

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nina SKALE

**MERJENJE PROLIFERACIJE LIMFOCITOV PO  
SPODBUJANJU S SESTAVINAMI CELIČNIH STEN  
BAKTERIJ IN GLIV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nina SKALE

**MERJENJE PROLIFERACIJE LIMFOCITOV PO SPODBUJANJU S  
SESTAVINAMI CELIČNIH STEN BAKTERIJ IN GLIV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**MEASUREMENT OF LYMPHOCYTE PROLIFERATION AFTER  
STIMULATION WITH BACTERIAL AND FUNGAL CELL-WALL  
COMPOUNDS**

M.SC. THESIS

Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014



Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in imunologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo v Laboratoriju za celično imunologijo (CEL) Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela predlagala prof. dr. Alojza Ihana, dr. med, za somentorico asistent. dr. Andrejo Natašo Kopitar in za recenzentko prof. dr. Mojca Narat.

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

Somentorica: asist. dr. Andreja Nataša Kopitar

Recenzentka: prof. dr. Mojca Narat

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Vladimir KOTNIK, dr. med.  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo  
in imunologijo

Članica: prof. dr. Mojca NARAT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Članica: asist. dr. Andreja Nataša KOPITAR  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo  
in imunologijo

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Nina SKALE

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 577.27:612.112:576.35.083(043)=163.6
KG	limfociti/proliferacija limfocitov/pretočni citometer/test BrdU/test EdU/ spodbujanje limfocitov/molekularna imunologija
AV	SKALE, Nina, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	IHAN, Alojz (mentor)/KOPITAR, Andreja Nataša (somentorica)/NARAT, Mojca (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2014
IN	MERJENJE PROLIFERACIJE LIMFOCITOV PO SPODBUJANJU S SESTAVINAMI CELIČNIH STEN BAKTERIJ IN GLIV
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	IX, 66 str., 4 pregl., 18 sl., 46 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Zaznavanje celic, ki se delijo, je pomemben kazalec aktivacije limfocitov, tako v pogojih <i>in vivo</i> , kakor tudi v <i>in vitro</i> . Test proliferacije limfocitov meri povečano proliferacijo limfocitov v krvi, kot odgovor na določene antigene ali mitogene. Namen magistrskega dela je bilo izmeriti vpliv molekul bakterijskih (lipopolisaharid) in glivnih celičnih sten (betaglukan) na proliferacijo limfocitov. Pri tem smo določali proliferacijo limfocitov s testom BrdU, ki temelji na tem, da se nukleotid BrdU vgradi v novo sintetizirano verigo DNA aktivno delečih se celic. S kontrolnimi poskusi z znanimi učinkovinami, kjer smo limfocite inkubirali skupaj s fitohemaglutininom (PHA), ionomicinom skupaj s forbol 12-miristat 13-acetatom (PMA) ter CD3+ skupaj s CD28+, smo želeli sklepati na mehanizem delovanja omenjenih spodbujevalcev na limfocite. V poskusu smo dokazali, da PHA, ionomicin skupaj s PMA ter CD3+ skupaj s CD28+ močno spodbudijo proliferacijo limfocitov, zato jih pri našem testu BrdU lahko uporabimo kot pozitivno kontrolo. Limfocite smo inkubirali tudi skupaj z <i>E.coli</i> , ter dokazali, da LPS spodbudi proliferacijo limfocitov. Preverjali smo tudi vpliv imunomodulatorjev (betaglukan, metiprednizolon, glatiramer acetat in natrijev nukleinat) na predhodno spodbujene limfocite z <i>E.coli</i> , kjer smo limfocite najprej inkubirali z <i>E. coli</i> , nato pa po 1 urni inkubaciji dodali še modulatorje v ustrezni koncentracij ter inkubirali. S tem smo dokazali, da metiprednizolon močno zavre predhodno spodbujeno proliferacijo limfocitov z <i>E.coli</i> , ter ga tako lahko uporabimo kot negativno kontrolo pri našem testu BrdU. Pri uporabi betaglukana, natrijevega nukleinata ter glatiramer acetata nismo dokazali nobenega učinka pri predhodno spodbujenih limfocitih z <i>E.coli</i> . V našem poskusu smo tako dokazali, da je test BrdU primeren in dovolj občutljiv za merjenje proliferacije limfocitov po spodbujanju z različnimi mitogeni in antigeni. Test BrdU smo primerjali tudi s testom Edu in dokazali, da sta oba enako specifična in primerna za merjenje proliferacije limfocitov po spodbujanju z različnimi antigeni.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2  
DC UDC 577.27:612.112:576.35.083(043)=163.6  
CX lymphocyte/lymphocyte proliferation/flow cytometer/BrdU assay/Edu assay/lymphocyte stimulation/molecular immunology  
AU SKALE, Nina, dipl. mikrobiol (UN)  
AA IHAN, Alojz (supervisor)/KOPITAR, Andreja Nataša (co-advisor)/NARAT, Mojca (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology  
PY 2014  
TI MEASUREMENT OF LYMPHOCYTE PROLIFERATION AFTER STIMULATION WITH BACTERIAL AND FUNGAL CELL-WALL COMPOUNDS  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)  
NO IX, 66 str., 4 pregl., 18 sl., 46 vir.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The lymphocyte proliferation test measures the increased proliferation of blood lymphocytes in response to specific antigens or mitogens. The purpose of this master thesis was to measure the impact of bacterial (LPS) and fungal (betaglucan) cell-wall compounds on lymphocyte proliferation. The lymphocyte proliferation was measured by BrdU assay, which is based on the fact that the BrdU nucleotide is incorporated into newly synthesized DNA strand during the cell division. The control experiments with known active substances, where the lymphocytes were incubated together with phytohaemagglutinin (PHA), ionomycin together with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and CD3+ together with CD28+, serve as a suggest of a mechanism of how these substances act on the lymphocyte proliferation. In these experiments we demonstrated that PHA, ionomycin together with PMA and CD3+ together with CD28+ act as a strong boost of lymphocyte proliferation and therefore can be used as a positive control in BrdU assay. Lymphocytes were also incubated together with *E. coli* where we demonstrated that LPS stimulate lymphocyte proliferation. We also study the effect of immunomodulators (betaglucan, methylprednisolone, glatiramer acetate and sodium nucleinate) on the previously stimulated lymphocytes with *E. coli*, where the lymphocytes were first incubated with *E. coli* and then after 1 hour incubation, modulators were added in the appropriate concentration and incubated again. We demonstrated that methylprednisolone significantly inhibit lymphocyte proliferation previously stimulated with *E. coli* and therefore can be used as a negative control in BrdU assay. When using betaglucan, sodium nucleinate and glatiramer acetate we didn't demonstrate any effect on pre-stimulated lymphocyte proliferation with *E. coli*. In our experiment we demonstrate that the BrdU assay is appropriate and sensitive enough to measure lymphocyte proliferation induced by various antigens. We also compared BrdU assay with the Edu assay and demonstrated that both are equally specific and suitable for the measurement of lymphocyte proliferation after stimulations with different antigens.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>4</b>
2.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI IMUNSKEGA SISTEMA IN IMUNSKEGA ODZIVA .....	4
2.1.1 Oblike specifične imunosti .....	4
2.1.2 Celice imunskega sistema - limfociti .....	5
2.1.1.1 Limfociti B .....	5
2.1.1.2 Limfociti T .....	6
<b>2.1.3 Blastno preoblikovanje limfocitov .....</b>	<b>6</b>
2.2 ZORENJE IN AKTIVACIJA LIMFOCITOV B .....	7
2.3 ZORENJE, AKTIVACIJA IN DIFERENCIACIJA LIMFOCITOV T .....	8
2.4 TEST PROLIFERACIJE LIMFOCITOV .....	10
2.4.1 Uvod .....	10
2.4.2 Osnove testa .....	11
2.4.3 BrdU .....	12
2.4.4 Uporaba .....	13
2.4.5 Metoda LTT .....	15
2.4.6 Specifičnost in selektivnost testa LTT .....	16
2.5 PRETOČNA CITOMETRIJA .....	16
2.5.1 Pretočni citometer .....	16
2.5.2 Uporaba pretočne citometrije .....	18
2.5.3 Uporaba BrdU skupaj s pretočno citometrijo .....	18
2.6 STIMULACIJE V POSKUSU .....	19
2.7 SPODBUJEVALCI IN MODULATORJI V POSKUSU .....	20
2.7.1 Lipopolisaharid .....	20
2.7.2 Betaglukan .....	22
2.7.3 Fitohemaglutinin .....	23
2.7.4 Ionomicin .....	23
2.7.5 CD3+ (aktivirajoča protitelesa) in CD28+ (kostimulatorna protitelesa) .	24
2.7.5.1 CD3 .....	25
2.7.5.2 CD28 .....	25
2.7.6 Metilprednizolon .....	25
2.7.7 Natrijev nukleinat .....	26
2.7.8 Glatiramer acetat .....	26

<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>28</b>
3.1	MATERIALI .....	28
3.1.1	Uporabljeni reagenti .....	28
3.1.2	Priprava reagentov .....	29
3.1.2.1	Medij MII .....	29
3.1.2.2	Betaglukan .....	29
3.1.2.3	<i>E.coli</i> .....	29
3.2	METODE .....	30
3.2.1	Pridobitev vzorcev krvi .....	30
3.2.2	Izolacija mononuklearnih celic (PBMC) .....	30
3.2.3	Merjenje proliferacije limfocitov z metodo BrdU in EdU .....	31
3.2.3.1	Spodbujanje limfocitov .....	32
3.2.4	Priprava celic za merjenje na pretočnem citometru .....	33
3.2.4.1	Označevanje celic z BrdU .....	33
3.2.4.2	Označevanje celic z EdU .....	33
3.2.4.3	Ločitev posameznih podvrst celic .....	34
3.2.5	Analiza proliferacije limfocitov s pretočnim citometrom .....	34
3.2.6	Statistična analiza podatkov .....	38
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>39</b>
4.1	STIMULACIJA LIMFOCITOV Z RAZLIČNIMI SPODBUJEVALCI .....	39
4.2	PRIMERJAVA SPODBUJANJA PROLIFERACIJE PRI RAZLIČNIH POPULACIJAH LIMFOCITOV .....	44
4.3	PRIMERJAVA DVEH TESTOV (TEST BRDU IN EDU) ZA MERJENJE PROLIFERACIJE LIMFOCITOV PO SPODBUJANJU Z RAZLIČNIMI ANTIGENI .....	45
4.4	TITRACIJSKA KRIVULJA LPS .....	46
4.5	NORMALNE VREDNOSTI .....	47
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b> .....	<b>48</b>
5.1	KONTROLE TESTA BRDU ZA MERJENJE PROLIFERACIJE LIMFOCITOV PO SPODBUJANJU Z RAZLIČNIMI ANTIGENI .....	49
5.2	SPODBUJANJE PROLIFERACIJE LIMFOCITOV Z RAZLIČNIMI SPODBUJEVALCI IN MODULATORJI .....	50
5.2.1	Spodbujevalci proliferacije limfocitov .....	51
5.2.2	Vpliv mikrobnih produktov na proliferacijo limfocitov .....	53
5.2.3	Modulatorji imunskega odziva .....	54
5.3	PRIMERJAVA SPODBUJANJA PROLIFERACIJE PRI RAZLIČNIH PODVRSTAH LIMFOCITOV .....	56
5.4	PRIMERJAVA TESTA BRDU IN EDU ZA MERJENJE PROLIFERACIJE LIMFOCITOV PO SPODBUJANJU Z RAZLIČNIMI ANTIGENI .....	56
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b> .....	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>61</b>
<b>ZAHVALA</b>		



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Koncentracije in časi spodbujanja limfocitov z različnimi spodbujevalci	32
Preglednica 2: Delež delečih limfocitov (% BrdU+) po spodbujanju s fitohemaglutininom, ionomicinom skupaj s PMA ter CD3+ aktivirajočimi protitelesi skupaj z CD28+ kostimulatornimi protitelesi. ....	40
Preglednica 3: Normalne in srednje vrednosti proliferacije limfocitov (% BrdU pozitivnih celic) zdravih krvodajalcev: negativna kontrola (NK) ter pozitivna kontrola (spodbujevalci fitohemaglutinin, ionomicin skupaj s PMA ter CD3+ aktivirajoča protitelesa skupaj z CD28+ kostimulatornimi protitelesi) merjene s testom BrdU, tako pri limfocitih T, kot merjeni na celotni populaciji limfocitov. ....	47
Preglednica 4: Normalne in srednje vrednosti proliferacije limfocitov (% EdU pozitivnih celic) zdravih krvodajalcev: negativna kontrola (NK) ter pozitivna kontrola (spodbujevalec fitohemaglutinin) merjene s testom EdU, tako pri limfocitih T, kot merjeni na celotni populaciji limfocitov. ....	47

## KAZALO SLIK

Slika 1: Ključni dogodki dinamike proliferacije limfocitov T – pri aktivaciji z antigenom pride sprva do rasti celic, sčasoma pa tudi do njihove proliferacije. Te deleče celice T, imenujemo blastne celice. Brez nadaljne izpostavljenosti antigenu, se celice T delijo še nekajkrat, nato pa se prenehajo deliti in začnejo odmirati - pride do apoptoze. Blastne celice se lahko po ponovni izpostavljenosti antigenu znova začnejo deliti, z namenom opravljanja svoje efektorske aktivnosti (Hodgkin in sod., 2005).....	10
Slika 2: Primerjava med molekulo timina in BrdU. A: Normalna vodikova vez med adeninom in timinom (zgoraj) in BrdU kot zamenjava za timin (spodaj). B: Primerjava med kemijsko strukturo timina in molekulo BrdU (van der Wath in Lio, 2008).....	13
Slika 3: Shema pretočnega citometra (Ihan in Kopitar, 2010).....	17
Slika 5: Shematični prikaz ločitve krvi na mediju Ficoll-Hypaque .....	31
Slika 6: Pretočni citometer: citometer, voziček s tekočinami in računalnik z LCD-monitorjem (Becton Dickinson, 2005). .....	35
Slika 7: Zamejitev živih mononuklearnih celic.....	36
Slika 8: Določitev meje BrdU pozitivnih celic pri limfocitih, ki jih nismo spodbujali. ...	36
Slika 9: Določitev meje BrdU pozitivnih celic pri limfocitih, spodbujenih s fitohemaglutininom. ....	37
Slika 10: Zamejitev živih limfocitov T. ....	37
Slika 11: Določitev meje BrdU pozitivnih celic pri limfocitih T, ki jih nismo spodbujali.	38
Slika 12: Določitev meje BrdU pozitivnih celic pri limfocitih T, spodbujenih s fitohemaglutininom. ....	38
Slika 13: Vpliv fitohemaglutinina, ionomicina skupaj s PMA ter protiteles CD3+ skupaj s protitelesi CD28+ na proliferacijo limfocitov.....	41
Slika 14: Vpliv molekul bakterijskih (lipopolisaharid) in glivnih sten (betaglukan) na proliferacijo limfocitov .....	42
Slika 15: Vpliv znanih učinkovin (metilprednizolon (Medrol), natrijev nukleinat (Tamerit), glatiramer acetat (Kopakson)) na predhodno stimulirane limfocite z <i>E.coli</i> .....	43
Slika 16: Proliferativni odziv pri različnih populacijah limfocitov po spodbujanju s fitohemaglutininom (PHA) ter brez uporabljenih spodbujevalcev (negativna kontrola - NK) z uporabo testa BrdU.....	44
Slika 17: Primerjava testa BrdU ter Edu pri negativni kontroli (NK) ter pri spodbujanju s fitohemaglutininom (PHA) pri limfocitih T in limfocitih B .....	45
Slika 18: Vpliv lipopolisaharida (LPS) na proliferacijo limfocitov.....	46

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Anti-BrdU	specifična monoklonska protitelesa, ki se vežejo na BrdU
APC	antigen predstavljajoče celice
Betaglukan	(1→3)-β-D-glukan
BrdU	5-bromo-2'-deoksiuridin
CBD	kronična bolezen povzročena z izpostavljenostjo beriliju(angl. Chronic beryllium disease)
CD	angl. Cluster of Differentiation
CD3+	aktivirajoča protitelesa
CD28+	kostimulatorna protitelesa
CIM	cimosan A
CVID	prirojene imunske pomankljivosti (angl. Common variable immunodeficiency)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EdU	5-etinil-2'-deoksiuridin
FALS	fotodetektor, ki meri odboj ali lom svetlobe iz smeri vira svetlobe (angl. Forward angle light scatter)
GA	glatiramer acetat
LPS	lipopolisaharid
LPT	test proliferacije limfocitov (angl. The lymphocyte proliferation test)
LTT	test transformacije limfocitov (angl. The lymphocyte transformation test)
MII	medij II (angl. Cell loading medium)
NK	negativna kontrola
PBMC	mononuklearne celice (angl. Peripheral blood mononuclear cells)
PHA	fitohemaglutinin
PHK	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
PMA	angl. Phorbol 12-myristate 13 acetate
RALS	fotodetektor, ki meri odboj ali lom svetlobe pravokotno na smer vpadne svetlobe (angl. Right angle light scatter)
SN	natrijev nukleinat (angl. Sodium nucleinate)
T <sub>C</sub>	citotoksični limfociti T (angl. Cytotoxic T cell)
TCR	T celični receptor
T <sub>H</sub>	celice T pomagalke (angl. Helper T cell)



## 1 UVOD

Test transformacije limfocitov (angl. The lymphocyte transformation test - LTT) je *in vitro* test, ki temelji na dejstvu, da se limfociti (spominske celice), po stiku z določenim antigenom preoblikujejo v blastne celice in proliferirajo po ponovni izpostavitvi enakemu antigenu (Klein in sod., 2004). Proliferacijo limfocitov lahko določimo z merjenjem vgrajenega radioaktivno označenega [3H]-timidina v podvojeno DNA. Ta postopek je počasen in ima več omejitev, vključno z obdelavo in odlaganjem radioaktivnih izotopov in potrebo po dragi opremi. Uveljavljena alternativa te metode je uporaba bromodeoksiuridina (BrdU), ki je analog timina (Salic in Mitchison, 2008). V poskusu smo za merjenje proliferacije limfocitov uporabljali test BrdU skupaj s pretočnim citometrom, ki temelji na tem, da se nukleotid BrdU vgradi v novo sintetizirano verigo DNA aktivno delečih se celic. Po delni denaturaciji dvoverižne DNA, BrdU zaznamo imunokemično. Tako lahko ocenimo populacijo celic, ki aktivno sintetizirajo DNK (BrdU proliferation assay, 2007)

Ta metoda se danes uporablja za oceno funkcije limfocitov, kot tudi za dokazovanje preobčutljivosti bolnikov na zunanje antigene (infekcijske agense, alergene), ali na autoantigene (avtoimunske bolezni). Test BrdU je občutljiv, hiter in enostaven za izvedbo. Tako lahko poleg ocene proliferacije celic pridobimo tudi informacije o številu celic, morfologiji in analizi celičnih antigenov. Test ima tudi veliko prednost pred kožnimi testi, saj se z njegovo uporabo izognemo izpostavljanju ljudi kovinam tekom samega testiranja, kar lahko poslabša stanje ali pa celo povzroči preobčutljivost (Klein in sod., 2004).

V poskusu smo uporabili različne spodbujevalce proliferacije in sicer lipopolisaharid (LPS ali endotoksin), ki je sestavni del zunanje membrane po Gramu negativnih bakterij. Ostali spodbujevalci so bili še fitohemaglutinin (mitogen, ki vodi do aktivacije limfocitov in njihove proliferacije), ionomicin (ionofor, ki ga proizvaja bakterija *Streptomyces conglobatus*; poveča znotrajcelično raven  $Ca^{2+}$  in s tem posledično tudi proliferacijo limfocitov) skupaj s PMA ter CD3+ (aktivirajoča protitelesa) skupaj z CD28+ (kostimulatorna protitelesa). Modulatorji, ki smo jih uporabili v poskusu so bili netopni

betaglukan, ki je sestavni del celične stene gliv, metilprednizolon (kortikosteroid), natrijev nukleinat in glatiramer acetat. Pri modulatorjih smo preverjali njihov vpliv na predhodno spodbujeno proliferacijo limfocitov z *E.coli*. Po 1 urni inkubaciji, pa smo dodali še modulatorje v ustrezni koncentraciji.

## 1.1 NAMEN DELA

Namen našega dela je bilo izmeriti vpliv molekul bakterijskih (lipopolisaharid) in glivnih celičnih sten (betaglukan) na proliferacijo posameznih podvrst limfocitov. S kontrolnimi poskusi z znanimi učinkovinami, kot so fitohemaglutinin (PHA), ionomicin skupaj s PMA, CD3+ (aktivirajoča protitelesa) skupaj z CD28+ (kostimulatorna protitelesa) ter protivnetnimi zdravili metilprednizolon, natrijev nukleinat in glatiramer acetat bomo sklepali na mehanizem delovanja omenjenih spodbujevalcev in modulatorjev na limfocite.

Želeli smo tudi vpeljati in umeriti test merjenja proliferacije limfocitov BrdU po spodbujanju z različnimi mitogeni ali antigeni. Hkrati smo test BrdU želeli tudi primerjati z testom EdU, ki je alternativa testu BrdU.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednje delovne hipoteze:

- znane učinkovine fitohemaglutinin, ionomicin skupaj s PMA ter aktivatorna protitelesa CD3+ skupaj s kostimulatornimi protitelesi CD28+ spodbujajo proliferacijo limfocitov, zato jih lahko uporabimo kot pozitivne kontrole pri vpeljavi metode merjenja proliferacije limfocitov s testom BrdU
- mikrobn produkt bakterijskih celičnih sten, LPS, pozitivno vpliva na limfocite in spodbuja njihovo proliferacijo
- mikrobn produkt glivnih sten, betaglukan, na limfocite deluje protivnetno, zato bo proliferacija limfocitov zmanjšana
- zdravilo metilprednizolon je modulator imunskega odziva in zveča proliferacijo limfocitov

- zdravili glatiramer acetat in natrijev nukleinat sta prav tako modulatorja imunskega odziva; predvidevamo da delujeta zaviralno na proliferacijo limfocitov in jo zmanjšata
- test merjenja proliferacije limfocitov BrdU skupaj z uporabo pretočne citometrije bo primeren za merjenje proliferacije limfocitov ter vpliva nanjo zaradi različnih antigenov in modulatorjev imunskega odziva

## **2 PREGLED OBJAV**

### **2.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI IMUNSKEGA SISTEMA IN IMUNSKEGA ODZIVA**

Sesalci so v milijonih let koeksistence z mikrobi razvili več vrst učinkovitih mehanizmov, da se ubranijo potencialnih patogenih mikrobov, ki so vdrlji vanje. Tak mehanizem je npr. naravna ali prirojena imunost, ki vključuje genetske dejavnike, anatomske in mehanske ovire, nespecifične baktericidne snovi telesnih tekočin, fagocitozo in znotrajcelično uničenje mikroorganizmov ter različne efektorske mehanizme, kot sta npr. komplementni sistem in interferoni (Vozelj, 2000).

Mehanizmi naravne odpornosti pa sami dostikrat niso zadosti učinkoviti proti nekaterim patogenim mikrobom. Zato so vretenčarji v evoluciji razvili še eno skupino obrambnih mehanizmov. Te mehanizme, ki jih imenujemo pridobljeni ali specifični imunski mehanizmi, razvije posameznik kot odziv na vdor infekcijskega agensa. Zanje je značilno spoznanje tujih snovi ali mikrobov (antigenov), nastanek protiteles, efektorskih celic in imunski spomin (Vozelj, 2000).

#### **2.1.1 Oblike specifične imunosti**

Specifični imunski odziv se sproži, če vdre v telo tuja snov. Nosilci specifičnega imunskega odziva so limfociti (vrsta leukocitov). Na podlagi komponent imunskega sistema, ki posredujejo odziv, razdelimo specifične imunske odzive v dve obliki: humoralno in celično posredovano imunost. Humoralno imunost posredujejo protitelesa ali imunoglobulini, ki specifično spoznajo in odstranijo antigene. Izdelujejo jih limfociti B. V razširjenem pomenu je humoralna imunost posledica katerega koli dejavnika v telesnih tekočinah, npr. komplementa, lizocima, protiteles, ki posreduje odstranjevanje antigena. Celično posredovano imunost pa posredujejo limfociti T, ki pri odstranjevanju mikrobov ali tujkov (antigenov) dostikrat sodelujejo z drugimi celicami, npr. s fagociti (Vozelj, 2000).



## **2.1.2 Celice imunskega sistema - limfociti**

Za učinkovit imunski odziv sta potrebni dve poglavitni skupini celic: limfociti in antigen predstavljajoče celice (APC). Vse te celice nastajajo v kostnem mozgu, nato pa dozoriijo v primarnih limfatičnih organih. Ko limfociti zapustijo primarne limfatične organe, krožijo po krvnem in limfnem obtoku in se naselijo v različnih sekundarnih limfatičnih organih. Limfociti imajo na svoji površini membranske receptorje, ki vežejo antigene ter posredujejo bistvene imunske značilnosti, tj. specifičnost, spomin ter prepoznavanje lastnega in tujega (Vozelj, 2000).

Limfociti so nosilci specifične imunosti. To so edine celice v telesu, ki specifično spoznajo in razločujejo različne epitope (antigenske determinante). V začetnem stadiju razvoja nimajo površinskih receptorjev in se zato ne odzivajo na spodbujanje z antigenom. Ko dozoriijo, izražajo receptorje za antigen, postanejo odzivni na antigen in se razvijejo v funkcijsko različne razrede. Razdelimo jih v dve skupini : v limfocite B in limfocite T, ki imajo več podskupin (Vozelj, 2000).

### **2.1.1.1 Limfociti B**

Celice B nastajajo iz hematopoetskih matičnih celic v kostnem mozgu. Receptor za antigen na celicah B je na membrano vezana molekula imunoglobulina (protitelo). Ko naivne celice B (ki še niso srečale antigena) prvič srečajo antigen, ki je specifičen za njihov receptor, se začnejo hitro razmnoževati. Njihovo potomstvo se diferencira v mirujoče spominske celice B in efektorske celice B, ki jih imenujemo plazmatke. Te izločajo v kri in mezgo velike količine protiteles, ki so različnih razredov in imajo različne biološke funkcije. Humoralna imunost je poglavitni obrambni mehanizem pred zunajceličnimi mikrobi. Protitelesa ob pomoči komplementa lizirajo številne viruse in bakterije ter nevtralizirajo njihove toksine (Vozelj, 2000).

### 2.1.1.2 Limfociti T

Tudi limfociti T nastajajo v kostnem mozgu, nato pa potujejo v timus, kjer dozori do popolne imunske zmožnosti. Med zorenjem v timusu pridobijo na svoji membrani svojevrsten receptor za antigen, tako imenovani T – celični receptor (TCR). Ta receptor lahko spozna antigen samo, če je vezan z membranskimi proteini, imenovanimi molekule poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (PHK), saj limfociti T ne spoznajo topnih antigenov. Ko naivna celica T sreča antigen, povezan z molekulo PHK na lastni celici, se celica T razmnožuje in diferencira v spominske celice T in različne efektorske celice (Vozelj, 2000).

Poznamo dve podvrsti efektorskih celic T: celice T pomagalke ( $T_H$  – angl. helper T cell) in citotoksične celice T ( $T_C$  – angl. cytotoxic T cell). Ti dve vrsti se razlikujeta med seboj po membranskih glikoproteinih: CD4 in CD8. Celice T, ki izražajo CD4, delujejo kot celice pomagalke, ki pomagajo celicam B, da izdelujejo protitelesa. Celice T, ki pa imajo na membrani CD8, so citotoksične celice T, ki uničijo z virusom in znotrajceličnimi bakterijami okužene celice. Ko se celica T CD4+ aktivira z antigenom, izloča številne citokine. Ti so izredno pomembni za aktivacijo celic B, celic  $T_C$ , makrofagov in različnih drugih celic, ki sodelujejo pri imunskem odzivu (Vozelj, 2000).

### 2. 1. 3 Blastno preoblikovanje limfocitov

Pred stimulacijo z antigeni so mali limfociti v mirujočem stanju ali v stadiju  $G_0$  celičnega ciklusa. Če počivajoči limfocit ne sreča antigena, verjetno pogine v nekaj dneh ali tednih in populacija se vzdržuje z nastajanjem novih celic iz prednikov v kostnem mozgu (Vozelj, 2000).

V odgovor za spodbujevanje z antigenom vstopi limfocit v stadij  $G_1$  celičnega ciklusa. Celica se večja in razvije se bazofilna, z ribosomi bogata citoplazma, oblikuje se jedrce in močno poveča jedro. Tako preoblikovano celico imenujemo blastna celica ali limfoblast. Nadaljuje se prehod v stadij S celičnega ciklusa in aktivirani veliki limfociti se razmnožujejo in diferencirajo. Pri tem nastanejo končne celice, ki se ne delijo in živijo le nekaj dni (Vozelj, 2000).

Po stiku z antigenom se limfociti razmnožujejo, večja se klon za antigen specifičnih celic, vendar se vse celice ne diferencirajo v efektorske celice. Nekatere postanejo spominske celice, ki hitro odgovorijo na drugo dajanje antigena. V odsotnosti stimulacije živijo te celice več kot 20 let (Vozelj, 2000).

## 2.2 ZORENJE IN AKTIVACIJA LIMFOCITOV B

Limfociti B, proizvajajo protitelesa, ki so sposobna nevtralizirati ali uničiti antigen, so poglavitni del humoralne imunosti. Z namenom, da opravljajo svojo funkcijo in proizvajajo protitelesa mora priti do njihove aktivacije. Pri tem pride do proliferacije in diferenciacije, kar vodi do nastanka plazmatk, ki proizvajajo imunoglobuline z visoko afiniteto za epitop antigena, ki je sprožil njihovo aktivacijo. (Junior in sod., 2010).

Med svojim življenjem gre vsak limfocit B in njegovo klonsko potomstvo skozi vrsto dobro opredeljenih stadijev zorenja in diferenciacije. Kot trdi hipoteza selekcije klonov, se razvijejo limfociti, specifični za različne antigene, pred vdorom antigenov. Razvojni proces, pri katerem nastanejo plazmatke in spominske celice B, lahko razdelimo v tri stadije: nastanek zrelih, imunsko zmožnih celic B (zorenje), aktivacijo zrelih celic B z antigenom in diferenciacijo aktiviranih celic B v plazmatke in spominske celice B (Vozelj, 2000).

Zorenje celic B v kostnem mozgu vključuje zaporedje preureditev imunoglobulinskih genov in poteka v odsotnosti antigena. To je od antigena neodvisna faza B-celičnega razvoja. Zrela celica B zapusti kostni mozeg in izraža na membrano vezan imunoglobulin (mIgM in mIgD) z eno antigensko specifičnostjo. Te naivne celice B, ki še niso srečale antigena, krožijo po krvi in mezgi, vstopajo v sekundarne limfatične organe, predvsem v vranico in bezgavke, in se vrnejo v kri. Za samo aktivacijo limfocitov B je potrebna vezava epitopa antigena na receptor, ki se nahaja na površini celice B (B celični receptor – BCR), kar sproži zaporedje dogodkov znotraj celice. Poleg prepoznavanja antigena z BCR je aktivacija limfocitov B odvisna tudi od drugega aktivacijskega signala, ki ga posredujejo proteini komplementnega sistema (Junior in sod., 2010). Ta interakcija antigena z membransko vezanim protitelesom, ki je specifično za ta antigen, povzroči, da

se celica začne razmnoževati (razrast klona) in se diferencira. Pri tem nastane populacija plazmatk, ki izdelujejo protitelesa in spominskih celic B. To fazo imenujemo od antigena odvisno fazo razvoja (Vozelj, 2000).

Spominske celice preživijo mesece ali celo leta brez antigenkega draženja in aktivno krožijo med krvjo, limfo in limfatičnimi organi. Stimulacija spominskih celic B sproži sekundarni imunski odziv (Vozelj, 2000).

Limfociti B so tudi antigen predstavitvene celice (APC), ki po obdelavi predstavijo na svoji površini antigen vezan na B celični receptor. Peptidi, ki nastanejo s predelavo antigena so na površini limfocitov B izraženi tako, da so vezani s poglavitnim histokompatibilnim kompleksom (PHK) razreda II. Tako jih lahko prepoznajo limfociti T CD4 + (Th). Interakcija med kompleksom peptid-MHCII z receptorjem na površini limfocitov T (TCR), sproži zaporedje dogodkov, ki vodijo do klonalne ekspanzije (klonalnega povečanja števila) limfocitov T ter proizvodnjo citokinov, ki spodbujajo proliferacijo in diferenciacijo limfocitov B (Junior in sod., 2010).

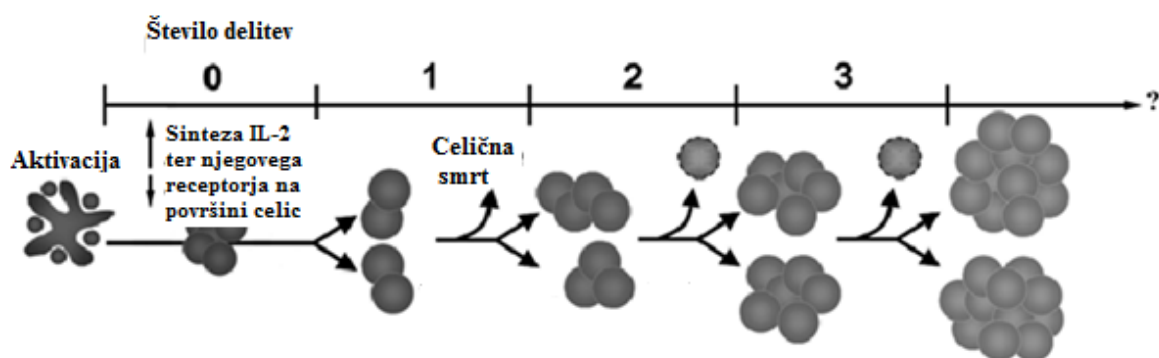
### 2.3 ZORENJE, AKTIVACIJA IN DIFERENCIACIJA LIMFOCITOV T

Predniki limfocitov T, ki pridejo v timus iz kostnega mozga, se začnejo hitro razmnoževati. V tem stadiju jih imenujemo timociti. Ko se timociti razmnožujejo in zorijo, gredo skozi vrsto stopenj, za katere so značilne spremembe v statusu genov T-celičnega receptorja, v izražanju TCR, koreceptorjev CD4 in CD8 ter dugih celičnih površinskih molekul, ki odsevajo stopnjo celične funkcijske zrelosti (Vozelj, 2000).

Po pozitivni in negativni selekciji, ki potekata v timusu, vstopijo naivni limfociti T v krvni obtok in mezgo ter krožijo po telesu. Pri tistih limfocitih, ki pridejo v stik z antigenom, ki ga na svoji površini predstavijo antigen predstavitvene celice (APC) pride do velikega klonalnega razrasta in njihove diferenciacije v celice, ki izločajo efektorske vnetne citokine. Vlogo APC ima več vrst celic, vključno z makrofagi, dendritičnimi celicami in limfociti B (Vozelj, 2000).

Popolna aktivacija celic T celic, ki vodi v njihovo proliferacijo in sintezo citokinov, zahteva dva ločena signala. Prvi signal predstavlja povezava T celičnega receptorja s kompleksom peptid-MHC, na površini APC. Te površinske reakcije sprožijo zapleteno kaskado prevajanja signalov, ki privedejo do razmnoževanja celic. Drugi signal ali kostimulacija pa poteka preko interakcije receptorja CD28 na površini celic T z ligandi B7, ki se ravno tako nahajajo na površini APC. Signalizacija preko TCR in CD28 vodi do aktivacije protein kinazne kaskade, proizvodnje sekundarnih sporočevalcev in aktivacije določenih transkripcijskih faktorjev (Cuddapah in sod., 2010).

Pri aktivaciji celic T lahko pride do aktivacije celic, ki še nikoli niso prišle v stik z antigenom (naivne celice) ali do aktivacija spominskih celic, ki so že prišle v stik z antigenom. Aktivacija naivnih celic povzroči njihovo proliferacijo ter produkcijo citokinov (sprva IL-2, kasneje tudi IFN- $\gamma$  ter IL-4). Po aktivaciji spominskih celic, pa pride do proizvodnje citokinov veliko hitreje. Za aktivacijo spominskih in naivnih celic so potrebni enaki signali, vendar pa naj bi bila aktivacija spominskih celic manj odvisna od kostimulacije (Cuddapah in sod., 2010).



Slika 1: Ključni dogodki dinamike proliferacije limfocitov T – pri aktivaciji z antigenom pride sprva do rasti celic, sčasoma pa tudi do njihove proliferacije. Te deleče celice T, imenujemo blastne celice. Brez nadaljne izpostavljenosti antigenu, se celice T delijo še nekajkrat, nato pa se prenehajo deliti in začnejo odmirati - pride do apoptoze. Blastne celice se lahko po ponovni izpostavljenosti antigenu znova začnejo deliti, z namenom opravljanja svoje efektivne aktivnosti (Hodgkin in sod., 2005).

Aktivirane celice Th izločajo citokine, ki pospešujejo lastno razmnoževanje in izražanje receptorjev za te citokine. Posledica proliferativnega odziva je razrast klona celic Th, specifičnih za spodbujevalni antigen. Del nastalih, antigen odzivnih celic Th, se razvije v efektivne celice T, drugi del pa v mirujoče spominske celice Th, specifične za isti antigen. Spominske celice sprožijo po ponovnih izpostavljenih antigenu močnejši sekundarni odziv (Vozelj, 2000).

Efektivne funkcije, ki se razvijejo po aktivaciji z antigeni, omogočajo celicam Th, da z učinkovitim imunskim odzivom prispevajo k odstranitvi tujih antigenov. Celice Th pošiljajo signale (citokine) drugim celicam, npr. celicam B, da lahko izločajo protitelesa, citotoksičnim celicam T, vnetnim celicam in endotelijskim celicam. Ti citokini posredujejo različne učinke, ki uravnavajo humoralni in celični imunski odziv (Vozelj, 2000).

## 2.4 TEST PROLIFERACIJE LIMFOCITOV

### 2.4.1 Uvod

Test transformacije limfocitov (angl. The lymphocyte transformation test - LTT) je *in vitro* test, ki temelji na dejstvu, da se limfociti (spominske celice), po stiku z določenim

antigenom, preoblikujejo v blastne celice in se po ponovni izpostavitvi enakemu antigenu razmnožujejo. Transformacijo v blastne celice lahko merimo z različnimi kemijskimi in fizikalnimi metodami, kot npr. določanje metabolnih procesov, biosinteza beljakovin, ter sinteza ribonukleinske kisline (RNA) ali deoksiribonukleinske kisline (DNA). Najbolj razširjen pa je test LTT, ki meri podvojevanje DNK (Klein in sod., 2004).

Razvoj testa LTT temelji na ugotovitvi iz leta 1960, da inkubacija limfocitov skupaj s fitohemaglutininom (PHA), ki je mitogen, povzroči aktivacijo in delitev celic. Zaradi te ugotovitve, ga nekateri imenujejo tudi test proliferacije limfocitov (angl. the lymphocyte proliferation test – LPT). Ta test se uporablja za ovrednotenje različnih imunskih reakcij, ki jih posredujejo celice imunskega sistema (Klein in sod., 2004).

Merjenje proliferacije limfocitov *in vitro* se uporablja za zaznavanje predhodne izpostavljenosti limfocitov antigenom ali za preučevanje proliferacije limfocitov, ki še nikoli niso prišli v stik z antigenom (naivni limfociti). Pri tem se moramo zavedati, da s temi testi lahko zaznamo samo povečanje števila celic, ne pa tudi efektorskih funkcij, ki jih limfociti posredujejo. Za oceno efektorskih funkcij, lahko teste proliferacije limfocitov združimo z ostalimi testi, kot npr. merjenje proizvodnje citokinov, citotoksičnimi testi ali testi določanja apoptoze (Hodgkin in sod., 2005).

Zaznavanje celic, ki se delijo, je pomemben kazalec aktivacije limfocitov, tako *in vivo* kakor tudi *in vitro*. Tako je za imunologe pomembno odkrivanje proliferacije limfocitov za samo spremljanje njihove stimulacije z različnimi antigeni in določitev njihove izpostavljenosti določenim antigenom (Hodgkin in sod., 2005).

#### **2.4.2 Osnove testa**

Test proliferacije limfocitov meri povečano proliferacijo limfocitov v krvi, kot odgovor na določen antigen ali mitogen (Farriss in sod., 2000). Po aktivaciji z antigenom se limfociti B in T začnejo razmnoževati in njihovo število hitro naraste. Tej fazi povečanja števila limfocitov, sledi obdobje zmanjševanja populacije, kar povzroči, da preživi le majhen del te povečane populacije. Ta del preživele populacije postanejo spominske celice. Kinetika

povečanja (proliferacije) in zmanjševanja števila populacije limfocitov vpliva na samo hitrost prepoznavanja antigena in klinični potek bolezni (Zilman in sod., 2010).

Detekcija sinteze DNA v proliferirajočih celicah temelji na vgraditvi označenega prekursorja DNA v celično DNA tekom faze S celičnega cikla. V tej fazi pride do podvajanja dednega materiala celic. Ker je ta faza obvezna za samo podvajanje celic, je njena frekvenca dober kazalec odgovora podvojevanja celic (Salic in Mitchison, 2008).

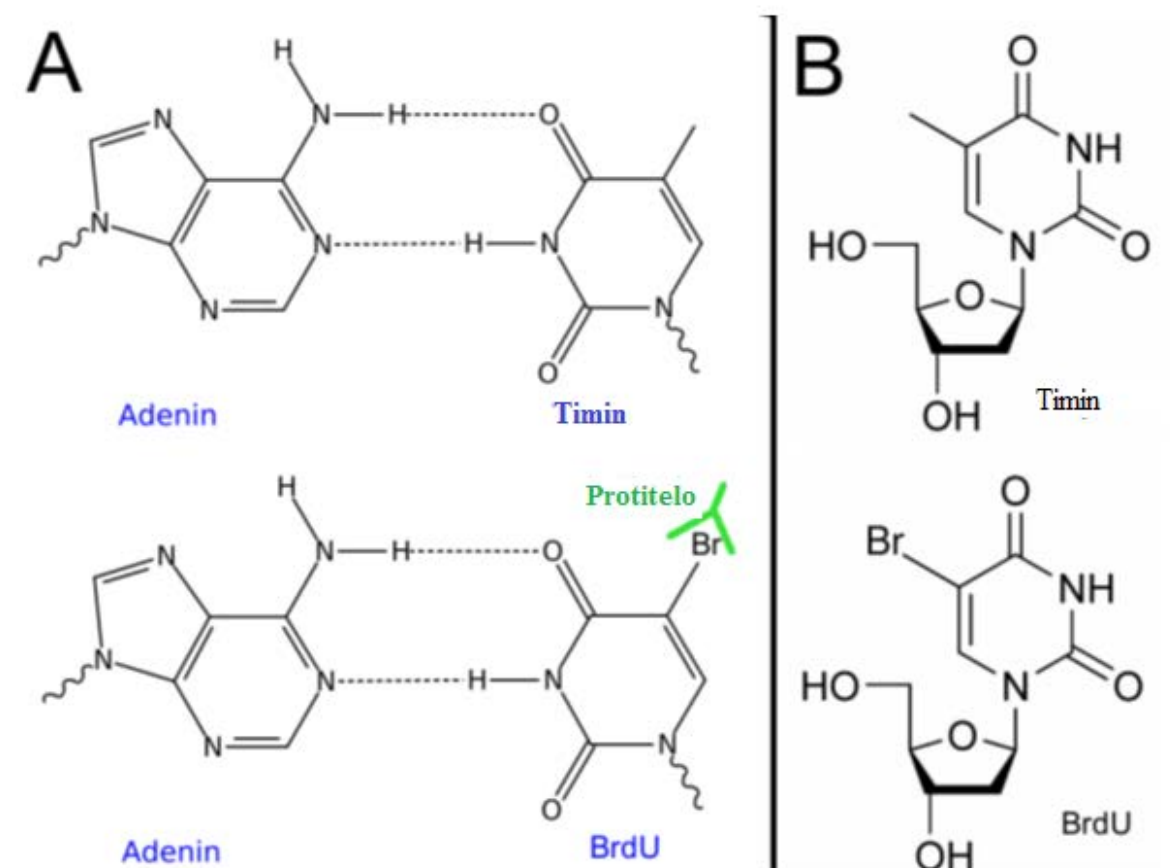
Označene prekursorje DNA, ki so običajno pirimidinski deoksinukleozidi, dodamo kultiviranim celicam tekom njihovega podvojevanja, nato pa po inkubaciji in barvanju vzorcev, kvantitativno določimo njihovo vgraditev v genomsko DNA. Enaki označeni deoksinukleozidi se lahko vbrizgajo tudi testnim živalim, da se testira proliferacija celic v določenih organih ali tkivih. Najbolj pogosto uporabljena deoksinukleozida za merjenje podvojevanja DNA sta [3H]timidin in 5-bromo-2'-deoksiuridin (BrdU). Vgraditev [3H]timidina v DNA zaznamo z uporabo autoradiologije (Salic in Mitchison, 2008). Ta postopek je počasen in ima več omejitev, vključno z obdelavo in odlaganjem radioaktivnih izotopov in potrebo po dragi opremi. Vgrajen BrdU pa lahko zaznamo imunokemično, po delni denaturaciji dvoverižne DNA, z uporabo specifičnih protiteles anti-BrdU. Tako lahko ocenimo populacijo celic, ki aktivno sintetizirajo DNA (ki se aktivno delijo) (BrdU proliferation assay, 2007).

Tak test je občutljiv, hiter in enostaven za izvedbo. Tako lahko poleg ocenjevanja proliferacije celic pridobimo tudi informacije o številu celic, morfologiji in analizi celičnih antigenov (Klein in sod., 2004).

### **2.4.3 BrdU**

5-bromo-2'-deoksiuridin (BrdU) je sintetični nukleotid, ki je analog timina. Tako se lahko vgradi v na novo podvojeno DNA in nadomesti timin (van der Wath in Lio, 2008).





Slika 2: Primerjava med molekulo timina in BrdU. A: Normalna vodikova vez med adeninom in timinom (zgoraj) in BrdU kot zamenjava za timin (spodaj). B: Primerjava med kemijsko strukturo timina in molekulo BrdU (van der Wath in Lio, 2008).

#### 2.4.4 Uporaba

Test LPT z uporabo [3H]timidina in BrdU je uporaben za preučevanje kinetike celičnega cikla, podvojevanja DNA, za ocenjevanje celične proliferacije normalnih ali patološko spremenjenih celic ali tkiv pod različnimi pogoji ter za proučevanje izmenjave sestrskih kromatid (Salic in Mitchison, 2008).

Ta test se danes uporablja za oceno funkcije limfocitov (limfocite inkubiramo z mitogeni, kar inducira nespecifično transformacijo v blastne celice *in vitro*), kot tudi za dokazovanje preobčutljivosti bolnikov na zunanje antigene (infekcijske agense, alergene), ali na autoantigene (avtoimunske bolezni). V zadnjih 40 letih se je ta test izkazal za koristnega, še posebej pri diagnozi alergijskih obolenj, do katerih lahko pride po uporabi določenih zdravil in alergijskih obolenj povezanih z izpostavljenostjo alergenom na

delovnem mestu. Test LTT lahko uporabljamo tudi za določanje preobčutljivosti na nekatere kovine, predvsem na berilij. Pozitiven BeLTT lahko opredeli bolnike s kronično boleznijo povzročeno z izpostavljenostjo beriliju (angl. chronic beryllium disease - CBD) ter bolnike s tveganjem za razvoj CBD, ki prizadene večinoma respiratorni trakt in lahko povzroči tudi smrt. Uporablja se tudi kot biomarker za določanje biološkega učinka pri ljudeh brez simptomov CBD, a z visokim tveganjem za kasnejši razvoj CBD (Klein in sod., 2004).

LTT *in vitro* test ima veliko prednost pred kožnimi testi, saj se z njegovo uporabo izognemo ponovnemu izpostavljanju ljudi antigenom (alergenom) tekom samega testiranja, kar lahko poslabša stanje ali pa celo povzroči preobčutljivost (Klein in sod., 2004).

Merjenje proliferacije limfocitov je tudi izredno pomembno pri prirojenih imunskih pomankljivostih, npr. CVID (angl. Common variable immunodeficiency), ki je najpogostejša in klinično pomembna prirojena imunska pomankljivost pri ljudeh (Sutor in Fabel, 2000; Podjasek in Abraham, 2012). CVID je heterogena skupina primarnih imunskih okvar, ki se kaže z nezadostno količino serumskih imunoglobulinov, zmanjšanim imunskim odzivom na specifične antigene ter z višjo incidenco okužb, ki se ponavljajo. Pri bolnikih s CVID gre za motnje pridobljenega, kakor tudi prirojenega imunskega odziva (Salzer in sod., 2012). Klinična slika CVID se kaže kot hipogamaglobulinemija in različne stopnje okvare funkcije limfocitov T in makrofagov. Glavna imunološka okvara pri bolnikih s CVID je okvara v produkciji imunoglobulinov s strani limfocitov B (Abolhassani in sod., 2013).

### 2.4.5 Metoda LTT

S centrifugiranjem v gradientnem mediju Ficoll iz periferne krvi z dodanim antikoagulantom (heparinom ali EDTA) izoliramo mononuklearne celice (angl. peripheral blood mononuclear cells - PBMC) v sterilnih pogojih. Kultiviramo jih v ustreznem mediju. Za določitev nespecifične funkcije limfocitov, v kulturo dodamo mitogen, kot npr. fitohemaglutinin (PHA), ki nespecifično aktivira limfocite T in limfocite B (pozitivna kontrola). Za odkrivanje določene preobčutljivosti, se doda ustrezn antigen v različnih koncentracijah (3-kratno ali 4-kratno povečanje). Različne koncentracije, so potrebne za določitev optimalnega razmerja med limfociti in antigenom v kulturi z namenom, da sprožimo najmočnejšo proliferacijo. Imamo tudi sam medij brez antigena, ki služi kot kontrola za spontano proliferacijo. Kot negativno kontrolo uporabimo limfocite zdravih ljudi, ki niso imeli stika s preiskovano snovjo (antigenom). Celice nato inkubiramo v suspenziji z antigenom od 2 do 6 dni pri 37 °C v atmosferi s 5-10 % CO<sub>2</sub> v zraku (Klein in sod., 2004).

Celicam, kultiviranim na mikrotiterski ploščici, dodamo BrdU zadnjih 2 do 24 ur inkubacije. Ta se nato vgradi v DNA delečih se celic. Da omogočimo samo vezavo protiteles na vgrajen BrdU, moramo celice predhodno fiksirati, jim povečati prepustnost membrane in denaturirati njihovo DNA. Nato dodamo detekcijska anti-BrdU monoklonska protitelesa in inkubiramo eno uro. V tem času se protitelesa vežejo na vsako molekulo vgrajenega BrdU. Protitelesa, ki se niso vezala odstranimo s spiranjem ter nato dodamo sekundarna protitelesa konjugirana s hrenovo peroksidazo, ki se vežejo na detektorska (primarna anti-BrdU) protitelesa. Hrenova peroksidaza katalizira pretvorbo fluorogenega substrata v modri fluorescentni produkt. Njegovo intenziteto, ki je sorazmerna s količino vgrajenega BrdU v celicah, določimo z uporabo fluorometra (BrdU proliferation assay, 2007). BrdU lahko zaznamo tudi z uporabo anti-BrdU imunoglobulinov na katere je vezana peroksidaza. Te komplekse, pa nato zaznamo spektrofotometrično tako, da dodamo kromofor, kot je O-fenilendiamin (Klein in sod., 2004).

Uporabimo lahko tudi imunofluorescentno označevanje vgrajenega bromodeoksiuridina (BrdU) in analizo z uporabo pretočne citometrije, ki nam zagotavljata metodo visoke

ločljivosti za določitev frekvence in narave posameznih celic, ki sintetizirajo DNA. Pri tej metodi uporabimo BrdU, ki se vgradi v novo sintetizirano DNA. Vgrajeni BrdU, zaznamo z uporabo specifičnih fluorescentno označenih anti-BrdU protiteles, vezavo katerih nato zaznamo z uporabo pretočnega citometra (Becton Dickinson, 2011).

#### **2.4.6 Specifičnost in selektivnost testa LTT**

Zavedati se moramo, da test LTT meri samo preobčutljivost limfocitov, ne pa tudi njihovih efektorskih reakcij, zato so lahko rezultati pozitivni tudi pri izpostavljenih posameznikih, ki še nimajo razvitih kliničnih simptomov. Te lažno pozitivne reakcije nakazujejo samo na to, da so posamezniki bili izpostavljeni določenim antigenom, vendar nimajo razvitih kliničnih znakov. Možni so tudi lažno negativni rezultati, kjer je pri posameznikih klinično razvita vidna oblika alergijske reakcije na določeno snov, rezultat testa LTT pa je negativen (Klein in sod., 2004).

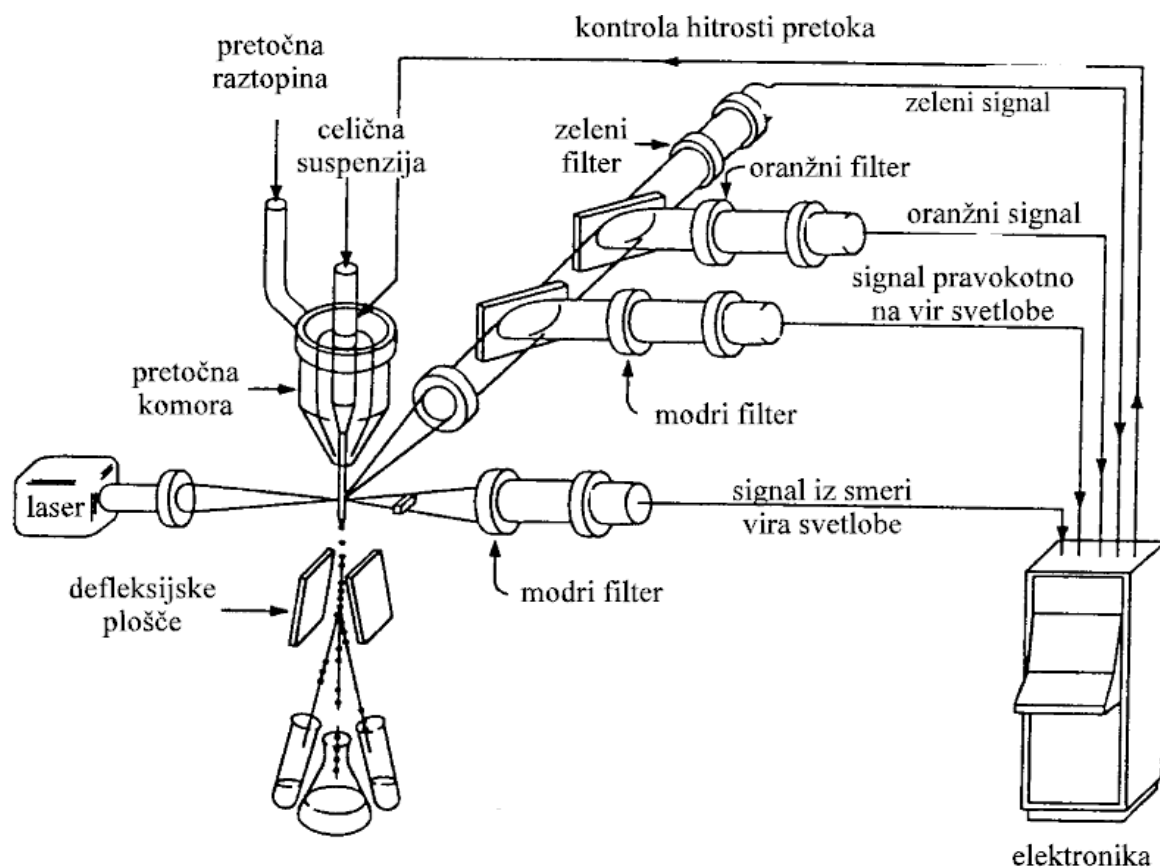
### **2.5 PRETOČNA CITOMETRIJA**

#### **2.5.1 Pretočni citometer**

S pretočno citometrijo lahko ugotavljamo vezavo fluorescenčno označenih protiteles na celice. Pri analizi s pretočnim citometrom potujejo celice ena za drugo v tankem curku mimo vira svetlobe. Svetlobni žarek, ki zadane celico, se odbije ali lomi, ali pa se absorbira v določenih fluorokromih, ki nato izsevajo svetlobo višjih valovnih dolžin. Spremembe beleži sistem fotosprejemnikov (Ihan in Kopitar, 2010).

Glavni sestavni deli pretočnega citometra so:

- vir svetlobe
- pretočna komora z optičnim sistemom ogledal, leč in filtrov
- elektronika, ki spreminja svetlobne impulze v električne in slednje v digitalne
- računalnik, ki zbira, analizira in usklajuje podatke ter uravnava delovanje aparata



Slika 3: Shema pretočnega citometra (Ihan in Kopitar, 2010).

Vir svetlobe pri današnjih pretočnih citometrih je laserski žarek, ki je lahko argonski, kriptomski ali kombiniran helij-kadmijksi ali helij-neonski (Ihan in Kopitar, 2010).

Pretočni sistem je zgrajen predvsem iz pretočne komore, skozi katero tečejo celice v izotonični tekočini. Ob prehodu snopa žarkov odda posamezna celica signal. V dveh ali več detektorjih, ki so opremljeni z barvnimi filtri, merimo izsevano svetlobo. Vse dobljene podatke ureja in analizira računalnik. Rezultate prikažemo matematično in grafično (Ihan in Kopitar, 2010).

S pretočno citometrijo lahko celice barvamo tudi z dvema, tremi ali več različnimi vrstami monoklonskih protiteles in tako prikažemo, katere kombinacije antigenov izražajo posamezne celice (Ihan in Kopitar, 2010).

## **2.5.2 Uporaba pretočne citometrije**

Z metodo pretočne citometrije navadno analiziramo limfocitne populacije v krvi (Ihan in Kopitar, 2010). Dve pogosti aplikaciji uporabe pretočne citometrije pa sta merjenje količine celične DNA in analiza celičnega cikla. Za merjenje količine jedrne DNA celic, suspenziji celic dodamo fluorescentna barvila, ki se vežejo na DNA. Ta metoda temelji na tem, da je količina vgrajenega barvila proporcionalna količini molekule DNA v celicah. Tako označene celice, nato izmerimo na pretočnem citometru, kjer je količina oddanega fluorescentnega signala sorazmerna s celokupno količino fluorescence, ki jo oddaja celica (Nunez, 2001).

Uporaba pretočne citometrije za oceno fenotipa celic, kakor tudi vsebnosti DNA v celicah, nam tako omogoča merjenje proliferativnega odziva posameznih podskupin celic v mešanih vzorcih brez predhodnega ločevanja posameznih skupin celic (Schmid in sod., 2001).

## **2.5.3 Uporaba BrdU skupaj s pretočno citometrijo**

Uporaba imunološke metode BrdU skupaj s pretočno citometrijo in mikroskopijo, za proučevanje kinetike celic, je skoraj popolnoma nadomestila uporabo avtoradiografskih metod z [3H]timidinom. Imunokemijsko vrednotenje vgrajenega BrdU v novo nastalo DNA je široko uporabno v klinični praksi za merjenje kinetike celic. Tako lahko določimo dolžino posameznih faz celičnega cikla, podvojevalni čas in rastno frakcijo celic (Dolbeare in Selden, 2009).

Običajno se uporablja imunofluorescentno označevanje vgrajenega BrdU skupaj z uporabo barvil, ki se vežejo na celokupno DNK, kot npr. 7-amino-aktinomicin D (7-AAD). Pri tem lahko uporabimo pretočni citometer z dvema različnima fluorescentnima barviloma in tako lahko določimo število in značilnosti celic, ki aktivno sintetizirajo DNA (Becton Dickinson, 2011)

## 2.6 STIMULACIJE V POSKUSU

Kvantitativno določanje kinetike proliferacije limfocitov in apoptoze ob aktivaciji z določenim antigenom, je ključnega pomena pri razumevanju dejavnikov, ki določajo obseg, trajanje in učinkovitost imunskega odziva (Zilman in sod., 2010). Spodbujanje limfocitov v pogojih *in vitro* se uporablja za določanje proliferativnega odziva limfocitov po spodbujanju z različnimi antigeni in mitogeni ter za proučevanje funkcije teh celic (Trickett in Kwan, 2003). Pri tem uporabimo snovi, ki spodbujajo proliferacijo celic - spodbujevalci. Uporabljeni spodbujevalci lahko blokirajo določeno fazo celičnega cikla ali pa zmanjšajo sam prehod preko različnih faz celičnega cikla, kar lahko potem tudi izmerimo (Dolbeare in Selden, 2009). Uporabimo lahko poliklonske ali antigensko specifične spodbujevalce (Hodgkin in sod., 2005). Pri poliklonskem spodbujanju limfocitov uporabimo mitogene, kot so lektini ali monoklonska protitelesa, ki povzročijo poliklonsko proliferacijo limfocitov neodvisno do antigena. Pri antigensko specifičnem spodbujanju limfocitov, pa uporabimo specifične antigene, ki povzročijo monoklonski odziv (Trickett in Kwan, 2003; Hodgkin in sod., 2005).

Kemično povzročeni proliferativni odziv je lahko mitogen ali citotoksičen. Mitogeni povzročijo proliferacijo celic brez vidne celične smrti (apoptoze). V nasprotju s tem citotoksiki povzročijo nekrozo, ki ji pogosto sledi proliferacija celic z namenom obnavljanja nekroznega tkiva. Kemično povzročeno proliferacijo celic lahko ocenjujemo z uporabo označenih prekurzorjev DNA, kot sta [3H]timidin ali Brdu, ali pa z analizo endogenih označevalcev podvajanja celic, kot npr. jedrni antigen proliferirajočih celic (angl. proliferating cell nuclear antigen – PCNA). Sposobnost zaznavanja kemično inducirane faze S celičnega cikla, nam tako omogoča določitev proliferativnega odziva celic na določenih tarčnih populacijah celic (Goldsworthy in sod., 1993).

## 2.7 SPODBUJEVALCI IN MODULATORJI V POSKUSU

### 2.7.1 Lipopolisaharid

Bakterijska stena po Gramu negativnih bakterij vsebuje dve dodatni plasti, ki obe navzven obdajata peptidoglikan; ti sta zunanja membrana in periplazemski prostor. Zunanja membrana je zgrajena kot asimetrični lipidni dvosloj, in sicer iz zunanjega ter notranjega lipidnega sloja. Zunanji lipidni sloj sestavljajo lipopolisaharidne molekule (LPS) (Ihan, 2002a).

Lipopolisaharidi (LPS ali endotoksin) se nahajajo v zunanji membrani bakterijske stene po Gramu negativnih bakterij. Ena molekula je sestavljena iz lipidne molekule imenovane lipid A. Nanj je vezan središčni polisaharid, iz katerega štrlijo navzven terminalne polisaharidne verige. Osnovo lipida A tvorijo enote fosforiliranega glukozamina, na katerega so pritrjene dolgoverižne maščobne kisline. Terminalni polisaharidi štrlijo iz bakterijske stene in zaradi svoje zunanje lege izzovejo močan protitelesni imunski odziv, zato so pomembni kot antigeni po Gramu negativnih bakterij (antigeni O) (Ihan, 2002a).

Pri nenadzorovanem razmnoževanju in širjenju bakterij po krvi pride do preplavljanja organizma z bakterijami in njihovimi toksičnimi sestavinami. Toksični učinek LPS je skoraj v celoti vezan na lipid A. Ta se sprosti, kadar se bakterije razkrojijo, npr. zaradi delovanja komplementa, fagocitov ali antibiotikov (Ihan, 2002a).

Tekom okužb, ki jih povzročajo po Gramu negativne bakterije, se LPS sprošča v krvni obtok, kjer povzroči obsežno sproščanje biološko aktivnih citokinov. Večja količina citokinov v organizmu povzroči hude okvare žilja. Sproži se tudi buren sistemski odziv, ki se kaže s klinično sliko sepse in se v najhujših primerih razvije v septični šok (Koren, 2002). Pri tem pride v telesu do številnih patofizioloških sprememb, kot so povišana telesna temperatura, leukopenija, tahikardija, hipotenzija, diseminirana intravaskularna koagulacija in odpoved številnih organov (Ulmer in sod., 2000).

Dokazano je, da LPS, tako *in vivo* kakor tudi *in vitro*, povzroči nastanek vnetne reakcije, saj vpliva na celice imunskega odziva in sicer povzroča poliklonsko aktivacijo celic B ter



stimulacijo makrofagov in drugih APC. Pri APC sproži izločanje različnih citokinov, kot npr. IFN-I, TNF- $\alpha$  in IL-12 (Tough in sod., 1997). Glavna tarča LPS so monociti in makrofagi. LPS se veže na specifične receptorje na površini celic (CD14 in TLR-4) ter tako povzroči aktivacijo makrofagov in ostalih celic. To sproži izločanje različnih mediatorjev vnetja, kot so citokini (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, itd.), prostaglandini in reaktivne dušikove komponente (Nikitin in sod., 2004).

Tough in sod., so s poskusi na živalih pokazali, da v pogojih *in vivo*, LPS povzroči tudi močno stimulacijo celic T, in sicer LPS stimulira tako naivne, kakor tudi spominske celice T. Z metodo vključitve BrdU v DNA so ugotovili, da je klonski razrast pri naivnih celicah T (počivajoče celice) počasen, medtem ko je klonski razrast pri večini spominskih celic T hiter. S poskusi na živalih *in vivo* so ugotovili tudi, da je lahko nenehna proliferacija spominskih celic T, delno posredovana z IFN-I in drugimi citokini, ki se sproščajo po stiku celic z različnimi infekcijskimi agensi. Če to velja, potem lahko vsak mikroorganizem, ki je sposoben stimulirati proizvodnjo IFN-I *in vivo*, povzroči tudi stimulacijo limfocitov T (Tough in sod., 1997).

Ulmer in sod., pa so ugotovili, da LPS vpliva tudi na humane limfocite T, ki tako pripomorejo k nastanku vnetja zaradi prisotnosti LPS. LPS je tako močan aktivator proliferacije limfocitov T in aktivator produkcije citokinov. S poskusi na humanih limfocitih *in vitro* so ugotovili, da je aktivacija limfocitov T zaradi prisotnosti molekule LPS močno odvisna od direktnih stikov celica-celica, kjer gre za stike med aktiviranimi limfociti T in monociti. Tu so predvsem pomembne kostimulatorne povezave med receptorji CD28 in B7, ki niso odvisne od molekul PHK. Ugotovili so tudi, da je prisotnost krvotvornih matičnih celic CD34+ predpogoj za uspešno stimulacijo limfocitov T s prisotnimi molekulami LPS (Ulmer in sod., 2000).

Majhne koncentracije LPS-a naj bi bile za gostitelja celo koristne, saj povzročajo stimulacijo imunskega odziva in tako povečajo odpornost pred okužbami in nastankom rakavih obolenj. Poleg tega so preučili tudi prispevek molekule LPS pri nastanku alergijskih reakcij. Ugotovili so, da tako škodljive kakor tudi koristne odzive gostitelja na prisotnost LPS posredujejo endogeni mediatorji imunskega sistema (citokini), ki jih

izločajo številne celice (makrofagi, celice žilnega endotelija in polimorfonuklearne celice) (Ulmer in sod., 2000).

## 2.7.2 Betaglukan

Celične stene gliv vsebujejo elemente, kot so betaglukan, hitin in manani. Ti imajo pomembno biološko in imunofarmakološko aktivnost. Betaglukane najdemo v celičnih stenah gliv kot polimere sestavljene iz D-glukoz, povezanih z (1,3)- $\beta$ -vezmi in z različnim številom ter različnimi dolžinami stranskih verih, povezanih z (1,6)- $\beta$ -vezmi. Večina podatkov pridobljenih iz različnih študij nakazuje na to, da biološke učinke (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukana posreduje dektin-1, ki sodeluje pri prepoznavanju (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukanov celične stene kvasovk in plesni. Dektin-1 so receptorji naravne imunosti, ki prepoznajo betaglukane in imajo osrednjo vlogo pri imunosti proti glivam. Spadajo v družino lektinskih receptorjev (Stopinšek in sod., 2011).

Strukturno najpreprostejši (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukan je kurdlan iz bakterije *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, ki je podoben glivnim (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukanom, vendar ne vsebuje stranskih verig. Študije so pokazale, da so (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukani odgovorni za večino bioloških aktivnosti cimosana A (CIM), ki je netopni izvleček pridobljen iz celične stene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Cimosan A je zgrajen iz betaglukana, manana, hitina, proteinov in lipidov (Stopinšek in sod., 2011).

Dektin-1 sodeluje z receptorji, podobnimi proteinu tol 2 (angl. toll-like receptors; TLR) pri posredovanju sinteze vnetnih mediatorjev, spodbujenih s CIM, kot je TNF- $\alpha$ . Nekateri betaglukan, kot npr. CIM in kurdlan, imajo tako *in vivo* kakor tudi *in vitro* antimikrobne in imunomodulatorne lastnosti (Stopinšek in sod., 2011).

S študijami na podganah, so pokazali, da sistemska uporaba netopnega betaglukana poveča občutljivost podgan na nastanek endotoksičnega šoka, medtem ko pri uporabi topnega betaglukana ti negativni učinki niso bili vidni. Dokazali so tudi, da topen betaglukan ščiti pred okužbo in nastankom endotoksičnega šoka pri podganah in miših. Nekatere študije so pokazale tudi, da *in vitro* stimulacija humanih PBMC z (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-

glukani poveča proizvodnjo z LPS induciranih vnetnih citokinov (Stopinšek in sod., 2011).

(1→3)-β-D-glukani delujejo kot stimulatorji celične imunosti. Njihova vezava na specifični receptor povzroči aktivacijo makrofagov, ki sproži povečano kemotaktično migracijo makrofagov, njihovo degranulacijo, ki poveča izražanje adhezijskih molekul na površini makrofagov, potovanje makrofagov v različna tkiva, sprožijo pa se tudi različni znotrajcelični procesi, kot je oksidativni izbruh po fagocitozi tujkov ter izločanje citokinov. Poleg stimulacije makrofagov delujejo betaglukani tudi protivnetno in zavirajo nastanek raka, sprožijo nastanek reaktivnih kisikovih spojin, vnetnih mediatorjev in citokinov ter ojačajo celično citotoksičnost. Uporaba (1→3)-β-D-glukanov izboljša obrambne mehanizme gostitelja, saj imajo le ti imunomodulatorne lastnosti (Vetvicka in Vetvickova, 2011).

### 2.7.3 Fitohemaglutinin

Fitohemaglutinin (PHA) je mitogen, ki sproži delitev celic. Mitogeni ponavadi povzročijo relativno kratek izbruh proliferacije celic tekom kemično spodbujene rasti tkiva takoj po izpostavitvi. Za tem pa sledi vrnitev celičnega cikla na začetno stanje. Pri limfocitih, ki jih stimuliramo z mitogeni pride do sprememb na membrani ter izražanju površinskih antigenov, do podvojevanja DNA (proliferacije celic) in/ali apoptoze (celične smrti). (Goldsworthy in sod., 1993). Fitohemaglutinin aktivira limfocite in sproži njihovo proliferacijo z vezavo na glikoproteine, ki se nahajajo na membrani limfocitov, ter tudi na kompleks TCR-CD3 (Trickett in Kwan, 2003).

### 2.7.4 Ionomycin

Ionomycin skupaj s PMA (angl. phorbol 12-myristate 13-acetate) se pogosto uporabljata za stimulacijo limfocitov (Baran in sod., 2001).

Ionomycin je polietrski antibiotik, ki ga proizvaja kvasovka *Streptomyces conglabutus*. Ima visoko afiniteto za Ca<sup>2+</sup> ione. Deluje kot ionofor za kalcij in povzroči povišanje

koncentracije znotrajceličnega kalcija, ta pa potem aktivira proliferacijo limfocitov (Liu in Hermann, 1978).

PMA povzroči direktno aktivacijo proteinske kinaze C, ter tako stimulira limfocite (Trickett in Kwan, 2003).

### **2.7.5 CD3+ (aktivirajoča protitelesa) in CD28+ (kostimulatorna protitelesa)**

Levkociti (bele celice) izražajo na svoji površinah molekule, ki jih je mogoče zanesljivo določiti z monoklonskimi telesi. Monoklonska protitelesa, ki jih uporabljamo za prikazovanje takih levkocitnih molekul so sistematizirana po razvrstitvi CD (angl. cluster of differentiation). Posamezna vrsta monoklonskih protiteles CD je specifična za eno vrsto molekul na površinah človeških levkocitov (Ihan, 2002b).

Protitelesa, ki so specifična za kompleks TCR-CD3 so potrebna za začetni aktivacijski signal, vendar pa je proliferacija limfocitov T odvisna od kostimulatornega signala, ki jih običajno zagotavljajo molekule CD28 (Trickett in Kwan, 2003).

Limfociti T, ki se srečajo s specifičnimi antigeni potrebujejo še dodatne signale, da pride do funkcionalnega imunskega odziva (Wells in sod., 1997). Za aktivacijo limfocitov T sta tako potrebna dva signala: prvi, specifični signal, posreduje TCR, ki prepozna antigen vezan na PHK, predstavljen na APC; drugi signal je nespecifičen, posreduje pa ga vezava kostimulatornega liganda na receptor, ki se nahaja na površini celic T. Če limfociti T prejmejo oba signala, pride do njihove proliferacije, diferenciacije in ti na koncu dozoriijo v zrele limfocite z določeno efektorsko funkcijo. V nasprotju, če kostimulatorni signal ni prisoten, ali pa niso prisotni ustrezni receptorji na celicah T ali ligandi na APC, pa pride do apoptoze celic T (Song in sod., 2008).

### 2.7.5.1 CD3

Monoklonska protitelesa CD3 se vežejo na receptorje, ki omogočajo limfocitom T prepoznavanje antigenov (T celični receptor - TCR). TCR so značilni samo za limfocite T (Ihan, 2002b).

### 2.7.5.2 CD28

Na površini celic T se nahaja nekaj različnih molekul, ki posredujejo kostimulatorne signale, med katerimi je kot kostimulatorni ligand najpomembnejši glikoprotein CD28 (Wells in sod., 1997). CD28 molekule spadajo v superdružino imunoglobulinov (IgSF) in so konstitutivno izražene na celicah T (Song in sod., 2008). Kostimulacija s protitelesi CD28 sproži povečanje proliferacije limfocitov T in močno poveča izločanje citokinov (Wells in sod., 1997).

## 2.7.6 Metilprednizolon

Glukokortikosteroidi (GCS) se zaradi svojih imunosupresivnih in protivnetnih lastnosti uporabljajo za zdravljenje avtoimunskih in alergijskih obolenj, kar jim zagotavlja sposobnost, da zavrejo izražanje genov in produkcijo mnogih citokinov ter mediatorjev vnetja (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ , in drugi). Njihovi učinki so odvisni od uporabljenih količin glukokortikosteroidov. Delujejo supresivno na celice T, monocite in naravne celice ubijalke in sicer delujejo na zmanjšanje izločanja citokinov (Hodge in sod, 1999).

Metilprednizolon (Medrol) je sintetični kortikosteroid, podoben naravnim hormonom kortikosteroidom, ki jih proizvaja nadledvična žleza. Uporablja se kot zdravilo, kadar naše telo ne proizvaja zadostnih količin kortikosteroidov, kar se kaže v obliki raznih obolenj. Uporablja se za zmanjševanje vnetnih reakcij (vročino, otekanje, rdečino, bolečino) ter za zdravljenja različnih oblik artritisa, alergij, nekaterih oblik rakavih obolenj ter drugih obolenj kože, ledvic, žlez, črevesnih obolenj, itd. (AHFS, 2013).

### **2.7.7 Natrijev nukleinat**

Natrijev nukleinat (angl. sodium nucleinate – SN), v Rusiji registriran kot Tamerit<sup>®</sup>, je 2-amino-1,2,3,4,-tetrahidroftalazin-1,4-dion dihidrat natrijeve soli, derivat dobro poznane kemične substance luminol. V Ruski farmakopeji je opisan kot imunomodulatorna substanca s protivnetnimi in antioksidativnimi lastnostmi. Sestavljen je iz dveh zelo aktivnih aminoftalhidratov. SN je obetaven zaviralec večkratnega vnetnega izločanja citokinov, to pa lahko sproži ali podaljša znatno število patoloških procesov (Jukić in sod., 2011).

Jukić in sod. so dokazali, da SN inhibira razvoj sepse pri mišjih modelih, pri katerih so predhodno inducirali sepsu z LPS. SN je pri miših povzročil zmanjšanje sinteze vnetnih citokinov v plazmi in posledično inhibiral razvoj sepse. S poskusi na ljudeh, pa so ugotovili, da SN ravno tako vpliva na zmanjšanje števila vnetnih citokinov (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6) pri predhodno stimuliranih mononuklearnih celic z LPS. Tako so pokazali, da je SN inhibitor izločanja vnetnih citokinov in bi se lahko v prihodnosti uporabljal za zdravljenje sepse, kot zdravilo za inhibicijo patogenosti molekule LPS (Jukić in sod., 2011).

### **2.7.8 Glatiramer acetat**

Glatiramer acetat (GA, angl. Copaxone) je kopolimer, sestavljen iz štirih amino kislin: L-alanina, L-glutaminske kisline, L-lizina in L-tirozina. GA je zdravilo, ki se uporablja za zdravljenje multiple skleroze kot imunomodulatorna terapija (Farina in sod., 2001). Klinične študije kažejo na to, da zdravljenje z GA zmanjša aktivnost lezij, ki nastanejo pri multipli sklerozi (Weber in sod., 2004).

V različnih kliničnih študijah so pokazali, da GA zmanjša biološko aktivnost recidivne remitente multiple skleroze. Glavni klinični učinek pri tem je zmanjšanje stopnje recidivov in tvorbe novih lezij pri multipli sklerozi (Weisemann in sod., 2003).

Galatimer acetat ovira aktivacijo mielin-specifičnih limfocitov T, tako da deluje kod spremenjen peptidni ligand in sproži regulatorno supresivne GA-specifične celice T. GA moti zaznavanje antigenov in uravnava izločanje citokinov s strani limfocitov T na od

antigena specifičen način. Schmidt in sod. (2002), so dokazali, da GA modulira tudi proliferativni odziv in izločanje citokinov pri mononuklearnih celicah izoliranih iz periferne krvi zdravih posameznikov, ki so jih spodbudili s fitohemaglutininom in stafilokoknim enterotoksinom B – od antigena neodvisna stimulacija. Ugotovili so, da GA inhibira proliferacijo limfocitov T sproženo s superantigenom in mitogenom v odvisnosti od uporabljene količine zdravila (zadostna količina GA). Prav tako GA inhibira tudi izločanje citokinov (IFN- $\gamma$  in TNF- $\alpha$ ) v *in vitro* pogojih. Ta odkritja so pomembna, saj kažejo na to, da GA ne ovira aktivacijo celic T samo na od antigena specifičen način (Schmidt in sod., 2002).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Uporabljeni reagenti

- Medij MII:
  - RPMI: 1640 medium (hepes modificated), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
  - Fetal bovine serum: Gibco, Auckland, New Zealand
  - Penicilin – Streptomycin: Gibco, Auckland, New Zealand
  - L-glutamin: GlutaMAX™ I, Gibco, Auckland, New Zealand
- Fitohemaglutinin (PHA): Phytohemaglutinin 5mg, Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
- Ionomycin: Ionomycin Ca<sup>2+</sup> salt 1mg, Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
- PMA: Phorbol 12 myristate 13 acetat 1mg, Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
- *E. coli*: *Escherichia coli* ATCC 25922 1 McF (8. 6. 2012)
- Betaglukan: Wako Chemicals USA, Inc.; ZDA
- Natrijev nukleinat (Tamerit): Dekopharm; Rusija
- Glatiramer acetat (Kopakson): Teva Pharmaceuticals VB (Teva LTD); Izrael
- Metiprednizolon: Pfizer Luxemburg; Luksemburg (Krka)
- CD3: Purified NA/LE mouse anti-human CD3 0,5mg, BD Biosciences, San Jose, California, USA
- CD28: Purified NA/LE mouse anti-human CD28 0,5mg, BD Biosciences
- LPS: Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Fikoll – Paque™ plus (endotoxin tested), GE Healthcare, Sweden
- CD3 APC: BD Biosciences, San Jose, California, USA
- Epruvete: Epruvete BD Vacutainer® K2E 10,8mg, BD Phymouth UK
- Test BrdU: BD Pharmingen™ FITC BrdU Flow Kit, BD Biosciences, San Jose, California, USA;

Komplet BD Pharmingen™ FITC BrdU Flow vsebuje: protitelesa anti-BrdU konjugirana s fluokromomi, raztopino BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization, 10X pufer BD Perm/Wash™, pufer BD Cytoperm™ Plus Permeabilization, nukleotid BrdU, DNazo.



- Test Edu: Invitrogen™ Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry Assay Kit, Invitrogen, California, USA

Komplet Invitrogen™ Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry Assay vsebuje: nukleotid EdU, barvilo Alexa Fluor® 488, dimetilsulfoksid (DMSO), fiksativ Click-iT®, Click-iT® saponin-based permeabilization and wash reagent, CuSO<sub>4</sub>, Click-iT® EdU buffer additive.

### 3.1.2 Priprava reagentov

#### 3.1.2.1 Medij MII

Za pripravo medija II smo zmešali:

- 400 ml RPMI
- 20 ml FCS
- 4 ml Penicilin – Streptomycin
- 1,6 ml L-glutamin

Priprava medija II je potekala v mikrobiološki komori.

#### 3.1.2.2 Betaglukan

Končna koncentracija Curdlana (komercialno ime Betaglukan) je 10 mg/ml. Natehtamo 400 mg Curdlana in dodamo 40 ml RPMI. Dobro premešamo na vorteksu. Alikvotiramo po 1 ml in shranimo pri -20 °C.

Priprava betaglukana je potekala v mikrobiološki komori.

#### 3.1.2.3 *E.coli*

V našem poskusu smo uporabili bakterijski sev po Gramu negativne, nepatogene *E. coli* ATCC 25922 s koncentracijo 1 McF (1x10<sup>8</sup> CFU/ml). Bakterijsko kulturo *E. coli* ATCC 25922 smo 10-krat redčili z gojiščem MII do koncentracije 1x10<sup>6</sup> CFU/ ml ter jo nato

inaktivirali s toploto: kuhanje pri 100 °C, 30 minut. Njeno inaktivacijo smo tudi preverili, tako da smo 200 µl inaktivirane *E. coli* ATCC 25922 v 1 ml RPMI inkubirali 3 dni v CO<sub>2</sub> inkubatorju ter inkubatorju brez CO<sub>2</sub>. Kulturo inaktivirane *E. coli* ATCC 25922 smo nato alikvotirali po 500 µl ter shranili pri -20 °C.

Priprava inaktivirane kulture *E. coli* ATCC 25922 je potekala v mikrobiološki komori.

## 3.2 METODE

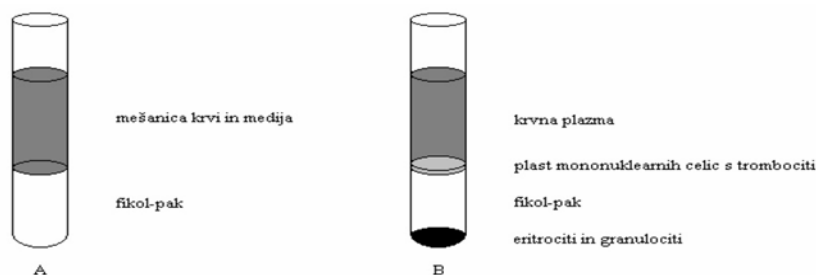
### 3.2.1 Pridobitev vzorcev krvi

Vsakotedensko smo iz iz Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani, na oddelku za preskrbo s krvjo, dobili 2 – 3 vzorca krvi.. Kri so darovali zdravi krvodajalci različne starosti in različnega spola. Vsak krvodajalec je ob darovanju krvi podpisal soglasje za darovanje krvi v znanstvene namene. Darovanje krvi je koordinirala vodja Centra za izbor dajalcev in zbiranje krvi, Polonca Mali, dr. Med. Vsa dokumentacija je shranjena v Centru za izbor dajalcev in zbiranje krvi. Iz Zavoda RS za transfuzijsko medicino smo skupno dobili 14 vzorcev. Poskus je trajal 7 tednov.

### 3.2.2 Izolacija mononuklearnih celic (PBMC)

Mononuklearne celice smo iz dobljenih vzorcev (2 ali 3 vzorci) periferne krvi izolirali z gradientnim centrifugiranjem z medijem fikol (angl. Ficoll – Paque). Metoda temelji na nižji gostoti mononuklearnih celic v primerjavi z drugimi krvnimi celicami. Za izolacijo PBMC na gostotnem gradientu smo kot ločevalni medij uporabili fikol. Fikol pri sobni temperaturi povzroči agregacijo eritrocitov in tako hitrejšo sedimentacijo na dno epruvete. Granulocitom se ob stiku s fikolom poveča gostota in s tem tudi hitrost sedimentacije. Limfociti in monociti se zaradi svoje majhne gostote ne morejo prebiti skozi fikol ter tako skupaj s trombociti tvorijo zgoščeno plast na meji med fikolom in krvno plazmo.

V laboratorij smo prejeli epruvete z vensko krvjo. Vzorec krvi posameznega krvodajalca je bil razdeljen v dve 10-ml epruveti. Krv je bil dodan antikoagulant EDTA. Postopek osamitve PBMC je potekal v sterilnih pogojih. Kri smo dobro premešali na vorteksu, nato pa 3 ml krvi razredčili v razmerju 1:1 z RPMI (PBS). Vsakega izmed štirih vzorčkov smo razdelili na pol in previdno naplastili na gostotno blazinico Ficoll – Paque ( 3ml). Vzorce smo nato centrifugirali 20 minut pri 1800 obratih na minuto. Po centrifugiranju smo s Pasteurjevo pipeto odstranili krvno plazmo, limfocitni pas pa previdno ločili od plasti Ficoll - Paque in odpipetirali v drugo epruveto. Limfocite smo razredčili v razmerju 1:1 z RPMI (PBS), premešali in centrifugirali 10 minut pri 1600 obratih na minuto. Nato smo odstranili supernatant, pretresli sediment in vse skupaj še enkrat ponovili. Na koncu smo dodali 5 ml medija II (MII – angl. cell loading medium) ter označili celice s tripanskim modrilom (100  $\mu$ l izoliranih celic + 900  $\mu$ l tripanskega modrila), premešali in s pomočjo Neubarjeve komore na hemocitometru prešteli celice ter izračunali njihovo koncentracijo v vzorcu.



Slika 5: Shematični prikaz ločitve krvi na mediju Ficoll-Hypaque

### 3.2.3 Merjenje proliferacije limfocitov z metodo BrdU in EdU

Osamljene celice smo nato resuspendirali v mediju II in uravnali koncentracijo celic do  $1 \times 10^6$  celic/ml. Izolirane mononuklearne celice s koncentracijo  $1 \times 10^6$  celic/ml smo nato razporedili v mikrotitrne ploščice z 24 vdolbnicami ter jim dodali spodbujevalce oz. modulatorje v ustrezni koncentraciji. Pri uporabi modulatorjev (betaglukan,

metilprednizolon, natrijev nukleinat ter glatiramer acetat) smo celice predhodno inkubirali z *E.coli* v ustrezni koncentraciji ( $1 \times 10^6$  CFU/ml). Po 1 urni inkubaciji smo dodali modulatorje v ustrezni koncentraciji ter inkubirali po določenih časih inkubacije.

### 3.2.3.1 Spodbujanje limfocitov

Za spodbujanje limfocitov v našem poskusu smo potrebovali limfocite s koncentracijo  $1 \times 10^6$  celic/ml, ki smo jih pridobili iz 10-ih ml krvi zdravih posameznikov. Spodbujevalci in modulatorji, ki smo jih uporabili v poskusu so:

- SPODBUJEVALCI: fitohemaglutinin (PHA), ionomicin skupaj s PMA, CD3+ (aktivirajoča protitelesa) skupaj s CD28+ (kostimulatorna protitelesa), lipopolisaharid (LPS), *E.coli* (vir molekule LPS).
- MODULATORJI: betaglukan, metilprednizolon, natrijev nukleinat ter glatiramer acetat.

Poskus spodbujanja limfocitov smo izvajali pri naslednjih koncentracijah spodbujevalcev/modulatorjev in časih spodbujanja:

Preglednica 1: Koncentracije in časi spodbujanja limfocitov z različnimi spodbujevalci

<b>SPODBUJEVALCI/ MODULATORJI</b>	<b>KONCENTRACIJA</b>	<b>ČAS STIMULACIJE</b>
PHA	5 µg/ml	40h
ionomicin + PMA	500 nM + 3,33 ng/ml	40h
CD3 + CD28	1 µg/ml + 5 µg/ml	66h
LPS	10 ng/ml, 50 ng/ml	18h/66h
<i>E. coli</i>	$1 \times 10^6$ CFU/ml	66h
betaglukan + <i>E. coli</i>	200 µg/ml + $1 \times 10^6$ CFU/ml	18h/66h
metilprednizolon + <i>E. coli</i>	1 µg/ml + $1 \times 10^6$ CFU/ml	40h/66h
natrijev nukleinat + <i>E. coli</i>	7 µg/ml + $1 \times 10^6$ CFU/ml	18h/66h
glatiramer acetat + <i>E. coli</i>	50 µg/ml + $1 \times 10^6$ CFU/ml	18h/66h

Legenda: PHA (fitohemaglutinin), PMA (forbol 12-miristat 13-acetat), LPS (lipopolisaharid).

### 3.2.4 Priprava celic za merjenje na pretočnem citometru

#### 3.2.4.1 Označevanje celic z BrdU

Celice smo inkubirali od 2 do 6 dni pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. Zadnjih 20 ur inkubacije smo dodali 10 μM nukleotida BrdU.

200 μL celic smo po končani inkubaciji sprali z 1ml pufra DPBS ter centrifugirali 5 minut pri 300 g. Nato smo celice resuspendirali v 100 μL pufra Cytofix/Cytoperm, ki vsebuje fiksativ za celice formaldehid in detergent saponin, ki omogoča permebilizacijo celične membrane. Celice smo nato inkubirali 20 minut pri sobni temperaturi ter jih po končani inkubaciji ponovno sprali z 1 ml pufra Perm/Wash in centrifugirali pri 300 g 5 minut. Nato smo celice resuspendirali v 100 μL pufra Cytoperm Plus, ki je sekundarni permebilizacijski reagent ter jih inkubirali 10 minut na ledu. Nato smo ponovili postopek spiranja celic z 1ml pufra Perm/Wash. Znova smo centrifugirali celice pri 300g 5 minut. Nato smo celice resuspendirali v 100 μL pufra Cytofix/Cytoperm ter jih inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo celice ponovno sprali z 1ml pufra Perm/Wash ter jih centrifugirali pri 300 g 5 minut. Celice smo nato resuspendirali v 100 μL redčene DN-aze (30 μg DN-aze in 70 μl pufra DPBS) ter jih inkubirali 1 uro pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. S tem smo omogočili izpostavitve epitopov vgrajenih nukleozidov BrdU, kamor se nato vežejo detekcijska anti-BrdU protitelesa. Po končani inkubaciji smo jih sprali z 1ml pufra Perm/Wash ter centrifugirali pri 300 g 5 minut. Nato smo dodali 50 μl anti-BrdU protiteles konjugiranih s fluorkromom, ki smo jih predhodno redčili v razmerju 1:50 s pufrom Perm Wash ter inkubirali 20 minut pri sobni temperaturi v temi. Nato smo celice sprali z 1ml pufra Perm/Wash ter jih centrifugirali pri 300 g 5 minut . Na koncu smo celice resuspendirali v 0,5 ml pufra DPBS in na pretočnem citometru izmerili količino vgrajenega BrdU.

#### 3.2.4.2 Označevanje celic z EdU

Celice smo inkubirali od 2 do 6 dni pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. Zadnjih 20 ur inkubacije smo dodali 10 μM nukleotida EdU.

200  $\mu$ L celic smo po končani inkubaciji sprali s 3 ml pufru 1% BSA v PBS ter centrifugirali 5 minut pri 300 g. Nato smo celice resuspendirali v 100  $\mu$ l fiksativa Click-iT ter dobro premešali in inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi v temi. Po končani inkubaciji smo celice znova sprali s 3 ml pufru 1% BSA v PBS ter jih centrifugirali 5 minut pri 300 g. Nato smo celice resuspendirali v 100  $\mu$ l Click-iT saponin-based permeabilization and wash reagent ter dobro premešali. Celice smo nato inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi v temi. Po končani inkubaciji smo dodali 0,5 ml reakcijske mešanice Click-iT ter dobro premešali. Celice smo inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi v temi ter jih po končani inkubaciji sprali s 3 ml 1x Click-iT saponin-based permeabilization and wash reagentom ter znova centrifugirali 5 minut pri 300 g. Na koncu smo celice resuspendirali v 200  $\mu$ l 1x Click-iT saponin-based permeabilization and wash reagent in na pretočnem citometru izmerili količino vgrajenega EdU.

#### 3.2.4.3 Ločitev posameznih podvrst celic

Kadar delamo imunofluorescenčni test s fluorescenčno označenimi protitelesi CD3 so vse celice, ki fluorescirajo limfociti T. Protitelesa CD3 so specifična za TCR, ki se nahaja samo na limfocitih T (Ihan, 2002b). Tako označimo limfocite T in jih ločimo od celotne populacije limfocitov.

Pri negativni kontroli in spodbujanju s PHA, smo še dodatno 200  $\mu$ L celic predhodno označili z 10  $\mu$ L CD3 APC ter inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi v temi, tako pri metodi BrdU, kakor tudi pri metodi EdU. Nato smo nadaljevali s celotnim postopkom označevanja vgrajenega BrdU/EdU s fluorescentno označenimi protitelesi anti-BrdU/anti-EdU po protokolu označevanja celic z BrdU/EdU.

#### 3.2.5 Analiza proliferacije limfocitov s pretočnim citometrom

V laboratoriju za celično imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani se uporablja pretočni citometer BD FACSCanto. Na računalniku je nameščena programska oprema BD FACSDiva.



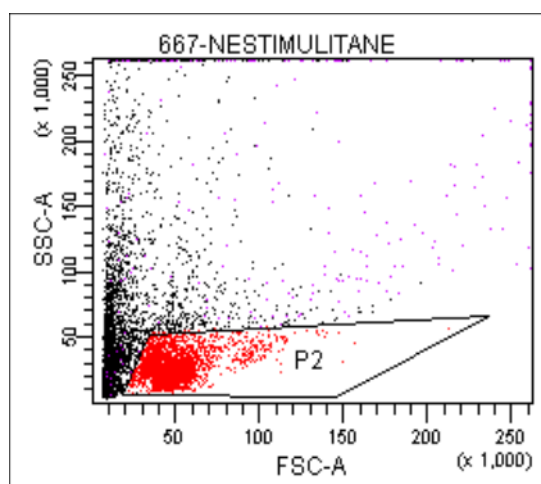
Slika 6: Pretočni citometer: citometer, voziček s tekočinami in računalnik z LCD-monitorjem (Becton Dickinson, 2005).

Ob prehodu snopa žarkov na pretočnem citometru odda posamezna celica signal. Dva fotodetektorja merita odboj ali lom svetlobe, eden iz smeri vira – FALS (angl. forward angle light scatter) in drugi pravokotno na smer vpadne svetlobe – RALS (angl. right angle light scatter). Detektor FALS je pomemben za ugotovitev velikosti celice, detektor RALS pa sprejema od celice odbito svetlobo, skladno z granuliranostjo in površinsko strukturo celice (Ihan in Kopitar, 2010).

Vse dobljene podatke ureja in analizira računalnik. Rezultati so prikazani na ekranu v obliki točkovnega diagrama in matematično. Rezultat pretočne citometrije lahko predstavimo kot odstotek pozitivnih celic ali kot povprečno celično svetilnost. Pozitivne celice so celice, ki fluorescirajo po reakciji s fluorescenčno označenimi monoklonskimi protitelesi. Velikost celic je prikazana na X-osi diagrama. Količina prejete svetlobe je obratno sorazmerna velikosti celice. Granuliranost celic pa je prikazana na Y-osi diagrama. Granuliranost je odraz količine in lastnosti membranskih struktur celice (Ifko, 2011).

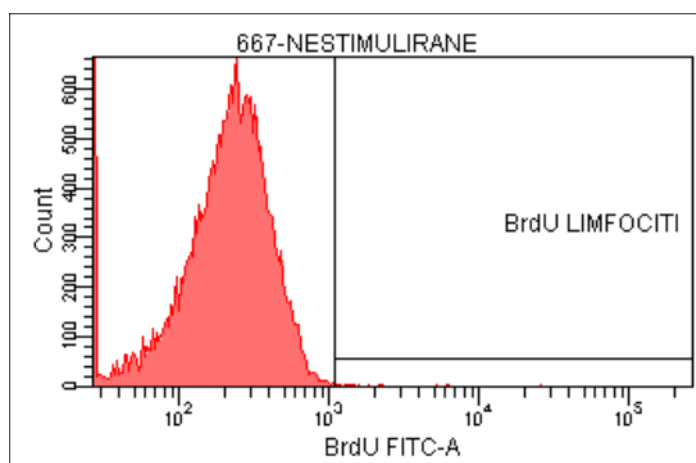
Glede na položaj točk na diagramu ločimo posamezne vrste celic.

Pri analizi podatkov smo najprej zamejili žive mononuklearne celice v celotni populaciji celic.



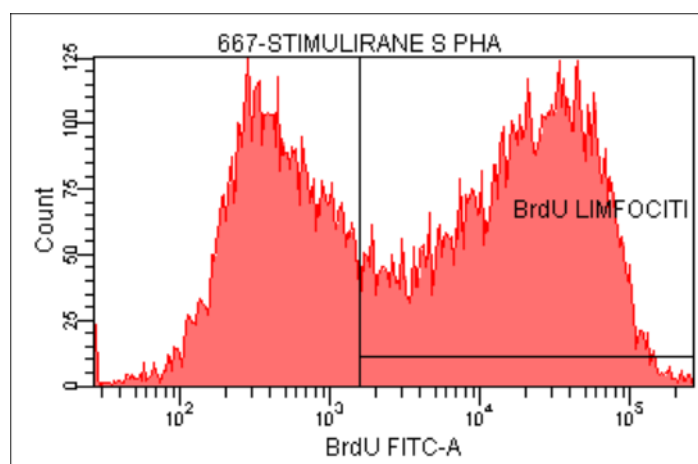
Slika 7: Zamejitev živih mononuklearnih celic.

Nato smo označili BrdU pozitivne celice, torej celice, ki se aktivno delijo. To mejo smo najprej določili pri negativnih kontroli – vzorci brez dodanih spodbujevalcev. Nato pa smo s pomočjo določitve meje pri negativni kontroli, določili tudi celice, ki se delijo po uporabi ostalih spodbujevalcev. Vse celice, ki se nahajajo desno od te meje so BrdU pozitivne celice.



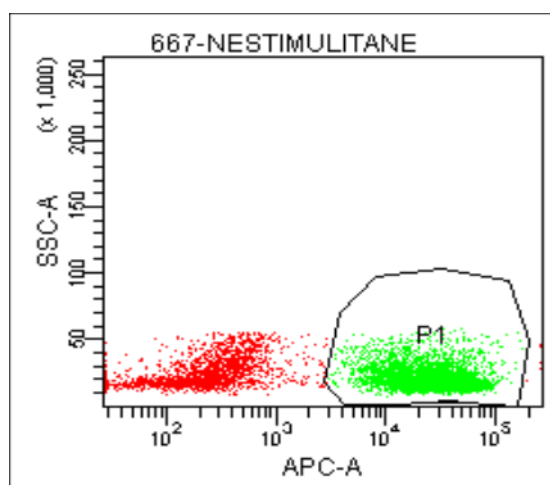
Slika 8: Določitev meje BrdU pozitivnih celic pri limfocitih, ki jih nismo spodbujali.





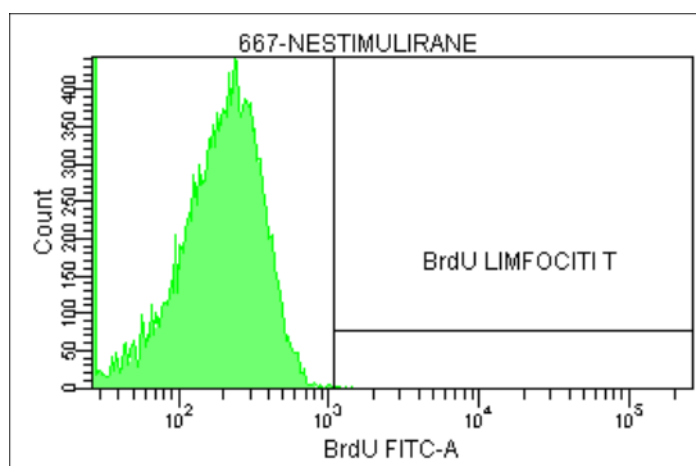
Slika 9: Določitev meje BrdU pozitivnih celic pri limfocitih, spodbujenih s fitohemaglutininom.

Zanimal nas je tudi proliferativni odziv pri posameznih podvrstah limfocitov. V ta namen smo uporabili vzorce PBMC brez dodanih spodbujevalcev (negativna kontrola) in PBMC spodbujene s PHA. Za ločitev limfocitov T od celotne populacije smo vzorcem dodali še CD3 APC, ki oddajajo rdečo fluorescenco. Tudi tu smo najprej zamejili žive limfocite.

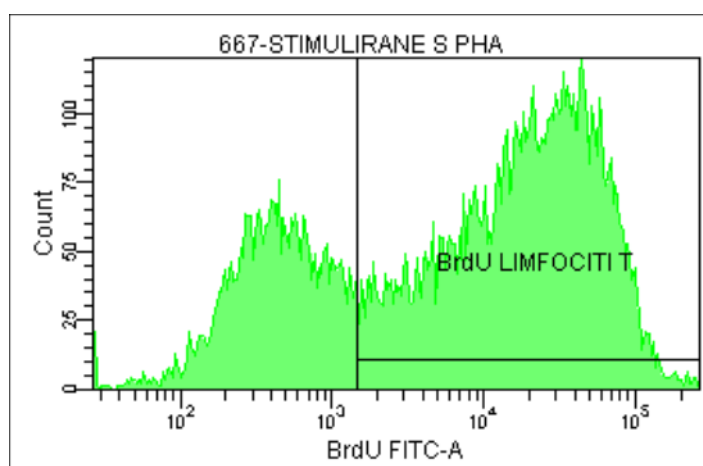


Slika 10: Zamejitev živih limfocitov T.

Nato pa smo na grafu postavili meje pri negativni kontroli ter pri spodbujanju s PHA in tako določili delež BrdU pozitivnih celic, torej celic, ki se aktivno delijo.



Slika 11: Določitev meje BrdU pozitivnih celic pri limfocitih T, ki jih nismo spodbujali.



Slika 12: Določitev meje BrdU pozitivnih celic pri limfocitih T, spodbujenih s fitohemaglutininom.

### 3.2.6 Statistična analiza podatkov

Iz dobljenih podatkov smo izračunali povprečne vrednosti, standardne odklone ter standarne napake in jih predstavili na stolpičastem grafikonu. Testirali smo razlike v variancah za normalno porazdelitev. Z dvostranskim Studentovim t-testom smo preverjali ničelne domneve o razliki povprečij za dva odvisna vzorca, pri čemer smo za stopnjo tveganja ( $\alpha$ ) izbrali 0,05.

Rezultate smo statistično obdelali z tehnično-računalniško opremo ter podatke med seboj primerjali v programu Microsoft Excell, MS Office 2010.

## 4 REZULTATI

### 4.1 STIMULACIJA LIMFOCITOV Z RAZLIČNIMI SPODBUJEVALCI

V poskusu smo preverjali, kako različne snovi, ki jih dodamo izoliranim mononuklearnih celicam iz periferne krvi, vplivajo na njihovo proliferacijo.

V ta namen, smo izolirane PBMC gojili skupaj z dodanimi različnimi snovmi, ki delujejo bodisi kot spodbujevalci teh celic in povzročijo njihovo proliferacijo oz. kot modulatorji, ki lahko proliferacijo spodbudijo ali pa jo zmanjšajo.

S pomočjo negativne kontrole smo določili delež limfocitov, ki se spontano delijo brez dodanih spodbujevalcev. Imeli smo tudi kontrolo samega testa BrdU, kjer smo poskus nastavili tako, da smo gojili izolirane mononuklearne celice brez dodanih spodbujevalcev. Te celice smo nato inkubirali za določen čas, vendar jim nismo dodali BrdU. Na koncu inkubacije smo, tako kot pri vseh ostalih, dodali anti-BrdU protitelesa in po protokolu pripravili celice za merjenje na pretočnem citometru, kjer smo določili delež BrdU pozitivnih celic. S to kontrolo smo želeli preveriti specifičnost BrdU testa. Tako smo preverili nespecifično vezavo dodanih anti-BrdU protiteles, kar bi lahko prispevalo k lažno pozitivnim rezultatom. Delež BrdU pozitivnih celic je bil nižji od 5 %, s čimer smo potrdili, da je test BrdU primeren za merjenje proliferacije limfocitov po spodbujanju z različnimi antigeni.

V prvi skupini so snovi z znanimi učinki. Ti so nam služili kot kontrolni poskusi, na podlagi katerih, smo rezultate nato primerjali s poskusi, kjer smo testirali snovi, katerih učinkov ne poznamo in tako sklepali na mehanizem njihovega delovanja. V prvo skupino smo umestili vse snovi, ki so po dodatku izoliranim limfocitov ter ustrezni inkubaciji spodbudili njihovo proliferacijo.

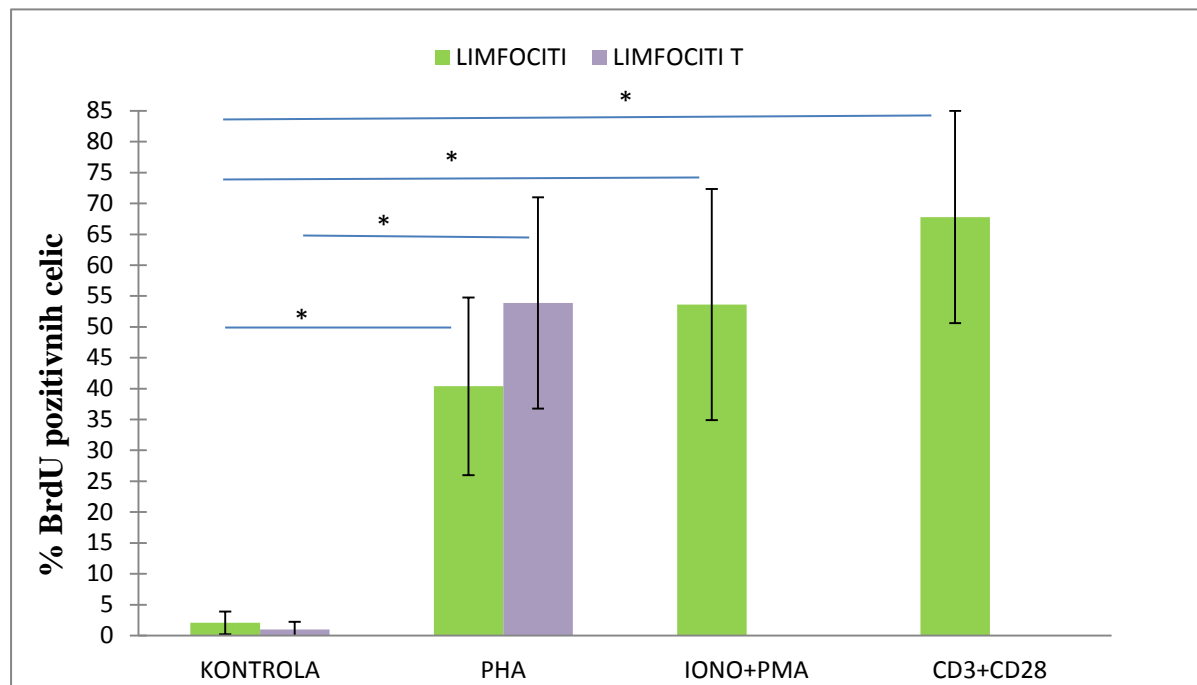
Preglednica 2: Delež deležih limfocitov (% BrdU+) po spodbujanju s fitohemaglutininom, ionomicinom skupaj s PMA ter CD3+ aktivirajočimi protitelesi skupaj z CD28+ kostimulatornimi protitelesi.

Številka vzorca	% BrdU+ NK	% BrdU+ PHA	% BrdU+ IONO+PMA	% BrdU+ CD3+CD28
vzorec 334	1	34	53	69
vzorec 335	3	29	24	75
vzorec 141	3	28		70
vzorec 142	5	27		61
vzorec 68	1	29		47
vzorec 69	0	31		34
vzorec 442	1	25		90
vzorec 443	0	27		74
vzorec 666	1	36	30	69
vzorec 667	1	62	56	89
vzorec 668	4	39	43	
vzorec 992	1	65	79	
vzorec 993	0	62	80	
vzorec 994	5	51	69	
vzorec 100	5	57	53	
vzorec 101	2	44	49	
<b>SREDNJA VREDNOST</b>	2,06	40,38	53,60	67,80
<b>STDEV</b>	1,84	14,38	18,72	17,20
<b>STANDARDNA NAPAKA</b>	0,46	3,59	5,92	5,44

Legenda: NK (negativna kontrola), PHA (fitohemaglutinin), IONO (ionomicin), PMA (forbol 12-miristat 13-acetat)

Na podlagi dobljenih vrednosti (% BrdU pozitivnih celic), smo izračunali srednjo vrednost, standarni odklon in standardno napako za vse spodbujevalce (fitohemaglutinin, ionomicin skupaj s PMA ter aktivatorna protitelesa CD3+ skupaj s kostimulatornimi protitelesi CD28+).

Iz preglednice 2 je razvidno, da fitohemaglutinin (PHA), ionomicin skupaj s PMA ter CD3+ aktivirajoča protitelesa skupaj z CD28+ kostimulatornimi protitelesi povečajo proliferacijo limfocitov.

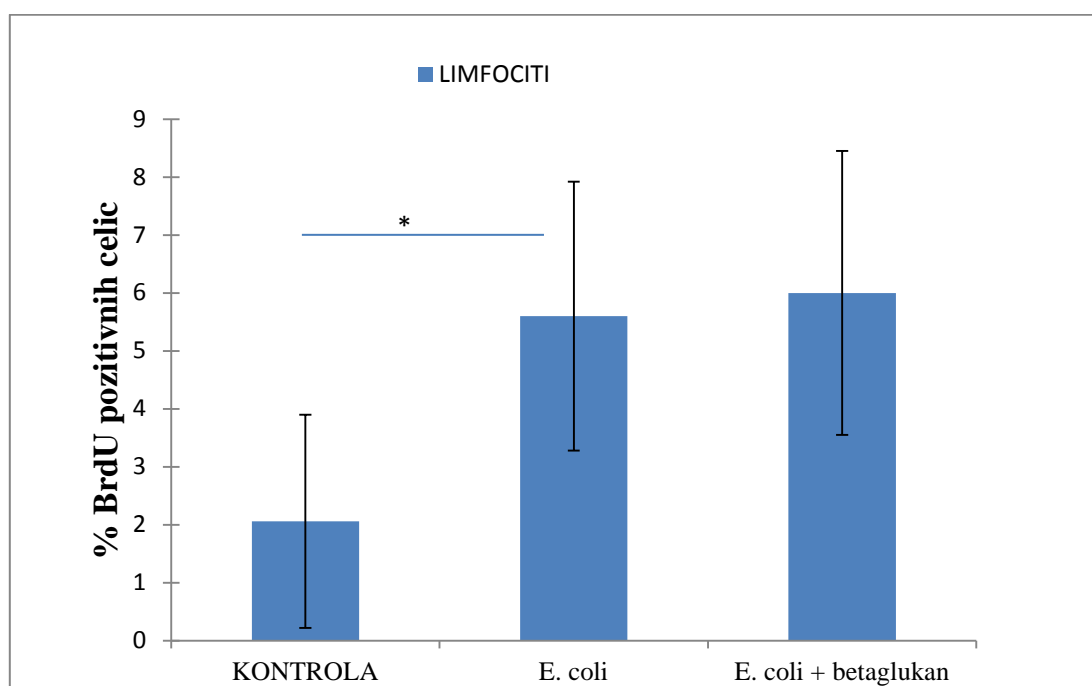


Slika 13: Vpliv fitohemaglutinina, ionomicina skupaj s PMA ter protiteles CD3+ skupaj s protitelesi CD28+ na proliferacijo limfocitov. Na sliki so prikazane srednje vrednosti in standardni odkloni. Število ponovitev je 16 pri negativni kontroli in spodbujanju s fitohemaglutininom ter 10 pri spodbujanju z ionomicinom skupaj s PMA in spodbujanju z CD3+ skupaj s CD28+ protitelesi. % BrdU pozitivnih celic predstavlja delež limfocitov v populaciji, ki se aktivno delijo.

\*: Rezultati se statistično razlikujejo med seboj, kar smo potrdili z dvostranskimi t-testi, kjer smo preverjali razlike povprečij za dva odvisna vzorca, pri čemer je bila  $\alpha = 0,05$ .

Iz slike 13 je razvidno, da fitohemaglutinin (PHA) (~ 40 % BrdU pozitivnih celic), ionomicin skupaj s PMA (~ 55 % BrdU pozitivnih celic) ter CD3+ aktivirajoča protitelesa skupaj z CD28+ kostimulatornimi protitelesi (~ 70 % BrdU pozitivnih celic) delujejo kot spodbujevalci ter povečajo proliferacijo limocitov.

V drugi skupini sta mikroba produkta, pri katerih nas je zanimalo njuno delovanje na proliferacijo limfocitov. To sta molekuli bakterijskih (lipopolisaharid) ter glivnih sten (betaglukan).



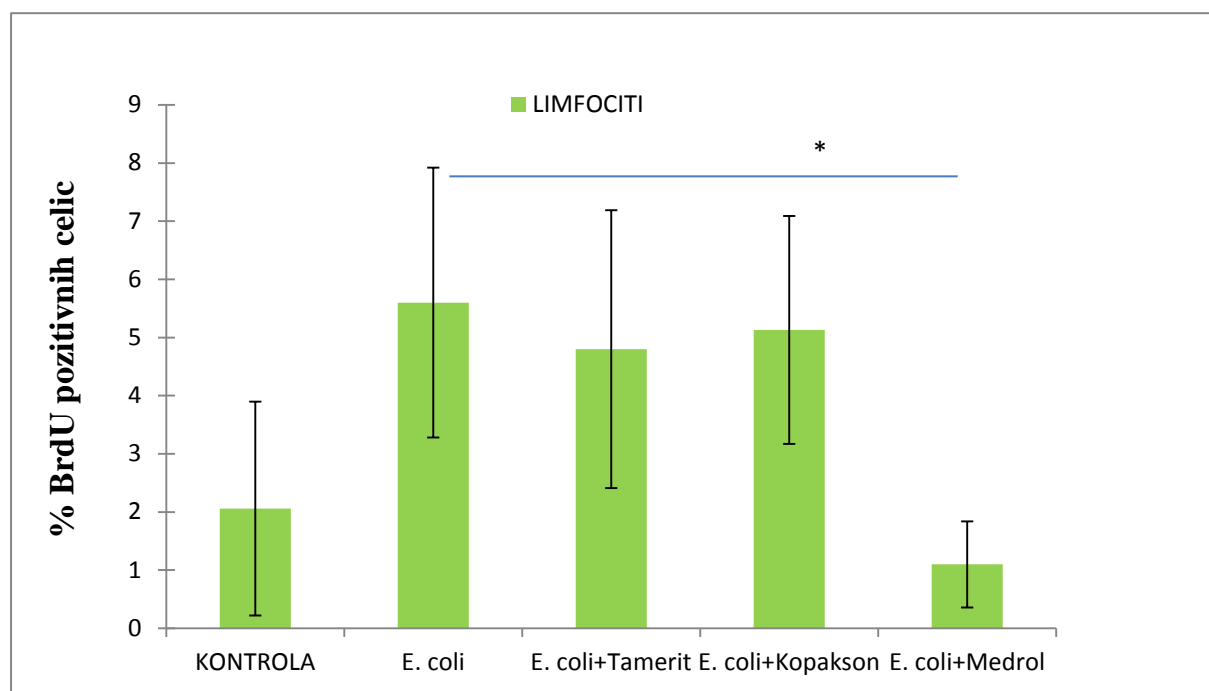
Slika 14: Vpliv molekul bakterijskih (lipopolisaharid) in glivnih sten (betaglukan) na proliferacijo limfocitov. Na sliki so prikazane srednje vrednosti in standardni odkloni za 10 vzorcev. % BrdU pozitivnih celic predstavlja delež limfocitov v populaciji, ki se aktivno delijo.

\*: Rezultati se statistično razlikujejo med seboj, kar smo potrdili z dvostranskimi t-testi, kjer smo preverjali razlike povprečij za dva odvisna vzorca, pri čemer je bila  $\alpha = 0,05$ .

Iz slike 14 vidimo, da pri spodbujanju limfocitov z *E. coli*, pride do povečane proliferacije limfocitov (~ 6 % BrdU pozitivnih celic) v primerjavi z negativno kontrolo, kjer je spontana proliferacija limfocitov nizka (~ 2 % BrdU pozitivnih celic). Rezultati se statistično razlikujejo med seboj, kar smo potrdili s t-testi. V drugem delu poskusa smo limfocite predhodno spodbudili z *E.coli* ter povečali njihovo proliferacijo, nato pa smo dodali še betaglukan, ter preverjali kako vpliva na predhodno spodbujene limfocite. Tu vidimo, da ni razlik v proliferaciji limfocitov med primerjavo proliferacije pri limfocitih spodbujenih samo z *E.coli* ter limfocitih, ki smo jih spodbudili z *E.coli* nato pa še z betaglukanom (~ 6 % BrdU pozitivnih celic, tako pri spodbujanju z *E. coli*, kot pri spodbujanju z *E.coli* skupaj z betaglukanom).

V tretji skupini so modulatorji imunskega odziva (zdravila metilprednizolon, natrijev nukleinat in glatiramer acetat), na katerega lahko delujejo spodbujevalno (povečajo proliferacijo) ali zaviralno (zmanjšajo proliferacijo). Pri tem smo izolirane mononuklearne celice predhodno spodbudili z *E.coli* ter jim nato dodali modulatorje v

ustrezni koncentraciji. Tako smo preverili njihov vpliv na predhodno stimulirane limfocite.



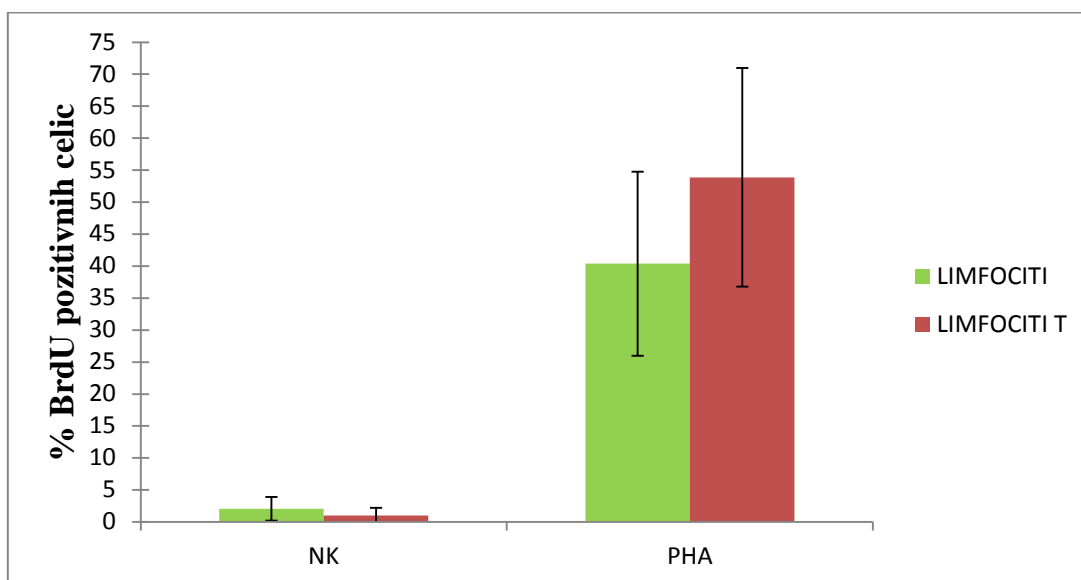
Slika 15: Vpliv znanih učinkovin (metilprednizolon (Medrol), natrijev nukleinat (Tamerit), glatiramer acetat (Kopakson)) na predhodno stimulirane limfocite z *E.coli*. Na sliki so prikazane srednje vrednosti in standardni odkloni. Število vzorcev je 10 pri spodbujanju z natrijevim nukleinatom in metilprednizolonom ter 8 pri spodbujanju z glatiramer acetatom. % BrdU pozitivnih celic predstavlja delež limfocitov v populaciji, ki se aktivno delijo.

\*: Rezultati se statistično razlikujejo med seboj, kar smo potrdili z dvostranskimi t-testi, kjer smo preverjali razlike povprečij za dva odvisna vzorca, pri čemer je bila  $\alpha = 0,05$ .

Iz slike 15 vidimo, da je proliferacija limfocitov predhodno spodbujenih z *E.coli* ter dodanim metilprednizolonom močno zmanjšana (~ 1 % BrdU pozitivnih celic), v primerjavi s proliferacijo limfocitov spodbujenih z *E. coli* (~ 6 % BrdU pozitivnih celic). Pri spodbujanju limfocitov z *E.coli* ter zdravi natrijev nukleinat (~ 5 % BrdU pozitivnih celic) in glatiramer acetat (~ 6 % BrdU pozitivnih celic) vidimo, da ni razlik v proliferaciji limfocitov v primerjavi s proliferacijo limfocitov spodbujenih samo z *E.coli* (~ 6 % BrdU pozitivnih celic).

#### 4.2 PRIMERJAVA SPODBUJANJA PROLIFERACIJE PRI RAZLIČNIH POPULACIJAH LIMFOCITOV

V poskusu smo preverjali tudi spodbujanje proliferacije pri različnih podvrstah limfocitov. Primerjali smo proliferativni odziv pri limfocitih T in limfocitih B po spodbujanju s fitohemaglutininom (PHA) ter brez dodanih spodbujevalcev (negativna kontrola). Proliferacijo smo določili s pomočjo vgrajenega BrdU, ki smo ga zaznali z uporabo fluorescentno označenih anti-BrdU protiteles. V tem poskusu smo določali deleže BrdU pozitivnih celic na celotni populaciji limfocitov, hkrati pa smo še z uporabo CD3+ APC protiteles označili samo limfocite T ter določali njihov proliferativni odziv.



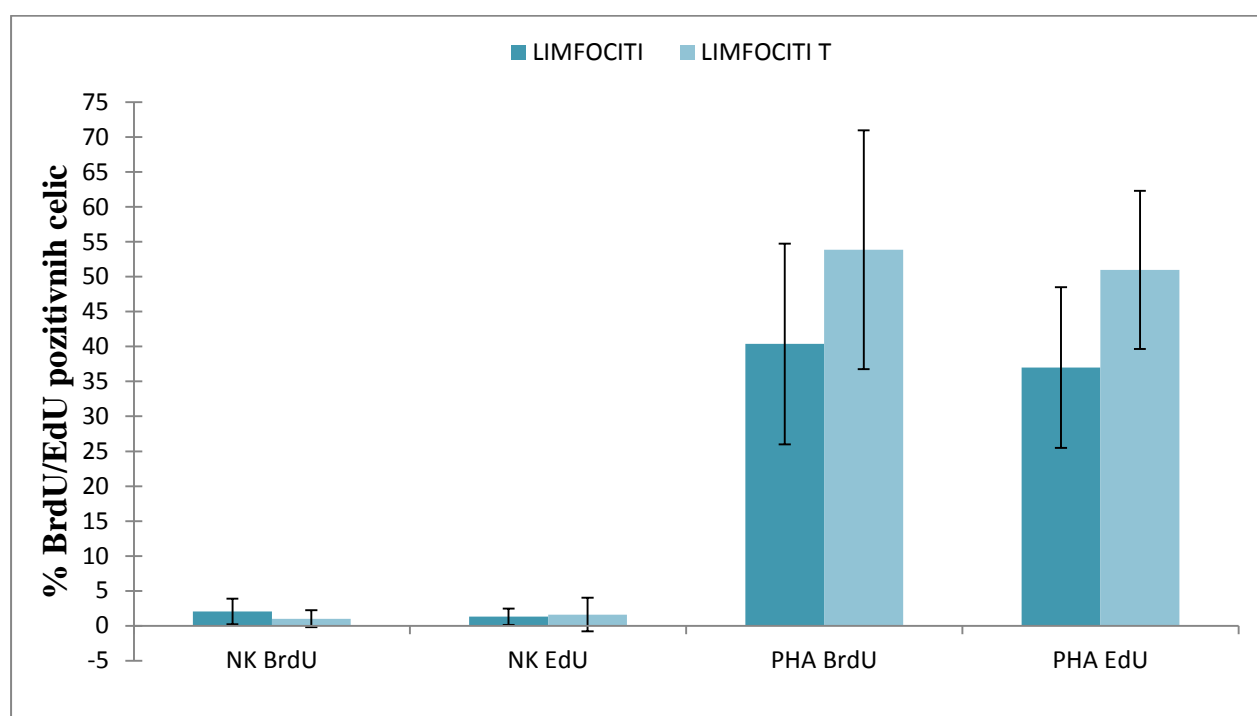
Slika 16: Proliferativni odziv pri različnih populacijah limfocitov po spodbujanju s fitohemaglutininom (PHA) ter brez uporabljenih spodbujevalcev (negativna kontrola - NK) z uporabo testa BrdU. Na sliki so prikazane srednje vrednosti in standardni odkloni za 16 vzorcev. % BrdU pozitivnih celic predstavlja delež limfocitov v populaciji, ki se aktivno delijo.

Iz slike 16 vidimo, da ni razlik v proliferaciji limfocitov merjeni na celotni populaciji limfocitov (~ 40 % BrdU pozitivnih celic) ter pri limfocitih T (~ 55 % BrdU pozitivnih celic), tako pri negativni kontroli, kakor tudi pri spodbujanju s PHA, kar smo potrdili tudi s t-testi.



#### 4.3 PRIMERJAVA DVEH TESTOV (test BrdU in EdU) ZA MERJENJE PROLIFERACIJE LIMFOCITOV PO SPODBUJANJU Z RAZLIČNIMI ANTIGENI

S temi poskusi, smo želeli primerjati uporabnost testa BrdU in Edu za zaznavanje proliferacije limfocitov, ter ju primerjati med seboj. Pri tem smo izolirane mononuklearne celice spodbudili s fitohemaglutininom ter merili delež BrdU oz. EdU pozitivnih celic. Hkrati smo imeli pri obeh testih tudi negativno kontrolo. Pri obeh testih smo merili delež deležih se limfocitov T in limfocitov B.



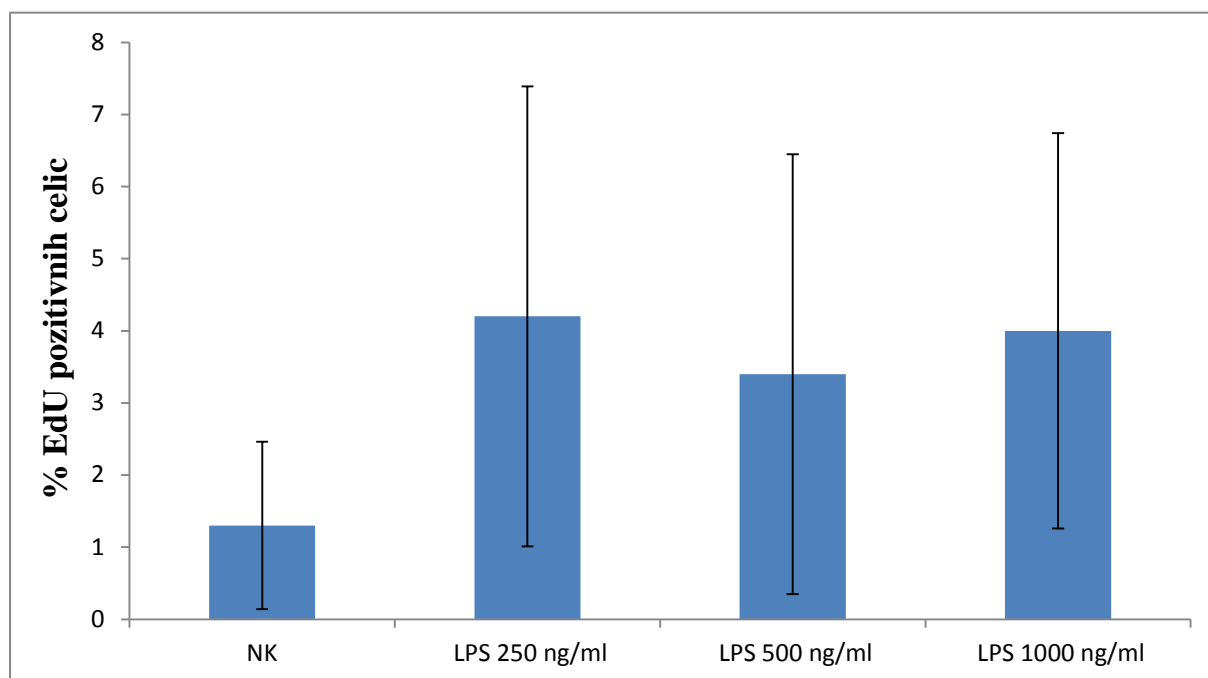
Slika 17: Primerjava testa BrdU ter Edu pri negativni kontroli (NK) ter pri spodbujanju s fitohemaglutininom (PHA) pri limfocitih T in limfocitih B. Na sliki so prikazane srednje vrednosti in standardni odkloni. Število vzorcev je 16 pri merjenju proliferacije limfocitov s testom BrdU (NK in spodbujanje s fitohemaglutininom) ter 10 pri merjenju proliferacije limfocitov s testom EdU (NK in spodbujanje s fitohemaglutininom). % BrdU/EdU pozitivnih celic predstavlja delež limfocitov v populaciji, ki se aktivno delijo.

Iz slike 17 vidimo, da med testoma BrdU in Edu, tako pri negativnih kontroli (< 5 % BrdU/EdU pozitivnih celic), kot tudi pri spodbujanju s fitohemaglutininom (~ 40 % BrdU/EdU pozitivnih celic) ni prisotnih razlik, kar smo potrdili s t-testi. Tudi pri posameznih podvrstah limfocitov, limfociti T, med testoma za merjenje proliferacije

limfocitov BrdU ter EdU ni prisotnih razlik (~ 55 % BrdU/EdU pozitivnih celic). S temi rezultati smo dokazali, da sta obe metodi primerni za merjenje proliferacije limfocitov po spodbujanju z različnimi antigeni.

#### 4.4 TITRACIJSKA KRIVULJA LPS

V poskusu smo želeli preveriti vpliv lipopolisaharida na proliferacijo limfocitov ter določiti katera koncentracija lipopolisaharida in čas inkubacije naših izoliranih celic nam da najvišji proliferativni odziv limfocitov na spodbujanje z lipopolisaharidom. V ta namen smo naredili titracijsko krivuljo za spodbujanje proliferacije limfocitov z lipopolisaharidom, kjer smo za spodbujanje limfocitov uporabili tri različne koncentracije lipopolisaharida: 250 ng/ml, 500 ng/ml ter 1000 ng/ml ter inkubirali različno dolgo (1 dan, 2 dni, 3 dni, 4 dni, 7 dni). Proliferacijo limfocitov po spodbujanju z lipopolisaharidom smo merili s testom Edu.



Slika 18: Vpliv lipopolisaharida (LPS) na proliferacijo limfocitov. Pri tem smo uporabili tri različne koncentracije LPS-a (250 ng/ml, 500 ng/ml ter 1000 ng/ml) ter inkubirali različno dolgo (1 dan, 2 dni, 3 dni, 4 dni in 7 dni). Na sliki je prikazan delež deležih limfocitov (% EdU pozitivnih celic) za 6 ponovitev.

Na sliki 18 vidimo, da ni statistično značilnih razlik v proliferaciji limfocitov po spodbujanju z lipopolisaharidom pri vseh uporabljenih koncentracijah lipopolisaharida (250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml) (~ 4 % EdU pozitivnih celic).

#### 4.5 NORMALNE VREDNOSTI

Za negativno kontrolo ter za spodbujevalce proliferacije limfocitov fitohemaglutinin, ionomicin skupaj s PMA in aktivirajoča protitelesa CD3+ skupaj s kostimulirajočimi protitelesi CD28+ smo izračunali normalne vrednosti proliferativnega odziva limfocitov zdravih krvodajalcev po spodbujanju in brez spodbujanja. Normalne vrednosti smo izračunali tako za test BrdU, kakor tudi za test EdU.

Preglednica 3: Normalne in srednje vrednosti proliferacije limfocitov (% BrdU pozitivnih celic) zdravih krvodajalcev: negativna kontrola (NK) ter pozitivna kontrola (spodbujevalci fitohemaglutinin, ionomicin skupaj s PMA ter CD3+ aktivirajoča protitelesa skupaj z CD28+ kostimulatornimi protitelesi) merjene s testom BrdU, tako pri limfocitih T, kot merjeni na celotni populaciji limfocitov.

	NK	NK (limT)	PHA	PHA (limT)	iono + PMA	CD3 + CD28
<b>SREDNJA VREDNOST</b> ( $\bar{x}$ )	2	1	40	54	54	68
<b>NORMALNE VREDNOSTI</b> ( $\bar{x} \pm SD$ )	0-4	0-2	26-57	37-71	35-72	51-85

Preglednica 4: Normalne in srednje vrednosti proliferacije limfocitov (% EdU pozitivnih celic) zdravih krvodajalcev: negativna kontrola (NK) ter pozitivna kontrola (spodbujevalec fitohemaglutinin) merjene s testom EdU, tako pri limfocitih T, kot merjeni na celotni populaciji limfocitov.

	NK	NK (limT)	PHA	PHA (limT)
<b>SREDNJA VREDNOST</b> ( $\bar{x}$ )	1	2	37	51
<b>NORMALNE VREDNOSTI</b> ( $\bar{x} \pm SD$ )	0-3	0-4	26-49	40-62

## 5 RAZPRAVA

Proliferacija celic imunskega sistema je ključna za pridobljeni imunski odziv. Zaznavanje celic, ki se delijo, je pomemben indikator aktivacije limfocitov, tako v pogojih *in vivo* kakor tudi v *in vitro* (Hodgkin in sod., 2005).

Test transformacije limfocitov, LTT, meri povečano proliferacijo limfocitov kot odgovor na antigen v pogojih *in vitro*, na podlagi česar nato sklepamo na predhodno izpostavljenost limfocitov določenim antigenom ali alergenom (Pichler in Tilch, 2004). LTT je *in vitro* test, ki temelji na dejstvu, da se limfociti, ki so bili izpostavljeni določenemu antigenu, pretvorijo v blastne celice in se po ponovni izpostavitvi enakemu antigenu delijo (Farris in sod., 2000).

Proliferacijo limfocitov določimo z merjenjem vgraditve nukleotida bromodeoksiuridina (BrdU), ki je analog timina v novo sintetizirano verigo DNA pri prehodu celic v S fazo celičnega cikla (Klein in sod., 2004). Vgrajeni BrdU nato zaznamo z uporabo specifičnih protiteles BrdU, ki so konjugirana s fluorokromi, po delni denaturaciji DNA ter analiziramo na pretočnem citometru (Hodgkin in sod., 2005). Prednosti te metode so, da je visoko občutljiva, hitra (nekaj ur) in enostavna za izvedbo ter omogoča boljše zaznavanje označene DNA (BrdU proliferation assay, 2007). Prednost testa za merjenje proliferacije limfocitov z uporabo BrdU je tudi v tem, da ga lahko združimo skupaj z ostalimi tehnikami merjenja s pretočnim citometrom. Tako lahko skupaj z merjenjem proliferativnega odziva limfocitov, merimo tudi izločanje citokinov ali pa označujemo določene markerje, ki se nahajajo na površini teh celic (Hodgkin in sod., 2005).

Namen našega dela je bila uvedba preiskave kvantifikacije proliferacije mononuklearnih celic, izoliranih iz periferne krvi. Želeli smo ovrednotiti uporabnost testa BrdU za merjenje proliferativnega odziva limfocitov po spodbujanju z različnim antigeni in mitogeni. Ta test se uporablja za oceno funkcije limfocitov (limfocite inkubiramo z mitogeni, kar inducira nespecifično transformacijo v blastne celice *in vitro*), kot tudi za dokazovanje preobčutljivosti bolnikov na zunanje antigene (infekcijske agense, alergene), ali na autoantigene (avtoimunske bolezni). Test BrdU je pomemben, saj se uporablja za diagnozo alergijskih obolenj povzročenih zaradi uporabe zdravil (alergije na zdravila).

Uporablja se tudi za določanje alergijskih obolenj pri posameznikih, ki so bili izpostavljeni določenim kovinam (zlatu (Au), amalgamu (Hg), niklju (Ni)). Predvsem je uporaben za določanje preobčutljivosti na berilij (Be) pri posameznikih. (Klein in sod., 2004; BrdU proliferation assay, 2007; Becton Dickinson, 2011). Uporablja se tudi v farmakologiji in onkologiji, kjer študiramo citostatični vpliv zdravila na celice. V tem primeru kombiniramo metodo BrdU z merjenjem celičnega cikla – DNA histogramom, ki nam poda informacijo o deležih celic, ki se nahajajo v različnih fazah celičnega cikla (G1, S, G2 in M). Za preučevanje citostatičnega vpliva zdravila na celice tako merimo histograme v različnih časovnih obdobjih. Test BrdU lahko uporabimo tudi za preučevanje tumorjev in vpliva različnih oblik zdravljenja na tumorske celice v *in vivo* živalskih modelih, kakor tudi pri ljudeh. Pri tem BrdU injiciramo v testne živali, kjer gojimo tumorje ter nato z biopsijo tkiva pridobimo tumorske celice, pri katerih nato zaznamo vgrajeni BrdU na enak način kot pri celicah, ki jih gojimo na mikrotiterskih ploščicah (Ormerod, 2008). Merjenje proliferacije limfocitov je tudi izredno pomembno pri prirojenih imunskih pomanjkljivostih, npr. CVID, kjer gre za okvaro celične imunosti. Klinična slika CVID se kaže kot hipogamaglobulinemija in različne stopnje okvare funkcije limfocitov T in makrofagov. Proliferacija limfocitov v odgovor na spodbujanje s T celičnimi mitogeni je pri prirojenih imunskih pomanjkljivostih (CVID) zmanjšana (Sutor in Fabel, 2000).

## 5.1 KONTROLE TESTA BrdU ZA MERJENJE PROLIFERACIJE LIMFOCITOV PO SPODBUJANJU Z RAZLIČNIMI ANTIGENI

V *in vitro* poskusu merjenja proliferacije limfocitov po spodbujanju z različnimi antigeni smo imeli več kontrol samega testa BrdU. Negativna kontrola so bile mononuklearne celice, ki smo jih gojili brez dodanih spodbujevalcev. Po določenem času inkubacije smo s pomočjo vgrajenega BrdU izmerili proliferacijo limfocitov. Ti rezultati nam povedo, kolikšna je proliferacija limfocitov brez dodanega spodbujevalca, torej koliko se limfociti delijo sami od sebe. V *in vitro* poskusu, smo dobili < 5 % BrdU pozitivnih celic pri merjenju proliferacije limfocitov brez dodanih spodbujevalcev (slika 13). S pomočjo negativne kontrole smo nato tudi določili meje na grafih vseh ostalih rezultatov, ki smo jih dobili pri merjenju s pretočnim citometrom. Tako smo določili delež limfocitov v populaciji, ki se aktivno delijo.

Poleg negativne kontrole smo imeli tudi kontrolo same metode merjenja proliferacije limfocitov s pomočjo testa BrdU. Ustrezno koncentracijo izoliranih PBMC smo inkubirali skupaj z ustrešno koncentracijo fitohemaglutinina kot spodbujevalca limfocitov, vendar zraven nismo dodali BrdU. Nato smo izvedli celoten postopek označevanje vgrajenega BrdU s pomočjo testa BrdU ter izmerili na pretočnem citometru. Pri tej kontroli smo dodali samo fluorescentno označena protitelesa anti-BrdU brez predhodnega BrdU. Tako smo preverili, ali se protitelesa anti-BrdU vežejo nespecifično še kam drugam. S tem izločimo lažno pozitivne rezultate v poskusu. Vrednosti, ki smo jih tu pričakovali morajo biti primerljive z negativno kontrolo oz. nizke. Vrednosti, ki smo jih dobili v poskusu so bile nizke (< 5 % BrdU pozitivnih celic), s čimer smo potrdili, da test BrdU dobro deluje.

## 5.2 SPODBUJANJE PROLIFERACIJE LIMFOCITOV Z RAZLIČNIMI SPODBUJEVALCI IN MODULATORJI

Spodbujanje limfocitov v pogojih *in vitro* se uporablja za določanje proliferativnega odziva limfocitov po spodbujanju z različnimi antigeni in mitogeni ter za proučevanje funkcije teh celic (Trickett in Kwan, 2003). To spodbujanje limfocitov je lahko poliklonsko, kjer gre za spodbujanje limfocitov neodvisno od antigena, ali specifično za določen antigen, kjer spodbujamo limfocite z določenimi antigeni (Hodgkin in sod., 2005).

V poskusu smo želeli preveriti, kako določene snovi vplivajo na proliferacijo limfocitov – celic imunskega sistema v pogojih *in vitro* in ovrednotiti primernost testa BrdU za merjenje proliferativnega odziva po spodbujanju z različnimi antigeni. V ta namen smo po izolaciji PBMC iz periferne krvi z mitogeni in specifičnimi antigeni spodbudili proliferacijo teh celic. Pri tem so se limfociti aktivirali in se začeli v pogojih *in vitro* hitro deliti (Trickett in Kwan, 2003). Na podlagi dobljenih rezultatov proliferacije limfocitov po spodbujanju z različnimi spodbujevalci in modulatorji imunskega odziva, smo le-te nato umestili v tri skupine glede na njihov vpliv na proliferacijo izoliranih limfocitov. V prvo skupino smo umestili znane učinkovine, za katere smo predvidevali, da po določeni časovni inkubaciji z limfociti povzročijo njihovo aktivacijo in s tem povečajo

proliferacijo teh celic. V to skupino spadajo mitogen fitohemaglutinin, bakterijski ionofor ionomicin skupaj s PMA ter aktivirajoča protitelesa CD3+ skupaj s kostimulatornimi protitelesi CD28+. Vse te snovi delujejo kot spodbujevalci proliferacije limfocitov in le-to povečajo. V drugo skupino smo umestili mikroba produkta bakterijskih (lipopolisaharid) in glivnih celičnih sten (betaglukan), kjer smo proučevali njun vpliv na proliferacijo izoliranih limfocitov. Tretjo skupino pa predstavljajo modulatorji imunskega odziva, na katerega lahko delujejo spodbujevalno in povečajo proliferacijo limfocitov, ali pa zaviralno in tako zmanjšajo proliferacijo teh celic. V to skupino smo umestili zdravila metilprednizolon (glukokortikosteroid), glatiramer acetat in natrijev nukleinat ter proučevali njihov vpliv na proliferacijo izoliranih limfocitov.

### **5.2.1 Spodbujevalci proliferacije limfocitov**

V poskusu smo v prvo skupino umestili tiste snovi, ki delujejo kot spodbujevalci imunskega odziva. Te snovi delujejo spodbujevalno na celice imunskega odziva, limfocite, tako, da jih aktivirajo in posledično povzročijo njihovo proliferacijo. V to skupino spadajo mitogen fitohemaglutinin, bakterijski ionofor ionomicin skupaj s PMA ter aktivatorna protitelesa CD3+ skupaj s kostimulatornimi protitelesi CD28+. Po končanem spodbujanju limfocitov z znanimi učinkovinami smo z uporabo testa BrdU skupaj s pretočno citometrijo določili deleže deležih se limfocitov v populaciji. Te vrednosti smo primerjali z negativno kontrolo, ki nam pove kolikšna je proliferacija limfocitov brez dodanih spodbujevalcev. Rezulate smo statistično predstavili na stolpičastem grafikonu (slika 13).

Na sliki 13 vidimo, da vsi spodbujevalci (fitohemaglutinin, ionomicin skupaj s PMA ter aktivatorna protitelesa CD3+ skupaj s kostimulatornimi protitelesi CD28+) pozitivno vplivajo na proliferacijo limfocitov in jo spodbujajo.

Največji proliferativni odziv spodbujanja limfocitov je bil pri inkubaciji limfocitov z aktivatornimi protitelesi CD3+ skupaj s kostimulatornimi protitelesi CD28+ (~ 70 % BrdU pozitivnih celic). Naši rezultati so bili v skladu z našo hipotezo, saj je dokazano je, da sta za aktivacijo in proliferacijo limfocitov T potrebna dva signala; začetni aktivacijski

signal zagotavljajo protitelesa CD3+, ki se vežejo na T celični receptor, glikoprotein CD28+ pa zagotavlja kostimulatorni signal (Song in sod., 2008; Ihan, 2002b).

Drugi največji proliferativni odziv limfocitov smo dobili pri spodbujanju teh celic z bakterijskim ionoforom ionomicinom skupaj s PMA (~ 55 % BrdU pozitivnih celic), ki se pogosto uporablja za spodbujanju proliferacije limfocitov (Baran in sod., 2000). Liu in Hermann (1978), sta dokazala, da ionomicin deluje kot ionofor za kalcij in povzroči povišanje koncentracije kalcija znotraj celice, kar povzroči aktivacijo limfocitov in njihovo proliferacijo, kar je v skladu z dobljenimi rezultati.

Tudi mitogen fitohemaglutinin, ki deluje nespecifično na limfocite T in limfocite B ter povzroči njihovo aktivacijo in spodbuja proliferacijo teh celic, je povzročil povečano proliferacijo limfocitov (Klein in sod., 2004). V primerjavi proliferacije limfocitov po spodbujanju z ionomicinom skupaj s PMA ter protitelesi CD3+ skupaj s protitelesi CD28+, smo pri spodbujanju proliferacije limfocitov s fitohemaglutininom dobili najnižji proliferativni odziv teh celic (~ 45 % BrdU pozitivnih celic).

Z rezultati, ki smo jih dobili v poskusu, smo tako potrdili hipotezo, da fitohemaglutinin, ionomicin skupaj s PMA ter aktivatorna protitelesa CD3+ skupaj s kostimulatornimi protitelesi CD28+ aktivirajo limfocite in spodbujajo njihovo proliferacijo. Vse te snovi, tako lahko uporabimo kot pozitivne kontrole pri vpeljavi metode merjenja proliferacije limfocitov s testom BrdU.

Na podlagi rezultatov meritev proliferacije limfocitov po spodbujanju s fitohemaglutininom, ionomicinom skupaj s PMA ter protitelesi CD3+ skupaj s protitelesi CD28+, kakor tudi za negativno kontrolo, smo izračunali tudi normalne vrednosti proliferativnega odziva limfocitov zdravih krvodajalcev po spodbujanju in brez spodbujanja. Normalne vrednosti smo izračunali tako za test BrdU (preglednica 3), kakor tudi za test EdU (preglednica 4).



### 5.2.2 Vpliv mikrobnih produktov na proliferacijo limfocitov

Nadalje smo želeli preveriti vpliv molekul bakterijskih (lipopolisaharid) in glivnih celičnih sten (betaglukan) na proliferacijo limfocitov. Postavljena hipoteza je bila, da lipopolisaharid pozitivno vpliva na limfocite ter spodbuja njihovo proliferacijo.

V poskusu smo sprva za spodbujanje proliferacije limfocitov uporabili komercialno dostopni lipopolisaharid izoliran iz celične kulture bakterije *E. coli*. Pri uporabi izoliranega lipopolisaharida nismo dobili statistično značilnih razlik v primerjavi z negativno kontrolo (slika 18), zato smo se odločili, da za spodbujanje proliferacije limfocitov uporabimo inaktivirano kulturo *E. coli* v ustrezni koncentraciji ( $1 \times 10^6$  CFU/ml). Pri tem smo bakterijsko kulturo inaktivirali s toploto – kuhanje 30 minut na 100 °C, saj bi nam bakterije v nasprotnem primeru prerasle naše PBMC, ki rastejo počasneje. Haller in sod. (2000), so v svojem poskusu, kjer so kulturi PBMC dodali inaktivirano kulturo bakterije *E. coli* s koncentracijo 1 µg/ml skupaj z antibiotikom (Gentamicin) ter inkubirali 3 in 5 dni ter nato izmerili proliferativni odziv celic z metodo vgrajevanja radioaktivno označenega [<sup>3</sup>H] - timidina tekom podvojevanja DNK, ugotovili, da LPS povzroči povečano proliferacijo PBMC, ki je najvišja po petih dneh spodbujanja.

Rezultati spodbujanja proliferacije limfocitov z inaktivirano kulturo bakterije *E. coli*, so bili v skladu s pričakovanji, saj je bila proliferacija limfocitov po spodbujanju z *E. coli* večja, kot pri negativni kontroli, kjer limfocitov nismo spodbujali (~ 6 % BrdU pozitivnih celic) (slika 14). Tako smo potrdili hipotezo, da lipopolisaharid, ki je glavna sestavina zunanje membrane celične stene po Gramu negativnih bakterij, pozitivno vpliva na limfocite in spodbuja njihovo proliferacijo tako, da povzroči poliklonsko aktivacijo celic B ter limfocitov T (Tough in sod., 1997; Ulmer in sod., 2000).

Zanimivo je tudi odkritje Ulmer in sod. (2000), da so predpogoj za stimulacijo limfocitov T z molekulami lipopolisaharida, poleg monocitov potrebne tudi CD34+ hematopoetske matične celice, ki jih v majhni količini najdemo v periferni krvi pri ljudeh. Aktivacija limfocitov T z molekulami lipopolisaharida tako predstavlja nov in edinstven mehanizem aktivacije celic T, ki se razlikuje od ostalih mehanizmov, ki jih povzročajo mitogeni, superantigeni ter navadni antigeni.

Nadalje smo v *in vitro* poskusu merili vpliv molekul glivnih sten (betaglukan) na proliferacijo limfocitov. Pri merjenju proliferacije limfocitov po spodbujanju z betaglukanom smo merili vpliv betaglukanu kot modulatorja imunskega odziva. Modulatorji lahko delujejo kot spodbujevalci imunskega odziva ter povečajo proliferacijo limfocitov, ali pa delujejo kot zaviralci imunskega odziva in proliferacijo limfocitov zmanjšajo. Limfocite smo tako predhodno inkubirali z *E.coli* ter tako povzročili njihovo proliferacijo. Po eni uri pa smo tako spodbujenim celicam dodali še betaglukan.

Na sliki 14 vidimo, da ni statistično značilnih razlik v proliferaciji limfocitov, ki smo jih spodbudili samo z *E.coli* (~ 6 % BrdU pozitivnih celic) ter proliferaciji limfocitov, ki smo jih predhodno spodbudili z *E.coli* nato pa dodali še betaglukan (~ 6 % BrdU pozitivnih celic). Rezultati tako ne potrjujejo postavljene hipoteze, saj smo pričakovali, da bo betaglukan deloval protivnetno na celice imunskega sistema in posledično zmanjšal spodbujeno proliferacijo limfocitov, kajti znano je, da imajo betaglukanu imunomodulatorne lastnosti ter delujejo kot spodbujevalci celične imunosti. Na podlagi različnih študij modulatornih učinkov betaglukanov na predhodno spodbujenih celicah z molekulo LPS, so ugotovili, da spodbujanje PBMC z betaglukanu v pogojih *in vitro*, poveča proizvodnjo vnetnih citokinov spodbujenih z molekulo LPS ter povzroči aktivacijo makrofagov (Vetvicka in Vetvickova, 2011; Stopinšek in sod., 2011).

### 5.2.3 Modulatorji imunskega odziva

V tretjo skupino smo umestili snovi, ki delujejo kot modulatorji imunskega odziva. Snovi, ki delujejo kot modulatorji imunskega odziva lahko povečajo proliferacijo limfocitov ali pa jo zmanjšajo. V to skupino smo umestili zdravila natrijev nukleinat, glatiramer acetat in metilprednizolon. Pred uporabo modulatorjev smo limfocite predhodno spodbudili z *E.coli* in tako preverjali njihov vpliv na predhodno stimulirane limfocite. S tem smo želeli sklepati na mehanizem delovanja mikrobnih produktov na tarčne limfocite ter preveriti ali modulatorji delujejo spodbujevalno na proliferacijo ali pa jo zavirajo.

Na sliki 15 vidimo, da je prišlo do zmanjšanja proliferacije predhodno spodbujenih limfocitov z *E.coli* samo pri uporabi glukokortikosteroida metilprednizolona (~ 1 % BrdU pozitivnih celic), za katerega je znano, da ima imunosupresivne in protivnetne lastnosti.

Hodge in sod. (1999) so dokazali, da metiprednizolon deluje zaviralno na limfocite T, monocite ter naravne celice ubijalke, tako da zmanjša izločanje citokinov ter mediatorjev vnetja.

Pri uporabi glatiramer acetata (~ 6 % BrdU pozitivnih celic) in natrijevega nukleinata (~ 5 % BrdU pozitivnih celic) kot modulatorjev imunskega odziva nismo dobili statistično značilnih razlik v proliferaciji predhodno spodbujenih limfocitov z *E.coli*, če ju primerjamo s proliferacijo limfocitov spodbujenih samo z *E. coli* (~ 6 % BrdU pozitivnih celic).

Pričakovali smo, da bo glatiramer acetat zmanjšal proliferacijo predhodno spodbujenih limfocitov z *E. coli*, saj je znano, da glatiramer acetat moti zaznavanje antigenov in uravnava izločanje citokinov s strani limfocitov T na od antigena specifičen način (Schmidt in sod., 2002). Schmidt in sod. (2002) so dokazali, da glatiramer acetat uravnava proliferativni odziv in izločanje citokinov pri PBMC izoliranih iz periferne krvi zdravih posameznikov, ki so jih predhodno spodbujali s fitohemaglutininom in stafilokoknim enterotoksinom B – od antigena neodvisno spodbujanje. Proliferacijo limfocitov so merili z metodo BrdU. Ugotovili so, da glatiramer acetat zmanjša proliferacijo limfocitov T sproženo s superantigenom in mitogenom v odvisnosti od uporabljene količine zdravila.

Tudi pri uporabi natrijevega nukleinata kod modulatorja imunskega odziva pri predhodno spodbujenih limfocitih z *E.coli* smo pričakovali, da bo prišlo do zmanjšanja proliferacije limfocitov v primerjavi s proliferacijo limfocitov spodbujenih samo z *E. coli*. Jukić in sod. (2011) so s poskusi na ljudeh ugotovili, da natrijev nukleinat zmanjša število vnetnih citokinov pri predhodno spodbujenih mononuklearnih celic z lipopolisaharidom. Nikitin in sod (2004), pa so v svojem poskusu pokazali, da natrijev nukleinat uravnava sintezo citokinov s strani makrofagov, ki so bili predhodno spodbujeni z lipopolisaharidom in jo zmanjša.

### 5.3 PRIMERJAVA SPODBUJANJA PROLIFERACIJE PRI RAZLIČNIH PODVRSTAH LIMFOCITOV

Nadalje smo v našem poskusu želeli primerjati spodbujanje proliferacije pri posameznih podvrstah limfocitov. V ta namen smo limfocite T ločili od celotne populacije limfocitov z uporabo CD3 APC, ki smo jih dodali kulturi naših celic. Spodbujanje proliferacije pri različnih podvrstah limfocitov smo primerjali pri spodbujanju proliferacije z mitogenom fitohemaglutininom ter brez spodbujanja (negativna kontrola).

Na sliki 16 vidimo, da ni statistično značilnih razlik pri merjenju proliferacije pri različnih podvrstah limfocitov po spodbujanju s fitohemaglutininom (limfociti: ~ 45 % BrdU pozitivnih celic; limfociti T: ~ 55 % BrdU pozitivnih celic) in brez spodbujanja (negativna kontrola) (< 5 % BrdU pozitivnih celic tako na celotni populaciji limfocitov, kot pri limfocitih T). Proliferacija merjena pri posebej označenih limfocitih T je bila enaka kot proliferacija merjena na celotni populaciji limfocitov. Spodbujevalci proliferacije limfocitov, ki smo jih uporabili v *in vitro* poskusu, imajo tako največji učinek na aktivacijo limfocitov T ter posledično tudi na njihovo proliferacijo.

### 5.4 PRIMERJAVA TESTA BrdU IN EdU ZA MERJENJE PROLIFERACIJE LIMFOCITOV PO SPODBUJANJU Z RAZLIČNIMI ANTIGENI

V poskusu smo želeli tudi preveriti primerljivost dveh testov, ki se uporabljata za merjenje proliferacije po spodbujanju z različnimi antigeni. V ta namen smo izolirane PBMC spodbudili s fitohemaglutininom, ki je mitogen in se uporablja kot pozitivna kontrola, saj spodbudi in močno poveča proliferacijo limfocitov (Klein in sod., 2004). Poleg spodbujanja s fitohemaglutininom smo imeli tudi negativno kontrolo, ki predstavlja izolirane PBMC brez dodanih spodbujevalcev. Proliferacijo limfocitov smo merili pri različnih podvrstah limfocitov, tako z uporabo testa BrdU, kakor tudi z uporabo testa EdU.

Test Click-iT<sup>®</sup> EdU je novejša alternativa testa BrdU. 5-etinil-2'-deoksiuridin (EdU) je nukleozidni analog timina, ki se vgradi v DNA tekom aktivnega podvojevanja dvoverižne DNA. Zaznavanje vgrajenega EdU temelji na kovalentni reakciji katalizirani s bakrom med azidom in alkinom. Alkin najdemo v molekuli etinila, ki se nahaja na EdU, azid pa je

vezan na fluorokrom. Vgrajeni EdU nato izmerimo na pretočnem citometru (Invitrogen™, 2011).

Prednosti testa Click-iT® EdU so, da že majhna količina azidnega barvila omogoča učinkovito detekcijo vgrajenega EdU z uporabo milih pogojev. Standardna fiksacija na osnovi aldehida in permeabilizacija membrane z uporabo detergenta sta zadostni za vstop detekcijskega reagenta v celice in dostop do DNA. V nasprotju s testom EdU, je pri testu BrdU potrebna denaturacija dvoverižne DNA z uporabo kisline, toplote ali razgradnjo z DNazo, za izpostavljenje vgrajenega BrdU, katerega zaznamo z uporabo detekcijskih protiteles anti-BrdU konjugiranih s fluorokromi. Test Edu lahko tudi združimo z uporabo protiteles proti antigenom, ki se nahajajo na površini celic ali proti znotrajceličnim markerjem (Invitrogen™, 2011).

V poskusu smo z uporabo dveh različnih testov (BrdU in EdU) za merjenje proliferacije limfocitov po spodbujanju z različnimi antigeni dokazali, da med testoma ni statistično značilnih razlik, tudi pri posameznih podvrstah limfocitov ne (~ 55 % BrdU/EdU pozitivnih celic) (slika 17). Vrednosti, ki smo jih dobili v poskusu, so bile primerljive med testom EdU ter BrdU, tako pri negativni kontroli (< 5 % BrdU/EdU pozitivnih celic), kot tudi pri spodbujanju s fitohemaglutininom (~ 40 % BrdU/EdU pozitivnih celic). Dokazali smo, da sta oba testa enako specifična in primerna za merjenje proliferacije limfocitov po spodbujanju z mitogeni in različnimi antigeni.

## 6 SKLEPI

V *in vitro* poskusu merjenja proliferacije mononuklearnih celic izoliranih iz periferne krvi z testom BrdU smo dokazali:

- Da je metoda BrdU primerna in dovolj občutljiva za merjenje proliferacije limfocitov po spodbujanju z različnimi antigeni in mitogeni.
- Fitohemaglutinin, ionomicin skupaj s PMA ter aktivatorna protitelesa CD3+ skupaj s kostimulatornimi protitelesi CD28+, močno spodbudijo proliferacijo limfocitov ter se tako lahko uporabljajo kot pozitivna kontrola pri merjenju proliferacije limfocitov s testom BrdU.
- Lipopolisaharid spodbudi proliferacijo limfocitov, ki je v primerjavi z negativno kontrolo višja. Tako smo dokazali, da LPS pozitivno vpliva na limfocite in povzroči njihovo proliferacijo.
- Betaglukan nima vpliva na proliferacijo predhodno spodbujenih limfocitov z *E. coli* oz. je ta metoda merjenja proliferacije s testom BrdU premalo občutljiva za merjenje proliferacije po spodbujanju limfocitov z betaglukanom.
- Zdravili natrijev nukleinat in glatiramer acetat nimata vpliva na proliferacijo limfocitov, ki smo jih predhodno spodbudili z *E. coli*.
- Metilprednololon močno zniža proliferacijo pri predhodno spodbujenih limfocitih z *E. coli* ter bi ga tako lahko uporabili kot negativno kontrolo pri merjenju proliferacije limfocitov po spodbujanju z različnimi antigeni s testom BrdU.
- Spodbujevalci, ki smo jih uporabili v *in vitro* poskusu imajo največji vpliv na proliferacijo limfocitov T.
- Oba testa, ki se uporabljata za merjenje proliferativnega odziva limfocitov, BrdU in EdU, sta enako specifična in primerna za merjenje proliferacije limfocitov po spodbujanju z različnimi antigeni in mitogeni.

## 7 POVZETEK

Imunski sistem sestavljajo različni organi, celice in molekule, ki so odgovorni za vzdrževanje homeostaze človeškega telesa. Delimo ga na prirojeni in pridobljeni imunski odziv. Prirojeni imunski odziv deluje v povezavi z pridobljeno imunostjo in tako predstavlja prvo obrambno linijo organizma pred vdorom tujkov. Njegovi mehanizmi vključujejo fizične, kemične in biološke bariere, kakor tudi celične komponente ter topne molekule (Junior in sod., 2010).

Proliferacija celic imunskega sistema je ključna za pridobljeni imunski odziv. Zaznavanje celic, ki se delijo, je tako pomemben indikator aktivacije limfocitov tako v pogojih *in vivo* kakor tudi v *in vitro* (Hodgking in sod., 2005). Proliferacijo limfocitov po spodbujanju z različnimi mitogeni in antigeni v pogojih *in vitro* zaznamo s testom proliferacije limfocitov (LPT) oz. testom transformacije limfocitov (LTT), na podlagi česar nato sklepamo na predhodno izpostavljenost limfocitov določenim antigenom ali alergenom (Pichler in Tilch, 2004; Klein in sod., 2004). LTT je *in vitro* test, ki temelji na dejstvu, da se limfociti, ki so prišli v stik z določenim antigenom, ki povzroči njihovo aktivacijo, preoblikujejo v blastne celice in ponovno proliferirajo, ko pridejo v stik z enakim antigenom (Klein in sod., 2004). Proliferacijo limfocitov merimo z zaznavanjem podvojevanja DNA v celicah, ki temelji na vgraditvi označenih prekurzorjev DNA ( $[^3\text{H}]$ -timidin ali bromodeoskiuridin (BrdU)) v celično DNA tekom S faze celičnega cikla. Označeni prekurzorji DNA, se dodajo kultiviranim celicam tekom njihove delitve. Po inkubaciji sledi njihova kvantifikacija (Salic in Michison, 2008).

V *in vitro* poskusu smo tako želeli ovrednotiti preiskavo kvantifikacije proliferacije limfocitov izoliranih iz periferne krvi. V ta namen smo raziskovali test BrdU in njegovo primernost za merjenje proliferacije limfocitov po spodbujanju z različnimi mitogeni in antigeni. Ta metoda imunofluorescentnega označevanja vgrajenega BrdU s pomočjo fluorescentno označenih protiteles anti-BrdU skupaj s pretočno citometrijo nam zagotavlja tehniko visoke ločljivosti za določitev frekvence in narave posamezne celice, ki aktivno sintetizira DNA (Becton Dickinson, 2011).

Dokazali smo, da je metoda primerna za merjenje proliferacije limfocitov po spodbujanju z različnimi antigeni. S kontrolnimi poskusi z znanimi učinkovinami, kot so fitohemaglutinin, ionomicin skupaj s PMA ter CD3+ (aktivirajoča protitelesa) skupaj z CD28+ (kostimulatorna protitelesa) smo dokazali, da test BrdU dobro deluje, saj je bila proliferacija po spodbujanju s temi snovmi v skladu z našimi pričakovanji ter smo jo s testom BrdU lahko zaznali. Proliferacija po spodbujanju s PHA, ionomicinom skupaj s PMA ter protitelesi CD3+ skupaj s protitelesi CD28+ je bila močno spodbujena in tako bi spodbujanje s temi snovmi lahko uporabili kot pozitivne kontrole pri merjenju proliferacije limfocitov s testom BrdU.

Z uporabo testa BrdU smo dokazali tudi, da lipopolisaharid spodbudi proliferacijo limfocitov, torej jih aktivira. Pri spodbujanju predhodno spodbujenih limfocitov z *E.coli* ter nato dodanim betaglukanom pa nismo zaznali nobenih razlik v proliferaciji limfocitov v primerjavi s spodbujanjem limfocitov samo z *E.coli*. Tako smo dokazali, da lipopolisaharid vpliva na limfocite in jih aktivira ter povzroči njihovo proliferacijo, medtem ko betaglukan nima vpliva na proliferacijo teh celic oz. njegovega vpliva na limfocite ne moremo zaznati s testom BrdU.

Pri modulatorjih imunskega odziva (zdravila natrijev nukleinat, glatiramer acetat in metilprednizolon) smo zaznali razlike v proliferaciji predhodno spodbujenih limfocitov z *E.coli* samo pri metilprednizolonu, ki je močno znižal proliferacijo limfocitov. Metiprednizolon bi tako lahko uporabili kot negativno kontrolo pri merjenju proliferacije limfocitov kot odgovor na različne antigene s testom BrdU.

Primerjali smo tudi dva testa, ki se uporabljata za merjenje proliferacije limfocitov po spodbujanju z različnimi antigeni. To sta testa BrdU in Edu, ki je alternativa testu BrdU. Dokazali smo, da med njima ni razlik v merjenju proliferacije limfocitov po spodbujanju s fitohemaglutininom. Tako sta oba testa enako primerna in specifična za merjenje proliferacije teh celic po spodbujanju z različnimi antigeni in mitogeni.



## 8 VIRI

Abolhassani H., Torabi-Sagvand B., Shokuhtar T., Mirminachi B., Rezaei N., Aghamohammadi A. 2013. A review on guidelines for management and treatment of common variable immunodeficiency. *Expert Review of Clinical Immunology*, 9: 561-575

AHFS. 2013. Methylprednisolone oral. Bethesda, AHFS – American Society of Health-System Pharmacists: 2 str.

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a682795.html> (12. okt. 2013)

Baran J., Kowalczyk D., Ozog M, Zembala M. 2001. Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8, 2: 303-312

Becton Dickinson. 2005. BD FACSCanto™ flow cytometer. San Jose, Becton, Dickinson and Company: 12 str.

Becton Dickinson. 2011. BD Pharmingen™ BrdU flow kits: Instruction manual. San Jose, Becton, Dickinson and Company: 40 str. (Navodilo za uporabo)

BrdU proliferation assay. 2007. Darmstadt, Calbiochem: 7 str. (Navodilo za uporabo)

Cuddapah S., Barski A., Zhao K. 2010. Epigenomics of T cell activation, differentiation and memory. *Current Opinion in Immunology*, 22: 341-347

Dolbeare F., Selden J. R. 2009. Immunochemical quantitation of bromodeoxyuridine: application to cell-cycle kinetics. V: *Essential cytometry methods*. Darzynkiewicz Z., Robinson J. P., Roeder M (eds.). Oxford, Elsevier: 331-351

Farina C., Bergh F. T., Albrecht H., Meinel E., Yassouridis A., Neuhaus O., Hohlfeld R. 2001. Treatment of multiple sclerosis with Copaxone (COP). *Brain*, 124: 705-719

Farris G. M., Newman L. S., Frome E. L., Shou Y., Barker E., Habbersett R. C., Maier L., Smith H. N., Marrone B. L. 2000. Detection of beryllium sensitivity using a flow cytometric lymphocyte proliferation test: the immuno-Be-LPT. *Toxicology*, 143: 125-140

Goldsworthy T. L., Butterworth B. E., Maronpot R. R. 1993. Concepts, labeling procedures and design of cell proliferation studies relating to carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 101: 59-66

Haller D., Blum S., Bode C., Hammes W. P., Schiffrin E. J. 2000. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria *in vitro*: evidence of NK cells as primary targets. *Infection and Immunity*, 68, 2: 752-759

Hodge S., Hodge G., Flower R., Han P. 1999. Methyl-prednisolone up-regulates monocyte Interleukin-10 production in stimulated whole blood. *Scandinavian Journal of Immunology*, 49: 548-553

Hodgkin P. D., Hawkins E. D., Hasbold J., Gett A. V., Deenick E. K., Todd H. F., Hommel M. 2005. Monitoring T cell proliferation. V: Analyzing T cell responses. Nagorsen D., Marincola F.M. (eds.). Heidelberg, Springer: 123-141

Ifko M. 2011. Preživetje človeških matičnih celic v vzorcu shranjene popkovnične krvi. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 69 str.

Ihan A. 2002a. Bakterijska celica. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 3-15

Ihan A. 2002b. Pridobljena (specifična) imunost. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 105-124

Ihan A., Kopitar A. N. 2010. Imunski sistem – celice in tkiva. V: Imunološki priročnik. Kotnik V. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 73-103

Invitrogen<sup>TM</sup>. 2011. Click-iT EdU flow cytometry assay kits. Carlsbad, Life Technologies Corporation: 10 str. (Navodilo za uporabo)

Jukić T., Abidov M., Ihan A. 2011. A tetrahydrophthalazine derivative «sodium nucleinate» exerts a potent suppressive effect upon LPS-stimulated mononuclear cells *in vitro* and *in vivo*. Collegium Antropologicum, 35, 4: 1219-1223

Junior D. M., Pereira-Araujo J. A., Catelan T. T. T., Silva de Souza A. W., Cruvinel W. M., Coelho-Andrade L. E., Pereira da Silva N. 2010. Immune system - part II basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. Rheumatology, 50: 552-580

Klein R., Schwenk M., Heinrich-Ramm R., Templeton D. M. 2004. Diagnostic relevance of the lymphocyte transformation test for sensitization to beryllium and other metals. Pure and Applied Chemistry, 76, 6: 1269-1281

Koren S. 2002. Bakterijski toksini. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 75-88

Liu C., Hermann T. E. 1978. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. Journal of Biological Chemistry, 253, 17: 5892-5894

Nikitin A. A., Abidov M. T., Kovalevskaya E. O., Kalyuzhin O. V. 2004. Search for potent modulators of cytokine production by macrophages. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 3: 259-261

Nunez R. 2001. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Current Issues in Molecular Biology*, 3: 67-70

Ormerod M.G. 2008. *Flow cytometry: A basic introduction*. Privately published: 126 str.

Pichler W. J., Tilch J. 2004. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy*, 59: 809-820

Podjasek J. C., Abraham R. S. 2012. Autoimmune cytopenias in common variable immunodeficiency. *Frontiers in Immunology*, 3: 189, doi: 10.3389/fimmu.2012.00189: 7 str.

Salic A., Mitchison T. J. 2008. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 7: 2415-2420

Salzer U., Warnatz K., Hartmut-Peter H. 2012. Common variable immunodeficiency - an update. *Arthritis Research and Therapy*, 14: 223, doi: 10.1186/ar4032: 11 str.

Schmid I., Hausner M. A., Cole S. W., Uittenbogaart C. H., Giorgi J. V., Jamieson B. D. 2001. Simultaneous flow cytometric measurement of viability and lymphocyte subset proliferation. *Journal of Immunological Methods*, 247: 175-186

Schmidt S., Balzer S., Nüllen C., Schmidt M., Pohl C., von Rücker A., Klockgether T. 2002. Immunomodulatory effects of glatiramer acetate on superantigen- and mitogen-induced T-cell stimulation *in vitro*. *Multiple Sclerosis*, 8: 307-309

Song J., Lei F. T., Xiong X., Haque R. 2008. Intracellular signals of T cell costimulation. *Cellular and Molecular Immunology*, 5, 4: 239-245

- Stopinšek S., Ihan A., Wraber B., Terčelj M., Salobir B., Rylander R., Simčič S. 2011. Fungal cell wall agents suppress the innate inflammatory cytokine responses of human peripheral blood mononuclear cells challenged with lipopolysaccharide *in vitro*. *International Immunopharmacology*, 11: 939-947
- Sutor G. C., Fabel H. 2000. Sarcoidosis and common variable immunodeficiency. *Respiration*, 67: 204-208
- Trickett A., Kwan Y.L. 2003. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of Immunological Methods*, 275: 251-255
- Tough D. F., Sun S., Sprent J. 1997. T cell stimulation *in vivo* by lipopolysaccharide (LPS). *Journal of Experimental Medicine*, 185, 12: 2089-2094
- Ulmer A. J., Flad H. D., Rietschel T. Mettern T. 2000. Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS). *Toxicology*, 152: 37-45
- van der Wath R. C., Lio P. 2008. A stochastic single cell based model of BrdU measured hematopoietic stem cell kinetics. V: *Computational methods in system biology*. Heiner M., Uhrmacher A.M. (eds.). Heidelberg, Springer: 387-401
- Vetvicka V., Vetvickova J. 2011.  $\beta(1-3)$ -D-glucan affects adipogenesis, wound healing and inflammation. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 11: 169-175
- Vozelj M. 2000. *Temelji imunologije*. Ljubljana, DZS: 552 str.
- Weber M. S., Starck M., Wagenpfeil S., Meinel E., Hohlfeld R., Farina C. 2004. Multiple sclerosis: glatiramer acetate inhibits monocyte reactivity *in vitro* and *in vivo*. *Brain*, 127: 1370-1378

Wells A. D., Gudmundsdottir H., Turka L. A. 1997. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. *Journal of Clinical Investigation*, 100, 12: 3173-3183

Wiesemann E., Klatt J., Wenzel C., Heidenreich F., Windhagen A. 2003. Correlation of serum IL-13 and IL-5 levels with clinical response to glatiramer acetate in patients with multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 133: 454-460

Zilman A., Ganusov V. V., Perelson A. S. 2010. Stochastic models of lymphocyte proliferation and death. *Plos ONE*, 5, 1: e12775, doi: 10.1371/journal.pone.0012775: 14 str.



## ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Alojzu Ihanu, dr. med. za mentorstvo, pomoč ter popravke pri izdelavi magistrske naloge. Hvala somentorici in delovni mentorici, dr. Andreji Nataši Kopitar, za organizacijo raziskovalnega dela, pomoč, vse razlage in napotke ter popravke pri izdelavi magistrske naloge.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Mojci Narat za natančen ter strokoven pregled magistrskega dela. Hvala tudi prof. dr. Vladimirju Kotniku, dr. med. za hiter odziv in sodelovanje.

Zahvaljujem se Katedri za mikrobiologijo in imunologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, ki mi je omogočila izdelavo magistrske naloge in vsem zaposlenim v Laboratoriju za celično imunologijo za pomoč in nasvete med eksperimentalnim delom.

Hvala tudi Zavodu RS za transfuzijsko medicino in Polonci Mali, dr. med. za sodelovanje in darovanje vzorcev krvi.

Neskončno sem hvaležna tudi svoji družini za spodbudo, nasvete in finančno podporo tekom študija. Hvala tudi vsem prijateljem, ki so mi stali ob strani, me spodbujali ter zaupali vame. Še posebej hvala Nani za pomoč in dobro družbo v vseh študijskih letih ter za sodelovanje, prijateljske nasvete in podporo tako med eksperimentalnim delom poskusa, kot tudi med nastajanjem magistrskega dela.