lahko uporabljali za zdravljenje infekcijskih bolezni (Takeda in Akira, 2003).



Slika 1: Ključni "toll-like" receptorji in njihovi ligandi (prirejeno po Takeda in Akira, 2003)

2.2.3.1 "Toll-like" receptorji pri prepoznavanju virusov

"Toll-like" receptorji so vključeni tako v bakterijsko kot tudi v virusno prepoznavanje. TLR3 in TLR4, kot odgovor na virusno prepoznavanje, uporabljata edinstveno signalno pot, neodvisno od mieloidnega diferenciacijskega dejavnika 88 (MyD88). To bi lahko pripomoglo k razvoju odpornosti proti virusom, kemične komponente, ki jih prepoznava TLR7, pa se že uporabljajo za zdravljenje virusnih infekcij (Takeda in Akira, 2003).

2.2.3.2 Signaliziranje "toll-like" receptorjev

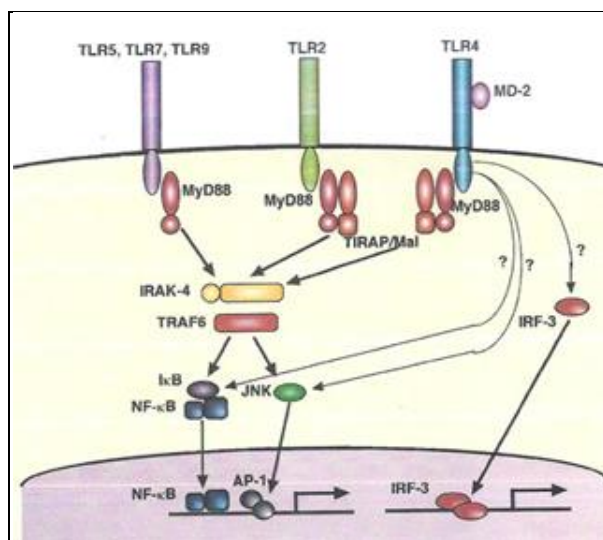
Začetek signaliziranja TLR lahko poteka prek MyD88 (pri vseh TLR razen TLR3) ali prek adapterskega proteina, ki vsebuje "toll"/interleukin-1 receptorsko domeno (TRIF) (pri TLR3 in TLR4). MyD88 direktno ali prek kinaze, povezane z receptorjem IL-1 (IRAK) in dejavnika, povezanega z receptorjem za TNF (TRAF6), kontrolira aktivacijo mitogensko aktiviranih proteinskih kinaz in jedrno translokacijo transkripcijskih dejavnikov (NF- κ B, AP-1 in interferon regulatornega faktorja 7 (IRF-7)). TRIF, aktivira interferonsko pot tipa I prek fosforilacije IRF-3 na IRAK/TRAF6 neodvisni način. TLR se izkažejo kot ključna komponenta naravnega imunskega odziva, prav tako pa imajo pomembno vlogo tudi pri sprožitvi specifične imunosti, prek kontrole številnih funkcij DC (Mazzoni in Seagal, 2004; Rad in sod., 2007).

Signalna pot, odvisna od MyD88

Signalna pot, odvisna od MyD88 se začne z interakcijo med TIR domeno TLR in TIR domeno, ki jo na svojem C-terminalnem delu nosi adapterski protein MyD88. Po stimulaciji MyD88 fosforilira IRAK, ki se tako aktivira in združi s TRAF6, kar vodi v aktivacijo dveh različnih signalnih poti, c-jun N-terminalne kinaze (JNK) in NF- κ B. JNK in NF- κ B nato potujeta v jedro, kjer se signalna pot konča z aktivacijo promotorjev za citokine. MyD88 tako sproži produkcijo vnetnih citokinov, kot odgovor na LPS, peptidoglikan, lipoproteine, CpG DNA, dsRNA, flagelin in imidazokvinoline (Takeda in Akira, 2003). Od MyD88 je odvisna sinteza citokinov, kot so tumor nekrotizirajoči faktor- α (TNF- α), IL-6, IL-12, IL-1b, in kemokinov, kamor spada IL-8 (Sankar in sod., 2006).

Signalna pot, ki je neodvisna od MyD88 (signaliziranje preko TRIF)

Pri signaliziranju TLR3 in TLR4 obstaja tudi dodatna signalna pot, ki pa je neodvisna od MyD88. Pri MyD88 neodvisni signalni poti TLR ligandi aktivirajo IRF-3, ki povzroči indukcijo IFN- β in posledično aktivacijo Stat1, kar vodi do ekspresije IFN-inducibilnih genov v makrofagih in DC (Takeda in Akira, 2003).

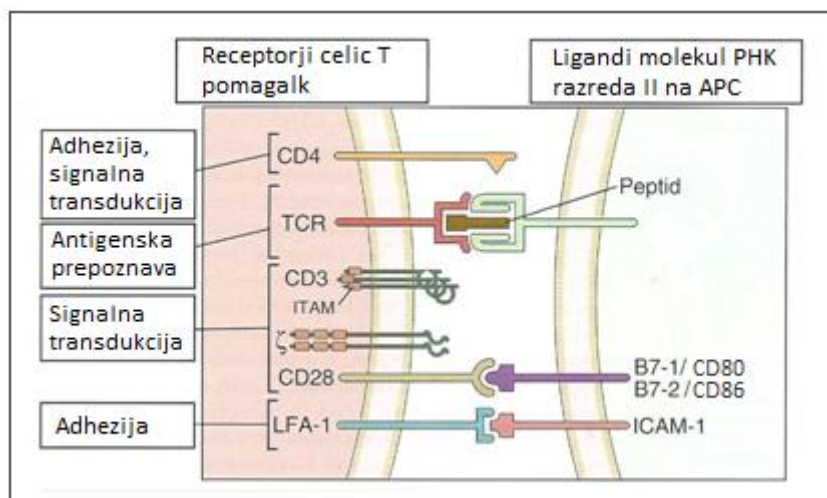


Slika 2: Signalne poti "toll-like" receptorjev, ki so odvisne ali neodvisne od mieloidnega diferenciacijskega dejavnika 88 (Takeda in Akira, 2003)

2.3 AKTIVACIJA IN DIFERENCIACIJA CELIC T POMAGALK

Odzivi celic T na antigen vključujejo sintezo citokinov in efektorskih molekul, razmnoževanje celic T, diferenciacijo v spominske in efektorske celice ter izvršitev efektorskih funkcij (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007). Za aktivacijo, razmnoževanje in diferenciacijo naivnih celic T pomagalk so potrebni trije signali, ki jih posredujejo zrele DC. Celice T pomagalk s TCR prepoznajo peptide, ki nastanejo iz razgrajenih antigenov in so vezani s proteini PHK razreda II na APC. Koreceptorska molekula CD4 se veže izključno na molekule PHK razreda II in okrepi interakcijo med TCR in kompleksom PHK II-peptid. Sledi prenos signala v jedro, pri čemer sodelujejo številni adapterski proteini in encimi. V jedru poteče prepis genov za sintezo citokinov in efektorskih molekul (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007).

Drugi signal posredujejo pomembni kostimulatorni molekuli CD80 (B7-1) in CD86 (B7-2) na aktiviranih DC, ki se povezujejo s kostimulativnim receptorjem CD28 ali CD152 na celicah T. Vezava na CD28 aktivira celice T ter jih spodbudi k sproščanju IL-2 (rastni faktor celic T, ki je ključnega pomena za razmnoževanje celic T) in drugih citokinov. Kostimulatorni receptor CD152 je strukturno homologen CD28, njegova funkcija pa je preprečitev aktivacije celic T z zaustavitvijo prenosa signala prek kompleksa TCR-CD28. Pred aktivacijo celice T izražajo CD28, po aktivaciji pa tudi CD152, ki ima večjo afiniteto do vezave na CD80 in CD86 in tako prepreči sproščanje IL-2 in posledično razmnoževanje celic T. CD152 ima tako pomembno vlogo pri vzdrževanju tolerance na lastne antigene. Največ kostimulativnih molekul izražajo aktivirane DC in zato veljajo za najučinkovitejše aktivatorje celic T izmed vseh APC. Neaktivirane DC ne izražajo kostimulativnih molekul, kar prav tako prispeva k vzdrževanju tolerance na lastne antigene (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007; Coico in Sunshine, 2009).



Slika 3: Molekule, vključene v antigensko predstavitev celicam T pomagalkam s pomočjo antigen predstavitevni celic (prirejeno po Abbas in Lichtman, 2006)

Tretji signal, ki sodeluje pri aktivaciji celic T, je odvisen od različnih citokinov, ki jih izločajo DC. Ti citokini vplivajo na diferenciacijo celic T pomagalk v podskupino 1 (Th1), podskupino 2 (Th2) in regulatorne celice T (Treg). DC izločajo IL-12p75, IL-18, IL-23 in IL-27, ki vodijo diferenciacijo naivnih celic T k celicam Th1. Nasprotno pa IL-4, IL-5, IL-10 in TNF- α vodijo v nastanek Th2 odgovorov. Pod vplivom transformirajočega rastnega dejavnika- β (TGF- β) se lahko naivne celice pomagalke diferencirajo v Treg. Celice Th1 primarno sproščajo IL-2, IFN- γ in TNF- β , ki aktivirajo makrofage in celične efektorje imunosti, Th2 pa sprožijo humoralne odgovore s pomočjo sproščanja IL-4, IL-5 in IL-13. IL-5 aktivira eozinofilce, IL-4 in IL-13 pa spodbujata celice B k produkciji IgG4 in IgE. Treg preprečujejo imunske odzive na lastne molekule in na tuje antigene. Zavirajo aktivacijo in razmnoževanje drugih celic T pomagalk, celic B, naravnih celic ubijalk (NK) in DC. Aktivirajo se prek specifičnega TCR, ko pa so aktivirane, je njihova inhibitorna funkcija antigensko nespecifična. Na svoji površini izražajo molekulo CD25, ki predstavlja verigo α receptorja za IL-2 in je ključnega pomena za njihov obstoj in aktivacijo. Za način, kako Treg izvedejo svojo inhibitorno aktivnost, obstaja več različnih hipotez. Številne hipoteze vključujejo vpletenost inhibitorne molekule CD152, ki jo izražajo na svoji površini. CD152 se poveže s kostimulativnimi molekulami CD80 in CD86 na APC, prek te interakcije pa Treg sprejmejo kostimulativni signal, ki sproži njihovo inhibitorno aktivnost. Nekatere študije predpostavljajo, da Treg svojo inhibitorno funkcijo opravljajo s sproščanjem inhibitornih citokinov, kot sta IL-10 in TGF- β . Določene raziskave so

pokazale, da Treg zmanjšujejo učinkovitost CD80 in CD86 na DC, kar povzroči šibkejšo antigensko predstavitev antigenov celicam T. Posledično sta zavrti aktivacija in razmnoževanje celic T, prav tako pa tudi njihovo sproščanje IL-2 (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007; Coico in Sunshine, 2009).

Pomen pravilne Th izbire je učinkovita odstranitev infekcije, kar pa zahteva specifični tip Th odziva (Mazzoni in Segal, 2004). Prekomerni Th1 odziv lahko povzroči kronično vnetje in okvare tkiv, medtem ko lahko prekomerni Th2 odziv povzroči alergije in astmo (Guermonprez in sod., 2002).

2.3.1 Spominske celice

Spominske celice se razvijejo po aktivaciji z antigeni in lahko v stanju funkcionalnega mirovanja preživijo mnogo let po odstranitvi patogena iz organizma. Spominske celice B izražajo nekatere tipe membranskih imunoglobulinov (Ig), kot so IgG, IgE ali IgA, medtem ko naivne celice B izražajo le IgM in IgD. Spominske celice T izražajo veliko količino kostimulatornih molekul CD80 in CD86 in površinskih molekul, ki omogočajo njihovo migracijo na mesto vnetja. Spominske celice B in T se aktivirajo hitreje in učinkoviteje od "naivnih" celic B in T, kar omogoča gostitelju, da ob vsakem naslednjem stiku z istim patogenom vzpostavi hiter in močan imunski odgovor (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007; Coico in Sunshine, 2009).

2.4 CITOKINI

Pri razvoju učinkovitega imunskega sistema sodelujejo hemopoetske, limfoidne in vnetne celice, interakcije med njimi pa posredujejo citokini. Citokini so proteinske ali glikoproteinske molekule z majhno molekulsko maso, manjšo od 30 kDa, ki jih izločajo številne celice imunskega sistema v odgovor na različne dražljaje. Delujejo lahko avtokrino, parakrino ali endokrino, sinergistično ali antagonistično, njihova najpomembnejša lastnost pa je pleiotropnost, kar pomeni, da lahko v različnih celicah povzročijo različne biološke učinke. Intenzivnost in trajanje imunskih odzivov uravnavajo s spodbujanjem ali zaviranjem aktivacije, razmnoževanjem in diferenciacijo različnih celic

ter z uravnavanjem sproščanja protiteles ali drugih citokinov. V mnogih lastnostih so podobni hormonom, a za razliko od njih večina citokinov deluje lokalno. Navadno se izločajo po aktivaciji določene celice, izločanje pa je kratkotrajno in na omejenem območju. Hitro se razgradijo, njihov razpolovni čas je kratek. Skupina citokinov obsega družine molekul, kot so rastni dejavniki, interferoni, interlevkini in kemokini. Vežejo se s specifičnimi receptorji na membrani tarčnih celic, kar sproži signal, ki se prenese v celično notranjost in spremeni njeno izražanje genov. Na receptorje se vežejo z močno afiniteto, zato posredujejo biološke učinke v pikomolarnih koncentracijah. Najpomembnejši proizvajalci citokinov so makrofagi, DC, endotelne celice in limfociti, še posebej celice T pomagalke (Kindt, Goldsby in Osborne, 2007).

2.4.1 Opis bistvenih citokinov

2.4.1.1 Citokini, ki posredujejo in uravnavajo naravne imunske odzive

Številni citokini spodbujajo naravne imunske odgovore na viruse in mikrobne patogene. V to skupino spadajo IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- α in IFN- β ter kemokini (Coico in Sunshine, 2009).

Interlevkin 1 (IL-1)

Interlevkin 1 izdelujejo monociti, aktivirani makrofagi, DC, celice T in B, NK in številni drugi celični tipi. Poleg IL-6 in TNF- α je ključni vnetni citokin, ki povzroča vročino, povečano nastajanje proteinov akutne faze in spodbuja proliferacijo celic Th2 (Coico in Sunshine, 2009). V majhnih količinah deluje kot posrednik lokalnega vnetja s spodbujanjem endotelnih celic k povečanemu izražanju površinskih molekul. V velikih količinah IL-1 preide v krvni obtok in izzove endokrine učinke. Deluje neposredno ali s spodbujanjem sproščanja drugih citokinov, kot sta IL-6 in TNF- α . Njegovo sproščanje spodbujajo bakterijski produkti, kot je LPS, ali drugi citokini, recimo TNF (Eales, 2003; Abbas, Lichtman in Pillai, 2007; Coico in Sunshine, 2009).

Interlevkin 6 (IL-6)

Interlevkin 6 sproščajo celice T, monociti, makrofagi, DC in številni drugi celični tipi. Je citokin, ki ima pomembno funkcijo tako pri posredovanju naravnih kot tudi specifičnih imunskih odzivov. Spodbuja sintezo proteinov akutne faze, sintezo nevtrofilcev, sproščanje IL-2, aktivacijo celic T, sproščanje Ig iz limfocitov B ter deluje kot rastni dejavnik. V obtoku se nahaja ob okužbi z Gram negativnimi bakterijami, kjer se izloča v odgovor na TNF in ne v odgovor na LPS. Njegovo sproščanje spodbujata IL-1 in TNF- α (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007; Coico in Sunshine, 2009).

Interlevkin 8 (IL-8)

Interlevkin 8 spada v skupino kemokinov. Sproščajo ga aktivirani monociti, makrofagi, fibroblasti, DC, endotelijske celice in drugi celični tipi, deluje pa kakor kemotaktični dejavnik, ki privlači nevtrofilce, bazofilce in naivne celice T na mesto vnetja. Ima ključno vlogo pri posredovanju vnetnih odzivov in zdravljenju ran (Coico in Sunshine, 2009).

Interlevkin 10 (IL-10)

Interlevkin 10 izdelujejo monociti, makrofagi, DC, celice Th, Tc in nekateri drugi celični tipi. Zavira funkcije aktiviranih makrofagov in DC (negativna povratna zanka) in tako uravnava reakcije naravne in celično posredovane imunosti. Njegova pomembna funkcija je tudi zaviranje sproščanja IL-12 iz aktiviranih makrofagov in DC. Ker IL-12 predstavlja ključni dražljaj za sproščanje IFN- γ , IL-10 zavira tudi sproščanje IFN- γ . Poleg tega IL-10 onemogoča celično posredovane imunske reakcije, saj zavira izražanje površinskih molekul PHK razreda II in posledično aktivacijo celic T. IL-10 izločajo tudi nekatere regulatorne celice, ki onemogočijo aktivacijo limfocitov in APC (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007; Coico in Sunshine, 2009). Preprečuje izdelavo citokinov v celicah Th1, aktiviranih monocitih in celicah NK in tako tudi imunsko vnetje. Spodbuja razmnoževanje celic B, mastocitov in timocitov ter skupaj s TGF- β spodbuja izdelavo IgA v celicah B (Eales, 2003).

Interlevkin 12 (IL-12)

Interlevkin 12 izdelujejo DC, makrofagi, monociti in celice B. Je ključni posrednik zgodnjega naravnega imunskega odziva na znotrajcelične patogene. Deluje kot pomemben regulator celično posredovane imunosti zaradi učinkov na NK in celice T. V celicah T in NK spodbuja izdelavo IFN- γ , ki nato aktivira makrofage in povzroči uničenje fagocitiranih mikrobov. Skupaj z IFN- γ spodbuja diferenciacijo celic Th v celice Th1, ki sproščajo IFN- γ in spodbuja citotoksične funkcije aktiviranih NK ter citotoksičnih limfocitov T (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007; Coico in Sunshine, 2009).

Dejavnika tumorske nekroze- α in - β (TNF- α in TNF- β)

Dejavnik tumorske nekroze- α izločajo aktivirane DC, monociti, makrofagi, mastociti, celice B in T in celice NK. Vključen je v vnetne odzive, aktivira endotelijske in druge celice imunskega sistema in povzroča vročino ter septični šok (Coico in Sunshine, 2009). Skupaj z IL-1 spodbuja endotelijske celice žil k izražanju adhezijskih molekul, kar omogoči makrofagom, nevtrofilcem in limfocitom prepoznavo teh molekul in njihov prehod iz žil v okužena tkiva. S spodbujanjem sproščanja kemokinov iz makrofagov in endotelijskih celic povečujeta afiniteto vezave levkocitov na adhezijske molekule ter posledično njihovo kemotakso (Kind, Goldsby in Osborne, 2007). Levkociti nato potujejo na mesto okužbe, kjer povzročita njihovo aktivacijo in tako pripomoreta k odstranitvi mikrobov (Abbas in Lichtman, 2006). TNF- β sproščajo aktivirane celice T. Vključen je v vnetne odzive in ubija tarčne celice s citotoksičnimi limfociti T (Coico in Sunshine, 2009).

Transformirajoči rastni faktor- β (TGF- β)

Transformirajoči rastni faktor- β sproščajo aktivirane celice T, mononuklearni fagociti in drugi celični tipi. Njegova ključna funkcija je preprečevanje razmnoževanja in aktivacije limfocitov in drugih levkocitov. Spodbuja sproščanje IgA iz celic B in pripomore k zdravljenju poškodovanega tkiva. Prav tako spodbuja tudi diferenciacijo celic Th v Treg, zato je posledica njegove povečane produkcije zmanjševanje vnetja in tako neučinkovit imunski odgovor na infekcijo (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007; Obermajer in sod., 2009).

2.4.1.2 Citokini, ki posredujejo in uravnavaajo specifične imunske odzive

Interlevkin 2 (IL-2)

Interlevkin 2 sproščajo zgolj aktivirane celice T, predvsem celice Th. Je rastni, preživetveni in diferenciacijski dejavnik za celice T in s svojo aktivnostjo uravnava jakost in obseg imunskih odzivov, ki jih posredujejo celice T. Poleg tega spodbuja tudi razmnoževanje celic B, razmnoževanje mononuklearnih fagocitov, aktivacijo in razmnoževanje celic NK ter sproščanje citokinov iz celic T (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007; Coico in Sunshine, 2009).

Interlevkin 4 (IL-4)

Interlevkin 4 izdelujejo celice Th2 in mastociti. Spodbuja diferenciacijo in razmnoževanje celic Th2 in zavira diferenciacijo celic Th0 v Th1. Deluje kot avtokrini rastni dejavnik za diferencirane celice Th2. Pri celicah B spodbuja preklap Ig težke verige v izotipa IgG4 in IgE. Pomemben je pri razvoju alergij, ker predstavlja ključni dražljaj za sintezo IgE. Poleg tega spodbuja aktivacijo, razmnoževanje in diferenciacijo celic B ter razmnoževanje mastocitov. Preprečuje aktivacijo makrofagov prek IFN- γ in posledično onemogoča povečano izdelovanje citokinov. Preprečuje aktivacijo makrofagov, deluje sinergistično z IL-13, njegovo delovanje pa uravnava citokin IL-12 (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007).

Interferon- γ (IFN- γ)

Interferon- γ izdelujejo celice T pomagalkke tipa Th0 in Th1, citotoksični limfociti T in celice NK. Njegova ključna funkcija je aktivacija makrofagov, s čimer posreduje naravne in specifične imunske odzive proti znotrajceličnim mikrobom. Spodbuja diferenciacijo celic Th0 v celice Th1 in preprečuje diferenciacijo v celice Th2. Na APC povečuje ekspresijo molekul PHK razredov I in II in kostimulatornih molekul, s čimer povečuje antigensko predstavitev. Deluje sinergistično z drugimi citokini in aktivira celice NK (Kindt, Goldsby in Osborne, 2007; Abbas, Lichtman in Pillai, 2007).

2.4.1.3 Citokini, ki spodbujajo hematopoezo

Interlevkin 7 (IL-7)

Interlevkin 7 izdelujejo stromalne celice timusa, celice kostnega mozga in nekatere celice T. Je rastni dejavnik, ki pospešuje razmnoževanje nezrelih prekurzorjev limfocitov B in T. Njegova pomembna funkcija je tudi spodbujanje izločanja IL-1 α , IL-1 β , IL-6 in TNF- α v monocitih (Vozelj, 2000; Abbas, Lichtman in Pillai, 2007; Coico in Sunshine, 2009).

Granulocitne in makrofagne kolonije spodbujajoči faktor (GM-CSF)

Granulocitne in makrofagne kolonije spodbujajoči faktor izločajo celice T, makrofagi, DC, fibroblasti in endotelijske celice. Je rastni dejavnik, ki deluje na prekurzorje v kostnem mozgu in spodbuja sintezo, preživetje in rast granulocitov in makrofagov. Deluje tudi kot rastni dejavnik za *in vitro* gojene DC (Abbas, Lichtman in Pillai, 2007; Coico in Sunshine, 2009).

2.5 *HELICOBACTER PYLORI*

Bakterija *Helicobacter pylori* kolonizira želodčno sluznico najmanj 50–80 % svetovne populacije. Igra ključno vlogo pri razvoju kroničnega gastritisa (vnetje želodčne sluznice), želodčnega ulkusa (razjeda na želodčni sluznici), ulkusa dvanajstnika (razjeda na sluznici dvanajstnika), imunske trombocitopenične purpure, želodčnega MALT (mucosa associated lymphoid tissue) limfoma in povečuje tveganje za razvoj želodčnega raka (Velin in Michetti, 2006; Hasni, Ippolito in Illei, 2011).

2.5.1 Mikrobiologija bakterije *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori je Gram negativna, spiralna bakterija, dolga približno 3 μm , s premerom okoli 0,5 μm (Tepeš, 2009). Je mikroaerofilna bakterija, ki vsebuje oksidaze, katalaze in ureaze (Ukaji in sod., 2011). Sposobna je tvorbe biofilmov, v neugodnih razmerah pa lahko preide iz spiralne oblike v obliko koka, kar lahko prispeva k prenosu infekcije (Boyanova, Mitov in Vladmirov, 2011). Dobro gibljivost ji omogoča štiri do šest

bičkov, sestavljenih iz dveh flagelinov FlaA in FlaB (Rust, Schweinitzer in Josenhans, 2008).

Bakterija *Helicobacter pylori* je specifično prilagojena na kolonizacijo človeške želodčne sluznice. Kljub indukciji močnih lokalnih imunskih odgovorov v želodčni sluznici okuženih bolnikov je zmožna vzpostaviti kronične infekcije, ki trajajo nekaj desetletij. Ti odgovori so neučinkoviti pri odstranitvi bakterije iz njene najljubše niše, poleg tega pa pripomorejo k razvoju ran na želodčni sluznici okuženih oseb. Vsi posamezniki, okuženi s *H. pylori*, razvijejo kronični gastritis, medtem ko se v približno 15–20 % primerov razvijejo resnejše oblike želodčnih bolezni, kot sta želodčni ulkus in rak na želodcu (Ferrero, 2005). Poznani so trije glavni fenotipi gastritisa, preprosti (benigni) gastritis, fenotip razjede dvanajstnika in fenotip želodčnega raka (Tepeš, 2009).

Resnost bolezni bolnikov, okuženih s *H. pylori*, je odvisna od bakterijskih in gostiteljskih dejavnikov. Gastritis, ki ga povzroči infekcija s *H. pylori*, je opredeljen s prisotnostjo mešanih populacij polimorfonuklearnih in mononuklearnih celic (MNC) v želodčni sluznici. Začetni signal za te vnetne odgovore posredujejo epiteljske celice, ki zagotavljajo prvo obrambno linijo proti vdoru bakterije. *H. pylori* navadno ne vdre v epiteljske celice želodca, temveč se pritrdi na zunanje površine celic, kar je za želodčni patogen precej nenavadno. Ko se pritrdi na gostiteljske celice, v epitelne celice vnese nekatere bakterijske komponente (Ferrero, 2005).

2.5.2 Virulenčni dejavniki

Virulenčni dejavniki *H. pylori* vključujejo prisotnost *cag*-patogenih otočkov (*cagPAI*), genotipov vakuolizirajočega citotoksina A (*vacA*), alelov za protein, ki nastane ob stiku z epitelom (*iceA*) in genov za adhezín, ki se veže na krvne antigene (*babA2*) (Blanchard in sod., 2004).

Segment bakterijske DNA (*cagPAI*) kodira proteine za bakterijski sekrecijski sistem tipa IV (CagE), ki omogoča prenos efektorskega citotoksičnega proteina (CagA) v epitelne celice želodca (Ferrero, 2005). CagA se v želodčnih epitelnih celicah fosforilira in

povzroči spremembe v strukturi celičnih stikov, spremembe v organizaciji citoskeleta in celične gibljivosti, zmede nadzor celičnega cikla, sproži invazivnost v epitelne celice in s sproščanjem vnetnih in regulatornih citokinov (TNF- α , IL-6, IL-10, IL-8) povzroča kronično vnetje (Kim in sod., 2006; Amieva in sod., 2008; Peek, Fiske in Wilson, 2010; Hasni, Ippolito in Illei, 2011). Poleg tega zavira zorenje DC in njihove funkcije (Tanaka in sod., 2010).

Vakuolizirajoči citotoksin A (VacA) je pomemben virulenčni faktor, ki sproži številne celične aktivnosti, vključno s celično vakuolizacijo, spremembami na membranskih kanalih, porušenjem endosomalnih in lizosomalnih funkcij, apoptozo in imunomodulacijo. VacA zavira sproščanje sluzničnega bikarbonata, kar oslabi sluznično obrambo pred poškodbami, ki jih povzroča kislina, in tako pripomore k razvoju ulkusa. Združuje se z lipidnimi rafti mikrodomen v membranah epiteljskih celic. Vezava na receptor proteinsko-tirozinske fosfataze (RPTP) s citotoksinom ne zadostuje za vakuolizacijo, če niso prisotni lipidni rafti. Ustavi lahko celični cikel v celicah T in blokira njihovo proliferacijo. Z blokiranjem proliferacije in vmešavanjem v receptorske signalne poti celic T deluje kot imunosupresivni dejavnik v prid bakterijskemu obstoju (Guiney, Hasegawa in Cole, 2003; Costa, Figueiredo in Touati, 2009).

Gen, ki spodbuja nastanek ulkusa dvanajstnika (*dupA*) je virulenčni faktor *H. pylori*, ki je povezan z razvojem ulkusa dvanajstnika. Povzroči povečano sproščanje vnetnih citokinov (večinoma IL-12p40) iz MNC. Deluje kot kemotaktični dejavnik, ki privlači makrofage in aktivirane DC in je povezan z razvojem vnetnih bolezni (Hussein in sod., 2010).

2.5.3 Izmik gostiteljskemu imunskemu odzivu

Bakterija *Helicobacter pylori* uporablja številne mehanizme, ki ji omogočajo obstoj v gostitelju. Ti mehanizmi vključujejo omejevanje lastne toksičnosti prek negativne povratne zanke, izmik gostiteljskemu imunskemu odzivu z zmožnostjo preživetja znotraj epitelnih celic in makrofagov, zmanjševanje vnetja prek aktivacije Treg ali z direktnim preprečevanjem aktivnosti celic T, s pomočjo endonukleaze III, s posnemanjem

komenzalnih bakterij in s povečevanjem ekspresije katepsina X (Blanchard in sod., 2004; Velin in Michetti, 2006; Obermajer in sod., 2009).

Zmožnost preživetja v znotrajceličnih vakuolah

Bakterija *Helicobacter pylori* se lahko izogne gostiteljevi imunski obrambi z zmožnostjo preživetja znotraj gostiteljevih epiteljskih celic v znotrajceličnih vakuolah (Blanchard in sod., 2004).

Izogib učinkoviti makrofagni fagocitozi

Obstoj *H. pylori* v organizmu povečuje tudi zmožnost, da se izogne učinkoviti fagocitozi makrofagov. Čeprav makrofagi hitro fagocitirajo *H. pylori*, se ti fagosomi zlijejo in tvorijo "megasome", ki vsebujejo veliko število živih bakterij. Sevi, ki nimajo *cagPAI* in ne tvorijo VacA, ne povzročijo zlitja fagosomov in so zato dovzetni za uničenje s fagocitozo. Sevi *H. pylori*, ki vsebujejo *cagPAI* in tvorijo VacA, preprečujejo zlitje fagosomov z lizosomi, ki je nujno za uničenje bakterij. To jim omogoča preživetje znotraj makrofagnih fagosomov do 24 ur (Guiney, Hasegawa in Cole, 2003; Wilson in Crabtree, 2007). Drug mehanizem s pomočjo katerega se lahko *H. pylori* izogne makrofagni fagocitozi, je glukozilacija holesterola. Mutirani sevi *H. pylori*, ki niso sposobni procesirati holesterola, so bolj dovzetni za makrofagno fagocitozo (Wilson in Crabtree, 2007).

Lipopolisaharid *H. pylori*

Lipopolisaharidi in lipoproteini *H. pylori* so manj učinkoviti pri aktivaciji APC preko TLR kakor LPS ostalih Gram negativnih bakterij (Velin in Michetti, 2006). Aktivirajo TLR2, TLR4 in v redkih primerih TLR5. Pomembna komponenta LPS Gram negativnih bakterij je lipid A. *H. pylori* tvori dve obliki lipida A, tetraacilno različico, ki je bolj pogosta, in manj pogosto heksaacilno obliko. LPS s tetraacilnim lipidom A ne aktivirajo TLR4, temveč TLR2 in v manjši meri TLR5. Različni sevi *H. pylori* proizvajajo različne strukture lipida A, zato je tudi aktivacija TLR pri različnih sevih *H. pylori* različna (Smith in sod., 2003). LPS *H. pylori* je agonist TLR2, zato je omogočeno zaznavanje *H. pylori* prek TLR2

in TLR5 na epiteljskih celicah. TLR5 prepozna evlucijsko konzervirano mesto bakterijskega flagelina, ki je potreben za sestavljanje in gibljivost nitastih filamentov. Prepoznavanje flagelina ϵ proteobakterij, vključno s *H. pylori*, le redko poteka prek TLR5. Razlog so specifične modifikacije TLR5 prepoznavnega mesta za flagelin α in ϵ proteobakterij, ki onemogočijo zaznavanje, odvisno od TLR5. TLR2 ima velik pomen pri prepoznavanju *H. pylori* s pomočjo makrofagov. TLR2 prepozna veliko število različnih bakterijskih komponent, vključno s peptidoglikanom in lipopeptidi. Protein *H. pylori*, ki aktivira nevtrofilce, je bil prav tako prepoznan kot agonist TLR2 (Rad in sod., 2007). LPS *H. pylori* deluje tudi kot dejavnik, ki zavira sproščanje želodčne kisline in tako olajša bakteriji preživetje v gostitelju.

Zmanjševanje vnetja s pomočjo regulatornih celic T

Bakterija *Helicobacter pylori* se lahko obdrži v mukozi, ker se zna izogniti vnetju tako, da ga zniža. To doseže z aktivacijo regulatornih celic T, ki producirajo IL-10. IL-10 preprečuje imunske vnetje, ki ga posredujejo celice T, in tako omogoči bakteriji, da se obrži v želodčni sluznici (Blanchard in sod., 2004).

Zniževanje vnetja z direktno supresijo celic T

Antigeni *H. pylori* aktivirajo in razširijo Treg, ki v periferni krvi asimptomatičnih posameznikov nadzorujejo odgovore spominskih celic T. Treg zavirajo specifične odgovore na infekcijo s *H. pylori*, vendar pa ne zavrejo odgovorov na ostale antigene. Za *H. pylori* specifične Treg vzdržujejo ravnotežje med kronično bakterijsko infekcijo in razvojem poškodb tkiva želodčne sluznice (Velin in Michetti, 2006).

Posnemanje komenzalnih bakterij

Večina posameznikov ima doživljenjsko klinično in imunološko toleranco na antigene hrane in na črevesno floro. K oralni toleranci prispevajo številni mehanizmi, od odstranitve antigen specifičnih celic T do imunskega odstopanja in zavrtja Treg. Oralna toleranca na antigene hrane in na črevesno floro se večinoma izoblikuje v zgodnjem otroštvu. Med tem

časom se nezrel imunski sistem sluznice nauči sprejemati novo prehrano in kolonizacijo novih sevov in vrst bakterij. Oralna toleranca in infekcija s *H. pylori* naj bi nastali v isti časovni periodi, zato se naš imunski sistem nauči tolerirati kolonizacijo s *H. pylori*. Tako obstaja možnost, da je bakterija *H. pylori* videti kot komponenta črevesne flore, kar pa ji omogoča obstoj v želodcu (Velin in Michetti, 2006).

Povečevanje ekspresije Katepsina X

Cisteinski Katepsini so lizosomalne proteaze, ki so vključene v različne stopnje specifične in naravne imunosti. Imajo velik pomen pri nastanku kroničnih oblik infekcij, saj zavirajo zaščitni Th1 imunski odziv. Izražanje Katepsina X je omejeno na celice imunskega sistema, kot so monociti, makrofagi, DC, bronhialne epiteljske celce, alveolarne celice tipa I itd., kar pomeni, da je njegova funkcija lahko povezana s procesi vnetja in imunskega odziva. Višjo stopnjo izražanja Katepsina X so našli v makrofagih želodčne sluznice, posebno po okužbi s *H. pylori*, ter pri raku želodca in prostate. Katepsin X se nahaja tudi na membrani človeške makrofagne celične linije (THP-1) skupaj z β -2 integrinskim receptorjem Mac-1. Antigeni *H. pylori* inducirajo povečano ekspresijo Katepsina X in posledično aktivacijo Mac-1 receptorja na THP-1 celicah. Aktivacija receptorja Mac-1 usmerja delovanje DC, ki nato povečajo ekspresijo MHCII, CD80 in CD86, a zavirajo sproščanje citokinov, kot je IL-12. Aktivacija Mac-1 integrinskega receptorja torej povzroči zavrtje stimulatorne sposobnosti DC in posledično ustreznega imunskega odziva na infekcijo s *H. pylori*. Poleg tega pa vezava Mac-1 poveča produkcijo TGF- β iz DC. TGF- β je potencialni imunomodulatorni citokin, ki je povezan z indukcijo regulatornih celic T, posledica njegove povečane produkcije pa je zmanjševanje vnetja in tako neučinkovit imunski odgovor na infekcijo s *H. pylori* (Obermajer in sod., 2009).

Endonukleaza III

Vnetje želodčne sluznice povzroči precejšen stres za *H. pylori*. *H. pylori* pa ima encim, imenovan endonukleaza III, ki odstranjuje oksidirane pirimidine iz genoma in tako pripomore k lažjemu preživetju *H. pylori*. Brez tega encima je njegova možnost za

preživetje v prisotnosti reaktivnih kisikovih intermediatov veliko manjša (Blanchard in sod., 2004).

Ureaza

Arginaze bakterije *Helicobacter pylori* tvorijo ureo iz L-arginina, ureo pa ureaza razcepi v ogljikov dioksid in amoniak, ki nevtralizira želodčno kislino in bakteriji omogoči preživetje v želodcu (Peek, Fiske in Wilson, 2010; Hasni, Appolito in Illei, 2011). Čeprav deluje ureaza večinoma kot puferni encim proti želodčni kislosti, pa povzroča tudi vnetje in celične poškodbe (Amieva, 2008). B podenota ureaze se lahko veže na CD74 in vpliva na gibljivost DC ali povroči nastanek megasomov (Wang in sod., 2010). Kompleks ureaza B/CD74 sproži aktivacijo NF- κ B in posledično produkcijo IL-8, kar prispeva k razvoju vnetja (Beswick in sod., 2006).

Ekološka niša

Morebitni razlog za neuspešno antibiotično zdravljenje okužbe s *H. pylori* je ekološka niša, v kateri se nahaja bakterija. Oblika in motiliteta želodca, debelina želodčne sluznice in kislo okolje bi bili lahko glavni razlogi za nezadostno koncentracijo in porazdelitev zdravil na površini želodčne sluznice (Kopitar in sod., 2007). To bi lahko pojasnilo neuspeh antibiotičnih terapij pri nekaterih sevih *H. pylori*, sicer neodpornih na določene antibiotike.

2.6 NAMEN NALOGE

Z raziskavo smo želeli razjasniti, kateri antigeni pri določenih sevih *H. pylori* sprožijo zadosten imunski odziv na okužbo in s tem pripomorejo k odstranitvi *H. pylori* iz organizma. Izvedli smo *in vitro* spodbujanje DC z različnimi sevi *H. pylori*, s čimer smo preverjali naravni imunski odziv DC na različne antigene *H. pylori*. Poskušali smo ugotoviti, katere TLR izražajo, in na podlagi tega sklepati, kateri so tisti antigeni *H. pylori*, ki vplivajo na aktivacijo DC. Zanimala pa nas je tudi razlika med izražanjem površinskih molekul PHK razreda II (HLA-DR) in kostimulatornih molekul ter sproščanjem vnetnih in regulatornih citokinov, ki posledično vplivajo na aktivacijo specifične imunosti.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZOLACIJA SEVOV BAKTERIJE *HELICOBACTER PYLORI*

V diplomski nalogi smo za poskuse uporabili bakterijo *Helicobacter pylori*, ki je Gram negativna zakrivljena paličica, dolga približno 3 μm , s premerom okoli 0,5 μm . Raste v mikroaerofilnih razmerah, kar pomeni, da za svoj obstoj potrebuje kisik v manjši koncentraciji, kot ga je v atmosferi, zato jo gojimo v atmosferi s povečano koncentracijo CO_2 . Bakterija proizvaja katalaze, oksidaze, ureaze in hidrogenaze (pridobivanje energije z oksidacijo molekulskega vodika) (Ukaji in sod., 2011). Sposobna je tvorbe biofilmov in transformacije iz paličaste v viabilno krogličasto obliko (Boyanova, Mitov in Vladmirov, 2011), ki pa se je ne da gojiti.

Črevesno bakterijo *H. pylori* smo izolirali iz biopsijskih vzorcev želodčne sluznice dveh skupin bolnikov. V prvi skupini je bilo 7 bolnikov z želodčno razjedo, pri katerih je bilo zdravljenje okužbe s *H. pylori* z antibiotiki uspešno, v drugi skupini pa je bilo 7 bolnikov z želodčno razjedo, pri katerih zdravljenje okužbe s *H. pylori* z antibiotiki ni uspelo. Seve *H. pylori* smo nacepili na Müller-Hintonov krvni agar za 3 do 14 dni. Odpornost na antibiotike in minimalno inhibitorno koncentracijo smo določili z E-testom. V serumu smo določili protitelesa proti CagA in VacA in med skupinama nismo našli statistično značilnih razlik.

3.2 PRIPRAVA BAKTERIJSKIH ANTIGENOV

Po gojenju smo bakterijske kulture z brisi posneli iz gojišč, jih resuspendirali v 5 ml enkratnega fosfatnega pufra s soljo (1 x PBS, pH 7,4) in jih prenesli v centrifugirke. Centrifugirali smo jih 20 minut pri 4°C in 10.000 obratih na minuto. Po končanem centrifugiranju smo supernatant odlili, preostanek pa ponovno resuspendirali v 5 ml 1 x PBS. Postopek smo štirikrat ponovili, po zadnjem centrifugiranju smo odlili supernatant, preostanek pa resuspendirali v 1 ml 1 x PBS in bakterije shranili pri -20 °C. Suspenzije bakterij smo nato razbili z ultrazvočnim sonifikatorjem (Misonix, Sonificator LX), da smo pridobili antigene. Bakterije smo sonificirali na ledu 4 minute, 12-krat po 30 sekund z

vmesnim hlajenjem, pri jakosti 3. Suspenzijo bakterijskih antigenov smo prefiltrirali skozi 0,45 µm filter in jo shranili pri –20 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.1 Določanje koncentracije proteinov v suspenziji bakterijskih antigenov

Koncentracijo proteinov v suspenziji bakterijskih antigenov smo določili s spektrofotometrično metodo Bio-Rad protein Assay. Metoda temelji na spremembi absorbance, ki je posledica spremembe barve dodanega barvila Coomassie brilliant blue G-250, v odvisnosti od koncentracije proteina v raztopini. Barvilo se z aromatskimi aminokislinami (triptofan, tirozin in fenilalanin) veže na hidrofobne konce aminokislin v proteinu. Nevezana (kationska) oblika je zelena ali rdeča, vezana (anionska) oblika pa je modra. Sprememba absorbance je sorazmerna s koncentracijo vezanega barvila, merimo pa jo s spektrofotometrom.

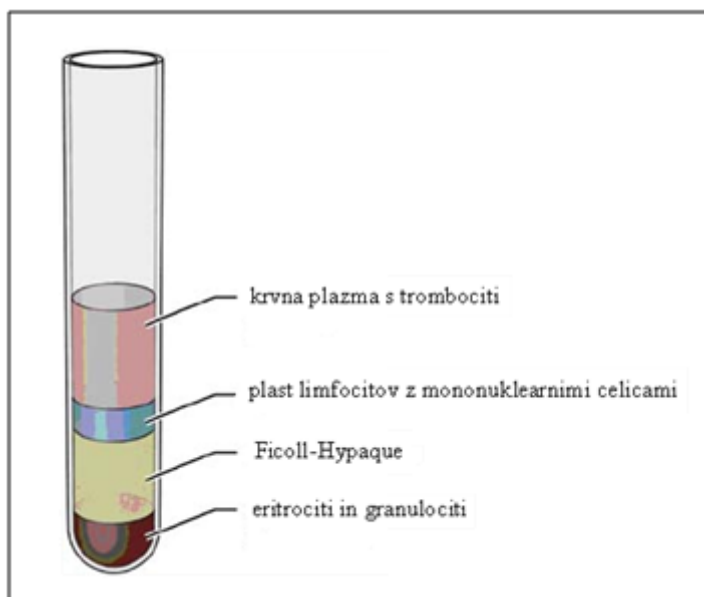
Najprej smo naredili različne razredčine govejega serumskega albumina (BSA), od 0,1 do 1 mg/ml, ki smo jih potrebovali za pripravo umeritvene krivulje. K 400 µl ustrezne razredčine BSA smo dodali 10 µl reagenta Bradford, premešali in inkubirali na sobni temperaturi od 5 minut do največ 1 ure. Vzorce smo pripravili tako, da smo k 400 µl posameznega vzorca dodali 10 µl reagenta Bradford in to prav tako inkubirali na sobni temperaturi od 5 minut do največ 1 ure. Po inkubaciji smo vzeli po 200 µl BSA (standard) in po 200 µl vzorca in jih dali v mikrotitrne plošče. S spektrofotometrom smo izmerili absorbanco pri 600 nm (A_{600}) in iz dobljenih podatkov najprej pripravili umeritveno krivuljo, nato pa z nje odčitati rezultate (Bradford, 1976).

3.3 PRIPRAVA DENDRITIČNIH CELIC

3.3.1 Izolacija mononuklearnih celic

Mononuklearne celice (MNC) smo izolirali iz levkocitnega koncentrata zdravega prostovoljca. Za izolacijo smo uporabili metodo Ficoll-Hypaque, ki temelji na razlikah v gostoti MNC v primerjavi z drugimi krvnimi celicami. Levkocitni koncentrat smo redčili z dvakratnim volumnom medija RPMI (ime je dobil po inštitutu, kjer so ga razvili, in sicer po Roswell Memorial Park Institute) in nato nanegli 25 ml suspenzije na 15 ml

Ficoll-Hypaque. Centrifugirali smo 30 minut (4 °C, 1800 obratov na minuto) in po centrifugiranju je prišlo do tvorbe značilnih plasti (Kopitar, 1995: str. 7). Ficoll-Hypaque povzroči agregacijo eritrocitov, kar poveča stopnjo njihove sedimentacije med centrifugiranjem. Eritrociti se tako po centrifugiranju sedimentirajo na dno epruvete, prav tako pa zaradi višje gostote tudi granulociti, ki se namestijo v plast nad eritrociti in pod plastjo Ficoll-Hypaque (Boyum, 1964). Na vrhu je plast krvne plazme s trombociti, plast MNC pa se nahaja med plazmo in ficollom in je vidna kot bel obroček. Krvno plazmo s trombociti smo odpipetirali in zavrgli, plast MNC pa smo odpipetirali v drugo epruveto. Prav tako smo zavrgli tudi najnižjo plast granulocitov in monocitov. V centrifugirke z MNC smo dodali medij RPMI do končnega volumna 45 ml, suspenzijo vorteksirali in centrifugirali 20 minut (1800 obratov na minuto). Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in postopek še trikrat ponovili (Kopitar, 1995: str. 7).



Slika 4: Shematični prikaz ločitve krvi z metodo Ficoll-Hypaque

3.3.2 Preverjanje koncentracije mononuklearnih celic in uravnavanje do želene koncentracije

Koncentracijo MNC smo določili s štetjem v Neubauerjevi komori. To je steklena ploščica, ki ima v sredini poglobljen predel z vrisano mrežo. Mreža vsebuje štiri velike kvadrate, ki so razdeljeni na 16 manjših kvadratov. Prostornina velikega kvadrata je 0,1 mm³ (0,1 µl).

Celično suspenzijo smo najprej razredčili in jo obarvali z 0,1 % raztopino tripanskega modrila. To je barvilo, ki ne more prehajati skozi nepoškodovano, normalno prepustno membrano živih celic. Če je membrana poškodovana, barvilo vdre v celico in jo obarva modro (Vozelj, 1996). 0,9 ml tripanskega modrila v fiziološki raztopini smo dodali 0,1 ml celične suspenzije. Tako pripravljeno suspenzijo smo nanесли na Neubauerjevo komoro. Mrtve in poškodovane celice so se obarvale modro in tako smo lažje šteli žive in nepoškodovane celice, ki so bile pod svetlobnim mikroskopom videti svetlejše, z debelejšo membrano.

Prešteli smo MNC v štirih kvadratih in izračunali povprečno število MNC v enem »velikem« kvadratu (N). Uporabili smo formulo za izračun števila celic v vzorcu, ki upošteva tudi faktor redčenja v tripanskem modrilu.

$$N/10 \times 10^6 \text{ celic/ml}$$

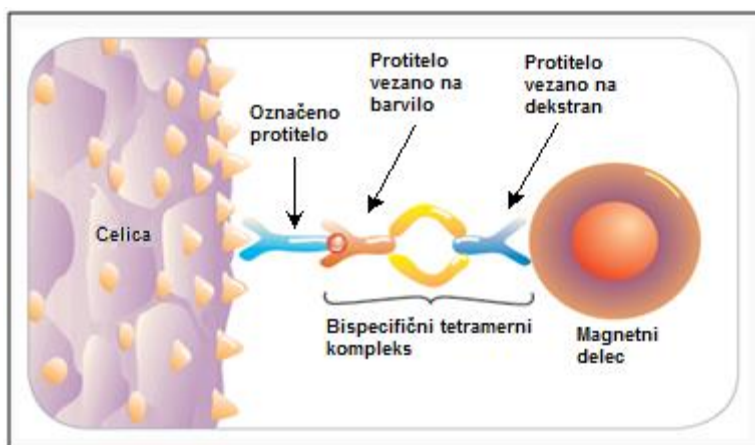
S pomočjo formule smo izračunali število MNC v 1 ml suspenzije, nato pa smo koncentracijo uravnali na 1×10^6 celic/ml.

3.3.3 Izolacija monocitov iz mononuklearnih celic

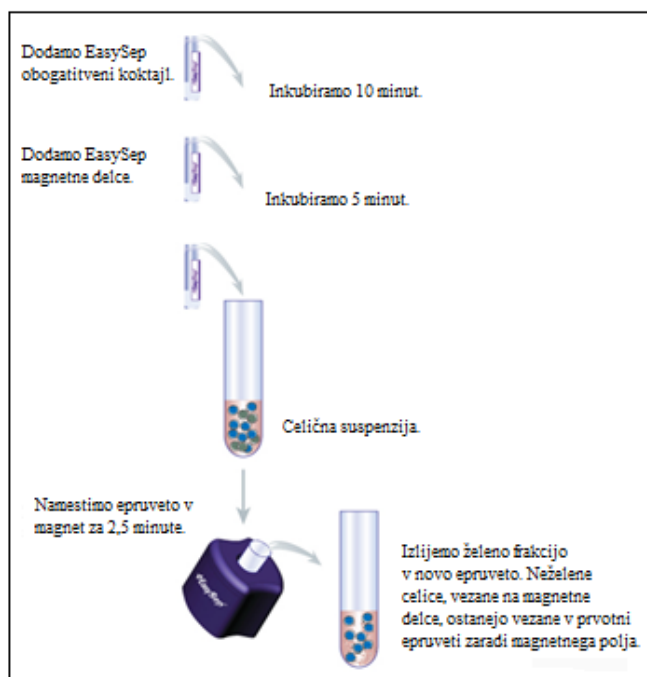
Monocyte smo izolirali iz MNC z negativno selekcijo, s protitelesi, konjugiranimi z magneti. Uporabili smo metodo EasySep negative selection. Metoda je zasnovana na magnetni ločitvi monocitov od preostalih krvnih mononuklearnih celic. Neželene celice (vse MNC razen monocitov) so specifično označene z magnetnimi delci, ki so prekriti z dekstranom. Z magnetnimi delci se povežejo s pomočjo bispecifičnih tetramernih kompleksov protiteles, ki prepoznajo tako dextran kot tudi antigene CD2, CD3, CD16, CD19, CD20, CD56, CD66b, CD123 in glikoforin A, izražene na površini neželenih celic (EasySep Monocyte Enrichment Kit, STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada).

Najprej smo pripravili mononuklearno celično suspenzijo v celičnem mediju MII v koncentraciji 5×10^7 celic/mL. 2 ml molekularne celične suspenzije smo dali v polistirensko epruveto (12 x 75 mm), ki se je prilegala magnetu. Dodali smo 100 µL

človeškega monocitnega obogatitvenega koktajla, da smo dobili razmerje 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ celic. Vse skupaj smo dobro premešali in inkubirali 10 minut pri 2–8 °C. Nato smo vorteksirali magnetne delce za monocite 30 sekund, da ni bilo vidnih agregatov. V 2 ml celične suspenzije smo dodali 100 μL magnetnih delcev, da smo dobili razmerje 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ celic, vse skupaj dobro premešali in inkubirali 5 minut pri 2–8 °C. Celično suspenzijo smo postavili v totalni volumen 2,5 mL z dodatkom priporočenega medija. Celično suspenzijo smo dobro premešali s pipetiranjem, namestili epruveto v magnet in inkubirali 2–5 minut na sobni temperaturi (15–25 °C). Iz magneta smo hitro izlili tekočino v novo epruveto. Neželenne celice so ostale v epruveti, ker so bile konjugirane z magnetnimi delci in so se zaradi magnetnega polja zadržale znotraj epruvete. Celice, ki smo jih želeli izolirati, torej monociti, pa so bile v novi epruveti.



Slika 5: Prikaz bispecifičnega tetramernega kompleksa (prirejeno po protokolu EasySep negative selection, STEMCELL)



Slika 6: Protokol izolacije monocitov iz mononuklearnih celic z metodo EasySep negative selection (STEMCELL)

Koncentracijo monocitov smo določili s štetjem pod mikroskopom v Neubauerjevi komori, in sicer enako, kot smo to naredili pri mononuklearnih celicah.

3.3.4 Priprava in dozorevanje dendritičnih celic z rastnimi faktorji ter spodbujanje z bakterijskimi lizati

Dendritične celice smo pripravili tako, da smo gojili monocite v celičnem mediju II (MII). MII je medij RPMI, obogaten s 5 % fetalnim govejim serumom FCS (Sigma, St. Louis, USA), 2 % penicilinom (Sigma, St. Louis, USA) in 0,5 % L-glutaminom (Sigma, St. Louis, USA). Po 2 ml monocitov ($4,5 \times 10^5$ celic/ml) smo gojili 5 dni, z dodatkom humanega rekombinantnega interlevkina-4 (IL-4) s končno koncentracijo 200 U/ml in dodatkom GM-CSF v koncentraciji 50 ng/ml, pri temperaturi 37 °C in v 5 % CO₂. Medij smo menjali vsake 3 dni in tako pridobili nezrele DC. Po petih dneh smo dodali 100 µl bakterijskega lizata (0,01 mg/ml) in DC gojili še 48 ur (Reis e Sousa in sod., 1999).

3.4 ANALIZA VZORCEV S PRETOČNIM CITOMETROM

3.4.1 Priprava celičnih suspenzij za analizo s pretočnim citometrom

3.4.1.1 Preverjanje zrelosti dendritičnih z merjenjem prisotnosti površinskih molekul CD14, CD80, CD83, CD86 in HLA-DR

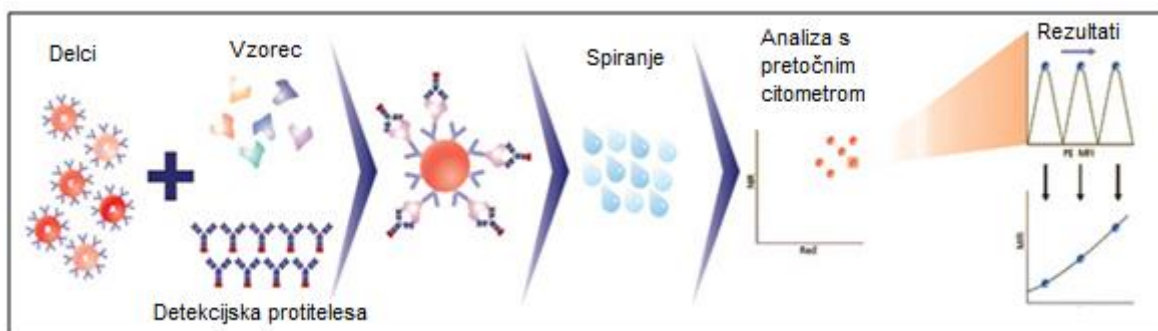
Prisotnost CD14, CD80, CD83, CD86, TLR2, TLR4 in HLA-DR smo merili pred stimulacijo DC z bakterijskimi antigeni in po njej

Po gojenju smo celice sprali z gojiščem RPMI, ohlajenim na 4 °C, da so se odlepile od podlage, in jih prenesli v epruvete. Ploščice smo izpirali z RPMI toliko časa, dokler se celice niso povsem odlepile od podlage. Prisotnost DC na dnu vdolbinic smo preverjali s faznokontrastnim mikroskopom. Epruvete z DC in gojiščem RPMI smo centrifugirali 5 minut pri sobni temperaturi in 1600 obratih na minuto (452 g). V epruveto smo dali 100 µl suspenzije celic (1×10^6 celic/ml) in 10 µl mišjih monoklonskih protiteles: Anti-Hu-CD14, konjugiranih s fluorescenčnim barvilom PerCP, Anti-Hu-CD80, konjugiranih s fluorescenčnim barvilom FITC, Anti-Hu-CD83, konjugiranih s fluorescenčnim barvilom fikoeritrin (PE), Anti-Hu-CD86, konjugiranih s fluorescenčnim barvilom PE, Anti-Hu-HLA-DR, konjugiranih s fluorescenčnim barvilom PE (Becton Dickinson, USA), Anti-Hu-TLR-2, konjugiranih s fluorescenčnim barvilom PE, in Anti-Hu-TLR4, konjugiranih s fluorescenčnim barvilom PE (eBioscience). Vsebine epruvete smo vorteksirali in inkubirali 20 minut pri sobni temperaturi v temnem prostoru. Po inkubaciji smo celice 10 minut fiksirali z 2 ml 1,5 % formaldehida in jih 5 minut centrifugirali pri 1600 obratih na minuto. Po centrifugiranju smo supernatant odlili in celice sprali z 2 ml fosfatnega pufra. Ponovno smo jih centrifugirali 5 minut, nato pa odlili supernatant in celice resuspendirali v 1 ml 1 x PBS. Tako smo celice pripravili za analizo na pretočnem citometru.

Ko smo celice analizirali po stimulaciji z bakterijskimi antigeni, je bil postopek označevanja enak, celice pa smo morali analizirati na pretočnem citometru v 1 uri.

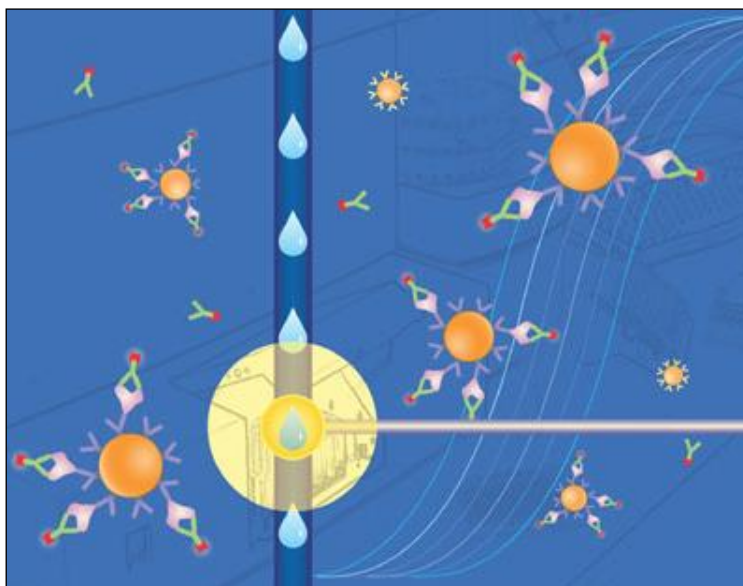
3.4.1.2 Določanje proizvodnje citokinov IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70 v dendritičnih celicah z Becton Dickinson Cytometric Bead Array tehniko

Proizvodnjo citokinov v dendritičnih celicah smo določali s pomočjo Becton Dickinson Cytometric Bead Array (BD CBA) tehnike. Metoda temelji na označevanju topnih analitov z delci znanih velikosti in fluorescence, da jih je mogoče analizirati s pretočnim citometrom.



Slika 7: Shematski prikaz Becton Dickinson Cytometric Bead Array tehnike (Prirejeno po BD Biosciences)

Šest različnih suspenzij delcev z različno fluorescenco je konjugiranih s specifičnimi protitelesi za šest različnih citokinov (IL-8, IL-1, IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70). Vzorcju moramo poleg delcev dodati tudi detekcijski reagent. To so protitelesa, označena s PE, ki proizvajajo fluorescenčni signal, sorazmeren s količino vezanega analita. Vzorec, ki vsebuje želene analite, fluorescenčne delce in detekcijski reagent skupaj inkubiramo. Po inkubaciji nastanejo kompleksi (delec + citokin + detekcijski reagent), ki jih lahko merimo s pretočno citometrijo. S pretočnim citometrom identificiramo tako fluorescenco delca kot tudi detektorja. Fluorescenca delca identificira analit, fikoeritrinska fluorescenca detektorja pa nam da podatke o koncentraciji tega analita v vzorcu. Na pretočnem citometru razberemo rezultate v grafični in tabelarni obliki.



Slika 8: Becton Dickinson Cytometric Bead Array (BD CBA) tehnika (BD Biosciences)

Priprava standardov:

Liofilizirane standarde človeških vnetnih citokinov (Becton Dickinson CBA Human Inflammatory Cytokines Kit, USA) smo prenesli v 15-mililitrsko polipropilensko epruveto in jo označili kot "Top standard". Standarde smo raztopili v 2 ml medija (BD CBA Human Inflammatory Cytokines Kit, USA), inkubirali na sobni temperaturi 15 minut in jih nato s pipeto previdno premešali. Pripravili smo 8 epruvet (12 x 75 mm) in jih uredili v vrstnem redu: 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128, 1 : 256. V vsako epruveto smo odpipetirali 300 μ L medija in pripravili serijo redčitev. 300 μ L Top standarda smo prenesli v epruveto 1 : 2 in premešali s pipeto. Serijo redčitev smo nadaljevali tako, da smo prenesli 300 μ L vsebine iz epruvete 1 : 2 v epruveto 1 : 4 in tako nadaljevali do epruvete 1 : 256. Pripravili smo še eno epruveto, v katero smo dali le medij in je služila kot negativna kontrola.

Priprava mešanice fluorescirajočih delcev, konjugiranih s protitelesi za človeške vnetne citokine:

Imeli smo 6 različnih suspenzij delcev, konjugiranih s protitelesi (BD CBA Human Inflammatory Cytokines Kit, USA), za identifikacijo 6 različnih citokinov (IL-8, IL-1 β ,

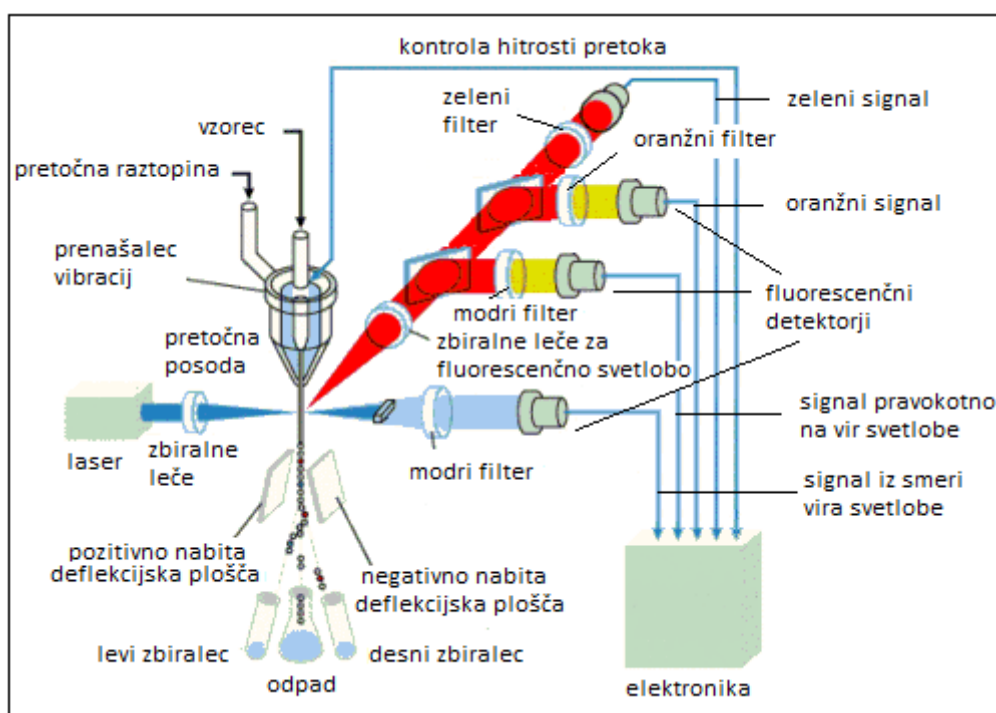
IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70). Vsaka suspenzija je bila shranjena posebej. Pripravili smo si 24 epruvet (9 za standarde, 1 za kontrolo, 14 za vzorce) in jih označili. Vseh 6 suspenzij smo dobro premešali na vibracijskem stresalniku, preden smo jih združili v eno epruveto, ki smo jo označili z "mix CB (Capture Beads)". Iz vsake suspenzije smo odpipetirali po 240 μ l (10 μ l za vsako epruveto). Mešanico suspenzij smo dobro premešali in v pripravljene epruvete odpipetirali po 50 μ l suspenzije delcev, konjugiranih s protitelesi. Nato smo dodali po 50 μ l raztopin standardov v epruvete, označene z redčitvami standardov. V kontrolno epruveto nismo dali standarda, temveč le medij. V epruvete, namenjene vzorcem, smo dali po 50 μ l vsakega neznanega vzorca. V naslednjem koraku smo v vse epruvete dali po 50 μ l PE detekcijskega reagenta (BD CBA Human Inflammatory Cytokines Kit, USA) in inkubirali 3 ure v temnem prostoru pri sobni temperaturi. Med inkubacijo smo opravili vse potrebne nastavitve na pretočnem citometru. Po inkubaciji smo v vse epruvete dali 1 ml pufru (BD CBA Human Inflammatory Cytokines Kit, USA) in centrifugirali 5 minut pri 200 g. Previdno smo odlili supernatant in usedlino resuspendirali v 300 μ l pufru.

3.4.2 Analiza s pretočnim citometrom

3.4.2.1 Princip delovanja pretočnega citometra

Ključni deli pretočnega citometra so fluidni sistem, laserji (vir svetlobe za sipanje in fluorescenco), optika (zbira in usmerja svetlobo), detektorji (sprejemajo svetlobo) in računalniški sistem (pretvori signal iz detektorjev v digitalne podatke in poda analizo). Celice ali delci v suspenziji potujejo skozi ozko režo pod pritiskom, tako da so na mestu, kjer jih osvetli laserski žarek, prisotne posamezno. Takemu načinu rečemo hidrodinamično fokusiranje. Laserski žarek se na celici oziroma delcu lomi ali sipa v vseh smereh (razpršena svetloba), lahko pa se absorbira v različnih fluorescenčnih barvilih, ki fluorescirajo svetlobo višjih valovnih dolžin (Flow Cytometry Introduction, 2011). Fotodetektorji zbirajo svetlobne signale, ki pridejo do njih prek sistema leč in filtrov. Fotodetektor FALS (Forward Angle Light Scatter) sprejema razpršeno svetlobo, ki prihaja iz smeri laserskega žarka. Količina sprejete svetlobe je obratno sorazmerna z velikostjo

celice. Fotodetektor RALS (Right Angle Light Scatter) pa sprejema razpršeno svetlobo, pravokotno na smer laserskega žarka. Količina sprejete svetlobe je v skladu z granularnostjo in površinsko strukturo celic. Fluorescirajoča svetloba potuje skozi serijo leč in filtrov, ki svetlobo različnih valovnih dolžin usmerijo v primerne detektorje. Trije fluorescenčni detektorji merijo izsevano fluorescenčno svetlobo določene valovne dolžine in tako signal, ki ga oddaja določeno fluorescenčno barvilo. V detekcijski coni je sistem leč, ki sprejeto svetlobo posredujejo fotopomnoževalkam. Fotopomnoževalke pretvarjajo svetlobne signale v električne signale, katerih izmerjene vrednosti lahko po računalniški obdelavi prikažemo matematično in grafično (Ihan, 1999).



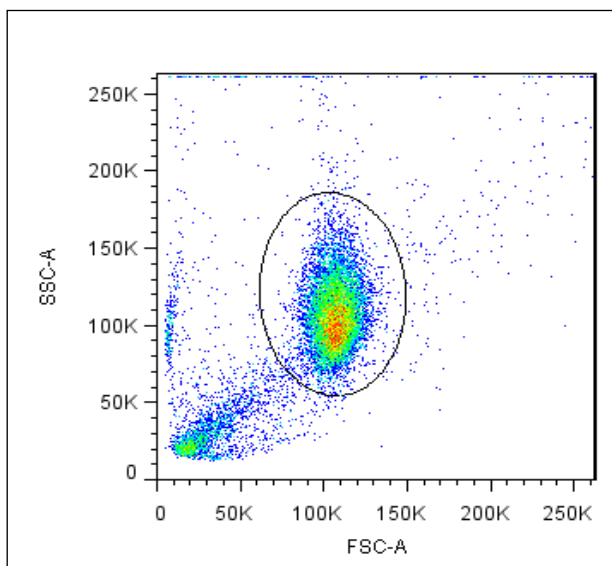
Slika 9: Shematični prikaz pretočnega citometra FACS Calibur

3.4.2.2 Nastavitve pretočnega citometra

V epruveto smo dali 50 μ l suspenzije za nastavitev citometra in jo 30 minut inkubirali v temnem prostoru na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo dodali 450 μ l pufru in opravili vse potrebne nastavitve na pretočnem citometru. Epruveto s pripravljeno suspenzijo smo namestili v citometer in zagnali proces nastavitvev.

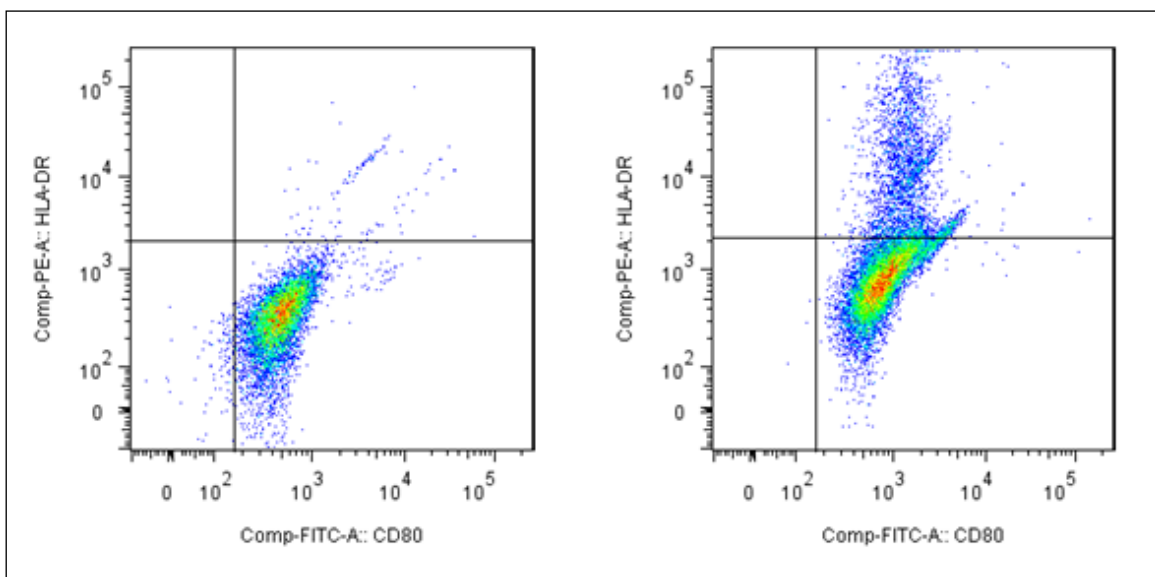
3.4.2.3 Analiza vzorcev

Vzorci smo premešali na vibracijskem stresalniku 3 do 5 sekund in jih vstavili v pretočni citometer. Rezultati so se izpisali na zaslonu v obliki točkovnega diagrama. Vsaka točka v diagramu predstavlja dogodek, ki ga zaznajo fotodetektorji. Na osi X je prikazana velikost celice, ki jo zazna fotodetektor FALS (količina prejete svetlobe je obratno sorazmerna z velikostjo celice), na osi Y pa zrnatost celic, ki jo zazna fotodetektor RALS (zrnatost je odraz količine in lastnosti membranskih struktur celice). Na podlagi položaja točk v diagramu lahko razločimo posamezno vrsto celic glede na njihovo morfologijo. S pomočjo računalniške miške obkrožimo vrsto limfocitov, ki jo želimo analizirati naprej, in jo tako ločimo od preostalih.



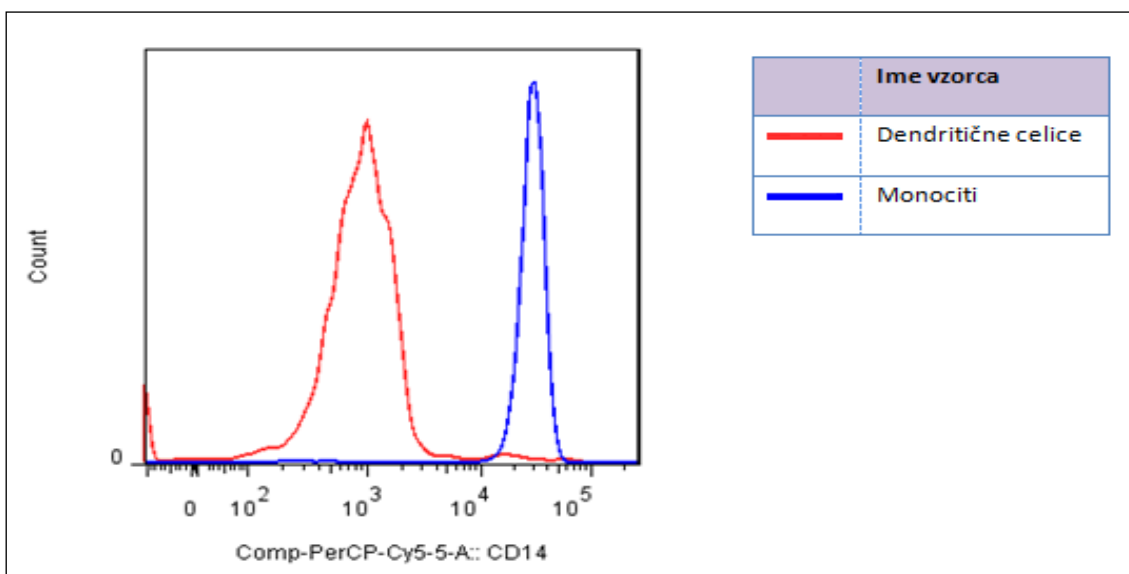
Slika 10: Točkovni diagram, ki prikazuje morfologijo celic

Pri nadaljnji analizi opazujemo celice glede na fluorescenco, točkovni diagram pa je drugačen. Površinske molekule smo označili z različnimi fluorescenčnimi barvili, zato lahko primerjamo vrednosti intenzitet fluorescence dveh površinskih molekul na istem diagramu. Na osi X je predstavljena vrednost intenzitete fluorescence celic (svetilnost celic), označenih s protitelesi z eno vrsto fluorokroma, na osi Y pa svetilnost celic, označenih s protitelesi z drugo vrsto fluorokroma.



Slika 11: Točkovni diagram, ki prikazuje celice, označene z monoklonskimi protitelesi CD80 FITC in HLA-DR PE. Na sliki so prikazane nespodbujene dendritične celice (negativna kontrola) in dendritične celice po spodbujanju z antigeni bakterije *Helicobacter pylori*.

Poseben diagram nam omogoča primerjavo svetilnosti različnih vrst celic, označenih z istim fluorescenčnim barvilom. Os Y prikazuje število celic, os X pa njihovo svetilnost. Različne barve krivulj omogočajo razlikovanje med vrstami celic, za katere celice gre, pa razberemo iz legende.



Slika 12: Primerjava svetilnosti dendritičnih celic in monocitov na podlagi izražanja površinske molekule CD14

3.5 STATISTIČNA OBDELAVA

Na podlagi rezultatov, dobljenih s pomočjo pretočnega citometra, smo najprej izračunali povprečne vrednosti za določen parameter. Statistično značilne razlike v izražanju površinskih markerjev CD14, CD80, CD83, CD86, TLR2, TLR4 in HLA-DR med preučevanima skupinama sevov (sevi, neobčutljivi na terapijo (SNT) in sevi, občutljivi na terapijo (SOT)) smo analizirali z uporabo neodvisnega Student's T testa ter določili vrednosti p. Stopnja tveganja je bila 0,05, kar pomeni da je razlika med skupinama za določen parameter statistično značilna, če je vrednost p manjša od 0,05.

Razlike v koncentraciji citokinov smo analizirali z neparametričnim testom Mann-Whitney. Za analizo z neparametričnim testom Mann-Whitney smo uporabili program PSAW/SPSS za Windows verzijo 18 (SPSS Inc., IBM Company, USA). Rezultate smo prikazali kot povprečje MFI (mediana fluorescenčna intenziteta – svetilnost) $\pm$ SE (standardna napaka).

4 REZULTATI

V naši raziskavi smo preverjali aktivacijo DC ob *in vitro* spodbujanju z različnimi antigeni *H. pylori*. Bakterijske lizate smo izolirali iz dveh skupin bolnikov. V prvi skupini so bili bolniki, pri katerih je bila predhodna antibiotična terapija uspešna, zato smo te seve *H. pylori* označili kot SOT (sevi, občutljivi na terapijo). Drugo skupino so predstavljali bolniki, pri katerih predhodna antibiotična terapija ni uspela, zato smo seve *H. pylori*, izolirane iz teh posameznikov, označili kot SNT (sevi, neobčutljivi na terapijo).

Suspenzije celic smo označili z monoklonskimi protitelesi in na pretočnem citometru določili mediane fluorescenčne intenzitete (MFI):

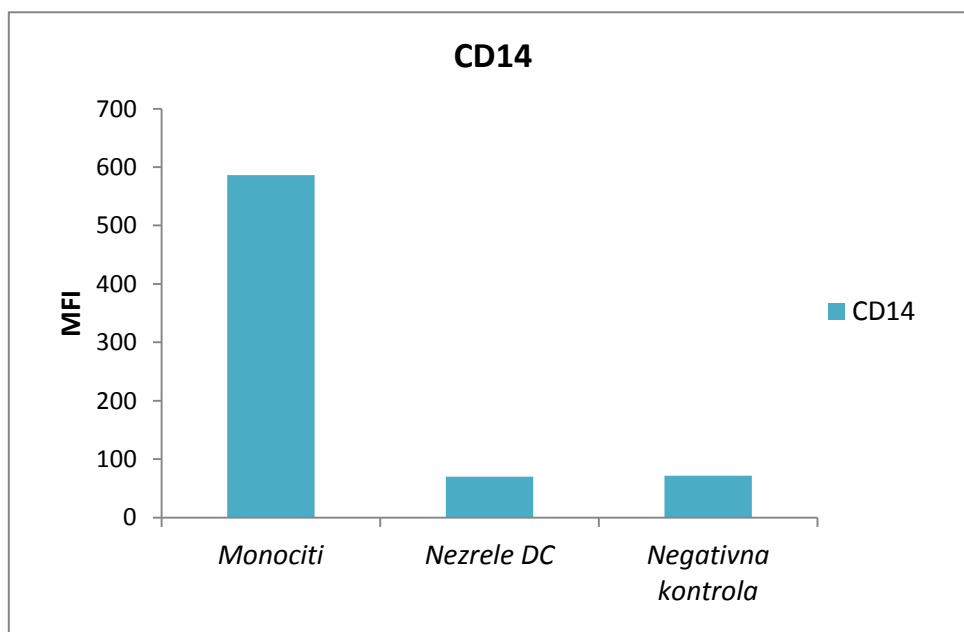
- monocitov, ki so izražali CD14, CD80, CD83, CD86 in HLA-DR,
- nezrelih DC, ki so izražale CD14, CD80, CD83, CD86 in HLA-DR,
- DC, stimuliranih z antigeni *H. pylori*, ki so izražale CD80, CD83, CD86, HLA-DR, TLR2 in TLR4
- DC, stimuliranih z antigeni *H. pylori*, ki so sproščale IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 in TNF- α .

Za analizo izražanja površinskih molekul in analizo produkcije citokinov smo pripravili sedem paralelk DC, ki niso bule stimulirane z antigeni *H. pylori* (sedem kontrol), sedem paralelk DC, spodbujenih z različnimi *H. pylori* SNT, in sedem paralelk DC, spodbujenih z različnimi *H. pylori* SOT. Z analizo na pretočnem citometru smo pridobili podatke o MFI molekul, označenih s fluorescenčnimi barvili, za vsak merjen vzorec. Izračunali smo povprečje medianih fluorescenčnih intenzitet kontrol in DC, spodbujenih s *H. pylori* SNT in SOT, za vsak označen parameter. Statistično značilne razlike med skupinami vzorcev (negativna kontrola, *H. pylori* SNT in SOT) za posamezen parameter smo določili s pomočjo neodvisnega Student's T testa, s katerim smo določili tudi vrednosti p. Preverjali smo ničelno hipotezo, ki s 95-odstotno verjetnostjo predpostavlja, da med vzorci ni statistično značilnih razlik. Stopnja tveganja je bila 0,05, kar pomeni, da je razlika med skupinama za določen parameter statistično značilna, če je vrednost p manjša od 0,05.

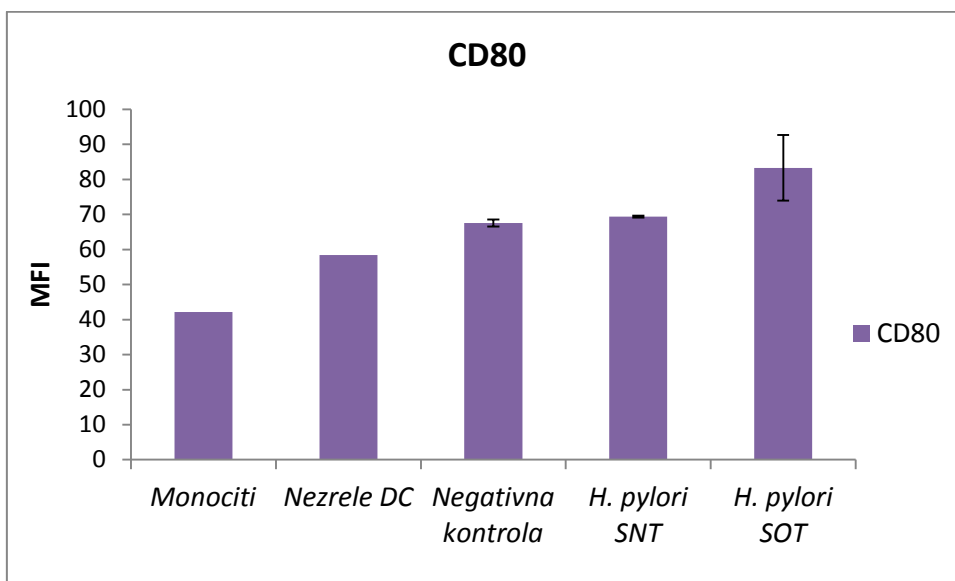
4.1 DOZOREVANJE DENDRITIČNIH CELIC

Monocyte, izolirane iz MNC, smo označili z monoklonskimi protitelesi in jih analizirali na pretočnem citometru. DC smo pripravili iz monocitov, ki smo jih gojili v celičnem mediju z dodanim humanim rekombinantnim IL-4 in GM-CSF. Po petih dnevih gojenja smo nezrele DC analizirali s pretočnim citometrom, jim dodali bakterijski lizat in jih gojili še dva dni. Po dveh dneh stimulacije z bakterijskimi antigeni smo izvedli še analizo zrelih DC na pretočnem citometru.

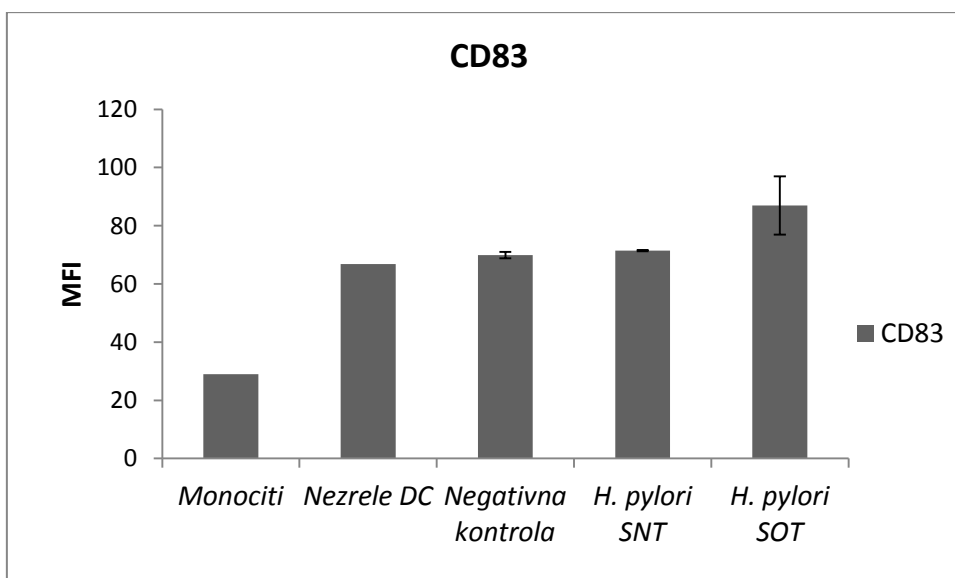
Izolirani monociti močno izražajo molekulo CD14, z diferenciacijo v DC pa se stopnja izražanja CD14 zmanjšuje. Zrele DC prenehajo izražati molekulo DC14 in v primerjavi z monociti povečajo izražanje kostimulatornih molekul CD80 in CD86, molekule CD83 ter molekule PHK razreda II (HLA-DR).



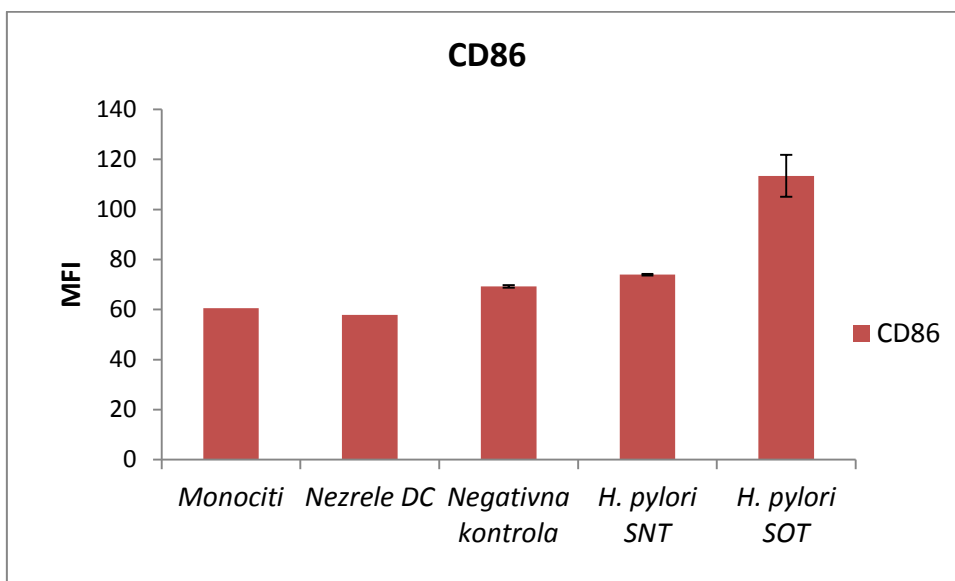
Slika 13: Dozorevanje dendritičnih celic, prikazano z izražanjem površinske molekule CD14 na izoliranih monocitih pred gojenjem, nezrelih dendritičnih celicah in nespodbujenih dendritičnih celicah (negativna kontrola). Rezultati so prikazani kot mediane fluorescenčne intenzitete (MFI) monocitov in dendritičnih celic, ki izražajo površinsko molekulo CD14.



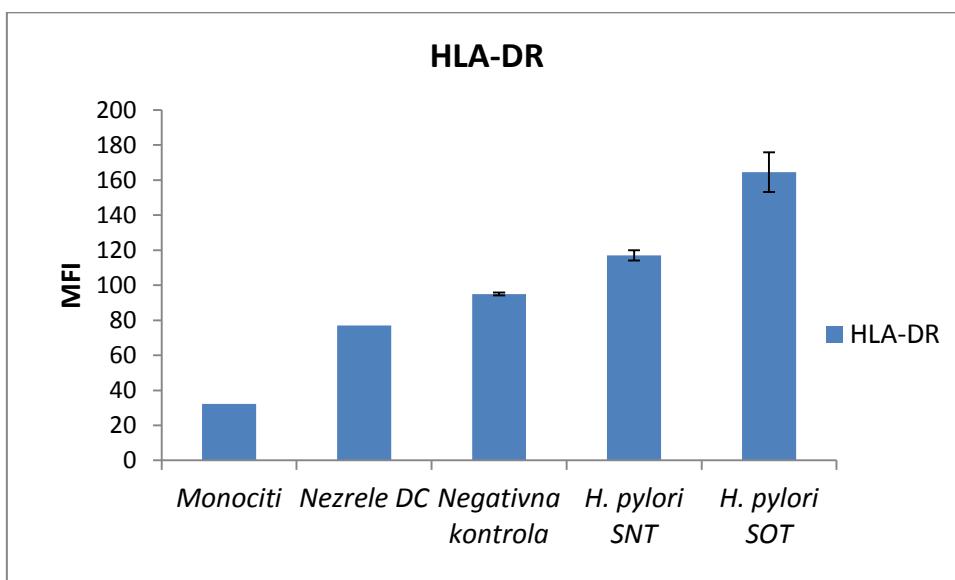
Slika 14: Dozorevanje dendritičnih celic, prikazano z izražanjem površinske molekule CD80 na izoliranih monocitih pred gojenjem, nezrelih dendritičnih celicah, nespodbujenih dendritičnih celicah (negativna kontrola) in po spodbujanju dendritičnih celic z različnimi sevi bakterije *Helicobacter pylori*. Rezultati so prikazani kot mediane fluorescenčne intenzitete (MFI) monocitov in dendritičnih celic, ki izražajo CD80. Pri nespodbujenih dendritičnih celicah (negativna kontrola) in dendritičnih celicah, spodbujenih s *H. pylori* SNT (sevi, neobčutljivi na terapijo) in SOT (sevi, občutljivi na terapijo), je prikazano povprečje MFI za posamezno skupino, ki je izračunano na podlagi sedmih meritev, podana pa je tudi standardna napaka (SE).



Slika 15: Aktivacija dendritičnih celic, prikazana z izražanjem površinske molekule CD83 na izoliranih monocitih pred gojenjem, nezrelih dendritičnih celicah, nespodbujenih dendritičnih celicah (negativna kontrola) in po spodbujanju dendritičnih celic z različnimi sevi bakterije *Helicobacter pylori*. Rezultati so prikazani kot mediane fluorescenčne intenzitete (MFI) monocitov in dendritičnih celic, ki izražajo CD83. Pri nespodbujenih dendritičnih celicah (negativna kontrola) in dendritičnih celicah, spodbujenih s *H. pylori* SNT (sevi, neobčutljivi na terapijo) in SOT (sevi, občutljivi na terapijo), je prikazano povprečje MFI za posamezno skupino, ki je izračunano na podlagi sedmih meritev, podana pa je tudi standardna napaka (SE).



Slika 16: Dozorevanje dendritičnih celic, prikazano z izražanjem površinske molekule CD86 na izoliranih monocitih pred gojenjem, nezrelih dendritičnih celicah, nespodbujenih dendritičnih celicah (negativna kontrola) in po spodbujanju dendritičnih celic z različnimi sevi bakterije *Helicobacter pylori*. Rezultati so prikazani kot mediane fluorescenčne intenzitete (MFI) monocitov in dendritičnih celic, ki izražajo CD86. Pri nespodbujenih dendritičnih celicah (negativna kontrola) in dendritičnih celicah, spodbujenih s *H. pylori* SNT (sevi, neobčutljivi na terapijo) in SOT (sevi, občutljivi na terapijo), je prikazano povprečje MFI za posamezno skupino, ki je izračunano na podlagi sedmih meritev, podana pa je tudi standardna napaka (SE).



Slika 17: Dozorevanje dendritičnih celic, prikazano z izražanjem površinske molekule HLA-DR na izoliranih monocitih pred gojenjem, nezrelih dendritičnih celicah, nespodbujenih dendritičnih celicah (negativna kontrola) in po spodbujanju dendritičnih celic z različnimi sevi bakterije *Helicobacter pylori*. Rezultati so prikazani kot mediane fluorescenčne intenzitete (MFI) monocitov in dendritičnih celic, ki izražajo HLA-DR. Pri nespodbujenih dendritičnih celicah (negativna kontrola) in dendritičnih celicah, spodbujenih s *H. pylori* SNT (sevi, neobčutljivi na terapijo) in SOT (sevi, občutljivi na terapijo), je prikazano povprečje MFI za posamezno skupino, ki je izračunano na podlagi sedmih meritev, podana pa je tudi standardna napaka (SE).

4.2 IZRAŽANJE POVRŠINSKIH MOLEKUL CD80, CD83, CD86, HLA-DR, TLR2 IN TLR4 NA DENDRITIČNIH CELICAH

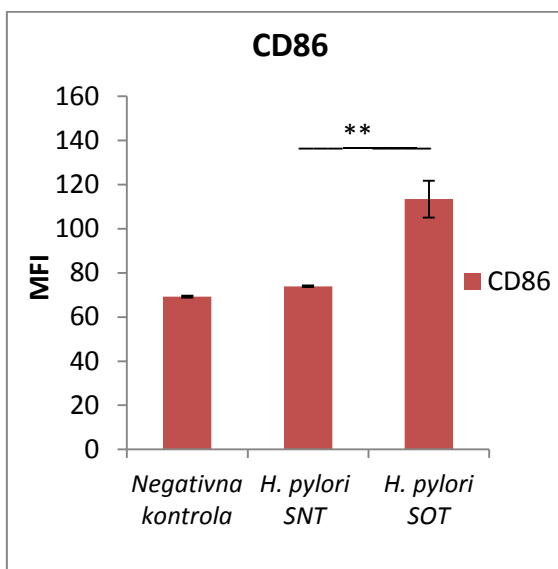
Dendritične celice smo *in vitro* spodbujali s *H. pylori* SNT in SOT tako, da smo nezrelim DC dodali bakterijske lizate in jih gojili še 48 ur. Kot negativna kontrola so nam služile DC, ki jih nismo spodbujali z bakterijskimi antigeni. Po spodbujanju DC z bakterijskimi antigeni smo opazovali izražanje molekul PHK razreda II (HLA-DR), molekule CD83, kostimulatornih molekul CD80 in CD86 ter receptorjev TLR2 in TLR4 na DC.

Preglednica 1: Izražanje površinskih molekul na dendritičnih celicah, po spodbujanju z različnimi sevi bakterije *Helicobacter pylori*.

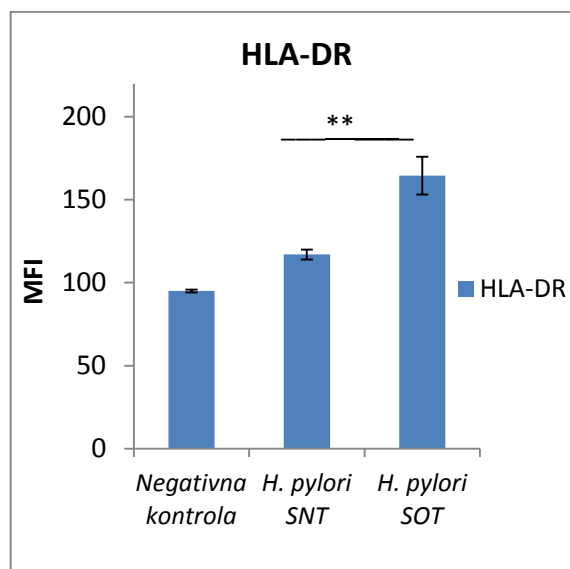
	Negativna kontrola	<i>H. pylori</i> SNT	<i>H. pylori</i> SOT
CD80 MFI ± SE	67,7 ± 1,0	69,4 ± 0,3	83,3 ± 9,4
CD83 MFI ± SE	69,9 ± 1,1	71,4 ± 0,2	87,0 ± 10,0
CD86 MFI ± SE	69,2 ± 0,5	73,9 ± 0,4 **	113,4 ± 8,4 **
HLA-DR MFI ± SE	95,0 ± 0,8	117,0 ± 3,0 **	164,6 ± 11,3 **
TLR2 MFI ± SE	62,2 ± 0,69	60,6 ± 0,16	66,9 ± 2,26
TLR4 MFI ± SE	50,6 ± 0,31	63,2 ± 0,2 **	61,7 ± 1,51 **

Rezultati so prikazani kot povprečje medianih fluorescenčnih intenzitet (MFI) ± standardna napaka (SE). Povprečje MFI za posamezno skupino je izračunano na podlagi sedmih meritev. Statistično značilne razlike med kontrolo in *H. pylori* SNT (sevi, neobčutljivi na terapijo) ali SOT (sevi, občutljivi na terapijo) smo prikazali z *, če je $p \leq 0,05$, in z **, če je $p \leq 0,01$.

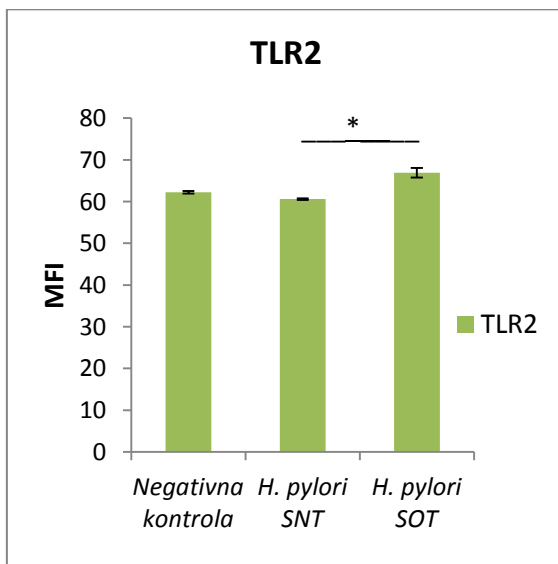
Dendritične celice po inkubaciji z različnimi sevi *H. pylori* statistično značilno povečajo izražanje kostimulatornih molekul CD86, molekul PHK razreda II (HLA-DR) in TLR4 v primerjavi z negativno kontrolo.



Slika 18: Izražanje kostimulatorne molekule CD86 na dendritičnih celicah po spodbujanju z različnimi sevi bakterije *Helicobacter pylori*. Prikazano je povprečje medianih fluorescenčnih intenzitet (MFI) za posamezno skupino, ki je izračunano na podlagi sedmih meritev, podane pa so tudi standardne napake (SE). Statistično značilne razlike med negativno kontrolo in *H. pylori* SNT (sevi, neobčutljivi na terapijo) ali SOT (sevi, občutljivi na terapijo) smo prikazali z *, če je $p \leq 0,05$, in z **, če je $p \leq 0,01$.



Slika 19: Izražanje površinske molekule HLA-DR na dendritičnih celicah po spodbujanju z različnimi sevi bakterije *Helicobacter pylori*. Prikazano je povprečje medianih fluorescenčnih intenzitet (MFI) za posamezno skupino, ki je izračunano na podlagi sedmih meritev, podane pa so tudi standardne napake (SE). Statistično značilne razlike med negativno kontrolo in *H. pylori* SNT (sevi, neobčutljivi na terapijo) ali SOT (sevi, občutljivi na terapijo) smo prikazali z *, če je $p \leq 0,05$, in z **, če je $p \leq 0,01$.



Slika 20: Izražanje "toll-like" receptorja 2 na dendritičnih celicah po spodbujanju z različnimi sevi bakterije *Helicobacter pylori*. Prikazano je povprečje medianih fluorescenčnih intenzitet (MFI) za posamezno skupino, ki je izračunano na podlagi sedmih meritev, podane pa so tudi standardne napake (SE). Statistično značilne razlike med negativno kontrolo in *H. pylori* SNT (sevi, neobčutljivi na terapijo) ali SOT (sevi, občutljivi na terapijo) smo prikazali z *, če je $p \leq 0,05$, in z **, če je $p \leq 0,01$.

Dendritične celice po spodbujanju s *H. pylori* SOT statistično značilno povečajo izražanje CD86, HLA-DR in TLR2 kakor DC, ki so bile spodbujene s *H. pylori* SNT.

4.3 PRODUKCIJA CITOKINOV IZ DENDRITIČNIH CELIC

Dendritične celice smo spodbujali z antigeni *H. pylori* tako, da smo nezrelim DC dodali bakterijski lizat in jih gojili še 48 ur. Po aktivaciji z bakterijskimi antigeni smo opazovali sproščanje vnetnih in regulatornih citokinov IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 in TNF- α iz DC.

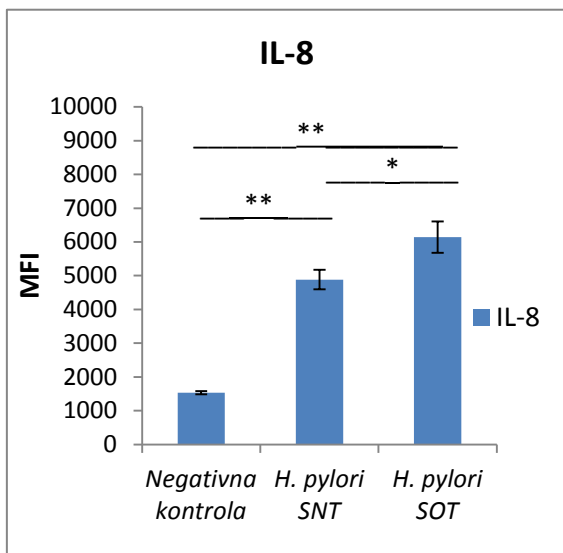
Preglednica 2: Sproščanje vnetnih in regulatornih citokinov iz dendritičnih celic po spodbujanju z različnimi sevi bakterije *Helicobacter pylori*.

	Negativna kontrola	<i>H. pylori</i> SNT	<i>H. pylori</i> SOT
IL-8 MFI $\pm$ SE	1536,7 $\pm$ 46,8	4885,4 $\pm$ 291,9 **	6143,5 $\pm$ 468,1 **
IL-1b MFI $\pm$ SE	14,5 $\pm$ 1,1	16,6 $\pm$ 1,0	19,2 $\pm$ 1,6 *
IL-6 MFI $\pm$ SE	19,4 $\pm$ 0,9	24,9 $\pm$ 2,2 *	35,1 $\pm$ 9,6 **
IL-10 MFI $\pm$ SE	15,0 $\pm$ 0,9	17,2 $\pm$ 0,6	15,2 $\pm$ 0,5
TNF-α MFI $\pm$ SE	38,5 $\pm$ 1,2	52,6 $\pm$ 8,2	73,0 $\pm$ 22,3 *
IL-12p70 MFI $\pm$ SE	16,1 $\pm$ 0,5	30,2 $\pm$ 0,5 **	30,5 $\pm$ 0,7 **

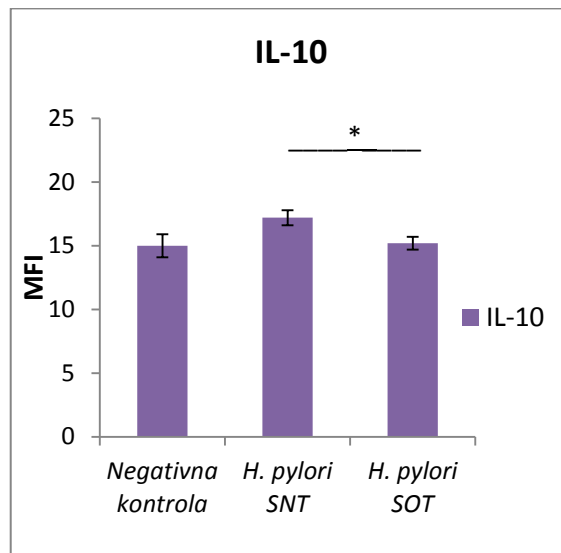
Rezultati so prikazani kot povprečje medianih fluorescenčnih intenzitet (MFI) $\pm$ standardna napaka (SE). Povprečje MFI za posamezno skupino je izračunano na podlagi sedmih meritev. Statistično značilne razlike med kontrolo in *H. pylori* SNT (sevi, neobčutljivi na terapijo) ali SOT (sevi, občutljivi na terapijo) smo prikazali z *, če je $p \leq 0,05$, in z **, če je $p \leq 0,01$.

Dendritične celice po inkubaciji s *H. pylori* SNT statistično značilno povečajo sproščanje IL-8, IL-12p70 in IL-6 v primerjavi z negativno kontrolo.

Spodbujanje DC s *H. pylori* SOT, statistično značilno poveča sproščanje IL-8, IL-1b, IL-6, TNF- α in IL-12 iz DC v primerjavi z negativno kontrolo.



Slika 21: Sproščanje interleukina 8 iz dendritičnih celic po spodbujanju z različnimi sevi bakterije *Helicobacter pylori*. Prikazano je povprečje medianih fluorescenčnih intenzitet (MFI) za posamezno skupino, ki je izračunano na podlagi sedmih meritev, podane pa so tudi standardne napake (SE). Statistično značilne razlike med negativno kontrolo in *H. pylori* SNT (sevi, neobčutljivi na terapijo) ali SOT (sevi, občutljivi na terapijo) smo prikazali z *, če je $p \leq 0,05$, in z **, če je $p \leq 0,01$.



Slika 22: Sproščanje interleukina 10 iz dendritičnih celic po spodbujanju z različnimi sevi bakterije *Helicobacter pylori*. Prikazano je povprečje medianih fluorescenčnih intenzitet (MFI) za posamezno skupino, ki je izračunano na podlagi sedmih meritev, podane pa so tudi standardne napake (SE). Statistično značilne razlike med negativno kontrolo in *H. pylori* SNT (sevi, neobčutljivi na terapijo) ali SOT (sevi, občutljivi na terapijo) smo prikazali z *, če je $p \leq 0,05$, in z **, če je $p \leq 0,01$.

Pri opazovanju statistično značilnih razlik med DC, spodbujenimi s *H. pylori* SNT in SOT, smo ugotovili, da je sproščanje IL-8 večje pri DC, stimuliranih s *H. pylori* SOT, medtem ko je sproščanje IL-10 večje pri DC, stimuliranih s *H. pylori* SNT.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Uvod

Bakterija *Helicobacter pylori* kolonizira želodčno sluznico najmanj 50–80 % svetovne populacije (Hasni, Ippolito in Illei, 2011). Za njeno odstranitev iz organizma je potrebno antibiotično zdravljenje v kombinaciji z učinkovitim imunskim odzivom. Čeprav izzove *H. pylori* tako naravno kot specifično imunost, je imunski odziv nanj običajno neučinkovit. Z boljšim razumevanjem mehanizma imunskega odziva na *H. pylori* bi lahko prišli do novih oblik zdravljenja infekcije s to bakterijo. V raziskavi smo izvedli *in vitro* stimulacijo DC z različnimi sevi *H. pylori*, s čimer smo želeli razjasniti, kateri antigeni pri določenih sevih *H. pylori* sprožijo zadosten imunski odziv na okužbo in s tem pripomorejo k odstranitvi *H. pylori* iz organizma.

Dendritične celice so antigen predstavitvene celice, ki povezujejo naravni in specifični imunski odziv (Tanaka in sod., 2010) in z izpostavljanjem tujih antigenov na svoji površini določajo način imunskega odziva. S TLR, ki jih izražajo na svoji površini, prepoznava različne strukture, prisotne na mikroorganizmih (Takeda in Akira, 2003). Nezrele DC imajo visoko sposobnost fagocitoze in so specializirane za lovljenje in predstavljanje antigenov. Vezava antigena na TLR povzroči aktivacijo in zorenje DC, ki nato fagocitirajo antigen in ga predstavijo "naivnim" celicam T. Celice T na svoji površini izražajo TCR, ki prepoznava mikrobne antigene, povezane z molekulami PHK na površini DC. Prepoznavanje kompleksa antigen-PHK povzroči razmnoževanje in diferenciacijo "naivnih" celic T v spominske celice T in efektorske celice T, Th, Tc in Treg. Zrele DC vplivajo na diferenciacijo celic T tudi z izražanjem kostimulatornih molekul in z izločanjem citokinov (Guermonprez in sod., 2002; Mazzoni in Seagal, 2004; Abbas, Lichtman in Pillai, 2007; Coico in Sunshine, 2009).

Kopitar in sodelavci so leta 2007 izvedli raziskavo, kjer so primerjali uspeh antibiotičnega zdravljenja okužbe s *H. pylori* s specifičnim T-celičnim odzivom, merjenim pred zdravljenjem. Pred zdravljenjem so bolnikom odvzeli biopsijske vzorce antralnega dela želodčne sluznice in jih uporabili za gojenje bakterije *H. pylori*. Iz krvi bolnikov so izolirali MNC in jih razdelili na dva dela. Iz enega dela so pripravili DC, ki so jih *in vitro* spodbujali z bakterijskimi antigeni *H. pylori*, drug del pa so uporabili za kasnejšo stimulacijo limfocitov T z bakterijskimi antigeni, ki so jim jih predstavile DC (merjenje specifičnega T-odziva). Zrelost DC so preverili na podlagi izražanja molekul CD80, CD83, CD86, CD14 in HLA-DR na površini DC. Zrele DC so v primerjavi z monociti povečale izražanje CD80, CD83 in HLA-DR ter zmanjšale ekspresijo CD14, kar se delno ujema z rezultati naše raziskave. Po stimulaciji MNC so s pretočnim citometrom določili aktivirane limfocite T na podlagi količine izraženih CD25 ali CD69 in količine proizvodnje znotrajceličnega IFN- γ ali IL-4 ter rezultate primerjali z uspehom zdravljenja eno leto po antibiotični terapiji. Rezultati so pokazali, da so bolniki, pri katerih je bilo zdravljenje z antibiotiki uspešno, močno povečali tvorbo IL-4 in IFN- γ v primerjavi z bolniki, pri katerih je bila antibiotična terapija neuspešna. Ugotovili so, da proizvodnja citokinov lahko napove uspešnost antibiotičnega zdravljenja, medtem ko uspešnosti na podlagi aktivacije limfocitov T z merjeno ekspresijo CD25 in CD69 ni mogoče napovedati.

Andres in sodelavci so leta 2010 raziskovali interakcije med *H. pylori* in DC. Namen njihove študije je bil določiti vpliv različnih sevov *H. pylori* na zorenje in aktivacijo DC. DC so spodbujali z dvajsetimi kliničnimi sevi *H. pylori*, z različnimi vnetnimi učinki na želodčne epitelne celice bolnikov, ki so oboleli za želodčnim rakom. Po *in vitro* spodbujanju DC z različnimi sevi *H. pylori* so s pretočnim citometrom merili sproščanje citokinov IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 in TNF- α iz DC. Zorenje spodbujenih DC so spremljali na podlagi merjenja kostimulatornih molekul CD80 in CD86 na površini DC in ugotovili, da so DC, spodbujene s *H. pylori*, povečale izražanje teh molekul v primerjavi z negativno kontrolo (nespodbujene DC), kar se ujema tudi z rezultati naše študije. Ugotovili so, da virulenčni faktorji različnih sevov *H. pylori* ne povzročajo razlik v zorenju DC, zabeležili pa so razlike v sproščanju vnetnih citokinov iz DC. Sevi *H. pylori*, ki so pri bolnikih *in vivo* povzročili močnejše vnetne odzive, so povzročili povečano sproščanje vnetnih citokinov IL-12, TNF- α , IL-6 in IL-1 β ter zmanjšano sproščanje regulatornega citokina

IL-10 *in vitro*. Naša raziskava je pokazala enake rezultate, pri opazovanju sproščanja kemokina IL-8 pa se naše ugotovitve in ugotovitve Andresa in sodelavcev razlikujejo. Sproščanje IL-8 so opazovali pri spodbujenih rakavih epitelih celicah, kjer so ga uporabili za nadomestni marker vnetnega potenciala posameznih sevov. Spodbujene epitelne celice so sicer povečale sproščanje IL-8 v primerjavi z negativno kontrolo (nespodbujene epitelne celice), vendar pa razlik med sevi z različnim vnetnim potencialom, ki so ga ugotovili pri bolnikih, *in vitro* niso opazili. Odgovor DC na spodbujanje z različnimi sevi *H. pylori in vitro* se ujema s kliničnimi izsledki posameznih bolnikov, kar poudari velik pomen DC pri usmerjanju infekcije z različnimi sevi *H. pylori*.

5.1.2 Analiza rezultatov

5.1.2.1 Dozorevanje dendritičnih celic

Monocyte, izolirane iz MNC, smo označili z monoklonskimi protitelesi in jih analizirali na pretočnem citometru. DC smo pripravili iz monocitov, ki smo jih gojili v celičnem mediju z dodanim humanim rekombinantnim IL-4 in GM-CSF. Po petih dnevih gojenja smo nezrele DC analizirali s pretočnim citometrom, jim dodali bakterijski lizat in jih gojili še dva dni. Po dveh dneh stimulacije z bakterijskimi antigeni smo izvedli še analizo zrelih DC na pretočnem citometru. Morfološko DC in monocitov v mirujočem stanju ne moremo razločiti, zato jih ločimo na podlagi navzočnosti površinskih molekul (Vozelj, 2000). Po stimulaciji z bakterijskimi antigeni zrele DC povečajo izražanje površinskih molekul CD80, CD83, CD86 in HLA-DR (Kranzer in sod., 2004) in zmanjšajo izražanje molekule CD14, ki je značilna za monocyte (Mitchell in sod., 2007). Pri izoliranih monocitih smo izmerili visoko stopnjo izražanja CD14, ki se je pri diferenciaciji v nezrele DC znižala. Zrele DC so prenehale izražati CD14 in v primerjavi z monociti povečale izražanje kostimulatornih molekul CD80 in CD86, molekule CD83 ter molekul PHK razreda II (HLA-DR), s čimer smo se prepričali o njihovi zrelosti.

5.1.2.2 Izražanje površinskih molekul CD80, CD83, CD86, HLA-DR, TLR2 in TLR4 na dendritičnih celicah ter sproščanje vnetnih in regulatornih citokinov

Dendritične celice, izolirane iz zdravih prostovoljcev, smo *in vitro* spodbujali s *H. pylori* SNT (sevi, neobčutljivi na terapijo) in SOT (sevi, občutljivi na terapijo). Nezrelim DC smo dodali bakterijske lizate in jih gojili še dodatnih 48 ur. Za kontrolo smo uporabili DC, ki jih nismo spodbujali z bakterijskimi antigeni.

Rezultati so pokazali, da so DC po stimulaciji z bakterijskim antigenom povečale izražanje molekul CD86 in HLA-DR v primerjavi z nespodbujenimi DC (negativna kontrola). Podobna odkritja so v svojih raziskavah zabeležili Hafsi in sodelavci leta 2004, Kranzer in sodelavci leta 2004, Wang in sodelavci leta 2010 in Bimczok in sodelavci leta 2010.

DC so APC, ki prepoznavajo bakterijske antigene in jih predstavljajo naivnim celicam T. So ključnega pomena pri naravni imunosti in pri posredovanju specifičnih imunskih odzivov. Vezava bakterijskega antigena na TLR na površini DC povzroči aktivacijo in zorenje DC. Zrele DC na svoji površini povečajo izražanje molekul PHK in kostimulatornih molekul (Coico in Sunshine, 2009), zato smo s primerjavo stopnje izražanja površinskih molekul stimuliranih DC in kontrole ugotovili, da antigeni *H. pylori* sprožijo imunski odziv.

V naši raziskavi smo želeli preučiti predvsem razlike v imunskem odzivu, ki jih povzročajo *H. pylori* SNT in SOT, kar smo ugotavljali na podlagi izražanja površinskih molekul in sproščanja citokinov iz DC.

Primerjava izražanja površinskih molekul na DC, spodbujenih s *H. pylori* SNT in SOT, je pokazala statistično značilno povečanje izražanja CD86 in HLA-DR pri *H. pylori* SOT. CD86 in HLA-DR so aktivacijske molekule, ki jih na svoji površini izražajo aktivirane DC in so ključnega pomena pri predstavitvi antigena celicam T (Wang in sod., 2010). Na podlagi izražanja površinskih molekul tako lahko sklepamo, da so *H. pylori* SOT bolj učinkoviti pri aktivaciji zorenja DC ter njihovi predstavitvi antigena celicam T in zato izzovejo bolj učinkovit imunski odziv. DC, ki smo jih stimulirali s *H. pylori* SNT in SOT,

so bile vzgojene iz levkocitnega koncentrata istega zdravega prostovoljca, zato lahko izključimo možnost, da bi do razlik prišlo zaradi oslabljenega imunskega sistema gostitelja. Razlike v učinkovitosti imunskega odziva lahko povzročajo različni TLR ligandi, to pa so različni antigeni *H. pylori* (Agrawal in sod., 2003).

Različni sevi *H. pylori* imajo lipopolisaharide z različno strukturo in se posledično vežejo na različne TLR; TLR4, TLR2 ali TLR5 (Rad in sod., 2007). V naši raziskavi smo preučevali izražanje TLR2 in TLR4 na DC. DC, spodbujene s *H. pylori* SOT, so izražale več TLR2 na svoji površini, kar lahko povežemo z raziskavami nekaterih študij, ki izključujejo od TLR4 odvisno epitelijsko zaznavanje *H. pylori* (Smith in sod., 2003; Su in sod., 2003; Backhed in sod., 2003). Določeni sevi *H. pylori* izzovejo aktivacijo NF- κ B le prek TLR2 in TLR5, ne pa prek TLR4. Razlog za to je specifičen LPS *H. pylori* s tetraacilno obliko lipida A, ki se veže na TLR2 in TLR5, nima pa afinitete do vezave na TLR4. Tetraacilna oblika LPS torej aktivira NF- κ B le prek TLR2 (in redko prek TLR5), kar povzroči ekspresijo genov za kemokine (IL-8) in vnetne citokine, kot so TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1b (Sankar in sod., 2006; Abbas, Lichtman in Pillai, 2007). NF- κ B je ključni transkripcijski faktor, ki je odgovoren za prepis genov, pomembnih za razvoj vnetja, celično razmnoževanje in apoptozo. Povečana aktivacija NF- κ B in sinteza citokinov, ki ju sproži *H. pylori* in njegovi produkti, lahko predstavljata pomemben mehanizem med patogenezo *H. pylori* (Smith in sod., 2011).

Rezultati so pokazali, da so DC, spodbujene s *H. pylori* SNT, statistično značilno povečale sproščanje IL-6, IL-8 in IL-12, DC, spodbujene s *H. pylori* SOT, pa sproščanje IL-1b, IL-6, IL-12, TNF- α in IL-8 v primerjavi z negativno kontrolo. Iz pridobljenih rezultatov smo sklepali, da sevi *H. pylori* aktivirajo DC in sprožijo imunski odgovor, kljub temu pa se učinkovitost imunskega odgovora med posameznimi sevi razlikuje. Podobne ugotovitve so leta 2009 v svoji raziskavi objavili tudi Obermajer in sodelavci, ki so merili citokinski odziv na limfocitih, spodbujenih s celicami THP-1, ter poudarili pomen učinkovitega citokinskega odgovora pri uspešni odstranitvi okužbe s *H. pylori*. K povečanemu sproščanju IL-8 in razvoju vnetja je morda prispevala ureaza *H. pylori*. Ureaza se veže na CD74 (del nastajajoče molekule PHK razreda II), kar sproži aktivacijo NF- κ B in posledično produkcijo IL-8 (Beswick in sod., 2006).

Zaradi ključne vloge citokinov pri usmerjanju imunskih odzivov smo primerjali sproščanje citokinov pri DC, spodbujenih s *H. pylori* SNT in SOT. DC so po spodbujanju s *H. pylori* SOT sproščale več vnetnega kemokina IL-8, medtem ko so DC, spodbujene s *H. pylori* SNT, sproščale več regulatornega IL-10.

Interlevkin 8 je pomemben citokin, ki ima osrednjo vlogo pri posredovanju vnetnih odzivov. Deluje kot kemotaktični dejavnik, ki privlači nevtrofilce, bazofilce in celice T na mesto vnetja (Coico in Sunshine, 2009). Na podlagi povečanega izražanja TLR2 in povečanega sproščanja IL-8 iz DC, spodbujenih s *H. pylori* SOT, smo sklepali, da je ključni dejavnik, ki je sprožil dovolj intenzivno vnetje za odstranitev infekcije pri *H. pylori* SOT, tetraacilna oblika lipida A lipopolisaharida *H. pylori*. Podobne ugotovitve so leta 2011 v svoji raziskavi objavili Smith in sodelavci. Menili so, da je LPS *H. pylori* je pomemben ligand TLR2, ki aktivira NF- κ B, in promotor za sintezo IL-8. V naši raziskavi je povečano sproščanje ključnega vnetnega citokina IL-8 iz DC, spodbujenih s *H. pylori* SOT, pripomoglo k posredovanju dovolj velikega vnetja za odstranitev *H. pylori* iz organizma. Spontana odstranitev *H. pylori* iz želodčne sluznice gostitelja je mogoča šele takrat, ko jakost vnetja preseže kronično vnetje (Matsumoto in sod., 2005).

Nasprotno od IL-8 je IL-10 protivnetni citokin, ki znižuje učinke IL-1 β , TNF- α , IFN- γ in drugih vnetnih citokinov (Amieva in sod., 2008). Povečano izražanje IL-10 v povezavi z zniževanjem aktivnosti IL-12 in IL-6 so v svoji raziskavi leta 2009 zabeležili tudi Gringhuis in sodelavci. *H. pylori* se lahko obdrži v mukozi, ker se zna izogniti vnetju tako, da ga zniža. To doseže z aktivacijo regulatornih celic T, ki producirajo IL-10, slednji pa zavira produkcijo IL-12 in s tem imunsko vnetje, ki ga posredujejo celice T (Blanchard in sod., 2004). Nekatere študije so pokazale, da IL-10 preprečuje izražanje površinskih molekul PHK razreda II na APC. To doseže s preprečevanjem aktivnosti katepsina S, ki je odgovoren za proteolitično razgradnjo CD74 in posledično za prenos molekul PHK razreda II na plazemsko membrano APC (Sendide in sod., 2005; Beswick in sod., 2006; Wang in sod., 2010). Njihova odkritja se ujemajo z rezultati naše raziskave, saj smo pri DC, spodbujenih s *H. pylori* SNT, ugotovili tako zmanjšano izražanje molekul HLA-DR kot tudi povečano sproščanje IL-10 v primerjavi s *H. pylori* SOT. Ugotovili smo torej, da so *H. pylori* SNT s pomočjo sprožitve povečanega sproščanja regulatornega citokina IL-10 iz

DC uspešno znižali imunsko vnetje in s tem preprečili odstranitev *H. pylori* iz organizma. Ostalo nam je še ključno vprašanje, kateri so tisti virulenčni dejavniki *H. pylori* SNT, ki so omogočili povečano sproščanje IL-10 iz spodbujenih DC. *H. pylori* izzove kronično vnetje, ki je neučinkovito pri odstranitvi infekcije, kar doseže z uspešnim izogibanjem vnetju, ki bi ga lahko odstranilo. Kritično ravnotežje med vnetjem in kolonizacijo je ključno za obstoj *H. pylori* v organizmu (Amieva in sod., 2008).

K neuspešni odstranitvi bakterije *H. pylori* iz želodčne sluznice nekaterih bolnikov po antibiotičnem zdravljenju je morda prispeval virulenčni dejavnik *H. pylori*, CagA. CagA je efektorski protein, ki v epitelnih celicah želodca povzroči spremembe v strukturi celičnih stikov, spremembe v organizaciji citoskeleta in celične gibljivosti, zmede nadzor celičnega cikla, sproži invazivnost v epitelne celice in s sproščanjem vnetnih in regulatornih citokinov (TNF- α , IL-6, IL-10, IL-8) povzroča kronično vnetje (Kim in sod., 2006; Amieva in sod., 2008; Peek, Fiske in Wilson, 2010; Hasni, Ippolito in Illei, 2011).

Leta 2010 so Tanaka in sodelavci v svoji raziskavi preučevali vpliv CagA na DC. Menili so, da je nastanek raka na želodcu, ki ga povzroča *H. pylori*, povezan z neposrednim vplivom *H. pylori* na želodčne epitelne celice in z njegovim posrednim vplivom prek sprožitve vnetnih odzivov. Nezmožnost odstranitve infekcije s *H. pylori* so povezovali z negativnim uravnavanjem gostiteljskega imunskega odziva, ki ga povzroča *H. pylori* CagA, in domnevali, da je to posledica njegovega delovanja na DC. Rezultati njihove raziskave so pokazali, da je CagA povzročil zmanjšano sproščanje vnetnih citokinov TNF- α in IL-12p40 in spodbudil sproščanje regulatornega citokina IL-10 iz spodbujenih DC. Rezultati naše raziskave so prav tako pokazali povečano sproščanje IL-10 iz DC, spodbujenih s *H. pylori* SNT, v primerjavi z DC, spodbujenimi s *H. pylori* SOT. Na podlagi primerjave naših rezultatov z njihovimi bi lahko sklepali, da je *H. pylori* CagA odgovoren za povečano sproščanje IL-10. Rezultati seroloških testov, s katerimi smo določali prisotnost CagA in VacA pri obeh skupinah sevov, pa niso pokazali statistično značilnih razlik med *H. pylori* SOT in SNT, zato ne moremo potrditi, da je za povečano sproščanje IL-10 pri *H. pylori* SNT odgovoren *H. pylori* CagA. Tanaka in sodelavci so preverjali tudi hipotezo, da je fosforilacija CagA ključnega pomena pri njegovem zaviranju funkcij DC. Fosforiliran CagA se poveže s tirozinsko fosfatazo 2, ki vsebuje domeno

homologno src 2 (SHP-2), slednja pa prepreči fosforilacijo IRF-3 in sledečo jedrno translokacijo. Tako sta preprečena signaliziranje prek TLR3 in TLR4 in sproščanje interferonov iz dendritičnih celic. Naša raziskava je pokazala povečano izražanje TLR4 pri DC, spodbujenih s *H. pylori* SNT, v primerjavi z negativno kontrolo. Kljub povečanemu izražanju TLR4 pa infekcija s *H. pylori* ni bila odstranjena. K temu je morda prispeval fosforiliran CagA, ki je prekinil signaliziranje prek TLR4 ter tako preprečil imunske odzive, ki jih posredujejo DC.

5.1.3 Možnosti za nadaljnje delo

Neuspešno antibiotično zdravljenje okužbe s *H. pylori* je običajno povezano z neučinkovitim imunskim odzivom na okužbo. Z natančnim vpogledom v mehanizme s katerimi *H. pylori* aktivira gostiteljski imunski sistem, bi bilo mogoče zasnovati nove terapije, ki bi temeljile na inhibiciji ali zmanjšanju vnetja, ki ga povzroča ta patogen (Ferrero, 2005).

K uspešni odstranitvi okužbe s *H. pylori* bi morda pripomogla kombinacija antibiotičnega zdravljenja in ustreznega cepiva, ki bi spodbudilo gostiteljski imunski odziv na okužbo. Merjenje imunskega odgovora na okužbo s *H. pylori* bi lahko omogočilo predvidevanje, kateri bolniki so bolj nagnjeni k neuspehu pri zdravljenju z antibiotično terapijo. Iskanje bolj ustreznih imunskih markerjev bi morda omogočilo uporabo *H. pylori* antigenske stimulacije MNC za predvidevanje uspešnosti odstranitve *H. pylori* (Kopitar in sod., 2007). Različni TLR ligandi so zelo učinkoviti kot dodatki cepiv (Ulevitch, 2004). Določene molekule, ki izvirajo iz *H. pylori*, lahko morda zagotovijo možnost zasnovanja novih cepiv, ki bi povečala antimikrobni imunski odgovor (Rad in sod., 2007). Antigen, ki ima ključno vlogo pri prepoznavanju bakterije *H. pylori* s pomočjo DC, je bakterijski LPS. Lipopolisaharidi in lipoproteini *H. pylori* so manj učinkoviti pri aktivaciji APC prek TLR kakor LPS ostalih Gram negativnih bakterij (Velin in Michetti, 2006), zato bi bil lahko LPS, ki bi imel večjo afiniteto do vezave na TLR in bi učinkoviteje aktiviral DC, pomemben dodatek cepiv. Razumevanje, kako komponente LPS *H. pylori* vplivajo na aktivacijo NF- κ B, bi bilo uporabno kot nova terapevtska strategija za zmanjševanje vnetja pri boleznih, ki jih povzroča *H. pylori* (Smith in sod., 2011). Poleg LPS bi bilo treba

preučiti tudi druge molekule *H. pylori*, ki prispevajo k prepoznavanju te bakterije v želodčni sluznici (Ferrero, 2005). Takšni molekuli sta recimo *H. pylori* ureaza in HSP60, ki prispevata k aktivaciji makrofagov in sproščanju citokinov (Ferrero, 2005). Ureaza je pomembna tarča cepiv, saj jo proizvajajo vsi sevi *H. pylori*, in je ključnega pomena pri bakterijski kolonizaciji. Žal pa ureazno cepljenje v preteklih raziskavah ni pokazalo ustreznih rezultatov, zato bi bila potrebna kombinacija ureaze z drugimi antigeni, ki bi morda izboljšala učinek cepljenja (Muller in Solnick, 2011).

Moss in sodelavci so leta 2011 preizkušali nova cepiva, tako da so miši, okužene s *H. pylori*, imunizirali s plazmidi, v katere so vnesli konzervirane sekvence DNA, ki kodirajo specifične epitope HLA razreda II. Rezultat imunizacije je bila tvorba peptidov, ki so se sami oblikovali v liposome s CpG oligonukleotidi in toplotno labilnim enterotoksinom. Miši so nekaj tednov po imunizaciji razvile odpornost na specifične antigene. O resnični učinkovitosti študije še ni mogoče govoriti, saj študija ni vključevala neimuniziranih kontrol in tudi uporaba toplotno labilnega enterotoksina pri ljudeh ni varna, kljub vsemu pa se zdi tovrsten pristop obetajoč.

Pomembni dodatki cepiv so tudi različni vnetni citokini, ki z aktivacijo celic T in drugih imunskih celic posredujejo dovolj veliko vnetje za odstranitev okužbe s *H. pylori* (Blanchard in sod., 2004).

Zmožnost *in vitro* pridobivanja DC iz monocitov omogoča imunoterapijo z uporabo avtolognih DC, "naloženih" z ustreznimi antigeni, ki pri bolnikih izboljšajo imunski odziv (Steinman, 2008).

5.2 SKLEPI

- Izolirani monociti močno izražajo molekulo CD14, z diferenciacijo v DC pa se stopnja izražanja CD14 zmanjšuje. Zrele DC prenehajo izražati molekulo DC14 in v primerjavi z monociti povečajo izražanje kostimulatornih molekul CD80 in CD86, molekule CD83 ter molekule PHK razreda II (HLA-DR).
- Dendritične celice po inkubaciji z različnimi sevi *H. pylori* statistično značilno povečajo izražanje kostimulatornih molekul CD86, molekul PHK razreda II (HLA-DR) in TLR4 v primerjavi z negativno kontrolo.
- Dendritične celice po spodbujanju s *H. pylori* SOT izražajo statistično značilno več CD86, HLA-DR in TLR2 kakor DC, ki so bile spodbujene s *H. pylori* SNT.
- Lizat *H. pylori* SNT je povzročil statistično značilno povečano sproščanje IL-8, IL-12p70 in IL-6 iz aktiviranih DC v primerjavi z negativno kontrolo.
- Spodbujanje DC s *H. pylori* SOT statistično značilno poveča sproščanje IL-8, IL-1b, IL-6, TNF- α in IL-12 iz DC v primerjavi z negativno kontrolo.
- Pri opazovanju statistično značilnih razlik med DC, spodbujenimi s *H. pylori* SNT in SOT, smo ugotovili, da je sproščanje IL-8 večje pri DC, stimuliranih s *H. pylori* SOT, medtem ko je sproščanje IL-10 večje pri DC, stimuliranih s *H. pylori* SNT.

6 POVZETEK

Bakterija *Helicobacter pylori* kolonizira želodčno sluznico najmanj 50–80 % svetovne populacije. Okužba se običajno zdravi z antibiotično terapijo, ki pa je neuspešna pri najmanj 10–25 % bolnikov, čeprav pri njih bakterija sicer ni odporna na izbrane antibiotike.

Za uspešno odstranitev okužbe s *H. pylori* zgolj antibiotično zdravljenje ne zadostuje, zato je potreben tudi učinkovit imunski odziv, ki pripomore k odstranitvi bakterije iz organizma. *H. pylori* izzove tako naravni kot specifični imunski odziv, ki pa je običajno neučinkovit in onemogoča gostitelju odstranitev bakterije iz želodčne sluznice.

V diplomskem delu smo želeli razjasniti, kateri antigeni pri določenih sevih *H. pylori* sprožijo zadosten imunski odziv na okužbo in s tem pripomorejo k odstranitvi *H. pylori* iz organizma.

Ključno vlogo pri usmerjanju imunskega odziva imajo dendritične celice (DC), ki preko površinskih "toll-like" receptorjev (TLR) prepoznavajo različne strukture, prisotne na mikroorganizmih, in jih predstavljajo naivnim celicam T.

V raziskavi smo preverjali aktivacijo DC ob *in vitro* spodbujanju z različnimi antigeni *H. pylori*. Bakterijske lizate smo izolirali iz dveh skupin bolnikov. V prvi skupini so bili bolniki, pri katerih je bila predhodna antibiotična terapija uspešna, zato smo te seve *H. pylori* označili kot SOT (sevi, občutljivi na terapijo). Drugo skupino so predstavljali bolniki, pri katerih predhodna antibiotična terapija ni uspela, zato smo seve *H. pylori*, izolirane iz teh posameznikov, označili kot SNT (sevi, neobčutljivi na terapijo). Učinkovitost imunskega odziva, ki ga posredujejo DC, smo preučevali na podlagi izražanja površinskih molekul in sproščanja vnetnih citokinov. Suspenzije celic smo označili z monoklonskimi protitelesi in na pretočnem citometru določili povprečje medianih fluorescenčnih intenzitet (MFI) DC, ki so izražale površinske molekule in sproščale citokine.

Rezultati raziskave so pokazali, da je odstranitev okužbe s *H. pylori* povezana s povečanim izražanjem površinskih molekul in sproščanjem vnetnih citokinov in kemokinov iz DC. DC so po spodbujanju s *H. pylori* SOT izražale občutno več CD86 in HLA-DR kakor DC, spodbujene s SNT. Površinske molekule so ključnega pomena pri antigenski predstavitvi celicam T in posledično pri posredovanju učinkovitega specifičnega imunskega odziva. Primerjava sproščanja citokinov iz DC, spodbujenih s *H. pylori* SNT in SOT, je pokazala, da so DC po spodbujanju s *H. pylori* SOT sproščale več vnetnega kemokina IL-8, ki je sprožil dovolj učinkovit vnetni odziv za odstranitev bakterije iz želodčne sluznice bolnikov. Nasprotno pa so DC, spodbujene s *H. pylori* SNT, sproščale več regulatornega IL-10, ki je z zmanjševanjem učinkov vnetnih citokinov in zmanjševanjem izražanja HLA-DR pri bolnikih preprečil učinkovit imunski odziv. Posledica je bila obstoj bakterije v želodčni sluznici bolnikov in s tem povezan nastanek kronične infekcije.

Dendritične celice, spodbujene s *H. pylori* SNT in SOT, so povečale izražanje površinskih molekul PHK razreda II (HLA-DR) in kostimulatornih molekul ter sproščanje vnetnih citokinov IL-6, IL-8 in IL-12 v primerjavi z nespodbujenimi DC (negativna kontrola). Na podlagi rezultatov smo sklepali, da *H. pylori* sproži imunski odziv gostitelja, vendar je njegova učinkovitost odvisna tudi od stopnje vnetja in predstavitve antigenov celicam T.

Naravni imunski odziv DC na različne antigene *H. pylori* smo preverjali na podlagi izražanja TLR. Uspešna odstranitev okužbe je bila povezana s povečanim izražanjem TLR2, iz česar smo sklepali, da je različica lipopolisaharida (LPS) s tetraacilnim lipodom A tista, ki je uspešno aktivirala DC in z njimi povezan imunski odziv. Različni sevi *H. pylori* tvorijo različne oblike LPS, zato je tudi aktivacija DC prek TLR različna.

In vitro spodbujanje DC z različnimi antigeni in preučevanje imunskega odziva, ki ga povzročijo, bi morda omogočili predvidevanje uspešnosti odstranitve *H. pylori*. Markerje, ki se izkažejo za uspešne aktivatorje imunskega odziva, bi lahko uporabili kot dodatke cepiv in tako izboljšali imunske odgovore na okužbo s *H. pylori*.

7 VIRI

- Abbas A.K., Lichtman A.H. 2006. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. Philadelphia, Elsevier Saunders: 324 str.
- Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. 2007. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, Elsevier Saunders: 566 str.
- Agrawal S., Agrawal A., Doughty B., Gerwitz A., Blenis J., Van Dyke T., Pulendran B. 2003. Cutting Edge: Different Toll-Like Receptor Agonist Instruct Dendritic Cells to Induce Distinct Th Responses via Differential Modulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Fos. *Journal of Immunology*, 171: 4984–4989
- Amieva M.R., El-Omar E.M. 2008. Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection, *Gastroenterology*, 134: 306–323
- Andres S., Schmidt H.M.A., Hazel M., Rhen M., Maeurer M., Engstrand L. 2010. *Helicobacter pylori* defines local immune response through interaction with dendritic cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 61, 2: 168–178
- Backhed F., Rokbi B., Torstensson E., Zhao Y., Nilsson C., Seguin D., Normark S., Buchan A.M., Richter-Dahlfors A. 2003. Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like receptor 4. *The Journal of Infectious Diseases*, 187: 829–836
- Bauditz J., Ortner M., Bierbaum M., Niedobitek G., Lochs H., Schreiber S. 1999. Production of IL-12 in gastritis relates to infection with *Helicobacter pylori*. *The Journal of Translational Immunology*, 117, 2: 316–323
- Beswick E.J., Pinchuk I.V., Minch K., Suarez G., Sierra J.C., Yamaoka Y., Reyes V.E. 2006. The *Helicobacter pylori* Urease B Subunit Binds to CD74 on Gastric Epithelial cells and Induces NF- κ B Activation and Interleukin-8 Production. *Infection and Immunity*, 74, 2: 1148–1155
- Bimczok D., Clements R.H., Waites K.B., Novak L., Eckhoff E., Mannon P.J., Smith P.D., Smythies L.E. 2010. Human primary gastric dendritic cells induce a Th1 response to *H. pylori*. *Mucosal Immunology*, 3: 260–269

- Blanchard T.B., Drakes M.L., Czinn S.J. 2004. *Helicobacter* infection: pathogenesis. *Gastroenterology*, 20: 10–15
- Boyanova L., Mitov I., Vladmirov B. 2011. *Helicobacter pylori* book. Caister Academic Press: 316
- Boyum A. 1964. Separation of white blood cells. *Nature*, 204: 793–794
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–54
- Coico R., Sunshine G. 2009. *Immunology*. 6th edition. Hoboken (NJ), Wiley-Blackwell: 391 str.
- Costa A.C., Figueiredo C., Touati E. 2009. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 14, 1: 15–20
- Eales L.J. 2003. *Immunology for life scientists*. Chichester, J. Wiley: 337 str.
- Faure-André G., Vargas P., Yuseff M.I., Heuzé M., Diaz J., Lankar D., Steri V., Manry J., Huques S., Vascotto F., Boulanger J., Raposo G., Bono M.R., Roseblatt M., Piel M., Lennon-Duménil A.M. 2008. Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain. *Science*, 322, 5908: 1705–1710
- Ferrero R.L. 2005. Innate immune recognition of the extracellular mucosal pathogen, *Helicobacter pylori*. *Molecular Immunology*, 42: 879–885
- Geijtenbeek B., Engering A., Van Kooyk Y. 2002. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *The Journal of Leukocyte Biology*, 71, 6: 921–931
- Geissman F., Jung S., Littman D.R. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19, 1: 71–82
- Gringhuis S.I., den Dunnen J., Litjens M., Van der Vilst M., Geijtenbeek T.B. 2009. Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to *Mycobacterium tuberculosis*, HIV-1 and *Helicobacter pylori*. *Nature immunology*, 10: 1081–1088
- Guermónprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Thery C., Amigorena S. 2002. Antigen presentation T cell stimulation by dendritic cell. *Annual Review of Immunology*, 20: 621–667

- Guiney D.G., Hasegawa P., Cole S.P. 2003. *Helicobacter pylori* preferentially induces interleukin 12 (IL-12) rather than IL-6 or IL-10 in human dendritic cells. *Infection and Immunity*, 71: 4163–4166
- Hafsi N., Volland P., Schwendy S., Rad R., Reindl W., Gerhard M., Prinz C. 2004. Human Dendritic Cells Respond to *Helicobacter pylori*, Promoting NK Cell and Th1-Effector Responses *in vitro*. *The Journal of Immunology*, 173: 1249–1257
- Hasni S., Ippolito A., Illei G.G. 2011. *Helicobacter pylori* and autoimmune diseases. *Oral diseases*, 17, 7: 621–627
- Hussein N.R., Argent R.H., Marx C.K., Patel S.R., Robinson K., Atherton J.C. 2010. *Helicobacter pylori dupA* Is Polymorphic, and Its Active Form Induces Proinflammatory Cytokine Secretion by Mononuclear Cells. *Journal of Infectious Diseases*, 202, 2: 261–269
- Ihan A. 1999. Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom. Kranj, Kemomed: 64 str.
- Israel D.A., Salama N., Arnold C.N., Moss S.F., Ando T., Wirth H.P., Tham K.T., Camorlinga M., Blaser M.J., Falkow S., Peek R.M. Jr. 2011. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *The Journal of Clinical Investigation*, 107: 611–620
- Kaisho T., Akira S. 2002. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochimica et Biophysica acta*, 1589: 1–13
- Kaisho T., Akira S. 2006. Toll-like receptor function and signaling. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117: 979–987
- Kapsenberg M.L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology*, 3, 12: 984–993
- Kim S.Y., Lee Y.C., Kim H.K., Blaser M.J. 2006. *Helicobacter pylori* CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. *Cellular Microbiology*, 8: 97–106.
- Kindt T.J., Goldsby R.A., Osborne B.A. 2007. *Kuby Immunology*. New York, W. H. Freeman: 695 str.
- Kopitar A.N. 1995. Analiza metod z izolacijo limfocitov iz periferne krvi. *Diplomska naloga*. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 50 str.

- Kopitar N.A., Stegel V., Tepeš B., Gubina M., Novakovič S., Ihan A. 2007. Specific T cell responses to *Helicobacter pylori* predict successful eradication therapy. *Journal of infection*, 54: 257–261
- Kranzer K., Eckhardt A., Aigner M., Knoll G., Dem L., Speth C., Lehn N., Brachert W.S. 2004. Induction of Maturation and Cytokine Release of Human Dendritic Cells by *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 72, 8: 4416–4423
- Matsumoto Y., Blanchard T.G., Drakes M.L., Basu M., Redline R.W., Levine A.D, Czinn S.J. 2005. Eradication of *Helicobacter pylori* and resolution of gastritis in the gastric mucosa of IL-10-deficient mice. *Helicobacter*, 10, 5: 407–415
- Mazzoni A., Segal D.M. 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell polarisation. *Journal of Leukocyte Biology*, 75: 721–730
- Mitchell P., Germain C., Fiori P.L., Khamri P.L., Foster W., Ghosh G.R., Leichler R.I., Bamford K.B., Lombardi G. 2007. Chronic exposure to *Helicobacter pylori* impairs dendritic cell function and inhibits Th1 development. *Infection and Immunity*, 75, 2: 810–819
- Moss S.F., Moise L., Lee D.S., Kin W., Zhang S., Lee J., Rogers A.B., Martin W., De Groot A.S. 2011. HelicoVax: Epitope based therapeutics *Helicobacter pylori* vaccination in a mouse model. *Vaccine*, 29: 2085–2091
- Muller A., Solnick A.V. 2011. Inflammation, Immunity, and Vaccine Development for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology and Hepatology*, 16, 1: 26–32
- Obermajer N., Magister Š., Kopitar A.N., Tepeš B., Ihan A., Kos J. 2009. Cathepsin X prevents an effective immune response against *Helicobacter pylori* infection. *European Journal of Cell Biology*, 88, 8: 461–471
- Peek R.M., Fiske C., Wilson K.T. 2010. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. *Physiological Reviews*, 90: 831–858
- Rad R., Brenner L., Krug A., Volland P., Mages J., Lang R., Schwendy S., Reindl W., Dossumbekova A., Ballhorn W., Wagner H., Schmid R.M., Bauer S., Prinz C. 2007. Toll-Like-Dependent Activation of Antigen-Presenting Cells Affects Adaptive Immunity to *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 133: 150–163
- Reis e Sousa C., Sher A., Kaye P. 1999. The role of dendritic cells in the introduction and regulation of immunity in microbial infections. *Current Opinion in Immunology*, 11, 4: 392–399

- Roitt I., Brostoff J., Male D. 2001. Immunology. 6th edition. Edinburgh, Mosby: 480 str.
- Rust M., Schweinitzer T., Josenhans C. 2008. *Helicobacter* Flagella, Motility and Chemotaxis. *Helicobacter pylori*: molecular genetics and cellular biology. Caister Academic Press, 61–86
- Sankar S., Chan H., Romanow W.J., Li J., Bates R.J. 2006. IKK- α signals through IRF3 and NF- κ B to mediate the production of inflammatory cytokines. Cellular signaling, 18: 982–993
- Sendide K., Deghmane A., Pechkovsky D., Av-Gay Y., Talal A., Hmama Z. 2005. *Mycobacterium bovis* BCG attenuates surface expression of mature class II molecules through IL-10 dependent inhibition of cathepsin S. Journal of Immunology, 175: 5324–5332
- Smith M.F.Jr., Mitchell A., Li G., Ding S., Fitzmaurice A.M., Ryan K., Crowe S., Goldberg J.B. 2003. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. The journal of Biological Chemistry, 278: 32552–32560
- Smith S.M., Moran A.P., Duggan S.P., Ahmed S.A., Mohamed A.S., Windle H.J., O'Neil L.A., Kelleher D.P. 2011. Tribbles 3: A Novel Regulator of TLR2-Mediated Signaling in Response to *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide. Journal of Immunology, 186: 2462–2471
- Steinman R.M. 2008. Dendritic cells and vaccines. Baylor University Medical Center Proceedings, 21, 1: 3–8
- Su B., Ceponis P.J., Lebel S., Huynh H., Sherman P.M. 2003. *Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. Infection and Immunity, 71: 3496–3502
- Takeda K., Akira S. 2003. Toll receptors and pathogen resistance. Cellular Microbiology, 5, 3: 143-153
- Takeda K., Kaisho T., Akira S. 2003. Toll-like receptors. Annual Review of Immunology, 21: 335–376
- Takenaka R., Yokota K., Ayada K., Mizuno M., Zhao Y., Fujinami Y., Lin S.N., Toyokawa T., Okada H., Shiratori Y., Oguma K. 2004. Microbiology, 150, 12: 3913–3922

- Tan Z.Y., Bealgey K.W., Fanf Y., Gong Y.M., Bao S. 2009. Interleukin-23: Immunological roles and clinical implications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41: 733–735
- Tanaka H., Yoshida M., Nishiumi S., Ohnishi N., Kobayashi K., Yamamoto K., Fujita T., Hatakeyama M., Azuma T. 2010. The CagA protein of *Helicobacter pylori* suppresses the functions of dendritic cell in mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 498: 35–42
- Tepeš B. 2009. Can gastric cancer be prevented? *Journal of physiology and pharmacology*, 60, 7: 71–77
- Tsan M.F., Gao B., 2004. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of leukocyte biology*, 76, 3: 514–519
- Ukaji D.C., Ezeiruaku F.C., Eze E.M., Ayila F. 2011. *Helicobacter Pylori* Associated Ulcerative Infections among Patients Attending Madonna University Teaching Hospital, Elele, Rivers State. *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences*, 2, 1: 123–125
- Ulevitch R.J. 2004. Therapeutics targeting the innate immune system. *Nature Reviews Immunology*, 4: 512–520
- Velin D., Michetti P. 2006. Immunology of *Helicobacter pylori* Infection. *Digestion*, 73: 116–123
- Vozelj M. 1996. Imunologija. Enciklopedijski priročnik. 1. izdaja. Ljubljana, DZS: 373 str.
- Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1.izdaja. Ljubljana, DZS: 552 str.
- Wang Y.H., Gorvel J.P., Chu Y.T., Wu J.J., Lei H.Y. 2010. *Helicobacter pylori* Impairs Murine Dendritic Cell Responses to Infection. *PloS ONE*, 5, 5: e10844
- Wilson K.T., Crabtree J.E. 2007. Immunology of *Helicobacter pylori*: Insights Into The Failure of the Immune Response and Perspectives on Vaccine Studies. *Gastroenterology*, 133: 288–308

Elektronski vir

Flow Cytometry Introduction, 2011. Invitrogen.

http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html

(17.5.2011)

ZAHVALA

Diplomsko delo sem opravila na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Zahvaljujem se vsem, ki so mi pri tem pomagali.

Najprej se moram zahvaliti somentorici asist. dr. Andreji Nataši Kopitar za neizmerno pomoč pri praktičnem delu in za številne dragocene nasvete.

Zahvaljujem se tudi svojemu mentorju prof. dr. Alojzu Ihanu za strokovno pomoč in usmerjanje med izdelavo diplomskega dela.

Recenzentki prof. dr. Kristini Sepčič se zahvaljujem za spodbudne besede in za to, da si je hitro vzela čas za pregled diplomskega dela.

Prav tako se moram zahvaliti predsednici komisije doc. dr. Poloni Zalar za pregled diplomskega dela in za udeležbo na zagovoru.

Hvala Zdenki Repanšek Tavčar iz oddelčnega referata za biologijo in predsednici študijske komisije 1. in 2. stopnje doc. dr. Jasni Dolenc Koce za pomoč pri reševanju zapletov ob oddaji teme diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi lektorici Jani Agič za lektorske popravke.

Svojim sodelavcem iz Mengša se zahvaljujem za vso spodbudo in razumevanje.

Prav lepo pa se zahvaljujem tudi moji družini, ki mi je stala ob strani, verjela vame in mi v težkih trenutkih narisala nasmeh na obraz.