

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Janja OVEN

**LIMFOCITNE POPULACIJE V BRONHOALVEOLARNEM IZPIRKU
OTROK S SUMOM NA ASTMO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE LYMPHOCYTE POPULATIONS IN BRONCHOALVEOLAR
LAVAGE FLUID IN ASTMATIC CHILDREN**

GRADUATION THESIS
University Studies

LJUBLJANA, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za citometrijo na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani, kjer so bili vzorci pregledani in analizirani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Alojza Ihana in za recenzenta prof. dr. Vladimirja Kotnika.

Mentor: prof. dr. Alojz IHAN

Recenzent: prof. dr. Vladimir KOTNIK

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Vladimir KOTNIK, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Član: prof. dr. Alojz IHAN, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Janja OVEN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 616.22/.24-07(043)=863
KG Bolezni dihal/astma pri otrocih/diagnostične metode/imunske celice/BAL/levkociti
AV OVEN, Janja
SA IHAN, Alojz (mentor), KOTNIK, Vladimir (recenzent)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2006
IN LIMFOCITNE POPULACIJE V BRONHOALVEOLARNEM IZPIRKU OTROK S SUMOM NA ASTMO
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 51 str., 5 pregl., 5 sl., 1 pril., 40 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V raziskavi smo želeli pojasniti vnetno dogajanje v dihalnih poteh pri otrocih, ki imajo dolgotrajno zgodovino vnetja dihalnih poti in znake atopične predispozicije, nimajo pa še kliničnih znakov za astmo. Pri otrocih, ki so bili bronhoskopirani zaradi diferencialne diagnostike med astmo in kronično okužbo dihal, smo z metodo pretočne citometrije pregledali celice bronhoalveolarnega izpirka (BAL-a). Želeli smo opredeliti diagnostičen pomen, ki bi ga lahko imela analiza BAL-a s pretočno citometrijo pri opredeljevanju astme pri otrocih z dihalno stisko. Ugotovili smo, da je razmerje celic Th-1 in Th-2 v BAL-u otrok s kronično astmo manjše kot pri otrocih brez astme ali pa s prvo epizodo astme. Velikost ekspresije interferona (IFN) γ in interleukina (IL) 4 je bilo različno v primerjavi otrok s kronično astmo, otrok s prvo epizodo astme in brez nje. Pri neastmatikih in kroničnih astmatikih smo ugotovili povečano tvorbo IFN- γ , pri otrocih s prvo epizodo astme pa je povečana tvorba IL-4. Pri kroničnih astmatikih smo v primerjavi z otroci s prvo epizodo astme ugotovili tudi značilno manjšo ekspresijo markerja CD69 na limfocitih T.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 616.22/.24-07(043)=863
CX Respiratory illness/asthma in the children/diagnostic methods/immune cells/BAL/leukocytes
AU OVEN Janja
AA IHAN Alojz (supervisor), KOTNIK Vladimir (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental programme in Microbiology
PY 2006
TI THE LYMPHOCYTE POPULATIONS IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID IN ASTHMATIC CHILDREN
DT Graduation thesis (Universty studies)
NO XI, 51 p., 5 tab., 5 fig., 1 ann., 40 ref.
LA sl
AL sl/en
AB An imbalance of T cell subsets in asthma with a predominance of Th2 type cells has been proposed. The aim of this study was simultaneously to detect surface markers and intracellular production of cytokines in T cells from the airways of children with and without asthma. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was obtained by wedging a suction catheter into the distal airway. The cells were stained with the relevant antibodies and analysed by flow cytometry. No statistical difference was observed between children with atopic asthma, non astmatic children and children who have asthma for the first time in the percentage of CD3+ cells producing IL-4. Interferon (IFN) γ + T cells, were however, present in a much higher percentage. The percentage of IFN- γ + of T cells was significantly increased in subject with no asthma and children with atopic asthma compared with the non astmatic children. The proinflammatory activities of IFN γ may play an important role in the patogenesis of childhood asthma and may suggest that asthma is not simply a Th2 driven response.

KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
	Key Words Documentation (KWD)	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	VII
	Kazalo slik	VIII
	Kazalo prilog	IX
	Okrajšave in simboli	X
	Slovarček	XI
1	UVOD	2
1.1	DELOVNA HIPOTEZA	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	ASTMA	3
2.2	DIAGNOZA ASTME	6
2.3	ALERGIJA	7
2.4	IMUNSKI SISTEM	10
2.4.1	Imunski sistem otroka	11
2.4.2	Naravna odpornost	11
2.4.3	Naravna odpornost pri otroku	12
2.4.4	Pasivna imunost pri otroku	12
2.4.5	Specifični imunski odziv	12
2.4.6	Celice imunskega sistema	13
2.4.6.1	Limfociti	13
2.4.6.1.1	Limfociti B	14
2.4.6.1.2	Limfociti B pri otroku	14
2.4.6.1.3	Limfociti T	15
2.4.6.1.4	Limfociti T pri otroku	16
2.4.6.1.5	Celice naravne ubijalke	17
2.4.6.1.6	Celice NK pri otroku	17
2.4.6.2	Monociti	17
2.4.6.3	Makrofagi	18
2.4.6.4	Granulociti	18
2.4.6.5	Mastociti	19
2.4.6.6	Dendritične celice	20
2.4.7	Citokini	21
2.4.7.1	Interlevkin-1 (IL-1)	22
2.4.7.2	Citokini, ki so poglobitnega pomena za funkcijo celic T	23
2.4.7.2.1	Interlevkin-2 (IL-2)	23
2.4.7.2.2	Interlevkin-4 (IL-4)	23
2.4.7.2.3	Interlevkin 7 (IL-7)	24
2.4.7.2.4	Interlevkin-9 (IL-9)	24
2.4.7.2.5	Interlevkin 10 (IL-10)	24
2.4.7.2.6	Interlevkin 12 (IL-12)	25
2.4.7.3	Citokini, ki delujejo na celice B	25
2.4.7.3.1	Interlevkin-5 (IL-5)	25

2.4.7.3.2	Interlevkin-6 (IL-6)	26
2.4.7.3.3	Interlevkin-13 (IL-13)	26
2.4.7.3.4	Interlevkin-14 (IL-14)	26
2.4.7.4	Citokini , ki sodelujejo pri vnetju	27
2.4.7.4.1	Interferon- γ (INF- γ)	27
2.4.7.4.2	Dejavnika tumorske nekroze α in β (TNF- α in β)	27
2.4.7.5	Drugi citokini	27
2.4.7.5.1	Levkemijo inhbirajoči faktor (LIF)	27
2.4.7.5.2	Onkostatin M	28
2.4.7.5.3	Granulocitno makrofagni rastni dejavnik (GM-CSF)	28
2.4.7.6	Kemokini	28
2.5	UPORABA PRETOČNE CITOMETRIJE ZA OPREDELJEVANJE LIMFOCITNIH POPULACIJ	29
2.5.1	Uporaba metode	29
2.5.2	Analiza limfocitov s pretočnim citometrom	29
2.5.3	Monoklonska protitelesa	31
2.6	UPORABA PRETOČNE CITOMETRIJE PRI BAL	31
3	MATERIAL IN METODE	33
3.1	PREISKOVANCI	33
3.2	ODVZEM VZORCEV	33
3.3	OPREDELITEV AKTIVIRANIH LIMFOCITOV T, MONOCITOV IN GRANULOCITOV V BAL-U	33
3.3.1	Reagenti	33
3.3.2	Opis analitskega postopka opredeltve aktiviranih limfocitov T, monocitov in granulocitov BAL-u.	34
3.4	OPREDELITEV CELIC TH-1 IN TH-2	35
3.4.1	Reagenti	35
3.4.2	Priprava reagentov A, B in C za stimulacijo limfocitov T	35
3.4.3	Opis analitskega postopka	35
3.5	STATISTIČNA OBDELAVA	36
4	REZULTATI	37
4.1	ANALIZA LEVKOCITNIH POPULACIJ V KRVI PRI SKUPINI NEASTMATIKOV, SKUPINI S PRVO EPIZODO ASTME TER SKUPINI S KRONIČNO OBLIKO ASTME	37
4.2	ANALIZA LEVKOCITNIH POPULACIJ V VZORCU BAL-A PRI SKUPINI NEASTMATIKOV, SKUPINI KRONIČNIH ASTMATIKOV IN PRI SKUPINI S PRVO EPIZODO ASTME	39
4.3	ANALIZA EKSPRESIJE ZNOTRAJCELIČNIH CITOKINOV V VZORCU BAL-A PRI SKUPINI NEASTMATIKOV, SKUPINI OTROK S PRVO EPIZODO ASTME IN SKUPINI OTROK S KRONIČNO OBLIKO ASTME	41
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	43
5.1	RAZPRAVA	43
5.2	SKLEPI	46
6	POVZETEK	47
7	VIRI	48

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Klasifikacija makrofagov glede na mesto nahajanja v tkivih (Pretnar in sod., 2005).....	18
Preglednica 2: Razlike med rastnimi hormoni in citokini (Vozelj, 2000)	22
Preglednica 3: Analiza levkocitnih populacij v krvi pri skupini neastmatikov, skupini s prvo epizodo astme ter skupina s kronično obliko astme.....	38
Preglednica 4: Levkocitne populacije v vzorcih BAL-a pri skupini neastmatikov, skupini kroničnih astmatikov in skupini s prvo epizodo astme.....	40
Preglednica 5: Analiza svetilnosti levkocitnih populacij v vzorcu BAL-a pri neastmatikih, skupini otrok s prvo epizodo astme in skupini otrok s kronično obliko astme	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Prerez dihalne poti. Pri bolniku z astmo je značilna močno zadebeljena sluznica z obilo sekreta v lumnu dihalne poti, zadebeljena mišična plast in debelejša bazalna membrana (Šuškovič in sod., 2005)	4
Slika 2: Alergijsko vnetje (Šuškovič S. in sod. 2005)	9
Slika 3: Analize levkocitnih populacij v krvi pri skupini neastmatikov, skupini s prvo epizodo astme ter skupino s kronično obliko astme.	38
Slika 4: Analiza levkocitnih populacij v vzorcih BAL-a pri skupini neastmatikov, skupini s prvo epizodo astme in skupini s kronično astmo.	40
Slika 5: Analiza svetilnosti levkocitnih populacij v vzorcih BAL-a pri skupini neastmatikov, skupini s prvo epizodo astme in skupini s kronično astmo.	42

KAZALO PRILOG

Priloga A: Analiza levkocitnih populacij v vzorcih BAL-a pri neastmatikih, otrocih s prvo epizodo astme in otrocih s kronično obliko astme.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ab – protitelo
AIM – activation inducer molecule
BAL - bronhoalveolarni izpirek
BALF- bronhoalveolarna tekočina
CD – cluster of differentiation
Celice NK – celice naravne ubijalke
EA – zgodnji antigen aktivacije
FALS – forward angle light scatter
FCS- foward scatter chanel
FITC – fluorokrom fluroscein izocianatom
GM-CSF – granulocitno makrofagni rastni dejavnik
Ig – imunoglobulin
IL – interlevkin
INF – inetrferon
LIF – levkemijo inhibirajoči faktor
LT- levkotrieni
Ly- limfociti
NCAM – neurall cell adhesion molecule
PE – fikoeritrin
PHK-poglavitni histokompatibilnostni kompleks
RALS – right angle light scatter
SSC – side scatter chanel
Tc – citotoksične celice T
Th – celice T pomagalk
TNF – dejavnik tumorske nekroze

SLOVARČEK

CD3%	Delež celic CD3
CD69 eoz (%)	Delež celic CD69+ med eozinofilci
CD69 eoz sv.	Svetilnost CD69+ na eozinofilcih
CD69 gran (%)	Delež celic CD69+ med granulociti
CD69 gran sv.	Svetilnost CD69+ na granulocitih
CD69 lim (%)	Delež celic CD69+med limfociti
CD69 lim sv.	Svetilnost CD69+ na limfocitih
CD69 mono (%)	Delež celic CD69+ med monociti
CD69 mono sv.	Svetilnost CD69+ na monocitih
cIFN- γ /3 sv.	Svetilnost limfocitov T, ki tvorijo cIFN- γ
cIFN- γ /3 (%)	Delež limfocitov T, ki tvorijo cIFN- γ
cIFN- γ /4 (%)	Delež limfocitov T celic pomagalk, ki so cIFN- γ +
cIFN- γ /4 sv.	Svetilnost limfocitov T celic pomagalk, ki so cIFN- γ +
cIL-4/3 (%)	Delež limfocitov T, ki tvorijo cIL-4
cIL-4/3 sv.	Svetilnost limfocitov T, ki tvorijo cIL-4
cIL-4/4 (%)	Delež limfocitov T celic pomagalk, ki tvorijo cIL-4
cIL4/4 sv.	Svetilnost limfocitov T celic pomagalk, ki tvorijo cIL-4

1 UVOD

1.1 DELOVNA HIPOTEZA

Z omenjeno študijo smo želeli pojasniti vnetno dogajanje v dihalnih poteh pri otrocih, ki imajo dolgotrajno zgodovino vnetja dihalnih poti in znake atopične predispozicije, nimajo pa še kliničnih znakov za astmo. Pri otrocih, bronhoskopiranih zaradi diferencialne diagnostike med astmo in kronično okužbo dihal, smo z metodo pretočne citometrije pregledali celice bronhoalveolarnega izpirka. Primerjali smo lastnosti imunskih celic v bronhoalveolarnem izpirku z ostalimi laboratorijskimi in kliničnimi preiskavami ter opredelili, kakšno vlogo ima analiza bronhoalveolarnega izpirka s pretočno citometrijo pri opredeljevanju astme pri otrocih z dihalno stisko.

V nalogi smo med skupinami neastmatikov, kroničnih astmatikov ter astmatikov s prvo epizodo astme, primerjali povprečne vrednosti limfocitnih in levkocitnih parametrov v BAL-u z rezultati bronhoskopije, histoloških in hematoloških preiskav, povprečnih vrednosti aktivacijskih markerjev na limfocitih in povprečnih vrednosti razmerja Th1/Th2.

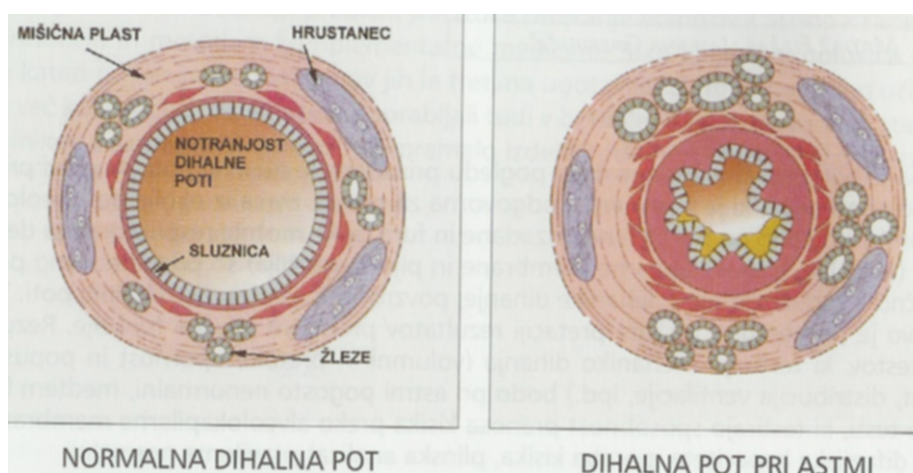
Delovne hipoteze, ki smo jih postavili so:

- razmerje celic Th1 (sodelujejo pri citotoksičnem odzivu proti mikrobom) in Th2 (sodelujejo pri alergijskem odzivu) v bronhoalveolarnem izpirku je pri otrocih s kronično astmo značilno manjše kot pri otrocih brez astme ali s prvo epizodo astme
- Velikost ekspresije interferona gama in interlevkina 4 je značilno različno pri otrocih s kronično obliko astme v primerjavi z otroki brez nje ali s prvo epizodo astme
- Ekspresija aktivacijskega markerja CD69 je pri kroničnih astmatikih značilno različna od ekspresije pri otrocih brez astme ali s prvo epizodo astme.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ASTMA

Astma je kronična vnetna bolezen dihal. Značilni znaki astme so dispneja, kašelj, piskanje in stiskanje v prsnem košu. Znaki astme so praviloma bolj izraženi v zgodnjih jutranjih urah (nočna astma) ali ob zbujanju. Bolnik težje diha zaradi zožanih dihalnih poti. Zožanje dihalnih poti popusti samodejno ali po aplikaciji zdravil. Za astmo so značilne tudi vnete dihalne poti in preobčutljivost le-teh na različne dejavnike, ki lahko sprožijo astmo; na primer: fizični napor, cigaretni dim, megla, mraz, močne vonjave, onesnažen zrak. Astmo pogosto sprožijo tudi virusna vnetja dihal. (Košnik, 2005). V dihalnih poteh pride do perzistentnega vnetja in kot posledico le tega najdemo poškodovan epitelij bronhijev, hiperplazijo mukoznih žlez in hipertrofijo gladkega mišičja, prisotna pa je tudi hiperemija ter izločanje tekočine in vnetnih celic v stene in lumen bronhijev. Do vnetja v dihalnih poteh pride zaradi sproščanja vnetnih mediatorjev iz celic. Med vnetnimi celicami pri astmi najdemo eozinofilce, limfocite T, mastocite, bazofilce, monocite in alveolarne makrofage. Dihalne poti med astmo otečejo, zaradi česar se zmanjša premer njihove svetline. Vnetje in oteklina lahko trajata več tednov po akutni epizodi astme. Za blaženje vnetne reakcije se uporabljajo inhalacijski kortikosteroidi. Z redno uporabo inhalacijskih kortikosteroidov se lahko akutne napade astme prepreči. Zdravljenje s preventivnimi protivnetnimi zdravili je potrebno tudi v obdobjih, ko ni napadov astme, ker ta zdravila zmanjšajo vnetno reakcijo in ščitijo pred epizodami akutnih poslabšanj astme. Ko pride do akutnega poslabšanja astme, je pomembno, da pride do zdravljenja čimprej, v prvih minutah, ker je učinkovitost zdravil v najzgodnejšem obdobju napada astme najboljša (Košnik, 2005).



Slika 1: Prerez dihalne poti. Pri bolniku z astmo je značilna močno zadebeljena sluznica z obilo sekreta v lumen dihalne poti, zadebeljena mišična plast in debelejša bazalna membrana (Šuškovič in sod., 2000)

Pri patogenezi astme imajo pomembno vlogo celice T. Pri astmi so predvsem pomembne celice Th-2. Hipoteza o prevladi celic Th-2 pri astmi je bila prvič predlagana s strani Mossman-a leta 1982. Mossman je odkril dve različni skupini celic pomagalk pri miših. Poimenoval jih je celice Th-1 in Th-2. Ta dva podrazreda celic T se med seboj razlikujeta po proizvodnji citokinov. Celice Th-2 proizvajajo interlevkin 4 (IL-4), IL-5, IL-9 in IL-13. Ti citokini se tvorijo pri obrambi proti parazitom in pri alergijskem vnetju. Posledica je proizvodnja IgE, diferenciacija mastocitov ter rast, migracija in aktivacija eozinofilcev. Celice Th-1 pa proizvajajo IFN- γ in IL-2, ki aktivirata pomembne mehanizme pri obrambi proti bakterijam in virusom. Hipoteza pravi, da pride pri astmi do povečanja odziva Th-2 v kombinaciji z zmanjšanjem odziva Th-1. Celice, ki izražajo CD4 in IL-4 imenujemo celice Th-2. Celice, ki pa izražajo IFN- γ pa so celice Th-1. To nomenklaturu so razširili tudi na druge celice, na primer CD8⁺ in celice NK. Pri ljudeh pa so take razvrstitve manj jasne. Celice, ki bi proizvajale samo citokine Th-1 ali Th-2, pri ljudeh ni. Odvisno od dražljaja človeške celice T lahko proizvajajo tako IL-4 kot tudi IFN- γ . Zaradi tega večina raziskovalcev za opredelitev fenotipa celic T pri ljudeh uporablja razmerje med IFN- γ in IL-4. Vendar pa take definicije ne vzamejo v obzir niti količine izločenih citokinov niti moči signala, ki je bil uporabljen, da se je stimulirala citokinska produkcija (Salvi in sod., 2001). Tako pri ljudeh kot celice Th-1 opišemo tiste, ki izločajo IFN- γ , celice Th-2 pa so tiste, ki izločajo IL-4. IL-2, IL-6 in IL-10 pa izločata oba podtipa celic T. Limfociti Th-2 so pomnoženi v dihalnih poteh bolnikov z atopično astmo (Brown in sod., 2003). Pri astmi pride do povečane proizvodnje IL-4, če je prisotna atopija. Kadar pa bolnik nima atopije

do povečane proizvodnje IL-4 pri astmi, ne pride. Pri astmi pride tudi do prekomerne proizvodnje IFN- γ , k čemur vsaj delno prispevajo tudi celice CD8⁺. Ta povečana sposobnost celic CD8⁺, da proizvajajo IFN- γ , je karakteristična za astmo. Vloga celic CD8⁺ pri astmi je neznana. Odvisno od spodbujevanja lahko celice CD8⁺ proizvajajo citokine podobne tistim, ki jih proizvajajo celice Th-1 ali pa celice Th-2. Tako so tudi za celice CD8⁺ predlagali razdelitev na celice Tc1 (c-citotoksični) in celice Tc2. Pri astmi in atopiji pride do aktivacije celic Tc2, vendar pa so eksperimentalni podatki pokazali, da celice CD8⁺ inhibirajo alergijske reakcije. Celice CD8⁺, ki proizvajajo IFN- γ , imajo regulatorno vlogo pri atopičnih boleznih, ker zavirajo eozinofilno vnetje in vnetje, ki je odvisno od IgE. Pri neatopični astmi bi lahko te celice imele podobno vlogo. Dokazano je bilo, da je IL-5, ki je pro-eozinofilni citokin inhibiran s strani IFN- γ (Mangan in sod., 2000).

Po načinu nastanka astmo razdelimo na alergijsko in intrinzično astmo. Pri alergijski astmi so vdihani ali redkeje zaužiti alergeni eden od povodov za nastanek astme. Obenem pa so pomemben dejavnik poslabšanja astme. Izpostavljenost večji količini vdihanih alergenov lahko povzroči hudo in celo smrtno poslabšanje astme. V okviru celovite obravnave bolnika z astmo je potrebno bolnika temeljito alergološko pregledati. Za ta namen se poslužujemo kožnih testov alergije, merjenja specifičnih protiteles razreda IgE in drugih alergoloških testov. Alergološke teste je potrebno vselej vrednotiti v okviru natančno odvzete anamneze.

Pri intrinzični astmi pa ne ugotovimo senzibilizacije tipa IgE. Možno je, da astmatsko vnetje sprožijo virusi ali pa avtoantigeni, ki so usmerjeni proti nekaterim strukturam pljuč (Šuškovič, 2005).

2.2 DIAGNOZA ASTME

Astmo opredeljujejo tri značilnosti:

- prisotnost eozinofilcev;
- dihalne poti so preodzivne za številne dražljaje, zaradi česar prihaja do spazma dihalnih poti;
- z meritvijo pljučne funkcije izmerimo zaporo bronhijev, ki popusti spontano ali zaradi vpliva zdravil (Šuškovič, 2005).

Raziskav astmatskega vnetja pri otrocih je malo, zato je bilo največ podatkov pridobljenih pri odraslih. Iz podatkov teh raziskav, so nato sklepali na potek in razvoj astme pri otrocih. Zgodnji dokazi o vpletenosti T celičnih citokinov pri astmi so bili pridobljeni z indirektnimi študijami, kot je na primer merjenje koncentracije citokinov v venski krvi. To je vodilo do izolacije mononukleranih celic iz venske krvi in merjenja T celičnih citokinov v supernatantu. Slabost te metode je v tem, da ni bila mogoča istočasna identifikacija podtipov celic T, iz katerih so se izločali citokini. V nekaterih študijah so uporabili bronhoskopske postopke, da so izmerili citokine v supernatantu bronhoalveolarnega izpirka (BAL) otrok z različnimi tipi astme. BAL lahko naredimo samo pri tistih otrocih, kjer so jasne medicinske indikacije za tak postopek.

Metoda inducirane sputuma je neinvazivna, varna in uspešna metoda za pridobivanje vzorcev, vendar pa obstajata samo dva dokumentirana primera, pri katerih so uporabili inducirani sputum kot vzorec za pregled ekspresije citokinov pri otrocih z astmo. Na splošno velja, da pri otrocih mlajših od šestih let ne moremo dobiti dobrega vzorca. V novejših študijah se uporablja dvostransko cev, ki se lahko uporablja za pridobivanje sputuma tudi pri otrocih, ki so stari en mesec. Zdi se, da bo sputum postal zelo primerno orodje za celično in biokemično analizo markerjev pri majhnih otrocih z astmo.

Ker direkten dostop v dihalne poti ni vedno mogoč, je primerna alternativna metoda pridobivanja vzorcev z izpiranjem nosu; ta metoda je tudi varna. V zadnjem času pa se je

pojaviła nova, neinvazivna metoda pridobivanja vzorcev, to je uporaba izdihanih kondenzatov (Brown in Ennis, 2005).

2.3 ALERGIJA

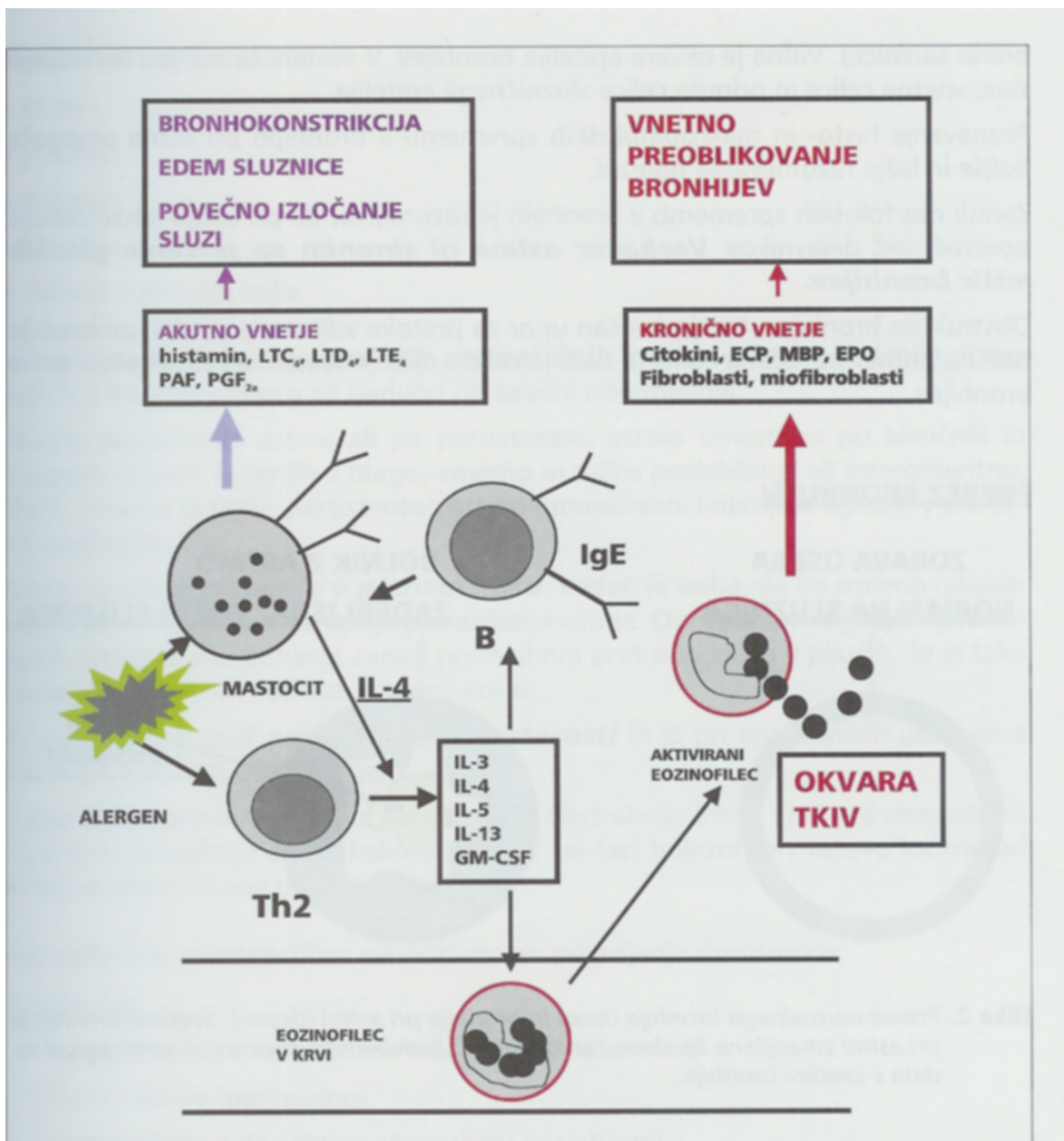
Alergija je spremenjena sposobnost organizma v imunskem odzivanju. Pomeni pa prekomerno občutljivost za snovi, ki jih bodisi inhaliramo, zaužijemo, vbrizgamo v telo ali pa pridemo z njimi v stik preko kože (Furlan J., 1993). Alergije po Gelu in Coombsu razdelimo na štiri skupine. Pri prvem tipu se imunoglobulin E (IgE) veže na mastocite, ki ob stiku z alergenom izločajo mediatorje. Pri tem pride v tkivu do vazodilatacije, krčenja gladkih mišic ter povečane žlezne sekrecije. Tipične bolezni prvega tipa so astma in anafilaktični šok. (Coombs R.R.A. in sod., 1992). Posameznike, ki so nagnjeni k z IgE posredovanim preobčutljivostnim odzivom, imenujemo atopiki ali alergiki. Takojšnja preobčutljivost se izraža v različnih kliničnih oblikah: seneni nahod, astma, koprivnica (urtikarija), angioedem, atopijski dermatitis, alergijski gastroenterokolitis in anafilaksa. Normalno ljudje ob stiku z antigenom tvorijo majhno količino specifičnih protiteles IgE. Za uravnavanje sinteze IgE je potrebno več dejavnikov: genetska nagnjenost, izpostavitve alergenom iz okolja, narava antigena, celice CD4⁺ in njihovi citokini. V populaciji atopikov je koncentracija celotnih protiteles IgE v serumu (cIgE) v povprečju večja kot v populaciji neatopikov. Vendar tudi majhna koncentracija cIgE ne izključuje atopije. Razlike v koncentraciji cIgE so tudi med posameznimi boleznimi. V splošnem je koncentracija cIgE v serumu večja pri bolnikih z atopijskim dermatitisom ali alergijsko astmo kot pri bolnikih z alergijskim rinitisom. Merjenje koncentracije celotnih protiteles IgE v serumu ni uporaben diagnostični test za ugotovitev atopije, bolje jo opredeljujejo specifična protitelesa IgE (Šubic, 2003).

Mastociti in bazofilci so celice, ki so ključnega pomena pri vnetju, ki ga posredujejo IgE. K alergijskemu vnetju veliko prispevajo tudi eozinofilci. Receptor za IgE na eozinofilcih ima kar 100 krat manjšo afiniteto kot receptor za IgE na mastocitih in bazofilcih. Eozinofilci izločajo snov, ki preprečuje sproščanje histamina kot tudi diaminooksidazo, ki oksidativno deaminira histamin. Če posplošimo, eozinofilci vsebujejo snovi, ki

nevtralizirajo produkte bazofilcev in mastocitov, zato so mnogi znanstveniki mnenja, da je ena izmed nalog eozinofilcev omejevanje alergičnega vnetja. V izpljunku bolnikov z astmo najdemo Charcot - Leydenove kristale, ki so značilni za alergično vnetje dihal. Bazični proteini, ki se sprostijo iz citoplazemskih zrn, so toksični za epitelij dihal. Njihov nivo pa je povečana v izpljunku in bronhoalveolarnem izpirku astmatikov.

Približno 75 % ljudi, ki je astmatikov ima pozitiven kožni test na vbrizganje enega ali več pogostih alergenov. Do obstrukcije v dihalnih poteh pride pogosto zaradi vdihavanja specifičnega alergena. Tudi pri neatopičnih astmatikih je patofiziologija krčenja sapnic podobna, kar kaže na alternativne mehanizme degranulacije mastocitov. Hipertrofija in hiperaktivnost celic gladkega mišičja sta posledici delovanja mediatorjev in citokinov, ki jih izločajo levkociti. Astma se začne z vezavo alergena na pritrjene IgE. Nato začnejo citokini novačiti eozinofilce, bazofilce in celice Th-2. Mastociti, bazofilci in eozinofilci začnejo izločati mediatorje, ki krčijo gladke mišice v dihalnih poteh. Najpomembnejši bronhokonstriktorji so levkotrieni LTC₄, LTD₄ in LTE₄. Antagonisti sinteze LTC₄ preprečujejo z alergenom sproženo krčenje dihalnih poti (Vozelj, 2000).

Atopija je povezana s povečanjem koncentracije IL-4 v supernatantu krvi. Izvor IL-4 pri atopiji je neznan. Opazili so tudi, da se je zmanjšala sposobnost celic T, da proizvajajo IFN- γ . Zdi se, da je ta nesposobnost celic T proizvajati IFN- γ direktno povezana z atopijo. Do povečanja krvne koncentracije IL-4 pa ne pride pri neatopični astmi (Mangan in sod., 2000).



Slika 2: Alergijsko vnetje (Šuškoviš S. in sod. 2000)

2.4 IMUNSKI SISTEM

Imunski sistem je kompleksno tkivo, katerega naloga je razlikovati med lastnim in tujim, nevtralizirati toksine, uničevati tumorske celice ter prepoznavati in odstranjevati tujke, zlasti mikroorganizme, ki vdrejo v organizem. Nekateri tujki pa kljub naravnim pregradam (koža, sluznice) vdirajo v organizem. Tekom evolucije so se razvile različne vrste imunskih celic, od katerih so evolucijsko najstarejše in najpreprostejše fagocitne celice (zlasti nevtrofilci in makrofagi), ki prepoznavajo in fagocitirajo tujke, ob tem pa izločajo vnetne mediatorje, ki organizirajo vnetno reakcijo ter predstavljajo antigene limfocitom (T pomagalkam) (Goldsby in sod., 2000).

Organe imunskega sistema razdelimo na centralne (primarne) limfatične organe, med katere uvrščamo timus in kostni mozeg ter periferne (sekundarne) limfatične organe, ki jih sestavljajo vranica, bezgavke in limfatično tkivo sluznic. Timus je pomemben pri ontogenezi imunskega odziva. V njegovi skorji namreč poteka diferenciacija limfocitov. Ko limfociti zapustijo primarne limfatične organe, se naselijo v sekundarnih ali perifernih limfatičnih organih. Tu srečajo tuje antigene in se nanje odzivajo.

Imunski sistem lahko deluje nespecifično ali specifično. Nespecifična ali prirojena imunost je prva obrambna črta v boju pred okužbami. Sestavljajo jo fizične in kemijske ovire za vstop mikrobov v notranjost organizma (npr. nepoškodovana koža in sluznice, cilije, sluz, vsebina želodca). Del nespecifične imunosti so tudi celice fagocitnega sistema, komponente komplemента ter celice naravne ubijalke (NK), ki nespecifično odstranjujejo in nevtralizirajo tujke.

Pridobljena ali specifična imunost temelji na specifični prepoznavi in odstranitvi antigena. Zanj so značilni antigena specifičnost, sposobnost prepoznave tujih antigenov, imunski spomin ter ločevanje lastnega od tujega. Glavni nosilci specifične imunosti so limfociti (Vozelj, 2000).

2.4.1 Imunski sistem otroka

Hemopoetska pluripotentna matična celica se pojavi v rumenjaki vreči približno 60. dan gestacije. Po 50-150 dneh gestacije se prenese v plodova jetra, kjer poteka največji del fetalne hemopoeze in nato v po približno 79 dneh se pluripotentna matična celica prenese v kostni mozeg. Pluripotentna matična celica se zgodaj v hemopoezi diferencira v limfoidno matično celico ali mieloidno matično celico. Diferenciacija limfoidne matične celice se odvija v timusu ali burzi. Formirata se dve vrsti imunokompetentnih celic in sicer limfociti T in B. V sedmem tednu gestacije se limfociti pojavijo v periferni krvi embrija. Iz mieloidne matične celice se razvijejo progenične celice za eritrocite in levkocite.

Timus, se pri fetusu formira v šestem tednu gestacije. Med plodovim življenjem ima pglavilni pomen pri naselitvi limfocitov T v krvi, limfi in v timusno odvisnem področju vranice in bezgavk. Od pubertete dalje timus usiha.

Sekundarni limfatični organi se pojavijo kasneje v embriogenezi. Limfni vozli se pojavijo v 12. tednu nosečnosti (Jevremović M., 1979).

2.4.2 Naravna odpornost

Naravna (prirojena) imunost, ki vključuje genetske dejavnike, anatomske in mehanične pregrade, nespecifične bakteriocidne snovi telesnih tekočin, fagocitozo ter znotrajcelično uničenje mikroorganizmov in različne efektorske mehanizme kot na primer komplement. Ta vrsta odziva je prva obrambna linija gostiteljeve obrambe. Nespecifični odziv se hitro aktivira. Že od rojstva prirojena imunost omogoča dobro organizma pred mikrobi (Kotnik V., 2005).

Glavne celice nespecifičnega imunskega odziva so: mononuklearni fagociti (monociti, makrofagi), polimorfonuklearni levkociti (večinoma nevtrofilci) in naravne celice ubijalke (celice NK).

2.4.3 Naravna odpornost pri otroku

Morfološke sestavine nespecifičnega oziroma prirojenga imunskega odziva se pojavijo že zelo zgodaj v obdobju fetusa, vendar pa te sestavine funkcionalno še niso razvite. Zato so otroci bolj podvrženi okužbam. K hitrejšemu širjenju okužbe z mesta vdora v organizem pri otroku pripomorejo slabša funkcijska sposobnost kostnega mozga, slabša sposobnost adherence, kemotakse in encimske aktivnosti nevtrofilnih granulocitov. Podobno imajo otroci zmanjšane krvne koncentracije monocitov, komponent komplemента ter celic NK (Qian in sod., 1997).

2.4.4 Pasivna imunost pri otroku

Imunski sistem novorojenčka je po rojstvu še nerazvit, šibek in počasen. Njegovo obrambo dopolnjujejo protitelesa IgE, ki so se prenesla preko placente v otrokov krvni obtok. Vse ostale materine beljakovine so izključene iz otrokovega krvnega obtoka.

Prenos preko placente se začne v 12. tednu gestacije. Poteka preko aktivnega transporta in je odvisen od fragmenta Fc in vrste IgG. Transplacentni prenos je značilen za materina protitelesa, ki so nastala kot odziv na fetusne antigene, ter ima zaščitno vlogo pri znotraj materničnih in neonatalnih infekcijah. Po rojstvu se nivo teh protiteles znižuje zaradi katabolizma le-teh, in ker novorojenček začne sam izdelovati protitelesa. Tranplacentno preneseni IgE izginejo iz krvi dojenčka med 6. in 8. mesecem življenja (Mardešić D., Dekaris D., 2000).

2.4.5 Specifični imunski odziv

Razvil se je, ker naravna odpornost ni dovolj učinkovita v borbi proti patogenim mikrobov. Ta imunski odziv imenujemo tudi pridobljena imunost, ker jo posameznik pridobi po vdoru infekcijskega agensa in temelji na izkušnjah posameznika (Vozelj, 2000).

Pri specifičnem imunskem odzivu vzajemno delujejo številne celice in molekule. Specifični imunski sistem je obdržal številne mehanizme naravne odpornosti in dodal nekatere pomembne lastnosti:

- Specifični imunski odziv okrepi zaščitne mehanizme naravne odpornosti, usmerja ali osredotoči te mehanizme na mesto vstopa antigena in jim omogoči, da odstranijo antigen.
- Specifični imunski odziv se normalno odzove samo na tuje antigene, kar pomeni, da razlikuje tuje od lastnega. Tako se prepreči neustrezen odziv na lastne molekule, kar bi lahko povzročilo usodno avtoimunsko bolezen.

Na podlagi komponent, ki posredujejo specifični imunski odziv, le-tega razdelimo na humoralno imunost, ki jo posredujejo protitelesa (imunoglobulini), in celično posredovano imunost, ki jo posredujejo limfociti T (Vozelj, 2000).

2.4.6 Celice imunskega sistema

2.4.6.1 Limfociti

So gibljive celice velikosti 5-12 μm . So okrogle ali jajčaste oblike. V citoplazmi, ki obdaja jedro je malo organelov. Na površini limfocitov opazimo številne resice. Limfociti se razvijejo v kostnem mozgu. V začetnem stadiju razvoja nimajo površinskih receptorjev in se zato ne odzivajo na spodbujanje z antigenom. Ko dozori izrazijo receptorje za antigen, postanejo odzivni na antigen in se razvijejo v funkcijsko različne razrede. Limfociti so nosilci specifične imunosti. So edine celice v telesu, ki specifično prepoznajo in razlikujejo med različnimi epitopi, oziroma antigenskimi determinantami. Z izrazom antigen označimo vsako molekulo, ki jo limfociti s svojimi antigenskimi receptorji prepoznajo kot tujek. Vsak limfocit ima samo eno vrsto receptorjev za antigen in prepoznava samo eno vrsto molekul. Ker je v naravi zelo veliko vrst molekul, je zato v telesu veliko različnih vrst limfocitov, od katerih se vsak odziva le na »svoj« antigen. Ocenjujejo, da ima človek nekaj deset milijonov medsebojno različnih limfocitov. Zaradi take raznolikosti se je na katerokoli tujo molekulo, ki pride v organizem, zmožno specifično odzvati vsaj nekaj vrst limfocitov. Limfocite razdelimo v dve skupini limfocite B in limfocite T, ki imajo več podskupin (Vozelj, 2000).

2.4.6.1.1 Limfociti B

Limfociti B nastajajo in funkcionalno dozorevajo v kostnem mozgu. So edine celice, ki izdelujejo protitelesa, in so tako nosilci protitelesne–humoralne imunosti. Njihovi antigenski receptorji so imunoglobulinske molekule, vsajene v citoplazemsko membrano. Protitelesa razvrščamo v pet imunoglobulinskih razredov: IgA, IgG, IgE, IgM, IgD. Ko naivni limfocit B (tak, ki pred tem še ni prišel v stik z antigenom) prvič prepozna antigen, se aktivira in začne razmnoževati. Razmnožene celice ostanejo deloma kot dolgoživeči (spominski) limfociti B, deloma pa se diferencirajo v plazmatke, ki izločajo velike količine protiteles, katerih specifičnost za antigen je enaka, kot je bila specifičnost membranskih imunoglobulinov pri limfocitu B, iz katerega je nastala posamezna plazmatka. Neaktivirani limfociti B imajo na svoji površini receptorje, imunoglobuline (Ig) tipa IgM in IgD, za prepoznavanje specifičnih antigenov (Roitt in sod., 1996).

V kostnem mozgu nastanejo zrele in imunsko zmožne celice B. To je od antigena neodvisna faza B-celičnega razvoja. Sam razvoj poteka prek progeničnega limfocita B (pro B-cell), predhodnega limfocita B (pre B-cell) nezrelega limfocita v zrel limfocit. Za zorenje so potrebne stromalne celice kostnega mozga (Pretnar in sod., 2005).

2.4.6.1.2 Limfociti B pri otroku

Limfociti B se prvič pojavijo v človekovem zarodku v 8. tednu gestacije. Z 12 tedni gestacije že imajo izražene obe skupini membranskih protiteles - IgM in IgD. Za nezrele limfocite B je značilno, da na svoji površini ne izražajo skupaj IgM in IgD (Splawski in Lipsky, 1991; Nonoyama in sod., 1995).

Glavna mesta, kjer nastajajo celice B pred rojstvom otroka, so rumenjaka vreča, plodova jetra ter plodov kostni mozeg. Po rojstvu pa je glavno mesto nastanka limfocitov B kostni mozeg (Vozelj, 2000).

Koncentracija limfocitov B v krvi v neonatalnem obdobju ter v zgodnjem otroškem obdobju je večja od koncentracije limfocitov v krvi odraslih. Limfociti otrok se od

limfocitov odraslih razlikujejo po fenotipu, saj imajo otroci na membrani limfocitov B v večji meri izražene molekule CD5 in jih imenujemo tudi celice B-1B. Celice B-1B se razlikujejo od celic B-2B, ki jih najdemo večinoma pri odraslih, po sposobnosti lastne obnove izven kostnega mozga. Celice B-1B se slabše odzovejo na proteinske antigene ter veliko bolje na karbohidratne antigene. Večina jih nosi le IgM in imajo zmanjšano sposobnost preklopa med razredi protiteles. Tako so protitelesa, ki jih sintetizirajo celice B-1B večinoma IgM, ki imajo razmeroma majhno afiniteto za antigen.

Že znotraj maternice poteka sinteza specifičnih protiteles, vendar pa je v otrokovi krvi ob rojstvu prisotna majhna koncentracija IgM in IgA, kar gre deloma na račun majhne izpostavljenosti tujim antigenom. Novorojenček je v veliki meri odvisen od transplacentalno prenesenih protiteles IgG in ob rojstvu dosežejo koncentracije, ki so primerljive z materinimi. Po rojstvu pride do postopnega upada količine pasivno prenesenih IgG, ki dosežejo najmanjši nivo okrog 4. meseca starosti. Po 4. mesecu starosti začnejo koncentracije posameznih razredov protiteles naraščati in dosežejo nivoje odraslih otrok: 1. leta (IgM), oziroma 5. do 6. leta (IgG) oziroma adolescence (IgA) (English in Wilson, 1996).

2.4.6.1.3 Limfociti T

Predniki limfocitov nastajajo v kostnem mozgu, nato pa potujejo kot nezreli limfociti preko krvi v timus, kjer dozori. Preden postanejo limfociti funkcionalno zmožni, je potrebna selekcija, da se prepreči razvoj avtoimunskih bolezni. Samo selekcijo lahko preživijo samo limfociti, ki so se sposobni odzivati na tuje molekule in ne na molekule lastnega organizma. Limfociti T se delijo v dve skupini, ki izražata različne površinske proteine: celice pomagalke (celice Th), ki izražajo CD4+ in CD3+ in citotoksične limfocite (Tc), ki izražajo na svoji površini CD8+ in CD3+. Celice Th z izločanjem citokinov uravnajo imunski sistem, Tc pa ubijajo okužene celice lastnega telesa. Limfociti ne spoznajo topnih antigenov, ampak njihove peptide, ki nastanejo iz razgrajenih antigenov in so vezani na proteine, poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (PHK). Kot odziv na antigensko spodbujevanje izločajo celice T proteinske hormone-citokine, katerih funkcija je pospeševanje, razmnoževanje in diferenciacija limfocitov T in drugih celic,

vključno celic B. Najpomembnejša funkcija Tc je uničenje z virusi in drugimi znotrajceličnimi mikroorganizmi okuženih celic. Le-ti celice uničijo s svojimi citotoksičnimi molekulami-perforini, ki jih ob prepoznavanju antigenov sprostijo v okolico (Vozelj, 2000; Roitt in sod., 1996).

2.4.6.1.4 Limfociti T pri otroku

Majhni limfociti se pojavijo v plodovem vezivnem tkivu že v 8. do 9. tednu gestacije. Zorenje limfocitov je končano že konec prvega trimesečja nosečnosti, medtem ko razmnoževanje in diferenciacija trajata celo življenje. Celice CD4+ in CD8+ se prvič pojavijo v jetrih in vranici zarodka v 14. tednu gestacije. Krvna koncentracija le teh narašča do približno 6. meseca starosti, potem pa začne upadati in se približevati vrednostim odraslih. Razmerje CD4+/CD8+ je največje v neonatalnem obdobju in se približa vrednostim odraslih okrog četrtega leta starosti. Več kot 90% limfocitov T novorojenčka izraža molekule CD45RA, ki še označujejo naivne limfocite T, ki še niso prišli v stik z antigenom. Odrasli imajo naivnih oblik limfocitov le še 60%, ostalih 40% so spominski limfociti, ki izražajo molekule CD45RO (Clement in sod., 1990).

Otroci imajo v primerjavi z odraslimi manjšo zmožnost proliferacije limfocitov po stimulaciji s protitelesi CD3 ali kombinaciji CD3 in CD2. Manjšo možnost proliferacije s protitelesi imajo naivni limfociti T in ker le-ti pri otroku prevladujejo, imajo otrokovi limfociti zmanjšano zmožnost proliferacije (Byrne in sod., 1988).

Limfociti T otroka v primerjavi z odraslimi izločajo normalne količine IL-2 in imajo tudi normalno število IL-2R. Je pa zmanjšano izločanje TNF- α , GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5 in IFN- γ . zmanjšana sinteza citokinov, predvsem IFN- γ in IL-4, ob zmanjšani sintezi kostimulirajočih molekul CD40 na celicah Th novorojenčkov, povzroča slabšo stimulacijo limfocitov B k sintezi IgM. Citotoksičnost otrokovih limfocitov T je zmanjšana za 30 do 60% v primerjavi z limfociti T odraslih ne glede na vrsto antigenske stimulacije (English in sod., 1988; Wilson in sod., 1993).

2.4.6.1.5 Celice naravne ubijalke

Celice naravne ubijalke (celice NK) so veliki granularni limfociti, ki jih je 10-15 % med limfociti. Nimajo označevalcev za celice B ali T, zato so jih sprva imenovali celice nič (null cells). Celice NK izhajajo iz kostnega mozga in imajo z limfociti T skupnega prednika, vendar pa za zorenje ne potrebujejo timusa. Imajo številna citoplazemska zrna in so zmožne lizirati različne tumorske in z virusi okužene celice neposredno brez senzibilizacije z antigenom. Poleg citoplazemskih zrn pa je zanje značilno tudi izražanje CD16, CD2 in CD56. Zaradi molekul CD16 lahko posredujejo uničenje celic tarč z od protiteles odvisno celično citotoksičnostjo (Vozelj, 2000; Berke G., 1995).

2.4.6.1.6 Celice NK pri otroku

Delež celic NK je približno 10% do 15% krožečih limfocitov tako pri otrocih kot pri odraslih. Koncentracija celic NK v krvi pa je večja v otroškem obdobju. Kljub večji koncentraciji celic NK pri otroku, pa je njihova funkcijska sposobnost zmanjšana za približno polovico in doseže aktivnost odraslih šele okoli 4. leta starosti. Manjša citotoksična sposobnost otrokovih celic NK pa lahko vpliva na težji potek virusnih okužb. S starostjo otroka se odpornost proti virusom povečuje (Kohl in sod., 1989).

2.4.6.2 Monociti

Razvijejo se iz matične celice v kostnem mozgu. Razvoj monocitov poteka preko večih stopenj, in sicer: iz monoblasta v promonocit in nato v monocit. Diferenciacijo in zorenje omogočajo številni rastni faktorji (npr. kolonije spodbujajoči faktorji). Monociti so velike gibljive ameboidne celice, katerih premer je 10-15 μ m. Imajo veliko ledvici podobno jedro in drobnozrnato citoplazmo, ki vsebuje lizosome, fagocitne celice in citoskeletne filamente. Iz kostnega mozga vstopijo monociti v krvni obtok, kjer se zadržijo samo 20 do 40 ur. V citoplazmi imajo mieloperoksidazo, ki v navzočnosti vodikovega peroksida in halidov ubije različne mikroorganizme. Po bivanju v tkivu monociti (makrofagi) ta potencial izgubijo in postanejo sprejemljivi gostitelji za znotrajcelične parazite. Samo mlade celice so antimikrobno učinkovite (Vozelj, 2000).

2.4.6.3 Makrofagi

Ko monociti dospejo v različna tkiva, postanejo makrofagi. Diferenciacija monocitov v makrofage vključuje številne spremembe. Celica se poveča 5 do 10-krat, zveča se število znotraj celičnih organelov, celica postane zelo zmožna fagocitoze in izloča večje količine topnih faktorjev. Makrofagi so dopolnilne (akcesorne) celice in antigen predstavljajoče celice. Razširjeni so povsod po telesu. Glede na tkiva v katerih so in glede na funkcijo, ki jo tam opravljajo, jih tudi poimenujemo (glej tabelo 1). Imajo dolgo življenjsko dobo ter se v nekaterih primerih tudi delijo. Požirajo tujke in celice, ki so v fazi apoptoze. Makrofagi sodelujejo pri obrambi gostitelja, še preden se razvije specifična imunost (Vozelj, 2000).

Preglednica 1: Klasifikacija makrofagov glede na mesto nahajanja v tkivih (Pretnar in sod., 2005)

MESTO NAHAJANJA V TKIVU	POIMENOVANJE MAKROFAGA
vezno tkivo	histociti
pljuča	alveolarni makrofagi
jetra	Kupfferjeve celice
vranica, bezgavke, kostni mozeg	prosti in pritrjeni makrofagi
trebušna votlina	peritonealni makrofagi
kostno tkivo	osteoklasti
živčevje	mikroglija

2.4.6.4 Granulociti

Sodelujejo v efektorski fazi imunskega odziva poleg limfocitov in mononukleranih fagocitov. So levkociti, ki vsebujejo številna citoplazemska zrna, od tu tudi izvira njihovo ime. Predhodne celice granulocitov nastajajo v kostnem mozgu. Razvoj poteka od premielocita do zrelega granulocita. Dozorevajo v metamielocit, neseegmentirani in segmentirani granulocit. So vnetne celice. Pomembni so pri vnetju in pri naravni imunosti, kjer odstranjujejo mikrobo in mrtve tkivne celice. Granulocite spodbujajo citokini, ki jih izločajo celice T. Granulociti so pomembne efektorske celice tudi pri specifičnem imunskem odzivu, ker fagocitirajo opsonizirane delce. V venski krvi so trije tipi

granulocitov, ki jih razvrstimo po značilnem obarvanju njihovih citoplazemskih zrn: nevtrofilci, bazofilci in eozinofilci (Vozelj, 2000).

Nevtrofilci so najpomembnejše fagocitne celice. Gibljivost jim omogoča, da gredo preko kapilarnega endotela do vnetišča. Njihova citoplazma je napolnjena z lizosomi, ki vsebujejo razgrajevalne encime. Le-ti aktivirajo komplement, povečajo propustnost žilja ter razgrajujejo različne proteine.

Bazofilci so nefagocitne celice, ki na površini nosijo receptorje za protitelesa IgE, ki po stiku z antigenom sprožijo izločanje histamina in s tem reakcijo takojšnje preobčutljivosti.

Eozinofilci so polimorfonukelarne celice, ki imajo v citoplazmi velika zrna. Sposobni so fagocitirati kompleks antigen-protitelo ter z encimi razgrajevati snovi, ki spodbujajo nastanek IgE (Vozelj, 2000)

2.4.6.5 Mastociti

Mastociti so okrogle ali ovalne celice s tipično okroglim jedrom. V citoplazmi so vezana zrna in lipidna telesca. So celice, ki so ključne za vnetje, ki ga posredujejo protitelesa IgE. Vsi mastociti izvirajo iz prednikov v kostnem mozgu. Normalno jih v krvnem obtoku ne najdemo. Predniki potujejo v periferna tkiva kot nezrele celice in se tam diferencirajo v zrele mastocite. Najdemo jih povsem telesu. Nekatera tkiva, predvsem koža, sluznice dihal in prebavil, imajo zelo veliko mastocitov. Na celični membrani mastocitov in bazofilcev so številni receptorji za protitelesa IgE z močno afiniteto. Križna povezava na celice vezanih IgE in z multivalentnim antigenom je poglavitni sprožilni mehanizem aktivacije bazofilcev in mastocitev. Z aktivacijo mastocitov in bazofilcev se začne reakcija takojšnje preobčutljivosti (Vozelj, 2000).

2.4.6.6 Dendritične celice

Dendritične celice so dopolnilne (akcesorne) celice in so pomembne za sprožitev imunskega odziva. To so celice z dolgimi izrastki. Poznamo dva tipa dendritičnih celic, ki pa imata različne funkcije.

Prvi tip celic se imenuje intersticijske dendritične celice in se nahajajo v intersticiju večine organov, veliko jih je tudi v T-limfocitnem področju bezgavk in vranice. Ta tip dendritičnih celic najdemo tudi raztresen po epidermisu kože, kjer jih imenujemo Langerhansove celice. Dendritične celice zelo verjetno izhajajo iz prednikov v kostnem mozgu in so sorodne mononuklearnim fagocitom. Te celice z dolgimi izrastki so izredno učinkovite pri predstavljanju antigena celicam T pomagalkam.

Drugi tip dendritičnih celic so dendritične celice z dolgimi izrastki, ki segajo med druge celice, in jih imenujemo celice vrinjenke. Nahajajo se v germativnih središčih limfatičnih foliklov v bezgavkah, vranici in limfatičnem tkivu sluznic. Te celice ne izhajajo iz prednikov v kostnem mozgu in niso sorodne drugim dendritičnim celicam. Folikularne dendritične celice so v B-celičnem področju limfatičnih organov. Te celice zajamejo antigene, vezane s protitelesi ali s komponentami komplemента, in jih izpostavijo na svoji površini, da jih spoznajo limfociti B (Vozelj, 2000).

2.4.7 Citokini

Pri razvoju učinkovitega imunskega odziva sodelujejo limfoidne celice, vnetne celice in homopetske celice. Med temi celicami so zapletene interakcije, ki pa jih posreduje skupina majhnih molekularskih proteinov, ki jih imenujemo citokini. Citokini so skupina majhnih molekularskih regulacijskih glikoproteinov neimunoglobulinske narave, ki jih izločajo skoraj vse celice, predvsem pa limfociti in makrofagi. Uravnavajo razmnoževanje, diferenciacijo, efektorske funkcije in preživetje celic. Večinoma delujejo lokalno in se hitro razgradijo. Njihov razpolovni čas v krvi je manj kot 30 minut. Citokini se vežejo s specifičnimi receptorji na membrani tarčne celice 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 in zato lahko delujejo v pikomolarnih koncentracijah kot aktivatorji ali inhibitorji tarčne celice. Kljub temu, da citokine izločajo različne celice, so najpomembnejši proizvajalci citokinov celice T pomagalke (Vozelj, 2000).

Nekateri citokini se lahko vežejo z receptorji na membrani iste celice in delujejo avtokrino. Drugi citokini se vežejo na receptorje tarčnih celic, ki so v neposredni bližini celice, ki jih izloča, in delujejo parakrino. Spet tretji citokini pa se lahko vežejo na celico v oddaljenem delu telesa in delujejo endokrino. Vezava določenega citokina na odzivno celico povzroči, da odzivna celica izrazi na svoji površini citokinske receptorje in sprošča številne druge citokine, ki nato delujejo na različne tarčne celice. Tako lahko citokini, ki jih izloča posamezen limfocit po aktivaciji z antigenom, vplivajo na aktivnost različnih celic, ki sodelujejo pri imunskem odzivu. Na primer citokini, ki jih izločajo aktivirane celice Th vplivajo na aktivnost celic B, celic Tc, celic NK, makrofagov, granulocitov in homopetskih matičnih celic in tako aktivirajo celotno mrežo sodelujočih celic (Vozelj, 2000).

Najpomembnejša lastnost citokinov je pleiotropnost (v različnih tarčnih celicah sproščajo različne biološke učinke). Delujejo lahko sinergistično (skupen učinek dveh citokinov je večji kot aditivni učinek posameznih citokinov) ali pa antagonistično. Citokini obsegajo različne družine molekul: rastni faktorji, interferoni, kemokini in interleukini (izdelujejo jih limfociti T, makrofagi in nekatere tkivne celice. Imajo številne funkcije. Večina usmerja

druge celice k delitvi in razmnoževanju. Vsak interlevkin deluje na specifično skupino celic, ki izražajo ustrezen receptor za ta interlevkin.) (Vozelj, 2000).

Ker imajo citokini številne lastnosti, ki so prav tak kot jih imajo hormoni in rastni faktorji, je razlikovanje med temi tremi razredi mediatorjev velikokrat težko in nejasno. Vsi ti razredi mediatorjev so izločane topne molekule, ki sproščajo biološke učinke v pikomolarnih koncentracijah z vezavo na receptorje tarčnih celic (Vozelj, 2000).

Preglednica 2: Razlike med rastnimi hormoni in citokini (Vozelj, 2000)

	RASTNI FAKTORJI (RF) IN HORMONI	CITOKINI
IZDELAVA	RF nastanejo konstitucijsko	skrbno uravnano
ČAS IZLOČANJA	dolgotrajno	kratkotrajno
NAČIN DELOVANJA	endokrino	avtokrino in parakrino
KDO JIH IZDELUJE	specializirane žleze	številni tipi celic
TARČNE CELICE	svojevrstno delujejo na eno ali več vrst tarčnih celic	vezava na receptorje na zelo različnih celicah

2.4.7.1 Interlevkin-1 (IL-1)

IL-1 ima številne biološke aktivnosti. Izdelujejo ga predvsem aktivirani makrofagi in deluje na različne celice. Nahaja se v dveh oblikah IL-1 α in IL-1 β , ki ju kodirata dva različna gena. Obe obliki se vežeta na dva receptorja IL-1 (IL-1RI in IL-1RII) in imata enake biološke funkcije. Nastajata v predhodni obliki. Zdi se, da se IL-1 sprošča iz makrofagov med apoptozo. Nastanek IL-1 sprožijo različni dražljaji. Antagonist receptorja za IL-1 (IL-1 RA), ki ga izdelujejo iste celice kot IL-1, se veže na receptorje IL-1 in tako blokira njihove funkcije. Fiziološki pomen IL-1RA je verjetno v omejevanju aktivnosti IL-1.

IL-1 α in IL-1 β sta ključna vnetna citokina in imata osrednjo vlogo pri imunskem odzivu. Ta dva citokina povzročata vročino, kaheksijo, resorpcijo kosti, proteolizo mišic in povečano nastajanje proteinov akutne faze. V nekaterih primerih je učinek neposreden, v drugih pa posreden prek spodbuditve drugih citokinov, npr. IL-6 in TNF- α (Vozelj, 2000).

2.4.7.2 Citokini, ki so poglavitnega pomena za funkcijo celic T

2.4.7.2.1 Interlevkin-2 (IL-2)

IL-2 so prvotno opisovali kot T-celični rastni faktor, vendar pa je danes znano, da deluje na številne druge celične tipe, npr. na celice NK, celice B in makrofage. Ob aktivaciji zrelih celic T pride do sinteze in izločanja IL-2. Vpliva na rast, razmnoževanje in diferenciacije vseh imunskih celic, ki imajo na svoji površini receptorje za IL-2. To so limfociti T in B, mononuklearni fagociti in celice NK. IL-2 izdelujejo predvsem celice CD4 in delujejo na iste celice, ki ga izdelujejo (avtokrino delovanje), in na sosednje limfocite T (parakrino delovanje). Interakcija IL-2 z odgovarjajočim receptorjem IL-2R vodi v razmnoževanje limfocitnih celic Th-1. Pri tem pride tudi do tvorbe drugih citokinov ter pojavljanja receptorjev za rastne faktorje na površini Th-1. IL-2 je poglavitni avtokrini faktor za limfocite T. Količina sintetiziranega IL-2 v aktivnih celicah T je pomembna za jakost in obseg od celic T odvisnega imunskega odziva. Visoko afinitetni receptorji IL-2R se pojavijo tudi na drugih celicah: aktiviranih limfocitih B, aktiviranih limfocitih Th-2, citotoksičnih limfocitih in monocitih (Kroemer in sod., 1991; Vozelj, 2000).

2.4.7.2.2 Interlevkin-4 (IL-4)

IL-4 usmerja odziv celic Th-2 in uravnava alergijske reakcije. Izdelujejo ga subpopulacija celic T in mastociti. Njegovo izdelovanje se sproži ob aktivaciji celic T ali s križno povezavo receptorjev Fc ϵ RI in Fc ϵ RII na bazofilcih in mastocitih. IL-4 pospešuje razmnoževanje celic T, celic B, mastocitov in prednikov mieloidnih in eritroidnih celic. IL-4 je pomemben za izdelovanje IgE. V celicah B spodbuja preklon izotipa v IgE ter izdelovanje IgG1 (pri miših), IgG4 (pri ljudeh) in IgA. IL-4 preprečuje aktivacijo makrofagov in blokira večino učinkov INF- γ na makrofage, predvsem onemogoča povečano izdelovanje citokinov, npr. IL-1, prostagladinov in dušikovega oksida. Prav tako

IL-4 tudi blokira diferenciacijo Th-0 v Th-1 in pospešuje diferenciacijo Th-2. Delovanje IL-4 uravnava IL-12. IL-4 je rastni faktor za mastocite in deluje sinergistično z IL-3. To pomeni, da je IL-4 zelo pomemben za vnetne reakcije, ki so povzročene z IgE in eozinofilci. Močno afinitetne receptorje IL-4 najdemo na celicah T, celicah B, mastocitih, mieloidnih celicah, stromalnih celicah, endotelijskih celicah in monocitih (Vozelj, 2000).

2.4.7.2.3 Interlevkin 7 (IL-7)

IL-7 izdelujejo stromalne celice in tako pospešujejo razmnoževanje prednikov celic B in T, zrelih celic T in diferenciacijo prednikov T in celic Tc. V monocitih IL-7 spodbuja izločanje IL-1 α , IL-1 β , IL-6 in TNF- α (Vozelj, 2000).

2.4.7.2.4 Interlevkin-9 (IL-9)

Izdelujejo ga nekatere aktivirane celice T in celice Hodgkinovega limfoma. Je T-celični rastni faktor, ki deluje sinergistično z drugimi citokini. Z IL-2 povzroča razmnoževanje mišjih timocitov in skupaj z IL-4 pospešuje nastajanje IgE in IgG1 v celicah B (Vozelj, 2000).

2.4.7.2.5 Interlevkin 10 (IL-10)

Ima močan biološki učinek na funkcijo celic T. Izdelujejo ga celične podvrste Th-0 in Th-2. Njegovo izdelovanje preprečuje IFN- γ . Poglavitni funkciji IL-10 sta preprečevanje od lipopolisaharida LPS spodbujenega izdelovanja IL-1, TNF- α , GM-CSF in G-CSF. Preprečuje tudi izdelovanje reaktivnih kisikovih presnovkov in NO v makrofagih. IL-10 imenujemo tudi zaviralni faktor sinteze citokinov, ker preprečuje sintezo citokinov, predvsem v makrofagih celicah Th in celicah NK. Končni učinek teh akcij je preprečevanje imunskega vnetja, ki ga posredujejo celice. IL-10 ima stimulativen učinek na celice B in na sluznične mastocite. Sodeluje pa tudi pri razvoju limfocitov B v plazmatke. Povzroča preklon izotipa v IgG4. Skupaj z TGF- β pospešuje izdelovanje IgA v celicah B (Vozelj, 2000).

2.4.7.2.6 Interlevkin 12 (IL-12)

IL-12 je heterodimer, ki ga izdelujejo celice B, monociti in makrofagi. Je edini citokin, ki ga celice ne izdelujejo in ga imamo zaradi njegovega delovanja na celice NK za mediatorja naravne imunosti. Je pomemben regulator celično posredovanega imunskega odziva zaradi učinkov na celice NK in celice T. Je najmočnejši znani stimulator celic NK. V celicah NK spodbuja izdelovanje IFN- γ in deluje sinergistično z IL-2 ter okrepi citolitično aktivnost celic NK. IL-12 tudi spodbuja diferenciacijo celic T CD8 v zrele funkcijsko aktivne citotoksične celice. IL-12 ima zmožnost, da okrepi odziv celic Th-1. Prav zaradi te sposobnosti, se pravi, da preusmeri citokinski profil k odzivu s celicami Th-1, ga je možno uporabiti za zdravljenje alergijskih bolezni. Pokazali so, da rekombinantni IL-12 preprečuje preklon v odgovor z IgE (Vozelj, 2000).

2.4.7.3 Citokini, ki delujejo na celice B

Citokini IL-1, IL-2 in IL-4, ki delujejo na celice T, delujejo tudi na celice B. IL-2 spodbuja razmnoževanje in diferenciacijo celic B. IL-4 sproži preklon izotipa v celicah B (Vozelj, 2000).

2.4.7.3.1 Interlevkin-5 (IL-5)

Je homodimerni citokin, ki ga izdelujejo aktivirane celice T. Receptor za IL-5 (IL-5R) je izražen na eozinofilcih, bazofilcih in mišjih celicah B. Poglavitna lastnost IL-5 je spodbujevanje diferenciacije eozinofilcev in aktivacija zrelih eozinofilcev, tako da lahko ubijejo helminte. To aktivnost dopolnjujeta IL-4, ki sproži preusmeritev izdelovanja IgG (preklon) k izdelovanju IgE in novači eozinofilce, ter IL-10 (ki sproži preklon k IgG4) in s tem prispevata k alergijskim reakcijam, ki jih posredujejo celice Th-2 (Vozelj, 2000).

Patološko je IL-5 ključnega pomena pri alergijskem vnetju. Po antigenskem dražljaju se v pljučih astmatičnih bolnikov nakopiči zelo veliko eozinofilcev, kar povzroči pozne manifestacije alergijskega odziva. Eozinofilci okvarijo pljuča s sproščanjem poglavitnega

bazičnega proteina in nevtrotoksina iz njihovih citoplazemskih zrn. Zdi se torej, da je pozni astmatični odziv posledica pozne faze alergijske preobčutljivosti skupaj z eozinofilijo, ki nastane zaradi aktivacije celic T in izdelovanja IL-5 (Vozelj, 2000).

2.4.7.3.2 Interlevkin-6 (IL-6)

IL-6 izdelujejo različni celični tipi kot odgovor na IL-1. Je izrazit pleiotropni citokin. Na celice B deluje s pospeševanjem razmnoževanja in zorenja ter s tem okrepi izločanje imunoglobulinov. Počivajoče celice B ne izražajo IL-6R. Na njihovi površini se pojavi šele po aktivaciji. Ob vezavi IL-6 z IL-6R se aktivirajo tirozinove kinaze, ki prenesejo signale v notranjost celice (Vozelj, 2000).

2.4.7.3.3 Interlevkin-13 (IL-13)

Pretežno je izražen na aktiviranih celicah Th-2 in uravnava aktivnost človeških celic B in monocitov. Deluje kot kostimulator celic B. Interakcija med CD40 in CD40L spodbudi v navzočnosti IL-13 preklon izotipa v sintezo IgE prav tako kot IL-4. V človeških monocitih prepreči nastanek citokinov, ki so inducirani z LPS (IL-1 α in β , IL-6, IL-8 in TNF- α) (Vozelj, 2000).

2.4.7.3.4 Interlevkin-14 (IL-14)

IL-14 sodeluje pri razvoju spominskih celic B. Poleg tega pa tudi pospešuje razmnoževanje aktiviranih celic in zavira sintezo imunoglobulinov. Izdelujejo ga folikularne dendritične celice in aktivirane celice T (Vozelj, 2000).

2.4.7.4 Citokini , ki sodelujejo pri vnetju

2.4.7.4.1 Interferon- γ (INF- γ)

IFN- γ je pleiotropen citokin , ki vpliva na razmnoževanje, diferenciacijo in aktivnost celic T, celic NK in celic B. Je homodimerni glikoprotein. Izdelujejo ga naivne celice Th, podvrste Th-0 in Th-1, vse celice CD8+ in celice NK. Je tudi močan aktivator makrofagov. Zavira razvoj Th-2 odziva. Deluje sinergistično z drugimi citokini (Vozelj, 2000).

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

TNF- α izdelujejo makrofagi, celice T, celice NK, astrociti in Kuppferjeve celice v odgovor na bakterije, viruse, različne citokine in imunске komplekse. Je homotrimer, to je aktivna oblika. V nepredelani predhodni obliki je vezan na membrano (Vozelj, 2000). TNF- α je odgovoren za številne biološke učinke (vnetne in imunomodulatorne), sodeluje tudi pri apoptozi. Pri majhnih koncentracijah TNF- α deluje avtokrino in parakrino na levkocite in endotelijske celice.

TNF- β izločajo aktivirane celice T in B. Lahko je v membranski obliki, vezan na transmembranski protein LT- β (Vozelj, 2000).

2.4.7.5 Drugi citokini

2.4.7.5.1 Levkemijo inhbirajoči faktor (LIF)

LIF izločajo timusne epiteljske celice in stromalne celice kostnega mozga. Deluje na hepatocite, v katerih inducira sintezo proteinov akutne faze, ter na embrionalne matične celice in pospešuje razmnoževanje in diferenciacijo (Vozelj, 2000).

2.4.7.5.2 Onkostatin M

OSM izdelujejo makrofagi in celice T. Deluje na tumorske celice in zavira njihovo razmnoževanje, na hepatocite, v katerih inducira sintezo proteinov akutne faze, in na celice Kaposijevega sarkoma, kjer pospešuje razmnoževanje (Vozelj, 2000).

2.4.7.5.3 Granulocitno makrofagni rastni dejavnik (GM-CSF)

GM-CSF je rastni dejavnik, pomemben za preživetje in rast matičnih krvnih celic za diferenciacijo mieloidne celične vrste, ter kot rastni faktor endotelijskih, eritrocitnih celic, megakariocitov in celic T. Izločajo ga celice T, makrofagi, fibroblasti in endotelijske celice (Roitt in sod., 1996).

2.4.7.6 Kemokini

Kemokini spodbujajo naključno gibanje (kemokinezo) in usmerjeno potovanje levkocitov (kemotakso). So zelo pomembni pri naravni imunosti. Vežejo se na receptorje kačaste oblike, ki do sedemkrat prehajajo skozi membrano in spadajo k rodopsinski superfamiliji. Kemokine razdelimo v tri družine CC, CXC in C. Kemokini družine CXC so zelo aktivne molekule in jih izdelujejo monociti, limfociti, granulociti, bronhalne epiteljske celice in keratinociti. Gre za zelo kemotaktične molekule in povzročajo vdor nevtrofilcev, monocitov, celic T in bazofilcev v vnetišče. Najbolj poznan kemokin te družine je IL-8. IL-8 je močan kemoatraktant, ki aktivira te celice, sproži respirativni izbruh v nevtrofilcih in sproščanje histamina in levkotrienov iz bazofilcev (Vozelj, 2000).

V družino kemokinov CC spada makrofagni vnetni protein, ki ga izdelujejo celice T, celice B, makrofagi, Langerhansove celice in nevtrofilci. Je kemotaktičen faktor za eozinofilce, monocite ter preprečuje razmnoževanje matičnih celic. Drugi član družine CC je eotaksin, ki je močan kemotaktičen faktor za eozinofilce. V to družino spadata še kemokina RANTES (regulated upon activation normal T-cells expressed and secreted), ki ga izdelujejo celice T in makrofagi in je kemotaktičen za spominske celice T in eozinofilce, in

MCAF (macrophage chemotactic and activating factor), ki je kemoatraktant za človeške makrofage (Vozelj, 2000).

2.5 UPORABA PRETOČNE CITOMETRIJE ZA OPREDELJEVANJE LIMFOCITNIH POPULACIJ

2.5.1 Uporaba metode

Z metodo pretočne citometrije ugotavljamo deleže levkocitnih populacij v krvi in BAL-u, najpogosteje določamo limfocitne populacije. Je metoda za hitro in natančno preiskavo molekul, vezanih na membrane celic in njihovo pojavljanje med diferenciacijo. Metoda pretočne citometrije je v osnovi enaka metodi fluorescentne mikroskopije, le da je odčitavanje odstotka obarvanih celic pri pretočni citometriji avtomatizirano, hitrejše in objektivnejše (Ihan A., 1999).

2.5.2 Analiza limfocitov s pretočnim citometrom

Za analizo potrebujemo celice v suspenziji, kateri dodamo raztopino monoklonskih protiteles označenih s fluorescenčnim barvilom. Po določenem času celice speremo. S tem odstranimo protitelesa, ki se niso vezala na celice. Tako pripravljeno suspenzijo lahko analiziramo s pretočnim citometrom. V pretočnem citometru celice potujejo ena za drugo skozi ozek snop svetlobe. Ko pride posamezna celica v območje svetlobnega žarka, se le-ta lahko odbije, lomi ali pa absorbira v molekulah flurokromnih barvil, ki so vezana na monoklonska protitelesa. Flurokromi nato oddajo svetlobo večjih valovnih dolžin. Svetlobo, ki jo osvetljena celica odda, analizira sistem fotosprejemnikov. Vir svetlobe, ki obseva celice, je navadno laserski žarek, ki je argonski, kriptomski, helij-kadmijski ali helij-neonski.

Pretočni sistem tvori predvsem pretočna komora, skozi katero tečejo celice v izotonični tekočini. Ob prehodu snopa žarkov posamezna celica odda, odvisno od njenih fizikalnih in kemičnih lastnosti, signal, katerega preko ogledal, leč in filtrov zbirajo in selekcionirajo fotodetektorji. Navadno dva fotodetektorja merita svetlobo, eden iz smeri vira-FALS

(Forward Angle Light Scatter) in drugi pravokotno na smer vpadle svetlobe-RALS (Right Angle Light Scatter). FALS je pomemben za ugotovitev velikosti celice, RALS pa sprejema svetlobo odbito od celice, ki je v skladu z zrnatostjo ter površinsko strukturo celice. V dveh ali več detektorjih, ki so opremljeni z barvnimi filtri, merimo fluorescenčno svetlobo.

Fotopomnoževalke zvečajo svetlobne impulze in jih spremenijo v električne impulze, posebni analogno digitalni preoblikovalci pa v končne digitalne impulze. Vse dobljene podatke ureja računalnik, rezultate pa lahko prikažemo matematično ali grafično.

Točkovni diagram je osnovni rezultat pretočne citometrije, na katerem vsaka točka predstavlja celico. Položaj točke je odvisen od izmerjenih celičnih parametrov. Bele krvne celice se zaradi morfoloških razlik razvrstijo na različna mesta točkovnega diagrama. Pri večjih celicah je položaj pike bolj v desno, pri bolj granuliranih je položaj pike bolj navzgor. Največja in najbolj granulirana skupina celic so granulociti. Najmanjši in najmanj granulirani so limfociti, monociti pa so nekoliko večji in bolj granulirani od limfocitov. Skupino celic, ki jo želimo opazovati glede na njihove fluorescenčne lastnosti obkrožimo z elektronskim svinčnikom. Kot rezultat pretočne citometrije lahko navedemo:

- odstotek pozitivnih celic (celice, ki se po reakciji s fluorokromom, označenim monoklonskim protitelom, fluorescirajo in jih po razločitvi med pozitivnimi in negativnimi celicami lahko izračunamo);
- povprečno celično svetilnost (fluorescenca), ki je sorazmerna povprečni količini antigenskih molekul na posamezni celici. Rezultat na ta način predstavimo takrat, ko ni jasnih razmejitev med celičnimi populacijami (Ihan, 1999).

2.5.3 Monoklonska protitelesa

Levkociti na svojih površinah izražajo molekule (receptorje, encime), ki jih prikazujemo z uporabo monoklonskih protiteles, na katera so vezana fluorescenčna barvila. Monoklonska protitelesa, ki se uporabljajo za prikazovanje teh molekul, so razvrščena v skupine CD (cluster of differentiation).

CD3 se specifično vežejo na T celični receptor, zato se jih uporablja za prikaz zrelih limfocitov T.

CD69 imenujemo tudi AIM (activation inducer molecule) ali zgodnji antigen aktivacije (EA-1). Je zgodnji inducibilni celični površinski glikoprotein, ki je potreben med limfoidno aktivacijo. Povezan je z diferenciacijo celic Th-1 in z njo povezanimi citokini (IL-2, TNF- α , IFN- γ). Izražajo ga aktivirane celice T, celice B, celice NK, nevtrofilci, eozinofilci, epidermalne Langerhansove celice.

2.6 UPORABA PRETOČNE CITOMETRIJE PRI BAL

Pretočno citometrijo so že več desetletij uporabljali za identifikacijo in očiščenje celic za različne raziskovalne namene. Razvoj velikega števila fluorescentno označenih monoklonskih protiteles je omogočil analizo različnih celičnih tipov v številnih vzorcih v relativno kratkem času. Pretočna citometrija lahko kombinira morfološke lastnosti glede na FCS (forward scatter)/SSC (side scatter channel) z intenzivnostjo ekspresije za celico specifičnega površinskega markerja z uporabo fluorescentno označenih protiteles (van Rijt in sod., 2004).

Citokini so pomembni mediatorji fiziološkega in patološkega vnetnega odziva. Za študij citokinov, ki se izražajo iz celic v dihalnih poteh, so uporabili več različnih metod. Proteine citokinov, ki se izločajo v dihalne poti, so merili v BALF (bronhoalveolar fluid). Vendar pa ta metoda ni pokazala katere celice so odgovorne za produkcijo citokinov. Drug pristop, ki nam tudi omogoči ocenitev ekspresije citokinov, je ugotavljanje mRNA. Za

ugotovitev fenotipa celice, ki izraža mRNA, lahko uporabimo tehniko dvojnega barvanja. Vendar pa translacija ne sledi popolnoma ekspresiji mRNA. Celice iz BALF lahko gojimo in vitro, citokinsko produkcijo potem ocenimo v kratkem času in tako dobimo informacije o celi celični populaciji. Prisotnost citokinov v celici pa zaznamo tudi s pretočno citometrijo, ki uporablja fluorescnetno označena protitelesa. Podatki, ki jih dobimo na ta način, natančno izražajo situacijo in vivo (Krouwels in sod., 1997).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

V študijo smo zajeli 25 otrok, starih od 20 mesecev do 144 mesecev, ki so bili hospitalizirani na Pediatrični kliniki v Ljubljani na Oddelku za pljučne bolezni zaradi načrtovanih preiskav. Enega otroka smo izključili iz raziskave, ker je bilo ugotovljeno, da ima tumor in so težave z dihalo izhajale iz tega.

Otroke smo razdelili v tri skupine glede na to ali imajo astmo in, če jo imajo ali gre za prvo epizodo astme ali za kronično obliko astme. Tako smo dobili tri skupine in sicer: v prvo skupino smo uvrstili otroke, ki astme nimajo (7 otrok), v drugo skupino smo uvrstili otroke, ki imajo prvo epizodo astme (9 otrok), v tretjo pa otroke s kronično obliko astme (9 otrok).

3.2 ODVZEM VZORCEV

Vzorci so bili odvzeti med postopkom bronhoskopije pri otrocih, ki so bili hospitalizirani zaradi nadaljne diagnostike.

3.3 OPREDELITEV AKTIVIRANIH LIMFOCITOV T, MONOCITOV IN GRANULOCITOV V BAL-U

3.3.1 Reagenti

- CD3 PerCP (Becton Dickinson), IFN- γ FITC-IL-4 PE (Becton Dickinson)
- Lizacijska raztopina (Becton Dickinson) redčenje 1:10
- PBS z 0,5 % BSA in 0,1 % Na- azid (na 50 ml PBS 0,5 g BSA in 200 μ l NaN₃)
- Cytodetect kit IQ products
- CD69, označena s FITC (Becton Dickinson)

3.3.2 Opis analitskega postopka opredelitve aktiviranih limfocitov T, monocitov in granulocitov BAL-u.

V epruveto smo dali po 100 μ l suspenzije celic (1×10^6 celic/ml) in 10 μ l mešanice mišjih monoklonskih protiteles: Anti-Hu-CD3, označenih s PerCP (Becton Dickinson) Anti-Hu-CD69, označenih s FITC (Becton Dickinson). Vsebino smo na hitro premešali in inkubirali 15 do 30 minut pri sobni temperaturi v temnem prostoru. Nato smo celice fiksirali 10 minut z 2 ml 1,5% formalaldehida in jih 5 minut centrifugirali pri 1600 obratih na minuto. Po centrifugiranju smo supernatant odlili in celice sprali z 2 ml fosfatnega pufra. Po 5 minutnem centrifugiranju smo celice resuspendirali v 1ml fosfatnega pufra. Celice so bile pripravljene za analizo na pretočnem citometru. V primeru, ko analize nismo izvedli takoj, smo suspenzijo v pokritih epruvetah shranili v temnem prostoru pri temperaturi od 2 do 8°C. Pred analizo smo vzorec še enkrat premešali, da smo zmanjšali agregate. Celice je potrebno analizirati najkasneje 24 ur po označitvi s protitelesi.

3.4 OPREDELITEV CELIC TH-1 IN TH-2

3.4.1 Reagenti

- CD3 PerCP (Becton Dickinson), IFN- γ FITC-IL-4 PE (Becton Dickinson)
- PBS (izocel)
- Lizacijska raztopina (Becton Dickinson) redčenje 1:10
- Premeabilizacijska raztopina (Becton Dickinson) redčenje 1:10
- PBS z 0,5 % BSA in 0,1 % Na- azid (na 50 ml PBS 0,5 g BSA in 200 μ l NaN₃)
- Cytodetect kit IQ products

3.4.2 Priprava reagentov A, B in C za stimulacijo limfocitov T

A: V stekleničko smo dodali 250 μ l DMSO. Nato smo vsebino prenesli v ependorfko in jo zamrznili na -20°C . Odvzeli smo 5 μ l in dodali 5 ml RPMI (working solution). 10 μ l raztopine smo uravnali na koncentracijo 1×10^6 celic/ml.

B: V stekleničko smo dodali 75 μ l DMSO. Vsebino smo prenesli v ependorko in jo zamrznili na -20°C . Odvzeli smo 1,5 μ l ter dodali 75 μ l RPMI (working solution). 10 μ l raztopine smo uravnali na koncentracijo 1×10^6 celic/ml.

C: V stekleničko smo dodali 250 μ l 98% EtOH. Vsebino smo prenesli mo v ependorko in jo zamrznili na -20°C . Odvzeli smo 5 μ l in dodali 500 μ l RPMI (working solution). 10 μ l raztopine smo uravnali na koncentracijo 1×10^6 celic/ml.

3.4.3 Opis analitskega postopka

V epruveto smo dali 1 ml nestrjene krvi ali pa suspenzijo limfocitov - koncentracijo limfocitov smo uravnali na 1×10^6 celic/ml. Dodali smo reagenta A in B (stimulacijski reagent) in 10 μ l reagenta C (akumulacijski reagent- Cytodetect Kit IQ Products). Inkubirali smo 5 ur pri 37°C v 5% CO₂. Po inkubaciji smo celice fiksirali z 2 ml lizacijske

raztopine (2% formalin). Inkubirali smo 10 minut, nato centrifugirali 5 minut pri 1600 obratih na minuto. Čez noč smo shranili v hladilniku na 5 °C. Naslednje jutro smo najprej označili površinski marker CD3 PerCP. Nato smo inkubirali 20 minut. Sledila je fiksacija z 2 ml lizacijske raztopine (2% formalin). Nato smo inkubirali 10 minut in centrifugirali 5 minut pri 1600 obratih na minuto. Supernatant smo zavrgli in dodali 0,5 ml permeabilizacijske raztopine. Inkubirali smo 10 minut. Nato pa dodali 2 ml 0,5% BSA in 0,1% NaN_3 v PBS. Centifugirali smo 5 minut pri 1600 obratih na minuto. Supernatant smo zavrgli. V epruveto smo dodali po 10 μl IFN- γ FITC-IL-4 PE. Vsebino smo na hitro premešali. Sledila je 20-30 minutna inkubacija pri sobni temperaturi v temnem prostoru. Nato smo dodali 2 ml PBS ter premešali. Temu je sledila 5 minutna centrifugacija pri 1600 obratih na minuto. Supernatant smo zavrgli. Postopek smo še enkrat ponovili. Supernatant smo zavrgli in ponovno dodali 1 ml PBS. Sedaj so bile celice pripravljene za analizo na pretočnem citometru.

Če analize ne izvedemo takoj, shranimo pokrite epruvete v temnem prostoru pri temperaturi 2 do 8 °C. Pred analizo vzorec še enkrat premešamo, da zmanjšamo agregate.

3.5 STATISTIČNA OBDELAVA

Iz rezultatov poskusov smo izračunali povprečne vrednosti in standardne odklone za posamezne parametre. Razlike v krvni sliki in v vzorcih BAL-a smo ugotovili po testiranju razlik v variancah z Neumann-Keulsovim t-testom (eno parametrska anova analiza varianc) ter določili vrednosti p. Izbrali smo stopnjo tveganja 0,05; kar pomeni, da je razlika med vzorcema statistično značilna, če je vrednost p manjša od 0,05. Ni pa značilna, če je vrednost p večja od 0,05.

V tabelah sem prikazala analizo vzorce BAL-a za tiste parametre za katere je stopnja tveganja blizu 0,05 ali pa je manjša od 0,05. Celotne tabele pa so v prilogi.

4 REZULTATI

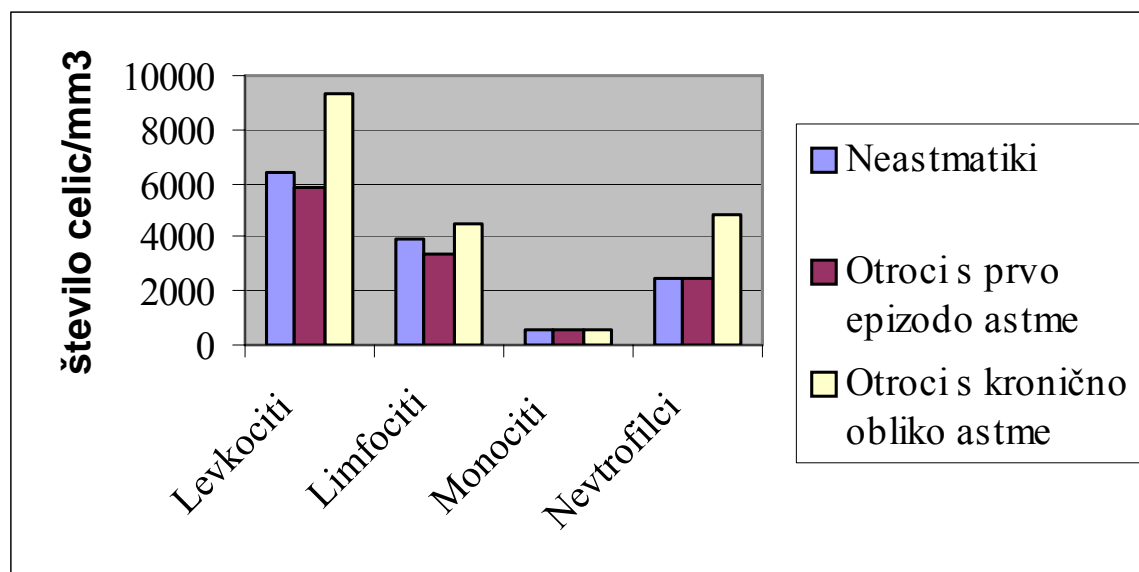
4.1 ANALIZA LEVKOCITNIH POPULACIJ V KRVI PRI SKUPINI NEASTMATIKOV, SKUPINI S PRVO EPIZODO ASTME TER SKUPINI S KRONIČNO OBLIKO ASTME

Primerjali smo koncentracijo levkocitov, limfocitov, monocitov in nevtrofilcev v krvi otrok, ki niso bili astmatiki, otrok s prvo epizodo astme in v krvi otrok s kronično obliko astme. Ugotovili smo, da se statistično pomembne razlike pojavijo med skupino s prvo epizodo astme in skupino otrok s kronično obliko astme v koncentraciji nevtrofilcev.

Preglednica 3: Analiza levkocitnih populacij v krvi pri skupini neastmatikov, skupini s prvo epizodo astme ter skupina s kronično obliko astme.

	Neastmatiki	Otroci s prvo epizodo astme	Otroci s kronično obliko astme			
	Povprečje			p(t 1)	p(t 2)	p(t 3)
Levkociti (število/mm ³)	6400,00	5828,57	9311,11	0,73	0,32	0,18
Limfociti (število/mm ³)	3973,00	3347,67	4441,63	0,24	0,71	0,39
Monociti (število/mm ³)	576,33	572,33	559,25	0,98	0,92	0,92
Nevtrofilci (število/mm ³)	2500,57	2468,57	4865,89	0,97	0,07	0,05

Legenda: p(t 1)-t test med skupino neastmatikov in skupino otrok s prvo epizodo astme, p(t 2)- t test med skupino neastmatikov in skupino s kronično obliko astme, p(t 3)- t test med skupino s prvo epizodo astme in skupino s kronično obliko astme.



Slika 3: Analize levkocitnih populacij v krvi pri skupini neastmatikov, skupini s prvo epizodo astme ter skupino s kronično obliko astme.

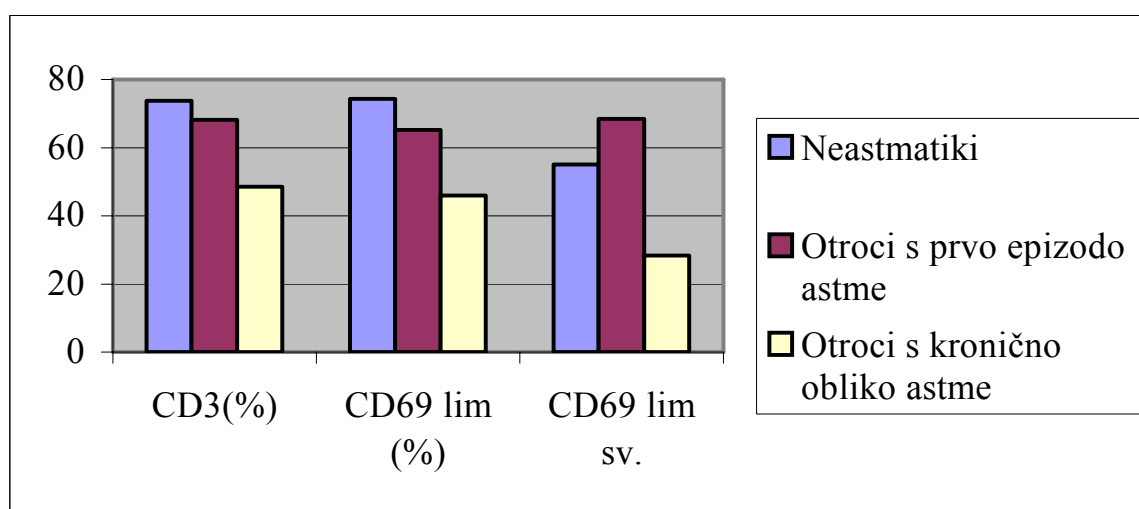
4.2 ANALIZA LEVKOCITNIH POPULACIJ V VZORCU BAL-A PRI SKUPINI NEASTMATIKOV, SKUPINI KRONIČNIH ASTMATIKOV IN PRI SKUPINI S PRVO EPIZODO ASTME

Pri primerjavi skupine neastmatikov s skupino kroničnih astmatikov smo ugotovili, da pride do statistično značilnih razlik pri deležu celic CD3 ter pri deležu celic CD69+ med limfociti. Pri primerjavi skupine otrok s prvo epizodo astme in skupine otrok s kronično obliko astme pa smo ugotovili, da pride do statistično pomembnih razlik v svetilnosti CD69+ na limfocitih.

Preglednica 4: Levkocitne populacije v vzorcih BAL-a pri skupini neastmatikov, skupini kroničnih astmatikov in skupini s prvo epizodo astme

	Neastmatiki	Otroci s prvo epizodo astme	Otroci s kronično astmo		
	Povprečje			p (t 1)	p(t 2)
CD3 (%)	73,76	68,20	48,53	0,02	0,14
CD69lim (%)	74,24	65,14	45,94	0,04	0,18
CD69lim sv	55,05	68,43	28,34	0,06	0,04

Legenda: CD3(%)- delež CD3 , CD69lim (%)- delež celic CD69 med limfociti, CD69lim sv.-svetlnost CD69+ na limocitih; p(t 1)- t test med skupino neastmatikov in skupino kroničnih astmatikov, p(t 2)- t test med skupino kroničnih astmatikov in skupino s prvo epizodo astme.



Slika 4: Analiza levkocitnih populacij v vzorcih BAL-a pri skupini neastmatikov, skupini s prvo epizodo astme in skupini s kronično astmo.

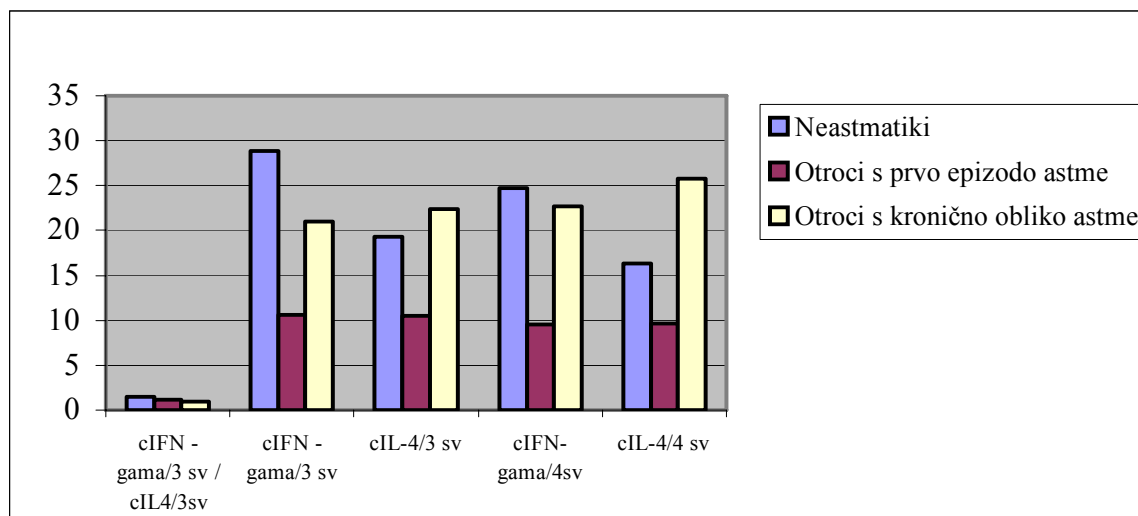
4.3 ANALIZA EKSPRESIJE ZNOTRAJCELIČNIH CITOKINOV V VZORCU BAL-A PRI SKUPINI NEASTMATIKOV, SKUPINI OTROK S PRVO EPIZODO ASTME IN SKUPINI OTROK S KRONIČNO OBLIKO ASTME

Pri statistični obdelavi vseh treh skupin smo ugotovili, da pride do statistično pomembnih razlik pri ekspresiji znotrajceličnih citokinov cIFN- γ in cIL-4 v limfocitih T. Pri primerjavi skupine otrok s kronično astmo in otrok s prvo epizodo astme smo ugotovili, da pride do statistično pomembnih razlik pri ekspresiji cIFN- γ limfocitov T ter celic T pomagalk. Statistično značilni razlike pri primerjavi skupine neastmatikov s skupino otrok s prvo epizodo astme pa se zelo približa tudi razmerje med svetilnostjo cIFN- γ in cIL-4 limfocitv T.

Preglednica 5: Analiza svetilnosti levkocitnih populacij v vzorcu BAL-a pri neastmatikih, skupini otrok s prvo epizodo astme in skupini otrok s kronično obliko astme

	Neastmatiki	Otroci s prvo epizodo astme	Otroci s kronično obliko astme		
	Povprečje			p(t 2)	p(t 3)
cIFN-gama/3 sv/cIL-4/3 sv	1,47	1,14	0,96	0,06	0,30
cIFN-gama/3 sv	28,80	10,65	20,98	0,56	0,05
cIL-4/3 sv	19,32	10,45	22,41	0,72	0,05
cIFN-gama/4 sv	24,69	9,58	22,69	0,88	0,09
cIL-4/4 sv	16,36	9,67	25,78	0,38	0,09

Legenda: cIFN-gama/3 sv/cIL-4/3 sv.- razmerje med svetilnostjo cIFN- γ in cIL-4 limfocitov T, cIFN-gama/3 sv.- cIFN- γ , cIL-4/3 sv.- svetilnost cIL-4, cIFN-gama/4 sv.-svetilnost cIFN- γ limfocitov T celic pomagalk, cIL-4/4 sv.-svetilnost cIL-4 limfocitov T celic pomagalk, p(t 2)- t test med skupino neastmatikov in skupino s kronično obliko astme, p(t 3)- t test med skupino s prvo epizodo astme in skupino s kronično obliko astme.



Slika 5: Analiza svetilnosti levkocitnih populacij v vzorcih BAL-a pri skupini neastmatikov, skupini s prvo epizodo astme in skupini s kronično astmo.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Število otrok, ki obolevajo za astmo, se je v zadnjih letih močno povečalo. Gre za kronično obliko vnetja, ki je povezana z vnetjem, ki ga posredujejo citokini. Vnetje dihalnih poti pri astmi je posledica delovanja limfocitov T, eozinofilcev, makrofagov in mastocitov. Pri pacientih z astmo so našli veliko količino limfocitov v dihalnih poteh, kar je vodilo do raziskav vloge celic T v patogenezi astme (Robinson in sod., 1993). Ugotovljeno je bilo, da so celice T, ki jih dobimo iz zračnih poti, z BAL-om ali s sputumom bolj reprezentativne. Številne študije kažejo, da pri otroški astmi prevladujejo citokini Th-2. Najnovejši dokazi pa kažejo tudi to, da pri vnetju sodelujejo tudi citokini Th-1 (Brown in Ennis, 2005).

Vzorec BAL-a naj bi odražal stopnjo vnetja znotraj in okoli bronhialnega lumna in globljih alveolarnih predelov. Celice v BAL-u klasično identificiramo na osnovi morfoloških kriterijev z barvanjem po May-Grünwald Giemsa. Pri tej tehniki uporabljamo za identifikacijo kombinacijo celične velikosti, oblike jedra in obarvanja citoplazme. V vsakodnevni praksi je razlikovanje med eozinofilci in nevtrofilci problematično zaradi heterogenosti v obarvanju citoplazme in možnosti, da eozinofilci izgubijo sposobnost obarvanja citoplazme zaradi degranulacije. Eozinofilce ločimo od nevtrofilcev glede na prisotnost eozinofilne citoplazme ali pa glede na prisotnost jedra v oblike kroga. Drug problem pri razlikovanju med celicami v BAL-u je razlikovanje med velikimi aktiviranimi limfociti in monociti (Brown in Ennis, 2005).

Izhodišče za naše delo je bila hipoteza, da lahko z analizo BAL-a s pretočno citometrijo opredelimo astmo pri otrocih z dihalno stisko. V naši raziskavi so sodelovali otroci, ki so imeli že predhodne dihalne stiske, ki pa niso bile nujno vse povezane z astmo. Veliko otrokom v pljučih piska, kar pa še ne pomeni, da imajo astma.

V raziskavi so sodelovali otroci, ki so bili hospitalizirani na pljučnem oddelku Pediatrične klinike, zaradi bolj natančne opredelitve njihovih dihalnih stisk. V raziskavi je sodelovalo 23 otrok v starosti od 6 mesecev pa do 144 mesecev, ki so bili hospitalizirani od 18. 4. 2003 pa do 29. 3. 2005.

Paciente smo razdelili v tri različne skupine in sicer na neastmatike, otroke s prvo epizodo astme in otroke s kronično obliko astme. V vseh skupinah smo gledali iste parametre in ugotavljali statistično pomembne razlike med posameznimi skupinami otrok. Statistično pomembne razlike se pojavijo pri različnih parametrih. Pri statistični primerjavi skupine neastmatikov in skupine s prvo epizodo astme smo ugotovili, da ne pride pri primerjanih parametrih do nobenih statistično značilnih razlik. Pri primerjavi skupine s prvo epizodo astme in skupine s kronično astmo smo ugotovili, da pride do razlik pri deležu celic CD3 v BAL-u ter deležu celic CD69 med limfociti. Pri primerjavi skupine neastmatikov in skupine s kronično astmo smo ugotovili, da pride do razlik pri svetilnosti CD69+ na limfocitih (glej preglednico 5).

Brown in sodelavci so leta 2003 ugotovili, da je pogostnost celic, ki imajo IFN- γ večja pri astmatikih, ki imajo tudi atopijo, se pravi pri kroničnih astmatikih. Atopijo so določili s pomočjo zgodovine alergije, merjenja serumskih koncentracij IgE. V naši študiji pa smo ugotovili, da je pogostnost celic, ki imajo IFN- γ večja pri neastmatikih, njim sledijo kronični astmatiki, najmanjša pogostnost celic, ki imajo IFN- γ pa se pojavi pri astmatikih s prvo epizodo astme. Ugotovili so tudi, da celice T, ki imajo IFN- γ prevladujejo, v primerjavi z celicami T, ki imajo IL-2 ali pa IL-4. V naši študiji pa smo ugotovili, da pri neastmatikih, prevladujejo celice, ki imajo IFN- γ , pri kroničnih astmatikih in astmatikih s prvo epizodo astme pa prevladujejo celice, ki imajo IL-4. Celice, ki imajo IL-2 pa v naši študiji nismo proučevali (glej prilogo A).

Celice Th-1 so tiste, ki izražajo IFN- γ , celice Th-2 pa so tiste, ki izražajo IL-4. Razmerje med celicami Th-1 in Th-2 naj bi bilo pri astmatikih v prid celicam Th-2, to pomeni, da naj bi bil pri njih dominanten citokin IL-4.

Atopija je povezana s povečanjem koncentracije IL-4 v krvi in z zmanjšano sposobnostjo celic T, da proizvajajo IFN- γ . Do povečanja koncentracije IL-4 v krvi pa ne pride pri neatopični astmi (Mangan in sod., 2000). Pri nas nismo spremljali koncentracije IL-4 v krvi ampak ekspresijo v celicah BAL-a. Tudi tu smo ugotovili, da pride do povečanja ekspresije IL-4 v celicah T pri astmi. IL-4 usmerja odziv celic Th-2 in uravnava alergijske reakcije, zato je razumljivo, da pride do povečanja ekspresije IL-4 v celicah pri atopični

astmi, ker sta prisotna tako vnetje kot alergija. IL-4 je pomemben za izdelovanje IgE, preprečuje tudi aktivacijo makrofagov in večino učinkov IFN- γ na makrofage. IL-4 je pomemben za vnetne reakcije, ki so povzročene z IgE in eozinofilci (glej prilogo A).

Pri otrocih, s kronično astmo, smo ugotovili, da imajo zmanjšan delež limfocitov in monocitov, ki izražajo CD69+.

V številnih študijah so ugotovili, da na izražanje citokinov vplivata tako starost kot tudi resnost obolenja. Nurse s sodelovci je leta 1997 pokazal, da imajo otroci, ki imajo hudo astmo, značilno nižje koncentracije IFN- γ v krvi. Medtem ko so imeli otroci z zmerno astmo nižje, vendar pa ne značilno nižje, koncentracije IFN- γ v primerjavi z zdravimi kontrolami. To nakazuje možnost povezave med koncentracijo IFN- γ in resnostjo obolenja. V naši raziskavi nismo imeli normalnih zdravih kontrol, niti nismo ugotavljali resnosti astme. Ugotovili smo razliko v koncentraciji IFN- γ v BAL-u pri kroničnih astmatikih in neastmatikih in otrocih s prvo epizodo astme. Pri kroničnih astmatikih in skupini otrok s prvo epizodo astme, je bila koncentracija nižja kot pri skupini neastmatikov. Nismo pa imeli kontrol zdravih, s katerimi bi primerjali te rezultate.

Število otrok, ki so sodelovali v naši študiji je bilo premajhno, da bi lahko zanesljivo sklepali o značilnih spremembah v celicah BAL-a med neastmatiki, otroci s prvo epizodo astme in otroci s kronično obliko astme.

5.2 SKLEPI

1. Razmerje celic Th-1 in Th-2 je pri kroničnih astmatikih manjše kot pri neastmatikih in otrocih s prvo epizodo astme.
2. Pri kroničnih astmatikih in otrocih s prvo epizodo astme je povečana ekspresija IL-4 in zmanjšana ekspresija IFN- γ , kar potrjuje trditev, da pri astmatikih prevladuje odziv Th-
3. Ekspresija aktivacijskega markerja CD69 je pri kroničnih astmatikih značilno manjša kot pri neastmatikih in otrocih s prvo epizodo astme.

6 POVZETEK

Astma je kronična bolezen dihal, za katero je značilno prezistentno vnetje bronhijev. Pri tem vnetju sodelujejo različne vrste celic: limfociti, eozinofilci, mastociti, bazofilci, monociti, alveolarni makrofagi. Značilni simptomi in znaki astme so: naduha, kašelj, piskanje ali stiskanje v prsnem košu. Vendar pa vsako piskanje še ne pomeni tudi astme, zato je potrebna nadaljna diagnostika. Povzročitelj astme ni znan.

Pri patogenezi astme igrajo pomembno vlogo celice Th-2. Hipoteza Th-2 pravi, da pride pri astmi do povečanja odziva Th-2 in zmanjšanja odziva Th-1. Celice Th-2 so tiste, ki izražajo IL-4, Th-1 pa so tiste, ki izražajo IFN- γ . Limfocitov Th-2 je več v dihalnih poteh tistih ljudi, ki imajo tako atopijo kot tudi astmo.

Uporabili smo metodo pretočne citometrije za analizo levkocitnih populacij v vzorcih BAL-a.

Ugotovili smo, da je razmerje med celicami Th-1 in Th-2 manjše pri kroničnih astmatikih. Pri neastmatikih in otrocih s kronično obliko astme je povečana koncentracija IFN- γ v primerjavi s skupino s prvo epizodo astme. Pri kroničnih astmatikih in skupini otrok s prvo epizodo astme je povečana koncentracija IL-4, v primerjavi z neastmatiki, zaradi česar je povečan odziv Th-2. Pri primerjavi skupine otrok s prvo epizodo astme in skupino s kronično obliko astme pa ugotovimo, da je koncentracija IL-4 večja pri skupini otrok s prvo epizodo astme. Ekspresija aktivacijskega markerja CD69 na limfocitih je bila pri kroničnih astmatikih manjša v primerjavi z neastmatiki.

7 VIRI

- Berke G. 1995. Unlocking the secrets of CTL and NK cells. *Imunnology Today*, 16, 343-346.
- Brown V. G., Ennis M. 2005. T cell cytokine production in childhood asthma. *Current Respiratory Medicine Reviews*, 1, 1-6.
- Brown V., Warke T. J., Shields M. D., Ennis M. 2003. T cell cytokine profiles in childhood asthma. *Thorax*, 58, 311-316.
- Byrne J. A., Butler J. L., Cooper M. D. 1988. Differential activation requirements for virgin and memory T cells. *Journal of Immunology*, 141, 3249-3257.
- Clement L. T., Vink P. E., Bradley G. E. 1990. Novel immunoregulatory functions of phenotypically distinct suppopulations of CD4+ cells in the humane neonate. *Journal of Immunology*, 145, 102-108.
- Coombs R. R. A., Gell P. G. H., Mabry R. I., Faaoa F. 1992. The classification of allergic reactions. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 25, 159-160.
- English B. K., Burchett S. K., English J. D. 1988. Production of lymphotoxin and tumor necrosis factor by human neonatal mononuclear cells. *Pediatric Research*, 24, 717-722.
- English B. K., Wilson C. B. 1996. The neonatal immune system. V: *Clinical immunology: principles and practice*. Rich R.R., Fleishher T. A., Schwartz B. D., Shearer W. T., Strober W. (eds.). St. Louis, Mosby: 779-788.
- Furlan J. 1993. Alergija. *Zdravniški vestnik*, 62, 441-444.
- Goldsby R. A. 2000. Overview of the immune system. V: *Immunology*. Goldsby R. A., Kindt T. J., Osborne B. A. (eds.). New York. Freeman: 3-26.
- Hartl D., Griese M., Nicolai T., Zissel G., Prell C., Konstantopoulos N., Gruber R., Reinhardt D., Schendel D. J., Krauss-Etschmann S. 20004. Pulmonary chemokines and their receptors differentite children with asthma in cronic cough. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115 ,4, 728- 736.
- Ihan A. 1999. Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom. Ljubljana, Kemomed d. o. o.: 17-29.
- Jevremović M. 1979. Klinička imunologija normalne i patološke trudnoće. V: *Osnove kliničke imunologije humane reprodukcije*. Jevremović M.. Zagreb, Jugoslovanska medicinska naklada: 43-62.

Kohl S., West M. S., Prober C. G. 1989. Neonatal antibody dependent cellular cytotoxicity antibody levels are associated with the clinical presentation of neonatal herpes simplex virus infection. *Journal of Infection Disease*, 160, 770-776.

Košnik M. 2005. Kaj je astma in kako se zdravi?. Golnik, Klinika za pljučne bolezni in alergijo, Bolnišnica Golnik (junij 2005).

<http://www.astma-info.com> : 2str

Kotnik V. 2005. Delovanje imunskega sistema. V: *Interna medicina*. Kocijančič A., Mravlje F., Štajer D. (ur.), Ljubljana, DZS: 843-855.

Kravos A. 2004. Vloga alergije pri nastanku Reinkejevega edema glasilk. Magistrsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 63 str.

Kroemer G., Andreu J. L., Gonzalo J. A., Gutierrez-Ramos J. C., Martinez A. C. 1991. Interleukin-2, Interleukin-2, autotolerance and autoimmunity. *Advances in Immunology*, 50: 147-235.

Krouwels F. H., Nocker R. E. T., Snoek M., Lutter R., van der Zee J. S., Weller F. R., Jansen H. M., Out T. A. 1997. Immunocytochemical and flow cytometric detection of intracellular IL-4, IL-5, and IFN- γ : applications using blood- and airway-derived cells. *Journal of Immunological Methods*, 203, 89-101.

Leckie M. J., Khan G. R., Smith S. J., Walker C., Barnes P. J., Hansel T. T. 2003. Sputum T lymphocytes in asthma, COPD and healthy subjects have the phenotype of activated intraepithelial T cells (CD69⁺ CD103⁺). *Thorax*, 58, 23-29.

Mangan A. O., Mely L. G., Camilla C. A., Badier M. M., Montero - Julian F. A., Guilot C. M., Casano B. B., Prato S. J., Fert V., Bongrand P., Vervloet D. 2000. Assessment of Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161, 1792-1796.

Mardešić D., Dekaris D. 2000. *Pediatrija*. Zagreb, Školska knjiga: 395-414.

Mossmann 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.

Nonoyama S., Penix L., Edwards C. 1995. Diminished expression of CD40 ligand by activated neonatal lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 95, 66-75.

Nurse B., Haus M., Puterman A. S., Weinberg E. G., Potter P. C. 1997. Reduced interferon-gamma but normal IL-4 and IL-5 release by peripheral blood mononuclear cells from Xhosa children with atopic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100, 662-668.

Pretnar J., Mlakar U., Črnelč P., Andolšek D. 2005. Uvod v hematologijo. V: Interna medicina. Kocijančič A., Mravlje F., Štejer D. (ur.). Ljubljana, DZS: 947-960.

Qian J. X., Lee S. M., Suen Y., Knoppel E., van de Ven C., Cairo M. S. 1997. Decreased interleukin 15 from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and the effect of interleukin 15 in upregulating antitumor immune activity and cytokine production in cord blood. *Blood*, 90, 3106-3117.

Ratjen F., Costabel U., Griese M., Paul K. 2003. Bronchoalveolar lavage fluid findings in children with hypersensitivity pneumonitis. *European Respiratory Journal*, 21, 144-148.

Robinson D. S., Bentley A. M., Hartnell A., Kay A. B., Durham S. R. 1993. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness. *Thorax*, 48, 26-32.

Roitt I., Brostoff J., Male D. 1996. *Immunology*. 4th ed. London, Mosby: 423 str.

Salvi S. S., Babu S., Holgate S. T. 2001. Is asthma really due to a polarized T cell response toward a helper T cell tipe 2 phenotype? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164, 1343-1346.

Splawski J. B., Lipsky P. E. 1991. Cytokine regulation of immunoglobulin secretion by neonatal lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 88, 967-977.

Suzuki M., Maghmi K., Molet S., Shimbara A., Hamid Q. A., Martin J. G. 2002. IFN- γ secretion by CD8⁺ T cells inhibits allergen - induced airway eosinophilia but not late airway responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109, 5, 803-809

Šubic T. 2003. Vpliv sulfoidolevkoatrienov na patogenezo kronične urtikarije. Magistrsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 60 str.

Šuškovič S. 2005. Astma. V: Interna medicina. Kocijančič A., Mravlje F., Štejer D. (ur.). Ljubljana, DZS: 334-343.

Šuškovič, S., Košnik M., Šorli J. Astma. 2000. Klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik: 25-29.

van Rijt L. S., Kuipers H., Vos D., Hijdra D., Hoogsteden H. C., Lambrecht B. N. 2004. A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. *Journal of Immunological Methods*, 288, 111-121.

Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. Ljubljana, DZS: 405 str.

Wahlström J, Berlin M, Sköld C M, Wigzell H, Eklund A, Grunewald J. 1999. Phenotypic analysis of lymphocytes and monocytes/macrophages in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary sarcoidosis. *Thorax*, 54, 339-346.

Wilson C. B., Penix L., Melvin A., Lewis D. B. 1993. Lymphokine regulation and role of abnormal regulation in immunodeficiency. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 67, 25-32.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju prof. dr. Alojzu Ihanu, dr. med., ki me je usmerjal pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi gospodu Silvestru Koprivi, dr.med, ki mi je pomagal pri zbiranju podatkov.

Zahvaljujem se tudi gdč. Eriki Gliha za lektoriranje diplomske naloge.

PRILOGE

Priloga A: Analiza levkocitnih populacij v vzorcih BAL-a pri neastmatikih, otrocih s prvo epizodo astme in otrocih s kronično obliko astme.

	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3			
	Povprečje			p(t 1)	p(t 2)	p(t 3)
Starost ob preiskavi (mesec)	47,43	48,29	51,50	0,96	0,84	0,86
BAL-celice (št.)	106,43	186,21	93,75	0,30	0,66	0,22
BAL- pal (%)		8,00	5,67			
BAL-seg (%)	23,83	45,00	32,83	0,30	0,62	0,56
BAL-limfociti (%)	37,43	36,86	34,38	0,97	0,83	0,88
BAL-monociti (%)	15,25	3,17	6,40	0,13	0,34	0,31
BAL-eritrociti (0-3)	1,00	0,86	0,78	0,86	0,75	0,91
BAL-ECP	4,35	4,78	5,26			
BAL- Bakterije (0,1)	0,43	0,43	0,11	1,00	0,17	0,17
BAL - virusi (0,1)	0,14	0,57	0,11	0,11	0,86	0,05
Paličasti (%)	2,00	3,00	1,50		0,63	
Segmentirani (%)	27,67	47,83	39,14	0,05	0,15	0,30
Limfociti (št.)	3973,00	3347,67	4536,14	0,24	0,67	0,39
Št.limfocitov v krvi	2,17	2,00	2,14	0,39	0,92	0,42
Limfociti (%)	55,50	38,67	44,57	0,09	0,23	0,52
Monociti (št.)	576,33	572,33	531,14	0,98	0,81	0,75
Monociti (%)	7,17	8,33	5,57	0,48	0,28	0,03
Eozinofilci (št.)	285,67	137,67	413,43	0,27	0,62	0,24
Eozinofilci (%)	3,33	2,17	4,86	0,31	0,60	0,35
Plazma cel. (%)	2,00	1,00	2,00			
Ly. Plazmatka (%)	2,25	4,00	1,50	0,53	0,39	0,57
CRP	0,00	0,00	0,13		0,41	0,45
Levkociti	7,47	6,80	9,13	0,49	0,31	0,14
Eritrociti	4,68	4,59	5,01	0,68	0,04	0,07
Hemaglobin	125,33	127,00	134,50	0,59	0,01	0,03
Hematokrit	371,20	312,89	394,57	0,43	0,06	0,19
MCH	26,60	27,66	23,59	0,29	0,50	0,37
Trombociti	312,80	332,33	306,71	0,55	0,88	0,51
Histo.-zadebeljena BM (0,1)	0,20	0,40	0,50	0,54	0,41	0,80
Histo.-zadebeljen epitel (0,1)	0,50	0,75	0,80	0,54	0,41	0,88
Histo.-fibroza(0,1)	0,40	0,60	0,50	0,58	0,80	0,80
Histo.-vnetje	1,40	2,17	2,25	0,16	0,14	0,85
Histo.-parenhim	3,00	2,83	3,00	0,39		0,45

Nadaljevanje Priloge A: Analiza levkocitnih populacij v vzorcih BAL-a pri neastmatikih, otrocih s prvo epizodo astme in otrocih s kronično obliko astme.

	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3			
	Povprečje			p(t1)	p(t2)	p(t3)
Alergija -celokupni IgE	18,26	46,57	119,90	0,48	0,15	0,31
Alergija 0,1 (+ alergen ali +kožni test)	0,50	0,33	0,78	0,60	0,30	0,10
CD3 (%)	73,76	68,20	48,53	0,65	0,02	0,14
cIFN -gama/3 (%) / cIL4/3(%)	0,98	0,54	0,31	0,49	0,19	0,27
cIFN -gama/3 sv / cIL4/3sv	1,47	1,14	0,96	0,38	0,06	0,30
cIFN -gama/3 (%)	8,83	4,73	5,83	0,17	0,32	0,68
cIFN -gama/3 sv	28,80	10,65	20,98	0,26	0,56	0,05
cIL-4/3 (%)	6,10	8,17	8,01	0,28	0,44	0,96
cIL-4/3 sv	19,32	10,45	22,41	0,33	0,72	0,05
cIFN-gama/4(%)	12,12	8,35	12,20	0,29	0,99	0,48
cIFN-gama/4sv	24,69	9,58	22,69	0,29	0,88	0,09
cIL-4/4 (%)	9,08	21,87	14,98	0,20	0,22	0,47
cIL-4/4 sv	16,36	9,67	25,78	0,41	0,38	0,09
CD69lim (%)	74,24	65,14	45,94	0,44	0,04	0,18
CD69lim sv	55,05	68,43	28,34	0,57	0,06	0,04
CD69gran(%)	14,64	17,10	28,02	0,67	0,17	0,19
CD69gran sv	62,96	171,00	132,38	0,36	0,17	0,71
CD69mono (%)	37,82	28,81	24,67	0,47	0,18	0,73
CD69 mono sv	52,72	72,00	55,74	0,58	0,86	0,60
CD69 eozi (%)	22,62	8,77	14,45	0,14	0,45	0,50
CD69 eozi sv	273,47	221,39	189,11	0,47	0,18	0,64

Legenda: Skupina 1- neastmatiki, skupina 2- otroci s prvo epizodo astme, skupina 3- otroci s kronično obliko astme, p(t 1)- t test med skupino neastmatikov in skupino otrok s prvo epizodo astme, p(t 2)- t test med skupino neastmatikov in skupino otrok s kronično obliko astme, p(t 3)- t test med skupino otrok s prvo epizodo astme in otrok s kronično obliko astme.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Janja OVEN

**LIMFOCITNE POPULACIJE V
BRONHOALVEOLARNEM IZPIRKU OTROK S
SUMOM NA ASTMO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006