

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Sanja STOPINŠEK

**POMEN GLIV V IMUNOPATOGENEZI  
SARKOIDOZE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Sanja STOPINŠEK

**POMEN GLIV V IMUNOPATOGENEZI SARKOIDOZE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE ROLE OF FUNGI IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF  
SARCOIDOSIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2011

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 26. seje Komisije za doktorski študij (po pooblastilu 30. seje Senata Univerze z dne 20.1.2009) je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti s področja mikrobiologije. Za mentorico je bila imenovana znan. sod. dr. Saša Simčič, univ. dipl. ing. kem. in za somentorico doc. dr. Marjeta Terčelj, dr. med.

Doktorska disertacija je zaključek univerzitetnega podiplomskega študija Biomedicine – področja mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za humoralno imunost in serološko diagnostiko glivičnih infekcij, v Laboratoriju za diagnostiko alergij in citokinov ter v Laboratorij za diagnostiko glivičnih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Mentorica: znan. sod. dr. Saša Simčič, univ. dipl. ing. kem.

Somentorica: doc. dr. Marjeta Terčelj, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Nina GUNDE-CIMERMAN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: znan. sod. dr. Saša SIMČIČ, univ. dipl. ing. kem.  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo  
in imunologijo

Članica: doc. dr. Marjeta TERČELJ, dr. med.  
Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za pljučne  
bolezni in alergije

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

Datum zagovora: 1.7.2011

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorandka:  
Sanja STOPINŠEK

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd  
DK 616.24-002+616-097:579.61:582.28(043)=163.6  
KG sarkoidoza/glive/plesni/koncentracija spor plesni/CFU/protitelesa proti glivam/mononuklearne celice periferne krvi/PBMC/beta-glukan/cimosan/hitosan/lipopolisaharidi/LPS/TNF- $\alpha$ /IL-6/IL-10/IL-12/IL-17/citokini  
AV STOPINŠEK, Sanja, univ. dipl. biol.  
SA SIMČIČ, Saša (mentorica)/TERČELJ, Marjeta (somentorica)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnkarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Univerzitetni podiplomski študij Biomedicine, področje mikrobiologije  
LI 2011  
IN POMEN GLIV V IMUNOPATOGENEZI SARKOIDOZE  
TD Doktorska disertacija  
OP X, 94 str., 5 pregl., 19 sl., 130 vir.  
IJ SI  
JI sl/en  
AI Sarkoidoza je granulomatozna bolezen neznanega vzroka, ki se najpogosteje pojavlja v pljučih. Epidemiološke in klinične študije opisujejo povezavo med sarkoidozo in življenjem v plesnivem okolju. Namen naše študije je bil ugotoviti pomen gliv v imunopatogenezi sarkoidoze. V zraku domačega okolja bolnikov s sarkoidozo in zdravih kontrol smo izmerili koncentracijo spor plesni v enotah, ki tvorijo kolonije na m<sup>3</sup> zraka (CFU/m<sup>3</sup>). V plazmi bolnikov s sarkoidozo in zdravih kontrol smo z encimsko imunskimi testi ELISA določili koncentracijo specifičnih protiteles proti glivam. Iz venske krvi bolnikov s sarkoidozo (N=22) in zdravih kontrol (N=20) smo izolirali mononuklearne celice periferne krvi (PBMC) s centrifugiranjem na gostotnem gradientu in jih spodbujali s komponentami celične stene gliv (KCSG), in sicer s topno in netopno obliko (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukana – kurdlna (BGT in BGN), cimosanom A (CIM) in hitosanom (HIT) (vsi 200  $\mu$ g/ml) v odsotnosti ali prisotnosti bakterijskega lipopolisaharida (LPS) (10 ng/ml). V supernatantih PBMC kultur smo nato po 4 urah določili koncentracijo TNF- $\alpha$  in po 18 urah IL-6, IL-10 in IL-12 s testi ELISA. Prav tako smo po 40 urah določili IL-17 odziv po spodbujanju PBMC bolnikov s sarkoidozo in zdravih kontrol s KCSG v odsotnosti ali prisotnosti ionomicina in forbol 12-miristat 13-acetata. Ugotovili smo, da so bolniki živeli v domačem okolju z dvakrat večjo koncentracijo plesni kot zdrave kontrole. Izpostavljenost glivam je dokazala tudi prisotnost višje koncentracije specifičnih protiteles proti glivam v plazmi bolnikov. KCSG, predvsem BGN, so imele močan vpliv na sintezo naravnih vnetnih citokinov v PBMC, ki so vpleteni v imunopatogenezo sarkoidoze. Pri sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS, so imele KCSG stimulatorne kot tudi inhibitorne učinke na sintezo vnetnih citokinov. Prav tako so vplivale na IL-17 odziv aktiviranih PBMC, ki lahko vodi do nastanka granulomov. Opažene *in vitro* učinke KCSG lahko povzročajo glive in njihove komponente celične stene v pogojih *in vivo* in povzročijo motnjo v normalnih imunskih odzivih in omogočajo razvoj in/ali vztrajanje različnih imunopatoloških dogodkov, ki lahko pri posameznikih z dedno nagnjenostjo vodijo do nastanka sarkoidoze.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
DC 616.24-002+616-097:579.61:582.28(043)=163.6  
CX sarcoidosis/fungi/moulds/mould spores concentration/CFU/antibodies against fungi/peripheral blood mononuclear cells/PBMC/beta-glucan/zymosan/chitosan/lipopolysaccharides/LPS/TNF- $\alpha$ /IL-6/IL-10/IL-12/cytokines  
AU STOPINŠEK, Sanja  
AA SIMČIČ, Saša (supervisor)/TERČELJ, Marjeta (co-advisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, University Postgraduate Study Programme in Biomedicine, Field: Microbiology  
PY 2011  
TI THE ROLE OF FUNGI IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF SARCOIDOSIS  
DT Doctoral dissertation  
NO X, 94 p., 5 tab., 19 fig., 130 ref.  
LA Sl  
AL sl/en  
AB Sarcoidosis is a granulomatous disease of unknown cause, that most commonly affects the lungs. Epidemiological and clinical studies describe the association between sarcoidosis and living in mouldy houses. The aim of our study was to determine the role of fungi in the immunopathogenesis of sarcoidosis. We measured the air concentration of mould spores in CFU/m<sup>3</sup> in the homes of patients with sarcoidosis and healthy controls. In the plasma of patients with sarcoidosis and healthy controls we measured the concentration of specific antibody against fungi by ELISA tests. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with sarcoidosis (N=22) and healthy subjects (N = 20) were isolated by density gradient centrifugation and stimulated *in vitro* with fungal cell wall agents (KCSG), namely soluble or particulate (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan - curdlan (BGT and BGN), zymosan A (CIM) or chitosan (HIT) (all 200  $\mu$ g/ml) in the absence or presence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) (10 ng/ml). The cytokine responses were measured as the production of TNF- $\alpha$  in cell culture supernatants after 4 hour incubation and IL-6, IL-10 and IL-12 after 18 hour incubation by ELISA tests. After 40 hour incubation we also measured IL-17 response after stimulation of PBMC with KCSG in the absence or presence of ionomycin and phorbol 12-myristate 13-acetate. Our results demonstrate that patients with sarcoidosis lived in the homes with significant two times higher concentration of mould compared to healthy controls. Exposure to fungi was also proven by the presence of specific antibodies against fungi in the plasma of patients with sarcoidosis. KCSG, particularly BGN had strong influence on the production of the innate inflammatory cytokines in PBMC, that are involved in the pathogenesis of sarcoidosis. When PBMC were stimulated simultaneously with KCSG and LPS stimulatory and inhibitory effects on the cytokine production were present. KCSG also influenced on the IL-17 response in the activated PBMC, which could lead to the granuloma formation. The described *in vitro* effects of KCSG might also be caused by fungi and their cell wall agents *in vivo* and cause a disruption in normal immune responses and allow the development and/or persistence of various immunopathological events that might lead to the development of sarcoidosis in individuals with genetic susceptibility.

## KAZALO VSEBINE

|   | str.      |
|---|-----------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA   | III       |
| KEY WORDS DOCUMENTATION   | IV        |
| KAZALO VSEBINE  | V         |
| KAZALO PREGLEDNIC   | VII       |
| KAZALO SLIK   | VIII      |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI  | IX        |
| <br>  |           |
| <b>1 UVOD</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 HIPOTEZE IN CILJI   | 2         |
| <b>2 PREGLED OBJAV</b>  | <b>3</b>  |
| 2.1 SARKOIDOZA  | 3         |
| <b>2.1.1 Epidemiologija sarkoidoze</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2.1.2 Klinična slika sarkoidoze</b>  | <b>4</b>  |
| 2.1.2.1 Pljučna sarkoidoza  | 4         |
| <b>2.1.3 Diagnostika sarkoidoze</b>   | <b>5</b>  |
| <b>2.1.4 Zdravljenje sarkoidoze</b>   | <b>6</b>  |
| <b>2.1.5 Etiologija sarkoidoze</b>  | <b>7</b>  |
| <b>2.1.6 Genetska nagnjenost do sarkoidoze</b>  | <b>9</b>  |
| 2.2 IMUNOPATOGENEZA SARKOIDOZE  | 10        |
| <b>2.2.1 Hipotetični model imunopatogeneze sarkoidoze</b>   | <b>10</b> |
| 2.2.1.1 Sarkoidozni antigen(i)  | 10        |
| 2.2.1.2 Sarkoidozni granulomi   | 11        |
| 2.2.1.3 Celice in citokini vpleteni v imunopatogenezo sarkoidoze  | 12        |
| 2.2.1.3.1 Alveolarni makrofagi in njihovi citokini  | 13        |
| 2.2.1.3.2 Limfociti T in njihovi citokini   | 15        |
| 2.2.1.3.3 Regulatorne celice T  | 16        |
| 2.2.1.4 Imunski paradoks  | 17        |
| 2.2.1.7 Fibroza   | 18        |
| 2.3 GLIVE   | 19        |
| <b>2.3.1 Celična stena gliv</b>   | <b>19</b> |
| 2.3.1.2 (1→3)-β-D-glukan  | 20        |
| 2.3.1.3 Hitin in hitosan  | 22        |
| <b>2.3.2 Glive in bolezni dihal</b>   | <b>23</b> |
| <b>3 MATERIAL IN METODE</b>   | <b>25</b> |
| 3.1 PREISKOVANCI  | 25        |
| 3.2 VZORČENJE ZRAKA   | 26        |
| 3.3 DOLOČANJE SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI GLIVAM   | 27        |
| <b>3.3.1 Določanje specifičnih protiteles IgG proti glivam</b>  | <b>27</b> |
| <b>3.3.2 Določanje specifičnih protiteles IgA, IgM in IgG proti <i>Aspergillus fumigatus</i> in <i>Candida albicans</i></b> | <b>28</b> |
| 3.4 REAGENTI IN KOMPONENTE CELIČNE STENE GLIV   | 29        |
| 3.5 IZOLACIJA IN SPODBUJANJE HUMANIH PBMC   | 30        |
| 3.6 TEST CITOTOKSIČNOSTI  | 31        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.7 DOLOČANJE CITOKINOV V SUPERNATANTIH CELIČNIH KULTUR<br>PBMC  | 32        |
| 3.8 SINERGISTIČNI INDEKS   | 32        |
| 3.9 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV   | 33        |
| <b>4 REZULTATI</b>   | <b>34</b> |
| 4.1 KONCENTRACIJA IN VRSTNA RAZNOLIKOST PLESNI V DOMAČEM<br>OKLJU BOLNIKOV S SARKOIDOZO  | 34        |
| <b>4.1.1 Primerjava med koncentracijo plesni v domačem okolju bolnikov s<br/>sarkoidozo in v domačem okolju zdravih kontrol</b>  | <b>34</b> |
| <b>4.1.2 Primerjava vrstne raznolikosti plesni v domačem okolju bolnikov s<br/>sarkoidozo in v domačem okolju zdravih kontrol</b>  | <b>35</b> |
| 4.2 PROTITELESNI ODZIV NA GLIVE PRI BOLNIKI S SARKOIDOZO   | 40        |
| <b>4.2.1 Primerjava koncentracij specifičnih protiteles IgG proti glivam v plazmi<br/>bolnikov s sarkoidozo in v plazmi zdravih kontrol</b>  | <b>40</b> |
| <b>4.2.2 Primerjava koncentracij specifičnih protiteles IgA, IgM in IgG proti<br/><i>Aspergillus fumigatus</i> in <i>Candida albicans</i> v plazmi bolnikov s sarkoidozo in v<br/>plazmi zdravih kontrol</b> | <b>42</b> |
| 4.3 POVEZAVA MED KONCENTRACIJO PLESNI V DOMAČEM OKOLJU IN<br>SPECIFIČNIMI PROTITELESNI PROTI PLESNIM V PLAZMI  | 44        |
| 4.4 CITOKINSKI ODZIV PBMC PO IN VITRO SPODBUJANJU S<br>KOMPONENTAMI CELIČNE STENE GLIV   | 48        |
| <b>4.4.1 Komponente celične stene gliv (KCSG)</b>  | <b>48</b> |
| <b>4.4.2 Citokinski odziv PBMC bolnikov s sarkoidozo po in vitro spodbujanju s<br/>komponentami celične stene gliv</b>   | <b>50</b> |
| 4.5 CITOKINSKI ODZIV PBMC BOLNIKOV S SARKOIDOZO PO<br>SOČASNEM IN VITRO SPODBUJANJU S KCSG IN LPS  | 53        |
| <b>4.5.1 IL-17 odziv PBMC bolnikov s sarkoidozo po sočasnem in vitro<br/>spodbujanju s KCSG ter ionomicinom in PMA</b>   | <b>59</b> |
| <b>5 RAZPRAVA</b>  | <b>62</b> |
| <b>6 SKLEPI</b>  | <b>75</b> |
| <b>7 POVZETEK</b>  | <b>77</b> |
| 7.1 SUMMARY  | 80        |
| ZAHVALA  |           |

## KAZALO PREGLEDNIC

|  |    |
|--|----|
| Preglednica 1: Razpon in povprečna koncentracija spor plesni (CFU/m <sup>3</sup> ) v zraku domačega okolja bolnikov s sarkoidozo in v zraku domačega okolja zdravih kontrol                            | 34 |
| Preglednica 2: Povprečna koncentracija izoliranih rodov plesni (CFU/m <sup>3</sup> ) v zraku domačega okolja bolnikov s sarkoidozo in v zraku domačega okolja zdravih kontrol                          | 36 |
| Preglednica 3: Povprečna koncentracija posameznih vrst plesni (CFU/m <sup>3</sup> ) v zraku domačega okolja bolnikov s sarkoidozo in v zraku domačega okolja zdravih kontrol                           | 38 |
| Preglednica 4: Povprečna koncentracija specifičnih protiteles IgG proti glivam v plazmi bolnikov s sarkoidozo in v plazmi zdravih kontrol  | 41 |
| Preglednica 5: Povprečna koncentracija specifičnih protiteles IgA, IgM in IgG proti <i>Aspergillus fumigatus</i> in <i>Candida albicans</i> v plazmi bolnikov s sarkoidozo in v plazmi zdravih kontrol | 43 |



## KAZALO SLIK

|  |    |
|--|----|
| Slika 1: Rentgenska slika prsnega koša, kjer je razvidna mediastinalna in hilusna limfadenopatija z infiltrati v pljučnem parenhimu  | 5  |
| Slika 2: Hipotetični model imunopatogeneze sarkoidoze  | 11 |
| Slika 3: Sarkoidozni nekazeozni granulom   | 12 |
| Slika 4: Povprečna koncentracija spor plesni (CFU/m <sup>3</sup> ) v zraku domačega okolja sarkoidoznih bolnikov in domačega okolja zdravih kontrol  | 35 |
| Slika 5: Primerjava povprečne koncentracije najpogostejših rodov plesni (CFU/m <sup>3</sup> ) v domačem okolju bolnikov s sarkoidozo in v domačem okolju zdravih kontrol   | 37 |
| Slika 6: Prikaz deležev najpogosteje izoliranih plesni (CFU/m <sup>3</sup> ) v zraku domačega okolja zdravih kontrol (A) in v zraku domačega okolja bolnikov s sarkoidozo (B)  | 39 |
| Slika 7: Primerjava koncentracij specifičnih protiteles IgG proti glivam v plazmi bolnikov s sarkoidozo in v plazmi zdravih kontrol  | 42 |
| Slika 8: Koncentracija protiteles IgA, IgM in IgG proti <i>Aspergillus fumigatus</i> in <i>Candida albicans</i> v plazmi zdravih kontrol in v plazmi bolnikov s sarkoidozo   | 44 |
| Slika 9: Povezava med koncentracijo plesni v domačem okolju in koncentracijo specifičnih protiteles proti plesnim v plazmi pri zdravih kontrolah (A) in pri bolnikih s sarkoidozo (B)  | 45 |
| Slika 10: Povezava med koncentracijo <i>Aspergillus</i> spp. In <i>Candida albicans</i> v domačem okolju in koncentracijo specifičnih protiteles IgA, IgM in IgG proti <i>Aspergillus fumigatus</i> in <i>Candida albicans</i> v plazmi pri zdravih kontrolah (A) in pri bolnikih s sarkoidozo (B) | 47 |
| Slika 11: Sinteza TNF- $\alpha$ v humanih PBMC po <i>in vitro</i> spodbujanju z LPS (A) ali različnimi KCSG (B)  | 49 |
| Slika 12: Citokinski odziv PBMC bolnikov s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi kontrolami po <i>in vitro</i> spodbujanju s KCSG   | 52 |
| Slika 13: IL-17 odziv PBMC bolnikov s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi kontrolami po <i>in vitro</i> spodbujanju s KCSG  | 53 |
| Slika 14: TNF- $\alpha$ odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS   | 55 |
| Slika 15: IL-6 odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS  | 56 |
| Slika 16: IL-10 odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS   | 57 |
| Slika 17: IL-12 odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS   | 58 |
| Slika 18: Vpliv KCSG na sintezo TNF- $\alpha$ , spodbujeno z LPS v PBMC  | 59 |
| Slika 19: IL-17 odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG ter ionomicinom in PMA   | 61 |

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|        |   |
|--------|---|
| ACE    | angiotenzin konvertaza                                  |
| APC    | antigen predstavitvene celice                           |
| AM     | alveolarni makrofagi                                    |
| BAI    | bronhoalveolarni izpirek                                |
| BGT    | topni (1→3)-β-D-glukan                                  |
| BGN    | netopni (1→3)-β-D-glukan                                |
| BTNL2  | protein podoben butirofilinu 2                          |
| CIM    | cimosan A   |
| CFU    | enote, ki tvorijo kolonije (angl. colony forming units) |
| CTO    | Hitotriozidaza  |
| CLR    | angl. C-type lectin receptor                            |
| DC     | dendritične celice                                      |
| ELISA  | encimsko imunski test                                   |
| GM-CSF | faktor, ki spodbuja razvoj granulocitov in makrofagov   |
| GPI    | glikozilfosfatidilinozitolne vezi                       |
| HIT    | Hitosan   |
| HLA    | humani levkocitni antigeni                              |
| IFN-γ  | interferon-γ  |
| IL     | Interlevkin   |
| KCSG   | komponente celične stene gliv                           |
| LPS    | Lipopolisaharid   |
| M-CSF  | faktor, ki spodbuja razvoj makrofagov                   |
| MHC    | poglavitni histokompatibilnostni kompleks               |
| mKatG  | mikobakterijska katalaza-peroksidaza                    |
| MR     | manozni receptor  |
| NAHA   | N-acetil-β-D-heksozaminidaza                            |
| NKT    | naravne celice T ubijalke                               |
| NO     | dušikov oksid   |
| ODTS   | angl. Organic dust toxic syndrom                        |
| TCR    | T-celični receptor                                      |
| Th     | celice T pomagalke (angl. T helper cells)               |
| TLR    | angl. Toll-like receptor                                |
| TNF-α  | dejavnik tumorske nekroze α                             |
| Treg   | regulatorne celice T                                    |
| PBMC   | mononuklearne celice periferne krvi                     |
| PMA    | forbol-12-miristat-13-acetat                            |
| PRR    | angl. pattern recognition receptors                     |
| SAA    | serumski amiloid A                                      |
| SBS    | angl. sick building syndrome                            |
| SI     | sinergistični indeks                                    |

## 1 UVOD

Sarkoidoza je večorganska granulomatozna bolezen neznanega vzroka, ki se najpogosteje pojavlja v mediastinalnih bezgavkah in pljučih. Pojavi se lahko v akutni obliki, ki se ponavadi spontano pozdravi, ali v kronični obliki, ki lahko napreduje v pljučno fibrozo. Diagnoza temelji na kliničnih in radioloških ugotovitvah, podprtih s histološkim dokazom nekazeoznih granulomov (Baughman, 2006).

Imunski mehanizmi pri razvoju sarkoidoze še niso povsem znani. Imunski odziv se očitno začne z antigenim dražljajem, ki ga skupaj z molekulami MHC II sprožijo makrofagi in aktivirajo limfocite T. Ta proces ima vse značilnosti prevlade odziva Th1. Sproščajo se citokini in kemokini, ki v tkivu povzročijo močno vnetje in nastanek granulomov. Okolje granulomov se lahko sčasoma spremeni v bolj Th2 podobno okolje, ki zmanjša intenzivnost tvorbe granulomov in vodi do nastanka fibroze (Gerke in Hunninghake, 2008).

Kljub številnim raziskavam ostaja etiologija sarkoidoze še vedno neznan. Prevladujoča hipoteza govori v prid enemu ali več okoljskih antigenov, ki sprožijo razvoj sarkoidoze pri posamezniku z dedno nagnjenostjo do bolezni (Nunes in sod., 2005). Epidemiološke študije opisujejo povezavo med sarkoidozo in življenjem v vlažnem in plesnivem okolju. Zadnje klinične raziskave Terčeljeve in sod. (2007; 2011) so pokazale uspešno zdravljenje sarkoidoze z antimikotiki pri dveh tretjinah bolnikov. Iz dosedanjih epidemioloških in kliničnih raziskav smo predhodno že postavili hipotezo, da imajo lahko glive etiopatogenetsko vlogo pri nastanku sarkoidoze. Glive imajo v celični steni biološko aktivne komponente, ki povzročajo različne imunološke in farmakološke učinke. Zato smo domnevali, da imajo etiopatogenetsko vlogo pri nastanku sarkoidoze prav preko neopredeljenega vpliva na imunske odzive, ki so pri bolnikih s sarkoidozo drugačni kot pri zdravih in vplivajo na nastanek granulomov.

## 1.1 HIPOTEZE IN CILJI

Namen doktorske naloge je ugotoviti pomen gliv v imunopatogenezi sarkoidoze. V ta namen smo postavili naslednje hipoteze:

- Pričakujemo, da živijo bolniki s sarkoidozo v okolju z večjo obremenjenostjo z glivami.
- Pričakujemo, da morebitna večja koncentracija protiteles proti glivam pri bolnikih s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi lahko pri bolnikih odraža večjo obremenitev okolja z glivami.
- Pričakujemo, da je v primerjavi z zdravimi ljudmi citokinski odziv mononuklearnih celic periferne krvi (PBMC) bolnikov s sarkoidozo pred terapijo drugačen po spodbujanju *in vitro* s komponentami celične stene gliv (KCSG).
- Pričakujemo, da je v primerjavi z zdravimi ljudmi modulacija citokinskega odziva PBMC *in vitro* po sočasnem spodbujanju PBMC z lipopolisaharidom (LPS) in KCSG drugačna kot pri bolnikih s sarkoidozo pred terapijo.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 SARKOIDOZA

Sarkoidoza je večorganska granulomatozna bolezen neznanega vzroka, ki se najpogosteje pojavlja v mediastinalnih bezgavkah in pljučih. Pojavi se lahko v akutni obliki, ki se po navadi spontano pozdravi, ali v kronični obliki, ki lahko napreduje v pljučno fibrozo. Diagnoza temelji na kliničnih in radioloških ugotovitvah, podprtih s histološkim dokazom nekazeoznih granulomov. Prvič je bila opisana leta 1877, ko je britanski zdravnik Jonathon Hutchinson predstavil primer bolnika s kožno sarkoidozo. Beseda sarkoidoza izvira iz angleške besede »sarcoid«, ki jo je leta 1899 uporabil norveški dermatolog Caesar Boeck, ki je menil, da so kožne lezije podobne sarkomu (Baughman, 2006).

#### 2.1.1 Epidemiologija sarkoidoze

Sarkoidoza se pojavlja po vsem svetu. Prizadene tako moške kot ženske, vseh ras in starosti. Pogosteje pa se pojavlja pri ljudeh, starih manj kot 40 let, predvsem med 20 in 29 letom starosti. V skandinavskih državah in na Japonskem se pogosto pojavlja tudi pri ženskah, ki so stare več kot 50 let. Študije kažejo, da se sarkoidoza pojavlja pogosteje pri ženskah (Milman in Selroos, 1990).

Prevalenca sarkoidoze sega od manj kot 1 do 40 primerov na 100.000 prebivalcev. Sarkoidoza je najbolj razširjena pri Švedih, Dancih in temnopoltih Američanih. Najvišja letna incidenca sarkoidoze je v skandinavskih državah, kjer znaša od 5 do 40 primerov na 100.000 prebivalcev. V Združenih državah Amerike (ZDA) je incidenca pri temnopoltih trikrat večja kot pri belopoltih (35,5 primera oziroma 10,9 primera na 100.000 prebivalcev). V ZDA je stopnja tveganja za sarkoidozo 0,85 % pri belopoltih in 2,4 % pri temnopoltih. Na Japonskem je incidenca od 1 do 2 primera na 100.000 prebivalcev (American Thoracic Society, 1999; Iannuzzi in sod., 2007). V Sloveniji se vsako leto pojavi vsaj 60 novih bolnikov s sarkoidozo (3 primeri na 100.000 prebivalcev) (Šuškovič in sod., 2001). Umrljivost zaradi sarkoidoze je 1 do 5 %, največja je pri temnopoltih Američanih (American Thoracic Society, 1999; Iannuzzi in sod., 2007), najpogosteje

zaradi pljučne fibroze (Nunes in sod., 2005).

## **2.1.2 Klinična slika sarkoidoze**

Sarkoidoza je zelo heterogena bolezen, saj se pojavlja v različnih kliničnih fenotipih, glede na vrsto prizadetega organa, trajanje bolezni in težavnost bolezni. Pogosto so obojestransko prizadete hilusne bezgavke, pljuča, oči in koža. Jetra, vranica, bezgavke, žleze slinavke, srce, živčni sistem, mišice in drugi organi so prizadeti redkeje (American Thoracic Society, 1999).

### **2.1.2.1 Pljučna sarkoidoza**

Sarkoidoza najpogosteje prizadene pljuča. Študije na podlagi rentgenskih slik prsnega koša so pokazale, da so pljuča prizadeta v več kot 90 % primerov (Baughman in sod., 2010). V 50 % primerov so poleg pljuč prizadeti tudi drugi organi (Nunes in sod., 2005).

Nespecifični znaki pri bolnikih s sarkoidozo so zvišana telesna temperatura, utrujenost, hujšanje, slabost in nočno potenje. Sarkoidoza je lahko vzrok povišane temperature nejasnega vzroka. Simptomi pljučne sarkoidoze so prisotni pri 30–50 % bolnikov, in sicer naduha, kašelj, bolečina v prsnem košu ter redkeje krvav izkašljaj.

Na podlagi rentgenskih slik prsnega koša bolnikov delimo sarkoidozo v naslednje stadije:

- Stadij I – bilateralna hilusna limfadenopatija, ki jo lahko spremlja tudi paratrahealna limfadenopatija,
- Stadij II – bilateralna hilusna limfadenopatija in infiltrati v pljučnem parenhimu,
- Stadij III – infiltrati v parenhimu brez hilusne limfadenopatije in
- Stadij IV – napredovala fibroza z znaki satastih pljuč, trakcijo hilusov, bulami, cistami in emfizemom (American Thoracic Society, 1999; Iannuzzi in sod., 2007) (Slika 1).



Slika 1: Rentgenska slika prsnega koša, kjer je razvidna mediastinalna in hilarna limfadenopatija z infiltrati v pljučnem parenhimu (Nakatsu in sod., 2002: 1390)

Figure 1: Chest radiograph shows mediastinal and hilar lymphadenopathy accompanied by parenchymal infiltration and infiltrates in lung parenchyma (Nakatsu et al., 2002: 1390)

Pljučna sarkoidoza se lahko pojavi v akutni obliki, ki se pri več kot polovici bolnikov spontano pozdravi v 12 do 36 mesecih, ali pa v kronični obliki, ki lahko napreduje v pljučno fibrozo. Slednja je, kot že omenjeno, najpogostejši vzrok smrti pri sarkoidozi (Nunes in sod., 2005; Iannuzzi in sod., 2007).

### 2.1.3 Diagnostika sarkoidoze

Za postavitev diagnoze sarkoidoze so potrebne klinične in radiološke ugotovitve, podprte s histološkim dokazom nekazeoznih epiteloideoceličnih granulomov. V Sloveniji je smernice za obravnavo bolnika s sarkoidozo sprejelo Združenje pnevmologov Slovenije na sestanku 7. aprila 2001 (Šuškovič in sod., 2001). Smernice temeljijo na dokumentih, ki so jih leta 1999 sprejele ATS (Ameriško torakalno društvo), ERS (Evropsko respiratorno društvo) in WASOG (Svetovno združenje za sarkoidozo in druge granulomatoze) (American Thoracic Society, 1999).

Pri diagnozi je potrebno izločiti druge granulomatozne bolezni, predvsem tuberkulozo in glivična vnetja. Običajni diagnostični postopki so anamneza, telesni pregled, rentgensko slikanje prsnega koša, preiskava pljučne funkcije, kompletna krvna slika, biokemične preiskave, aktivnost serumske angiotenzinove konvertaze (ACE), pregled urina,

elektrokardiogram, okulistični pregled, tuberkulinski test in sputum na *Mycobacterium tuberculosis*. ACE proizvajajo epiteloidne celice sarkoidoznega granuloma. Nivo ACE v serumu odraža granulomsko breme v telesu pri sarkoidozi in ima 60-odstotno občutljivost in 90-odstotno specifičnost. Vendar pa ima negativno napovedno vrednost le 60-odstotno, zato ni primeren kot diagnostični test (Studdy in Bird, 1989). Z bronhoskopsko pljučno biopsijo se odvzame tkivo za histološko potrditev nekazeoznih granulomov. Z bronhoskopsko igelno aspiracijo se odvzame material za citološki pregled. Poleg biopsije se opravi tudi bronhoalveolarni izpirek (BAI) za določanje števila limfocitov ter njihovih subpopulacij. V BAI-u se določi razmerje CD4/CD8 limfocitov T, ki pri sarkoidozi običajno presega vrednost 4 in ima 96-odstotno specifičnost in 59-odstotno občutljivost (Nunes in sod., 2005; Danila in sod., 2009). Kadar so bronhoskopske biopsije nediyagnostične, je ob povečanih mediastinalnih bezgavkah potrebna cervikalna mediastinoskopija, posebno ker diferencialno diyagnostično pride v poštev prizadetost mediastinalnih bezgavk z maligno boleznijo. Malo povečana aktivnost ACE ni diyagnostična, ker zvišanje lahko povzročajo mnoge druge bolezni. Aktivnost ACE, ki je več kot dvakratna vrednost zgornje normalne vrednosti, je redko posledica drugih bolezni. Ugotavljamo jo lahko občasno pri tuberkulozi, Gaucherjevi bolezni in hipertiroidizmu.

Aktivnosti sarkoidoze ob prvem pregledu navadno ni mogoče oceniti. Aktivnost ocenimo s kliničnim in laboratorijskim sledenjem (npr. čez 1, 3, 6 in 12 mesecev). Sarkoidoza je aktivna, kadar se simptomi, znaki ali laboratorijski kazalniki pojavijo, slabšajo ali vztrajajo.

#### **2.1.4 Zdravljenje sarkoidoze**

Etiologija sarkoidoze je še vedno neznana, zato temelji zdravljenje granulomatoznega vnetja pri sarkoidozi na nespecifičnem zaviranju imunskega odziva s kortikosteroidi (Lazar in Culver, 2010).

Pri bolnikih z blago obliko pljučne sarkoidoze s kašljem zadostujejo lokalni kortikosteroidi za inhaliranje. Pljučno sarkoidozo stadijev II do IV pa se zdravi s sistemskimi kortikosteroidi, kot je na primer prednizon. Zdravljenje je po navadi dolgotrajno, in sicer



od 12 do 24 mesecev. Pri bolnikih, ki se jim stanje po kortikosteroidni terapiji ne izboljšuje, ali pri bolnikih s hudimi stranskimi učinki zaradi zdravljenja s kortikosteroidi, ali pri bolnikih, ki potrebujejo zaradi remisije dolgotrajno zdravljenje s kortikosteroidi, se uporablja nesteroidna zdravila. Slednja so: citostatik metotreksat, azatioprin, leflunomid ali mikofenolat. Refraktarna sarkoidoza se zdravi z biološkim zdravilom infliksimabom, ki blokira dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Baughman in sod., 2010). Novejše klinične raziskave kažejo, da učinkujejo pri zdravljenju sarkoidoze tudi zdravila za zdravljenje glivičnih okužb ali antimikotiki (Terčelj in sod., 2007; Terčelj in sod., 2011).

### **2.1.5 Etiologija sarkoidoze**

Kljub številnim raziskavam ostaja etiologija sarkoidoze še vedno neznana. Prevladujoča hipoteza govori v prid enemu ali več okoljskih antigenov, ki sprožijo razvoj sarkoidoze pri posamezniku z dedno nagnjenostjo do bolezni (Nunes in sod., 2005). Epidemiološki podatki, ki podpirajo omenjeno hipotezo, so: pojavljanje sarkoidoze znotraj določenih skupin, povečana dovzetnosti pri opravljanju določenih poklicev in prenos bolezni pri transplantaciji (Baughman in sod., 2010). V zadnjem času se pojavlja vse več podatkov, da je dolgotrajna in velika izpostavljenost mikrobov povezana s tveganjem za sarkoidozo (du Bois in sod., 2003). Kot mogoče povzročitelje sarkoidoze navajajo nekateri avtorji tudi glive (Newman in sod., 2004; Terčelj in sod., 2007; Terčelj in sod., 2008; Terčelj in sod., 2011; Stopinšek in sod., 2010b; Stopinšek in sod., 2010c; Terčelj 2011; Iannuzzi in sod., 2007).

Številne epidemiološke študije opisujejo povezavo med sarkoidozo in življenjem v vlažnem in plesnivem okolju. Newman in sod. (2004) so v obsežni študiji primerov in kontrol (706 bolnikov s sarkoidozo in enako število po starosti, rasi in spolu ustreznih kontrol) analizirali okoljske dejavnike tveganja za sarkoidozo. Rezultati so pokazali povezavo sarkoidoze z izpostavljenostjo glivam v rastlinskemu prahu, visoki vlažnosti, po poplavih ali vonju po plesnih. Pozitivna povezava s sarkoidozo je značilna za delavce v kmetijstvu in delovnem okolju, kjer je prisotna plesen (Kucera in sod., 2003). Obolevanje za sarkoidozo je večje pri ljudeh, ki delajo v vlažnih in plesnivih zgradbah (Laney in sod., 2009). Glive predstavljajo povečan dejavnik tveganja za sarkoidozo tudi za gasilce, ki

delajo v okolju z veliko obremenjenostjo zraka z organskimi snovmi v aerosolih (Kern in sod., 1993; Prezant in sod., 1999). Terčeljeva in sod. (2011) so ugotavljali, ali obstaja povezava med izpostavitvijo glivam in nastankom sarkoidoze pri slovenskih bolnikih. Obremenjenost okolja z glivami so določali z merjenjem aktivnosti glivičnega encima N-acetil- $\beta$ -D-heksozaminidaze (NAHA) v zraku domovih bolnikov in zdravih kontrol. Ugotovili so, da je bila večja obremenjenost okolja z glivami povezana z dejavnikom tveganja za sarkoidozo in predvsem s ponovim pojavom bolezni.

Vpletenost gliv v sarkoidozo nakazujeta tudi nedavni klinični študiji Terčeljeve in sod., v katerih so dokazali uspešnost zdravljenja sarkoidoze z antimikotiki pri večini bolnikov. V prvi so dvaindvajset bolnikov s kronično sarkoidozo, neodzivnih na zdravljenje s kortikosteroidi, zdravili od 3 do 6 mesecev sočasno s kortikosteroidi in antimikotiki (Terčelj in sod., 2007). Pri bolnikih, ki so bili med zdravljenjem brez kliničnih in imunoloških znakov glivične okužbe, so opazili značilno izboljšanje pljučne patologije, kot so izboljšanje iz stadija II na stadij I, na podlagi rentgenske slike pljuč, izboljšanje difuzne kapacitete pljuč in izboljšanje drugih simptomov, ki nakazujejo resnost bolezni. V drugo študijo pa so bili vključeni na novo diagnosticirani bolniki s sarkoidozo, ki so prejeli kortikosteroide (N=39), kortikosteroide in antimikotike (N=31) ter samo antimikotike (N=22) (Terčelj in sod., 2011). Učinke zdravljenja so ocenili po 6 mesecih. Rentgenske slike so naredili pred in po zdravljenju. Poleg tega so določili difuzno kapaciteto pljuč ter dva markerja sarkoidozne aktivnosti ACE in hitotriozidaze (CTO). Ugotovili so, da so se značilno izboljšali rentgenski izvidi ter značilno zmanjšali aktivnosti ACE in CTO. Rentgenski izvidi so se nekoliko bolj izboljšali pri bolnikih, ki so prejeli antimikotično terapijo v primerjavi z bolniki, ki so prejeli le kortikosteroide. Ti rezultati kažejo, da je zdravljenje z antimikotiki enako učinkovito kot kortikosteroidi pri zdravljenju granulomatoznega vnetja pri sarkoidozi. Kar je verjetno posledica tega, da je takšno zdravljenje usmerjeno proti povzročitelju bolezni. Potrebne so dodatne študije, s katerimi bi določili fenotipe, pri katerih zdravljenje z antimikotiki ni bilo učinkovito (4/22) ter izvesti dolgoročno sledenje za določitev tveganja ponovnega pojava sarkoidoze.

Raziskave s pomočjo molekularnih tehnik nakazujejo na možno vpletenost bakterij, kot so *Mycobacterium* ali *Propionibacterium acnes*. Vendar prve študije še niso postregle z dovolj

prepričljivimi dokazi. Zelo verjetno je tudi, da se sprožitveni antigen razlikuje med etničnimi, geografskimi lokacijami in genetskim ozadjem posameznika (Baughman in sod., 2010). Čeprav *Mycobacterium tuberculosis* verjetno ni etiološki sprožitelj sarkoidoze, pa obstaja vse več dokazov, da so mikobakterije vzrok za vsaj nekatere primere sarkoidoze. Ključna je bila ugotovitev Song in sod. (2005), da ima mikobakterijska katalaza-peroksidaza (mKatG), prisotna v sarkoidoznem tkivu, enake fiziološke in kemijske lastnosti kot reagent Kveim-Siltzbach in je bila povezana s prisotnostjo humoralne imunosti pri istih bolnikih. Kveim-Siltzbachov reagent je homogenat humanega sarkoidnega vraničnega tkiva, ki se ga pri kožnem testu vbrizga intradernalno. Test je pozitiven, če se po 4 tednih na mestu vboda razvijejo granulomi. mKatG tako predstavlja potencialni sarkoidozni antigen, vendar odzivi celic T niso bili omejeni le na protein mKatG, ampak so bili prisotni tudi za mikolil transferazni antigen 85A in mikobakterijsko superoksid dizmutazo. Slednja opazovanja dopuščajo možnost, da je možen vzrok sarkoidoze intakten organizem. Vendar ni nujno, da je ta organizem še vedno živ. Tudi reagent Kveim-Siltzbach ne vsebuje živega organizma, pa vseeno povzroči nastanek granulomov (Baughman in sod., 2010).

### 2.1.6 Genetska nagnjenost do sarkoidoze

Pojavljanje sarkoidoze znotraj družin in etničnih skupin dokazuje genetsko nagnjenost do bolezni (Spagnolo in du Bois, 2007). Raziskovalci so se osredotočili na študiranje genov humanih levkocitnih antigenov (angl. human leukocyte antigen; HLA). Analiza bolnikov, vključenih epidemiološko študijo v ZDA, je pokazala, da je dejavnik tveganja za sarkoidozo prisotnost alelov HLA-DBR1\*1101 in HLA-DBR1\*0101 (Rossmann in sod., 2003). Pri temnopoltih Američanih so odkrili povezavo med določenimi aleli HLA-DQB1 in dovzetnostjo do sarkoidoze ali zaščito pred sarkoidozo. Na fenotip in izid sarkoidoze imajo verjetno geni humanih levkocitnih antigenov (HLA) močan vpliv (Baughman in sod., 2010). Potekajo tudi asociacijske študije celotnega genoma. V raziskavi nemških družin s sarkoidozo so odkrili mutacijo v domnevnem genu imunske regulacije, genu podobnemu butirofilinu 2 (BTNL2), v regiji poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) II. Gen BTNL2 so predlagali kot kandidata za gensko nagnjenost do sarkoidoze. Analiza istega gena pri temnopoltih Američanih ni pokazala nobene vloge

BTNL2, vendar je potrdila povezavo s sarkoidozo pri belopoltnih bolnikih (Rybicki in sod., 2005).

## 2.2 IMUNOPATOGENEZA SARKOIDOZE

Imunopatogeneza sarkoidoze še ni povsem znana. Raziskave imunopatogeneze sarkoidoze otežujejo velika heterogenost bolezni, neznani vzrok bolezni ter pomanjkanje ustreznega živalskega modela (Noor in Knox, 2007). Večina raziskav kaže, da je razvoj sarkoidoze podoben ostalim granulomatoznim boleznim z znanim vzrokom, kot sta na primer kronična berilioza in tuberkuloza (Gerke in Hunninghake, 2008; Baughman in sod., 2010).

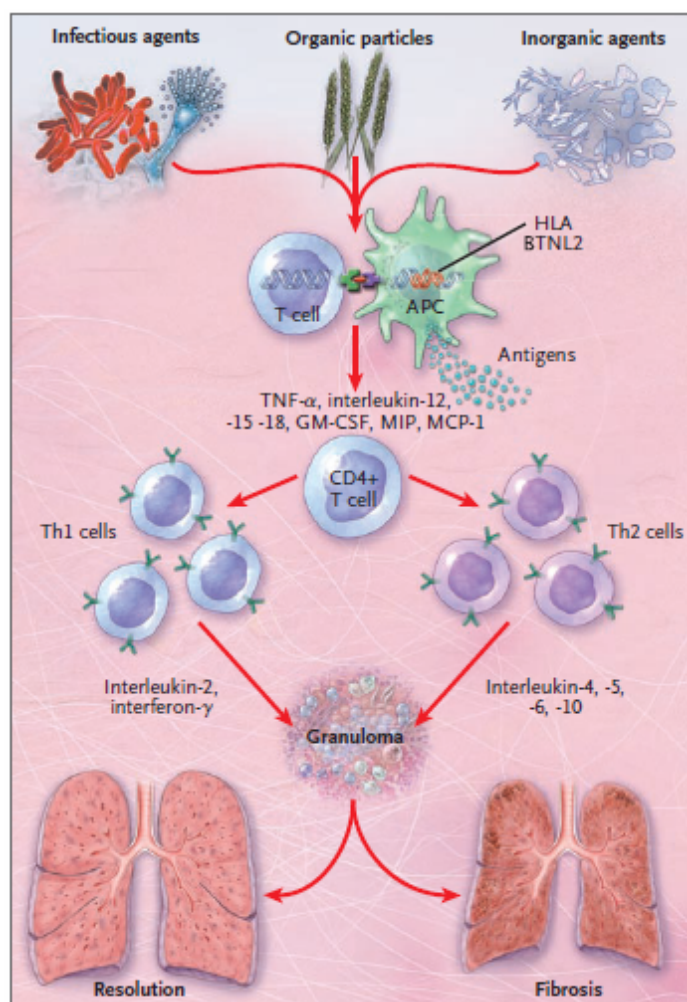
### 2.2.1 Hipotetični model imunopatogeneze sarkoidoze

Prevladujoča hipoteza razlaga, da sproži nastanek sarkoidoze eden ali več antigenov, ki vdrejo v gostitelja z genetsko nagnjenostjo do bolezni (Slika 2). Antigen nato fagocitirajo antigen predstavitvene celice (APC), predvsem makrofagi ali dendritične celice (DC). APC predelajo antigen ter ga predstavijo preko molekul HLA razreda II T-celičnim receptorjem (TCR) na naivnih limfocitih T (predvsem razreda CD4+), ki se ob tem aktivirajo. Ta proces ima vse značilnosti prevlade odziva Th1. Pri sarkoidoznem Th1 odzivu imajo pomembno vlogo interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin- (IL-) 12 in dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Baughman in sod., 2010). Sproščajo se tudi drugi citokini in kemokini, ki v tkivu povzročijo močno vnetje in nastanek granulomov. Okolje granulomov se lahko sčasoma spremeni v bolj Th2 podobno okolje, ki zmanjša intenzivnost tvorbe granulomov in vodi do nastanka fibroze (Gerke in Hunninghake, 2008).

#### 2.2.1.1 Sarkoidozni antigen(i)

Nastanek sarkoidoze sproži do sedaj še neznani antigen. Rezultati raziskav kažejo, da gre verjetno za več različnih antigenov (Gerke in Hunninghake, 2008). V literaturi navajajo kot možne sprožitelje sarkoidoze povzročitelje okužb (glive, bakterije, viruse), organske delce ali anorganske delce (Iannuzzi in sod., 2007). Vse več raziskav potrjuje, da povzroči nastanek sarkoidoze eden ali več povzročiteljev okužb, čeprav verjetno organizem ni več

prisoten v gostitelju v živi obliki (Baughman in sod., 2010). Ker so pri sarkoidozi običajno prizadeta pljuča, se predvideva, da izvirajo antigeni iz vdihanega zraka (Iannuzzi in sod., 2007; Newman in sod., 2004). Prav tako se predvideva, da so ti antigeni stalno prisotni v organizmu oziroma da so slabo topni in težko razgradljivi (Gerke in Hunninghake, 2008).

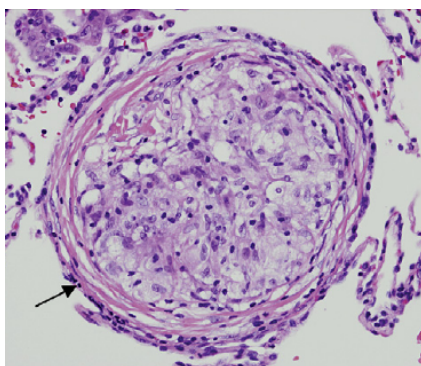


Slika 2: Hipotetični model imunopatogeneze sarkoidoze (Iannuzzi in sod., 2007: 2156)  
Figure 2: Hypothesized immunopathogenesis of sarcoidosis (Iannuzzi et al., 2007: 2156)

### 2.2.1.2 Sarkoidozni granulomi

Sarkoidozni granulomi so nekazeozni, kar pomeni, da v notranjosti granuloma ni prisotne nekroze (Slika 3). Histološko so zgrajeni iz limfocitov, makrofagov, epiteloidnih celic, mnogojedrnih celic velikank, mastocitov in iz fibroblastov. V mnogojedrne celice velikanke se združijo makrofagi pod vplivom faktorja, ki spodbuja razvoj makrofagov (M-

CSF) in faktorja, ki spodbuja razvoj granulocitov in makrofagov (GM-CSF). Jedro aktivnega granuloma sestoji iz mononuklearnih fagocitov v različnih stadijih aktivacije in diferenciacije. Obdano je s celicami T pomagalkami (CD4+) in presejano z majhnim številom citotoksičnih limfocitov T (CD8+) in limfocitov B (Gerke in Hunninghake, 2008). Na obrobju granulomov se nahajajo celice CD8+, fibroblasti in FoxP3+ regulatorne celice T (Treg), ki imajo pomembno vlogo pri zmanjševanju granulomov in nastanku fibroze. Epitelijske celice obdajajo granulom, da zadržijo morebitno škodljivi in nerazgradljivi antigen.



Slika 3: Sarkoidozni nekazeozni granulom (Gerke in Hunninghake, 2008: 381)  
Figure 3: Sarcoid noncaseating granulomas (Gerke and Hunninghake., 2008: 381)

### 2.2.1.3 Celice in citokini vpleteni v imunopatogenezo sarkoidoze

Za nastanek sarkoidoznih granulomov je nujno potrebna aktivacija APC, ki so običajno alveolarni makrofagi (AM), in aktivacija limfocitov T. Sproščajo se različni citokini in kemokini, vendar za mnoge od njih ni jasna njihova relativna pomembnost pri sarkoidozi (Baughman in sod., 2010). Ti citokini so TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12 in IL-17. TNF- $\alpha$  je poglavitni citokin pri granulomskem vnetju sarkoidoze, kar med drugim dokazuje uspešno zdravljenje bolezni z zdravili, ki blokirajo TNF- $\alpha$  (Gerke in Hunninghake, 2008). Raziskave so pokazale, da imajo bolniki povečane količine TNF- $\alpha$  v BAI-u in da lahko povečano izražanje TNF- $\alpha$  v AM nakazuje na razvoj težje oblike bolezni (Ziegenhagen in sod., 2003). Pri tvorbi granulomov in značilnem sarkoidoznem Th1 odzivu ima poleg TNF- $\alpha$  pomembno vlogo tudi IL-12 (Baughman, 2010). AM bolnikov proizvajajo večje količine IL-12, ki pospeši sintezo IFN- $\gamma$  in povzroči diferenciacijo Th0 v aktivne limfocite Th1 ter omogoča neprestan vnetni odziv v pljučih (Shigehara in sod., 2001; Gerke in

Hunninghake, 2008, Mroz in sod., 2008). IL-6 ima različne biološke učinke, kot so aktivacija celic T in B, sinteza proteinov akutne faze vnetja in proizvodnje imunoglobulinov. Kljub temu da nekateri avtorji omenjajo povečano sintezo IL-6 v BAI-u bolnikov s sarkoidozo (Homolka in sod., 1993; Prior in sod., 1996), pa njegova vloga pri sarkoidozi ni jasna. Znano pa je, da povzroči IL-6 povečano sintezo IL-17 (LeibundGut-Landmann in sod., 2007), ki ga povezujejo z vnetnimi boleznimi in nastankom granulomov (Okamoto in sod., 2010). Poleg omenjenih vnetnih citokinov pa imajo bolniki s sarkoidozo tudi povečano sproščanje IL-10 v BAI-u (Bingisser in sod., 2000; Minshall in sod., 1997; Oltmanns in sod., 2003). IL-10 je regulatorni citokin, ki zavira sproščanje vnetnih citokinov in delitev celic T (Abbas, 2010). Kot možna razloga za neučinkovito zaviranje vnetnega odziva pri sarkoidozi omenjajo nezadostno količino receptorjev za IL-10 ali pa neučinkovit prenos signala IL-10 v notranjosti celic (Oltmanns in sod., 2003). IL-17 je nedavno odkriti vnetni citokin, ki igra pomembno vlogo pri obrambi pred zunajceličnimi mikrobi, kot so glive, po drugi strani pa je vpleten tudi v patogenezo različnih vnetnih in avtoimunskih bolezni (Mai in sod., 2010; Vautier in sod., 2010). Pri okužbi z mikobakterijami igra ključno vlogo pri nastanku granulomov (Okamoto Yoshida in sod., 2010). Kljub temu da je za sarkoidozo značilen odziv Th1, pa se v zadnjem času pospešeno raziskuje tudi vloga Th17 pri sarkoidozi. Facco in sod. (2010) so odkrili, da so celice Th17 prisotne v krvi in pljučih bolnikov s sarkoidozo, in sicer v jedru in na periferiji granulomov. Prav tako so pokazali, da te celice sodelujejo v zgodnji fazi sarkoidoze, kot tudi pri napredovanju bolezni v fibrozo.

#### 2.2.1.3.1 Alveolarni makrofagi in njihovi citokini

V imunopatogenezi sarkoidoze imajo ključno vlogo AM. Bolniki s sarkoidozo imajo v BAIBAI-u izrazito povečano njihovo število (Pforte in sod., 1993). Aktivnost AM je omejena na območja, kjer je bolezen aktivna. Primarni vlogi AM sta predstavljanje antigenov limfocitom in izločanje citokinov in kemokinov, ki uravnavajo vnetni odziv (Gerke in Hunninghake, 2008). AM bolnikov s sarkoidozo imajo večjo sposobnost fagocitiranja (Nunes in sod., 2005) in večjo sposobnost predstavljanja antigenov kot AM zdravih kontrol (Ina in sod., 1990). Sarkoidozni AM sintetizirajo, v primerjavi z normalnimi AM, več metaloproteinaz, kisikovih in dušikovih prostih radikalov, encima

ACE in več lizocima. Izražajo receptor IL-2 (CD25) in transferinski receptor (CD71), M-CSF in GM-CSF receptorje, ki so vpleteni v pomnoževanje AM. Prav tako izražajo na svoji površini izrazito povečano število molekul MHC razreda II in povečano število različnih kostimulativnih molekul, kot so CD154 (ligand za CD40), CD72 (ligand za CD5), CD80, CD86 (oba liganda za CD28) in CD153 (CD30L), in molekul, ki so vpletene v adhezijo celic in interakcijo s celicami T, kot sta CD54 (ICAM) in CD11a-c (Nunes in sod., 2005; Zissel in sod., 2010).

AM izločajo številne citokine, ki so pomembni pri tvorbi granulomov in pri pospeševanju odziva Th1. Citokini delujejo kot kemoatraktanti in sodelujejo pri širjenju vnetja. AM v BAI-u bolnikov s sarkoidozo med drugim sproščajo večje količine IL-1 in TNF- $\alpha$ , kar potrjuje močno aktiviranost teh celic (Gerke in Hunninghake, 2008). Raziskave so pokazale, da lahko povečano sproščanje TNF- $\alpha$  nakazuje na resnejšo obliko bolezni (Ziegenhagen in sod., 2003). Z resnostjo bolezni so povezali tudi polimorfizme TNF- $\alpha$ , vendar ni jasne povezave z dejanskim izražanjem TNF- $\alpha$ . Zaradi pomembnosti TNF- $\alpha$  pri tvorbi granulomov se pospešeno študira zdravila, ki učinkujejo na TNF- $\alpha$ , kot so infliksimab, talidomid in pentoksifilin. Infliksimab je trenutno že v klinični uporabi. Med ostale pomembnejše citokine, ki jih izločajo sarkoidozni AM, spadata tudi IL-12 in IL-15. IL-15 privabi in aktivira celice CD4<sup>+</sup> in deluje kot limfocitni rastni faktor. IL-12 mRNA je povišana v AM in je pomemben za povečanje sinteze interferona- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). IFN- $\gamma$  povzroči izločanje večje količine kemokina IP-10 v AM.

Vnetni produkti AM so potencialni markerji sarkoidoze. Encim ACE, ki ga sintetizirajo epitelioidne celice, ki se razvijejo iz makrofagov, se pogosto uporablja za sledenje napredovanja bolezni, če je njegova koncentracija visoka ob diagnozi. Odkrili so, da je z resnostjo sarkoidoze povezan neopterin, majhen protein, ki ga sproščajo makrofagi (Ziegenhagen in sod., 2003). Aktivirani makrofagi in polimorfonuklearni levkociti izločajo CTO, ki bi se morda lahko uporabljala kot nespecifični marker za spremljanje uspešnosti zdravljenja (van Eijk in sod., 2005; Terčelj in sod., 2009).



#### 2.2.1.3.2 Limfociti T in njihovi citokini

V imunopatogenezi sarkoidoze igrajo ključno vlogo tudi limfociti T. Njihovo število v BAI-u bolnikov s sarkoidozo je, tako kot število AM, izrazito povečano. Razmerje CD4+/CD8+ limfocitov T v BAI-u bolnikov s sarkoidozo običajno presega vrednost 4.

Limfociti CD4+, ki sprožijo nastanek granuloma, izražajo fenotip Th1 in privabljajo limfocite Th1 in makrofage, ki sintetizirajo citokine, kot so IFN- $\gamma$ , IL-2 in IL-15. Prav tako je povečana tudi sinteza IL-12 in IL-18, kar pospeši sintezo IFN- $\gamma$  v pljučih in povzroči diferenciacijo celic Th0 v aktivne limfocite Th1 in omogoča neprestan odziv. Povečano izražanje kemokinov Th1 in citokinskih receptorjev, kot so CXCR3, CCR5, IL-2 receptor in IL-18 receptor skupaj z zmanjšanim izražanjem Th2 kemokinskih receptorjev CXCR4 in CCR4 še dodatno dokazuje prevlado Th1. Okolje Th1 povzroči aktivacijo makrofagov, komunikacijo med celicami za tvorbo granulomov, sintezo rastnih faktorjev celic T in inhibicijo fibroze (Gerke in Hunninghake, 2008).

Makrofagi izločajo kemoatraktante, ki privabijo limfocite v tkiva. Ti kemokini in citokini so kemotaktični protein 1 (MCP-1, CCL2), makrofagni vnetni protein-1 $\alpha$  (MIP $\alpha$ , CCL3), MIP $\beta$  (CCL4), RANTES (CCL5), IL-8, IL-12 in IL-15. IP-10 sodeluje z receptorjem CXCR3 na celicah T, kar privabi in kopiči celice T. Makrofagi sintetizirajo tudi IL-1, IL-15 in TNF- $\alpha$ , kar poveča količino adhezijskih molekul na endoteliju in poveča interakcijo med endotelijskimi celicami in celicami T. Epitelijske celice dihalnega trakta sintetizirajo tudi IL-16, ki je domnevno vpleten v procese migracije. Celice T pripotujejo iz periferije, vendar poteka tudi lokalna namnožitev celic T.

Stimulacija celic T se pojavi, ko APC predelajo antigene in jih predstavijo preko molekul MHC-II. Variabilne regije TCR, ki so vnaprej določene s selekcijo v priželjcu, se nato vežejo na kompleks MHC-antigen in se klonsko namnožijo. Število TCR na površini celic se nato zmanjša in služi kot znak nedavne aktivacije celic T v pljučih. Za optimalno stimulacijo celic T je poleg vezave TCR potrebna tudi povezava kostimulatornih molekul na celični površini z ustreznim ligandom na APC (najpomembnejša CD28 na celica T, ki se veže na CD80 in CD86 na APC). Pri bolnikih s pljučno sarkoidozo izražajo celice T na

svoji površini zgodnje in pozne aktivacijske markerje, od katerih je najbolj študiran IL-2R (CD25). Topna oblika IL-2 receptorja je možen marker za resnost bolezni. V BAI-u so povišane koncentracije markerjev aktivacije celic T, kot so CD69, CD26, glikoprotein 240 in zelo pozni antigen (VLA)-1. Te aktivirane populacije celic T se nato neprestano širijo in množijo na mestih domnevne neprestane antigenske stimulacije (Noor in Knox., 2007; Gerke in Hunninghake, 2008).

Po aktivaciji diferencirajo limfociti Th0 v limfocite Th1, ki sintetizirajo številne citokine, kot so INF- $\gamma$ , IL-2, IL-16 in TNF- $\alpha$ . INF- $\gamma$ , je verjetno najbolj ključen, saj se granulomi ne tvorijo v miših z izničnim genom za INF- $\gamma$ , ki so izpostavljene termofilnim bakterijam. Podobno kot INF- $\gamma$  sta IL-2 in IL-2 receptor pozitivno povezana s T-celičnim alveolitisom. Sinteza teh citokinov privabi in aktivira monocite in makrofage, ki povratno aktivirajo limfocite. Analiza TCR je pokazala oligoklonalno in prav tako poliklonalno rast celic T, kar lahko pomeni, da spremlja alveolitis pri sarkoidozi lokalna klonska ekspanzija celic T v ozadju velikega, nespecifičnega limfocitnega odziva (Gerke in Hunninghake, 2008).

#### 2.2.1.3.3 Regulatorne celice T

Regulatorne celice T (Treg) predstavljajo orodje imunskega sistema za zaviranje imunskega odziva. Miyara in sod. (2006) so pokazali, da se na obrobju granulomov, v BAI-u in v periferni krvi bolnikov z aktivno sarkoidozo nahajajo CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regulatorne celice T. Prisotnost slednjih lahko pojasni stanje anergije pri kožnem testiranju, vendar pa očitno niso sposobne popolnoma zavreti imunski odziv pri tvorbi granulomov. Naslednji pomemben podtip regulatornih celic T so od CD1d odvisne naravne celice T ubijalke (NKT), ki v živalskem modelu ščitijo pred Th1 odzivom. Študije kažejo na odsotnost ali zmanjšanje le-teh pri sarkoidozi, vendar njihova vloga pri sarkoidozi še ni znana. Naslednji podtip regulatornih celic T so celice CD4+, ki izražajo s citotoksičnim limfocitom T povezan protein 4 (CTLA-4). Domnevajo, da polimorfizmi CTLA-4 vplivajo na resnejši potek sarkoidoze. Tudi  $\gamma$ - $\delta$  celice T, ki se nahajajo na epiteliski površini, imajo regulatorno vlogo, vendar njihova vloga pri sarkoidozi še ni jasna. Potrebno je tudi omeniti, da pljučne in krvne celice T bolnikov s sarkoidozo visoko izražajo Fas (CD95) in so lahko usmerjene k pospešeni apoptozi, predvsem *in vitro* (Noor

in Knox, 2007).

#### 2.2.1.4 Imunski paradoks

Zanimivo nepojasnjeno odkritje pri sarkoidozi je pojav periferne anergije v okviru močnega imunskega odziva v prizadetih organih. Periferno anergijo so opazili z odsotnostjo odziva na tuberkulin in druge antigene pri bolnikih s sarkoidozo in je povezana z aktivnostjo bolezni. Prav tako je pri bolnikih s sarkoidozo prisotna limfopenija v periferni krvi, saj se aktivirane celice T kopičijo na mestih granulomatoznega vnetja. Limfopenijo opisujejo kot možen vzrok za pojav periferne anergije. Prav tako predlagajo, da so v stanje anergije vpletene zaviralne celice CD8+. Med akutno ali aktivno fazo je opaziti obilico CD4+ limfocitov T. Ko pa bolezen postaja bolj kronična, začnejo prevladovati CD8+ limfociti T (Gerke in Hunninghake, 2008). Nedavno so predlagali, da mogoče obstaja neravnovesje med efektorskimi in regulatornimi limfociti T. V krvi in BAI-u bolnikov z aktivno sarkoidozo so določili večji odstotek regulatornih celic T, označenih kot celice CD4+/CD25 v primerjavi z zdravimi kontrolami. Prejšnji podatki podpirajo to odkritje s prikazom povečanega števila CD4+/CD25/FoxP3+ regulatornih limfocitov T na obrobju granulomov, v BAI-u in v periferni krvi bolnikov z aktivno sarkoidozo (Miyara in sod., 2006). Te celice niso popolnoma zavrle aktivnosti TNF- $\alpha$  in lahko omogočajo tvorbo granulomov. Njihovo normalno delovanje pa lahko razloži periferno anergijo. Čeprav so opisali zmanjšano izražanje markerja FOXP3+ v BAI-u (Grunevald in Eklund, 2007), pa lahko ta ugotovitev kaže na zmanjšano število regulatornih celic T ali pa kaže na prisotnost nenavadnih celic T, ki lahko dovolijo nastanek nekontroliranega vnetja.

V nasprotju s prevladujočim odzivom Th1 v pljučih celice na periferiji ne kažejo tako jasnega odziva. V serumu imajo bolniki s sarkoidozo povišan IL-13, ki je citokin Th2, poleg tega imajo bolniki v serumu, v primerjavi s kontrolami, večje koncentracije Th1 CXCR3 in Th2 CCR4 celic T in višje razmerje med CXCR3 in CCR4 (Gerke in Hunninghake, 2008).

### 2.2.1.5 Fibroza

Fibroza nastaja na mestih granulomatoznega vnetja, vendar natančni imunološki mehanizmi niso poznani. Z napredno pljučno fibrozo je povezana prekomerna sinteza kemokinov. Prav tako predvidevajo, da številni citokini, ki so povezani z granulomi, privabijo fibroblaste in spremenjene adhezijske molekule na fibroblastih lahko dovolijo namnožitev na mestu vnetja. Izpostavitvev fibroblastov tem makrofagnim citokinom, kot so inzulinski rastni faktor-1, tumorski rastni faktor (TGF)- $\beta$  in od trombocitov vodeni rastni faktor, vodi v odlaganje kolagena in fibronektina. Preklop v prevlado Th2 citokinov lahko prav tako doprinese k sintezi citokinov, kot sta IL-4 in IL-13, ki sta znana spodbujevalca sinteze kolagena in fibrogenih procesov. V nasprotju pa INF- $\gamma$  zavira razmnoževanje fibroblastov (Gerke in Hunninghake, 2008). Zunajcelični matriks se nahaja v zunanjem obodu/robu in znotraj granuloma, kar kaže, da se fibroza pri sarkoidozi začne v granulomih. Zunajcelični matriks, citokini Th2 in fibroblasti povečajo sproščanje CCL18, kar začne škodljivi cikel, ki pospeši pljučno fibrozo.

Zaradi že omenjenih težav pri raziskovanju imunopatogeneze sarkoidoze bodo v prihodnosti verjetno zelo uporabne tehnike bioinformatike. Prve študije, kjer so raziskovali mreže genskega izražanja v pljučnem tkivu pri sarkoidozi in v bezgavkah v primerjavi s kontrolami, so pokazale, da je s sarkoidozo povezana mreža, ki jo regulira prenašalec signala in aktivator prepisovanja-1 (STAT1). Ker je STAT1 tarča IFN- $\gamma$ , ta študija potrjuje pomembnost Th1 imunskega odziva.

Uspešni imunski odzivi normalno privedejo do odstranitve antigena in ozdravitve. Razlage o vzrokih za neustrezne imunske odzive pri sarkoidozi so različne. Eni znanstveniki razlagajo, da je vzrok v stalno prisotnem ali slabo topnem in nerazgradljivem antigenu. Drugi sumijo neustrezno delovanje regulatornih celic T. Treg so običajno potrebne za zaviranje celično-posredovanih imunskih odzivov in so prisotne v periferni krvi, v BAI-u in v granulomih pri bolnikih z aktivno sarkoidozo. Vendar študije kažejo, da so Treg pri sarkoidozi v primerjavi z zdravimi kontrolami funkcionalno defektne ali izčrpane. CD4-posredovane imunske odzive lahko omejijo tudi NKT celice. V študiji s 60 bolniki s sarkoidozo so ugotovili zmanjšano število NKT celic v krvi in BAI-u, razen pri bolnikih z

Löfgrenovim sindromom. Ker slednji običajno povezan z ozdravitvijo sklepajo, da dovoli izguba NKT celic vztrajanje sarkoidoze. Chen in sod. (2010) so ugotovili, da so granulomi pri sarkoidozi označeni z obsežnim odlaganjem proteina serumskega amiloida A (SAA). SAA sproži imunske odzive in sproščanje citokinov preko interakcije s TLR2. Vpletenost SAA v granulomatozne procese torej lahko oslabi odstranjevanje etiološkega agenta. Za vzrok neprestanega granulomatoznega vnetja nekateri raziskovalci predlagajo mehanizme, povezane z razdorom mehanizmov apoptoze granulomov. TNF- $\alpha$ , regulator apoptoze in INF- $\gamma$  sta vpletena kot glavna igralca v neprestani vnetni odziv. Poleg samega citokina so ugotovili, da so receptor TNF- $\alpha$  in naddružine liganda neustrezno regulirane pri sarkoidozi. Nadaljnja neustrezna regulacija limfocitnega in citokinskega odziva lahko prav tako doprinese k nenormalni apoptozi. Citokini alveolarnih makrofagov, kot je IL-15, so povišani in zavirajo normalno odstranitev limfocitov. Omenjajo tudi vpletenost onkogenov v motenje ustrezne apoptoze.

## 2.3 GLIVE

Glive so ubikvitarni heterotrofni organizmi, ki živijo kot saprofiti, simbionti ali paraziti. Med glive, ki vplivajo na zdravje ljudi, spadajo predvsem plesni in kvasovke (Kavanagh, 2005; Nevalainen in Morawska, 2009). Plesni so filamentozne večcelične glive, ki so sestavljene iz razvejanih hif. Med plesni prištevamo glive iz več taksonomskih skupin, kot so *Zygomycota* (rodova *Mucor*, *Rhizopus*) in *Ascomycota* (rodovi *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Scopulariopsis*). Kvasovke so netaksonomska kategorija gliv, definirana na osnovi morfoloških in fizioloških značilnosti. Sestavljajo filogenetsko različno skupino gliv, kot so *Ascomycota* (rodovi *Saccharomyces*, *Candida*, *Aureobasidium*) in *Basidiomycota* (rod *Cryptococcus*) (Kavanagh, 2005).

### 2.3.1 Celična stena gliv

Celična stena gliv je zgrajena iz polimerov ogljikovih hidratov (> 90 %) in glikoproteinov. Tri glavne komponente so  $\beta$ -glukani (polimeri glukoze), hitin (polimer N-acetilglukozamina) in manani. Hitin se nahaja predvsem v bližini plazemske membrane, medtem ko so manani v zunanji celični steni. Glavno ogrodje celične stene tvorijo (1 $\rightarrow$ 3)-

$\beta$ -D-glukani, ki vsebujejo različne količine stranskih (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$  verig. Hitin daje celični steni strukturno čvrstost (Levitz, 2010). (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukani in hitin tvorijo kompleks glukan-hitin, ki je kovalentno vezan na ostale polisaharide, ki se med glivami razlikujejo. Na primer, *Aspergillus fumigatus* vsebuje galaktomanan in (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -glukani, *Candida albicans* pa vsebuje (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukan (Latge, 2010). Manani so zgrajeni iz več sto manoz, ki so povezani z glivičnimi proteini. Manoproteini so kovalentno vezani na glukane ali hitin preko njihovih sladkornih ostankov ali preko glikozilfosfatidilinozitolnih (GPI) vezi. Sidra GPI lahko povezujejo tudi manoproteine z plazemsko membrano. V celični steni gliv se nahajajo tudi proteini, kot na primer stresni proteini, ki so običajno prisotni v notranjosti celic in omogočajo sodelovanje z imunskimi celicami. Celična stena je dinamična struktura, pri kateri so prisotne znatne kvalitativne in kvantitativne razlike med različnimi vrstami gliv, kot tudi med različnimi morfološkimi oblikami iste vrste (Kavanagh, 2005; Levitz, 2010). Na primer prisotnost  $\alpha$ -glukanov poleg  $\beta$ -glukanov pri nekaterih podvrstah *Histoplasma capsulatum*, hitosan pri *Cryptococcus neoformans* ter galaktomanani pri vrstah *Aspergillus*.

Komponente celične stene gliv so biološko aktivne in imajo različne imunomodulatorne lastnosti (Brown in sod., 2003; Muzzarelli, 2010). Prepoznavanje komponent poteka pri naravni imunosti preko receptorjev, ki prepoznajo patogene (angl. pattern-recognition receptors; PRR) (Levitz, 2010; Latge, 2010). Glavni receptor za prepoznavanje (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukana je dektin-1, za prepoznavanje hitina pa je domnevno manozni receptor (MR). Dektin-1 in MR spadata v skupino receptorjev CLR (angl. C-type lectin receptors). Prepoznavanje mananov pa poteka preko MR in DC-SIGN. Komponente celične stene gliv aktivirajo tudi receptorje TLR (angl. toll-like receptors), in sicer TLR2 in TLR4. V primeru glivične okužbe je izpostavljenih več ligandov, ki se vežejo na različne receptorje imunskih celic, med katerimi so prisotni sinergistični in antagonistični učinki, ki privedejo do zapletenih vzorcev imunskih odzivov (Levitz, 2010).

#### 2.3.1.2 (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukan

(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukan je poglavitna komponenta celične stene večine gliv, nekaterih bakterij in rastlin. V celični steni gliv je sestavljen iz D-glukoz, povezanih z (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -vezmi, in

vsebuje različne količine stranskih verig, povezanih (1→6)-β-vezmi. V celični steni gliv je β-D-glukan povezan s hitinom, drugimi polisaharidi in manoproteini. β-D-glukan tvori do 60 % suhe teže celične stene gliv (Klis, 1994). β-D-glukani imajo različno molekulsko maso, različno stopnjo razvejanosti in se pojavljajo v treh različnih konformacijah: trojni vijačnici, enojni vijačnici in naključnih spiralnih strukturah. Večinoma so netopni v vodi, raztopijo pa se v razredčenih bazah. Strukturno najpreprostejši je linearni (1→3)-β-D-glukan kurdlan iz bakterije *Alcaligenes faecalis* var. *Myxogenes*, ki je podoben glivičnim (1→3)-β-D-glukanom, vendar ne vsebuje stranskih verig. Kurdlan in mnogi drugi (1→3)-β-D-glukani se imajo medicinski in farmakološki potencial in se uporabljajo v prehrabeni industriji zaradi edinstvene sposobnosti tvorbe termalnih gelov. (1→3)-β-D-glukani imajo imunomodulatorne lastnosti. Delujejo protivnetno in zavirajo nastanek raka, sprožijo nastanek reaktivnih kisikovih spojin, vnetnih mediatorjev in citokinov ter ojačijo celično citotoksičnost. Receptorji naravne imunosti, ki prepoznajo β-glukane, so dektin-1 (Brown in sod., 2003), komplementni receptor 3 ter odstranjevalni receptorji (CD5, CD36 in SCARF1) (Levitz, 2010). Študije so pokazale, da je (1→3)-β-D-glukan odgovoren za večino bioloških aktivnosti cimosana A (CIM), ki je netopni izvleček iz celične stene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. CIM je zgrajen iz (1→3)(1→6)-β-D-glukana, manana, hitina, proteinov in lipidov (Kelly in sod., 2010). Dektin-1 sodeluje z receptorji, TLR, in sicer s TLR2 in TLR4 pri posredovanju sinteze vnetnih mediatorjev, spodbujenih s CIM, kot je TNF-α. Med drugim se (1→3)-β-D-glukani uporabljajo tudi za določanje celotne biomase gliv z merjenjem njegove koncentracije v zraku (Rylander in Lin, 2000; Young in Castranova, 2005). Študije kažejo, da je 1,3-β-D-glukan tudi sprožitelj pljučnega vnetja (Rylander, 1999; Martin in sod., 2004; Iannuzzi in sod., 2004). Znano je, da lahko ali glive (Martin in sod., 2004; Iannuzzi in sod., 2004; Ezzie in Crouser, 2007; Newman in sod., 2004) ali sam (1→3)-β-D-glukan (Gallin in sod., 1992) povzročijo tvorbo granulomov. (1→3)-β-D-glukan iz celične stene gliv vztraja intracelularno in zmoti makrofagno funkcijo (Rylander, 1989; Rylander, 1995). V podganjem modelu je vbrizganje (1→3)-β-D-glukana povzročilo nastanek pljučnih granulomov. Poleg tega so pokazali, da (1→3)-β-D-glukan pospešuje nastanek pozne preobčutljivostne reakcije povzročene z 2,4-dinitro-1-fluorobenzenom (Paulík in sod., 1996). Izločanje TNF-α iz monocitov periferne krvi po stimulaciji z endotoksinom je bilo večje pri preiskovancih, ki so živeli v plesnivih zgradbah v primerjavi z kontrolami v čistih zgradbah (Beijer in sod.,

2003). Po vdihavanju (1→3)-β-D-glukana so pri preiskovancih z višjim nivojem (1→3)-β-D-glukana v primerjavi s preiskovanci z nižjim nivojem (1→3)-β-D-glukana ugotovili zmanjšano izločanje TNF-α iz mononuklearnih celic periferne krvi (PBMC) spodbujenih z endotoksinom. Prav tako je vdihavanje (1→3)-β-D-glukana pri preiskovancih z višjim nivojem (1→3)-β-D-glukana povzročilo značilno povišanje limfocitov v krvi (Beijer in sod., 2002). Očitno razliko v aktivnosti med topno in netopno obliko glukana so ugotovili tudi pri *in vivo* študiji, kjer so podgane izpostavili obema oblikama glukana z intratrahealno instilacijo (~2 mg/kg telesne teže) (Young in sod., 2003). Netopna oblika glukana - cimosana je povzročila veliko močnejše pljučno vnetje kot topna oblika, kar so dokazali s povečanjem določenih parametrov, kot so število polimorfonuklearnih levkocitov, količino serumskega albumina, dušikovega oksida (NO) in aktivnostjo laktat dehidrogenaze v BAI-u. V podobni študiji, kjer so budre akutno vdihavale netopni kurdlan, šizofilan in cimosan (300 μg/m<sup>3</sup>), pa niso opazili tako močne aktivnosti (Rylander in sod., 2008). Celo nasprotno, število makrofagov in limfocitov se je zmanjšalo, medtem ko je število nevtrofilcev ostalo nespremenjeno. Takšno neskladje med študijama je verjetno posledica uporabe zelo različnih koncentracij glukana ter uporabe različnih vrst poskusnih živali z drugačno aktivnostjo pljučnih makrofagov (Holt in sod., 1980).

### 2.3.1.3 Hitin in hitosan

Hitin je zgrajen iz N-acetil-D-glukozaminov, povezanih z (1,4)-β-vezmi. V naravi je hitin del kompleksnih struktur, kjer je na primer v celični steni gliv povezan z glukani in manoproteini. Hitin se nahaja v celični steni gliv in oklepu členonožcev. Hitin in njegovi derivati, kot je hitosan (deacetiliran hitin, ki je zgrajen iz glukozamina, povezanega z (1,4)-β-vezmi in N-acetilglukozamina), imajo imunomodulatorne lastnosti, in sicer aktivirajo celice naravne imunosti z vezavo na različne receptorje PRR, kot so verjetno manozni receptor (MR), dektin-2, TLR2 in drugi receptorji, in pripomorejo k odpornosti proti mikrobom in delujejo proti nastanku raka (Muzzarelli, 2010). V nekaterih študijah je hitin v pljučih, podobno kot β-glukan, vpleten v potek vnetja (Chen in sod., 2008; Young in sod., 2007).

Hitosan je kationski polimer, ki ga pridobivajo z delno deacetilacijo hitina iz oklepov



rakov. Zgrajen je iz glukoamina, povezanega z (1,4)- $\beta$ -vezmi, in N-acetilglukoamina. Zaradi slabe topnosti hitina v vodi se v farmaciji pogosteje uporablja hitosan, ki je topen v šibkih organskih kislinah. Hitosan je biološko kompatibilen, biološko razgradljiv in nizko toksičen polielektrolit, namenjen predvsem za uporabo v medicinskih in farmacevtskih pripravkih in v prehranbeni industriji. V naravi je hitosan redek in se pojavlja le pri določenih glivah (George in Abraham, 2006).

### 2.3.2 Glive in boleznih dihal

Ljudje smo neprestano izpostavljeni glivam in njihovim delcem iz okolja. Pri obrambi pred glivami sta pomembni naravna in pridobljena imunost. Glive proizvajajo ogromno število spor, velikih 2-3  $\mu\text{m}$ , ki jih, poleg delcev gliv in majhnih celic, vdihujemo z zrakom (Singh, 2005). Odložijo se na površino sluznice zgornjih dihal, kjer poteka mukociliarno čiščenje ali odstranjevanje sluzi z migetalkami sluznice. Preostale spore fagocitirajo celice naravne imunosti, kot so neutrofilci, monociti, makrofagi, DC, ter NKT in jih znotrajcelično uničijo. Celice naravne imunosti prepoznajo glive z receptorji PRR (angl. pattern recognition receptor), kot so receptorji TLR in receptorji CLR. Pri naravni imunosti sodeluje tudi komplementni sistem.

Poleg naravne imunosti sodeluje pri obrambi pred glivami tudi pridobljena imunost. Aktivirajo se limfociti T in B, ki aktivirajo celično in humoralno imunost (Cramer in Blaser, 2002). APC fagocitirajo, predelajo in predstavijo glivične antigene preko MHC II naivnim celicam T. Slednje nato diferencirajo v različne podtipе efektorskih celic T pomagalk (angl. T helper cells; Th). Celice Th1, za katere je značilna sinteza IFN- $\gamma$ , so ključne pri odstranjevanju gliv in povzročitvi vnetja. Poleg IFN- $\gamma$  izločajo celice Th1 tudi TNF- $\alpha$ , IL-6 in IL-12. Celice Th2, ki sintetizirajo IL-4 in IL-5, zavrejo odstranjevanje gliv in lahko povzročijo nastanek alergije. Poleg odziva Th1 je pri obrambi pred glivami pomemben tudi odziv Th17. Celice Th17 sintetizirajo IL-17A, IL-17F in IL-22 ter privabijo nevtrofilce, povzročijo sintezo defenzinov in povzročijo vnetje. Med glivično okužbo mora imunski odziv uspešno odstraniti glivo, omejiti stranske poškodbe tkiva in ponovno vzpostaviti homeostazo. Klinična opazovanja kažejo na nasprotno učinke IFN- $\gamma$  in IL-10 med glivično okužbo. Visoka koncentracija IL-10 zavre vnetje in ima negativni

učinek na sintezo IFN- $\gamma$ . Pri glivičnih okužbah delujejo protivnetno različni podtipi regulatornih celic T (Treg), ki nadzorujejo kvaliteto in obseg naravnih in pridobljenih efektorskih odzivov (Romani, 2011).

Pri zdravih ljudeh lahko na dihalni sluznici kolonizirajo različne glive, kot so *Aspergillus*, *Penicillium* in *Candida*, vendar ne povzročijo okužbe. Pri imunsko oslabljenih ljudeh pa se lahko iz spor razvijejo hife, ki povzročijo invazivne glivične okužbe (Shoham in Levitz, 2005). Glive lahko povzročijo tudi nastanek granulomatoznega vnetja (Ezzie in Crouser, 2007).

Dolgotrajna izpostavljenost visokim koncentracijam plesni lahko privede do različnih simptomov in bolezni. Poleg že omenjenih invazivnih glivičnih okužb pri imunsko oslabljenih ljudeh lahko izpostavitve gliv vodi do nastanka različnih respiratornih simptomov, alergij, astme, hipersenzitivnega pneumonitisa in verjetno tudi do nastanka sarkoidoze. Neugodni vplivi plesni na zdravje ljudi, kor posledica bivanja v plesnivih zgradbah, se odražajo v obliki sindroma SBS (angl. sick building syndrome), sindroma ODTS (angl. organic dust toxic syndrom), preobčutljivostnih reakcij in okužb. V organskem prahu so delci mikrobnega, organskega in rastlinskega izvora, med katerimi povzročata največ učinkov (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukan in bakterijski lipopolisaharid (LPS) (Fogelmark in sod., 1994; Rylander in Lin, 2000; Rylander, 2010). Klinični znaki sindroma SBS so konjunktivitis, epistaksa, kongestija nosne sluznice in sinusov, kronični kašelj, glavobol, utrujenost in motnje koncentracije (Norbäck in sod., 2009). Sindrom ODTS nastane po masovni izpostavitvi sporam plesni ali mikotoksinom. Klinični znaki sindroma ODTS so kašelj, vročina in respiratorna insuficienca (Seifert in sod., 2003). Pri osebah, ki so preobčutljive na plesni, se lahko pojavijo rinitis, konjunktivitis, alergije, alergijska bronhopulmonalna aspergiloza in astma. Alergije na plesni lahko vodijo v resnejše zaplete, ki so pogosti pri osebah, izpostavljenim večjim koncentracijam plesni. Pri kmetih, ki prihajajo v stik z vlažnim, razpadajočim senom, se kot posledica visoke koncentracije plesni pojavi vročina in zasoplost. Farmarska pljuča ali hipersenzitivni pneumonitis lahko vodi v pljučno fibrozo in pljučno hipertenzijo (Singh, 2005).

### 3 METODE

#### 3.1 PREISKOVANCI

V raziskavo je bilo vključenih dvaindvajset (12 žensk in 10 moških; povprečne starosti  $44,7 \pm 2,1$  leto) na novo diagnosticiranih bolnikov s pljučno sarkoidozo stadija II ali III, določeno po kriterijih Ameriškega torakalnega društva (ATS), Evropskega respiratornega društva (ERS) in Svetovnega združenja za sarkoidozo in druge granulomatoze (WASOG) (1999) na Kliničnem oddelku za pljučne bolezni in alergije Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani v obdobju od septembra 2008 do januarja 2010. Diagnostični postopki pri prvem pregledu so bili anamneza, telesni pregled, rentgensko slikanje prsnih organov, preiskave za ugotavljanje pljučne funkcije, kompletna krvna slika, biokemične preiskave ter aktivnost serumske angiotenzinove konvertaze (ACE), ki je bila pri bolnikih povišana in imela vrednost  $0,50 \mu\text{Kat/l}$  (normalno je  $0,06 \mu\text{Kat/l}$ ). Bolnikom se je izvedla bronhoskopija s 5 do 10 transbronhialnih biopsij pljučnega parenhima ter bronhoskopska igelna aspiracija mediastinalnih limfnih vozlov. V bronhoalveolarnem izpirku (BAI-u) se je določilo razmerje CD4/CD8 limfocitov T, ki je imelo pri tej skupini bolnikov povprečno vrednost 7,5. Pri sarkoidozi razmerje CD4/CD8 običajno presega vrednost 4 (Danila in sod., 2009). S histološko analizo se je dokazalo prisotnost nekazeoznih granulomov. V primeru, da biopsija ni bila reprezentativna, se je izvedla kirurška biopsija pljuč ali limfnih vozlov. Za gojenje gliv in bakterij, vključno s testiranjem na tuberkulozo, se je izvedla aspiracija desnega zgornjega pljučnega krila. Za testiranje na prisotnosti glivične okužbe se je vzorce biopsij fiksiralo in obarvalo s srebrnim barvilom (angl. Gomori's methenamin silverstain – GMS). Vsi bolniki so bili nekadilci. Izključitveni kriteriji so bili: pljučna sarkoidoza stadij I in IV, razmerje CD4/CD8 manjše od 4, kajenje, prejemanje kakršnekoli imunosupresivne terapije zaradi drugih bolezni in odklonitev sodelovanja v raziskavo.

V raziskavo je bila vključena tudi skupina dvajsetih zdravih ljudi (13 žensk in 7 moških; povprečne starosti  $39,9 \pm 1,8$  let), ki smo jim odvzeli vensko kri. Osebe smo vključili v raziskavo kot zdrave kontrole na osnovi izpolnjenega vprašalnika (Plankl, 2009), s katerim smo izključili alergijske in avtoimunske in kroničnih vnetnih bolezni ter akutne infekcije. Tudi v tej skupini so bili sami nekadilci.

Raziskava je bila z etičnega vidika neoporečna, zato nam je Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko dne 18. 11. 2008 zanj izdala soglasje št. 122/11/08. Za sodelovanje v raziskavah so preiskovanci privolili s podpisom.

### 3.2 VZORČENJE ZRAKA

Od decembra 2009 do aprila 2010 smo z vzorčevalnikom SAS (angl. Surface air system sampler) (Cherwell Laboratories, Bicester, Velika Britanija) vzorčili zrak v domačem okolju bolnikov s sarkoidozo in v domačem okolju zdravih kontrol. Vzorčevalnik SAS je enostopenjski, pri katerem vstopa zrak skozi preluknjan zunanji pokrov z 219 luknjicami premera 1 mm. Pod zunanjim pokrovom je nameščena z agarjem napolnjena plošča Rodac (angl. Replicate organism detection and counting), kamor se med vzorčenjem ujamejo delci zraka. Zrak smo vzorčili približno 1 m od tal v spalnicah, kjer ljudje preživimo največ časa, ko smo doma. Zrak smo pri vsakem vzorčenju vzorčili dvakrat zaporedoma na plošče Rodac. Uporabili smo selektivni gojišči za glive, in sicer gojišče po Sabouraudu (SABA) in dikloran-18 % glicerol agar (DG-18).

Ustrezne volumne vzorčenega zraka smo določili z večkratnim poskusnim vzorčenjem. V kontaminiranem okolju vzorčimo manjše volumne zraka, kjer pa pričakujemo nižjo koncentracijo spor, pa večje volumne zraka. Volumen vzorčenega zraka je bil 480 l na ploščo Rodac. Po končanem vzorčenju smo plošče z gojiščem zaprli s parafilmom in jih inkubirali 48 ur pri sobni temperaturi. Štetje in identifikacija zraslih kolonij je potekala v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Plošče smo dnevno pregledovali ter določali število zraslih kolonij. Število kolonij na posamezni plošči smo izrazili kot koncentracijo spor na volumsko enoto zraka (Ocvirk in sod., 2004; Matos in Kavčič, 2010). To je CFU (angl. colony forming units) na  $m^3$  (CFU/ $m^3$ ), ki smo jo določili s formulo in korekcijskimi tabelami, ki so priložene vzorčevalniku in jih priporoča tudi proizvajalec. CFU/ $m^3$  smo izračunali po naslednji formuli (Morris in sod., 2000):

$CFU/m^3 = \text{število prešteti kolonij na plošči (z upoštevanjem korekcijskega koeficienta)} \times 1000 / \text{volumen vzorčenega zraka} \dots(1)$

Po 48 urah smo zrasle kolonije precepili na SABA ter inkubirali pri 30 °C. Identifikacija kolonij je potekala po dihotomnem ključu z makroskopsko analizo kultur in s prepoznavanjem značilnih morfoloških struktur v mikroskopskem preparatu. Preparate smo pripravili s samolepilnim trakom in jih obarvali s kapljico modrila (ang. Lactophenol-Cotton Blue). Tako pripravljene preparate smo pregledovali pri 400- in 1000-kratni povečavi. Kolonije, ki so na SABA slabo zrasle ali jih nismo uspeli identificirati, smo precepili na Czapek agar ali gojišče z ovsenimi kosmiči, ki pospešujeta konidiogenezo plesni, ki je osnova mikroskopske identifikacije.

Raziskava je bila z etičnega vidika neoporečna, zato nam je Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko dne 9. 10. 2009 zanj izdala soglasje št. 21/10/09. Za sodelovanje v raziskavah so preiskovanci privolili s podpisom.

### 3.3 DOLOČANJE SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI GLIVAM

#### 3.3.1 Določanje specifičnih protiteles IgG proti glivam

V plazmi zdravih kontrol (N=20) in bolnikov s sarkoidozo pred terapijo (N=22) smo določili koncentracijo specifičnih protiteles IgG proti *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus* spp., *Mucor racemosus*, *Aleternaria alternata*, *Micropolyspora faeni*, *Thermoactinomyces vulgaris* in *Candida* spp. Koncentracijo protiteles smo določili z uporabo analizatorja ImmunoCAP 100 (Phadia, Uppsala, Švedska) s testnim kompletom ImmunoCAP® Specific IgG (Phadia, Uppsala, Švedska) v Laboratoriju za diagnostiko alergij in citokinov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Pri določanju protiteles smo teste izvajali skladno z navodili proizvajalca testa.

Metoda je bila fluoroencimskoimunski test. Antigen je bil kovalentno vezan na ImmunoCAP in je reagiral z IgG v vzorcu, ki se avtomatsko redči v puffru 1:100 v

analizatorju. Po spiranju nevezanih sestavin je sledila stopnja dodajanja konjugata, ki je tvorila kompleks z IgG, vezanim na antigen. Po spiranju nevezanih protiteles je sledila inkubacija z reagentom za razvijanje reakcije. Reakcijo smo ustavili z reagentom za prekinitev reakcije, temu je sledilo zadnje spiranje ImmunoCAP-a in merjenje fluorescence v izpirku. Več fluorescence je pomenilo več IgG v vzorcu. Za vrednotenje rezultata meritve v vzorcu smo uporabljali umeritveno krivuljo.

### **3.3.2 Določanje specifičnih protiteles IgA, IgM in IgG proti *Aspergillus fumigatus* in *Candida albicans***

V plazmi zdravih kontrol (N=20) in bolnikov s sarkoidozo pred terapijo (N=22) smo določili koncentracijo specifičnih protiteles IgA, IgM in IgG proti *Aspergillus fumigatus* in *Candida albicans*. Koncentracijo protiteles smo določili z encimskoimunskimi testi ELISA od proizvajalca Virion-Serion (Würzburg, Nemčija), in sicer s testnimi kompleti SERION ELISA classic *Aspergillus fumigatus* in SERION ELISA classic *Candida albicans* (Virion-Serion, Würzburg, Nemčija) v Laboratoriju za humoralno imunost in serološko diagnostiko glivičnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Pri določanju protiteles smo teste izvajali skladno z navodili proizvajalca testa.

SERION ELISA classic je dvostopenjski encimskoimunski test v mikroplošči. Na mikroploščo je adsorbiran antigen aspergilusa ali kandidate. V prvi stopnji se z antigenom vežejo specifična protitelesa v vzorcu. V drugi stopnji dodamo encimski konjugat, to so protitelesa proti humanim imunoglobulinom IgA, IgM ali IgG, konjugirana z alkalno fosfatazo. Če so v vzorcu specifična protitelesa proti glivi, se ta protitelesa vežejo v kompleks z antigenom in encimskim konjugatom in ga zasledimo z barvno reakcijo encima in substrata. Intenziteta obarvanega produkta je sorazmerna koncentraciji protiteles, ki jo določimo kolorimetrično.

### 3.4 REAGENTI IN KOMPONENTE IZ CELIČNE STENE GLIV

Vodo, medij RPMI-1640 z dodatkom 25 mM pufra Hepes, natrijev hidroksid (NaOH), klorovodikovo kislino (HCl), očetno kislino, polimiksin B sulfat, Hanksovo raztopino soli (po zagotovilih proizvajalca so bile vse kemikalije preskušene na celičnih kulturah in preskušene na prisotnost endotoksina - vsebovale so manj kot 1 EU/ml endotoksina), hitosan z nizko molekulsko maso ( $M = 50-190$  kDa) iz rakovih lupin (75-85-odstotni deacetiliran hitosan, HIT), cimosan A iz *Saccharomyces cerevisiae* (CIM), LPS iz *Escherichia coli* (sev 0111:B4), forbol-12-miristat-13-acetat (PMA) in ionomicin smo kupili pri proizvajalcu Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, ZDA). Kurdlan iz *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* smo kupili pri proizvajalcu Wako Pure Chemical Industries (Japonska).

LPS smo raztopili v vodi in pripravili koncentrirano raztopino 1 mg/ml, ki smo jo do uporabe hranili pri  $-30$  °C. V predhodnih poskusih smo pripravili LPS v mediju za celične kulture v koncentracijskem območju od 0 do 1  $\mu\text{g/ml}$  in merili TNF- $\alpha$  v supernatantih PBMC. Na podlagi teh poskusov je bila končna koncentracija LPS v nadaljnjih poskusih 10 ng/ml. Topni (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukan (BGT) smo pripravili iz suspenzije kurdlana v 0,3 M NaOH, ki smo jo segrevali pri 80 °C v vodni kopeli, dokler se kurdlan ni popolnoma raztopil. Koncentrirano raztopino BGT 20 mg/ml smo do uporabe hranili pri  $-30$  °C. Pred poskusi smo pH tako pripravljenega BGT pred dodajanjem v celične kulture nevtralizirali z 0,3 M HCl. Netopna oblika (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukana (BGN) je bila pripravljena kot suspenzija kurdlana v mediju RPMI 1640. Koncentrirano raztopino BGN 10 mg/ml smo do uporabe hranili pri  $-30$  °C. CIM smo pripravili po navodilih proizvajalca. Na kratko, prah CIM smo segrevali v 0,25 M NaOH 30 minut pri 100 °C. CIM smo nato temeljito sprali in resuspendirali do koncentrirane raztopine 7,5 mg/ml v mediju RPMI 1640, ki smo jo do uporabe hranili pri  $-30$  °C. HIT smo pripravili kot koncentrirano raztopino 2 mg/ml v 0,2-odstotni očetni kislini. V predhodnih poskusih smo pripravili BGT, BGN, CIM in HIT v mediju za celične kulture v koncentracijskem območju od 0 do 400  $\mu\text{g/ml}$  in merili TNF- $\alpha$  v supernatantih PBMC. Na podlagi teh poskusov je bila končna koncentracija KCSG v nadaljnjih poskusih 200  $\mu\text{g/ml}$ . Polimiksin B s končno koncentracijo 50  $\mu\text{g/ml}$  smo uporabili kot ireverzibilni inhibitor sinteze citokinov, spodbujene z LPS (Nabereznykh in

sod., 2008). Isonomicin smo pripravili v dimetil sulfoksidu (DMSO) do koncentrirane raztopine 1 mM. PMA smo raztopili v Hanksovi raztopini soli do koncentrirane raztopine 6 mg/ml in ga sterilno filtrirali skozi filter s porami premera 0,22 µm. Koncentrirani raztopini isonomicina in PMA smo do uporabe hranili pri -30 °C. Pred poskusom smo končno koncentracijo isonomicina 500 nM in PMA 3,33 ng/ml pripravili v mediju za celične kulture.

### 3.5 IZOLACIJA IN SPODBUJANJE HUMANIH PBMC

Penicilin, streptomycin, L-glutamin, humani serum skupine AB in fetalni telečji serum (po zagotovilih proizvajalca so bile vse kemikalije preskušene na celičnih kulturah in preskušene na prisotnost endotoksina - vsebovale so manj kot 1 EU/ml endotoksina) smo kupili pri proizvajalcu Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, ZDA). Po zagotovilih proizvajalca so bile omenjene kemikalije preskušene na celičnih kulturah ter preskušene na prisotnost endotoksina in so vsebovale manj kot 1 EU/ml endotoksina. Ficoll-Paque<sup>TM</sup> smo pridobili pri GE Healthcare (Velika Britanija). Plošče za celične kulture pa smo kupili pri Corning Costar<sup>®</sup> (ZDA).

*In vitro* spodbujanje humanih PBMC smo izvajali po že opisanem modelu (Simčič in sod., 2000; Berovič in sod., 2003; Švagelj in sod., 2008). Na kratko, PBMC smo izolirali iz venske krvi z EDTA s centrifugiranjem na gostotnem gradientu ločevalnega medija Ficoll-Paque<sup>TM</sup>. Celice smo obarvali s tripanskim modrilom in jih šteli v Neubauerjevi komori pod svetlobnim mikroskopom. Za gojenje PBMC v kulturi in za pripravo ustreznih razredčin aktivatorjev smo uporabljali medij RPMI 1640 z dodatkom 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml streptomicina in 10-odstotnega humanega seruma ali 5-odstotnega fetalnega telečjega seruma, ki smo ju pred tem inaktivirali s 30-minutno toplotno kopeljo pri 56 °C. Fetalni telečji serum smo uporabili pri spodbujanju PBMC s kombinacijo aktivatorjev isonomicina in PMA pri 40-urni inkubaciji.

Celice smo gojili na ploščah za celične kulture s 24 vdolbinicami. V vsako vdolbinico smo odpipetirali 1 ml celične suspenzije ( $1 \times 10^6$  celic) in 500 µl dodatkov (končni volumen 1,5 ml). Koncentracija PBMC v kulturah je torej znašala  $6,66 \times 10^5$  celic/ml. Za negativno



kontrolno smo kulturi PBMC dodali samo hranilni medij. Za ugotavljanje citokinskega odziva smo PBMC kulturam dodali LPS ali KCSG ali kombinacijo LPS in KCSG. Končna koncentracija LPS v kulturi je bila 10 ng/ml, KCSG pa 200 µg/ml. Da smo lahko izločili možnost kontaminacije pripravkov KCSG z LPS, smo poleg naštetih pogojev kulturam s KCSG dodali tudi polimiksin B in primerjali citokinski odziv z odzivom kultur samo s KCSG (Berovič in sod., 2003; Švigelj in sod., 2008). Tako pripravljene kulture PBMC smo gojili 4 in 18 ur v inkubatorju s 5-odstotnim CO<sub>2</sub>, 95-odstotno zračno vlažnostjo in temperaturo 37 °C. Pri spodbujanju PBMC z aktivatorjema ionomicinom in PMA ter kombinacijo slednjih s KCSG smo kulture gojili 40 ur. Supernatante celičnih kultur smo do nadaljnje uporabe hranili pri -30 °C.

### 3.6 TEST CITOTOKSIČNOSTI

Citotoksičnost posameznih KCSG ali kombinacijo KCSG in LPS smo preverili z alamarBlue<sup>®</sup> Cell Viability Reagent (Invitrogen, ZDA). Reagent alamarBlue<sup>®</sup> vsebuje netoksično modro barvilo - resazurin, ki prehaja skozi membrano celic. Po vstopu v citosol se resazurin reducira v resorufin, ki je rdeče barve in je visoko fluorescenten. Zdrave, nepoškodovane celice neprestano vzpostavljajo reducirajoči potencial v citosolu. Količina fluorescence pri testu je sorazmerna s številom živih celic in odgovarja celični metabolni aktivnosti. Poškodovane in mrtve celice imajo nižjo naravno metabolno aktivnost in sorazmerno nižji signal kot zdrave celice.

1,2 x 10<sup>5</sup> PBMC smo gojili v ploščah za celične kulture s 96 vdolbinicami v mediju, z 200 µg/ml posameznih KCSG ali s kombinacijo 10 ng/ml LPS in 200 µg/ml KCSG v CO<sub>2</sub> inkubatorju pri 37 °C 4 in 18 ur. Zadnji 2 uri vsake inkubacijske dobe smo v vse kulture dodali tudi reagent alamarBlue<sup>®</sup>. Za kontrolo smo poleg medija uporabili lizacijski pufer. Reducirajoča moč PBMC v mediju izmerjena kot intenziteta fluorescence resorufina pri ekscitacijski/emisijski valovni dolžini 530/590 nm, ki smo jo izmerili na fluorometru Synergy 2 (BioTek<sup>®</sup>, ZDA) je bila primerljiva z reducirajočo močjo spodbujenih kultur PBMC glede na navodila proizvajalca.

### 3.7 DOLOČANJE CITOKINOV V SUPERNATANTIH KULTUR PBMC

Koncentracijo citokinov TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12 in IL-17 v supernatantih kultur PBMC smo določevali z encimskoimunskimi testi ELISA. Koncentracijo TNF- $\alpha$  smo določali po 4-urni inkubaciji pri 37 °C z uporabo reagentov podjetja Milenia Biotec (Nemčija) s testnimi kompleti Milenia TNF- $\alpha$ . Koncentracije citokinov IL-6, IL-10 in IL-12 smo določevali v supernatantih po 18-urni inkubaciji pri 37 °C z reagenti podjetja Pierce Biotechnology (Thermo Scientific, ZDA), in sicer s testnimi kompleti Human IL-6 ELISA, Human IL-10 ELISA in Total Human IL-12 (IL-12, p40&p70) ELISA. Po 40-urni inkubaciji pa smo določevali koncentracijo citokina IL-17 z reagenti iz podjetja BioSource Europe S.A. (Belgija), in sicer s testnim kompletom IL-17 Cytoscreen. Občutljivosti testov za določanje TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12 in IL-17 so si sledile v naslednjem vrstnem redu: 6, 1, 3, 5 in 2 pg/ml. Pri določanju citokinov smo teste ELISA izvajali skladno z navodili ustreznega proizvajalca testa.

Vsi zgoraj naštetih testi ELISA so dvostopenjski encimsko imunski test v mikroplošči. Na mikroploščo so bila adsorbirana protitelesa proti ustreznemu citokinu. V prvi stopnji se z antigeni (citokini) v vzorcu vežejo protitelesa. V drugi stopnji dodamo encimski konjugat, to so protitelesa proti antigenom, konjugirana z encimom. Če so v vzorcu antigeni, se ta protitelesa vežejo v kompleks z antigenom in encimskim konjugatom in ga zasledimo z barvno reakcijo encima in substrata. Intenziteta obarvanega produkta je sorazmerna koncentraciji citokina, ki jo določimo kolorimetrično. S fotometrom Synergy 2 (BioTek<sup>®</sup>, ZDA) smo izmerili absorbanco vsebine posameznih vdolbinic pri 450 nm (referenčni filter 550 nm) ali 405 nm (referenčni filter 630 nm). Koncentracije citokinov v vzorcih smo določili s pomočjo umeritvene krivulje.

### 3.8 SINERGISTIČNI INDEKS

Modulatorne učinke KCSG na sintezo citokinov, spodbujeno z LPS v kulturah PBMC, smo ovrednotili s sinergističnim indeksom (SI). SI smo izračunali iz eksperimentalne vrednosti (KCSG + LPS) in teoretično aditivnih učinkov KCSG in LPS z enačbo (Engstad in sod., 2002; Ferwerda in sod., 2008):

$$SI = \frac{\text{citokin}(KCSG + LPS)}{\text{citokin}(KCSG) + \text{citokin}(LPS)} \quad \dots(2)$$

### 3.9 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški program PSAW/SPSS for Windows version 18 (SPSS Inc. IBM Company, ZDA) (SPSS Inc., 2010). Preglednice smo oblikovali z računalniškim programom Microsoft Excel, MS Office 2007. Izračunali smo srednje vrednosti ( $\bar{x}$ ) in standardne napake (SEM). Ker so podatki večinoma odstopali od normalne porazdelitve, smo podatke analizirali z neparametričnimi testi. Za ugotavljanje statistično značilnih razlik med skupinama smo uporabili Mann-Whitneyev test, za analizo parnih povezanih spremenljivk pa test Wilcoxon. Stopnjo korelacije smo izračunali s Spearmanovim koeficientom korelacije. Statistična značilnost je bila določena s statistično vrednostjo  $p < 0,05$ .

## 4 REZULTATI

### 4.1 KONCENTRACIJA IN VRSTNA RAZNOLIKOST PLESNI V DOMAČEM OKOLJU BOLNIKOV S SARKOIDOZO

V času od decembra 2009 do aprila 2010 smo opravili vzorčenje zraka z vzorčevalnikom SAS v domačem okolju petnajstih bolnikov s sarkoidozo in v domačem okolju petnajstih zdravih kontrol. Vzorčenje je potekalo v spalnicah, kjer ljudje preživimo največ časa, ko smo doma. Zrak smo v vsakem stanovanju vzorčili dvakrat zaporedoma na RODAC plošče. Volumen vzorčenega zraka je bil 480 l na posamezno ploščo. Uporabili smo gojišči SABA in DG-18. Število zraslih kolonij plesni na posamezni plošči smo izrazili kot koncentracijo spor plesni na volumsko enoto zraka, t. i. CFU na m<sup>3</sup>. Identifikacija kolonij je potekala po dihonomnem ključu z makroskopsko analizo kultur in s prepoznavanjem značilnih morfoloških struktur v mikroskopskem preparatu.

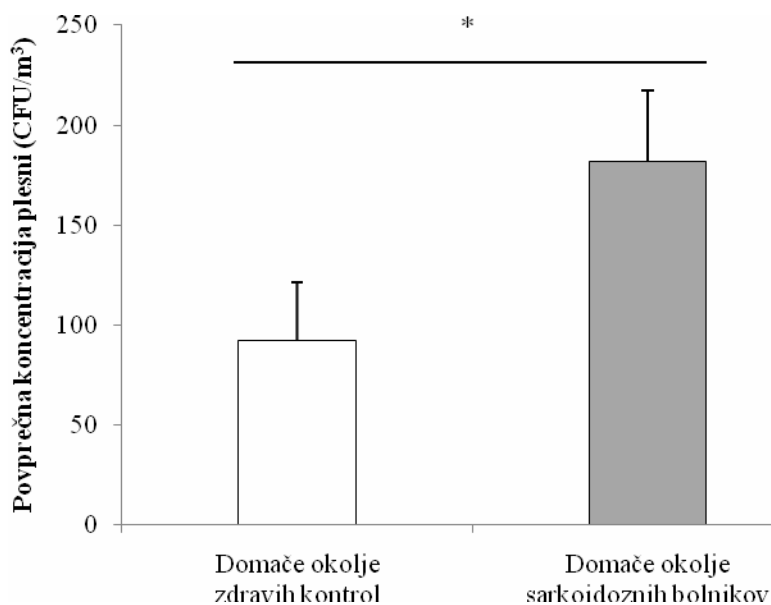
#### 4.1.1 Primerjava med koncentracijo spor plesni v domačem okolju bolnikov s sarkoidozo in v domačem okolju zdravih kontrol

Rezultati vzorčenja zraka so pokazali, da so imeli bolniki s sarkoidozo v domačem okolju dvakrat višjo statistično značilno koncentracijo spor plesni ( $182,0 \pm 35,3$  CFU/m<sup>3</sup>) v primerjavi z zdravimi kontrolami ( $92,2 \pm 29,3$  CFU/m<sup>3</sup>) ( $p=0,018$ ). Rezultati so prikazani v Preglednici 1 in na Sliki 4.

Preglednica 1: Razpon in povprečna koncentracija spor plesni (CFU/m<sup>3</sup>) v zraku domačega okolja bolnikov s sarkoidozo in v zraku domačega okolja zdravih kontrol

Table 1: The range and the average concentrations of mould spores (CFU/m<sup>3</sup>) in the air of homes of patients with sarcoidosis and healthy subjects

| Področje vzorčenja                  | Razpon koncentracij plesni (CFU/m <sup>3</sup> ) | Povprečna koncentracija plesni (CFU/m <sup>3</sup> ± SEM) |
|-------------------------------------|--|---|
| Domače okolje zdravih kontrol       | 4,8 - 424,9                                      | 92,2 ± 29,3   |
| Domače okolje sarkoidoznih bolnikov | 37,7 - 445,2                                     | 182,0 ± 35,3  |



Slika 4: Povprečna koncentracija spor plesni (CFU/m<sup>3</sup>) v zraku domačega okolja sarkoidoznih bolnikov in domačega okolja zdravih kontrol

Figure 4: The average concentrations of mould spores (CFU/m<sup>3</sup>) in the air of homes of patients with sarcoidosis and healthy controls

Vzorčenje zraka smo opravili z vzorčevalnikom SAS v domačem okolju bolnikov s sarkoidozo (N=15) in v domačem okolju zdravih kontrol (N=15). Zrak smo v vsakem stanovanju vzorčili dvakrat zaporedoma na RODAC plošče, in sicer na gojišči SABA in DG-18. Volumen vzorčenega zraka je bil 480 l na posamezno ploščo. Število zraslih kolonij plesni na posamezni plošči smo izrazili kot koncentracijo spor plesni na volumsko enoto zraka, t. i. CFU na m<sup>3</sup>. Vrednosti na grafu predstavljajo povprečje CFU/m<sup>3</sup> ± SEM. \*p<0,05: statistično značilno različna koncentracija plesni v primerjavi s koncentracijo plesni pri zdravih kontrolah.

#### 4.1.2 Primerjava vrstne raznolikosti plesni v domačem okolju bolnikov s sarkoidozo in v domačem okolju zdravih kontrol

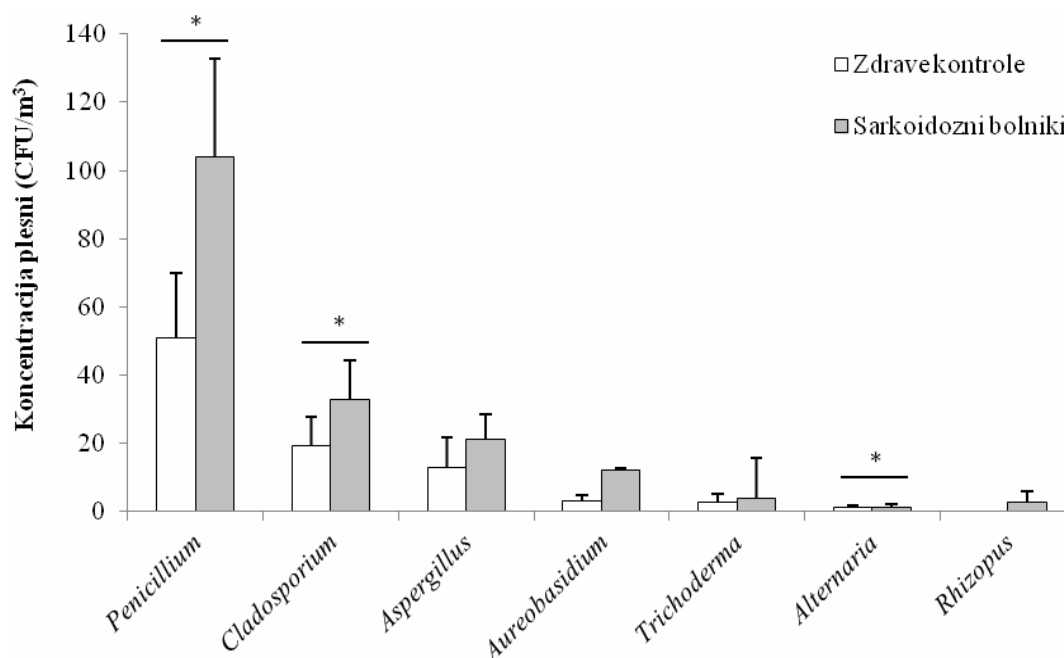
V domačem okolju bolnikov s sarkoidozo in v domačem okolju zdravih kontrol so se z najvišjimi povprečnimi koncentracijami spor pojavljale plesni iz rodu *Penicillium* (Preglednica 2 in Slika 5). Bolniki so imeli statistično značilno višjo koncentracijo plesni iz rodu *Penicillium* (103,8 ± 28,8) v primerjavi z zdravimi (50,9 ± 19,1) (p=0,048). V obeh okoljih so nato po pogostosti sledile plesni iz rodov *Cladosporium* in *Aspergillus*. Bolniki so imeli statistično značilno višjo koncentracijo plesni iz rodu *Cladosporium* (32,9 ± 11,6) v primerjavi z zdravimi (19,3 ± 8,6) (p=0,035). V domačem okolju zdravih kontrol so sledile še plesni iz rodu *Aureobasidium* in *Trichoderma*, v domačem okolju bolnikov s sarkoidozo pa *Trichoderma* in *Alternaria*. Bolniki so imeli statistično značilno višjo

koncentracijo plesni iz rodu *Alternaria* ( $3,8 \pm 0,9$ ) v primerjavi z zdravimi ( $1,1 \pm 0,6$ ) ( $p=0,014$ ).

Preglednica 2: Povprečna koncentracija izoliranih rodov plesni (CFU/m<sup>3</sup>) v zraku domačega okolja bolnikov s sarkoidozo in v zraku domačega okolja zdravih kontrol

Table 2: The average concentrations of isolated mould genera (CFU/m<sup>3</sup>) in the air of homes of patients with sarcoidosis and healthy controls

| <b>Rod plesni</b>     | <b>Domače okolje<br/>zdravih kontrol<br/>(CFU/m<sup>3</sup> ± SEM)</b> | <b>Domače okolje<br/>sarkoidoznih bolnikov<br/>(CFU/m<sup>3</sup> ± SEM)</b> |
|-----------------------|--|--|
| <i>Alternaria</i>     | 1,1 ± 0,6  | 3,8 ± 0,9  |
| <i>Aspergillus</i>    | 13,1 ± 8,5   | 21,3 ± 7,2   |
| <i>Aureobasidium</i>  | 3,1 ± 1,9  | 1,4 ± 0,6  |
| <i>Cladosporium</i>   | 19,3 ± 8,6   | 32,9 ± 11,6  |
| <i>Fusarium</i>       | 0,1 ± 0,1  | 0,4 ± 0,4  |
| <i>Mucor</i>          | 0  | 0,4 ± 0,3  |
| <i>Penicillium</i>    | 50,9 ± 19,1  | 103,8 ± 28,8   |
| <i>Paecilomyces</i>   | 1,0 ± 0,7  | 0,1 ± 0,1  |
| <i>Rhizopus</i>       | 0  | 2,9 ± 2,9  |
| <i>Scopulariopsis</i> | 0,6 ± 0,4  | 1,4 ± 0,8  |
| <i>Stachybotrys</i>   | 0  | 0,3 ± 0,3  |
| <i>Trichocladium</i>  | 0,1 ± 0,1  | 0,4 ± 0,4  |
| <i>Trichoderma</i>    | 2,9 ± 2,2  | 12,2 ± 12,1  |
| <i>Ulocladium</i>     | 0  | 0,6 ± 0,6  |



Slika 5: Primerjava povprečne koncentracije najpogostejših rodov plesni (CFU/m<sup>3</sup>) v domačem okolju bolnikov s sarkoidozo in v domačem okolju zdravih kontrol

Figure 5: Comparison of the average concentration of the most common genera of moulds (CFU/m<sup>3</sup>) in the air of homes of patients with sarcoidosis and healthy controls

Vzorčenje zraka smo opravili z vzorčevalnikom SAS v domačem okolju bolnikov s sarkoidozo (N=15) in v domačem okolju zdravih kontrol (N=15). Zrak smo v vsakem stanovanju vzorčili dvakrat zaporedoma na RODAC plošče, in sicer na gojišči SABA in DG-18. Volumen vzorčenega zraka je bil 480 l na posamezno ploščo. Število zraslih kolonij plesni na posamezni plošči smo izrazili kot koncentracijo spor plesni na volumsko enoto zraka, t. i. CFU na m<sup>3</sup>. Identifikacija kolonij je potekala po dihotomnem ključu z makroskopsko analizo kultur in s prepoznavanjem značilnih morfoloških struktur v mikroskopskem preparatu. Vrednosti na grafu predstavljajo povprečje CFU/m<sup>3</sup> ± SEM. \*p<0,05: statistično značilno različna koncentracija plesni v primerjavi s koncentracijo plesni pri zdravih kontrolah.

Iz zraka v domačem okolju zdravih kontrol smo izolirali 16 različnih vrst plesni. V zraku domačega okolja bolnikov s sarkoidozo pa je bila nekoliko večja raznolikost plesni, saj smo osamili 19 različnih vrst plesni (Preglednica 3).

Med vrstami plesni smo v zraku domačega okolja zdravih kontrol in v zraku domačega okolja bolnikov s sarkoidozo najpogosteje osamili *Penicillium* spp. (Preglednica 3, Slika 5 in 6). V zraku obeh okolij je nato sledila plesen *Cladosporium herbarum*. V domačem okolju zdravih kontrol so nato sledile plesni *Aspergillus fumigatus*, *Aureobasidium pullulans* in *Trichoderma* spp., v domačem okolju sarkoidoznih bolnikov pa *Trichoderma* spp., *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus niger*.

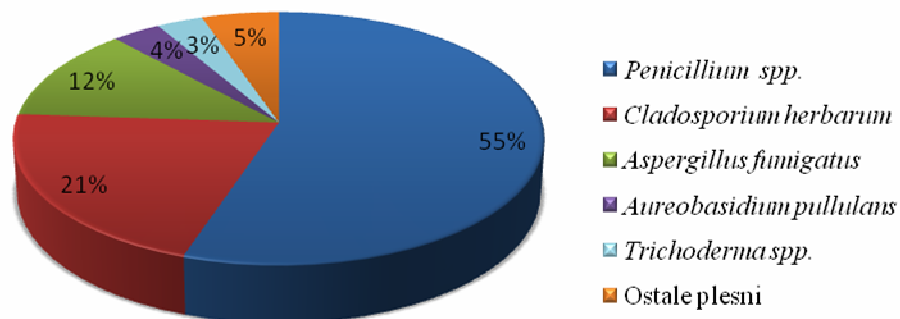
Preglednica 3: Povprečna koncentracija posameznih vrst plesni (CFU/m<sup>3</sup>) v zraku domačega okolja bolnikov s sarkoidozo in v zraku domačega okolja zdravih kontrol

Table 3: The average concentrations of isolated mould species (CFU/m<sup>3</sup>) in the air of homes of patients with sarcoidosis and healthy controls

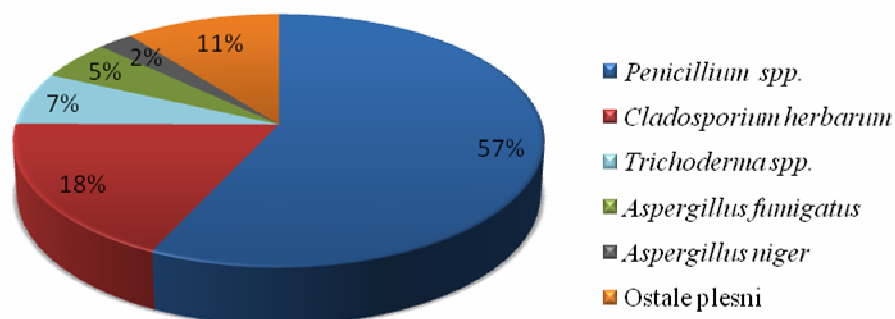
| Vrsta plesni                      | Domače okolje<br>zdravih kontrol<br>(CFU/m <sup>3</sup> ± SEM) | Domače okolje<br>sarkoidoznih bolnikov<br>(CFU/m <sup>3</sup> ± SEM) |
|-----------------------------------|--|--|
| <i>Alternaria alternata</i>       | 1,1 ± 0,6  | 3,5 ± 0,9  |
| <i>Alternaria chlamydospora</i>   | 0  | 0,3 ± 0,3  |
| <i>Aspergillus</i> spp.           | 0,1 ± 0,1  | 4,3 ± 3,5  |
| <i>Aspergillus candidus</i>       | 0,3 ± 0,3  | 0  |
| <i>Aspergillus flavus</i>         | 0,4 ± 0,4  | 0  |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>      | 11,1 ± 8,6   | 9,2 ± 5,7  |
| <i>Aspergillus niger</i>          | 1,1 ± 0,7  | 4,4 ± 3,5  |
| <i>Aspergillus terreus</i>        | 0  | 0,4 ± 0,4  |
| <i>Aspergillus ustus</i>          | 0,1 ± 0,1  | 0  |
| <i>Aspergillus versicolor</i>     | 0  | 2,9 ± 1,7  |
| <i>Aureobasidium pullulans</i>    | 3,1 ± 1,9  | 1,4 ± 0,6  |
| <i>Cladosporium herbarum</i>      | 19,3 ± 8,6   | 32,9 ± 11,6  |
| <i>Fusarium</i> spp.              | 0  | 0,4 ± 0,4  |
| <i>Fusarium solani</i>            | 0,1 ± 0,1  | 0  |
| <i>Mucor</i> spp.                 | 0  | 0,5 ± 0,3  |
| <i>Penicillium</i> spp.           | 50,9 ± 19,1  | 103,8 ± 28,8   |
| <i>Paecilomyces variottii</i>     | 1,0 ± 0,7  | 0,1 ± 0,1  |
| <i>Rhizopus oryzae</i>            | 0  | 2,9 ± 2,9  |
| <i>Scopulariopsis</i> spp.        | 0,4 ± 0,4  | 1,4 ± 0,8  |
| <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> | 0,1 ± 0,1  | 0  |
| <i>Stachybotrys cartarum</i>      | 0  | 0,3 ± 0,3  |
| <i>Trichocladium</i> spp.         | 0,1 ± 0,1  | 0,4 ± 0,4  |
| <i>Trichoderma</i> spp.           | 2,9 ± 2,2  | 12,2 ± 12,1  |
| <i>Ulocladium</i> spp.            | 0  | 0,6 ± 0,6  |



A Zdrave kontrole



B Sarkoidozni bolniki



Slika 6: Prikaz deležev najpogosteje izoliranih plesni (CFU/m<sup>3</sup>) v zraku domačega okolja zdravih kontrol (A) in v zraku domačega okolja bolnikov s sarkoidozo (B)

Figure 6: The ratio of the most common isolated moulds (CFU/m<sup>3</sup>) in the air of homes of patients with sarcoidosis and healthy controls

Vzorčenje zraka smo opravili z vzorčevalnikom SAS v domačem okolju bolnikov s sarkoidozo (N=15) in v domačem okolju zdravih kontrol (N=15). Zrak smo v vsakem stanovanju vzorčili dvakrat zaporedoma na RODAC plošče, in sicer na gojišči SABA in DG-18. Volumen vzorčenega zraka je bil 480 l na posamezno ploščo. Število zraslih kolonij plesni na posamezni plošči smo izrazili kot koncentracijo spor plesni na volumsko enoto zraka, t. i. CFU na m<sup>3</sup>. Identifikacija kolonij je potekala po dihotomnem ključu z makroskopsko analizo kultur in s prepoznavanjem značilnih morfoloških struktur v mikroskopskem preparatu. Vrednosti na grafu predstavljajo deleže CFU/m<sup>3</sup> (%) glede na vse izolirane plesni v določenem okolju.

## 4.2 PROTITELESNI ODZIV NA GLIVE PRI BOLNIKI S SARKOIDOZO

### 4.2.1 Primerjava koncentracij specifičnih protiteles IgG proti glivam v plazmi bolnikov s sarkoidozo in v plazmi zdravih kontrol

V plazmi dvaindvajsetih bolnikov s sarkoidozo pred terapijo in v plazmi dvajsetih zdravih kontrol smo s kvantitativnim encimsko-immunskim testom z analizatorjem ImmunoCAP 100 določili koncentracije specifičnih protiteles IgG proti naslednjim glivam: *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor racemosus*, *Aleternaria alternata*, *Candida albicans* in proti bakterijama, ki sta podobni glivam: *Micropolyspora faeni* in *Thermoactinomyces vulgaris*.

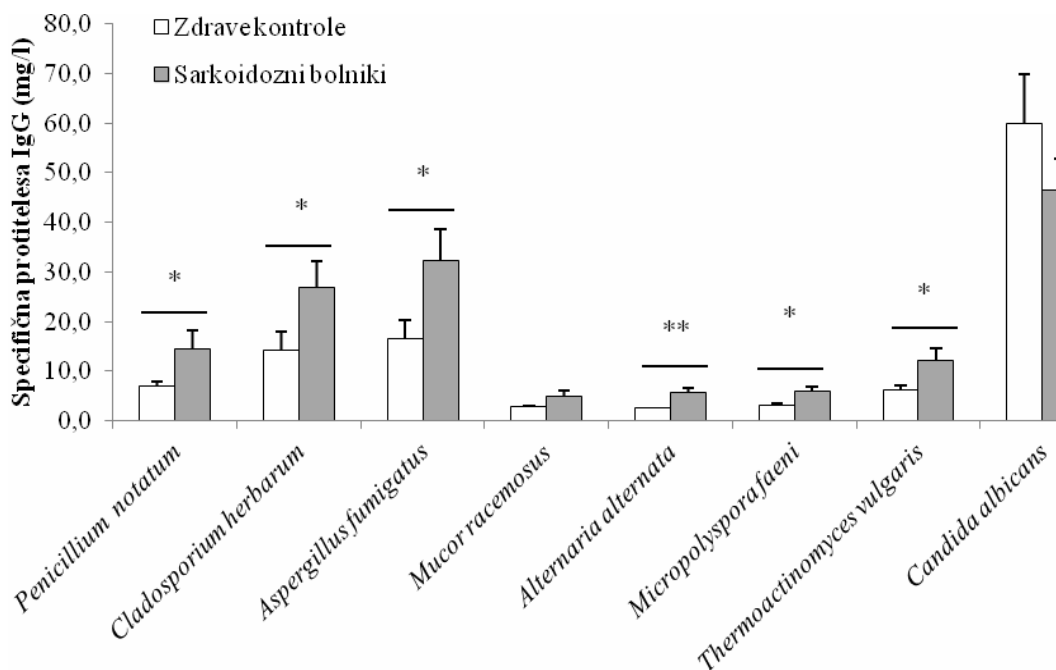
Bolniki s sarkoidozo so imeli v primerjavi z zdravimi kontrolami statistično značilno višje koncentracije specifičnih protiteles IgG proti glivam *Penicillium notatum* ( $p=0,017$ ), *Cladosporium herbarum* ( $p=0,027$ ), *Aspergillus fumigatus* ( $p=0,038$ ), *Aleternaria alternata* ( $p<0,001$ ), *Micropolyspora faeni* ( $p=0,001$ ) in proti *Thermoactinomyces vulgaris* ( $p=0,031$ ) (Preglednica 4, Slika 7). Protitelesni odziv proti glivama *Mucor racemosus* in *Candida albicans* med skupinama ni bil statistično značilno različen.

Koncentracije specifičnih protiteles IgG smo primerjali z normalnimi vrednostmi, ki so bile določene v Laboratoriju za alergije na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani oziroma v Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko Bolnišnice Golnik. Za mešanico plesni *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Mucor racemosus*, *Alternaria alternata* je normalna vrednost do 10,53 mg/l; za *Aspergillus fumigatus* do 39,00 mg/l; za *Candida albicans* do 150,00 mg/l; za mešanico plesni *Micropolyspora faeni* in *Thermoactinomyces vulgaris* pa 10,03 mg/l. Bolniki s sarkoidozo so imeli povišano koncentracijo protiteles proti *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum* in proti *Thermoactinomyces vulgaris*.

Preglednica 4: Povprečna koncentracija specifičnih protiteles IgG proti glivam v plazmi bolnikov s sarkoidozo in v plazmi zdravih kontrol

Table 4: The average concentrations of specific IgG against fungi in plasma of patients with sarcoidosis and healthy controls

| <b>Vrsta glive</b>                | <b>Povprečna koncentracija protiteles IgG (mg/l) ± SEM pri zdravih kontrolah</b> | <b>Povprečna koncentracija protiteles IgG (mg/l) ± SEM pri sarkoidoznih bolnikih</b> |
|-----------------------------------|--|--|
| <i>Penicillium notatum</i>        | 7,1 ± 0,9  | 14,4 ± 3,8   |
| <i>Cladosporium herbarum</i>      | 14,2 ± 3,7   | 26,8 ± 5,3   |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>      | 16,6 ± 3,6   | 32,3 ± 6,4   |
| <i>Mucor racemosus</i>            | 2,8 ± 0,2  | 4,9 ± 1,1  |
| <i>Alternaria alternata</i>       | 2,7 ± 0,1  | 5,6 ± 0,9  |
| <i>Micropolyspora faeni</i>       | 3,0 ± 0,4  | 6,1 ± 0,9  |
| <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> | 6,1 ± 1,0  | 12,1 ± 2,5   |
| <i>Candida albicans</i>           | 59,8 ± 10,0  | 46,4 ± 6,3   |



Slika 7: Primerjava koncentracij specifičnih protiteles IgG proti glivam v plazmi bolnikov s sarkoidozo in v plazmi zdravih kontrol

Figure 7: The comparison of the concentrations of specific antibodies IgG against fungi in the plasma of patients with sarcoidosis and healthy controls

V plazmi bolnikov s sarkoidozo pred terapijo (N=22) in v plazmi zdravih kontrol (N=20) smo s kvantitativnim encimsko-immunskim testom z analizatorjem ImmunoCAP 100 določili koncentracije specifičnih protiteles IgG proti glivam. Vrednosti na grafu predstavljajo povprečje koncentracij IgG v mg/l  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ : statistično značilno različna koncentracija protiteles IgG v primerjavi s koncentracijo protiteles pri zdravih kontrolah.

#### 4.2.2 Primerjava specifičnih protiteles IgA, IgM in IgG proti *Aspergillus fumigatus* in *Candida albicans* v plazmi bolnikov s sarkoidozo in v plazmi zdravih kontrol

V plazmi dvaindvajsetih bolnikov s sarkoidozo pred terapijo in v plazmi dvajsetih zdravih kontrol smo s testom ELISA določili koncentracijo protiteles IgA, IgM in IgG proti glivama *Aspergillus fumigatus* in *Candida albicans* (Preglednica 5).

Protitelesni odziv IgA, IgM in IgG proti *Aspergillus fumigatus* in proti *Candida albicans* med bolniki s sarkoidozo in zdravimi kontrolami ni bil statistično značilno različen (Slika 8). Pri bolnikih je bila v primerjavi z zdravimi opazna tendenca k višji koncentraciji

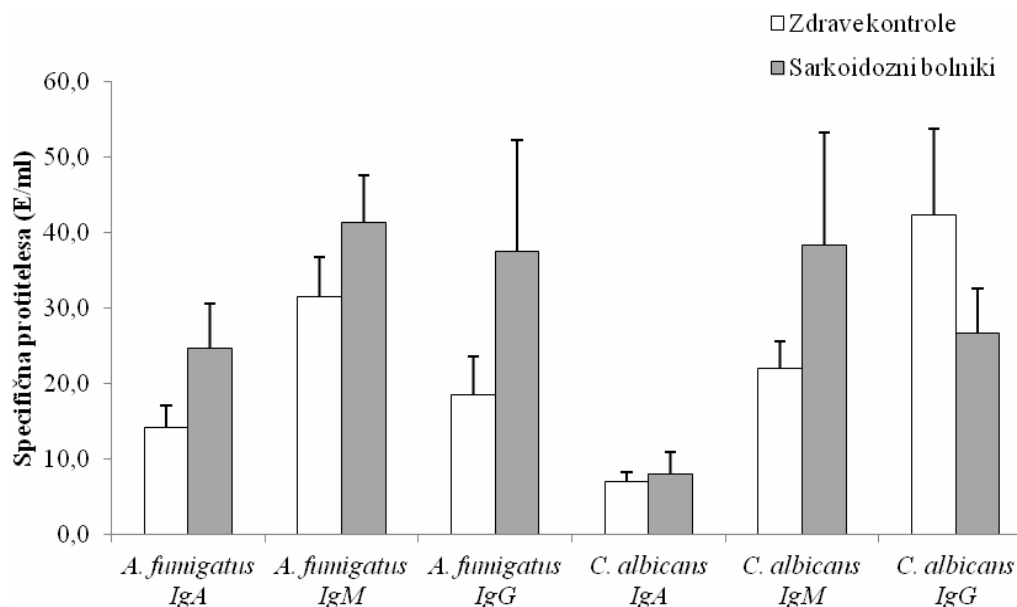
protiteles IgA, IgM in IgG proti *Aspergillus fumigatus* ter IgA in IgM proti *Candida albicans*, ne pa protiteles IgG proti *Candida albicans*.

Koncentracije specifičnih protiteles IgG smo primerjali z normalnimi vrednostmi, ki so bile določene v Laboratoriju za humoralno imunost in serološko diagnostiko glivičnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Normalne vrednosti za protitelesa IgA, IgM in IgG proti *Aspergillus fumigatus* so do 50 E/ml. Normalne vrednosti za protitelesa *Candida albicans* so za IgA in IgM do 50 E/ml, za IgG pa do 40 E/ml. Bolniki s sarkoidozo so imeli rahlo povišano oziroma mejno koncentracijo protiteles IgG proti *Candida albicans*.

Preglednica 5: Povprečna koncentracija specifičnih protiteles IgA, IgM in IgG proti *Aspergillus fumigatus* in *Candida albicans* v plazmi bolnikov s sarkoidozo in v plazmi zdravih kontrol

Table 5: The average concentration of specific antibodies IgA, IgM and IgG against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in plasma of patients with sarcoidosis and healthy controls

| <b>Protitelesa</b>      | <b>Povprečna koncentracija protiteles (E/ml) ± SEM pri zdravih kontrolah</b> | <b>Povprečna koncentracija protiteles (E/ml) ± SEM pri sarkoidoznih bolnikih</b> |
|-------------------------|--|--|
| <i>A. fumigatus</i> IgA | 14,2 ± 2,9   | 24,6 ± 6,0   |
| <i>A. fumigatus</i> IgM | 31,6 ± 5,2   | 41,4 ± 6,2   |
| <i>A. fumigatus</i> IgG | 18,5 ± 5,0   | 37,5 ± 14,8  |
| <i>C. albicans</i> IgA  | 6,9 ± 1,4  | 8,0 ± 3,0  |
| <i>C. albicans</i> IgM  | 21,9 ± 3,6   | 38,4 ± 14,8  |
| <i>C. albicans</i> IgG  | 42,3 ± 11,4  | 26,7 ± 5,9   |



Slika 8: Koncentracija protiteles IgA, IgM in IgG proti *Aspergillus fumigatus* in *Candida albicans* v plazmi zdravih kontrol in v plazmi bolnikov s sarkoidozo

Figure 8: The concentration of antibodies IgA, IgM and IgG against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in plasma of patients with sarcoidosis and healthy controls

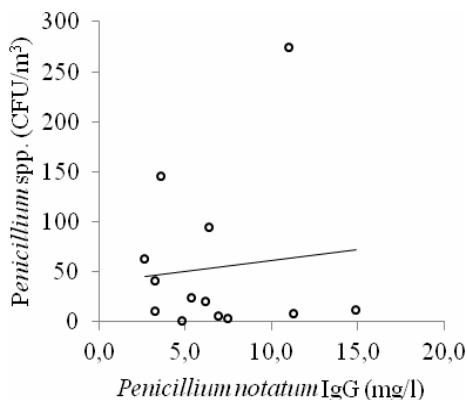
V plazmi bolnikov s sarkoidozo pred terapijo (N=22) in v plazmi zdravih kontrol (N=20) smo s testom ELISA določili koncentracijo protiteles IgA, IgM in IgG proti glivama *Aspergillus fumigatus* in *Candida albicans*. Vrednosti na grafu predstavljajo povprečje koncentracij protiteles v E/ml  $\pm$  SEM.

#### 4.3 POVEZAVA MED KONCENTRACIJO PLESNI V DOMAČEM OKOLJU IN SPECIFIČNIMI PROTITELESI PROTI PLESNIM V PLAZMI

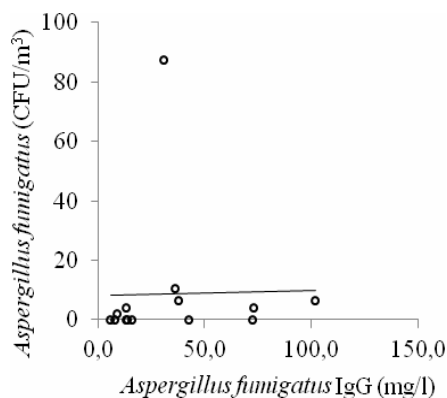
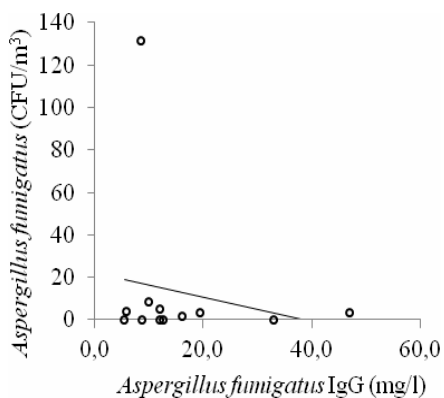
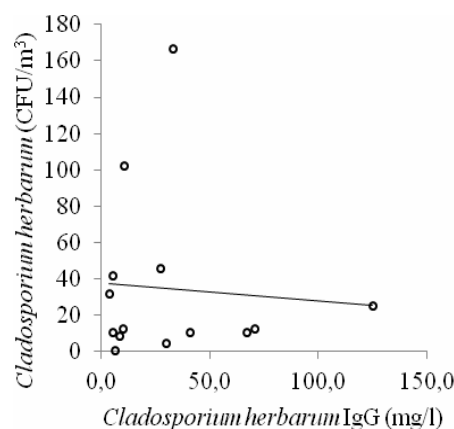
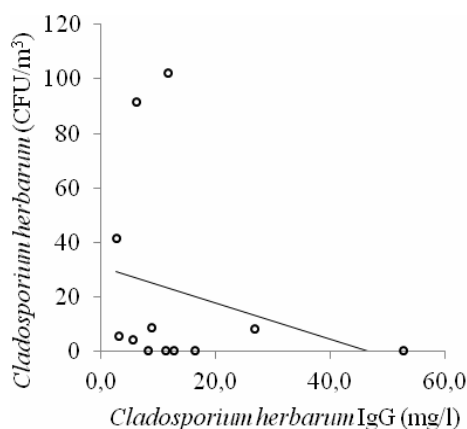
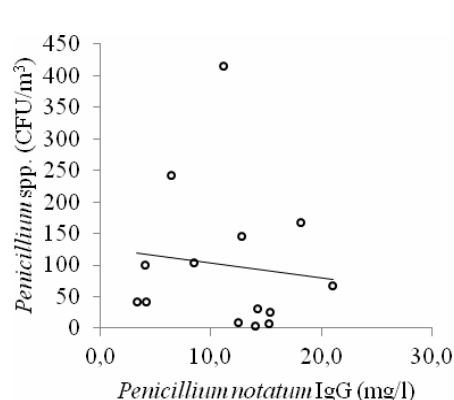
Domnevali smo, da večja koncentracija protiteles proti glivam pri bolnikih s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi odraža večjo obremenitev okolja z glivami. Zato smo preverili, ali obstaja povezava med koncentracijo plesni v domačem okolju in koncentracijo specifičnih protiteles proti plesnim v plazmi tako pri bolnikih s sarkoidozo (N=15) kot pri zdravih kontrolah (N=15). Povezave smo preverili pri plesnih *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus* spp., *Mucor* spp.

Ugotovili smo, da med koncentracijo zgoraj naštetih plesni v domačem okolju in koncentracijo specifičnih protiteles proti plesnim v plazmi ni bilo povezave ne pri bolnikih s sarkoidozo in prav tako ne pri zdravih kontrolah (Sliki 9 in 10).

**A Zdrave kontrole**



**B Sarkoidozni bolniki**

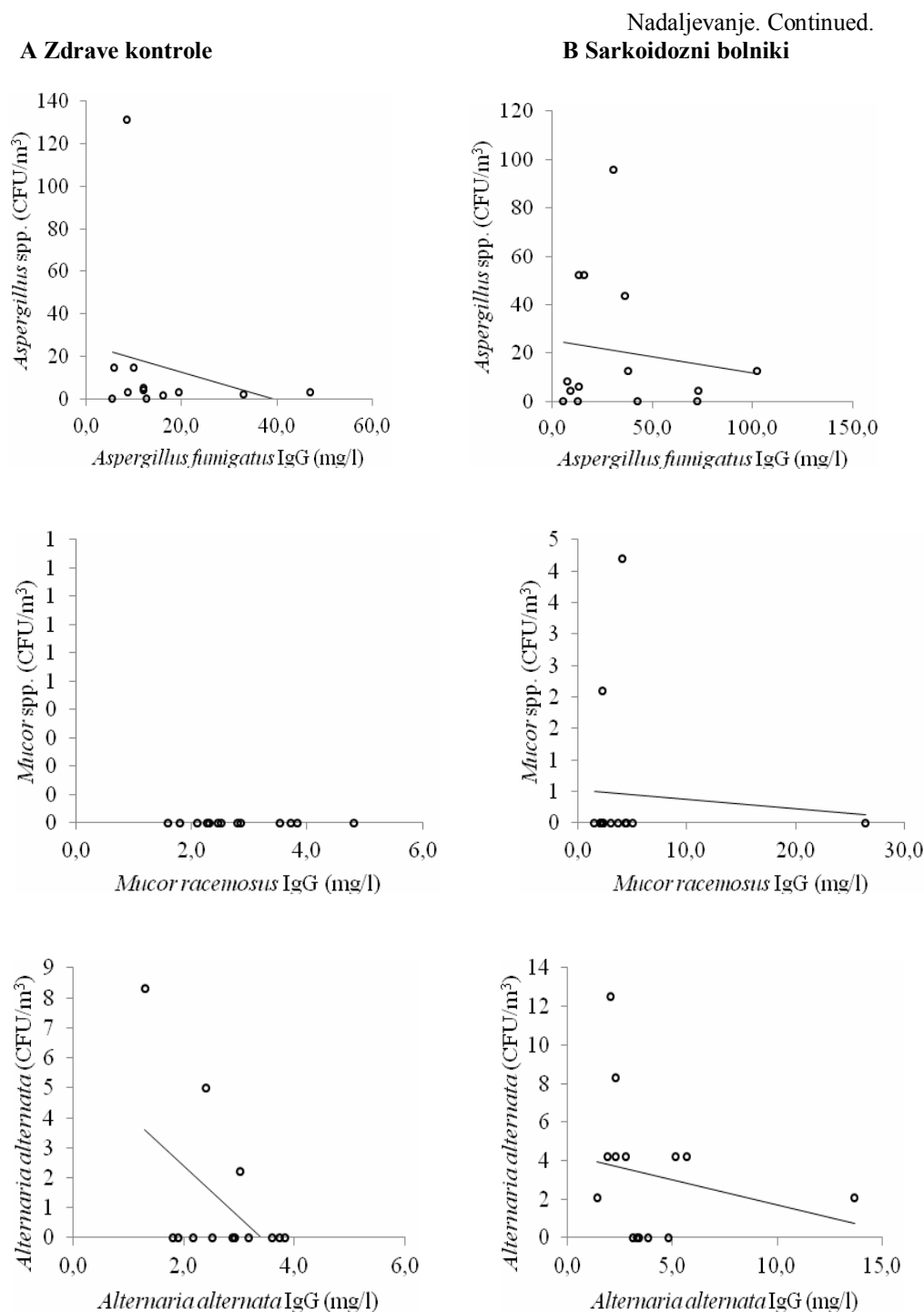


Se nadaljuje. To be continued.

Slika 9: Povezava med koncentracijo plesni v domačem okolju in koncentracijo specifičnih protiteles proti plesnim v plazmi pri zdravih kontrolah (A) in pri bolnikih s sarkoidozo (B)

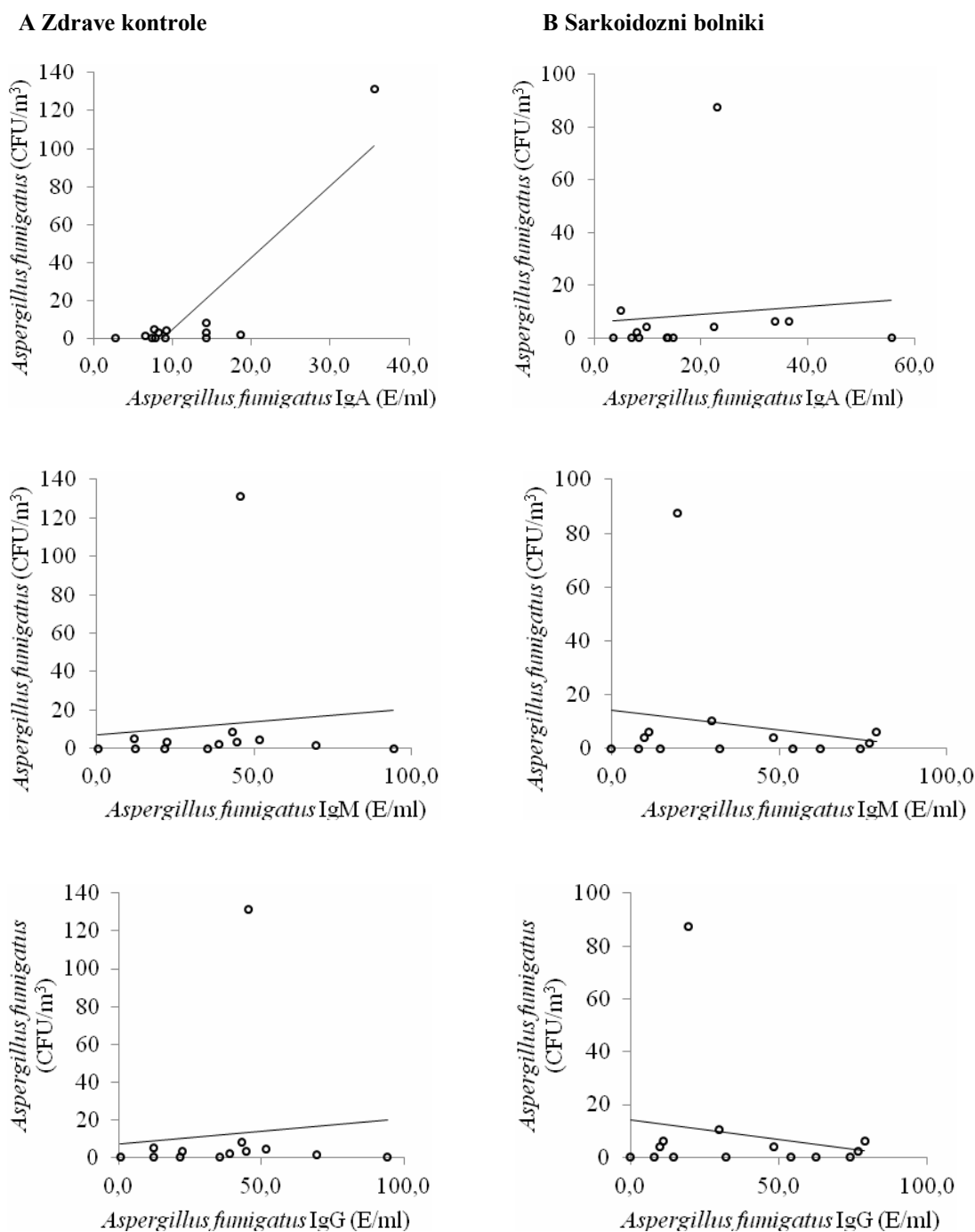
Figure 9: The correlation between the concentrations of moulds in homes and the concentrations of specific antibodies against moulds in the plasma of healthy controls (A) patients with sarcoidosis (B)

Pri bolnikih s sarkoidozo (N=14) in pri zdravih kontrolah (N=13) smo določili koncentracijo plesni v domačem okolju (CFU/m<sup>3</sup>) z vzorčevalnikom SAS in koncentracijo specifičnih protiteles IgG proti plesnim v plazmi s kvantitativnim encimsko-immunskim testom z analizatorjem ImmunoCAP 100. Na sliki so t. i. raztreseni grafi z linearnimi trendnimi linijami.



Slika 9: Povezava med koncentracijo plesni v domačem okolju in koncentracijo specifičnih protiteles proti plesnim v plazmi pri zdravih kontrolah (A) in pri bolnikih s sarkoidozo (B)  
 Figure 9: The correlation between concentrations of moulds in homes and the concentrations of specific antibodies against moulds in the plasma of healthy controls (A) patients with sarcoidosis (B)  
 Pri bolnikih s sarkoidozo (N=14) in pri zdravih kontrolah (N=13) smo določili koncentracijo plesni v domačem okolju (CFU/m<sup>3</sup>) z vzorčevalnikom SAS in koncentracijo specifičnih protiteles IgG proti plesnim v plazmi s kvantitativnim encimsko-immunskim testom z analizatorjem ImmunoCAP 100. Na sliki so t. i. raztreseni grafi z linearnimi trendnimi linijami.





Slika 10: Povezava med koncentracijo *Aspergillus* spp. in *Candida albicans* v domačem okolju in koncentracijo specifičnih protiteles IgA, IgM in IgG proti *Aspergillus fumigatus* in *Candida albicans* v plazmi pri zdravih kontrolah (A) in pri bolnikih s sarkoidozo (B)

Figure 10: The correlation between concentrations of *Aspergillus* spp. and *Candida albicans* in homes and the concentrations of specific antibodies IgA, IgM and IgG against moulds in the plazma of healthy controls (A) patients with sarcoidosis (B)

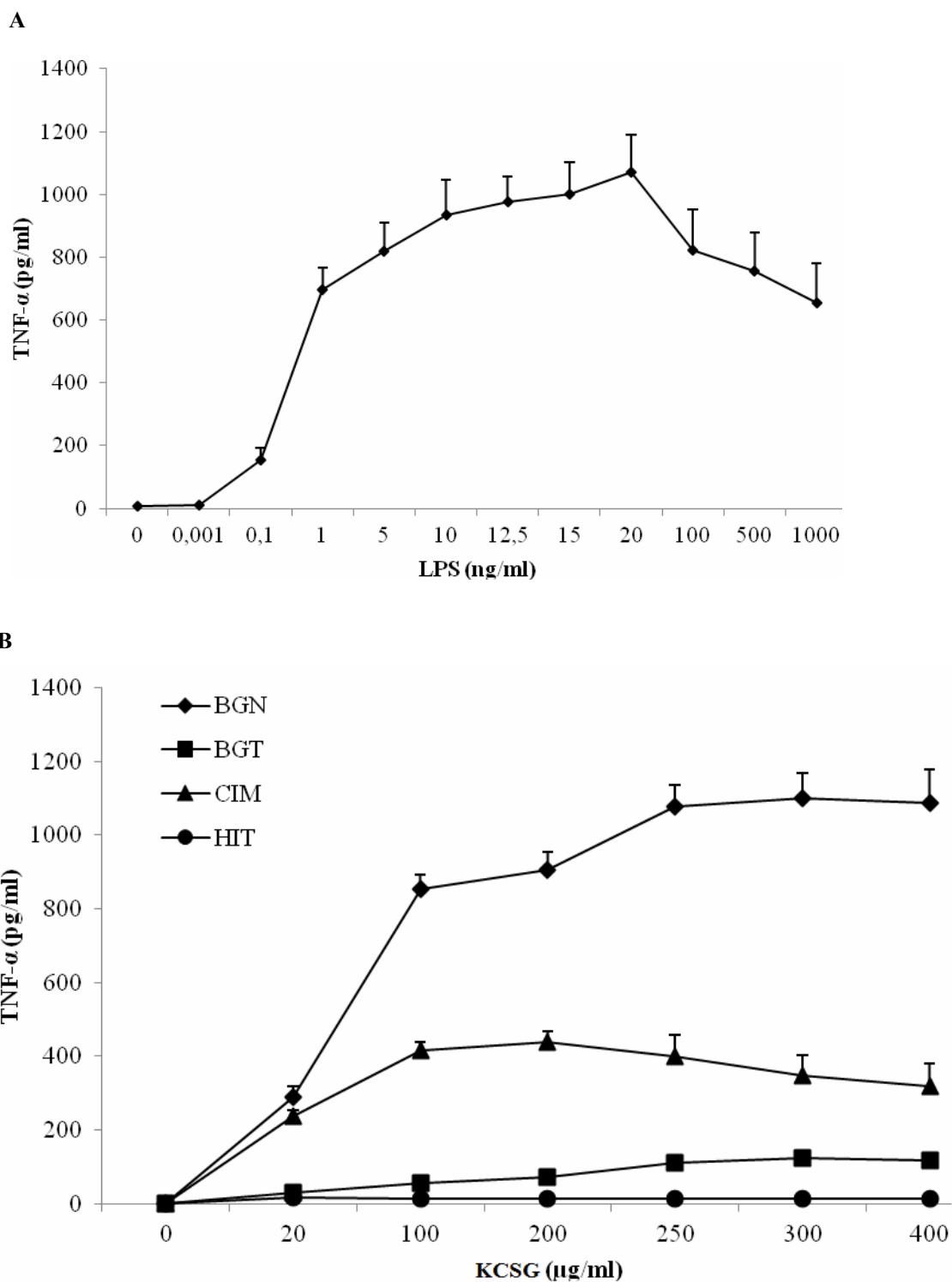
Pri bolnikih s sarkoidozo (N=15) in pri zdravih kontrolah (N=15) smo določili koncentracijo spor plesni v domačem okolju (CFU/m<sup>3</sup>) z vzorčevalnikom SAS in koncentracijo specifičnih protiteles IgA, IgM in IgG proti *Aspergillus fumigatus* in *Candida albicans* v plazmi s testom ELISA. Na sliki so t. i. raztreseni grafi z linearnimi trendnimi črtami.

#### 4.4 CITOKINSKI ODZIV PBMC PO *IN VITRO* SPODBUJANJU S KOMPONENTAMI CELIČNE STENE GLIV

##### 4.4.1 Komponente celične stene gliv (KCSG)

V naših študijah smo za proučevanje citokinskega odziva PBMC po *in vitro* spodbujanju s komponentami iz celične stene gliv (KCSG) uporabili topno in netopno obliko kurdlna (BGT in BGN), cimosana A (CIM) in hitosana (HIT). Kurdlan je linearni (1→3)-β-D-glukan izoliran iz bakterije *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* in je po strukturi enak glivičnemu (1→3)-β-D-glukanu (Stasinopoulos in sod., 1999). Cimosan A je pripravek iz celične stene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* in vsebuje razvejan (1→3)(1→6)-β-D-glukan, manan, proteine in hitin (Young in sod., 2007). Uporabili smo tudi derivat hitina, hitosan z nizko molekulsko maso, ki je prav tako komponenta celične stene gliv (Nwe in Stevens, 2002). Za pozitivno kontrolo smo uporabili bakterijski LPS, ki je znan močan spodbujevalec vnetnega citokinskega odziva. Bili smo prvi, ki smo primerjali *in vitro* vnetni potencial različnih oblik β-glukanov (BGT, BGN in CIM) s HIT in netopni CIM z BGN.

Najprej smo preverili sposobnost spodbujanja citokinskega odziva v PBMC z LPS oziroma s KCSG. PBMC smo gojili z LPS v koncentracijskem območju LPS od 0 do 1 μg/ml ali s KCSG v koncentracijskem območju od 0 do 400 μg/ml. Po 4-urni inkubaciji pri 37 °C smo v supernatantih celičnih kultur določili koncentracijo TNF-α. Slika 11 prikazuje naraščanje TNF-α v našem sistemu v odvisnosti od doze od 0,1 do 20 ng/ml LPS (Slika 11A), od 20 do 300 μg/ml BGN ali BGT ter od 20 do 200 μg/ml CIM (Slika 11B). Nasprotno pa je bila sinteza TNF-α, spodbujena s HIT, v danem koncentracijskem območju skoraj nična. Pri nadaljnjih študijah citokinskega odziva PBMC po *in vitro* spodbujanju smo uporabili suboptimalne koncentracije LPS (10 ng/ml) ali (200 μg/ml).



Slika 11: Sinteza TNF- $\alpha$  v humanih PBMC po *in vitro* spodbujanju z LPS (A) ali različnimi KCSG (B)  
Figure 11: Ability of LPS or fungal cell wall agents (KCSG) to induce TNF- $\alpha$  secretion in human PBMC *in vitro*

Iz venske krvi zdrave kontrole smo izolirali PBMC in jih ( $1 \times 10^6$ /ml) spodbujali z LPS v koncentracijskem območju od 0 do 1  $\mu$ g/ml (A) ali s KCSG v koncentracijskem območju od 0 do 400  $\mu$ g/ml (B). Po 4-urni inkubaciji pri 37 °C smo v supernatantih celičnih kultur določili TNF- $\alpha$  s testom ELISA. Vsaka točka na grafu predstavlja povprečje koncentracije TNF- $\alpha$  v pg/ml  $\pm$  SEM iz petih kultur.

Nadalje smo preverili možnost kontaminacije z LPS naših pripravkov KCSG. Po spodbujanju PBMC s KCSG in polimiksinom B v primerjavi s spodbujanjem s posamezno KCSG ni bilo razlik v nivojih citokinov v PBMC kulturah, zato smo lahko kontaminacijo KCSG z LPS izključili in pripisali izmerjeno sintezo citokinov izključno učinkom KCSG (rezultati niso prikazani). Prav tako smo preverili citotoksičnost v spodbujenih kulturah PBMC. Vsaka posamezna KCSG ali v kombinaciji z LPS v vseh pogojih ni imela toksičnega učinka (rezultati niso prikazani).

Študirali smo tudi vpliv KCSG na izražanje mRNA receptorjev PRR, ki sodelujejo pri prepoznavanju komponent iz celične stene gliv pri naravni imunosti, in sicer dektina-1, TLR2, TLR4 in MR. Rezultate smo objavili v članku v *International Immunopharmacology* (Stopinšek in sod., 2011a; Stopinšek in sod., 2011b).

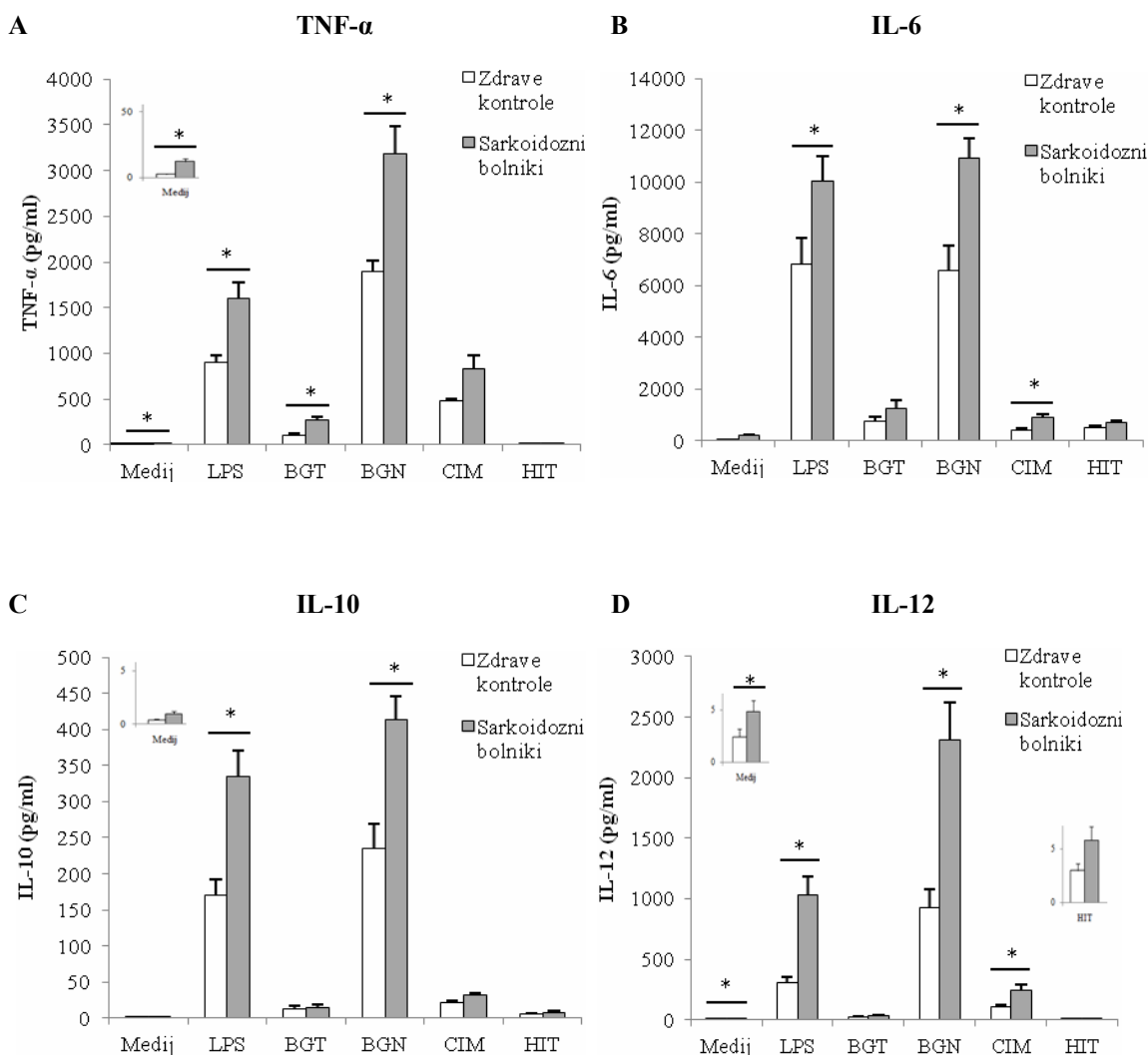
#### **4.4.2 Citokinski odziv PBMC bolnikov s sarkoidozo po *in vitro* spodbujanju s komponentami celične stene gliv**

Citokinski odziv PBMC po *in vitro* spodbujanju s KCSG smo študirali tako, da smo iz venske krvi dvaindvajsetih bolnikov s sarkoidozo pred terapijo in dvajsetih zdravih kontrol izolirali PBMC in jih spodbujali s KCSG (200 µg/ml) ali z LPS (10 ng/ml). Pri študiji citokinskega odziva IL-17 smo PBMC namesto z LPS spodbudili z dvema nefiziološkima agonistoma - ionomicinom (50 nM) in PMA (3,33 ng/ml). V supernatantih celičnih kultur smo nato po 4 urah določili koncentracijo TNF- $\alpha$ , po 18 urah IL-6, IL-10 in IL-12 in po 40 urah IL-17 s testi ELISA. Za omenjeni nabor citokinov smo se odločili, ker so le-ti vpleteni v imunopatogenezo sarkoidoze in so pomembni pri obrambnem mehanizmu pred okužbo z glivami.

Najprej smo študirali citokinski odziv PBMC po spodbujanju s KCSG ali LPS pri zdravih kontrolah. KCSG so v PBMC zdravih kontrolah spodbudile statistično značilno sintezo TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 in IL-12 (Slika 12) v primerjavi z medijem (vsi  $p < 0,05$ ). Edina izjema je bil HIT, ki ni vplival na sintezo IL-12. Nasprotno pa nobena od KCSG ni spodbudila sinteze IL-17 (Slika 13). Le ionomicin in PMA, ki sta predstavljala pozitivno kontrolo, sta spodbudila statistično značilno izločanje IL-17 v primerjavi z medijem ( $p < 0,001$ ). V

primerjavi z LPS, ki je močan spodbujevalec vnetnih citokinov, je BGN povzročil statistično značilno dva- (2,2) do trikrat (3,4) večjo sintezo TNF- $\alpha$ , IL-12 ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ) in enainpolkrat (1,5) večjo sintezo IL-10 ( $p < 0,017$ ). BGN je bil statistično značilno najmočnejši spodbujevalec citokinov TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 in IL-12 v primerjavi z ostalimi KCSG (vsi  $p < 0,001$ ). BGT in CIM sta bila veliko šibkejša pri spodbujanju citokinov TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 in IL-12 v primerjavi z BGN ali z LPS. HIT je spodbudil izločanje majhne, a signifikantne količine TNF- $\alpha$ , IL-6 in IL-10 (vsi  $p < 0,05$ ).

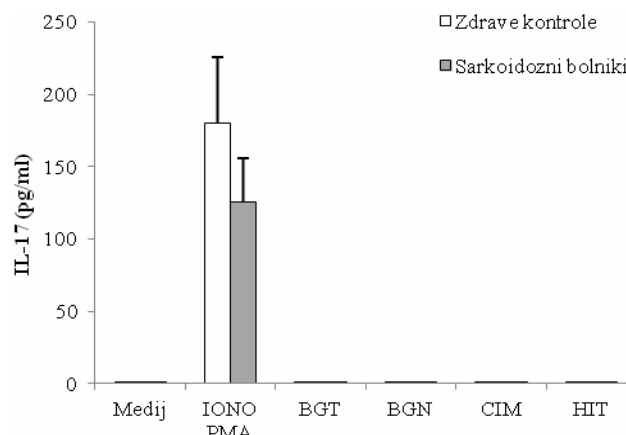
Nadalje smo primerjali citokinski odziv PBMC po spodbujanju s KCSG ali LPS med bolniki s sarkoidozo in zdravimi kontrolami. Bolniki s sarkoidozo so imeli v primerjavi z zdravimi kontrolami večje spontano izločanje vseh merjenih citokinov v supernatantih PBMC, gojenih v mediju, s statistično značilnimi razlikami pri TNF- $\alpha$  in IL-12 ( $p = 0,002$  in  $p = 0,026$ ) (Slika 12). Po spodbujanju PBMC z BGT je bila statistično značilno večja sinteza TNF- $\alpha$  pri bolnikih s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi kontrolami. Pri ostalih citokinih ni bilo značilnih razlik po spodbujanju z BGT. Pri bolnikih s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi sta LPS in BGN povzročila statistično značilno večje izločanje citokinov TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 in IL-12 (vsi  $p < 0,05$ ). CIM je povzročil statistično značilno večjo sintezo IL-6 in IL-12 pri bolnikih v primerjavi z zdravimi. Po spodbujanju s HIT med bolniki in zdravimi ni bilo značilnih razlik pri nobenem od citokinov. V primerih, kjer sinteza citokinov po spodbujanju s KCSG ni bila statistično značilno različna med bolnikih in zdravimi, pa smo vseeno opazili tendenco k večji sintezi citokinov pri bolnikih v primerjavi z zdravimi. Nobena od KCSG ni spodbudila *in vitro* sinteze IL-17 ne v kulturah PBMC bolnikov s sarkoidozo in ne v kulturah PBMC zdravih kontrol (Slika 13). Le ionomicin in PMA sta spodbudila izločanje IL-17, vendar statistično značilne razlike med bolniki in zdravimi kontrolami ni bilo. V nasprotju z ostalimi citokini je bila opazna tendenca k manjši sintezi IL-17 pri bolnikih po spodbujanju z ionomicinom in PMA. Če povzamemo, iz rezultatov smo ugotovili, da je bil citokinski odziv TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 in IL-12 PBMC bolnikov s sarkoidozo po *in vitro* spodbujanju s komponentami iz celične stene gliv značilno močnejši v primerjavi z citokinskim odzivom PBMC zdravih kontrol.



Slika 12: Citokinski odzivi PBMC bolnikov s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi kontrolami po *in vitro* spodbujanju s KCSG

Figure 12: Cytokine responses of PBMC from patients with sarcoidosis and healthy controls stimulated with fungal cell wall agents

Iz venske krvi zdravih kontrol (N=20) in bolnikov s sarkoidozo (N=22) smo izolirali PBMC in jih ( $1 \times 10^6$ /ml) gojili v mediju kot kontrolo ali spodbujali z LPS (10 ng/ml) ali s KCSG (200  $\mu$ g/ml). Po 4-urni inkubaciji pri 37 °C smo v supernatantih celičnih kultur določili TNF- $\alpha$  (A), po 18-urni inkubaciji pri 37 °C pa IL-6 (B), IL-10 (C) in IL-12 (D) s testi ELISA. Grafi predstavljajo povprečje koncentracije citokinov v pg/ml  $\pm$  SEM. \*Statistično značilno različna koncentracija citokinov v primerjavi s koncentracijo citokinov pri zdravih kontrolah,  $p < 0,05$ .



Slika 13: IL-17 odziv PBMC bolnikov s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi kontrolami po *in vitro* spodbujanju s KCSG

Slika 13: IL-17 response of PBMC from patients with sarcoidosis and healthy controls stimulated with fungal cell wall agents

Iz venske krvi zdravih kontrol (N=20) in bolnikov s sarkoidozo (N=22) smo izolirali PBMC in jih ( $1 \times 10^6$ /ml) gojili v mediju kot kontrolo ali spodbujali z ionomicinom (50 nM) in PMA (3,33 ng/ml) ali s KCSG (200  $\mu$ g/ml). Po 40-urni inkubaciji pri 37 °C smo v supernatantih celičnih kultur določili IL-17 s testom ELISA. Graf predstavlja povprečne koncentracije IL-17 v pg/ml  $\pm$  SEM.

#### 4.5 CITOKINSKI ODZIV PBMC BOLNIKOV S SARKOIDOZO PO SOČASNEM *IN VITRO* SPODBUJANJU S KOMPONENTAMI CELIČNE STENE GLIV IN LPS

Citokinski odziv po sočasnem *in vitro* spodbujanju s KCSG in LPS smo študirali tako, da smo iz venske krvi dvaindvajsetih bolnikov s sarkoidozo pred terapijo in dvajsetih zdravih kontrol izolirali PBMC in jih sočasno spodbujali s KCSG (200  $\mu$ g/ml) in z LPS (10 ng/ml). V supernatantih celičnih kultur smo nato po 4 urah določili koncentracijo TNF- $\alpha$  in po 18 urah IL-6, IL-10 in IL-12 s testi ELISA. Na koncu smo primerjali koncentracije citokinov med zdravimi kontrolami in bolniki s sarkoidozo z Mann-Whitneyevim testom. Modulatorne učinke KCSG smo določili s sinergističnimi indeksi (SI), ki smo jih primerjali z vrednostjo 1 (glej enačbo 2).

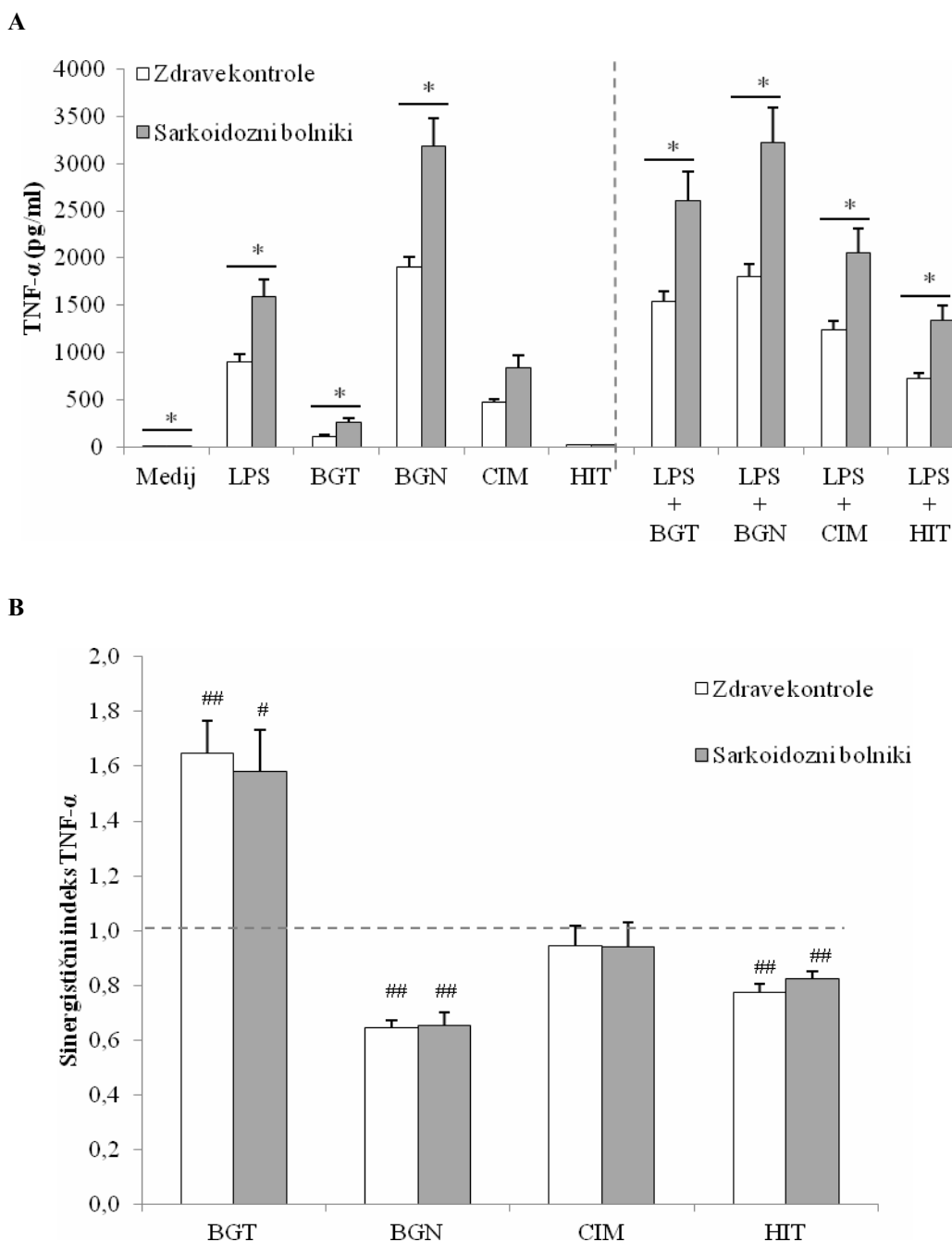
Najprej smo proučili citokinski odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS pri zdravih kontrolah. Rezultati so pokazali, da je imelo sočasno spodbujanje z BGT in LPS statistično značilen sinergističen učinek na sintezo TNF- $\alpha$ , spodbujeno z LPS (SI=1,65), ni pa imelo učinka na izločanje IL-10 in IL-12 (Slike 14, 16 in 17). Nasprotno je bila sinteza

IL-6 z BGT statistično značilno inhibirana (SI = 0,73) (Slika 15). BGN in HIT sta statistično značilno inhibirala vse citokine, TNF- $\alpha$  (SI = 0,65; SI = 0,77), IL-6 (SI = 0,52; SI = 0,29), IL-10 (SI = 0,55, SI = 0,09) in IL-12 (SI = 0,58; SI = 0,79) (vsi  $p < 0,001$ ) (Slike 14-17). CIM je statistično značilno inhibiral z LPS, spodbujene IL-6 (SI = 0,14), IL-10 (SI = 0,22) in IL-12 (SI = 0,64) (vsi  $p < 0,001$ ) (Slike 15-17), ni pa imel učinka na sintezo TNF- $\alpha$  (Slika 14). Najmočnejša inhibicija je bila prisotna pri HIT in CIM v primeru IL-6 in IL-10, kjer je bila sinteza skoraj popolnoma izničena (Sliki 15 in 16).

Kljub temu da smo pri zgoraj opisanih študijah modulatornih učinkov uporabili suboptimalne koncentracije KCSG, smo napravili dodatne poskuse, da smo ugotovili, ali je učinek KCSG inhibicija ali nasičenje sistema (Stopinšek in sod., 2011a). PBMC zdrave kontrole smo 4 ure spodbujali s posameznimi KCSG v koncentracijskem območju od 0 do 300  $\mu\text{g/ml}$  in sočasno s KCSG in LPS (10  $\text{ng/ml}$ ). V supernatantih celičnih kultur smo po 4 urah določili TNF- $\alpha$  ( $\text{pg/ml}$ ) in izračunali teoretične vrednosti aditivnih učinkov KCSG in LPS v danem koncentracijskem območju in primerjali z eksperimentalnimi vrednostmi s KCSG+LPS-spodbujenim odzivom TNF- $\alpha$ . Kot je prikazano na sliki 18, je BGT v celotnem koncentracijskem območju statistično značilno stimuliral z LPS spodbujeno sintezo TNF- $\alpha$ . CIM ni imel učinka na z LPS spodbujeno sintezo TNF- $\alpha$ , kar je bilo razvidno že prej (Slika 14). Nasprotno pa sta oba BGN in HIT statistično značilno inhibirala TNF- $\alpha$  v celotnem koncentracijskem območju ( $p < 0,001$ ). Če povzamemo, rezultati potrjujejo, da so prisotni inhibitorni učinki BGN in predvsem HIT na sintezo citokinov, ki je bila spodbujena z LPS.

Nadalje smo primerjali citokinski odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS med bolniki s sarkoidozo in zdravimi kontrolami. Po količini izločenih citokinov so imeli bolniki statistično značilno močnejši odziv tudi pri sočasnem spodbujanju PBMC s KCSG in LPS (vsi  $p < 0,05$ ). Po izračunu sinergističnega indeksa pa so imeli bolniki s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi kontrolami opazno tendenco k šibkejši stimulaciji oziroma šibkejši inhibiciji citokinskega odziva, spodbujenega z LPS. Statistično značilno šibkejša je bila pri bolnikih inhibicija sinteze IL-6 in IL-10 v primeru HIT (Sliki 15 in 16).

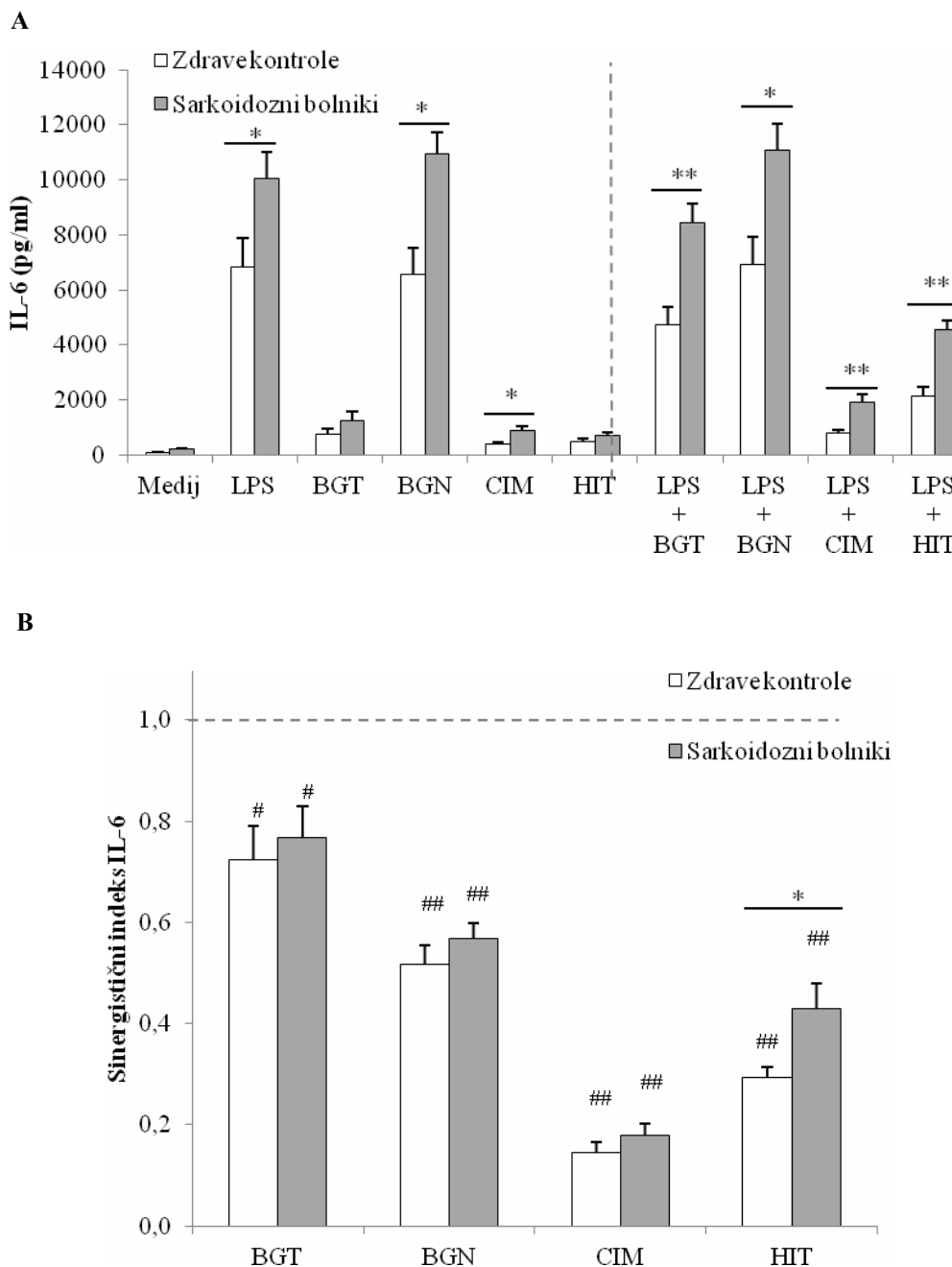




Slika 14: TNF- $\alpha$  odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS

Figure 14: TNF- $\alpha$  response of PBMC stimulated with fungal cell wall agents and LPS

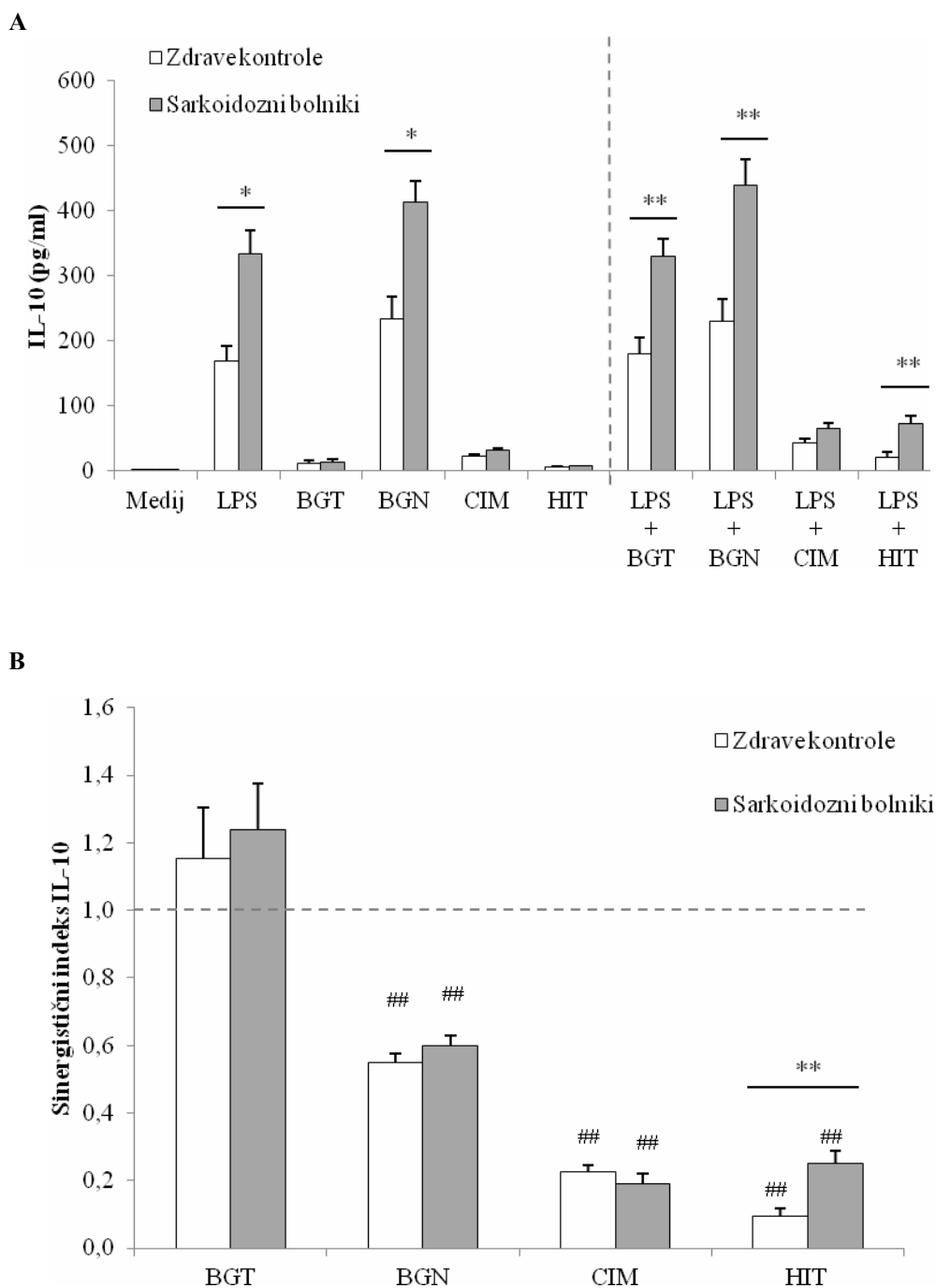
Iz venske krvi zdravih kontrol (N=20) in bolnikov s sarkoidozo (N=22) smo izolirali PBMC in jih ( $1 \times 10^6$ /ml) sočasno spodbujali s KCSG (200  $\mu$ g/ml) in LPS (10 ng/ml). Po 4-urni inkubaciji pri 37 °C smo v supernatantih celičnih kultur določili TNF- $\alpha$  s testom ELISA (A) ter določili sinergistični indeks TNF- $\alpha$  (B). Graf A predstavlja povprečje koncentracije TNF- $\alpha$  v pg/ml  $\pm$  SEM, graf B pa predstavlja sinergistični indeks TNF- $\alpha$ . \* $p < 0,05$ : statistično značilno različna koncentracija TNF- $\alpha$  v primerjavi s koncentracijo citokinov pri zdravih kontrolah. ## $p < 0,05$ ; ### $p < 0,001$ : statistično značilno različen sinergistični indeks od vrednosti 1.



Slika 15: IL-6 odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS

Figure 15: IL-6 response of PBMC stimulated with fungal cell wall agents and LPS

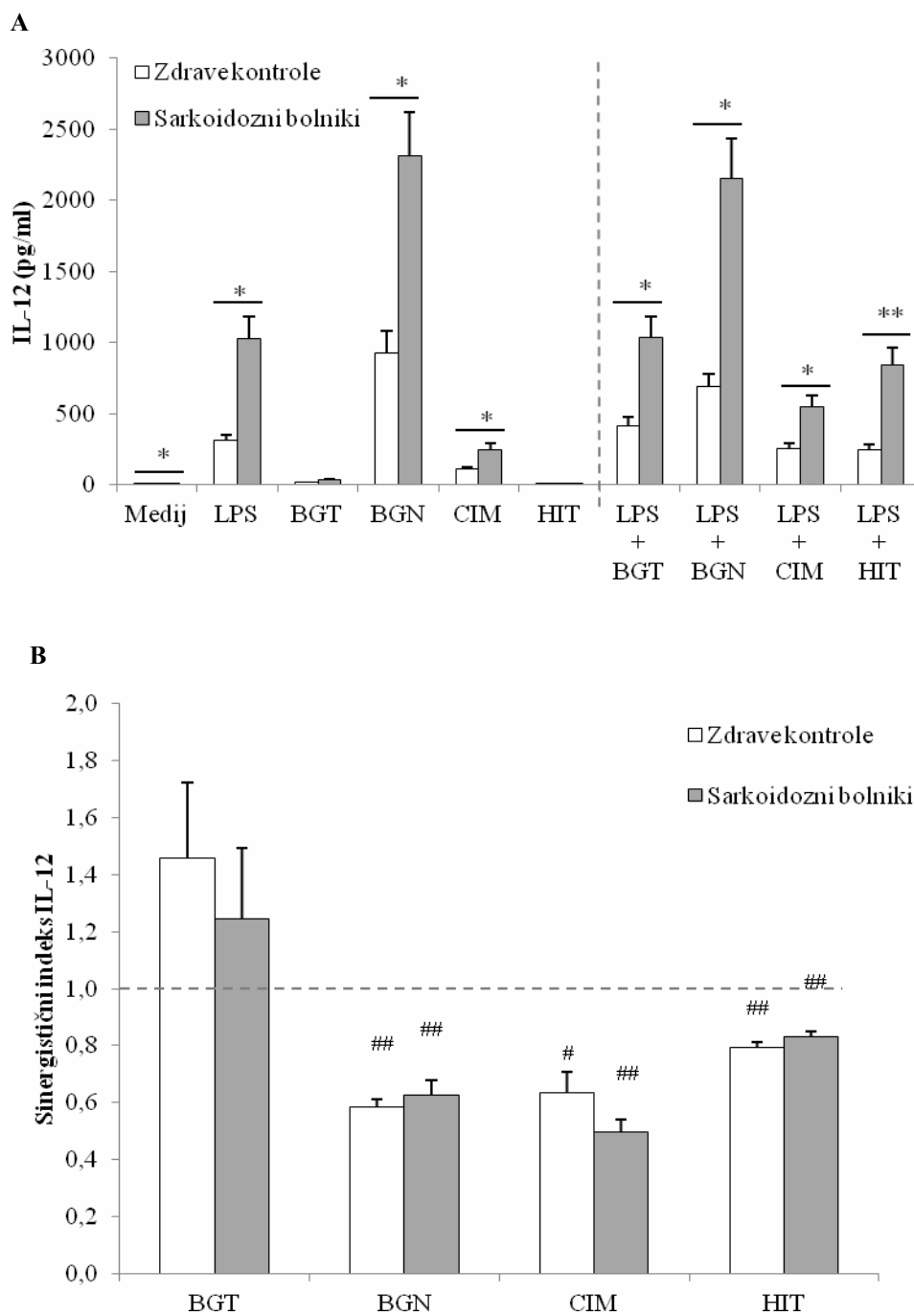
Iz venske krvi zdravih kontrol (N=20) in bolnikov s sarkoidozo (N=22) smo izolirali PBMC in jih ( $1 \times 10^6$ /ml) sočasno spodbujali s KCSG (200  $\mu$ g/ml) in LPS (10 ng/ml). Po 18-urni inkubaciji pri 37 °C smo v supernatantih celičnih kultur določili IL-6 s testom ELISA (A) ter določili sinergistični indeks IL-6 (B). Graf A predstavlja povprečje koncentracije IL-6 v pg/ml  $\pm$  SEM, graf B pa predstavlja sinergistični indeks IL-6. \* $p < 0,05$ : statistično značilno različna koncentracija IL-6 v primerjavi s koncentracijo citokinov pri zdravih kontrolah. # $p < 0,05$ ; ### $p < 0,001$ : statistično značilno različen sinergistični indeks od vrednosti 1.



Slika 16: IL-10 odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS

Figure 16: IL-10 response of PBMC stimulated with fungal cell wall agents and LPS

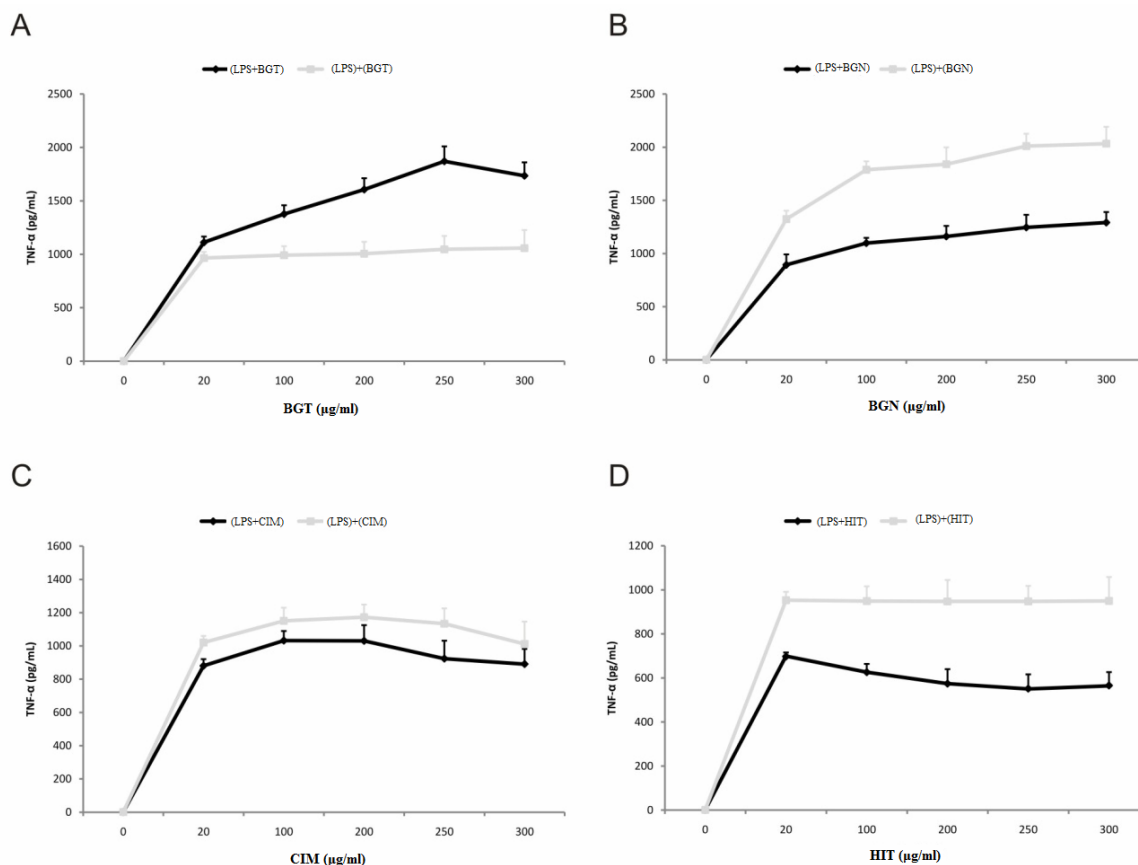
Iz venske krvi zdravih kontrol (N=20) in bolnikov s sarkoidozo (N=22) smo izolirali PBMC in jih ( $1 \times 10^6$ /ml) sočasno spodbujali s KCSG (200  $\mu$ g/ml) in LPS (10 ng/ml). Po 18-urni inkubaciji pri 37 °C smo v supernatantih celičnih kultur določili IL-10 s testom ELISA (A) ter določili sinergistični indeks IL-10 (B). Graf A predstavlja povprečje koncentracije IL-10 v pg/ml  $\pm$  SEM, graf B pa predstavlja sinergistični indeks IL-10. \* $p < 0,05$ : statistično značilno različna koncentracija IL-10 v primerjavi s koncentracijo citokinov pri zdravih kontrolah. ## $p < 0,05$ ; ### $p < 0,001$ : statistično značilno različen sinergistični indeks od vrednosti



Slika 17: IL-12 odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS

Figure 17: IL-12 response of PBMC stimulated with fungal cell wall agents and LPS

Iz venske krvi zdravih kontrol (N=20) in bolnikov s sarkoidozo (N=22) smo izolirali PBMC in jih ( $1 \times 10^6$ /ml) sočasno spodbujali s KCSG (200  $\mu$ g/ml) in LPS (10 ng/ml). Po 18-urni inkubaciji pri 37 °C smo v supernatantih celičnih kultur določili IL-12 s testom ELISA (A) ter določili sinergistični indeks IL-12 (B). Graf A predstavlja povprečje koncentracije IL-12 v pg/ml  $\pm$  SEM, graf B pa predstavlja sinergistični indeks IL-12. #p<0,05; ##p<0,001: statistično značilno različen sinergistični indeks od vrednosti 1.



Slika 18: Vpliv KCSG na sintezo TNF- $\alpha$ , spodbujeno z LPS v PBMC

Figure 18: The effect of fungal cell wall agents on the LPS-induced TNF- $\alpha$  secretion in PBMC

Iz venske krvi zdrave kontrole smo izolirali PBMC in jih ( $1 \times 10^6$ /ml) spodbujali s KCSG v koncentracijskem območju od 0 do 300  $\mu$ g/ml in z LPS (10 ng/ml). Po 4-urni inkubaciji pri 37 °C smo v supernatantih celičnih kultur določili TNF- $\alpha$  (pg/ml) s testom ELISA. Nato smo izračunali teoretične aditivne učinke KCSG in LPS in jih vrisali v celem koncentracijskem območju KCSG in jih primerjali z eksperimentalnimi vrednostmi TNF- $\alpha$ , spodbujenimi z (KCSG+LPS). Graf A predstavlja vpliv BGT na sintezo TNF- $\alpha$ , spodbujeno z LPS, graf B predstavlja vpliv BGN, graf C vpliv CIM in graf D vpliv HIT na sintezo TNF- $\alpha$ , spodbujeno z LPS. Vsaka točka na grafu predstavlja povprečje koncentracije TNF- $\alpha$   $\pm$  SEM v petih kulturah.

#### 4.4.1 IL-17 odziv PBMC bolnikov s sarkoidozo po sočasnem *in vitro* spodbujanju s KCSG ter ionomicinom in PMA

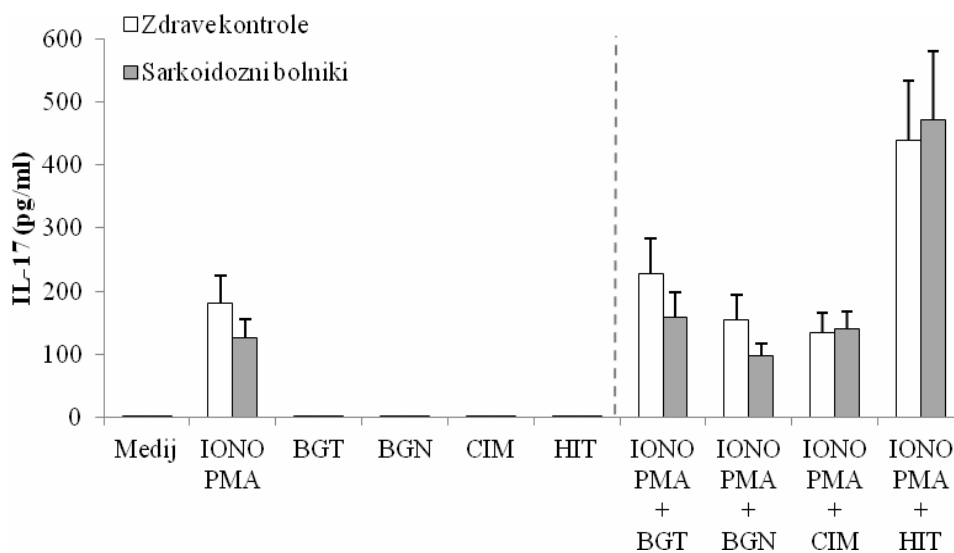
IL-17 odziv PBMC po sočasnem *in vitro* spodbujanju s KCSG ter ionomicinom in PMA smo študirali tako, da smo iz venske krvi dvaindvajsetih bolnikov s sarkoidozo pred terapijo in dvajsetih zdravih kontrol izolirali PBMC in jih sočasno spodbujali s KCSG (200  $\mu$ g/ml) ter ionomicinom (50 nM) in PMA (3,33 ng/ml). Slednja sta nefiziološka agonista, ki smo ju uporabili kot pozitivno kontrolo. V supernatantih celičnih kultur smo nato po 40 urah določili koncentracijo IL-17 s testom ELISA. Na koncu smo primerjali koncentracijo

IL-17 med zdravimi kontrolami in bolniki s sarkoidozo z Mann-Whitneyevim testom. Modulatorne učinke KCSG smo določili s sinergističnimi indeksi (SI), ki smo jih primerjali z vrednostjo 1.

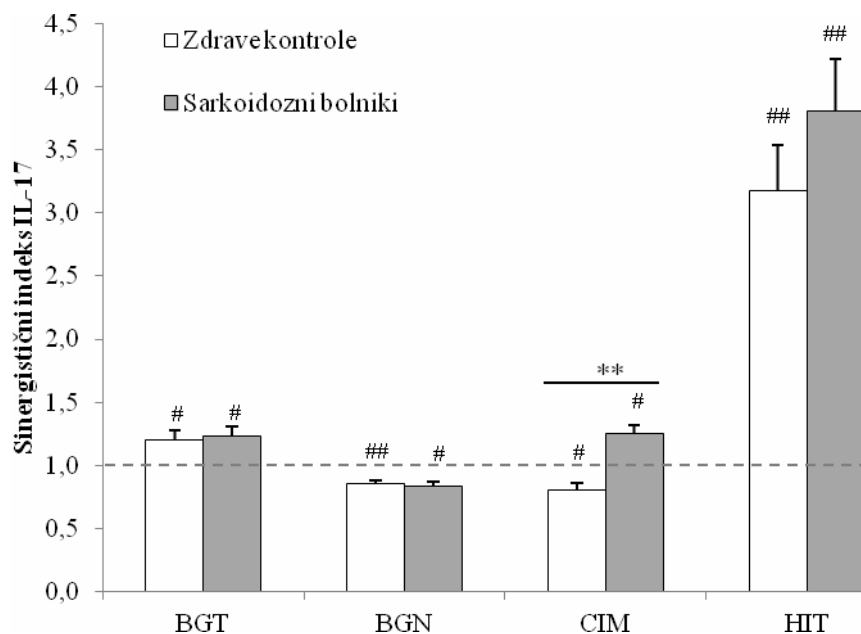
Najprej smo proučili IL-17 odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG ter ionomicinom in PMA pri zdravih kontrolah. Rezultati so pokazali, da je imelo sočasno spodbujanje z BGT ter ionomicinom in PMA statistično značilni sinergistični učinek na sintezo IL-17 (SI=1,20; p=0,01) (Slika 19). Do izredno močnega statistično značilnega sinergističnega učinka je privedlo sočasno spodbujanje s HIT ter ionomicinom in PMA (SI=3,17; p<0,001). Nasprotno pa je bila z ionomicinom in PMA spodbujena sinteza IL-17 z BGN in CIM statistično značilno inhibirana (SI = 0,85; SI=0,81) (p<0,001; p=0,002).

Nadalje smo primerjali IL-17 odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG ter ionomicinom in PMA med bolniki s sarkoidozo in zdravimi kontrolami. Bolniki s sarkoidozo so imeli po sočasnem spodbujanju z BGT, HIT ali BGN ter ionomicinom in PMA podobne učinke kot pri zdravih kontrolah, torej pri BGT in HIT sinergistični učinek (SI=1,23; SI=3,81) (p<0,004; p<0,001) ter pri BGN pa inhibitorni učinek (SI=0,83; p=0,003). Presenetljivo pa je sočasno spodbujanje PBMC s CIM ter ionomicinom in PMA pri bolnikih s sarkoidozo privedlo do nasprotnega učinka kot pri zdravih, in sicer pri bolnikih do sinergističnega učinka (SI=1,26) (p<0,001), pri zdravih pa do inhibitornega učinka (SI=0,81; p=0,002). Omenjena razlika med bolniki s sarkoidozo in zdravimi je bila statistično značilna (p<0,001).

A



B



Slika 19: IL-17 odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG ter ionomicinom in PMA

Figure 19: IL-17 response of PBMC stimulated with fungal cell wall agents and ionomycin and phorbol 12-myristate 13-acetate

Iz venske krvi zdravih kontrol (N=20) in bolnikov s sarkoidozo (N=22) smo izolirali PBMC in jih ( $1 \times 10^6$ /ml) sočasno spodbujali s KCSG (200  $\mu$ g/ml) in ionomicinom (50 nM) in PMA (3,33 ng/ml). Po 40-urni inkubaciji pri 37 °C smo v supernatantih celičnih kultur določili IL-17 s testom ELISA (A) ter določili sinergistični indeks IL-17 (B). Graf A predstavlja povprečje koncentracije IL-17 v pg/ml  $\pm$  SEM, graf B pa predstavlja sinergistični indeks IL-17. \* $p < 0,05$ : statistično značilno različna koncentracija IL-10 v primerjavi s koncentracijo citokinov pri zdravih kontrolah. # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,001$ : statistično značilno različen sinergistični indeks od vrednosti 1.

## 5 RAZPRAVA

Namen naše raziskave je bil ugotoviti pomen gliv v imunopatogenezi sarkoidoze. Rezultati so pokazali, da so bolniki s sarkoidozo živeli v okolju s statistično značilno dvakrat večjo obremenjenostjo z glivami. Izpostavitvev glivam potrjuje tudi prisotnost statistično značilno višje koncentracije specifičnih protiteles proti glivam v primerjavi z zdravimi kontrolami. Povezave med koncentracijo gliv v domačem okolju bolnikov s sarkoidozo ter koncentracijo protiteles proti glivam v plazmi nismo odkrili. Ugotovili smo, da so imeli bolniki s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi kontrolami značilno močnejši *in vitro* naravni vnetni citokinski odziv v PBMC po spodbujanju s KCSG v odsotnosti kot tudi v prisotnosti LPS. Prav tako smo ugotovili, da KCSG same niso spodbudile sinteze IL-17 v PBMC bolnikov ali zdravih kontrol, so pa modulirale IL-17 odziv aktiviranih PBMC bolnikov ali zdravih kontrol.

Več obsežnih epidemioloških študij je pokazalo, da predstavlja velik dejavnik tveganja za nastanek sarkoidoze življenje v vlažnem in plesnivem okolju, bodisi v domačem okolju ali v službenem okolju (Kern in sod., 1993; Prezant in sod., 1999; Kucera in sod., 2003; Newman in sod., 2004; Laney in sod., 2009). V nedavni študiji so Terčeljeva in sod. (2011) ugotavljali obremenjenost okolja z glivami v domačem okolju slovenskih bolnikov s sarkoidozo (N=55). V vzorcih zraka iz spalnic so merili aktivnosti glivičnega encima N-acetil- $\beta$ -D-heksozaminidaze (NAHA), ki je pokazatelj glivične biomase. NAHA je del hitinolitičnega sistema in je prisoten tako v živih (hife, spore), kot tudi v neživih delih gliv. Ugotovili so, da so imeli bolniki s sarkoidozo statistično značilno večjo aktivnost NAHA v primerjavi z zdravimi kontrolami (N=30). V naši raziskavi smo ugotavljali obremenjenost domačega okolja z glivami tako, da smo v vzorcih zraka iz spalnic določili koncentracijo spor plesni (CFU/m<sup>3</sup>). Rezultati so pokazali, da so imeli bolniki s sarkoidozo v domačem okolju dvakrat višjo statistično značilno koncentracijo plesni ( $182,0 \pm 35,3$  CFU/m<sup>3</sup>) v primerjavi z zdravimi kontrolami ( $92,2 \pm 29,3$  CFU/m<sup>3</sup>) ( $p=0,018$ ) (Slika 4). Kljub omejitvam naše študije, zaradi majhnih skupin (15 bolnikov in 15 zdravih kontrol), so naši rezultati v skladu z zgoraj omenjenimi študijami. Metoda za določanje koncentracije spor v zraku ni standardizirana, zato je primerjava rezultatov med študijami otežena. Poleg tega se koncentracija plesni v zraku zelo spreminja. V literaturi se omenja, da sega območje



koncentracije plesni v notranjih prostorih od  $10$  do  $10^4$  CFU/m<sup>3</sup> (Nevalainen in Morawska, 2009). Na koncentracijo in spekter plesni v zunanjem in notranjem prostoru vplivajo različni geografski in fiziološki dejavniki. Koncentracija plesni je višja na področjih z zmerno klimo, v jesenskem in poletnem času. Vzrok naj bi bile višje temperature, večja vlažnost ter razgradnja vegetacije. V notranjih prostorih se koncentracije spreminjajo sorazmerno z zunanjim zrakom ter predstavljajo približno tretjino zunanje koncentracije plesni. V notranjih prostorih se pojavljajo plesni v višjih koncentracijah v prostorih z visoko relativno vlago (več kot 50 %), ki skupaj z neustreznim prezračevanjem, vlažilci zraka, klimatskimi napravami ter zbiralniki vode pospešuje rast in razmnoževanje plesni v stavbah. Trenutno v nacionalni kot tudi evropski zakonodaji ni določenih vrednosti za »normalno« ali »varno« koncentracijo plesni v zraku notranjih prostorov. Številni avtorji in institucije pa vendarle predlagajo neke smernice, ki temeljijo pretežno na podlagi izkušenj. Po priporočilih Svetovne zdravstvene organizacije vrednosti CFU/m<sup>3</sup> plesni pod 500 še niso zaskrbljujoče (Nevalainen in Morawska, 2009).

V literaturi se omenjajo kot najbolj pogosti rodovi plesni v notranjih prostorih *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* in *Alternaria* (Mullins, 2001; Nevalainen in Morawska, 2009). Tudi v naši raziskavi so se v domačem okolju bolnikov s sarkoidozo in v domačem okolju zdravih kontrol z najvišjimi povprečnimi koncentracijami spor pojavljale plesni iz rodu *Penicillium* (Preglednica 2 in Slika 5). Bolniki so imeli statistično značilno višjo koncentracijo plesni iz rodu *Penicillium* ( $103,8 \pm 28,8$  pg/ml) v primerjavi z zdravimi ( $50,9 \pm 19,1$  pg/ml) ( $p=0,048$ ). V obeh okoljih so nato po pogostosti sledile plesni iz rodov *Cladosporium* in *Aspergillus*. Bolniki so imeli statistično značilno višjo koncentracijo plesni iz rodu *Cladosporium* ( $32,9 \pm 11,6$  pg/ml) v primerjavi z zdravimi ( $19,3 \pm 8,6$  pg/ml) ( $p=0,035$ ). V domačem okolju zdravih kontrol so sledile še plesni iz rodu *Aureobasidium* in *Trichoderma*, v domačem okolju bolnikov s sarkoidozo pa *Trichoderma* in *Alternaria*. Bolniki so imeli statistično značilno višjo koncentracijo plesni iz rodu *Alternaria* ( $3,8 \pm 0,9$  pg/ml) v primerjavi z zdravimi ( $1,1 \pm 0,6$  pg/ml) ( $p=0,014$ ). V zraku domačega okolja bolnikov s sarkoidozo je bilo opaziti nekoliko večjo raznolikost vrst plesni kot pri zdravih. Znano je, da lahko izpostavitve višjim koncentracijam omenjenih plesni, kot se je izkazalo pri naših bolnikih s sarkoidozo, pri ljudeh povzročijo različne respiratorne simptome, kot so rinitis, kašelj, sopihanje, hipersenzitivni pneumonitis, alergije, astmo (Gent in sod.,

2002; Havaux in sod., 2004; Kämpfer in sod., 2005) in verjetno tudi sarkoidozo (Terčelj in sod., 2011).

Domnevali smo, da bo zaradi večje obremenjenosti okolja z glivami pri bolnikih s sarkoidozo prisotna večja koncentracija specifičnih protiteles proti glivam v plazmi bolnikov. Rezultati so pokazali, da so imeli bolniki s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi kontrolami statistično značilno višje koncentracije protiteles IgG proti glivam *Penicillium notatum* ( $14,4 \pm 3,8$  pg/ml;  $7,1 \pm 0,9$  pg/ml;  $p=0,017$ ), *Cladosporium herbarum* ( $26,8 \pm 5,3$ ;  $14,2 \pm 3,7$  pg/ml;  $p=0,027$ ), *Aspergillus fumigatus* ( $32,3 \pm 6,4$ ;  $\pm 16,6$  pg/ml;  $p=0,038$ ) in proti *Aleternaria alternata* ( $5,6 \pm$  pg/ml;  $2,7 \pm 0,1$  pg/ml;  $p<0,001$ ) (Preglednica 4, Slika 7). Prav tako so imeli bolniki v primerjavi z zdravimi statistično značilno višje koncentracije protiteles proti *Micropolyspora faeni* ( $6,1 \pm 0,9$  pg/ml;  $3,0 \pm 0,4$  pg/ml;  $p=0,001$ ) in *Thermoactinomyces vulgaris* ( $12,1 \pm 2,5$  pg/ml;  $6,1 \pm 1,0$  pg/ml;  $p=0,031$ ), ki sta bakteriji podobni glivam in povzročata farmarska pljuča. Protitelesni odziv IgG proti glivama *Mucor racemosus* in *Candida albicans* med skupinama ni bil statistično značilno različen. Protitelesni odziv IgA in IgM proti *Aspergillus fumigatus* in proti *Candida albicans* med bolniki s sarkoidozo in zdravimi kontrolami prav tako ni bil statistično značilno različen, vendar je bila pri bolnikih opazna tendenca k višji koncentraciji omenjenih protiteles (Preglednica 5, Slika 8). V primerjavi z normalnimi vrednostmi koncentracij protiteles proti glivam, pa koncentracija protiteles pri bolnikih s sarkoidozo ni bila zelo povišana, zato smo sklepali, da pri bolnikih s sarkoidozo ni bila prisotna okužba z glivami.

Ob izpostavitvi antigenu se pri imunskem odzivu tvorijo specifična protitelesa proti letemu (Abbas, 2010), zato smo preverili, ali višja koncentracija protiteles proti glivam odraža večjo obremenitev okolja z glivami. Povezave med koncentracijo spor plesni (CFU/m<sup>3</sup>) v domačem okolju in koncentracijo specifičnih protiteles proti glivam v plazmi nismo odkrili ne pri bolnikih in ne pri zdravih. Odsotnost povezave je verjetno posledica individualnih razlik v imunskem odzivu na izpostavitve in posledica genetskih razlik med posamezniki. Poleg tega bi bilo potrebno za večjo verodostojnost rezultatov povečati skupini preiskovancev, pri katerih smo določali koncentracijo spor plesni.

Domnevali smo, da mehanizem v ozadju nastanka sarkoidoze po izpostavitvi glivam ni posledica okužbe z glivami, temveč morda posledica reakcije na nekatere komponente gliv (Terčelj in sod., 2008). Naš namen je bil zato ugotoviti, ali je citokinski odziv PBMC bolnikov s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi ljudmi drugačen po *in vitro* spodbujanju s KCSG. Za *in vitro* spodbujanje humanih PBMC smo uporabili model, ki je bil že opisan drugje (Simčič in sod., 2000; Berovič in sod., 2003; Švagelj in sod., 2008). V supernatantih celičnih kultur smo določili naslednje citokine: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12 in IL-17. Za omenjeni nabor citokinov smo se odločili, ker so le-ti vpleteni v imunopatogenezo sarkoidoze in so pomembni pri obrambnem mehanizmu pred okužbo z glivami. Komponente gliv, ki smo jih uporabili, so bile: topna in netopna oblika (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukana - kurdiana (BGT in BGN), cimosan A (CIM) ter hitosan (HIT). Kurdian je čisti linearni (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukan, izoliran iz bakterije *A. faecalis* var. *myxogenes* in je po strukturi primerljiv z glivičnim (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukanom (Stasinopoulos in sod., 1999). Uporabili smo tudi derivat hitina, čisti hitosan z nizko molekulsko maso, ki je prav tako komponenta celične stene gliv (Nwe in Stevens, 2002; George in Abraham, 2006). Poleg čistih komponent, ki niso ravno reprezentativne snovi v okolju, saj so običajno vezane na različne polisaharide, proteine in lipide, pa smo uporabili tudi cimosan A, ki je netopni izvleček iz celične stene kvasovke *S. cerevisiae*, ki vsebuje razvejan (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glukan, manan, hitin, proteine in lipide (Kelly in sod., 2010). Citokinske odzive PBMC po spodbujanju s KCSG smo primerjali z bakterijskim LPS, ki je znan močan spodbujevalec vnetnih citokinov. Potrebno je omeniti, da je bila koncentracija KCSG, ki smo jo uporabili pri poskusih (200  $\mu$ g/ml), relativno visoka v primerjavi s koncentracijami, ki so prisotne v okolju. Koncentracija (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukana v zraku je namreč okrog 20 ng/ml (Thorn in sod., 1998). Koncentracijo KCSG 200  $\mu$ g/ml smo izbrali na podlagi podatkov iz literature (Galan-Diez in sod., 2010) in na podlagi naših predhodnih poskusov (Slika 11).

Glukani so znani po svojih imunoloških in farmakoloških učinkih, ki so bili opisani že v mnogih študijah. Pripravki glukana, uporabljenih v teh študijah, so bili izolirani iz različnih vrst gliv, rastlin ali bakterij z različno stopnjo čistosti in so imeli različne kemijske in fizikalne lastnosti, kot na primer: topnost v vodi, molekulsko maso, koncentracijo, stopnjo razvejanosti in konformacijo. Posledično ni sprejetega soglasnega mnenja o zmožnosti spodbujanja sinteze citokinov različnih oblik  $\beta$ -glukanov, saj so

opisani tako stimulatívni kot zaviralni učinki (Novak in Vetvicka, 2008). Zato smo najprej natančno proučili učinke naših pripravkov KCSG na naravni vnetni citokinski odziv PBMC pri zdravih kontrolah. V naši raziskavi je bil BGN najmočnejši spodbujevalec naravnih vnetnih citokinov PBMC. Tudi v primerjavi z LPS je BGN povzročil 2- do 3-krat močnejše izločanje TNF- $\alpha$  in IL-12 ter 1,5-krat močnejše izločanje IL-10 kot LPS (Slika 12). Naši rezultati so skladni s študijo Adachija in sod. (1994), ki so ugotovili, da je bil glukan grifolan, izoliran iz *Grifola frondosa*, prav tako bolj učinkovit kot LPS pri sintezi TNF- $\alpha$  v mišjih makrofagih. Med topno in netopno obliko  $\beta$ -glukanov obstajajo velike razlike v fizikalnih in bioloških aktivnostih. Študije kažejo, da ima netopna oblika  $\beta$ -glukanov v primerjavi s topno obliko močnejše vnetne in imunomodulatorne učinke (Ishibashi in sod., 2004), kar smo ugotovili tudi pri naši raziskavi. Po kemijski strukturi je bil BGN pri naših poskusih v natívni linearni konformaciji trojne vijačnice, medtem ko je obstajal BGT, raztopljen v alkalni raztopini, v konformaciji enojne vijačnice in v naključnih spiralnih strukturah (Zhang in sod., 2003). V skladu z ostalimi raziskovalci smo opazili, da  $\beta$ -glukani v enojni vijačnici (BGT) sprožijo šibkejši vnetni citokinski odziv kot  $\beta$ -glukani v trojni vijačnici (BGN) (Falch in sod., 2000). Očitno razliko v aktivnosti med topno in netopno obliko glukana so ugotovili tudi pri *in vivo* študiji, kjer so podgane izpostavili obema oblikama glukanov z intratrahealno instilacijo (~2 mg/kg telesne teže) (Young in sod., 2003). Netopna oblika glukana - cimosana je povzročila veliko močnejše pljučno vnetje kot topna oblika, kar so dokazali s povečanjem določenih parametrov, kot so število polimorfonuklearnih levkocitov, količino serumskega albumina, dušikovega oksida (NO) in aktivnostjo laktat dehidrogenaze v BAI-u. V podobni študiji, kjer so budre akutno vdihavale netopni kurdlan, šizofilan in cimosan (300  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ), pa niso opazili tako močne aktivnosti (Rylander in sod., 2008). Celo nasprotno, število makrofagov in limfocitov se je zmanjšalo, medtem ko je število nevtrofilcev ostalo nespremenjeno. Takšno neskladje med študijama je verjetno posledica uporabe zelo različnih koncentracij glukanov ter uporabe različnih vrst poskusnih živali z drugačno aktivnostjo pljučnih makrofagov (Holt in sod., 1980). Naši rezultati kažejo, da je BGN močnejši spodbujevalec vnetnega odziva tudi v primerjavi s CIM. Po fagocitozi netopnih  $\beta$ -glukanov, kot sta CIM in kurdlan, nastane močan in podaljšan vnetni odziv. Kankunen in sod. (2010) so pokazali, da (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukani aktivirajo dektin-1 in inflamasom NALRP3 v humanih makrofagih, kar je potrebno za obsežno izločanje IL-1 $\beta$ . Pokazali so tudi, da je CIM

šibkejši spodbujevalec citokinov kot kurdlan, kar smo ugotovili tudi pri naši raziskavi. Hida in sod. (2009) so predlagali, da vpliva na sposobnost spodbujanja sinteze citokinov razlika v afiniteti  $\beta$ -glukanov do dektina-1. Odkrili so, da se vežejo razvejani oligosaharidi glukanov na dektin-1 z večjo afiniteto kot linearni glukani, kar privede do večje sinteze citokinov. Ker je CIM zgrajen iz razvejanega (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glukana, ki ga prepozna dektin-1 z večjo afiniteto kot nerazvejanega (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukana v BGN, se zdi verjetno, da je znotrajcelično zaznavanje čistega nerazvejanega  $\beta$ -D-glukana z inflamatomom NALRP3 potrebno za močnejši citokinski odziv na BGN. Paradoksalno pa prepoznavanje  $\beta$ -D-glukana sproži tudi značilno sintezo protivnetnega citokina IL-10. Domnevamo lahko, da lahko takšen nepolariziran naravni vnetni odziv na KCSG sprožijo glive *in vivo* in tako omejujejo vnetno patologijo ter omogočajo vztrajno prisotnost gliv.

Nekateri raziskovalci so pokazali, da lahko HIT v makrofagih stimulira *in vitro* izločanje vnetnih mediatorjev, kot so TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO in GM-CSF (Chen in sod., 2008). Nasprotno pa Pattani in sod. (2009) niso opazili učinka na sintezo IL-6 v humanih PBMC *in vitro* po spodbujanju z nanodelci hitosana. Pri naših poskusih smo odkrili, v nasprotju s Pattanijem in sod., da je topni HIT sprožil v humanih PBMC majhne, a statistično značilne količine TNF- $\alpha$ , IL-6 in IL-10, ne pa IL-12. HIT je bil vsekakor šibek spodbujevalec vnetnih citokinov, kar lahko prisodimo specifičnosti različnih signalnih poti, ki jih sprožijo različne KCSG. Če povzamemo, KCSG so imele različne vplive na *in vitro* sintezo naravnih vnetnih citokinov v PBMC zdravih kontrol, med katerimi bil BGN najmočnejši spodbujevalec citokinov, CIM, BGT in HIT pa so bili šibki spodbujevalci citokinov.

Sarkoidoza je kronična vnetna bolezen, pri kateri je imunski odziv v organih, kjer je bolezen aktivna, izjemno intenziven v primerjavi s periferijo, kar imenujejo imunski paradoks ali periferna anergija (Gerke in Hunninghake, 2008). Pri pljučni sarkoidozi so močno aktivirani alveolarni makrofagi (AM) in druge celice iz BAI-a bolnikov, kar so dokazali s študijami, kjer so imeli AM in celice iz BAI-a bolnikov značilno povečano spontano *in vitro* izločanje različnih citokinov in drugih vnetnih mediatorjev, kot so TNF- $\alpha$  (Baughman in sod., 1990; Strausz in sod., 1991; Homolka in sod., 1993; Zheng in sod., 1995; Prior in sod., 1996; Ziegenhagen in sod., 2003), IL-6 (Homolka in sod., 1993; Prior in sod., 1996), IL-10 (Oltmanns in sod., 2003; Bingisser in sod., 1997), IL-12 (Moller in

sod., 1996; Prior in sod., 1996; Shigehara in sod., 2001), kot tudi IL-1 (Strausz in sod., 1991), IL-18 (Shigenhana in sod., 2001), IFN- $\gamma$  (Prior in sod., 1996; Oltmanns in sod., 2003), MIP-1 $\alpha$  in GM-CSF (Oltmanns in sod., 2003). V naši raziskavi bolniki s sarkoidozo, v primerjavi z zdravimi kontrolami, niso imeli povečanega *in vitro* spontanega izločanja pri nobenem od merjenih citokinov v supernatantih PBMC, razen v primeru TNF- $\alpha$  in IL-12, kjer je bilo spontano izločanje statistično značilno rahlo povečano ( $p=0,002$  in  $p=0,026$ ) (Slika 12). Homolka in sod. (1993) prav tako niso opazili povečanega spontanega izločanja vnetnih citokinov iz PBMC bolnikov s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi. Nasprotno pa so Prior in sod. (1996) izmerili večjo *in vitro* spontano sintezo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 in GM-CSC v PBMC bolnikov s sarkoidozo. Naši rezultati potrjujejo, da so imunske celice na periferiji neaktivirane v primerjavi z imunskimi celicami v pljučih, saj so bile količine spontano izločenih citokinov iz PBMC bolnikov pri naših poskusih zanemarljive, oziroma zelo majhne pri TNF- $\alpha$  in IL-12, v primerjavi s količinami spontano izločenih citokinov iz AM in iz celic BAI-a bolnikov, kot jih opisujejo zgoraj naštetje študije.

Domnevali smo, da je mehanizem pri nastanku sarkoidoze po izpostavitvi glivam lahko posledica reakcije na komponente v celični steni gliv (Terčelj in sod., 2008; Stopinšek in sod., 2010a; Stopinšek in sod., 2010b; Stopinšek in sod., 2010c). Zato smo ugotavljali, ali je vnetni citokinski odziv PBMC bolnikov s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi ljudmi drugačen po *in vitro* spodbujanju s KCSG. BGT in HIT sta bila, kot že prej omenjeno, najšibkejša pri spodbujanju vnetnih citokinov v PBMC in nista povzročila značilnih razlik v citokinskih odzivih med bolniki s sarkoidozo in zdravimi, razen pri TNF- $\alpha$ , kjer je BGT spodbudil statistično značilno večjo sintezo TNF- $\alpha$  pri bolnikih v primerjavi z zdravimi kontrolami ( $p<0,05$ ) (Slika 12). Nasprotno pa sta BGN in LPS pri bolnikih s sarkoidozo, v primerjavi z zdravimi, povzročila statistično značilno večje izločanje citokinov TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 in IL-12 v kulturah PBMC (vsi  $p<0,05$ ) (Slike 14-17). CIM pa je povzročil statistično značilno večjo sintezo IL-6 in IL-12 pri bolnikih v primerjavi z zdravimi (Slike 15 in 17). Bingisser in sod. (2000) so ugotovili, da je *in vitro* izločanje IL-10 tudi iz AM bolnikov s sarkoidozo, spodbujeno z LPS (1 ali 10  $\mu\text{g/ml}$ ), statistično značilno večje v primerjavi z zdravimi kontrolami.

KCSG so pri bolnikih s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi kontrolami povzročile močnejše izločanje vnetnih citokinov, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 in IL-12, ki so vpleteni v imunopatogenezo sarkoidoze. TNF- $\alpha$  je poglobitni citokin pri granulomskem vnetju sarkoidoze, kar med drugim dokazuje uspešno zdravljenje bolezni z zdravili, ki blokirajo TNF- $\alpha$  (Gerke in Hunninghake, 2008). Raziskave so pokazale, da imajo bolniki povečane količine TNF- $\alpha$  v BAI-u in da lahko povečano izražanje TNF- $\alpha$  v AM nakazuje na razvoj težje oblike bolezni (Ziegenhagen in sod., 2003). Pri tvorbi granulomov in značilnem sarkoidoznem Th1 odzivu ima poleg TNF- $\alpha$  pomembno vlogo tudi IL-12 (Baughman, 2010). AM bolnikov proizvajajo večje količine IL-12, ki pospeši sintezo IFN- $\gamma$  in povzroči diferenciacijo Th0 v aktivne limfocite Th1 ter omogoča neprestan vnetni odziv v pljučih (Shigehara in sod., 2001; Gerke in Hunninghake, 2008, Mroz in sod., 2008). IL-6 ima različne biološke učinke, kot so aktivacija celic T in B, sinteza proteinov akutne faze vnetja in proizvodnje imunoglobulinov. Kljub temu da nekateri avtorji omenjajo povečano sintezo IL-6 v BAI-u bolnikov s sarkoidozo (Homolka in sod., 1993; Prior in sod., 1996), pa njegova vloga pri sarkoidozi ni jasna. Znano pa je, da povzroči IL-6 povečano sintezo IL-17 (LeibundGut-Landmann in sod., 2007), ki ga povezujejo z vnetnimi boleznimi in nastankom granulomov (Okamoto in sod., 2010). Poleg omenjenih vnetnih citokinov pa imajo bolniki s sarkoidozo tudi povečano sproščanje IL-10 v BAI-u (Bingisser in sod., 2000; Minshall in sod., 1997; Oltmanns in sod., 2003). IL-10 je regulatorni citokin, ki zavira sproščanje vnetnih citokinov in delitev celic T (Abbas, 2010). Kot možna razloga za neučinkovito zaviranje vnetnega odziva pri sarkoidozi omenjajo nezadostno količino receptorjev za IL-10 ali pa neučinkovit prenos signala IL-10 v notranjosti celic (Oltmanns in sod., 2003).

V organskem prahu, ki ga vdihavamo, so poleg gliv in njihovih komponent tudi delci mikrobnega, organskega in rastlinskega izvora, med katerimi sta najpomembnejša (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukan in bakterijski LPS (Rylander in sod., 1994; Rylander in sod., 2000; Rylander in sod., 2010). V nadaljevanju raziskave smo zato ugotavljali, kakšni so učinki na sintezo vnetnih citokinov v PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS. Modulatorne učinke smo najprej preverili na PBMC zdravih kontrol. BGT je imel statistično značilne stimulacijske učinke na izločanje TNF- $\alpha$ , spodbujeno z LPS, kar je bilo nakazano tudi pri izločanju IL-10 in IL-12 (Slike 14, 16, 17). Tudi drugi raziskovalci so pokazali *in vitro*

porast izločanja citokinov, spodbujenih z LPS v polni krvi ali v kulturah PBMC z različnimi topnimi oblikami  $\beta$ -glukana (Engstad in sod., 2002; Ferwerda in sod., 2008; Tokunaka in sod., 2000). Pri teh študijah so uporabili približno enake koncentracije LPS – 0,5-50ng/ml (Engstad in sod., 2002) in 10 ng/ml (Ferwerda in sod., 2008; Tokunaka in sod., 2000) ter nižje koncentracije (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukana – 2-20  $\mu$ g/ml (Engstad in sod., 2002), 100  $\mu$ g/ml (Tokunaka in sod., 2000) in 125  $\mu$ g/ml (Ferwerda in sod., 2008). Kikkert in sod. (2007) so pokazali, da (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukan pahiman pri koncentraciji (0,25  $\mu$ g/ml), pri kateri sam ni sprožil sinteze citokinov v polni krvi, močno stimulira izločanje IL-6 in IL-8, spodbujeno z različnimi agonisti TLR. V drugi študiji je topni  $\beta$ -glukan iz *Candida albicans* pri precej višji koncentraciji (100  $\mu$ g/ml) zavrl *in vitro* sintezo IL-6 v PBMC spodbujeno z LPS (Nakagawa in sod., 2003). Tudi v naši raziskavi je BGT statistično značilno zavrl sintezo IL-6, spodbujeno z LPS (Slika 15). Domnevamo lahko, prvič, da je bila inhibicija IL-6, povzročena pri visokih dozah BGT, posledica višjih nivojev IL-10, kar pa nasprotno ni bilo v primeru stimulacije izločanja TNF- $\alpha$  in IL-12, in, drugič, da je lahko takšen ukrivljen naravni vnetni citokinski odziv prisoten zaradi interakcij med PRR-ji, namreč dektina-1 in TLR-jev (Ferwerda in sod., 2008), ki vodijo do sprememb v znotrajceličnih signalnih poteh in do aktivacije transkripcijskih faktorjev, in sicer NF- $\kappa$ B, AP-1 in NF-IL6.

Pokazali smo, da sta BGN in HIT statistično značilno inhibirala sintezo TNF- $\alpha$ , spodbujeno z LPS (Slika 14). Podobnost temu lahko najdemo pri študiji na preiskovancih, ki živijo v plesnivih domovih (Beijer in sod., 2002). Po vdihovanju topnega grifolana (28 ng/m<sup>3</sup>) je bilo izločanje TNF- $\alpha$ , spodbujeno z LPS v PBMC, nižje. V drugi študiji so zdravi posamezniki vdihnili 125 ng topnega grifolana in njihove PBMC, spodbujene s fitohemaglutininom so izločale nižje nivoje TNF- $\alpha$  v primerjavi s posamezniki, ki so vdihovali le fiziološko raztopino (Thorn in sod., 2001).

Spodbujanje PBMC z BGN, CIM ali HIT je statistično značilno zavrlo sintezo IL-6, IL-10 in IL-12, spodbujeno z LPS (Slike 15-17). V primeru CIM in HIT je bila sinteza skoraj popolnoma izničena. To je v skladu s študijo Yoona in sod. (2007), kjer je oligosaharid hitosana (COS) inhibiral izločanje TNF- $\alpha$  in IL-6 v makrofagih RAW 264.7. TNF- $\alpha$  je močan sprožitelj sinteze IL-6, zato lahko nastane zaviralni učinek COS na izločanje IL-6



zaradi avtokrinega delovanja TNF- $\alpha$ . Avtokrino delovanje vnetnega citokina TNF- $\alpha$  in protivnetnega citokina IL-10 (Abbas, 2010) pa očitno ni glavni razlog za tako splošni protivnetni odziv v našem sistemu. Inhibitrni učinki v našem sistemu bi lahko bili tudi posledica nasičenja sistema (Stopinšek in sod., 2011a). Vendar smo z rezultati dodatnih poskusov pokazali, da so prisotni inhibitorni učinki in ne nasičenje sistema, saj sta BGN in HIT statistično značilno inhibirala sintezo TNF- $\alpha$  v celotnem koncentracijskem območju ( $p < 0,001$ ) (Slika 18). Verjetno pa je bila pri sočasnem spodbujanju PBMC z močnima aktivatorjema, kot sta BGN in LPS, prisotna kombinacija inhibitornih učinkov in nasičenja sistema.

Nedavno so ugotovili, da kationski polielektrolit HIT reagira z LPS (Yermak in sod., 2006; Naberezhnykh in sod., 2008) in da afiniteta reakcije narašča s stopnjo acetilacije. Čeprav smo v naših poskusih uporabili HIT z dokaj visoko stopnjo acetilacije (15-25 %), pa ne smemo popolnoma zanemariti vezave HIT na LPS. Inhibitrni učinek HIT na izločanje citokinov, spodbujeno z LPS, lahko tako vsaj delno razložimo z reakcijo med HIT in LPS (Slike 14-17). V nasprotju pa inhibitorne učinke BGN in CIM ne moremo razložiti s to reakcijo. Ugotovili smo torej, da sočasno spodbujanje PBMC s KCSG in LPS modulira naravni citokinski odziv PBMC v primerjavi s pričakovanim iz teoretičnih aditivnih učinkov KCSG in LPS.

Nadalje smo primerjali citokinski odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS med bolniki s sarkoidozo in zdravimi kontrolami. Po količini izločenih citokinov so imeli bolniki statistično značilno močnejši odziv tudi pri sočasnem spodbujanju PBMC s KCSG in LPS (Slika 14A-17A) (vsi  $p < 0,05$ ). Po izračunu sinergističnega indeksa pa so imeli bolniki s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi kontrolami opazno tendenco k šibkejši stimulaciji oziroma šibkejši inhibiciji citokinskega odziva spodbujenega z LPS (Slike 14B-17B). Statistično značilno šibkejša je bila pri bolnikih inhibicija sinteze IL-6 in IL-10 v primeru HIT (Slike 15 in 16). Pri sarkoidozi so za neprestani vnetni odziv vsaj delno odgovorni neustrezni regulatorni mehanizmi, ki jih najpogosteje povezujejo z neuspešnim delovanjem regulatornih celic T ali pa genetskim ozadjem bolnikov, kot je prisotnost določenih polimorfizmov v HLA genih in genu BTNL2 (Baughman in sod., 2010).

IL-17 je nedavno odkriti vnetni citokin, ki igra pomembno vlogo pri obrambi pred zunajceličnimi mikrobi, kot so glive, po drugi strani pa je vpleten tudi v patogenezo različnih vnetnih in avtoimunskih boleznih (Mai in sod., 2010; Vautier in sod., 2010). Pri okužbi z mikobakterijami igra ključno vlogo pri nastanku granulomov (Okamoto Yoshida in sod., 2010). Kljub temu da je za sarkoidozo značilen odziv Th1, pa se v zadnjem času pospešeno raziskuje tudi vloga Th17 pri sarkoidozi. Facco in sod. (2010) so odkrili, da so celice Th17 prisotne v krvi in pljučih bolnikov s sarkoidozo, in sicer v jedru in na periferiji granulomov. Prav tako so pokazali, da te celice sodelujejo v zgodnji fazi sarkoidoze, kot tudi pri napredovanju bolezni v fibrozo. V našem *in vitro* modelu ni nobena od KCSG spodbudila *in vitro* sinteze IL-17 ne v kulturah PBMC zdravih kontrol in prav tako ne v kulturah PBMC bolnikov s sarkoidozo (Slika 13), kar je v skladu z rezultati študije van de Veerdonka in sod., (2009), kjer kurdlan, CIM in manan iz *S. cerevisiae* prav tako niso spodbudili nastanka IL-17 v humanih PBMC. Edini od glivičnih komponent, ki je sprožil sintezo IL-17, je bil manan iz *Candida albicans* (10 µg/ml), in sicer preko MR (van de Veerdonka in sod., 2009). V naših predhodnih poskusih smo dokazali, da se HIT veže na MR (Stopinšek in sod., 2011a), vendar kljub temu ni spodbudil sinteze IL-17. Da Silva in sod. (2008), so študirali vpliv hitina (70-100 µm) in njegovih odlomkov (40-70 µm) na sintezo IL-17 v mišjih makrofagih *in vitro*. Ugotovili so, da hitin ni imel učinka na sintezo IL-17, medtem ko so bili njegovi manjši odlomki močni spodbujevalci IL-17, in sicer preko TLR2 in MyD88. Isonomicin in PMA, ki se uporabljata kot umetna sprožitelja sinteze IL-17 (Miyamoto in sod., 2003), sta v tudi v našem modelu spodbudila izločanje IL-17 v PBMC, vendar statistično značilne razlike v odzivih med bolniki in zdravimi kontrolami ni bilo. V nasprotju z ostalimi citokini, ki smo jih merili, je bila opazna tendenca k manjši sintezi IL-17 pri bolnikih po spodbujanju z ionomicinom in PMA. Manjša količina IL-17 bi lahko pri bolnikih pomenila slabši Th17 obrambni odziv pred glivami in slabšo učinkovitost pri odstranjevanju gliv ter posledično dolgotrajno izpostavljenost glivičnim antigenom, ki so morda potencialni sarkoidozni antigeni.

Pri obrambi pred glivami so v odziv Th17 vpleteni receptorji PRR, ki prepoznajo komponente iz celične stene gliv (Vautier in sod., 2010). Študije na živalskih modelih so pokazale, da je dektin-1 pomemben pri nastanku obrambnega Th17 odziva med pljučno okužbo z *Aspergillus fumigatus* (Werner in sod., 2009), pri obrambi pred *Candida albicans*

pa ima MR pomembnejšo vlogo od dektina-1 pri odzivu Th17 (LeibundGut-Landmann in sod., 2007; van de Veerdonk in sod., 2009). Učinki naših pripravkov KCSG na sintezo citokinov v PBMC so prav tako posredovani preko omenjenih receptorjev (Stopinšek in sod., 2011a). Zato smo preverili, ali lahko KCSG zaradi vezave na te receptorje modulirajo sintezo IL-17, spodbujeno z ionomicinom in PMA. Poskusi na PBMC zdravih kontrol so pokazali, da je imelo sočasno spodbujanje s BGT ter ionomicinom in PMA statistično značilni stimulatorni učinek na sintezo IL-17 (SI=1,20; p=0,01) (Slika 19). Tudi Higashi in sod. (2010) so ugotovili podobno na celičnih kulturah dendritičnih celic in CD4+ celic T, kjer sam kurdlan (0,1-100 µg/ml) ni sprožil sinteze IL-17, skupaj z umetnim mitogenim sprožiteljem – protitelesi anti-CD3/anti-CD28 pa je kurdlan stimuliral nastanek IL-17. Do izredno močnega statistično značilnega sinergističnega učinka je privedlo sočasno spodbujanje s HIT ter ionomicinom in PMA (SI=3,17; p<0,001). Nasprotno pa je bila z ionomicinom in PMA spodbujena sinteza IL-17 pri zdravih kontrolah z BGN in CIM statistično značilno inhibirana (SI = 0,85; p<0,001 in SI=0,81; p=0,002) (Slika 19). Pokazali so, da lahko pri sintezi IL-17 v humanih PBMC sodeluje MR sinergistično s TLR2 in dektinom-1 (Van de Veerdonk in sod. 2009). Različni modulatorni učinki KCSG na sintezo IL-17, spodbujeno z ionomicinom in PMA, so verjetno posledica različnih interakcij med receptorji, ki je najbolj očitna pri HIT, ligandu za MR.

Nadalje smo primerjali IL-17 odziv PBMC po sočasnem spodbujanju s KCSG ter ionomicinom in PMA med bolniki s sarkoidozo in zdravimi kontrolami. Bolniki s sarkoidozo so imeli po sočasnem spodbujanju z BGT, HIT ali BGN ter ionomicinom in PMA podobne učinke kot pri zdravih kontrolah, torej pri BGT in HIT sinergistični učinek (SI=1,23; SI=3,81) (p<0,004; p<0,001) ter pri BGN pa inhibitorni učinek (SI=0,83; p=0,003) (Slika 19). Presenetljivo pa je sočasno spodbujanje PBMC s CIM ter ionomicinom in PMA pri bolnikih s sarkoidozo privedlo do nasprotnega učinka kot pri zdravih, in sicer pri bolnikih do sinergističnega učinka (SI=1,26) (p<0,001), pri zdravih pa do inhibitornega učinka (SI=0,81; p=0,002). Omenjena razlika med bolniki s sarkoidozo in zdravimi je bila statistično značilna (p<0,001). Pokazali smo, da KCSG same niso imele učinka na sintezo IL-17, so pa vplivale na sintezo IL-17, spodbujeno z ionomicinom in PMA. To pomeni, da bi lahko glive vplivale na patološki Th17 odziv, ki verjetno poteka v sarkoidoznih pljučih, kar bi morda lahko privedlo do slabšega poteka bolezni.

Ugotovili smo, da so bili bolniki s sarkoidozo v domačem okolju izpostavljeni večji koncentraciji plesni kot zdrave kontrole, kar potrjuje tudi prisotnost specifičnih protiteles proti glivam v serumu bolnikov. Domnevali smo, da mehanizem v ozadju nastanka sarkoidoze ni okužba z glivami, temveč morda reakcija na določene komponente iz celične stene gliv. KCSG, predvsem BGN, so imele močan vpliv na več naravnih vnetnih (TNF- $\alpha$ , IL-6 in IL-12) in protivnetni citokin (IL-10), ki so pomembni v imunopatogenezi sarkoidoze. Pri sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS, so imele KCSG stimulatorne kot tudi inhibitorne učinke na sintezo vnetnih in protivnetnih citokinov. Prav tako so vplivale na IL-17 odziv aktiviranih PBMC, ki lahko vodi do nastanka granulomov. Opažene *in vitro* učinke KCSG lahko povzročajo glive v pogojih *in vivo*, vendar je pri sklepanju iz študij *in vitro* na klinične pogoje potrebna previdnost. Po eni strani lahko glive povzročijo povečano izločanje protivnetnega IL-10 in inhibicijo sinteze vnetnih citokinov, kot smo opazili pri sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS, ter tako zmanjšajo vnetje in omogočajo vztrajno prisotnost gliv. Po drugi strani pa lahko dolgotrajna izpostavljenost visokim koncentracijam KCSG in LPS (organskemu prahu) povzroči motnjo v normalnih imunskih odzivih (regulatorna aktivnost celic in izločanje citokinov) in omogoča razvoj in/ali vztrajanje različnih imunopatoloških dogodkov, ki lahko pri posameznikih z dedno nagnjenostjo vodijo do nastanka sarkoidoze.

Z našo raziskavo smo ugotovili, da lahko glive oziroma komponente njihove celične stene povzročijo imunopatološke dogodke, ki morda lahko sprožijo nastanek sarkoidoze, ali pa povzročijo resnejši potek bolezni pri posameznikih z dedno nagnjenostjo do sarkoidoze. Menimo, da bi lahko naši rezultati pripomogli k diagnozi, zdravljenju in k preprečevanju sarkoidoze.

## 6 SKLEPI

Potrdili smo, da so imeli bolniki s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi kontrolami v domačem okolju statistično značilno dvakrat višjo koncentracijo spor plesni kot zdrave kontrole.

Izpostavljenost glivam potrjuje tudi prisotnost statistično značilne višje koncentracije specifičnih protiteles proti glivam v plazmi bolnikov s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi kontrolami. Vendar povezave med koncentracijo gliv in koncentracijo protiteles proti glivam v plazmi nismo odkrili.

Rezultati so pokazali, da je bil BGN najmočnejši spodbujevalec naravnih vnetnih citokinov, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 in IL-12, v humanih PBMC *in vitro*, medtem ko so bili BGT, CIM in HIT šibki spodbujevalci naravnih vnetnih citokinov v PBMC. Bolniki s sarkoidozo so imeli v primerjavi z zdravimi kontrolami močnejši naravni vnetni citokinski odziv PBMC *in vitro* na po spodbujanju s KCSG.

Ugotovili smo, da sočasno spodbujanje humanih PBMC s KCSG in LPS modulira naravni citokinski odziv humanih PBMC v primerjavi s pričakovanim iz teoretičnih aditivnih učinkov KCSG in LPS. BGT je imel statistično značilne stimulatorne učinke na izločanje TNF- $\alpha$ , spodbujeno z LPS, in inhibitorne učinke na izločanje IL-6, spodbujeno z LPS. BGN in HIT sta statistično značilno inhibirala sintezo TNF- $\alpha$ , spodbujeno z LPS. Spodbujanje PBMC z BGN, CIM ali HIT je statistično značilno zavrlo sintezo IL-6, IL-10 in IL-12, spodbujeno z LPS. V primeru CIM in HIT je bila sinteza skoraj popolnoma izničena. Bolniki s sarkoidozo so imeli v primerjavi z zdravimi kontrolami tudi po sočasnem spodbujanju PBMC s KCSG in LPS močnejši naravni vnetni citokinski odziv. Po izračunu sinergističnega indeksa pa so imeli bolniki s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi kontrolami opazno tendenco k šibkejši stimulaciji oziroma šibkejši inhibiciji citokinskega odziva spodbujenega z LPS. Statistično značilno šibkejša je bila pri bolnikih inhibicija sinteze IL-6 in IL-10 v primeru HIT.

KCSG same niso spodbudile *in vitro* sinteze IL-17 v humanih PBMC, so pa modulirale IL-17 odziv aktiviranih PBMC. Sočasno spodbujanje s BGT ali HIT ter ionomicinom in PMA je povzročilo statistično značilni sinergistični učinek na sintezo IL-17, medtem ko je sočasno spodbujanje z BGN ter ionomicinom in PMA povzročilo inhibicijo. Razlike v spodbujenih IL-17 odzivih med bolniki s sarkoidozo in zdravimi kontrolami ni bilo, razen v primeru CIM, ki je imel pri bolnikih s sarkoidozo stimulatorni učinek, pri zdravih pa inhibitorni učinek.

## 7 POVZETEK

Sarkoidoza je večorganska granulomatozna bolezen neznanega vzroka, ki se najpogosteje pojavlja v mediastinalnih bezgavkah in pljučih. Diagnoza temelji na kliničnih in radioloških ugotovitvah, podprtih s histološkim dokazom nekazeoznih granulomov. Kljub številnim raziskavam ostaja etiologija sarkoidoze še vedno neznan. Prevladujoča hipoteza govori v prid enemu ali več okoljskih antigenov, ki sprožijo razvoj sarkoidoze pri posamezniku z dedno nagnjenostjo do bolezni. Epidemiološke in klinične študije opisujejo povezavo med sarkoidozo in življenjem v vlažnem in plesnivem okolju. Namen naše študije je bil ugotoviti pomen gliv v imunopatogenezi sarkoidoze.

V zraku domačega okolja bolnikov s sarkoidozo (N=15) in zdravih kontrol (N=15) smo z vzorčevalnikom zraka SAS (*angl.* saurface air system sampler) izmerili koncentracijo spor plesni v enotah, ki tvorijo kolonije na m<sup>3</sup> zraka (*angl.* colony forming units, CFU/m<sup>3</sup>). V plazmi bolnikov s sarkoidozo (N=22) in zdravih kontrol (N=20) smo z encimsko imunskimi testi ELISA določili koncentracijo specifičnih protiteles proti glivam (pg/ml). Iz periferne venske krvi bolnikov s sarkoidozo (N=22) in zdravih kontrol (N=20) smo izolirali mononuklearne celice (PBMC) s centrifugiranjem na gostotnem gradientu ločevalnega medija Ficoll-Paque<sup>TM</sup> in jih spodbujali s komponentami iz celične stene gliv (KCSG), in sicer s topno in netopno obliko (1→3)-β-D-glukanom – kurdlanom (BGT in BGN), cimosanom A (CIM) in hitosanom (HIT). Prav tako smo PBMC bolnikov in zdravih kontrol spodbujali sočasno s KCSG in bakterijskim lipopolisaharidom (LPS). V supernatantih PBMC kultur smo nato po 4 urah določili koncentracijo TNF-α in po 18 urah IL-6, IL-10 in IL-12 s testi ELISA. Prav tako smo po 40 urah določali IL-17 odziv po spodbujanju PBMC bolnikov s sarkoidozo in zdravih kontrol s KCSG v odsotnosti ali prisotnosti ionomicina in forbol 12-miristat 13-acetata (PMA).

Bolniki s sarkoidozo so imeli v primerjavi z zdravimi v zraku domačega okolja statistično značilno dvakrat višjo koncentracijo spor plesni ( $182,0 \pm 35,3$  CFU/m<sup>3</sup>;  $92,2 \pm 29,3$  CFU/m<sup>3</sup>;  $p=0,018$ ). Najpogostejše plesni, ki smo jih izolirali iz zraka v domačem okolju bolnikov in zdravih kontrol so bile iz rodov *Penicillium*, *Cladosporium* in *Aspergillus*.

Rezultati so pokazali, da so imeli bolniki s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi kontrolami v plazmi statistično značilno višje koncentracije protiteles IgG proti glivam *Penicillium notatum* ( $14,4 \pm 3,8$  pg/ml;  $7,1 \pm 0,9$  pg/ml;  $p=0,017$ ), *Cladosporium herbarum* ( $26,8 \pm 5,3$ ;  $14,2 \pm 3,7$  pg/ml;  $p=0,027$ ), *Aspergillus fumigatus* ( $32,3 \pm 6,4$ ;  $\pm 16,6$  pg/ml;  $p=0,038$ ) in proti *Aleternaria alternata* ( $5,6 \pm$  pg/ml;  $2,7 \pm 0,1$  pg/ml;  $p<0,001$ ). Povezave med koncentracijo spor plesni v domačem okolju in koncentracijo protiteles proti glivam v plazmi nismo odkrili.

Med KCSG je bil BGN najmočnejši spodbujevalec naravnih vnetnih citokinov, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 in IL-12, v humanih PBMC, medtem ko so bili BGT, CIM in HIT šibki spodbujevalci naravnih vnetnih citokinov v PBMC. Bolniki s sarkoidozo so imeli v primerjavi z zdravimi kontrolami močnejši naravni vnetni citokinski odziv PBMC na KCSG, v odsotnosti, kot tudi v prisotnosti LPS.

Sočasno spodbujanje humanih PBMC s KCSG in LPS je privedlo do različne modulacije citokinskih odzivov v primerjavi s pričakovanim iz teoretičnih aditivnih učinkov KCSG in LPS. BGT je imel statistično značilne stimulatorne učinke na izločanje TNF- $\alpha$ , spodbujeno z LPS. Nasprotno pa so BGN, CIM in HIT inhibirali sintezo citokinov, spodbujeno z LPS. Po izračunu sinergističnega indeksa, pa so imeli bolniki s sarkoidozo v primerjavi z zdravimi kontrolami opazno tendenco k šibkejši stimulaciji oziroma šibkejši inhibiciji citokinskega odziva, spodbujenega z LPS. Statistično značilno šibkejša je bila pri bolnikih inhibicija sinteze IL-6 in IL-10 v primeru HIT.

Preverili smo, ali KCSG vplivajo na odziv Th17 v humanih PBMC. V našem *in vitro* modelu ni nobena od KCSG spodbudila *in vitro* sinteze IL-17 ne v kulturah PBMC zdravih kontrol in prav tako ne v kulturah PBMC bolnikov s sarkoidozo. Odkrili pa smo, da lahko KCSG modulirajo sintezo IL-17, spodbujeno z ionomicinom in PMA. BGT je povzročil rahlo stimulacijo, medtem ko je HIT povzročil močno stimulacijo sinteze IL-17 po sočasnem spodbujanju z ionomicinom in PMA. Nasprotno pa je bila z ionomicinom in PMA spodbujena sinteza IL-17 pri zdravih kontrolah z BGN in CIM statistično značilno inhibirana. Presenetljivo pa je sočasno spodbujanje PBMC s CIM ter ionomicinom in PMA pri bolnikih s sarkoidozo privedlo do nasprotnega učinka kot pri zdravih, in sicer pri



bolnikih do sinergističnega učinka ( $SI=1,26$ ) ( $p<0,001$ ), pri zdravih pa do inhibitornega učinka ( $SI=0,81$ ;  $p=0,002$ ). Omenjena razlika med bolniki s sarkoidozo in zdravimi je bila statistično značilna ( $p<0,001$ ).

Ugotovili smo, da so bili bolniki s sarkoidozo v domačem okolju izpostavljeni večji koncentraciji plesni kot zdrave kontrole, kar potrjuje tudi prisotnost specifičnih protiteles proti glivam v plazmi bolnikov. Domnevali smo, da mehanizem v ozadju nastanka sarkoidoze ni okužba z glivami, temveč morda reakcija na določene komponente iz celične stene gliv. KCSG, predvsem BGN, so imele močan vpliv na več naravnih vnetnih ( $TNF-\alpha$ , IL-6 in IL-12) in protivnetni citokin (IL-10), ki so pomembni v imunopatogenezi sarkoidoze. Pri sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS, so imele KCSG stimulatorne kot tudi inhibitorne učinke na sintezo vnetnih in protivnetnih citokinov. Prav tako so vplivali na IL-17 odziv aktiviranih PBMC, ki lahko vodi do nastanka granulomov. Opažene *in vitro* učinke KCSG lahko povzročajo glive v pogojih *in vivo*, vendar je pri sklepanju iz študij *in vitro* na klinične pogoje potrebna previdnost. Po eni strani lahko glive povzročijo povečano izločanje protivnetnega IL-10 in inhibicijo sinteze vnetnih citokinov, kot smo opazili pri sočasnem spodbujanju s KCSG in LPS, ter tako zmanjšajo vnetje in omogočajo vztrajno prisotnost gliv. Po drugi strani pa lahko dolgotrajna izpostavljenost visokim koncentracijam KCSG in LPS (organskemu prahu) povzroči motnjo v normalnih imunskih odzivih (regulatorna aktivnost celic in izločanje citokinov) in omogoča razvoj in/ali vztrajanje različnih imunopatoloških dogodkov, poleg dedne nagnjenosti, kot je nastanek sarkoidoze.

Z našo raziskavo smo ugotovili, da lahko glive oziroma komponente njihove celične stene povzročijo imunopatološke dogodke, ki morda lahko sprožijo nastanek sarkoidoze, ali pa povzročijo resnejši potek bolezni pri posameznikih z dedno nagnjenostjo do sarkoidoze. Menimo, da bi lahko naši rezultati pripomogli k diagnozi, zdravljenju in k preprečevanju sarkoidoze.

## 7.1 SUMMARY

Sarcoidosis is a multisystem granulomatous disease of unknown cause that most commonly affects mediastinal lymph nodes and the lung. The diagnosis is established when clinicoradiological findings are supported by histological evidence of noncaseating granulomas. Despite intensive research, the etiology of sarcoidosis remains unknown. The prevailing hypothesis is that environmental antigen(s) could promote sarcoidosis in genetically susceptible hosts. Several epidemiological and clinical studies have shown relationship between sarcoidosis and living in humid and moldy environment. The aim of our study was to determine the role of fungi in the immunopathogenesis of sarcoidosis.

We measured the air concentration of mould spores in CFU/m<sup>3</sup> in the homes of patients with sarcoidosis (N=15) and healthy controls (N=15) with a surface air system sampler (SAS). In the plasma of patients with sarcoidosis and healthy controls we measured the concentration of specific antibody against fungi (pg/ml) by ELISA. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with sarcoidosis (N = 22) and healthy subjects (N = 20) were isolated by density gradient centrifugation with Ficoll-Paque<sup>TM</sup> and stimulated *in vitro* with fungal cell wall agents (KCSG), namely soluble or particulate (1→3)-β-D-glucan - curdlan (BGT and BGN), zymosan A (CIM) or chitosan (HIT) (all 200 µg/ml) in the absence or presence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) (10 ng/ml). The cytokine responses were measured as the production of TNF-α in cell culture supernatants after 4 hour incubation and IL-6, IL-10 and IL-12 after 18 hour incubation by the ELISA. After 40 hour incubation we also measured IL-17 response after stimulation of PBMC with KCSG in the absence or presence of ionomycin and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA).

Our results demonstrate that patients with sarcoidosis lived in the homes with significant two times higher concentration of mould compared to healthy controls (182,0 ± 35,3 CFU/m<sup>3</sup>; 92,2 ± 29,3 CFU/m<sup>3</sup>; p=0,018). Exposure to fungi was also proven by the presence of specific antibodies against fungi in the plasma of patients with sarcoidosis. The most common moulds that we isolated were *Penicillium*, *Cladosporium* and *Aspergillus*.

Patients with sarcoidosis compared to healthy subjects had statistically significantly higher concentrations of antibodies IgG in plasma against *Penicillium notatum* ( $14,4 \pm 3,8$  pg/ml;  $7,1 \pm 0,9$  pg/ml;  $p=0,017$ ), *Cladosporium herbarum* ( $26,8 \pm 5,3$ ;  $14,2 \pm 3,7$  pg/ml;  $p=0,027$ ), *Aspergillus fumigatus* ( $32,3 \pm 6,4$ ;  $\pm 16,6$  pg/ml;  $p=0,038$ ) and against *Aleternaria alternata* ( $5,6 \pm$  pg/ml;  $2,7 \pm 0,1$  pg/ml;  $p<0,001$ ). We found no correlation between the concentrations of mould spores in homes and the concentrations of antibodies against fungi in plasma.

Simultaneous stimulation of human PBMC with KCSG and LPS led to different modulation of cytokine responses compared to the expected additive effects of KCSG and LPS. BGT had stimulatory effects on TNF- $\alpha$  production, induced with LPS. On the contrary, BGN, CIM and HIT had suppressive effects on cytokine production, induced with LPS. When comparing synergistic index, patients with sarcoidosis compared to healthy subjects showed tendency toward weaker stimulation or weaker inhibition of cytokine response induced with LPS. In PBMC from patients with sarcoidosis statistically significantly weaker inhibition of production IL-6 and IL-10 was shown in case of HIT.

In our in vitro model KCSG did not induce production of IL-17 in human PBMC cultures. We discovered that KCSG can modulate IL-17 production induced by ionomycin and PMA. BGT induced a mild stimulation while HIT induced a very strong stimulation of IL-17 induced by ionomycin and PMA. On the contrary, production of IL-17 induced by ionomycin and PMA was inhibited by BGN and CIM in healthy subjects. Surprisingly, simultaneous stimulation of PBMC with CIM and ionomycin and PMA led to the significantly opposite effect in patients compared to controls, while in healthy subjects there was an inhibition (SI=1,26) ( $p<0,001$ ), while there was stimulation present in patients with sarcoidosis (SI=1,26) ( $p<0,001$ ).

We assumed that the mechanism behind the development of sarcoidosis is not an infection, but perhaps the reaction to fungal cell wall agents. KCSG, particularly BGN had strong influence on the production of the innate inflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-6 in IL-12) and anti-inflammatory cytokine (IL-10) in PBMC, that are involved in the pathogenesis of sarcoidosis. When PBMC were stimulated simultaneously with KCSG and LPS

stimulatory and inhibitory effects on cytokine production were present. KCSG also influenced on the IL-17 response in the activated PBMC, which could lead to granuloma formation. The described *in vitro* effects of KCSG might also be caused by fungi *in vivo* and cause a disruption in normal immune responses and allow the development and/or persistence of various immunopathological events, depending as well upon an individual's genetic susceptibility, as development of sarcoidosis.

Our research indicates that fungi and their cell wall agents can effect on immunopathological events, that might lead to the development of sarcoidosis or cause a more serious course of the disease in individuals with genetic predisposition to sarcoidosis. We think that our results can contribute to diagnosis, treatment and to prevention of sarcoidosis.

## 8 VIRI

Abbas K.A., Lichtman A.H., Pillai S. 2010. Cellular and molecular immunology. Updated 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Saunders Elsevier: 576 str.

Adachi Y., Okazaki M., Ohno N., Yadomae T. 1994. Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1→3)-beta-D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 17, 12: 1554–1560

Baughman R.P., Strohofer S.A., Buchsbaum J., Lower E.E. 1990. Release of tumor necrosis factor by alveolar macrophages of patients with sarcoidosis. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 115, 1: 36-42

Baughman R.P. (ed.) 2006. Sarcoidosis. Lung biology in health and disease. Vol. 210. New York, Taylor & Francis Group: 813 str.

Baughman R.P., Culver D.A., Judson M.A. 2010. A concise review of pulmonary sarcoidosis. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 183, 5: 573-581

Beijer L., Thorn J., Rylander R. 2002. Effects after inhalation of (1→3)-β-D-glucan and relation to mould exposure in the home. Mediators of Inflammation, 11, 3: 149–153

Beijer L., Thorn J., Rylander R. 2003. Mould exposure at home relates to inflammatory markers in blood. The European Respiratory Journal, 21, 2: 317-322

Berovič M., Habijanič J., Zore I., Wraber B., Hodzar D., Boh B., Pohleven F. 2003. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. Journal of Biotechnology, 103, 1: 77–86

Bingisser R., Speich R., Zollinger A., Russi E., Frei K. 2000. Interleukin-10 secretion by alveolar macrophages and monocytes in sarcoidosis. Respiration, 67, 3: 280-286

Brown G.D., Herre J., Williams D.L., Willment J.A., Marshall A.S., Gordon S. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. Journal of Experimental Medicine, 197, 9: 1119–1124

Chen C.L., Wang Y.M., Liu C.F., Wang J.Y. 2008. The effect of water-soluble chitosan on macrophage activation and the attenuation of mite allergen-induced airway inflammation. Biomaterials, 29, 14: 2173-2182

Chen E.S., Song Z., Willett M.H., Heine S., Yung R.C., Liu M.C., Groshong S.D., Zhang Y., Tuder R.M., Moller D.R. 2010. Serum amyloid A regulates granulomatous inflammation in sarcoidosis through Toll-like receptor-2. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 181, 4: 360-373

Cramer R., Blaser K. 2002. Allergy and immunity to fungal infections and colonization. European Respiratory Journal, 19, 1: 151-157

Danila E., Norkūniene J., Jurgauskiene L., Malickaite R. 2009. Diagnostic role of BAL fluid CD4/CD8 ratio in different radiographic and clinical forms of pulmonary sarcoidosis. *Clinical Respiratory Journal*, 3, 4: 214-221

Da Silva C.A., Hartl D., Liu W., Lee C.G., Elias J.A. 2008. TLR-2 and IL-17A in chitin-induced macrophage activation and acute inflammation. *Journal of Immunology*, 181, 6: 4279–4286

du Bois R.M., Goh N., McGrath D., Cullinan P. 2003. Is there a role for microorganisms in the pathogenesis of sarcoidosis? *Journal of Internal Medicine*, 253: 4-17

Engstad C.S., Engstad R.E., Olsen J.O., Osterud B. 2002. The effect of soluble beta-1,3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood. *International Immunopharmacology*, 2, 11: 1585–1597

Ezzie M.E., Crouser E.D. 2007. Considering an infectious etiology of sarcoidosis. *Clinics in Dermatology*, 25, 3: 259-266

Facco M., Cabrelle A., Teramo A., Olivieri V., Gnoato M., Teolato S., Ave E., Gattazzo C., Fadini G.P., Calabrese F., Semenzato G., Agostini C. 2011. Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder. *Thorax*, 66, 2: 144-150

Falch B.H., Espevik T., Ryan L., Stokke B.T. 2000. The cytokine stimulating activity of (1→3)-β-D-glucans is dependent on the triple helix conformation. *Carbohydrate Research*, 329, 3:587–596

Ferwerda G., Meyer-Wentrup F., Kullberg B.J., Netea M.G., Adema G.J. 2008. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cellular Microbiology*, 10, 10: 2058–2066

Fogelmark B., Sjöstrand M., Rylander R. 1994. Pulmonary inflammation induced by repeated inhalations of beta(1,3)-D-glucan and endotoxin. *Journal of Experimental Pathology*, 75, 2: 85-90

Galán-Díez M., Arana D.M., Serrano-Gómez D., Kremer L., Casasnovas J.M., Ortega M., Cuesta-Domínguez A., Corbí A.L., Pla J., Fernández-Ruiz E. 2010. *Candida albicans* beta-glucan exposure is controlled by the fungal CEK1-mediated mitogen-activated protein kinase pathway that modulates immune responses triggered through dectin-1. *Infection and Immunity*, 78(4):1426-1436

Gallin E.K., Green S.W., Patchen M.L. 1992. Comparative effects of particulate and soluble glucan on macrophages of C3H/HeN and C3H/HeJ mice. *International Journal of Immunopharmacology*, 14, 2: 173-183

George M., Abraham T.E. 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan--a review. *Journal of Controlled Release*, 114, 1: 1-14

Gent J.F., Ren P., Belanger K., Triche E., Bracken M.B., Holford T.R., Leaderer B.P. 2002. Levels of household mold associated with respiratory symptoms in the first year of life in a cohort at risk for asthma. *Environmental Health Perspectives*, 110, 12: A781–A786

Gerke A.K., Hunninghake G. 2008. The immunology of sarcoidosis. *Clinics in Chest Medicine*, 29, 3: 379-390

Grunewald J., Eklund A. 2007. Role of CD4+ T cells in sarcoidosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 4, 5: 461–464

Havaux X., Zeine A., Dits A., Denis O. 2005. A new mouse model of lung allergy induced by the spores of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum* molds. *Clinical and Experimental Immunology*, 139, 2: 179-188

Hida T.H., Ishibashi K., Miura N.N., Adachi Y., Shirasu Y., Ohno N. 2009. Cytokine induction by a linear 1,3-glucan, curdlan-oligo, in mouse leukocytes *in vitro*. *Inflammation Research*, 58, 1: 9–14

Higashi T., Hashimoto K., Takagi R., Mizuno Y., Okazaki Y., Tanaka Y., Matsushita S. 2010. Curdlan induces DC-mediated Th17 polarization via Jagged1 activation in human dendritic cells. *Allergology International*, 59, 2: 161-166

Hofmann S., Franke A., Fischer A., Jacobs G., Nothnagel M., Gaede K.I., Schürmann M., Müller-Quernheim J., Krawczak M., Rosenstiel P., Schreiber S. 2008. Genome-wide association study identifies ANXA11 as a new susceptibility locus for sarcoidosis. *Nature Genetics*, 40, 9: 1103-1106

Holt P.G., Batty J.E. 1980. Alveolar macrophages. V. Comparative studies on the antigen presentation activity of guinea-pig and rat alveolar macrophages. *Immunology*, 41, 2: 361-366.

Homolka J., Müller-Quernheim J. 1993. Increased interleukin 6 production by bronchoalveolar lavage cells in patients with active sarcoidosis. *Lung*, 171, 3:173-183

Iannuzzi M.C., Rybicki B.A., Teirstein A.S. 2007. Sarcoidosis. *New England Journal of Medicine*, 357, 21: 2153-2165

Ina Y., Takada K., Yamamoto M., Morishita M., Miyachi A. 1990. Antigen-presenting capacity in patients with sarcoidosis. *Chest*, 98: 911–916

Ishibashi K., Miura N.N., Adachi Y., Ogura N., Tamura H., Tanaka S., Ohno N. 2004. DNA array analysis of altered gene expression in human leukocytes stimulated with soluble and particulate forms of *Candida* cell wall beta-glucan. *International Immunopharmacology*, 4, 3: 387–401

Johnson K.J., Glovsky M., Schrier D. 1984. Pulmonary granulomatous vasculitis induced in rats by treatment with glucan. *American Journal of Pathology*, 114: 515–516

Kämpfer P., Engelhart S., Rolke M., Sennekamp J. 2005. Extrinsic allergic alveolitis (hypersensitivity pneumonitis) caused by *Sphingobacterium spiritivorum* from the water reservoir of a steam iron. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 9: 4908-4910

Kankkunen P., Teirilä L., Rintahaka J., Alenius H., Wolff H., Matikainen S. 2010. (1,3)- $\beta$ -glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *Journal of Immunology*, 184, 11: 6335–6342

Kavanagh K. (ed.) 2005. *Fungi. Biology and applications*. West Sussex, John Wiley & Sons Ltd.: 267 str.

Kelly E.K., Wang L., Ivashkiv L.B. 2010. Calcium-activated pathways and oxidative burst mediate zymosan-induced signaling and IL-10 production in human macrophages. *Journal of Immunology*, 184, 10: 5545–5552.

Kern D.G., Neill M.A., Wrenn D.S., Varone J.C. 1993. Investigation of a unique time-space cluster of sarcoidosis in firefighters. *American Review of Respiratory Disease*, 148, 4 Pt 1: 974-980

Kikkert R., Bulder I., de Groot E.R., Aarden L.A., Finkelman M.A. Potentiation of Toll-like receptor-induced cytokine production by (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans: implications for the monocyte activation test. *Journal of Endotoxin Research*, 13, 3: 140–149

Klis F.M. 1994. Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast*, 10, 7: 851–869

Kucera G.P., Rybicki B.A., Kirkey K.L., Coon S.W., Major M.L., Maliarik M.J., Iannuzzi M.C. 2003. Occupational risk factors for sarcoidosis in African-American siblings. *Chest*, 123, 5: 1527-1535

Laney A.S., Cragin L.A., Blevins L.Z., Sumner A.D., Cox-Ganser J.M., Kreiss K., Moffatt S.G., Lohff C.J. 2009. Sarcoidosis, asthma, and asthma-like symptoms among occupants of a historically water-damaged office building. *Indoor Air*, 19, 1: 83-90

Latgé J.P. 2010. Tasting the fungal cell wall. *Cellular Microbiology*, 12, 7: 863-872

Lazar C.A., Culver D.A. 2010. Treatment of sarcoidosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 31, 4: 501-518

LeibundGut-Landmann S., Gross O., Robinson M.J., Osorio F., Slack E.C., Tsoni S.V., Schweighoffer E., Tybulewicz V., Brown G.D., Ruland J., Reis e Sousa C. 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nature Immunology*, 8, 6: 630–638



Levitz S.M. 2010. Innate recognition of fungal cell walls. *PLoS Pathogens*, 6, 4: e1000758, doi: 10.1371/journal.ppat.1000758: 3 str.

Mai J., Wang H., Yang X.F. 2010. Th 17 cells interplay with Foxp3+ Tregs in regulation of inflammation and autoimmunity. *Frontiers in Bioscience*, 15: 986-1006

Martin W.J. 2nd., Iannuzzi M.C., Gail D.B., Peavy H.H. 2004. Future directions in sarcoidosis research: summary of an NHLBI working group. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170, 5: 567-571

Matos T., Kavčič T. 2010. Vrstna raznolikost in koncentracije plesni v zraku bolnišničnega in zunanjega okolja. *Zdravniški Vestnik*, 79, 2: 117-126

Milman N., Selroos O. 1990. Pulmonary sarcoidosis in the Nordic countries 1950–1982: epidemiology and clinical picture. *Sarcoidosis*, 7: 50–57

Minshall E.M., Tsicopoulos A., Yasrael Z., Wallaert B., Akoum H., Vorng H., Tonnel A.B., Hamid Q. 1997. Cytokine mRNA gene expression in active and nonactive pulmonary sarcoidosis. *European Journal of Respiratory Diseases*, 10, 9: 2034–2039

Miyamoto M., Prause O., Sjöstrand M., Laan M., Lötvall J., Lindén A. 2003. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *Journal of Immunology*, 170, 9: 4665-4672

Miyara M., Amoura Z., Parizot C., Badoual C., Dorgham K., Trad S., Kambouchner M., Valeyre D., Chapelon-Abric C., Debré P., Piette J.C., Gorochov G. 2006. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 203, 2: 359-370

Moller D.R., Forman J.D., Liu M.C., Noble P.W., Greenlee B.M., Vyas P., Holden D.A., Forrester J.M., Lazarius A., Wysocka M., Trinchieri G., Karp C. 1996. Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *Journal of Immunology*, 156, 12: 4952-4960

Mroz R.M., Korniluk M., Stasiak-Barmuta A., Chyczewska E. 2008. Increased levels of interleukin-12 and interleukin-18 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. *Journal of physiology and pharmacology*, 59, Suppl. 6: 507-513

Morris G., Kokki M.H., Anderson K., Richardson M.D. 2000. Sampling of *Aspergillus* spores in air. *Journal of Hospital Infection*, 44: 81–92

Mullins J. 2001. Microorganisms in outdoor air. V: Microorganisms in home and indoor work environments: Diversity, health impacts, investigation and control. (ed.) New York, Taylor & Francis Group: 3-16

Muzzarelli R.A. 2010. Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Marine Drugs*, 8, 2: 292–312

Naberezhnykh G.A., Gorbach V.I., Likhatskaya G.N., Davidova V.N., Solov'eva TF. 2008. Interaction of chitosans and their N-acylated derivatives with lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 73, 4: 432–441

Nakagawa Y., Ohno N., Murai T. 2003. Suppression by *Candida albicans*  $\beta$ -glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes. *Journal of Infectious Diseases*, 187, 4: 710–713

Nakatsu M., Hatabu H., Morikawa K., Uematsu H., Ohno Y., Nishimura K., Nagai S., Izumi T., Konishi J., Itoh H. 2002. Large coalescent parenchymal nodules in pulmonary sarcoidosis: "sarcoid galaxy" sign. *American Journal of Roentgenology*, 178, 6: 1389-1393

Nevalainen A., Morawska L. 2009. Biological agents in indoor environments assessment of health risks. Indianapolis. Geneva, WHO: 206 str.

Newman L.S., Rose C.S., Bresnitz E.A., Rossman M.D., Barnard J., Frederick M., Terrin M.L., Weinberger S.E., Moller D.R., McLennan G., Hunninghake G., DePalo L., Baughman R.P., Iannuzzi M.C., Judson M.A., Knatterud G.L., Thompson B.W., Teirstein A.S., Yeager H. Jr, Johns C.J., Rabin D.L., Rybicki B.A., Cherniack R. ACCESS Research Group. 2004. A case control etiologic study of sarcoidosis: environmental and occupational risk factors. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170, 12: 1324-1330

Noor A., Knox K.S. 2007. Immunopathogenesis of sarcoidosis. *Clinics in Dermatology*, 25, 3: 250-258

Norbäck D. 2009. An update on sick building syndrome. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 9, 1: 55-59

Novak M., Vetvicka V. 2008. Beta-glucans, history, and the present: Immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *Journal of Immunotoxicology*, 5, 1: 47–57

Nunes H., Soler P., Valeyre D. 2005. Pulmonary sarcoidosis. *Allergy*, 60: 565-582

Nwe N., Stevens W.F. 2002. Chitosan isolation from the chitosan-glucan complex of fungal cell wall using amyolytic enzymes. *Biotechnology Letters*, 24, 18: 1461–1464

Ocvirk R., Matos T., Sever M., Zver S. 2004. Vzorčenje spor plesni iz rodu *Aspergillus* v zraku Kliničnega oddelka za hematologijo v Ljubljani. *Zdravniški Vestnik*, 73, Suppl. 1: I-173-I-177

Okamoto Yoshida Y., Umemura M., Yahagi A., O'Brien R.L., Ikuta K., Kishihara K., Hara H., Nakae S., Iwakura Y., Matsuzaki G. 2010. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *Journal of Immunology*, 184, 8: 4414–4422

Oltmanns U., Schmidt B., Hoernig S., Witt C., John M. 2003. Increased spontaneous interleukin-10 release from alveolar macrophages in active pulmonary sarcoidosis. *Experimental Lung Research*, 29, 5: 315-328

Pattani A., Patravale V.B., Panicker L., Potdar P.D. 2009 Immunological effects and membrane interactions of chitosan nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 6, 2: 345–352

Paulík S., Svrcek, Mojzisoová J., Durove A., Benísek Z., Húska M. 1996. The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan (*Pleurotus ostreatus*) on delayed hypersensitivity and phagocytic ability of blood leucocytes in mice. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, 43, 3: 129-135

Pforte A., Gerth C., Voss A., Beer B., Häussinger K., Jütting U., Burger G., Ziegler-Heitbrock H.W. 1993. Proliferating alveolarmacrophages in BAL and lung function changes in interstitial lung disease. *European Respiratory Journal*, 6, 7: 951–955

Plankl M. 2009. Vpliv atorvastatina na sintezo citokinov vnetnega in specifičnega imunskega odziva v kulturah humanih mononuklearnih celic iz venske krvi. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 89 str.

Prezant D.J., Dhala A., Goldstein A., Janus D., Ortiz F., Aldrich T.K., Kelly K.J. 1999. The incidence, prevalence, and severity of sarcoidosis in New York City firefighters. *Chest*, 116, 5: 1183-1193

Prior C., Knight R.A., Herold M., Ott G., Spiteri M.A. 1996. Pulmonary sarcoidosis: patterns of cytokine release *in vitro*. *European Journal of Respiratory Diseases*, 9, 1: 47-53

Romani L. 2011. Immunity to fungal infections. *Nature reviews. Immunology*, 11, 4: 275-288

Rossmann M.D., Thompson B., Frederick M., Maliarik M., Iannuzzi M.C., Rybicki B.A., Pandey J.P., Newman L.S., Magira E., Beznik-Cizman B., Monos D.; ACCESS Group. 2003. HLA-DRB1\*1101: a significant risk factor for sarcoidosis in blacks and whites. *American Journal of Human Genetics*, 73, 4: 720-735

Rybicki B.A., Walewski J.L., Maliarik M.J., Kian H., Iannuzzi M.C. ACCESS Research Group. 2005. The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and whites. *American Journal of Human Genetics*, 77, 3: 491-499

Rylander R. 1989. Role of endotoxin and glucan for the development of granulomatous disease in the lung. *Sarcoidosis*, 6: 26–27

Rylander R., Jacobs R.R. (Eds). 1994. *Organic Dusts: Exposure, Effects And Prevention*. Lewis Publ, Boca Raton FA, ZDA: 298 str.

Rylander R. 1995. (1→3)-β-D-glucan in the environment: a risk assessment. In: Young S-H, Castranova V. Toxicology of (1→3)-β-glucans: glucans as a marker for fungal exposure. Boca Raton FA: CRC press: 53–64

Rylander R. 1999. Indoor air-related effects and airborne (1→ 3)-β-D-glucan. *Environmental Health Perspectives*, 107, Suppl. 3: S501-S503

Rylander R., Lin R.H. 2000. (1→3)-β-D-glucan - relationship to indoor air-related symptoms, allergy and asthma. *Toxicology*, 152, 1-3: 47-52

Rylander R., Fogelmark B., Ewaldsson B. 2008. Mouldy environments and toxic pneumonitis. *Toxicology and Industrial Health*, 24, 3: 177-180

Rylander R. 2010. Organic dust induced pulmonary disease – the role of mould derived β-glucan. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 17, 1: 9-13

Seifert S.A., von Essen S., Jacobitz K., Crouch R., Lintner C.P. 2003. Organic dust toxic syndrome: a review. *Journal of toxicology-Clinical Toxicology*, 41, 2: 185-193

Shigehara K., Shijubo N., Ohmichi M., Takahashi R., Kon S., Okamura H., Kurimoto M., Hiraga Y., Tatsuno T., Abe S., Sato N. 2001. IL-12 and IL-18 are increased and stimulate IFN-gamma production in sarcoid lungs. *Journal of Immunology*, 166, 1: 642-649

Shoham S., Levitz S.M. 2005. The immune response to fungal infections. *British Journal of Haematology*, 129, 5: 569-582

Simčič S., Wraber B., Sollner M., Urleb U., Gobec S. 2000. Modulation of tumour necrosis factor production with desmuramyldipeptide analogues. *Pflugers Archiv*, 440, Suppl. 5: R64–R66

Singh J. 2005. Toxic molds and indoor air Quality. *Indoor + Built Environment : Journal of the International Society of the Built Environment*, 14, 3-4: 229–234

Song Z., Marzilli L., Greenlee B.M., Chen E.S., Silver R.F., Askin F.B., Teirstein A.S., Zhang Y., Cotter R.J., Moller D.R. 2005. Mycobacterial catalase-peroxidase is a tissue antigen and target of the adaptive immune response in systemic sarcoidosis. *Journal of Experimental Medicine*, 201, 5: 755-767

Spagnolo P., du Bois R.M. 2007. Genetics of sarcoidosis. *Clinics in Dermatology*, 25, 3: 242-249

SPSS Inc. 2010. PASW statistics 18 user manuals. New York, SPSS inc, IBM company: str. 42  
<http://support.spss.com/productsext/statistics/documentation/18/clientindex.html#UManuals> (januar 2010)

Stasinopoulos S.J., Fisher P.R., Stone B.A., Stanisich V.A. 1999. Detection of two loci involved in (1→3)-beta-glucan (curdlan) biosynthesis by *Agrobacterium* sp. ATCC31749, and comparative sequence analysis of the putative curdlan synthase gene. *Glycobiology*, 9, 1: 31–41

American Thoracic Society. 1999. American Thoracic Society: Joint statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160: 736-755

Stopinšek S., Ihan A., Wraber B., Terčelj M., Salobir B., Rylander R., Simčič S. 2010a. Innate inflammatory potential of different microbial cell wall agents. World immune regulation meeting-IV, Davos, 29 March-1 April 2010, Abstract book : str. 168

Stopinšek S., Simčič S., Ihan A., Wraber B., Salobir B., Rylander R., Terčelj M. 2010b. Reactivity to fungal cell wall agents (KCSG) in peripheral blood mononuclear cells from patients with sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010: str. A5709

Stopinšek S., Terčelj M., Salobir B., Wraber B., Ihan A., Rylander R. 2010c. Effects of fungal cell wall polysaccharides and lipopolysaccharide on *in vitro* tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells of sarcoidosis patients. *Zdravniški Vestnik*, 79: 684–689

Stopinšek S., Ihan A., Wraber B., Terčelj M., Salobir B., Rylander R., Simčič S. 2011a. Fungal cell wall agents suppress the innate inflammatory cytokine responses of human peripheral blood mononuclear cells challenged with lipopolysaccharide *in vitro*. *International Immunopharmacology*, doi: 10.1016/j.intimp.2011.02.006: 9 str. (sprejeto v tisk)

Stopinšek S., Ihan A., Wraber B., Terčelj M., Salobir B., Rylander R., Simčič S. 2011b. Fungal cell wall agents suppress the innate inflammatory cytokine responses of human peripheral blood mononuclear cells challenged with lipopolysaccharide *in vitro*. World immune regulation meeting-V, Davos, 24-27 March 2011, Abstract book: str. 157

Strausz J., Männel D.N., Pfeifer S., Borkowski A., Ferlinz R., Müller-Quernheim J. 1991. Spontaneous monokine release by alveolar macrophages in chronic sarcoidosis. *International Archives of Allergy and Immunology*, 96, 1: 68-75

Studdy P.R., Bird R. 1989. Serum angiotensin converting enzyme in sarcoidosis--its value in present clinical practice. *Annals of Clinical Biochemistry*, 26, 1: 13-18

Šuškovič S., Košnik M., Osolnik K., Debeljak A., Fležar M., Kern I., Kraut A, Cesar R., Žolnir-Dovč M., Mušič E., Šorli J. 2001. Smernice za obravnavo bolnika s sarkoidozo. *Zdravniški Vestnik*, 70: 419-424

Švagelj M., Berovič M., Boh B., Menard A., Simčič S., Wraber B. 2008. Solid-state cultivation of *Grifola frondosa* (Dicks: Fr) S.F. Gray biomass and immunostimulatory effects of fungal intra- and extracellular beta-polysaccharides. *New Biotechnology*, 25, 2–3: 150–156

Terčelj M., Rott T., Rylander R. 2007. Antifungal treatment in sarcoidosis – a pilot intervention trial. *Respiratory Medicine*, 101, 4:774-778

Terčelj M., Salobir B., Rylander R. 2008. Microbial antigen treatment in sarcoidosis: A new paradigm? *Medical Hypothesis*, 70, 4: 831-834

Terčelj M., Salobir B., Simčič S., Wraber B., Zupančič M., Rylander R. 2009. Chitotriosidase activity in sarcoidosis and some other pulmonary diseases. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 69, 5: 575-578

Terčelj M., Salobir B., Rylander. 2011. Antifungal medication is efficient in treatment of sarcoidosis. *Therapeutic advances in respiratory disease*, doi: 10.1177/1753465811401648: str. 6 (sprejeto v tisk)

Thorn J., Beijer L., Rylander R. 2001. Effects after inhalation of (1→3)-β-D-glucan in healthy humans. *Mediators of Inflammation*, 10, 4: 173–178

Tokunaka K., Ohno N., Adachi Y., Tanaka S., Tamura H., Yadomae T. 2000. Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water-soluble (1→3)-β-D-glucan, CSBG from *Candida* spp. *International Journal of Immunopharmacology*, 22, 5: 383–394

Yermak I.M., Davidova V.N., Gorbach V.I., Luk'yanov P.A., Slov'eva T.F., Ulmer A.J., Buwitt-Beckmann U., Rietschel E.T., Ovodov Y.S. 2006. Forming and immunological properties of some lipopolysaccharide-chitosan complexes. *Biochimie*, 88, 1: 23-30

Yoon H.J., Moon M.E., Park H.S., Im S.Y., Kim Y.H. 2007. Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358, 3: 954–959

Young S.H., Robinson V.A., Barger M., Whitmer M., Porter D.W., Frazer D.G., Castranova V. 2003. Exposure to particulate 1-3-β-glucans induces greater pulmonary toxicity than soluble 1-3-β-glucans in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, part A*, 66: 25-38

Young S.H., Ostroff G.R., Zeidler-Erdely P.C., Roberts J.R., Antonini J.M., Castranova V. 2007. A comparison of the pulmonary inflammatory potential of different components of yeast cell wall. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 70, 13: 1116-1124

Young S.-H., Castranova V. 2005. Toxicology of 1→3-beta-glucans: Glucans as marker for fungal exposure. CRC Press: 217 str.

Werner J.L., Metz A.E., Horn D., Schoeb T.R., Hewitt M.M., Schwiebert L.M., Faro-Trindade I., Brown G.D., Steele C. 2009. Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Immunology*, 182, 8: 4938-4946

van de Veerdonk F.L., Marijnissen R.J., Kullberg B.J., Koenen H.J., Cheng S.C., Joosten I., van den Berg W.B., Williams D.L., van der Meer J.W., Joosten L.A., Netea M.G. 2009. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host & Microbe*, 5, 4: 329-340

van Eijk M., van Roomen C.P.A.A., Renkema G.H., Bussink A.P., Andrews L., Blooart E.F.C., Sugar A., Verhoeven A.J., Boot R.G., Aerts J.M.F.G. 2005. Characterization of human phagocyte derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *International immunology*, 17: 1505–1512

Vautier S., Sousa Mda G., Brown G.D. 2010. C-type lectins, fungi and Th17 responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21, 6: 405-412

Zhang L., Wang C., Cui S., Wang Z., Zhang X. 2003. Single-molecule force spectroscopy on curdlan: unwinding helical structures and random coils. *Nano Letters*, 3, 8: 1119–1124

Zheng L., Teschler H., Guzman J., Hübner K., Striz I., Costabel U. 1995. Alveolar macrophage TNF-alpha release and BAI cell phenotypes in sarcoidosis. *American journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 152, 3: 1061-1066

Ziegenhagen M.W., Rothe M.E., Schlaak M., Müller-Quernheim J. 2003. Bronchoalveolar and serological parameters reflecting the severity of sarcoidosis. *European Respiratory Journal*, 21, 3: 407–413

Zissel G., Prasse A., Müller-Querheim J. 2010. Immunologic response of Sarcoidosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 31, 4: 390-403

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici znan. sod. dr. Saši Simčič in somentorici doc. dr. Marjeti Terčelj, dr. med. za strokovne nasvete, ideje, vodenje in usmerjanje med raziskovalnim delom.

Iskreno se zahvaljujem tudi prof. dr. Alojzu Ihanu, dr. med za strokovne nasvete in usmerjanje med raziskovalnim delom.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Nini Gunde-Cimerman za predsedovanje v komisiji, za pregled doktorske disertacije in vse strokovne predloge.

Iskrena hvala tudi doc. dr. Tadeji Matos, dr. med. in njenim tehničnim sodelavkam za določitev koncentracije in vrstne raznolikosti plesni pri vzorčenju zraka. Prav tako hvala za strokovne nasvete.

Za pomoč pri laboratorijskem delu se zahvaljujem vsem sodelavkam in sodelavcem na Oddelku za imunologijo, predvsem pa hvala Mojci Privšek, Petri Simić in Jasmini Letić za vso njihovo pomoč, oporo in dobro voljo.

Hvala tudi vsem ostalim sodelavkam in sodelavcem iz Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri delu.

Posebno pa se zahvaljujem moji družini in vsem prijateljem, ki mi vztrajno stojijo ob strani, me vzpodbujajo in so mi v oporo.