

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Eva KOCJAN

**TEST PROLIFERACIJE LIMFOCITOV ZA
DIAGNOSTIKO KONGENITALNE
TOKSOPLAZMOZE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Eva KOCJAN

**TEST PROLIFERACIJE LIMFOCITOV ZA DIAGNOSTIKO
KONGENITALNE TOKSOPLAZMOZE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**THE LYMPOCYTE PROLIFERATION ASSAY IN THE DIAGNOSIS
OF CONGENITAL TOXOPLASMOSIS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek Univerzitetnega študija II. Bolonjske stopnje Strukturna in funkcionalna biologija. Opravljeno je bilo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje oziroma Senat oddelka je dne 21. 2. 2014 odobrila naslov magistrske naloge. Za mentorja magistrskega dela je bil imenovan prof. dr. Alojz Ihan, dr. med., za somentorico doc. dr. Andreja Nataša Kopitar, univ. dipl. biol., za recenzenta pa prof. dr. Rok Kostanjšek.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentor: prof. dr. Alojz IHAN

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Somentorica: doc. dr. Andreja Nataša KOPITAR

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Recenzent: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

11. 12. 2015

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Eva KOCJAN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK 612:616.159(043.2)=163.6
- KG kongenitalna toksoplazmoza/toksoplazmoza/*Toxoplasma gondii*/parazit/limfociti/
celični test/proliferacija limfocitov/interferon gama/ IFN- γ /test EdU
- AV KOCJAN, Eva, diplomirana biologinja (UN)
- SA IHAN, Alojz (mentor)/KOPITAR, Andreja Nataša (somentorica)/KOSTANJŠEK,
Rok (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne
biologije
- LI 2015
- IN TEST PROLIFERACIJE LIMFOCITOV ZA DIAGNOSTIKO KONGENITALNE
TOKSOPLAZMOZE
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
- OP XII, 107 str., 10 preg., 26 sl., 91 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI *Toxoplasma gondii* je obligatorni znotrajcelični parazit, ki zajeda širok spekter toplokrvnih živali in je razširjen po vsem svetu. Povzročja eno najpogostejših parazitskih bolezni – toksoplazmozo, ki je pri zdravih, imunsko neoslabljenih ljudeh večinoma asimptomatska. Kongenitalna toksoplazmoza pa je primarna okužba nosečnice, ki lahko, v primeru prenosa parazita prek posteljice, povzroči hude anomalije v razvoju še ne rojenega otroka. Trenutna diagnostika temelji predvsem na seroloških testih, a so ti uspešni le v 75 % primerov. Zato je namen naloge raziskati celično posredovano imunost, ki je ključnega pomena za obrambo gostitelja pred okužbo, a se je ne izrablja v diagnostične namene. V raziskavo smo vključili 23 zdravih seropozitivnih in 20 seronegativnih preiskovancev. Za merjenje proliferacije smo celice stimulirali 7 dni, za merjenje produkcije citokina IFN- γ pa 24 ur. Proliferirane celice smo izmerili na pretočnem citometru, pri čemer smo merili količino vgrajenega EdU. Izmerili smo proliferativni odziv celic CD3+, CD4+ in CD8+, ter podali odstotek celic v katere se je vgradil EdU. Ugotovili smo, da je specifičnost testa proliferacije celic CD3 94 %, občutljivost pa 100 %. Rezultate smo primerjali tudi s testom merjenja koncentracije izločenega citokina IFN- γ , katerega specifičnost je bila 90 %, občutljivost pa 100 %. Test proliferacije limfocitov CD3, bi bil lahko torej dobra, občutljiva in specifična alternativna metoda za diagnostiko kongenitalne toksoplazmoze.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Du2
- DC 612:616.159(043.2)=163.6
- CX congenital toxoplasmosis/toxoplasmosis/*Toxoplasma gondii*/parasite/lymphocytes/cellular assay/lymphocyte proliferation/interferon gamma/ IFN- γ /EdU assay
- AU KOCJAN, Eva
- AA IHAN, Alojz (supervisor)/KOPITAR, Andreja Nataša (co-advisor)/KOSTANJŠEK, Rok (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
- PY 2015
- TI THE LYMPHOCYTE PROLIFERATION ASSAY IN THE DIAGNOSIS OF CONGENITAL TOXOPLASMOSIS
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
- NO XII, 107 p., 10 tbl., 26 fig., 91 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular protozoan parasite, is globally distributed among all warm blooded animals, including humans. Toxoplasmosis is one of the most common parasitic infections and it is usually asymptomatic in immunocompetent patients, whereas primary infection in a pregnant woman can cause severe anomalies in the developing fetus. Current diagnosis of congenital toxoplasmosis is based mainly on serological tests, which fail to establish the right diagnosis in 25 % of cases. In that view we want to search for new and more accurate tests based on cell-mediated immunity, which plays a key role in resistance to infection, but is not routinely used for diagnostic purposes. A total of 23 healthy seropositive and 20 seronegative patients were recruited into the study. For purpose of proliferation test, the mononuclear cells were cultured in the presence of *Toxoplasma gondii* antigen for 7 days and 24 hours for measuring IFN- γ response. Activated lymphocytes, with incorporated EdU, were detected by flow cytometry. Results were expressed as percentages of CD3, CD4 or CD8 cells, with incorporated EdU. We evaluated the sensitivity and specificity of CD3 proliferation assay, which were 94 % and 100 %, respectively. We also ran a quick test based on IFN- γ response, which showed the sensitivity and specificity of the test of 90 % and 100 %, respectively. Our results indicate the potential of CD3 lymphocyte proliferation test as accurate, sensitive and specific alternative method for diagnosis of congenital toxoplasmosis, comparing to currently used serological tests.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 NAMEN NALOGE	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	3
2.1.1 Morfologija in biologija parazita.....	3
2.1.1.1 Tahizoit	4
2.1.1.2 Bradizoit.....	4
2.1.1.3 Sporozoit	5
2.1.2 Življenjski cikel <i>Toxoplasma gondii</i>	6
2.1.3 Okužba s parazitom.....	9
2.2 TOKSOPLAZMOZA	9
2.2.1 Pridobljena toksoplazmoza	10
2.2.2 Kongenitalna toksoplazmoza	11
2.3 IMUNSKI ODZIV GOSTITELJA NA OKUŽBO S PARAZITOM <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	12
2.3.1 Splošno o imunskem sistemu.....	12
2.3.1.1 Prirojena oz. naravna imunost.....	12
2.3.1.2 Pridobljena oz. adaptivna imunost.....	13
2.3.1.2.1 Limfociti B	13
2.3.1.2.2 Limfociti T	14
2.3.2 Imunski odziv gostitelja na okužbo	16
2.3.2.1 Aktivacija imunskega odziva prirojene odpornosti	16
2.3.2.2 Aktivacija adaptivnega imunskega odziva.....	18
2.3.2.3 Citokin IFN- γ	19
2.4 DIAGNOSTIKA	20

2.4.1	Kinetika protitelesnega odziva.....	20
2.4.2	Diagnostika kongenitalne toksoplazmoze	22
2.4.2.1	Proliferacija limfocitov kot perspektivna metoda za diagnostiko.....	23
2.5	TEST PROLIFERACIJE LIMFOCITOV	24
2.5.1	Princip metode	24
2.5.2	Detekcija sinteze DNK	25
2.5.2.1	[³ H]timidin	26
2.5.2.2	BrdU (5-bromo-2'-deoksiuridin)	26
2.5.2.3	EdU (5-etinil-2'-deoksiuridin)	28
2.6	CELIČNI STIMULATORJI TER POVRŠINSKI CELIČNI MARKERJI	30
2.6.1	Celični stimulatorji	30
2.6.1.1	Fitohemaglutinin (PHA)	31
2.6.1.2	Interlevkin 2 (IL-2)	31
2.6.1.3	Monoklonska protitelesa CD3 in CD28.....	32
2.6.2	Površinski celični markerji	32
2.6.2.1	CD3	33
2.6.2.2	CD4	33
2.7	PRETOČNA CITOMETRIJA	33
2.8	ENCIMSKO IMUNSKI TEST – ELISA	36
2.8.1	Princip metode	36
2.8.2	Interpretacija rezultatov	38
3	MATERIAL IN METODE	39
3.1	MATERIAL	39
3.1.1	Reagenti	39
3.1.2	Laboratorijski material	40
3.1.3	Laboratorijska oprema	41
3.2	METODE	42
3.2.1	Vzorci krvi	42
3.2.2	Uporabljeni stimulatorji proliferacije limfocitov ter titracija antigena <i>Toxoplasma gondii</i>	43
3.2.2.1	Stimulatorji proliferacije limfocitov	43
3.2.2.2	Titracija antigena <i>Toxoplasma gondii</i>	43

3.2.3	Priprava raztopin in reagentov.....	43
3.2.3.1	EdU (5-Etini-2'-deoksiuridin)	43
3.2.3.2	Alexa Fluor azid.....	44
3.2.3.3	Click-iT [®] EdU buffer additive	44
3.2.3.4	Click-iT [®] saponin-based permeabilization and wash buffer	44
3.2.3.5	Click-iT reakcijska mešanica.....	44
3.2.4	Določanje okužbe s parazitom <i>Toxoplasma gondii</i>	44
3.2.5	Izolacija mononuklearnih celic (MNC).....	45
3.2.6	Določanje števila MNC v vzorcih ter uravnavanje koncentracije celic	46
3.2.7	Stimulacija MNC ter označevanje z EdU	47
3.2.8	Test proliferacije limfocitov	48
3.2.9	Merjenje koncentracije celic na pretočnem citometru	49
3.2.10	Test ugotavljanja koncentracije citokina IFN-γ z encimsko imunskim testom ELISA	50
3.2.10.1	Stimulacija celic ter odvzem krvne plazme	50
3.2.10.2	Merjenje koncentracije IFN- γ v vzorcu krvne plazme z ELISO	51
3.2.11	Merjenje absorbance s spektrofotometrom.....	53
3.2.12	Statistična obdelava podatkov	53
4	REZULTATI.....	54
4.1	TITRACIJSKA KRIVULJA SPODBUJANJA LIMFOCITOV Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI ANTIGENA <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	54
4.2	STIMULATORJI PROLIFERACIJE LIMFOCITOV ZA UPORABO V POZITIVNI KONTROLI	56
4.3	TEST PROLIFERACIJE LIMFOCITOV.....	58
4.3.1	Proliferacija celokupnih limfocitov	60
4.3.2	Proliferacija in izražanje CD3+	62
4.3.3	Proliferacija in izražanje CD4+	64
4.3.4	Proliferacija in izražanje CD8+	65
4.3.5	Proliferacija limfocitov CD4+ v primerjavi z limfociti CD8+	66
4.3.6	Točkovni diagram proliferacije limfocitov CD3+.....	67
4.4	MERJENJE KONCENTRACIJE CITOKINA IFN- γ	68

4.4.1	Tvorba citokina IFN-γ	70
4.4.2	Točkovni diagram tvorbe citokina IFN-γ	71
4.5	OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST TESTA PROLIFERACIJE LIMFOCITOV TER TESTA IFN- γ	72
5	RAZPRAVA	75
5.1	TEST PROLIFERACIJE LIMFOCITOV	75
5.2	TEST MERJENJA CITOKINA IFN- γ	78
6	SKLEPI	81
7	POVZETEK	82
8	VIRI	84
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Shema stimulacije mononuklearnih celic.....	47
Pregl. 2: Stimulacija celic za merjenje koncentracije citokina IFN- γ	50
Pregl. 3: Stimulacija limfocitov z različnimi koncentracijami antigena <i>T. gondii</i>	54
Pregl. 4: Stimulacija limfocitov z različnimi stimulatorji.	56
Pregl. 5: Opisna statistika deležev različnih tipov limfocitov (CD3+, CD4+, CD8+, celokupni limfociti) oseb z negativnim statusom okužbe, po stimulaciji z mitogenom PHA in antigenom <i>T. gondii</i>	58
Pregl. 6: Opisne statistike deležev različnih tipov limfocitov (CD3+, CD4+, CD8+, celokupni limfociti) oseb s statusom stare okužbe, po stimulaciji z mitogenom PHA in antigenom <i>T. gondii</i>	59
Pregl. 7: Opisne statistike koncentracij citokina interferon gama (IFN- γ) pri osebah z negativnim statusom okužbe, po stimulaciji z mitogenom PHA in antigenom <i>T. gondii</i>	70
Pregl. 8: Opisne statistike koncentracij citokina interferon gama (IFN- γ) pri osebah s statusom stare okužbe, po stimulaciji z mitogenom PHA in antigenom <i>T.</i> <i>gondii</i>	70
Pregl. 9: Karakteristike ROC krivulje, izračunane na podlagi antigensko stimuliranih vzorcev serološko pozitivnih in negativnih preiskovancev za ovrednotenje testa proliferacije limfocitov.....	74
Pregl. 10: Karakteristike ROC krivulje, izračunane na podlagi antigensko stimuliranih vzorcev serološko pozitivnih in negativnih preiskovancev za ovrednotenje testa IFN- γ	74

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Transmisijsko elektronska mikrografija tahizoita.....	4
Sl. 2:	Različna infektivna stanja ter oblike parazita <i>T. gondii</i>	6
Sl. 3:	Življenjski cikel <i>T. gondii</i>	8
Sl. 4:	Shema usklajenega delovanja imunskega odziva proti parazitu <i>T. gondii</i> v črevesu gostitelja.. ..	17
Sl. 5:	Kinetika protitelesnega odziva.....	21
Sl. 6:	Kemijski strukturi deoksitimidina in BrdU.. ..	26
Sl. 7:	Kemijski strukturi deoksitimidina in EdU.	27
Sl. 8:	Detekcija vgrajenega EdU z Alexa Fluor azidom v primerjavi z detekcijo vgrajenega BrdU z anti-BrdU protitelesi	28
Sl. 9:	Zgradba pretočnega citometra.....	33
Sl. 10:	Rezultat pretočne citometrije v obliki točkovnega diagrama.....	34
Sl. 11:	Grafični prikaz sendvič ELISE	36
Sl. 12:	Primer umeritvene krivulje, izrisane glede na absorbančne vrednosti standardnih raztopin.....	37
Sl. 13:	Shematičen prikaz tvorbe značilnih plasti ob ločevanju krvnih celic z metodo Ficcol-Paque	44
Sl. 14:	Zgradba Neubauerjeve komore	46
Sl. 15:	Mreža za štetje celic na Neubauerjevi komori.....	46
Sl. 16:	Shema redčenja standardnih raztopin za encimsko imunski test ELISA.....	51
Sl. 17:	Titracijska krivulja.....	55
Sl. 18:	Proliferativni odziv vseh limfocitov v nestimuliranih vzorcih, vzorcih stimuliranih z antigenom <i>T.gondii</i> ter vzorcih stimuliranih s PHA, pri obeh skupinah preiskovancev, po 6-dnevni inkubaciji.	60
Sl. 19:	Proliferativni odziv limfocitov, ki na celični površini izražajo molekulo CD3+ v nestimuliranih vzorcih, vzorcih stimuliranih z antigenom <i>T. gondii</i> ter vzorcih stimuliranih s PHA, pri obeh skupinah preiskovancev, po 6-dnevni inkubaciji.....	62
Sl. 20:	Proliferativni odziv limfocitov, ki na celični površini izražajo molekulo CD4+ v nestimuliranih vzorcih, vzorcih stimuliranih z antigenom <i>T. gondii</i> ter vzorcih stimuliranih s PHA, pri obeh skupinah preiskovancev, po 6 dnevni inkubaciji.	64
Sl. 21:	Proliferativni odziv limfocitov, ki na celični površini izražajo molekulo CD8+ v nestimuliranih vzorcih, vzorcih stimuliranih z antigenom <i>T. gondii</i> ter vzorcih stimuliranih s PHA, pri obeh skupinah preiskovancev, po 6-dnevni inkubaciji...65	
Sl. 22:	Proliferativni odziv limfocitov, ki na celični površini izražajo molekulo CD4+ in CD8+ v vzorcih stimuliranih z antigenom <i>T. gondii</i> pri skupini preiskovancev s staro okužbo, po 6-dnevni inkubaciji.....	67

- Sl. 23: Proliferativni odziv limfocitov T (CD3+) serološko pozitivnih in negativnih oseb na okužbo s parazitom *T. gondii*, ob stimulaciji z antigenom, v primerjavi z nesimuliranimi vzorci (negativna kontrola) istih preiskovancev.68
- Sl. 24: Prikaz razpršenosti koncentracij citokina IFN- γ v supernatantih kultur mononuklearnih celic v nestimuliranih vzorcih, vzorcih stimuliranih z antigenom *T. gondii* ter vzorcih stimuliranih s PHA, pri obeh skupinah preiskovancev, po 24-urni inkubaciji.71
- Sl. 25: Izločanje citokina IFN- γ serološko pozitivnih in negativnih oseb na okužbo s parazitom *T. gondii*, ob stimulaciji z antigenom, v primerjavi z nestimuliranimi vzorci (negativna kontrola) istih preiskovancev.72
- Sl. 26: ROC krivulji za determinacijo specifičnosti in občutljivosti testa proliferacije limfocitov, ki izražajo površinski marker CD3+ (limfociti T) ter testa IFN- γ , za diagnostiko okužbe s parazitom *T. gondii*.....75

Okrajšave in simboli

AMP	adenozinmonofosfat
anti-BrdU	Specifična monoklonska protitelesa, ki se vežejo na BrdU
APC	antigen predstavitvene celice
BrdU	5-bromo-2'-deoksiuridin
CD	angl. <i>Cluster of differentiation</i>
ConA	konkanavalin A
DC	dendritične celice
DMSO	dimetil sulfoksid
EdU	5-etinil-2'-deoksiuridin
ELISA	encimsko imunski test (angl. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
FALS	fotodetektor, ki zaznava v smeri svetlobnega vira (angl. <i>Forward Angle Light Scatter</i>)
GMP	gvanozinmonofosfat
HRP	hrenova peroksidaza
IDO	indolamin-2,3-deoksigenaza
IFN- γ	interferon gama
IgA	imunoglobulin tipa A, protitelo
IgE	imunoglobulin tipa E, protitelo
IgG	imunoglobulin tipa G, protitelo
IgM	imunoglobulin tipa M, protitelo
IL-2	interlevkin 2
ISAGA	imunski aglutinacijski test (angl. <i>ImmunoSorbent Agglutination Assay</i>)
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (angl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MII	medij II

MNC	mononuklearne celice
NaCl	natrijev klorid, fiziološka raztopina
NK	celice naravne ubijalke
PHA	fitohemaglutinin
RALS	fotodetektor, ki zaznava pravokotno na smer svetlobnega vira (angl. <i>Right Angle Light Scatter</i>)
T _c	citotoksične celice T (angl. <i>cytotoxic cells</i>)
TCR	T celični receptor
T _H	celice T pomagalke (angl. <i>helper cells</i>)
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TNF	tumor nekrotizirajoči faktor

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Okužba z obligatornim enoceličnim parazitom *Toxoplasma gondii*, povzroča eno najpogostejših in svetovno razširjenih parazitskih bolezní človeka, toksoplazmozo (Tenter in sod., 2000; Montoya in Liesefeld, 2004). O njegovi razširjenosti priča dejstvo, da naj bi bila, po ocenah strokovnjakov, okužena skoraj tretjina človeškega prebivalstva (Montoya in Liesefeld, 2004). Parazit namreč zajeda na skoraj vseh vrstah toplokrvnih živali, med drugim pri človeku, ki za parazita predstavlja vmesnega gostitelja, znotraj katerega poteče nespolno razmnoževanje (Robert-Gangneux in Darde, 2012). Glavni rezervoar bolezní so živali iz družine mačk (Felidae), ki jih parazit potrebuje za svoj popoln razvoj in spolno reprodukcijo ter mu tako služijo kot končni gostitelj (McAuley, 2014). Tekom evolucije je, kljub svojemu obligatornemu znotrajceličnemu življenjskemu slogu, *Toxoplasma gondii* razvil učinkovito tehniko razširjanja oz. razmnoževanja, kar omogoča okužbo širokega spektra ljudi, klinični znaki in obsežnost bolezní pa se med njimi razlikuje. Bolezen namreč lahko ločimo na pridobljeno ali prirojeno (kongenitalno) toksoplazmozo. Prva predstavlja okužbo po rojstvu ter pri zdravih, imunsko neoslabljenih ljudeh ne povzroča vidnejših kliničnih znakov oz. jo spremljajo le blagi, gripi podobni simptomi. Pri kongenitalni toksoplazmozi pa govorimo o primarni okužbi nosečnice ter posledično njenega še nerojenega otroka (Robert-Gangneux in Darde, 2012). Patološke posledice se razlikujejo, vse od težkih anomalij pri razvoju otroka v maternici do bolezenskih stanj, ki se razvijejo šele nekaj mesecev ali let po rojstvu. Zaradi tega se zavedamo pomembnosti čim zgodnejšega odkrivanja kongenitalne toksoplazmoze, uporabljene metode pa morajo biti dovolj natančne in zanesljive. Trenutna diagnostika sloni na seroloških testih za določanje prisotnosti specifičnih protiteles tipa IgM in IgA (Logar, 1985), a se ta ni izkazala za najbolj zanesljivo, saj je uspešna v le 75 % vseh kongenitalno okuženih primerov (Montoya in Liesefeld, 2004). Za natančnejšo diagnozo je potrebno ponavljanje testov, dejansko okužbo pa lahko potrdimo šele po 12 mesecih življenja novorojenčka. S tem je njihovo zdravljenje precej zakasnjeno, zato raziskovalci stremijo k iskanju novih, učinkovitejših ter zanesljivejših diagnostičnih metod.

1.2 NAMEN NALOGE

Z našo raziskavo smo želeli raziskati nov *in vitro* celični test za diagnostiko kongenitalne toksoplazmoze, ki temelji na celično posredovani imunosti, saj je ta tista, ki igra ključno vlogo pri odpornosti gostitelja na okužbo. Temelji na imunskem spominu celic, ki so bile predhodno že izpostavljene določenemu antigenu, ob *in vitro* stimulaciji s tem istim antigenom pa se preoblikujejo v blastne celice in proliferirajo. Izmeriti želimo moč limfocitnega odziva pri preiskovancih, ki s parazitom niso okuženi ter jo primerjati z limfocitnim odzivom preiskovancev s staro okužbo.

Poleg testa proliferacije limfocitov želimo preveriti tudi test merjenja koncentracije izločenih citokinov interferon gama po *in vitro* stimulaciji z antigenom *Toxoplasma gondii*. Tudi v tem delu naloge želimo preveriti ali se koncentracija citokinov v krvi preiskovancev, ki s parazitom niso okuženi razlikuje od koncentracije citokinov pri preiskovancih s staro okužbo.

Namen magistrske raziskave je tako, poleg ovrednotenja metode za zgodnejšo in natančnejšo diagnozo kongenitalne okužbe, tudi primerjava proliferativnega in citokinskega odziva celic telesne obrambe, kot osnove za primernejše diagnostične metode.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TOXOPLASMA GONDII

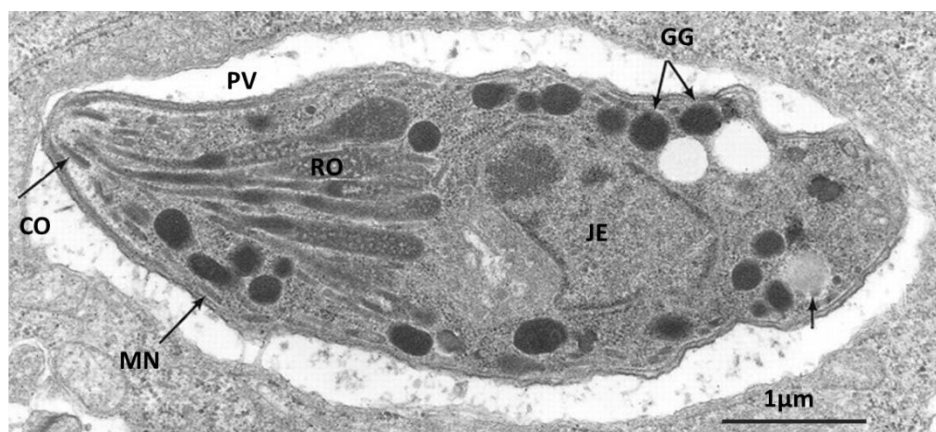
2.1.1 Morfologija in biologija parazita

Leta 1908 sta francoska raziskovalca Nicolle in Manceaux, pri severno afriškem glodalcu gundi (*Ctenodactylus gundi*) odkrila parazita, ga prvič opisala ter poimenovala. Ime rodu namiguje na značilno obokasto obliko parazita (*grško* »*toxos*« - *lok, obok*; »*plasma*« - *oblika*), vrstno ime pa nosi po vrsti glodalca, na kateri je bil odkrit (Weiss in Dubey, 2009). S spoznanjem centralne vloge mačk, kot končnih gostiteljic, znotraj katerih poteka spolno razmnoževanje parazita, so šele v poznih 60. letih prejšnjega stoletja dokončno razvozljali njegov življenjski cikel. Istočasno so ga klasificirali v podrazred Coccidium in deblo trosovcev oz. Apicomplexa (Robert-Gangneux in Darde, 2012).

Parazit se nahaja v treh infektivnih stanjih, ki so odvisna od faze reprodukcijskega cikla, v katerem se trenutno nahaja:

- **Tahizoit** – invazivna ter hitro deleča se oblika parazita
- **Bradizoit** – počasi deleča se oblika parazita, ki tvori tkivne ciste
- **Sporozoit** – oblika parazita, ki se večinoma nahaja v zunanjem okolju, znotraj oocist

Vsa tri infektivna stanja so značilne enocelične polmesečaste oblike, dolge približno 5 µm ter široke 2 µm. Apikalni del celice je zašiljene oblike, medtem ko je bazalni konec zaobljen. Od zunanosti jih loči kompleksno grajena membrana, imenovana pelikula. Ta je tesno povezana s citoskeletom, ki vzdržuje strukturno trdnost in omogoča gibljivost celice (Robert-Gangneux in Darde, 2012). V apikalnem delu parazita se nahajajo tudi specializirane strukture in organeli, ki sodelujejo pri penetraciji v gostitelja. Gre za t.i. apikalni kompleks, ki sestoji iz stožičaste strukture iz citoskeleta – konioda, ki ima mehansko vlogo pri invaziji parazita, saj z njo predre bariero črevesnega epitela gostitelja. Poleg konioda so del apikalnega kompleksa tudi sekretorni organeli roptrije, mikroneme ter gostotne granule, ki so s svojo produkcijo proteolitičnih in adhezivnih proteinov pomembni za zagotavljanje uspešne infekcije gostitelja (Morrissette in Sibley, 2002; Ajioka in Soldati, 2007) (Slika 1).



Slika 1: Transmisijsko elektronska mikrofografija tahizoita. MN - mikroneme, JE - jedro, GG - gostotne granule, PV - parazitoformna vakuola, CO - konoid, RO - roptrije (Dubey in sod., 1998)

2.1.1.1 Tahizoit

Tahizoit je invazivna in hitro deleča oblika parazita, ki se razširja znotraj telesa gostitelja. Zmožni so aktivne penetracije v vse celice z jedrom, kjer tvorijo t.i. parazitoformno vakuolo, znotraj katere se razmnožujejo z endodogenijo. Ko se namnožijo v zadostni količini, to vodi v razpad gostiteljske celice in sprostitve številnih novih toksoplazem, ki okužijo sosednje celice ter se, s pomočjo krvnega obtoka, razširijo po telesu v različna tkiva in organe. Najpogosteje se naselijo v skeletni muskulaturi, v očeh, pljučih in srcu, možnost prečkanja krvno-možganske ter placentalne bariere pa jim omogoča tudi okužbo posteljice ter centralnega živčnega sistema (Montoya in Liesenfeld, 2004; Logar, 2010). Parazit v tkivih povzroči močan vnetni odziv, katerega posledica je uničenje tkiv ter izraz kliničnih simptomov bolezni, ki jo imenujemo toksoplazmoza (Montoya in Liesenfeld, 2004) (Slika 2a).

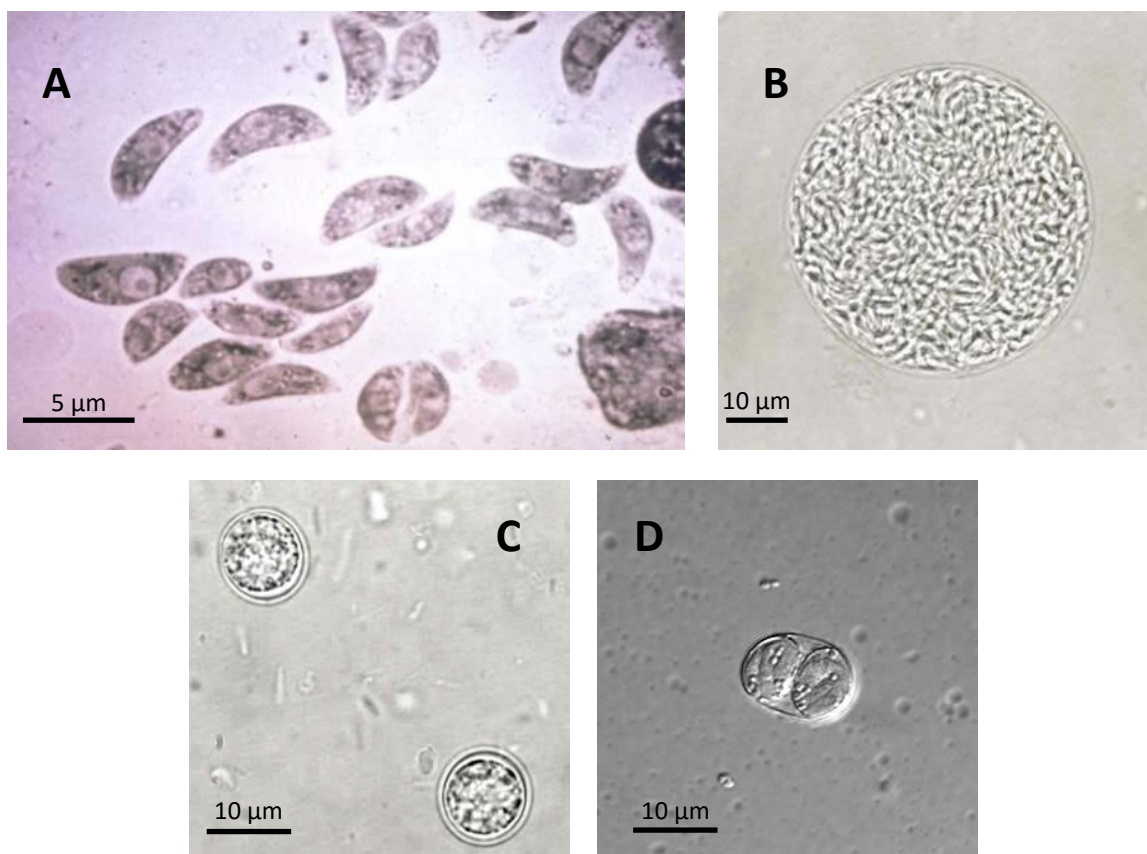
2.1.1.2 Bradizoit

Bradizoiti so posledica pretvorbe tahizoitov v počasi delečo obliko, ki, pod pritiskom imunskega sistema, tvorijo tkivne ciste, najpogosteje v možganih, skeletnih mišicah ter miokardu (McAuley, 2014). Ciste se izoblikujejo iz membrane parazitoformne vakuole in v možganskih tkivih tvorijo bolj ali manj sferične oblike, medtem ko so v mišičnih tkivih podolgovate oblike (Robert-Gangneux in Darde, 2012; Montoya in Liesenfeld, 2004). Velikosti cist variirajo glede na njihovo starost. Mlajše ciste merijo vse od 10 μm in vsebujejo le dva bradizoita, starejše ciste pa lahko zrastejo do 100 μm v katerih je na stotine ali tisoče tesno pakiranih bradizoitov. Ciste v tkivih gostitelja ostajajo celo

življenje, zaradi česar je okužba s *Toxoplasma* kronična okužba (Montoya in Liesenfeld, 2004; Sullivan, 2011). Bradizoiti so na dolgoročno preživetje dobro prilagojeni z latentnim metabolizmom (Robert-Gangneux in Darde, 2012). Zaradi oslabilnosti imunskega sistema ali vpliva nekaterih drugih dejavnikov (obsevanje, zdravila, ...) lahko cista počni, sprosti bradizoite, ti pa zaradi svoje zmožnosti ponovne pretvorbe v tahizoite, povzročijo ponoven izbruh bolezni (Dubey in Frenkel, 1972). Tkivne ciste so torej infektivni stadij tako za končne kot vmesne gostitelje parazita (Montoya in Liesenfeld, 2004) (Slika 2b).

2.1.1.3 Sporozoit

Sporozoit predstavlja tretjo infektivno obliko parazita ter se nahaja znotraj zrelih oocist. Te predstavljajo čvrste ovojnice z večplastno steno, ki so rezultat spolnega razmnoževanja parazita, znotraj končnega gostitelja – mačke. Te s svojimi iztrebki izločajo na milijone nesporuliranih oocist, ki po nekaj dneh v zunanjem okolju, v procesu sporogenije, postanejo infektivne. Zrele oociste so 12-13 μm velike ovalne strukture, znotraj katerih se nahajata 2 sporocisti, ki vsebujeta po 4 sporozoite. Izredno robustna in čvrsta stena oociste jih ščiti pred mehanskimi in kemičnimi poškodbami ter jim, v vlažnem zunanjem okolju, omogoča preživetje celo več kot eno leto (Robert-Gangneux in Darde, 2012) (Slika 2c, 2d).



Slika 2: Različna infektivna stanja ter oblike parazita *Toxoplasma gondii*. (A) Invazivni, hitro deleči se tahizoiti polmesečaste oblike. (B) Tkivna cista, ki vsebuje številne bradizoite. (C) Nesporulirana oocista z debelo čvrsto ovojnico. (D) Sporulirana oocista, znotraj katere sta 2 sporocisti, ki vsebujeta vsaka po 4 sporozoite. (Prirejeno po: CDC, 2013a, 2013b, 2013c; StudyBlue, 2015)

2.1.2 Življenjski cikel *Toxoplasma gondii*

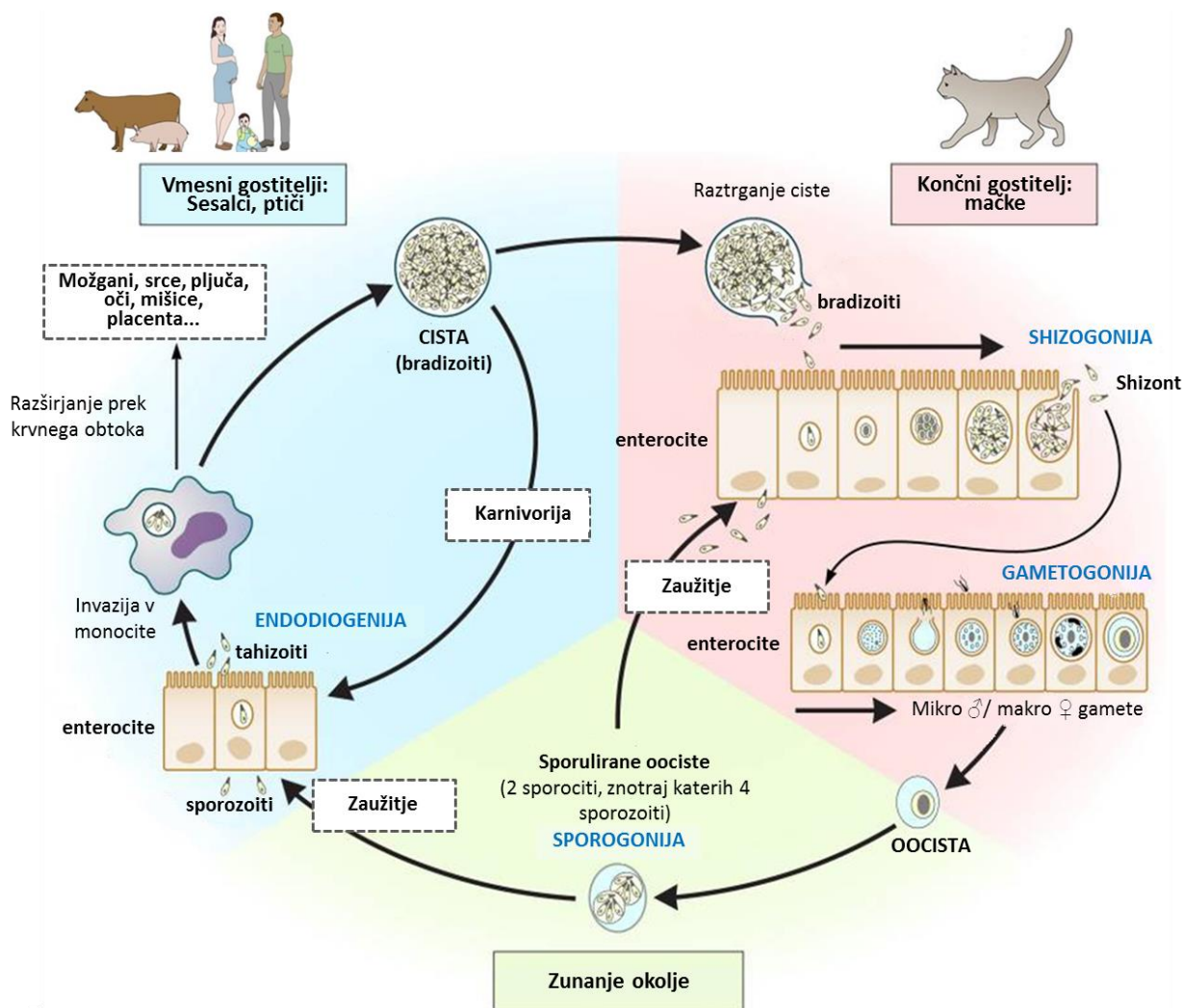
Življenjski cikel toksoplazme je zapleten ter sestoji iz treh različnih infektivnih oblik parazita, ki nihajo med proliferativnim in latentnim stadijem (Sullivan, 2011) (Slika 3). Razmnožuje se lahko spolno ali nespolno, pri čemer je spolno razmnoževanje vezano le na končnega gostitelja, živali iz družine mačk. Te se v večini primerov okužijo z lovom, ob zaužitju surovega mesa okuženih vmesnih gostiteljev. Ob zaužitju tkivnih cist, pride v želodcu in tankem črevesu mačke do razgradnje stene cist zaradi delovanja proteolitičnih encimov (Ajioka in Soldati, 2007). To povzroči sprostitvev bradizoitov, ki penetrirajo v epitelijske celice tankega črevesa (enterocite), kjer se množično nespolno razmnožijo. Natančneje, gre za t.i. shizogonijo, ki vodi v nastanek številnih shizontov (Robert-Gangneux in Darde, 2012). Približno 2 dni po zaužitju tkivnih cist, nespolnemu razmnoževanju bradizoitov sledi cikel spolnega razmnoževanja (Ajioka in Soldati,

2007). Okoliščine znotraj tankega črevesa mačk iz znanstvenikom še neznanega razloga spodbudijo diferenciacijo nekaterih shizontov v makrogamete ter običkane mikrogamete, katerih združitve, v procesu imenovanem gametogonija, vodi v nastanek oocist (Sullivan, 2011). Te se iz enterocit sprostitjo v lumen črevesa, od koder se z mačjimi iztrebki izločajo v zunanost. 1 do 5 dni kasneje, v zunanjem okolju, na primerni temperaturi in vlagi, poteče proces sporulacije, katerega posledica je infektivna sporulirana oocista, ki vsebuje 8 sporozoitov (Ajioka in Soldati, 2007). Izločanje oocist pri mačkah se prične 3. – 7. dan po infekciji s parazitom, ki se nadaljuje še 20 dni, pri čemer lahko ena okužena mačka izloči več kot 100 milijonov oocist (Dubey in Frenkel, 1972).

Znotraj vmesnih gostiteljev, toplokrvnih živali, se parazit razmnožuje le nespolno. Po zaužitju oocist z okuženo vodo, hrano, prstjo, itd., se sporozoiti sprostitjo v lumen črevesa, od koder penetrirajo v epiteljske celice ter se pretvarjajo v tahizoite. Ti se hitro množijo z endodigenijo znotraj katerih koli celic z jedrom ter se razširjajo po telesu gostitelja. 7-10 dni po okužbi pride do pretvarjanja tahizoitov v bradizoite ter tvorbe tkivnih cist (Robert-Gangneux in Darde, 2012).

Okužbo vmesnega gostitelja v veliki meri povzroča tudi uživanje surovega ali slabo termično obdelanega mesa, inficiranega s tkivnimi cistami. Te se, ob prehodu skozi prebavni trakt, zaradi delovanja želodčne kisline ter prebavnih encimov (pepsin), pretrgajo, kar povzroči sprostitve bradizoitov, ki vdrejo v črevesne epiteljske celice, kjer se preobrazijo v aktivne tahizoite (Sullivan, 2011). Ti se močno namnožijo, povzročijo razpad gostitejskih celic, ter se, prek limfe in krvi, razširijo po telesu, v različna tkiva in organe. Od poškodbe le-teh, je tako odvisna tudi klinična slika (Logar, 2010).

Učinkovitost omenjenega masovnega razširjanja tahizoitov po telesu gostitelja se skriva v zmožnosti invazije in vdora v vse celice z jedrom, vključno s fagocitnimi celicami imunskega sistema – monociti. Po razmnožitvi tahizoitov znotraj enterocit, ti prečkajo črevesno bariero ter prehajajo v sloj lamine proprie, kjer vstopajo v monocite, ki so ključnega pomena za razširjanje parazita v vsa bistvena tkiva in organe ter prehod pomembnih bioloških barier (krvno-možganska, placentalna), katerih prvotni namen, s svojo selektivno prepustnostjo, je tudi obramba pred patogenimi mikroorganizmi (Nassif in sod., 2002).



Slika 3: Življenjski cikel *Toxoplasma gondii* (Robert-Gangneux in Darde, 2012).

2.1.3 Okužba s parazitom

V večini primerov se človek okuži s tkivnimi cistami ob uživanju surovega ali slabo termično obdelanega mesa ter s hrano, vodo oz. prstjo, kontaminirano s sporuliranimi oocistami, ki so v zunanje okolje zašle prek mačjih iztrebkov (Logar, 2010; Robert-Gangneux in Darde, 2012). Infektivnost tkivnih cist lahko izničimo s primerno termično obdelavo, pri čemer je 67° C dovolj za takojšnje uničenje. Sporulirane oociste so izredno odporne na različne ostre okoljske dejavnike, v vlažnem okolju pa lahko ostanejo viabilne tudi več kot eno leto. Prav tako kot tkivne ciste, ki jih lahko uničimo s termično obdelavo, zadostujeta že 1 do 2 minuti segrevanja pri 55-60° C (Robert-Gangneux in Darde, 2012).

Redka, a možna oblika okužbe posameznika s parazitom *T. gondii*, je presaditev s cistami okuženih organov darovalca, neimuniziranemu prejemniku. Glede na to, da je tvorba tkivnih cist pogostejša v določenih organih (mišice, srce, možgani), največje tveganje predstavlja transplantacija srca (Robert-Gangneux in Darde, 2012).

Največje tveganje pa predstavlja okužba prek posteljice oz. kongenitalna okužba. Gre za vertikalni prenos bolezni z noseče matere na zarodek, ko tahizoiti, v procesu razširjanja po telesu gostitelja, kolonizirajo tkiva posteljice, od koder lahko vstopajo naprej v placentalni krvni obtok ter s tem okužijo še nerojenega otroka (Robert-Gangneux in Darde, 2012).

2.2 TOKSOPLAZMOZA

Predvidevajo, da je s parazitom *T. gondii* okužene 25-30 % celotne človeške populacije (Montoya in Liesenfeld, 2004). Pravzaprav pa razširjenost okužbe variira med posameznimi državami oz. geografskimi področji, od 10 % pa vse do 80 % (Pappas in sod., 2009). Nizka seroprevalenca (10-30 %) je značilna za področja Severne Amerike, jugovzhodne Azije, severne Evrope ter v državah Sahela v Afriki. Države osrednje in južne Evrope spadajo v območje srednje razširjenosti parazita (30-50 % okuženih prebivalcev), medtem ko je za države Latinske Amerike ter v tropskih predelih Afrike, značilna visoka prevalenca toksoplazmoze (Robert-Gangneux in Darde, 2012).

2.2.1 Pridobljena toksoplazmoza

Glede na tip okužbe lahko ločimo pridobljeno ali prirojeno (kongenitalno) toksoplazmozo. O pridobljeni oz. akvirirani toksoplazmozi govorimo, kadar se človek s parazitom okuži po rojstvu. Takšna okužba je pri zdravih, imunsko neoslabljenih ljudeh (tako pri odraslih kot otrocih) večinoma asimptomatična ali pa jo spremljajo le blagi, gripi podobni simptomi kot so glavobol, vročina, otekle bezgalke in utrujenost (Logar, 2010; Robert-Gangneux in Darde, 2012). V redkih primerih lahko pride do cervikalne limfadenopatije (močno otekle vratne bezgavke), ki je pogosto zamenjana za infekcijsko mononukleozo. Bolezenski znaki ponavadi izzvenijo v nekaj tednih zato tudi zdravljenje navadno ni potrebno. Kljub temu se lahko takšna limfadenopatična toksoplazmoza zaplete z okvarami drugih organov kot so možgani, srce, jetra in gibalno živčevje, a so takšni primeri, kot rečeno, precej redki (Logar, 2010). V zadnjih letih pa raziskovalci ugotavljajo celo morebitne povezave med infekcijo s *T. gondii* ter nekaterimi pogostejšimi nevrološkimi boleznimi, kot sta shizofrenija ter Alzheimerjeva bolezen (Kusbeci in sod., 2011; Arias in sod., 2012). Zaradi parazitove afinitete do živčevja oz. nevtropizma predvidevajo, da bi lahko takšna okužba povečala tveganje za razvoj omenjenih nevroloških bolezni (Arias in sod., 2012). Tekom okužbe s *T. gondii* se aktivirajo astrocite v možganih, ki povečajo tvorbo kinurenične kisline (produkt ob metabolizmu aminokisline triptofan), česar posledica je čezmerna inhibicija glutaminskih ter nikotinskih nevrotransmiterskih receptorjev. Omenjen proces pa velja tudi za povzročitelja kognitivnih simptomov shizofrenije (Schwarcz in Hunter, 2007; Costa da Silva in Langoni, 2009).

Povsem drugačna in življenjsko ogrožujoča pa je infekcija bolnikov z imunsko oslabeledostjo, ki je mnogokrat posledica različnih bolezni npr. levkemije, aidsa, Hodgkinovega limfoma, limfosarkoma, ali zdravljenja z različnimi imunosupresivnimi zdravili (Logar, 2010). Pri takšnih bolnikih gre v večini primerov za reaktivacijo latentne kronične infekcije, saj odsotnost normalnega imunskega odziva povzroči raztrganje cist znotraj tkiv gostitelja, ter naglo pretvorbo bradizoizov v proliferirajoče tahizoite. Tvorbo cist in vzdrževanje njihove latence namreč inducirajo različni dejavniki stresa, med drugim normalen odziv imunskega sistema. V primeru *T. gondii*, je imunski odziv posredovan preko celic T pomagalk (CD4+) ter citotoksičnih celic T (CD8+) (Sullivan, 2011). Ob njihovi odsotnosti oz. padcu koncentracije, navadno pod 100 celic/ μ l, pride do reaktivacije tkivnih cist, tahizoiti pa se nenadzorovano razmnožujejo in razširjajo po telesu v različna tkiva in organe, kjer povzročajo njihove poškodbe. Enako velja v primeru akutne (na novo pridobljene) okužbe takšnega

bolnika, kjer ne pride do pretvorbe tahizoitov v bradizoite, temveč se ti nenadzorovano razširjajo ter škodujejo telesu gostitelja (Sullivan, 2011). Najpogosteje gre za prizadetost centralnega živčnega sistema oz. pojav t.i. toksoplazmoznega encefalitisa, ki ga spremljajo glavoboli, letargija (duševna otopelost), motnje koordinacije, hemipareza in demenca. Pogosto so prizadeti tudi drugi organi, predvsem tisti, ki so primarna tarča za tvorbo tkivnih cist (Robert-Gangneux in Darde, 2012).

2.2.2 Kongenitalna toksoplazmoza

Največje tveganje pa predstavlja prirojena ali kongenitalna toksoplazmoza, kjer gre za primarno okužbo nosečnice ter posledično njenega še nerojenega otroka (Robert-Gangneux in Darde, 2012). Tahizoiti se, v procesu razširjanja po telesu, naselijo v tkivu posteljice, od koder se vključujejo v krvni obtok otroka (Montoya in Liesenfeld, 2004). Frekvenca vertikalnega prenosa ter resnost bolezni pri kongenitalno okuženemu plodu je odvisna od časovnega okvirja materine primarne okužbe tekom nosečnosti. Posteljica ali placenta pri tem igra pomembno vlogo, saj je hkrati naravna bariera, ki otroka ščiti, ter tudi tarčno tkivo za razmnoževanje parazita (Robert-Gangneux in Darde, 2012). Placentalna bariera je v začetku nosečnosti učinkovitejša, saj verjetnost prenosa okužbe narašča s stadijem nosečnosti. V prvem tromesečju je tako vrednost prenosa parazita približno 25 %, 54 % v drugem tromesečju ter več kot 65 % v zadnjem tromesečju (McAuley, 2014), proti koncu nosečnosti pa se le še povečuje (Robert-Gangneux in Darde, 2012). Obsežnost oziroma resnost bolezni ploda pa je obratno sorazmerna z verjetnostjo prenosa prek posteljice, saj je več kot 80 % novorojenčkov, ki so se okužili v zadnjem tromesečju nosečnosti, asimptomatičnih. Nasprotno, pa so posledice prenosa okužbe v prvem tromesečju izredno težke ter vodijo v obsežne anomalije v razvoju otroka ali celo splav. Replikacija parazita sproža fokalno nekrozo tkiva in močan vnetni odziv, kar posledično privede v večje nepravilnosti v razvoju možganskih ter očesnih tkiv. Med najpogostejše hujše posledice kongenitalne toksoplazmoze spadajo: hidrocefalija, mikrocefalija, mentalna zaostalost, možganske kalcifikacije, psihomotorične motnje, oglušelost, očesne lezije ter slepota (Robert-Gangneux in Darde, 2012).

Glede na omenjene vrednosti prenosa okužbe z matere na plod, torej večina novorojenčkov ob rojstvu izgleda popolnoma zdravih oz. ne kažejo nobenih kliničnih znakov okužbe s parazitom toksoplazme. Natančneje, najmanj 75 % vseh kongenitalnih okužb pri novorojenčkih je subkliničnih, vendar do razvoja bolezni običajno pride nekaj mesecev ali celo nekaj let kasneje (McAuley, 2014). Kljub dejstvu, da se najresnejše

posledice kongenitalne okužbe razvijejo ob materini primarni okužbi v prvem tromesečju nosečnosti, pa bolezenska stanja, ki se razvijejo tekom prvih nekaj let po rojstvu, nikakor niso zanemarljiva. Najpogostejša kasnejša obolenja oz. posledice so: toksoplazemski horioretinitis, slepota, hidro- ali mikrocefalija, cerebralne kalcifikacije, zaostalost v razvoju, epilepsije ter oglušlost (McAuley, 2014).

Takšna latentna bolezenska stanja torej še poudarjajo pomembnost diagnostike potencialne okužbe novorojenčkov ter, da so metode, s katerimi jo odkrivamo, dovolj natančne, zanesljive ter hkrati omogočajo čim zgodnejše odkrivanje kongenitalne toksoplazmoze.

2.3 IMUNSKI ODZIV GOSTITELJA NA OKUŽBO S PARAZITOM *TOXOPLASMA GONDII*

2.3.1 Splošno o imunskem sistemu

Imunski sistem je izjemen obrambni mehanizem, ki se je tekom evolucije razvil z namenom zaščite telesa pred vdorom patogenih mikroorganizmov oz. vsem zunanjim agensom, ki so telesu tuji (Kuby in sod., 2003; Coico in sod., 2003). Zmožen je generacije velikega števila raznolikih celic in molekul, ki so sposobne specifične prepoznave in odstranitve tujkov. Omenjene celice in molekule, delujejo v skupnem, izredno dinamičnem in kompleksnem omrežju, za katerega so pomembne in značilne lastnosti predvsem prepoznavna med lastnim in tujim ter specifičnost za širok nabor tujih molekul (Kuby in sod., 2003). Rezultat uspešnega usklajenega in sinergističnega delovanja teh specializiranih celic in organov je situaciji primeren, učinkovit in samoomejujoč imunski odziv (Woods Schindler, 1991). Telesno obrambo lahko v grobem delimo na prirojeno (naravno) odpornost in pridobljeno oz. adaptivno odpornost oz. imunski sistem, obe pa vsebujeta komponente tako humoralnih kot celičnih mehanizmov.

2.3.1.1 Prirojena oz. naravna odpornost

Predstavlja prvo linijo obrambe pred okužbo in sestoji iz antigen-nespecifičnih fizičnih barier, kot sta koža ter površine različnih mukoznih membran, iz fagocitnega delovanja celic, kot so nevtrofilci, makrofagi in mikroglia celice v centralno živčnem sistemu ter iz molekularnega delovanja interferonov, komplementa ter določenih ostalih serumskih proteinov (Coico in sod., 2003).

Makrofagi ter nevtrofilci so izredno pomembne fagocitotske celice, pomembne zlasti v zgodnji fazi okužbe, pri uničevanju znotrajceličnih patogenov, s fagocitozo, z izločanjem protimikrobnih proteinov ter produkcijo in izločanjem reaktivnih kisikovih in dušikovih intermediatov (Vozelj, 1996; Munoz in sod., 2011). Pomembne celice prirojene obrambe, ki med drugim igrajo tudi vlogo pri okužbi s *T. gondii*, so celice naravne ubijalke oz. celice NK, ki sicer izhajajo iz iste zarodne linije kot limfociti, a njihova nespecifična citotoksičnost ni pogojena s stikom pglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa na tarčnih celicah, zaradi česar jih uvrščamo med naravno obrambo (Vozelj, 1996; Coico in sod., 2003).

2.3.1.2 Pridobljena oz. adaptivna odpornost (imunski sistem)

Pridobljena odpornost dopolnjuje delovanje prirojene odpornosti in je evolucijsko mlajša. Najpomembnejša lastnost je sposobnost specifične prepoznave in selektivnega uničenja tujih molekul in mikroorganizmov. Poleg tega je, za razliko od prirojene odpornosti, sposobna tvorbe t.i. imunskega spomina, ki temelji na dejstvu, da so celice, ki so bile predhodne že izpostavljene določenemu antigenu, zmožne shraniti informacije o njem, ob naslednji izpostavitvi antigenu pa je imunska reakcija hitrejša in učinkovitejša (Vozelj, 1996). Dodatna sposobnost in predpogoj za učinkovito delovanje prirojenega sistema je zmožnost razlikovanja med telesu lastnimi ter tujimi molekulami ter posledično generiranje primerne imunskega odziva izključno proti tujim, saj v nasprotnem primeru pride do razvoja avtoimunskih reakcij (Kuby in sod., 2003). Glavne komponente imunskega sistema so limfociti T, limfociti B ter protitelesa. Antigen predstavivne celice (APC), kot so dendritične celice (DC) in makrofagi, ne posedujejo antigen specifičnih receptorjev, tako kot limfociti, a imajo pomembno funkcijo pri obdelavi in predstavitvi antigenov specifičnim receptorjem na limfocitih T (Coico in sod., 2003).

2.3.1.2.1 Limfociti B

Limfociti B so eden izmed tipov belih krvnih celic, ki nastajajo v kostnem mozgu, od koder se sproščajo v krvni in limfni obtok ter naselijo v različnih limfatičnih organih. Na svoji površini izražajo za antigen specifične imunoglobulinske receptorje. Stik z antigenom spodbudi hitro proliferacijo in diferenciacijo celic v efektorske limfocite B oz. plazmatke ter spominske celice (Kuby in sod., 2003). Spominske celice B so frakcija celic B, ki so ohranile sposobnost razmnoževanja, a se ne morejo diferencirati v protitelesa izdelujoče plazmatke (Vozelj, 1996). Dolgožive spominske celice zapustijo

limfatične organe ter krožijo po krvožilju in tkivih, kjer ob ponovnem srečanju z enakim antigenom, kot tistim, ki je sprožil njihov nastanek, generirajo hitrejši in močnejši sekundarni imunski odziv. Celice plazmatke pa so končno stanje v razvoju limfocitov B, katerih vloga je sinteza in izločanje takšnih protiteles, ki nosijo enako antigensko specifičnost, kot imunoglobulini na površini tistih limfocitih B, katerih potomke so. Zaradi produkcije protiteles, so limfociti B tudi nosilci humoralne adaptivne imunosti (Coico in sod., 2003).

2.3.1.2.2 Limfociti T

Efektorski limfociti T, ki se generirajo ob stiku z antigenom, pa so po drugi strani nosilci celično posredovane imunosti. Prav tako kot celice B, tudi limfociti T nastajajo v kostnem mozgu, s to razliko, da dozoriijo v timusu oz. priželjcu. Tekom zorenja, na svoji površini izrazijo edinstvene receptorske molekule za prepoznavo antigenov, imenovane T-celične receptorje (TCR). A ker antigena niso zmožne prepoznati same, za to potrebujejo pomoč antigen predstavitevni celic, ki antigen predstavljajo na membranskih proteinih imenovanih poglavitni histokompatibilnostni kompleks tipa II (MHC, angl. *Major Histocompatibility Complex*). Glede na funkcijo in način prepoznave antigena ločimo dve večji podvrsti limfocitov T, in sicer: celice T pomagalke (T_H , angl. *helper cells*) ter citotoksične celice T (T_c , angl. *cytotoxic cells*) (Kuby in sod., 2003). Opredeljujejo jih posebni membranski glikoproteini, specifični za določeno vrsto limfocitov. Označujemo jih z oznako CD (angl. *Cluster of differentiation*), pri čemer T pomagalke izražajo proteine $CD4^+$, citotoksične celice pa $CD8^+$ (Vozelj, 1996). Glede na način prepoznave antigena, jih ločimo po tem, da celice $CD4^+$ aktivirajo eksogeni proteinski antigeni, ki se razgradijo v fagolizosomu APC, te pa jih vgradijo in predstavijo na membranskem kompleksu MHC II (Vozelj, 1996; Kuby in sod., 2003). Nasprotno, pa celice $CD8^+$ aktivirajo endogeni, sintetizirani antigeni (npr. virusni antigeni), ki jih celice predhodno razgradijo na peptidne fragmente in vežejo na molekule MHC tipa I, te pa se nahajajo na vseh telesnih celicah, ki vsebujejo jedro. $CD4^+$ in $CD8^+$ celice pa se razlikujejo tudi na podlagi različne funkcionalnosti (Vozelj, 1996).

Celice pomagalke ($CD4^+$) ob stiku z antigenom proliferirajo ter se diferencirajo v efektorske celice, ki izločajo različne regulacijske faktorje, imenovane citokini. Ti igrajo pomembno vlogo pri aktivaciji limfocitov B, citotoksičnih limfocitov T, makrofagov, ter številnih drugih celic, ki sodelujejo pri imunskem odzivu. Različni tipi citokinov spodbujajo različne tipe imunskih odzivov (Kuby in sod., 2003). V populaciji

celic pomagalk lahko ločimo tudi več podvrst, ki v odgovor na antigensko spodbujanje, izločajo različne citokine. Ob aktivaciji se tako formirajo podvrste T_{H1} in T_{H2} , pri čemer celice T_{H1} izdelujejo citokine interleukin 2 (IL-2) ter interferon gama (IFN- γ), ki aktivirata makrofage ter so tako poglavitne efektorke celice pri celično posredovani imunosti proti znotrajceličnim mikrobov in pozni preobčutljivosti. Poleg tega spodbujajo produkcijo takšnih protiteles pri limfocitih B, ki so učinkovita za opsonizacijo antigenov za fagocitozo ter aktivacijo komplemента. Celice T_{H2} , pa so poglavitne pri, od fagocitov neodvisni obrambi, ki jo posreduje IgE protitelesa ter eozinofinci (npr. obramba proti nekaterim glistam). Tvorijo in izločajo citokine IL-4 (ti spodbujajo izdelavo protiteles tipa IgE in IgG), IL-5 (faktor, ki aktivira eozinofince ter rastni faktor za limfocite B), IL-10 (zaviralec celično posredovane imunosti) ter IL-13 (njihova vloga je podobna IL-4, s to razliko, da vplivajo le na rast limfocitov B) (Vozelj, 1996; Coico in sod., 2003).

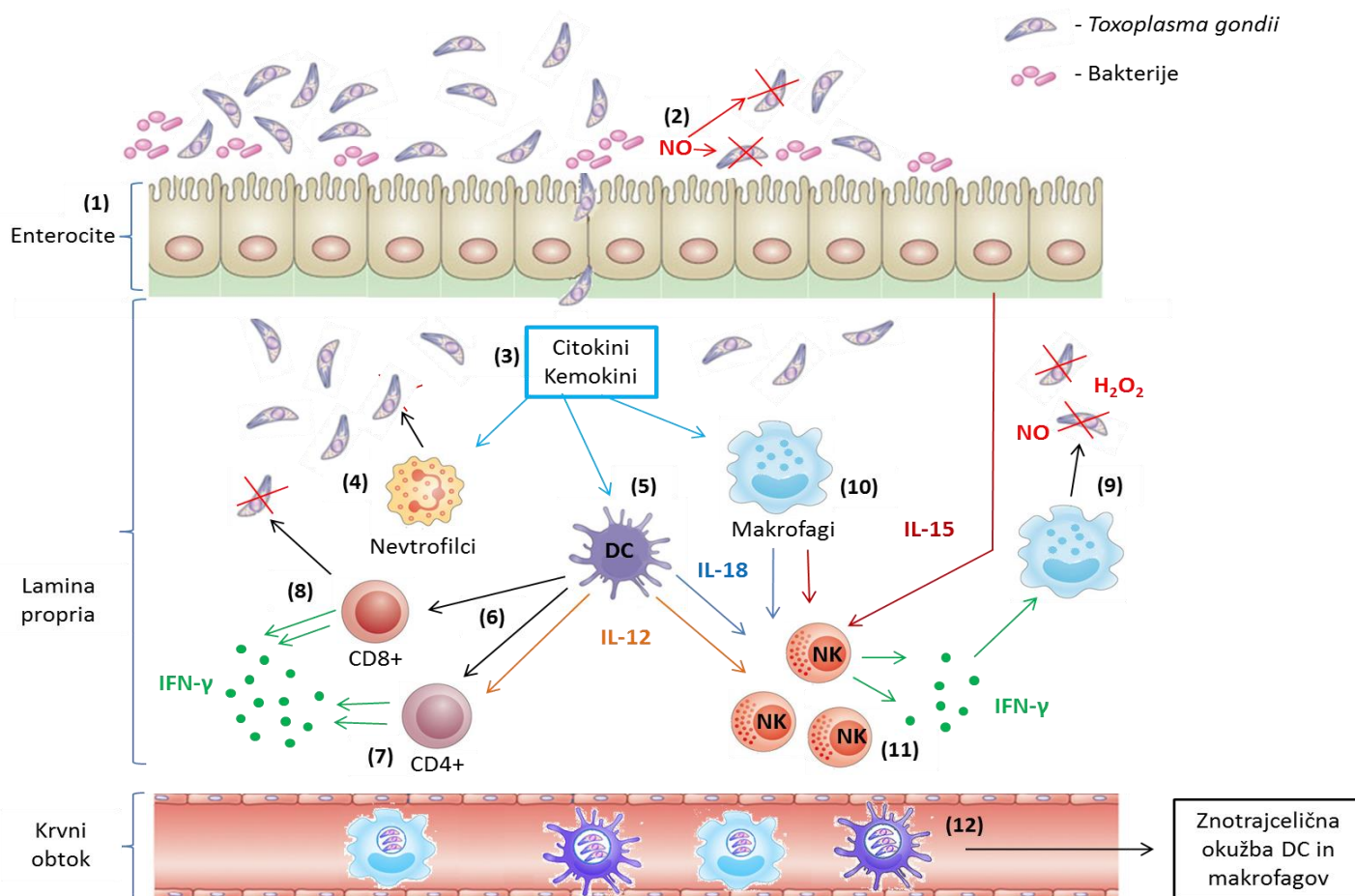
Citotoksični $CD8^+$ limfociti so efektorske celice v celično posredovani imunosti. Njihova poglavitna vloga je uničenje celic, okuženih z različnimi patogeni zaradi česar so bistvenega pomena pri obrambi pred virusnimi, bakterijskimi ter nekaterimi parazitskimi infekcijami (Vozelj, 1996). Udeležene so tudi v nekaterih avtoimunskih boleznih, uničevanju tumorskih celic ter zavračanju alogenskih presadkov (Kuby in sod., 2003). Primarna vloga $CD8^+$ celic je torej citotoksičnost oz. uničevanje tarčnih celic, ki poteka z neposrednim stikom. Za pritrnitev so potrebne adhezijske molekule na površini obeh, tako tarčne kot citotoksične celice. Prepoznavi antigena ter kostimulatornem signalu, potrebnem za aktivacijo limfocitov T, sledi usmeritev citoplazemskih granul znotraj celic $CD8^+$, proti tarčni celici (Vozelj, 1996). Granule vsebujejo citotoksične proteine, kot sta perforin in grancim, ki se, s pomočjo eksocitoze, izlijeta v notranjost tarčne celice. Perforini so molekule, ki s polimerizacijo oblikujejo transmembranske kanale oz. pore v membrani tarčne celice, povišana permeabilnost celice pa posledično vodi v celično smrt. Grancini pa po drugi strani vstopajo v celico prek por kjer, v interakciji z znotrajceličnimi komponentami, inducirajo kontrolirano celično smrt oz. apoptozo. Drug način uničenja tarčnih celic pa je z receptorji posredovano ubijanje, kjer se ob interakciji površinske molekule CD178 (ligand Fas), na površini citotoksične celice, ter CD95 (Fas) na površini tarčnih celic, aktivirajo proteolitični encimi kaspaze, ki prav tako inducirajo apoptozo. Poleg citotoksičnosti, je sekundarna vloga celic $CD8^+$ tudi sinteza in izločanje citokinov, zlasti IFN- γ , TNF- β ter IL-4 (Coico in sod., 2003).

2.3.2 Imunski odziv gostitelja na okužbo

Za uspešno obrambo telesa pred toksoplazmo je potrebno usklajeno in sinergistično delovanje tako prirojene kot pridobljene telesne obrambe. Za vzpostavitev učinkovitega in ustreznega imunskega odziva je v zgodnji fazi, takoj po okužbi, ključna interakcija med parazitom in gostiteljskimi celicami (med drugim enterociti), ki poskrbijo za sekrecijo provnetnih citokinov in kemokinov, ki privabljajo ostale celice imunskega odziva na mesto okužbe ter ustvarjajo vnetni odziv. Poleg tega pričnejo enterocite izločati tudi protimikrobne proteine defenzine ter molekule dušikovega oksida (NO), ki neposredno poškodujejo parazita (Buzoni-Gatel in sod., 2006).

2.3.2.1 Aktivacija odziva prirojene odpornosti

Kemokini privabljajo zgodnje fagocitne celice kot so nevtrofilni granulociti, ter dendritične celice na mesto okužbe (Buzoni-Gatel in sod., 2006). Dendritične celice igrajo pomembno vlogo pri razširjanju parazita po telesu gostitelja, saj namnoženi tahizoiti vstopajo v lamino proprio, mukozno plast, ki leži nad slojem enterocit, od koder invazirajo v omenjene celice ter makrofage (Munoz in sod., 2011). Poleg tega so DC pomemben vir citokinov IL-12, ki so pomemben sprožilec sinteze citokinov IFN- γ pri celicah NK ter limfocitih T, kar zavira hitro razmnoževalno fazo tahizoitov (Buzoni-Gatel in sod., 2006), izločajo pa tudi citokine IL-15 ter IL-18, ki sta pomembna aktivatorja proliferacije celic NK (French in sod., 2006). V lamini proprii se nahajajo tudi nespecifične celice naravne obrambe, makrofagi ter prej omenjene celice NK. Oba tipa celic sta pomembna predvsem v zgodnji fazi infekcije, pri čemer tudi makrofagi zavirajo replikacijo tahizoitov s produkcijo reaktivnih kisikovih ter dušikovih intermediatov ter, prav tako kot DC, izločajo IL-15 in IL-18, ki aktivirata proliferacijo celic NK (Buzoni-Gatel in sod., 2006; French in sod., 2006). Te delujejo citotoksično na okužene tarčne celice, poleg tega pa so pomemben vir ključnega citokina IFN- γ , ki aktivira in pospeši delovanje makrofagov ter razvoj specifičnega T-celičnega odziva (Buzoni-Gatel in sod., 2006) (Slika 4).



Slika 4: Shema usklajenega delovanja imunskega odziva proti parazitu *Toxoplasma gondii* v črevesu gostitelja. (1) Fizična bariera črevesnih celic, enterocit, ki so med seboj povezane s tesnimi stiki, predstavlja prvo linijo obrambe proti parazitu. (2) Okužene enterocite pričnejo z izločanjem citotoksičnih molekul, kot je dušikov oksid (NO). (3) Poleg tega, pričnejo enterocite z izločanjem citokinov in kemokinov, ki privabljajo celice imunskega odziva na mesto okužbe. (4) Nevtrofilci pričnejo s fagocitozo in uničevanjem tujkov. (5) Dendritične celice (DC) imajo več različnih vlog. Izločajo citokine IL-18, ki spodbujajo proliferacijo celic NK, izločajo citokine IL-12, ki spodbudijo tvorbo citokinov IFN- γ pri NK celicah in limfocitih T. (6) DC delujejo tudi kot antigen predstavitvene celice (APC), ki aktivirajo limfocite T. (7) T-celice pomagalke (CD4+) izločajo pomembne citokine, med drugim IFN- γ , IL-2, ki spodbuja proliferacijo citotoksičnih celic T, ter TNF- β . (8) Citotoksične celice T (CD8+) ubijajo s parazitom okužene celice ter so pomemben vir citokinov IFN- γ . (9) Makrofagi delujejo zaviralno na razmnoževanje tahizoitov z izločanjem reaktivnih kisikovih in dušikovih intermediatov, (10) poleg tega proizvajajo citokine IL-18 ter IL-15, ki inducirajo proliferacijo in produkcijo IFN- γ pri celicah NK. (11) Celice naravne ubijalke (NK) delujejo citotoksično na okužene tarčne celice, poleg tega pa so pomemben vir ključnega citokina IFN- γ . (12) Tahizoiti invazirajo v makrofage in DC, ki se vključujejo v krvni obtok, to pa omogoča njihovo učinkovito razširjanje po telesu gostitelja (Prirejeno po: Goldszmid in Trinchieri, 2012; Yarovinsky, 2014).

2.3.2.2 Aktivacija adaptivnega imunskega odziva

V boju s parazitom *T. gondii* pa je celično posredovana imunost tista, ki ima ključno vlogo pri odpornosti gostitelja na okužbo (Chapey in sod., 2010; Yamamoto in sod., 2000; Denkers, 1999). Kljub temu se, v rutinskih preiskavah, ne uporablja v diagnostične namene (Chapey in sod., 2010). Mononuklearne celice, izolirane iz novorojenčkov ali okuženih odraslih oseb, ob stimulaciji z antigeni toksoplazme *in vitro* tvorijo močan proliferativni odziv (Ciardelli in sod., 2008). Rezultat je dobro merljiv ter izredno dolgotrajen celični odziv (Denkers, 1999), katerega vloga je zaščita gostitelja pred naglim razmnoževanjem invazivnih tahizoitov ter posledičnimi patološkimi posledicami (Denkers in Gazzinelli, 1998). Takšna celično posredovana imunost temelji na delovanju limfocitov T. Ob okužbi s *T. gondii* imajo pomembno vlogo tako celice T pomagalke (CD4+) kot tudi celice T ubijalke (CD8+), vendar pa dosedanje raziskave ključno vlogo pripisujejo celicam T pomagalkam podvrste T_{H1} , za katere je značilna produkcija najpomembnejših citokinov za obrambo proti parazitu, kot so: IL-2, interferon gama (INF- γ) ter tumor nekrotizirajoči faktor beta (TNF- β) (Kuby in sod., 2003; Montoya 2004). Oba tipa limfocitov T proizvajata in izločata visoke koncentracije INF- γ ob *in vitro* stimulaciji s parazitom (Denkers, 1999), prav tako pa, tako CD4+ kot tudi CD8+ celice, delujejo citotoksično proti, s *T. gondii*, okuženim celicam (Montoya, 1996). Funkcija CD4+ limfocitov T je sicer proizvodnja vnetnih citokinov, pomembnih za uničenje in omejitev parazita v telesu gostitelja ter tvorba citokina IL-2, pomembnega rastnega faktorja, ki vzpodbuja proliferacijo CD8+ citotoksičnih limfocitov T, ojača ekspanzijo celic NK, njihovo litično aktivnost ter proizvodnjo INF- γ (Denkers in Gazzinelli, 1998). Limfociti CD8+ pa so glavni citotoksični efektorji obrambe *in vivo*. Ti imajo, poleg tvorbe citokinov INF- γ , vlogo citotoksičnih celic, ki povzročijo lizo, s parazitom okuženih, tarčnih celic (Denkers, 1999).

Vloga limfocitov B in njihova produkcija protiteles še ni dovolj dobro raziskana, a znanstveniki iz rezultatov raziskav sklepajo, da protitelesni odziv sicer prispeva k obrambi gostitelja ob okužbi s *T. gondii*, a ni bistvenega pomena (Kang in sod., 2000; Munoz in sod., 2011). Predvidevajo tudi, da igra pomembnejšo vlogo pri kontroli latentne faze okužbe oz. preprečevanju reinfekcije s parazitom, kot v akutni fazi okužbe. Prisotnost in vezava specifičnih protiteles na tahizoite sicer pospeši delovanje makrofagov ter aktivira komplement, kar posledično privede do lize tahizoitov (Kang in sod., 2000).

2.3.2.3 Citokin IFN- γ

Namen magistrske raziskave je, poleg ovrednotenja metode za zgodnejšo in natančnejšo diagnozo kongenitalne okužbe, tudi primerjava proliferativnega ter citokinskega odziva limfocitov na stimulacijo s parazitom *T. gondii*.

Najprimernejši in najpomembnejši citokin za izvedbo raziskave je interferon gama (IFN- γ), ki ima poglavitno vlogo v obrambi pred *T. gondii* tako v akutni kot kronični fazi okužbe, saj sproža pomembne efektorske mehanizme posredovane prek ostalih celic imunskega sistema – predvsem makrofagov (Denkers in Gazzinelli, 1998). V zgodnji fazi okužbe je sinteza IFN-y odvisna predvsem od celic NK, ki so med drugim pomemben vir omenjenih citokinov (Sher in sod., 1993), njegova vloga pa je omejevanje razmnoževanja tahizoitov ter razvoj primerne T-celičnega odziva (Denkers in Gazzinelli, 1998). Zgodnji izbruh IFN- γ je torej ključen za oblikovanje imunskega odziva (Gazzinelli in sod., 1993). Omenjen citokin sproža oz. potencira sintezo takšnih kemokinov in proteinov, ki sodelujejo pri rekrutaciji limfocitov T, vodi diferenciacijo prekurzorskih celic v T_{H1} efektorske celice (Denkers in Gazzinelli, 1998), kasneje tekom okužbe, ko je visoka produkcija citokina odvisna predvsem od aktivnosti limfocitov T, pa je sinteza specifičnih protiteles izotipa IgG1 na B limfocitih deloma odvisna prav od omenjenega citokina (Finkelman in sod., 1990).

Različne študije kažejo, da odsotnost ali pomanjkanje vodi v nenadzorovano razmnoževanje parazita znotraj gostiteljevega telesa, ki akutne faze okužbe večinoma ne preživi (Scharton-Kersten, 1996). Pomanjkanje citokina v kronični fazi okužbe pa vodi v reaktivacijo cist ter posledično smrt gostitelja. IFN-y je torej izredno pomemben pri nadzoru replikacije invazivnih tahizoitov preko različnih mehanizmov kot so: indukcija sinteze reaktivnih dušikovih intermediatov oz. dušikovega oksida (NO) pri makrofagih kot tudi astrocitih in mikroglia celicah v možganih (Denkers, 1999). NO vpliva na različne metabolne poti in je, kot prosti radikal, toksičen za bakterije ter znotrajcelične parazite (Sturge in Yarovinsky, 2014). Poleg dušikovih intemediatov, IFN-y aktivira tudi oksidativni metabolizem makrofagov, kar vodi v tvorbo, za parazita prav tako toksičnih, reaktivnih kisikovih spojin (Denkers, 1999).

Naslednji mehanizem obrambe, posredovan preko IFN-y je degradacija ključne rastne aminokislina, triptofana, znotraj gostiteljske celice (Pfefferkorn, 1984; Denkers, 1999). IFN-y inducira encim indolamin-2,3-deoksigenazo (IDO), ki sodeluje pri katabolizmu triptofana kar posledično zniža njegovo koncentracijo v celici. Zaradi dejstva, da je *T.*

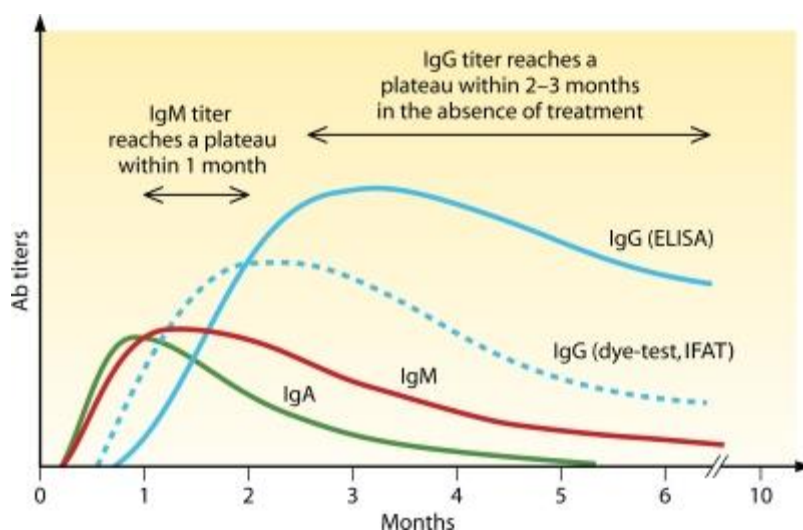
gondii avksotrof za triptofan (Sturge in Yarovinsky, 2014), njegovo pomanjkanje upočasni oz. prekine rast parazitov, sproži njihovo preobrazbo ter tvorbo cist znotraj tkiv (Sullivan, 2012). Z IFN- γ posredovana razgradnja triptofana je dokazana pri človeških fibroblastih ter nekaterih drugih celičnih tipih, kot so epiteljske celice (Denkers, 1999) npr. človeške mikrovaskularne epiteljske celice v možganih (Sullivan, 2012).

2.4 DIAGNOSTIKA

Najpogosteje uporabljeni testi, za odkrivanje akutnih in kroničnih okužb s parazitom, so serološki testi, s katerimi ugotavljamo prisotnost specifičnih protiteles tipa IgG, IgM in IgA (Logar, 1985). Za samo časovno umestitev okužbe, ki je zlasti pomembna pri testiranju nosečnic, pa je pomemben tudi test avidnosti protiteles IgG (Logar 1999). Ker je okužba pogosto asimptomatična, je serološka diagnostika navadno restrospektivna ter uporabljena za določitev imunskega statusa nosečnic, donorjev ter prejemnikov presaditve organov, pa tudi pacientov z retinohorditisom in limfadenopatijo (Robert-Gangneux in Darde, 2012).

2.4.1 Kinetika protitelesnega odziva

Specifična protitelesa IgM in IgA pričnejo nastajati tekom prvega tedna, ki sledi okužbi s parazitom *T. gondii*, ter dosežejo plato v roku enega meseca. Nivo protiteles IgA prične upadati hitreje v primerjavi s protitelesi IgM, vse do njihovega izginotja v 4-5 mesecih (Slika 5). V nedavni raziskavi pa so potrdili prisotnost IgA protiteles celo 9 mesecev po okužbi, zaradi česar njihova pozitivna detekcija ni zanesljiv pokazatelj nedavno pridobljene okužbe (Nascimento in sod., 2008). Nasprotno, zaradi običajno kratke aktivne dobe, negativen serološki rezultat ne izključuje okužbe s parazitom (Jenum in Stray-Pedersen, 1998).



Slika 5: Kinetika protitelesnega odziva. Prikazana je povprečna kinetika odziva različnih tipov protiteles, a se lahko ta razlikuje med pacienti ali glede na uporabljeno serološko tehniko (Robert-Gangneux, 2012).

Nivo specifičnih imunoglobulinov M prav tako prične upadati po enem mesecu, vse tja do 6–7 meseca, ko naj bi popolnoma izginili. Zaradi omenjenega dejstva, je dokazovanje protiteles IgM uporabljeno za dokaz akutne okužbe s toksoplazmozo (Robert-Gangneux in Darde, 2012). Vendar ob ugotovitvah angleških in francoskih raziskovalcev to ne velja popolnoma, saj lahko večina ELISA in ISAGA diagnostičnih tehnik zazna prisotnost protiteles IgM še nekaj mesecev ali celo let po prvotni okužbi (Gras in sod., 2004; Robert-Gangneux in Darde, 2012). Izjemoma, lahko IgM protitelesa izginejo oziroma padejo pod prag zaznave še pred 3 mesecem po okužbi (Jenum in Stray-Pedersen, 1998). Upad vrednosti IgM protiteles ter njihovo popolno izginotje, pri posameznikih torej močno variira. Lažno pozitivni rezultati oziroma vztrajanje pozitivnih titrov protiteles IgM še več let po prvotni okužbi tako ovirajo pravilno interpretacijo rezultatov pridobljenih s tako občutljivimi diagnostičnimi tehnikami (Montoya in Liesenfeld, 2004). Detekcija IgM protiteles zatorej ni več zadosten znak nedavne okužbe razen ob zaznavi visokih titrov (Robert-Gangneux in Darde, 2012).

Specifična protitelesa IgG se razvijejo kasneje, običajno do 4. tedna, ki sledi okužbi. Nivo protiteles doseže plato v roku 2-3 mesecev nakar sledi bolj ali manj postopno zmanjševanje do rezidualnega titra, ki vztraja tekom celotnega življenja in je močno variabilen med posamezniki (Robert-Gangneux in Darde, 2012).

2.4.2 Diagnostika kongenitalne toksoplazmoze

Kljub temu, da je serološko testiranje za prisotnost specifičnih IgG protiteles trenutno najučinkovitejša in najbolj zanesljiva metoda za dokazovanje okužbe, pa je ta neprimerna za zgodnje ugotavljanje potencialne kongenitalne okužbe novorojenčkov. Razlog je formacija in stanje imunskega sistema otroka tekom nosečnosti ter zgodaj po rojstvu. Kljub temu, da se razvoj imunskega sistema zarodka prične že relativno zgodaj ter se sinteza prvih protiteles (IgG in IgM) prične že 10 tednov po zanositvi, po 17. tednu pa ta že vstopijo v fetalni krvni obtok, je večina serumskega IgG materinega izvora (Holt in Jones, 2000).

Imunoglobulini tipa G namreč, tekom nosečnosti, pasivno prehajajo skozi placento in ščitijo še nerojenega otroka pred toksoplazmsko okužbo. Tako so otroci, katerih matere imajo kronično okužbo toksoplazmoze, rojeni z materinimi protitelesi IgG, njihov titer pa se začne postopoma zmanjševati ob razpolovni dobi IgG – po 4 tednih. Vsak mesec se koncentracija zmanjša za približno 50 % in izgine v obdobju enega leta (12 mesecev) (Naessens in sod., 1999; Moncarda in Montoya, 2012). Kljub temu, da je odkrivanje specifičnih IgG protiteles trenutno najučinkovitejši test za potrditev okužbe s toksoplazmo je za zgodnjo diagnostiko kongenitalne okužbe relativno neučinkovit, saj lahko le-to potrdimo šele ob zaznavi prisotnosti otrokovih IgG protiteles najmanj 12 mesecev po rojstvu, ko naj bi materina protitelesa izginila (Cook in sod., 1990; Logar, 1985).

V izogib napakam zaradi prisotnosti materinih protiteles IgG je, pri novorojenčkih, zato bolj uveljavljena serološka metoda ugotavljanja specifičnih protiteles IgM in IgA, ki ne prečkajo placentalne bariere, nekje med 5. do 10. dnem po rojstvu. Pri tem se najpogosteje uporabljata metodi: imunski aglutinacijski test (ISAGA) za merjenje specifičnih protiteles IgM ter encimsko-immunski test ELISA za dokazovanje prisotnosti IgA.

Omenjene tehnike dokazovanja prisotnosti protiteles IgA in IgM trenutno veljajo za najbolj učinkovite in so tako tudi najbolj uporabljene za diagnosticiranje kongenitalne okužbe novorojenčkov. Vendar pa so raziskave zadnjih let pokazale kar nekaj pomankljivosti oziroma omejitev, predvsem na račun tvorbe novorojenčkovih specifičnih protiteles IgM, saj lahko ta močno variira (Ciardelli in sod., 2008 2008, Lappalainen in Hedman, 2004), poleg tega, lahko na njihovo zaznavo vpliva kar nekaj različnih dejavnikov. Prvi dejavnik je **občutljivost testov**, ki so v trenutni uporabi, saj

razpon najbolj občutljivega med njimi, imunsko aglutinacijskega testa (ISAGA), sega od 41 do 70 %, za zaznavo specifičnih IgM (Robert-Gangneux in Darde, 2012).

Drug dejavnik, za slabo zaznavo novorojenčkovih protiteles IgM in IgA, je vpliv že tekočega **zdravljenja materine okužbe** s toksoplazmozo. Rezultati iz francoskega laboratorija za parazitologijo so pokazali, da je občutljivost zaznave novorojenčkovih specifičnih IgM v povezavi z zdravljenjem mater tekom nosečnosti. Test zaznave specifičnih IgM je bil namreč pozitiven pri 43 %, katerih matere so bile zdravljene ter pri 75 % novorojenčkov, katerih matere niso bile (Gangneux, 2010).

Na detekcijo protiteles izotipa IgM in IgA ima velik vpliv tudi **čas materine primarne infekcije** tekom nosečnosti. Pri tistih novorojenčkih, katerih matere so se okužile v zadnjem trimesečju nosečnosti, je verjetnost za zaznavo protiteles IgM in IgA višja, kot pri tistih, kjer so se matere okužile v prvih mesecih nosečnosti (Bessières in sod., 2009). Takšno stanje sovпада s kinetiko novorojenčkovega protitelesnega odziva, saj se sinteza omenjenih protiteles vrši tekom prvega tedna po okužbi s parazitom *T. gondii*. Plato dosežejo v roku enega meseca, nato pa začnejo postopoma izginjati, vse do 6-7 meseca po okužbi. V primeru zgodnje materine infekcije, lahko tako pride do velikega upada oz. izginotja novorojenčkovih protiteles že pred rojstvom (Robert-Gangneux in Darde, 2012). Takšni primeri seroloških preiskav, ki temeljijo na zaznavi specifičnih protiteles v novorojenčkovi krvi nekaj dni po rojstvu, privedejo do lažno negativnih rezultatov kongenitalne okužbe.

Trenutna, najbolj ustaljena in učinkovita diagnostika kongenitalne toksoplazmoze v Sloveniji, kot tudi v večini drugih držav, še zmeraj temelji na seroloških testih, s katerimi zaznavamo prisotnost novorojenčkovih specifičnih protiteles IgM in IgA. Vendar pa, upoštevajoč zgoraj našete omejitve, te diagnostične metode občasno zatajijo, predvsem pri diagnozi kongenitalne okužbe nekaj mesecev po rojstvu (Lappalainen in Hedman, 2004; Gilbert in sod., 2007; Ciardelli in sod., 2008). S kombinacijo dveh diagnostičnih metod (ISAGA - IgM ter ELISA - IgA), je stopnja odkritja kongenitalne okužbe sicer večja, a kljub temu omenjena kombinacija zataji v **enemu od štirih** primerov (Montoya in Liesenfeld, 2004).

2.4.2.1 Proliferacija limfocitov kot perspektivna metoda za diagnostiko

V iskanju nove, učinkovitejše metode za odkrivanje kongenitalne toksoplazmoze pri novorojenčkih, se zdi proliferativni odziv limfocitov dobra alternativa, a se ob tem poraja vprašanje primerljivosti limfocitnega odziva novorojenčkov in odraslih oseb ob

okužbi z raziskovanim parazitom. To so že leta 1983 raziskali japonski raziskovalci iz univerze Shinshu, kjer so preverili proliferativni odziv limfocitov novorojenčka s sumom na kongenitalno okužbo, ga primerjali s proliferativnim odzivom matere ter odzivom novonastalih protiteles specifičnih za *T. gondii*, pri čemer so uporabili hemaglutinacijski test. Iz rezultatov so zaključili, da so limfociti obeh visoko odzivni na antigen toksoplazmoze že 21 dni po rojstvu otroka ter še pomembneje, da se je proliferativni odziv limfocitov novorojenčka izkazal za hitrejšega in močnejšega od specifičnega protitelesnega odziva, ki ga v ustreznih koncentracijah niso zaznali niti 21 dni po rojstvu (Yano in sod., 1983). Funkcionalna aktivnost limfocitov se namreč vzpostavi že v roku nekaj dni po okužbi (Denkers in Gazzinelli 1998), za razliko od protitelesnega odziva IgG, IgM in IgA protiteles, ki ga lahko zaznamo šele znotraj dveh tednov ali celo kasneje po okužbi s parazitom (Montoya 2004).

Poleg hitrosti, so italijanski raziskovalci nedavno odkrili še eno pozitivno plat specifičnega T-limfocitnega odziva, namreč le-ta se, za razliko od protitelesnega odziva, ohranja tudi tekom zdravljenja kongenitalno okuženih novorojenčkov, kar omogoča nemoteno in predvsem natančno zaznavo limfocitnega odgovora na prisotnost parazita (Ciardelli in sod., 2008).

2.5 TEST PROLIFERACIJE LIMFOCITOV

2.5.1 Princip metode

Celična proliferacija je bistvena komponenta adaptivnega imunskega sistema (Burnet, 1959). Detekcija delečih se celic je tako pomemben indikator limfocitne aktivacije, tako *in vivo* kot *in vitro*, kar je v imunologiji omogočilo nastanek uporabne diagnostične metode (Hodgkin in sod., 2005).

Test proliferacije limfocitov (ang. Lymphocyte Proliferation Test – LPT) je funkcionalni *in vitro* test sposobnosti limfocitov, da se odzovejo na specifične antigene ter različne mitogene (Miller in sod., 2003). Temelji na dejstvu, da se spominski limfociti ob stiku z določenim antigenom oz. mitogenom preoblikujejo v blastne celice in proliferirajo na podlagi imunskega spomina celic, ki so bile predhodno že izpostavljene uporabljenim antigenom (Hodgkin in sod., 2005).

Transformacijo v blastne celice je mogoče meriti z različnimi kemijskimi in fizikalnimi metodami, kot so določevanje metabolnih procesov, spremljanje biosinteze različnih

proteinov, sinteze RNK ali sinteze DNK v novo nastalih limfocitih. Najbolj uporabljena metoda je prav zadnja, kjer je proliferacija limfocitov ovrednotena z meritvijo sinteze DNK. Takšen test proliferacije se uporablja predvsem za oceno funkcije limfocitov, pri čemer se za stimulacijo uporabi mitogene, ki nespecifično inducirajo transformacijo celic *in vitro*. Pomemben je tudi za dokazovanje preobčutljivosti pacientov na lastne antigene, torej za dokazovanje različnih avtoimunskih bolezni, ter za dokazovanje preobčutljivosti pacientov na zunanje antigene, kot so različni infekcijski agensi ter alergeni (Klein in sod., 2009).

Blastna transformacija limfocitov je dobro merilo za funkcionalno zmožnost limfocitov T in B, saj se kaže zmožnost razmnoževanja celic po antigenskem dražljaju in je tako boljši pristop za ugotavljanje imunske zmožnosti kot le določanje števila različnih limfocitov (Vozelj, 1996).

2.5.2 Detekcija sinteze DNK

Označevanje, detekcija in kvantifikacija celic, ki aktivno sintetizirajo DNK tekom S faze celičnega cikla, so ne le pomembne za karakterizacijo osnov celične biologije, temveč tudi za ugotavljanje celičnih odzivov na stimulacije z različnimi substancami ter določanje genotoksičnosti le-teh (Buck in sod., 2008).

Detekcija sinteze DNK v novonastalih proliferirajočih celicah temelji na vgradnji označenih DNK prekurzorjev v celično DNK znotraj S faze celičnega cikla (Salic in Mitchison, 2007). Tekom omenjene faze poteče replikacija celične DNK, ob čemer pride do razklenitve dvovijačne strukture ter vezave prostih citoplazemskih nukleotidov na komplementarna mesta enojne verige, s pomočjo encima DNK polimeraze (Bell in Dutta, 2002). Tekom takšnega podvojevanja, kultiviranim celicam dodajamo označene DNK prekurzorje, navadno pirimidinske deoksinukleotide, njihovo vgradnjo v genomsko DNK, pa nato kvantitativno določamo po koncu inkubacije in barvanja vzorcev.

Za zaznavo novo sintetizirane DNK obstaja kar nekaj klasičnih metod vgradnje različnih deoksinukleotidov, med drugim sta v preteklosti najbolj učinkovita in uporabljena [³H]timidin ter 5-bromo-2'-deoksiuridin (BrdU) (Sun Ya in sod., 2012). A kljub temu, da sta se obe označevalni metodi izkazali za izredno uporabni v študijah kinetike celičnega cikla, DNK replikacije in izmenjave sestrskih kromatid, ob vrednotenju celične proliferacije tako normalnih, kot patološko spremenjenih celic pod

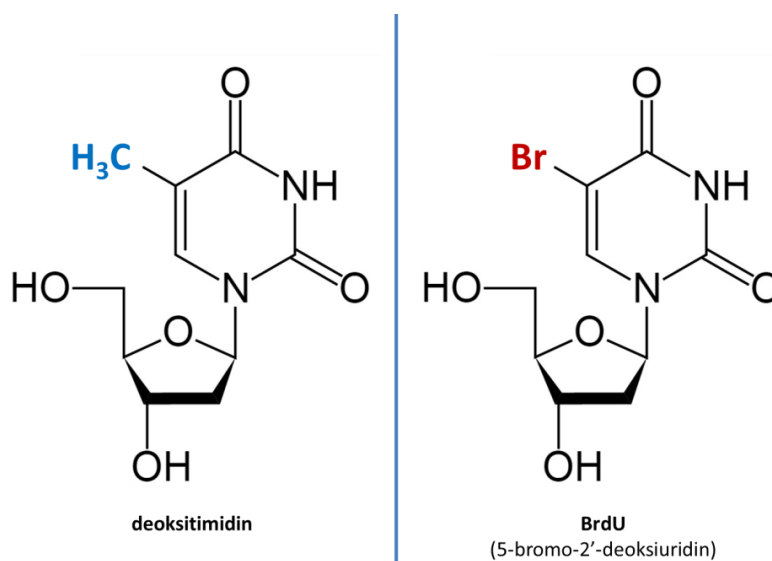
različnimi pogoji, se je izkazalo, da imata obe kar nekaj omejitev (Salic in Mitchison, 2007).

2.5.2.1 [³H]timidin

Timidin (5-metil-2'-deoksiuridin) oz. deoksitimidin je nukleozid, na katerega je vezana pirimidinska baza timin (Boyer, 2005). Kadar pa govorimo o [³H]timidinu, pa gre za radioaktivno označen timidin, ki se ga, že vse od leta 1960, uporablja za detekcijo S faze celičnega cikla (Buck in sod., 2008). Vgradnja [³H]timidina je običajno merljiva z avtoradiografijo, ki pa je, že zaradi uporabe radioaktivnih delcev, nepraktična saj je škodljiva tako zdravju kot okolju (Salic in Mitchison, 2007; Sun Ya. in sod., 2012). Metoda je pomankljiva tudi v diagnostiki oz. merjenju proliferativne funkcije limfocitov, saj lahko rezultati pokažejo lažno znižane vrednosti, na račun znižane koncentracije določene podvrste limfocitov (Kopitar, osebna komunikacija). Poleg tega, imajo mikroskopski posnetki s [³H]timidinom označene DNK slabšo resolucijo (Salic in Mitchison, 2007). Zaradi tega se je širše uveljavila metoda označevanja z BrdU, ki temelji na vezavi protiteles (Buck in sod., 2008).

2.5.2.2 BrdU (5-bromo-2'-deoksiuridin)

Alternativa uporabi radioaktivnega [³H]timidina, je torej vgradnja sintetičnega nukleozida BrdU, ki se v novo sintetizirano DNK vgradi kot analog timidina. Vgradnjo lahko merimo imunokemično, po delni denaturaciji DNK, z vezavo specifičnih anti-BrdU protiteles, na katera so vezani različni fluorokromi (Salic in Mitchison, 2007).



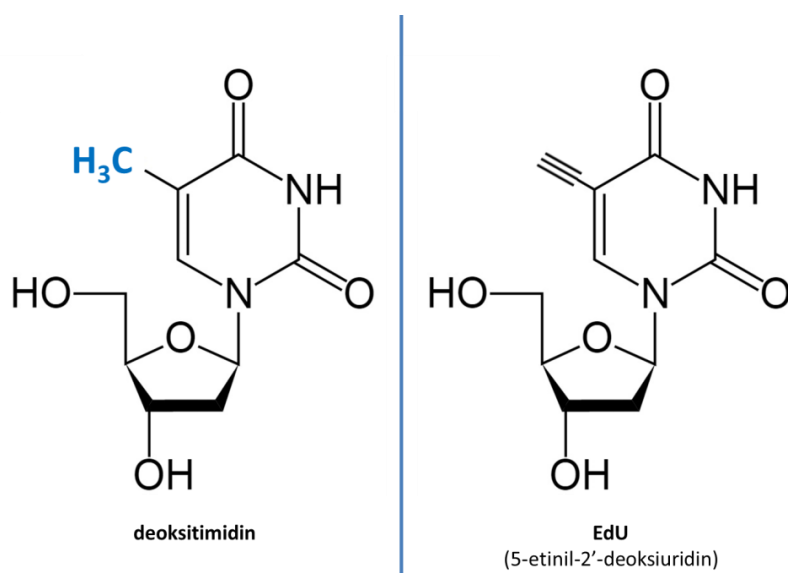
Slika 6: Kemijski strukturi deoksitimidina in BrdU.

V primerjavi s prejšnjo metodo je ta, s svojim hitrejšim in poenostavljenim postopkom bolj učinkovita (Salic in Mitchison, 2007; Sun Ya in sod., 2012), poleg tega pa nam omogoča tudi merjenje proliferacije posameznih limfocitnih podvrst. Vendar pa ima metoda označevanja z BrdU eno večjo pomankljivost, in sicer komplementarne baze, ki sestavljajo novo dvovijačno DNK, blokirajo dostop oz. vezavo anti-BrdU protiteles na podenote BrdU. Za izpostavitvev BrdU epitopov, morajo biti vzorci celic ali tkiv podvrženi močnim denaturacijskim pogojem, kot so depolimerizacija DNK z encimi DNaze, tretiranje s koncentrirano klorovodikovo kislino ali mešanico metanola ter očetne kisline (Salic in Mitchison, 2007). Takšni pogoji nepopravljivo degradirajo strukturo preiskovanega vzorca ter uničijo mnogo epitopov, ki so potrebni za vezavo protiteles (Buck in sod., 2008). Poleg tega je intenziteta označevanja z BrdU, močno odvisna od pogojev, ki jih za detekcijo uporabljajo posamezni raziskovalci (Rakić, 2002). Imunohistokemična detekcija in kvantifikacija rezultatov označevanja z BrdU je tako odvisna od večih dejavnikov, kot so afiniteta in specifičnost uporabljenih protiteles, metode fiksacije celic, kot predpriprava na označevanje le-teh ter različne metode denaturacije DNK (Rakić, 2002).

Zaradi potrebe študij kinetike celičnega cikla, DNK sinteze in celične proliferacije *in vitro*, po enostavnejši, hitri in natančni metodi označevanja nukleinskih kislin, brez invazivnega posega v ultrastrukturo vzorca so raziskovalci razvili metodo na podlagi vgradnje molekule EdU (Salic in Mitchison, 2007).

2.5.2.3 EdU (5-etinil-2'-deoksiuridin)

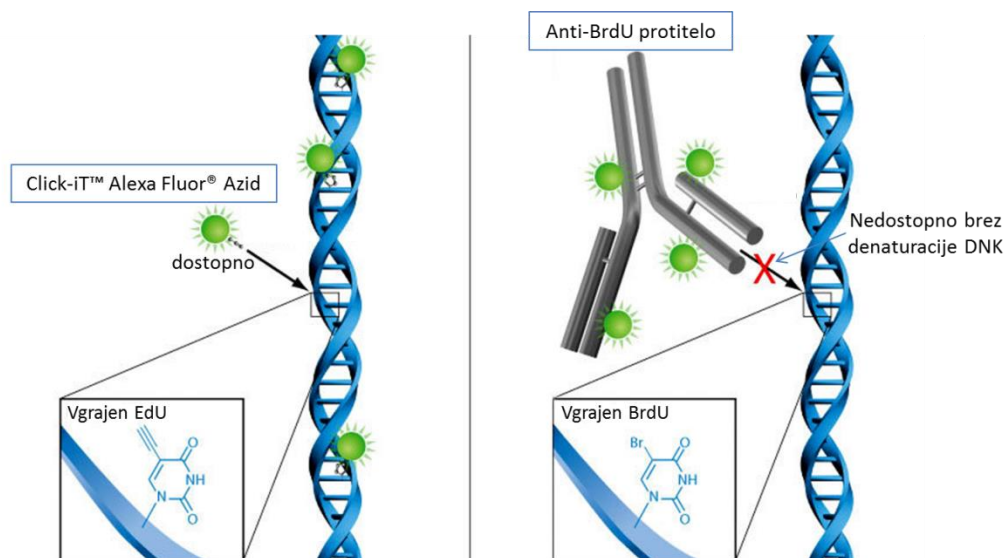
Prav tako kot BrdU, je tudi EdU analog timidina, ki se zlahka vgradi v novo sintetizirano verigo DNK tekom S faze celičnega cikla. Po kemijski zgradbi se ločita v tem, da v molekuli EdU terminalno metilno skupino na peti poziciji pirimidinskega obroča, nadomešča alkilna skupina (Slika 7) (Salic in Mitchison, 2007).



Slika 7: Kemijski strukturi deoksitimidina in EdU.

Detekcija EdU temelji na kovalentni vezavi alkilne skupine s fluorescentnimi azidi, ob prisotnosti bakra (Cu (I)) kot katalizatorja. Gre za tako imenovano »Click Chemistry« kemijsko metodo, ki jo je leta 2001 predstavil ameriški kemik K. B. Sharpless, sloni pa na dejstvu, da ob Cu(I)-katalizirani konjugaciji alkina ter azida pride do formacije [3+2] cikličnega obroča (angl. Cu(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition) (Wang in sod., 2003).

Takšna metoda je visoko občutljiva ter precej hitrejša od detekcije BrdU (Salic in Mitchison, 2007). Poleg tega pa se največja prednost skriva v majhni strukturi reakcijskih komponent (azidi, velikosti 0,6 kDa), saj imajo manjše molekule lažji dostop do nukleotidov vgrajenih v dvojnovijačno DNK v primerjavi z večjimi makromolekulami, kot so antigeni (15 kDa). S tem dejstvom se izognemo potrebi po ostrem denaturacijskem tretiranju DNK, kar ohranja njeno helikalno strukturo ter ne poškoduje epitopov potrebnih za kasnejšo vezavo ostalih površinskih markerjev (Buck in sod., 2008).



Slika 8: Detekcija vgrajenega EdU z Alexa Fluor azidom v primerjavi z detekcijo vgrajenega BrdU z anti-BrdU protitelesi (Prirejeno po: Click-iT® EdU Cell Proliferation Assays ..., 2009).

Meritve standardnega EdU proliferativnega testa lahko izvedemo že v 1,5 – 2 urah po vgradnji EdU (10 μ M) v novo sintetizirano DNK, medtem ko tradicionalna metoda merjenja anti-BrdU, zahteva najmanj 4 ure. Po koncu inkubacije oz. vgraditvi EdU lahko suspenziji celic dodamo še željena fluorescenčno označena protitelesa za označevanje površinskih celičnih markerjev. Nato sledi postopek fiksacije in permeabilizacije celic ter 30 minutna inkubacija v prisotnosti fluorescentnega azida, vezanega z željenim barvilom (v našem primeru Alexa Fluor[®] 488), bakrovega (II) sulfata (CuSO₄) ter reducirajočega agensa, ki vodi v nastanek bakra (I), ki reakcijo katalizira (Buck in sod., 2008).

Gre torej za izboljšano metodo detekcije novo sintetizirane DNK tekom celične proliferacije limfocitov, predvsem v smislu dobro ohranjene ultrastrukture celic ter kromatina, ohranjenih površinskih celičnih epitopov ter krajšem času izvedbe celotnega proliferativnega testa (Salic in Mitchison, 2007; Buck in sod., 2008).

2.6 CELIČNI STIMULATORJI TER POVRŠINSKI CELIČNI MARKERJI

2.6.1 Celični stimulatorji

In vitro stimulacija limfocitov, ter njihova posledična proliferacija, je široko uporabljena tako v znanstvenih krogih (eksperimentalna imunologija), kot tudi diagnostičnih laboratorijih za oceno funkcije limfocitov, v študijah celične aktivacije ter dokazovanju odziva oz. senzibilizacije bolnikovih limfocitov na zunanje ter lastne antigene (Chen in sod., 1975; Trickett in Kwan, 2003; Klein in sod., 2009). Temelji na dejstvu, da prisotnost specifičnih antigenov ali mitogenov, v limfocitih T in B privede do morfoloških in metabolnih sprememb. Celice se močno povečajo, preoblikujejo v blastne celice (z velikim jedrom, neurejenim kromatinom, obilno in slabo diferencirano citoplazmo, bogato z RNK, ribosomi ter aktivno sintetizirajočo DNK) ter pričnejo z aktivnim razmnoževanjem oz. proliferacijo (Vozelj, 1996)..

Ob stimulaciji celic z aktivatorji, kot so mitogeni lektini (fitohemaglutinin (PHA), konkanavalin A (ConA)) ali monoklonska protitelesa (CD3) v kombinaciji s snovmi, ki izzovejo kostimulatorni signal (CD28), spodbujamo poliklonsko proliferacijo celic, ki je neodvisna od antigena. V nasprotnem primeru, ko za stimulacijo uporabimo specifične antigene (v našem primeru antigen parazita *T. gondii*), pa izzovemo monoklonsko, antigen specifično proliferacijo limfocitov (Trickett in Kwan, 2003; Chen in sod., 1975).

Mitogeni so torej sposobni nespecifične stimulacije proliferacije limfocitov ter izzovejo močan poliklonski proliferativni odziv večjega števila celic, kar omogoča njihovo široko uporabnost v ocenjevanju zmožnosti pacientovega imunskega odgovora, v raziskovalnih vodah, pa so uporabni predvsem kot nespecifični stimulatorji v pozitivnih kontrolah (Vozelj, 1996; Klein in sod., 2009). Proliferativni limfocitni odziv na specifične antigene, ki se vrši le v manjšem številu celic, ki so bile predhodno že senzibilizirane za uporabljen antigen, pa nam posreduje informacije o funkcionalnosti spominskih celic ter splošni celično posredovani imunosti pacienta (Klein in sod., 2009).

Za potrebe dotične magistrske raziskave, smo za stimulacijo celic uporabili rastlinski mitogen fitohemaglutin (PHA), tako za stimulacijo proliferacije limfocitov, kot tudi stimulacijo izdelave ter izločanja citokinov IFN- γ . V iskanju najbolj primernega mitogena, katerega delovanje bi najbolj optimalno ustrezalo našim izbranim raziskovalnim pogojem (24-urna inkubacija za citokine IFN- γ in 6-dnevna inkubacija za

proliferacijo limfocitov), smo pred izvedbo same raziskave, stestirali različne vrste mitogenov, kot so PHA, interlevkin 12 (IL-12) ter monoklonska protitelesa CD3 v kombinaciji z monoklonskimi protitelesi CD28.

2.6.1.1 Fitohemaglutinin (PHA)

Mitogeni so snovi, ki v določenih pogojih sprožajo nespecifično aktivacijo celic, spodbujajo njihovo mitozo ter vodijo v blastno transformacijo (Vozelj, 1996). Eden takih je močan rastlinski mitogen fitohemaglutinin, ki ga pridobivajo z ekstrakcijo iz navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*) (Hirschhorn in sod., 1963). Ta v topni obliki posnema antigensko stimulacijo ter z vezavo na celične glikoproteine, med drugim na kompleks TCR-CD3, povzroča nespecifično proliferacijo limfocitov T, pritrjen na netopni nosilec pa je mitogen tudi za limfocite B (Vozelj, 1996; Trickett in Kwan, 2003). Natančneje gre za glikoproteinsko molekulo, ki sodi v skupino lektinov. Ti se reverzibilno vežejo na sladkorje oz. ogljikove hidrate, ki so del membranskih proteinov ter v roku nekaj minut sprožijo porast koncentracije cikličnega AMP, cikličnega GMP ter sinteze fosfolipidov, kar privede do kasnejše sinteze celičnih proteinov, DNK ter posledične proliferacije celic. Poleg tega, imajo lektini velikokrat tudi hemaglutinacijske lastnosti (Chen in sod., 1975; Hamelryck in sod., 1996).

2.6.1.2 Interlevkin 2 (IL-2)

IL-2 je poglavitni citokin ter T celični rastni faktor, ki ga izdelujejo T celice same. Izdelujejo ga tako celice CD4 kot CD8, a s to razliko, da je produkcija citokina pri celicah CD4 precej večja. Produkcija citokina IL-2 je posledica antigenske stimulacije limfocitov T v stanju mirovanja, njegovo izločanje pa privede do ekspresije IL-2 celičnih receptorjev na površini aktiviranih celic (Kuby in sod., 2003). Vezava citokina na omenjene receptorje spodbuja limfocite T, da preidejo iz faze G1 (rast celice) celičnega cikla v fazo S (sinteza DNK) ter torej spodbuja njihovo razmnoževanje. Poleg tega vpliva na izločanje številnih drugih citokinov (IFN- γ), poveča izražanje molekul MHC II na celičnih površinah ter izražanje receptorjev za nekatere druge rastne faktorje (transferinski, inzulinski receptor). IL-2 lahko deluje kot avtokrini rastni faktor (deluje na iste celice, kot ga izločajo) ali pa vpliva na sosednje limfocite T (deluje parakrino). Pomembna je tudi količina sintetiziranega ali v raziskavi dodanega citokina, saj ta vpliva na jakost in obseg od limfocitov T odvisnega imunskega odziva (Vozelj, 1996).

2.6.1.3 Monoklonska protitelesa na CD3 in CD28

Monoklonska protitelesa CD3 se vežejo na istoimenske transmembranske proteine na površini limfocitov T, ki so nekovalentno vezani s T celičnim receptorjem (TCR) (Vozelj, 1996). Za popolno aktivacijo ter proliferacijo limfocitov sta običajno potrebna dva signala, in sicer antigen-specifični ter nespecifični kostimulatorni signal. Prvi je odvisen od prepoznave ter vezave antigena na TCR preko molekule MHC II na antigen predstavitevni celici (Vozelj, 1996; Song in sod., 2008). Enak učinek ima *in vitro* vezava monoklonskih protiteles CD3, ki povzročijo aktivacijo kompleksa CD3-TCR na površini limfocita ter tako prispevajo prvi oz. začetni signal za aktivacijo celic (Trickett in Kwan, 2003). Drugi, antigen-nespecifični signal pa zagotavlja interakcija med kostimulatornimi molekulami na limfocitih T – CD28 ter njenim ligandom, molekulo B7, ki jo izražajo antigen predstavitvene celice (dendritične celice, limfociti B, monociti ter makrofagi). V pogojih *in vitro* lahko omenjen kostimulatorni signal izzovemo z dodatkom monoklonskih protiteles CD28 (Vozelj, 1996). Ko celica prejme oba stimulaturna signala to izzove proliferacijo, diferenciacijo ter pridobitev efektorske funkcije celice (Song in sod., 2008).

2.6.2 Površinski celični markerji

Za ugotavljanje deležev določenega tipa celic, celice označujemo s specifičnimi monoklonskimi protitelesi, ki so vezani s fluorescentnim barvilom (Ihan in Kopitar, 2010). Označena monoklonska protitelesa se vežejo na določene proteinske molekule na celičnih površinah, imenovane CD oz. »Cluster of differentiation«. Glede na tip molekule CD na celični površini, lahko torej ločimo različne vrste imunskih celic, zaradi česar je njihovo označevanje s fluorescentnimi protitelesi izredno uporaben pristop v raziskovalnih in diagnostičnih laboratorijih za fenotipizacijo in razvrščanje celic (Coico in sod., 2003).

2.6.2.1 CD3

Monoklonska protitelesa CD3 so specifična za T celični receptor, ki se nahaja na površini limfocitov T (Vozelj, 1996). Naša uporabljena protitelesa (CD3 APC) se natančneje vežejo na epsilon verigo kompleksa CD3-TCR ter s tem omogočajo prepoznavo limfocitov T.

2.6.2.2 CD4

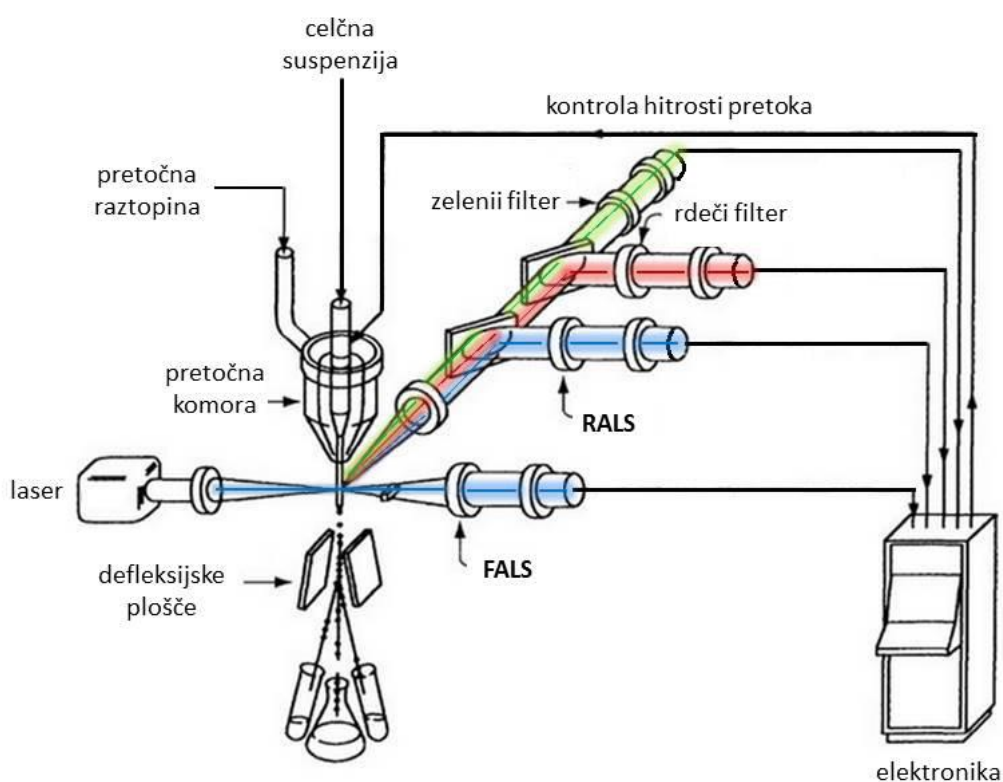
Monoklonska protitelesa CD4 se specifično vežejo na transmembranski protein CD4, ki ga na svojih površinah izražajo celice T pomagalke. Ti proteini, skupaj s TCR, omogočajo prepoznavo antigenov, ki jih posredujejo antigen predstavitvene celice na kompleksih MHC II. Molekule CD4 izražajo tudi nekateri drugi tipi celic kot so monociti, zato celice T pomagalke dokazujemo v kombinaciji s protitelesi CD3 (Ihan in Kopitar, 2010).

2.7 PRETOČNA CITOMETRIJA

Kot kaže že samo ime, je metoda pretočne citometrije v osnovi meritev celic v pretočnem sistemu, ki zagotavlja posamezno potovanje delcev (celic, mikroveziklov, itd.) enega za drugim v tankem snopu mimo svetlobnega vira (Ormerod, 2008). Temelji na zmožnosti sortiranja različnih celic glede na njihove strukturne značilnosti, kot so velikost in granuliranost ter njihove zunaj- in znotrajcelične molekule, ob predhodni označitvi z različnimi fluorokromi. Merjenje fluorescence oddane pri različnih valovnih dožinah nam tako zagotavlja kvantitativne in kvalitativne informacije o površinskih celičnih receptorjih ali znotrajceličnih molekulah, kot so DNK in citokini (Rachman, 2014). Poleg naštetega nam pretočna citometrija omogoča tudi merjenje fagocitne ter oksidativne zmožnosti monocitov in granulocitov (Ihan in Kopitar, 2010).

Svetlobni vir je povečini laserski žarek, ki ima to prednost, da sveti z visoko intenzitetno monokromatsko svetlobo. Poleg tega je izredno tanek, kar ustreza pogojem za meritev tako majhnih struktur, kot so celice (Ormerod, 2008). Mimo svetlobnega vira posamično potujejo celice, ki so resuspendirane v izotonični tekočini ter zbrane znotraj pretočne komore. Ob prehodu skozi laserski žarek, celice zaznata dva glavna fotodetektorja, ki merita odboj in sipanje svetlobe, izsevano svetlobo pa meri sistem večih detektorjev opremljenih z barvnimi filtri (Ihan in Kopitar, 2010). Fotodetektor FSC (angl. *Forward Scatter*) je nameščen v smeri svetlobnega vira in zaznava jakost

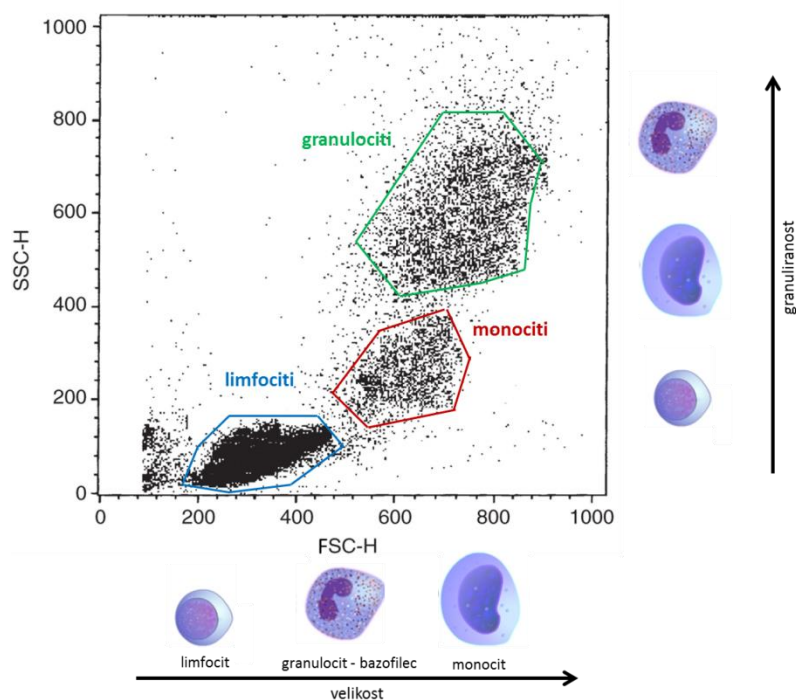
prepuščene svetlobe, ki je premosorazmerna z velikostjo celice. Drugi fotodetektor, RSC (angl. *Right Scatter*), pa je nameščen pravokotno na smer vpadne svetlobe in meri lom oz. sipanje svetlobe v skladu z granuliranostjo in površinsko strukturo celic (Ihan in Kopitar, 2010; Černilec in sod., 2012) (Slika 9). Granuliranost je sicer odraz količine in lastnosti membranskih struktur znotraj celic in bolj, ko je celica granulirana, več svetlobe sipa, signal pa je močnejši (Černilec in sod., 2012) (Slika 10).



Slika 9: Zgradba pretočnega citometra (Prirejeno po Givan, 2001)

Pretočna citometrija, poleg velikosti in zrnatosti celic, omogoča tudi merjenje fluorescence z več različnimi fotodetektorji, opremljenimi z barvnimi optičnimi filtri, ki blokirajo dostop svetlobe določenih valovnih dolžin, medtem ko prepuščajo ostale (Rachman, 2014). Na merjene delce vezani fluorokromi absorbirajo lasersko svetlobo ter nato izsevajo svetlobo daljših valovnih dolžin, kar zaznamo kot fluorescenco (Ormerod, 2008). Če želimo opazovati oz. meriti več različnih parametrov, imamo

možnost uporabe različnih fluorokromov, ki absorbirajo svetlobo v enakem valovnem območju, izsevajo pa jo pri različnih valovnih dolžinah. To pomeni, da lahko isti delec označimo z več različnimi označenimi monoklonskimi protitelesi ter barvili za označevanje notranjih struktur (DNA), meritve pa bodo, zahvaljujoč večjemu številu fluorescenčnih fotodetektorjev, potekle istočasno, ob enkratnem prehodu delca skozi laserski žarek (Jahan-Tigh in sod., 2012).



Slika 10: Rezultat pretočne citometrije v obliki točkovnega diagrama. Vsaka točka na diagramu predstavlja posamezno celico, njen položaj pa je odvisen od dveh parametrov: celična velikost (abscisna os – detektor FALS oz. FSC) in celična granuliranost (ordinatna os – detektor RALS oz. SSC). Večje celice povzročijo premik pike bolj v desno, bolj granulirane pa bolj navzgor.

2.8 ENCIMSKO IMUNSKI TEST – ELISA

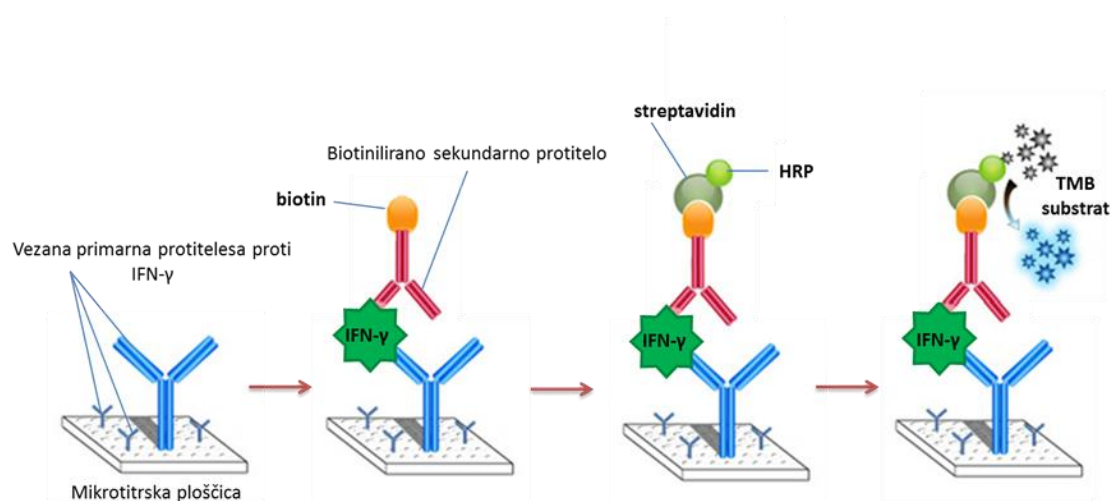
2.8.1 Princip metode

Encimsko imunski test ELISA (angl. Enzyme Linked Immuno Assay) temelji na nastanku imunskih kompleksov antigen-protitelo. Ti so označeni z ustreznimi encimi, ki jih zaznamo po razvoju barvne reakcije, ob dodatku ustreznega encimskega substrata (Coico in sod., 2003). Gre za eno izmed najbolj uporabljenih metod za kvantitativno določanje različnih substanc, kot so peptidi, proteini, protitelesa in hormoni (Overview of ELISA, 2015), saj gre za izredno enostavno, zmogljivo in cenovno dostopno metodo (Černilec in sod., 2012). Poleg tega so njene prednosti tudi velika specifičnost, občutljivost ter zmožnost obdelave velikega števila vzorcev naenkrat (Simčič, 2010; Černilec in sod., 2012).

Test je pogojen z vezavo antigena oz. specifičnih protiteles (odvisno od vzorca, ki ga testiramo) na trden nosilec. Običajno gre za mikrotitersko ploščico z 96 vdolbinicami na katero je mogoče, kovalentno ali s hidrofobnimi vezmi vezati in imobilizirati željena protitelesa oz. antigen (Simčič, 2010; Overview of ELISA, 2015). Glede na lastnosti snovi, ki jo določamo, poznamo več vrst tehnik, in sicer lahko preiskovano snov določamo neposredno z vezavo označenih primarnih ali sekundarnih protiteles, ali posredno s tako imenovano kompetitivno tehniko, kjer preiskovani antigeni tekmujejo z označenimi ali na ploščo vezanimi antigeni za vezavo na specifična protitelesa (Vozelj, 1996; Simčič, 2010).

Ena najbolj učinkovitih tehnik je neposredna oz. t.i. sendvič ELISA (angl. »Sandwich ELISA«), ki smo jo uporabili tudi mi. Pri takšni neposredni tehniki, na stene mikrotiterske ploščice vežemo specifična primarna protitelesa ali uporabimo ploščice proizvajalca, kjer so specifična protitelesa že predhodno naplastena na stene vdolbinic (Simčič, 2010; Overview of ELISA, 2015). Sami smo uporabili ploščice s predhodno naplastenimi protitelesi za citokine IFN- γ . Na ploščico se nato nanese vzorec, ki vsebuje omenjene citokine, zatem pa še sekundarna protitelesa, na katera so se, v postopku biotinizacije, kovalentno vezale molekule biotina (Biotinylation, 2015). Temu sledi nanašanje standardnih raztopin s pomočjo katerih se kasneje izdelava umeritveno krivuljo, ter vzorcev s preiskovanim antigenom. V času inkubacije poteče imunska reakcija med protitelesi in vzorčnim antigenom, ki pa mora biti, za uporabo v takšnem testu, večvalenten, saj se mora dobro vezati tako s primarnimi kot sekundarnimi protitelesi (Vozelj, 1996). Sledi spiranje ploščice, pri čemer se odstranijo vse nevezane substance. Naslednja stopnja je dodatek, z encimim označenih proteinskih molekul streptavidina,

za katerega je znano, da ima izredno visoko afiniteto do biotina (Biotinylation, 2015). Najpogosteje uporabljen encim, ki je kovalentno konjugiran s streptavidinom je hrenova peroksidaza (HRP). Nevezane substance se, v postopku spiranja, ponovno sperejo s ploščice, čemur sledi dodatek encimskega substrata. V našem primeru je to 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, okrajšano TMB. Encim HRP katalizira pretvorbo kromogenega substrata TMB v obarvan produkt, ki ga s prostim očesom zaznamo kot modro barvo (ELISA Enzyme ..., 2015) (Slika 11).

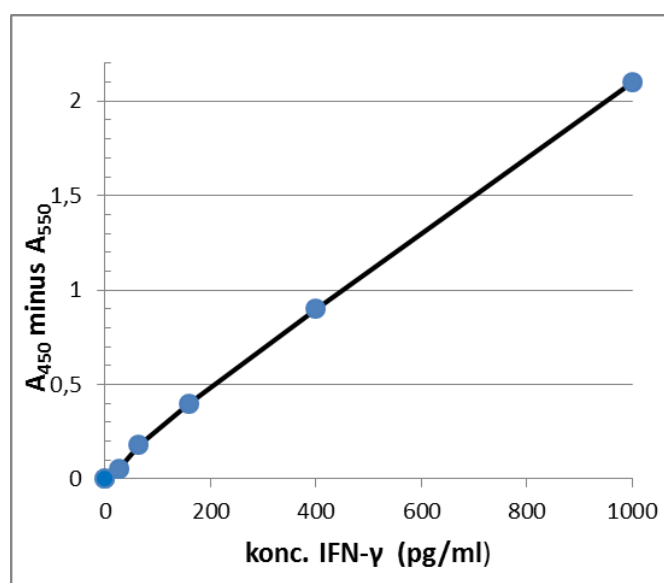


Slika 11: Grafični prikaz sendvič ELISE. Na dno in stene mikrotitrne ploščice so naplastena primarna protitelesa za IFN- γ . Na ploščico nanese vzorec s citokini, ki se vežejo na primarna protitelesa. Dodamo tudi, z biotinom označena sekundarna protitelesa, ki se vežejo na druge epitope citokinov IFN- γ kot primarna protitelesa. Po inkubaciji in spiranju dodamo proteinske molekule streptavidin, na katerega je kovalentno vezan encim hrenova peroksidaza (HRP). Ob dodatku encimskega substrata TMB se razvije barvna reakcija, katere intenziteto določamo fotometrično (Prirejeno po: ZAP-70 Total ELISA Kit ..., 2015).

Razvoj barvne reakcije nato prekine dodatek zaustavitvenega reagenta »Stop solution«, ki ga sestavlja 0,16 M žveplena kislina (H_2SO_4), ki stabilizira razvoj barvne reakcije (Stop Solution ..., 2015). S spektrofotometrom nato pomerimo absorbanco vzorcev pri valovnih dolžinah 450 nm ter 550 nm. Vrednosti izmerjene pri 550 nm odštejemo od vrednosti absorbance pri 450 nm, da izpravimo optične napake, nastale zaradi mikrotitrne ploščice (Human IFN- γ ..., 2015).

2.8.2 Interpretacija rezultatov

Glede na povprečne absorpcijske vrednosti standardnih raztopin, se izriše umeritvena krivulja, s katero določamo količino citokinov IFN- γ v posameznem vzorcu. Količinske vrednosti citokinov v enoti pg/ml, so navedene na abscisni osi grafa umeritvene krivulje, medtem ko so pripadajoče povprečne vrednosti absorbance navedene na ordinatni osi. Če smo vzorec predhodno redčili, pomnožimo količinske vrednosti z razredčitvenim faktorjem, še preden jih vnašamo na graf (Human IFN- γ ..., 2015). S pomočjo takšne krivulje je mogoče iz razlike absorbanc pri 450 in 550 nm ugotoviti koncentracijo IFN- γ v vzorcu.



Slika 12: Primer umeritvene krivulje, izrisane glede na absorbančne vrednosti standardnih raztopin. Na abscisni osi je navedena koncentracija (pg/ml), na ordinatni osi pa povprečna vrednost absorbance pri 450 nm, od katere odštejemo povprečno vrednost absorbance izmerjene pri 550 nm.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Reagenti

- Medij RPMI - 1640 medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Ficoll – Paque™ plus, GE Healthcare, Sweden
- Medij MII:
 - Medij RPMI: 1640 medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 - Fetal bovine serum: Gibco, Auckland, New Zeland
 - Penicilin – Streptomycin: Gibco, Auckland, New Zeland
 - L-glutamin: GlutaMAX™ I, Gibco, Auckland, New Zeland
- Fitohemaglutinin (PHA) - 200 µg/ml
- Antigen toksoplazme, založna raztopina - 1000 µg/ml
- Antigen toksoplazme, delovna raztopina - 200 µg/ml
- Protitelesa CD3 APC™ (SK7), Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, California, USA
- Protitelesa CD4 PerCP-Cy™ 5,5, Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, California, USA
- KIT Invitrogen™ Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry assay Kit, Invitrogen, California, USA:
 - EdU (5-etinil-2'-deoksiuridin)
 - Alexa Fluor® 488 azid
 - DMSO (brezvodni dimetil sulfoksid)
 - Click-iT® fiksativ
 - Click-iT® saponin-based permeabilization and wash buffer (permeabilizacijska raztopina)
 - Bakrov (II) sulfat (CuSO₄)
 - Click-iT® EdU buffer additive (pufer)
- Human IFN-γ ELISA Kit, Thermo Scientific™ Inc., Waltham, Massachusetts, USA:
 - Lyophilized Recombinant Human IFN-γ Standard

- Standard Diluent (vsebuje 0,1 % natrijevega azida)
 - 30x Wash Buffer
 - Biotinylated Antibody Reagent (vsebuje 0,1 % natrijevega azida)
 - Streptavidin-HRP Concentrate
 - Streptavidin-HRP Dilution Buffer
 - TMB Substrate
 - Stop Solution (vsebuje 0.1M žvepleno kislino)
- Destilirana voda, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
 - 0,1 % raztopina tripanskega modrila
 - 10 mM založna raztopina EdU
 - 1 % BSA v PBS raztopina
 - D-PBS raztopina

3.1.2 Laboratorijski material

- Polistirenske epruvete z zaobljenim dnom (5ml, 12 x 75 mm, REF 352052), BD Falcon, BD Biosciences, San Jose, California, USA
- Vakumske epruvete z litijevim heparinom BD Vacutainer[®] (2ml, REF 367869), Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, Plymouth, UK
- Centrifugirke volumna 13 ml in 15ml; TPP Techno Plastic Products AG, Switzerland
- Mikrocentrifugirke volumna 1ml in 1,5 ml; Eppendorf AG, Germany
- Mikrocentrifugirke volumna 2ml, Corning Incorporated, New York, USA
- Stojalo za centrifugirke, TPP Techno Plastic Products AG, Switzerland
- Pipete v območju od 2 μ l – 5 ml; Eppendorf AG, Germany
- Pipetni nastavki 1-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l ter 1000-5000 μ l; Eppendorf AG, Germany
- Pipetni nastavki 5ml, 10ml in 25ml; TPP Techno Plastic Products AG, Switzerland
- Pipeta MACROMAN[™], Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, USA
- Multikanalna pipeta, 100 μ l; Eppendorf AG, Germany
- Neubauerjeva komora, Bright-Line Hemacytometer, Hausser Scientific, Horsham, Pennsylvania, USA

- Mikrotiterske plošče s 24 luknjami, TPP Techno Plastic Products AG, Switzerland
- Mikrotitrska plošča s 96 luknjicami za izvedbo ELISE (Human IFN- γ ELISA Kit), Thermo Scientific™ Inc., Waltham, Massachusetts, USA
- Plastična banjica za reagente(Human IFN- γ ELISA Kit), Thermo Scientific™ Inc., Waltham, Massachusetts, USA
- Steklena bučka, 2L
- Merilni valj
- Škatle za shranjevanje mikrovial, TPP Techno Plastic Products AG, Switzerland

3.1.3 Laboratorijska oprema

- Centrifuga Heraeus Megafuge 1.0R, Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
- Citometer BD FACSCanto™ Flow Cytometer (REF 337175), Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, California, USA
- Vorteks Fisherbrand ZX Wizard 15013 TopMix, Fisher Scientific UK Ltd., Loughborough, UK
- Svetlobni mikroskop Olympus BX40, Olympus Corporation, Tokyo, Japan
- CO₂ inkubator Panasonic MCO-19AICUV-PE, Panasonic Healthcare Co., Ltd., Tokyo, Japan
- Računalnik s programsko opremo BD FACSDiva™ Software, Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, California, USA
- Stresalnik KS 501 digital, IKA® - Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany
- Naprava za spiranje mikrotiterskih plošč ELX50™, Biotek Instruments, Inc., Vermont, USA
- Spektrofotometer Synergy 2, Biotek Instruments, Inc., Vermont, USA
- Računalnik s programsko opremo Gen5 Data Analysis Software 2.07, Biotek Instruments, Inc., Vermont, USA

3.2 METODE

3.2.1 Vzorci krvi

V raziskavi je sodelovalo 43 zdravih oseb od tega 6 moških in 37 žensk, z različnimi statusi okužbe s *T. gondii*. Testno skupino je sestavljalo 23 oseb, ki je imelo status stare okužbe oz. so imeli v krvi prisotna specifična protitelesa IgG, 20 oseb, ki s parazitom ni bilo okuženih pa smo uporabili kot kontrolno skupino. Zaradi omejenih količin krvi pri nekaterih posameznikih je v raziskovalnem delu merjenja proliferacije limfocitov ter merjenja koncentracije IFN- γ sodelovalo različno število preiskovancev:

- Za merjenje proliferativnega učinka limfocitov smo uporabili krvne vzorce **9** kontrolnih oseb z negativnim statusom okužbe ter **17** pozitivnih oseb oz. oseb s statusom stare okužbe.
- Za merjenje koncentracije citokina IFN- γ pa smo uporabili krvne vzorce **19** kontrolnih oseb z negativnim statusom okužbe ter **20** oseb s statusom stare okužbe.

Zajeli smo tudi precej veliko starostno okno saj so bili preiskovanci stari od 17 dni do 60 let. Vsak darovalec krvi je bil, pred vključitvijo v raziskavo, osebno obveščen in seznanjen z izvajanjem, namenom in potekom raziskave ter je predhodno podpisal soglasje za darovanje krvi v raziskovalne namene.

Vzorke venske krvi so odvzele medicinske sestre v eni izmed ambulant v Porodnišnici Ljubljana ter na katedri za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Za potrebe raziskave smo preiskovancem odvzeli 4 ml venske krvi v posebne epruvete za vakuumski odvzem. Takšne epruvete so posebno namenjene za pripravo vzorcev plazme ter stimulacijo limfocitov saj je vanje dodan antikoagulant (sredstvo proti strjevanju krvi) litijev heparin. Pred pričetkom raziskovalnega dela je bilo potrebno za vsakega posameznega preiskovanca preveriti status okužbe s parazitom *T. gondii*. Od 44 preiskovancev je bilo 24 nosečnic, ki so bile v prvem tromesečju nosečnosti že testirane za toksoplazmozo kar pomeni, da smo podatke o statusu okužbe pridobili v bazi podatkov pacientov Porodnišnice Ljubljana. 20 preiskovancev je bilo prostovoljnih darovalcev vzorca krvi, pri katerih smo del krvne plazme poslali na diagnostiko v Laboratorij za parazitologijo Inštituta za imunologijo in mikrobiologijo, Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Za dobljene vzorce smo dobili odobritev etične komisije Univerze v Ljubljani št. 005-5-155/15.

3.2.2 Uporabljeni stimulatorji proliferacije limfocitov ter titracija antigena *Toxoplasma gondii*

3.2.2.1 Stimulatorji proliferacije limfocitov

Pred izvedbo same raziskave smo v iskanju najbolj primernega stimulatorja limfocitov, katerega delovanje bi najbolj optimalno ustrezalo našim izbranim raziskovalnim pogojem (24-urna inkubacija za citokine IFN- γ , 6-dnevna inkubacija za proliferacijo limfocitov), preverili nekaj različnih vrst stimulatorjev kot so PHA, interlevkin 2 (IL-2) ter monoklonska protitelesa CD3 v kombinaciji z monoklonskimi protitelesi CD28. Želeli smo najti najbolj ugodno razmerje med dobrim proliferativnim odzivom limfocitov po koncu inkubacije ter ceno in količino uporabljenega mitogena v poskusu.

3.2.2.2 Titracija antigena *Toxoplasma gondii*

Za detekcijo specifične senzibilizacije celic smo le-te stimulirali z antigenom *T. gondii*. Ker smo želeli zagotoviti takšno optimalno razmerje med limfociti in antigenom, ki izzove najmočnejšo proliferacijo, smo pred samo raziskavo umerili koncentracijo antigena. Vzorce krvi iste osebe smo stimulirali z naslednjimi koncentracijami antigena: 50 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ in 2 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.3 Priprava raztopin in reagentov

Vse omenjenjene komponente, ki so bile potrebne za pripravo reagentov in raztopin, razen medija II, 1 % BSA v PBS ter deionirane vode, so bile priložene komercialnemu kitu za izvedbo meritev na pretočnem citometru; Invitrogen™ Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry assay Kit.

3.2.3.1 EdU (5-Etini-2'-deoksiuridin)

Za pripravo 10 mM založne raztopine EdU, smo v komponento A (10 mg EdU) dodali 4 ml DMSO (dimetilsulfoksid), dobro premešali ter tako pripravljeno raztopino shranili v zamrzovalniku na -20 °C.

Za označevanje celic smo uporabili 10 μl 1 mM raztopine EdU, ki smo jo morali pripraviti na dan dodajanja v sterilnih pogojih. Tako smo na sobni temperaturi odmrznili 10 mM raztopino EdU ter ustrezno količino redčili v razmerju 1:10 z medijem II, s čimer smo zagotovili 1 mM koncentracijo.

3.2.3.2 Alexa Fluor azid

Raztopino fluorescentnega barvila Alexa Fluor azida smo pripravili tako, da smo v komponento B (vsebuje azid) dodali 130 μ l DMSO, dobro premešali ter shranili v zamrzovalniku na -20 °C.

3.2.3.3 Click-iT[®] EdU buffer additive

Za pripravo Click-iT[®] EdU pufra, smo v epruveto s 400 mg liofiliziranega reagenta dodali 2 ml deionizirane vode ter dobro premešali. Pripravljeno mešanico smo nato še razredčili v razmerju 1:10 z deionizirano vodo. Za zagotavljanje večje učinkovitosti pufra pa smo nato pripravljeno mešanico še razdelili na ustrezno število mikrocentrifugirk po 500 μ l. Te smo nato shranili v zamrzovalniku na -20 °C.

3.2.3.4 Click-iT[®] saponin-based permeabilization and wash buffer

Za pripravo reagenta za permeabilizacijo in spiranje celic smo redčili koncentriran pripravek (komponenta E) z 1 % BSA v PBS v razmerju 1:10. To smo nato shranili v hladilnik na 2-6 °C.

3.2.3.5 Click-iT reakcijska mešanica

Za potrebe testa proliferacije limfocitov je potrebno vsakič na novo pripraviti t.i. Click-iT reakcijsko mešanico, ki sestoji iz štirih sestavin. Te so umerjene za meritev enega vzorca, zato je pred pripravo potrebno preračunavanje količine reagentov za ustrezno število vzorcev. Za meritev enega vzorca potrebujemo: 438 μ l D-PBS, 10 μ l CuSO₄ (komponenta F), 2,5 μ l fluorescentnega barvila azid ter 50 μ l prej pripravljene in razredčenega Click-iT[®] EdU pufra. Vse omenjene reagente smo dodajali v navedenem vrstnem redu, da med pripravo mešanice ni prišlo do oborin.

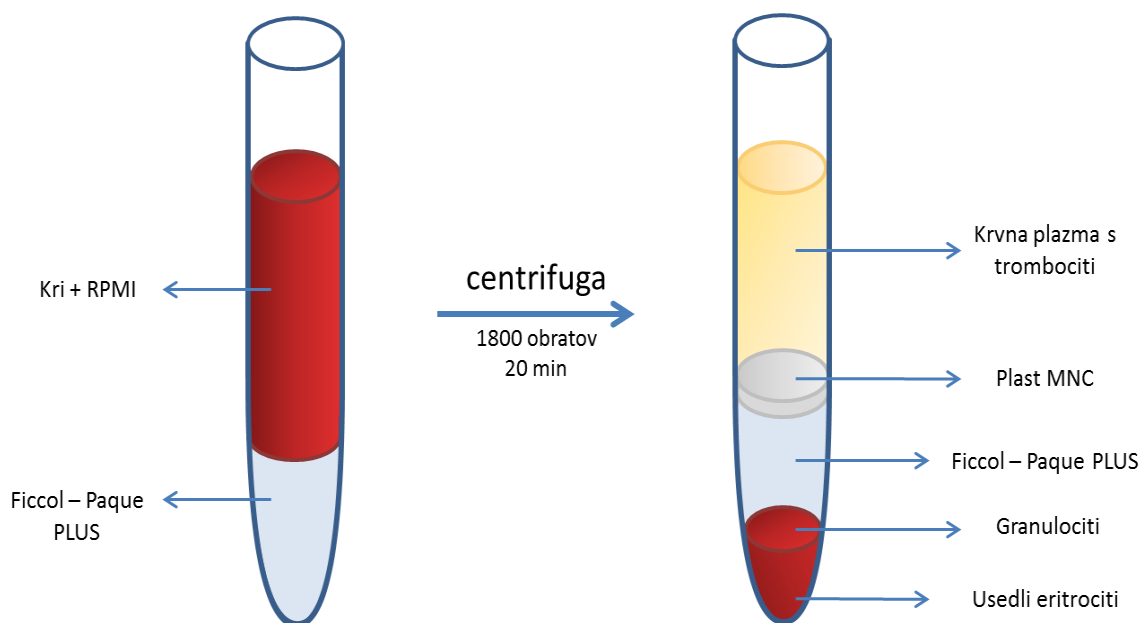
3.2.4 Določanje okužbe s *Toxoplasma gondii*

Za potrebe določanja toksoplazmoze smo vzorce krvi oseb, ki predhodno niso bile testirane za prisotnost specifičnih protiteles, najprej 5 minut centrifugirali pri 1600 obratih pri čemer se je krvna plazma ločila od eritrocitov. V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 0,5 ml krvne plazme ter jo shranili v zamrzovalniku pri -20 °C. Vzorce krvne plazme smo nato poslali na diagnostiko v Laboratorij za parazitologijo Inštituta za imunologijo in mikrobiologijo, Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, za

določanje okužbe s toksoplazmozo na podlagi prisotnosti specifičnih protiteles IgG in IgM.

3.2.5 Izolacija mononuklearnih celic (MNC)

Postopek izolacije mononuklearnih celic je potekal v sterilnih pogojih v brezprašni komori (laminariju). Kri vsakega posameznega darovalca je bila razdeljena v dve 4 ml epruveti z dodanim antikoagulantom heparinom. To smo nato prenesli v eno 12 ml epruveto ter jo v razmerju 1:1 razredčili z medijem RPMI. Za vsak posamezen vzorec krvi smo nato pripravili po dve 12 ml epruveti v katero smo odpipetirali 2,5 ml gostega ločevalnega medija Ficoll-Paque, ki po centrifugiranju, na podlagi gostotne razlike med mononuklearnimi celicami ter drugimi krvnimi celicami, ustvari jasno ločene plasti. Na medij smo zatem previdno naplastili polovico mešanice krvi ter RPMI. Tako pripravljene vzorce smo nato brez zavore centrifugirali na 1800 obratih 20 minut. Medtem je prišlo do sedimentacije eritrocitov na dno centrifugirke, ostale celice pa so se na podlagi gradientnih razlik porazdelile nad eritrocitno usedlino (Slika 13).



Slika 43: Shematičen prikaz tvorbe značilnih plasti ob ločevanju krvnih celic z metodo Ficoll-Paque.

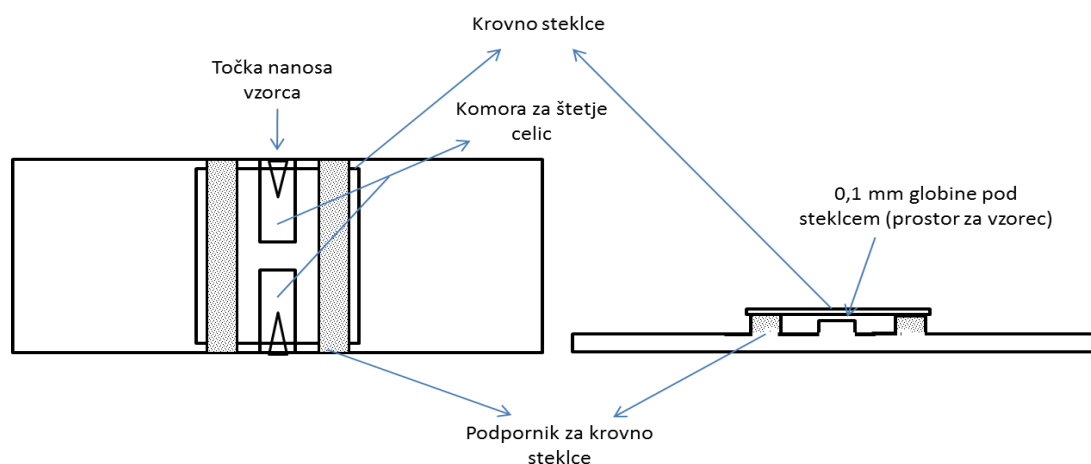
Gost medij so prepotovali še granulociti, ki so se znašli tik nad usedlimi eritrociti, nad njimi sledi plast Ficolla, na vrhu pa je krvna plazma s trombociti. Limfociti ter ostale MNC so se znašle v vmesni fazi tik nad Ficollom v obliki belega obročka. To plast MNC smo nato previdno ločili ter odpipetirali v novo 12 ml epruveto. Iz obeh prvotnih

epruвет napolnjenjih s Ficollom, smo limfocitne oblake združili v isto epruветo. Ker smo ob ločevanju MNC zajeli tudi nekaj Ficolla, smo tako pripravljene vzorce sprali s 6-8 ml medija RPMI. Ponovno smo centrifugirali, tokrat z uporabo zavore, na 1800 obratih, 10 minut. Zatem smo odlili supernatant, celice resuspendirali v 2 ml medija MII ter dobljeno suspenzijo MNC dobro premešali na namiznem mešalu.

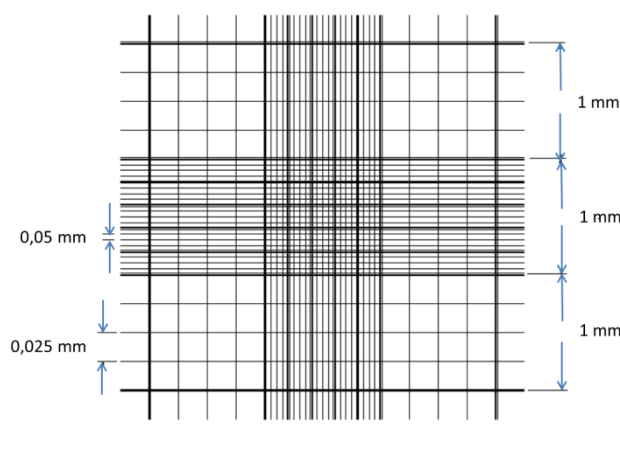
3.2.6 Določanje števila MNC v vzorcih ter uravnavanje koncentracije celic

Mononuklearne celice, resuspendirane v mediju MII, smo prešteli s pomočjo Neubauerjeve komore pod svetlobnim mikroskopom (Slika 14). Suspenziji celic smo predhodno dodali 0,1 % tripansko modrilo v fiziološki raztopini (NaCl). Izolat smo redčili v razmerju 1:10, pri čemer smo zamešali 450 μ l tripanskega modrila s 50 μ l suspenzije celic ter dobro premešali na mešalu. Tako pripravljeno obarvano suspenzijo celic smo nato nanесли na hemocitometer oz. komoro za štetje celic – Neubauerjevo komoro. Osrednji del steklene ploščice predstavljata dve vrisani mreži, namenjeni dvema različnima vzorcema. Eno mrežo komore sestavlja 9 velikih kvadratov, pri katerih so štiri od njih namenjeni štetju celic. Stranica le teh meri 1mm, prostornina med objektom in krovnim steklom pa znaša 0,1 mm^3 . Vsak večji meritveni kvadrat je razdeljen na 16 manjših znotraj katerih, pod svetlobnim mikroskopom pri 400x povečavi, preštejemo ustrezne žive ter nepoškodovane limfocite. Ko smo celice prešteli smo izračunali povprečje (N) ter z uporabo ustrezne formule preračunali koncentracijo celic v enem mililitru suspenzije. Z dobljeno informacijo nato z dodatkom hranilnega medija MII uravnamo koncentracijo na 1×10^6 MNC/ml.

$$\text{Število celic/ml} = N / 10 \times 10^6 \quad \dots (1)$$



Slika 14: Zgradba Neubauerjeve komore.



Slika 15: Mreža za štetje celic na Neubauerjevi komori

3.2.7 Stimulacija MNC ter označevanje z EdU

Pripravili smo plošče za gojenje celic s 24 vdolbinami ter stolpce označili z naslednjimi oznakami: "NK" (negativna kontrola), "PHA +" (pozitivna kontrola z dodatkom fitohemaglutinina ter EdU), "PHA -" (pozitivna kontrola z dodatkom fitohemaglutinina brez EdU), "TOXO +" (spodbujanje celic z antigeni *T. gondii* z dodatkom EdU) ter "TOXO -" (spodbujanje celic z antigeni *T. gondii* brez dodatka EdU). V vsako od označenih vdolbin smo nato odpipetirali 500 μ l umerjene suspenzije celic. V vsako vrstico smo odpipetirali vzorec posamezne osebe. Celice smo nato stimulirali po spodnji shemi:

Preglednica 1: Shema stimulacije mononuklearnih celic.

Stimulacija 6 dni	NK (negativna kontrola)	PHA + (pozitivna kontrola)	TOXO + (stimulacija z antigenom)	PHA - (pozitivna kontrola)	TOXO - (stimulacija z antigenom)
Oseba 1	500 µl MNC	500 µl MNC 12,5 µl PHA 10 µl EdU	500 µl MNC 5 µl antigen Tox 10 µl EdU	500 µl MNC 12,5 µl PHA	500 µl MNC 5 µl antigen Tox
Oseba 2	500 µl MNC	500 µl MNC 12,5 µl PHA 10 µl EdU	500 µl MNC 5 µl antigen Tox 10 µl EdU	500 µl MNC 12,5 µl PHA	500 µl MNC 5 µl antigen Tox
Oseba 3	500 µl MNC	500 µl MNC 12,5 µl PHA 10 µl EdU	500 µl MNC 5 µl antigen Tox 10 µl EdU	500 µl MNC 12,5 µl PHA	500 µl MNC 5 µl antigen Tox
Oseba 4	500 µl MNC	500 µl MNC 12,5 µl PHA 10 µl EdU	500 µl MNC 5 µl antigen Tox 10 µl EdU	500 µl MNC 12,5 µl PHA	500 µl MNC 5 µl antigen Tox

- Celice v predelku "PHA +" smo stimulirali z 12,5 µl PHA, s koncentracijo 200 µg/ml.
- Celice v predelku "TOXO +" smo stimulirali s 5 µl antigenske raztopine (*T. gondii*), s koncentracijo 200 µg/ml.

Po dodatku obeh stimulantov smo mikrotitersko ploščo za 5 minut prenesli na stresalnik ter jo nato prestavili v CO₂ inkubator (5 % CO₂) na 37 °C za 6 dni. Zadnjih 20 ur inkubacije smo pripravili 10 µM raztopino EdU (opisano zgoraj) ter v ustrezno označene vdolbine dodali po 10 µl le-te.

3.2.8 Test proliferacije limfocitov

Po koncu 6 dnevne inkubacije smo s pipeto temeljito postrgali in pomešali celice v posamezni vdolbinici. Označili smo ustrezno število epruvet ter vanjo prenesli 500 µl suspenzije celic. Te smo nato sprali z 1 ml pufru DPBS in pomešali na mešalu. Vzorce smo zatem centrifugirali 5 minut pri 300 g oziroma na 1300 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo odlili supernatant ter dodali 5 µl specifičnih monoklonskih

protiteles CD3 APC ter 10 μ l specifičnih monoklonskih protiteles CD4 PercP. To smo dobro premešali ter inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi v temi. Po končani inkubaciji smo celice sprali z 2,5 ml 1 % BSA v PBS ter vzorce centrifugirali 5 minut pri 300 g. Nato smo ponovno odlili supernatant ter celice resuspendirali v 100 μ l »Click-iT fixative« (komponenta D) in dobro premešali. Celice smo ponovno postavili v temo ter inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Po 15 minutah smo celice ponovno spirali z 2,5 ml 1 % BSA v PBS in centrifugirali 5 minut pri 300 g. Zatem smo odlili supernatant ter permeabilizirali celice s 100 μ l »Click-iT saponin-based permeabilization and wash« reagentom, ki smo ga predhodno pripravili. Mešanico smo dobro premešali ter za 15 minut postavili v temo. Medtem smo pripravili »Click-iT reaction cocktail« za ustrezno število vzorcev, pri čemer smo uporabili DPBS, CuSO₄, fluorescentno barvilo azid ter EdU reakcijski puffer (EdU Reaction Buffer Additive). Po koncu inkubacije smo dodali 500 μ l pripravljenega »Click-iT reaction cocktail-a« ter mešanico premešali na mešalu. Tokrat smo tako pripravljene vzorce inkubirali 30 minut v temi. Po tem smo celice sprali s 3 ml »Click-iT saponin-based permeabilization and wash« reagentom ter še zadnjič centrifugirali pri 300 g, 5 minut. Zatem smo odlili supernatant ter celice resuspendirali v 200 μ l »Click-iT saponin-based permeabilization and wash« reagentom.

3.2.9 Merjenje koncentracije celic na pretočnem citometru

Tako označene ter obdelane celice so pripravljene za merjenje na pretočnem citometru. Epruvete smo v ustreznem vrstnem redu razvrstili na plastičen kolut ter ga vstavili v citometer. Analiza epruвет na takšnem kolutu omogoča avtomatično mešanje vsakega posameznega vzorca pred merjenjem ter hitrejši postopek merjenja. S pomočjo računalniškega programa, povezanega s pretočnim citometrom, smo lahko sproti spremljali rezultate, ki nam jih citometer predvaja v obliki točkovnega diagrama, pri čemer vsaka točka predstavlja posamezno celico, pomerjeno z dvema fotoreceptorjema FALS ter RALS. Njuni posredovani podatki o razpršenosti svetlobe od posamezne celice le-te ovrednotijo glede na njihovo velikost ter granuliranost. Ostali fotodetektorji z barvnimi filtri merijo izsevano svetlobo ter s tem prikazujejo različne tipe celic, obarvane z različnimi fluorescenčnimi barvili. Glede na podatke o velikosti in granuliranosti celic smo dalje z elektronskim svinčnikom obkrožili posamezno skupino celic, ki nas je zanimala (limfociti). Označene celice nato zaznajo omenjeni fotodetektorji z optičnimi filtri, ki merijo fluorescenco, z različnimi monoklonskimi protitelesi označenih limfocitov. Na točkovnih diagramih nato z elektronskim svinčnikom ponovno obkrožimo željeno skupino celic, ob tem pa spremljamo še

dodaten diagram katerega podatke posreduje fotodetektor, ki meri fluorescenco barvila EdU Aleksafluor 488. Ta na abscisni osi opredeljuje količino ter moč zelene fluorescence, ki jo izsevajo z barvilom označene celice, na ordinatni osi pa je podano število dogodkov.

Na podlagi kontrolnih vzorcev brez dodanega EdU smo na diagramih postavili smiselne meje, ki sicer opredeljujejo delež celic označenih z EdU ter jih nato uporabili za dejansko določanje deležev v vzorcih, katerim smo dodali EdU.

3.2.10 Test ugotavljanja koncentracije citokina IFN- γ z encimsko imunskim testom ELISA

3.2.10.1 Stimulacija celic ter odvzem krvne plazme

Po pridobitvi venske krvi od preiskovancev smo iz heparinske epruvete najprej odvzeli 3 x 300 μ l krvi, ki smo jo razdelili v 3 luknje na mikrotiterski plošči ter jih označili z oznakami: "NK" (negativna kontrola), "PHA" (pozitivna kontrola z dodatkom fitohemaglutinina) ter "TOXO" (spodbujanje celic z antigeni *T. gondii*) (Preglednica 2).

Preglednica 2: Stimulacija celic za merjenje koncentracije citokina IFN- γ

Inkubacija 24 ur	NK (negativna kontrola)	PHA (pozitivna kontrola)	TOXO (stimulacija z antigenom)
Oseba 1	300 μ l MNC	300 μ l MNC 30 μ l PHA (200 μ g/ml)	300 μ l MNC 3 μ l antigen Tox (200 μ g/ml)

Krvi v luknji označeni s "PHA", smo dodali 30 μ l fitohemaglutinina ($c = 200 \mu\text{g/ml}$), s čimer smo koncentracijo mitogena v krvi umerili na 20 $\mu\text{g/ml}$, krvi v luknji označeni s "TOXO" pa smo dodali 3 μ l raztopine ($c = 200 \mu\text{g/ml}$), ki je vsebovala antigene *T. gondii*, s čimer smo koncentracijo antigena v krvi umerili na 2 $\mu\text{g/ml}$. Zatem smo tako pripravljeno ploščo za 5 minut postavili na stresalnik z 80 tresljaji na minuto. Temu je sledila 24 urna inkubacija v inkubatorju pri 37 °C ter v atmosferi s 5 % CO₂. Po 24 urni inkubaciji smo ploščo vzeli iz inkubatorja ter pripravili in ustrezno označili toliko mikrocentrifugirk, kolikor je bilo s krvjo zapolnjenih lukenj na mikrotiterski plošči. S 1000 μ l pipeto smo postrgali celice z dna mikrotiterske plošče ter prenesli vso kri v

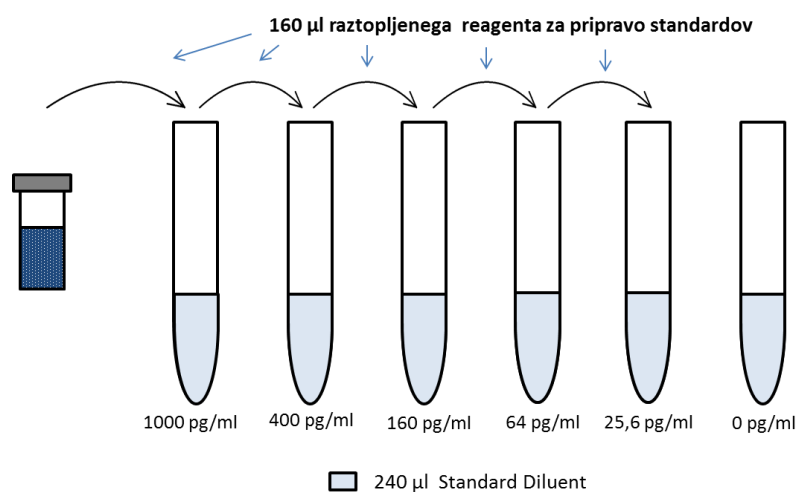
ustrezne mikrocentrifugirke. Te smo postavili v centrifugo ter jih zavrteli na 2500 obratih za 5 minut. Po centrifugiranju je prišlo do vidne ločitve krvne plazme od usedlih se eritrocitov. Nato smo z 200 μ l pipeto odpipetirali čimvečjo količino plazme ter jo prenesli v prej pripravljene in z ustrezno zaporedno številko označene krioviale. Te smo do nadaljnjega shranili v škatle za shranjevanje kriovial ter jih postavili v zamrzovalnik pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.10.2 Merjenje koncentracije IFN- γ v vzorcu krvne plazme z ELISA

Zaradi velikega števila vzorcev smo meritve koncentracije IFN- γ izvedli v dveh serijah, pri čemer smo v prvi seriji pomerili vzorce 20 oseb v drugi seriji pa vzorce 19 oseb. Odločili smo se, da vzorce negativne ter pozitivne kontrole (stimulirane s PHA) merimo v eni paralelki, medtem ko vzorce stimulirane z antigenom toksoplazme, merimo v dveh paralelkah vkolikor nam to dovoljuje količina vzorca krvne plazme. Pred začetkom izvedbe meritve z ELISA smo pripravili ter ustrezno redčili posamezne vzorce, kar nam omogoča umestitev rezultatov znotraj občutljivostnih meja testa:

- Nestimulirane vzorce (negativna kontrola – »NK«) ter z antigenom toksoplazme stimulirane vzorce oseb, ki niso bile okužene s parazitom smo pustili nerazredčene.
- Z antigenom toksoplazme stimulirane vzorce oseb, ki so bile okužene s parazitom oz. so imele status stare okužbe smo redčili v razmerju 1:2.
- Vzorce, stimulirane z limfocitnim spodbujevalcem PHA pa smo redčili v razmerju 1:20.

Vzorce krvne plazme smo po navodilih redčili s pripravkom Standard Diluent, ki je bil priložen kitu za izvajanje ELISA. Tik pred pričetkom smo pripravili tudi standardne raztopine, ki so potrebne za umerjanje in izračun standardne krivulje. Najprej smo v vialo z liofiliziranim reagentom za pripravo standardov (Lyophilized Recombinant Human IFN- γ Standard) odpipetirali 3600 μ l ultra čiste vode, s čimer smo reagent raztopili. Nato smo 6 epruвет (za vsako točko standardne krivulje) opremili z oznakami: 1000 pg/ml, 400 pg/ml, 160 pg/ml, 64 pg/ml, 25,6 pg/ml ter 0 pg/ml (Slika 16). V vsako izmed njih smo nato odpipetirali 240 μ l pripravka Standard Diluent. Zatem smo v epruветo z oznako »1000 pg/ml« odpipetirali 160 μ l prej raztopljenega reagenta za pripravo standardov ter dobro premešali. Tej mešanici smo nato odvzeli 160 μ l tekočine ter jo prenesli v naslednjo epruветo z oznako "400 pg/ml". To smo ponavljali do predzadnje epruветe z oznako »25,6 pg/ml«, v zadnjo epruветo nismo dodali nič.



Slika 16: Shema redčenja standardnih raztopin za encimski imunski test ELISA.

Po tako pripravljenih standardih in vzorcih smo pričeli z encimsko imunskim testom. V plastično banjico smo nalili reagent z biotiniziranimi protitelesi (Biotinylated Antibody Reagent) ter z multikanalno pipeto odpipetirali 50 µl v vsako luknjico na mikrotitrski plošči. Nato smo v dveh paralelkah nanesli po 50 µl vsake izmed standardnih raztopin ter kontrolno raztopino z vnaprej umerjeno koncentracijo citokina IFN- γ , ki jo hranijo v Laboratoriju za celično imunologijo Inštituta za mikrobiologijo ter imunologijo. V preostale luknjice smo nanesli po 50 µl naših vzorcev bodisi v eni ali dveh paralelkah po vnaprej načrtovani shemi. Nato smo ploščo previdno prekrili z adhezivno folijo čemur je sledila dvournna inkubacija na sobni temperaturi (20-25°C). Vmes smo pripravili pufer za spiranje plošče. V dvolitrsko stekleno bučko smo nalili 1,5 L ultra čiste vode ter od tega volumna odpipetirali 50 ml vode. Nato smo dodali 50 ml nerazredčenega pufra (30x Wash Buffer) ter dobro premešali. Vsebino bučke smo nato prelili v plastenko, ki je del naprave za spiranje mikrotitrskih plošč ter jo priklopili na napravo. Po koncu dvournne inkubacije smo previdno odlepili adhezivno folijo ter mikrotitrsko ploščo namestili v napravo za spiranje, ki jo je 3x sprala s prej pripravljenim pufrom. Vmes smo pripravili streptavidin-HRP raztopino iz priloženega streptavidin-HRP koncentrata ter streptavidin-HRP razredčitvenega pufra (Streptavidin-HRP Dilution Buffer). Vialo s koncentratom smo najprej na kratko scentrifugirali, da se je vsa vsebina posedla na dno. Nato smo odpipetirali 30 µl koncentrata v vialo z 12 ml razredčitvenega pufra ter nežno premešali. Mešanico smo nato prelili v plastično banjico ter z multikanalno pipeto, takoj po koncu spiranja, v luknjice na mikrotitrski plošči nanesli po 100 µl raztopine. Ploščo smo ponovno prelepili z adhezivno folijo ter

inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Po koncu inkubacije smo ploščo prenesli v aparat za spiranje ter po trikratnem spiranju v vsako izmed luknjic z multikanalno pipeto nanесли 100 μ l TMB substrata, ki omogoča detekcijo HRP molekul. Ploščo smo nato brez adhezivne folije položili v temno škatlo ter inkubirali 30 minut. Po inkubaciji smo končali razvoj barvne reakcije s tem, da smo v vsako izmed luknjic z multikanalno pipeto dodali 100 μ l »Stop Solution« raztopine.

3.2.11 Merjenje absorbance s spektrofotometrom

Absorbanco standardnih raztopin ter vzorcev smo izmerili s spektrofotometrom Synergy 2 pri valovnih dolžinah 450 nm ter 550 nm. Vsi izračuni, vključno z izrisovanjem standardne krivulje na podlagi povprečne absorbance obeh paralelk posameznih standardov ter pomnoževanjem razredčenih vzorcev z razredčitvenim faktorjem, so bile izračunane računalniško s programom Gen5 Data Analysis Software 2.07. Občutljivost dotičnega testa ali »najnižja meja detekcije« je 2 pg/ml kar pomeni, da smo za vse vrednosti vzorcev, ki so bile nižje v rezultatih navedli kot »< 2 pg/ml«.

3.2.12 Statistična obdelava podatkov

Statistično obdelavo podatkov ter risanje grafov smo izvedli s pomočjo računalniških programov Excel (Microsoft, ZDA) ter MatLab (MathWorks, ZDA). Iz obeh ločenih sklopov podatkov (odstotek proliferiranih celic po stimulaciji z antigenom *T. gondii* ter koncentracija IFN- γ) smo izračunali povprečne vrednosti (\bar{x}) ter standardne odklone (SD), ki smo jih predstavili v preglednicah.

Za testiranje normalne porazdelitve podatkov smo uporabili Kolmogorov-Smirnov test. Na podlagi le-tega smo ob značilnem odstopanju od normalne porazdelitve podatke analizirali z neparametričnim testom Wilcoxon Rank Sum test, ki je uporabljen kot ekvivalent parametričnemu Studentovemu t-testu za neodvisna vzorca (Dytham, 2011). Z Wilcoxon Rank Sum testom smo ugotavljali razlike med povprečnima vrednostma dveh neodvisnih vzorcev, pri čemer smo za stopnjo tveganja (α) izbrali vrednost 0,05 kar pomeni, da sta vzorca med seboj statistično značilno različna, če je vrednost p manjša od 0,05.

Podatke smo grafično prikazali s pomočjo kvartilnih diagramov, točkovnih diagramov ter ROC krivulje. S podajanjem zadnje, smo definirali optimalno občutljivost, specifičnost, mejno vrednost ter diagnostično natančnost (vrednost AUC) testa proliferacije limfocitov in testa IFN- γ .

4 REZULTATI

Vsi odstotki limfocitov, prikazani v preglednicah in grafih, so s pomočjo pretočnega citometra preračunani glede na odstotek vseh limfocitov, ki sicer v celotnem vzorcu predstavljajo le določen delež vseh izmerjenih celic telesne obrambe.

4.1 TITRACIJSKA KRIVULJA SPODBUJANJA LIMFOCITOV Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI ANTIGENA *TOXOPLASMA GONDII*

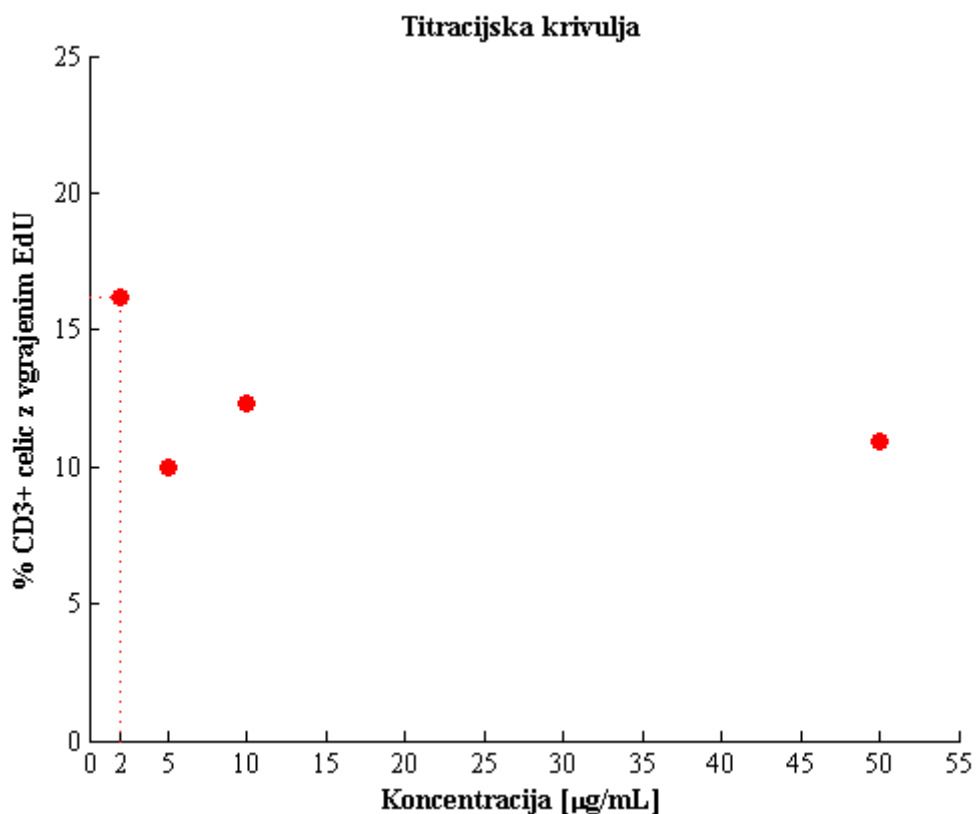
Za izvedbo testa proliferacije limfocitov smo želeli zagotoviti takšno optimalno razmerje med limfociti in uporabljenim antigenom, ki izzove najmočnejšo proliferacijo. Različne koncentracije antigena namreč izzovejo različne stopnje proliferativnega odziva limfocitov zato smo pred samo raziskavo umerili koncentracijo antigena tako, da smo vzorce krvi iste osebe, stimulirali z različnimi koncentracijami antigena: 50 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml in 2 µg/ml. Iz pridobljenih odstotkov proliferirajočih se celic je sledila izdelava titracijske krivulje (Slika 17), na podlagi le-te pa smo nato določili najustreznejšo koncentracijo za izvedbo raziskave (Preglednica 3).

Preglednica 3: Stimulacija limfocitov z različnimi koncentracijami antigena *T. gondii*. Prikazani so na pretočnem citometru izmerjeni odstotki različnih tipov limfocitov (CD3+, CD4+, CD8+, celokupni limfociti) z vgrajenim EdU glede na vse limfocite v vzorcu.

	CD3+ EdU+	CD4+ EdU+	CD8+ EdU+	Limfociti EdU+
50 µg/ml	10,9	10,1	12,3	12,2
10 µg/ml	12,3	11,7	12,4	12,6
5 µg/ml	10	9	10,6	10,6
2 µg/ml	16,2	15,7	14,4	16,3

Rezultati so pokazali najvišji delež celic CD3+, CD4+ ter CD8+ z vgrajenim EdU ob stimulaciji s koncentracijo antigena 2 µg/ml, zato smo takšno koncentracijo uporabili tudi v naši raziskavi.

Na sliki 17 je prikazana titracijska krivulja limfocitov T (CD3+) po stimulaciji z različnimi koncentracijami antigena. S slike je razvidno, da je namočnejši proliferativni odziv izzvala koncentracija 2 $\mu\text{g/ml}$.



Slika 17: Titracijska krivulja. Proliferativni odziv CD3 pozitivnih celic (odstotek celic z vgrajenim EdU) glede na različne koncentracije dodanega antigena (50 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ in 2 $\mu\text{g/ml}$).

4.2 STIMULATORJI PROLIFERACIJE LIMFOCITOV ZA UPORABO V POZITIVNI KONTROLI

Za ovrednotenje proliferacije limfocitov je potrebna primerna pozitivna kontrola, s katero zagotovo in nespecifično aktiviramo limfocite in spodbujamo njihovo proliferacijo. Pred začetkom raziskave smo vzorce krvi iste osebe stimulirali z različnimi stimulatorji, pri čemer smo uporabili fitohemaglutin PHA s koncentracijo 1,25 µg/ml, interleukin 2 (IL-2) s koncentracijo 100 µg/ml, monoklonska protitelesa CD3 (1 µg/ml) v kombinaciji z monoklonskimi protitelesi CD28 (5 µg/ml) ter kombinacijo PHA in IL-2 z enakimi koncentracijami, kot smo jih uporabili v posamičnem poskusu. Želeli smo najti takšen stimulator, katerega delovanje bi najbolj optimalno ustrezalo našim izbranim raziskovalnim pogojem, njegova stimulacija pa bi izzvala dober proliferativni odziv v razmerju z ugodno ceno in količino uporabljenega mitogena v poskusu.

Preglednica 4: Stimulacija limfocitov z različnimi stimulatorji. Prikaz koncentracije različnih snovi, ki so bile uporabljene za stimulacijo ter odstotek limfocitov z in brez vgrajenega EdU, glede na vse limfocite v vzorcu. Podatki so dobljeni z meritvijo na pretočnem citometru po 6-dnevni inkubaciji.

		MITOGEN			
		IL-2	CD3+ CD28+	PHA	PHA, IL-2
koncentracija		100 µg/ml	1 µg/ml in 5 µg/ml	1,25 µg/ml	1,25 µg/ml, 100 µg/ml
Vsi limfociti		100	100	100	100
Vsi limfociti EdU+		46,8	9,9	47,1	41,7
Vsi limfociti EdU-		53,2	90,1	52,9	58,3
CD3+		92,4	74,7	87,3	90,7
	CD3+ EdU+	48	9,1	47	42,9
	CD3+ EdU-	52	90,9	53	57,1
CD4+		50,3	76,5	47,2	53,2
	CD4+ EdU+	32,3	7	35,2	29,9
	CD4+ EdU-	67,7	93	64,8	70,1
CD8+		38,8	16,1	36,7	33,9
	CD8+ EdU+	69,1	13,1	62,9	63,8
	CD8+ EdU-	30,9	86,9	37,1	36,2
Ostale CD3+		10,9	7,4	16,1	12,9
Ostali limfociti		7,6	25,3	12,7	9,3

Preglednica 4 prikazuje vpliv treh stimulatornih snovi v štirih različnih kombinacijah na stimulacijo različnih tipov limfocitov. Za najbolj primerno mitogeno substanco se je izkazal PHA, ki je v primeru celic pomagalk (CD4+) z vgrajenim EdU ter celokupnih limfocitov z vgrajenim EdU, izzval najmočnejšo proliferacijo, v ostalih primerih pa ni izzval najvišje a kljub temu zadostno mero proliferacije limfocitov. V nadaljni raziskavi smo torej za stimulator limfocitov ter produkcijo citokinov IFN- γ uporabili PHA s končno koncentracijo v vzorcu 1,25 μ g/ml.

4.3 TEST PROLIFERACIJE LIMFOCITOV

Z namenom vzpostavitve nove diagnostične metode za odkrivanje okužbe s parazitom *T. gondii* smo mononuklearne celice iz vzorcev periferne krvi izpostavili antigenom, ki bi, v primeru predhodne senzibilizacije, izzvali njihovo proliferacijo. Z metodo vgradnje EdU v novonastalo DNK smo nato s pretočnim citometrom izmerili proliferativni odziv. Z označevanjem celic s specifičnimi monoklonskimi protitelesi, ki so označeni s fluorescentnim barvilom pa smo ugotavljali tudi deleže določenih tipov celic – CD3+, CD4+ in CD8+, ki so proliferirali.

Za primerjavo limfocitnega odziva ob stimulaciji z izbranim antigenom, smo sočasno izvedli tudi pozitivno in negativno kontrolo. Za pozitivno kontrolo smo mononuklearnim celicam v mediju dodali mitogen PHA, s čimer smo preverili funkcionalnost limfocitov ter izločili vzorce z imunskimi pomankljivostmi oz. s slabim proliferativnim odzivom ter se tako izognili lažno negativnim rezultatom. Kot negativno kontrolo pa smo uporabili izolirane mononuklearne celice v mediju, katerim nismo dodali nobenih antigenih oz. mitogenih spodbujevalcev.

Veljavnost rezultatov je bila zagotovljena tudi z uvedbo notranje kontrole testa EdU, s katero smo želeli preveriti oziroma zagotoviti, da ni prišlo do nespecifične vezave EdU označevalcev, kar lahko prav tako prispeva k lažno pozitivnim rezultatom. Stimulacijo celic z antigenom oz. PHA smo izvedli v dveh paralelkah, pri čemer smo eni paralelki 5. dan inkubacije dodali EdU drugi pa ne. Po koncu inkubacije smo obe paralelki tretirali enako, z dodatkom EdU označevalca, njegovo vgradnjo pa nato merili s pretočno citometrijo. Ugotavljali smo delež EdU pozitivnih celic, ki v protokolih brez dodatka EdU ni smel presegati 5 %. Če je bil delež nižji smo zaključili, da do nespecifične vezave ni prišlo in da je test EdU primeren za merjenje proliferacije. Poleg tega smo izolate brez dodanega EdU uporabili za določanje mej, znotraj katerih je sicer opredeljen delež celic z EdU označevalcem.

Preiskovance smo razdelili v dve skupini na podlagi njihovega statusa okužbe s *T. gondii*, pridobljenega s serološkimi testi. Tako smo imeli kontrolno skupino oseb z negativnim statusom okužbe (N = 9) ter testno skupino oseb s statusom stare okužbe (N = 17).

Rezultati grafov (Slika 18–23) prikazujejo proliferativni odziv različnih tipov limfocitov (limfociti T, limfociti T-pomagalk, limfociti T-citotoksični) po vgradnji EdU v novonastalo verigo DNK.

V preglednici 5 in 6 sta podana povprečna vrednost ter standardni odklon deležev celic v vzorcu za vsak posamezen protokol, ki smo ga izvedli: NK (negativna kontrola brez celičnih spodbujevalcev), PHA (stimulacija s PHA) ter TOXO (stimulacija z antigenom *T. gondii*) z ter brez vgradnje EdU.

Preglednica 5: Opisna statistika deležev različnih tipov limfocitov (CD3+, CD4+, CD8+, celokupni limfociti) oseb z negativnim statusom okužbe po stimulaciji z mitogenom PHA in antigenom *T. gondii*. Podano je število preiskovancev oz. podatkov za vsakega izmed protokolov ter povprečna vrednost z enim standardnim odklonom.

$\bar{x} \pm SD$ [%]					
PROTOKOL	N	CD3+ EdU+	CD4+ EdU+	CD8+ EdU+	Limfociti EdU+
NK	8	0,10 ± 0,17	0,18 ± 0,24	0,01 ± 0,04	0,20 ± 0,13
PHA + EdU	8	47,48 ± 19,96	39,84 ± 18,50	56,71 ± 21,97	46,48 ± 20,33
PHA - EdU	8	1,48 ± 1,70	1,54 ± 1,47	1,35 ± 2,32	1,69 ± 1,58
TOX + EdU	9	0,48 ± 0,52	0,49 ± 0,52	0,23 ± 0,29	0,78 ± 0,53
TOX - EdU	9	0,22 ± 0,20	0,20 ± 0,20	0,08 ± 0,13	0,39 ± 0,40

Legenda: NK (negativna kontrola); PHA (fitohemaglutinin); TOXO (antigen *T. gondii*); EdU (5-etinil-2'-deoksiuridin); N (število preiskovancev); CD3+ (limfociti T); CD4+ (limfociti T – pomagalke); CD8+ (limfociti T – citotoksični); \bar{x} (povprečna vrednost); SD (standardni odklon)

Preglednica 6: Opisne statistike deležev različnih tipov limfocitov (CD3+, CD4+, CD8+, celokupni limfociti) oseb s statusom stare okužbe po stimulaciji z mitogenom PHA in antigenom *T. gondii*. Podano je število preiskovancev oz. podatkov za vsakega izmed protokolov ter povprečna vrednost z enim standardnim odklonom.

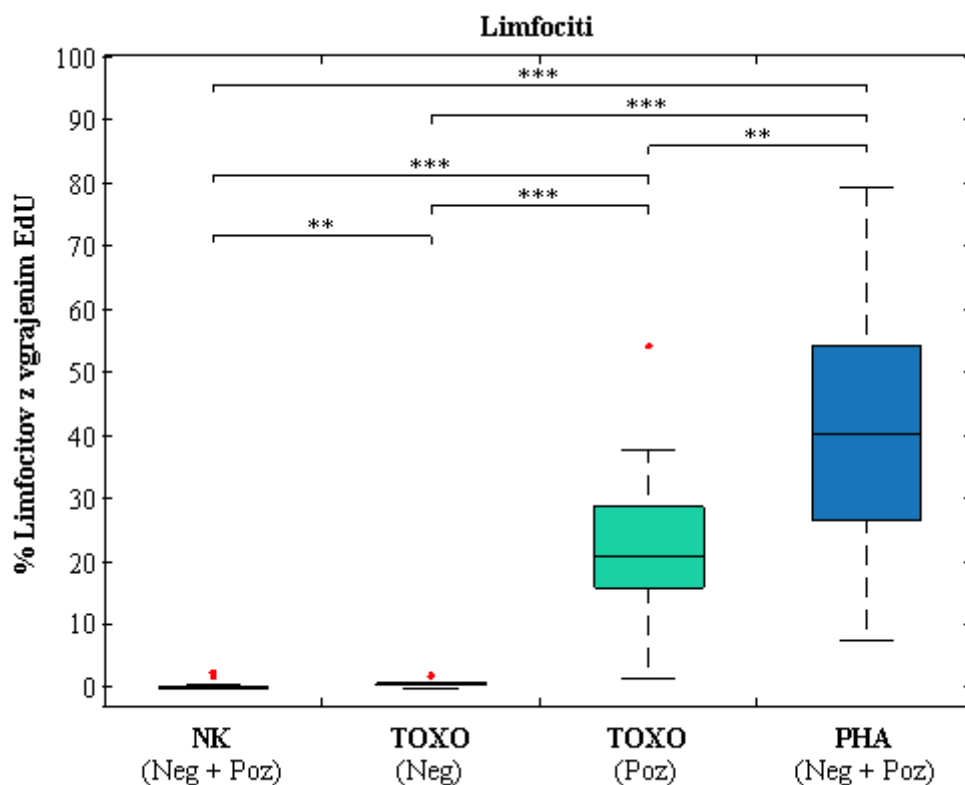
$\bar{x} \pm SD$ [%]					
PROTOKOL	N	CD3+ EdU+	CD4+ EdU+	CD8+ EdU+	Limfociti EdU+
NK	16	0,16 ± 0,19	0,28 ± 0,43	0,26 ± 0,76	0,45 ± 0,73
PHA + EdU	15	46,09 ± 17,24	38,93 ± 17,22	54,36 ± 19,46	39,47 ± 17,82
PHA - EdU	13	1,51 ± 1,76	1,16 ± 1,29	1,30 ± 1,41	1,57 ± 1,70
TOX + EdU	17	24,29 ± 13,4	29,12 ± 15,95	4,63 ± 3,63	22,67 ± 12,52
TOX - EdU	16	0,72 ± 0,97	0,71 ± 1,03	0,39 ± 0,80	0,84 ± 1,28

Legenda: NK (negativna kontrola); PHA (fitohemaglutinin); TOXO (antigen *T. gondii*); EdU (5-etinil-2'-deoksiuridin); N (število preiskovancev); CD3+ (limfociti T); CD4+ (limfociti T – pomagalke); CD8+ (limfociti T – citotoksični); \bar{x} (povprečna vrednost); SD (standardni odklon)

4.3.1 Proliferacija celokupnih limfocitov

Pozitivna kontrola z mitogenom PHA se je izkazala za primerno, saj je s slike 18 razvidna močna proliferacija limfocitov preiskovancev s pozitivnim in negativnim statusom okužbe ($\bar{x} = 41,9$ % EdU pozitivnih limfocitov). Poleg tega je proliferacija ob stimulaciji s PHA statistično značilno višja v primerjavi z negativno kontrolo ($p < 0,001$), pri kateri lahko opazimo tudi nizko stopnjo spontane proliferacije ($\bar{x} = 0,37$ % EdU pozitivnih limfocitov). Nizka proliferacija se kaže tudi pri skupini s parazitom neokuženih preiskovancev, katerih vzorce smo stimulirali z antigenim *T. gondii* ($\bar{x} = 0,78$ % EdU pozitivnih limfocitov) a je ta kljub temu statistično značilno višja od negativne kontrole ($p = 0,0037$).

Pričakovana višja stopnja proliferacije se kaže pri preiskovancih s staro okužbo, katerih vzorce smo prav tako stimulirali z antigenom parazita ($\bar{x} = 22,67$ % EdU pozitivnih limfocitov). Ta je statistično značilno višja v primerjavi z negativno kontrolo ($p < 0,001$) ter vzorci negativnih preiskovancev stimuliranih z antigenom ($p < 0,001$).



Slika 18: Proliferativni odziv vseh limfocitov v nestimuliranih vzorcih, vzorcih stimuliranih z antigenom *T. gondii* ter vzorcih stimuliranih s PHA, pri obeh skupinah preiskovancev po 6-dnevni inkubaciji. S kvartilnimi diagrami je prikazana razpršenost deležev vseh novonastalih limfocitov, v katere se je vgradil EdU. Diagram predstavlja vrednosti med prvim in četrtim kvartilom, mejni črti pa vrednosti med prvim in desetim decilom, črta na sredini pa mediano. Točke izven diagramov predstavljajo ekstremne vrednosti.

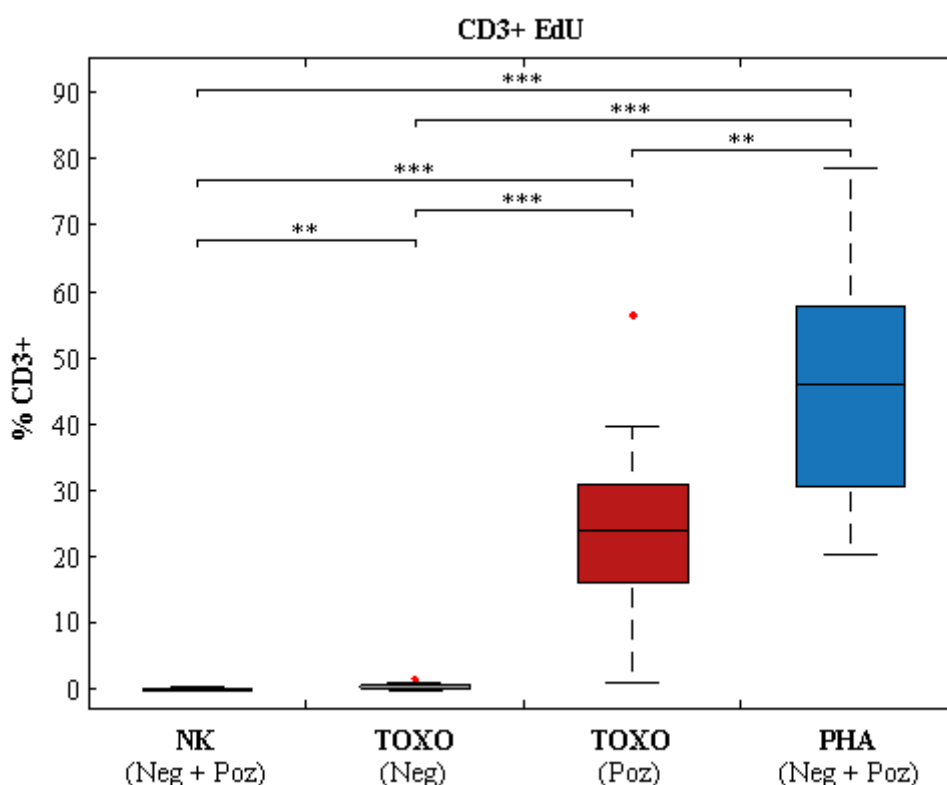
Legenda: NK (negativna kontrola); PHA (fitohemaglutinin); TOXO (antigen *T. gondii*); Neg (preiskovanci z negativnim statusom okužbe); Poz (preiskovanci s statusom stare okužbe)

Opombe: * $0,01 \leq p < 0,05$; ** $0,001 \leq p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.3.2 Proliferacija in izražanje CD3+

Slika 19 prikazuje proliferativni odziv CD3+ pozitivnih limfocitov (limfociti T) na spodbujanje z mitogenom PHA in antigenom *T. gondii*. Ponovno lahko opazimo visok delež proliferacije limfocitov ob stimulaciji s PHA ($\bar{x} = 46,57$ % EdU pozitivnih limfocitov), ki se tudi sicer pojavlja pri vseh ostalih opazovanih tipih limfocitov. Ponovno je prisotna nizka proliferacija pri skupini neokuženih preiskovancev ob stimulaciji z antigenom ($\bar{x} = 0,48$ % EdU pozitivnih limfocitov). Ta se statistično značilno razlikuje od negativne kontrole ($p = 0,0086$) s še nižjo proliferativno stopnjo ($\bar{x} = 0,14$ % EdU pozitivnih limfocitov).

Odstotek CD3+ pozitivnih limfocitov oseb s staro okužbo, ki so proliferirali ob stimulaciji z antigenom je višji ($\bar{x} = 24,29$ % EdU pozitivnih limfocitov) in statistično značilno večji od negativne kontrole ter oseb z negativnim statusom okužbe ($p < 0,001$).



Slika 19: Proliferativni odziv limfocitov, ki na celični površini izražajo molekulo CD3+ v nestimuliranih vzorcih, vzorcih stimuliranih z antigenom *T. gondii* ter vzorcih stimuliranih s PHA, pri obeh skupinah preiskovancev po 6-dnevni inkubaciji. S kvartilnimi diagrami je prikazana razpršenost deležev vseh novonastalih limfocitov T, v katere se je vgradil EdU. Diagram predstavlja

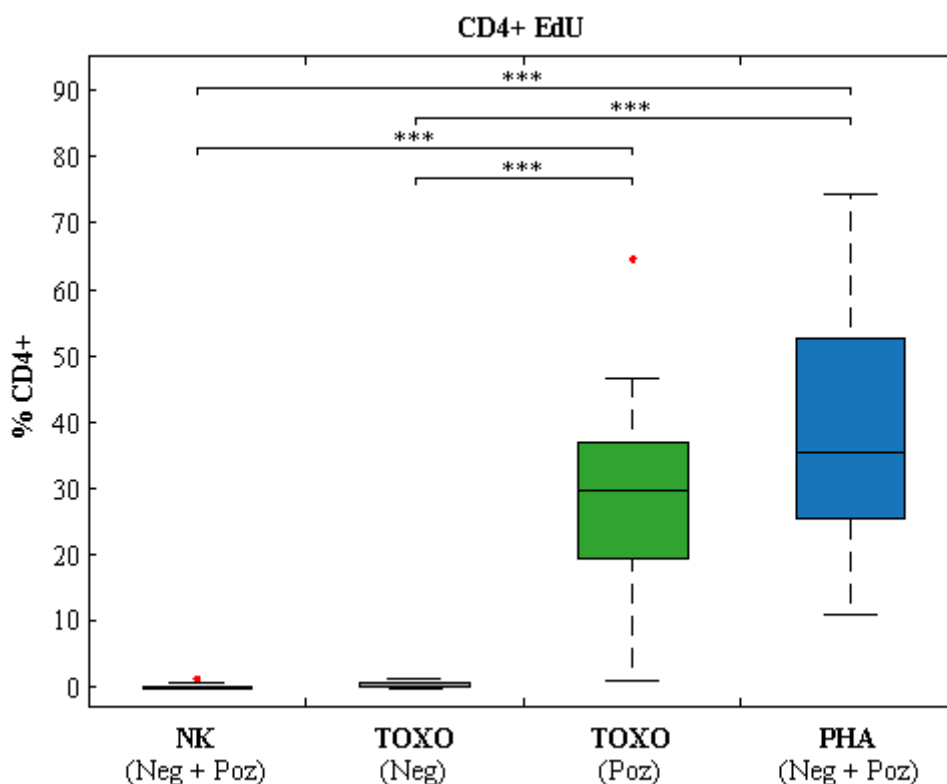
vrednosti med prvim in četrtem kvartilom, mejni črti pa vrednosti med prvim in desetim decilom, črta na sredini pa mediano. Točke izven diagramov predstavljajo ekstremne vrednosti.

Legenda: NK (negativna kontrola); PHA (fitohemaglutinin); TOXO (antigen *T. gondii*); Neg (preiskovanci z negativnim statusom okužbe); Poz (preiskovanci s statusom stare okužbe)

Opombe: * $0,01 \leq p < 0,05$; ** $0,001 \leq p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.3.3 Proliferacija in izražanje CD4+

Na sliki 4 opazimo visoko stopnjo proliferacije limfocitov, ki izražajo molekulo CD4+ (celice T pomagalk) ob stimulaciji s PHA ($\bar{x} = 39,25$ % EdU pozitivnih limfocitov), ki pa se tokrat statistično značilno ne razlikuje od proliferacije preiskovancev s staro okužbo s *T. gondii* ($\bar{x} = 29,12$ % EdU pozitivnih limfocitov). Zadnja je značilno višja v primerjavi z vzorci negativne kontrole ter vzorci preiskovancev z negativnim statusom okužbe ($\bar{x} = 0,24$ %; $\bar{x} = 0,49$ % EdU pozitivnih limfocitov; $p < 0,001$).



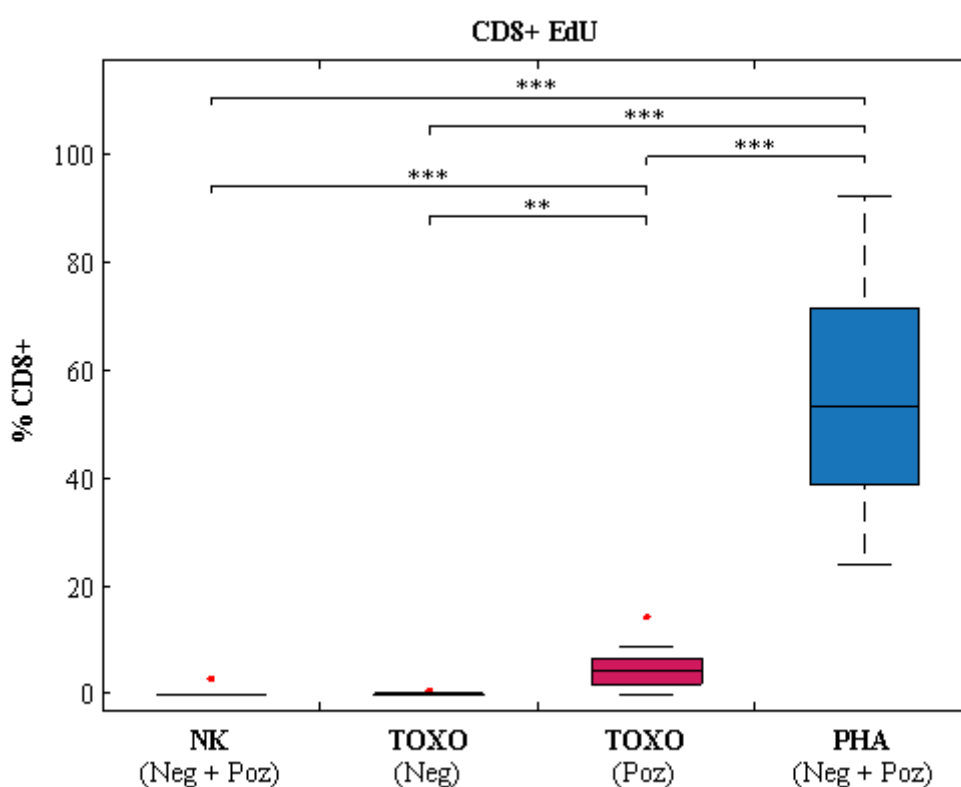
Slika 20: Proliferativni odziv limfocitov, ki na celični površini izražajo molekulo CD4+ v nestimuliranih vzorcih, vzorcih stimuliranih z antigenom *T. gondii* ter vzorcih stimuliranih s PHA, pri obeh skupinah preiskovancev po 6 dnevni inkubaciji. S kvartilnimi diagrami je prikazana razpršenost deležev vseh novonastanih limfocitov T pomagalk, v katere se je vgradil EdU. Diagram predstavlja vrednosti med prvim in četrtim kvartilom, mejni črti pa vrednosti med prvim in desetim decilom, črta na sredini pa mediano. Točke izven diagramov predstavljajo ekstremne vrednosti.

Legenda: NK (negativna kontrola); PHA (fitohemaglutinin); TOXO (antigen *T. gondii*); Neg (preiskovanci z negativnim statusom okužbe); Poz (preiskovanci s statusom stare okužbe)

Opombe: * $0,01 \leq p < 0,05$; ** $0,001 \leq p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.3.4 Proliferacija in izražanje CD8+

Odstotek proliferiranih limfocitov ob stimulaciji s PHA je najvišji pri celicah, ki na svoji površini izražajo molekulo CD8+ (citotoksične celice T) ($\bar{x} = 55,18$ % EdU pozitivnih limfocitov). Stopnja proliferacije pri preiskovancih s staro okužbo pa je najnižja v primerjavi z ostalimi tipi limfocitov ($\bar{x} = 4,63$ % EdU pozitivnih limfocitov) a se kljub temu statistično značilno razlikuje od vzorcev negativne kontrole ($\bar{x} = 0,18$ % EdU pozitivnih limfocitov; $p < 0,01$) ter vzorcev preiskovancev z negativnim statusom okužbe ($\bar{x} = 0,23$ % EdU pozitivnih limfocitov; $p < 0,001$).



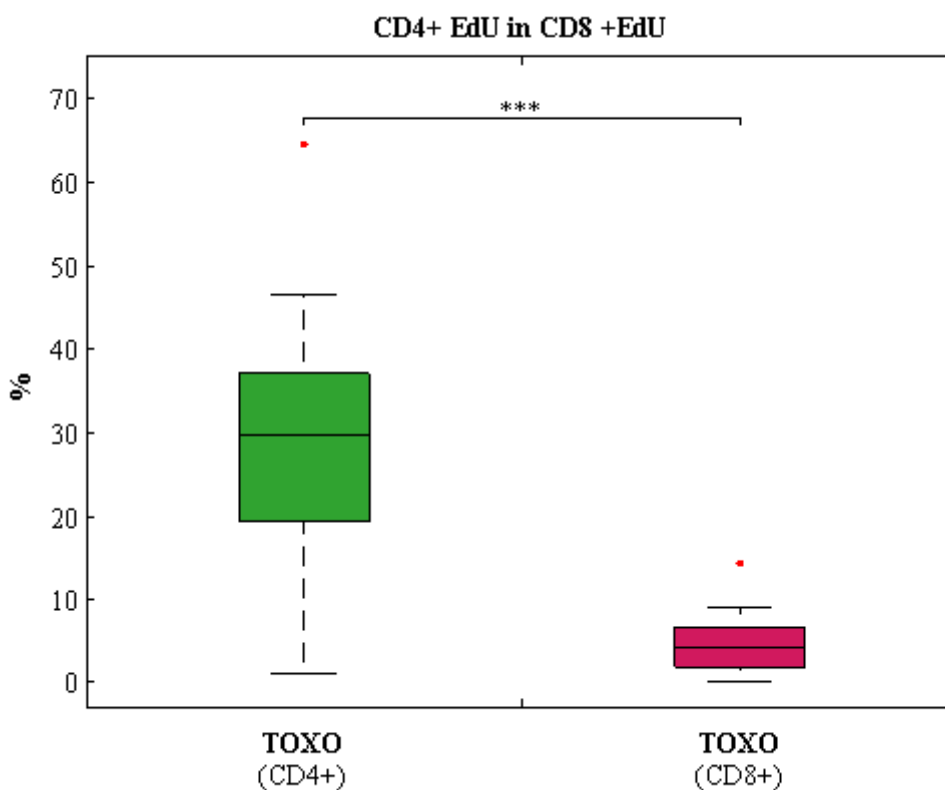
Slika 21: Proliferativni odziv limfocitov, ki na celični površini izražajo molekulo CD8+ v nestimuliranih vzorcih, vzorcih stimuliranih z antigenom *T. gondii* ter vzorcih stimuliranih s PHA, pri obeh skupinah preiskovancev po 6-dnevni inkubaciji. S kvartilnimi diagrami je prikazana razpršenost deležev vseh novonastanih citotoksičnih limfocitov T, v katere se je vgradil EdU. Diagram predstavlja vrednosti med prvim in četrtem kvartilom, mejni črti pa vrednosti med prvim in desetim decilom, črta na sredini pa mediano. Točke izven diagramov predstavljajo ekstremne vrednosti.

Legenda: NK (negativna kontrola); PHA (fitohemaglutinin); TOXO (antigen *T. gondii*); Neg (preiskovanci z negativnim statusom okužbe); Poz (preiskovanci s statusom stare okužbe)

Opombe: * $0,01 \leq p < 0,05$; ** $0,001 \leq p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.3.5 Proliferacija limfocitov CD4+ v primerjavi z limfociti CD8+

Slika 22 prikazuje stopnjo proliferacije limfocitov preiskovancev s statusom stare okužbe, katerih vzorce smo stimulirali z antigenom *T. gondii*. Proliferacija limfocitov, ki na svoji površini izražajo molekulo CD4+ je značilno višja od proliferacije tistih, ki izražajo molekulo CD8+ ($p < 0,001$).



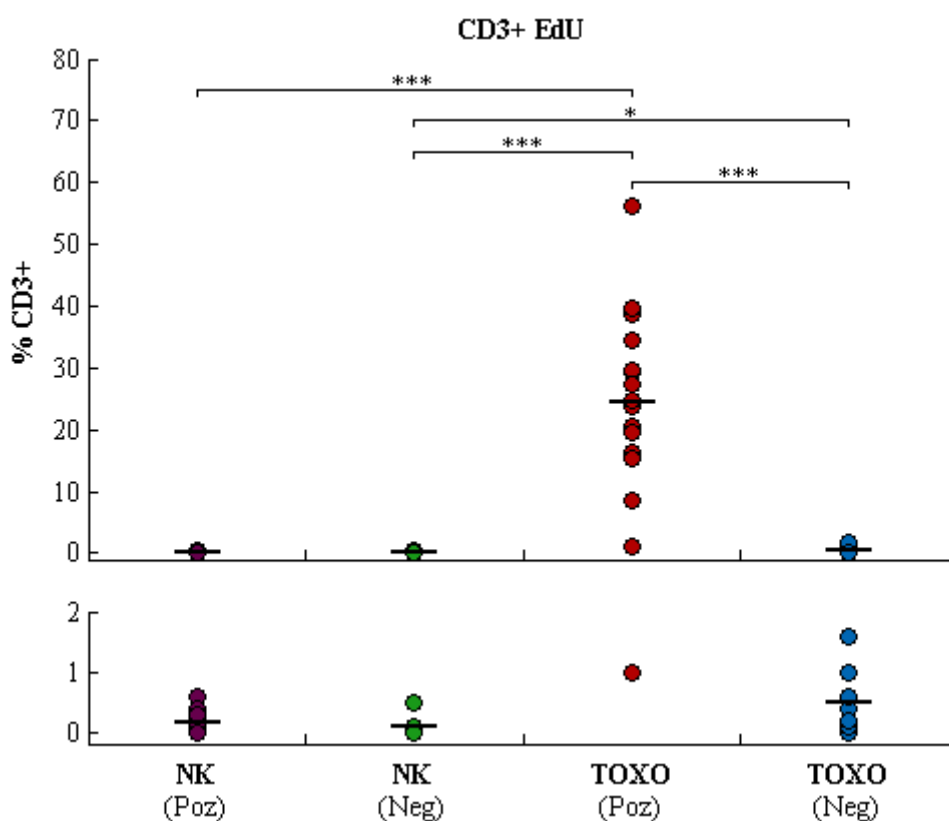
Slika 22: Proliferativni odziv limfocitov, ki na celični površini izražajo molekulo CD4+ in CD8+ v vzorcih stimuliranih z antigenom *T. gondii* pri skupini preiskovancev s staro okužbo po 6-dnevni inkubaciji. S kvartilnimi diagrami je prikazana razpršenost deležev vseh novonastanih citotoksičnih limfocitov T, v katere se je vgradil EdU. Diagram predstavlja vrednosti med prvim in četrtem kvartilom, mejni črti pa vrednosti med prvim in desetim decilom, črta na sredini pa mediano. Točke izven diagramov predstavljajo ekstremne vrednosti.

Legenda: TOXO (antigen *T. gondii*); CD4+ (limfociti T pomagalke); CD8+ (citotoksični limfociti T)

Opombe: * $0,01 \leq p < 0,05$; ** $0,001 \leq p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.3.6 Točkovni diagram proliferacije limfocitov CD3+

Na sliki 23 je prikazana proliferacija limfocitov T (CD3+) pri preiskovancih z negativnim in pozitivnim statusom okužbe, kot odgovor na stimulacijo z antigenom *T. gondii*. Stopnja proliferacije pri preiskovancih s staro okužbo je ob stimulaciji statistično značilno višja od: z antigenom stimuliranih vzorcev negativnih preiskovancev ($p < 0,001$), negativne kontrole negativnih preiskovancev ter negativne kontrole pozitivnih preiskovancev ($p < 0,001$ pri obeh). Razlike znotraj skupin pa se kažejo tudi med negativno kontrolo ($\bar{x} = 0,1$ % EdU pozitivnih limfocitov) ter vzorci, z antigenom stimuliranih, negativnih preiskovancev ($\bar{x} = 0,48$ % EdU pozitivnih limfocitov; $p = 0,017$).



Slika 23: Proliferativni odziv limfocitov T (CD3+) serološko pozitivnih in negativnih oseb na okužbo s *T. gondii* ob stimulaciji z antigenom v primerjavi z nesimuliranimi vzorci (negativna kontrola) istih preiskovancev. Slika je razdeljena na dva odseka istega grafa, pri čemer je spodnji odsek povečava zgornjega med vrednostmi 0 in 2 %. Vsaka točka na diagramu predstavlja odstotek proliferiranih limfocitov, v katere se je vgradil EdU, pri vsakem posamezniku. Vmesna črta predstavlja povprečno vrednost vzorca.

Legenda: NK (negativna kontrola); TOXO (antigen *T. gondii*); Neg (preiskovanci z negativnim statusom okužbe); Poz (preiskovanci s statusom stare okužbe); % CD3+ (odstotek limfocitov T)

4.4 MERJENJE KONCENTRACIJE CITOKINA IFN- γ

Za primerjavo citokinskega in proliferativnega odziva preiskovancev smo izvedli relativno preprost *in vitro* test za merjenje koncentracije citokina IFN- γ po stimulaciji krvi z antigenom *T. gondii*. Poleg omenjenega testnega vzorca smo izvedli še pozitivno kontrolo s PHA stimulacijo celic, s čimer smo preverili funkcionalnost limfocitov oz. njihovo zmožnost produkcije citokinov. V izogib spontani aktivaciji in tvorbi citokinov, pa smo izvedli tudi negativno kontrolo, kjer vzorcu krvi nismo dodali ničesar. Inkubacija je potekala 24 ur, temu pa je sledil odvzem krvne plazme ter njeno shranjevanje pri -20 °C.

Za kasnejše vrednotenje citokinskega odziva smo preiskovance razdelili v dve skupini na podlagi njihovega serološkega statusa okužbe s *T. gondii*, na kontrolno skupino oseb z negativnim statusom okužbe (N = 19) ter testno skupino oseb s statusom stare okužbe (N = 20).

V preglednici 7 in 8 sta podana povprečna vrednost ter standardni odklon deležev celic v vzorcu za vsak posamezen protokol: NK (negativna kontrola, brez celičnih spodbujevalcev), PHA (stimulacija s PHA) ter TOXO (stimulacija z antigenom *T. gondii*).

Preglednica 7: Opisne statistike koncentracij citokina interferon gama (IFN- γ) pri osebah z negativnim statusom okužbe po stimulaciji z mitogenom PHA in antigenom *T. gondii*. Podano je število preiskovancev oz. podatkov za vsakega izmed protokolov, povprečna vrednost ter standardni odklon.

	NK	PHA	TOXO
N	19	19	19
\bar{x}	18,37	5132,79	19,22
SD	13,69	4641,92	14,37

Legenda: NK (negativna kontrola); PHA (fitohemaglutinin); TOXO (antigen *T. gondii*); N (število preiskovancev); \bar{x} (povprečna vrednost); SD (standardni odklon)

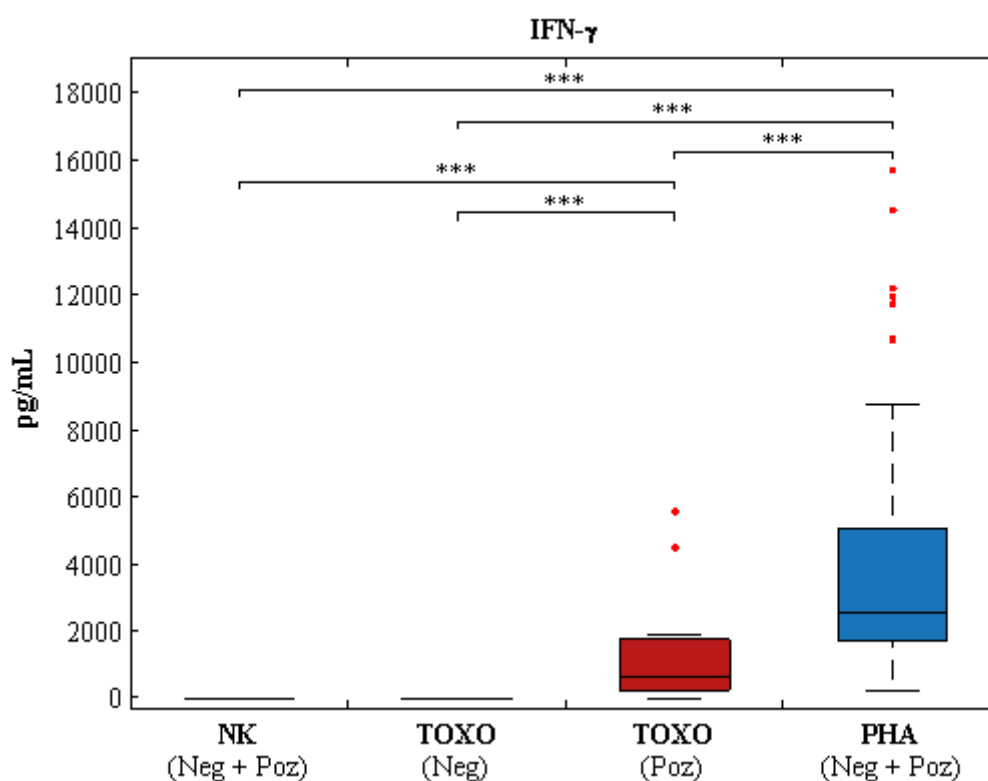
Preglednica 8: Opisne statistike koncentracij citokina interferon gama (IFN- γ) pri osebah s statusom stare okužbe po stimulaciji z mitogenom PHA in antigenom *T. gondii*. Podano je število preiskovancev oz. podatkov za vsakega izmed protokolov, povprečna vrednost ter standardni odklon.

	NK	PHA	TOXO
N	20	20	20
\bar{x}	15,88	4679,1	1217,21
SD	17,64	6700,35	1460,42

Legenda: NK (negativna kontrola); PHA (fitohemaglutinin); TOXO (antigen *T. gondii*); N (število preiskovancev); \bar{x} (povprečna vrednost); SD (standardni odklon)

4.4.1 Tvorba citokina IFN- γ

Iz slike 24 je razvidna močno povečana produkcija citokinov IFN- γ v vzorcih stimuliranih s PHA ($\bar{x} = 4901,1$ pg/mL). Ta se statistično značilno razlikuje od vzorcev negativne kontrole ($\bar{x} = 17,1$ pg/mL; $p < 0,001$) ter vzorcev negativnih preiskovancev, stimuliranih z antigenom ($\bar{x} = 19,22$ pg/mL; $p < 0,001$). Statistično značilno višja koncentracija se kaže tudi v primerjavi z vzorci preiskovancev, ki imajo status stare okužbe ($\bar{x} = 1217,21$ pg/mL; $p < 0,001$). Diagnostično pomembnejše je, da so ti značilno precej višji tako od vzorcev negativne kontrole ($p < 0,001$), kot tudi od vzorcev neokuženih preiskovancev, stimuliranih z antigenom ($p < 0,001$).



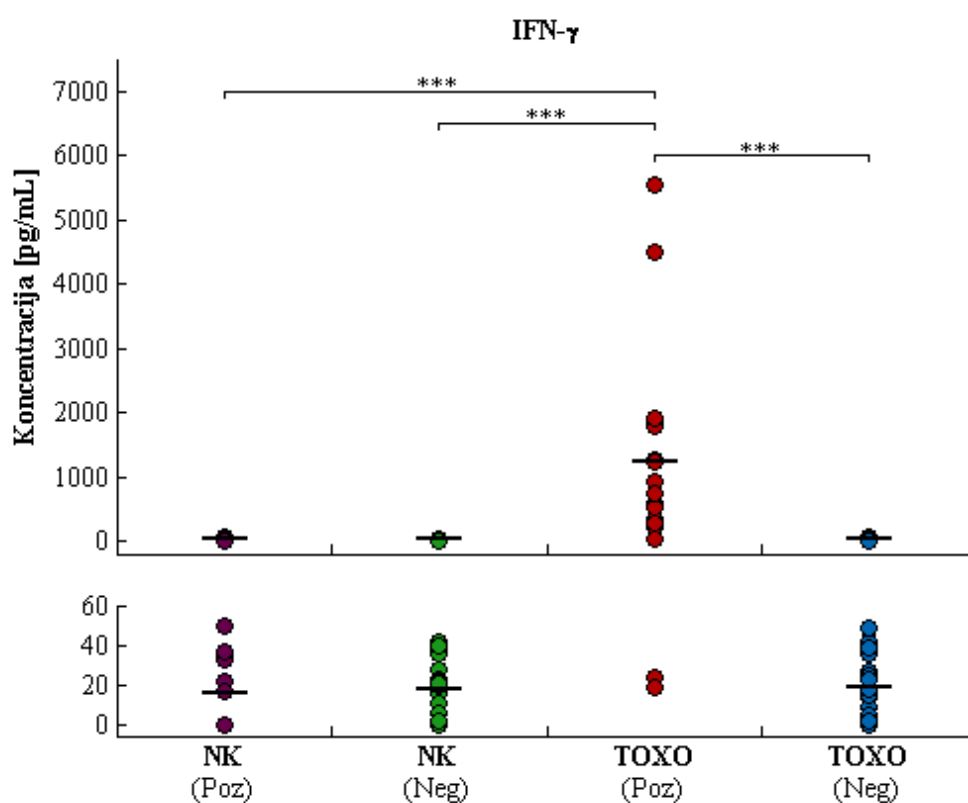
Slika 24: Prikaz razpršenosti koncentracij citokina IFN- γ v supernatantih kultur mononuklearnih celic v nestimuliranih vzorcih, vzorcih stimuliranih z antigenom *T. gondii* ter vzorcih stimuliranih s PHA pri obeh skupinah preiskovancev po 24-urni inkubaciji. Koncentracije citokina so podane v pg/mL. Diagram predstavlja vrednosti med prvim in četrtim kvartilom, mejni črti pa vrednosti med prvim in desetim decilom, črta na sredini pa mediano. Točke izven diagramov predstavljajo ekstremne vrednosti.

Legenda: NK (negativna kontrola); PHA (fitohemaglutinin); TOXO (antigen *T. gondii*); Neg (preiskovanci z negativnim statusom okužbe); Poz (preiskovanci s statusom stare okužbe)

Opombe: * $0,01 \leq p < 0,05$; ** $0,001 \leq p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.4.2 Točkovni diagram tvorbe citokina IFN- γ

Na sliki 25 je prikazana moč citokinskega odziva preiskovancev z negativnim in pozitivnim statusom okužbe, kot odgovor na stimulacijo z antigenom *T. gondii*. Slika je razdeljena na odseka istega grafa, pri čemer je spodnji odsek povečava zgornjega, med vrednostmi 0 in 60 pg/mL. Koncentracija citokinov IFN- γ v vzorcih preiskovancev s staro okužbo ($\bar{x} = 1217,21$ pg/mL) je statistično značilno višja od negativne kontrole preiskovancev s staro okužbo ($\bar{x} = 15,88$ pg/mL; $p < 0,001$) ter negativnih preiskovancev, ob stimulaciji z antigenom ($\bar{x} = 19,22$ pg/mL; $p < 0,001$).



Slika 25: Izločanje citokina IFN- γ serološko pozitivnih in negativnih oseb na okužbo s parazitom *T. gondii*, ob stimulaciji z antigenom, v primerjavi n nesimuliranimi vzorci (negativna kontrola) istih preiskovancev. Vsaka točka na diagramu predstavlja koncentracijo citokina v vzorcu krvne plazme vsakega posameznika. Vmesna črta predstavlja povprečno vrednost vzorca.

Legenda: NK (negativna kontrola); TOXO (antigen *T. gondii*); Neg (preiskovanci z negativnim statusom okužbe); Poz (preiskovanci s statusom stare okužbe)

Opombe: * $0,01 \leq p < 0,05$; ** $0,001 \leq p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.5 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST TESTA PROLIFERACIJE LIMFOCITOV TER TESTA IFN- γ

Za ovrednotenje uporabnosti proliferativnega odziva limfocitov za diagnostiko okužbe s parazitom *T. gondii* smo, na podlagi antigensko stimuliranih vzorcev serološko pozitivnih in negativnih preiskovancev, izdelali ROC krivuljo (Slika 26) ter izračunali vrednosti specifičnosti in občutljivosti obeh testov. Na koncu smo določili takšno mejno (»Cut Off«) vrednost ob kateri dosegamo najvišjo vrednost občutljivosti in specifičnosti. V preglednici 9 in 10 so prikazane različne karakteristike ROC krivulje (občutljivost, specifičnost, vrednost AUC, 95 % interval zaupanja, mejna »Cut Off« vrednost).

Iz preglednice 9 lahko razberemo, da največjo učinkovitost oz. natančnost dosežata meritev proliferacije na vseh limfocitih T (CD3+) ter meritev proliferacije na limfocitih T pomagalkah (CD4+). Z določitvijo mejne »Cut Off« vrednosti pri 1,6 za CD3+ in 1,4 za CD4+ je občutljivost testa proliferacije limfocitov 94 %, specifičnost pa kar 100 %.

Občutljivost IFN- γ testa je 90 %, specifičnost pa 100 % pri mejni »Cut Off« vrednosti 48,61 pg/mL (Preglednica 10).

Preglednica 9: Karakteristike ROC krivulje, izračunane na podlagi antigensko stimuliranih vzorcev serološko pozitivnih in negativnih preiskovancev za ovrednotenje testa proliferacije limfocitov. Podane karakteristike so: občutljivost, specifičnost, AUC – območje pod krivuljo, CI (interval zaupanja) ter mejna »Cut Off« vrednost.

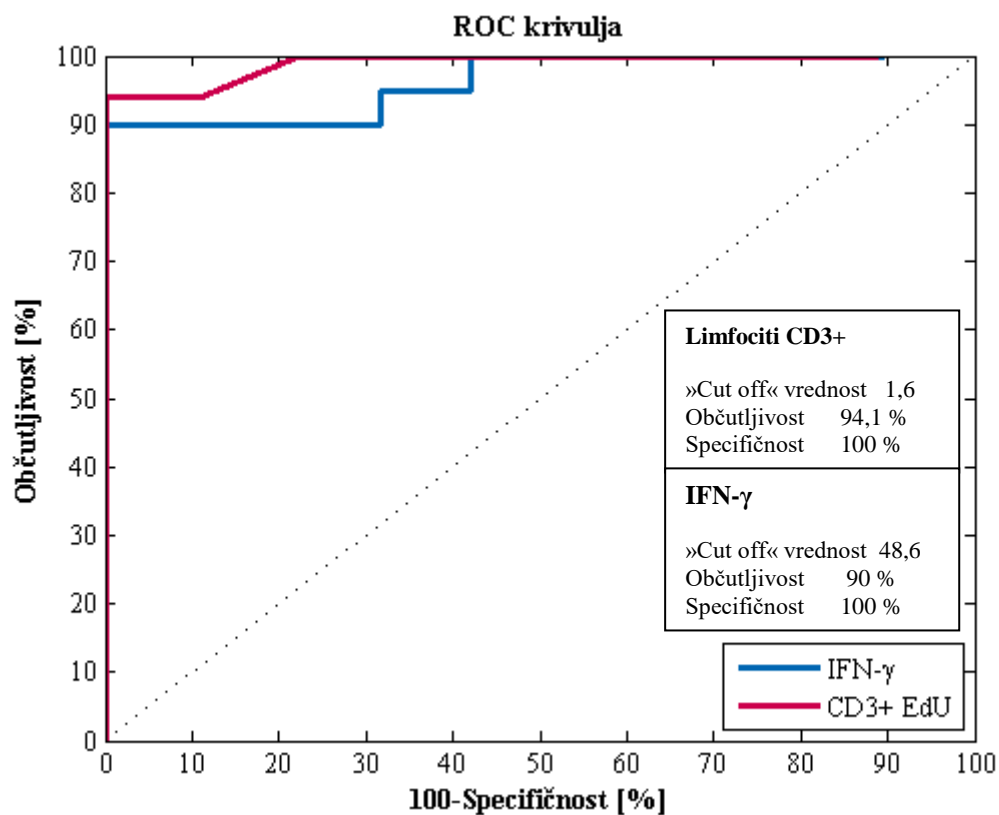
	Občutljivost*	Specifičnost*	AUC*	ROC območje (CI 95 %)		Mejna »Cut Off« vrednosti
CD3+	94,1	100	94,2	0,85	1,00	1,6
CD4+	94,1	100	96,9	0,90	1,00	1,4
CD8+	82,3	100	94,5	0,86	1,00	0,9
Limfociti	94,1	100	96	0,88	1,00	2,00

Opombe: * - odstotek [%]

Preglednica 10: Karakteristike ROC krivulje, izračunane na podlagi antigensko stimuliranih vzorcev serološko pozitivnih in negativnih preiskovancev za ovrednotenje testa IFN- γ . Podane karakteristike so: občutljivost, specifičnost, AUC – območje pod krivuljo, CI (interval zaupanja) ter mejna »Cut Off« vrednost.

	Občutljivost*	Specifičnost*	AUC*	ROC območje (CI 95 %)		Mejna »Cut Off« vrednosti
IFN-γ	90	100	95,2	0,88	1,00	48,61

Opombe: * - odstotek [%]



Slika 26: ROC krivulji za determinacijo specifičnosti in občutljivosti testa proliferacije limfocitov, ki izražajo površinski marker CD3+ (limfociti T) ter testa IFN- γ , za diagnostiko okužbe s parazitom *T. gondii*. ROC krivulji sta izrisani na podlagi različnih praznih vrednosti (angl. »threshold«), pri čemer so na y osi nanizane resnično pozitivne vrednosti (angl. »true-positive rate) na x osi pa lažno pozitivne vrednosti (angl. »false-positive rate).

5 RAZPRAVA

Okužba s parazitom *T. gondii* izzove izredno močno in dolgotrajno celično posredovano imunost, ki gostitelja obvaruje pred naglim razmnoževanjem invazivnih tahizoitov ter posledičnimi patološkimi spremembami (Denkers in Gazzinelli, 1998; Denkers, 1999). Kljub temu se ta lastnost ne uporablja v rutinskih preiskavah v diagnostične namene, kjer prevladujejo serološki testi na podlagi preverjanja prisotnosti specifičnih protiteles IgG in IgM (Logar, 1985). Takšna metoda je sicer povsem učinkovita za dokazovanje akutne in kronične okužbe pri odraslih ljudeh a se zaplete pri diagnostiki kongenitalne okužbe novorojenčkov, pri katerih materina protitelesa IgG ovirajo detekcijo otrokovih protiteles še do 12 mesecev po rojstvu. Zaradi tega je pri novorojenčkih bolj uveljavljena metoda ugotavljanja specifičnih protiteles IgM in IgA, ki pa v 75 % primerov ni učinkovita (Montoya in Liesenfeld, 2004).

5.1 TEST PROLIFERACIJE LIMFOCITOV

V okviru naše raziskave pa smo želeli preveriti *in vitro* celični test za ocenjevanje T celičnega odziva na stimulacijo z antigenom *T. gondii*. Ocenjevali smo izražanje različnih površinskih celičnih markerjev (CD3+, CD4+ in CD8+) ter z metodo pretočne citometrije merili stopnjo proliferativnega odziva limfocitov. Primerjali smo proliferativni odziv s parazitom neokuženih oz. serološko negativnih preiskovancev ter serološko pozitivnih preiskovancev s staro okužbo. Merjenja smo se lotili z detekcijo na novo sintetizirane DNA delečih se celic s pomočjo vgradnje analoga timidina - EdU. Takšna metoda je izredno občutljiva, hitrejša in varna alternativa dosedanjim metodam (vgradnja BrdU ali [³H]timidina), ki so navadno uporabljeni v raziskavah proliferativnega odziva limfocitov proti *T. gondii*.

V raziskavi smo za pozitivno kontrolo uporabili stimulacijo z rastlinskim mitogenom PHA. Ta spada v skupino lektinov, ki se vežejo na široko paleto ogljikovih hidratov, ki so del membranskih proteinov ter s tem nespecifično aktivirajo večino glikoproteinskih receptorjev, kar vodi v aktivacijo limfocita (Hamelryck in sod., 1996). Z dodatkom PHA smo torej izmerili zmožnost mehanizma proliferacije limfocitov ter ugotovili, da je bil proliferativni odziv močan ter prisoten pri vseh preiskovancih. Stopnja proliferacije limfocitov (tj. tistih v vgrajenim EdU) je segala od 39,3 % do 55,2 % pri različnih tipih limfocitov, kar nakazuje, da so limfociti vseh preiskovancev sposobni dobre blastne transformacije.

Po drugi strani pa je bil proliferativni odziv limfocitov vseh preiskovancev znotraj negativne kontrole komaj zaznaven. Vzorcem negativne kontrole nismo dodali nobenih celičnih stimulatorjev, s čimer se izognemo pojavu spontane proliferacije limfocitov ter s tem lažno pozitivnim rezultatom v poskusu. Izmerjene vrednosti (0,14 % - 0,37 % limfocitov z vgrajenim EdU) so bile tako nizke, da so zaradi same občutljivosti metode merjenja s pretočnim citometrom na pragu zaznave in s tem ne moremo zagotoviti povsem natančnih oz. relevantnih meritev proliferativnega odziva.

Enako dejstvo velja za vzorce serološko negativnih preiskovancev, ki smo jih stimulirali z antigenom toksoplazme, pri katerih smo prav tako izmerili komaj zaznaven proliferativni odziv. Ta je bil v povprečju sicer nekoliko višji (0,23 % - 0,78 %) od meritev pri vzorcih negativne kontrole a ponovno, ti podatki zaradi tako nizke proliferativne stopnje niso povsem relevantni.

S podobno situacijo so se soočili tudi francoski raziskovalci Purner in Chapey s sodelavci (Purner in sod., 1998; Chapey in sod., 2010), razloge za nizko aktivacijo limfocitov serološko negativnih preiskovancev pa lahko poiščemo v mehanizmu izjemne raznolikosti TCR, ki omogoča prepoznavo številnih tujih molekul (Coico in sod., 2003). Raziskovalci ocenjujejo, da pri človeku obstaja kar 25×10^6 različnih TCR (Arstila in sod., 1999), kar pravzaprav omogoča takšno izjemno antigensko specifičnost limfocitov in v osnovi tudi tvorbo klonske ekspanzije proti širokemu spektru tujih molekul (Ihan, osebna komunikacija). V našem primeru je, zaradi uporabe antigenskega lizata in s tem velikega števila potencialnih antigenov, morda prišlo do vezave enega takšnih antigenov na TCR naivnega limfocita, kar je posledično izzvalo primarni imunski odziv. S testom proliferacije, ki smo ga izvedli mi pa smo želeli izmeriti moč sekundarnega imunskega odziva, ki temelji na delovanju spominskih celic, ta je namreč hitrejši, učinkovitejši in obsežnejši od primarnega proliferativnega odziva (Owen in sod., 2013). Chapey ter Purner s sodelavci kot možnost navajajo tudi poliklonsko proliferacijo limfocitov ter navzkrižno reaktivnost TCR s strukturnimi proteini podobnimi tistim, ki jih imajo drugi prav tako patogeni predstavniki podrazreda *Coccidium* (Purner in sod., 1998; Chapey in sod., 2010).

A kot rečeno, so izmerjene proliferativne razlike tako majhne, da so komaj zaznavne in diagnostično pravzaprav nimajo pomena.

Diagnostično pomembnejši pa je dober proliferativni odziv limfocitov serološko pozitivnih preiskovancev na *in vitro* stimulacijo z antigenom *T. gondii*. Odstotek limfocitov z vgrajenim EdU smo merili na vseh limfocitih v kulturi, na limfocitih T

(CD3+), na limfocitih T pomagalkah (CD4+) in citotoksičnih limfocitih T (CD8+). Pri različnih tipih smo izmerili različno močan proliferativni odziv a se je izkazalo, da je bil ta vsakokrat statistično značilno višji od odziva pri negativni kontroli in seronegativnih preiskovancih, stimuliranih z istim antigenom. Vrednosti se gibljejo od 4,6 % do 29,1 % EdU pozitivnih limfocitov, pri čemer smo najnižjo proliferativno stopnjo izmerili pri CD8+ najvišjo pa pri CD4+ celicah.

Ob analizi rezultatov smo torej opazili precej velik razkorak med proliferativnim odzivom celic CD4+ in CD8+, kar sovпада z rezultati dveh predhodnih študij francoskih raziskovalcev (Kahi in sod., 1998; Purner in sod., 1998), kjer so ob stimulaciji človeških limfocitov z antigenom parazita ali s parazitom okuženimi APC, izmerili prevladujoč proliferativni odziv T celic pomagalk. Vzroki za tak odziv pa zaenkrat še niso povsem znani oz. raziskani. Predvidevamo, da ob izmerjenem močnem odzivu CD4+ limfocitov ($\bar{x} = 29,1$ % EdU pozitivnih celic) ni šlo le za toksoplazmo specifičen proliferativni odziv oz. je bila njihova aktivacija pospešena s strani citokinov iz drugih mononuklearnih celic (monociti) (Ihan, osebna komunikacija). Serološko pozitivne osebe, ki so okužbo s parazitom v preteklosti že prebolele, so razvile specifičen spominski odziv, v njihovi krvi pa poleg spominskih limfocitov ostaja tudi titer specifičnih protiteles IgG, ob nedavni okužbi tudi IgM (Robert-Gangneux in Darde, 2012). Če omenjenih protiteles po 6-dnevni inkubaciji nismo uspešno sprali med postopkom spiranja in priprave vzorcev za merjenje na pretočnem citometru, se ti ob prisotnosti antigenov nanje vežejo in tvorijo skupke oz. komplekse antigen-protitelo. To bi bil lahko povod za aktivacijo monocitov, ki s svojo produkcijo citokinov še pospešijo limfocitno proliferacijo. Lahko bi šlo torej za močan nespecifičen citokinski odziv v povezavi s specifičnimi citokini IL-2, ki jih izločajo aktivirane CD4+ celice. Kombinacija citokinov in številnih različnih antigenskih komponent, ki so posledica lizata antigena, lahko povzroči aktivacijo tudi takšnih klonov limfocitov, ki niso *T. gondii*-specifični (Ihan, osebna komunikacija).

Za ovrednotenje testa proliferacije limfocitov kot ustrezne diagnostične metode smo izbrali rezultate, ki smo jih z merjenjem na pretočnem citometru, pridobili na limfocitih T (CD3+). V ta namen smo izrisali ROC krivuljo ter izračunali diagnostično natančnost, občutljivost, specifičnost in mejno (ang. »Cut off«) vrednost metode za omenjene celice. Pri mejni vrednosti 1,6 % je občutljivost testa proliferacije limfocitov 94 %, specifičnost pa kar 100 %. Občutljivost testa je nižja, saj se je eden izmed 17 preiskovancev (5,9 %) izkazal za lažno negativnega, medtem ko lažno pozitivnih rezultatov pri tej mejni vrednosti ni.

5.2 TEST MERJENJA CITOKINA IFN- γ

Okužba s parazitom *T. gondii* aktivira celično posredovano imunost, katere rezultat je med drugim sinteza pomembnih citokinov IFN- γ , ključnih za obrambo in preživetje akutne faze okužbe (Sturge in Yarovinsky, 2014). Je osrednji mediator odpornosti, saj sproža številne efektorske mehanizme, ki pripomorejo k zatiranju in obvladovanju tako akutne kot kronične faze (Denkers in Gazzinelli, 1998), zaradi česar bi bilo merjenje prisotnosti omenjenega citokina dober pokazatelj predhodne okužbe. Zaradi tega smo se, za primerjavo s proliferativnim odzivom limfocitov, odločili preveriti še en *in vitro* test, ki temelji na visoko specifični in občutljivi kvantitativni metodi - encimsko imunskem testu ELISA.

Da je merjenje tvorbe citokina IFN- γ učinkovit test za diagnostiko, s *T. gondii* okuženih novorojenčkov, je leta 2010 že raziskoval francoski znanstvenik Chapey s sodelavci. V raziskavo je vključil 62 novorojenčkov, katerih matere so se okužile tekom nosečnosti. Na podlagi rezultatov so zaključili, da je specifičnost testa dosegla 94 %, občutljivost pa 98 %. Pri dveh novorojenčkih, katerih test se je izkazal za lažno negativnega so opazili znatno zvišanje koncentracije IFN- γ v krvi po prekinitvi zdravljenja, kar namiguje na to, da zdravljenje morda negativno vpliva na koncentracije IFN- γ v krvi okuženih oseb (Chapey in sod., 2010).

Rezultati naše raziskave pa so pokazali močan citokinski odziv ob stimulaciji celic z mitogenom PHA pri vseh serološko negativnih in pozitivnih preiskovancih (\bar{x} = 5132,8 pg/mL, pri negativnih preiskovancih; \bar{x} = 4679,1 pg/mL, pri pozitivnih preiskovancih), kar kaže na dobro odzivnost limfocitov in njihovo zmožnost izdelave IFN- γ . Po drugi strani, pa smo se z uvedbo negativne kontrole in odsotnostjo stimulatorjev v vzorcih krvi izognili možnosti spontanega izločanja citokinov. Koncentracije IFN- γ v vseh kontrolnih vzorcih so bile izredno nizke (\bar{x} = 18,4 pg/mL pri negativnih preiskovancih; \bar{x} = 15,9 pg/mL pri pozitivnih preiskovancih). Prav tako smo nizek citokinski odziv, ki se statistično ni razlikoval od negativne kontrole, izmerili pri serološko negativnih preiskovancih, ki smo jih stimulirali z antigenom (\bar{x} = 19,2 pg/mL). Povsem drugačen pa je citokinski odziv preiskovancev s staro okužbo, kjer smo po stimulaciji krvi z antigenom izmerili visoke koncentracijske vrednosti. V povprečju so vrednosti dosegale 1217,1 pg/mL, kar nakazuje na to, da je merjenje koncentracije IFN- γ dober pokazatelj za odkrivanje okužbe. Občutljivost testa dosega 90 %, specifičnost je 100 %, pri čemer smo »Cut off« mejo postavili pri vrednosti 48,6 pg/mL. Lažno pozitivnih rezultatov ob 100 % specifičnosti ni, 2 izmed 20 preiskovancev pa sta se izkazala za lažno negativna (10 %).

Če primerjamo oba testa in izpostavimo primernejšega za diagnostiko okužbe s parazitom *T. gondii* lahko rečemo, da ima test proliferacije limfocitov, ki na celični površini izražajo molekulo CD3+, z višjo stopnjo občutljivosti (94 %) in manjšim odstotkom lažno negativnih rezultatov (5,9 %), večjo diagnostično vrednost od testa pri katerem merimo koncentracijo nastalega citokina IFN- γ .

Raziskavo smo izvedli z namenom vzpostavitve in uveljavljanja nove diagnostične metode, ki bi bila v praksi uporabna predvsem za ugotavljanje kongenitalnih okužb novorojenčkov saj trenutna diagnostika ni dovolj natančna in zanesljiva glede na dejstvo, da ta zataji v enem od štirih primerov. V naši raziskavi smo sicer v večini uporabili vzorce odraslih preiskovancev, na katerih smo dokazali dober in diagnostično uporaben limfocitni odziv na stimulacijo s preiskovanim antigenom a smo poleg vzorcev odraslih pomerili tudi serološko negativna vzorca otroka starega 16 mesecev in novorojenčka starega 17 dni. Opazili smo, da se limfocitni odziv v nobenem izmed merjenih protokolov (CD3+, CD4+, CD8+, celokupni limfociti) ni razlikoval od odzivov, ki smo jih izmerili pri odraslih osebah. Poleg tega smo ob stimulaciji z mitogenom PHA izmerili dober oz. močan proliferativni odziv, nasprotno pa je bil pri negativni kontroli le-ta komaj zaznaven. O dobri zaznavnosti celične imunosti tako pri odraslih kot novorojenčkih ter primernosti proliferacije limfocitov za diagnostiko okužbe s parazitom *Toxoplasme gondi* pričajo tudi rezultati drugih raziskav.

Japonski znanstvenik Yano je že leta 1983 (Yano in sod., 1983) dokazal proliferativni odziv po stimulaciji z antigenom *Toxoplasme* tako pri okuženih novorojenčkih kot njihovih materah. Poleg tega se je proliferativni odziv limfocitov novorojenčka izkazal za hitrejšega in močnejšega od specifičnega protitelesnega odziva (Yano in sod., 1983), kar ustreza dejstvu, da specifična protitelesa IgG, IgM in IgA pričnejo nastajati šele znotraj dveh tednov ali celo kasneje po okužbi (Montoya 2004), medtem ko se aktivnost limfocitov vzpostavi že v roku nekaj dni po okužbi (Denkers in Gazzinelli 1998).

Fatoohi je s sodelavci leta 2003 preiskoval celični odziv na stimulacijo z antigenom *Toxoplasme*, pri 592 otrocih v različnih starostnih obdobjih (starih < 1 leto, starih > 1 leto, starih > 5 let). Rezultati so pokazali, da je celična imunost, kot odgovor na antigen parazita, zaznavna pri skoraj vseh okuženih osebah oz. pri 99 % oseb in kar je še pomembneje, pri skoraj vseh (95 %) kongenitalno okuženih novorojenčkih. Uporabili in ocenjevali pa so metodo proliferacije limfocitov, ki na svoji površini izražajo marker CD25 (receptor za IL-2), po vgradnji [³H]timidina. Metoda je dosegla 99 % občutljivost in 94 % specifičnost pri otrocih starejših od enega leta ter 95 % občutljivost in 89 % specifičnost pri otrocih mlajših od enega leta. Ob tem so diagnosticirali 10

kongenitalnih okužb, ki jih serološke preiskave niso odkrile. Poleg tega je pomembna ugotovitev raziskave ta, da se odstotki proliferiranih limfocitov, ki izražajo CD25, statistično ne razlikujejo med preiskovanci s kronično okužbo ter preiskovanci z nedavno serokonverzijo (Fatoohi in sod., 2003).

Limfocitno proliferacijo, pri 88 novorojenčkih starih manj kot 1 leto, so leta 2008 raziskali tudi italijanski raziskovalci, ki so prav tako uporabili metodo proliferacije limfocitov, ki na svoji površini izražajo marker CD25 po vgradnji [³H]timidina. Prikazali so močan proliferativni odziv s parazitom okuženih novorojenčkov in, kar je morda najpomembnejše, močan proliferativni odziv le-teh že v prvih dneh po rojstvu. S to metodo so pri dveh novorojenčkih, kljub negativnim serološkim rezultatom, uspešno diagnosticirali kongenitalno okužbo. S svojo raziskavo so prišli še do enega, za diagnostično uveljavljanje limfocitne proliferacije, izredno pomembnega odkritja, namreč specifični limfocitni odziv se, za razliko od protitelesnega odziva, ohranja tudi tekom zdravljenja kongenitalno okuženih novorojenčkov (Ciardelli in sod., 2008).

Na podlagi vseh pridobljenih informacij iz različnih raziskav ter pridobljenih rezultatov naše raziskave lahko torej predpostavimo, da je test proliferacije limfocitov, ki na svoji površini izražajo marker CD3+, primeren tudi za testiranje novorojenčkov ter s tem primerna alternativna metoda za diagnostiko kongenitalne toksoplazmoze že v prvih mesecih življenja. Gre za visoko občutljivo in specifično metodo, s katero bi se lahko izognili psihičnemu in fizičnemu stresu ponavljajočega se testiranja v prvem letu življenja otroka, omogočila pa bi tudi zgodnejšo odločitev za zdravljenje okužbe za katerega predvidevajo, da omili oz. izniči hujše bolezenske posledice v kasnejšem obdobju življenja.

6 SKLEPI

V okviru naše raziskave in iskanju nove, alternativne metode za diagnostiko kongenitalne toksoplazmoze smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Ob stimulaciji limfocitov z antigenom *T. gondii* dobimo dober in statistično značilno višji proliferativni odziv v vzorcih krvi serološko pozitivnih preiskovancev v primerjavi z ostalimi merjenimi vzorci, tj. serološko negativnih preiskovancev ter vzorci negativne kontrole.
- Jakost proliferativnega odziva na stimulacijo z antigenom *T. gondii* se razlikuje med različnimi tipi merjenih limfocitov (CD3, CD4, CD8). Najmočnejša proliferacija je prisotna pri limfocitih T pomagalkah, najšibkejša pa pri citotoksičnih limfocitih T.
- Pri vrednostih, ki so višje od 1,6 % EdU pozitivnih limfocitov je občutljivost testa proliferacije limfocitov 94 %, specifičnost pa 100 %.
- Ob antigenski stimulaciji limfocitov serološko pozitivnih preiskovancev smo izmerili visoke in statistično značilno višje koncentracijske vrednosti citokinov IFN- γ v primerjavi z vzorci serološko negativnih preiskovancev ter vzorci negativne kontrole.
- Pri vrednostih, ki so višje od 48,6 pg/mL je občutljivost testa IFN- γ 90 %, specifičnost pa 100 %.
- Ob primerjavi obeh testov se je izkazalo, da ima test proliferacije limfocitov, ki na celični površini izražajo molekulo CD3+, z višjo stopnjo občutljivosti (94 %) in manjšim odstotkom lažno negativnih rezultatov (5,9 %), večjo diagnostično vrednost od testa, pri katerem merimo koncentracijo nastalega citokina IFN- γ .
- Izsledki naše raziskave v kombinaciji z rezultati drugih raziskav na tem področju kažejo na to, da je test proliferacije limfocitov primeren za diagnostiko kongenitalne toksoplazmoze tudi pri novorojenčkih ter s tem predstavlja boljšo alternativo trenutnim serološkim testom.

7 POVZETEK

Toxoplasma gondii, znotrajcelični parazit iz podrazreda Coccidium, je povzročitelj ene najbolj pogostih in svetovno razširjenih bolezni, toksoplazmoze. Končnega gostitelja, znotraj katerega se parazit spolno razmnožuje, predstavljajo mačke (Felidae), vse ostale toplokrvne živali pa predstavljajo vmesne gostitelje (Robert-Gangneux, 2012). Gre za enega bolj uspešnih parazitov saj je, kljub svojemu obligatornemu znotrajceličnemu življenjskemu slogu, evolucijsko razvil izredno učinkovito tehniko razširjanja oz. razmnoževanja. Prvi pomemben vidik je zmožnost tvorbe znotrajceličnih cist v gostiteljskih tkivih ter njihova ponovna vrnitev v aktivno proliferativno fazo. To je pomembna evolucijska pridobitev, s katero se parazit, z namenom razširjanja v nove vmesne gostitelje, izogne potrebi po spolni reprodukciji. Drugi vidik pa je uspešno in množično klonsko razširjanje znotraj vmesnih gostiteljev z izredno invazivno in aktivno obliko tahizoita (Sullivan, 2011). Človek se večinoma okuži s tkivnimi cistami ob uživanju surovega mesa ter prek sporuliranih oocist, ki so v zunanje okolje zašle prek mačjih iztrebkov. Če do okužbe pride tekom življenja, po rojstvu, govorimo o pridobljeni oz. akvirirani toksoplazmozi, ki je pri zdravih, imunsko neoslabljenih ljudeh večinoma asimptomatična ali pa jo spremljajo le blagi, gripi podobni simptomi. Večje tveganje pa predstavlja prirojena ali kongenitalna toksoplazmoza, kjer gre za primarno okužbo nosečnice, parazit pa se preko posteljice prenese tudi na plod. Od časovnega okvirja materine primarne okužbe sta odvisna možnost vertikalnega prenosa ter obsežnost patoloških posledic za otroka. Te so lahko izrazite že v času razvoja otroka, kar vodi v obsežne anomalije ali celo splav. Lahko pa je otrok ob rojstvu posem asimptomatičen, vendar pa do bolezni običajno pride nekaj mesecev ali celo kar nekaj let kasneje.

Ključno vlogo pri odpornosti gostitelja na okužbo ima celično posredovana imunost, ki temelji predvsem na delovanju limfocitov T, tako celic T pomagalk (CD4+) kot tudi celic T ubijalk (CD8+). Oba tipa limfocitov T ob stiku z antigenom tvorita močan proliferativni odziv ter proizvajata in izločata visoke koncentracije citokina INF- γ , ki pa je pravzaprav osrednji mediator okužbe in ima poglobitno vlogo v obrambi tako v akutni kot kronični fazi okužbe, saj sproža pomembne efektorske mehanizme posredovane prek ostalih celic imunskega sistema.

Trenutna diagnostika okužbe temelji prav na seroloških tehnikah s katerimi se ugotavlja prisotnost specifičnih protiteles tipa IgG, IgM in IgA. Ta se je izkazala kot učinkovita restrospektivna metoda za določitev imunskega statusa odraslih oseb a ni najbolj

primerna za diagnostiko kongenitalne toksoplazmoze pri novorojenčkih, saj se je za uspešno izkazala le v 75 % vseh kongenitalno okuženih primerov (Montoya in Liesenfeld, 2004).

Z namenom iskanja natančnejše diagnostične metode smo tako z raziskavo preverili bistveno komponento adaptivnega imunskega sistema – celično proliferacijo. Mononuklearne celice iz vzorcev periferne krvi smo izpostavili antigenom *T. gondii*, ki so, v primeru predhodne senzibilizacije, izzvali njihovo proliferacijo. Proliferativni odziv smo nato izmerili na pretočnem citometru z metodo vgradnje analoga timidina – EdU v novonastalo DNK. S specifičnimi monoklonskimi protitelesi pa smo obenem tudi ugotavljali deleže določenih tipov limfocitov – CD3+, CD4+ in CD8+, ki so proliferirali. Odziv preiskovancev s staro okužbo smo nato primerjali z negativno kontrolo in preiskovanci z negativnim statusom okužbe. Rezultati so pokazali, da je proliferativni odziv limfocitov serološko pozitivnih preiskovancev pri različnih tipih limfocitov različno močan a vsakokrat statistično značilno višji od odziva pri negativni kontroli in serološko negativnih preiskovancih, stimuliranih z istim antigenom. Test se je tako izkazal za visoko občutljivega (94%) in specifičnega (100%) pri mejni vrednosti 1,6 %.

Poleg tega smo, za primerjavo s proliferativnim odzivom limfocitov, izvedli še en *in vitro* test z metodo ELISA, pri čemer smo merili koncentracijo nastalega citokina IFN- γ v krvi preiskovancev z negativnim statusom okužbe ter tistih s staro okužbo. Test se je pri mejni vrednosti 48,6 pg/mL izkazal za visoko občutljivega (90%) in specifičnega (100%) a je njegova diagnostična vrednost v primerjavi s testom proliferacije limfocitov nižja.

Ob primerjavi obeh testov smo zaključili, da je za diagnostiko okužbe s parazitom *T. gondii* primernejši test proliferacije limfocitov, ki na celični površini izražajo molekulo CD3+. Z višjo stopnjo občutljivosti (94 %) in manjšim odstotkom lažno negativnih rezultatov (5,9 %) je tako primeren kot ustrezna alternativna metoda dosednjim diagnostičnim testom.

8 VIRI

- Ajioka J. W., Soldati D. 2007. *Toxoplasma: Molecular and Cellular Biology*. Norfolk, Horizon Bioscience: 626 str.
- Arias I., Sorlozano A., Villegas E., de Dios Luna J., McKenney K., Cervilla J., Gutierrez B., Gutierrez J. 2012. Infectious agents associated with schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophrenia Research*, 136, 1-3: 128-136
- Arstila T. P., Casrouge A., Baron V., Even J., Kanellopoulos J., Kourilsky P. 1999. A direct estimate of the human alpha T cell receptor diversity. *Science*, 286, 5441: 958-961
- Bell S. P., Dutta A. 2002. DNK replication in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry*, 71: 333-374
- Bessières M. H., Berrebi A., Rolland M., Bloom M. C., Roques C., Cassaing S., Courjault C., Séguéla J. P. 2001. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. *The European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 94, 1: 37-45
- Biotinylation. Illinois, Thermo Fisher Scientific Inc.
<https://www.lifetechnologies.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/biotinylation.html> (22. avg. 2015)
- Boyer R. F. 2005. *Temelji biokemije*. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Buck S.B., Bradford J., Gee K.R., Agnew B.J., Clarke S.T., Salic A. 2008. Detection of S-phase cell cycle progression using 5 ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *BioTechniques*, 44: 927-929
- Burnet F.M. 1959. *The clonal selection theory of acquired immunity*. London, The Syndics of the Cambridge University Press: 236 str.

Buzoni-Gatel D., Schulthess J., Menard L. C., Kasper L. H. 2006. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cellular Microbiology*, 8, 4: 535-544

CDC. 2013a. Unstained cyst of *Toxoplasma gondii*. Atlanta, CDC – Center for Disease Control and Prevention.

<http://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/gallery.html#cystunstained> (20. avg. 2015)

CDC. 2013b. *Toxoplasma gondii* sporulated oocyst in an unstained wet mount, viewed under differential interference contrast (DIC) microscopy. Atlanta, CDC – Center for Disease Control and Prevention.

<http://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/gallery.html#sporulated> (20. avg. 2015)

CDC. 2013c. Unsporulated *Toxoplasma gondii* oocyst in an unstained wet mount. Atlanta, CDC – Center for Disease Control and Prevention.

<http://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/gallery.html#unsporulated> (20. avg. 2015)

Chapey E., Wallon M., Debize G., Rabilloud M., Peyron F. 2010. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by using a whole-blood gamma interferon release assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 1: 41-45

Chen H. W., Heiniger H. J., Kandutsch A. A. 1975. Relationship Between Sterol Synthesis and DNA Synthesis in Phytohemagglutinin-Stimulated Mouse Lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 5: 1950-1954

Ciardelli L., Meroni V., Avanzini M. A., Bollani L., Tinelli C., Garofoli F., Gasparoni A., Stronati M. 2008. Early and accurate diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases*, 27, 2: 125-129

Click-iT® EdU Cell Proliferation Assays - Improve upon traditional methods for detecting and quantitating newly synthesized DNA. 2009. *BioPath Online Newsletter*. Illinois, Thermo Fisher Scientific Inc., 1, 9: 1.

<https://www.thermofisher.com/si/en/home/references/newsletters-and-journals/biopath-online/biopathonline-issues-2009/biopath-online-apr-2009.html> (30. avg. 2015)

- Coico R., Sunshine G., Benjamini E. 2003. Immunology: a short course. 5th ed. New Jersey, John Wiley & Sons Inc.: 361 str.
- Cook A.J.C., Gilbert R.E., Buffolano W., Zufferey J., Petersen E., Jenzm P.A. Foulon W., Semprini A.E., Dunn D.T. 2000. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. British medical journal (Clinical research ed.), 321, 7254: 142-147
- Costa da Silva R., Langoni H. 2009. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. Parasitology Research, 105, 4: 893-898
- Černilec M., Čurin Šerbec V., Galvani V., Ghielmetti M., Hartman K., Kopitar A. N., Koren S., Kosmač M., Ruprecht R., Vranac T. 2012. Priročnik za vaje pri predmetu Molekularna imunologija z imunokemijo za študente Biokemije. Ljubljana, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino: 70 str.
- Denkers E. Y. 1999. T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. Microbes and Infection, 1, 9: 699-708
- Denkers E. Y., Gazzinelli R. T. 1998. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. Clinical Microbiology Reviews, 11, 4: 569-588
- Dubey J. P., Frenkel J. K. 1972. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. The Journal of Protozoology, 19, 1: 155-177
- Dubey J. P., Lindsay D. S., Speer C. A. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cyst. Clinical Microbiology Reviews, 11, 2: 267-299
- ELISA Enzyme Substrates Selection Guide. Illinois, Thermo Fisher Scientific Inc. <https://www.lifetechnologies.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/elisa/elisa-enzyme-substrates-selection-guide.html> (22. avg. 2015)

- Dytham C. 2011. Choosing and using statistics: a biologist's guide. 3rd ed. West Sussex, Wiley-Blackwell: 298 str.
- Fatoohi A. F., Cozon G. J. N., Wallon M., Kahi S., Gay-Andrieu F., Greenland T., Peyron F. 2003. Cellular Immunity to *Toxoplasma gondii* in Congenitally Infected Newborns and Immunocompetent Infected Hosts. *European Journal of Clinical Microbiology*, 22: 181-184
- Finkelman F. D., Holmes J., Katona I. M., Urban J. F. Jr., Beckmann M. P., Park L. S., Schooley K. A., Coffman R. L., Mosmann T. R., Paul W. E. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annual Review of Immunology*, 8: 303-333
- French A. R., Holroyd E. B., Yang L., Kim S., Yokoyama W. M. 2006. IL-18 acts synergistically with IL-15 in stimulating natural killer cell proliferation. *Cytokine*, 35, 5-6: 229-234
- Gangneux J. P. 2010. Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 29, 1: 33-38
- Gazzinelli R. T., Denkers E. Y., Sher A. 1993. Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites. *Infectious agents and disease*, 2, 3: 139-149
- Gilbert R. E., Thalib L., Tan H. K., Paul M., Wallon M., Petersen E. 2007. Screening for congenital toxoplasmosis: accuracy of immunoglobulin M and immunoglobulin A tests after birth. *Journal of medical screening*, 14, 1: 8-13
- Givan A. L. 2001. *Flow Cytometry: First Principles*. 2nd ed. New Jersey, John Wiley & Sons Inc.: 296 str.
- Goldszmid R. S., Trinchieri G. 2012. The price of immunity. *Nature Immunology*, 13: 932-938

- Gras L., Gilbert R.E., Wallon M., Peron F., Cortina-Borja M. 2004. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. *Epidemiology and infection*, 132, 3: 541-548
- Hamelryck T. W., Dao-Thi M. H., Poortmans F., Chrispeels M. J., Wyns L., Loris R. 1996. The Crystallographic Structure of Phytohemagglutinin-L. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 34: 20479-20485
- Hirschhorn K., Bach F., Kolondny R. L., Firschein I. L., Hashem N. 1963. Immune Response and Mitosis of Human Peripheral Blood Lymphocytes *in vitro*. *Science*, 142, 3596: 1185-1187
- Hodgkin P. D., Hawkins E. D., Hasbold J., Gett A. V., Deenick E. K., Todd H. F., Hommel M. 2005. Monitoring T cell proliferation V: Analyzing T Cell Responses. How to analyze cellular immune responses against tumor associated antigens. Nagorsen D., Marincola F. M. (eds.). Dordrecht, Springer: 123-141
- Holt P., Jones C. 2000. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy*, 55, 8: 688-697
- Human IFN- γ ELISA Kit. 2012. Illinois, Thermo Fisher Scientific Inc.: 8 str. (Navodilo za uporabo)
- Ihan A., Kopitar A. N. 2010. Imunski sistem – celice in tkiva. V: *Imunološki priročnik*. Kotnik V. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo imunologijo: 71-103
- Jahan-Tigh R. R., Ryan C., Obermoser G., Schwarzenberger K. 2012. Flow Cytometry. *Journal of Investigative Dermatology*, 132: 1-6
- Jenum P., Stray-Pedersen B. 1998. Development of specific immunoglobulins G, M, and A following primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Journal of clinical microbiology*, 36, 10: 2907-2913

- Kahi S., Cozon G. J., Greenland T., Wallon M., Gay-Andrieu F., Peyron F. 1998. A rapid flow cytometric method to explore cellular immunity against *Toxoplasma gondii* in humans. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5, 6: 745-748
- Kang H., Remington J. S., Suzuki Y. 2000. Decreased Resistance of B Cell-Deficient Mice to Infection with *Toxoplasma gondii* Despite Unimpaired Expression of IFN- γ , TNF- α , and Inducible Nitric Oxide Synthase. *The Journal of Immunology*, 164, 5: 2629-2634
- Klein R., Schwenk M., Heinrich-Ramm R., Templeton D. M. 2009. Diagnostic relevance of the lymphocyte transformation test for sensitization to beryllium and other metals (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 76, 6: 129-1281
- Kuby J., Goldsby R. A., Kindt T. J., Osborne B. A. 2003. *Kuby Immunology*. 5th ed. New York, W.H. Freeman and Company: 554 str.
- Kusbeci O. Y., Miman O., Yaman M., Aktepe O.C., Yazar S. 2011. Could *Toxoplasma gondii* have any role in Alzheimer disease?. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 25, 1:1-3
- Lappalainen M., Hedman K. 2004. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 40, 1: 81-88
- Logar J. 1985. Kongenitalna toksoplazmoza v Sloveniji. *Zdravstveni vestnik*, 54: 369-373
- Logar J. 1999. *Parazitologija v medicini*. 1. izd. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 64-74
- Logar J. 2010. *Parazitologija človeka*. Radovljica, Didakta: 261 str.
- McAuley J. B. 2014. Congenital Toxoplasmosis. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 3, 1: 530-535

- Miller B. F., Keane C. B., O'Toole M. T. 2003. Miller-Keane Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health. 7th ed. Philadelphia, Saunders: 2272 str.
- Moncarda P., Montoya J. 2012. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10, 7: 815-828
- Montoya J. G., Lowe K. E., Clayberger C., Moody D., Do D., Remington J. S., Talib S., Subauste C. S. 1996. Human CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes are both cytotoxic to *Toxoplasma gondii* - infected cells. *Infection and Immunity*, 64, 1: 176-181
- Montoya J. G., Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *The Lancet*, 363: 1965-1976
- Morrisette N. S., Sibley L. D. 2002. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 1: 21-38
- Munoz M., Liesenfeld O., Heimesaat M. M. 2011. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunological Reviews*, 240, 1: 269-285
- Naessens A., Jenum P. A., Pollak A., Decoster A., Lappalainen M., Villena I., Lebech M., Stray-Pedersen B., Hayde M., Pinon J. M., Petersen E., Foulon W. 1999. Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: A multicenter evaluation. *The Journal of Pediatrics*, 135, 6: 714-719
- Nascimento F. S., Suzuki L. A., Rossi C. L. 2008. Assessment of the value of detecting specific IgA antibodies for the diagnosis of a recently acquired primary *Toxoplasma* infection. *Prenatal Diagnosis*, 28, 8: 749-752
- Nassif X., Bourdoulous S., Eugène E., Couraud P. O. 2002. How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier?. *Trends in Microbiology*, 10, 5: 227-232
- Ormerod M. G. 2008. Flow Cytometry: A Basic Introduction. California, De Novo: 116 str.

Overview of ELISA. Illinois, Thermo Fisher Scientific Inc.

<https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>
(18. avg. 2015)

Owen J. A., Punt J., Stranford S. A., Jones P. 2013. Kuby Immunology. 7th ed. New York, W.H. Freeman and Company: 832 str.

Pappas G., Roussos N., Falagas M. E. 2009. Toxoplasmosis snapshots: Epidemiology and Diagnosis of Toxoplasmosis global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. The International Journal for Parasitology, 39, 12: 1385–1394.

Pfefferkorn E. R. 1984. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81, 3: 908-912

Purner M. B., Berens R. L., Tomavo S., Lecordier L., Cesbron-Delauw M. F., Kotzin B. L., Curiel T. J. 1998. Stimulation of human T lymphocytes obtained from *Toxoplasma gondii*-seronegative persons by proteins derived from *T. gondii*. International Journal of Infectious Diseases, 177, 3: 746-753

Rachman M. 2014. Introduction to Flow Cytometry. Kidlington, AbD Serotec: 34 str.

Rakić P. 2002. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. Nature Reviews Neuroscience, 3, 1: 65-71

Robert-Gangneux F., Dupretz P., Yvenou C., Quinio D., Poulain P., Guiguen C., Scharton-Kersten T. M., Wynn T. A., Denkers E. Y., Bala S., Grunvald E., Hieny S., Gazzinelli R. T., Sher A. 1996. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. The Journal of Immunology, 157, 9: 4045-4054

Robert-Gangneux F., Darde M. L. 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clinical microbiology review, 25, 2: 264-296

Salic A., Mitchison T. J. 2007. A chemical method for fast and sensitive detection of DNK synthesis *in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105, 7: 2415-2420

Schwarcz R., Hunter C. A. 2007. *Toxoplasma gondii* and schizophrenia: linkage through astrocyte-derived kynurenic acid? Schizophrenia Bulletin, 33, 3: 652-653

Sher A., Oswald I. P., Hieny S., Gazzinelli R. T. 1993. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. The Journal of Immunology, 150, 9: 3982-3989

Simčič S. 2010. Uporaba imunoloških metod pri spoznavi bolezni. V: Imunološki priročnik. Kotnik V. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo imunologijo: 35-53

Song J., Lei F. T., Xiong X., Haque R. 2008. Intracellular Signals of T Cell Costimulation. Cellular & Molecular Immunology, 5, 4: 239-247

Stop Solution for TMB Substrates. Illinois, Thermo Fisher Scientific Inc.

<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/N600> (22. avg. 2015)

StudyBlue. 2015. *Toxoplasma gondii*. Michigan, StudyBlue Inc.

<https://www.studyblue.com/notes/note/n/lecture-17-protozoa-iii/deck/14274296>
(20. avg. 2015)

Sturge C. R., Yarovinsky F. 2014. Complex immune cell interplay in the IFN- γ response during *Toxoplasma gondii* infection. Infection and Immunity, 82, 8: 3090-3097

Sullivan W. J., Jeffers V. 2012. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. FEMS Microbiology Reviews, 36, 3: 717-733

Sun Ya., Sun Yu., Lin G., Zhang R., Zhang K., Xie J., Wang L., Li J. 2012. Multicolor Flow Cytometry Analysis of the Proliferations of T-Lymphocyte Subsets *In Vitro* by EdU Incorporation. Cytometry Part A, 81A, 10: 901-909

- Tenter A.M., Heckerroth A.R., Weiss L.M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. The International Journal for Parasitology, 30: 1217-1258
- Trickett A., Kwan Y. L. 2003. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. Journal of Immunological Methods, 275: 251-255
- Vozelj M. 1996. Imunologija: Enciklopedijski priročnik. 1.izd. Ljubljana, DZS: 373 str.
- Wang Q., Chan T. R., Hilgraf R., Fokin V. V., Sharpless K. B., Finn M. G. 2003. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. Journal of the American Chemical Society, 125, 11: 3192-3193
- Weiss L. M., Dubey J. P. 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. The International Journal for Parasitology, 39, 8: 895-901
- Woods Schindler L. 1991. Understanding the Immune System. Philadelphia, Diane Publishing Co.: 40 str.
- Yamamoto J. H., Vallochi A. L., Silveira C., Filho J. K., Nussenblatt R. B., Cunha-Neto E., Gazzinelli R. T., Belfort R. Jr., Rizzo L. V. 2000. Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. The Journal of infectious diseases, 181, 6: 2018-2022
- Yano A., Yui K., Yamamoto M., Aosai F., Furuta S., Kojima S. 1983. Immune Response to *Toxoplasma gondii*: *Toxoplasma*-Specific Proliferation Response of Peripheral Blood Lymphocytes from Patients with Toxoplasmosis. Microbiology and Immunology, 27, 5: 455-463
- Yarovinsky F. 2014. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. Nature Reviews Immunology, 14: 109-121
- ZAP-70 Total ELISA Kit antibody RabMab®. California, Epitomics - an Abcam Company
http://www.epitomics.com/products/product_info/1257 (30. avg. 2015)

ZAHVALA

V prvi vrsti bi se rada zahvalila vsem, ki so neposredno prispevali k nastanku moje magistrske naloge. Hvala mentorju prof. dr. Alojzu Ihanu, da mi je omogočil izdelavo takšne vsebinsko zanimive naloge pod okriljem Laboratorija za celično imunologijo, mi omogočil dodatno nabiranje laboratorijskih izkušenj ter njegovo strokovno znanje in nasvete med pisanjem same naloge.

Najlepše sem hvaležna tudi somentorici doc. dr. Andreji Nataši Kopitar, ki mi je pomagala pri laboratorijskem delu, mi svetovala in z optimističnimi nasveti pomagala, kadar ni šlo vse po načrtih. Iskreno sem hvaležna tudi za ves njen čas in trud, ki ga je vložila, brez nje raziskava in naloga ne bi bili takšni kot sta.

Hvala tudi recenzentu, prof. dr. Roku Kostanjšku, da ni spregledal niti najmanjše podrobnosti in je zato naloga še boljša ter za njegovo prijaznost in sproščeno vzdušje med sprejemanjem popravkov in konstruktivnih kritik.

Najlepša hvala tudi vsem zaposlenim v Laboratoriju za celično imunologijo, še posebej hvala Davidu, Ini, Mojci in Sabini, ki so mi pomagali pri laboratorijskem delu, mi dali kakšen uporaben nasvet in zame opravili kakšno malenkost, zaradi katere mi ni bilo potrebno zapravljati denarja za prevoz ☺.

Hvaležna sem tudi vsem, ki so za mojo raziskavo prostovoljno darovali svojo kri ter za prijazne medicinske sestre v ljubljanski porodnišnici, ki so bile, kljub natrpanemu delavniku, pripravljene sodelovati z mano in za potrebe raziskave kadarkoli odvzeti kri.

Izredno pa sem hvaležna tudi čisto vsem, ki sicer niso neposredno prispevali k moji magistrski nalogi a sem hvaležna, da so del mojega življenja.

Najprej hvala mojima staršema, mami in pokojnemu atju, ki bi bil name trenutno zagotovo ponosen ☺. Predvsem pa hvala mami za vso podporo v času študija, za vsa skuhana kosila in kave med pisanjem naloge, brez katerih bi to trajalo še malo dlje.

Hvaležna sem tudi vsem super prijateljem, Borisu, Leonu, Maji, Niki, Petri, Urši, Tei, Tanji in Tini ter vsem kul bio sošolcem (za naštevanje katerih žal nimam prostora ☺) brez katerih bi mi bilo zagotovo precej bolj dolgčas in ne bi imela prave motivacije ne za priden študij ne za pisanje naloge.

Nenazadnje pa se moram zahvaliti osebi, ki mi je najbolj stala ob strani in me podpirala kadarkoli je bilo to potrebno. Hvala mojemu fantu Markotu, za vse skupne zabavne in bolj resne trenutke ter za vso pomoč tudi ob študiju, brez tebe najbrž ne bi naredila vseh izpitov v prvo ☺.