UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nana ŠKRJANC

MERJENJE ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA PO SPODBUJANJU LIMFOCITOV Z RAZLIČNIMI BAKTERIJSKIMI LPS IN GLIVIČNIMI BETAGLUKAN MOLEKULAMI

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nana ŠKRJANC

MERJENJE ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA PO SPODBUJANJU LIMFOCITOV Z RAZLIČNIMI BAKTERIJSKIMI LPS IN GLIVIČNIMI BETAGLUKAN MOLEKULAMI

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

MEASUREMENT OF INTRACELLULAR CALCIUM AFTER LYMPHOCITE STIMULATION WITH BACTERIAL (LPS) AND FUNGI (BETAGLUCANS) CELL-WALL COMPONENTS

M.SC. THESIS
Master Study Programmes: Academic Study in Microbiology

Ljubljana, 2013

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. Mojco 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.

Nana ŠKRJANC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 577.27:612.112:576.342:57.086(043)=163.6
KG molekularna imunologija/limfociti/specifični imunski odziv/ znotrajcelični kalcij/ionomicin/PHA/aktivirajoča protitelesa CD3/kostimulatorna protitelesa CD28/LPS/betaglukan/metilprednizolon/glatiramer acetat/ natrijev nukleinat/ pretočna citometrija
AV ŠKRJANC, Nana, 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 2013
IN MERJENJE ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA PO SPODBUJANJU LIMFOCITOV Z RAZLIČNIMI BAKTERIJSKIMI LPS IN GLIVIČNIMI BETAGLUKAN MOLEKULAMI
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XII, 69 str., 4 pregl., 15 sl., 49 vir.
IJ sl
JI sl/en
AB Ena najpomembnejših vlog pri prenosu signala in določanju limfocitne celične aktivnosti pripada znotrajceličnemu kalciju (Ca^{2+}). Glavni dogodek po spodbujanju limfocitov je namreč sprememba v koncentraciji znotrajceličnega kalcija, kar za sabo potegne številne celične procese (npr. kemotakso, oksidativni izbruh, proizvajanje citokinov ali fagoctiozo). S spodbujanjem limfocitov smo v naši raziskavi želeli spodbuditi ali zavreti koncentracijo kalcija v celici. Z različnimi spodbujevalci, modulatorji ter sprožilci smo želeli ugotoviti, ali je naša metoda primerna za merjenje koncentracije znotrajceličnega kalcija v limfocitih. Ugotovili smo, da vsi spodbujevalci znotrajceličnega kalcija v našem poskusu - ionomicin, protitelesa CD3 s kostimulatornim protitelesom CD28 in PHA, močno povišajo koncentracijo znotrajceličnega kalcija v limfocitnih celicah in so zato primerne pozitivne kontrole v poskusu merjenja znotrajceličnega kalcija. Metilprednizolon je uspešen zaviralec koncentracije znotrajceličnega kalcija in primerna negativna kontrola, ki potrjuje uspešnost metode merjenja znotrajceličnega kalcija s pretočnim citometrom. Metoda merjenja znotrajceličnega kalcija se je prav tako izkazala za uspešno ob dodajanju modulatorja, natrijevega nukleinata ter šibkem spodbujevalcu, kulturi *E. coli*. Naša metoda zaenkrat še ni dovolj občutljiva za merjenje znotrajceličnega kalcija v limfocitih po dodatku modulatorjev betaglukana, glatiramer acetata in izoliranih molekul LPS-a.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Du2
DC	UDC 577.27:612.112:576.342:57.086(043)=163.6
CX	molecular immunology/limphocytes/specific immune response/ intracellular calcium/ionomycin/PHA/anti-CD3 monoclonal antybody/ CD28 monoclonal antybody/LPS/betaglucan/methylprednisolone/glatiramer acetat/ sodium nucleinat/ flow cytometry
AV	ŠKRJANC, Nana
SA	IHAN, Alojz (supervisor)/KOPITAR, Andreja Nataša (co-advisor)/NARAT, Mojca (reviewer)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
LI	2013
IN	MEASUREMENT OF INTRACELLULAR CALCIUM AFTER LYMPHOCITE STIMULATION WITH BACTERIAL (LPS) AND FUNGI (BETAGLUCANS) CELL-WALL COMPONENTS
TD	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
OP	XII, 69 p., 4 tab., 15 fig., 49 ref.
IJ	sl
JI	sl/en

AB Calcium (Ca^{2+}) is one of the major elements in the transmission of the signal and the determination of lymphocyte cell activity. The main event to stimulate lymphocyte is the difference in concentration of intracellular calcium, which is why cellular processes occurs (for instance, chemotaxis, oxidative eruption, producing cytokines or fagocitosis). However, the stimulation or inhibition of intracellular calcium concentration by stimulating lymphocytes was purpose of this study. Different types of stimulators, modulators and triggers were used to determine applicability of the method for measuring the concentration of intracellular calcium in lymphocytes. As a result, it is determined that all the stimulators of intracellular calcium in the experiment - ionomycin, anti-CD3 antibody with co-stimulation CD28 antibody and PHA, significantly increase the concentration of intracellular calcium in the lymphocyte cells and are therefore suitable positive control in the experiment of measuring intracellular calcium. The methylprednisolone is a successful inhibitor of the intracellular calcium concentration and appropriate negative control and the effectiveness of methods of measuring intracellular calcium by flow cytometry was confirmed. These methods has also proved to be successful with the addition of a modulator, sodium nukleinat and weak stimulator, the culture of *E. coli*. The method needs further research since it is not yet sensitive enough for measurement of intracellular calcium in lymphocytes after the addition of modulator betaglucans, glatiramer acetate, and the isolated molecules of the LPS.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA III

KEY WORDS DOCUMENTATION IV

KAZALO VSEBINE V

KAZALO PREGLEDNIC VIII

KAZALO SLIK IX

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI XI

SLOVARČEK XII

1 UVOD 1

1.1 NAMEN DELA 3

1.2 DELOVNE HIPOTEZE 3

2 PREGLED OBJAV 5

2.1 IMUNSKI SISTEM, MONONUKLEARNE CELICE IN CELICE T 5

2.2 ZNOTRAJCELIČNI KALCIJ 7

2.3 PRETOČNA CITOMETRIJA 9

2.4 SPODBUJEVALCI ZNOTRAJCELIČNEGA CA^{2+} 12

2.4.1 Ionomicin 12

2.4.2 Fitohemaglutinin (PHA) 14

2.4.3 Monoklonska protitelesa CD3 in kostimulatorna protitelesa CD28 14

2.4.4 Lipopolisaharidi (LPS) 15

2.5 MODULATORJI ZNOTRAJCELIČNEGA CA^{2+} 17

2.5.1 Betaglukan 17

2.5.2 Glatiramer acetat 18

2.5.3 Natrijev nukleinat 19

2.5.4 Metilprednizolon 19

3 MATERIALI IN METODE 21

3.1 MATERIALI 22
3.1.1 Uporabljeni reagenti 22
3.1.2 Priprava reagentov 23
3.1.2.1 Medij II 23
3.1.2.2 Betaglukan 23
3.1.2.3 Medij za pripravo celic pred merjenjem na pretočnem citometru 23
3.1.2.4 Fluo-3 AM (acetoksimethil ester) 24
3.1.2.5 Probenecid, 100 mM 24
3.1.3 Aparature in pribor 24
3.2 METODE 25
3.2.1 Načrt poskusa 25
3.2.2 Osamitev PBMC iz venske krvi 26
3.2.3 Uravnavanje koncentracije celic in določanje števila PBMC v vzorcih 27
3.2.4 Stimulacije limfocitov z različnimi modulatorji in merjenje koncentracije znotrajceličnega kalcija 29
3.2.5 Priprava celic za merjenje na pretočnem citometru 29
3.2.6 Imunokarakterizacija in merjenje koncentracije znotrajceličnega Ca^{2+} na pretočnem citometru 30
3.2.7 Označevanje celic po metodi EdU 32
3.2.8 Priprava kulture *Escherichia coli* 33
3.2.9 Statistična analiza podatkov 33

4 REZULTATI 35

4.1 NEGATIVNA KONTROLA POSKUSA 35
4.2 BAZIČNE VREDNOSTI KONCENTRACIJE ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA 36
4.3 SPODBUJEVALCI KONCENTRACIJE ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA 37
4.3.1 Normalne vrednosti in razmerja povprečnih vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih kontrole in spodbujevalcev 38
4.4 SPODBUJANJE LIMFOCITOV Z MOLEKULAMI LPS 39
4.5 MODULATORJI KONCENTRACIJE ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA 41

5 RAZPRAVA 47

5.1 KONCENTRACIJA ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA NEGATIVNE KONTROLE 48

5.2 PRIMERJAVA BAZIČNEGA ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA MED POSAMEZNIMI POSKUSI 49

5.3 VPLIV SPODBUJEVALCEV NA KONCENTRACIJO ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA 51

5.3.1 Primerjava normalnih vrednosti koncentracij znotrajceličnega kalcija in razmerij povprečij negativne kontrole ter spodbujevalcev 53

5.4 LPS KOT MIKROBNI SPODBUJEVALEC ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA 54

5.5 VPLIV MODULATORJEV NA KONCENTRACIJO ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA 56

5.5.1 Vpliv različnih modulatorjev na bazične koncentracije znotrajceličnega kalcija 57

5.5.2 Vpliv in delovanje sprožilca LPS 58

5.5.3 Vpliv in delovanje sprožilca PHA 59

5.5.4 Vpliv in delovanje sprožilca ionomicina 59

6 SKLEPI 61

7 POVZETEK 63

8 VIRI 64

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Spodbujevalci, modulatorji in sprožilci v našem poskusu. 26

Preglednica 2: Končna koncentracija in inkubacijski časi spodbujevalcev in modulatorjev koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih. 29

Preglednica 3: Končna koncentracija sprožilcev koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih. 31

Preglednica 4: Normalne vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija zdravih krvodajalcev: negativna kontrola in spodbujevalci CD3 + CD28 ter PHA brez dodanih sprožilcev (bazična koncentracija znotrajceličnega kalcija) in ob dodanih sprožilcih LPS, PHA in ionomicinu za 10 (CD3 + CD28, PHA) ter 12 vzorcev (kontrola). Na sliki so prikazane normalne vrednosti svetilnosti (povprečne vrednosti fluorescence v opazovani populaciji limfocitov). 39

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema poskusa. 21

Slika 2: Shematični prikaz ločitve krvi na Ficoll-Hypaque (Isolation of mononuclear cells, 2007: 9). 27

Slika 3: Mrežni sistem, vrisan na Neubauerjevi komori (Žemva, 1968: 176). 28

Slika 4: BD Biosciences. 2005. BD FACSCanto™ Flow Cytometer. San Jose, BD: 12 str. 30

Slika 5: Koncentracija znotrajceličnega kalcija brez dodanega spodbujevalca ali modulatorja (slika levo), ob dodatku metilprednizolona, ki je močan zaviralec imunskega odziva (slika na sredini) ter ob sprožilcu z ionomicinom (slika desno). Na vsaki izmed slik je v prvem stolpcu prikazana bazična koncentracija znotrajceličnega kalcija (brez dodatka sprožilca), drugi stolpec prikazuje koncentracijo znotrajceličnega kalcija ob dodatku sprožilca LPS-a ter tretji ob dodatku sprožilca PHA. Vsaka slika prikazuje en vzorec. 32

Slika 6: Povprečne vrednosti znotrajceličnega kalcija negativne kontrole po 24. urah (kontrola 1) in po 72. urah (kontrola 2) ter primerjava bazičnega kalcija kontrole s sprožilci LPS, PHA in ionomicinom za 12 vzorcev. 35

Slika 7: Povprečne vrednosti bazične koncentracije znotrajceličnega kalcija za 2 (ionomicin + PMA), 8 (*E. coli* + GA), 10 (CD3 + CD28, PHA, *E. coli*, *E. coli* + betaglukan, *E. coli* + NK, *E. coli* + MP) ter 12 vzorcev (kontrola). 36

Slika 8: Bazična koncentracija znotrajceličnega kalcija ter koncentracija znotrajceličnega kalcija spodbujevalcev po dodatni stimulaciji s sprožilci LPS, PHA in ionomicinom za 2 (ionomicin + PMA), 10 (CD3 + CD28, PHA) ter 12 vzorcev (kontrola). 38

Slika 9: Razmerja povprečnih vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija med negativno kontrolo in spodbujevalcema CD3 in CD28 ter PHA brez dodanih sprožilcev (bazična koncentracija znotrajceličnega kalcija) in ob dodanih sprožilcih LPS, PHA in ionomicinu za 10 (CD3 + CD28, PHA) ter 12 vzorcev (kontrola). 39

Slika 10: Titracijska krivulja spodbujanja limfocitov z lipopolisaharidom s tremi različnimi koncentracijami (LPS: 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml). Na sliki je prikazan delež delečih limfocitov (% EdU +) za 6 ponovitev (Skale, 2013). 40

Slika 11: Povprečne vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih negativne kontrole (brez spodbujanja) in v vzorcih s spodbujevalcem koncentracije znotrajceličnega kalcija, kulturo *E. coli* za 10 (*E. coli*) ter 12 vzorcev (kontrola). 41

Slika 12: Povprečne vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih, spodbujanih z *E. coli*, in modulatorjih (betaglukan, GA, NK, MP) na ravni bazičnih vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija (brez dodatnega spodbujanja s sprožilci) za 8 (*E. coli* + GA) ter 10 vzorcev (*E. coli*, *E. coli* + betaglukan, *E. coli* + NK, *E. coli* + MP). 43

Slika 13: Povprečne vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih, spodbujanih z *E. coli*, in modulatorjih (betaglukan, GA, NK, MP) ob dodatnem spodbujanju s sprožilcem LPS za 8 (*E. coli* + GA) ter 10 vzorcev (*E. coli*, *E. coli* + betaglukan, *E. coli* + NK, *E. coli* + MP). 44

Slika 14: Povprečne vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih, spodbujanih z *E. coli*, in modulatorjih (betaglukan, GA, NK, MP) ob dodatnem spodbujanju s sprožilcem PHA za 8 (*E. coli* + GA) ter 10 vzorcev (*E. coli*, *E. coli* + betaglukan, *E. coli* + NK, *E. coli* + MP). 45

Slika 15: Povprečne vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih, spodbujanih z *E. coli*, in modulatorjih (betaglukan, GA, NK, MP) ob dodatnem spodbujanju s sprožilcem ionomicinom za 8 (*E. coli* + GA) ter 10 vzorcev (*E. coli*, *E. coli* + betaglukan, *E. coli* + NK, *E. coli* + MP). 46

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AM acetoksimetil ester

APCs antigen predstavitvene celice

ATP adenozin trifosfat

Ca^{2+} kalcijev ion

CD monoklonska protitelesa, s katerimi razlikujemo med posameznimi vrstami limfocitov (angl. **C**luster of **D**ifferantiation)

CRAC ionski kanalček, selektiven za Ca^{2+} (angl. **C**alcium **R**elease **A**ctivated **C**hannel)

DC dendritične celice

FSC prednji detektor sipanja pretočnega citometra (angl. **F**orward **Sc**atter)

GA glatiramer acetat

$InsP_3$ inositol 1,4,5,-trifosfataza

IONO ionomicin

LPS lipopolisaharid

MP metilprednizolon

NA natrijev nukleinat

PBMC mononuklearne celice, osamljene iz krvi (angl. **P**eripheral **B**lood **M**ononuclear **C**ells)

PHA fitohemaglutinin

PMA 4-metoksiamfetamin

SSC stranski detektor sipanja pretočnega citometra (angl. **S**ide **Sc**atter)

TCR T-celični receptorji (angl. Toll-like receptors, TLR) so antigenski receptorji limfocitov T, sestavljeni iz zunajceličnega dela, ki prepoznava različne antigene in iz znotrajceličnega dela, ki v različnih celicah aktivira različne dejavnike prepisovanja in sproži različne celične odzive

SLOVARČEK

bazična koncentracija znotrajceličnega kalcija	koncentracija znotrajceličnega kalcija brez dodatka sprožilca
CD3 in CD28	monoklonska protitelesa, ki jih zaradi njihovih specifičnih vezav lahko imenujemo tudi antigen CD3 oziroma CD28 ali kot molekulo CD2 oziroma CD28
modulator	snov, ki ob inkubaciji s PBMC po določenem času bodisi znižuje bodisi povišuje koncentracijo znotrajceličnega kalcija v limfocitih
medij za pripravo celic pred merjenjem na pretočnem citometru	katerikoli pufer, ki mu dodamo 1 mM kalcij, 1 mM magnezij in 0,5 % BSA (angl. cell loading media, CLM)
negativna kontrola	PBMC brez dodanih spodbujevalcev ali modulatorjev
proliferacija	razmnoževanje
spodbujevalec	snov, ki ob inkubaciji s PBMC po določenem času spodbuja in povišuje koncentracijo znotrajceličnega kalcija v limfocitih
sprožilec	snov, ki ob že spodbujenih ali moduliranih PBMC dodatno in hipno zviša (sproži) koncentracijo znotrajceličnega kalcija v limfocitih

1 UVOD

Specifični imunski odziv temelji na zmožnosti, da imunske celice s specifičnimi receptorji razlikujejo med svojim in tujim, s čimer vzdržujejo individualnost in integriteto organizma. Imunske celice – limfociti – so filogenetsko mlajše imunske celice, ki imajo za specifično prepoznavo tujih molekul na svojih površinah posebne receptorje – antigenske receptorje. Med seboj so si limfociti morfološko podobni, lahko pa jih razlikujemo z monoklonskimi protitelesi CD (angl. cluster of differantiation), saj je posamezna vrsta monoklonskih protiteles CD specifična za eno vrsto molekul na površinah človeških limfocitov (Ihan, 2002b). Pri sesalcih je aktivacija ali zaviranje limfocitov odvisna od številnih imunskih in drugih signalov, ki so lahko pozitivni ali negativni. Ti vzpodbudijo tarčne limfocite, ki na koncu določijo celični odziv nanje, na primer celično proliferacijo, izločanje citokinov ali apopotozo celice. Znotrajcelični kalcij (Ca^{2+}) ima ključno vlogo pri prenosu signala in določanju limfocitne celične aktivnosti (Lidy Verburg–Van Kemande in sod., 1998). Z merjenjem koncentracije znotrajceličnega kalcija lahko opazujemo vpliv določenega spodbujevalca (na primer lipopolisaharida) na limfocite T in posledično predvidimo celični odziv nanj (Chien in sod., 2007).

Bakterijski lipopolisaharid (LPS) je sestavni del zunanje membrane po Gramu negativnih bakterij in pomemben endotoksin, ki spodbudi makrofage k izločanju velike količine citokinov. Večja količina citokinov v organizmu lahko povzroči hude okvare žilja in posledično septičnega šoka (Ihan, 2002a). Nasprotno je betaglukan, naravni polisaharid, ki ga prav tako proizvajajo bakterije in glive, imunomodulator, saj imunski odziv bodisi spodbuja bodisi zavira (Kim in sod., 2011).

Zanimalo nas je, kako LPS in betaglukan delujeta na koncentracijo znotrajceličnega kalcija. V poskusu smo preverili, kakšna je koncentracija znotrajceličnega kalcija ob dodatku komercialne molekule LPS ter ali se koncentracija znotrajceličnega kalcija razlikuje, če mononuklearnim celicam kot vir LPS-a dodamo inaktivirano kulturo *E. coli*.

Poleg LPS-a in betaglukana smo v poskusu uporabili še spodbujevalce fitohemaglutinin (PHA), ionomicin (ionofor bakterije *Streptomyces conglobatus*) ter protitelesa CD3 skupaj

s kostimulatorno molekulo CD28, za katere je znano, da povišujejo koncentracijo znotrajceličnega kalcija v limfocitih.

Ob prisotnosti LPS-a v limfocitih nas je zanimalo še delovanje nekaterih zdravil na koncentracijo znotrajceličnega kalcija. Poimenovali smo jih modulatorji, saj koncentracijo znotrajceličnega kalcija lahko znižujejo ali pa zvišujejo. To so bila glukokortikosteroid in zaviralec imunskega odziva metilprednizolon (komercialno ime Medrol) ter glatiramer acetat (komercialno ime Copaxone) in natrijev nukleinat (komercialno ime Tamerit), katerih delovanje na koncentracijo znotrajceličnega kalcija ne poznamo.

1.1 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je bil vpeljati in umeriti test merjenja koncentracije znotrajceličnega kalcija limfocitov. Želeli smo izmeriti vpliv molekul bakterijskih (LPS) in glivnih sten (betaglukan) na koncentracijo znotrajceličnega kalcija pri limfocitih T.

Z učinkovinami, kot so fitohemaglutinin (PHA), ionomicin (ionofor bakterije *Streptomyces conglobatus* in zviševalec znotrajceličnega kalcija), aktivirajoča protitelesa CD3 skupaj s kostimulatornim protitelesom CD28, ter protivnetnimi zdravili metilprednizolonom (glukokortikosteroid), glatiramer acetatom ter natrijevim nukleinatom smo sklepali na mehanizem delovanja omenjenih spodbujevalcev, modulatorjev ter sprožilcev na limfocite.

Tik pred merjenjem koncentracije znotrajceličnega kalcija na pretočnem citometru smo spodbujene ali modulirane celice dodatno izpostavili trem različnim sprožilcem (LPS, PHA in ionomicin). S tem smo želeli preveriti vpliv sprožilcev na hitre spremembe v koncentraciji znotrajceličnega kalcija limfocitov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednje delovne hipoteze:

- učinkovine PHA, ionomicin s PMA-jem ter protitelesa CD3 skupaj s kostimulatorno molekulo CD28 povišujejo raven znotrajceličnega kalcija in so njegovi spodbujevalci, zato jih bomo lahko uporabili kot pozitivne kontrole pri vpeljavi metode merjenja znotrajceličnega kalcija
- zdravilo metilprednizolon je modulator znotrajceličnega kalcija in na njegovo koncentracijo deluje močno zaviralno
- zdravili glatiramer acetat in natrijev nukleinat sta prav tako modulatorja celičnega odziva znotrajceličnega kalcija in zaviralca imunskega odziva, predvidevamo, da njegovo koncentracijo znotraj limfocitne celice znižujeta
- mikrobni produkt bakterijskih celičnih sten, LPS, ob stiku z limfocitom poviša koncentracijo znotrajceličnega kalcija

- mikrobni produkt glivnih celičnih sten, betaglukan, na limfocite deluje protivnetno, zato bo koncentracija znotrajceličnega kalcija ob njegovi modulaciji v limfocitni celici nižja
- test merjenja koncentracije znotrajceličnega kalcija s pretočnim citometrom v limfocitih zdravih oseb bo primeren za merjenje koncentracije znotrajceličnega kalcija ob dodatku različnih spodbujevalcev, modulatorjev in sprožilcev

2 PREGLED OBJAV

2.1 IMUNSKI SISTEM, MONONUKLEARNE CELICE IN CELICE T

Celice, ki sodelujejo pri imunskem odzivu, lahko delimo v dve skupini. V prvo skupino uvrščamo celice, ki specifično spoznajo antigenske determinante – limfocite. Imenujemo jih tudi imunsko zmožne ali imunsko kompetentne celice. Po stimulaciji z antigenom se te celice diferencirajo v efektorske celice imunskega odziva, npr. v celice, ki izdelujejo protitelesa, v celice pomagalke in citotoksične celice ali celice ubijalke. V drugo skupino prištevamo številne celice, ki neposredno ali posredno sodelujejo v imunskem odzivu. Med temi celicami so najpomembnejši makrofagi. Ti aktivno sodelujejo pri številnih imunskih reakcijah, vendar ne spoznajo antigenskih determinant specifično (Vozelj, 2001).

Specifični imunski odziv temelji na zmožnosti, da imunske celice s specifičnimi receptorji razlikujejo med svojim in tujim, s čimer vzdržujejo individualnost in integriteto organizma. Limfociti imajo na svojih površinah receptorje, ki specifično prepoznavajo tuje molekule – antigene. Prepoznavi sledi imunski odziv, katerega cilj je odstraniti antigene iz telesa. Zaradi raznolikosti molekul v okolju mora biti imunski sistem sposoben specifično prepoznavati milijone različnih antigenov in se nanje ustrezno odzvati (Ihan, 2002b).

Limfociti so filogenetsko mlajše imunske celice, ki imajo za prepoznavanje tujih molekul posebne receptorje – antigenske receptorje. Vsak limfocit ima samo eno vrsto receptorjev za antigen, ki prepoznavajo samo eno vrsto antigenskih molekul. Imunoglobulini (Ig) so antigenski receptorji limfocitov B, T-celični receptorji (TCR) pa antigenski receptorji limfocitov T. Antigen, ki pride v telo, se veže samo na limfocite, ki imajo antigenske receptorje ustrezne specifičnosti. Po vezavi antigena se limfocit začne hitro razmnoževati (proliferirati) in diferencirati. Iz limfocita, ki se po vezavi antigena razmnožuje, v nekaj dneh nastanejo številni limfociti, ki imajo enake antigenske receptorje. Tako nastane specifični limfocitni klon. Posledica klonske ekspanzije specifičnih limfocitov je imunski spomin. Limfociti, ki še nikoli niso prišli v stik s specifičnim antigenom, so naivni

limfociti. Del limfocitov, ki so nastali med klonsko ekspanzijo, so lahko kratkoživeči (nekaj dni ali tednov), imenovani efektorski ali aktivirani limfociti, ki so v stanju odzivanja na antigen; drugi del pa so dolgoživeči (leta, desetletja) ali spominski limfociti, ki se aktivirajo pri poznejših stikih s specifičnim antigenom (Ihan, 2002b).

Limfociti so si morfološko med seboj zelo podobni, lahko pa jih razlikujemo z monoklonskimi protitelesi CD (angl. cluster of differentiation), ki so običajno mišjega izvora. Posamezna vrsta monoklonskih protiteles CD je specifična za eno vrsto molekul na površinah človeških levkocitov. Protitelesa CD3 so na primer specifična za del TCR, zato TCR pogosto imenujemo tudi antigen CD3 ali molekula CD3. TCR se nahaja samo na limfocitih T. Kadar delamo imunofluorescenčni test s fluorescenčno označenimi protitelesi CD3, so vse celice, ki fluorescirajo, celice T. Celice T pomagalke imajo na površini molekule CD4, citotoksični limfoctit T pa molekule CD8. Za limfocite B so značilne molekule CD19, za celice NK pa molekule CD56 in CD16 (Ihan, 2002b).

Limfociti B nastanejo in funkcionalno dozorijo v kostnem mozgu. Njihovi antigenski receptorji so imunoglobulinske ali protitelesne molekule, vsajene v citoplazemsko membrano. Ko naivni limfocit B prvič prepozna antigen, sledi aktivacija celice, ki povzroči njeno razmnoževanje (klonska ekspanzija). Razmnožene celice ostanejo deloma kot dolgoživeči spominski limfociti B, deloma pa se diferencirajo v plazmatke, kratkoživeče celice z ekscentričnim jedrom in obilnimi sekretornimi strukturami v citoplazmi. Plazmatke izločajo v okolico velike količine protiteles. Plazmatka izloča protitelesa enake specifičnosti, kot jo imajo antigenski receptorji tistega limfocita B, iz katerega je tudi sama nastala (Ihan, 2002b).

Limfociti T nastanejo iz izvornih limfoidnih celic v kostnem mozgu. Od tam prehajajo v kri kot nezreli predhodniki limfocitov T in potujejo v priželjc (timus), kjer funkcijsko dozorijo bodisi v celice T pomagalke (CD4) ali v citotoksične limfocite T (CD8). Antigenski receptor limfocitov T je TCR. Celice T pomagalke po aktivaciji z antigenom izločajo citokine in tako uravnavajo imunski odziv. Citotoksični limfociti T po aktivaciji z antigenom izločajo citotoksične snovi. Na ta način ubijajo predvsem celice lastnega organizma, ki so okužene z znotrajceličnimi mikrobi (Ihan, 2002b).

Limfocite v obtoku največkrat uporabimo za merjenje celičnih funkcij in dogodkov, preko katerih nato sklepamo na druge zdrave somatske celice. Krvni limfociti v fazi celičnega cikla G0 počivajo, zato jih lahko z različnimi mitogeni stimuliramo *in vitro* (Kosti in sod., 2010).

2.2 ZNOTRAJCELIČNI KALCIJ

Kalcij je univerzalen znotrajcelični sporočevalec zaradi njegove vsestranskosti. Vsaka celica ima svoje 'orodje' za uravnavanje koncentracije znotrajceličnega kalcija z mnogimi komponentami, ki jih je med seboj mogoče premeščati in uskladiti ter s tem ustvariti široko paleto prostorskih in časovnih signalov. To vsestranskost celice izkoriščajo za nadzor nad različnimi celičnimi procesi kot so oploditev, proliferacija, razvoj, učenje in spomin, krčenje ter izločanje. Pri tem je pomembno, da se koncentracije kalcija gibljejo v mejah normale, saj lahko v nasprotnem primeru pride do celične smrti, tako z nekrozo kot tudi apoptozo (Berridge in sod., 2000).

Celice v svoji notranjosti vzdržujejo nizke koncentracije Ca^{2+}. Prenos Ca^{2+} preko membrane je zelo pomemben, saj se lahko tesno veže na mnoge druge molekule v celici in spreminja njeno aktivnost. Pretok Ca^{2+} skozi Ca^{2+} kanalčke lahko nadalje sproži tudi druge znotrajcelične procese. Manjša kot je koncentracija prostega Ca^{2+} v citosolu, bolj je celica občutljiva na povečanje zunajceličnega Ca^{2+}. Evkariontske celice na splošno vzdržujejo zelo nizke koncentracije prostega Ca^{2+} v citosolu (okrog 10^{-4} mM), medtem ko je koncentracija zunajceličnega Ca^{2+} navadno 1-2 mM. Nizko koncentracijo celice dosežejo s pomočjo Ca^{2+} črpalk, ki jih poganja ATP, tako v plazemski membrani kot tudi na membranah endoplazmatskega retikuluma, ki aktivno črpa Ca^{2+} iz citosola. Ca^{2+} črpalka je ATPaza, ki je med svojim ciklom fosforilirana in defosforilirana (Alberts in sod., 2004).

V imunskih celicah – celicah T in B, mastocitah in drugih, koncentracija znotrajceličnega kalcija nadzoruje proliferacijo, diferenciacijo, efektorske funkcije in različne

transkripcijske programe. Zunajcelični Ca^{2+} prihaja v limfocite skozi kanalčke CRAC (angl. calcium release activated calcium), s čimer se njegova koncentracija v celici poveča (Hodge in sod., 2010; Oh-hora in Rao, 2008).

Posledice sprememb v koncentraciji znotrajceličnega kalcija so lahko kratkotrajne ali dolgotrajne. Kratkotrajni dogodki, ki se pojavijo v nekaj minutah, so neodvisni od novega genskega izražanja. To so predvsem regulacija gibljivosti limfocitov, degranulacija z alergenom senzibiliziranih mastocitov ali citolitičnih $CD8^+$ celic T. Interakcija celic T z antigen predstavitvenimi celicami (APCs) povzroči hitro povečanje koncentracije znotrajceličnega Ca^{2+} (Oh-hora in Rao, 2008). Nasprotno pa se dolgotrajne posledice, ki so povezane z genskim izražanjem, kažejo šele po nekaj urah ali dneh. Pod dolgotrajne dogodke prištevamo proliferacijo limfocitov, proizvajanje citokinov in kemokinov, diferenciacijo naivnih celic T v različne efektorje ali spominske celice T ter vzpostavitev anergije (ob odsotnosti kostimulacije) (Oh-hora in Rao, 2009).

Pri sesalcih je torej aktivacija ali inhibicija limfocitov odvisna od številnih imunskih in drugih signalov, ki so lahko pozitivni ali negativni. Ti spodbudijo tarčne limfocite, ki na koncu določijo celični odziv nanje, kot so celična proliferacija, izločanje citokinov ali apoptoza celice. Spremembe v koncentraciji znotrajceličnega kalcija igrajo ključno vlogo pri določanju limfocitne celične aktivnosti (Lidy Verburg-Van Kemande in sod., 1998). Tako je na primer aktivacija limfocitov T z antigenskim receptorjem tesno povezana s povišanjem koncentracije znotrajceličnega Ca^{2+}. Del dviga koncentracije Ca^{2+} je odvisen od pretoka Ca^{2+}, na katerega se aktivirane celice T odzovejo s povečanim iztokom K^+. Dvig koncentracije Ca^{2+} preko receptorjev za pogon kanalov ali drugih signalnih poti je odvisen od membranskega potenciala. Depolarizacija limfocitne membrane zavira z mitogenom aktiviran prevzem Ca^{2+} v človeških limfocitih T (Shirley Lin in sod., 1993). Medtem sta iniciacija proliferacije in apoptoze kot odgovor na navzkrižno povezovanje membranskih Ig povezani s povečanjem koncentracije znotrajceličnega kalcija v celicah B. Celice T, nevrotransmiterji, hormoni in rastni faktorji delujejo preko G-proteina ali s tirozin kinazo povezanimi receptorji za spodbujanje nastanka drugega sporočevalca $InsP_3$ (inositol 1,4,5,-trifosfataza), ki nato difundira v citosol in z aktivacijo Ca^{2+} kanalčkov sprosti Ca^{2+} iz endoplazmatskega retikuluma. Kalcijevi signali in spremembe v

koncentraciji znotrajceličnega kalcija se lahko hitro končajo s pomočjo Ca^{2+} črpalk, kar omogoča nastanek kratkih Ca^{2+} vrhov (oscilacije) in valov (Lidy Verburg-Van Kemande in sod., 1998).

Ko v procesu diferenciacije celice dobijo vsaka svojo nalogo, se navadno nehajo deliti. Diferencirane celice ohranijo možnost ponovnega vstopa v celični cikel, kar je ponavadi odgovor na rastne faktorje. Koncentracija Ca^{2+} je eden izmed ključnih regulatorjev celične proliferacije, delovanja in povezovanja z drugimi signalnimi potmi. V primeru odgovora limfocitov na antigen je le-ta v vlogi rastnega faktorja. Z vezavo antigena na T-celični receptor (TCR) in kaskado dogodkov povzroči sestavljanje supramolekularne aktivacijske skupine (Berridge in sod., 2000).

Glavni dogodek po stimulaciji limfocitov je torej sprememba v koncentraciji znotrajceličnega kalcija, kar za sabo potegne številne celične procese – kemotakso, oksidativni izbruh, proizvajanje citokinov in fagoctiozo. Merjenje sprememb v koncentraciji znotrajceličnega kalcija levkocitov lahko prispeva k pojasnitvi patofiziološko pomembnih mehanizmov celične aktivacije, ki jih sumimo za dovzetnost na okužbe, vnetja, hiranje in podhranjenost ter poškodbe srca (Shepers in sod., 2009).

2.3 PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočna citometrija je tehnika, s katero merimo in analiziramo lastnosti posameznih celic, ki v suspenziji ena za drugo potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe. V eni sekundi lahko analiziramo več sto celic, kar nam da zanesljivo podobo o fizikalnih in biokemičnih lastnostih celic. Svetlobni žarek zadane ob celico, se odbije, lomi ali pa se absorbira v fluorokromih, če smo jih predhodno vezali na celice in celica s fluorokromom nato oddaja svetlobo daljše valovne dolžine (Kotnik in sod., 2010). S pretočno citometrijo merimo relativno velikost in granuliranost delcev ter relativno intenziteto fluorescence. Te lastnosti določamo z uporabo sklopljenega optično-elektronskega sistema, ki beleži, kako celica ali delec razprši lasersko svetlobo in odda fluorescenco.

Pretočni citometer je sestavljen iz treh glavnih povezujočih se sistemov: fluidnega, optičnega in elektronskega. Fluidni sistem z usmerjenim tokom prenaša delce do laserskega žarka, ki osvetli tok delcev vzorca, optični filtri pa usmerjajo svetlobne signale do ustreznih detektorjev. Elektronski sistem pretvori zaznane svetlobne signale v elektronske signale, ki jih nato obdela računalnik. Vsak delec ali celica, velika od 0,2 do 150 mikrometrov, je primerna za analizo na citometru. Pred analizo je potrebno celice iz masivnega tkiva razčleniti.

Del fluidnega toka, kjer se nahajajo delci, se imenuje jedrni vzorec. Ko delce prestrežemo z laserskim žarkom, sipajo svetlobo. Vse fluorescentne molekule, prisotne na delcu, fluorescirajo, razpršena in fluorescentna svetloba se zbirata na ustrezno nameščenih lečah. Razcepitveni žarek in filtri usmerjajo razpršeno in fluorescentno svetlobo do primernih detektorjev. Detektorji proizvedejo elektronske signale, sorazmerne optičnim signalom, ki so jih dosegli. Podatki se zbirajo za vsak delec ali dogodek. Značilnosti ali parametri vsakega dogodka temeljijo na njegovem sipanju svetlobe in fluorescentnih lastnostih.

Ko svetloba iz laserja zadane celico, se žarek svetlobe sipa. Sipanje zaradi uklona svetlobe na robovih celice zazna prednji detektor sipanja (»Forward Scatter«, FSC) in nam pove, kako velika je posamezna celica - jakost signala na FSC je v korelaciji z velikostjo celice. Sipanje zaradi odboja svetlobe meri stranski detektor sipanja (»Side Scatter«, SSC) in je odvisno od granuliranosti celice. Merjenje sipanja svetlobe nam torej omogoči ločevanje celičnih populacij glede na velikost in granuliranost. Povezava meritev FSC in SSC detektorjev omogoča razlikovanje celičnih vrst v heterogenih populacijah celic (BD Biosciences, 2000).

Z merjenjem fluorescence pri različnih valovnih dolžinah dobimo kvantitativno in kvalitativno informacijo o s fluorokromi označenih celičnih označevalcih. Lahko jih označimo s specifičnimi protitelesi, neposredno označenimi s fluorokromom ali pa uporabimo sekundarna, s fluorokromom označena protitelesa. Če uporabljamo različne fluorokrome, ki absorbirajo svetlobo v enakem valovnem območju, emitirajo pa jo v različnih, lahko opazujemo več različnih označevalcev naenkrat. Večina citometrov ima vsaj tri detektorje fluorescence: FL1 za zeleno, FL2 za rumeno in FL3 za oranžno

fluorescenco (BD Biosciences, 2000). V detekcijski coni se nahaja sistem leč, ki sprejeto svetlobo posredujejo fotopomnoževalkam, ki optične impulze spremenijo v električne, konvertorji pa v končne digitalne impulze. Izmerjene vrednosti električnih signalov po računalniški obdelavi grafično prikažemo in tako o vsaki celici dobimo podatke o njeni relativni velikosti, zrnatosti in o vrstah ter jakosti oddanih fluorescenčnih signalov (Ihan, 1999).

Pretočni citometer se uporablja za merjenje različnih funkcionalnih parametrov, ki so zanimivi tudi za imunologe (June in Moore, 2004), dragocena je predvsem za ločevanje in merjenje odzivov pri različnih vrstah levkocitov, med njimi limfocitov (Shepers in sod., 2009). Z metodo pretočne citometrije lahko analiziramo limfocitne populacije v krvi. Analiza je zlasti pomembna za opredeljevanje prirojenih in pridobljenih imunskih pomanjkljivosti, pri katerih lahko ugotovimo pomanjkanje določene vrste limfocitov. Ker manjkajoči limfociti ne opravljajo predvidenih nalog, imunski odziv ni popoln ali pa ga ni. Merjenje koncentracije oz. določanje deleža celic T pomagalk v krvi je najboljši laboratorijski pokazatelj napredovanja bolezni, kakor tudi uspešnosti zdravljenja (June in Moore, 2004).

Razvoj številnih novih fluorescentnih sond pa omogoča tudi merjenje koncentracije različnih znotrajceličnih ionov v posameznih živih celicah. Mednje spadajo kalcij, magnezij, natrij, kalij in vodik (merjenje pH). Vse prejšnje tehnike merjenja znotrajceličnih ionov so določile srednjo vrednost za populacijo celic, kar pa ne omogoča optimalne ločljivost celičnih odzivov na stimulacije. Pretočni citometer je še posebej uporaben za ta namen, saj lahko meri ionske koncentracije v velikem številu posameznih celic in omogoča povezavo ionske koncentracije z drugimi parametri, kot so imunofenotip in celični cikel (June in Moore, 2004).

Spremembe v koncentracijah znotrajceličnega kalcija lahko torej vrednotimo in opazujemo z uporabo fluorescentnih Ca^{2+} indikatorjev, kot je Fluo-3, ki ga lahko vnesemo v intaktne celice (Shepers in sod., 2009). Fluo-3 je eden izmed najustreznejših kalcijevih indikatorjev za uporabo pretočne citometrije. Absorbcijski in emisijskih vrh ima pri 506 in 526 nm. Vzbujen je lahko z argonskim ionskim laserjem pri 488 nm, njegova oddaja fluorescence

pa se poveča s povečano koncentracijo Ca^{2+}, ki je lahko od 5 do 10-kratna, pri tako velikem razponu pa še vedno ostaja visoko občutljiv (Takahashi in sod.,1999). Filtri za fluorescin in njegova visoka afiniteta do Ca^{2+} z argonsko ionskim laserjem omogočajo vidljivost fiziološko pomembnih sprememb v koncentracijah Ca^{2+} (Shepers in sod., 2009).

Ker večina kemijskih fluorescentnih indikatorjev v celico ne more prodirati, se je za vnos Ca^{2+} indikatorjev potrebno poslužiti posebnih invazivnih ali biokemisjkih tehnik. Veliko fluorescentnih kalcijevih indikatorjev je derivatiziranih z AM – acetoksimetil ester (June in Moore, 2004), ki so celično propustni. Za razliko od prvotne aktivne oblike lahko indikator v obliki AM s pasivno difuzijo potuje po celični membrani in ko je enkrat v notranjosti celice, esteraze cepijo AM skupino s sonde, kar pripelje do vnosa indikatorja, ki v celici sicer ni dovoljen (Takahashi in sod., 1999).

2.4 SPODBUJEVALCI ZNOTRAJCELIČNEGA Ca^{2+}

Ionomicin, PHA, aktivirajoča protitelesa CD3 skupaj s kostimulatorno molekulo CD28 in LPS so snovi, ki ob vezavi na limfocitne receptorje delujejo kot spodbujevalci in povečujejo koncentracijo znotrajceličnega kalcija.

2.4.1 Ionomicin

Ionofor je v lipidih topna proteinska molekula, ki jo navadno sintetizirajo mikroorganizmi za transport ionov preko lipidnega dvosloja celične membrane. Obstajata dve vrsti ionoforov. Mobilni prenašalci ionov so male molekule, ki se vežejo z določenim ionom in s tem zaščitijo njegov naboj pred medijem, ki ga obdaja, nato pa ga prenesejo preko hidrofobne lipidne membrane. Medtem kanalčki v membrani ustvarijo hidrofilno poro in s tem omogočijo ionom prehod brez kontakta z membrano. Ionofori prekinejo transmembranski koncentracijski gradient ionov, ki je potreben za pravo delovanje in preživetje mikroorganizmov, zato pravimo, da imajo antibiotične lastnosti. Mikrobi jih izdelujejo zato, da se branijo pred drugimi konkurenčnimi mikrobi. V laboratorijskih

raziskavah jih uporabljamo za porast prepustnosti bioloških membran za določene ione, nekateri so v uporabi tudi kot antibiotiki (Robič, 2008).

Ionomicin je ionofor, ki izhaja iz aktinobakterije *Streptomyces conglobatus.* Deluje kot gibljivi prenašalec kationov preko lipidne membrane. Samostojen je prosta kislina z molekulsko maso 709 Da in empirično formulo C41H72O9, kot kalcijeva sol pa ima molekulsko maso 746 Da in empirično formulo C41H70O9Ca. Za prenos 1 mola kalcija preko membrane je tako potreben 1 mol ionomicina (Liu in Hermann, 1978). Ionomicin deluje celično nespecifično in poveča koncentracijo kalcija v celici zaradi prenosa kalcija iz zunajceličnega prostora in iz znotrajceličnih predelov, ki vsebujejo zalogo kalcija (Clementi in sod., 1994).

Ionomicin z odpiranjem kalcijevih kanalčkov poviša koncentracijo kalcija v celici in tako posnema delovanje IP3 (Gajewski in sod., 1990). V raziskavah se uporablja za zviševanje koncentracije Ca^{2+} pri opazovanju transporta Ca^{2+} preko biološke membrane. Uporablja se tudi za stimulacijo znotrajcelične produkcije citokinov, interferona, perforina, IL-2 in IL-4, navadno v kombinaciji s PMA (4-metoksiamfetamin, ki deluje kot poživilo). Ti citokini so pomembni pri vnetnem odgovoru. Ionomicin se veže v membrane celice in poruši gradient Ca^{2+} med zunanjostjo in notranjostjo citosola, kar se splošno uporablja kot umeritev koncentracije kalcijevih ionov, saj lahko dobimo najmanjši in največji odgovor celic na Ca^{2+} (Robič, 2008).

Z ionomicinom, ki je selektiven za Ca^{2+}, na preprost način proučujemo zmogljivost celic glede na koncentracijo Ca^{2+}. V plazemsko membrano vstavimo fiksno pretočno pot Ca^{2+} in spremljamo spremembe koncentracije Ca^{2+}. Poleg ostalih celic ionomicin povzroči spremembe tudi v limfocitih B in T. V teh celicah je sprememba koncentracije Ca^{2+} odvisna od membranskega potenciala s stimulacijo hiperpolarizacije in inhibicijo depolarizacije, kar povzroči dvig Ca^{2+}. Dvig v koncentraciji Ca^{2+} po dodatku ionomicina je veliko višji pri celicah T kot pa pri B (Mason in Grinstein, 1993).

2.4.2 Fitohemaglutinin (PHA)

Lektini so proteini, ki vežejo ogljikove hidrate reverzibilno in na specifičen način. Pogosto imajo hemaglutininske lastnosti. Mednje spada tudi fitohemaglutinin (PHA), ki je lektinski izvleček rdečega fižola v zrnju (*Phaseolus vulgaris*). Sestavljen je iz dveh sorodnih si proteinov, levkoaglutininov PHA-L in PHA-E. Črki L in E v imenu označujeta, da proteina aglutinirata bodisi levkocite bodisi eritrocite. Lektini imajo številne učinke na celični metabolizem: inducirajo mitozo, učinkujejo na celično membrano in permeabilnost proteinov, prav tako pa aglutinirajo večino sesalskih rdečih krvničk (Hamelryck in sod., 1996). Poleg aglutinacije človeških eritrocitov ima tudi zmožnost stimulacije limfocitov T, medtem ko ima na limfocite B malo ali nič vpliva (Kosti in sod., 2010).

Fitohemaglutinin je močan spodbujevalec limfocitov, spodbudi lahko od 70 do 90% preoblikovanja običajnih človeških limfocitih, prisotnih v krvnem obtoku. Ta lastnost PHA omogoča preprost, vendar uporaben način za raziskovanje limfocitnega vedenja (Trubowitz in sod., 1966). Ravno zaradi tega ga uporabljamo kot enega izmed spodbujevalcev limfocitnih celic pri opazovanju koncentracije znotrajceličnega Ca^{2+}.

2.4.3 Monoklonska protitelesa CD3 in kostimulatorna protitelesa CD28

Ker so si limfociti med seboj morfološko zelo podobni, jih med seboj razlikujemo s hibridiziranimi monoklonskimi protitelesi CD. Posamezna vrsta monoklonskih protiteles je specifična za eno vrsto molekul na površinah človeških limfocitov (Ihan, 2002b).

Protitelesa CD3 so specifična za TCR, ki se nahaja samo na limfocitih T. Kadar delamo imunofluorescenčni test s fluorescenčno označenimi protitelesi, so vse celice, ki fluorescirajo, limfociti T (Ihan, 2002b).

CD28 je najbolje poznana kostimulatorna molekula, kostimulacija CD28 pa ima jasno opredeljeno vlogo. Ob prvem stiku s tujim patogenim aktivira CD8 naivne celice T (citotoksični limfoctiti T). Njihova aktivacija zahteva sprejem dveh signalov antigen predstavitvene celice (APC). Prvi signal potuje preko TCR, drugi, kostimulatorni signal je

zagotovljen s CD28 po vezavi na ligande (CD80 ali CD86) APC. Ta dva signala oblikujeta osnovno dvosignalno teorijo aktivacije limfocitov. Signaliziranje preko CD28 povečuje aktivacijo naivnih celic T, proliferacijo in njihovo preživetje. Prav tako je ta isti signal nujno potreben za razvoj primarnih CD8 T celičnih odgovorov na večino patogenov. Med primarnim CD8 celičnim odgovorom CD28 deluje kot dopolnilni signal skozi TCR - znižuje aktivacijski prag in z izboljšanjem preživetja celic T ščiti pred celično smrtjo, inducirano z aktivacijo, medtem ko sekundarni celični odgovor (ob ponovnem srečanju z istim antigenom) najverjetneje ne zahteva njihove prisotnosti (Borowski in sod., 2007).

2.4.4 Lipopolisaharidi (LPS)

Bakterijska stena je trdno ogrodje, ki daje bakterijam obliko in jim omogoča živeti v okolju, kjer koncentracije osmozno aktivnih molekul niso uravnovešene z bakterijsko citoplazmo. Bakterija v citoplazmo koncentrira številne osmozne aktivne molekule, ki proti okolici povzročijo velik notranji osmotski tlak. Nastali tlak daleč presega trdnost citoplazemske membrane in bakterijo bi razneslo, če je ne bi obdajala trdna stena. Značilna komponenta bakterijske stene je peptidoglikan, ki sestoji iz N-acetilglukozamina in N-acetilmuraminske kisline. Peptidoglikanska mreža ovija po Gramu pozitivne bakterije v številnih plasteh in tvori do 50 % mase bakterijske stene. Po Gramu negativne bakterije so ovite le z enojno ali dvojno plastjo peptidoglikana (5 do 10 % mase bakterijske stene) (Ihan, 2002a).

Bakterijska stena po Gramu negativnih bakterij vsebuje dve dodatni plasti, ki obe navzven obdajata peptidoglikan; ti sta zunanja membrana in periplazemski prostor, ki je vmesni prostor med peptidoglikanom in zunanjo membrano. Zunanja membrana je zgrajena kot asimetrični lipidni sloj, v katerega so vloženi proteini, med njimi so zlasti pomembni porini. Notranji lipidni sloj je podoben fosfolipidnemu sloju citoplazemske membrane. Zunanji lipidni sloj pa sestavljajo lipopolisaharidne molekule (Ihan, 2002a).

Lipopolisaharidi (LPS ali endotoksin) so sestavljeni iz lipidne molekule, imenovane lipid A. Nanj je vezan središčni polisaharid, iz katerega štrlijo navzven terminalne polisaharidne

verige. Osnovo lipida A tvorijo enote fosforiliziranega glukozamina, na katerega so pritrjene dolgoverižne maščobne kisline. Vrsta maščobnih kislin je odvisna od bakterijske vrste. Središčni polisaharid je sestavljen podobno kot pri vseh po Gramu negativnih bakterijah, ki imajo LPS. Po sestavi terminalnih polisaharidnih verig obstajajo med po Gramu negativnimi bakterijami velike razlike. Terminalna polisaharidna veriga je sestavljena iz osnovnih enot. 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). Zaradi raznolike sestave terminalnih polisaharidov obstajajo številne različice antigenov O, samo pri salmonelah jih je znanih več kot 2000 (Ihan, 2002a).

Molekule LPS so pomembne zaradi toksičnih učinkov. LPS spodbudi makrofage, da izločajo velike količine mediatorjev imunskega odziva – citokinov. Večja količina citokinov v organizmu povzroči hude okvare žilja, zato obsežnejša okužba z Gram negativnimi bakterijami lahko povzroči nastanek septičnega šoka. Toksični učinek LPS je skoraj v celoti vezan na lipid A (Ihan, 2002a).

Nekatere po Gramu negativne bakterije, ki so sicer naseljene na sluznicah (npr. najserije, hemofilusi), imajo namesto dolgoverižnih terminalnih polisaharidov mnogo krajše in razvejane polisaharide. Zato pri takih bakterijah namesto o LPS govorimo o lipooligosaharidu. Nekateri lipooligosaharidi imajo terminalne sladkorje, ki so podobni eritrocitnim molekulam. Na te sladkorje lahko bakterija encimsko veže človeško sialično kislino in z njo zamaskira svojo površino, da je imunske celice in protitelesa ne prepoznajo (Ihan, 2002a).

LPS je glavni virulentni dejavnik po Gramu negativnih bakterij, odgovoren za letalne učinke in klinične manifestacije bolezni pri ljudeh in živalih. Sesalci smo zelo občutljivi nanj že v manjših odmerkih (Swain in sod., 2008). Pri nenadzorovanem razmnoževanju in širjenju bakterij po krvi pride do preplavljanja organizma z bakterijami in njihovimi toksičnimi sestavinami. Toksični del molekule LPS je lipid A, ki se sprosti, kadar se bakterije razkrojijo, npr. zaradi delovanja komplementa, fagocitov ali antibiotikov (Koren, 2002). T-celični receptorji TLR-4 (angl. toll-like receptor, TCR) specifično prepoznajo

lipid A in aktivirajo gostiteljev imunski odziv. LPS oziroma lipid A v krvnem obtoku povzroči obsežno sproščanje biološko aktivnih citokinov (Swain in sod., 2008). Odgovoren je za začetek procesov, ki zaradi burnega sistemskega odziva pripeljejo do sepse in septičnega šoka. Inducira nenadzorovano sproščanje vnetnih mediatorjev imunskih celic, zlasti monocitov in makrofagov. Glavni vnetni citokini, proizvedeni med okužbo (TNF-α, interlevkin IL-1β, interferon IFN-γ in IL-12) nepravilno aktivirajo gostiteljev imunski odziv. Obsežna apoptoza limfocitov je ključna točka patogeneze vsake sepse (Jeong in sod., 2009). Sepsa se v najhujših primerih razvije v septični šok s hudo prizadetostjo krvnega obtoka, trdovratnim znižanje krvnega tlaka in odpovedjo več organov. Bolnikovo življenje je ogroženo (Koren, 2002).

2.5 MODULATORJI ZNOTRAJCELIČNEGA Ca^{2+}

Modulatorji imunskega odziva po določenem času izpostavljenosti spremenijo odzivnost celice. Spremenjena celica se tako ob stiku z določenimi mitogeni na le-te odzove drugače, njena odzivnost je lahko povišana ali zmanjšana.

2.5.1 Betaglukan

Betaglukani so naravni polisaharidi mikrobnega izvora (Kim in sod., 2007). Betaglukan je poglavitna komponenta celične stene večine gliv, nekaterih bakterij in rastlin. V celični steni gliv je sestavljen iz D-glukoz, povezanih z (1,3)-β-vezmi, in vsebuje različne količine stranskih verig, povezanih z (1,6)-β-vezmi. V celični steni gliv je betaglukan povezan s hitinom, drugimi polisaharidi in manoproteini in tvori do 60 % suhe teže celične stene gliv. Betaglukani imajo različno molekulsko maso, različno stopnjo razvejanosti in se pojavljajo v treh različnih konformacijah: trojni vijačnici, enojni vijačnici in naključnih spiralnih strukturah. Večinoma so netopni v vodi, raztopijo pa se v razredčenih bazah (Stopinšek in sod., 2011).

Betaglukani imajo imunomodulatorne lastnosti. Delujejo protivnetno in zavirajo nastanek raka, sprožijo nastanek reaktivnih kisikovih spojin, vnetnih mediatorjev in citokinov ter

ojačajo celično citotoksičnost (Stopinšek in sod., 2011). Receptorji naravne imunosti, ki prepoznajo betaglukane, so dektin-1 na makrofagih, ki posredno aktivira fagocite in proizvodnjo citokinov; komplementni receptor 3 ter odstranjevalni receptorji (CD5, CD36 in SCARF1). Aktivirani receptorji komplementa na naravnih celicah ubijalkah, nevtrofilcih in limfocitih so lahko povezani s citotoksičnostjo tumorja (Chen in Seviour, 2007; Kim in sod., 2007).

Med seboj se betaglukani strukturno razlikujejo, imajo različne afinitete na receptorje in posledično ustvarjajo različne imunske odzive gostitelja (Stopinšek in sod., 2011). Človeško telo ni sposobno naravne sinteze betaglukanov, zato so molekule v imunskem sistemu prepoznane kot tuje in sprožijo tako pridobljen kot specifičen imunski odziv, ki sestoji iz celic B in T (Chen in Seviour, 2007). Zaradi tega je potrebna posebno skrbna izbira betaglukanskih produktov, če želimo optimizirati njihovo uporabo. Tudi stene patogenih gliv vsebujejo betoglukan. Čeprav se betaglukan patogenih gliv ne uporablja v klinične namene, je prav tako pomemben za sprožitev protiglivnega odziva gostitelja. Katera komponenta celične stene je spodbujevalec, ni vedno jasno, kot tudi to, ali imajo vse glive podoben način delovanja. Nekateri glivični betaglukani močno spodbujajo naš imunski sistem in delujejo protivnetno – ščitijo pred napadom patogenih mikrobov in škodljivim učinkom okoljskih toksinov ter karcinogenih snovi (Stopinšek in sod., 2011).

2.5.2 Glatiramer acetat

Pomemben cilj raziskav avtoimunskih bolezni, kot je na primer multipla skleroza, je razvoj novih terapij, ki bi specifično prepoznavale samoreaktivne imunske celice. Želeni cilji so spremeniti TCR s kostimulatorno signalno molekulo ter njune znotrajcelične signalne poti. Za multiplo sklerozo so značilne perivaskularne infiltracije CD4 celic T in mononuklearnih celic v centralni živčni sistem z naknadno demielizacijo aksonskih poti, kar vodi v progresivno paralizo (Metz in sod., 2004).

Zdravilo glatiramer acetat s komercialnim imenom Copaxone je sestavljeno iz mešanice aminokislin glutamina, lizina, alanina in tirozina različnih dolžin. Bolniki z recidivno

reminentno multiplo sklerozo si ga s pomočjo injekcije vsakodnevno vbrizgavajo v podkožje. Zdravljenje z glatiramer acetatom sproži premik limfocitov iz oblike proinflamatornih celic pomagalk Th1, ki bolezen ves čas spodbujajo z indukcijo nizke ravni stimulacije TCR, proti Th2 regulatornem celičnem fenotipu. Th2 regulira bolezen in zavira vnetni odziv. Glatiramer acetat lahko tudi blokira predstavitev antigenov s kompetitivno vezavo na molekule MHC (Podojil in Miller, 2009). V kliničnih študijah je glatiramer acetat izkazal zmanjšanje števila in jakosti izbruhov bolezni (Metz in sod., 2004).

2.5.3 Natrijev nukleinat

Natrijev nukleinat (angl. sodium nucleinate, SN), v Rusiji registriran kot Tamerit®, je 2-amino-1,2,3,4,-tetrahidroftalazin-1,4-dion dihidrat natrijve 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. Inhibicija sproščanja citokinov lahko služi kot orodje za nadzor bolezni (Jukić in sod., 2011).

Natrijev nukleinat ob spodbujanju sepse z LPS pri mišjih modelih zavira razvoj le-te. Zavira nastanek vnetnih citokinov v citoplazmi in zaradi tega pri mišjih modelih zavre razvoj sepse. V človeških mononuklearnih celicah, predhodno spodbujenih z LPS-om, ravno tako vpliva na zmanjšanje števila vnetnih citokinov (TNF-α, IFN-γ, IL-6). Jukić in sodelavci so s svojimi poskusi pokazali, da je natrijev nukleinat zaviralec izločanja vnetnih citokinov in se bo v prihodnosti lahko uporabljal za zdravljenje sepse – zdravilo za zaviranje patogenosti molekule LPS (Jukić in sod., 2011).

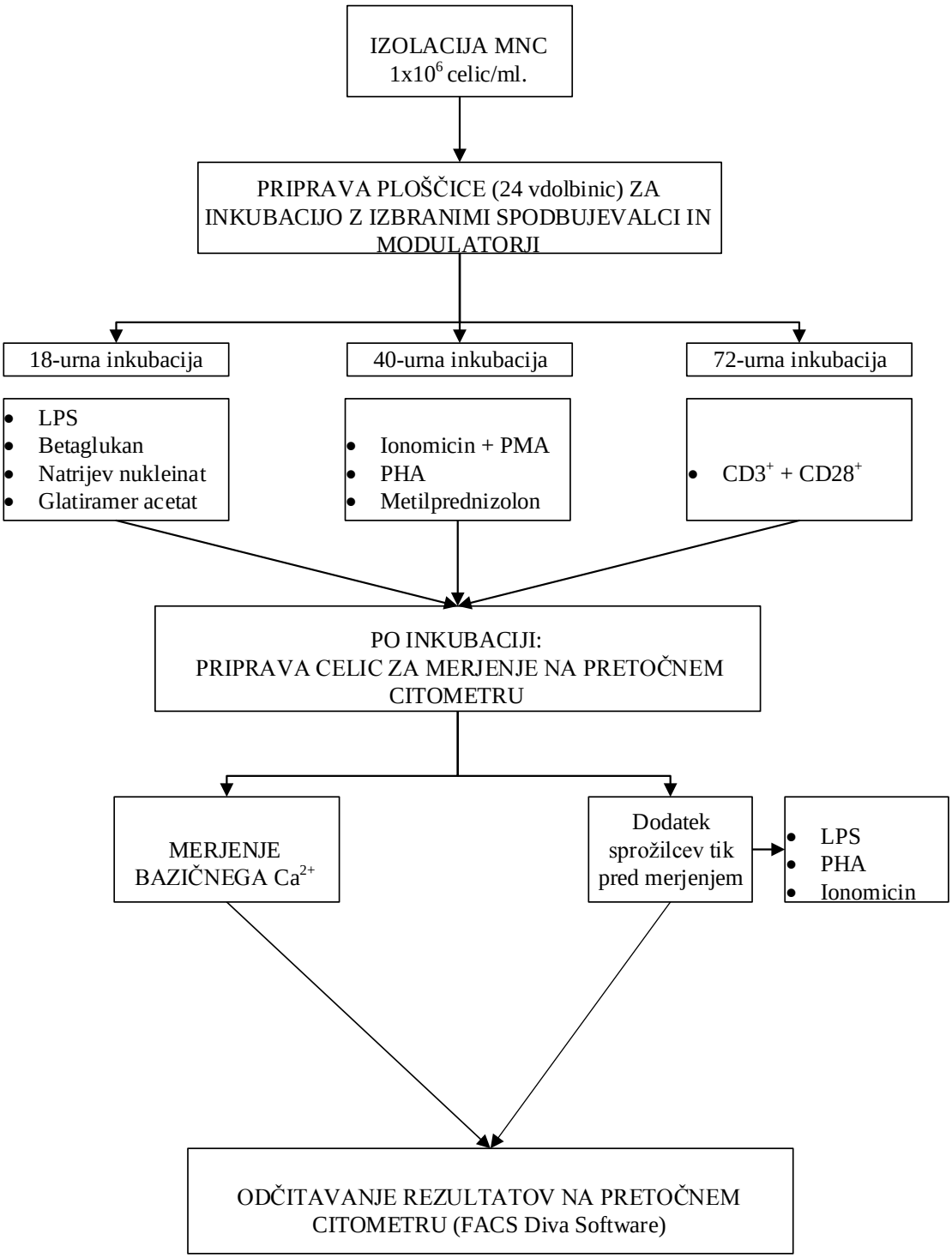
2.5.4 Metilprednizolon

Kortikosteroidi so hormoni, ki jih proizvaja nadledvična žleza. Ti hormoni pomagajo

telesu, da se borijo proti vnetju, alergijskim reakcijam in drugim stresom. Zdravilo metilprednizilon spada pod glukokortikosteroide in metilprednizolna zdravila. Ima dve glavni značilnosti: zmanjšuje vnetja v telesu in delovanje imunskega zdravila, zato mu pravimo tudi protivnetno zdravilo. Prednizolna (Prednisolone) in metilprednizolna (Medrol, Methylpred, Solu-Medrol) zdravila so torej skoraj nepogrešljiva pri zdravljenju z imunosupresijo. Na molekularnem nivoju ti glukokortikosteroidi zavirajo transkripcijo gena za IL-2 in s tem vplivajo na signalno pot pri aktivaciji celic T. Prav tako blokirajo izražanje IL-1, IL-6 in TNFα, zavirajo migracijo monocitov in makrofagov ter zmanjšajo število celic T, eozinofilcev in bazofilcev v obtoku (Prokai in sod., 2012).

Glukokortikosteroidi močno zavirajo kroženje Ca^{2+} in Na^{+} preko plazemske membrane. Metilprednizol inhibira prevzem Ca^{2+} in Na^{+} s plazemske membrane, sintezo RNA/DNA in oksidacijske reakcije ter spodbuja odliv protonov preko mitohondrijskih notranjih membran. Zmanjšuje prosti znotrajcelični Ca^{2+} in odpravlja morebiten dvig v koncentraciji Ca^{2+}. To mu omogoča njegova lastnost raztapljanja v membranah - v velikih koncentracijah vpliva na fizikalno-kemijske lastnosti membrane ter aktivira z membrano povezane proteine (Buttgereit in sod., 1997).

3 MATERIALI IN METODE



Slika 1: Shema poskusa.

Legenda: CD3 + CD28 (aktivirajoča protitelesa CD3 skupaj z kostimulatorno molekulo CD28); PHA (fitohemaglutinin); LPS (lipopolisaharid).

3.1 MATERIALI

3.1.1 Uporabljeni reagenti

- MEDIJ MII:
  - RPMI: 1640 medium (hepes modificated), Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
  - Fetal bovine serum (FCS): Gibco; Auckland, Nova Zelandija
  - Penicilin – Streptomicin: Gibco; Auckland, Nova Zelandija
  - L-glutamin: GlutaMAX ™ I, Gibco; Auckland, Nova Zelandija
- PHA: Phytohemaglutinin 5mg, Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
- Ionomicin: Ionomycin Ca^{2+} salt 1mg, Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
- PMA: Phorbol 12 myristate 13 acetat 1mg, Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
- *E. coli*: *Escherichia coli* ATCC 25922 1 McF (8. 6. 2012)
- Beta-glukan: Wako Chemicals USA, Inc.; ZDA
- Natrijev nukleinat (Tamerit): Dekopharm; Rusija
- Glatiramer acetat (Kopakson): Teva Pharmaceuticals VB (Teva LTD); Izrael
- Metilprednizolon (Medrol): Pfizer Luxemburg; Luksemburg
- CD3: Purified NA/LE mouse anti-human CD3 0,5 mg, BD Biosciences; San Jose, Kalifornia, ZDA
- CD28: Purified NA/LE mouse anti-human CD28 0,5 mg, BD Biosciences; San Jose, Kalifornia, ZDA
- LPS: Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- Ficoll – paque ™ plus (endotoxin tested), GE Healthcare, Švedska
- Epruvete z EDTA: Epruvete BD Vacutainer ® K2E 10,8 mg, BD Phymouth UK; Velika Britanija
- Medij za pripravo celic pred merjenjem na pretočnem citometru (pripravljen na Inštitutu za biokemijo)
- Probenecid (25 g): Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA
- Fluo-3 AM; Sigma-Aldrich; St. Louis, ZDA

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

3.1.2 Priprava reagentov

3.1.2.1 Medij II

Za pripravo medija II smo zmešali:

- 400 ml RPMI
- 20 ml FCS
- 4 ml Penicilin – Streptomicin
- 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 bila 10 mg/ml. Natehtali smo 400 mg Curdlana in dodali 40 ml RPMI. Nato smo mešanico dobro premešali na vorteksnem mešalu. Shranili smo pri -20 °C.

Priprava Betaglukana je potekala v mikrobiološki komori.

3.1.2.3 Medij za pripravo celic pred merjenjem na pretočnem citometru

HBSS (angl. Hank's balanced salt; Hanksova ozmolarna raztopina soli) smo dodali:

- 1 mM kalcij
- 1 mM magnezij
- 1 % (v/v) FBS (toplotno obdelan 1 uro na 56 °C) ali 0,5 % (w/v) BSA

Medij smo hranili na 4 °C (June in Moore, 2004).

Medij za pripravo celic pred merjenjem na pretočnem citometru so pripravili na Inštitutu za biokemijo.

3.1.2.4 Fluo-3 AM (acetoksimethil ester)

10 mg Fluo-3 AM smo raztopili v 1 ml DMSO, da je bila končna koncentracija 10 mg/ml. 200 µl tako pripravljenega Fluo-3 AM smo zmešali z 800 µl medija za pripravo celic pred merjenjem na pretočnem citometru (do končne koncentracije Fluo-3 AM 2 mg/ml). Shranili smo v temo na -20 °C (June in Moore, 2004).

V 1 ml celične suspenzije smo želeli 4 µg/ml Fluo-3 AM, ki smo ga zato k vzorcem dodajali 2 µl.

3.1.2.5 Probenecid, 100 mM

Probenecid (Sigma) smo zmešali z vodo do 100 mM raztopine. Dodali smo 1M NaOH, dokler se probenicid ni raztopil (pH od 9 do 10). Shranili smo na 23 °C (June in Moore, 2004).

3.1.3 Aparature in pribor

- Stojala za epruvete
- Epruvete
- Pipete
- Pasteurjeve pipete
- Centrifuga
- Vorteksno mešalo
- Neubauerjeve komore
- Ploščice za gojenje celičnih kultur z 24 vdolbinicami
- Pretočni citometer BDFACSCanto
- Računalniška oprema pretočnega citometra (BD FACSDiva Software)
- Inkubator
- Vodna kopel
- Mikrobiološka komora
- Hladilna omara (2-8 °C)
- Zamrzovalna omara (-20 °C)

- Zamrzovalna omara (-85 °C)
- Mikroskop

3.2 METODE

3.2.1 Načrt poskusa

Vzorce krvi smo vsakotedensko pridobili iz Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani, na oddelku za preskrbo s krvjo. Darovanje krvi je koordinirala vodja Centra za izbor dajalcev in zbiranje krvi, Polonca Mali, dr. med. Kri so darovali zdravi krvodajalci različne starosti in različnega spola. Vsak krvodajalec je ob darovanju krvi podpisal soglasje za darovanje krvi v znanstvene namene. Vsa dokumentacija je shranjena v Centru za izbor dajalcev in zbiranje krvi. Skupno smo iz Zavoda RS za transfuzijsko medicino dobili 14 vzorcev. Poskus je trajal 7 tednov. Na začetku vsakega tedna smo iz dobljenih vzorcev (2 ali 3 vzorci) izolirali PBMC (mononuklearne celice, osamljene iz krvi, angl. Peripheral Blood Mononuclear Cells). Celice smo inkubirali s spodbujevalci in modulatorji ter tekom tedna merili koncentracijo znotrajceličnega kalcija, ki smo jo dodatno spodbudili z različnimi sprožilci.

V poskusu smo preverjali, kako različne snovi bodisi spodbujajoče bodisi zaviralno vplivajo na koncentracijo in posledično signalizacijo znotrajceličnega kalcija v mononuklearnih krvnih celicah zdravih ljudi. Le-ta nosi ključno vlogo pri določanju nadaljnje limfocitne aktivnosti (na primer razmnoževanja) (Lidy Verburg-Van Kemande in sod., 1998).

Snovi, ki smo jih dodajali mononuklearnim krvnim celicam, smo razdelili v tri skupine. Prvo skupino smo poimenovali spodbujevalci, za katere smo predvidevali, da močno povišajo koncentracijo kalcija v celici. Drugo skupino predstavljajo modulatorji, ki ob svoji prisotnosti koncentracijo znotrajceličnega kalcija lahko povečajo ali pa tudi zmanjšajo.

Vsakemu vzorcu smo po inkubaciji s spodbujevalci ali modulatorji izmerili njegovo bazično vrednost kalcija, to je bila koncentracija znotrajceličnega kalcija brez dodanih sprožilcev. Nato smo tik pred merjenjem koncentracije kalcija na pretočnem citometru vsakemu vzorcu dodali različne sprožilce, snovi iz tretje skupine, za katere smo predvidevali, da koncentracijo znotrajceličnega kalcija po inkubaciji s spodbujevalci ali modulatorji dodatno spodbudijo. Sprožilci so bili v našem poskusu LPS, PHA in ionomicin.

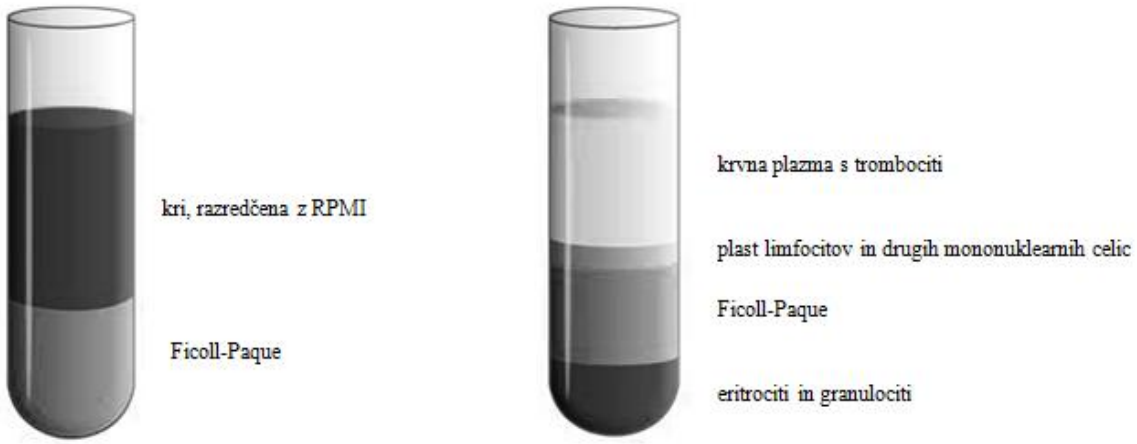
Preglednica 1: Spodbujevalci, modulatorji in sprožilci v našem poskusu.

SPODBUJEVALCI	**MODULATORJI**	**SPROŽILCI**
Ionomicin + PMA	*E. coli* + betaglukan	LPS
$CD3^+ + CD28^+$	*E. coli* + glatiramer acetat	PHA
PHA	*E. coli* + natrijev nukleinat	IONOMICIN
E. coli	*E. coli* + metilprednizolon	

Legenda: PHA (fitohemaglutinin); LPS (lipopolisaharid).

3.2.2 Osamitev PBMC iz venske krvi

Mononuklearne celice smo iz krvi izolirali z metodo Ficoll Paque. Metoda je temeljila na razlikah v gostoti mononuklearnih celic v primerjavi z drugimi krvnimi celicami. Za izolacijo PBMC na gostotnem gradientu smo kot ločevalni medij uporabili Ficoll Paque. Le-ta povzroči nastajanje skupkov eritrocitov, ki se po centrifugiranju usedejo na dno epruvete. Granulociti zaradi svoje gostote med centrifugiranjem prepotujejo plast medija v celoti, po centrifugiranju jih zato najdemo nad eritrociti in pod plastjo ločevalnega medija. Limfociti, monociti in trombociti so prisotni na meji med Ficoll Paque-om in krvno plazmo v obliki belega obročka. Na vrhu ostane krvna plazma in trombociti. Za osamitev PBMC odpipetiramo limfocitni pas. Z nadaljnjim spiranjem odstranimo še trombocite. Tako dobimo suspenzijo celic, ki vsebuje 95±5 % mononuklearnih celic. Delež živih celic je 95±5 %. S to metodo lahko iz vzorca krvi osamimo 50±15 % vseh limfocitov (Bøyum, 1964; Isolation of mononuclear cells: Methodology and applications, 2007).

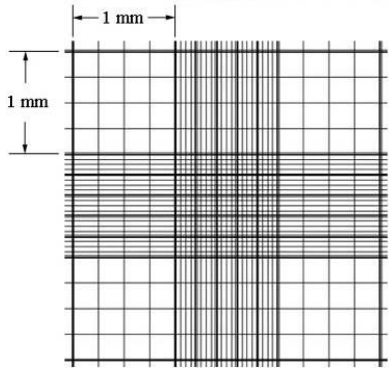


Slika 2: Shematični prikaz ločitve krvi na Ficoll-Hypaque (Isolation of mononuclear cells, 2007: 9).

Postopek osamitve PBMC je potekal v sterilnih pogojih. Vzorec krvi posameznega krvodajalca je bil razdeljen v dve 10-ml epruveti z EDTA. Vsak vzorec krvi smo ponovno razdelili v dve enaki epruveti, dobro premešali na vorteksnem mešalu in jo nato z RPMI razredčili v razmerju 1:1. Vsakega izmed štirih vzorčkov smo razdelili na dva enaka dela in previdno nadplastili na gostotno blazinico Ficoll – Paque (2 ml). Nato smo vzorce centrifugirali 20 minut pri 1800 obratih na minuto in 20 °C. Po centrifugiranju smo s Pasteurjevo pipeto odstranili krvno plazmo, limfocitni pas pa previdno ločili od plasti Ficoll - Paque in odpipetirali v novo epruveto. Pri tem smo pazili, da s pipeto nismo zajeli granulocitov, ki so se posedli na dno epruvete. Iz dveh epruvet, napolnjenih z ločevalnim medijem Ficoll – Paque-om, smo limfocitne oblake združili v eno epruveto. Limfocite smo ponovno redčili z RPMIv razmerju 1:1, ročno premešali in centrifugirali 10 minut pri 1800 obratih na minuto in 20 °C. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in celice razbili z mešanjem na vorteksnem mešalu. Na koncu smo vsakemu vzorcu dodali 5 ml hranilnega medija MII in združili vsak vzorec v svojo epruveto. Suspenzija PBMC je bila pripravljena za štetje na Neubaurjevi komori.

3.2.3 Uravnavanje koncentracije celic in določanje števila PBMC v vzorcih

Osamljene celice smo resuspendirali v mediju za pripravo celic pred merjenjem na pretočnem citometru in uravnali koncentracijo celic do 1×10^6 celic/ml. Krvne celice smo šteli pod mikroskopom v komorah za štetje krvnih celic. To so steklene ploščice, ki imajo v osrednjem delu vrisano mrežo. Različne vrste komor imajo različne mreže. Uporabili smo Neubauerjevo komoro. Celice smo šteli v štirih velikih kvadratih s ploščino 1 mm^2, ki jih sestavlja 16 manjših kvadratov. Prostornina pod velikim kvadratom med objektnim in krovnim stekelcem je 0,1 mm^3 (Žemva, 1968).



Slika 3: Mrežni sistem, vrisan na Neubauerjevi komori (Žemva, 1968: 176).

Za ugotavljanje števila živih, nepoškodovanih celic smo uporabili tripansko modrilo. To je vitalno kislo barvilo, ki ga celice z normalno prepustnostjo membrane ne vsrkavajo, če pa je membrana poškodovana, barvilo vdre v celico. Mrtve in okvarjene celice se zato obarvajo modro (Vozelj, 1996). V 1 ml-epruveto smo odpipetirali 900 µl tripanskega modrila (0,1 % modrila v 0,154 M NaCl) in 100 µl celične suspenzije ter premešali na vorteksnem mešalu. Tako pripravljeno razredčeno suspenzijo celic smo nanesli na Neubauerjevo komoro. PBMC, ki smo jih opazovali s svetlobnim mikroskopom, so bile okrogle, imele so debelejšo membrano in svetile zeleno.

PBMC smo prešteli v štirih velikih kvadratih in izračunali povprečje (N). Število celic v enem mililitru prvotne suspenzije izračunamo po enačbi (1), ki upošteva vsa redčenja med pripravo suspenzije za štetje celic. Nato smo suspenzijo s hranilnim medijem uravnali do koncentracije 1×10^6 PBMC/ml in jo uporabili za pripravo celičnih kultur.

$$\text{število celic/mililiter} = N / 0{,}1 \times 10^4 \qquad \text{... (1)}$$

3.2.4 Stimulacije limfocitov z različnimi modulatorji in merjenje koncentracije znotrajceličnega kalcija

Po uravnavanju koncentracije mononuklearnih celic smo jih pripravili za inkubacijo z različnimi spodbujevalci in modulatorji. Za vsak spodbujevalec in modulator smo preračunali začetni volumen (µl) v 1 ml celic, da smo dobili želeno končno koncentracijo. Modulatorjem imunskega odziva smo predhodno dodali tudi določeno koncentracijo inaktivirane *E. coli*. Celice in njihove stimulatorje ter modulatorje smo napipetirali v ploščico za merjenje celičnih kultur z 24 vdolbinicami. Za vsak vzorec smo pripravili tudi negativno kontrolo, ki je bila suspenzija PBMC v hranilnem mediju MII. Ploščico smo inkubirali na 37 °C po pripadajočih inkubacijskih časih.

Preglednica 2: Končna koncentracija in inkubacijski časi spodbujevalcev in modulatorjev koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih.

SPODBUJEVALEC /MODULATOR	KONČNA KONCENTRACIJA	INKUBACIJA
LPS	10 ng/ml	18 ur
E. coli	$1x10^6$ CFU/ml	18 ur
BETAGLUKAN + *E. coli*	200 µg/ml + $1x10^6$ CFU/ml	18 ur
NK + *E. coli*	7 µg/ml + $1x10^6$ CFU/ml	18 ur
GA + *E. coli*	50 µg/ml + $1x10^6$ CFU/ml	18 ur
IONOMICIN + PMA	500 nM + 3,33 ng/ml	40 ur
PHA	5 µg/ml	40 ur
MP + *E. coli*	1 µg/ml + $1x10^6$ CFU/ml	40 ur
$CD3^+$ + $CD28^+$	1 µg/ml + 5µg/ml	72 ur

Legenda: LPS (lipopolisaharid); NK (natrijev nukleinat); GA (glatiramer acetat); PHA (fitohemaglutinin); MP (metilprednizolon).

3.2.5 Priprava celic za merjenje na pretočnem citometru

Po določenem času inkubacije s spodbujevalci ali modulatorji smo celice iz vdolbine na ploščice prenesli v plastične epruvete. Celicam z njihovimi spodbujevalci ali modulatorji smo dodali 100 mM probenecida do končne koncentracije 40 µg/ml ter 2 mg/ml Fluo3-AM

do končne koncentracije 2 μg/ml. Po dodatku reagentov smo celice 30 minut inkubirali v vodni kopeli pri 37 °C in jih nato centrifugirali 6 minut pri 180 g in sobni temperaturi. Supernatant smo odlili in previdno resuspendirali v 200 μl medija za pripravo celic pred merjenjem na pretočnem citometru Končna koncentracija celic je bila $3x10^6$ celic/ml.

3.2.6 Imunokarakterizacija in merjenje koncentracije znotrajceličnega Ca^{2+} na pretočnem citometru

Tako pripravljene celice smo lahko pomerili na pretočnem citometru. V laboratoriju za celično imunologijo (CEL) na Katedri za mikrobiologijo in imunologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo se uporablja pretočni citometer BD FACSCanto, na katerem je nameščena programska oprema BD FACSDiva.

Slika 4: BD Biosciences. 2005. BD FACSCanto™ Flow Cytometer. San Jose, BD: 12 str.

Na pretočnem citometru smo vedno najprej izmerili bazično vrednost koncentracije znotrajceličnega kalcija, nato pa celice dodatno spodbudili z različnimi sprožilci (LPS, PHA, ionomicin), ki smo jih dodali tik pred merjenjem na pretočnem citometru.

Preglednica 3: Končna koncentracija sprožilcev koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih.

SPROŽILEC	KONČNA KONCENTRACIJA
LPS	100 ng/ml
PHA	5 µg/ml
IONOMICIN	0,02 µg/ml

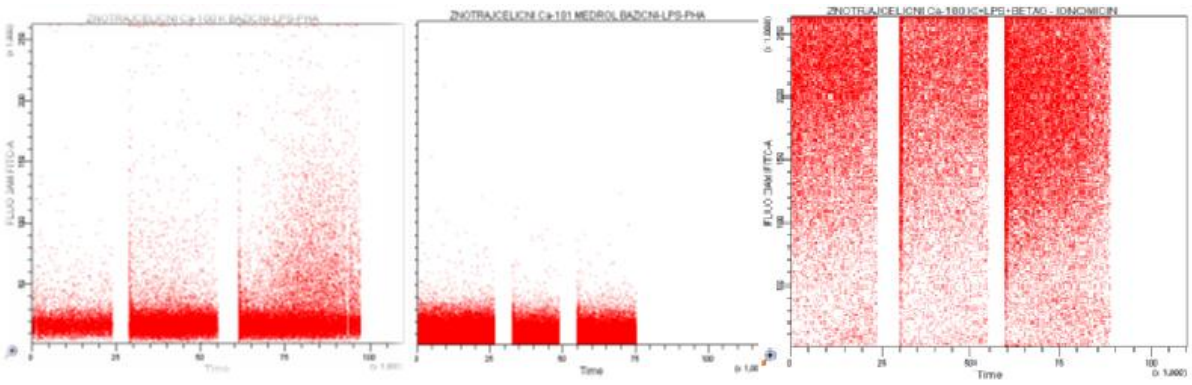
Legenda: PHA (fitohemaglutinin); LPS (lipopolisaharid).

Vsak vzorec, ki smo mu dodali sprožilec, smo tik pred merjenjem dobro premešali. Čas od dodatka sprožilca do merjenja na pretočnem citometru je moral biti zaradi hitrega odziva koncentracije znotrajceličnega kalcija na sprožilec čim krajši.

Epruveto z vzorcem celic smo ročno pripeli na nosilec citometra. Koncentracijo znotrajceličnega kalcija smo merili približno 5 minut oziroma dokler vzorca ni zmanjkalo.

Po merjenju na pretočnem citometru je le-ta v programu FACSDiva izrisal točkast diagram, ki je prikazoval svetilnost Fluo3-AM v odvisnosti od časa. Iz svetilnosti Fluo3-AM smo sklepali na koncentracijo znotrajceličnega kalcija različno spodbujenih ali moduliranih celic z različnimi sprožilci.

S pomočjo programske opreme pretočnega citometra, BD FACSDiva, smo na grafih opazovali svetilnost Fluo3-AM, ki se je vezal na znotrajcelični Ca^{2+}, v odvisnosti od časa (Shepers in sod., 2009; June in Moore, 2004). Glede na rezultate svetilnosti (povprečna vrednost fluorescence v opazovani populaciji limfocitov) smo sklepali na koncentracijo znotrajceličnega kalcija. Več kot je bilo celic pri višji svetilnosti, ki so tvorile zgoščen vrh, višja je bila koncentracija znotrajceličnega kalcija. Če je bilo število celic večje pri nižjih svetilnostih, je bila koncentracija znotrajceličnega kalcija manjša.



Slika 5: Koncentracija znotrajceličnega kalcija brez dodanega spodbujevalca ali modulatorja (slika levo), ob dodatku metilprednizolona, ki je močan zaviralec imunskega odziva (slika na sredini) ter ob sprožilcu z ionomicinom (slika desno). Na vsaki izmed slik je v prvem stolpcu prikazana bazična koncentracija znotrajceličnega kalcija (brez dodatka sprožilca), drugi stolpec prikazuje koncentracijo znotrajceličnega kalcija ob dodatku sprožilca LPS-a ter tretji ob dodatku sprožilca PHA. Vsaka slika prikazuje en vzorec.

3.2.7 Označevanje celic po metodi EdU

Za preverjanje delovanja molekule LPS na koncentracijo znotrajceličnega kalcija smo uporabili metodo EdU. Metoda EdU temelji na proliferaciji limfocitov, ki je posledica različnih koncentracij znotrajceličnega kalcija.

EdU ali 5-etinil-2′-deoksiuridin nukleozidni je analog timina, ki se vgradi v DNK med aktivnim podvojevanjem dvoverižne DNK. Zaznavanje vgrajenega EdU temelji na kovalentni reakciji med azidom in alkinom (Invitrogen Click-iT® EdU flow cytometry assay kits, 2011).

Celice smo inkubirali od 7 dni pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO2. Zadnjih 20 ur inkubacije smo jih dodali 10µM EdU.

200 µL celicam smo po končani inkubaciji dodali 3 ml 1 % BSA v PBS pufru ter centrifugirali 5 minut pri 300 g. Nato smo celice resuspendirali v 100 µl Click-iT fiksativa (Invitrogen™ Click-iT® EdU kit) ter dobro premešali in inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi v temi. Po končani inkubaciji smo celicam znova dodali 3 ml 1 % BSA v PBS pufru ter jih centrifugirali 5 minut pri 300 g. Nato smo celice resuspendirali v 100 µl Click-

iT saponin-based permebealization and wash reagent (Invitrogen™ Click-iT® EdU kit) ter dobro premešali. Celice smo inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi v temi. Po končani inkubaciji smo dodali 0,5 ml Click-iT reakcijske mešanice* (Invitrogen™ Click-iT® EdU kit) ter dobro premešali. Celice smo inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi v temi ter jim po končani inkubaciji dodali 3 ml 1x Click-iT saponin-based permebilization and wash reagenta (Invitrogen™ Click-iT® EdU kit) ter znova centrifugirali 5 minut pri 300 g. Na koncu smo celice resuspendirali v 200 µl 1x Click-iT saponin-based pemebilization and wash reagentu (Invitrogen™ Click-iT® EdU kit) in na pretočnem citometru izmerili količino vgrajenega EdU.

3.2.8 Priprava kulture *Escherichia coli*

Za spodbujanje limfocitov smo namesto komercialnega LPS v drugem delu poskusa uporabili inaktivirano kulturo *E. coli* (Haller in sod., 2000). Kulturo *E. coli* smo inaktivirali s kuhanjem pri 100 °C za 30 minut.

Za kontrolo inaktivacije smo pripravili 2 epruveti po 200 µl kulture skupaj z 1 ml RPMI. Eno epruveto smo inkubirali v inkubatorju s CO_2, pri 37 °C, drugo pa v inkubatorju brez CO_2. Inkubacija je potekala 4 dni.

V kolikor je bilo gojišče po 4-dnevni inkubaciji bistro, smo smatrali, da je bila inaktivacija uspešna, ker kultura *E. coli* ni zrastla.

3.2.9 Statistična analiza podatkov

Iz dobljenih podatkov smo izračunali povprečne vrednosti (x), standardne odklone (SD) ter standardne napake (SE) in jih predstavili na stolpičastem grafikonu. Testirali smo razlike v variancah, pri čemer smo za normalno porazdelitev uporabili Studenotov *t- test*, in sicer dvostransko t-statistiko za povprečne vrednosti. Za stopnjo tveganja smo izbrali 0,05, kar pomeni, da je razlika med vzorcema statistično značilna, če je vrednost p manjša od 0,05 in ni značilna, če je večja od 0,05.

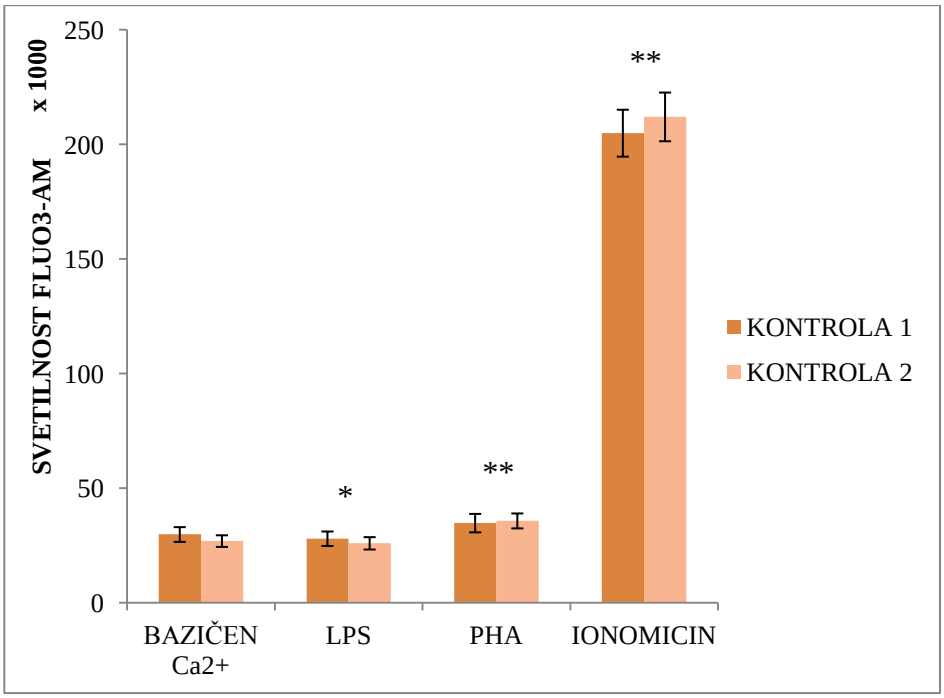
Podali smo izračunane normalne vrednosti za negativno kontrolo ter pozitivne spodbujevalce znotrajceličnega kalcija in pripadajoče indekse v primerjavi z negativno kontrolo.

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programsko opremo Microsoft Excell, MS Office 2010.

4 REZULTATI

4.1 NEGATIVNA KONTROLA POSKUSA

V našem poskusu so negativno kontrolo predstavljale mononuklearne celice brez dodanih spodbujevalcev ali modulatorjev. Koncentracijo kalcija negativne kontrole smo izmerili prvi dan nastavitve poskusa (kontrola 1) ter zadnji dan, 72 ur po inkubaciji (kontrola 2). Ker se rezultati obeh kontrol niso bistveno razlikovali, smo izračunali njuno povprečno vrednost in le-to upoštevali kot skupno negativno kontrolo za primerjavo rezultatov koncentracije znotrajceličnega kalcija ostalih vzorcev.



Slika 6: Povprečne vrednosti znotrajceličnega kalcija negativne kontrole po 24. urah (kontrola 1) in po 72. urah (kontrola 2) ter primerjava bazičnega kalcija kontrole s sprožilci LPS, PHA in ionomicinom za 12 vzorcev.

Legenda: PHA (fitohemaglutinin); LPS (lipopolisaharid).

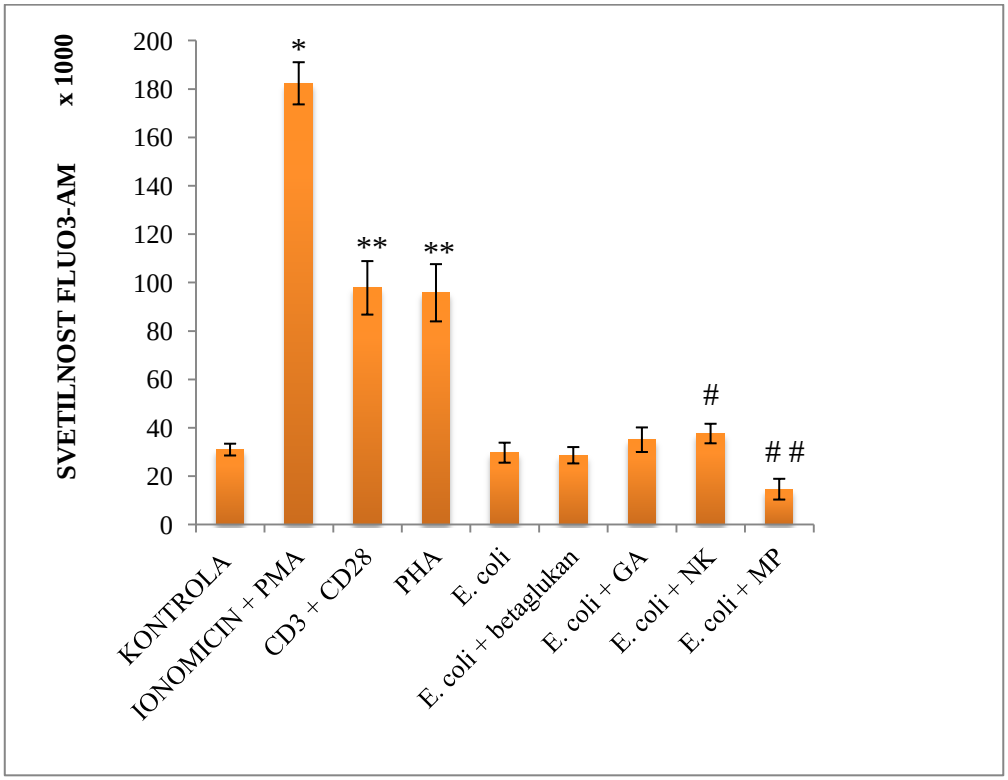
Opombe:

* - statistično različna koncentracija v primerjavi s kontrolo (bazični kalcij) pri $0{,}01 \leq p < 0{,}05$

** - statistično različna koncentracija v primerjavi s kontrolo (bazični kalcij) pri $p < 0{,}01$

4.2 BAZIČNE VREDNOSTI KONCENTRACIJE ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA

S pomočjo bazične vrednosti koncentracije kalcija v vzorcu smo primerjali vpliv različnih sprožilcev (LPS, PHA, ionomicin) na koncentracijo kalcija po inkubaciji s spodbujevalci in modulatorji. Prav tako smo primerjali bazične vrednosti koncentracije kalcija glede na dodan spodbujevalec ali modulator, da bi ugotovili razlike med različnimi spodbujevalci in modulatorji na kasnejšo koncentracijo znotrajceličnega kalcija.



Slika 7: Povprečne vrednosti bazične koncentracije znotrajceličnega kalcija za 2 (ionomicin + PMA), 8 (*E. coli* + GA), 10 (CD3 + CD28, PHA, *E. coli*, *E. coli* + betaglukan, *E. coli* + NK, *E. coli* + MP) ter 12 vzorcev (kontrola).

Legenda: CD3 + CD28 (aktivirajoča protitelesa CD3 skupaj s kostimulatorno molekulo CD28); PHA (fitohemaglutinin); GA (glatiramer acetat); NK (natrijev nukleinat); MP (metilprednizolon).

Opombe:

* - statistično različna koncentracija v primerjavi s kontrolo pri $0{,}01 \leq p < 0{,}05$

** - statistično različna koncentracija v primerjavi s kontrolo pri $p < 0{,}01$

- statistično različna koncentracija v primerjavi s kontrolo (*E.coli*) pri $0{,}01 \leq p < 0{,}05$

- statistično različna koncentracija v primerjavi s kontrolo (*E.coli*) pri $p < 0{,}01$

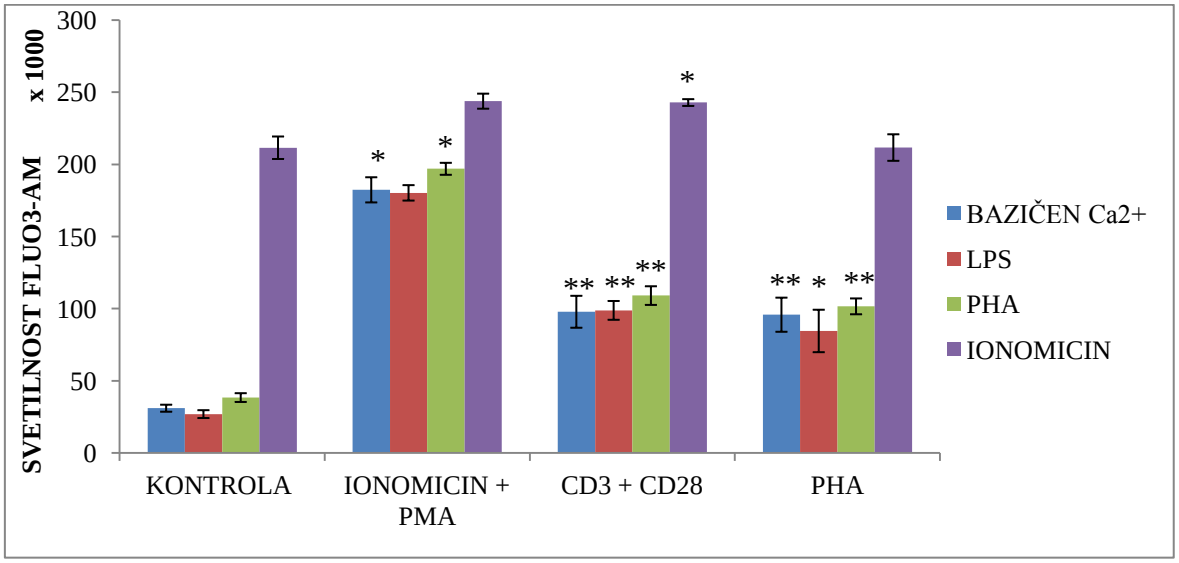
4.3 SPODBUJEVALCI KONCENTRACIJE ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA

Prva skupina dodanih učinkovin, ki smo jih v poskusu preučevali, so spodbujevalci znotrajceličnega kalcija. To so učinkovine z znanim načinom delovanja, ki koncentracijo kalcija v celici ob svoji prisotnosti povečujejo. Služile so nam kot pozitivne kontrole, ki smo jih nato primerjali s snovmi, katerih učinkov ne poznamo ter negativno kontrolo in na podlagi rezultatov sklepali na njihovo delovanje. Spodbujevalci so v našem poskusu ionomicin skupaj z PMA, PHA ter aktivirajoča protitelesa CD3 skupaj s kostimulatorno molekulo CD28.

Za statistično značilno primerjavo smo testirali razlike v variancah, pri čemer smo uporabili Studentov dvostranski *t-test* za povprečne vrednosti. Za stopnjo tveganja smo izbrali 0,05, kar pomeni, da je razlika med vzorcema statistično značilna, če je vrednost p manjša od 0,05 in ni značilna, če je večja od 0,05. Naša ničelna hipoteza je bila, da je povprečje razlik enako nič. V nasprotnem primeru smo hipotezo zavrgli in obdržali hipotezo, da povprečje razlik ni enako nič.

Vpliv spodbujevalcev ionomicina skupaj z PMA, PHA ter protitelesa CD3 skupaj s kostimulatorno molekulo CD28 na koncentracijo znotrajceličnega kalcija smo statistično primerjali z vrednostmi znotrajceličnega kalcija negativne kontrole brez spodbujanja.

V grafikonih smo predstavili povprečne vrednosti, standardne napake in statistično značilne rezultate vseh spodbujevalcev glede na bazično koncentracijo kalcija (brez dodanega sprožilca) ter dodanih sprožilcev: LPS, PHA in ionomicina.



Slika 8: Bazična koncentracija znotrajceličnega kalcija ter koncentracija znotrajceličnega kalcija spodbujevalcev po dodatni stimulaciji s sprožilci LPS, PHA in ionomicinom za 2 (ionomicin + PMA), 10 (CD3 + CD28, PHA) ter 12 vzorcev (kontrola).

Legenda: CD3 + CD28 (aktivirajoča protitelesa CD3 skupaj s kostimulatorno molekulo CD28); PHA (fitohemaglutinin); LPS (lipopolisaharid).

Opombe:

* - statistično različna koncentracija v primerjavi s kontrolo pri $0,01 \leq p < 0,05$

** - statistično različna koncentracija v primerjavi s kontrolo pri $p < 0,01$

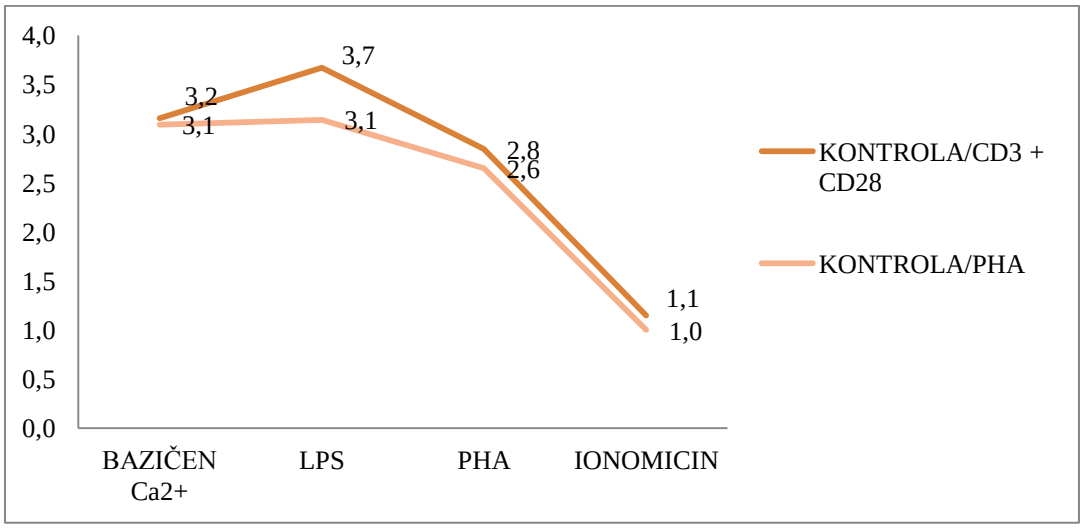
4.3.1 Normalne vrednosti in razmerja povprečnih vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih kontrole in spodbujevalcev

Za negativno kontrolo (mononuklearne celice brez dodanih spodbujevalcev) in spodbujevalca CD3 skupaj s kostimulatorno molekulo CD28 ter PHA smo izračunali normalne vrednosti bazične koncentracije znotrajceličnega kalcija in sprožilce LPS, PHA ter ionomicin. V preglednosti so podane svetilnosti, ki predstavljajo povprečne vrednosti fluorescence v opazovani populaciji limfocitov.

Vrednosti negativnih kontrolnih vzorcev smo primerjali z vrednostmi, ki smo jih izmerili v vzorcih s spodbujevalci in za vsak sprožilec med parom izračunali indekse.

Preglednica 4: Normalne vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija zdravih krvodajalcev: negativna kontrola in spodbujevalci CD3 + CD28 ter PHA brez dodanih sprožilcev (bazična koncentracija znotrajceličnega kalcija) in ob dodanih sprožilcih LPS, PHA in ionomicinu za 10 (CD3 + CD28, PHA) ter 12 vzorcev (kontrola). Na sliki so prikazane normalne vrednosti svetilnosti (povprečne vrednosti fluorescence v opazovani populaciji limfocitov).

	BAZIČEN Ca^{2+}	**LPS**	**PHA**	**IONOMICIN**
KONTROLA	21254 - 40763	17503 - 36346	26228 - 50552	180352 - 242729
CD3 + CD28	61168 - 134524	81560 - 116042	87621 - 130513	235027 - 250678
PHA	56578 - 135046	45631 - 123465	83418 - 119806	181143 - 242188



Slika 9: Razmerja povprečnih vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija med negativno kontrolo in spodbujevalcema CD3 in CD28 ter PHA brez dodanih sprožilcev (bazična koncentracija znotrajceličnega kalcija) in ob dodanih sprožilcih LPS, PHA in ionomicinu za 10 (CD3 + CD28, PHA) ter 12 vzorcev (kontrola).

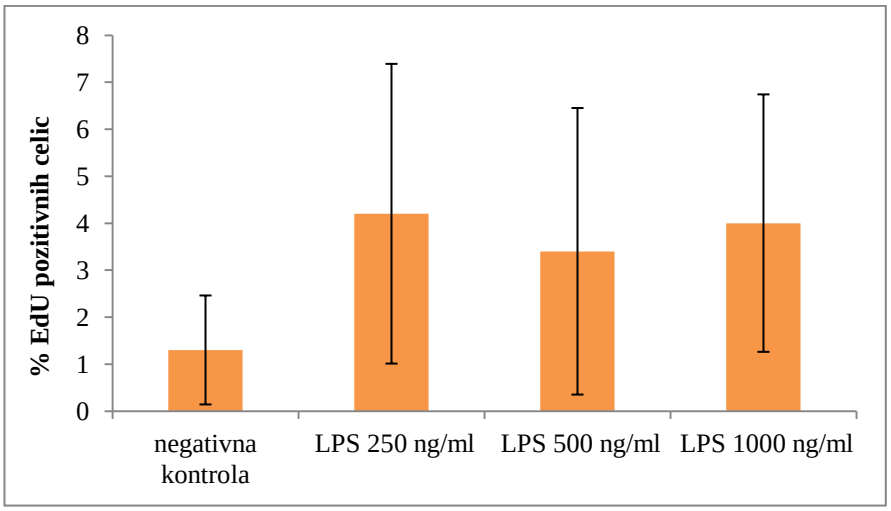
Legenda: CD3 + CD28 (aktivirajoča protitelesa CD3 skupaj s kostimulatorno molekulo CD28); PHA (fitohemaglutinin); LPS (lipopolisaharid).

4.4 SPODBUJANJE LIMFOCITOV Z MOLEKULAMI LPS

Ob dodatku izbrane koncentracije LPS-a mononuklearnim celicam se koncentracija znotrajceličnega kalcija ni niti povišala niti zmanjšala. Da bi ugotovili, kakšna

koncentracija LPS-a vpliva na koncentracijo znotrajceličnega kalcija, smo naredili titracijsko krivuljo vpliva LPS-a na proliferacijo limfocitov po metodi EdU pri različnih koncentracijah.

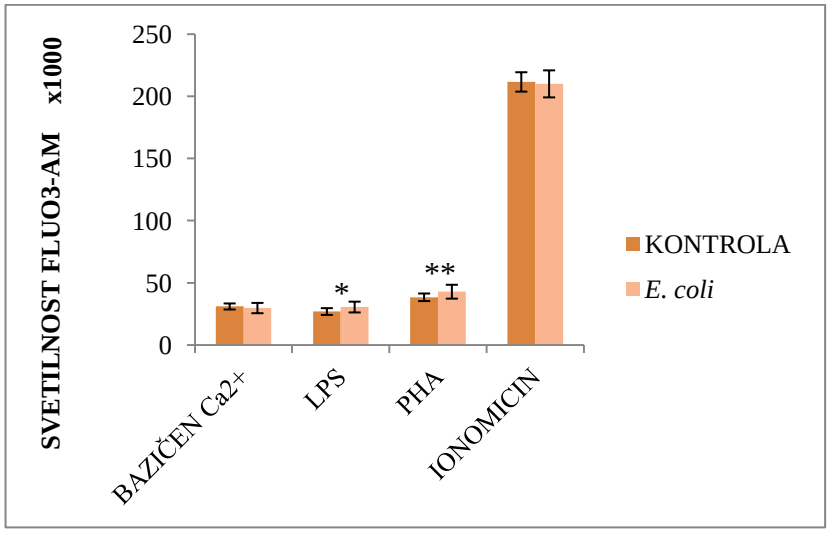
Proliferacija limfocitov je ena izmed reakcij, ki so posledica spremembe v koncentraciji kalcija v celici (Oh-hora in Rao, 2008). Na podlagi rezultatov metode BrdU smo zato sklepali, da različne koncentracije LPS-a enako vplivajo tudi na koncentracijo znotrajceličnega kalcija. Proliferacijo limfocitov smo merili ob različnih koncentracijah LPS-a: 250, 500 ter 1000 ng/ml, 7 zaporednih dni inkubacije z mononuklearnimi celicami.



Slika 10: Titracijska krivulja spodbujanja limfocitov z lipopolisaharidom s tremi različnimi koncentracijami (LPS: 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml). Na sliki je prikazan delež delečih limfocitov (% EdU +) za 6 ponovitev (Skale, 2013).

Po izvedeni titracijski krivulji rezultati vpliva različnih koncentracij LPS-a na proliferacijo limfocitov niso bili pričakovani (proliferacija se ob dodatku spodbujevalca ni bistveno spremenila), zato smo se odločili, da kot vir LPS-a uporabimo kulturo *E. coli* (Haller in sod., 2000). Kulturo *E. coli* smo inaktivirali, da ne bi prerasla monunklearnih celic in jo namesto LPS-a dodajali mononuklearnim celicam.

Koncentracijo znotrajceličnega kalcija po spodbujanju z *E. coli* smo primerjali s koncentracijo znotrajceličnega kalcija v vzorcu negativne kontrole, kjer limfociti niso bili spodbujeni.



Slika 11: Povprečne vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih negativne kontrole (brez spodbujanja) in v vzorcih s spodbujevalcem koncentracije znotrajceličnega kalcija, kulturo *E. coli* za 10 (*E. coli*) ter 12 vzorcev (kontrola).

Legenda: LPS (lipopolisaharid); PHA (fitohemaglutinin).

Opombe:

* - statistično različna koncentracija v primerjavi s kontrolo pri $0,01 \leq p < 0,05$

** - statistično različna koncentracija v primerjavi s kontrolo pri $p < 0,01$

4.5 MODULATORJI KONCENTRACIJE ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA

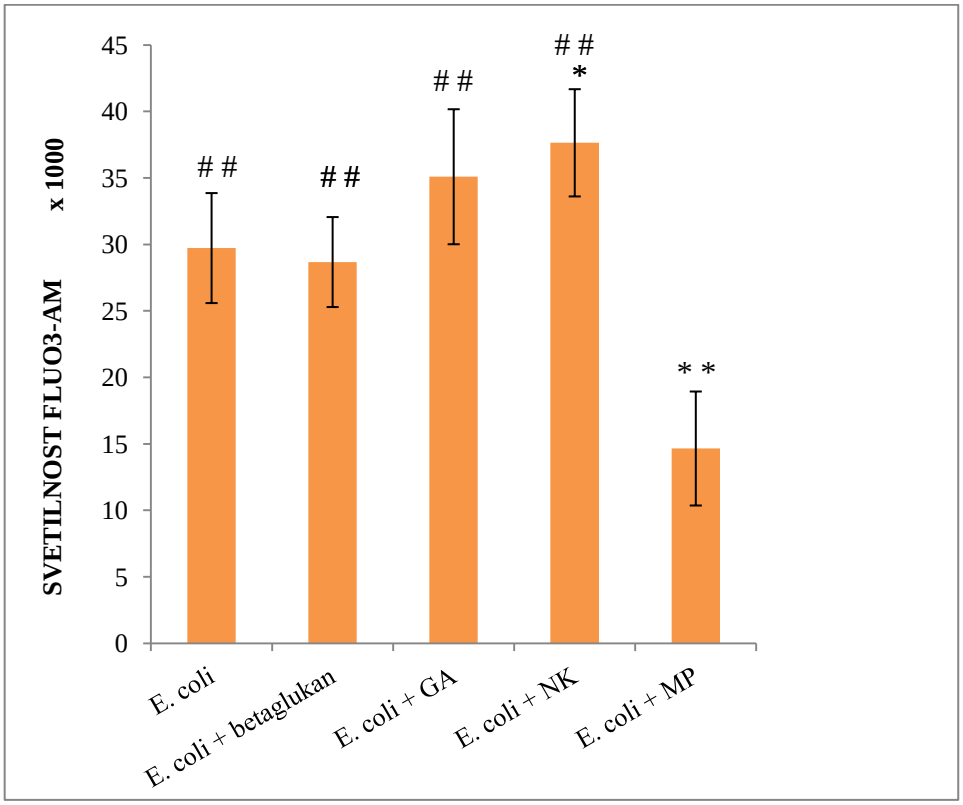
Med modulatorje smo uvrstili snovi, katerih učinek na koncentracijo znotrajceličnega kalcija smo želeli preveriti. Tu je nastopal še en mikrobni produkt, sestavna molekula glivnih sten, betaglukan, ter zdravila glatiramer acetat, natrijev nukleinat in metilprednizolon. Na limfocite delujejo modulatorno – imunosupresivno ali imunostimulatorno; imunski odziv torej zavirajo ali pa ga spodbujajo. Metilprednizolon je zaviralec imunskega odziva in posledično zmanjšuje koncentracijo znotrajceličnega kalcija v limfocitih (Prokai in sod., 2012; Buttgereit in sod., 1997), zato je služil kot negativna kontrola v primerjavi z ostalimi modulatorji.

Pred inkubacijo celic z betaglukanom, glatiramer acetatom, natrijev nukleinatom in metilprednizolonom smo limfocite ob nastavitvi poskusa dodatno spodbudili z dodatkom neaktivne kulture *E.coli*, ki je bila v našem primeru vir molekul LPS-a.

Za statistično značilno primerjavo smo testirali razlike v variancah, pri čemer smo uporabili Studentov dvostranski *t-test* za povprečne vrednosti. Za stopnjo tveganja smo izbrali 0,05, kar pomeni, da je razlika med vzorcema statistično značilna, če je vrednost p manjša od 0,05 in ni značilna, če je večja od 0,05. Naša ničelna hipoteza je bila, da je povprečje razlik enako nič. V nasprotnem primeru smo hipotezo zavrgli in obdržali hipotezo, da povprečje razlik ni enako nič.

Vpliv modulatorjev betaglukana, glatiramer acetata in natrijevega nukleinata na koncentracijo znotrajceličnega kalcija smo statisitčno primerjali z vrednostmi znotrajceličnega kalcija ob spodbujanju limfocitov s kulturo *E. coli* ter modulacijo z zdravilom metilptednizolonom.

V grafikonih smo predstavili povprečne vrednosti, standardne napake in statistično značilne rezultate vseh modulatorjev glede na bazično koncentracijo kalcija (brez dodanega sprožilca) ter dodanih sprožilcev – LPS, PHA in ionomicina.



Slika 12: Povprečne vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih, spodbujanih z *E. coli*, in modulatorjih (betaglukan, GA, NK, MP) na ravni bazičnih vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija (brez dodatnega spodbujanja s sprožilci) za 8 (*E. coli* + GA) ter 10 vzorcev (*E. coli*, *E. coli* + betaglukan, *E. coli* + NK, *E. coli* + MP).

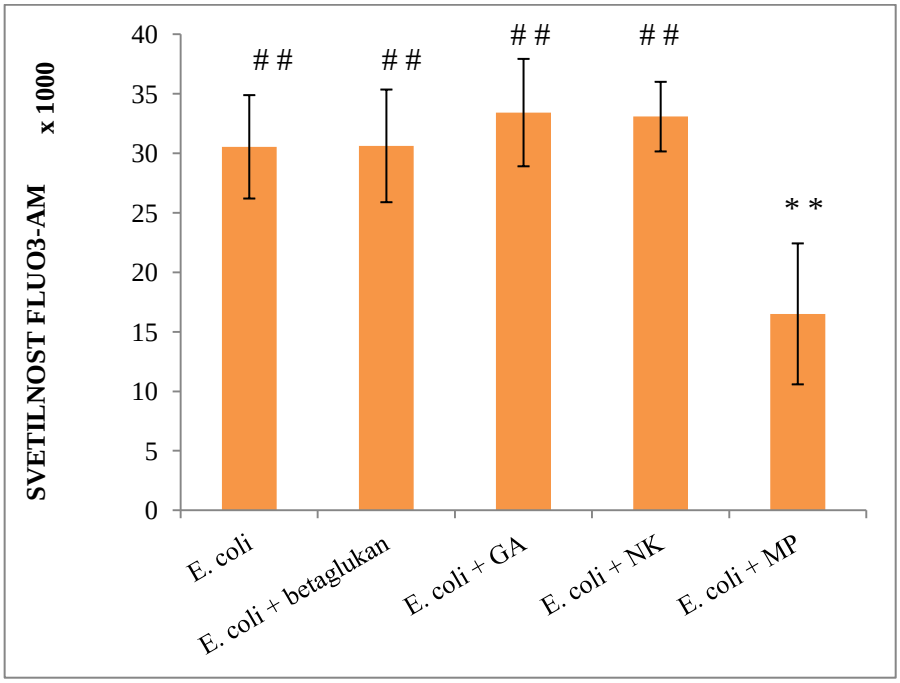
Legenda: GA (glatiramer acetat); NK (natrijev nukleinat); MP (metilprednizolon).

Opombe:

* - statistično različna koncentracija v primerjavi s kontrolo (*E.coli*) pri $0{,}01 \leq p < 0{,}05$

** - statistično različna koncentracija v primerjavi s kontrolo (*E. coli*) pri $p < 0{,}01$

- statistično različna koncentracija v primerjavi z metilprednizolonom pri $p < 0{,}01$



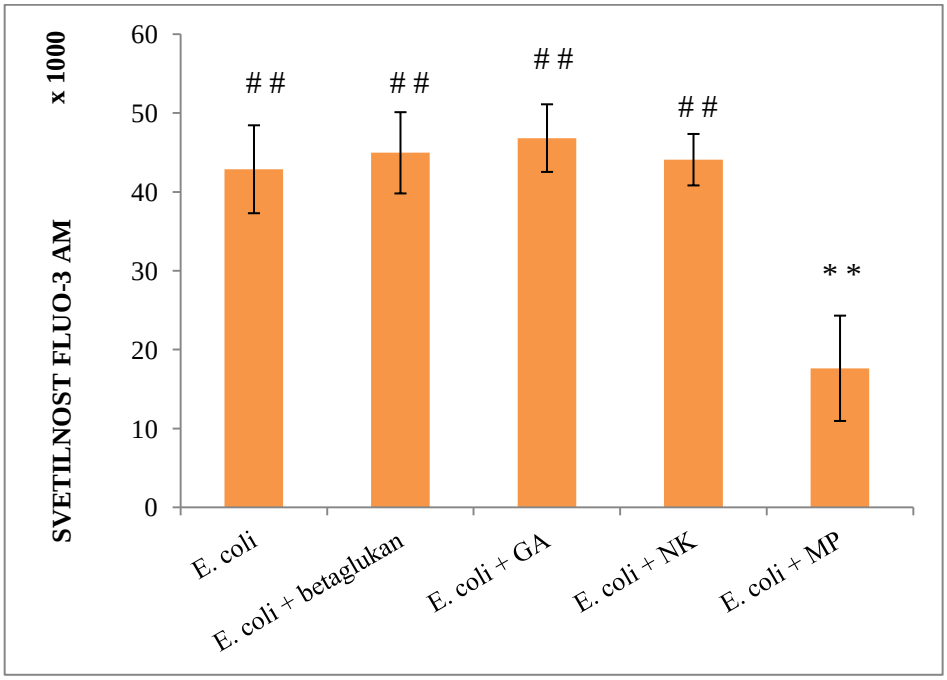
Slika 13: Povprečne vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih, spodbujanih z *E. coli*, in modulatorjih (betaglukan, GA, NK, MP) ob dodatnem spodbujanju s sprožilcem LPS za 8 (*E. coli* + GA) ter 10 vzorcev (*E. coli*, *E. coli* + betaglukan, *E. coli* + NK, *E. coli* + MP).

Legenda: GA (glatiramer acetat); NK (natrijev nukleinat); MP (metilprednizolon); LPS (lipopolisaharid).

Opombe:

** - statistično različna koncentracija v primerjavi s kontrolo (*E. coli*) pri $p < 0,01$

- statistično različna koncentracija v primerjavi z metilprednizolonom pri $p < 0,01$



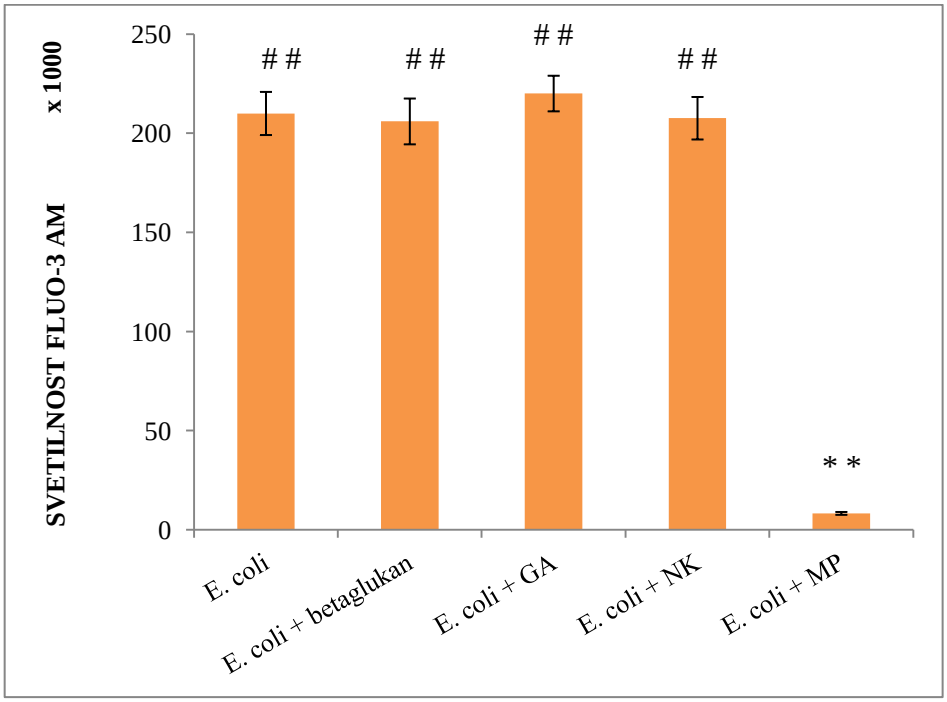
Slika 14: Povprečne vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih, spodbujanih z *E. coli*, in modulatorjih (betaglukan, GA, NK, MP) ob dodatnem spodbujanju s sprožilcem PHA za 8 (*E. coli* + GA) ter 10 vzorcev (*E. coli*, *E. coli* + betaglukan, *E. coli* + NK, *E. coli* + MP).

Legenda: GA (glatiramer acetat); NK (natrijev nukleinat); MP (metilprednizolon); PHA (fitohemaglutinin).

Opombe:

** - statistično različna koncentracija v primerjavi s kontrolo (*E. coli*) pri $p < 0,01$

- statistično različna koncentracija v primerjavi z metilprednizolonom pri $p < 0,01$



Slika 15: Povprečne vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija v vzorcih, spodbujanih z *E. coli*, in modulatorjih (betaglukan, GA, NK, MP) ob dodatnem spodbujanju s sprožilcem ionomicinom za 8 (*E. coli* + GA) ter 10 vzorcev (*E. coli*, *E. coli* + betaglukan, *E. coli* + NK, *E. coli* + MP).

Legenda: GA (glatiramer acetat); NK (natrijev nukleinat); MP (metilprednizolon).

Opombe:

** - statistično različna koncentracija v primerjavi s kontrolo (*E. coli*) pri $p < 0,01$

- statistično različna koncentracija v primerjavi z metilprednizolonom pri $p < 0,01$

5 RAZPRAVA

Znotraj celic imunskega odziva je kalcij nujno potreben za raznolikost celičnih funkcij in procesov kot so proliferacija, diferenciacija, apoptoza ter prepisovanje genov (Oh-hora in Rao, 2008). Zaradi njegove ključne vloge v celicah mora biti koncentracija kalcija natančno uravnana po času, prostoru in amplitudi njegovega prehajanja. Ker je ena izmed pomembnejših signalnih molekul, so napake v njenem delovanju lahko usodne in vodijo v različne bolezni, od Alzheimerjeve bolezni do hipertenzije, ali celo smrti (Missiaen in sod., 2000).

S spodbujanjem imunskih celic, limfocitov, smo v naši raziskavi želeli spodbuditi ali zavreti koncentracijo kalcija v celici. Pozitivni ali negativni signali nato vplivajo na različne signalne poti, ki vodijo do tarčnega limfocita, ta pa se nanje odzove s specifičnim celičnim odzivom (Lidy Verburg-Van Kemande in sod., 1998). Z različnimi spodbujevalci, modulatorji ter sprožilci smo želeli ugotoviti, ali je naša metoda primerna za merjenje koncentracije znotrajceličnega kalcija v limfocitih.

Zanimalo nas je, kako na koncentracijo znotrajceličnega kalcija vplivata bakterijski endotoksin LPS ter sestavina glivnih sten, betaglukan. Oba mikrobna produkta sta znana kot spodbujevalca oziroma modulatorja imunskega odziva (Swain in sod., 2008; Stopinšek in sod., 2011). Z merjenjem znotrajceličnega kalcija po določenem času spodbujanja na pretočnem citometru smo želeli ugotoviti, ali lahko z našo metodo merimo znotrajcelični kalcij po spodbujanju z mikrobnimi produkti, kot sta LPS in betaglukan.

Z merjenjem spodbujevalcev in modulatojrev, katerih delovnje smo poznali (ionomicin, CD3 skupaj z CD28, PHA ter metilprednizolon) smo želeli potrditi, da je metoda za merjenje znotrajceličnega kalcija uspešna in deluje.

Merjenje znotrajceličnega kalcija smo po izolaciji mononuklearnih celic in gojenju le-teh z določenimi spodbujevalci ali modulatorji nadaljevali na pretočnem citometru, katerega filtri za fluorescin in visoka afiniteta barvila Fluo-3 AM do Ca^{2+} z argonsko ionskim

laserjem omogočajo vidljivost fiziološko pomembnih sprememb v koncentracijah Ca^{2+} (Shepers in sod., 2009).

Na grafih, ki nam jih je izrisal program FACSDiva, smo opazovali svetilnost (MFI, angl. mean fluorescence intensity) Fluo-3 AM, ki se je vezal na Ca^{2+}, v odvisnosti od časa (Shepers in sod., 2009; June in Moore, 2004). Glede na rezultate svetilnosti smo sklepali na koncentracijo znotrajceličnega kalcija v opazovanih limfocitih. Več kot je bilo celic pri višji svetilnosti, ki so tvorile vrh, višja je bila koncentracija znotrajceličnega kalcija. Če je bilo število celic večje pri nižjih svetilnostih, je bila koncentracija znotrajceličnega kalcija manjša.

5.1 KONCENTRACIJA ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA NEGATIVNE KONTROLE

Negativno kontrolo so predstavljali limfociti brez dodanih spodbujevalcev ali modulatorjev. Koncentracijo znotrajceličnega kalcija negativnih kontrol smo izmerili ob začetku poskusa (kontrola 1) ter zadnji dan, 72 ur po inkubaciji (kontrola 2). Med primerjavo obeh kontrol (Slika 6) nismo ugotovili razlik, ki bi kazale na povišano koncentracijo znotrajceličnega kalcija takoj po izolaciji mononuklearnih celic oziroma po 72-urni inkubaciji. Ker se rezultati obeh kontrol med seboj niso bistveno razlikovali, smo izračunali njuno povprečno vrednost in le-to upoštevali kot negativno kontrolo.

Negativna kontrola nam je nadalje služila za primerjavo koncentracije znotrajceličnega kalcija z vsemi spodbujevalci (Slika 8). Tudi pri kontroli smo najprej izmerili bazično koncentracijo kalcija, nato pa vzorec spodbudili s sprožilci LPS-om, PHA-jem in ionomicinom.

Koncentracija bazičnega znotrajceličnega kalcija je bila pri obeh kontrolah statistično značilno nekoliko višja kot pri sprožilcu LPS, s čimer smo ugotovili, da v našem primeru sprožilec LPS ne deluje kot hipni sprožilec pri povišanju koncentracije znotrajceličnega

kalcija. Spoznali smo, da je LPS šibek sprožilec in je primeren za merjenje znotrajceličnega kalcija v celicah, ki so predhodno spodbujene.

Nasprotno PHA in ionomicin statistično značilno povišata koncentracijo znotrajceličnega kalcija negativne kontrole. Ob dodatku sprožilca PHA limfocitnim celicam smo pričakovali višji skok v koncentraciji znotrajceličnega kalcija, saj je močan spodbujevalec limfocitov (Trubowitz in sod., 1966), medtem ko je ionomicin opravičil svojo vlogo ionofora in z odpiranjem kalcijevih kanalčkov močno povišal koncentracijo kalcija v celici (Gajewski in sod., 1990). Z uporabo ionomicina smo lahko pri naslednjih primerjavah med kontrolnim poskusom in poskusi z različnimi spodbujevalci in modulatorji proučevali najvišjo zmogljivost celic v dvigu koncentracije kalcija (Mason in Grinstein, 1993).

5.2 PRIMERJAVA BAZIČNEGA ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA MED POSAMEZNIMI POSKUSI

S primerjavo srednjih vrednosti in standardnih napak svetilnosti bazičnega znotrajceličnega kalcija med kontrolo, spodbujevalci, modulatorji ter mikrobnimi produkti celičnih sten opazimo očitne razlike med posameznimi dodanimi snovmi. Rezultate smo skupaj s statističnimi značilnostmi prikazali na stolpičastem grafikonu (Slika 7).

Kontrola, ki ji nismo dodali spodbujevalca ali modulatorja, je služila kot negativna kontrola. V skupini spodbujevalcev (ionomicin z PMA, CD3 skupaj z CD28 ter PHA) smo ugotovili, da so le-ti dosegali visoke svetilnosti in koncentracije bazičnega kalcija. Kljub temu, da pred merjenjem na pretočnem citometru spodbujevalcem nismo dodali dodatnih sprožilcev, ki so pokazatelji hitrih, kratkotrajnih sprememb v koncentraciji znotrajceličnega kalcija, je bila koncentracija znotrajceličnega kalcija še vedno visoka (Slika 7). Oh-hora in Rao (2008) ugotavljata, da limfociti, ki so izpostavljeni močnim spodbujevalcem, doživijo nadaljnje dolgotrajnejše celične diferenciacije, na primer proliferacijo ali močno izločanje citokinov. Ker so za celotno kaskado dogodkov proliferacije potrebni močnejši signali znotrajceličnega kalcija, je njegova koncentracija še

vedno zaznana v visokih vrednostih tudi po večdnevni izpostavljenosti spodbujevalcem. Takšne posledice zaradi povišane koncentracije znotrajceličnega kalcija imenujemo dolgotrajni dogodki, ki v nekaj urah ali dnevih spremenijo gensko izražanje limfocitov (Oh-hora in Rao, 2008). Iz tega sklepamo, da spodbujevalci, ki smo jih proučevali v našem poskusu, sprožajo dolgotrajne dogodke, ki se kasneje lahko izražajo v različnih oblikah (na primer razmnoževanje limfocitov).

Najvišjo vrednost koncentracije znotrajceličnega kalcija je dosegel bakterijski ionofor ionomicin, ki skupaj s PMA služi kot pozitivna kontrola (June in Moore, 2004). Prav tako smo ugotovili visok skok v koncentraciji znotrajceličnega kalcija ob spodbujanju s specifičnimi monoklonskimi protitelesi, CD3 skupaj s kostimulatorno molekulo CD28, ki se vežejo na TCR receptorje limfocitov T (Ihan, 2002b) ter PHA, ki je močan spodbujevalec limfocitov T (Trubowitz in sod., 1966; Meszanos in sod., 2012).

Naša hipoteza, da spodbujevalci spodbujajo koncentracijo znotrajceličnega kalcija, je potrjena že po primerjavi njegovih bazičnih koncentracij. Iz tega sklepamo, da je test merjenja koncentracije znotrajceličnega kalcija v limfocitih s pretočnim citometrom uspešen in ga bomo lahko uporabljali tudi v prihodnje. Prav tako smo za merjenje izbrali primerne pozitivne kontrole, saj vse močno spodbujajo koncentracijo znotrajceličnega kalcija v limfocitih.

V nadaljnjem poskusu smo namesto komercialno dostopnega LPS, ki je prav tako izoliran iz celične kulture bakterije *Escherichia coli*, in s katerim nismo dobili statistično značilnih razlik v primerjavi s kontrolami, limfocitom dodajali toplotno inaktivirano kulturo *E. coli* (Haller in sod., 2000). Haller in sod. (2000) so potrdili, da spodbujanje s kulturo *E. coli* izzove močnejši imunski odziv in povzroči proliferacijo limfocitov. Ker je proliferacija eden izmed dogodkov, ki jih izzove povišana koncentracija znotrajceličnega kalcija (Oh-hora in Rao, 2008), smo predvidevali, da bo spodbujanje s kulturo *E. coli* uspešnejše kot spodbujanje z izoliranim LPS-om (Slika 11).

Pred dodatkom vseh modulatorjev smo limfocite dodatno spodbudili z inaktiviranimi celicami *E. coli*. Na ta način smo že na začetku poskusa na vseh nivojih (koncentracija

bazičnega znotrajceličnega kalcija ter koncentracija znotrajceličnega kalcija po inkubaciji z modulatorji in dodanih sprožilcih) preverjali vpliv modulatorjev na limfocite, ki smo jim dodali antigen. S tem smo nadalje želeli sklepati na mehanizem delovanja mikrobnih produktov na tarčne limfocite ter preveriti, ali modulatorji delujejo kot spodbujevalci ali zaviralci koncentracije kalcija spodbujenih in moduliranih limfocitov.

Na Sliki 7 opazimo, da se bazična vrednost znotrajceličnega kalcija po dodatku same kulture *E. coli* in inkubaciji statistično značilno ne spremeni, prav tako vrednost po dodatku betaglukana in zdravila glatiramer acetata. Iz tega ugotavljamo, da naš test merjenja bazične koncentracije znotrajceličnega kalcija pri omenjenih modulatorjih ni primeren.

Bazična vrednost koncentracije znotrajceličnega kalcija ob dodatku metilprednizolona je izrazito nizka, saj zdravilo deluje močno protivnetno, kar so dokazali že Prokai in sodelavci (2012) in tako znižuje tudi bazično koncentracijo znotrajceličnega kalcija (Buttgereit in sod., 1997). Naša hipoteza je v primeru bazične koncentracije znotrajceličnega kalcija potrjena.

Zdravilo natrijev nukleinat je v primerjavi z modulacijo z zdravilom metilprednizolom ter spodbujevalcem *E. coli* na koncentracijo znotrajceličnega kalcija delovalo spodbujajoče in ne zaviralno (Jukić in sod., 2011). V primerjavi z negativno kontrolo – celicami, spodbujenimi s kulturo *E. coli*, se je koncentracija znotrajceličnega kalcija ob dodatku natrijevega nukleinata statistično značilno povišala.

5.3 VPLIV SPODBUJEVALCEV NA KONCENTRACIJO ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA

Med spodbujevalce znotrajceličnega kalcija smo umestili tiste znane učinkovine, za katere smo predvidevali, da ob določeni inkubaciji z limfociti povišujejo koncentracijo kalcija v njih. V to skupino spadajo bakterijski ionofor ionomicin skupaj s PMA, aktivirajoča

protitelesa CD3 skupaj s kostimulatorno molekulo CD28 in PHA. Po končanem spodbujanju limfocitov smo vsakemu izmed spodbujevalcev izmerili bazično vrednost in dodali različne sprožilce – LPS, PHA in ionomicin.

Za vse poskuse smo izračunali povprečne vrednosti, ki smo jih skupaj s pripadajočimi standardnimi napakami in statističnimi značilnostmi predstavili na stolpičastem grafikonu. Vsakega izmed spodbujevalcev smo po merjenju z vsemi sprožilci s pomočjo t-testa primerjali z negativno kontrolo (Slika 8).

Prvi spodbujevalec in pozitivna kontrola, ionomicin skupaj s PMA (June in Moore, 2004), na vseh nivojih dodajanja sprožilcev (LPS, PHA in ionomicin) dosega najvišje vrednosti v koncentraciji znotrajceličnega kalcija. V primerjavi z negativno kontrolo pri bazični vrednosti znotrajceličnega kalcija so rezultati statistično značilni in potrjujejo domnevo, da je ionomicin spodbujevalec znotrajceličnega kalcija. Po dodatku sprožilca, ki je prav tako spodbujevalec limfocitov, PHA-ja (Meszanos in sod., 2012; Trubowitz in sod., 1966), smo dobili statistično značilne rezultate in dokazali, da že prej spodbujeni limfociti po dodatku drugega sprožilca dodatno dvignejo raven znotrajceličnega kalcija. Povprečja meritev kažejo na to, da so limfociti, ki smo jih predhodno že 40 ur spodbujali z ionomicinom, še vedno dovzetni za dodatni dvig znotrajceličnega kalcija z različnimi sprožilci. Naši rezultati se ujemajo s podatki Masona in Grinsteina (1993), ki sta dokazala, da je ionomicin najboljši spodbujevalec za proučevanje najvišje zmogljivosti celic v dvigu koncentracije kalcija.

Za protitelesna spodbujevalca, CD3 skupaj s kostimulatorno molekulo $CD28^{+}$, ki se specifično vežeta na limfocite T in njihove TCR receptorje (Ihan, 2002b; Borowski in sod., 2007), smo z vsemi sprožilci pridobili statistično značilne rezultate. Dokazali smo, da molekuli CD3 in CD28 po 72-urni inkubaciji močno vplivata na povišano koncentracijo znotrajceličnega kalcija limfocitov T.

Le pri spodbujevalcih CD3 z CD28 smo ob sprožilcu LPS dobili višjo koncentracijo znotrajceličnega kalcija kot je bila koncentracija bazičnega znotrajceličnega kalcija. Iz tega sklepamo, da LPS še dodatno spodbudi koncentracijo znotrajceličnega kalcija v že prej

aktiviranih limfocitih T. Naša hipoteza je potrjena – protitelesi CD3 in CD28 sta spodbujevalca znotrajceličnega kalcija.

Zadnji v skupini kontrolnih poskusov, PHA, ki je močan spodbujevalec limfocitov (Meszanos in sod., 2012; Trubowitz in sod., 1966), je prav tako z vsemi dodanimi sprožilci spodbudil koncentracijo znotrajceličnega kalcija. Tudi ob ponovnem dodatku sebi enakega sprožilca se je vrednost znotrajceličnega kalcija povišala. Sklepamo, da so limfociti po 40 urah inkubacije s PHA še dovzetnejši za močne sprožilce (ionomicin, PHA). Rezultati so bili ob vseh sprožilcih, razen ionomicinu, statistično značilni. Vrednost koncentracije znotrajceličnega kalcija je bila ob dodatku sprožilca LPS nižja kot bazična vrednost kalcija. Naša hipoteza je potrjena – PHA je spodbujevalec znotrajceličnega kalcija.

Za vse snovi prve skupine (ionomicin, molekuli CD3 in CD28, PHA) smo statistično dokazali, da po določenem času gojenja z mononuklearnimi celicami spodbujajo in povišujejo koncentracijo znotrajceličnega kalcija v limfocitih. Z našimi poskusi smo pokazali, da je povišana koncentracija znotrajceličnega kalcija znotraj celice lahko dolgotrajen, večdneven dogodek, ki se kaže v naslednjih celičnih stopnjah ali pa kratkotrajen dogodek, ko že aktivirane limfocite T dodatno spodbudimo s hitrimi sprožilci za povišanje koncentracije znotrajceličnega kalcija (LPS, PHA, ionomicin).

Dokazali smo, da je naša metoda merjenja koncentracije znotrajceličnega kalcija v limfocitih s pretočnim citometrom primerna metoda za merjenje koncentracije znotrajceličnega kalcija limfocitov.

5.3.1 Primerjava normalnih vrednosti koncentracij znotrajceličnega kalcija in razmerij povprečij negativne kontrole ter spodbujevalcev

Za negativno kontrolo, kjer smo gojili mononuklearne celice brez dodanih spodbujevalcev in pozitivni kontroli, za kateri smo vzeli spodbujevalca CD3 skupaj z CD28 in PHA, smo želeli izračunati normalne vrednosti koncentracije znotrajceličnega kalcija v humanih limfocitih T glede na svetilnosti, ki smo jih imerili. Normalne vrednosti nam predstavljajo

vrednosti, v katerih se giblje svetilnosti in posledično tudi koncentracija znotrajceličnega kalcija zdravega človeka ob bazičnem merjenju ter spodbujanjem z LPS-om, PHA-jem ter ionomicinom.

Ugotovili smo, da so najnižje vrednosti koncentracij znotrajceličnega kalcija vrednosti kontrol brez spodbujanja, medtem ko je najvišja koncentracija znotrajceličnega kalcija dosežena ob spodbujanju z molekulama CD3 in CD28 hkrati s sprožilcem ionomicinom. Najmočnejši sprožilec je v vseh treh primerih ionomicin, sledita mu PHA ter LPS.

Razmerja povprečnih vrednosti pozitivnih kontrol v primerjavi z negativno kontrolo so sorazmerna učinku posameznih sprožilcev na koncentracijo znotrajceličnega kalcija. Razmerja med obema spodbujevalcema, CD3 in CD28 in PHA, so si podobna, s čimer ugotavljamo, da sta oba spodbujevalca merilo za uspešnost metode merjenja znotrajceličnega kalcija.

5.4 LPS KOT MIKROBNI SPODBUJEVALEC ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA

Molekule LPS so pomembne zaradi toksičnih učinkov, saj spodbudijo makrofage k izločanju velike količine mediatorjev imunskega odziva, ki lahko v organizmu povzročijo hude okvare žilja ter pripeljejo do septičnega šoka (Ihan, 2002a). Sesalske celice so na LPS občutljive že v manjših odmerkih (Swain in sod., 2008). Predvidevali smo, da se bo pod vplivom bakterijskega LPS-a koncentracija znotrajceličnega kalcija kalcijevi povišala in sprožila nadaljnjo deljenje limfocitov ter imunski odgovor na antigen.

Na začetku poskusa smo mononuklearne celice inkubirali z izoliranimi molekulami LPS, tako za proučevanje učinka LPS kot tudi za spodbuditev celic pred dodatkom betaglukana ali ostalih zdravil (metilprednizolon, glatiramer acetat in natrijev nukleinat). Ker smo v štirih poskusih spodbujanja z LPS-om dobili podobne rezultate kot pri celicah brez spodbujanja, smo naredili titracijsko krivuljo z različnimi koncentracijami LPS in s pomočjo metode BrdU opazovali proliferacijo limfocitov (Skale, v pripravi) ter glede na končni delež delečih se limfocitov sklepali tudi na vpliv LPS-a na koncentracijo

znotrajceličnega kalcija. Izmerili smo vpliv različnih koncentracij LPS-a (250 ng/ml, 500 ng/ml ter 1000 ng/ml) na razmnoževanje limfocitov v različnih časovnih intervalih: prvi, drugi, tretji, četrti in sedmi dan po začetku poskusa. Ugotovili smo, da se odstotek limfocitov, ki so se delili, bistveno ne razlikuje od limfocitov, ki so se delili brez spodbujanja z LPS-om. Haller in sodelavci (2000) navajajo, da se koncentracija citokinov, ki so posledica zvišane koncentracije kalcija v celicah, po spodbujanjem z LPS-om poviša šele po 5-dnevni inkubaciji. V našem poskusu smo s titracijsko krivuljo dokazali, da ne pride do razlik v razmnoževanju po spodbujanju glede na čas spodbujanja. Sklepamo, da metoda merjenja razmnoževanja limfocitov ni dovolj občutljiva za naše potrebe merjenja (Slika 10).

Namesto komercialno dostopnega LPS-a smo nato poskusili kot bakterijski spodbujevalec dodajati čisto kulturo inaktivirane po Gramu negativne nepatogene bakterije *Escherichia coli* (Haller in sod., 2000), katere celične stene sestavljajo velike količine antigena LPS-a (Ihan, 2002a). Haller in sod. (2000) so limfocite spodbujali z *E. coli* (ATCC 25922, 1 MCF) z dodatkom antibiotika gentamicina. V našem primeru smo kulturo *E. coli* (ATCC 25922, 1 MCF) predhodno toplotno inaktivirali, saj bi v nasprotnem primeru lahko prerastla mononuklearne celice. Inaktivacijo bakterij smo preverili z gojenjem kulture *E. coli* na TIO gojišču v inkubatorju pri 37 °C tako s CO_2 kot tudi brez njega. Po končani inkubaciji je bila kultura bistra, s čimer smo dokazali, da smo uničili žive celice ter pridobili le produkte bakterijskih sten.

Nadaljnje poskuse smo izvajali z inaktivirano kulturo *E. coli*. Kot sprožilec za hitro povišanje koncentracije znotrajceličnega kalcija že aktiviranih limfocitov T pa smo še vedno uporabljali komercialno dostopne molekule LPS in ne kulture *E. coli*.

Ob primerjavi negativne kontrole in celic, gojenih z inaktivirano kulturo *E. coli* (Slika 11), smo dokazali statistično značilno razliko ob dodatnem spodbujanju znotrajceličnega kalcija s sprožilcema LPS in PHA. Dokazali smo, da sprožilca LPS in PHA spodbujata povišanje koncentracije znotrajceličnega kalcija v primeru spodbujanja limfocitov z LPS-om kulture *E. coli*.

Ob dodatku sprožilca ionomicina ter merjenju bazičnega kalcija nismo dobili statistično značilnih rezultatov.

Naša hipoteza, da LPS oziroma kultura *E. coli* spodbuja koncentracijo znotrajceličnega kalcija, je delno pravilna. Pri sprožilcih LPS in PHA hipotezo potrjujemo, za bazični kalcij jo zavržemo zaradi statistično neznačilnih rezultatov. Sprožilec ionomicin je močno spodbudil naše limfocite, vendar pa rezultati niso statistično značilni, zato hipoteze ne moremo potrditi.

5.5 VPLIV MODULATORJEV NA KONCENTRACIJO ZNOTRAJCELIČNEGA KALCIJA

V zadnjem delu poskusa smo proučevali vpliv modulatorjev na koncentracijo znotrajceličnega kalcija. Modulatorji koncentracije znotrajceličnega kalcija le-to povišujejo ali znižujejo. Da bi v kulturi mononuklearnih celicah ustvarili celične pogoje ob vdoru antigena v organizem in proučili modulatorne lastnosti betaglukana, glatiramer acetata, natrijevega nukleinata ter metilprednizolona ob okužbi, smo celicam predhodno dodali kulturo po Gramu negativne bakterije *E. coli* (Haller in sod., 2000), ki ima v svojih celičnih stenah LPS. Po eni uri smo tako spodbujenim celicam dodali še modulatorje.

Vse modulatorje smo primerjali z limfociti, spodbujenimi s kulturo *E. coli* in zdravilom metilprednizolonom glede na dodani sprožilec (LPS, PHA, ionomicin) oziroma bazično raven koncentracije znotrajceličnega kalcija. Poskus spodbujanja koncentracije znotrajceličnega kalcija *E. coli* nam je služil za negativno kontrolo, saj smo vse mononuklearne celice, ki smo jim nadalje dodali modulatorje, najprej spodbudili z LPS-om. Prav tako je bila negativna kontrola modulacija limfocitov z metilprednizolonom, za katerega so že Buttgereit in sodelavci (1997) dokazali, da zavira kroženje Ca^{2+} preko plazemske membrane ter znižuje koncentracijo znotrajceličnega kalcija imunskih celic.

Znano je, da imajo betaglukani imunomodulatorne lastnosti. Stopinšek in sodelavci (2011) navajajo, da delujejo protivnetno, vendar pa se med seboj betaglukani strukturno

razlikujejo, imajo različne afinitete na receptorje in posledično ustvarjajo različne imunske odzive gostitelja (Chen in Seviour., 2007). Ker smo v našem poskusu uporabljali enak betaglukan kot Stopinšek in sodelavci (2011), pričakujemo protivnetno delovanje betalgukana na imunski odziv in posledično zmanjšanje koncentracije znotrajceličnega kalcija v limfocitih.

Prav tako smo pričakovali, da bosta zdravili glatiramer acetat in natrijev nukleinat delovali protivnetno (Podojil in Miller, 2009; Jukić in sod., 2011) in posledično zavirali koncentracijo znotrajceličnega kalcija. Glatiramer acetat namreč sproži premik limfocitov iz oblike proinflamatornih celic pomagalk Th1, ki bolezen ves čas spodbujajo z indukcijo nizke ravni stimulacije TCR, proti Th2 regulatornem celičnem fenotipu. Th2 nadalje regulira bolezen in zavira vnetni odziv (Podojil in Miller, 2009). Jukić in sodelavci (2011) so potrdili, da je natrijev nukleinat obetaven zaviralec večkratnega vnetnega izločanja citokinov, iz česar smo sklepali na njegovo zaviralno delovanje na koncentracijo znotrajceličnega kalcija.

5.5.1 Vpliv različnih modulatorjev na bazične koncentracije znotrajceličnega kalcija

Med primerjanjem bazične koncentracije znotrajceličnega kalcija v kontrolnih vzorcih in v vzorcih z različnimi modulatorji in *E. coli*, smo pri inkubaciji mononuklearne kulture z natrijev nukleinatom opazili statistično značilno povišano koncentracijo znotrajceličnega kalcija, kar pomeni, da kot modulator nanj deluje spodbujevalno in ne zaviralno (Slika 12). Z dvigom koncentracije znotrajceličnega kalcija natrijev nukleinat spodbudi imunski sistem v odgovor na tujek (LPS) v mononuklearnih celicah. Jukić in sodelavci (2011) opisujejo, da natrijev nukleinat zmanjšuje odziv citokinov TNF-α, IFN-γ in IL-6, ki so mediatorji močnega vnetnega odziva (Ihan, 2002a). Obstaja možnost, da je povišana koncentracija znotrajceličnega kalcija posledica regulatornega odziva, ki v nadaljevanju povzroči protivnetni odziv. V nadaljnjih poskusih bi lahko preverili še aktivnost regulatornih limfocitov T (proizvodnjo IL-10, TGF-β, IL-2R).

Statistično značilne razlike smo prav tako dobili pri modulaciji metilprednizolona, ki kaže na močno protivnetno delovanje na ravni bazične koncentracije znotrajceličnega kalcija. Metilprednizolon je znan zaviralec koncentracije znotrajceličnega kalcija, saj zavira njegovo kroženje preko periplazemske membrane in zmanjša število limfocitov T (Buttgereit in sod., 1997; Prokai in sod., 2012). Naša hipoteza, da metilprednizolon zavira koncentracijo znotrajceličnega kalcija je potrjena.

Prav tako so statistično značilni vsi rezultati bazične koncentracije znotrajceličnega kalcija, ko smo primerjali vpliv ostalih modulatorjev z vplivom metilprednizolona. To smo tudi pričakovali, saj je metilprednizolon glede na ostale modulatorje močnejši zaviralec imunskega sistema. S tem dokazujemo, da je test merjenja koncentracije znotrajceličnega kalcija v primerjavi z najnižjim izkoristkom celične kapacitete kalcija (Prokai in sod., 2012) uspešen. Merjenje koncentracije znotrajceličnega kalcija limfocitov s pretočnim citometrom je torej primerna metoda za proučevanje vpliva različnih modulatorjev na kroženje kalcija v imunskih celicah.

5.5.2 Vpliv in delovanje sprožilca LPS

Po dodatku sprožilca LPS k spodbujenim in moduliranim mononuklearnim celicam smo med primerjavo z negativno kontrolo (kulturo *E. coli*) in ostalimi modulatorji pridobili statistično značilnih razlik le ob modulaciji limfocitov z metilprednizolonom (Slika 13). Tudi ob dodatku sprožilca LPS-a, za katerega smo dokazali, da spodbudi imunski odziv, je koncentracija znotrajceličnega kalcija pri modulaciji z metilprednizolonom zelo nizka. Ponovno potrjujemo hipotezo, da metilprednizolon znižuje raven kalcija v limfocitnih celicah in močno zavira imunski odziv.

Povprečne vrednosti koncentracij znotrajceličnega kalcija so ob dodatnem spodbujanju s sprožilcem LPS nekoliko višje od bazične vrednosti znotrajceličnega kalcija, s čimer dokazujemo, da molekule LPS spodbujajo imunski odziv in povišujejo koncentracijo znotrajceličnega kalcija v limfocitih.

Rezultati po modulaciji mononuklearnih celic z betaglukanom, glatiramer acetatom in natrijevim nukleinatom v primerjavi z negativno kontrolo (spodbujanjem s kulturo *E. coli*) niso statistično značilni.

V primerjavi z modulatorjem in zaviralcem koncentracije znotrajceličnega kalcija, metilprednizolonom, pri vseh modulatorjih (betaglukan, glatiramer acetat in natrijev nukleinat) dokažemo statistično značilne razlike. S tem ponovno potrdimo uspešnost metode merjenja znotrajceličnega kalcija po modulaciji limfocitnih celic z metilprednizolonom.

5.5.3 Vpliv in delovanje sprožilca PHA

Podobno kot pri dodatnem spodbujanju kalcija znotraj celice z dodajanjem sprožilca LPS, smo s sprožilcem PHA, ki je močan spodbujevalec imunskega odziva in kot smo dokazali v prvem poskusu dobra pozitivna kontrola, v primeru poviševanja koncentracije znotrajceličnega kalcija, pridobili statistične razlike le ob modulaciji z metilprednizilonom (Slika 14).

Povprečne vrednosti ob dodatku sprožilca PHA so v primerjavi z bazično koncentracijo znotrajceličnega kalcija in sprožilcem LPS statistično značilno višje. S tem smo dokazali, da kljub močnemu zaviralnemu delovanju metilprednizolona dodatek prav tako močnega sprožilca še vedno nekoliko poviša koncentracijo znotrajceličnega kalcija.

Med primerjanjem modulatorjev betaglukana, glatiramer acetata in natrijevega nukleinata z modulatorjem metilprednizolonom smo tudi ob spodbujanju s sprožilcem PHA-jem dokazali, da je metoda primerna za merjenje koncentracije znotrajceličnega kalcija.

5.5.4 Vpliv in delovanje sprožilca ionomicina

Kot zadnji sprožilec smo mononuklearnim celicam po določenem gojenju z modulatorji tik pred merjenjem na pretočnem citometru dodali še najmočnejši spodbujevalec

znotrajceličnega kalcija in imunskega odziva, ionomicin (Slika 15) (Clementi in sod., 1994; Robič, 2008; Mason in Grinstein, 1993).

V primerjavi s spodbujanjem limfocitov s kulturo *E. coli* so statistično značilne razlike vidne pri modulatorju metilprednizolonu. Za razliko od ostalih dveh sprožilcev (LPS in PHA) je povprečna vrednost koncentracije znotrajceličnega kalcija po spodbujanju z ionomicinom nižja kot bazična vrednost ter vrednosti po spodbujanju z LPS in PHA. Pričakovali smo, da bo koncentracija znotrajceličnega kalcija kljub modulaciji z metilprednizolonom po spodbujanju z ionomicinom močno narasla in presegla vrednosti po spodbujanju z LPS-om in PHA-jem.

Ostali rezultati modulatorjev znotrajceličnega kalcija (betaglukana, glatiramer acetata in natrijevega nukleinata) niso bili statistično značilni.

Ko pa smo ostale modulatorje ponovno primerjali z modulatorjem metilprednizolonom po spodbujanju z ionomicinom, smo tudi v zadnjem delu poskusa dokazali statistične razlike in potrdili, da je metoda primerna za merjenje znotrajceličnega kalcija limfocitov.

6 SKLEPI

Iz pregleda objav smo tekom našega poskusa ugotovili, da je naše raziskovalno delo eno prvih, ki se osredotoča zgolj na merjenje koncentracije znotrajceličnega kalcija v limfocitnih celicah zdravih darovalcih po dodatku različnih spodbujevalcev, modulatorjev ter sprožilcev.

Vsi spodbujevalci znotrajceličnega kalcija v našem poskusu, ionomicin, aktivirajoča protitelesa CD3 s kostimulatorno molekulo CD28 in PHA, močno povišajo koncentracijo znotrajceličnega kalcija v limfocitnih celicah. Za test merjenja znotrajceličnega kalcija so vsi spodbujevalci primerne pozitivne kontrole za določanje maksimalne zmogljivosti v koncentracijah kalcija znotraj celic. Poskus merjenja koncentracij znotrajceličnega kalcija na pretočnem citometru je torej za omenjene spodbujevalce primerna metoda merjenja.

Mikrobni spodbujevalec imunskega odziva, LPS, ni dosegal pričakovanih povišanih koncentracij kalcija v celicah. Pričakovali smo, da bo LPS močan spodbujevalec in tudi sprožilec. V našem poskusu smo ugotovili, da metoda merjenja znotrajceličnega kalcija ob dodatku spodbujevalca LPS-a zanj ni dovolj občutljiva. Metoda merjenja znotrajceličnega kalcija s samo molekulo LPS kot spodbujevalcem torej ni primerna.

Namesto molekul LPS-a smo kulturi mononuklearnih celic kot spodbujevalec dodajali kulturo *E. coli*. Ob dodanih sprožilcih LPS in PHA kultura *E. coli* spodbuja in nekoliko povišuje koncentracijo kalcija znotraj limfocitnih celic. S tem dokazujemo, da je kultura *E. coli* šibak spodbujevalec znotrajceličnega kalcija.

Med merjenjem znotrajceličnega kalcija po modulaciji imunskega odziva z betalgukanom in glatiramer acetatom v primerjavi s spodbujanjem z *E. coli* nismo dobili statističnih razlik, zato ne moremo sklepati na njun vpliv na koncentracijo kalcija znotraj celice. Ker sta to šibka modulatorja imunskega odziva, metoda merjenja znotrajceličnega kalcija za merjenje betaglukana in glatiramer acetata torej ni primerna.

Modulator imunskega odziva in zaviralec citokinov, natrijev nukleinat, je v nasprotju s pričakovanji spodbudil koncentracijo znotrajceličnega kalcija in jo povišal. Metoda merjenja znotrajceličnega kalcija je za merjenje natrijevega nukleinata primerna.

Metilprednizolon, ki zavira kroženje kalcija preko periplazemske membrane, je dobra negativna kontrola merjenja koncentracije znotrajceličnega kalcija, saj le-to močno znižuje. Metilprednizolon je uspešen zaviralec koncentracije znotrajceličnega kalcija tako v primerjavi s spodbujevalcem *E. coli* kot tudi z ostalimi modulatorji. Na podlagi rezultatov merjenja z metilprednizolonom lahko potrdimo uspešnost metode merjenja znotrajceličnega kalcija s pretočnim citometrom.

Sprožilci, ki smo jih tik pred merjenjem dodajali spodbujevalcem in modulatorjem, so dokazali, da lahko dodatno spodbudijo še tako visoko ali nizko koncentracijo znotrajceličnega kalcija.

Ob dodatku sprožilca ionomicina spodbujevalcu CD3 s CD28, se je koncentracija znotrajceličnega kalcija povišala za enkrat. Sprožilec PHA je povišal koncentracijo znotrajceličnega kalcija pri vsaki izmed pozitivnih kontrol, medtem ko sprožilec LPS pri pozitivnih kontrolah nima učinka.

Merjenje koncentracije znotrajceličnega kalcija s pretočnim citometrom je ob določenih spodbujevalcih, modulatorjih ter sprožilcih primerna in občutljiva metoda za proučevanje imunskega odziva zdravih ljudi.

7 POVZETEK

Spodbujanje ali zaviranje limfocitov T, ki z antigenskimi receptorji prepoznavajo antigene na celicah lastnega organizma, je odvisno od številnih imunskih in drugih signalov, ki so lahko pozitivni ali negativni. Različni signali vzpodbudijo tarčne limfocite, ki na koncu določijo celični odziv nanje, na primer celično proliferacijo, izločanje citokinov ali apopotozo celice. Celični odziv na antigen je ključnega pomena pri razvoju in zdravljenju človekovih bolezni.

Ena najpomembnejših vlog pri prenosu signala in določanju limfocitne celične aktivnosti pripada koncentraciji znotrajceličnega kalcija (Ca^{2+}). Glavni dogodek po spodbujanju limfocitov je namreč sprememba v koncentraciji znotrajceličnega kalcija (ki prehaja skozi celično membrano), kar za sabo potegne številne celične procese – na primer kemotakso, oksidativni izbruh, proizvajanje citokinov ali fagoctiozo. Merjenje sprememb v koncentraciji znotrajceličnega kalcija limfocitov lahko prispeva k pojasnitvi patofiziološko pomembnih mehanizmov celične aktivacije, ki jih sumimo za dovzetnost na okužbe, vnetja, hiranje in podhranjenost ter poškodbe srca.

S spodbujanjem imunskih celic, limfocitov, smo v naši raziskavi želeli spodbuditi ali zavreti koncentracijo kalcija v celici. Z različnimi spodbujevalci, modulatorji ter sprožilci smo želeli ugotoviti, ali je naša metoda primerna za merjenje koncentracije znotrajceličnega kalcija v limfocitih.

Ugotovili smo, da vsi spodbujevalci znotrajceličnega kalcija v našem poskusu, ionomicin, protitelesa CD3 s kostimulirajočo molekulo CD28 in PHA, močno povišajo koncentracijo znotrajceličnega kalcija v limfocitnih celicah in so zato primerne pozitivne kontrole v poskusu merjenja znotrajceličnega kalcija. Metilprednizolon je uspešen zaviralec koncentracije znotrajceličnega kalcija in primerna negativna kontrola, ki potrjuje uspešnost metode merjenja znotrajceličnega kalcija s pretočnim citometrom. Metoda merjenja znotrajceličnega kalcija se je prav tako izkazala za uspešno ob dodajanju modulatorja, natrijevega nukleinata ter šibkem spodbujevalcu, kulturi *E. coli*.

8 VIRI

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. 2000. Cellular and molecular immunology. 4th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 553 str.

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2004. Essential cell biology. 2nd ed. New York, Garland Science: 740 str.

BD Biosciences. 2002. Introduction to flow cytometry: A learning guide. San Jose, BD Biosciences: 43 str.

BD Biosciences. 2005. BD FACSCanto™ Flow Cytometer. San Jose, BD: 12 str.

Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. 2000. The versatility and universality of calcium signaling. Nature Reviews: Molecular Cell Biology, 1: 11-21

Borowski A.B., Boesteanu A.C., Mueller Y.M., Carafides C., Topham D., Altman J.D., Jennings S.R., Katsikis P.D. 2007. Memory $CD8^+$ T cells require CD28 costimulation. Journal of Immunology, 179: 6494-6503

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

Buttgereit F., Krauss S., Brand M.D. 1997. Methylprednisolone inhibits uptake of Ca^{2+} and Na^+ ions into concanavalin A-stimulated thymocytes. Biochemical Journal, 326: 329-332

Chen J., Seviour R. 2007. Medicinal importance of fungal β-(1→3), (1→6)-glucans. Mycological Research, 111: 635-652

Clementi E., Martino G., Grimaldi L.M., Brambilla E., Meldolesi J. 1994. Intracellular Ca^{2+} stores of T lymphocytes: changes induced by *in vitro* and in *vivo* activation. European Journal of Immunology, 24: 1365-1371

Gajewski T.F., Schell S.R., Fitch F.W. 1990. Evidence implicating utilization of different T cell receptor-associated signaling pathways by TH1 and TH2 clones. Journal of Immunology, 144: 4110-4120

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

Hamelryck T.W., Dao-Thi M.H., Poortmans F., Chrispeels M.J., Wyns L., Loris R. 1996. The crystallographic structue of phytohemaglutinin – L. Journal of Biological Chemistry, 271, 34: 20479-20485

Hogan P.G., Lewis R.S., Rao A. 2010. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. Annual Review of Immunology, 28: 491-533

Ihan A. 1999. Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom. Ljubljana, Kemomed, d.o.o.: 11-13

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

Isolation of mononuclear cells: Methodology and applications. 2007. Uppsala, GE Healthcare Bio-Sciences AB: 24 str.

Jeong Y., Jung I.D., Lee C.M., Chang J.H., Chun S.H., Noh K.T., Jeong S.K., Shin Y.K., Lee W.S., Kang M.S., Lee S.Y., Lee J.D., Park Y.M. 2009. The novel role of platelet-activating factor protecting mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. PloS ONE, 4, 8: e6503, doi: 10.1371/journal.pone.0006503: 9 str.

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

June C.H., Moore J.S. 2004. Measurement of intracellular ions by flow cytometry. V: Current protocols in immunology. Colligan J.E. (ed.). New York, Wiley: 5.5.1-5.5.20

Kim H.S., Hong J.T., Kim Y., Han S.B. 2011. Stimulatory effect of betaglukans in immune cells. Immune Network, 11, 4: 191-195

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

Kosti O., Byrne C., Cocilovo C., Willey S.C., Zheng Y.L. 2010. Phytogemagglutinin-induced mitotic index in blood lymphocytes: a potential biomarker for breast cancer risk. Breast Cancer: Basic and Clinical Research, 4: 73-83

Kotnik V., Čurin-Šerbec V., Ihan A., Jeras M., Malovrh T., Simčič S., Škoberne M., Wraber B. 2001. Imunologija: priročnik za vaje. Ljubljana, Medicinski razgledi: 13-17

Lidy Verburg-Van Kemande B.M., Saeij P.J., Flik G., Willems P. 1998. Ca^{2+} signals during early lymphocyte activation in carp *Cyprinus carpio* L. Journal of Experimental Biology, 201: 591-598

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

Mason M., Grinstein S. 1993. Ionomycin activates electrogenic Ca^{2+} influx in rat thymic lymphocytes. Biochemical Journal, 296: 33-39

Meszaros G., Szalay B., Toldi G., Kaposi A., Vasarhely B., Treszl A. 2012. Kinetic measurements using flow cytometry: new methods for monitoring intracellular processes. Assay and Drug Development Technologies, 10, 1: 97-104

Metz L.M., Patten S.B., Archibald C.J., Bakker J.I., Harris C.J., Patry D.G., Bell R.B., Yeung M., Murphy W.F., Stoian C.A., Billesberger K., Tillotson L., Peters S., McGowan D. 2004. The effect of immunomodulatory treatment on multiple sclerosis fatigue. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 75: 1045-1047

Missiaen L., Robberecht W., Van Den Bosch L., Callewaert G., Parys J.B., Wuytack F., Raeymaekers L., Nilius B., Eggermont J., De Smedt H. 2000. Abnormal intracellular Ca^{2+} homeostasis and disease. Cell Calcium, 28, 1: 1-21

Morgan A.J., Jacob R. 1994. Ionomycin enhanches Ca^{2+} influks by stimulating store-regulated cation entry and not by direct action at the plasma membrane. Biochemical Journal, 300: 665-672

Norimatsi M., Tomoko O., Aoki A., Ohishi K., Tamura Y. 1995. *In-vivo* induction of apoptosis in murine lymphocytes by bacterial lipopolysaccharides. Journal of Medical Microbiology, 43: 251-257

Oh-hora M., Rao A. 2008. Calcium signaling in lymphoytes. Current Opinion in Immunology, 20: 250-258

Oh-hora M., Rao A. 2009. The calcium/NFAT pathway: role in development and function of regulatory T cells. Microbes Infections, 11, 5: 612-619

Plankl M. 2009. Vpliv atorvastatina na sintezo citokinov vnetnega in specifičnega imunskega odziva v kulturah humanih mononuklearnih celic iz venske krvi. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 72 str.

Podojil J.R., Miller S.D. 2009. Molecular mechanisms of T-cell receptor and costimulatory molecule ligation/blockade in autoimmune disease therapy. Immunological Reviews, 229: 337-355

Prokai A., Fekete A., Pasti K., Rusai K., Banki N.F., Reusz G., Szabo A.J. 2012. The importance of different immunosupressive regimens in the development of posttransplant diabete mellitus. Pediatric Diabates, 13: 81-91

Robič T. 2008. Meritve znotrajcelične aktivnosti kalcija v celicah sveže izoliranega epitela človeške leče. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 55 str.

Schepers E., Glorieux G., Dhondt A., Leybaert L., Vanholder R. 2009. Flow cytometric calcium flux assay: Evaluation of cytoplasmic calcium kinetics in whole blood leukocytes. Journal of Immunological Methods, 348: 74-82

Shirley Lin C., Boltz R.C., Blake J.T., Nguyen M., Talento A., Fischer P.A., Springer M.S., Sigal N.H., Slaughter R.S., Garcia M.L., Kaczorowski G.J., Koo G.C. 1993. Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation. Journal of Experimental Medicine, 177: 637-645

Skale N. 2013. Merjenje proliferacije limfocitov po spodbujanju z bakterijskimi LPS in glivičnimi betaglukan produkti sten. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije (v pripravi)

Stopinšek S., Ihan A., Wraber B., Terčelj M., Salobir B., Rylander R., Simčič S. 2011. Fungal cell wall agents supress the innate inflammatory cytokine response of human

peripheral blood mononuclear cells challenged with lipopolysaccharide *in vitro*. International Immunopharmacology, 11, 8: 939-947

Swain P., Nayak S.K., Nanda P.K., Dash S. 2008. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review. Fish and Shellfish Immunology, 25, 3: 191-201

Takahashi A., Camacho P., Lechleiter J.D., Herman B. 1999. Measurement of intracellular calcium. Physiological Reviews, 79, 4: 1089-1125

Trubowitz S., Masek B., Del Rosario A. 1966. Lymphocyte response to phytohemagglutinin in Hodgkin's disease, lymphatic leukemia and lymphosarcoma. Cancer, 19: 2019-2023

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

Vozelj M., 2001. Temelji imunologije. Ljubljana, DZS: 552 str.

Žemva M. 1968. Laboratorijska hematologija. Ljubljana, DZS: 319 str.

ZAHVALA

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

Hvala prof. dr. Mojci Narat za natančen, strokoven in hiter pregled magistrskega dela ter 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.

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

Iz srca se zahvaljujem svojim staršem za spodbudo, nasvete in oporo med samim študijem, Žigu za bratsko spodbujanje med učenjem ter tehnično pomoč pri izdelavi magistrske naloge in Evi za dobro voljo vedno in povsod. Hvala babicam za tople obroke med predavanji in večno pripravljenost za pomoč.

Nik, hvala za potrpežljivost, razumevanje, pozitivno energijo in ker verjameš vame.

Hvala Nini in Katji za prijateljstvo, pomoč in dobro družbo v vseh študijskih letih. Nini se zahvaljujem tudi za sodelovanje, prijateljske nasvete in podporo tako med eksperimentalnim delom poskusa kot tudi med nastajanjem magistrskega dela.