

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Jasmina LIVK

**RAZMERJE MED EFEKTORSKIMI IN REGULATORNIMI ODZIVI
LIMFOCITOV T V KULTURAH MONONUKLEARNIH CELIC
ZDRAVIH LJUDI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**BALANCE BETWEEN EFFECTORY AND REGULATORY
T LYMPHOCYTE RESPONSES IN MONONUCLEAR CELL
CULTURES OF HEALTHY PEOPLE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc.dr. Blagajano Herzog-Velikonja, za somentorico pa višjo znan.sod.dr. Branko Wraber.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Darja Žgur-Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Član: doc. dr. Blagajana Herzog-Velikonja
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: višja znan. sod. dr. Branka Wraber
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora: 19.4.2007

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Jasmina Livk

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 577.2 : 57.083 (043.2) = 863
KG citokini/Th1/Th2/Th3/Tr1/interlevkin-4/interlevkin-10/interferon- γ /transformirajoči rastni faktor- β 1/PBMC/ELISA/pretočna citometrija/ionomicin/PMA/normalne vrednosti
KK
AV LIVK, Jasmina
SA HERZOG-VELIKONJA, Blagajana (mentorica)/WRABER, Branka (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2007
IN RAZMERJE MED EFEKTORSKIMI IN REGULATORNIMI ODZIVI LIMFOCITOV T V KULTURAH MONONUKLEARNIH CELIC ZDRAVIH LJUDI
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 78 str., 19 pregl., 8 sl., 116 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Citokini, ki jih izločajo različne celice, imajo pomembne biološke in regulatorne funkcije. Citokini Th1, kot je npr. IFN- γ , spodbujajo predvsem celično posredovanjo imunost, medtem ko citokini Th2 (npr. IL-4) spodbujajo močan protitelesni imunske odziv. Med najpomembnejša regulatorna citokina sodita IL-10 (Tr1) in TGF- β 1 (Th3), oba zavirata imunske odzive. Namensko raziskave je bil proučiti citokinski vzorec v perifernih mononuklearnih celicah (PBMC) pri zdravih odraslih ljudeh. PBMC, izolirane iz krvi zdravih darovalcev različnih starosti, smo spodbudili z ionomicinom in PMA ter inkubirali 24 in 40 ur. Koncentracijo IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β 1 v supernatantu celičnih kultur smo izmerili z metodo ELISA. Po 40-urni inkubaciji z ionomicinom in PMA so bile srednje vrednosti s standardnimi odkloni ($\bar{X} \pm SD$) pri zdravih odraslih naslednje: za IFN- γ 18503 ± 8730 pg/ml, za IL-4 $13,5 \pm 9,58$ pg/ml, za IL-10 $108 \pm 60,3$ pg/ml, za TGF- β 1 2181 ± 1151 pg/ml. Vrednosti *in vitro* določene koncentracije citokinov smo logaritmizirali in jih predstavili tudi kot geometrijsko sredino. Znotrajcelične citokine v PBMC smo določili še z metodo pretočne citometrije in jih primerjali z rezultati, dobljenimi z metodo ELISA.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 577.2 : 57.083 (043.2) = 863
CX cytokines/Th1/Th2/Th3/Tr1/interleukin-4/interleukin-10/interferon- γ /transforming growth factor- β 1/PBMC/ELISA/flow cytometry/ionomycin/PMA/normal values
CC
AU LIVK, Jasmina
AA HERZOG-VELIKONJA, Blagajana (supervisor)/WRABER, Branka (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Biological Department
PY 2007
TI BALANCE BETWEEN EFFECTORY AND REGULATORY T LYMPHOCYTE RESPONSES IN MONONUCLEAR CELL CULTURES OF HEALTHY PEOPLE
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 78 p., 19 tab., 8 fig., 116 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Cytokines, being produced by many cell types, have important biological and regulatory functions. Th1 cytokines (eg. IFN- γ) preferentially induce cell-mediated immunity, while Th2 cytokines (eg. IL-4) primarily support humoral immune response. The most important regulatory cytokines are considered to be IL-10 (Tr1) and TGF- β 1 (Th3), both suppress immune responses. Present study was performed to characterize the cytokine pattern in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy adults. PBMC obtained from healthy donors of different ages were incubated for 24 and 40 h with ionomycin and PMA as stimulating agents, followed by the measurement of concentrations of IFN- γ , IL-4, IL-10 and TGF- β 1 in cell culture supernatants by ELISA. After 40 hours of stimulation with ionomycin and PMA the following mean values and standard deviations ($\bar{X} \pm SD$) were determined in healthy adults: IFN- γ 18503 ± 8730 pg/ml, IL-4 $13,5 \pm 9,58$ pg/ml, IL-10 $108 \pm 60,3$ pg/ml, TGF- β 1 2181 ± 1151 pg/ml. The results of *in vitro* cytokine concentrations were transformed logarithmically and expressed also as geometric mean. Additionally, we have examined intracellular cytokines in PBMC by flow cytometry and compared the method with ELISA.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 CELICE T POMAGALKE IN NJIHOVA AKTIVACIJA	3
2.2 PODVRSTE CELIC T POMAGALK	4
2.2.1 Efektorske celice CD4⁺	4
2.2.1.1 Celice Th1 in Th2	4
2.2.1.2 Celice Th17	5
2.2.2 Regulatorne celice CD4⁺	5
2.2.2.1 Naravne regulatorne celice T CD4 ⁺ CD25 ⁺	9
2.2.2.2 Celice Tr1	11
2.2.2.3 Celice Th3	13
2.3 CITOKINI	15
2.3.1 Citokini v naših poskusih	16
2.3.1.1 Interferon- γ (IFN- γ)	16
2.3.1.2 Interlevkin-4 (IL-4)	17
2.3.1.3 Interlevkin-10 (IL-10)	17
2.3.1.4 Transformirajoči rastni faktor- β (TGF- β)	18
2.3.2 Merjenje citokinov	19
2.3.3 Citokinski odziv pri zdravih odraslih	23
2.4 NAMEN NALOGE	25
3 MATERIAL IN METODE	26
3.1 MATERIAL	26
3.1.1 Vzorci krvi	26
3.1.2 Mediji in ostale raztopine	26
3.1.3 Aktivatorja PBMC v naših poskusih	27
3.1.3.1 Forbol 12-miristat 13-acetat (PMA)	27
3.1.3.2 Ionomicin (IONO)	27
3.1.4 Opis uporabljenih monoklonskih protiteles	28
3.1.4.1 MoAb proti CD3	28
3.1.4.2 MoAb proti CD4	28
3.1.4.3 MoAb proti CD25	29
3.2 METODE	29
3.2.1 Osamitev PBMC iz venske krvi	29
3.2.1.1 Princip osamitve	29
3.2.1.2 Opis postopka	30

3.2.2	Določevanje števila PBMC v suspenziji in uravnavanje do želene koncentracije	31
3.2.3	Aktivacija PBMC	31
3.2.4	Določevanje citokinov z encimskoimunskim testom (ELISA)	32
3.2.5	Priprava celičnih suspenzij za analizo s pretočnim citometrom	34
3.2.5.1	Določanje membranskih antigenov CD25 in CD4	34
3.2.5.2	Določevanje znotrajceličnega IFN- γ , IL-4, IL-10 in TGF- β 1 skupaj z membranskim antigenom CD3	35
3.2.5.3	Določevanje znotrajceličnih citokinov po 24-urni inkubaciji	36
3.2.6	Analiza limfocitov s pretočnim citometrom	36
3.2.7	Obdelava podatkov	39
4	REZULTATI	40
4.1	EFEKTORSKI IN REGULATORNI CITOKINI V KULTURAH PBMC ZDRAVIH DAROVALCEV PO SPODBUJANJU Z IONO IN PMA	40
4.2	ZNOTRAJCELIČNO DOLOČANJE EFEKTORSKIH IN REGULATORNIH CITOKINOV Z METODO PRETOČNE CITOMETRIJE	44
4.3	KORELACIJA DOLOČANJA CITOKINSKEGA PROFILA Z METODO ZNOTRAJCELIČNEGA MERJENJA CITOKINOV IN <i>IN VITRO</i> METODE	47
4.4	NORMALNA OBMOČJA IZDELovanja CITOKINOV PO <i>IN VITRO</i> SPODBUJANJU Z IONO IN PMA	49
4.5	POPRAVEK NORMALNIH VREDNOSTI PRI SPREMENBI REAGENTOV ZA MERJENJE IFN- γ	56
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	58
5.1	RAZPRAVA	58
5.2	SKLEPI	65
6	POVZETEK	67
7	VIRI	69

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Pregl. 1: Različne podskupine regulatornih celic T (Treg)	14
Pregl. 2: Značilnosti različnih podskupin celic T	15
Pregl. 3: Razmerja citokinov pri zdravih odraslih ljudeh v supernatantih celic PBMC po spodbujanju <i>in vitro</i>	24
Pregl. 4: Označevalske molekule, ki smo jih uporabili za opredeljevanje želenih limfocitnih populacij	29
Pregl. 5: Razponi koncentracije standardov v umeritveni krivulji in meje občutljivosti testa ELISA za citokine IFN- γ , IL-4, IL-10 (Pierce Endogen, ZDA) in TGF- β 1 (DRG Diagnostics, Nemčija).....	33
Pregl. 6: Vrednosti koncentracije IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ (pg/ml) v kulturah PBMC zdravih odraslih darovalcev (n=20).....	42
Pregl. 7: Vrednosti koncentracije IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ v kulturah PBMC zdravih odraslih darovalcev, ki smo jih upoštevali pri končni analizi rezultatov.	43
Pregl. 8: Opisne statistike koncentracije citokinov IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ v kulturah PBMC zdravih odraslih darovalcev.	43
Pregl. 9: Odstotki celic T CD3 $^{+}$, ki so sintetizirale znotrajcelične citokine IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ po spodbujanju PBMC z IONO&PMA in inkubaciji 5 oz. 24 ur.	45
Pregl. 10: Odstotki celic T CD3 $^{+}$, ki so sintetizirale znotrajcelične citokine IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ po spodbujanju PBMC z IONO&PMA in inkubaciji 5 oz. 24 ur, in ki smo jih upoštevali pri končni analizi rezultatov.	46
Pregl. 11: Opisne statistike odstotkov opazovanih celic T CD3 $^{+}$ za citokine IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ po spodbujanju PBMC z IONO&PMA in inkubaciji 5 oz. 24 ur.	46
Pregl. 12: Korelacija dveh različnih metod določanja citokinov pri zdravih odraslih prostovoljcih.	48
Pregl. 13: Vse vrednosti koncentracije IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ (pg/ml) v kulturah PBMC pri posameznih zdravih odraslih darovalcih (n= 37-43), ki so bile izmerjene v istem laboratoriju in po enakih postopkih.	50
Pregl. 14: Nove opisne statistike koncentracije citokinov IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ v kulti PBMC iz venske krvi zdravih odraslih darovalcev	52
Pregl. 15: Aritmetične sredine koncentracije citokinov IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ po posameznih skupinah vzorcev.	52
Pregl. 16: Koeficienti variacije za koncentracijo citokinov IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ po posameznih skupinah vzorcev.	55
Pregl. 17: Kumulativni koeficienti variacije za koncentracijo citokinov IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ	55
Pregl. 18: Opisne statistike logaritmiranih vrednosti koncentracije citokinov IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ	56
Pregl. 19: Stare meritve in nove vrednosti koncentracije IFN- γ (pg/ml) v kulturah PBMC pri posameznih zdravih odraslih darovalcih (n=18), ki so bile določene z novimi reagenti.	57

KAZALO SLIK

str.

Sl. 1: Shematični prikaz ločitve krvi z metodo Ficoll-Pague	30
Sl. 2: Shematični prikaz pretočnega citometra BD FACS Calibur.....	37
Sl. 3: Točkasti diagram stopnje granuliranosti in velikosti celice	38
Sl. 4: Točkasti diagram, ki prikazuje celice, označene z MoAb CD25 FITC in CD4 PerCP	38
Sl. 5: Primerjava koncentracije regulatornih citokinov IL-10 in TGF- β 1 (pg/ml) v supernatantih kultur PBMC po 24-urni in po 40-urni inkubaciji.....	41
Sl. 6: Primerjava odstotkov celic T CD3 ⁺ , ki so sintetizirale znotrajcelične citokine IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ po spodbujanju PBMC z IONO&PMA.....	47
Sl. 7: Citokini po spodbujanju z IONO&PMA in 40-urni inkubaciji. Srednje vrednosti in standardne napake ($\bar{X} \pm SE$) koncentracije za IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ (pg/ml) v supernatantih kultur PBMC zdravih odraslih darovalcev. Prikazane so primerjave štirih aritmetičnih sredin po skupinah vzorcev, ki so bili merjeni v različnem obdobju.....	53
Sl. 8: Citokini po spodbujanju z IONO&PMA in 40-urni inkubaciji. Posamezne točke predstavljajo vrednosti koncentracije za IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ (pg/ml) v supernatantih kultur PBMC zdravih odraslih darovalcev. Prikazane so primerjave po skupinah vzorcev, ki so bili merjeni v različnem obdobju	54

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APC	antigen predstavljaljajoča celica
CD	»Cluster of Differentiation«, antigenske determinante gručnega razločevanja na levkocitih
ConA	»Concanavalin A«, konkanavalin A
CTLA-4	citotoksični-T limfocitni antigen-4
D	darovalec krvi
DAG	diacilglicerol
DC	dendritične celice
EAE	eksperimentalni alergični encefalomielitis
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina
ELISA	»Enzyme Linked Immunosorbent Assay«, encimskoimunski test
FC	»Flow Cytometry«, pretočna citometrija
FCS	»Fetal Calf Serum«, fetalni telečji serum
FITC	fluoresceinov izotiocianat
G	geometrijska sredina
GITR	»Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor family-related gene«, glukokortikoidni receptor za dejavnik tumorske nekroze
GM-CSF	»Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor«, granulocitno makrofagne kolonije spodbujajoči faktor
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interlevkin
IONO	ionomicin
IP3	inozitol trifosfat
KS-test	test Kolmogorov-Smirnov
KV	koeficient variacije
KV _k	kumulativni koeficient variacije
LAG	limfocitni aktivacijski antigen
LPS	lipopolisaharid

MAF	makrofage aktivirajoči faktor
MHC	»Major Histocompatibility Complex«, poglavitni kompleks tkivne skladnosti
MoAb	»Monoclonal Antibodies«, monoklonska protitelesa
mRNA	»Messenger Ribonucleic Acid«, informacijska ribonukleinska kislina
NK	»Natural Killer cells«, naravne celice ubijalke
NKT	»Natural Killer T cells«, naravne celice T ubijalke
nTreg	naravne regulatorne celice T
PBMC	»Peripheral Blood Mononuclear Cells«, periferne mononuklearne celice
PBS	»Phosphat Buffered Saline«, fosfatni pufer
PHA	fitohemaglutinin
PKC	protein-kinaza C
PMA	forbol 12-miristat 13-acetat
SD	standardni odklon
SE	standardna napaka
SLE	sistemski lupus eritematozus
Th	»T helper cell«, celica T pomagalka, limfociti T CD4 ⁺ , pomagalni limfociti T
Th1	pomagalni limfociti T tipa 1
Th2	pomagalni limfociti T tipa 2
Th3	pomagalni limfociti T tipa 3
Tr1	regulatorni limfociti T tipa 1
Treg	regulatorne celice T
Tc	citotoksični limfociti T
TCR	T-celični receptor
TGF-β	»Transforming Growth Factor beta«, transformirajoči rastni faktor-β
TNF	tumor nekrotizirajoči faktor
VCAM-1	»Vascular Cell Adhesion Molecule 1«, adhezijska molekula žilnih celic-1
—	aritmetična sredina

1 UVOD

Imunski sistem je obrambni sistem, ki nas ščiti pred tujimi organizmi ali snovmi. Vdor tujkov v telo sproži različne obrambne mehanizme. Naravna (prirojena) imunost vključuje anatomske, kemične, fiziološke, endocitne in fagocitne ter vnetne pregrade, ki preprečujejo mikrobom, da bi vdrlji v telo in se ustalili v njem. Mehanizmi naravne odpornosti pa sami dostikrat niso zadostni učinkoviti proti nekaterim patogenim mikrobom. Zato so vretenčarji v evoluciji razvili še eno skupino obrambnih mehanizmov. Zanje je značilno spoznanje tuje snovi ali mikroba, nastanek protiteles, efektorskih celic in imunski spomin. Te mehanizme razvije posameznik kot odziv na vdor patogenega agensa (antigena) in predstavlja pridobljeno ali specifično imunost. Na podlagi komponent imunskega sistema, ki posredujejo odziv, razdelimo specifične imunske odzive v dve obliki: humoralno in celično posredovano imunost, ki sta posledici reakcije različnih tipov limfocitov na spoznanje antigena. Poglavitne celice, ki sodelujejo pri razvoju specifičnega imunskega odziva, so antigen predstavlajoče celice, limfociti T in limfociti B. V poznejši efektorski fazi se vključijo še različne nespecifične celice, kot so npr. makrofagi in naravne celice ubijalke (celice NK) (Vozelj, 2000).

Ustrezne imunske celice morajo z medsebojnim signaliziranjem uskladiti svoje aktivnosti v primerno organiziran imunski odziv. Za medsebojno signaliziranje uporabljajo imunske celice neposredne stike. Zelo pomembno je tudi medcelično signaliziranje preko topnih proteinskih signalnih molekul - citokinov. Z izločanjem citokinov posamezna imunska celica vpliva na delovanje vseh preostalih, ki so običajno v njeni neposredni sosedstvini. Citokinov, ki lahko vplivajo na imunske reakcije, je več vrst. Najbolj znani so interferoni, dejavnik tumorske nekroze- α (TNF- α), limfotoksin, transformirajoči rastni faktor- β (TGF- β) in interlevkini (IL). Med slednjimi je najbolj znan IL-2, ki je osrednja molekula, s katero celice T pomagalke vzdržujejo aktivacijo efektorskih imunskeih celic (citotoksičnih limfocitov T, celic NK, limfocitov B) (Ihan in Kotnik, 2002).

Da se razvije humoralni in celično posredovani odziv, se morajo najprej aktivirati celice T pomagalke (Th, celice CD4 $^{+}$). Poglavitna funkcija celic Th je izločanje citokinov, ki delujejo avtokrino (na iste celice T, ki jih izločajo) in na druge celice, vključno celice B,

druge celice T, makrofage, vnetne celice in endotelijalne celice. Čeprav izločajo citokine različne celice, sta najpomembnejša izvora citokinov celice Th in makrofagi. Citokini, ki jih sproščata ta dva celična tipa, aktivirajo celotno mrežje sodelujočih celic (Vozelj 1996, 2000).

Nekateri drugi signali, ki jih prejmejo celice T (in tudi celice B), skrbijo za to, da se odziv ne razvije čezmerno. Ta strogi nadzor aktivacij celic T in B je bistven, kajti brez njega bi se okvaril imunski odziv, ki bi se lahko ohranjal tudi brez spodbujevalnega antigena. Taka neustrezna regulacija je najpomembnejši dejavnik pri patoloških imunskeih odzivih kot so npr. avtoimunske bolezni in preobčutljivostna stanja (Vozelj, 1996).

Torej, efektorski mehanizmi imunskega odziva se aktivirajo pri odstranjevanju antigena iz organizma. Regulatorni mehanizmi pa uravnavajo obseg in nabor efektorskih mehanizmov. Zadnje čase veliko raziskujejo potek tega uravnavanja pri zdravih ljudeh, saj je, in bo, takšno znanje pomembno pri zdravljenju mnogih bolezni. Ni še dokončno jasno, kakšno medsebojno razmerje se vzpostavi med efektorskimi citokini Th1 oz. Th2 odziva in regulatornimi citokini oz. regulatornimi limfociti T, kadar pride do aktivacije imunskega sistema zaradi vdora antigena v organizem.

Mi smo ugotavljali, kako se odzovejo imunske celice na nespecifično (poliklonsko) aktivacijo *in vitro*. S to aktivacijo smo posnemali specifično aktivacijo z antigenom, vendar odziv ni bil vezan na prepoznavanje antigena. Pripravili smo kulture mononuklearnih celic, jih aktivirali in ocenili citokinske odzive: efektorske citokine odziva Th1 in Th2 ter regulatorne citokine odziva Tr1 in Th3. Poleg tega pa smo ugotavljali prisotnost regulatornih limfocitov T CD4⁺CD25⁺ v sveži venski krvi. Poudarek našega dela je bil predvsem na regulatornih celicah in citokinih, ki jih te celice izločajo in tako uravnavajo delovanje imunskeih celic.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CELICE T POMAGALKE IN NJIHOVA AKTIVACIJA

Celice T pomagalke (limfociti T pomagalni CD4, celice T CD4⁺, celice Th) sodelujejo z limfociti B pri izdelovanju protiteles in s celicami T CD8⁺ pri celično posredovani imunosti. Imunski odziv se začne, ko makrofagi zajamejo antigen in ga predelajo. Te antigen predstavlajoče celice (APC), izpostavijo na svoji površini peptidne dele razgrajenega antiga, imenovane imunogene peptide, ki so povezani z molekulami poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) razreda II. Ta kompleks »antigeni peptid-molekula MHC razreda II« spoznajo celice Th s T-celičnim receptorjem (TCR). Ta interakcija sproži signal, ki skupaj s potrebnim kostimulacijskim signalom povzroči aktivacijo celic Th (Vozelj 1996, 2000).

Samo »poklicne« antigen predstavlajoče celice (makrofagi, dendritične celice in celice B) lahko predstavijo antigen skupaj z molekulami MHC razreda II in prispevajo kostimulacijski signal za T-celično aktivacijo, ki privede do razmnoževanja in diferenciacije. Najpomembnejši kostimulacijski molekuli, izraženi na APC, sta B7-1 in B7-2 (Vozelj, 2000).

Odziv celic Th na kompleks peptid-MHC vsebuje vrsto dogodkov, ki jih skupaj imenujemo T-celična aktivacija. Vezanje kompleksov peptid-MHC na TCR sproži znotrajcelične signale, ki prehodno spodbudijo k prepisovanju več genov, ki so bili v nespodbujenih celicah mirujoči. To pa privede do prehodnega izdelovanja proteinov, potrebnih za mitozo in funkcijo celic T. Funkcijski in mitotični odzivi celic T na antigenično stimulacijo trajajo le kratek čas in hitro prenehajo, ko se antigen odstrani (Vozelj, 2000).

Torej, ko celica Th spozna antigen, se začne deliti in diferencirati. Diferencirane celice izločajo različne citokine, ki imajo močan vpliv na funkcije drugih celic: limfociti B se začnejo razmnoževati in se diferencirajo v protitelesa izdelujuče celice (plazmatke), monociti se kopijo na kraju vdora mikroorganizmov, okrepijo se antimikrobne zmožnosti

makrofagov in neaktivne predhodne celice T se razvijejo v citotoksične limfocite T (Tc) (Vozelj, 1996).

Z antigenom aktivirane celice CD4⁺ lahko izločajo tudi citokine, ki preprečujejo aktivacijo in zavirajo razvoj imunskih celic. Limfociti T CD4⁺ izločajo torej regulacijske dejavnike, ki lahko okrepijo ali zavrejo razvoj imunskega odziva (Vozelj, 1996).

2.2 PODVRSTE CELIC T POMAGALK

Pridobljeni imunski odziv je nujno potreben za obrambo pred škodljivimi agensi. Vendar lahko napačno uravnavana pridobljena imunost vodi v kronična vnetja in avtoimunske bolezni. Osnovna komponenta imunskega odziva je celica Th, ki sicer uravnava funkcionalnost tako prirojenega, kot pridobljenega dela imunskega sistema. Da lahko imunski sistem učinkovito obvlada številne in različne antigenske dražljaje, mora v vsakih okoliščinah imeti na voljo primeren efektorski in regulatorni sistem. Tak efektorski in regulatorni sistem si pridobi z nadaljnjo diferenciacijo celic Th (Harrington in sod., 2006; Vozelj, 2000).

2.2.1 Efektorske celice CD4⁺

2.2.1.1 Celice Th1 in Th2

Leta 1986 so ugotovili, da je populacija mišjih limfocitov sestavljena iz več podskupin, opredeljenih z vrsto citokinov, ki jih izločajo aktivirane celice (Mosmann in sod., 1986). Danes vemo, da z ozirom na vrsto izdelanih citokinov tudi pri ljudeh obstajata dva osnovna tipa efektorskega odziva celic Th: Th1 in Th2. Zrele celice T pomagalke tipa 1 (Th1), ki so razvite za zatiranje znotrajceličnih patogenov (npr. znotrajceličnih bakterij, virusov in nekaterih protozojev), izločajo interferon- γ (IFN- γ), limfotoksin in IL-2 in podpirajo tip 1 imunosti: aktivacijo makrofagov, citotoksičnih limfocitov T (Tc) in reakcije pozne preobčutljivosti. IFN- γ je močan aktivator celično posredovane imunosti. Odzivi Th2 pa nastanejo za odstranjevanje okužbe s paraziti (npr. helminti) (Harrington in sod., 2006). Izločajo se citokini IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 in IL-13 in spodbujajo tip 2, humoralni tip imunosti, tako da nudijo pomoč limfocitom B pri izdelavi protiteles in aktivirajo eozinofilce. Pri ljudeh delitev na citokine, specifične za Th1 oziroma Th2 citokinski odziv

ni tako jasna, saj nekatere človeške celice Th1 izločajo IL-10 in IL-13. Th1 citokinski odziv je zato pri človeku definiran pretežno z izločanjem IFN- γ , Th2 citokinski odziv pa z izločanjem IL-4. Celice Th1 namreč izločajo IFN- γ , ne izločajo pa IL-4, obratno pa celice Th2 izločajo IL-4, ne izločajo pa IFN- γ . Citokini Th1 zavirajo razvoj odziva, ki ga posredujejo citokini Th2, citokini Th2 pa recipročno zavirajo odziv Th1 (Spellberg in Edwards, 2001; Kidd, 2003). Če se ravnotežje med podskupinama poruši, lahko pride do pojava različnih imunsko pogojenih bolezni. Napačno uravnavanje delovanja celic Th1 proti lastnim in tujim antigenom lahko povzroči okvaro tkiv in kronična vnetja. Napačno regulirano delovanje celic Th2 pa lahko povzroča alergije in astmo (Harrington in sod., 2006). Najpomembnejši dejavniki, ki uravnavajo polarizacijo v citokinski odziv Th1 in Th2 so: citokini, ki so prisotni v okolini še nediferencirane celice T, hormoni z imunomodulacijskim učinkom, odmerek in način vnosa antiga, vrsta APC, ki predstavlja antigen in spodbuja celice T ter jakost signala (Spellberg in Edwards, 2001).

2.2.1.2 Celice Th17

Najnovejše raziskave pa kažejo na večjo diverzitetno efektorskih celic T CD4 $^{+}$. Nova spoznanja povezujejo citokina IL-23 in IL-17 z boleznimi, ki so jih prej pripisovali odzivom Th1, zato so ločili novo podskupino efektorskih celic T CD4 $^{+}$, imenovano Th17. Jasno je, da ima ta podskupina celic Th vlogo pri odstranjevanju določenih patogenov, tako kot jo imajo celice Th1 in Th2. Z mnogimi modeli so že pokazali, da imata IL-23 in IL-17 odločilno vlogo pri obrambi pred bakterijskimi okužbami. Zato ni nemogoče, da ima Th17 vlogo pri obvladovanju mnogih zunajceličnih bakterijskih patogenov, vendar pa bo potrebno opraviti še kar nekaj raziskav, preden točno določimo vrsto patogenov, na katere delujejo celice Th17 (Harrington in sod., 2006).

2.2.2 Regulatorne celice CD4 $^{+}$

Ena izmed glavnih značilnosti imunskega sistema je njegova sposobnost, da razlikuje med lastnim in tujim in med antigeni v škodljivih in neškodljivih povezavah (Levings in sod., 2002a). Naš imunski sistem se ni razvil le zato, da sproži imunske odzive proti patogenom, ampak tudi, da zavira sprožene imunske reakcije, kar služi vzdrževanju imunske homeostaze in tolerance proti lastnim antigenom (avtotolerance) (Wan in Flavell, 2006). Mehanizmi, ki so se razvili, da zagotovijo imunsko homeostazo in toleranco, so izjemno

kompleksni in kot večina bioloških sistemov tudi ti niso popolni. Tako lahko izguba tolerance na lastne antigene ali neškodljive tuje antigene vodi k avtoimunskim boleznim oziroma alergijam. Po drugi strani pa neprimerna toleranca do antigenov, kot na primer tistih, prisotnih v tumorjih ali v celicah okuženih z virusi, lahko vodi k izgubi imunosti in k neomejeni rasti tumorja ali nezmožnosti obrambe proti infekcijskim boleznim (Levings in sod., 2002a).

Eno ključnih vprašanj v imunologiji in medicini je, kako se vzpostavi in vzdržuje toleranca na lastne snovi v organizmu in kako nastanejo avtoimunske bolezni zaradi motenj te tolerance. Poleg mehanizmov klonske delecije in anergije, ki fizično odstranjujejo ali inaktivirajo nevarne avtoreaktivne limfocite, tudi regulatorne celice T aktivno zavirajo aktivacijo in povečevanje avtoreaktivnih celic T in s tem preprečujejo razvoj avtoimunskih bolezni. Periferni mehanizmi tolerance so se razvili, da nadzorujejo imunske odzive na lastne antigene, ki se ne izražajo v timusu in tudi na tuje antigene. Dobro razviti mehanizmi periferne tolerance celic T vključujejo smrt in razvoj stanja neodzivnosti celic T. Tretji mehanizem, ki nadzoruje periferno toleranco, je supresija, posredovana s celicami T (Levings in sod., 2002a).

Aktivno imunsko supresijo sta predlagala Gershon in Kondo že pred več kot 30-imi leti (Gershon in Kondo 1970, 1971; Gershon, 1975). V osemdesetih letih je bila ta hipoteza diskreditirana, ker je bilo težko potrditi celično identiteto in molekulsko osnovo imunske supresije. Imunska supresija je postala eno izmed najbolj aktivno raziskovanih področij v imunologiji šele v devetdesetih, ko je Sakaguchi s sodelavci odkril supresorske celice T in jih imenoval regulatorne celice T (Treg) (Sakaguchi in sod., 1995). V zadnjih letih je prišlo do ogromnega napredka pri odkrivanju različnih tipov regulatornih celic T in pri razumevanju razvoja in delovanja teh celic. Na osnovi površinskih markerjev ali izločanja citokinov, so celice Treg sestavljene iz mreže raznolikih populacij (Pregl. 1), ki imajo skupne lastnosti, da se slabo odzivajo na antigensko stimulacijo in da imajo imunosupresivne lastnosti (Wan in Flavell, 2006).

Čeprav so nekoč dvomili v pomembnost regulatornih celic pri imunskega sistema, pa je v zadnjih petih letih močno poraslo zanimanje za Treg, tako z vidika bazične kot klinične

imunologije. Treg prispevajo k imunski homeostazi in avtotoleranci ter nadzirajo fiziološke in patološke imunske odzive - avtoimunost, obrambo pred mikrobi, alergije, transplantacije... (Sakaguchi, 2006)

Obstajajo dokazi, da se celice T z regulatorno/supresorno funkcijo nahajajo pri vseh glavnih podskupinah (Shevach in sod., 2006). Tako obstaja kar nekaj različnih tipov celic Treg, mednje štejemo: naravne Treg $CD4^+CD25^+$; celice Tr1, ki izločajo IL-10; celice Th3, ki izločajo TGF- β ; Qa-1-omejevalne celice T $CD8^+$; celice T $CD8^+CD28^-$; celice T $CD8^+CD122^+$; celice T γ/δ in celice NKT (Sakaguchi, 2006). Največ pozornosti regulatornim celicam pa je namenjene tistim, ki so $CD4^+$. Znanje o tem, kako natančno regulatorne celice T $CD4^+$ nastanejo v timusu in/ali v periferiji je še skromno. Tudi natančni mehanizmi, ki nadzorujejo njihove regulatorne funkcije, so še vedno precej slabo opredeljeni. Vendar pa je splošno sprejeto, da celice Treg $CD4^+$ posredujejo svoje zaviralne učinke ali preko izražanja inhibitornih molekul na celični površini ali s proizvajanjem imunoregulatornih citokinov, kot sta IL-10 in TGF- β (Levings in sod. 2002a).

Nekatere populacije Treg so naravni proizvod imunskega sistema in so funkcionalno različne, ostale Treg pa se izoblikujejo iz naivnih celic T kot posledica določenega načina izpostavljanja antigenu v določenem citokinskem okolju. Pri raziskovanju in ločevanju celic Treg je pomembna njihova odvisnost od citokinov, izražanje določenih molekulskeih markerjev, potek razvoja, način supresije in fiziološka vloga v kontroli imunskega odziva (Sakaguchi, 2006).

Med vsemi populacijami Treg so bile najbolj intenzivno proučevane naravne celice T $CD4^+CD25^+$. Nedavno pomembno odkritje je, da je transkripcijski faktor Foxp3 ključna kontrolna molekula za razvoj in delovanje celic Treg, in da genetska anomalija Foxp3 vodi v nezadostno delovanje naravnih celic T $CD4^+CD25^+$, kar pa je vzrok mnogih avtoimunskih bolezni. To je tudi jasen primer, da je pomanjkljivo delovanje regulatornih celic lahko vzrok avtoimunskih bolezni, alergij in imunopatoloških odzivov (Sakaguchi, 2006).

Naravne Treg so zelo odvisne od citokina IL-2, da preživijo na periferiji. IL-2 je pomemben tudi za razvoj Treg *de novo* iz naivnih celic na periferiji. Citokini kot so IL-2, IL-10 in TGF- β močno vplivajo na aktivacijo celic Treg, poleg njih pa so za stopnjo aktivacije, rasti in zaviralne funkcije celic Treg, pomembne tudi številne pomožne molekule na celicah Treg, kot sta CD28 in CTLA-4 (citotoksični-T limfocitni antigen-4) (Sakaguchi, 2006). Za razvoj celic Treg pa je pomembna tudi prisotnost drugih tipov celic, še posebej APC. Citokini lahko služijo kot iniciatorji ali kot posredniki za vzajemno delovanje med APC in Treg (Pregl. 1) (Wan in Flavell, 2006).

Poleg naravnih Treg CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ so zelo proučene regulatorne celice T tipa 1 (Tr1). Tr1 so definirane glede na svojo sposobnost izločanja velikih količin IL-10 in TGF- β in ti citokini posredujejo njihovo sposobnost preprečevanja patoloških imunskih odzivov pri transplantacijah, alergijah in avtoimunskih boleznih. Aktivnost celic Tr1 ni nujno koristna, kajti zavirajo lahko tudi imunske odzive na antogene iz tumorjev in patogenov. *In vivo* je diferenciacija celic Tr1 verjetno nadzorovana z določenimi dendritičnimi celicami (DC), ki pospešujejo sintezo IL-10 in lahko izražajo tolerogenske kostimulacijske molekule. Mnogo vprašanj o biologiji celic Tr1 ostaja neodgovorjenih, vendar pa že lahko opazujemo razvoj terapevtskih strategij, zasnovanih za uporabo imunoregulatornih učinkov (Levings in sod., 2002a).

Z napredkom o poznavanju bazične biologije celic Treg in raziskave Treg pri človeku pojasnjujejo vlogo teh celic pri boleznih kot je multipla skleroza in diabetes tipa I. V naslednjih letih se bo takšno znanje še povečalo in pomembna bo klinična uporaba celic Treg za zdravljenje in preprečevanje imunskih bolezni (Sakaguchi, 2006).

2.2.2.1 Naravne regulatorne celice T CD4⁺CD25⁺

Kot prvi mediatorji zaviranja avtoimunskih bolezni pri miših so bile odkrite celice T CD4⁺ s stalno izraženo verigo α (CD25) receptorja za IL-2 (Sakaguchi in sod., 1995). Do danes je že veliko poročil o identični vlogi celic T CD4⁺CD25⁺ pri ljudeh. Človeške celice T CD4⁺CD25⁺ so našli v timusu (Stephens in sod., 2001), perifernem krvnem obtoku (Stephens in sod., 2001; Ng in sod., 2001), limfatičnih organih (bezgavkah in vranici) (Taams in sod., 2001) in umbilikalmem venskem obtoku (Ng in sod., 2001).

Te celice predstavljajo 5 do 10 % vseh perifernih celic T CD4⁺. Pri človeških mononuklearnih celicah (PBMC) lahko celice T CD4⁺CD25⁺ razdelimo na celice CD4⁺CD25^{high} in CD4⁺CD25^{low}. Pri tem dejansko zaviralne celice (CD25^{high}) predstavljajo le 1-2 % vseh celic T CD4⁺. Celice T CD4⁺CD25⁺ so razdeljene tudi glede na to ali izražajo CD45RO (Jonuleit in sod., 2001). Le CD4⁺CD25⁺ CD45RO⁺ imajo namreč dokazano zaviralno funkcijo. Navkljub tem podatkom pa večina raziskav, vključno z našo, ki se ukvarjajo z regulatornimi celicami T CD4⁺, upoštevajo le prisotnost CD25 na celicah CD4⁺.

Celice T CD4⁺CD25⁺ imajo zaviralno funkcijo *in vitro* in *in vivo*. Funkcionalnost teh celic zahteva aktivacijo, ki je nespecifična *in vitro* in za antigen specifična *in vivo*. Te celice so gotovo udeležene pri obrambi proti avtoreaktivnim celicam T, ampak to ni njihova edina naloga. Celice T CD4⁺CD25⁺ ne preprečujejo le avtoimunskih odzivov, ampak zavirajo tudi številne fiziološke in patološke imunske odzive na tuje antigene. Te celice imajo velik pomen v medicini, saj pri gojenju *in vitro* ne izgubijo svoje regulatorne funkcije (Holm in sod., 2004).

Celice T CD4⁺CD25⁺ nastajajo v timusu. Ko se aktivirajo, so te celice preko celičnega kontakta sposobne inhibirati proliferacijo celic T CD4⁺ in CD8⁺ ter njihovo produkциjo citokinov (Stassen in sod., 2004a). Zaviralna aktivnost celic T CD4⁺CD25⁺ je povezana z njihovo zmožnostjo, da inhibirajo proizvajanje IL-2 in podaljšujejo obdobje mirovanja celičnega cikla pri obeh vrstah celic T, CD4⁺ in CD8⁺. To dosežejo preko mehanizma, ki ostaja nedefiniran, vendar zahteva neposreden kontakt celica-celica in lahko da zahteva

signale preko CTLA-4 in/ali glukokortikoidnega receptorja za dejavnik tumorske nekroze (GITR) (Levings in sod., 2002a). Z dodatkom IL-2 je mogoče preseči to regulacijo (Thornton in Shevach, 1998).

Naravne regulatorne celice CD4⁺CD25⁺ imajo številne imunske značilnosti, ki so pomembne za njihovo glavno vlogo pri vzdrževanju avtotolerance. Glavna značilnost je, da večina teh celic, če ne vse, nastaja v normalnem timusu kot funkcionalno zrele in predstavlajo posebno subpopulacijo celic T (Itoh in sod., 1999; Seddon in Mason, 2000). Tako so torej celice CD4⁺CD25⁺ že specializirane za supresivno funkcijo pred srečanjem z antigenom. To jih razlikuje od ostalih »prilagodljivih« celic Treg, ki nastanejo iz naivnih celic T po izpostavitvi antigenu na periferiji. Repertoar TCR naravnih celic Treg je tako širok in raznolik kot pri naivnih celicah T. Učinkovito zavirajo aktivacijo, proliferacijo in/ali efektorsko funkcijo ostalih celic T CD4⁺ in CD8⁺ in verjetno celic NK, celic NKT, celic B in DC. Čeprav doslej molekulska podlaga njihove zaviralne aktivnosti še ni bila popolnoma pojasnjena (von Boehmer, 2005). Zaradi teh edinstvenih imunoloških značilnosti so naravne celice Treg CD4⁺CD25⁺ primerne za učinkovito in hitro nadzorovanje patogenih avtoreaktivnih celic T v času, ko so lastni antigeni zmotno ali prekomerno prisotni v imunskejem sistemu (Sakaguchi in sod., 2006).

Pogosto je *in vivo* težko pripisati zaviralno aktivnost ali celicam Tr1 ali celicam Treg CD4⁺CD25⁺. Še posebej zanimivo je vprašanje ali imajo celice Treg CD4⁺CD25⁺ sposobnost proizvajanja IL-10 in/ali TGF-β in posredujejo supresijo preko citokinov. Znanstveniki so ugotovili, da pri funkciji človeških celic CD4⁺CD25⁺ *in vitro* IL-10 ne igra nobene vloge (Levings in sod., 2001a; Dieckmann in sod., 2002; Jonuleit in sod., 2001). Nasprotno pa pri nekaterih mišjih modelih IL-10 igra določeno vlogo (Belkaid, 2003). Čeprav so nekateri dokazali majhno, a opazno vlogo citokina TGF-β v supresiji, ki jo izvajajo kloni človeških celic T CD4⁺CD25⁺, nevtralizacijska protitelesa nikoli ne morejo popolnoma zaustaviti supresije *in vitro* (Levings in sod., 2001b, 2002a, 2002b; Dieckmann in sod., 2002; Jonuleit in sod., 2001). Nasprotno pa nekateri modeli glodavcev kažejo na to, da ima TGF-β na celični površini ali izločan TGF-β vlogo v supresiji, posredovani s celicami Treg CD4⁺CD25⁺ (Wahl in sod., 2004; Belghith in sod., 2003). Vendar pa so ostale študije jasno izločile funkcionalno vlogo tega citokina pri z naravnimi Treg

posredovani supresiji *in vitro* in *in vivo* (Piccirillo in sod., 2002; Mamura in sod., 2004; Kullberg in sod., 2005). Ta protislovja pa bo morda uredilo nedavno poročilo, ki predлага, da je TGF- β pomemben za vzdrževanje ekspresije Foxp3 in s tem za zaviralno funkcijo regulatornih celic CD4 $^+$ CD25 $^+$, vendar pa ni neposredno vključen v njihov mehanizem aktivnosti (Marie in sod., 2005). Te nasprotujejoče si ugotovitve glede vloge citokinov pri zaviralni funkciji regulatornih celic CD4 $^+$ CD25 $^+$ so lahko tudi posledica dejstva, da te celice v določenih okoliščinah lahko proizvajajo imunoregulatorne citokine. V teh posebnih primerih pa sta IL-10 in/ali TGF- β potrebna za supresijo (Roncarolo in sod., 2006). Še ena možnost je, da imajo podskupine celic Treg CD4 $^+$ CD25 $^+$ vlogo pri nastanku celic Tr1, ki izločajo IL-10 in/ali TGF- β (Dieckmann in sod., 2002; Stassen in sod., 2004b).

Pokazali so, da celice CD4 $^+$ CD25 $^+$ preko celičnega kontakta ne le inhibirajo odziv navadnih celic T CD4 $^+$, ampak hkrati prenesejo regulatorne lastnosti na takšne celice T. Ta proces so poimenovali kot »nalezljivo toleranco« (Jonuleit in sod., 2002; Dieckmann in sod., 2002). V popolnem nasprotju z regulatornimi celicami CD4 $^+$ CD25 $^+$, je uravnavanje z induciranimi zaviralnimi celicami Th neodvisno od kontakta celic in posredovano z inhibitornimi citokini (Holm in sod., 2004; Stassen in sod., 2004a).

Nedavno je bilo s strani mnogih znanstvenikov odkrito, da celice CD4 $^+$ CD25 $^+$ lahko nastanejo tudi na periferiji iz naivnih prekurzorjev (Walker in sod., 2003; Chen in sod., 2003; Apostolou in von Boehmer, 2004). Trenutno niso poznane nobene fenotipične ali funkcionalne razlike med naravnimi Treg in temi, z antigenom induciranimi Treg CD4 $^+$ CD25 $^+$ (Roncarolo in sod., 2006).

2.2.2.2 Celice Tr1

Prvi tip celic Treg, ki izločajo IL-10, je bil poimenovan kot celice Tr1 (Groux in sod., 1997). Na splošno se izraz za celice Tr1 uporablja za vse populacije celic T z regulatorno aktivnostjo, ki izločajo IL-10 in katerih indukcija je odvisna od IL-10 (Pregl. 1). V nasprotju z naravnimi regulatornimi celicami T CD4 $^+$ CD25 $^+$, ki se oblikujejo neposredno v timusu in imajo tako prednastavljeno antigensko specifičnost, se celice Tr1 *in vitro* in *in vivo* inducirajo iz naivnih celic z antigensko stimulacijo preko procesa, odvisnega od IL-10

in jih tako lahko opredeljujemo kot del prilagodljivega imunskega odziva (Sakaguchi, 2004; Shevach, 2004). Definirane so glede svoje sposobnosti izločanja velikih količin IL-10 in TGF- β . Ta citokina igrata glavno vlogo pri supresiji za antigen specifičnih efektorskih odzivov celic T. Celice Tr1 se jasno ločijo od celic Th1 in Th2, ker izločajo majhne količine IL-2 in nič IL-4 (Pregl. 2). Odvisno od eksperimentalnih pogojev, uporabljenih za indukcijo celic Tr1, profil citokinov variira glede na sintezo TGF- β , IFN- γ in/ali IL-5, vendar je raven sinteze IL-10, ki je dejanski znak celic Tr1, nespremenljivo visoka. Proizvajanje IL-4 je dosledno nezaznavno (Pregl. 2). IFN- γ pa se sintetizira v veliko manjših količinah kot pri celicah Th1 (Pregl. 2) (Bacchetta in sod., 1990; Roncarolo in sod., 2006).

Celice Tr1 uravnavajo imunske odzive in preprečujejo odzive tako naivnih kot tudi spominskih celic T *in vivo* in *in vitro* (Groux in sod., 1997; Levings in sod., 2001a). Za antigen specifične celice Tr1 morajo biti aktivirane preko TCR, da lahko uporabijo svojo supresivno funkcijo. Vendar, ko so enkrat že aktivirane, lahko vplivajo na zaviralno aktivnost proti ostalim antigenom. Takšna zaviralna aktivnost je verjetno posredovana z lokalnim povečanjem izločanjem IL-10 in TGF- β , ki deluje na APC in celice T. IL-10 zmanjša izražanje kostimulacijskih molekul in izdelovanje provnetnih citokinov s strani celic APC in neposredno zniža sintezo IL-2 in TNF- α s strani celic T CD4 $^{+}$ (Pestka in sod., 2004). Podobno TGF- β zmanjša funkcije APC (Strobl in Knapp, 1999) in ovira proliferacijo in sintezo citokinov s strani celic T (Pestka in sod., 2004).

Čeprav raven IL-10 in TGF- β *in vitro* ni pomemljivo višja od tiste, ki jo proizvedejo klasične celice Th2 (Levings in sod., 2001a), je pomembno dejstvo, da celice Tr1 naredijo te citokine brez prisotnosti IL-2 ali IL-4 (Pregl. 2) (Groux in sod., 1997). Zmožnost celic Tr1, da izdelujejo IFN- γ je malo kontroverzna, verjetno zaradi razlik, ki se kažejo med biologijo celic T pri normalnih miših in/ali TCR-transgenih miših ter ljudeh. Medtem ko celice Tr1 pri ljudeh običajno proizvajajo IFN- γ , a v občutno manjših količinah kot celice Th1 (Levings in sod., 2001a), ga celice Tr1 glodavcev ponavadi ne proizvajajo (Barrat in sod., 2002). Ali ima IFN- γ , ki ga proizvedejo človeške celice, funkcionalno vlogo, pa ostaja odprt vprašanje. Celice Tr1 se slabo razmnožujejo po poliklonski TCR-posredovani

ali antigen-specifični aktivaciji, vendar pa se njihovo razmnoževanje znatno poveča z eksogenimi IL-2 in IL-15 (Bacchetta in sod., 2002).

Celice Tr1 imajo, preko izločanja IL-10 in TGF- β , zaviralne učinke na raznolike tipe celic. Supernatanti iz aktiviranih celic Tr1 močno zmanjšajo zmožnost *in vitro* razmnoženih DC, da sprožijo aloantigen-specifično proliferacijo (Lécart in sod., 2001; Cavani in sod., 2000). Kloni celic Tr1 tudi zavirajo nastajanje imunoglobulina, ki ga izdelujejo celice B (Kitani in sod., 2000). Nadalje je verjetno, da lahko celice Tr1 pospešijo tudi diferenciacijo naivnih celic T CD4 $^+$ v celice Tr1. *In vivo* je pomembno, da so njihovi zaviralni učinki omejeni na lokalno mikrookolje, kot opisujejo Graca in sod. (2002), da se izognemo nevarnosti globalne imunske supresije. Vendar je to lahko odvisno od lokacije antiga, kajti celice Tr1, ki nastanejo med kroničnimi virusnimi infekcijami, dejansko lahko povzročijo neželeno supresijo antitumorske imunosti (Iwashiro in sod., 2001).

Celice CD4 $^+$ CD25 $^+$ lažje identificiramo na podlagi površinskih markerjev in ekspresije Foxp3. Sklepamo lahko, da, čeprav imata ti dve podskupini regulatornih celic pomembno vlogo pri periferni toleranci, verjetno dosežeta svoje učinke v medsebojno odvisnih mrežah regulacije, ki je lahko odvisna (celice Tr1) in neodvisna (celice CD4 $^+$ CD25 $^+$) od citokinov. Sorazmerna pomembnost Tr1 v primerjavi s CD4 $^+$ CD25 $^+$ v vsakem danem primeru pa je verjetno narekovana od narave antiga, predstavitve antiga in biologije specifičnih tkiv. Različen je lahko tudi čas, ko te dve različni podskupini regulatornih celic igrata vlogo v uravnavanju imunskega odziva. Jasno je, da se naravne celice Treg CD4 $^+$ CD25 $^+$ lahko rekrutirajo in aktivirajo zgodaj v času imunskega odziva, da nadzorujejo obseg odziva, medtem ko prilagodljive celice Tr1, ki se aktivirajo ob ponavljanju se antigenski stimulaciji, delujejo kasneje, da blažijo imunski odziv ter da obnovijo in vzdržujejo toleranco (Roncarolo in sod., 2006).

2.2.2.3 Celice Th3

Poleg regulatornih celic CD4 $^+$ CD25 $^+$ in regulatornih celic Tr1 se v periferiji nahaja še ena populacija celic T z regulatorno funkcijo. V raziskavi oralne tolerance so identificirali celice T pomagalke tipa 3 (Th3). Regulatorne celice Th3 tvorijo edinstveno podskupino celic T, ki primarno izločajo TGF- β (Pregl. 1), nudijo pomoč za IgA in imajo zaviralne

zmožnosti za obe efektorski podskupini celic T, celice Th1 in Th2 (Pregl. 2). Celice Th3 so drugačne od celic Th2, saj so bile celice CD4⁺, ki izločajo TGF-β in imajo zaviralne zmožnosti, raziskane pri živalih, ki jim primanjkuje IL-4 (Weiner, 2001). Po opisu regulatornih celic Th3 pri glodavcih so takšne celice, ki izločajo TGF-β, opisali tudi pri ljudeh. Izkazalo se je, da je za antigen specifična reakcija pri kronični infekciji s človeškimi helminti posredovana s celicami tipa Th3 ali Tr1, ki izločajo TGF-β ter IL-10 in ne s premikom Th1 v Th2 (Doetze in sod., 2000).

Pomembnost TGF-β pri imunoregulaciji in toleranci je postala jasna in pomembna (Letterio in Roberts, 1998; Prud'homme in Piccirillo, 2000). Prekinitev nastajanja TGF-β vodi do nastanka avtoimunskih bolezni (Gorelik in Flavell, 2000), TGF-β pa ima tudi pomembno vlogo pri odpornosti za razvoj EAE pri podganah (Cautain in sod., 2001). TGF-β ima mnoge supresivne učinke na celice T, celice B, makrofage ter ostale celice in zmanjša adhezijo limfocitov na endotelijalne stene. Zgleda tudi, da obstaja tesna povezava med TGF-β in CTLA-4. Na ta način je TGF-β ena odločilnih regulatornih molekul, ki ohranja homeostazo v imunskega sistema, regulatorne celice Th3 pa so eden izmed glavnih akterjev, s katerim se to uravnavanje ohranja (Weiner, 2001). V nasprotju z regulatornimi celicami CD4⁺CD25⁺ je uravnavanje s celicami Th3 in Tr1 neodvisno od celičnega kontakta in je posredovano s citokini (Stassen in sod., 2004a).

Preglednica 1: Različne podskupine regulatornih celic T (Treg) (Wan in Flavell, 2006: 115)

	površinski markerji	izražanje Foxp3	izločanje citokinov	citokini za njihovo delovanje	citokini za njihov razvoj	celice vključene v njihov razvoj
nTreg	CD25, CTLA-4, GITR, LAG	da	TGF-β	TGF-β	IL-2, TGF-β	epitelijalne celice, DC
Tr1	nepoznani	ne	IL-10	IL-10	IL-10	DC, NKT, nTreg
Th3	nepoznani	da	TGF-β	TGF-β	TGF-β	nTreg

Legenda: CTLA-4 (citotoksični-T limfocitni antigen-4); DC (dendritične celice); GITR (glukokortikoidni receptor za dejavnik tumorske nekroze); IL-2 (interlevkin-2); LAG (limfocitni aktivacijski antigen); TGF-β (transformirajoči rastni faktor-β); nTreg (naravne regulatorne celice T); NKT (naravne celice T ubijalke)

Preglednica 2: Značilnosti različnih podskupin celic T (Weiner, 2001: 211)

citokinski profil	Th1	Th2	Th3	Tr1
IFN- γ	++++	-	+/-	+
IL-4	-	++++	+/-	-
TGF- β	+/-	+/-	+++	++
IL-10	-	++	+/-	+++
rastni/diferenciacijski faktorji	IL-2	IL-2/IL-4	IL-4/TGF- β	IL-10
zaviranje	Th2	Th1	Th1/Th2	Th1

Legenda: IFN- γ (interferon- γ); IL (interlevkin); TGF- β (transformirajoči rastni faktor- β); Th (celice T pomagalke); Tr1 (regulatorne celice T tipa 1)

2.3 CITOKINI

Aktivnost citokinov so odkrili v sredini 1960, ko so ugotovili, da so v supernatantnih tekočinah nad kulturami limfocitov *in vitro* dejavniki, ki spodbujajo razmnoževanje in zorenje celic imunskega sistema. Kmalu nato so odkrili, da se izdelovanje teh dejavnikov v kulturah limfocitov sproži z aktivacijo z antigenom ali z nespecifičnimi mitogeni (Vozelj, 2000).

Citokini so skupina vodotopnih regulatornih polipeptidov, ki uravnavajo razmnoževanje, diferenciacijo, efektorske funkcije, regulatorne funkcije ter preživetje celic in večinoma delujejo lokalno. Izdelujejo jih številni tipi celic, predvsem pa limfociti in makrofagi. Citokini se vežejo s specifičnimi receptorji na membrani celice tarče in sprožijo signal, ki se prenese v notranjost celice in spremeni izražanje genov v njej. Na splošno se citokini vežejo na receptorje z močno afiniteto. Zaradi te velike afinitete lahko citokini posredujejo biološke učinke v pikomolarnih vrednostih koncentracije (Vozelj, 2000; Wraber, 1998).

Nekateri citokini delujejo avtokrino, večinoma parakrino, v redkih primerih pa se vežejo na celico v oddaljenem kraju telesa in delujejo endokrino. Najpomembnejša lastnost citokinov je pleiotropnost, kar pomeni, da ima isti citokin lahko različne učinke v različnih celicah tarčah in da so podobni učinki posledica delovanja različnih citokinov. Delujejo lahko

sinergistično, tj. če je skupen učinek dveh citokinov večji od aditivnega učinka posameznih citokinov, ali pa delujejo antagonistično. Delujejo v zapletenih medsebojnih povezavah, ki jih imenujemo citokinski splet (Vozelj, 2000; Wraber, 1998).

2.3.1 Citokini v naših poskusih

V poskusih smo določali citokine IFN- γ , IL-4, IL-10 in TGF- β 1. IFN- γ in IL-4 sta pomembna pri posredovanju efektorskih funkcij, nastopata kot tipična citokina citokinskega odziva Th1 oz. Th2. IL-10 in TGF- β 1 pa imata izrazito regulatorno vlogo.

2.3.1.1 Interferon- γ (IFN- γ)

Pogosto ga imenujemo tudi interferon tipa II. IFN- γ je homodimerni glikoprotein iz dveh podenot. Molekulska masa posamezne podenote znaša od 21 do 24 kDa, odvisno od glikozilacije. Izdelujejo ga aktivirani limfociti T CD4 $^{+}$, predvsem celice Th1, limfociti T CD8 $^{+}$ ter celice NK. Prepisovanje gena za IFN- γ je neposredno posledica aktivacije z antigenom in se pospeši z IL-2 in IL-12. IFN- γ je močan aktivator mononuklearnih fagocitov. Neposredno sproži sintezo encimov za nastanek oksidativnih mediatorjev, ki ubijejo fagocitirane mikrobe. Skupaj z drugimi signali kot so LPS (lipopolisaharid) in TNF omogoča makrofagom, da ubijejo tumorske celice. Citokine, ki povzročajo take funkcijeske spremembe, imenujemo makrofage aktivirajoči faktorji (MAF). IFN- γ je poleg GM-CSF (granulocitno makrofagne kolonije spodbujajoči faktor) in TNF najpomembnejši MAF. IFN- γ zveča izražanje molekul MHC razreda I in v nasprotju z IFN tipa I spodbuja številne celice, da izrazijo molekule MHC razreda II. Tako IFN- γ okrepi začetno fazo imunskega odziva s pospeševanjem aktivacije celic T pomagalk CD4 $^{+}$, ki so v reagiranju omejene z molekulami MHC razreda II. *In vivo* okrepi celično in humoralno imunost. IFN- γ deluje neposredno na celice T in B in pospeši njihovo diferenciacijo. Pospeši diferenciacijo limfocitov Th1 in zavre razmnoževanje limfocitov Th2. IFN- γ je eden od citokinov, ki je potreben za zorenje citotoksičnih limfocitov T CD8 $^{+}$. Poleg tega pa aktivira tudi nevtrofilce, stimulira citolitično aktivnost celic NK in pospešuje prilepljanje limfocitov T na žilni endotelij, kar olajša njihovo izstopanje (Vozelj 1996, 2000; Abbas in sod., 1997).

2.3.1.2 Interlevkin-4 (IL-4)

IL-4 je protein z molekulsko maso 20 kDa. Poglavitna fiziološka funkcija interlevkina-4 je uravnavanje alergijskih reakcij. Najpomembnejši vir IL-4 so celice T CD4⁺, podvrste Th2. IL-4 deluje tudi kot avtokrini rastni faktor za diferenciacijo celic Th2. Izdelovanje IL-4 je merilo za uvrstitev celice T CD4⁺ v podvrsto celic Th2. IL-4 izdelujejo tudi aktivirani mastociti in bazofilci ter nekatere celice T CD8⁺. Pospešuje razmnoževanje različnih celic, npr. celic T, celic B, mastocitov, prednikov mieloidnih in eritroidnih celic. IL-4 je potreben za izdelovanje IgE in je najpomembnejši citokin, ki v celicah B spodbuja preklop v izdelovanje tega izotipa težke verige. IgE je najpomembnejši mediator takojšnje preobčutljivosti in povečano izdelovanje IL-4 je videti odločilno za nastanek alergij. Protitelesa IgE so pomembna tudi pri obrambi pred infekcijo s helminti in to je pomembna fiziološka funkcija podvrste celic Th2. IL-4 preprečuje aktivacijo makrofagov in blokira večino učinkov IFN-γ na makrofage. Spodbuja izražanje nekaterih adhezijskih molekul, npr. adhezijsko molekulo vaskularnih celic-1 (VCAM-1) na endotelijskih celicah, monocitih in posebno na eozinofilcih. Velike lokalne vrednosti koncentracije IL-4 povzročijo z monociti in eozinofilci bogate vnetne reakcije. IL-4 je rastni faktor za mastocite in deluje pri spodbujevanju razmnoževanja mastocitov sinergistično z IL-3. Antagoniste IL-4 danes preskušajo pri bolnikih za omejitev hudih alergijskih reakcij (Vozelj 1996, 2000; Abbas in sod., 1997).

2.3.1.3 Interlevkin-10 (IL-10)

Ta citokin je bistvena molekula v zaviralnih mehanizmih, ki jih posredujejo celice Treg (Roncarolo in sod., 2006). IL-10 je homodimer z molekulsko maso 18 kD (Vozelj, 1996). Prvotno je bil kloniran kot molekula, ki so jo izločale celice Th2 in so lahko ovirale celice Th1 pri sintezi citokinov (Moore in sod., 2001). Osnovna funkcija IL-10 je zadrževanje imunskih odzivov in preprečevanje silnih in nevarnih vnetij, ki jih povzročajo patogeni mikroorganizmi (Levings in sod., 2002a). Izdelujejo ga podvrste celic T pomagalk CD4⁺ (celice Th0, Th2, Th3 in predvsem Tr1 celice), aktivirani makrofagi in nekateri nelimfocitni celični tipi (npr. keratinociti) (Vozelj, 1996; Abbas in sod., 1997; Roncarolo in sod., 2006). IL-10 ima protivnetne in supresivne učinke na večino hematopoetskih celic in posredno zadrži proizvajanje citokinov in proliferacijo za antigen specifičnih efektorskih

celic T CD4⁺, tako da ovira antigen predstavljaljajočo sposobnost različnih tipov profesionalnih APC, vključno z DC, Langerhansonovimi celicami in makrofagi (Moore in sod., 2001; Groux in sod., 1998). Poglavitni funkciji IL-10 sta tako preprečevanje izdelovanja citokinov (TNF, IL-1, kemokinov in IL-12) v makrofagih in preprečevanje dopolnilne funkcije makrofagov pri aktivaciji celic T. Ta, druga funkcija, je posledica zmanjšanega izražanja molekul MHC razreda II, ki vplivajo na zmožnost APC, da aktivirajo celice T, in zmanjšanega izražanja številnih kostimulacijskih molekul (npr. B7-1, B7-2, CD80 in CD86). Tako je oslabljena vloga makrofagov pri aktivaciji limfocitov T CD4⁺. IL-10 imenujemo tudi zaviralni faktor sinteze citokinov, ker preprečuje sintezo citokinov ne le v makrofagih, ampak tudi v celicah Th in celicah NK. Končni učinek teh akcij je preprečevanje imunskega vnetja, ki ga posredujejo celice T. (Vozelj, 1996; Abbas in sod., 1997; Levings in sod., 2002a). Nasprotno pa ima IL-10 stimulacijske učinke na efektorske celice T CD8⁺, tako da poveča njihovo citotoksično sposobnost in proliferacijo (Moore in sod., 2001; Groux in sod., 1998). IL-10 ima tudi antiapoptotični učinek na celice B, je vključen v menjavanje izotipa celic B in igra vlogo pri avtoimunskih boleznih, ki jim je osnova spremenjena regulacija celic B, kot je na primer sistemski lupus eritematozus (SLE) (Llorente in sod. 1995, 1997) ali avtoimunska hipertiroza (Kocjan in sod. 2000, 2004).

2.3.1.4 Transformirajoči rastni faktor-β (TGF-β)

TGF-β obstaja v treh izomerah, TGF-β1, TGF-β2 in TGF-β3. Celice imunskega odziva izdelujejo predvsem TGF-β1 (Vozelj, 2000). TGF-β1 se v latentni obliki sintetizira kot homodimerni protein molekulske mase 28 kDa (Vozelj, 1996). TGF-β je multifunkcionalen citokin in ima veliko različnih vlog v imunskem sistemu. Težko je pokazati celostno sliko o delovanju tega citokina na limfocite T, kajti TGF-β ne deluje le neposredno na limfocite T, ampak tudi posredno z uravnavanjem funkcije APC. V zgodnjih raziskavah je bila poudarjena predvsem inhibitorna vloga TGF-β. TGF-β je namreč močan imunosupresor. Preprečuje razmnoževanje celic T, celic B in celic NK ter omejuje aktivnost makrofagov in DC (Vozelj 1996, 2000; Strobl in sod., 1996). TGF-β deluje tudi na druge celice, na granulocite in endotelijske celice in zavira učinke drugih citokinov (Vozelj 1996, 2000). Inhibira proliferacijo limfocitov T, zavira produkcijo IL-2 in produkcijo citokinov Th1 in

Th2 odziva, vendar pa so še drugi faktorji, poleg TGF- β , ki k temu pripomorejo. Danes pa je TGF- β poznan tudi kot antiapoptotični preživetveni faktor za limfocite T. Vpliv TGF- β na limfocite T je močno odvisen od njihove stopnje diferenciacije in okoliških citokinov. Celice Th3, ki izločajo TGF- β , igrajo pomembno regulatorno funkcijo pri imunskega odziva. Pri večini raziskovanj so ugotovili, da limfociti T proizvajajo TGF- β v latentni obliki (Kehrl in sod., 1986; Seder in sod., 1998), ki se ne more povezati s TGF- β receptorji. Lokalna aktivacija celic pa omogoči izločanje aktivnega TGF- β iz latentnega kompleksa. TGF- β deluje parakrino in avtokrino na limfocite T. Sinteza tega citokina poteka večinoma v spominskih in ne v naivnih celicah T CD4 $^{+}$, čeprav nekatere raziskave nakazujejo, da je lahko sinteza TGF- β genetsko regulirana. Mnogi menijo, da je TGF- β eden glavnih citokinov pri uravnavanju imunskega odziva. Deluje kot nekakšen diferenciacijski preklop, ki nasprotuje obstoječemu programu diferenciacije celic in ima različne učinke na enake celice v različnih diferenciacijskih stadijih (Cerwenka in Swain, 1999).

2.3.2 Merjenje citokinov

Citokini v kliniki se razmeroma redko uporabljajo kot rutinski označevalci, ker je njihovo delovanje preveč zapleteno, odzivi pa preveč različni. Zelo pogosto pa jih merimo v kliničnih študijah, da bi osvetlili mehanizme, ki sodelujejo pri nastanku, razvoju in zdravljenju imunsko pogojenih bolezni (Wraber, 2007).

Najpogosteje merimo citokine z imunskeimi testi v tekočini, kamor so se izločili. To so bodisi telesne tekočine, ko gre za citokine, ki so nastali v organizmu (kri, urin, likvor, razni drugi puntati, aspirati, izpirki ipd.) ali pa supernatanti nad celicami, če merimo citokine, ki so se izločili *ex vivo* oz. *in vitro*. To so citokini v zunajceličnem okolju, kjer je tudi prostor njihovega učinkovanja. Vendar pa je citokine zaradi narave njihovega delovanja, ki je v večini primerov lokalno, v vnetišču in okolnih bezgavkah, težko izmeriti v tekočini. Zato sta se uveljavila dva komplementarna pristopa, zaznavanje citokinskih mRNA in merjenje znotrajceličnega citokina s pretočno citometrijo. Vsak od teh treh pristopov k merjenju citokinov zazna drugačno stopnjo na poti do aktivne molekule v zunajceličnem prostoru, in primerjave rezultatov pogosto niso smiselne (Wraber, 2007).

Danes citokine v telesnih tekočinah in v celičnih kulturah *in vitro* določamo z imunskimi testi, kot je na primer ELISA (Wraber 1998,2007). Uporabljamo predvsem nekompetitivno tehniko metode ELISA. Preizkus poteka na trdnem nosilcu, kjer so pritrjena primarna protitelesa proti iskanemu antigenu oz. citokinu. Dodamo vzorec s preiskovanim citokinom, ki se veže s protitelesi. Po spiranju sledi inkubacija s sekundarnimi, z encimom določenimi protitelesi. Označena protitelesa se proporcionalno vežejo s citokinom, povezanim s primarnimi protitelesi. Količino označenih protiteles določimo po spiranju z dodatkom encimskega substrata, ki se pretvori vobarvan produkt. Absorbanco le-tega izmerimo s spektrofotometrom. S standardi znanih vrednosti koncentracije izdelamo umeritveno krivuljo in določimo koncentracijo iskanega citokina (Vozelj, 2000). Na ta način dobljeni rezultati so primerljivi in se dopolnjujejo s tistimi, ki jih ugotovimo z znotrajceličnim barvanjem citokinov, drugo najbolj uporabljen metodo. Za merjenje citokinov jo uporabljamo samostojno ali v kombinaciji z ELISO (Pala in sod., 2000). Metoda pretočne citometrije je relativno enostavna in pred analizo ni potrebe po izolaciji celic. Omogoči hkratno označevanje in merjenje heterogenih celičnih populacij, nudi sposobnost analize izražanja citokinov v posameznih celicah in fenotipsko določitev celic, ki izražajo citokine (Pala in sod., 2000; Collins in sod., 1998).

Pri vsaki metodi moramo določiti normalno območje z merjenjem citokinov v serumu in plazmi zdravih darovalcev krvi. Če zamenjamo testni komplet oz. če se postopek spremeni, moramo meritve ponoviti. Ustanove, ki se ukvarjajo z medlaboratorijsko kontrolo (npr. NEQAS ali INSTAND) citokinov nimajo v ponudbi, zato je nujna uporaba kvalitetnih notranjih kontrolnih vzorcev. Merjenje citokinov je zaradi vseh naštetih zahtev zapleteno in drago (Wraber, 2007).

Če želimo opredeliti motnje v imunskej uravnavanju, proučujemo, kakšna je zmožnost celic, ki smo jih osamili iz organizma, za izdelovanje citokinov *in vitro* (McHugh in sod., 1996). Ta lastnost imunskih celic je namreč pri nekaterih bolezenskih stanjih spremenjena ali je celo vzrok za razvoj bolezni (Wraber, 1998). Uporabimo lahko celice iz različnih limfatičnih organov, pri človeku pa iz praktičnih razlogov najpogosteje PBMC iz venske krvi. PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) je skupna oznaka za limfocite (Th, Tc, B), celice NK in monocite oz. makrofage, ki nastanejo iz njih (Klein, 1990). Od

polimorfonuklearnih celic se morfološko razlikujejo v tem, da imajo veliko, nezažeto jedro in so brez citoplazemskih granul z gosto vsebino, ki se dobro obarvajo (Vozelj, 1996). Glavna funkcija limfocitov Th je izločanje citokinov, kot so IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β 1, ki spodbujajo in uravnavajo celično posredovan ali protitelesno imunost ali pa vnetne procese. Tudi podskupina limfocitov Tc izdelujejo citokine, kot so IL-2, IFN- γ , IL-10 in celo IL-4. Aktivirani limfociti B izdelujejo IL-10 in v manjši meri IL-2 ter IL-4. IL-12 celice NK spodbudi k izdelovanju IFN- γ . Aktivirani makrofagi izdelujejo citokine IL-12, TNF- α , IFN- α in mediatorje vnetja (Mosmann in Sad, 1996; Abbas in sod., 1997). V venski krvi je približno 70 % limfocitov T (38-46 % limfocitov T CD4 $^{+}$ in 31-40 % limfocitov T CD8 $^{+}$), 12-17 % limfocitov B in 12-17 % celic NK (Ilhan, 1999). V krvi pa je približno sedemkrat manj monocitov kot limfocitov (Vozelj, 1996).

Večina raziskovalcev za proučevanje izdelovanja citokinov *in vitro* uporablja izolirane PBMC ali celo izolirane podskupine limfocitov T. Nekateri raziskovalci pa se odločajo za delo s polno krvjo. To odločitev pojasnjujejo s slabostmi dela z izoliranimi PBMC in s prednostmi dela s polno krvjo. Kot slabosti dela z izoliranimi PBMC navajajo, da se del limfocitov izgubi, da se spremeni razmerje med monociti in limfociti v korist limfocitov, da je manjša aktivacija monocitov, da ni prisotno fiziološko okolje citokinov in drugih mediatorjev. Med prednostmi dela s polno krvjo izpostavljam, da so razmere med gojenjem *in vitro* zelo podobne razmeram *in vivo*, in da je potrebno manj časa in manj krvi, zato je delo s polno krvjo primerno tudi pri dojenčkih in otrocih (Ferry in sod., 1997; Kallmann in sod., 1997). Mi smo se odločili za delo z izoliranimi PBMC, saj menimo, da je prednost aktivacije izoliranih PBMC, v primerjavi z aktivacijo celic v polni krvi, relativno dober pregled nad fiziološkimi razmerami v celični kulturi. Razlike v citokinskem odzivu zato lahko z večjo verjetnostjo pripisemo nepravilnostim v celicah, ki citokine izdelujejo. Pri delu s polno krvjo fizioloških razmer ne moremo povsem opredeliti in pri iskanju vzrokov za ugotovljene razlike ne moremo izključiti vpliva npr. topnih mediatorjev v krvi. Metoda dela s polno krvjo je manj standardizirana, tako glede koncentracije celic, kot tudi glede fizioloških razmer v kulturi.

Ugotovili so, da v sveže izoliranih PBMC iz venske krvi ni mogoče določiti citokinov ali mRNA za citokine (Krug in sod., 1996). PBMC zato spodbujamo k izdelavi citokinov s

poliklonskimi aktivatorji, kot so mitogeni lektini (fitohemaglutinin (PHA), konkanavalin A (ConA)), kalcijevi ionofori (ionomicin, A23187) in protitelesa proti sestavnim delom TCR (monoklonska protitelesa CD3) v kombinaciji s snovmi, ki nadomeščajo kostimulacijske signale (forbolni estri - npr. forbolni miristatni acetat (PMA), protitelesa CD28) (Wraber, 1998). Na ta način posnemamo imunski odziv, saj sta tudi za akivacijo limfocitov T *in vivo* potrebna dva signala. Prvi je vezava kompleksa MHC-antagenski peptid na TCR in koreceptorsko molekulo CD4 oziroma CD8, drugi pa povezava med kostimulacijsko molekulo na APC in kostimulacijskim receptorjem na limfocitu. Po antigenski aktivaciji limfocita T se aktivirajo znotrajcelične protein tirozin kinaze, ki posredno sprožijo nastanek sekundarnih prenašalcev diacilglicerola (DAG) in inozitol trifosfata (IP3). Sledita močno povišanje koncentracije znotrajceličnega kalcija in aktivacija protein kinaze C (PKC), spremeni se aktivnost transkripcijskih faktorjev in začne prepisovanje genov za citokine (Spellberg in Edwards, 2001).

Med aktivatorji obstajajo razlike v načinu delovanja in učinkovitosti, saj se na različnih mestih vključujejo v aktivacijske poti celic (Yoshino in sod., 1993) in posnemajo eno ali več signalnih poti po aktivaciji preko kompleksa TCR. Kalcijevi ionofori, kot npr. ionomicin (IONO), z odpiranjem kalcijevih kanalčkov povečajo koncentracijo kalcija v celici in tako posnemajo delovanje IP3. Poleg tega pa različno učinkovitost poliklonskih aktivatorjev pri spodbujanju izdelovanja posameznih citokinov povezujejo z razlikami v signalnih poteh, ki so potrebne za začetek sinteze posameznih citokinov (Gajewski in sod., 1990).

Makrofage aktiviramo predvsem z bakterijskimi proizvodi, kot so lipopolisaharid (LPS), peptidoglikani in njihovi sintetski analogi. Aktivirata jih tudi PMA in IONO (Nathan, 1987; Wraber, 1994). V kulti PBMC lahko aktivacijo makrofagov posredujejo aktivirani limfociti T z molekulo CD40L in IFN- γ .

V raziskavah primerjave citokinskega odziva zdravih in bolnikov se pogosto odločajo za aktivacijo na en sam način. Več različnih načinov aktivacije uporabijo, kadar želijo preveriti ali je citokinski odziv odvisen od načina aktivacije. Izmed vseh načinov aktivacije

kombinacija IONO&PMA najbolj učinkovito spodbuja izdelovanje IL-2, IFN- γ , IL-4 in IL-10.

Za proučevanje citokinskega odziva v izbrani skupini zdravih odraslih prostovoljcev, smo se odločili za *in vitro* merjenje najpomembnejših citokinov Th1, Th2, Th3 in Tr1 citokinskega odziva: IFN- γ je efektorski citokin, značilen za citokinski odziv Th1. IL-4 je efektorski citokin, značilen za citokinski odziv Th2. TGF- β 1 je regulatorni citokin, značilen za citokinski odziv Th3, celice Tr1 pa proizvajajo predvsem regulatorni citokin IL-10. Metodo ELISA smo pri manjšem vzorcu zdravih ljudi primerjali z znotrajceličnim merjenjem omenjenih citokinov s pretočno citometrijo.

2.3.3 Citokinski odziv pri zdravih odraslih

Deleži celic, ki izdelujejo citokine, vplivajo na količino izločenih citokinov. Zato je določevanje le-teh z znotrajceličnim barvanjem v osnovi primerljivo s tehniko ELISA. Inogés in sod. (1999) so po štirih urah gojenja z IONO&PMA v limfocitih CD4 $^{+}$ in CD8 $^{+}$ določili deleže celic, ki izdelujejo citokine IFN- γ (14,57 %), IL-4 (2,78 %) in IL-10 (2,51 %). Končni rezultati različnih raziskav nakazujejo na dejstvo, da je razmerje med različnimi citokini bolj pomembno, kot njihove absolutne vrednosti (Inogés in sod., 1999). Tudi sicer so izmerjene vrednosti težko primerljive, saj se postopki priprave celic, spodbujanja celic in merjenja citokinov nekoliko razlikujejo od raziskave do raziskave.

V preglednici 3 so predstavljena razmerja med citokini pri zdravih odraslih ljudeh, ki so jih ugotovili nekateri raziskovalci *in vitro*.

Preglednica 3: Razmerja citokinov pri zdravih odraslih ljudeh v supernatantih celic PBMC po spodbujanju *in vitro*. Različni raziskovalci so za določanje koncentracije citokinov uporabili za ELISO reagente različnih proizvajalcev.

avtorji, leto objave	način spodbujanja	trajanje inkubacije celic	razmerje med citokini v supernatantih
Barcellini in sod., 1995	PHA	48 ur	IFN- γ >> IL-10 >> IL-4
Meroni in sod., 1996	PHA	48 ur	IFN- γ > IL-10 > IL-4
Esnault in sod., 1996	PHA&PMA	24 ur	IL-10 > IFN- γ > IL-4
Repnik, 2000	IONO&PMA	40 ur	IFN- γ > TGF- β 1* > IL-10 > IL-4
Min in sod., 2001	PHA	48 ur	IL-10 > IL-4 > IFN- γ
Rausch-Fan in sod., 2002	IONO&PMA	48 ur	IFN- γ > IL-4 > IL-10
Scala in sod., 2004	PHA	48 ur	TGF- β 1 > IL-10 >> IFN- γ > IL-4

Legenda: PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); PHA (fitohemaglutinin); PMA (forbol 12-miristat 13-acetat); IONO (ionomicin); IL-10 (interlevkin-10); TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor- β 1); IL-4 (interlevkin-4); IFN- γ (interferon- γ)

Opomba: * neobjavljen podatek

2.4 NAMEN NALOGE

Imunske celice izdelujejo citokine, ki posredujejo in uravnavajo naravno imunost ter specifični imunski odziv. Efektorski mehanizmi imunskega odziva se aktivirajo pri odstranjevanju antigena iz organizma. Regulatorni mehanizmi pa uravnavajo obseg in nabor efektorskih mehanizmov.

Citokini Th1 (IFN- γ in drugi) spodbujajo celično posredovani imunski odziv, citokini Th2 (IL-4 in drugi) pa močan protitelesni imunski odziv. Obstajajo vsaj tri podvrste celic T CD4 $^{+}$, ki imajo regulatorno funkcijo: celice T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$, regulatorne celice T tipa 1 (Tr1) in celice Th3. Ti različni tipi znižujejo imunski odziv z neposrednim sodelovanjem celic (CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$) ali pa z izločanjem regulatornih citokinov (Tr1 izločajo IL-10, Th3 in CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ izločajo TGF- β 1) (Levings, 2002b; Sakaguchi, 2006). Odločili smo se za proučevanje izdelovanja IFN- γ , IL-4, IL-10 in TGF- β 1 pri zdravih ljudeh. S tem izborom smo upoštevali efektorske in regulatorne citokine specifičnega imunskega odziva.

Osamili smo mononuklearne celice iz venske krvi (PBMC) zdravih odraslih darovalcev, jih aktivirali z ionomicinom in PMA ter gojili 24 in 40 ur v inkubatorju CO₂. To je najustreznejši način aktivacije in najustreznejše trajanje gojenja celic glede na prejšnje raziskave v tem laboratoriju. Odločili smo se, da bomo koncentracijo citokinov merili z dvema najbolj standardnima metodama. Koncentracijo citokinov v supernatantu celičnih kultur po 24 in 40-urni inkubaciji smo izmerili z metodo ELISA. V celični frakciji pa smo z metodo pretočne citometrije določili delež znotrajceličnih (citoplazemskih) IFN- γ , IL-4, IL-10 in TGF- β 1 po 5 in 24-urni inkubaciji. Poleg tega pa smo predhodno ugotovljali prisotnost regulatornih limfocitov T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ v sveži venski krvi. Naš glavni cilj je bila primerjava citokinskega profila Th1, Th2 in Tr1, Th3 ter njunega razmerja v *in vitro* pogojih. Zato smo v nalogi določili območja normalnih vrednosti koncentracije za IFN- γ , IL-4, IL-10 in TGF- β 1 po poliklonski (nespecifični) aktivaciji PBMC *in vitro* iz venske krvi zdravih odraslih ljudi. Poudarek naloge je sicer na regulatornih citokinih. Naš namen pa je bil tudi primerjati rezultate ELISE z metodo pretočne citometrije.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vzorci krvi

Za določitev normalnih območij izdelovanja citokinov smo aktivirali PBMC iz venske krvi zdravih odraslih darovalcev. Vseh darovalcev je bilo 20, od tega 9 žensk in 11 moških. Njihova starost je bila od 20 do 72 let, v povprečju 40 let. Vsi so dobili vprašalnik, s katerim smo izključili alergijske in avtoimunske bolezni, pomembno pa je bilo tudi, da tri tedne pred odvzemom krvi niso imeli akutne infekcije.

V epruvete za vakuumski odvzem z antikoagulantom EDTA (Becton Dickinson, ZDA) smo odvzeli 9 ml krvi in iz nje osamili PBMC. Pri desetih darovalcih smo odvzeli še dodatno epruveto (3 ml), saj smo porabili nekaj krvi za določanje znotrajceličnih citokinov po standardnem postopku za merjenje s pretočnim citometrom. Kri smo odvzeli med osmo in deseto uro zjutraj, darovalci pa so bili pred odvzemom krvi tešči. Z osamitvijo PBMC smo začeli takoj po odvzemu.

3.1.2 Mediji in ostale raztopine

Kot osnovni medij smo uporabljali RPMI 1640 brez L-glutamina (RPMI 1640 Lg-)(Sigma, ZDA). Z njim smo redčili vzorce krvi in spirali celice v postopku osamitve.

Za gojenje celic v kulti za produkcijo citokinov in za pripravo ustreznih razredčin aktivatorjev smo uporabljali hranilni medij. Pripravili smo ga iz RPMI 1640 Lg-, ki smo mu dodali 1 % L-glutamina, antibiotike (koncentracija 100 enot penicilina in 100 µg streptomicina na liter hranilnega medija) in 5 % inaktiviranega fetalnega telečjega seruma (FCS) (vsi Sigma, ZDA). Vsi reagenti so bili testirani na celičnih kulturah in so imeli nizke vrednosti endotoksina.

S fosfatnim pufrom (PBS) (Izocel, Lek, Slovenija) smo redčili in spirali PBMC, ki smo jih merili s pretočnim citometrom.

Lizacijsko raztopino (FACSTM, Lysing Solution, Becton Dickinson, ZDA), razredčeno v razmerju 1:10 z destilirano vodo, smo uporabljali pri označevanju PBMC z monoklonskimi protitelesi. Z njo smo lizirali eritrocite in fiksirali celične suspenzije. Za preluknjanje membran PBMC pri merjenju znotrajceličnih citokinov smo uporabljali permeabilizacijsko raztopino (FACSTM, Permeabilizing Solution, Becton Dickinson, ZDA), razredčeno v razmerju 1:10 z destilirano vodo; za njeno izpiranje pa inaktivacijsko raztopino (0,5 % govejega serumskega albumina in 0,1 % NaN₃ v PBS).

3.1.3 Aktivatorja PBMC v naših poskusih

3.1.3.1 Forbol 12-miristat 13-acetat (PMA) (Sigma, ZDA)

PMA je forbolni ester z molekulsko maso 616,8 Da. Deluje tako, da se veže na mesto, kamor se sicer veže diacilglicerol. S to vezavo se aktivira encim protein kinaza C (PKC). Poleg tega poveča izražanje genov za PKC (Altman in sod., 1992). V odvisnosti od PKC povzroči fosforilacijo serinskih in treoninskih ostankov v citoplazemskem delu molekule CD28 in s tem posnema koaktivacijski signal, ki ga *in vivo* posredujejo kostimulacijske molekule na APC (Hutchcroft in sod., 1996). PMA limfocitov ne aktivira do efektorskih funkcij, lahko pa aktivira makrofage (Nathan, 1987; Wraber, 1994).

Koncentracija PMA v kulturi PBMC je bila 3,33 ng/ml.

3.1.3.2 Ionomicin (IONO) (Sigma, ZDA)

Ionomicin je ionofor, ki deluje kot gibljivi prenašalec kationov preko lipidne membrane. Njegova afinitetna lestvica za katione je naslednja: Ca²⁺>Mg²⁺>>Sr²⁺ ≈ Ba²⁺. Samostojen je prosta kislina z molekulsko maso 709 Da in empirično formulo C₄₁H₇₂O₉. Kot kalcijeva sol pa ima molekulsko maso 746 Da in empirično formulo C₄₁H₇₀O₉Ca. Za prenos 1 mola kalcija preko membrane je tako potreben 1 mol ionomicina (Liu in Hermann, 1978). Ionomicin deluje celično nespecifično in poveča koncentracijo kalcija v celici zaradi prenosa kalcija iz zunajceličnega prostora in iz znotrajceličnih predelov, ki vsebujejo zalogo kalcija (Clementi in sod., 1994).

Koncentracija ionomicina v kulturi PBMC je bila 500 nM.

Za spodbujanje PBMC k izdelovanju citokinov smo uporabili kombinacijo teh dveh aktivatorjev: PMA in IONO. To kombinacijo aktivatorjev in njuni vrednosti koncentracije smo izbrali na osnovi poskusov, narejenih v tem laboratoriju, ko so primerjali učinkovitost različnih načinov aktivacije pri spodbujanju izdelovanja citokinov (Wraber, 1994; Bilač, 1996; Kocjan, 1999; Repnik, 2000).

3.1.4 Opis uporabljenih monoklonskih protiteles

Reagenti, ki jih uporabljamo pri pretočni citometriji, so s fluorokromi označena monoklonska protitelesa (MoAb), ki se specifično vežejo na antigenske molekule imunskih celic (Ihan, 1999). V preglednici 4 so predstavljene označevalske molekule, ki smo jih uporabili za opredeljevanje želenih limfocitnih populacij.

3.1.4.1 MoAb proti CD3

Monoklonska protitelesa proti CD3 se specifično vežejo na gama, delta ali eta proteine T-celičnih receptorjev. T-celični receptorji so proteinski kompleksi, sestavljeni iz petih različnih proteinov. Alfa in beta proteini T-celičnih receptorjev so močno variabilni, podobni imunoglobulinskim molekulam in omogočajo specifično prepoznavo antigenov. Gama, delta in eta proteini T-celičnih receptorjev nimajo variabilne zgradbe, omogočajo pa prenos specifičnega signala ob aktivaciji alfa in beta proteinov v celico (aktivacija tirozin kinaze in fosfolipaze C). Ker protitelesa proti CD3 prepoznavajo konstantne dele T-celičnih receptorjev, so uporabna za prikaz zrelih celic T v krvi (Ihan, 1999).

Za analizo citokinskega profila celic T, smo dodali MoAb CD3 v kombinaciji z MoAb proti IFN- γ , IL-4, IL-10 ali TGF- β 1.

3.1.4.2 MoAb proti CD4

Monoklonska protitelesa CD4 specifično vežejo proteine, ki jih na svojih površinah izraža del limfocitov T. Omenjeni proteini skupaj s T-celičnimi receptorji omogočajo prepoznavanje tujih antigenov, ki jih v proteinskih kompleksih MHC II predstavljajo APC. Celice T, ki izražajo antigene CD4 (celice Th) ob aktivaciji izločajo različne citokine, s tem pa odločilno usmerjajo in uravnavačjo imunske reakcije. Antigene CD4 poleg celic Th

izražajo tudi monociti. Protitelesa CD4 (v kombinaciji s protitelesi CD3) omogočajo prikaz celic Th (Ihan, 1999).

3.1.4.3 MoAb proti CD25

Ta protitelesa omogočajo prikaz verig alfa receptorjev za IL-2. Antigene CD25 izražajo različne celice v aktiviranem stanju, med njimi limfociti T, limfociti B, naravne celice ubijalke, monociti. Zato nam MoAb CD25 (v kombinaciji s protitelesi, specifičnimi za posamezne vrste celic) omogočajo prikaz aktiviranih in neaktiviranih celic določene vrste (Ihan, 1999).

S kombinacijo protiteles CD4 in CD25 smo prikazali aktivirane celice T pomagalke.

Preglednica 4: Označevalske molekule, ki smo jih uporabili za opredeljevanje želenih limfocitnih populacij

oznaka	dejavnost molekule	navzočnost na celicah
CD3	receptorji za antigen	limfociti T
CD4	receptorji za molekule MHC II	celice T pomagalke
CD25	veriga alfa (p55) receptorja za IL-2	aktivirani limfociti T, B, celice NK, monociti

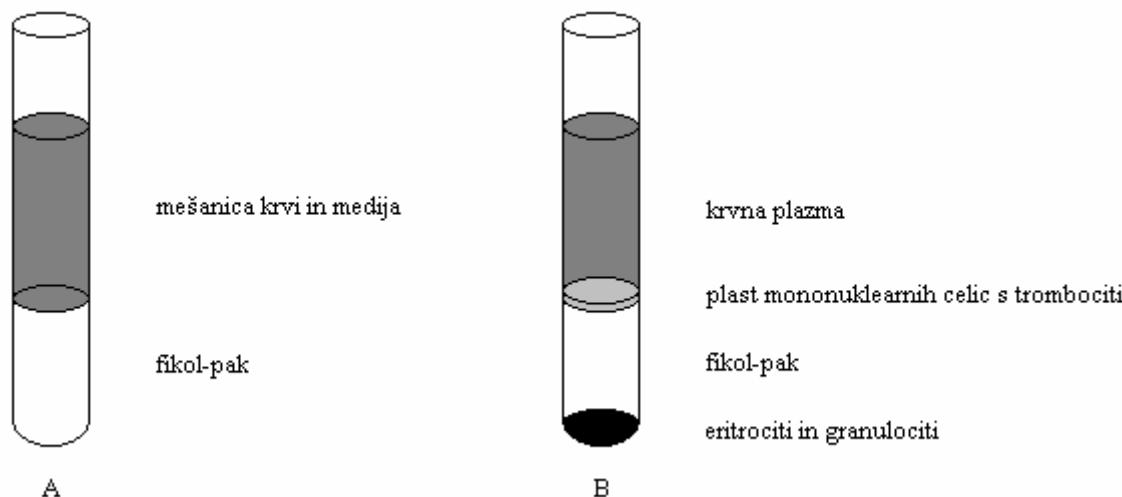
3.2 METODE

3.2.1 Osamitev PBMC iz venske krvi

3.2.1.1 Princip osamitve

Mononuklearne celice smo izolirali iz krvi z metodo Ficoll-Paque, ki temelji na razlikah v gostoti mononuklearnih celic v primerjavi z drugimi krvnimi celicami. Za izolacijo PBMC na gostotnem gradientu smo kot ločevalni medij uporabili fikol-pak (Ficoll-Paque, Pharmacia, Švedska). Fikol-pak povzroči nastajanje skupkov eritrocitov, ki po centrifugiraju sedimentirajo na dno epruvete. Granulociti zaradi svoje gostote med centrifugiranjem prepotujejo plast fikol-paka v celoti in jih po centrifugiraju najdemo nad eritrociti in pod plastjo fikol-paka. Limfociti, monociti in trombociti so prisotni na meji med fikol-pakom in krvno plazmo (bel obroček). Na vrhu ostane krvna plazma (Sl. 1, B). Za osamitev PBMC odpipetiramo bel obroček in del fikol-paka. Z nadaljnjam spiranjem

odstranimo še trombocite. Tako dobimo suspenzijo celic, ki vsebuje $95\pm5\%$ mononuklearnih celic. Delež viabilnih celic je $95\pm5\%$. S to metodo lahko iz vzorca krvi osamimo $50\pm15\%$ vseh limfocitov. (Bφyum, 1964; Navodila za uporabo Ficoll-Paque, 1989).



Slika 1: Shematični prikaz ločitve krvi z metodo Ficoll-Pague. A-pred centrifugiranjem, B-po centrifugiranju

3.2.1.2 Opis postopka

Vsakemu prostovoljcu smo odvzeli tri ali štiri epruvete krvi. Nato smo kri od posameznega darovalca v epruvetah za vakuumski odvzem najprej premešali in iz ene epruvete sterilno odpipetirali $100\text{ }\mu\text{l}$ krvi (ali $800\text{ }\mu\text{l}$ pri desetih vzorcih, kjer smo merili tudi znotrajcelične citokine), ki smo jo potrebovali za meritve s pretočnim citometrom.

Tudi vse nadaljnje delo je bilo sterilno. Kri iz epruvet smo nato združili v večjo, 50 ml epruveto in dodali enak volumen RPMI 1640 Lg-. V štiri epruvete smo odpipetirali po $2,5\text{ ml}$ fikol-paka, nato pa nanj pazljivo naplastili mešanico krvi in medija (štirikrat po približno 4 ml) (Sl. 1, A). Centrifugirali smo 30 minut pri $520 \times g$, 18°C in z izklopljeno zavoro (Megafuge 1.0R, rotor 2705, Heraeus Instruments). Po centrifugirjanju smo obročke PBMC nad fikol-pakom odpipetirali v dve epruveti in dodali v vsako 7 ml medija RPMI 1640 Lg- ter premešali. Centrifugirali smo 7 minut pri $719 \times g$ in 20°C . Supernatant smo odlili in celice na dnu nekajkrat premešali z mešalom vorteks. Dodali smo medij RPMI 1640 Lg-, premešali in ponovno centrifugirali 7 minut pri $719 \times g$ in 20°C . Odlili smo supernatant, celice na dnu epruvet premešali, nato v vsako epruveto odpipetirali točno 2 ml .

hranilnega medija. Vsebino obeh epruvet smo zopet premešali in ju združili v eno epruveto. Tako so bile PBMC pripravljene za štetje. V tem postopku smo uporabljali sterilizirane plastične epruvete z volumnom 10 ml (Repnik, 2000).

3.2.2 Določevanje števila PBMC v suspenziji in uravnavanje do želene koncentracije

Krvne celice štejemo pod mikroskopom v komorah za štetje krvnih celic. To so steklene ploščice, ki imajo v osrednjem delu vrisano mrežo. Različne vrste komor imajo različne mreže. Mi smo uporabljali Neubauerjevo komoro. Celice smo prestevali v štirih velikih kvadratih s ploščino 1 mm^2 , ki jih sestavlja 16 manjših kvadratov. Prostornina pod velikim kvadratom med objektnim in krovnim stekelcem je $0,1 \text{ mm}^3$ (Žemva, 1968).

Za ugotavljanje števila živih, nepoškodovanih celic smo uporabljali tripansko modrilo. To je vitalno kislo barvilo, ki ga celice z normalno prepustnostjo membrane ne vsrkavajo. Če pa je membrana poškodovana, vdre barvilo v celico. Mrtve in okvarjene celice se zato obarvajo modro (Vozelj, 1996). Pripravili smo mešanico iz $450 \mu\text{l}$ tripanskega modrila (delovna koncentracija je 0,1 % modrila v NaCl) in $50 \mu\text{l}$ prej pripravljene suspenzije PBMC. Tako smo celice desetkrat razredčili in si s tem olajšali štetje v Neubauerjevi komori. Šteli smo le PBMC, ki smo jih prepoznali kot večje okrogle strukture z debelejšo membrano, ki rahlo zelenkasto sveti. Formula za izračunavanje koncentracije PBMC v enem mililitru suspenzije je: $N/10 \times 10^6$. N je povprečno število celic v velikem kvadratu ploščine 1 mm^2 .

Po štetju smo PBMC s hranilnim medijem uravnali do koncentracije 1×10^6 celic/ml. Tako pripravljena suspenzija celic je bila osnova za nadaljnje delo.

3.2.3 Aktivacija PBMC

Celice smo gojili na ploščah za celične kulture s 24 vdolbinicami (Costar, Cambridge). V vdolbinico smo odmerili 1 ml suspenzije celic s koncentracijo 1×10^6 celic/ml. V kulture PBMC zdravih odraslih darovalcev smo dodali $250 \mu\text{l}$ IONO (koncentracija 500 nM) in $250 \mu\text{l}$ PMA (koncentracija 3,33 ng/ml) [IONO&PMA]. Za kontrolo smo gojili celične kulture iz 1 ml suspenzije celic in $500 \mu\text{l}$ hranilnega medija. Koncentracija celic v kulti

je torej znašala $6,66 \times 10^5$ /ml. Tako pripravljene kulture PBMC smo inkubirali 40 ur v inkubatorju, v atmosferi s 5 % CO₂, 95-odstotno vlažnostjo in temperaturo 37 °C. Deset vzorcev od dvajsetih smo inkubirali tudi 24 ur. Po koncu inkubacije smo suspenzijo celic odpipetirali iz vdolbinic v 5 ml epruvete in centrifugirali 3 minute pri 1619 x g in temperaturi 20 °C. Do določevanja citokinov z ELISO smo vzorce supernatanta shranili v fiolah pri -20 °C (Repnik, 2000). Celice 40-urne inkubacije smo zavrgli, celice 24-urne inkubacije [IONO&PMA] pa smo uporabili za določevanje znotrajceličnih citokinov z metodo pretočne citometrije.

3.2.4 Določevanje citokinov z encimskoimunskim testom (ELISA)

Koncentracijo citokinov IFN-γ, IL-4, IL-10 in TGF-β1 v supernatantu kultur PBMC smo določevali z nekompetitivno tehniko metode ELISA. Uporabljali smo reagente podjetja Pierce Endogen (ZDA), ki so namenjeni raziskovalnemu delu, ne pa uporabi v diagnostične ali terapevtske namene. Le za določanje TGF-β1 smo uporabili reagente podjetja DRG Diagnostics (Nemčija), ki so sicer namenjeni le za *in vitro* diagnostične namene.

Določevanje je potekalo na plastični mikrotitrni ploščici s 96 vdolbinicami. Na dno vdolbinic so bila vezana specifična primarna protitelesa I. V vdolbinice smo nanesli sekundarna protitelesa z vezanim biotinom, ki so bila specifična za drugačen epitop kot primarna protitelesa, in takoj zatem vzorce supernatanta. Delali smo v dveh paralelnih vzorcih. Reakcija je potekala dve uri pri sobni temperaturi (od 20 do 25 °C). Po inkubaciji smo ploščico trikrat temeljito sprali. Potem smo v vdolbinice nanesli streptavidin, označen z encimom hrenova peroksidaza, in vzorce inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo ploščico sprali in v vdolbinice nanesli encimski substrat. Med 30 minutno inkubacijo v temi pri sobni temperaturi se je substrat po encimski reakciji pretvoril v modroobarvan produkt. Z raztopino za ustavljanje reakcije smo zaustavili reakcijo, pri tem je modra barva prešla v rumeno. S spektrofotometrom smo izmerili absorbancijo vzorcev pri valovnih dolžinah 450 nm in 550 nm. Od vrednosti absorbance pri 450 nm smo odšteli vrednost absorbance pri 550 nm in s tem zmanjšali vrednost absorbance za tisti del, ki ga je prispevala mikrotitrna ploščica.

Postopek pri določevanju TGF- β 1 se je razlikoval od postopka določevanja ostalih citokinov. Na dno vdolbinic so bila vezana specifična primarna protitelesa I. Najprej smo v vdolbinice nanesli vzorce supernatanta. Reakcija je potekala tri ure pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo ploščico trikrat temeljito sprali. Potem smo v vdolbinice nanesli specifična primarna protitelesa II in vzorce inkubirali dve uri pri sobni temperaturi. Nato smo ploščico sprali in v vdolbinice nanesli sekundarna protitelesa z vezanim biotinom. Sledila je 45 minutna inkubacija pri sobni temperaturi. Ploščico smo sprali in v vdolbinice nanesli streptavidin, označen z encimom peroksidaza. Ponovno je sledila 45 minutna inkubacija in spiranje. Nato smo v vdolbinice nanesli encimski substrat in inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Z raztopino za ustavljanje reakcije smo zaustavili reakcijo. S spektrofotometrom smo izmerili absorbanco vzorcev pri valovni dolžini 450±10 nm.

Koncentracijo citokinov smo določili na osnovi umeritvene krivulje. To smo naredili s petimi vrednostmi koncentracije citokina (ozioroma šestimi pri določanju TGF- β 1), ki smo jih pripravili s serijskim redčenjem standarda (rekombinantni citokini) v hranilnem mediju. Ko smo pričakovali, da bodo vrednosti v vzorcu supernatanta večje od največje koncentracije v umeritveni krivulji, smo vzorec pred testom razredčili s hranilnim medijem (Pegl. 5).

Preglednica 5: Razponi koncentracije standardov v umeritveni krivulji in meje občutljivosti testa ELISA za citokine IFN- γ , IL-4, IL-10 (Pierce Endogen, ZDA) in TGF- β 1 (DRG Diagnostics, Nemčija)

citokin	razpon koncentracije standardov v umeritveni krivulji (pg/ml)	meja občutljivosti (pg/ml)
IFN- γ	od 0 do 1000	1
IL-4	od 0 do 400	1
IL-10	od 0 do 600	3
TGF- β 1	od 0 do 600	1,9

V navodilih, priloženih reagentom podjetja Pierce Endogen (ZDA) za test ELISA, je navedeno, da je koeficient variacije (KV) v rezultatih med posameznimi testi kot tudi znotraj testa manjši od 10 % (Instructions Endogen® Human IFN γ ELISA Kit, 2006; Instructions Human IL-4 ELISA Kit, 2002; Instructions Endogen® Human IL-10 ELISA Kit, 2005). Za reagente podjetja DRG Diagnostics (Nemčija) pa znaša KV med posameznimi testi 7,5 %, znotraj testa pa 1,0 % (DRG Diagnostics User's Manual TGF- β 1 ELISA, 2004).

3.2.5 Priprava celičnih suspenzij za analizo s pretočnim citometrom

Delo ni bilo sterilno. Pri delu smo uporabljali plastične 5 ml epruvete. Po vsakem dodajanju česarkoli, smo vsebino epruvete na hitro premešali z mešalom vorteks. Centrifugirali smo vedno 5 minut pri 452 x g in temperaturi 19 °C (Sigma 4K10). Različna monoklonska protitelesa so bila označena z različnimi fluorokromi, da jih je bilo pri merjenju moč ločiti med sabo.

3.2.5.1 Določanje membranskih antigenov CD25 in CD4

V epruveto smo odpipetirali 100 µl krvi in dodali monoklonska protitelesa Anti-Hu-CD25, označenih s fluorokromom fluorescein izotiocianatom (FITC) (Becton Dickinson, ZDA) in Anti-Hu-CD4, označenih s PerCP (Becton Dickinson, ZDA), vsakih po 10 µl. Vsebino smo na hitro premešali in inkubirali 15 do 30 minut pri sobni temperaturi v temnem prostoru. Nato smo dodali 2 ml lizacijske raztopine in lizirali celice 10 minut pri sobni temperaturi v temnem prostoru, takoj zatem pa centrifugirali. Po centrifugiranju smo supernatant odlili in celice sprali z 2 ml fosfatnega pufra in ponovno centrifugirali. Po odlitju supernatanta smo celice resuspendirali v 300 µl fosfatnega pufra. Celice so bile pripravljene za analizo s pretočnim citometrom. V primeru, ko analize nismo izvedli takoj, smo jih shranili v temnem prostoru pri temperaturi od 2 do 8 °C. Pred analizo smo vzorec še enkrat premešali, da smo zmanjšali aggregate.

Celice je potrebno analizirati najkasneje 24 ur po označitvi s protitelesi (Ihan, 1999).

3.2.5.2 Določevanje znotrajceličnega IFN- γ , IL-4, IL-10 in TGF- β 1 skupaj z membranskim antigenom CD3

V epruveto smo odpipetirali 700 μ l krvi in dodali 300 μ l RPMI. Nato smo dodali reagente A, B in C (CytodetectTM, Immuno Quality Products, Nizozemska), vsakega po 10 μ l. Reagent A je PMA, reagent B ionomicin, reagent C pa inhibitor eksocitoze, ki preprečuje izločanje citoplazemskih citokinov. Inkubirali smo 5 ur v inkubatorju, v atmosferi s 5 % CO₂, 95-odstotno vlažnostjo in temperaturo 37 °C.

Po petih urah smo suspenzijo vzeli iz inkubatorja in dodali 2 ml lizacijske raztopine ter inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi v temnem prostoru, nato pa centrifugirali. Supernatant smo odlili stran in dodali 2 ml PBS. Po inkubaciji celične suspenzije pri temperaturi 4 °C preko noči smo suspenzijo centrifugirali, odlili supernatant, usedlino resuspendirali v 350 μ l PBS in celice dobro premešali. Pripravili smo štiri nove epruvete in v vsako odpipetirali po 100 μ l suspenzije celic in dodali po 10 μ l monoklonskih protiteles Anti-Hu-CD3, označenih s PerCP (Becton Dickinson, ZDA). Sledila je 20 minutna inkubacija pri sobni temperaturi v temi. Po inkubaciji smo v vse štiri epruvete nalili po 2 ml lizacijske raztopine, inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi v temi, nato pa centrifugirali. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in celicam dodali 0,5 ml permeabilizacijske raztopine in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi v temi. Potem smo dodali 2 ml inaktivacijske raztopine in centrifugirali. Odlili smo supernatant in v prvo epruveto dodali 10 μ l monoklonskih protiteles Anti-IL-10, označenih s fikoeritrim PE (Immuno Quality Products, Nizozemska), v drugo 10 μ l Anti-TGF-beta, označenih s PE (Immuno Quality Products, Nizozemska), v tretjo 10 μ l Anti-Hu-IFN- γ , označenih s FITC in Anti-Hu-IL-4, označenih s PE (Becton Dickinson, ZDA). Četrti pa smo primešali protitelesa za izotipsko kontrolo γ_{2a}/γ_1 (Becton Dickinson, ZDA). Inkubirali smo 20 minut pri sobni temperaturi v temi. Nato smo celice sprali z 2 ml PBS in centrifugirali. Supernatant smo odlili in označenim celicam dodali 300 μ l PBS, premešali in suspenzijo shranili pri 4 °C. Analizo s pretočnim citometrom smo opravili najkasneje v 24 urah.

3.2.5.3 Določevanje znotrajceličnih citokinov po 24-urni inkubaciji

Citoplazemske IFN- γ , IL-4, IL-10 in TGF- β 1 smo določevali tudi po 24 urni aktivaciji z IONO&PMA. Po 24-urni inkubaciji smo s ploščice pobrali suspenzijo celic v sterilno epruveto, centrifugirali 3 minute pri 1619 x g in 20 °C (Megafuge 1.0R, rotor 2705, Heraeus Instruments). Supernatant smo odlili in shranili v sterilno fiolo pri -20 °C za kasnejše merjenje citokinov z ELISO. Celicam, ki so ostale na dnu epruvete, smo dodali 900 µl RPMI (1x10⁶ celic/ml). Nato smo dodali 10 µl inhibitorja eksocitoze (reagent C) in inkubirali 5 ur v atmosferi s 5 % CO₂, 95-odstotno vlažnostjo in temperaturo 37 °C. Od tu naprej je bil postopek dela enak kot je opisan pod točko 3.2.5.2 od drugega odstavka naprej (Določevanje znotrajceličnega IFN- γ , IL-4, IL-10 in TGF- β 1 skupaj z membranskim antigenom CD3).

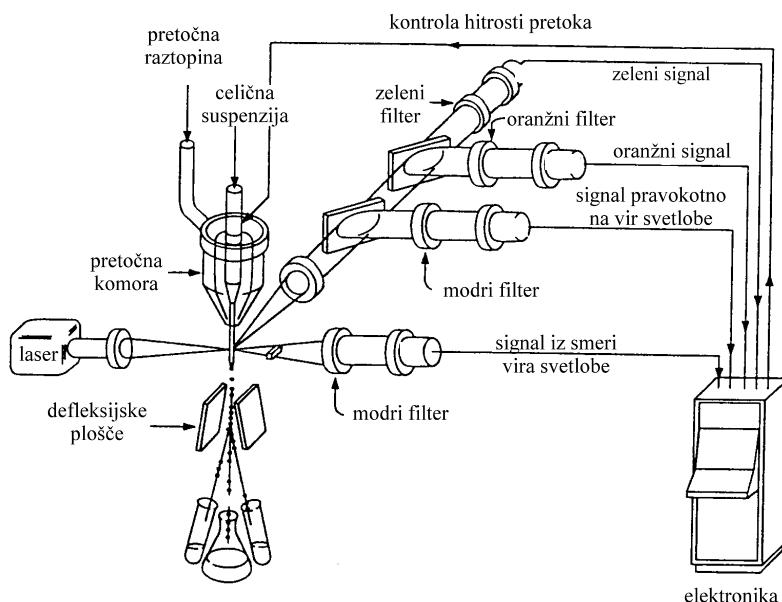
3.2.6 Analiza limfocitov s pretočnim citometrom

Metoda pretočne citometrije je v osnovi enaka metodi fluorescenčne mikroskopije, s to razliko, da je odčitavanje odstotka obarvanih celic avtomatizirano, hitrejše in objektivnejše. Zaradi tehnoloških prednosti pri odčitavanju je mogoče analizirati celice, obarvane z več fluorescenčnimi barvili hkrati (Sl. 2).

V pretočnem citometru celice ena za drugo potujejo skozi ozek snop svetlobe. Ko pride posamezna celica v območje svetlobnega žarka, se le-ta lahko odbije ali lomi (razpršena svetloba), lahko pa se tudi absorbira v molekulah fluorokromnih barvil, ki nato fluorescirajo svetobo večjih valovnih dolžin. Signale zbirajo in seleкционirajo fotodetektorji preko sistema leč in filtrov. Fotodetektor FALS (Forward Angle Light Scatter) sprejema razpršeno svetobo iz smeri laserskega žarka, količina prejete svetlobe pa je obratno sorazmerna velikosti celice. Fotodetektor RALS (Right Angle Light Scatter) sprejema razpršeno svetobo pravokotno od smeri laserskega žarka, količina prejete svetlobe pa je v skladu z granulacijo in površinsko strukturo celic. Trije fluorescenčni fotodetektorji pa merijo fluorescenčno svetobo določene valovne dolžine in na ta način signal, ki ga oddaja določeno fluorescenčno barvilo. Fotopomnoževalke pretvorijo svetlobne signale v električne. Izmerjene vrednosti električnih signalov po računalniški

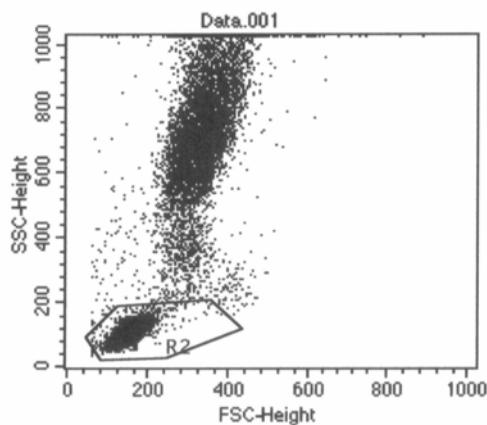
obdelavi prikažemo matematično in grafično. Tako v postopku računalniške analize razvrščamo celice glede na posamezne lastnosti (Ihan, 1999).

Epruvete s suspenzijami limfocitov smo dali v pretočni citometer. Rezultati so prikazani na ekranu v obliki točkovnega diagrama. Vsaka točka na diagramu predstavlja dogodek, ki ga zaznajo različni fotodetektorji. O vsaki posamezni celici izvemo več njenih lastnosti: velikost, granuliranost in fluorescenco.



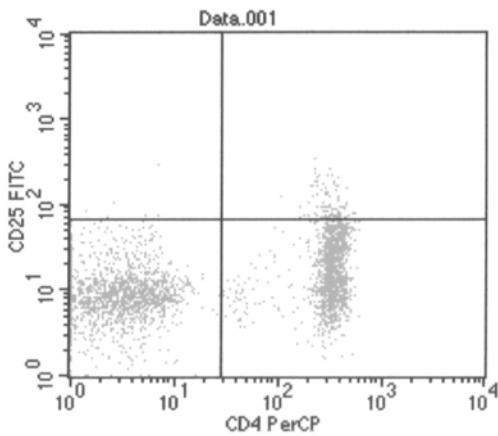
Slika 2: Shematični prikaz pretočnega citometra BD FACS Calibur (Givan, 1992)

Na osi X diagrama je prikazana velikost celic, ki jo zazna fotodetektor FALS. Količina prejete svetlobe je obratno sorazmerna velikosti celice. Na osi Y diagrama pa je prikazana granuliranost celice, ki jo zazna fotodetektor RALS (Sl. 3). Granuliranost je odraz količine in lastnosti membranskih struktur celice. Glede na položaj točk na diagramu ločimo posamezne vrste celic. Limfocite, ki jih želimo naprej analizirati, zamejimo na ekranu z elektronskim svinčnikom (Kopitar, 2004).



Slika 3: Točkasti diagram stopnje granuliranosti in velikosti celice

Če opazujemo celice glede na fluorescenco, nam računalnik prikaže njihov položaj v obliki točk na novem diagramu (Sl. 4). Na osi X je tokrat nanešena vrednost intenzitete fluorescence celic (svetilnost celic), označenih s protitelesi z eno vrsto fluorokroma, na osi Y pa svetilnost celic, označenih s protitelesi z drugo vrsto fluorokroma. V zgornjem desnem polju diagrama so celice, ki so označene z obema uporabljenima vrstama protiteles (npr. CD4⁺, CD25⁺), torej za naš poskus zanimive celice (Kopitar, 2004).



Slika 4: Točkasti diagram, ki prikazuje celice, označene z MoAb CD25 FITC in CD4 PerCP

3.2.7 Obdelava podatkov

Za statistično obdelavo podatkov in oblikovanje preglednic smo uporabljali računalniški program Microsoft Excel, MS Office XP.

Izračunali smo srednje vrednosti (\bar{X}) standardne odklone (SD) in standardne napake (SE). Razpršenost posameznih podatkov smo ocenjevali na osnovi koeficiente variacije (KV), ki meri, kolikšen odstotek aritmetične sredine predstavlja standardni odklon. Po formuli $X \pm 2SD$ smo izračunali območja normalnega izdelovanja citokinov po aktivaciji *in vitro* (Bilač, 1996; Wraber, 1998; Repnik, 2000). Izračunali smo tudi geometrijsko sredino (G) in območja normalnega izdelovanja citokinov na podlagi logaritmiranih podatkov.

Meritve citokinov smo izvajali s pomočjo dveh različnih metod. Za primerjavo obojih rezultatov smo izbrali Pearsonov koeficient korelacije in tako ugotavljali oceno linearne povezanosti.

Za primerjavo naših rezultatov z že znanimi rezultati, pridobljenimi v istem laboratoriju z enakimi postopki, smo upoštevali enosmerno analizo varianc in uporabili test Kolmogorov-Smirnov (KS-test). Kjer je bilo podatkov premalo za KS-test, smo uporabili dvosmerni t-preizkus (za majhne, neodvisne vzorce), pri čemer smo uporabljali srednje vrednosti in upoštevali variance. Ko z izbrano statistično metodo nismo mogli zavrniti ničelne domneve o enakosti aritmetičnih sredin, smo že znane podatke razširili z novimi in izračunali nova območja normalnega izdelovanja citokinov po aktivaciji *in vitro*.

4 REZULTATI

4.1 EFEKTORSKI IN REGULATORNI CITOKINI V KULTURAH PBMC ZDRAVIH DAROVALCEV PO SPODBUJANJU Z IONO IN PMA

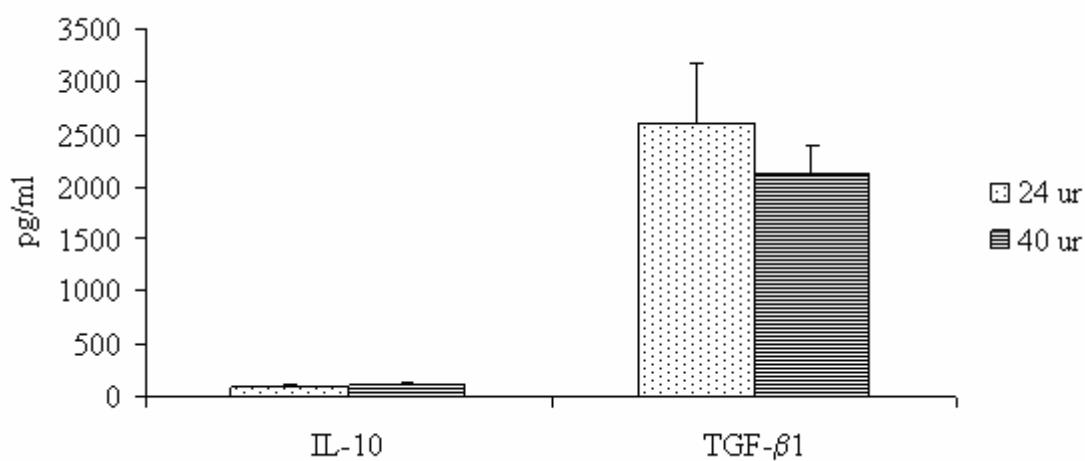
V tem delu poskusov smo citokine določali v supernatantih kultur PBMC, spodbujenih z IONO in PMA, z metodo ELISA. Za določitev normalnih območij smo izbrali 40-urno gojenje celic, da bi lahko primerjali naše rezultate z rezultati drugih poskusov, narejenih v tem laboratoriju, pri katerih je gojenje celic trajalo 40 ur (Bilač, 1996; Repnik, 2000). Pri polovici vzorcev (10) pa je gojenje trajalo tudi 24 ur, citokinski odziv pa smo merili tako z ELISO kot z metodo pretočne citometrije.

Preglednica 6 prikazuje koncentracijo IL-4, IFN- γ , IL-10 in TGF- β 1 pri posameznih zdravih darovalcih. Porazdelitev rezultatov ni značilno odstopala od normalne porazdelitve. Kljub temu je bilo nekaj posameznih vrednosti zelo velikih ali zelo majhnih in so prispevale k velikim vrednostim parametrov variacije (standardni odklon, koeficient variacije). Vzorce, katerih vsaj ena vrednost koncentracije je znatno odstopala od povprečja, smo izločili. Preglednica 7 tako prikazuje vzorce in izmerjeno koncentracijo, ki smo jo upoštevali pri nadaljnji obdelavi podatkov. Preglednica 8 prikazuje aritmetične sredine, standardne odklone, normalna območja koncentracije, standardne napake in koeficiente variacije (KV) za IL-4, IFN- γ , IL-10 in TGF- β 1 po 24-urnem in 40-urnem gojenju. Slika 5 prikazuje aritmetične sredine koncentracije regulatornih citokinov IL-10 in TGF- β 1 s standardnimi napakami.

Največja srednja vrednost koncentracije po 40-urni inkubaciji z IONO&PMA je bila izmerjena za IFN- γ , manjša za TGF- β 1, še manjša za IL-10 in najmanjša za IL-4. Razlike med temi vrednostmi koncentracije so bile velike (IFN- γ >> TGF- β 1 >> IL-10 >> IL4) (Pegl. 8). Srednja vrednost koncentracije IL-10 je bila po 24-urnem gojenju nekoliko manjša kot po 40-urnem gojenju celic. Ravno obratno pa je bila aritmetična sredina koncentracije TGF- β 1 po 24-urnem gojenju nekoliko večja kot po 40-urnem. Te razlike pa niso bile velike (Sl. 5).

Razpršenost posameznih vrednosti, prikazana s KV, je bila po 40-urnem gojenju celic najmanjša pri IFN- γ in največja pri IL-10. Pri ostalih dveh merjenih citokinih je bila približno enaka. KV je bil za IL-10 za 13,6 % nižji po 24-urni inkubaciji v primerjavi z 40-urno inkubacijo (Pregl. 8).

Normalna območja smo izračunali iz aritmetične sredine in standardnega odklona ($\bar{X} \pm 2SD$) in zato lahko za spodnjo mejo dobili negativno število. Tako je v večini primerov spodnja meja normalnega območja tudi meja občutljivosti metode merjenja, ki smo jo označili kot »nezaznavno«. Spodnjo mejo smo določili le pri IL-10 (24 ur) in IFN- γ (40 ur), torej tam, kjer je bil standardni odklon manjši od 50 % srednje vrednosti koncentracije. Razlika med normalnimi območji je bila tako predvsem v vrednostih za zgornjo mejo. Pri večjih srednjih vrednostih koncentracije je bila tudi meja normalnega območja višja. Vendar je večja razpršenost vrednosti višala tudi mejo normalnega območja (Pregl. 8).



Slika 5: Primerjava koncentracije regulatornih citokinov IL-10 in TGF- β 1 (pg/ml) v supernatantih kultur PBMC po 24-urni in po 40-urni inkubaciji. PBMC smo izolirali iz venske krvi zdravih odraslih darovalcev in spodbudili z IONO&PMA (z višino stolpca je prikazana aritmetična sredina, nad tem je vrisana standardna napaka te srednje vrednosti).

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulti in forbol 12-miristat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); IL-10 (interlevkin-10); TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor- β 1)

Preglednica 6: Vrednosti koncentracije IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ (pg/ml) v kulturah PBMC zdravih odraslih darovalcev (n=20). PBMC smo spodbudili z IONO&PMA in inkubirali 24 in 40 ur ali le 40 ur.

zap.št. D, oznaka	starost D	24 ur		40 ur			
		IL-10 pg/ml	TGF- β 1 pg/ml	IL-10 pg/ml	TGF- β 1 pg/ml	IL-4 pg/ml	IFN- γ pg/ml
1, 65-J	24,9	68,2	779	113,0	1101	4,53	16470
2, 70-J	22,3	64,3	2248	88,2	1634	2,83	*44000
**3, 99-J	36,8	28,2	1626	38,4	2366	4,18	9610
4,104-J	28,3	124,0	2826	135,0	706	5,12	13580
5,117-J	54,1	87,9	4696	118,0	4658	9,48	17580
6,122-J	44,1	186,0	4391	260,0	*6569	5,53	17790
7,127-J	72,6	164,0	3515	230,0	3397	15,30	24320
8,132-J	50,4	135,0	2186	155,0	2450	7,30	10470
9,145-J	30,1	38,3	504	73,2	*60,5	7,53	3774
10,150-J	20,8	97,8	3905	118,0	2705	9,06	*>>44000
11, 75-J	49,1			208,0	1704		
12, 79-J	49,6			233,0	3169		
13, 87-J	55,0			88,8	576		
14, 91-J	25,4			30,7	2009		
15, 95-J	24,9			83,5	2723	8,48	24080
16,109-J	67,8			209,0	1462		
17,113-J	69,0			106,0	1964		
18,137-J	27,7			52,0	975		
19,141-J	22,7			28,2	2211		
20,155-J	23,7			34,6	2518		

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); D (darovalec); IL-10 (interlevkin-10); TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor- β 1); IL-4 (interlevkin-4); IFN- γ (interferon- γ)

Opombi: * nepojasnjena velika odstopanja koncentracije od povprečja, zato smo celotne vzorce izločili iz nadaljnje obdelave

** vzorec, čigar koncentracija (%) za IL-4 znatno izstopa po 24-urni inkubaciji in merjenju s pretočnim citometrom (Pregl. 9)

Preglednica 7: Vrednosti koncentracije IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ (pg/ml) v kulturah PBMC zdravih odraslih darovalcev, ki smo jih upoštevali pri končni analizi rezultatov. PBMC smo spodbudili z IONO&PMA in inkubirali 24 in 40 ur ali le 40 ur.

zap.št. D, oznaka	starost D	24 ur		40 ur		IL-4 pg/ml	IFN- γ pg/ml
		IL-10 pg/ml	TGF- β 1 pg/ml	IL-10 pg/ml	TGF- β 1 pg/ml		
1, 65-J	24,9	68,2	779	113,0	1101	4,53	16470
**3, 99-J	36,8	28,2	1626	38,4	2366	4,18	9610
4,104-J	28,3	124,0	2826	135,0	706	5,12	13580
5,117-J	54,1	87,9	4696	118,0	4658	9,48	17580
7,127-J	72,6	164,0	3515	230,0	3397	15,30	24320
8,132-J	50,4	135,0	2186	155,0	2450	7,30	10470
11, 75-J	49,1			208,0	1704		
12, 79-J	49,6			233,0	3169		
13, 87-J	55,0			88,8	576		
14, 91-J	25,4			30,7	2009		
15, 95-J	24,9			83,5	2723	8,48	24080
16,109-J	67,8			209,0	1462		
17,113-J	69,0			106,0	1964		
18,137-J	27,7			52,0	975		
19,141-J	22,7			28,2	2211		
20,155-J	23,7			34,6	2518		

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); D (darovalec); IL-10 (interlevkin-10); TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor- β 1); IL-4 (interlevkin-4); IFN- γ (interferon- γ)

Opomba: ** vzorec, čigar koncentracija (%) za IL-4 znatno izstopa po 24-urni inkubaciji in merjenju s pretočnim citometrom (Pegl. 9)

Preglednica 8: Opisne statistike koncentracije citokinov IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ v kulturah PBMC zdravih odraslih darovalcev. PBMC smo spodbudili z IONO&PMA in inkubirali 24 in 40 ur ali le 40 ur.

parameter	24 ur		40 ur			IFN- γ
	IL-10	TGF- β 1	IL-10	TGF- β 1	IL-4	
število D	6	6	16	16	7	7
\bar{X} pg/ml	101	2605	116	2124	7,77	16587
SD pg/ml	49,40	1394	72,72	1072	3,889	5945
normalno območje (math display="block">\bar{X} \pm 2SD)	od 2 do 200	od nezaznavnega do 5393	od nezaznavnega do 262	od nezaznavnega do 4269	od nezaznavnega do 16	od 4696 do 28478
pg/ml						
SE pg/ml	20,2	569	18,2	268	1,47	2247
KV %	48,8	53,5	62,4	50,5	50,1	35,8

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); D (darovalec); \bar{X} (aritmetična sredina); SD (standardni odklon); $\bar{X} \pm 2SD$ (aritmetična sredina z dvema standardnima odklonoma); SE (standardna napaka); KV (koeficient variacije); IL-10 (interlevkin-10); TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor- β 1); IL-4 (interlevkin-4); IFN- γ (interferon- γ)

4.2 ZNOTRAJCELIČNO DOLOČANJE EFEKTORSKIH IN REGULATORNIH CITOKINOV Z METODO PRETOČNE CITOMETRIJE

V tem delu poskusov smo določali znotrajcelične citokine PBMC z metodo pretočne citometrije. Citokine smo merili pri desetih vzorcih krvi, in sicer s standardnim postopkom 5-urnega spodbujanja z IONO&PMA. Pri enakih vzorcih smo znotrajcelične citokine PBMC določili po spodbujanju z IONO&PMA ter 24-urnem gojenju celic *in vitro*. Poleg tega pa smo, z metodo pretočne citometrije, takoj po odvzemu krvi določili odstotek celic CD4⁺CD25⁺ pri vseh dvajsetih vzorcih krvi (Pregl. 9).

V preglednici 9 so predstavljeni odstotki celic T CD3⁺, ki so sintetizirale znotrajcelične citokine IL-4, IFN- γ , IL-10 in TGF- β 1. Ti odstotki odražajo povprečno znotrajcelično koncentracijo citokinov. Pri tretjem vzorcu je po 24-urni inkubaciji odstotek takih celic, ki sintetizirajo IL-4 izredno visok, zato tega vzorca nismo upoštevali. V preglednici 10 so predstavljeni rezultati, ki smo jih upoštevali pri nadaljnji obdelavi podatkov. Preglednica 11 prikazuje aritmetične sredine, standardne odklone, standardne napake in koeficiente variacije za odstotke celic, ki sintetizirajo IL-4, IFN- γ , IL-10 in TGF- β 1, po standardnem postopku določanja znotrajceličnih citokinov in po 24-urnem gojenju *in vitro*. Slika 6 prikazuje aritmetične sredine odstotkov teh celic s standardnimi napakami.

Največja srednja vrednost koncentracije po standardnem postopku določanja znotrajceličnih citokinov je bila izmerjena za TGF- β 1, manjša za IL-10, še manjša za IL-4 in najmanjša za IFN- γ ($TGF-\beta 1 > IL-10 > IL-4 > IFN-\gamma$). Največja srednja vrednost koncentracije po 24-urnem gojenju celic *in vitro* je bila izmerjena za IL-10, manjša za IFN- γ , manjša za TGF- β 1 in še manjša za IL-4 ($IL-10 >> IFN-\gamma >> TGF-\beta 1 >> IL-4$) (Pregl. 11). Srednje vrednosti koncentracije citokinov so v vseh primerih, razen v primeru IL-4, večje po 24-urnem gojenju, drastično je večja sinteza IL-10 in IFN- γ (Sl. 6). Razpršenost posameznih vrednosti (KV) je za vse citokine po 24-urnem gojenju celic manjša kot pri standardnem postopku merjenja (Pregl. 11).

Preglednica 9: Odstotki celic T CD3⁺, ki so sintetizirale znotrajcelične citokine IL-10, TGF-β1, IL-4 in IFN-γ po spodbujanju PBMC z IONO&PMA in inkubaciji 5 oz. 24 ur. Ti odstotki odražajo povprečno znotrajcelično koncentracijo citokinov. V trejem stolpcu je prikazan odstotek celic CD4⁺CD25⁺ v krvi zdravih odraslih darovalcev.

zap.št.D, oznaka	starost D	CD4CD25 %	5 ur				24 ur			
			IL-10+CD3 %	TGF-β1+CD3 %	IL-4+CD3 %	IFN-γ+CD3 %	IL-10+CD3 %	TGF-β1+CD3 %	IL-4+CD3 %	IFN-γ+CD3 %
1, 65-J	24,9	6	4	6	3	1	39	15	3	33
*2, 70-J	22,3	6	4	4	5	5	44	18	4	40
3, 99-J	36,8	5	5	5	3	2	41	14	**29	29
4,104-J	28,3	8	6	8	13	3	49	20	4	30
5,117-J	54,1	4	5	4	11	6	26	16	4	30
*6,122-J	44,1	7	7	8	2	1	36	15	1	16
7,127-J	72,6	5	8	5	3	1	30	25	9	30
8,132-J	50,4	6	3	6	4	2	25	9	8	13
*9,145-J	30,1	8	7	11	3	7	32	17	5	13
*10,150-J	20,8	6	7	6	3	2	37	18	7	44
11, 75-J	49,1	4								
12, 79-J	49,6	5								
13, 87-J	55,0	5								
14, 91-J	25,4	6								
15, 95-J	24,9	6								
16,109-J	67,8	8								
17,113-J	69,0	4								
18,137-J	27,7	2								
19,141-J	22,7	5								
20,155-J	23,7	6								

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 13-acetat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi); D (darovalec); IL-10 (interlevkin-10); TGF-β1 (transformirajoči rastni faktor-β1); IL-4 (interlevkin-4); IFN-γ (interferon-γ)

Oponji: ** nepojasnjeno veliko odstopanje koncentracije (%) od povprečja, zato smo celoten vzorec izločili iz nadaljnje obdelave
 * vzorci, katerih koncentracija nekaterih citokinov, določenih z ELISO, znatno odstopa od povprečja (Pregl. 6)

Preglednica 10: Odstotki celic T CD3⁺, ki so sintetizirale znotrajetične citokine IL-10, TGF-β1, IL-4 in IFN-γ po spodbujanju PBMC z IONO&PMA in inkubaciji 5 oz. 24 ur, in ki smo jih upoštevali pri končni analizi rezultatov. Ti odstotki odražajo povprečno znotrajetično koncentracijo citokinov.

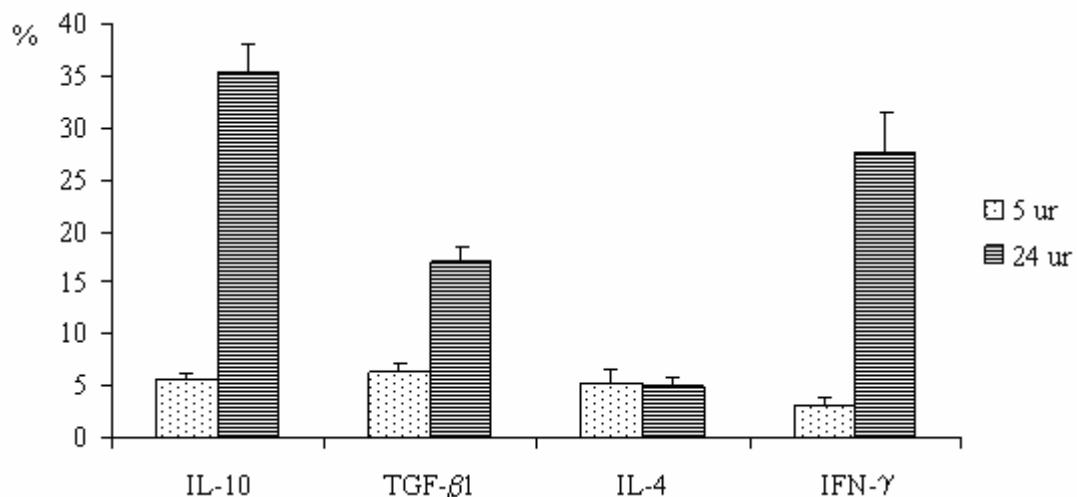
zap.št.D, oznaka	starost D	5 ur				24 ur			
		IL-10+CD3 %	TGF-β1+CD3 %	IL-4+CD3 %	IFN-γ+CD3 %	IL-10+CD3 %	TGF-β1+CD3 %	IL-4+CD3 %	IFN-γ+CD3 %
1, 65-J	24,9	4	6	3	1	39	15	3	33
*2, 70-J	22,3	4	4	5	5	44	18	4	40
4,104-J	28,3	6	8	13	3	49	20	4	30
5,117-J	34,1	5	4	11	6	26	16	4	30
*6,122-J	44,1	7	8	2	1	36	15	1	16
7,127-J	72,6	8	5	3	1	30	25	9	30
8,132-J	50,4	3	6	4	2	25	9	8	13
*9,145-J	30,1	7	11	3	7	32	17	5	13
*10,150-J	20,8	7	6	3	2	37	18	7	44

Opomba: * vzorci, katerih koncentracija nekaterih citokinov, določenih z ELISO, znatno odstopa od povprečja (Pregl. 6)

Preglednica 11: Opisne statistike odstotkov opazovanih celic T CD3⁺ za citokine IL-10, TGF-β1, IL-4 in IFN-γ po spodbujanju PBMC z IONO&PMA in inkubaciji 5 oz. 24 ur. V drugem stolpcu se nahajajo opisne statistike odstotkov celic CD4⁺CD25⁺ v krvi zdravih odraslih darovalcev.

parameter	CD25CD4	5 ur				24 ur			
		IL-10+CD3	TGF-β1+CD3	IL-4+CD3	IFN-γ+CD3	IL-10+CD3	TGF-β1+CD3	IL-4+CD3	IFN-γ+CD3
št. D	19	9	9	9	9	9	9	9	9
–X %	5,6	5,7	6,4	5,2	3,1	35	17,0	5,0	27,7
SD %	1,54	1,73	2,24	3,96	2,32	8,00	4,30	2,55	11,35
SE %	0,35	0,58	0,75	1,32	0,77	2,67	1,43	0,85	3,78
KV %	27,4	30,6	34,8	75,9	74,4	22,6	25,3	51,0	41,0

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 13-acetat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi); D (darovalec); –X (aritmetična sredina); SD (standardni odklon); SE (standardna napaka); KV (koeficient variacije); IL-10 (interleukin-10); TGF-β1 (transformirajoči rastni faktor-β1); IL-4 (interleukin-4); IFN-γ (interferon-γ)



Slika 6: Primerjava odstotkov celic $CD3^+$, ki so sintetizirale znotrajcelične citokine IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ po spodbujanju PBMC z IONO&PMA (z višino stolpca je prikazana aritmetična sredina, nad tem je vrisana standardna napaka te srednje vrednosti). Ti odstotki odražajo povprečno znotrajcelično koncentracijo citokinov.

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulti in forbol 12-miristat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); IL-10 (interlevkin-10); TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor- β 1); IL-4 (interlevkin-4); IFN- γ (interferon- γ)

4.3 KORELACIJA DOLOČANJA CITOKINSKEGA PROFILA Z METODO ZNOTRAJCELIČNEGA MERJENJA CITOKINOV IN *IN VITRO* METODE

Izračunali smo korelacijo dveh različnih metod določanja citokinov: koncentracijo IL-4, IFN- γ , IL-10 in TGF- β 1 smo merili *in vitro* v supernatantih kultur PBMC po spodbujanju z IONO&PMA, z metodo ELISA; znotrajcelično koncentracijo enakih citokinov v celicah $CD3^+$ smo določali z metodo pretočne citometrije. Iz analize smo izločili tretji vzorec, zaradi ekstremno velikega deleža IL-4 po 24-urni inkubaciji, izmerjenega s pretočnim citometrom (Pregl. 9). Nismo upoštevali tudi podatka za IFN- γ desetega vzorca, saj vrednost ni bila točno določena (Pregl. 6). Rezultati testiranja so navedeni v preglednici 12 (metoda korelacije po Pearson-u).

Stopnja korelacije je bila statistično pomembna pri merjenju efektorskih citokinov (IL-4 in IFN- γ). Koncentracija teh dveh citokinov je primerljiva z ELISO po 40-urni inkubaciji spodbujenih PBMC in znotrajceličnim določanjem s pretočnim citometrom po 24-urni inkubaciji spodbujenih PBMC (Pregl. 12). Pri nobenem od ostalih dveh merjenih citokinov oz. pri drugih pogojih korelacija ni bila statistično pomembna.

Preglednica 12: Korelacija dveh različnih metod določanja citokinov pri zdravih odraslih prostovoljcih. Koncentracijo IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ smo merili *in vitro* v supernatantu kultur PBMC, enake citokine smo določili znotrajcelično, v celicah T CD3 $^{+}$ z metodo pretočne citometrije (metoda korelacije po Pearson-u). Ure označujejo čas inkubacije celic po spodbujanju z IONO&PMA.

primerjava	citokin	koef.kor.
ELISA 24 UR IN	IL-10	-0,14
FC 24 UR	TGF- β 1	0,20
ELISA 24 UR IN	IL-10	0,32
FC 5 UR	TGF- β 1	-0,43
ELISA 40 UR IN	IFN- γ	*0,76
FC 24 UR	IL-4	*0,70
	IL-10	-0,19
	TGF- β 1	-0,08
ELISA 40 UR IN	IFN- γ	-0,04
FC 5 UR	IL-4	-0,12
	IL-10	0,41
	TGF- β 1	-0,31

Legenda: IL-10 (interlevkin-10); TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor- β 1); IL-4 (interlevkin-4); IFN- γ (interferon- γ); PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 13-acetat 3,33 ng/ml kulture); FC (flow cytometry, pretočna citometrija); koef.kor. (Pearsonov koeficient korelacije)

Opomba: * statistično značilna povezava

4.4 NORMALNA OBMOČJA IZDELOVANJA CITOKINOV PO *IN VITRO* SPODBUJANJU Z IONO IN PMA

Citokini IL-4, IFN- γ , IL-10 in TGF- β 1 so bili že merjeni v istem laboratoriju in po enakih postopkih kot smo jih uporabljali mi (izolacija PBMC iz venske krvi, spodbujanje z IONO&PMA, inkubacija 40 ur, določanje citokinov v supernatantih kultur z ELISO). Pred nami so bili prvič merjeni v šolskem letu 1998/99, kasneje pa še dvakrat. Skupaj z našimi meritvami so torej štiri skupine vzorcev, v katerih so se določali zgornji citokini. Podatki o vseh teh meritvah so zbrani v preglednici 13. V postopkih je bil vedno uporabljen material istega proizvajalca, ki pa se je skozi leta nekoliko spremjal.

Z enosmerno analizo varianc smo ugotovili, da se variance ne razlikujejo med posameznimi štirimi skupinami meritev za TGF- β 1 ($P=0,09$) in IFN- γ ($P=0,51$), razlikujejo pa se za IL-10 ($P=0,03$) in IL-4 ($P=0,003$). Enosmerna analiza varianc med vsemi predhodnimi meritvami v tem laboratoriju in našimi meritvami ni pokazala razlik med variancama pri nobenem od teh citokinov ($P>0,05$). S testom Kolmogorov-Smirnov (KS-test) nismo ugotovili odstopanja prejšnjih ali naših vrednosti koncentracije za TGF- β 1 od normalne porazdelitve ($P>0,05$), niti razlike med aritmetičnima sredinama prejšnjih in naših podatkov ($P=0,983$). Test pa je pokazal, da prejšnji podatki za IL-10 niso zelo v skladu z normalno porazdelitvijo ($P=0,17$), zato smo upoštevali KS-test o enakosti aritmetičnih sredin koncentracije prejšnjih in naših podatkov za IL-10 ($P=0,698$), saj je ta test neobčutljiv za distribucijo podatkov (za razliko od t-preizkusa za majhne vzorce).

Relevantne meritve za IL-4 in IFN- γ so bile le pri sedmih novih vzorcih, kar je premalo za preizkušanje s KS-testom. Aritmetični sredini koncentracije teh dveh citokinov smo testirali z aritmetičnima sredinama enakih citokinov, ki so bili že izmerjeni v istem laboratoriju po enakem postopku, z dvosmernim t-preizkusom za majhne, neodvisne vzorce. Pri IL-4 smo tvegali napako, saj je enosmerna analiza varianc med skupinami pokazala neenakost, poleg tega pa je KS-test pokazal, da se opazovana spremenljivka v vzorcih pred našimi ne porazdeljuje normalno ($P=0,00$).

Preglednica 13: Vse vrednosti koncentracije IL-10, TGF-β1, IL-4 in IFN-γ (pg/ml) v kulturah PBMC pri posameznih zdravih odraslih darovalcih (n= 37-43), ki so bile izmerjene v istem laboratoriju in po enakih postopkih. PBMC so bile spodbujene z IONO&PMA in inkubirane 40 ur.

oznaka vzorca: starost (leta), spol D	IL-10 pg/ml	TGF-β1 pg/ml	IL-4 pg/ml	IFN-γ pg/ml
48U: 20, M	56,2		3,94	4846
77U: 24, Ž	77,8		6,75	7138
121U: 24, Ž	106,0		12,70	12351
150U: 44, Ž	105,0	1409	12,30	13080
179U: 34, Ž	54,9	991	5,62	8124
222U: 32, Ž	65,1		11,20	19635
250U: 21, M	69,8	1712	9,86	4795
334U: 44, M	38,7	1179	24,80	21030
368U: 24, Ž	31,2	928	6,39	16760
383U: 25, M	106,0		17,70	20330
400U: 25, Ž	58,6		3,46	16330
416U: 25, Ž	87,8		6,87	16050
433U: 21, M	37,7		12,30	13130
451U: 21, M	55,1		15,00	12155
19U: 24, Ž	200,0		15,00	15418
278U: 21, M	108,0		11,50	8298
482U: 32, M	116,0	1267	34,20	23700
1874F: 44, M	157,0	3832	17,40	14060
1880F: 35, Ž	241,0	3401	27,80	13320
1891F: 36, Ž	95,5	2098	17,00	20440
1894F: 34, Ž	81,4	1434	8,49	19580
1897F: 53, Ž	103,0	1684	14,20	9449
1900F: 24, Ž	201,0	263	13,40	18100
1907F: 46, M	117,0	4329	48,80	17840
1936F: 30, Ž	123,0	3288	12,30	16720
1953F: 62, M	152,0	2669	30,60	8181
1959F: 32, M	133,0	2256	32,60	22790
6M: 23, Ž			15,90	17570
24M: 23, Ž		4813	5,07	14710
36M: 53, Ž		3152	12,40	9718
59M: 23, M		2916	8,10	18540
70M: 22, Ž		942	11,10	14060
118M: 46, Ž		2163	6,44	22280
154M: 53, Ž			8,45	16600
65-J: 25, Ž	113,0	1101	4,53	16470
99-J: 37, M	38,4	2366	4,18	9610
104-J: 28, Ž	135,0	706	5,12	13580
117-J: 54, Ž	118,0	4658	9,48	17580

se nadaljuje

nadaljevanje				
oznaka vzorca: starost (leta), spol D	IL-10 pg/ml	TGF- β 1 pg/ml	IL-4 pg/ml	IFN- γ pg/ml
127-J: 73, Ž	230,0	3397	15,30	24320
132-J: 50, M	155,0	2450	7,30	10470
75-J: 49, M	208,0	1704		
79-J: 50, M	233,0	3169		
87-J: 55, M	88,8	576		
91-J: 25, M	30,7	2009		
95-J: 25, Ž	83,5	2723	8,48	24080
109-J: 68, Ž	209,0	1462		
113-J: 69, M	106,0	1964		
137-J: 28, Ž	52,0	975		
141-J: 23, M	28,2	2211		
155-J: 24, M	34,6	2518		

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); D (darovalec); IL-10 (interlevkin-10); TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor- β 1); IL-4 (interlevkin-4); IFN- γ (interferon- γ)

Opomba: Prekinjene črte ločujejo posamezne skupine vzorcev, ki so bili merjeni v različnih časovnih obdobjih med letoma 1998 in 2006.

Izračunane razlike niso bile statistično značilne ($P>0,05$), zato smo prejšnje podatke razširili z našimi in izračunali nova normalna območja ($\bar{X} \pm 2SD$) izdelovanja citokinov IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ .

Preglednica 14 prikazuje aritmetične sredine, standardne deviacije, koeficiente variacije in nova normalna območja izdelovanja citokinov IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ po *in vitro* aktivaciji PBMC iz venske krvi zdravih odraslih darovalcev. PBMC so bile spodbujene z IONO&PMA ter inkubirane 40 ur (vse vrednosti koncentracije so v pg/ml). V preglednici 15 so zbrani podatki o aritmetičnih sredinah po posameznih skupinah meritev ($\bar{X} \pm 4$ predstavlja aritmetično sredino zadnjih, torej naših meritev), v preglednici 16 pa so koeficienti variacije, ravno tako po posameznih skupinah. Kumulativni koeficienti variacije, ki smo jih izračunali po vsakem povečanju števila podatkov o koncentraciji citokinov, so prikazani v preglednici 17.

Celotno, skupno število vzorcev je bilo za vse merjene citokine približno enako, v povprečju 41. Spodnja meja normalnega območja izdelovanja citokina je bila določena le

za IFN- γ , normalno območje je tako določeno med 4731 pg/ml in 25671 pg/ml. Količina izloženega IFN- γ je tudi največja, nižja je sinteza TGF- β 1 z zgornjo mejo normalnega območja izdelovanja 4483 pg/ml. Precej nižja je zgornja meja izdelovanja IL-10, ki znaša 228 pg/ml, in še nižja za IL-4, ki je določena z 32,7 pg/ml (Pregl. 14).

Izračunani kumulativni koeficienti variacije se pri vseh citokinih pri zadnjih treh dodanih meritvah ne spreminjačo prav dosti. Najvišji KV znaša sedaj 70,9 % za IL-4, nižja in podobna med sabo sta KV za TGF- β 1 in IL-10 (52,8 in 55,8 %), najnižji KV pa je izračunan za koncentracijo IFN- γ , in sicer 34,4 % (Pregl. 17).

Preglednica 14: Nove opisne statistike koncentracije citokinov IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ v kulti PBMC iz venske krvi zdravih odraslih darovalcev. PBMC smo spodbudili z IONO&PMA in inkubirali 40 ur. Upoštevane so naše meritve in prejšnje meritve, ki so bile dobljene po enakih postopkih v istem laboratoriju.

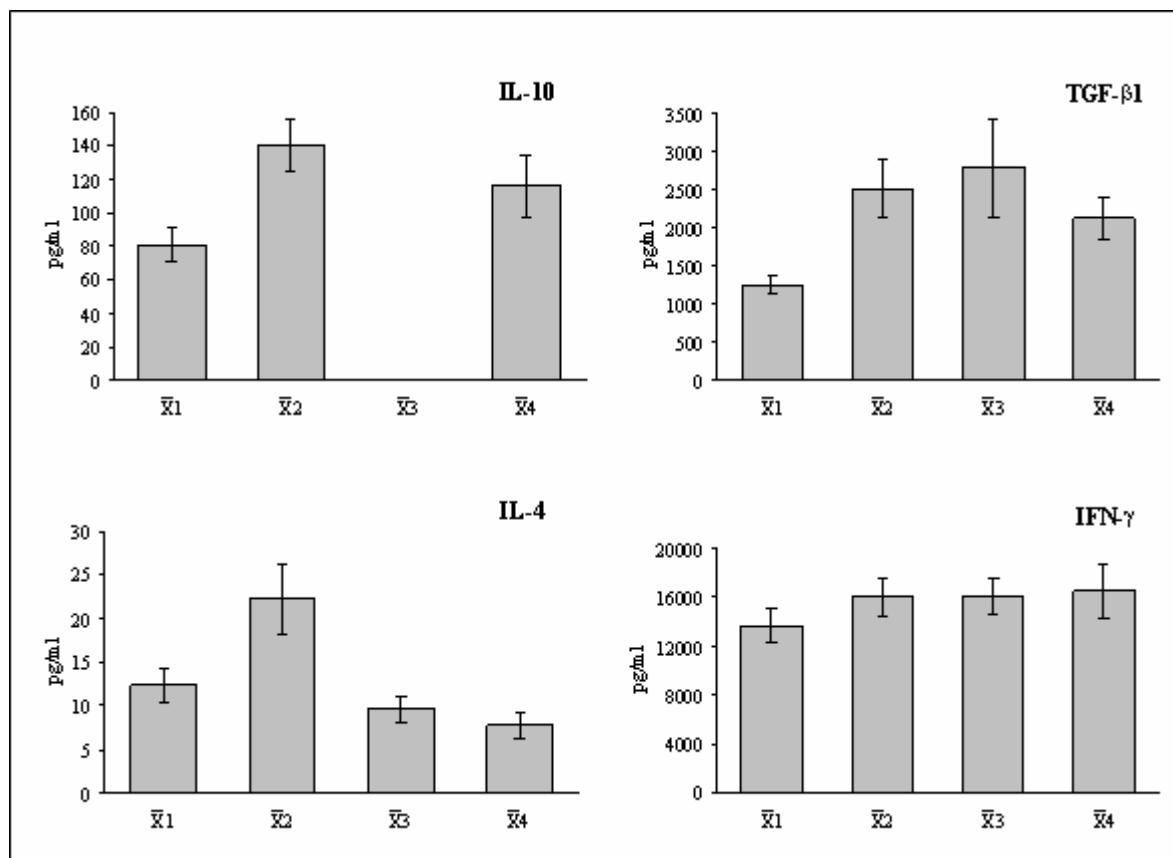
parameter	IL-10	TGF- β 1	IL-4	IFN- γ
število D	43	37	41	41
\bar{X} pg/ml	108	2181	13,5	15201
SD pg/ml	60,26	1151	9,579	5235
normalno območje ($\bar{X} \pm 2SD$) pg/ml	od nezaznavnega do 228	od nezaznavnega do 4483	od nezaznavnega do 32,7	od 4731 do 25671
KV %	55,8	52,8	70,9	34,4

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulti in forbol 12-miristat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); D (darovalec); \bar{X} (aritmetična sredina); SD (standardni odklon); $\bar{X} \pm 2SD$ (aritmetična sredina z dvema standardnima odklonoma); KV (koeficient variacije); IL-10 (interlevkin-10); TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor- β 1); IL-4 (interlevkin-4); IFN- γ (interferon- γ)

Preglednica 15: Aritmetične sredine koncentracije citokinov IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ po posameznih skupinah vzorcev. Koncentracijo smo merili po spodbujanju PBMC z IONO&PMA in 40-urni inkubaciji.

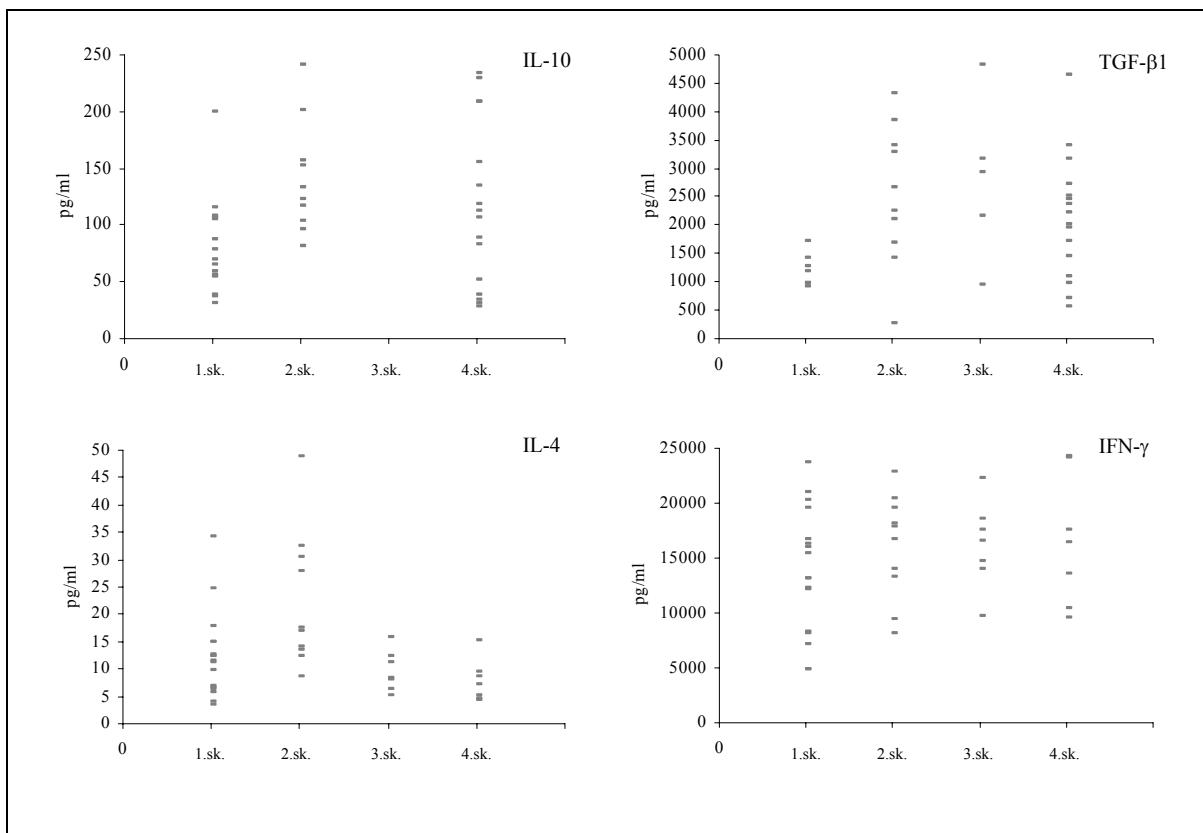
parameter	IL-10	TGF- β 1	IL-4	IFN- γ
\bar{X} 1 pg/ml	80,8	1248	12,30	13716
\bar{X} 2 pg/ml	140,0	2525	22,30	16048
\bar{X} 3 pg/ml	-	2797	9,64	16211
\bar{X} 4 pg/ml	116,0	2124	7,77	16587

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulti in forbol 12-miristat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); \bar{X} (aritmetična sredina); IL-10 (interlevkin-10); TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor- β 1); IL-4 (interlevkin-4); IFN- γ (interferon- γ)



Slika 7: Citokini po spodbujanju z IONO&PMA in 40-urni inkubaciji. Srednje vrednosti in standardne napake ($\bar{X} \pm SE$) koncentracije za IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ (pg/ml) v supernatantih kultur PBMC zdravih odraslih darovalcev. Prikazane so primerjave štirih aritmetičnih sredin po skupinah vzorcev, ki so bili merjeni v različnem obdobju (Pregl. 15).

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulti in forbol 12-miristat 3,33 ng/ml kulture); \bar{X} (aritmetična sredina); SE (standardna napaka); PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); IL-10 (interlevkin-10); TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor- β 1); IL-4 (interlevkin-4); IFN- γ (interferon- γ)



Slika 8: Citokini po spodbujanju z IONO&PMA in 40-urni inkubaciji. Posamezne točke predstavljajo vrednosti koncentracije za IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ (pg/ml) v supernatantih kultur PBMC zdravih odraslih darovalcev. Prikazane so primerjave po skupinah vzorcev, ki so bili merjeni v različnem obdobju (Pregl. 13).

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); sk. (skupina); IL-10 (interlevkin-10); TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor- β 1) IL-4 (interlevkin-4); IFN- γ (interferon- γ)

Preglednica 16: Koeficienti variacije za koncentracijo citokinov IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ po posameznih skupinah vzorcev. Koncentracijo smo merili po spodbujanju PBMC z IONO&PMA in 40-urni inkubaciji.

parameter	IL-10	TGF- β 1	IL-4	IFN- γ
KV1 %	50,8	23,1	63,3	41,7
KV2 %	35,2	48,7	55,9	29,5
KV3 %	/	50,7	38,8	24,3
KV4 %	62,4	50,5	50,1	35,8

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); KV (koeficient variacije); IL-10 (interlevkin-10); TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor- β 1); IL-4 (interlevkin-4); IFN- γ (interferon- γ)

Preglednica 17: Kumulativni koeficienti variacije za koncentracijo citokinov IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ . Koncentracijo smo merili po spodbujanju PBMC z IONO&PMA in 40-urni inkubaciji.

parameter	IL-10	TGF- β 1	IL-4	IFN- γ
KV1 %	50,8	23,1	63,3	41,7
KV2 _k %	50,9	56,6	67,0	37,1
KV3 _k %	/	55,3	68,1	34,4
KV4 _k %	55,8	52,8	70,9	34,4

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); KV_k (kumulativni koeficient variacije); IL-10 (interlevkin-10); TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor- β 1); IL-4 (interlevkin-4); IFN- γ (interferon- γ)

Zaradi ugotovljene velike razpršenosti podatkov o koncentraciji za posamezne citokine, in tudi ker so izračunane spodnje meje normalnih območij pri vseh proučevanih citokinih, z izjemo IFN- γ , negativne in zato označene kot »nezaznavno«, smo se odločili, da podatke logaritmiramo in izračunamo geometrijsko sredino. Z njo smo bolje popisali povprečje in v normalna območja zajeli vse podatke ter določili, kolikokrat je najnižji podatek manjši (spodnja meja) in kolikokrat je najvišji podatek večji od povprečja (zgornja meja). V preglednici 18 so prikazane opisne statistike logaritmiranih vrednosti koncentracije citokinov IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ pri posameznih zdravih darovalcih.

Pri vseh merjenih citokinih je razpršenost posameznih logaritmiranih vrednosti koncentracije dosti manjša kot razpršenost nelogaritmiranih vrednosti. Tudi spodnja meja je na ta način določena pri vseh citokinih.

Preglednica 18: Opisne statistike logaritmiziranih vrednosti koncentracije citokinov IL-10, TGF- β 1, IL-4 in IFN- γ . Koncentracijo smo merili v kulturah PBMC iz venske krvi zdravih odraslih darovalcev. PBMC smo spodbujali z IONO&PMA in inkubirali 40 ur. Upoštevane so naše meritve in prejšnje meritve, ki so bile dobljene po enakih postopkih v istem laboratoriju.

parameter	IL-10	TGF- β 1	IL-4	IFN- γ
število D	43	37	41	41
\bar{Y} pg/ml	1,9617	3,2682	1,0439	4,1510
SD \bar{Y} pg/ml	0,26198	0,27246	0,27284	0,17677
G=10 \bar{Y} pg/ml	91,6	1855	11,1	14158
spodnja meja pg/ml	27,4	528,8	3,15	6272,8
zgornja meja pg/ml	306	6504	38,9	31956
KV \bar{Y} %	13,4	8,34	26,1	4,26

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulti in forbol 12-miristat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); D (darovalec); \bar{Y} (aritmetična sredina logaritmiziranih vrednosti koncentracije); SD \bar{Y} (standardni odklon logaritmiziranih vrednosti koncentracije); G (geometrijska sredina); spodnja meja (10^L , kjer je $L = \bar{Y} - 2SD \bar{Y}$); zgornja meja (10^H , kjer je $H = \bar{Y} + 2SD \bar{Y}$); KV \bar{Y} (koeficient variacije logaritmiziranih vrednosti koncentracije); IL-10 (interlevkin-10); TGF- β 1 (transformirajoči rastni faktor- β 1); IL-4 (interlevkin-4); IFN- γ (interferon- γ)

4.5 POPRAVEK NORMALNIH VREDNOSTI PRI SPREMENIBI REAGENTOV ZA MERJENJE IFN- γ

Uporabljeni kompleti pri metodi ELISA so namenjeni raziskovalnemu delu, zato jih je potrebno kritično nadzorovati. V ta namen vsi laboratorijski uporabljajo lastne kontrole, ki zagotavljajo medserijsko natančnost meritev.

Pri večkratnem merjenju citokina IFN- γ z novimi reagenti (Pierce Endogen, ZDA; sprememba lota), so rezultati pokazali precejšnje odstopanje od starejših meritev, zato smo se odločili, da ponovno izmerimo IFN- γ v vseh vzorcih z novimi reagenti in postavimo nove normalne vrednosti izdelovanja tega citokina, da bodo v bodoče potrebna manjša prilagajanja.

V preglednici 19 je prikazanih osemnajst starih meritev in na novo izmerjene vrednosti koncentracije enakih vzorcev z novimi reagenti. Spodaj so izračuni srednjih vrednosti in normalnih območij izdelovanja IFN- γ .

Preglednica 19: Stare meritve in nove vrednosti koncentracije IFN- γ (pg/ml) v kulturah PBMC pri posameznih zdravih odraslih darovalcih (n=18), ki so bile določene z novimi reagenti. PBMC so bile spodbujene z IONO&PMA in inkubirane 40 ur. Spodaj so prikazane srednje vrednosti (aritmetična in geometrična) ter normalna območja izdelovanja citokina IFN- γ , enkrat iz osnovnih podatkov in drugič iz logaritmiziranih vrednosti.

oznaka vzorca: starost (leta), spol D	stare meritve IFN- γ pg/ml	nove meritve IFN- γ pg/ml
250U: 21, M	4795	5342
334U: 44, M	21030	23380
433U: 21, M	13130	9783
451U: 21, M	12155	14740
278U: 21, M	8298	7914
6M: 23, Ž	17570	33400
24M: 23, Ž	14710	27550
36M: 53, Ž	9718	15680
118M: 46, Ž	22280	26740
65-J: 25, Ž	16470	19050
99-J: 37, M	9610	10680
104-J: 28, Ž	13580	13230
117-J: 54, Ž	17580	21060
127-J: 73, Ž	24320	32780
132-J: 50, M	10470	16340
95-J: 25, Ž	24080	26630
122-J: 44, Ž	17790	21870
145-J: 30, M	3774	6883
\bar{X}	14520	18503
SD	6155	8730
normalno območje ($\bar{X} \pm 2SD$)	od 2211 do 26829	od 1043 do 35963
G	13024	16313
spodnja meja - zgornja meja	4601 - 36864	5470 - 48653

Legenda: IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklerne celice iz venske krvi); D (darovalec); \bar{X} (aritmetična sredina); SD (standardni odklon); G (geometrijska sredina); IFN- γ (interferon- γ)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Veliko dosedanjih raziskav, ki so vključevale bolnike, katerih citokinski odziv so primerjali z zdravimi osebami, je v model preiskovanega citokinskega profila vključilo samo Th1 in Th2 citokinski odziv, ne pa tudi Th3 in Tr1. Nekateri so poleg IFN- γ , IL-4 in IL-2 proučevali tudi sintezo še nekaterih drugih citokinov, kot na primer IL-12 in tudi IL-10 (Repnik, 2000). Zadnje čase, ko je poraslo zanimanje za regulatorne citokine, kot sta IL-10 in TGF- β 1, ki uravnavajo citokinski odziv Th1 in Th2, se v vse več raziskav vključuje merjenje teh citokinov. Podatkov še ni veliko, zato smo se tudi mi lotili tega problema. Namen naše raziskave je bil oceniti citokinski profil Th1, Th2, Th3 in Tr1 na vzorcu zdravih preiskovancev.

V vsakem laboratoriju je pomembno določiti najbolj optimalno aktivacijo celic in čas gojenja celic glede na uporabljene raztopine in reagente, tako da so takšne meritve najbolj transparentne; da je koncentracija citokinov nad mejo zaznavnosti; da je razpršenost posameznih vrednosti čim manjša; da so razmerja med citokini dovolj jasna. Takšni podatki so potem dobra osnova za ugotavljanje imunskih nepravilnosti.

V naši raziskavi smo proučevali razmerje citokinov pri zdravih odraslih na nespecifični ravni. S poliklonskimi aktivatorji smo spodbujali imunske celice iz venske krvi ne glede na njihovo specifičnost oziroma vpletenost v imunski in vnetni odziv. Obstajajo pomisleki, da se izolirane celice *in vitro* obnašajo drugače kot *in vivo*, še zlasti, če jih je potrebno spodbujati k izdelovanju citokinov. V literaturi obstaja več prepričljivih nasprotnih podatkov, da je osamitev PBMC iz venske krvi, njihovo gojenje v celičnih kulturah in spodbujanje k sintezi citokinov *in vitro* primeren model za oceno zmožnosti limfocitov T in monocitov oziroma makrofagov, da izločajo citokine in za proučevanje vplivov, ki to zmožnost spreminja (Wraber, 1994; Kocjan in sod. 2000; Pala in sod., 2000; Repnik, 2000; Kocjan in sod., 2004; Avguštin in sod., 2005).

Na izdelovanje citokinov vplivajo tudi medcelični stiki in izločeni citokini. V celični kulturi so zaradi neposrednega spodbujanja celic k izdelovanju citokinov te interakcije

manj izrazite. Njihov pomen je večji, če je inkubacija daljša. Citokini Th1 oziroma Th2 spodbujajo izdelovanje istega tipa in zavirajo izdelovanje citokinov nasprotnega tipa. Repnik (2000) je ugotovila, da je bilo medsebojno uravnavanje citokinov najbolj izrazito po spodbujanju s CD3&PMA in PHA&PMA. Ugotovila je, da se je koncentracija IL-10, ki zavira izdelovanje citokinov Th1, v času inkubacije od 40 do 48 ur še vedno povečevala. IL-10 je tako omejil citokinski odziv Th1. Vendar pa po spodbujanju z IONO&PMA regulacijska vloga IL-10 ni bila tako zelo očitna. V svoji raziskavi je ugotovila tudi, da je bila po 40-urnem gojenju, še bolj izrazito pa po 48-urnem gojenju celic, koncentracija vseh citokinov največja po spodbujanju z IONO&PMA. Vendar so bila pri posameznih citokinih razmerja med koncentracijo po različnih načinih spodbujanja različna. Njeni rezultati so v smislu učinkovitosti spodbujevalcev podobni podatkom, ki jih navajajo drugi raziskovalci. Štiridesetura inkubacija celic PBMC po spodbujanju z IONO&PMA je bila učinkovita, zato smo jo uporabili tudi mi.

Spontano izločanje citokinov iz kultur PBMC, ki niso predhodno spodbujene, je zelo majhno ali nezaznavno. Zato je za merjenje citokinskega odziva citokinov nujno potrebno spodbujanje celic. S tem pa so lahko originalne lastnosti PBMC precej spremenjene. Zato se nekateri raziskovalci odločajo za kratek čas spodbujanja in tako spodbudijo le celice, ki so bile že aktivirane *in vivo* (El-Mezzein in sod., 2001). Izmerjena sinteza citokinov tako bolje odraža dejansko sintezo citokinov *in vivo*.

V naši raziskavi smo v manjši skupini zdravih preiskovancev primerjali dve različni metodi merjenja citokinskega odziva: aktivacija in sinteza v *in vitro* pogojih, kjer merimo izločene citokine v supernatantih z ELISO; znotrajcelično, z metodo pretočne citometrije. Korelacija pretočne citometrije z meritvami citokinskega odziva v *in vitro* pogojih, po spodbujanju PBMC z IONO&PMA, so bile za posamezne citokine nizke. Statistično pomembna korelacija je bila le pri primerjavi merjenja citokinov s pretočnim citometrom po 24-urni inkubaciji spodbujenih celic in merjenjem enakih citokinov z ELISO po 40-urnem gojenju spodbujenih celic. Pa še v tem primeru le za IFN- γ in IL-4, torej citokina odziva Th1 in Th2, ob tem da koeficient korelacije ni bil zelo visok. Povezavo med količino znotrajceličnih citokinov po 24 urah in količino izločenih citokinov je lahko razložiti z zaporedjem dogodkov pri aktivaciji celic. Najprej se aktivira sinteza citokinov,

sledi njihovo izločanje in kopiranje v supernatantih. Zato je razumljivo, da smo korelacijo našli samo pri merjenju citokinov v supernatantih z ELISO po 40-urni inkubaciji in merjenju s pretočnim citometrom po 24-urni inkubaciji, ne pa tudi pri pretočni citometriji po 5-urnem spodbujanju. Pri tako kratkem spodbujanju gre verjetno res samo za dodatno spodbudo celicam, aktiviranih *in vivo*.

Metodi merjenja citokinov z ELISA oziroma z znotrajceličnim barvanjem dajeta primerljive rezultate, saj ugotavlja, da je razmerje med deleži celic, ki izdelujejo določene citokine, podobno razmerju med koncentracijo teh citokinov v supernatantu celičnih kultur (Jung in sod., 1995). Zato naj bi bil v naših celičnih kulturah delež limfocitov Th1, ki izdelujejo IFN- γ , največji, sledili pa bi deleži limfocitov Th3, Tr1 in Th2. Vendar ni bilo tako. Največji delež celic po 24-urni inkubaciji je pripadel celicam, ki sintetizirajo IL-10, sledile so tiste, ki sintetizirajo IFN- γ , TGF- β 1 in IL-4.

Med merjenjem citokinov z ELISA oziroma z znotrajceličnim barvanjem kljub primerljivosti obstajajo pomembne razlike. Z znotrajceličnim barvanjem citokinov določamo celice, ki vsebujejo določeno (zaznavno) količino citokina in zato bolj neposredno merimo izdelovanje citokinov. Z metodo ELISA pa merimo koncentracijo prostih citokinov v supernatantu celičnih kultur, na katero poleg izdelovanja in izločanja citokinov iz celic vplivajo še poraba (vezava na citokinski receptor in endocitoza kompleksa) citokinov in njihova razgradnj.

Razlike v dobljenih rezultatih so najverjetneje posledica razlik v metodologiji, saj z omenjenima metodama merimo različne imunske parametre. Označevanje in merjenje znotrajceličnih citokinov omogoča natančnejše določanje funkcionalnih podtipov mešane populacije celic T in števila celic, ki izdelujejo določene citokine in do določene mere tudi oceno koncentracije izdelanih citokinov. Dokaz prisotnosti znotrajceličnega citokina ni kazalec bioloških učinkov tega citokina, oziroma njegovega sproščanja iz celice v *in vivo* oziroma *in vitro* pogojih. Metoda ELISA naj bi imela tudi večjo specifičnost, saj metoda uporablja tehniko sendviča, pri kateri morata biti prepoznana dva različna epitopa citokina, da dobimo pozitivni odziv in odčitamo ustrezni citokin (Pala in sod., 2000).

Torej lahko razlike med meritvami s pretočnim citometrom in z metodo *in vitro* določanja citokinov delno pripisemo tudi temu, da smo z ELISA določali celokupne citokine, ki jih izločajo posamezne celice, s pretočnim citometrom pa smo določali znotrajcelične citokine le pri celicah CD3⁺, torej le pri limfocitih T. Različne celice pa so vir različnih citokinov. Določanje znotrajceličnih citokinov na osnovi posameznih celic je dober način za oceno imunskega statusa bolnikov. V mnogih raziskavah so pokazali, da obstaja dobra povezava med citokinskim profilom in klinično sliko pacientov. Hkratno zaznavanje citokinov in antigenov celične površine nam omogoča določanje citokinskega profila v različnih subpopulacijah celic T. Tako lahko določimo katere celice (CD4⁺ ali CD8⁺) so bolj pomembne pri patogenezi določenih bolezni. Spodbujanje PBMC z IONO&PMA vodi v sintezo ali IL-2 ali IFN- γ . Le majhen odstotek celic sintetizira oba citokina hkrati (Jung in sod., 1993). Inogés in sod. (1999) navajajo, da je potrebna nespecifična aktivacija limfocitov, da je sinteza citokinov dovolj velika za zaznavo. Tudi v nekaterih drugih raziskavah ugotavljajo, da je spodbujanje potrebno, saj je zaznavanje mnogih citokinov brez spodbujanja pod mejo merljivosti (Gobec in sod. 2001, 2004).

Neposredna primerjava naših rezultatov s podatki iz literature ni mogoča iz dveh razlogov. Prvi razlog je variabilnost metod, ki lahko prispeva k razlike v rezultatih posameznih raziskav in vključuje: razlike v pripravi celic, različne pogoje kultur, različne medije za spodbujanje celic, razlike v trajanju gojenja kultur, vrsta in koncentracija mitogena, uporaba dodatnega seruma, ki je lahko moteč dejavnik. Razlike v trajanju gojenja spodbujenih celičnih kultur vplivajo na količino izločenih citokinov. Ugotovili smo, da je bila srednja vrednost koncentracije IL-10 po 24-urnem gojenju nekoliko manjša kot po 40-urnem gojenju celic. Ravno obratno pa je veljalo za TGF- β 1. Sicer pa razlike niso bile tolikšne, da bi spremenile razmerja med citokini. Tudi metode ELISA različnih proizvajalcev ne dajo enakih rezultatov. Celo sprememba lota reagentov pri istem proizvajalcu se lahko odraži v drugačnih izmerjenih vrednostih koncentracije citokinov v istem vzorcu, zato je vsaki seriji merjenja citokinov potrebno dodati interno kontrolo in voditi kontrolne karte. Pri podjetju Pierce Endogen (ZDA) so spremenili lot reagentov za določanje IFN- γ , tako da smo za določitev normalnih vrednosti po tej spremembi še enkrat izmerili IFN- γ in določili novo normalno območje.

Drugi razlog so različne metode za določanje citokinov. Citokine lahko določamo z ELISA, znotrajceličnim barvanjem in tudi drugimi metodami. Lahko pa s podatki iz objav primerjamo razmerja koncentracije med različnimi citokini. Mi smo največje vrednosti izmerili z ELISA po 40-urni inkubaciji za IFN- γ , sledijo TGF- β 1, IL-10 in IL-4. Ravno tako je Repnik (2000) izmerila največjo koncentracijo za IFN- γ , sledile so TGF- β 1 (neobjavljeni), IL-10 in IL-4. Tudi Bilač (1996) je izmerila največjo koncentracijo za IFN- γ , manjšo za TGF- β 1 in najmanjšo za IL-4. Razlike med temi vrednostmi koncentracije so bile vedno velike. Obedve sta določevali citokine v našem laboratoriju in po enakih postopkih, zato so naši rezultati z njunimi bolj primerljivi, kot z rezultati drugih raziskovalcev. Naša raziskava ima še nekatere metodološke omejitve. Citokinski odziv smo pri posameznikih merili samo enkrat, v mrzlem zimskem obdobju, ko so bili ljudje precej dovzetni za prehlade. Z enkratnim merjenjem smo tvegali učinek psihičnega in fizičnega stresa na imunski sistem.

Razlike v izdelovanju citokinov med posameznimi darovalci v naših poskusih so bile precejšnje. Vendar tako velike ali še večje razlike med posamezniki opazimo tudi v člankih in drugih poskusih (Wraber, 1994; Bilač, 1996; Ferry in sod., 1997; Repnik, 2000). Obstajajo velike razlike v citokinskem odzivu, ki je del zapletenega imunskega odziva. Razlogi za to so lahko tudi v polimorfizmih molekul, ki uravnavaajo imunki sistem. Majhen del razlik v rezultatih pa gre tudi na račun napake metode, kamor prištevamo razlike med posameznimi poskusi v koncentraciji celic v celični kulturi, koncentraciji aktivatorjev, razlike v kontaminaciji celičnih kultur z granulociti, napake, ki nastanejo pri redčenju vzorcev, razlike med testi ELISA.

Citokine IL-4, IFN- γ , IL-10 in TGF- β 1 so že merili v istem laboratoriju, po enakih postopkih in z enakimi reagenti kot smo jih uporabljali mi. Za efektorska citokina je bilo meritev več, za IL-10 in predvsem TGF- β 1 pa je bilo teh meritev manj, zato smo jih želeli dopolniti. Poleg tega nas je zanimalo, če z večanjem meritev ugotovimo, da se normalna območja izdelovanja citokinov zelo spreminja. Iz rezultatov je razvidno, da se za posamezne citokine izračunani kumulativni koeficienti variacije ne spreminjačjo prav dosti, iz česar bi lahko sklepali, da je razpršenost podatkov realna slika izdelovanja citokinov pri zdravih odraslih ljudeh.

Ker razlike med našimi meritvami in prejšnjimi meritvami v tem laboratoriju niso bile statistično različne, smo prejšnje podatke razširili z našimi in izračunali nova normalna območja izdelovanja citokinov. Po 40-urnem spodbujanju PBMC z IONO&PMA, je največje izločanje IFN- γ , manjše TGF- β 1, sledita IL-10 in IL-4. Razlike med količinami teh izločenih citokinov so precejšnje. Normalna območja, določena iz teh vrednosti, so rezultat raziskave z zdravimi osebami in bodo služila kot primerjave za vse študije o imunsko pogojenih boleznih, ki se bodo izvajale v našem laboratoriju.

Iz slik 7 in 8 je razvidno, da je razpršenost posameznih meritev najmanjša za IFN- γ . Zaradi tega je bilo le pri tem citokingu mogoče določiti spodnjo mejo normalnega območja izdelovanja, ki jo predstavlja aritmetična sredina, zmanjšana za dve standardni deviaciji. Pri ostalih treh dobimo na tak način za spodnjo mejo izdelovanja negativno vrednost. Zaradi tega smo pomislili na drugačen statistični prikaz podatkov. Odločili smo se, da podatke logaritmiramo in izračunamo geometrijsko sredino. Tako smo dobili za vse citokine pozitivne spodnje meje normalnih območij, kar pomeni, da smo v normalna območja zajeli vse izmerjene vrednosti. Razmerja med citokini so ostala enaka. Ugotavljamo, da geometrijska sredina bolje opiše srednjo vrednost in verjetno bi bilo smiselno tudi, če bi vse statistične analize izvajali na podlagi logaritmiranih vrednosti.

El-Mezzein in sod. (2001) so pri bolnikih z določenimi alergijami pri spodbujanju PBMC in določanju količine IgE ter koncentracije citokinov *in vitro*, pred statistično analizo dobljene podatke najprej logaritmirali in jih predstavili v obliki geometrijske sredine ter 95 % intervalov zaupanja. Obstajajo tudi druge raziskave, ki so dobljene podatke po spodbujanju PBMC in določanju citokinov *in vitro* predstavili z geometrično srednjo vrednostjo (Kimura in sod., 1999). Gereda in sod. (2000) so citokine določevali z metodo pretočne citometrije in nekatere podatke logaritmično transformirali, da so dobili normalno distribucijo za nadaljnje statistične analize.

Za razvoj odziva Th1 je zelo pomembna prisotnost citokina IL-12. El-Mezzein je s sodelavci (2001) v svoji raziskavi ugotovil, da se koncentracija IL-12 ne razlikuje pri bolnikih z atopijskim dermatitisom, bolnikih z alergijsko bronhialno astmo in zdravih kontrolah. Druga mogoča razloga je, da se med alergičnimi bolniki in ne-alergičnimi

kontrolami razlikujejo regulatorni citokini, ki so vključeni v sintezo IFN- γ . Zato bi bila analiza regulatornih citokinov smiselna. Pomembno je tudi ugotavljanje, kje v procesu sinteze citokinov se pojavlja nepravilnost. Nekateri raziskovalci merijo ekspresijo citokinskih mRNA in s tem ugotavljajo, na katerem mestu je okvarjena pot za sintezo citokinov. El-Mezzein in sod. (2001) so ugotovili razlike med ekspresijo mRNA za IFN- γ in količino izločenega IFN- γ pri bolnikih z določenimi alergijami, iz česar so sklepali, da zmanjšana sinteza IFN- γ ni povezana z napačnim uravnavanjem transkripcije, ampak s post-transkripcijsko napako v sintezi IFN- γ . Pri raziskavah citokinov *in vitro* je pomembno vprašanje ali je neuravnovešenost citokinov vzrok ali posledica bolezenskega procesa.

Novejše raziskave vključujejo tudi regulatorne citokine, kot sta IL-10 in TGF- β 1. Scala in sod. (2004) so proučevali ravni citokinov in kemokinov po spodbujanju PBMC pri bolnikih s progresivno sistemsko sklerozo. Med drugim so izmerili tudi IFN- γ , IL-4, IL-10 in TGF- β 1 tako pri bolnikih kot pri dvajsetih zdravih prostovoljcih. Razmerja citokinov pri zdravih prostovoljcih so bila sledeča: TGF- β 1 > IL-10 >> IFN- γ > IL-4. Po naših meritvah pa je bila sinteza IFN- γ največja. Razlike so verjetno posledica v načinu spodbujanja. Scala in sod. (2004) so v ta namen uporabili PHA, mi pa smo celice PBMC spodbujali z IONO&PMA. Na razlike pa je lahko vplival tudi inkubacijski čas, ki je bil pri nas nekoliko krajši. Scala in sod. (2004) so merili citokine, ki so jih sintetizirale celice PBMC in linije celic T. Iz mononuklearnih celičnih kultur so vzgojili poliklonско linijo celic T in te celice spodbujali z IONO&PMA 48 ur in nato merili citokine. Zanimivo je, da so pri merjenju efektorskih in regulatornih citokinov, ki so jih proizvajale celice T, razmerja med temi citokini enaka našim razmerjem: IFN- γ > TGF- β 1 > IL-10 > IL-4. Celice T so proizvajale zmanjšane količine regulatornih citokinov, za razliko od celic PBMC, ki so imele povečano sintezo IL-10. Poznano je, da so glavni viri IL-10 iz PBMC celice B in monociti, nekaj pa prispevajo tudi celice T (Csiszár in sod., 2000), kar lahko razloži opažene razlike. In ker smo mi PBMC spodbujali z IONO, ki domnevno zavira sintezo regulatornih citokinov, je zato slika z izločenimi citokini s strani celic T bolj podobna.

Veliko raziskovalcev, ki se ukvarjajo s proučevanjem bolezni, ki se kažejo tudi v citokinskih spremembah, merijo citokinski profil. Pomembno je tudi napredovanje bolezni.

Scala in sod. (2004) so poudarili, da so njihovi bolniki imeli že vzpostavljen bolezensko stanje in da bi bilo zanimivo proučevati citokinski profil med samim razvojem in v akutni fazi bolezni, ko je imunski odziv najbolj buren. Pri merjenju TGF- β 1 je treba upoštevati, da se meri celotna količina TGF- β 1, znano pa je, da je le manjši del v biološko aktivni obliki, ki vpliva na uravnavanje in je pomemben pri določenih boleznih.

Danes je citokinski odziv *in vitro* zanimiv za proučevanje patogeneze bolezni, uvajanje novih terapevtskih pristopov ter za spremljanje napredovanja bolezni ali uspešnosti terapije. Namen naših poskusov je bil osvetliti razmerja med posameznimi citokini v izbranih pogojih gojenja PBMC in določiti normalna območja izdelovanja citokinov po *in vitro* aktivaciji PBMC iz venske krvi zdravih odraslih, ki bodo uporabna za proučevanje nepravilnosti v delovanju imunskega sistema pri različnih imunsko pogojenih boleznih.

5.2 SKLEPI

Normalni odziv Th3 bi lahko, glede na naše in prejšnje podatke, opredelili z normalnima območjema izdelovanja IL-10 in TGF- β 1. Po 40-urnem spodbujanju z IONO in PMA smo določili naslednje srednje vrednosti in standardne odklone ($\bar{X} \pm SD$) ter normalna območja ($\bar{X} \pm 2SD$) za ta dva regulatorna citokina: za IL-10 $108 \pm 60,3$ pg/ml in normalno območje od nezaznavnega do 228 pg/ml; za TGF- β 1 2181 ± 1151 pg/ml in normalno območje od nezaznavnega do 4483 pg/ml.

Na novo smo določili tudi srednje vrednosti in standardne odklone ($\bar{X} \pm SD$) ter normalna območja ($\bar{X} \pm 2SD$) izdelovanja dveh efektorskih citokinov, značilnih za odziv Th1 in Th2: za IFN- γ 15201 ± 5235 pg/ml in normalno območje od 4731 do 25671 pg/ml; za IL-4 $13,5 \pm 9,58$ pg/ml in normalno območje od nezaznavnega do 32,7 pg/ml.

Rezultati kažejo na to, da so v primeru efektorskih citokinov IL-4 in IFN- γ najbolje primerljivi podatki o koncentraciji, izmerjeni z ELISO po 40-urni inkubaciji ter podatki o enakih znotrajceličnih citokinih, pridobljeni po 24-urni inkubaciji in merjenju s pretočnim

citometrom. Vrednosti koncentracije regulatornih citokinov IL-10 in TGF- β 1, določene z ELISO in pretočnim citometrom, niso primerljive.

Z razširjanjem števila vzorcev se koeficient variacije ni bistveno spreminja, kar pomeni, da je verjetno v populaciji dejansko prisotna takšna razpršenost v vrednostih koncentracije posameznih citokinov.

Zaradi spremembe lota reagentov za IFN- γ (ELISA), smo ta citokin ponovno izmerili v vseh vzorcih z novimi reagenti in nato določili novo srednjo vrednost in standardni odklon ($\bar{X} \pm SD$) ter novo normalno območje ($\bar{X} \pm 2SD$) za IFN- γ : 18503 ± 8730 pg/ml in normalno območje od 1043 do 35963 pg/ml.

Ugotovili smo, da je, zaradi razpršenosti podatkov, za opis srednje vrednosti bolj primerna geometrijska sredina kot aritmetična. Z logaritmiranjem podatkov je tudi bolje določeno normalno območje, saj je v tem primeru določena tudi spodnja meja. Normalni regulatorni odziv je tako opredeljen z naslednjimi parametri: IL-10 z geometrijsko sredino 91,6 pg/ml, spodnjo mejo 27,4 pg/ml in zgornjo mejo 306 pg/ml; TGF- β 1 z geometrijsko sredino 1855 pg/ml, spodnjo mejo 528,8 pg/ml in zgornjo mejo 6504 pg/ml. Na ta način smo določili tudi normalno območje dveh efektorskih citokinov: za IL-4 znaša geometrijska sredina 11,1 pg/ml, spodnja meja 3,15 pg/ml in zgornja meja 38,9 pg/ml; za IFN- γ znaša geometrijska sredina 16313 pg/ml, spodnja meja 5470 pg/ml in zgornja meja 48653 pg/ml.

6 POVZETEK

Ustrezne imunske celice morajo z medsebojnim signaliziranjem uskladiti svoje aktivnosti v primerno organiziran imunski odziv. Zelo pomembno je medcelično signaliziranje preko topnih glikoproteinskih signalnih molekul - citokinov, ki jih izdelujejo imunske celice in imajo ključno vlogo pri posredovanju in uravnavanju specifičnega imunskega odziva. Citokine lahko razdelimo na efektorske in regulatorne. Citokini Th1 (IFN- γ in drugi) spodbujajo celično posredovani imunski odziv, citokini Th2 (IL-4 in drugi) pa močan protitelesni imunski odziv. Obstajajo vsaj tri podvrste celic T CD4 $^{+}$, ki imajo regulatorno funkcijo: celice T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$, celice Tr1 in celice Th3. Ti različni tipi znižujejo imunski odziv z neposrednim sodelovanjem celic (CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$) ali pa z izločanjem regulatornih citokinov (Tr1 izločajo IL-10, Th3 in CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ izločajo TGF- β 1). Neustreznost uravnavanja je najpomembnejši dejavnik pri patoloških imunskih odzivih, kot so npr. avtoimunske bolezni in preobčutljivostna stanja. Razumevanje delovanja imunskega sistema z vidika citokinskih odzivov bi lahko prispevalo k pojasnitvi nastanka bolezni, k uvajanju novih terapevtskih pristopov ter za spremljanje napredovanja bolezni ali uspešnosti terapije. Če želimo opredeliti motnje v imunskega uravnavanju, proučujemo, kakšna je zmožnost celic, ki smo jih osamili iz organizma, za izdelovanje citokinov *in vitro*. Ta lastnost imunskih celic je namreč pri nekaterih bolezenskih stanjih spremenjena ali je celo vzrok za razvoj bolezni. V nalogi smo žeeli določiti normalna območja izdelovanja IFN- γ , IL-4, IL-10 in TGF- β 1 v limfocitih in makrofagih iz venske krvi zdravih odraslih darovalcev. Iz venske krvi zdravih darovalcev smo pripravili kulture mononuklearnih celic (PBMC), jih aktivirali z ionomicinom in PMA (IONO&PMA), gojili 24 in 40 ur v inkubatorju CO₂ ter ocenili citokinske odzive: efektorske citokine odziva Th1 in Th2 ter regulatorne citokine odziva Tr1 in Th3. Normalna območja izdelovanja ($\bar{X} \pm 2SD$) smo določili po 40-urnem gojenju celic. Koncentracijo citokinov v supernatantu celičnih kultur smo izmerili z metodo ELISA. Zaporedje srednjih vrednosti koncentracije citokinov je bilo naslednje: IFN- γ >> TGF- β 1 >> IL-10 >> IL4. Citokini IL-4, IFN- γ , IL-10 in TGF- β 1 so bili že merjeni v istem laboratoriju in po enakih postopkih, kot smo jih uporabljali mi. Prejšnje podatke smo razširili z našimi in izračunali nova normalna območja ($\bar{X} \pm 2SD$) izdelovanja teh citokinov. Po 40-urnem spodbujanju z IONO&PMA

smo tako določili naslednje srednje vrednosti in standardne odklone ($\bar{X} \pm SD$) ter normalna območja ($\bar{X} \pm 2SD$): za IL-10 $108 \pm 60,3$ pg/ml in normalno območje od nezaznavnega do 228 pg/ml; za TGF- $\beta 1$ 2181 ± 1151 pg/ml in normalno območje od nezaznavnega do 4483 pg/ml; za IFN- γ 15201 ± 5235 pg/ml in normalno območje od 4731 do 25671 pg/ml; za IL-4 $13,5 \pm 9,58$ pg/ml in normalno območje od nezaznavnega do 32,7 pg/ml. Zaradi spremembe lota reagentov za IFN- γ , smo ta citokin ponovno izmerili v vseh vzorcih z novimi reagenti in nato določili novo srednjo vrednost in standardni odklon ($\bar{X} \pm SD$) ter novo normalno območje ($\bar{X} \pm 2SD$) za IFN- γ : 18503 ± 8730 pg/ml in normalno območje od 1043 do 35963 pg/ml. Z razširjanjem števila vzorcev se koeficient variacije ni bistveno spremenjal, kar pomeni, da je verjetno v populaciji dejansko prisotna takšna razpršenost v vrednostih koncentracije posameznih citokinov. Ugotovili smo, da je, zaradi razpršenosti podatkov, za opis srednje vrednosti verjetno bolj primerna geometrijska sredina kot aritmetična. Z logaritmiranjem podatkov je tudi bolje določeno normalno območje, saj je v tem primeru določena tudi spodnja meja. Normalni regulatorni odziv je tako opredeljen z naslednjimi parametri: IL-10 z geometrijsko sredino 91,6 pg/ml, spodnjo mejo 27,4 pg/ml in zgornjo mejo 306 pg/ml; TGF- $\beta 1$ z geometrijsko sredino 1855 pg/ml, spodnjo mejo 528,8 pg/ml in zgornjo mejo 6504 pg/ml. Na ta način smo določili tudi normalno območje dveh efektorskih citokinov: za IL-4 znaša geometrijska sredina 11,1 pg/ml, spodnja meja 3,15 pg/ml in zgornja meja 38,9 pg/ml; za IFN- γ znaša geometrijska sredina 16313 pg/ml, spodnja meja 5470 g/ml in zgornja meja 48653 pg/ml. Na manjšem vzorcu smo v celicah T CD3 $^{+}$ z metodo pretočne citometrije določili delež znotrajceličnih IFN- γ , IL-4, IL-10 in TGF- $\beta 1$ po 5 in 24-urni inkubaciji. Izračunali smo korelacijo teh dveh različnih metod določanja citokinov. Stopnja korelacije je bila statistično pomembna pri merjenju efektorskih citokinov (IL-4 in IFN- γ). Koncentracija teh dveh citokinov je primerljiva z ELISO po 40-urni inkubaciji spodbujenih PBMC in znotrajceličnim določanjem s pretočnim citometrom po 24-urni inkubaciji spodbujenih PBMC. Pri nobenem od ostalih dveh merjenih citokinov oz. pri drugih pogojih korelacija ni bilo.

7 VIRI

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. 1997. Cellular and Molecular Immunology. Third Edition. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 494 str.

Apostolou I., von Boehmer H. 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *The Journal Of Experimental Medicine*, 199: 1401-1408

Altman A., Mally M.I., Isakov N. 1992. Phorbol ester synergizes with Ca^{2+} ionophore in activation of protein kinase C (PKC) α and PKC β isoenzymes in human T cells and in induction of related cellular functions. *Immunology*, 76: 465-471

Avguštin B., Wraber B., Tavčar R. 2005. Increased Th1 and Th2 immune reactivity with relative Th2 dominance in patients with acute exacerbation of schizophrenia. *Croatian Medical Journal*, 46, 2: 268-274

Bacchetta R., de Waal Malefijt R., Yssel H., Abrams J., de Vries J.E., Spits H., Roncarolo M.G. 1990. Host-reactive CD4+ and CD8+ T cell clones isolated from a human chimera produce IL-5, IL-2, IFN-gamma and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor but not IL-4. *Journal Of Immunology*, 144: 902-908

Bacchetta R., Sartirana C., Levings M.K., Bordignon C., Narula S., Roncarolo M.G. 2002. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *European Journal Of Immunology*, 32: 2237-2245

Barcellini W., Rizzardi G.P., Velati C., Borghi M.O., Fain C., Lazzarin A., Meroni P.L. 1995. In vitro production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from high-risk HIV-negative intravenous drug users. *AIDS*, 9: 691-694

Barrat F.J., Cua D.J., Boonstra A., Richards D.F., Crain C., Savelkoul H.F., de Waal-Malefyt R., Coffman R.L., Hawrylowicz C.M., O'Garra A. 2002. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *The Journal Of Experimental Medicine*, 195: 603-616

Belghith M., Bluestone J.A., Barriot S., Mégret J., Bach J.F., Chatenoud L. 2003. TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nature Medicine*, 9: 1202-1208

Belkaid Y. 2003. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert Opinion On Biological Therapy*, 3: 875-885

Bilač M. 1996. Interlevkin 2 in njegov specifični receptor v primarnih kulturah mononuklearnih celic. Diplomska naloga. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 56 str.

BΦyum A. 1964. Separation of white blood cells. *Nature*, 204: 793-794

Cautain B., Damoiseaux J., Bernard I., van Straaten H., van Breda Vriesman P., Boneu B., Druet P., Saoudi A. 2001. Essential role of TGF-beta in the natural resistance to experimental allergic encephalomyelitis in rats. *European Journal Of Immunology*, 31: 1132-1140

Cavani A., Nasorri F., Prezzi C., Sebastiani S., Albanesi C., Girolomoni G. 2000. Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *The Journal Of Investigative Dermatology*, 114: 295-302

Cerwenka A., Swain S.L. 1999. TGF-β1: immunosuppressant and viability factor for T lymphocytes. *Microbes and Infection*, 1: 1291-1296

Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., Marinos N., McGrady G., Wahl S.M. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal Of Experimental Medicine*, 198: 1875-1886

Clementi E., Martino G., Grimaldi L.M., Brambilla E., Meldolesi J. 1994. Intracellular Ca²⁺ stores of T lymphocytes: changes induced by in vitro and in vivo activation. *European Journal Of Immunology*, 24: 1365-1371

Collins D.P., Luebering B.J., Shaut D.M. 1998. T-lymphocyte functionality assessed by analysis of cytokine receptor expression, intracellular cytokine expression, and femtomolar detection of cytokine secretion by quantitative flow cytometry. *Cytometry*, 33: 249-255

Csiszár A., Nagy G., Gergely P., Pozsonyi T., Pócsik E. 2000. Increased interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clinical And Experimental Immunology*, 122: 464-470

Dieckmann D., Bruett C.H., Ploettner H., Lutz M.B., Schuler G. 2002. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *The Journal Of Experimental Medicine*, 196: 247-253

Doetze A., Satoguina J., Burchard G., Rau T., Lölicher C., Fleischer B., Hoerauf A. 2000. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by Th3/Tr1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a Th1 to Th2 shift. *International Immunology*, 12: 623-630

El-Mezzein R.E., Matsumoto T., Nomiyama H., Miike T. 2001. Increased secretion of IL-18 in vitro by peripheral blood mononuclear cells of patients with bronchial asthma and atopic dermatitis. *Clinical And Experimental Immunology*, 126: 193-198

- Esnault S., Benbernou N., Lavaud F., Shin H.C., Potron G., Guenounou M. 1996. Differential spontaneous expression of mRNA for IL-4, IL-10, IL-13, IL-2 and interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from atopic patients. *Clinical And Experimental Immunology*, 103, 1: 111-118
- Ferry B., Antrobus P., Huzicka I., Farrell A., Lane A., Chapel H. 1997. Intracellular cytokine expression in whole blood preparations from normals and patients with atopic dermatitis. *Clinical And Experimental Immunology*, 110: 410-417
- Gajewski T.F., Schell S.R., Fitch F.W. 1990. Evidence implicating utilization of different T cell receptor-associated signaling pathways by TH1 and TH2 clones. *Journal Of Immunology*, 144: 4110-4120
- Gereda J.E., Leung D.Y., Thatayatikom A., Streib J.E., Price M.R., Klinnert M.D., Liu A.H. 2000. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet*, 355: 1680-1683
- Gershon R.K., Kondo K. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 18: 723-735
- Gershon R.K., Kondo K. 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology*, 21: 903-914
- Gershon R.K. 1975. A disquisition on suppressor T cells. *Transplantation Reviews*, 26: 170-85
- Givan A.L. 1992. Flow cytometry- first principles. New York, Wiley - Liss: 15-103
- Gobec S., Urleb U., Simčič S., Wraber B. 2001. Synthesis and modulation of cytokine production by two new adamantane substituted acyclic desmuramyldipeptide analogs. *Die Pharmazie*, 56, 7: 523-526
- Gobec S., Sollner-Dolenc M., Urleb U., Wraber B., Simčič S., Filipič M. 2004. Modulation of cytokine production by some phthalimido-desmuramyl dipeptides and their cytotoxicity. *Farmaco*, 59: 345-352
- Gorelik L., Flavell R.A. 2000. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity*, 12: 171-181
- Graca L., Cobbold S.P., Waldmann H. 2002. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *The Journal Of Experimental Medicine*, 195: 1641-1646
- Groux H., O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries J.E., Roncarolo M.G. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389: 737-742
- Groux H., Bigler M., de Vries J.E., Roncarolo M.G. 1998. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *Journal Of Immunology*, 160: 3188-3193

Harrington L.E., Mangan P.R., Weaver C.T. 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Current Opinion in Immunology*, 18: 349-356

Holm T.L., Nielsen J., Claesson M.H. 2004. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology. *APMIS* 112: 629-41

Hutchcroft J.E., Tsai B., Bierer B.E. 1996. Differential phosphorylation of the T lymphocyte costimulatory receptor CD28. Activation-dependent changes and regulation by protein kinase C. *The Journal Of Biological Chemistry*, 271: 13362-13370

Ihan A. 1999. Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom. Kranj, Kemomed: 64 str.

Ihan A., Kotnik V. 2002. Bakterija in gostitelj. Prirojena imunost. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. Ljubljana, Medicinski razgledi: 89-104

Inogés S., Merino J., Bandrés E., De Castro P., Subirá M.L., Sánchez-Ibarrola A. 1999. Cytokine flow cytometry differentiates the clinical status of multiple sclerosis (MS) patients. *Clinical And Experimental Immunology*, 115: 521-525

Itoh M., Takahashi T., Sakaguchi N., Kuniyasu Y., Shimizu J., Otsuka F., Sakaguchi S. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *Journal Of Immunology*, 162: 5317-26

Iwashiro M., Messer R.J., Peterson K.E., Stromnes I.M., Sugie T., Hasenkrug K.J. 2001. Immunosuppression by CD4+ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 98: 9226-9230

Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M., Tuettenberg A., Knop J., Enk A.H. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *The Journal Of Experimental Medicine*, 193: 1285-94

Jonuleit H., Schmitt E., Kakirman H., Stassen M., Knop J., Enk A.H. 2002. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *The Journal Of Experimental Medicine*, 196: 255-260

Jung T., Lack G., Schauer U., Überück W., Renz H., Gelfand E.W., Rieger C.H. 1995. Decreased frequency of interferon-gamma- and interleukin-2-producing cells in patients with atopic diseases measured at the single cell level. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, 96: 515-527

Jung T., Schauer U., Heusser C., Neumann C., Rieger C. 1993. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Journal Of Immunological Methods*, 159: 197-207

Kallmann B.A., Hüther M., Tubes M., Feldkamp J., Bertrams J., Gries F.A., Lampeter E.F., Kolb H. 1997. Systemic bias of cytokine production toward cell-mediated immune regulation in IDDM and toward humoral immunity in Graves' disease. *Diabetes*, 46: 237-243

Kehrl J.H., Wakefield L.M., Roberts A.B., Jakowlew S., Alvarez-Mon M., Deryck R., Sporn M.B., Fauci A.S. 1986. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *The Journal Of Experimental Medicine*, 163: 1037-1050

Kidd P. 2003. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitation, and implications for health and disease. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 8: 223-246

Kimura M., Tsuruta S., Yoshida T. 1999. Differences in cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) between patients with atopic dermatitis and bronchial asthma. *Clinical And Experimental Immunology*, 118: 192-196

Kitani A., Chua K., Nakamura K., Strober W. 2000. Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells. *Journal Of Immunology*, 165: 691-702

Klein J. 1990. Defence reactions mediated by phagocytes. In: *Immunology*. Boston, London, Edinburgh, Melbourne, Blackwell Scientific Publications: 311-334

Kocjan T. 1999. Spremembe v razmerju citokinov Th1 in Th2 pri bolnikih z avtoimunsko hipertirozo. Magistrsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 50 str.

Kocjan T., Wraber B., Kocijancic A., Hojker S. 2004. Methimazole upregulates T-cell-derived cytokines without improving the existing Th1/Th2 imbalance in Graves' disease. *Journal Of Endocrinological Investigation*, 27: 302-307

Kocjan T., Wraber B., Repnik U., Hojker S. 2000. Changes in Th1/Th2 cytokine balance in Graves' disease. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 440: R94-R95

Kopitar A.N. 2004. Vpliv bakterijskih antigenskih pripravkov na aktivacijo limfocitov s pomočjo gojenih dendritičnih celic. Diplomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 53 str.

Krug N., Madden J., Redington A.E., Lackie P., Djukanovic R., Schauer U., Holgate S.T., Frew A.J., Howarth P.H. 1996. T-cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*, 14: 319-326

Kullberg M.C., Hay V., Cheever A.W., Mamura M., Sher A., Letterio J.J., Shevach E.M., Piccirillo C.A. 2005. TGF-beta1 production by CD4+ CD25+ regulatory T cells is not essential for suppression of intestinal inflammation. *European Journal Of Immunology*, 35: 2886-2895

Lécart S., Boulay V., Raison-Peyron N., Bousquet J., Meunier L., Yssel H., Pène J. 2001. Phenotypic characterization of human CD4+ regulatory T cells obtained from cutaneous dinitrochlorobenzene-induced delayed type hypersensitivity reactions. *The Journal Of Investigative Dermatology*, 117: 318-325

Letterio J.J., Roberts A.B. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review Of Immunology*, 16: 137-161

Levings M.K., Sangregorio R., Galbiati F., Squadrone S., de Waal Malefy R., Roncarolo M.G. 2001a. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *Journal Of Immunology*, 166: 5530-5539

Levings M.K., Sangregorio R., Roncarolo M.G. 2001b. Human CD25(+)CD4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *The Journal Of Experimental Medicine*, 193: 1295-1302

Levings M.K., Bacchetta R., Schulz U., Roncarolo M.G. 2002a. The role of IL-10 and TGF- β in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *International Archives of Allergy and Immunology*, 129: 263-276

Levings M.K., Sangregorio R., Sartirana C., Moschin A.L., Battaglia M., Orban P.C., Roncarolo M.G. 2002b. Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *The Journal Of Experimental Medicine*, 196: 1335-46

Liu C., Hermann T.E. 1978. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *The Journal Of Biological Chemistry*, 253: 5892-5894

Llorente L., Zou W., Levy Y., Richaud-Patin Y., Wijdenes J., Alcocer-Varela J., Morel-Fourrier B., Brouet J.C., Alarcon-Segovia D., Galanaud P., Emilie D. 1995. Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *The Journal Of Experimental Medicine*, 181: 839-844

Llorente L., Richaud-Patin Y., Couderc J., Alarcon-Segovia D., Ruiz-Soto R., Alcocer-Castillejos N., Alcocer-Varela J., Granados J., Bahena S., Galanaud P., Emilie D. 1997. Dysregulation of interleukin-10 production in relatives of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis And Rheumatism*, 40: 1429-1435

Mamura M., Lee W., Sullivan T.J., Felici A., Sowers A.L., Allison J.P., Letterio J.J. 2004. CD28 disruption exacerbates inflammation in Tgf-beta1 $^{-/-}$ mice: in vivo suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells independent of autocrine TGF-beta1. *Blood*, 103: 4594-4601

Marie J.C., Letterio J.J., Gavin M., Rudensky A.Y. 2005. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *The Journal Of Experimental Medicine*, 201: 1061-1067

- McHugh S., Deighton J., Rifkin I., Ewan P. 1996. Kinetics and functional implications of Th1 and Th2 cytokine production following activation of peripheral blood mononuclear cells in primary culture. *European Journal Of Immunology*, 26, 6: 1260-1265
- Meroni L., Trabattoni D., Balotta C., Riva C., Gori A., Moroni M., Luisa Villa M., Clerici M., Galli M. 1996. Evidence for type 2 cytokine production and lymphocyte activation in the early phases of HIV-1 infection. *AIDS*, 10: 23-30
- Min D.J., Cho M.L., Cho C.S., Min S.Y., Kim W.U., Yang S.Y., Min J.K., Hong Y.S., Lee S.H., Park S.H., Kim H.Y. 2001. Decreased production of interleukin-12 and interferon-gamma is associated with renal involvement in systemic lupus erythematosus. *Scandinavian Journal Of Rheumatology*, 30: 159-163
- Moore K.W., de Waal Malefy R., Coffman R.L., O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review Of Immunology*, 19: 683-765
- Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*, 136: 2348-2357
- Mosmann T.R., Sad S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today*, 17: 138-146
- Ng W.F., Duggan P.J., Ponchel F., Matarese G., Lombardi G., Edwards A.D., Isaacs J.D., Lechler R.I. 2001. Human CD4+CD25+ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*, 98: 2736-44
- Nathan C.F. 1987. Secretory products of macrophages. *The Journal Of Clinical Investigation*, 79: 319-326
- Navodila za uporabo Ficoll-Pague. 1989. Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden.
- Pala P., Hussell T., Openshaw P.J. 2000. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *Journal Of Immunological Methods*, 243: 107-124
- Pestka S., Krause C.D., Sarkar D., Walter M.R., Shi Y., Fisher P.B. 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annual Review Of Immunology*, 22: 929-979
- Piccirillo C.A., Letterio J.J., Thornton A.M., McHugh R.S., Mamura M., Mizuhara H., Shevach E.M. 2002. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *The Journal Of Experimental Medicine*, 196: 237-246
- Prud'homme G.J., Piccirillo C.A. 2000. The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF-beta1) in autoimmune diseases. *Journal Of Autoimmunity*, 14: 23-42

Rausch-Fan X., Leutmezer F., Willheim M., Spittler A., Bohle B., Ebner C., Jensen-Jarolim E., Boltz-Nitulescu G. 2002. Regulation of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells and allergen-specific Th cell clones by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. International Archives Of Allergy And Immunology, 128: 33-41

Repnik U. 2000. Razmerje citokinov Th1 in Th2 v primarnih kulturah humanih mononuklearnih celic. Diplomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 80 str.

Roncarolo M.G., Gregori S., Battaglia M., Bacchetta R., Fleischhauer K., Levings M.K. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. Immunological Reviews, 212: 28-50

Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. Journal Of Immunology, 155: 1151-64

Sakaguchi S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annual Review Of Immunology, 22: 531-562

Sakaguchi S., 2006. Regulatory T cells: Meden Agan. Immunological Reviews, 212: 5-7

Sakaguchi S., Ono M., Setoguchi R., Yagi H., Hori S., Fehervari Z., Shimizu J., Takahashi T., Nomura T. 2006. Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. Immunological Reviews, 212: 8-27

Scala E., Pallotta S., Frezzolini A., Abeni D., Barbieri C., Sampogna F., De Pità O., Puddu P., Paganelli R., Russo G. 2004. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. Clinical And Experimental Immunology, 138: 540-546

Seddon B., Mason D. 2000. The third function of the thymus. Immunology Today, 21: 95-99

Seder R.A., Marth T., Sieve M.C., Strober W., Letterio J.J., Roberts A.B., Kelsall B. 1998. Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. Journal Of Immunology, 160: 5719-28

Shevach E.M. 2004. Regulatory/suppressor T cells in health and disease. Arthritis And Rheumatism, 50: 2721-2724

Shevach E.M., DiPaolo R.A., Andersson J., Zhao D.M., Stephens G.L., Thornton A.M. 2006. The lifestyle of naturally occurring CD4+CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. Immunological Reviews, 212: 60-73

Spellberg B., Edwards J.E. Jr. 2001. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. Clinical Infectious Diseases, 32: 76-102

Stassen M., Schmitt E., Jonuleit H. 2004a. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and infectious tolerance. Transplantation 77: S23-S25

Stassen M., Fondel S., Bopp T., Richter C., Müller C., Kubach J., Becker C., Knop J., Enk A.H., Schmitt S., Schmitt E., Jonuleit H. 2004b. Human CD25⁺ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. European Journal Of Immunology, 34: 1303-11

Stephens L.A., Mottet C., Mason D., Powrie F. 2001. Human CD4+CD25+ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. European Journal Of Immunology, 31: 1247-54

Strobl H., Riedl E., Scheinecker C., Bello-Fernandez C., Pickl W.F., Rappersberger K., Majdic O., Knapp W. 1996. TGF-beta 1 promotes *in vitro* development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. Journal Of Immunology, 157: 1499-1507

Strobl H., Knapp W. 1999. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. Microbes And Infection, 1: 1283-1290

Taams L.S., Smith J., Rustin M.H., Salmon M., Poulter L.W., Akbar A.N. 2001. Human anergic/suppressive CD4+CD25+ T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. European Journal Of Immunology, 31: 1122-31

Thornton A.M., Shevach E.M. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production. The Journal Of Experimental Medicine, 188: 287-96

von Boehmer H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. Nature Immunology, 6: 338-344

Vozelj M. 1996. Imunologija. Enciklopedijski priročnik. 1. izdaja. Ljubljana, DZS: 371 str.

Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1. izdaja. Ljubljana, DZS: 552 str.

Wahl S.M., Swisher J., McCartney-Francis N., Chen W. 2004. TGF-beta: the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells. Journal Of Leukocyte Biology, 76: 15-24

Walker M.R., Kasprowicz D.J., Gersuk V.H., Benard A., Van Landeghen M., Buckner J.H., Ziegler S.F. 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. The Journal Of Clinical Investigation, 112: 1437-1443

- Wan Y.Y., Flavell R.A. 2006. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunological Reviews*, 212: 114-130
- Weiner H.L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells. *Immunological Reviews*, 182: 207-214
- Wraber B. 1994. Modulation of cytokine synthesis in human mononuclear cell cultures of different origin. *Zdravniški vestnik*, 63: 57-61
- Wraber B. 1998. Citokini v kliniki - koristna informacija ali podatek odveč. *Medicinski razgledi*, 37: 39-46
- Wraber B. 2007. Citokini v kliniki - novi pogledi. V: Merjenje imunosti od molekule do bolnika, enodnevno podiplomsko izobraževanje iz laboratorijske biomedicine. Kranj, Kemomed: 46-52
- Žemva M. 1968. Laboratorijska hematologija. Ljubljana, DZS
- Yoshino I., Yano T., Miyamoto M., Sugimachi K., Kimura G., Nomoto K. 1993. Phenotypic and functional modulation of interleukin-2-activated peripheral blood mononuclear cells by anti-CD3 and anti-CD28 antibody. *Lymphokine And Cytokine Research*, 12: 191-196

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem somentorici, višji znan. sod. dr. Branki Wraber, za strokovno vodenje in pomoč pri nastajanju dela.

Bojani Žiberna in Andreji Kopitar se zahvaljujem za natančna navodila in vso pomoč pri laboratorijskem delu.

Prof. dr. Alojzu Ihanu za koristne nasvete in sodelovanje ter strokovnen pregled diplomske naloge.

Prof. Andreju Blejcu za vse odgovore na vprašanja o statistični obdelavi podatkov.

Doc. dr. Blagajani Herzog-Velikonja in prof. dr. Darji Žgur-Bertok za natančen pregled naloge.

Hvala tudi vsem prijateljem, sorodnikom in znancem, ki so prostovoljno darovali kri ter Katji Sluga za nežne odvzeme krvi.

Predvsem pa hvala tistim, ki vztrajno stojijo ob meni in verjamejo v moj uspeh - očetu, mami, bratu in prijateljem.