Molekulska i stanična svojstva imunopatofiziološkog odgovora na klicu i cjepivo Bordetellae pertussis u mišjem modelu

Barbić, Jerko

Doctoral thesis / Disertacija

2003

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:247920

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository



Središnja medicinska knjižnica

Barbić, Jerko (2003) *Molekulska i stanična svojstva imunopatofiziološkog odgovora na klicu i cjepivo Bordetellae pertussis u mišjem modelu [Molecular and cellular properties of immunopathophysiologic response to Bordetella pertussis bacterium and vaccine in the mouse model].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

http://medlib.mef.hr/164

University of Zagreb Medical School Repository

http://medlib.mef.hr/

MEDICINSKI FAKULTET

SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

Jerko Barbić

Molekulska i stanična svojstva imunopatofiziološkog odgovora na klicu i cjepivo *Bordetellae pertussis* u mišjem modelu

Doktorska disertacija

Zagreb, 2003

ZAHVALA

Ova disertacija je dijelom izrađena u institutu Američke administracije za hranu i lijekove (Food and Drug Administration) pri Nacionalnim Institutima Zdravlja (National Institutes of Health, Bethesda, SAD), Klinici za patofiziologiju KBC Rebro Zagreb te u Klinici za urologiju KB Osijek.

U ovoj prigodi izuzetno mi je zadovoljstvo da mogu zahvaliti svima koji su mi pomogli i omogućili izradu ove disertacije.

Posebno bih želio zahvaliti prof. dr. Zdenku Kovaču koji me je iz Osijeka poslao na poslijedoktorski studij u SAD, prvo na Sveučilište u Baltimoreu kod Dr. Barbare Fox a kasnije na Nacionalni Institut zdravlja u Bethesdi kod Dr. Roberte Shahin.

Posebno bih želio zahvaliti prof. dr. Antunu Tucaku predstojniku Klinike za urologiju KB Osijek, za izuzetnu podršku tijekom znanstvenog usavršavanja u SAD-u i povratka u Osijek.

Iznimnu zahvalnost dugujem dr. Roberti Shahin, pod Robertinim vodstvom su nastali svi rezultati prezentirani u ovoj disertaciji. Rad i boravak u njenom laboratoriju u sredini punoj znanstvenih izazova omogućio mi je daljnji znanstveni razvoj. Posebno bih želio zahvaliti na njezinoj potpori i prijateljskim savjetima kao za vrijeme boravka u SAD, tako i nakon povratka u domovinu.

Želio bih zahvaliti prof. dr. Zdenku Kovaču na raspravama, savjetima i tumačenjima te strpljivom jezičnom ujednačavanju koji su doveli do ove disertacije.

Želio bih zahvaliti i svojoj obitelji bez čije potpore i razumijevanja ova istraživanja i disertacija ne bi bila moguća.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA 1

1. UVOD

1.1. Klinička obilježja infekcije *B. pertussis* 6
1.1.1. Virulentni čimbenici *B. pertussis* 8
1.1.2 Adhezijske molekule 8
1.1.3. Filamentozni hemaglutinin (FHA) 10
1.1.4. Fimbrije (vlasaste bjelančevine) 11
1.1.5. Pertaktin 12
1.1.6. Toksin pertusisa 13
1.1.7. BrkA (engl. *Bordetellae resistance to killing)* 13
1.1.8. Toksin adenilne ciklaze 14
1.1.9. Trahealni citotoksin 15
1.1.10. Dermonekrotični toksin 15
1.1.11. Lipopolisaharid (LPS) 15
1.1.12. Ostali virulentni čimbenici 16
1.2. Genetska regulacija izražaja virulentnih čimbenika *Bordetellae* 17
1.3. Fiziologija imunosnog odgovora u infekciji 19
1.3.1. Odgovor domaćina na infekciju 19
1.3.2. Prirodne zaprjeke ulaska klica u organizam 20
1.3.3. Uloga komplementa 21
1.3.4. Temeljna svojstva upale 24
1.3.5. Prirođena imunost 28
1.3.6. Stečena imunost 32
1.3.7. Odgovor pomoćničkih limfocita T 34
1.3.8. Infekcija i Th1/Th2 usmjeravanje imunoreaktivnosti 37
1.3.9. Sluznička imunost 42
1.4. Načela razvitka cjepiva 45

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 48

3. TVARI I POSTUPCI 50

3.1. Pokusne životinje 50
3.2. Mišji model aerosolne infekcije *B. pertussis* 51
3.3. Određivanje m-RNK citokina u plućnom tkivu pomoću postupka RT-PCR 52
3.4. Dobivanje limfocitnih T-linija specifičnih za *B. pertussis* 54
3.5. Analiza odgovora limfocita T na imunizaciju *B. pertussis* 54
3.6. Određivanje proizvodnje citokina u uvjetima *in vitro* 55
3.7. *In vivo* neutralizacija citokina 55
3.8. Antigeni 56
3.9. Imunizacija 56
3.10. Analiza proizvodnje protutijela 57
3.11. Pokusi prijenosa limfocita B 57
3.12. Analiza podataka 58

4. REZULTATI 59

4.1. Infektivna doza *B. pertussis* u mišjem imunokompetentnom modelu aerosolne respiratorne infekcije 59

4.2. Tijek infekcije u odraslih i neonatalnih laboratorijskih miševa BALB/c 60

4.3. Kinetika odstranjivanja *B. pertussis* iz tkiva nakon aerosolne infekcije imunodostatnih laboratorijskih miševa BALB/c 61

4.4. Karakterizacija limofocita T dobivenih iz drenažnih regionalnih limfnih čvorova dobivenih nakon infekcije *B. pertussis* imunodostatnih miševa BALB/c 62

4.5. Izražaj mRNK citokina u plućnom tkivu nakon izlaganja miševa BALB/c bakterijskom areosolu 64

4.5.1. Titar specifičnih protutijela u serumu i bronhoalveloarnom ispirku u miševa BALB/c nakon izlaganja aerosolu 66

4.5.2. Uloga staničnog kraka u infekciji *B. pertussis* 68
4.5.3. *In vitro* proliferacija $CD4^+CD8^-$ limfocita T i proizvodnja citokina 69

4.5.4. Usporedba izražaja mRNK citokina u plućnom tkivu *SCID* i atimičnih (*nude)* miševa s imunodostatnim miševima BALB/c 71

4.5.5. Učinak neutralizacije IFN-γ *in vivo* na tijek infekcije *B. pertussis* kod imunodostatnih miševa BALB/c 73

4.5.6. Izražaj mRNK za IFN-γ u plućnom tkivu C57BL6 miševa i u miševa s izbačenim genom za IFN-γ nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis* 74

4.6. Mehanizmi imunizacije 76

4.6.1. Zaštita miševa BALB/c u aerosolnom modelu infekcije *B. pertussis* nakon intranazalne imunizacije različitim antigenskim pripravcima 76

4.6.2. Uloga limfocita T u zaštitnoj imunosti pri cijepljenju različitim pripravcima cjepiva *B. pertussis* 79

4.6.3. Određivanje specifičnog antigena odgovornog za proliferaciju limfocita T nakon imunizacije staničnim cjepivom *B. pertussis* 80

4.6.4. Proizvodnja citokina nakon pobude u uvjetima *in vitro* limfocita T dobivenih iz drenažnih traheobronhalnih limfnih čvorova različito imuniziranih miševa BALB/c 82

4.6.5. Istraživanje izražaja mRNK za IL-4 i IFN-γ u plućnom tkivu miševa BALB/c imuniziranih staničnim ili bestaničnim cjepivom nakon izlaganja aerosolu klica *B. pertussis* 84

4.6.6. Učinak *in vivo* neutralizacije IFN-γ i IL-4 na tijek infekcije *B. pertussis* u miševa BALB/c imuniziranih staničnim ili bestaničnim cjepivom 86

4.6.7. Tijek infekcije u miševa s izbačenim genom za IFN-γ intranazalno imuniziranih staničnim cjepivom *B. pertussis* 88

4.6.8. Titar protutijela nakon imunizacije miševa BALB/c staničnim ili bestaničnim cjepivom *B. pertussis* 89

4.6.9. Tijek infekcije nakon prijenosa imunog seruma dobivenog od miševa BALB/c poslije imunizacije staničnim ili bestaničnim cjepivom u mišjem respiratornom modelu infekcije *B. pertussis* 91

4.6.10. Uspješnost intranazalne imunizacije staničnim ili bestaničnim cjepivom *B. pertussis* u limfopeničnih B miševa 94
4.6.11. Zaštitni učinak limfocita B dobivenih nakon imunizacije staničnim cjepivom *B. pertussis* u respiracijskom modelu infekcije limfopeničnih B miševa 96

4.6.12. Važnost limfocita T pri imunizaciji staničnim cjepivom *B. pertussis* 99

4.6.13. Uloga limfocita T u dugotrajnom nadzoru infekcije nakon imunizacije staničnim cjepivom *B. pertussis* 100

4.6.14. Uloga limfocita T $CD4^+$ i $CD8^+$ pri imunizaciji staničnim cjepivom *B.* pertussis 101

5. RASPRAVA 103

5.1. Mišji model infekcije *B. pertussis* 103

5.2. Mehanizmi zaštitne imunosti u infekciji B*. pertussis* imunodostatnih miševa 104

5.3 Imunološki odgovor na imunizaciju staničnim i bestaničnim cjepivom *B. pertussis* 109

6. ZAKLJUČCI 115

7. SAŽETAK 117

8. SUMMARY 119

9. LITERATURA 121

10. ŽIVOTOPIS 143

POPIS KRATICA

ACT	toksin adenilne ciklaze (od engl. *Adenylate Cyclase Toxin*)
ADP	adenozin-difosfat
Ag	antigen
APC	imunopredočne stanice (od engl. *Antigen Presenting Cells)*
B	serumski čimbenik uključen u komplementnu kaskadu
$B^{-/-}$KO	B limfopenične životinje
B6129/JF_2	soj pokusnih miševa, H-2^b
B7.1	kostimulacijska molekula, ligand koreceptor CD28
B7.2	kostimulacijska molekula, ligand koreceptor CD28
BAL	bronhoalveloarni ispirak
BALB/c	soj pokusnih miševa, H-2^d
BALT	limfoidno tkivo povezano s sluznicom bronha (od engl. *Bronchus associated lymphoid tissue*)
BCG	*Bacille Calmette Guerin*
BG	agar za nasađivanje klica po *Bordet–Gengou*
BrkA	virulentna sastavnica klice *B. pertussis* (od engl. *Bordetella resistance to kiling*)
bvg	genetski lokus *B. pertussis* odgovoran za izražaj virulentnih sastavnica klice (od engl. *Bordetella pertussis virulence gene*)
C1INH	C1 kočidbeni čimbenik (od engl. *C1 inhibitor*)
C3	sastavnica komplementa
C3H/HeJ	pokusni soj miševa, H-2^b
C57BL6	pokusni soj miševa, H-2^k
cAMP	ciklički adenozin-monofosfat
CCR5	CC kemokinski receptor 5 (od engl. *CC-chemokine receptor 5*)
CD	stanična diferencijacija (od engl. *Cellular differentiation*)
$CD4^{-/-}$KO	CD4 limfopenične životinje
$CD8^{-/-}$KO	CD8 limfopenične životinje
CFU	broj kolonija klica (od engl. *Colony forming units*)

c-MAF	transkripcijski čimbenik
CR	komplementni receptor (od engl. *Complement receptor*)
CRD	karboksi-završna domena koja prepoznaje ugljikohidrate (od engl. carboxy-terminal carbohydrate recognition domain)
CRP	C-reaktivni protein
CTLA4	kostimulacijska molekula na limfocitima T (od engl. *Cytotoxic T lymphocyte antigen 4*)
cysLTs	cisteinilni leukotrieni (od eng. Cysteinyl-leukotriens)
D	serumski čimbenik uključen u komplementnu kaskadu
DAF	čimbenik ubrzavanja raspada (od engl. *Decay accelerating factor*)
DC	dendritičke stanice (od engl. *Dendritic cells*)
DL-PLG	poly DL-lactide-co-glycolide, materijal za uklapanje antigena
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
DNT	dermonekrotični toksin pertusisa (od engl. *Dermonecrotic toxin*)
ELISA	osjetljivi imunotest s enzimatskim sustavom očitovanja (od engl. *enzyme–linked immunosorbent assay*)
Fe	željezo
FFBP	umrtvljene klice *B. pertussis* fiskirane u formalinu
FFEC	umrtvljene klice *E. coli* fiksirane u formalinu
FHA	filamentozni hemaglutinin
FIM	fimbrije (vlasaste bjelančevine)
FITC	protutijela konjugirana s fluorescein-izotiocijanatom
G^-	gram-negativna klica
GALT	Limfoidno tkivo povezano s sluznicom crijeva (od engl. *gut associated lymphoid tissue*)
GATA3	prijepisni čimbenik
H	nadzorni čimbenik komplementa
HBD	ljudski defenzini (od engl. *Human β-defensin*)
Hib	*Haemophilus influenzae tip B*
HIV	virus čovjekove imunonedostatnosti (od engl. *Human immunodeficiency Virus)*

HRPT	hipoksantin-guanin fosforibozil transferaza
I	nadzorni čimbenik komplementa (serinska proteaza)
ICAM-1	međustanična adhezijska molekula (od engl. *intracellular adhesion molecule*)
ICOS	imunosna kostimulacijska molekula (od engl. *immune costimulatory molecule*)
IFN-γ :	gama interferon
$IFN^{-/-}KO$	životinje s izbačenim genom za IFN-γ
Ig	imunoglobulin
IL	interleukini
IL-R	interleukinski receptor
KO	oznaka za izbačeni gen (od engl. *knock-out*)
LBP	protein koji veže lipopolisaharide (od engl. *Lipopolysaccharide binding protein*)
LOS	lipooligosaharid
LPS	lipopolisaharid
LRI	leukocitni integrinski receptor (od engl. *leukocyte response integrin*)
LTB4	leukotrien B4 (od engl. *leukotriene B4*)
mAB	monoklonska protutijela
MAC	membranolitički sklop (od engl. *membrane attacking complex*)
MASP	serinska proteaza vezana uz lektine koji vežu manane (od engl. *MBL associated serine protease*)
MBL	lektin koji veže manane (od engl. *manan binding lectin*)
MCP	membranski kočimbenik proteolize (od engl. *membrane cofactor of proteolyisis*)
MHC	antigeni glavnog sustava tkivne snošljivosti (od engl. *major histocompatibility complex*)
m-RNK	glasnička ribonukleinska kiselina
NAD	nikotin-amid-dinukleotid
NADP	nikotin-amid-dinukleotid-fosfat
NF-κB	nuklearni čimbenik κB (od engl. *nuclear factor -κB*)

NFAT	nuklearni čimbenik aktiviranih limfocita T (od engl. *nuclear factor of activated T cells*)
NK	prirodnoubilačke stanice (od engl. *natural killer cells*)
NO	dušikov monoksid
nude	atimični miševi bez limfocita T
OMP	bjelančevine izvanjske membrane klice (od engl. *outer membrane proteins*)
P	kontrolni čimbenik komplementa (od engl. *properdin*)
PAF	čimbenik pobude trombocita (od engl. *platelet activating factor*)
PAMP	molekularni obrasci patogena (od engl. *pathogen associated molecular pattern*)
PBS	fosfatni pufer
PDGF	čimbenik rasta trombocita (od engl. *platelet derived growth factor*)
PE	protutijela konjugirana fikoeritrinom (od engl. *phycoerythrin*)
PG	prostaglandin
PLA_2	fosfolipaza A_2 (od engl. *phospholipase* A_2)
PRN	pertaktin
PRR	receptori prirođene imunosti (od engl. *pattern recognition receptors*)
PTX	Pertusisni toksin
PMN	polimorfonuklearni leukociti
RGD	tripeptid aminokiselina (arginin-aspartat-glicin)
RT-PCR	reakcija povratnog prijepisa i umnožavanja (od engl. *reverse transcriptase polymerase chain reaction*)
SAP	serumska amiloidna bjelančevina (od engl. serum amyloid protein)
SCID	miševi s nedostatkom limfocita T i B (od engl. *severe combined immunodeficiency disease*)
sIgA	sekrecijski IgA
SKAT2	transkripcijski čimbenik
SP	surfaktantna bjelančevina(od engl. *surfactant protein*)
STAT	unutarstanične signalne molekule (od engl. *signal transducer and activator of transcription*)

TAP	prijenosnici povezani s predočavanjem antigena (od engl. *transporters associted with antigen processing*)
TCCR	citokinski receptor limfocita T (od engl. *T cell cytokine receptor*)
TCR	antigenski receptor limfocita T (od engl. *T cell receptor*)
$TCR^{-/-}KO$	T limfopenične životinje
TCT	trahealni citotoksin (od engl. *tracheal cytotoxin*)
TGF	transformirajući čimbenik rasta
Th1/ Th2	pomoćnički limfociti T (od engl. *T helper lymphocytes*)
TNF-α	čimbenik tumorske nekroze alfa
TxA2	tromboksan A2 (od engl. *Tromboxane A2*)
VLA	skupina integrinskih receptora (od engl. *Very late antigen*)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (od engl. *World Health Organization*)

1.1. Klinička obilježja infekcije *B. pertussis*

Bordetella pertussis patogenična je klica u čovjeka koja uzrokuje respiratornu infekciju poznatu kao hripavac ili pertusis. Ovu gram–negativnu klicu (skraćeno G^-) izolirali su Bordet i Gengou 1906. godine. *B. pertussis* ima genom veličine 3,88 Mb od čega je 66% genoma sekvencionirano, a klica izražava više čimbenika virulentnosti koji doprinose njenoj patogenosti (1). Virulentni čimbenici uključuju adhezijske molekule specifične za pojedine molekule koje služe kao receptori na eukariotskim stanicama, zatim nekoliko izvanstaničnih egzotoksina koji utječu na odgovor domaćina te dovode do oštećenja tkiva. Klica *B. pertussis* epidemijski se širi putem aerosola. U organizmu čovjeka klica pokazuje posebni tropizam za cilije respiratornog epitela koji oblaže nazofarinks, dušnik i bronhalno stablo, vezujući se za integrinske receptore te glikoksilirane molekule respiratornog epitela i alveolarnih makrofaga. Infekcija *B. pertussis* ostaje, u načelu, ograničena na dišni sustav i ne napreduje u bakterijemiju ili meningitis (2).

Hripavac obično započinje kao blaga infekcija gornjeg dijela respiratornog sustava trajanja 7-10 dana, s nespecifičnim simptomima, obično bez vrućice. Taj početni kataralni stadij bolesti ujedno predstavlja razdoblje kada se klica može dokazati kultiviranjem uzorka iskašljaja (3). Nakon toga bolest napreduje do paroksizmalnog stadija obilježenog epizodama naprasnog kašlja. Djeca mlađa od godine dana imaju najveći rizik razvitka komplikacija pri infekciji *B. pertussis*. Najčešće su komplikacije upala pluća (obično kao rezultat sekundarne infekcije), apneja, konvulzije, encefalopatija i smrt (4). U razdoblju između 1986. do 1988., u djece mlađe od 6 mjeseci, 0,5% svih slučajeva hripavca imalo je smrtni ishod. Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) godišnje se u svijetu pojavljuje oko 600 000 smrtnih slučajeva nastalih kao rezultat infekcije *B. pertussis,* uglavnom među necijepljenom djecom (5). Incidencija hripavca znatno se smanjila od 1950. godine kada je uveden standard cijepljenja za *B. pertussis* cjepivom koje čine umrtvljene klice (stanično cjepivo). Nakon toga prema nekim procjenama u SAD-u ima godišnje oko 1200 – 4000 slučajeva hripavca, s 5 – 10 smrtnih slučajeva (5).

Istraživanja novoga učinkovitijeg cjepiva, sastavljenoga od pojedinačnih antigena klice (poznatim kao bestanično cjepivo), traju posljednjih nekoliko desetljeća

(6). Razlozi su tome višestruki, jedan je svakako uklanjanje čestih lokalnih i sustavnih neželjenih posljedica cijepljenja staničnim cjepivom *B. pertussis.* (Tablica 1.) Osim navedenih relativno blagih neželjenih posljedica neke studije povezuju primjenu tog cjepiva s teškim neurološkim komplikacijama kao što su konvulzije, hipotonično–hiporesponsivne epizode i encefalopatije (7). Drugi je razlog činjenica da cijepljenje ne dovodi do dugotrajnije zaštitne imunosti. U prilog tome govore studije iz zemalja s visokim postotkom procijepljenosti. Ondje je pertusis u adolescenata i odraslih značajna bolest, uglavnom u vidu produljenog kašlja. Takvi su bolesnici izvor širenja bolesti na osjetljivu populacijsku skupinu (8).

Tablica 1. Učestalost neželjenih reakcija pri primjeni staničnog i bestaničnog cjepiva u ljudi[a]

Neželjene reakcije	Učestalost %	
	Stanično cjepivo ♦	Bestanično cjepivo •
lokalno crvenilo	40	8-15
lokalno otvrdnuće	52	5-7
lokalni otok	38	5
vrućica 37,7-38,7 C	46	3-8
vrućica > 38,8 C	4	0,5
podražljivost	34	10

♦ Stanično cjepivo: suspenzija mrtvih klica *B. pertussis.*

• Bestanično cjepivo: cjepivo koje sadrži pojedine pročišćene antigenske komponente klice.

[a] prema literaturnom izvoru (9).

Optimalno bi cjepivo za hripavac moralo biti učinkovito u pokretanju specifične imunosti, te bi uz to morao postojati primjeren način nadzora uspješnosti cijepljenja. U tablici 2. prikazano je kako kod cjepiva za hripavac ne postoje serumski pokazatelji uspješnosti cjepiva izraženi kroz zaštitni titar protutijela, za razliku od nekih drugih cjepiva, kao recimo za Hib (Hib, lat. *Haemophilus influenzae tip B*), u kojega je titar protutijela u dobrom suodnosu s uspješnošću cjepiva (10). Mehanizmi zaštitne imunosti kod *B. pertussis* djelomično su poznati. Načelno gledajući, poznavanje imunosnih mehanizama osnovni je preduvjet za uspješniji razvoj cjepiva.

Tablica 2. Pokazatelji uspješnosti cjepiva[a]

Vrsta cjepiva	Uspješnost cjepiva (%)	Zaštitna serumska razina protutijela (μg/ml)
Hib[a]	95-100	Više od 1 μg/ml
Bestanično pertussis cjepivo	71-85	Nema korelacije

[a] Hib = cjepivo za Haemophilus influenzae tip B
[a] prema literaturnom izvoru (11).

1.1.1. Virulentni čimbenici *B. pertussis*

Bordetella pertussis proizvodi mnoge molekule koje djeluju kao čimbenici virulentnosti klice. Virulentni čimbenici imaju ulogu u međuodnosu klice i domaćina te posljedično u razvitku simptoma infekcije *B. pertussis*. Predstavljaju ih površinske sastavnice (adhezijske molekule klice), bakterijski toksini te enzimi koji sudjeluju u patobiološkom međuodnosu klice i domaćina. Neki od njih, kao što su toksin pertusisa (PTX), filamentozni hemaglutinin (FHA), pertaktin (PRN), adenilna ciklaza, trahealni citotoksin dobro su poznati te je određena njihova uloga u patogenezi infekcije (11-14). U tablici 3. navedena su osnovna molekularna i biološka svojstva virulentnih sastavnica klice.

1.1.2. Adhezijske molekule

Sposobnost vezivanja klica za površinu stanica domaćina, omogućuje kolonizaciju domaćina i razvitak bolesti. Načelno gledajući, bez adhezijskog međuodnosa klica se fiziološki odstranjuje iz dišnog sustava putem sluzi, cilijarnog valovitog gibanja i kašlja. Adhezijske molekule klice *B. pertussis* omogućuju njezino zadržavanje u respiratornom sustavu. *B. pertussis* izražava nekoliko različitih adhezijskih molekula. Cilije respiratornog epitela, alveolarni makrofazi i leukociti, primarni su ciljevi vezivanja te klice. Adhezijske molekule (adhezini) *B. pertussis* mogu se podijeliti u dvije skupine, jednu skupinu čine fimbrijalni adhezini (lat. *fimbriae*), a drugu skupinu čine nefimbrijalni adhezini.

Tablica 3. Virulentne sastavnice *B. Pertussis*[a]

Sastavnica	Temeljna molekula	Biološka aktivnost
Pertusisni toksin (PTX)	105 kDa bjelančevina, sastavljena od podjedinica od S1 do S5	S2-S5 su adhezijske domene. S1 domena ima enzimatsku aktivnost
Filamentozni hemaglutinin (FHA)	220 kDa bjelančevina koji sadrži aminokiselinski tripeptid (arginin, glicin, aspartat) poznat kao RGD adhezijski sklop.	Adhezija za eukariotske stanice, vezivanje za glikoksilirane i integrinske receptore
Pertaktin (PRN)	69 kDa bjelančevina (sa RGD tripletom)	Adhezija za eukariotske stanice
Fimbrije (vlasaste bjelančevine) (FIM)	20-21 kDa, građene od dvije velike podjedinice Fim 2 i 3, te male podjedinice Fim D	Vezivanje za integrinski receptor na eukariotskim stanicama
Toksin adenilne ciklaze (ACT)	Toksin koji ima sposobnost ubacivanja enzimatske domene u stanicu	Porast cAMP, izazivanje apoptoze makrofaga, kočenje agregacije trombocita
Endotoksin	(LOS) lipooligosaharid	Upalna reakcija, vrućica
Trahealni citotoksin (TCT)	Disaharidni tetrapeptid (muramilni peptid)	Uzrokuje cilijarnu stazu respiratornog epitela
BrkA (*Bordetella resistance to kiling*)	Bjelančevina veličine 73 kDa	Kočenje serumskog komplementa
Dermonekrotični toksin ili Heat labile toxin (PEHLT)	Polipeptid veličine 102 kDa	Uzrokuje nekrozu kože

[a] podatci prema literaturnom izvoru (12).

1.1.3. Filamentozni hemaglutinin (FHA)

Filamentozni hemaglutinin je bjelančevina molekularne mase od 220 kDa (veličine 2x40 nm) koja je važna u vezivanju klice za gornje dijelove respiratornog sustava. Tri gena označena kao *fhaA*, *fhaB* i fhaC genetski su lokus bitan za izražaj te molekule (15). Poznati su nukleotidni dijelovi strukturalnog gena za FHA označenoga kao *fhaB*. FhaB kodira protein veličine 367 kDa (16). FHA sintetizira se kao veliki prekursor, dok zreli oblik te molekule zapravo čini 2/3 N-završnog dijela *fhaB* gena. Gen označen kao *fhaC* odvojen je od *fhaB* gena s tri različita gena (*fimB, fimC i fimD*) koja su važna u izražaju druge skupine filamentoznih adhezijskih molekula *B. pertussis* poznatih kao fimbrije (17). FhaC pripada skupini akcesornih proteina izvanjske membrane (OMP, engl. *outer membrane proteins*), koji su važni kod G^--klica u sekreciji hemolizina i adhezina. Prijenosna bjelančevina za koju se veže FHA putem N-završnog dijela molekule i koja ujedno oblikuje kanal u izvanjskoj membrani klice predstavlja izražaj FhaC gena (18). Prijenos velikih molekula kao FHA kroz G^--stijenku klica odvija se na nekoliko načina. Jedan je od njih tip II proteinskog prijenosa koji se sastoji od skraćenja molekule, a zatim njezinog vezivanja za specifični prijenosnik na membrani klice, u ovom slučaju za FhaC, preko N-završnog dijela FHA molekule (19). FHA pokazuje tri različita načina vezivanja za eukariotske stanice. Jedno je vezivanje specifično za CR3 integrinski receptor na makrofazima (CR3, engl. *complement receptor 3*). Drugo je vezivanje preko vezujućeg mjesta za ugljikohidrate, a treće je vezivanje preko heparinskog veznog mjesta na eukariotskim stanicama. Vezno mjesto FHA-a za ugljikohidrate koje specifično prepoznaje glikokonjugate koje sadrže galaktozu, važno je za vezivanje te molekule sa cilijama respiratornog epitela i makrofaga, dok heparinsko vezno mjesto ima ulogu u vezivanju za ostale stanice respiratornog epitela (15, 20, 21). Molekula FHA sadrži tripeptid aminokiselina arginin-aspartat-glicin (poznat kao RGD slijed u fhaB genu).

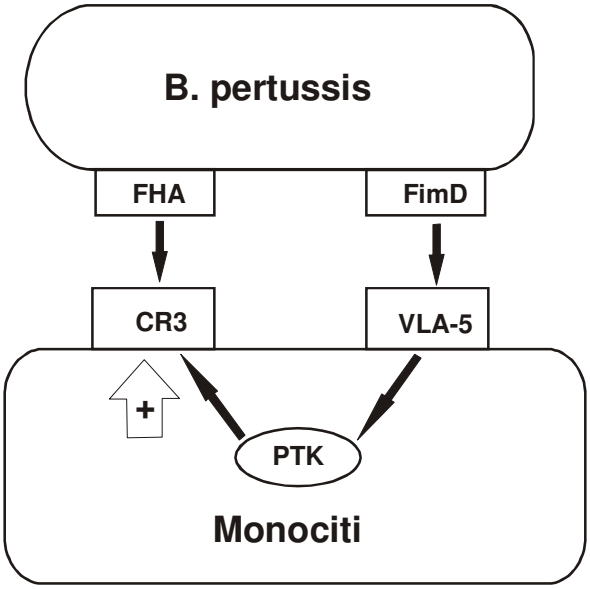
Istovrsni RGD tripeptid ima adhezijsku ulogu u eukariotskim stanicama putem svog izražaja u integrinskim receptorima. RGD tripeptid ima značajnu ulogu u adheziji FHA za makrofage i monocite (22). Različite se klice vežu za skupinu leukocitnih integrinskih receptora bilo izravno, bilo putem C3b sastavnice komplementa vezane za površinu klice. Molekula FHA izravno se veže za leukocitni receptor β_2 integrina, odnosno, komplementni receptor tipa 3 poznat kao CD11b/CD18. U tom vezivanju odlučujuću ulogu ima prethodno opisan RGD tripeptid (22). Osim toga FHA se putem RGD slijeda vezuje za LRI (LRI, engl. *leukocyte response integrin*) na monocitima, tim vezivanjem sama klica potiče adheziju putem prije opisanog CR3 receptora (23). Interakcija s integrinskim leukocitno/monocitnim receptorima može imati ulogu u unutarstaničnoj lokalizaciji klice, s obzirom na veliku sličnost s dobro istraženim načinom unutarstanične invazije kod *Yersinija* koja se odvija vezivanjem invazina za integrinski β1 receptor (24, 25). Podatci iz literature ukazuju kako FHA može imati izravnu proapoptotsku te upalotvornu ulogu u makrofagima, kao posljedica interakcije s makrofagnim receptorom za čimbenik tumorske nekroze alfa (TNF-α, engl. *tumor necrosis factor-*α) (26).

Poremećaj izražaja FHA sprječava vezivanje klice za cilije stanica dušnika (27). Osim toga protutijela specifična za FHA sprječavaju vezivanje klice za respiratorni epitel. Nakon imunizacije s FHA-om ili nakon davanja protutijela specifičnih za FHA utvrđena je inhibicija kolonizacije dišnog sustava *B. pertussis* (28).

1.1.4. Fimbrije (vlasaste bjelančevine)

Fimbrije su filamentozne molekule na površini klica sastavljene od istovrsnih proteinskih podjedinica. Nazočnost fimbrija na klicama obično je povezana s njihovom sposobnošću izazivanja aglutinacije eritrocita, vezivanja za druge eukariotske stanice te sposobnošću izazivanja bolesti. Prema aglutinaciji klice *B. pertussis* su serotipizirane kao serotip 2 i 3 (29). Nazočnost određenog serotipa, odnosno aglutinogena klice, utvrđena je u epidemijama hripavca u V. Britaniji (30). Fimbrije *B. pertussis* kao i u ostalih klica predstavljaju velike multimere sastavljene od malih

ponavljajućih jedinica veličine od 22 kDa, a na elektronskom sitnozoru izgledaju kao dugi nastavci promjera od 5 nm. Fimbrije *Bordetellae* sastoje se od dvije velike podjedinice označene kao Fim2 i Fim3 te male podjedinice označene kao FimD (31). FimD se nalazi na vrhu fimbrija, ima posebnu sklonost za sulfatne ugljikohidrate, a uz to pokazuje i vezivanje za integrinski receptor VLA-5 (VLA-5, engl. *very late antigen 5*) (32). FimD vezivanjem za VLA-5 aktivira tirozinsku kinazu u monocitima što dovodi do pojačanog izražaja CR3, a koji je ligand za FHA odnosno drugu nefimbrijalnu adhezijsku molekulu *Bordetelle* (33). (Slika 1.)



Slika 1. Shematski prikaz molekulskog mehanizma vezivanja *B. pertussis* na monocite. Tijekom međudjelovanja mala podjedinica fimbrija (FimD) se veže za VLA-5 na monocitima čime aktivira tirozinsku kinazu (PTK), koja dovodi do pojačanog izražaja CR3 receptora (označeno bijelom strelicom s oznakom plus), te tako omogućava vezivanje FHA – CR3.

1.1.5. Pertaktin

Pertaktin (PRN) bjelančevina je molekularne mase 69 kDa koja se nalazi na površini *Bordetelle,* a koja ima ulogu u njenoj adheziji za eukariotske stanice (34). Nazočnost RGD tripeptida u molekuli pertaktina daje joj strukturalne osobine

molekula koje su uključene u međustanično povezivanje (34, 35). Ligand za pertaktin nije u potpunosti određen, za razliku od drugih adhezijskih molekula kao što su FHA i fimbrije (36). Osim RGD tripeptida pertaktin posjeduje vezna područja bogata prolinom. Imunizacija pertaktinom u mišjem modelu infekcije *B. pertussis* ima zaštitni učinak, što ukazuje na važnost te molekule u patogenezi infekcije *B. pertussis* (14).

1.1.6. Toksin pertusisa

Toksin pertusisa (PTX, engl. *pertussis toxin*) jedna je od najbolje karakteriziranih molekula *B. pertussis* koja ujedinjuje brojne biološke aktivnosti te klice. PTX izaziva limfocitozu, povećava osjetljivost na histamin, uzrokuje hiperinzulinemiju, te djeluje kao imunološki adjuvans (*adjuvare*, lat. pomoći). PTX je tipični A-B toksin, sastavljen od pet podjedinica označenih kao S1 do S5 molekularne mase od 105 kDA. A-B toksini imaju dvije sastavnice, B-sastavnicu čine S2 do S5 podjedinice koje omogućuju vezivanje za stanice domaćina te na taj način toksin ulazi u stanicu domaćina. Drugu, A-sastavnicu, čini S1 podjedinica koja ima enzimatsku aktivnost (25). Gen *PTX* je kloniran, a istražena je prostorna struktura bjelančevine postupkom kristalografije (37-39). A-sastavnica toksina ima ADP ribozilirajuću aktivnost, ADP-riboziltransferaza koja djeluje na članove veleskupine G-bjelančevina (40). Prijenosom ADP riboze iz NAD na α-podjedinicu G-bjelančevina uzrokuje kovalentnu promjenu tih signalnih molekula, te time koči njihovu sposobnost reagiranja na izvanjski signal. Na taj način dolazi do kočenja unutarstaničnog prijenosa signala kao što su pobuda (*aktivacija*) adenilne ciklaze i fosfolipaze te otvaranja ionskih kanala (12). PTX ima sposobnost vezivanja za različite ugljikohidrate na membrani eukariotskih stanica (41). Vezivanjem za ugljikohidratne receptore PTX izaziva aktivaciju i proliferaciju limfocita i trombocita (38). PTX je bakterijski toksin koji ima karakterističnо djelovanje na promjenu unutarstanične signalizacije u eukariotskim stanicama.

1.1.7. BrkA

B. pertussis proizvodi bjelančevinu molekulske mase 73 kDa poznatu kao bjelančevina koja potiskuje baktericidnu aktivnost komplementa seruma, od čega potječe naziv molekule BrkA (BrkA, engl. *Bordetella resistance to kiling*). Gen za *BrkA* je sekvencioniran, a pokazuje sličnost genu za pertaktin, jednako tako posjeduje i dva RGD tripeptida koja su važna u međuodnosu stanica. Ta molekula po svom ustrojstvu spada u bjelančevine izvanjske membrane klice (42). BrkA potiskuje stvaranje membranolitičkog sklopa komplementa (43). Potiskivanje membranolitične uloge komplementa može biti značajan doprinos patogenezi hripavca.

1.1.8. Toksin adenilne ciklaze

Toksin adenilne ciklaze (ACT, engl. *adenylate cyclase toxin*) je molekula koja se pobuđuje vezivanjem za endogeni kalmodulin domaćina. Pobuđeni toksin iz ATP proizvodi tisuću puta višu koncentraciju unutarstaničnog cAMP-a, mijenjajući tako stanični metabolizam (44). Porast cAMP potiskuje kemotaksiju, fagocitozu te stvaranje superoksida u makrofazima. Osim toga, uništavanje *Bordetelle* je potisnuto u neutrofilima i monocitima izloženim ACT-u (45). ACT može izazvati programiranu staničnu smrt makrofaga (46). Za razliku od PTX ACT ostaje vezan za površinu klice. Sukladno tome djeluje samo na one stanice domaćina koje su u izravnom dodiru s klicom (47). Bakterijski gen za ACT kloniran je i sekvencioniran, a utvrđeni nukleotidni dijelovi određuju bjelančevinu veličine 177 kDa. N-završni dio molekule ima enzimatski aktivno mjesto i mjesto vezivanja kalmodulina, C-završni dio ima određene sličnosti s proizvodom hlyA gena *E. Coli* (hlyA, engl. *alpha hemolysin*), zbog čega se smatra da predstavlja molekularnu domenu vezivanja za eukariotske stanice. ACT pripada skupini RTX-toksina (RTX, engl. *repeat found in each toxin*). RTX-toksini općenito djeluju stvarajući pore u plazmatskoj membrani stanica domaćina (odgovoran *hly* ili C-završni dio ACT gena), dok je enzimatski dio ACT-a (dio koji veže kalmodulin ili N-završni dio ACT gena) odgovoran za porast cAMP. U tu skupinu toksina pripada i leukotoksin *Pasteurelle haemoliticae* te hemolizin *E. Coli* (25, 48).

Konstruirani ACT toksoid bez enzimatske aktivnosti, zadržava sposobnost stvaranja pora što je dobar način unosa antigena u put pobude $CD8^+$ limfocita T (49). Sojevi *B. pertussis* koji nemaju izražaj ACT, FHA i PTX molekula, ne uspijevaju ući niti preživjeti unutar makrofaga za razliku od normalnih klica (50).

1.1.9. Trahealni citotoksin

Trahealni citotoksin (TCT, engl. *tracheal cytotoxin*) disaharidni je tetrapeptid dobiven od bakterijskog peptidoglikana, a odgovoran je za ciliostazu, zatim kočenje sinteze DNK, te *in vitro* uništavanje respiratornih epitelnih stanica (13, 51). TCT-u slične molekule mogu biti proizvedene pri diobi drugih G^- klica, međutim kod ostalih klica postoji mehanizam njihove ponovne ugradnje u membranske peptidoglikane. Za razliku od ostalih klica, kod *B. pertussis* nedostatna je ponovna ugradnja tog tetrapeptida. Biološki učinak TCT na respiratorni epitel uključuje pobudu proizvodnje IL-1 (IL-1, engl. *interleukin 1*) i dušičnog oksida (NO, engl. *nitric oxide*). TCT i endotoksin *B. pertussis* djeluju na necilijarne stanice respiratornog epitela pobudom proizvodnje NO što dovodi, za sada nepoznatim mehanizmom, do uništavanja okolnih cilijarnih stanica (52).

1.1.10. Dermonekrotični toksin

Dermonekrotični toksin (DNT, engl. *dermonecrotic toxin*), također je poznat kao mišji letalni toksin ili toksin osjetljiv na toplinu. Otkriven je kao tvar koja izaziva nekrozu kože neonatalnih miševa (53). Unatoč ranom otkriću uloga DNT u patogenezi infekcije *Bordetellom* nije poznata. DNT ima molekularnu masu od 102 kDa, s podjedinicama od 30 do 24 kDa (53). DNT izaziva nepoznatim mehanizmom kontrakciju glatkih mišića krvnih žila te tako dovodi do ishemijske nekroze kože. Neke studije ukazuju na mogući mehanizam preko signalnih Rho bjelančevina (*Rho GTP-aze*) na način sličan djelovanju citotoksičnog nekrotizirajućeg čimbenika *E. Coli* (54).

1.1.11. Lipopolisaharid (LPS)

Lipopolisaharid, ili poznatiji kao endotoksin (LPS, engl. *lipopolysaccharide*) nalazi se u bakterijskoj stijenci. Izražaj LPS nadzire virulentni lokus *B. pertussis*

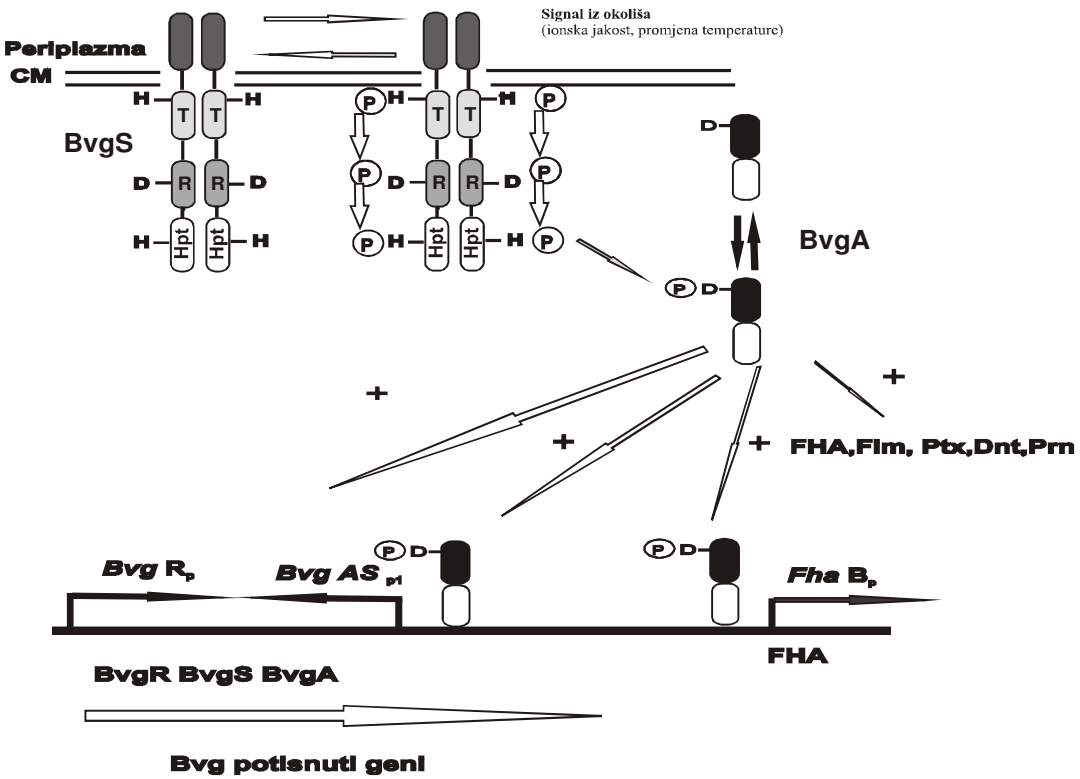
(poglavlje 1.2.) sugerirajući ulogu LPS u infekciji respiratornog sustava tim uzročnikom. LPS se sastoji od lipida A i polisaharidnog dijela. LPS na površini G^-klica ima ulogu u adheziji klica za stanice domaćina, zatim ulogu u antigenskoj promjeni i molekularnoj mimikriji klice, te u blokiranju djelovanja protutijela domaćina, podražavajući tim načinima infekciju G^- uzročnicima (55). Pokusi prijenosa monoklonskih protutijela specifičnih za LPS koja imaju zaštitnu ulogu u životinjskom modelu infekcije *B. pertussis* ukazuju na kritičnu ulogu u patogenezi infekcije (56). LPS *Bordetelle* razlikuje se građom od klasičnog oblika LPS. Naime, polisaharidni dio poznat kao O antigen znatno je kraći (čini ga 10 saharidnih jedinica), zbog čega se često naziva lipooligosaharid (LOS, engl. *lipooligosaccharide*) (57).

1.1.12. Ostali virulentni čimbenici

Većina klica zahtijeva za svoj rast i kolonizaciju domaćina visoku koncentraciju željeza. Neke G^- klice posjeduju Ton sustav za aktivni prijenos Fe kroz staničnu membranu. Ton je bjelančevina koja se veže za Fe receptore na površini klice te tako dovodi do internalizacije Fe unutar citoplazme klice. Mutacija Ton sustava *B. pertussis* (TonB) znatno smanjuje virulentnost takvih klica, pokazujući kako je TonB sustav važan virulentni čimbenik *B. pertussis* koji nije reguliran preko virulentnog lokusa *B. pertussis* (58).

1.2. Genetska regulacija izražaja virulentnih čimbenika *Bordetellae*

Patogenost virulentnih klica predstavlja sposobnost dinamičkog međuodnosa s tkivom domaćina što uključuje prilagodbu odgovora, odnosno bijeg od obrambenih mehanizama domaćina, te posljedično održavanje infekcije i klinički očitovanje bolesti (59). Izražaj većine virulentnih determinanti *B. pertussis* regulirana je pomoću *bvg* (engl. *Bordetella pertussis virulence gene*) genskog lokusa, kao odgovor na okolišne promjene, što predstavlja fenomen poznat kao bakterijska modulacija. Proizvodi kromosomskog *bvgAS* lokusa određuju koordinirani izražaj virulentnih determinanti *B. pertussis* (12). Izražaj *bvgS* gena senzorna je bjelančevina označena kao BvgS koja opaža okolinske promjene, dok je izražaj *bvgA* gena prijepisni čimbenik (označen kao BvgA) koji kao takav posljedično djeluje na izražaj virulentnih gena (60). Tako je pobuđeno 20-ak virulentnih gena *B. pertussis*, a istodobno je dio gena potisnut (engl. *bvg repressed genes)*. Uloga potisnutih gena nije savim poznata (61). BvgS je senzorni receptor (histidin kinaza ili senzorna kinaza), koja je specifična po tomu što posjeduje primajuću domenu (engl. *receiver*) i regulacijsku karboksi-završnu domenu. (Slika 2.) BvgS je transmembranska bjelančevina čija izvanstanična domena opaža okolinski signal (temperatura, ionski sastav), te na taj način modulira aktivnost BvgS. Na temperaturi 37^0C BvgS autofosforilira prijenosnu domenu, što dovodi do kaskade prijenosa fosfora, te u konačnici dolazi do fosforilacije BvgA (62). (Slika 2.) Fosforilirani BvgA veže se za DNK u promotorskom području virulentnih gena te u promotoru *bvgSA* i *bvgR* lokusa. (Slika 2.) Izražaj *bvgR* lokusa je prijepisni čimbenik označen kao BvgR koji djeluje na potisnuti lokus *bvg*. Takav regulacijski slijed pojačavanja signala omogućuje susljedni izražaj virulentnih gena, tako da se najprije pojavljuju adhezijske molekule, a tek kasnije bakterijski toksini (63).

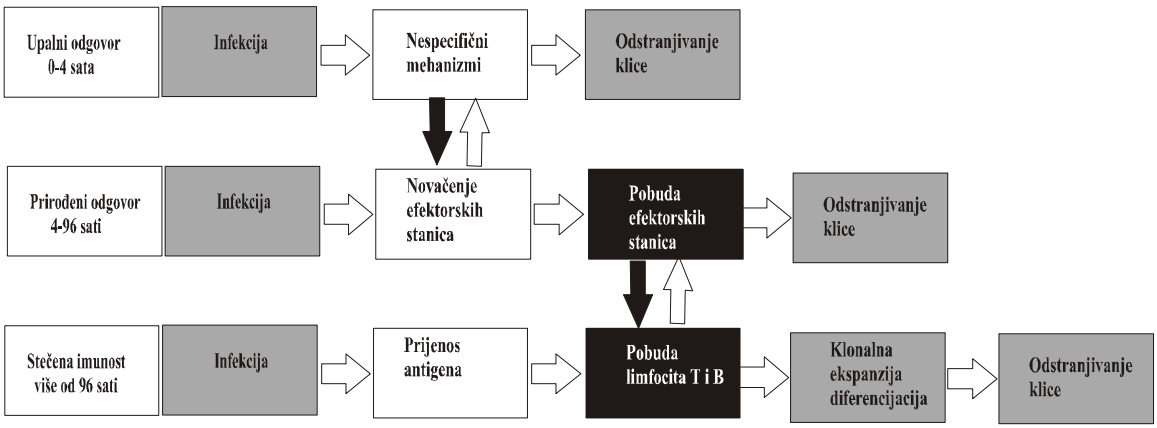


Slika 2. Shematski prikaz modela dvostrukog regulacijskog sustava za izražaj virulentnih čimbenika *Bordetellae* (Bvg).
Kratice: CM, citoplazmatska membrana klice; D, aspartat; Dnt, dermonekrotični toksin; FHA, filamentozni hemaglutinin; Fim, fimbrije; H, histidin; $_P$, promotor; P, fosforilirana domena; PRN, pertaktin; PTX, toksin pertusisa; R, primajuća domena ; T, prijepisna domena; + , pozitivni signal; Hpt, histidinfosfotransferna domena**.**

1.3. Fiziologija imunosnog odgovora u infekciji

1.3.1. Odgovor domaćina na infekciju

Imunosna reakcija obuhvaća imunosne stanice i tkiva i sinkronizirane međuodnose stanica i molekula koje imaju zaštitnu ulogu u obrani organizma od infektivnih mikroorganizama te drugih stranih antigenskih sustava. Zaštita se ostvaruje putem ciljnog prepoznavanja epitopa (imunoglobulini, receptori, ligandne molekule), čime se ostvaruje jedinstvena biološka snaga odgovora. Zahvaljujući tom sustavu, klice s kojima se susrećemo gotovo svakodnevno tijekom života, zapravo samo ponekad izazivaju nastanak bolesti. Većina klica bude zaustavljena fizičkim zaprjekama organizma domaćina (intaktna koža, sluznice) odnosno biva uništena obrambenim sustavima koji nisu specifični za antigen i ne zahtijevaju dugo razdoblje indukcije, a poznati su kao mehanizmi prirođene imunosti (engl. *innate immunity*) (64). U nastanku infekcije odlučujuću ulogu ima početno oštećenje tkiva. Oštećenje tkiva nastalo izravnim djelovanjem klica ili odgovorom domaćina izaziva takozvani signal opasnosti koji je nužan u nastanku specifične imunosti (65). Zapravo, samo ako klica uspije prevladati taj prvotni mehanizam obrane, razvija se specifični imunosni odgovor poznat kao stečeni imunosni odgovor (engl. *acquired immunity)*, a koji je obilježen nastankom stanica pamćenja koje imaju ulogu u prevenciji buduće infekcije istom klicom. Tijek se obrambenog odgovora na klicu događa u nekoliko faza, a shematski je prikazan u slici 3. Prirođeni imunosni odgovor predstavlja uspješan i brz način uočavanja nazočnosti klice, a i samog nadzora infekcije, u razdoblju dok još ne dođe do razvitka specifične imunosti, već u vremenu od 4-96 sati od dodira s uzročnikom. Odgovor stanica prirođene imunosti može imati odlučujuću ulogu u oblikovanju stečene imunosti što svakako ima važnu ulogu u nadzoru infekcije.



Slika 3. Shematski prikaz dinamike odgovora na infektivni čimbenik.
Najraniji je odgovor prethodno oblikovanim molekulama, zatim slijedi novačenje izvršnih stanica (prirođeni odgovor), te u završnoj fazi aktivacija naivnih limfocita T i B u regionalnim limfnim čvorovima s njihovom klonskom ekspanzijom i diferencijacijom (specifični odgovor). Crne i bijele strelice označavaju međusobnu interakciju pojedinih oblika odgovora.

1.3.2. Prirodne zaprjeke ulaska klica u organizam

Većina patogenih klica, vezano uz adhezijske molekule koje djeluju kao tkivni receptori, pokazuje tkivni odnosno stanični tropizam (histotropizam, citotropizam). *B. pertussis* je patogena klica koja ima izrazit citotropizam prema respiratornom epitelu. S druge strane, respiratorni epitel i sluznica respiratornog sustava imaju čitav niz zaštitnih sustava. Udahnuti uzročnici moraju preživjeti i savladati aerodinamični pročišćivački sustav gornjih dišnih putova i traheobronhalnog stabla. Kada takve infektivne čestice dođu na mukocilijarni sustav traheobronhalnog stabla, mukocilijarni ih sustav uspješno odstrani iz pluća. Proizvedena sluz respiratornog sustava djeluje kao fizička zaprjeka za klice. Ispod sloja sluzi nalazi se prostor koji sadrži čitav niz antimikrobnih čimbenika koji mogu uništiti klice. U plućnim alveolama ne postoji mukocilijarni sustav otklanjanja klica, te ovdje odlučujuću ulogu imaju alveolarni makrofazi i tkivni histiociti, te antimikrobne tvari. Fagocitne stanice respiratornog epitela luče surfaktantnu bjelančevinu A (SP-A, engl. *surfactant protein A*) i

surfaktantnu bjelančevinu D (SP-D, engl. *surfactant protein D*) koje se vežu i opsoniziraju klice pomažući njihovu fagocitozu. Surfaktantne bjelančevine SP-A i SP-D pripadaju skupini zaštitnih lektina poznatih kao kolektini (engl. *Collectins*) (66). Submukozne žlijezde, epitel dišnih putova i tkivni neutrofili proizvode niz drugih antimikrobnih bjelančevina kao što su lizozim, laktoferin, zatim skupinu antimikrobnih peptida, ljudski β-defenzin 1 (HBD1, engl. *human β-defensin 1*), HBD2, zatim ljudske neutrofilne peptide (engl. *human neutrophil peptides*). Te su antimikrobne tvari u literaturi poznate kao defenzini (engl. *defensins*), koji svoje protumikrobne učinke ostvaruju na više načina (67). Lizozim hidrolizira peptidoglikanski omotač mikroba, laktoferin veže željezo i oslobađa LPS od stijenke klice. Neke od tih antimikrobnih tvari imaju stalni izražaj u respiratornom sustavu, dok se izražaj drugih pojačava putem upalnih medijatora. Izražaj HBD1 defenzina konstitutivno je nazočan, dok na izražaj HBD2 utječu upalotvorni citokini (68). Važnost plućnih defenzina u modelima infekcije najbolje pokazuju genetski izmijenjeni miševi. U pokusu u kojem je pojačan izražaj lizozima povećana je brzina odstranjivanja klica iz pluća takvih transgeničnih životinja (69). Uloga SP-A pokazana je kod miševa s izbačenim genom za SP-A, naime, takve životinje pokazuju smanjenu sposobnost fagocitoze klica (70). Prema tomu, epitelne zaprjeke tijela predstavljaju učinkovitu aktivnu zaštitu za većinu mikroba. Infekcija nastaje samo onda kada klice prođu te zaprjeke. Prolaskom epitelne zaprjeke dolazi do aktivacije molekula i stanica koje čine prirođenu imunost.

1.3.3. Uloga komplementa

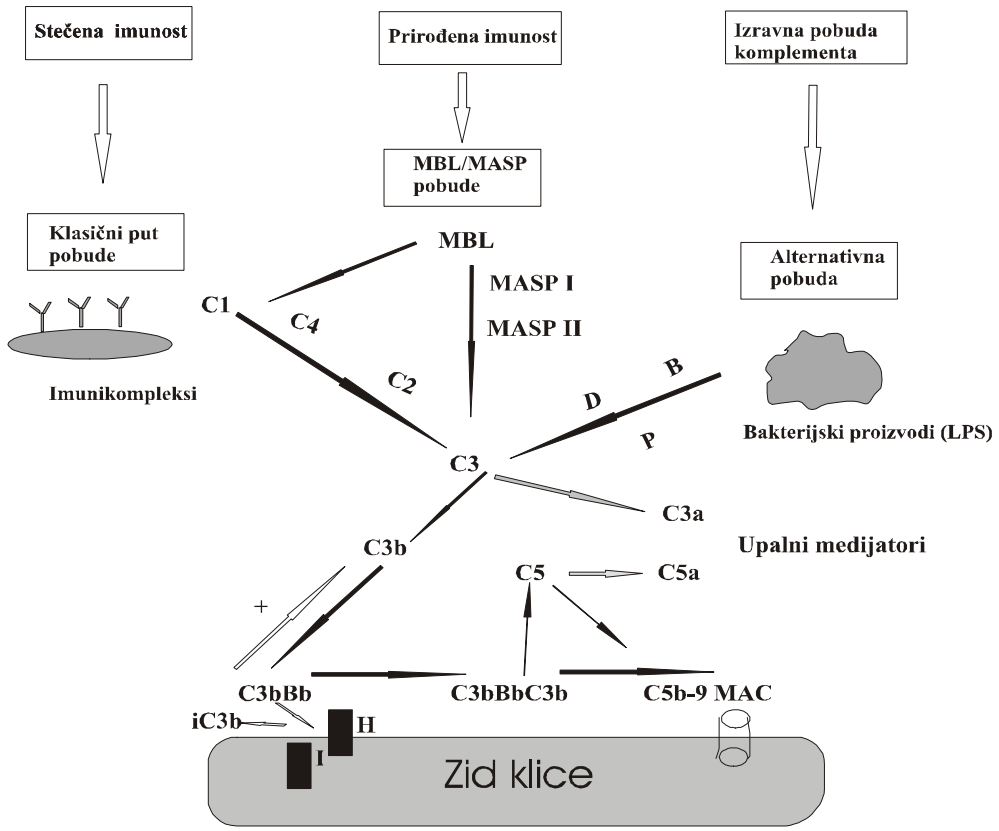
Sustav komplementa čini skupina od dvadesetak serumskih i desetak membranskih bjelančevina koje međusobno reagiraju na točno određen način poznat kao komplementna kaskada. Ehrlich je 1899. godine pokazao postojanje komplementa u serumu kroz lizu klica djelovanjem seruma u kombinaciji s protutijelima. Komplementna kaskada zapravo predstavlja proteolitički pojačivački sustav. Proteolizom nastali fragmenti komplementa pojačavaju upalotvorni odgovor i aktivnost fagocita. U svrhu biološke samoregulacije upalotvornog učinka neke

molekule komplementnog sustava imaju zadaću kočiti aktivnost komplementne kaskade (kočidbene molekule). Glavne kočidbene molekule su serumski čimbenici H, I i C1INH te membranski receptor CD59.

Dva su načina pobude komplementa, klasični i alternativni put. Klasični se put pobuđuje kada se protutijela vežu za površinu klica, a predstavlja izvršni mehanizam humoralne imunosti. Alternativni način pobude komplementa filogenetski je stariji i predstavlja način neposrednog odgovora na novi antigen. Neovisnost o protutijelima daje alternativnom putu pobude komplementa značajnu ulogu u izravnom odgovoru na klice. Taj način pobude komplementa čine humoralne sastavnice prirođenog odgovora na infekciju koje se pokreću bez prisutnosti protutijela. Bjelančevine plazme C3, B, D, i P imaju ulogu u alternativnom prepoznavanju i pobudi komplementa, što kao rezultat ima stvaranje C3/C5 konvertaze. Nedavno je otkriven i treći način pobude komplementa putom lektina, poznat kao MBL/MASP put pobude komplementa (MBL, engl. *mannan binding lectin*; MASP, engl. *MBL associated serine protease*) (71, 72). (Slika 4.) Poznati su različiti mehanizmi pobude, a posebnu važnost imaju polisaharidi klica (npr LPS mikroorganizama) i agregati imunoglobulina (73). Pobuđene sastavnice imaju dvojaku ulogu. Prvo, procesom poznatim kao opsonizacija komplementom se označavaju strane površine koje se moraju eliminirati fagocitozom. Drugo, sastavnice započinju stvaranje membranolitičkog sklopa (MAC, engl. *membrane attacking complex*) koji dovodi do lize mikroba. Alternativna pobuda komplementa odvija se na površini klica bez prisutnosti odgovarajućih protutijela. Na taj način dolazi do prije navedenoga antimikrobnog i upalotvornog učinka (pobuđene sastavnice C3a i C5a djeluju kao posrednici upalne reakcije) bez odgađanja potrebnog za sintezu specifičnih protutijela. Shematski prikaz reakcijske kaskade prikazan je na slici 4. C3 sastavnica komplementa prisutna je u suvišku u plazmi, a ona predstavlja ključnu sastavnicu u alternativnom i klasičnom načinu pobude komplementa. C3 je glikoprotein od 130 kDa s karakterističnom tioesterskom vezom, koja omogućuje vezivanje C3b fragmenta za površinu stanice (74). Spontana spora hidroliza tioestera pretvara inaktivni C3 u funkcionalno aktivnu C3b molekulu (75). Tako oblikovani C3 zapravo predstavlja podjedinicu C3 konvertaze (76). Prisutni C3b se kovalentno veže kroz tioestersku skupinu s lipidima na površini stanice domaćina

ili klica. Na C3b (Slika 4.) se veže čimbenik B, a za taj sklop se veže čimbenik D (koji je po funkciji serumska proteaza). Rezultat je cijepanje čimbenika B i otpuštanje manjeg fragmenta označenog kao Ba (veličine 30 kDa) i stvaranje C3bBb sklopa, odnosno početne C3 konvertaze (77). Sklop C3bBb stabiliziran je vezivanjem čimbenika P (engl. *properdin*), a predstavlja C3 konvertazu koja dovodi do pojačanja početno spontano stvorene C3b sastavnice komplementa (pozitivna povratna sprega) (78). Kada se to dogodi, na površini se stanice domaćina zaustavlja pobuda sklopa C3bBb pomoću površinskih staničnih receptora kao što su CR1 (CR1, engl. *complement receptor 1*), DAF (DAF, engl. *decay accelerating factor*), MCP (MCP, engl. *membrane cofactor of proteolysis*) i čimbenikom H. CR1, DAF i čimbenik H vežu se za C3b i izbacuju Bb te na taj način zaustavljaju daljnju pobudu komplementa (79).(Slika 4.) Osim toga čimbenik H i stanični receptori CR1 i MCP čine C3b osjetljivim na cijepanje pomoću čimbenika I, serinske proteaze koja cirkulira u aktivnom obliku i cijepa C3b, te ga na taj način inaktivira (iC3b). Stanice klica razlikuju se od stanica domaćina jer nemaju zaštitnih bjelančevina CR1, MCP i DAF, dok se čimbenik H veže ponajprije za C3b na stanicama domaćina. Posljedično tomu, ne raspada se sklop C3bBb oblikovan na površini klice te on djeluje kao C3-konvertaza. Klice podržavaju vezivanje čimbenika P koji povećava pobudu vezujući se za sklop C3bBb, zaustavljajući disocijaciju tog sklopa pomoću serumskog čimbenika H. Stabilizirana C3-konvertaza djeluje na isti način kao C3- konvertaza pokrenuta klasičnim putom. Neke molekule C3b vežu se za postojeći C3bBb sklop te tako stvaraju sklop C3bBbC3b (trimolekularni sklop) (78). Tako stvorena konvertaza cijepa C5, te time pokreće lizu stanica putem stvaranja membranolitičkog sklopa (C5b-9 sklop) i oslobađanja C5a, moćne upalotvorne bjelančevine. Tim pojačivačkim sustavom povećava se aktivnost C3 i C5 konvertaza na površini klice. MAC u koncentracijama nedovoljnim za lizu stanica može u endotelnim stanicama povećati izražaj adhezijskih molekula i prokoagulantnog tkivnog čimbenika (80). Klice različito pobuđuju alternativni put. Klice koje imaju veću količinu sijalične kiseline na površini (slično stanicama kralješnjaka) razlikuju se od drugih klica koje podržavaju vezivanje čimbenika H kroz receptore koji oponašaju stanice domaćina umjesto čimbenika B, čineći na taj način C3b osjetljivim na kočenje čimbenikom I (81).

Alternativni put pobude komplementa ima upalotvorni učinak putem fragmenta C3a i C5a koji djeluju pozitivno na nastanak bjelančevina akutne upale (82). C-reaktivni protein kao bjelančevina akutne upale može pobuditi klasični put komplementa putem C1q (83).



Slika 4. Pojednostavljeni shematski prikaz pobude komplementa
MBL označava lektin koji veže manane; MASP I i II predstavljaju serinske proteaze povezane uz MBL koje dovode do stvaranja C3 konvertaze. Prema tomu, sva tri oblika pobude komplementa konvergiraju do C3 konvertaze. Kočidbene su molekule označene kao H i I, Čimbenik H se veže za C3bBb što omogućava cjepanje ovog kompleksa čimbenikom I koji predstavlja serinsku proteazu te tako dovodi do stvaranja inaktivirane C3b sastavnice (označene kao iC3b). B, D i P označavaju bjelančevine plazme odgovorne u pobudi komplementa.

1.3.4. Temeljna svojstva upale

Upala je skupni tkivni odgovor organizma na upalotvornu noksu, koji se temelji na predodređenim obrascima ponašanja tkiva i organizma (84). Primarna homeostatska zadaća upale može se definirati kao smanjenje nokse, odnosno odstranjenje oštećenog tkiva. Prema tome upala djeluje i kao cjelidbeni proces.

Upala uključuje lokalne tkivne i sustavne procese. Lokalne upalne procese čine promjene žilja, pobuda pojačivačkih mehanizama plazme, vezivnotvorna reakcija tkiva i kočenje tkivnih funkcija koji nastaju kao rezultat infiltracije tkiva upalotvornim stanicama. Sustavni upalni procesi uključuju sintezu bjelančevina akutne faze u jetri, akutni odgovor središnjeg živčanog sustava, hemodinamsku prilagodbu žilja, tvarne i energijske metaboličke preinake, te konačno pokretanje upalostatskih procesa. Sva tkiva sadrže bar neke upalotvorne stanice u neaktivnom obliku (diferencirani makrofagi, mastociti, utkivljeni eozinofili, fibroblasti, endotelne stanice, histiociti) kao vlastite tkivnotvorne elemente. Osim toga, sva su tkiva zahvaljujući stalnom protoku krvi kroz kapilarni sustav organa neprestano u dodiru sa cirkulirajućim upalotvornim stanicama i pojačivačkim sustavom plazmatskih bjelančevina. Međutim, sama upala, osim svoje korisnosti u infekciji, ključni je patogeni element očitovanja bolesti (84). Zapravo, nakon pokretanja reakcije noksom upalotvorne stanice međusobnim novačenjem (kemotaksija) i lančanim pobudnim reakcijama pojačivačkih sustava pojačavaju upalnu reakciju do razine kliničkog očitovanja, prolazne i nepovratne disfunkcije organa sjedišta upale, te potencijalno smrti organizma.

Jačinu i ishod upale određuju upalotvorni i upalostatski mehanizmi, te permisivna reaktivnost organizma. Infekcija kao upalotvorna noksa uz upalnu reakciju pokreće i specifični imunosni odgovor (humoralni ili stanični), pri tome se razvija sinergizam imunosne i upalne reakcije putem zajedničkih citokina, efektornih mehanizama, te postizanjem optimalnog unutarnjeg okoliša upalne reakcije. Kemijski posrednici upale prikazani su u tablici 4. Razvoj edema nastaje kao odgovor na histamin, bradikinin, prostaglandine (PGE2 i PGI) i sastavnice komplementa C3a i C5a, koji djeluju na glatke mišiće krvnih žila pojačavajući propusnost njihovih stijenki za dijelove plazme. Odlučujuću ulogu u nastanku odgovarajućeg upalnog odgovora ima novačenje upalotvornih stanica (neutrofila, monocita i limfocita) na mjestu infekcije. Izgleda da u novačenju stanica odlučujuću ulogu ima skupina kemotaksijskih citokina poznatih kao kemokini (engl. *chemokines*). Kemokini se mogu razvrstati u tri skupine koje se razlikuju u položaju cisteina u aminozavršnom dijelu njihovih molekula. Kemokini označeni kao CXC djeluju na novačenje neutrofila, CC

skupina djeluje na novačenje monocita, dok C kemokin *lymphotactin* djeluje na kemotaksiju limfocita (85).

Neutrofili su prve stanice koje u roku od nekoliko sati dolaze na mjesto upale. Neutrofili imaju ključnu ulogu u fagocitozi klica. Kemokini imaju odlučujuću ulogu u umnožavanju i novačenju neutrofila na mjestu upale, osim toga, poticaj putem kemokinskih receptora dovodi do preživljavanje neutrofila potičući protuapoptotički signal u neutrofilima (86). Njihova pobuda se ogleda u porastu izražaja niza receptora kao što su imunoglobulinski, kemokinski i receptor za sastavnicu C3 komplementa. Adhezija i kotrljanje (engl. *rolling*) neutrofila odvija se međuodnosom selektina i β-2-integrina, a pobudom neutrofila povećava se izražaj p-selektina (87). Upalnim procesom povećava se izražaj na endotelu međustanične adhezijske molekule ICAM-1. Adhezija neutrofila odvija se izravnim vezivanjem β-2-integrina i ICAM-1. Izražaj integrinskih molekula je aktivan proces koji uključuje pobudu tirozinskih kinaza (88). Neutrofili na mjestu infekcije imaju sposobnost fagocitoze patogenih klica, a posebice fagocitoze mikroorganizama obloženih protutijelima. Međutim, neutrofili imaju sposobnost fagocitoze i mikroorganizama neobloženih protutijelima, te tako zapravo predstavljaju prvi korak u nespecifičnoj imunosti. Sastavnice stanične stijenke klica se mogu izravno vezati za neutrofile, odnosno neizravno, kao u slučaju LPS koji se najprije veže za LBP (LBP, engl. *lipopolysaccharide binding protein*), a onda se taj sklop veže za CD14. Neutrofili mogu fagocitirati klice obložene sa sastavnicom C3b komplementa ili njegovom inaktivnom sastavnicom iC3b koje se odlažu na površini klica putem alternativnog načina pobude komplementa. Tijekom fagocitoze stanica obloženih protutijelima u neutrofilima dolazi do fosforilacije bjelančevine ERK2, što se odvija kroz pobudu fosfolipaze D, te stvaranje diglicerida što rezultira translokacijom signalnih molekula PKCδ i Raf-1 iz citosola u staničnu membranu. Raf-1 pobuđuje MEK dovodeći do fosforilacije ERK2 te fosforilacije lakog lanca miozina. Na taj se način pobuđuje miozin stvarajući pseudopode koji su potrebni za fagocitozu klica. Fagocitoza se završava stvaranjem ceramida koji potiskuje pokretanje fosfolipaze D (89). Neutrofili kao fagocitne stanice sadrže oksidazu ovisnu o, NADPH koja prenosi elektrone s NADPH na O_2 te tako stvara kisikov superoksid (O_2^-). Snažnom pobudom neutrofila za stvaranje radikala povećava se potrošnja kisika i više od tisuću puta u

odnosu na stanje mirovanja što se naziva oksidativno izgaranje (*oxidative burns*), a stvoreni kisikovi radikali lipidnom peroksidacijom razaraju bakterije i membranske strukture tkiva. NADPH oksidaza složeni je sustav prijenosa elektrona sastavljen od molekule flavocitokroma b (sastavljene od dviju podjedinica α (p22 ^{phox}) i β (gp91 ^{phox})) vezane za staničnu membranu. Osim membranskih u aktivaciji transporta elektrona potrebne su i citoplazmatske bjelančevine p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} i p21rac (GTP-aza) (90). Mutacija bilo kojeg dijela NADPH oksidaznog sustava neutrofila uzrokuje kroničnu granulomatoznu bolest. Na mjestu upalne reakcije lokalno se oštećuje tkivo degranulacijom neutrofila i oslobađanjem proteolitičkih i drugih enzima (gelatinaze, kolagenaze, heparanaze). Neutrofili proizvode pojedine citokine, kemotaksijske tvari, zatim tvari koje pobuđuju komplement te tako pojačavaju upalnu reakciju (91). Azurofilne granule neutrofila sadrže čitav niz antimikrobnih tvari kao što su baktericidna/permeabilizirajuća bjelančevina (BPI, engl. *bactericidal/permeability - increasing protein*), laktoferin, lizozim, te razne defenzine (92). BPI vezivanjem koči endotoksin (LPS). Osim toga dovodi i do raspadanja izvanjske i unutarnje membrane klice potičući njihovu fagocitozu od strane neutrofila (93). Laktoferin, osim uloge u sniženju koncentracije Fe i vezivanju LPS, ima i izravni baktericidni učinak na staničnu stijenku klice (94). Serpocidini (veleskupina koju čine neutrofilna *elastaza, katepsin G, proteinaza 3, azurocidin/CAP37*) serinske su proteaze (ustrojbeno slične granzimu citotoksičnih limfocita T), i nalaze se u primarnim zrncima neutrofila, a njihov je baktericidni učinak rezultat perturbacije membrane klice i proteolitičkog učinka na klicu (95). Katelcidini su ustrojbeno različita skupina antimikrobnih peptida čiji baktericidni učinak nastaje kao rezultat stvaranja multipora u staničnoj membrani klica. Lizozim je 14 kDa enzim koji cijepa peptidoglikane stijenke G^- klice, te na taj način dovodi do njihove lize. Patogene G^+ klice imaju međusobno povezane peptidoglikane, te su tako otporne na litičko djelovanje toga enzima (96). Fosfolipaza A_2 (PLA_2, engl. *phospholipase A_2*) je enzim koji hidrolizira fosfolipide membrana klica. Kalprotektin je protein citoplazme neutrofila koji svoj baktericidni učinak ostvaruje vezivanjem cinka (kelator) (97). Defenzini su neutrofilni peptidi koji stvaraju pore na staničnoj stijenki klica. Upalotvornim citokinima pobuđeni endotel ima protrombotska svojstva dovodeći do nakupljanja trombocita. Pobuđeni trombociti otpuštaju čitav niz

upalotvornih i prokoagulantnih medijatora kao što je tromboksan A2, von Willebrandov čimbenik, trombospondin, čimbenik rasta trombocita (PDGF, engl. *platelet derived growth factor*).

Tablica 4. Osnovni posrednici upale i njihova patogenetska uloga [a].

Posrednici upalne reakcije	Uloga u upali
Histamin, bradikinin, C3a, C5a, CysLTs, PGE_2, prostaciklini, Hagemanov čimbenik (XII)	Povećana permeabilnost malih krvnih žila i kapilara koja dovodi do nakupljanja tekućine i stanica u okolnom tkivu.
TxA_2, , C5a, CysLTs	Vazokonstrikcija
C3a, C5a, LTB_4,TxA_2, CysLTs,	Kontrakcija glatkih mišića, uzrokuje konstrikciju krvnih žila
IL-1, TNF-α, endotoksin, LTB_4	Adhezivnost endotela
Kemokini, PAF, histamin, C5a, C3a, LTB_4	Novačenje neutrofila i limfocita na mjestu oštećenja tkiva; lokalna vazodilatacija
C5a, TNF-α, PAF, IFN-γ	Proizvodnja slobodnih radikala
C3b, iC3b, IgG, fibronektin, IFN-γ	Pojačana fagocitoza
IFN-γ, TNF-α, IL-1	Stvaranje granuloma
IL-1, TNF-α, PGE_2	Endogeni pirogeni

[a] prema literaturnom izvoru: (98).

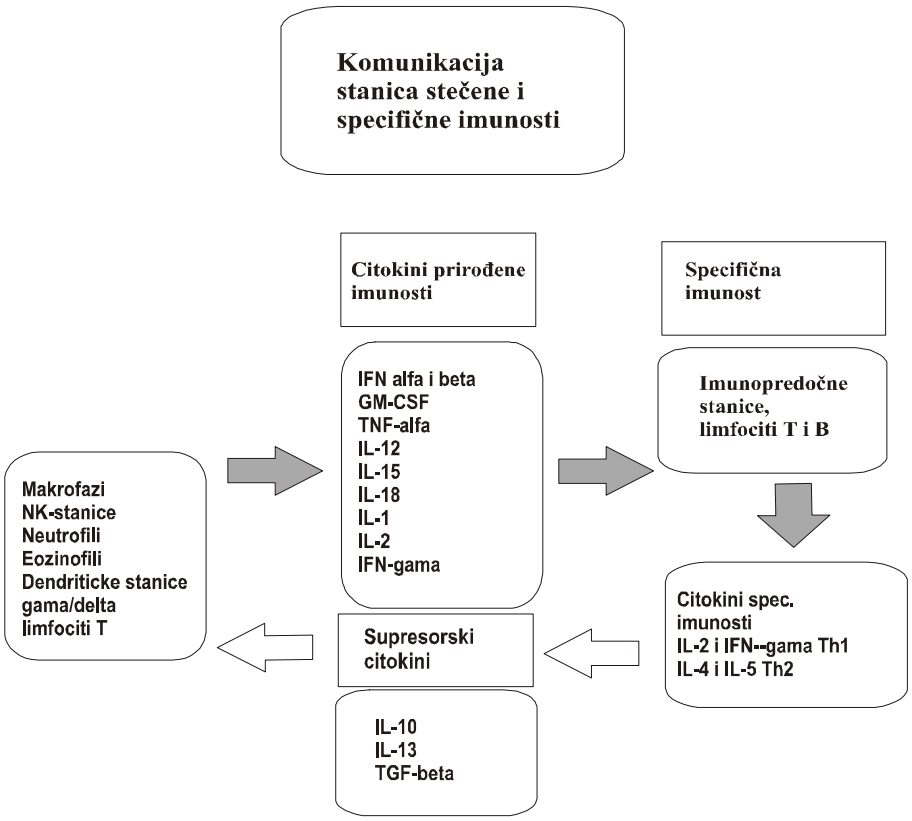
1.3.5. Prirođena imunost

U odnosu na stečenu imunost prirođena imunost predstavlja stariji evolucijski sustav koji omogućuje višestaničnim organizmima neposredni zaštitni odgovor prema različitim patogenim klicama bez obzira na prethodni dodir s uzročnikom. Osnovne osobine tog sustava čine sposobnost prepoznavanja specifičnih obrazaca građe klica. Prepoznavanjem se pobuđuju izvršni mehanizmi prirođene imunosti koji mogu uništiti klice. Razvijeni izvršni mehanizmi prirođene imunosti pobuđuju i usmjeravaju specifični imunosni odgovor (99). Molekularni ustroj mikroorganizama koje prepoznaju receptori stanica prirođene imunosti (receptori na stanicama domaćina su još poznati kao PRR (PRR engl. *pattern recognition receptors*)) predstavljaju tzv. PAMP (PAMP engl. *pathogen associated molecular pattern*) (100). (Tablica 5.)

Prepoznavanje molekularnih obrazaca patogena (skraćeno PAMP) pobuđuje humoralne i stanične sastavnice prirođene imunosti. Za razliku od stečenog imunosnog odgovora, ovaj odgovor na patogene klice uključuje mehanizam prepoznavanja koji se temelji na naslijeđenim receptorima koji prepoznaju nepromjenjive ustrojbene obrasce klica. Prirođena imunost ne dovodi do imunološkog pamćenja, odnosno ne uključuje pobudu limfocita T i B.

Prirođena imunost ima višestruku važnost. Prvo, izravno uništava klicu. Drugo, zadržava infekciju pod nadzorom do razvitka specifične imunosti. Treće, pobudom staničnih i humoralnih sastavnica prirođene imunosti usmjerava se sekundarni odnosno specifični odgovor. (Slika 5.) Brzi odgovor prirođene imunosti na infekciju zapravo nastaje pod utjecajem monocita, neutrofila i endotelnih stanica. Veleskupina receptora sačuvanih tijekom evolucije poznatih kao Toll (prisutni od kukaca do ljudi) imaju središnju ulogu u odgovoru prirođene imunosti na infekciju (101). Toll je bjelančevina koja ima unutarstaničnu signalnu domenu kao IL-1 receptor (Toll/IL-1 domena ili TIR domena). Signal putem tog receptora nastaje vezivanjem LPS-a što dovodi do pobude nuklearnog čimbenika NF-κB te posljedično do proizvodnje upalotvornih citokina (IL-1, IL-6, IL-12) i pojačanog izražaja kostimulacijskih molekula (B7.1, B7.2) (100). Osim Toll-receptora, postoji cijeli niz drugih receptora koji mogu prepoznati molekularna ustrojstva klica koja su bitna u pokretanju prirođene imunosti. (Tablica 5.) Makrofazi, osobito dendritičke stanice, predstavljaju *˝profesionalne˝* fagocite. Makrofazi prepoznaju i reagiraju na molekularne oblike karakteristične za klice. Oni na klicama prepoznaju manane na stijenkama gljivica, formilirane peptide klica, lipopolisaharide na površini G^- i lipoteikoičnu kiselinu na površini G^+ klica. Manozni receptori ili integrinski receptori (označeni kao CD11b,CD18), te receptori čistači (od engl. *scavanger receptors*) na fagocitima prepoznaju površinske lipidne sastavnice klica kao što je LPS i dovode do fagocitoze klica. Humoralne sastavnice prirođene imunosti vezuju se za klice (opsoniziraju klicu), što olakšava njezino prepoznavanje od strane receptora na fagocitima. Humoralnim sastavnicama pripadaju molekule u serumu koje se vežu za specifične strukture klica, a označene su u literaturi kao MBL, serumski amiloidni protein (SAP, engl. serum amyloid protein) i C-reaktivni protein. C3b sastavnica komplementa nastala alternativnim putom

pobude komplementa opsonizira klicu te potiče njezinu fagocitozu. Protutijela predstavljaju vezu između prirođene imunosti i specifične imunosti, njihovim vezivanjem za klicu dolazi do fagocitoze preko Fc receptora. Pobuđene stanice prirođene imunosti proizvode različite humoralne medijatore koji utječu na razvitak specifične imunosti (usmjeravanje specifične imunosti). Citokini su glavni medijatori odgovora domaćina koji sudjeluju u komunikaciji između stanica koje predočavaju antigen te limfocita T i B, te drugih stanica uključenih u imunološki odgovor. (Slika 5.)



Slika 5. Shematski prikaz komunikacije prirođene i stečene imunosti.
Središnju ulogu u komunikaciji imaju citokini koje su proizvele stanice prirođene i stečene imunosti. Sive strelice predstavljaju pozitivnu spregu, bijele strelice negativnu spregu,
IL-12 stimulira specifični Th1-odgovor (stanični odgovor). Suprotno tomu, IL-10 ima negativni učinak na Th1 odgovor. IL-4 potiče Th2-odgovor (odgovor protutijelima).

Tablica 5. Glavne serumske bjelančevine i stanični receptori prirođene imunosti odgovorni za prepoznavanje karakterističnih molekularnih sastavnica patogena [a]

	Ustrojstvo	Lokacija	Ligand	Uloga
CRP	Pentraksin, lektin ovisan o Ca	Plazma, primarna sinteza u jetri, akutni upalni odgovor	Polisaharidi klica	Pobuda komplementa Povećava fagocitozu
SAP	Pentraksin, Ca ovisan lektin	Plazma, sinteza u jetri	Ugljikohidrati mikrobne stijenke	Povećava fagocitozu
MBL	Lektin, sadrži 18 CRD	Primarna sinteza u jetri	Saharidi mikrobne stijenke	Veže se za C1q receptor, pokreće komplement, potiče fagocitozu i sintezu citokina
LBP	Lipidna transferaza	Sinteza u jetri	Prijenos LPS na CD14	Povećava osjetljivost na LPS, sistem za inaktivaciju LPS
sCD14	Bjelančevina bogata leucinom	Bjelančevina plazme	LPS, drugi sastojci stijenke klice	Povećava osjetljivost na LPS
C3	Disulfidno povezani dimer	Sinteza u jetri	Oblikuje esterske veze s OH skupinama na ugljikohidratima i bjelančevinama	Vezivanje za receptore CD21 i CD35
Manozni receptori	CRD i 10 CRD	Tkivni makrofazi dendritičke stanice	Različiti ugljikohidrati	Ciljanje antigena u II razred MHC
Receptori čistači (Tip 1, Tip2, MARCO)		Tkivni makrofazi, endotelne stanice	Sastojci stijenke klice	Odstranjenje LPS i klica, te adhezija
Lipopoli saharidni rceptor CD14	Lipidima povezani receptor (GPI linked)	Monociti, makrofazi	Sastojci stijenke klice	Adhezija klica, posredno prijenos signala
Toll	Tip I transmembranski receptor	Makrofazi, endotel	LPS, sastojci stijenke klice	Pokretanje sekrecije prouplanih molekula, kostimulacija
Receptori komple-menta		Monociti, makrofazi, PMN, limfociti	C3b, C4b, LPS, Fibrinogen	Adhezija, odstranjenje LPS

[a] prema literaturnom izvoru: (99).

1.3.6. Stečena imunost

Limfociti predstavljaju središnje stanice stečene imunosti koje svojom aktivnošću sudjeluju u izvršnom koraku imunosnog odgovora te u imunobiološkom pamćenju antigena. Pojedinačni limfociti putem receptora specifičnog za antigen preusmjereni su na reagiranje prema ograničenom broju antigena. Osnovna biološka snaga proistječe iz klonske ekspanzije pobuđenih limfocita. Eksponencijalna proliferacija povećava broj istovjetnih stanica, što obrazuje specifični klon limfocita. Prema antigenskim receptorima limfociti su krajnje heterogena populacija stanica. Zapravo se može reći kako je sposobnost reagiranja organizma na gotovo svaki antigen rezultat postojanja različitih limfocitnih klonova specifičnih za različite antigenične epitope. Postoje dvije osnovne skupine limfocita, limfociti B koji su odgovorni za stvaranje protutijela i limfociti T. Limfociti T razlikuju se prema izražaju antigenskog receptora (TCR, engl. *T cell receptor*). Limfociti koji imaju TCR sastavljen od polimorfnih α i β lanaca povezanih disulfidnim vezama u heterodimer koji se naziva Ti (Ti, engl. *T cell idiotype*) predstavljaju $\alpha\beta$ limfocite T. Drugu skupinu limfocita T čine $\gamma\delta$ limfociti T tako nazvani prema TCR heterodimeru sastavljenom od γ i δ lanca. Pored lanaca $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$ TCR-sklop sadrži i sklop molekula γ, δ, ε, η i ζ koji sudjeluju u regulaciji prijenosa signala, a kadšto se nazivaju CD3-sklop. Limfociti T s $\alpha\beta$ antigenskim receptorom odgovorni su za većinu izvršnih uloga specifične imunosti, bilo stanične, bilo humoralne. Čine ih dvije podskupine. Prva su podskupina pomoćnički, a druga citotoksični limfociti T. Pomoćnički limfociti T (Th, engl. *T helper lymphocytes*) imaju važnu regulacijsku ulogu u vidu poticanja i regulacije imunosnog odgovora. Oni mogu poticati proizvodnju protutijela, odnosno mikrobicidnu aktivnost makrofaga. Citotoksični limfociti T su izvršne stanice koje liziraju ciljne stanice. Specifični odgovor završava mnestičkom pripravnošću (imunobiološko pamćenje) za sljedeće susrete s istim antigenom. Prema tomu, antigenska specifičnost i pamćenje su dva osnovna obilježja specifičnog imunološkog odgovora (102). TCR $\alpha\beta$ lanac i protutijela limfocita B nastaju kao učinak genetske rekombinacije V (V, engl. *variable*),

D (D, engl. *diversity*), J (J, engl. *joining*) i C (C, engl. *constant*) dijela antigenskog receptora. Somatska mutacija nastala u razvitku protutijela dodatno povećava afinitet protutijela za antigene (103). Limfociti T prepoznaju antigen samo u obliku procesuiranog oligopeptida udruženoga s molekulama glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC, engl. *Major histocompatibility complex*) I i II razreda na susjednim stanicama. Peptidni antigenični ligand za MHC proteolitički je fragment antigena koji se unutarstanično veže za molekulu MHC.

Vezivanje limfocitnog TCR i sklopa anitigena i MHC je molekularni mehanizam prepoznavanja antigena i pobude limfocita T (104). Nakon prepoznavanja sklopa antigena i molekule MHC-a, TCR prenosi signal koji unutar limfocita T dovodi do proliferacije i proizvodnje citokina (105). Djelomice je pobuda limfocita T analogna pobudi limfocita B koja se temelji na međudjelovanju solubilnog antigena i membranskog protutijela. Pobuda limfocita T složeniji je proces koji ne zahtijeva samo međudjelovanje TCR i MHC molekula već predstavlja složeni signalni sustav koji uključuje γ, δ, ε i ξ lanac CD3 te koreceptorske molekule CD4 ili CD8, te kostimulacijske molekule na površini imunopredočnih stanica (106, 107). MHC molekule I i II razreda površinski su glikoproteini različitog, ali međusobno povezana ustrojstva. MHC razreda I sastoji se od α lanca i manjeg nekovalentno povezanog lanca, β_2 mikroglobulina. MHC razreda II se sastoji od α i β lanca. Antigenski fragmenti koji se vežu za MHC I su bjelančevine nastale u staničnom citosolu koji se pomoću prijenosnih bjelančevina TAP-1 i TAP-2 (TAP, engl. *transporters associated with antigen processing 1 and 2*) prenose u endoplazmatsku mrežicu gdje se vežu sa sastavnicama molekule MHC I. Peptidi koji nastaju razgradnjom u unutarstaničnim mjehurićima vežu se za MHC II. Koreceptorska molekula CD4 je karakteristična za pomoćničke limfocite T. CD4 receptor ima ulogu u uključivanju unutar citoplazmatske kinaze u pobudni sklop antigenskog receptora. Citotoksičnim limfocitima T specifična je koreceptorska molekula CD8 čija je uloga stabilizacija sklopa između TCR i MHC razreda I (106). Osim tog signala, potreban je i drugi signal preko drugih receptora na površini T-stanica i imunopredočnih stanica (CD28-CD80 ili CD28-CD86) (107). Dendritičke stanice i makrofazi su najmoćnije imunopredočne stanice (APC), a na

njihovu sposobnost predočavanja antigena i posljedično pokretanja specifične imunosti utječu sastavnice prirodne imunosti (108).

1.3.7. Odgovor pomoćničkih limfocita T

Tijekom 1986, godine Mossman i Coffman prvi put opisuju kako se pomoćnički limfociti T mogu podijeliti u dvije funkcionalne skupine na temelju imunoregulacijskih citokina koje te stanice proizvode u uvjetima *in vitro* (109, 110). Prema toj podjeli *in vitro* stimulirane stanice Th1 (pomoćnički limfociti 1. vrste) nakon stimulacije proizvode IFN-γ, IL-2, TNF-α, te sudjeluju u pobudi makrofaga i odstranjenju unutarstaničnih patogena. Th2 (pomoćnički limfociti 2. vrste) stanice proizvode IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13, te tako potiču proizvodnju protutijela i dovode do uklanjanja parazitnih infestacija (111). (Tablica 6.) Th0 limfocitni klonovi mogu proizvoditi obje skupine citokina (112). Brojna su istraživanja pokazala kako postoji uzajamni odnos između pojedinih citokina u smislu poticanja aktivnosti samo određenog tipa pomoćničkih limfocita T, odnosno sekrecije određene skupine citokina te istodobne inhibicije druge skupine. Tako na primjer IFN-γ potiskuje proizvodnju IL-4 od strane limfocitnih klonova Th2, suprotno tomu IL-4 potiskuje proizvodnju IFN-γ u stanicama Th1 (111, 113). (Slike 5. i 6.) Funkcijski odnos stanične imunosti i imunosti ovisne o protutijelima je prvi put uočen 1972. godine (114). Otkriće stanica Th1 i Th2 dijelom objašnjava opisanu pojavnost. Stanice Th1 sekrecijom citokina potiču staničnu imunost dok su stanice Th2 važnije u pobudi limfocita B i proizvodnji protutijela. Poznata je povezanost limfocitnih klonova Th u ljudi s različitim kroničnim bolestima (115). Takvi *in vitro* dobiveni T-limfocitni klonovi pružaju važne obavijesti u svezi s regulacijom imunosnog odgovora, iako su oni zapravo odvojeni od uvjeta *in vivo*. U tablicama 6., 7. i 8. navedeni su citokini koji sudjeluju u Th1 odnosno Th2 usmjeravanju odgovora. IL-12 je citokin kojega ne proizvode Th-limfociti, već pobuđene stanice za predočavanje antigena, a koji ima značajnu ulogu u pobudi Th1 odgovora . Osim toga, neki od citokina (kao recimo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IFN-γ) proizvode ne samo Th-limfociti već i leukociti, te neke nehematopoetske stanice.

Zaštitna imunost kod virusnih, bakterijskih infekcija ili infestacija parazitima ovisi o odluci imunološkog sustava o skupini citokina koju će proizvoditi, a takav odgovor u svojoj konačnici može biti zaštitni ili patološki (116). Postojanje limfocita Th0 koji mogu proizvoditi jednu i drugu skupinu citokina ukazuje kako probirna diferencijacija na tim stanicama može odrediti funkcionalni ishod imunosnog odgovora (112). Promjena građe antigeničnog peptida može imati utjecaja na stanje pobude limfocita T i njihovu diferencijaciju u proizvodnji citokina (117, 118). Osim toga, imunopredočne stanice mogu usmjeravati diferencijaciju limfocita Th0 najvjerojatnije kroz izražaj kostimulacijskih molekula (119).

Tablica 6. Citokini Th2 usmjeravaju odgovor prema obrascu Th2-reagiranja [a]

Citokini	Izvor stanica	Glavni biološki učinak
IL-4	T-limfociti, mastociti i bazofili	Proliferacija T i B limfocita, sinteza IgG1 i IgE, inhibicija makrofaga, inhibicija Th1
IL-5	T-limfociti, mastociti	Sinteza protutijela (IgM, IgA i IgE), proliferacija eozinofila
IL-6	Različite stanice, glavni izvor su mononuklearni fagociti	Posrednik akutnog odgovora, proliferacija limfocita B, sučimbenik za pobudu limfocita T
IL-10	Mononuklearni fagociti, CD4 limfociti T, limfociti B, keratinociti	Inhibicija makrofaga, smanjenje izražaja MHC II, kočenje Th1, proliferacija limfocita B
IL-11	Stromalne stanice koštane srži	Pobuda bjelančevina akutne faze, proliferacija limfocita B i stvaranaje plazma stanica
IL-13	Limfociti T	Proliferacija limfocita B, sinteza IgE i IgG, inhibicija proizvodnje citokina u makrofazima
IL-14	Limfociti B i T	Proliferacija pobuđenih limfocita B

[a] prirađeno prema literaturnom izvoru: (120).

Tablica 7. Citokini Th1 usmjeravaju odgovor prema obrascu Th1-reagiranja[a]

Citokini	Izvor stanica	Glavni biološki učinak
IL-2	limfociti T	Proliferacija limfocita T (čimbenik rasta)
IL-12	Mononuklearni fagociti, limfociti B	Potiče proizvodnju IFN-γ u limfocitima T i NK-stanicama, čimbenika rasta limfocita T, Th1 usmjeravanje
IL-17	Limfociti T	Utječe na pobudu makrofaga
IL-18	Makrofazi, keratinociti	Potiče proizvodnju IFN-γ i TNF-α
IFN-γ	Limfociti T, NK-stanice	Porast izražaja MHC klase I i II, pobuda makrofaga, glavni Th1 citokin
TNF-α	Mononuklearni fagociti, limfociti T, NK-stanice, mastociti i eozinofili	Vrućica, povećava međuodnos leukocita i endotela, izravna citotoksičnost za određene stanice

Tablica 8. Imunoregulacijski citokini [a]

Citokini	Izvor stanica	Glavni biološki učinak
IL-1	Različite stanice, uglavnom mononuklearni fagociti	Temperatura akutnog odgovora, oslobađanje kortikotropina
IL-1 RA	Mononuklearni fagociti	Antagonizira IL-1 vezujući se za receptor
IL-3	limfociti T, mastociti	Proliferacija pluripotentnih matičnih stanica, čimbenik rasta limfocita T
IL-7	Stromalne stanice koštane srži	Glavni čimbenik u NK homeostazi, čimbenik rasta limfocita B i T
IL-8 i CXC-kemokini	Različite stanice, mononuklearni fagociti, endotelne stanice, epitelne stanice, limfociti T	Kemotaksija neutrofila
CC-kemokini	Različite stanice, mononuklearni fagociti, endotelne stanice, epitelne stanice, limfociti	Kemotaksija limfocita i monocita, kemotaksija i pobuda eozinofila
IL-9	CD4 limfociti T	Čimbenik rasta mastocita
INF-α	Mononuklearni fagociti, limfociti	Interferira s RNA virusnom replikacijom, koći proizvodnju IL-12
INF-β	Fibroblasti, epitelne stanice	Interferira s umnožavanjem RNA-virusa, koči izražaj MHC

TGF-β	Limfociti T, mononuklearni fagociti	Protuupalni citokin

[a] priređeno prema literaturnom izvoru: (120)

1.3.8. Infekcija i Th1/Th2 usmjeravanje imunoreaktivnosti

Međudjelovanje pomoćničkih limfocita T i imunopredočnih stanica dovodi do njihova usmjeravanja (engl. *differentiation*) u Th1 odnosno Th2 stanice. Th1 i Th2 stanice završne su razine procesa u kojem stanice prethodnice postižu funkcijski citokinski obrazac. Temeljno biološko pitanje je ima li patogeni uzročnik utjecaj na taj proces usmjeravanja, odnosno koji je mehanizam navedenog usmjeravanja. Odgovor na ovo pitanje ima izuzetnu važnost u imunoterapiji, a isto tako i u razvitku cjepiva za različite zarazne bolesti. Eksperimentalna *lišmanijaza* najčešće je upotrebljavani model proučavanja mehanizma razvrstavanja prema Th1 odnosno Th2 stanicama u uvjetima *in vivo*. BALB/c miševi proizvodeći IL-4, te potiskujući lučenje IL-12, ne uspijevaju nadzirati infekciju tim unutarstaničnim parazitom (121).

Odgovor Th1

Limfociti Th1 potiču razvoj zaštitne imunosti na različite klice, bakterije, gljivice i viruse kao što su *HIV* (HIV, engl. human immunodeficiency virus) te za brojne unutarstanične uzročnike (primjerice *Legionella pneumofila, Listeria monocytogenes, Brucella abortus*). U slučaju ovih uzročnika nastanak i razvoj specifične bolesti je vezan uz promjenu citokinskog obrasca Th1 u Th2. Međutim, kao što je prije rečeno, svi ti organizmi pokreću u prvom koraku prirođenu imunost. Razvitak odgovora Th1 nastaje kao rezultat instruktivne uloge prirođene imunosti. Nakon stimulacije imunopredočne stanice (makrofazi i dendritičke stanice) proizvode upalotvorne citokine (TNF-α, IL-6 i IL-12). Dendritičke stanice (DC, engl. *dendritic cells*) u nelimfoidnim tkivima imaju najveću sposobnost antigenske obrade (engl. *antigen processing*), no nešto slabiju sposobnost stimulacije limfocita T. Upalni posrednici nespecifične imunosti potiču migraciju DC u sekundarne limfoidne organe, a tako pobuđene DC imaju izvanrednu sposobnost pobude limfocita T (122). Prema tomu, sposobnost dospijeća u sekundarna limfoidna tkiva čini DC najvažnijim stanicama za

predočavanje antigena. Otkrivene su dvije skupine DC (limfoidne i mijeloidne). Limfoidne DC imaju izražaj CD8α lanca, a mogu proizvoditi IL-12 te tako usmjeravati imunološki odgovor u smjeru Th1 (123, 124). Suprotno tomu, mijeloidne DC (one su CD8α$^-$) pobuđuju odgovor Th2 (125). Stanje pobude DC odlučujući je čimbenik u određivanju Th-fenotipa imunosnog odgovora pri čemu presudnu ulogu ima narav klice (126). Indukcija odgovora Th1 u svezi je s lokalnom prisutnošću IL-12 (127). Različita ustrojstva klica potiču proizvodnju IL-12 u DC i tkivnim makrofazima (128). Miševi koji su manjkavi u IL-12, receptoru za IL-12 ili u IL-12 specifičnom transkripcijskom čimbeniku (STAT4, engl. *signal transducer and activator of transcription 4*) pokazuju značajno poremećenu proizvodnju IFN-γ. Između ta dva citokina postoji pozitivna povratna sprega u kojoj IL-12 pobuđuje proizvodnju IFN-γ, a koji povratno potiče proizvodnju IL-12 u DC (127). Uloga kostimulacijkog sustava B7 (CD80) u razvitku odgovora Th1 ne čini se značajnom za razliku od odgovora Th2 (129). Tkivni makrofazi nemaju sposobnost migracije u sekundarne limfoidne organe, tako da svojom proizvodnjom IL-12 nemaju važnost u usmjeravanju odgovora Th1, ali mogu u mikrookolini inficiranog tkiva imati značajnu ulogu u podržavanju odgovora Th1. Drugi čimbenici, kao što su IL-18, IL-23, kemokini i IFN α i β, mogu imati ulogu u nastanku odgovora Th1. IL-18 početno je označen kao čimbenik koji pobuđuje proizvodnju IFN-γ. Uloga IL-18 pojačana je djelovanjem IL-12, a čini se kako ta dva citokina uzajamno pobuđuju izražaj svojih receptora (130). IL-18 pojačava zaštitni imunitet kod unutarstaničnih klica, međutim uloga tog citokina potčinjena je ulozi IL-12 (131). Klice potiču CC-kemokinski receptor 5 (CCR5, engl. *CC-chemokine receptor 5*) na DC, a vezivanje kemokina za taj receptor pobuđuje proizvodnju IL-12. IL-23 je citokinski sklop lanaca p19 i p40 podjedinice citokina IL-12, koji svoj učinak ostvaruje preko IL-12Rβ1 i preko citokinskog receptora na limfocitima T (TCCR, engl. *T-cell cytokine receptor*). Miševi s manjkavim izražajem TCCR pokazuju povećanu osjetljivost na unutarstanični uzročnik *Listeria monocytogenes*. U odsutnosti IL-12, IFN-α i β mogu potaknuti ljudske Th-limfocite na razvitak u pravcu Th1, međutim taj mehanizam ne postoji kod mišjih limfocita (132). Geni citokina u stanicama CD4 nalaze se u mirovanju u inaktivnom obliku. Tijekom usmjeravanja u stanice Th1 uočava se specifično preoblikovanje kromatina na lokusu za IFN-γ. Hipometilacija i

mjesta preosjetljiva na DNAazu na I i II intronu gena za IFN-γ uočena su kod Th1, ali ne i kod stanica Th2 (133). Signalizacija preko IL-12R pobuđuje unutarstanične signalizacijske molekule STAT1, STAT3 i STAT4, koje imaju značajnu ulogu u razvitku odgovora Th1 (134). Neki prijepisni čimbenici koji su odgovorni za proizvodnju citokina Th2 negativno su regulirani transkripcijskim čimbenicima Th1. Transkripcijski čimbenik *T-bet* specifično je izražen u stanicama Th1. *T-bet* pobuđuje gen za IFN-γ istovremeno potiskujući izražaj gena za IL-4 i IL-5 te tako potiče stvaranje IFN-γ ako se pokusno transfekcijom ugradi u limfocite Th2 (135). Podaci o međusobnoj regulaciji transkripcijskih čimbenika ukazuju na molekulski mehanizam kojime dvije skupine citokina potiču razvitak jednog citokinskog profila, a drugoga potiskuju. (Slika 6.)

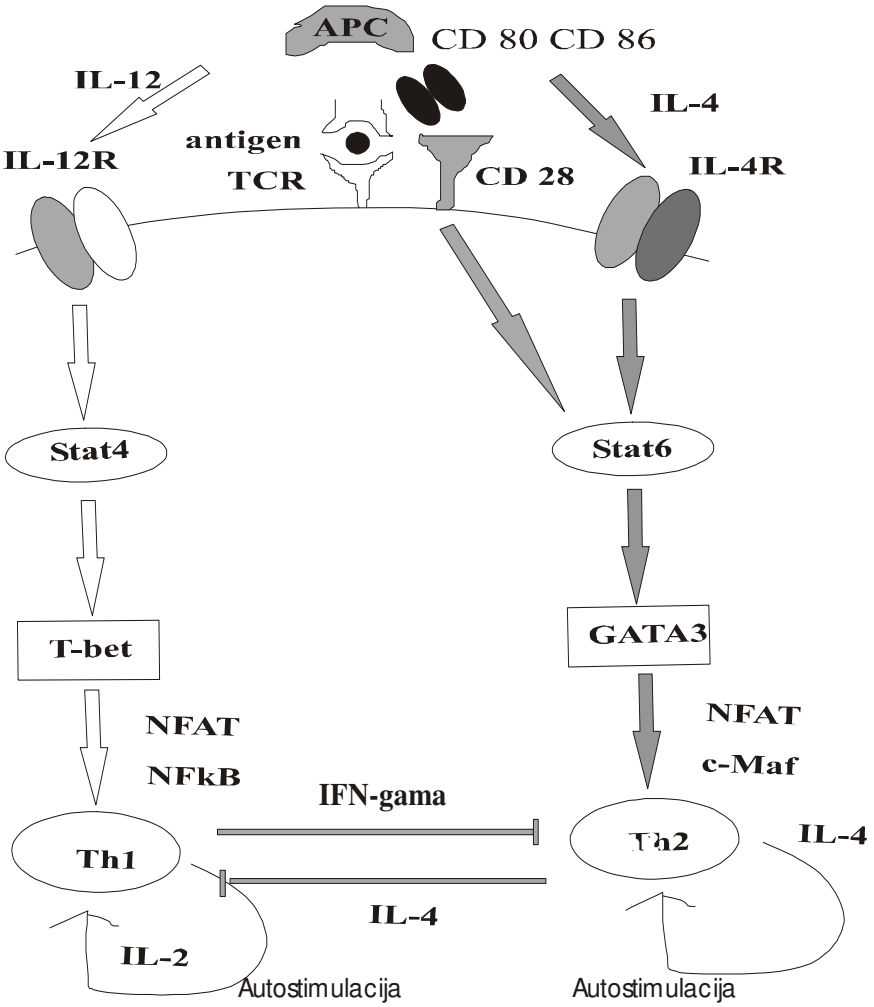
Odgovor Th2

Nastanak odgovora Th2 tijekom zaraznih bolesti nastaje najvjerojatnije kao posljedica izostanka ili nedostatka pobude imunopredočnih stanica od strane klica. U prilog tomu govore činjenice kako samo davanje topljivih antigena bez adjuvansa može dovesti do nastanka Th2 , ali ne i odgovora Th1 (136). Prethodni radovi ukazuju da IL-4 proizveden od strane nelimfocitnih stanica (uključujući i DC $CD8\alpha^-$ stanice) pruža početni signal koji dovodi do usmjeravanja Th2 (137, 138). U navedenom modelu vezivanje IL-4 za IL-4R dovodi do pobude STAT6, a učinak toga je funkcijsko usmjeravanje naivnih limfocita Th u smjeru Th2 (139). Više radova ukazuje da CD4 limfociti T mogu proizvoditi IL-4 i druge Th2-citokine u odsutnosti IL-4R i STAT6 (140). Postoje pokazatelji koji govore da proizvodi mikroorganizama (posebice kod nekih parazita kao što su *Schistosoma mansoni, Acanthoceilonema vitae, Nipostrongilus brasiliensis*) mogu izravno potaknuti odgovor Th2 (141, 142). U skladu s time čini se kako odgovor Th2 nastaje kao učinak izostanka signala koji pobuđuje DC i proizvodnju IL-12, odnosno ostalih citokina koji pobuđuju odgovor Th1. Tijekom različitih zaraznih bolesti kostimulacijske su molekule potrebne za pobudu proizvodnje IL-4 u limfocitima T. Takva povećana ovisnost odgovora Th2 o

kostimulacijskim molekulama u usporedbi s odgovorom Th1, može biti djelomično teorijski objašnjena jačinom signala. U tom je modelu odgovor Th2 favoriziran kada je pojačan signal prema limfocitima T (143). Među tim signalima spadaju signali koji nastaju preko molekula TCR, zatim CD4 i ostalih kostimulacijskih molekula (143, 144). Miševi BALB/c koji su inficirani malim brojem parazita *L. major* ili *T. muris* razvijaju odgovor Th1, dok miševi inficirani većim brojem parazita razvijaju odgovor Th2 (145). Međutim, ti rezultati mogu se činiti suprotni rezultatu koji ukazuje kako je odgovor Th1 povezan s limfocitima T koji imaju TCR visoke avidnosti za antigen (146). Odnos između B7 (CD80) ligand za receptor CD28 na APC i CD28 na limfocitima T ima posebnu važnost u usmjeravanju naivnih limfocita T u stanice Th2. Naime, blokada molekule B7 zaustavlja razvitak Th2-odgovora kod različitih parazitoza, uključujući *L. major, T. muris i S. manson* (147). Zanimljivo je kako odgovor Th1 ostaje i dalje nazočan pri blokadi B7 (148, 149). Osim toga, ti radovi ukazuju kako se blokadom B7 odgovor Th2 karakterističan za parazitoze mijenja u odgovor Th1, osim kod *H. polygrus* gdje je odgovor u cijelosti blokiran (147-149) . To je u skladu s rezultatima koji ukazuju kako *L. major* i *T. muris* mogu izazvati odgovor Th1 ili Th2 ovisno o genetskim osobinama životinjske vrste, dok *H. polygyrus* izaziva samo odgovor Th2 neovisno o životinjskoj vrsti. Miševi BALB/c pokazuju poremećeni odgovor na IL-12, zbog čega kod te vrste životinja *L. major* izaziva odgovor Th2 (150). Dakle, kod tih patogena postoji ravnoteža između stečene imunosti koja pospješuje odgovor Th1 i kostimulacijskih molekula koji signaliziraju odgovor Th2. Signalizacija putem receptora CD28 na limfocitima T i njegovih liganada B7-1 i B7-2 na APC stimulira fosforilaciju STAT6 i izražaj receptora za IL-4 pojačavajući tako njihovu osjetljivost na IL-4 (151). Kod nekih autoimunosnih bolesti signalizacija putem B7-1 odnosno B7-2 povezana je s razvitkom odgovora Th1 odnosno Th2 (152). CTLA4 (CTLA4, engl. *Cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) predstavlja drugi oblik receptora za B7-1 i B7-2 na limfocitima T koji suprotno pozitivnoj signalizaciji kroz CD28 pruža negativni signal (153). Neočekivano, životinje BALB/c s genetski izbačenim genom za CD28 razvijaju odgovor Th2 kod infekcije *L. major*, iako blokada B7 u normalnih životinja koči taj odgovor. Ti rezultati navode na to da CTLA4 daje pozitivni signal (kod CD28 deficitnih životinja) ili govore o postojanju drugog sustava,

koji je neovisan o B7. CD40L, OX40 i ICOS (ICOS, engl. *Immune costimulatory molecule*) su kostimulacijske molekule koje mogu biti uključene u razvitak odgovora Th2. Za razliku od CD28, koji je stalno izražen na limfocitima T, te se molekule pojavljuju nakon pobude limfocita T, pa prema tome mogu imati značajniju ulogu u reguliranju izvršnih uloga limfocita T. Vezivanje CD40L je nužno za promjenu izotipa protutijela, ali nije potrebno za indukciju limfocita T koji proizvode IL-4 kod infekcije *H. polygyrus* (154). Za razliku od toga, davanje anti OX40L (CD134) protutijela potiskuje odgovor Th2 u miševa BALB/c nakon infekcije *L. major* (155). CD134 deficitni miševi razvijaju odgovor Th2 kod infekcije *N. brasiliensis* (156). ICOS je treći član obitelji CD28 i CTLA4 receptora limfocita T koji ima ulogu u podržavanju odgovora Th2 nakon početne pobude kroz sustav B7 (157). Transkripcijski čimbenici koji promoviraju odgovor Th2 su djelomično poznati (osim od prije poznatoga STAT6 čimbenika). Oni uključuju skupine NFAT (NFAT, engl. *nuclear factor of activated T cells*), c-MAF, SKAT2 i GATA3 (158). Članovi skupine NFAT nadziru funkcijsku polarizaciju stanica Th1 i Th2, te zajedno s AP-1 (AP-1, engl. *activator protein*) promovira izražaj gena za IL-4. Uloga NFAT u *in vivo* uvjetima je složena, na što ukazuju pokusi s miševima defektnim u izražaju NFATc1, koji ne proizvode IL-4, dok miševi s deficitom NFATc2 i NFATc3 u pojačanoj mjeri proizvode IL-4 (159). C-MAF kao transkripcijski čimbenik potiče proizvodnju IL-4, suprotno tome on nema učinka na ostale citokine Th2. Ipak, c-MAF je karakterističan isključivo za stanice Th2 (160). SKAT2 potiče pobudu promotorskih područja za IL-4 i IL-5. SKAT2 i c-MAF tako mogu predstavljati u *in vivo* uvjetima dva neovisna mehanizma regulacije izražaja citokina Th2. Tako npr. CD4 limfociti T pokazuju pojačani izražaj IL-4, IL-10, IL-13 i IL-5 u imunosnom odgovoru na kozji protumišji IgD, dok infekcija *H. polygyrus* pokazuje pojačani izražaj IL-4, IL-13, IL-5, ali ne IL-10 (161). GATA3, kao transkripcijski čimbenik, ima općenitu ulogu u regulaciji izražaja citokina Th2 izravno pojačavajući izražaj IL-4, IL-5 i IL-13, te inhibirajući izražaj IL-12R. Zapravo, STAT6 pojačava izražaj GATA3, a pojačani izražaj GATA3 može izazvati odgovor Th2 kod životinja s nedostatkom STAT6, ukazujući na mogući mehanizam diferencijacije Th2 neovisne o IL-4. Osim toga, signalizacija preko kostimulacijske molekule povećava izražaj GATA3 i STAT6 (162). Pretpostavka je da polarizacija Th1/Th2 uključuje

ravnotežu između Th1- specifičnog T-bet i Th2-specifičnog čimbenika GATA3. (Slika 6.) U prvom susretu s antigenom limfociti T primaju signal preko TCR i kostimulacijskih molekula. Ukoliko su uvjeti pobude takvi da postoji proizvodnja IL-12, onda taj citokin inducira putem IL-12R signal putem STAT4 i T-bet, i potiče Th1 razvitak. Ukoliko je signal preko STAT6 i GATA3, pobuda je u smjeru Th2 preko pojačanog izražaja c-MAF. Transkripcijski čimbenik, kao NFAT, je prisutan i u jednom i drugom tipu pomoćničkih limfocita T (158).



Slika 6. Shematski prikaz međuregulacije odgovora Th1 i Th2.
APC fagocitira antigene klica i prezentira ih limfocitima T zajedno s molekulom MHC II. Signal kroz TCR, zatim kroz kostimulacijske molekule (označene kao CD28, CD80 i CD86), te citokinske receptore (označene kao IL-4R i IL-12R) može pobuditi odgovor Th1 kroz pobudu signalnih molekula *STAT4* i *T-bet*. Signal koji pokreće STAT6 dovodi do pobude *GATA3* i proizvodnje citokina Th2, a uključuje i signal preko CD28 kostimulacijske molekule i IL-4R. Th2-citokin IL-4 potiskuje proizvodnju Th1-citokina označeno sivim strelicama. Suprotno tome IL-4 ima pozitivnu autostimulacijsku ulogu na citokine Th2. IFN-γ koči izražaj Th2-citokina, uz autostimulacijski učinak na stanice Th1.

1.3.9. Sluznička imunost

Spoznaje nastale tijekom posljednjih nekoliko godina ukazuju kako imunološki sustav može biti podijeljen u dva funkcionalna odjeljka, sustavni (koštana srž, slezena, limfni čvorovi) i sluznički (limfoidno tkivo u sluznicama i egzokrinim žlijezdama, poznato kao MALT (MALT, engl. *mucosal associated lymphoid tissue*) (163, 164). MALT je lokalni imunosni sustav koji je odvojen od sustavne imunosti, a ta je činjenica izuzetno važna, posebno u razvitku cjepiva protiv različitih klica. Parenteralna imunizacija (potkožna, intravenozna ili intramuskularna) izaziva snažan sustavni imunosni odgovor, uz daleko slabiji imunosni odgovor na tjelesnim sluznicama. Površinska sluznica organizma, kao nastavak izvanjske okoline, glavno je mjesto izlaganja klicama, iz čega proizlazi važnost sluzničke imunosti (164). Sluznički se imunosni sustav može podijeliti na mjesta gdje se antigen susreće te potiče imunosni odgovor i izvršna mjesta u *lamini propriji* gdje se veliki broj plazma stanica koje proizvode IgA i pobuđenih limfocita T može naći (izvršna mjesta). Induktivna mjesta predstavljaju posebne nakupine limfoidnih stanica, a poznata su kao BALT, odnosno GALT (BALT i GALT, engl. *bronchial and gut associated lymphoid tissue*). Jedna od zanimljivih osobina sluzničke imunosti jest sposobnost međusobne komunikacije, odnosno poticaj odgovora u jednom sustavu dovodi do selidbe izvršnih stanica *lamine proprije* drugog sustava. Za razvitak novih cjepiva izuzetno je važna spoznaja kako poticaj odgovora u jednom sustavu, odnosno, komunikacija između različitih tjelesnih sluznica, može izazvati imunosni odgovor drugog sustava. Epitelne zaprjeke različitih tjelesnih sluznica pokazuju različitu organizaciju, a u skladu s time su razvijeni različiti načini antigenske prezentacije. U stratificiranom epitelu DC dospijevaju do rubnih dijelova epitela gdje procesuiraju antigene. U jednoslojnom epitelu iznad mjesta s organiziranim limfoidnim tkivom postoje specijalizirane M-stanice (M, engl. *microfold cells*) koje prenose stranu tvar iz lumena u limfoidno tkivo (165). ″Profesionalne″ imunopredočne stanice, kao što su makrofazi i DC, nalaze se u znatnom broju neposredno ispod M-stanica (166). Prema tome, sluznički imunološki odgovor uglavnom započinje u MALT-u koji za razliku od područnih limfnih čvorova nema limfoidnu drenažu, ali zato antigene sastavnice dobiva prijenosom kroz M-stanice. Najbolje proučeni sustav MALT-a su

limfoidne strukture crijeva, kao što su *Peyerove* pločice i crvuljak (166). Glavna uloga imunosnog odgovora u GALT-u je zaštita crijevne sluznice. Međutim pobuđene izvršne stanice sele i u druga tkiva kao što su respiratorni sustav, suzne žlijezde i mliječne žlijezde. Osim u GALT-u, primarni imunološki odgovor može nastati i u limfoidnom tkivu bronha, u tonzilama Waldeyerovog ždrijelnog prstena i u limfoidnom tkivu nosa (164). Sekrecijski IgA (sIgA, engl. *secretory IgA*) na površini tjelesnih sluznica predstavlja glavnu izvršnu sastavnicu sluznične imunosti (164). U respiratornoj sluznici, na kojoj ne postoji proteolitička razgradnja IgG, pasivni paracelularni IgG može imati zaštitnu ulogu (167). IgA dospijeva na površinu tjelesnih sluznica aktivnim procesom koji uključuje interakciju transmembranskog epitelnog glikoproteina poznatoga kao sekrecijska sastavnica (SC, engl. *secretory component*) i velikih polimera protutijela klase IgA. Osim toga, SC ima zaštitni protuproteolitički učinak (168). Aktivni prijenos IgA i IgM ovisi o prisutnosti 15 kDa polipeptidnoga lanca poznatog kao J-lanac (J, engl. *joining*) koji stvaraju sluznični limfociti B. U odsutnosti toga lanca dolazi do unutarstanične razgradnje navedenih protutijela (169). Klice obložene protutijelima IgA učinkovitije se odstranjuju iz epitelne strome ili iz njegove površine (170). Osim toga, sIgM (sekretorni IgM) koji ima polireaktivnu nespecifičnu aktivnost (poznat kao prirodna protutijela), dio je nespecifičnog imunosnog odgovora (171). Citokinski profil i drugi čimbenici u mikrookolini sluznica koji su odgovorni za diferencijaciju izotipa protutijela te posebice koekspresije J-lanca, tek su djelomično poznati. TGF-β, IL-2, IL-5 i IL-10 imaju naročito važnu ulogu u diferencijaciji limfocita B u stanice koje proizvode IgA (172).

Obje skupine limfocita T, α/β i γ/δ, imaju važnu ulogu u pokretanju sluznične imunosti (164). Gama/delta T-stanice čine veliki dio intraepitelnih limfocita, a novije spoznaje o tim stanicama ukazuju na njihovu ulogu u odstranjivanju inficiranih ili transformiranih stanica (173). Epitelne stanice predstavljaju mehaničku zaprjeku između imunosnog sustava i okoline. Te stanice imaju i aktivnu ulogu u proizvodnji sekretorne sastavnice polimeričnog IgA i citokina (174). Davanje antigena oralnim putem može kadšto dovesti do tolerancije (kasnijeg neodgovaranja na navedeni antigen) (164). Nisu jasni mehanizmi kojima pojedini antigeni dovode do pokretanja imunosnog sustava, a drugi do potiskivanja istoga (tolerancije). Poznavanje tih

mehanizama važno je jer je poticaj proizvodnje protutijela i pobude limfocita T specifičnih za klice u limfnom tkivu tjelesnih sluznica željeni način sprečavanja većine infekcija. Cijepljenjem se putem tjelesnih sluznica oponaša prirodni način ulaska antigena klica. Uspješnost takvog potencijalnog cijepljenja vezana je uz oblike dostave antigena kao što su mikrosfere, liposomi ili genetski promijenjene bakterije i virusi.

1.4. Načela razvitka cjepiva

Uvođenje cjepiva u medicinsku praksu predstavlja jedno od najvećih medicinskih dostignuća (175). Napretkom imunobiologije početni je iskustveni pristup uporabe umrtvljenih klica u razvitku cjepiva zamijenjen racionalnijim pristupom. Taj se racionalni pristup razvitka cjepiva temelji na otkrivanju zaštitnih antigena klica te razvitku prikladnog oblika cjepiva koje je sposobno potaknuti zaštitni imunosni odgovor. Na taj se način dolazi do novih oblika cjepiva koja prije svega moraju biti sigurna te uspješna u nadzoru infekcije. Klasična su cjepiva umrtvljene ili atenuirane klice (stanična cjepiva), a predstavljaju najjednostavniji i najjeftiniji oblik cjepiva. Dobar primjer je stanično cjepivo protiv *B. pertussis*. Novije generacije cjepiva predstavljaju pročišćeni antigeni klica, najčešće dobiveni rekombinantnom tehnologijom DNK (bestanična cjepiva). Najčešći nedostatak tih pročišćenih antigena jest njihova slaba imunogeničnost. Takva su cjepiva, s obzirom na odsutnost bakterijskih toksina, svakako najsigurnija, no zbog svoje slabije imunogeničnosti zahtijevaju dodavanje adjuvansa za pojačanje imunosnog odgovora na antigene cjepiva (176). Klasični primjeri adjuvansa su uljne emulzije, saponini, soli aluminija i kalcija i derivati LPS-klica. Sam mehanizam djelovanja adjuvansa tek je djelomično istražen. Učinak adjuvansa može se temeljiti na povećanom dospijeću APC na mjesto davanja antigena te povećanom prijenosu takvih APC u sekundarne limfoidne organe. To je najvjerojatniji mehanizam adjuvantnosti replikativnih oblika cjepiva, gdje stalna proliferacija vektora omogućuje stvaranje dovoljne količine antigena (177). Adjuvantni učinak liposoma i polimera mikrosfera s uklopljenim antigenima klice rezultat je jednakog učinka. Takvi pripravci cjepiva omogućuju bolju fagocitozu od strane APC, čime antigen može dospjeti u citoplazmu te se prezentirati u sklopu MHC razreda I (178). Upalni citokini nastali na mjestu davanja mogu doprinositi imunosnom odgovoru adjuvansa, štoviše, različiti oblici adjuvansa mogu dovesti do različitog profila citokinskog odgovora (179). S obzirom na ulogu citokina, oni se i sami mogu upotrebljavati kao adjuvansi i to najčešće izraženi u rekombinantnim vektorima ili u DNA-cjepivima (180). Imunogene sastavnice cjepiva mogu poticati APC, te na taj način dovesti do odgovarajuće pobude limfocita T, bilo putem proizvodnje citokina, bilo putem izražaja kostimulacijskih molekula, odnosno mogu potaknuti signal

opasnosti (65). Kombinacije različitih sastojaka adjuvansa mogu modulirati odgovor prema Th1 odnosno Th2 (ovisno omjeru polioksipropilena i polioksietilena) (181). Razvitak tehnologije rekombinantne DNK otvorio je nove mogućnosti manipulacije genomom klica. Alternativni postupak poboljšanja cjepiva predstavlja mogućnost rekombinantne proizvodnje virulentnih antigena klica u *in vitro* uvjetima, te njihovu uporabu kao visokopročišćenog proteinskog bestaničnog cjepiva. Osim toga, virulentni se geni klica mogu ubaciti u genom poznatih oslabljenih klica kao što je recimo *Vaccinia virus* ili *Bacille Calmette Guerin* (BCG), te tako ustrojeni transgenički organizmi mogu biti upotrijebljeni kao cjepiva (replikativni transgenični oblici cjepiva) (182). Daljnji napredak tehnologija DNK omogućio je stvaranje transgeničnih biljaka s antigenima uzročnika što će omogućiti uspješnu upotrebu tako genetski promijenjenih biljaka kao oralnih pripravaka cjepiva (transgenična biljna cjepiva) (183). Mogućnost njihove uporabe u imunizaciji ljudi je u postupku istraživanja (184). DNK ili genetska cjepiva, sastavljena od bakterijskog plazmida s virulentnim genom klice, što dovodi do proizvodnje antigenske sastavnice klice, predstavljaju daljnji napredak u postupku cijepljenja (185). Plazmidi su kružni izvankromosomski djelići DNK u koje se mogu ugraditi poželjni geni. Kada se plazmidi ugrade u stanice sisavaca, oni mogu proizvoditi bjelančevinu ugrađenog gena. Tako ustrojeni plazmidi vežu se za čestice zlata te se tako mogu primijeniti potkožno putem *˝genskog pištolja˝*, gdje dospijećem u imunopredočne stanice mogu potaknuti humoralni i stanični odgovor.

Dolazak antigena u sekundarne limfoidne organe ima izuzetnu važnost u nastanku zaštitnog imunosnog odgovora. Približno 90% infekcija u ljudi započinje na površini tjelesnih sluznica, a unatoč tomu jedino je oralno cjepivo protiv poliomijelitisa u uporabi kao oblik sluzničnog cjepiva.

Daljnji napredak istraživanja načina cijepljenja temelji se na proučavanjima načina zaustavljanja infekcije na tjelesnim sluznicama. Načelno gledajući, cjepiva koja bi se davala putem tjelesnih sluznica imaju niz prednosti koje uključuju jednostavnost davanja, pa sve do daleko važnijeg značenja u izazivanju sluznične imunosti koja može zapravo predstavljati jedini način izazivanja zaštitne imunosti na mjestu ulaska klica u organizam (186). U nekoliko studija biološki su razgradljive mikrosfere upotrijebljene za oralnu i sustavnu imunizaciju, osim toga uspješno su

upotrijebljene u prethodnom istraživanju u našem laboratoriju kod infekcije *B. pertussis* (187). Takve su mikrosfere sastavljene od biološki razgradljive i biološki podudarne tvari kao što je poly DL-lactide-co-glycolide (DL-PLG) unutar koje je uklopljen antigen. Biološko raspadanje može trajati od nekoliko dana do nekoliko mjeseci, što ovisi o udjelu laktid-glikolida. Promjer tih mikrosfera kreće se od promjera nekoliko μm do nekoliko mm. Ugradnja antigena u mikrosfere ima nekoliko prednosti, uključujući sprječavanje razgradnje proteolitičkim enzimima na tjelesnim sluznicama, polagano otpuštanje antigena i dospijeće antigena u sekundarno limfoidno tkivo (188).

Načelno gledajući, istraživanja uspješnosti cjepiva prošla su iskustveno razdoblje koje se temeljilo na ispitivanju različitih antigenskih pripravaka, njihove koncentracije, načina i redoslijeda davanja, odnosno uporabe različitih adjuvansa bez poznavanja mehanizma zaštitnog imunosnog odgovora. Današnja istraživanja uspješnosti cjepiva pokušavaju utvrditi mehanizam zaštitne imunosti raščlambom različitih parametara aktivnosti imunološkog sustava, odnosno današnja istraživanja pokušavaju utvrditi mehanizme uspješnosti cjepiva. Trenutne spoznaje i razumijevanje procesa ne daje jasne odgovore koji su mehanizmi odgovorni za zaštitno djelovanje cjepiva.

2. Ciljevi istraživanja

Istraživanja iznesena u ovom radu trebaju odgovoriti na više temeljnih bioloških pitanja koja mogu imati zanimljive praktične koristi u razvitku uspješnog i sigurnog cjepiva za *B. pertussis*. Dosadašnja istraživanja imunosnog odgovora organizma na različite klice ukazuju da je usmjeravanje odgovora domaćina kadšto važnije od same sposobnosti prepoznavanja antigena. Stoga su istraživanja uvjetovanosti odgovora organizma i svojstava klica u patogenezi infekcije važna u omogućavanju dizajna cjepiva potrebnih za eradikaciju pojedinih zaraznih bolesti.

U ovom radu istražit će se međuodnosi i međudjelovanje različitih medijatora (solubilnih i staničnih) imunosnog odgovora (promjena nutarnjeg okoliša organizma izazvana infekcijskom noksom) kako bi se utvrdila njihova uloga u infekciji i imunizaciji kod *B. pertussis* u *in vivo* i *in vitro* mišjem modelu infekcije kod *B. pertussis.* Sljedeća pitanja su postavljena kao središnji istraživački ciljevi disertacije:

1. Određivanje molekularnih i staničnih osobitosti i kinetike imunoreaktivnosti kod aerosolne infekcije *B. pertussis,* te ishod infekcije.
2. Utvrđivanje citokinskih i staničnih obrazaca reaktivnosti kod infekcije *B. pertussis* u imunonedostatnih i kontrolnih životinja.
3. Određivanje antigena klice koji pokreću zaštitne mehanizme imunosti pomoću intranazalne imunizacije (sluznična imunizacija) laboratorijskih miševa.
4. Svojstva cjepiva i imunosnog odgovora pri aktivnoj imunizaciji antigenima klice u ovom modelu.

Unutar općih ciljeva u disertaciji su istražena i opisana sljedeća specifična pitanja kao posebni ciljevi istraživanja.

Ad 1. Tijek infekcije *Bordetellom pertussis* u aerosolnom modelu infekcije laboratorijskih miševa.

1.1. Određivanje infektivne doze *Bordetelle pertussis.*

1.2. Kultivacija *B. pertussis* iz pripravaka pluća inficiranih životinja u različitim razdobljima nakon infekcije.
1.3. Praćenje broja kolonija tijekom infekcije u plućnom tkivu.
1.4. Određivanje tijeka infekcije kod imunokompetentnih (kontrolnih) miševa u odnosu na imunonedostatne SCID i atimične NUDE miševe.

Ad 2. Kinetika i obrasci citokina u tijeku infekcije *Bordetellom pertussis.*

1.1. Istodobno s određivanjem broja bakterija u plućnom tkivu u tijeku infekcije odredit će se izražaj citokina pomoću metode RT-PCR (IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-6 i IL-12).
1.2. Izolacija i karakterizacija limfocita T pomoću protočnog citometra stanica iz trahealnih limfnih čvorova inficiranih miševa za ispitivanje proizvodnje citokina *in vitro* postupkom ELISA.
1.3. Učinci *in vivo* uklanjanja IFN-γ i IL-4 pomoću specifičnih monoklonskih protutijela.
1.4. Tijek infekcije uzrokovane *B. pertussis* u miševa s izbačenim genom za IFN-γ (IFN-$\gamma^{-/-}$KO).

Ad 3. Imunizacija miševa intranazalnim putem s potencijalnim cjepivima za *B. pertussis.*

1.1. Tijek infekcije u imuniziranih životinja određen brojem bakterija u plućnom tkivu životinja.
1.2. Zaštitni titar protutijela u serumu imuniziranih životinja.

Ad 4. Svojstva imunosnog odgovora pri aktivnoj imunizaciji antigenima klice.

1.1. Određivanje naravi T-staničnog odgovora, proliferacija i proizvodnja citokina.
1.2. Odgovor na imunizaciju imunonedostatnih životinja.
1.3. Odgovor na imunizaciju genetski modificiranih limfopeničnih životinja (B i T limfopenični miševi).
1.4. Popravak odgovora prijenosom odgovarajućih stanica i imunog seruma.

3. Tvari i postupci

3.1. Pokusne životinje

Laboratorijski miševi rabljeni u ovom radu uključuju normalne imunodostatne miševe te imunonedostatne životinje s nedostatkom pojedinih kritičnih molekula ili stanica imunosnog sustava. U svrhu istraživanja ovisnosti infekcije *B. pertussis* o dobi životinja korišteni su miševi BALB/c (H-2^d) mlađi od 18 dana. Kao imunodostatne životinje korišteni su sojevi miševa BALB/c i C57BL6 (H-2^b). U proliferacijskim pokusima limfocita T upotrijebljeni su C3H/HeJ (H-2^k) koji su otporni na proliferacijske učinke lipopolisaharida klica (189). Kao imunonedostatne životinje upotrijebljene su životinje sa ciljanim nedostatkom pojedinih gena (KO, engl. *knock-out*) i one sa spontano nastalom mutacijom. Imunonedostatne životinje uključuju atimične miševe s manjkom limfocita T (*BALB/c nude/nude*), te miševe s nedostatkom limfocita T i B (*BALB/c scid/scid*) (190, 191). Osim tih životinja upotrijebljeni su miševi u kojih je ciljano izbačen gen za pojedinu molekulu važnu u djelovanju i razvitku imunosnog sustava. Uloga IFN-γ istražena je na KO miševima sa ciljano izbačenim genom za taj citokin (označeni kao *IFN-$\gamma^{-/-}$KO*) (192). Uloga limfocita T (α/β i γ/δ) u postupku imunizacije protiv *B. pertussis* istražena je na KO miševima sa ciljanom mutacijom β i δ lanca antigenskog receptora limfocita T (označeni kao *Tcrβ⁻ Tcrδ KO*) (193). Važnost CD4 i CD8 limfocita T istražena je na miševima s manjkom tih stanica (označeni kao *$CD4^{-/-}$KO* odnosno *$CD8^{-/-}$KO*) (194, 195). U istraživanju uloge limfocita B upotrijebljene su životinje s nedostatkom tih stanica nastalih nakon ciljane mutacije na genu za μ lanac imunoglobulina (označeni kao *$B^{-/-}$KO*) (196, 197). U pokusima s životinjama sa ciljanom mutacijom gena uvijek je rabljen kao nadzor soj miševa C57BL6 izvornog genetskog sastava. Najveći dio laboratorijskih životinja iz uzgoja su životinja (Animal Production Programm, National Cancer Institute, SAD). Životinje sa ciljano izbačenim genima su komercijalno dobavljene (The Jackson Laboratory, SAD i Gnotobiotic Laboratory, SAD). Miševi s izbačenim genom za IFN-γ su dobiveni iz laboratorija Dr. Ronalda Schwartza (NIH, Bethesda, SAD).

3.2. Mišji model aerosolne infekcije B. pertussis

Priprema klica za aerosol. Sojevi *Bordetellae pertussis* (18323 i Tohama I) rastu na temperaturi od 35^0 C na Bordet–Gengou (BG) agaru, koji sadrži 20 % defibrinirane krvi. Klice su najviše tri puta kultivirane na BG agaru. Nakon kulture na agaru od 21 sata klice su se resuspendirale u sterilnom fosfatnom puferu, 0.01M natrijev fosfat (pH 7,2; PBS), koji sadrži 1 % Casamino kiseline (Difco). Tako pripremljena suspenzija klica u koncentraciji od 10^9 kolonija klica (CFU, engls. *colony forming units*) koristila se u pripremi aerosola u sustavu zatvorene komore.

Sustav zatvorene komore za stvaranje aerosola. Zatvoreni sustav se sastoji od staklene komore veličine 40x40x40 cm . Životinje se stavljaju na metalnu mrežu koja se nalazi 15 cm iznad podnožja komore. Raspršivač (*nebulizer*) nalazi se u središnjem dijelu staklene komore. Aerosol se proizvodi pomoću raspršivača koji radi pri tlaku od 1,5 kg/cm^2 koristeći sterilni pročišćeni zrak i 0,4 ml/min prethodno pripremljene suspenzije klica. Pokusi se izvode pri izvanjskoj temperaturi od 23°C. Tijekom i nakon izlaganja aerosolu izlazni ventil na dnu staklene komore pod negativnim tlakom od 1,5 kg/ cm^2 odstranjuje zrak iz zatvorene komore u sustav za sterilizaciju. Taj je sustav potanko opisan u literaturnom izvoru (198).

Postupak sa životinjama nakon izlaganja aerosolu. Životinje se izvade iz zatvorene komore jedan sat nakon izlaganja aerosolu. Izložene su životinje u skupinama od šest stavljene u posebne kaveze prekrivene zračnim pročišćivačem. Prilikom svakog postupka izlaganja aerosolu dvije se životinje žrtvuju neposredno nakon završetka postupka radi utvrđivanja broja živih klica u plućima, odnosno radi provjere uspješnosti postupka.

Postupak praćenja tijeka infekcije. Inkubiranje na hranjivim podlogama dokazuje klice u uzorcima tkiva. Žvotinje su žrtvovane u različitim vremenima nakon infekcije. Plućno tkivo se uzimalo u aseptičnim uvjetima. Tako dobiveno tkivo se homogenizira i resuspendira u 5 ml sterilnog fosfatnog pufera (PBS). Desetorostruko razrjeđenje početne suspenzije plućnog tkiva se pripremi u PBS-u. Uzorak od 0,1 ml tako pripremljenog razrjeđenja se ravnomjerno nasadi na BG agar pločice. Nakon kultivacije brojenjem se određivao broj kolonija klica na pločicama (CFU).

3.3. Određivanje m-RNK citokina u plućnom tkivu pomoću postupka RT-PCR

Izolacija RNK. Mala se količina plućnog tkiva (50 mg) uzimala iz desnog srednjeg plućnog lobusa u različitim vremenima nakon infekcije. Takvo se tkivo homogeniziralo u 1,5 ml *RNAzolB* (Tel-Test, Inc. Friendswood,SAD) prema tehničkim uputama proizvođača. U tako dobivenu količinu tkivnog homogenata (2 ml) dodaje se 0,2 ml kloroforma. Uzorak se čvrsto zatvori, dobro se izmiješa tijekom 15 sekundi, zatim se 15 minuta inkubira na ledu. Nakon navedene inkubacije uzorak se centrifugira na 12 000 xg na temperaturi od 4^o C tijekom 15 minuta. U tako centrifugiranom uzorku izdvoji se tekuća faza koja se premjesti u čistu epruvetu, u koju se u jednakoj količini doda isopropanol. Uzorak se dobro izmiješa, te se inkubira 45 minuta na -20^0 C. Nakon navedene inkubacije uzorak se centrifugira na 12 000 x g (4^oC) tijekom 15 minuta. Dobiveni talog predstavlja RNK. Tako dobiveni precipitat dva se puta ispere u otopini 75% etanola. Konačni se pripravak RNK otopi u vodi. Koncentracija RNK se odredila mjerenjem apsorbancije na 260 nm. U tomu su postupku upotrijebljeni plastični materijali i voda bez RNK-aza.

Određivanje mRNK. Postupak određivanja mRNK citokina u plućnom tkivu se odvija postupkom RT-PCR (RT PCR, engl. *reverse transcriptase polymerase chain reaction*). Reakcijom enzima reverzne transkriptaze iz izdvojene se mRNK dobije stanična DNK, pomoću PCR metode amplificira se cDNK specifična za pojedine citokine uporabom oligonukleotida specifičnih za pojedine citokine. Probe su izabrane tako da se proizvodi koji se pojačavaju iz cDNK razlikuju od genomske DNK budući da su različite veličine. (Tablica 9.) Kako bi se potvrdila jednaka količina RNK u svakom uzorku je učinjena i amplifikacija gena stabilnog izražaja tzv *housekeeping gene.* Kao stabilni gen rabili smo hipoksantin guanin fosforibozil transferazu (HRPT). Za svaki pojedinačni citokin primjenjuje se optimalni broj ciklusa amplifikacije kako je prethodno objavljeno (161).

Tablica 9. Redoslijed sljedova oligonukleotida upotrijebljenih za amplifikaciju cDNK citokina u PCR reakciji te proba korištenih u određivanju PCR proizvoda.

Citokini	*Specifični oligonukleotidi (***primeri***)*	*Probe za određivanje*
IL6	CTTCATGTACTCCAGGTAG ACTTCACAAGTCCGGAGA	ACTTCACAAGTCCGGAGA
IL2	GAGTCAAATCCAGAACATGCC TCCACTTCAAGCTCTACAG	CTCCCAGGATGCTCACCTTC
IL12[a]	CGTGCTCATGGCTGGTGCAAAG GAACACATGCCCACTTGCTG	GCTCAGGATCGCTATTAC
TNF-α[b]	GATCTCAAAGACAACCAACTAGTG CTCCAGCTGGAAGACTCCTCCCAG	CCCGACTACGTGCTCCTCACC
IFN-γ	AACGCTACACACTGCATCTTGG GACTTCAAAGAGTCTGAGG	GGAGGAACTGGCAAAAAGGA
IL-4	GAATGTACCAGGAGCCATATC CTCAGTACTACGCGAGTAATCCA	AGGGCTTCCAAGGTGCCTTCGC -A
HRPT	GTTGGATACCAGGCCAGACTTTGTTG GATTCAACTTGCGCTCATCCTTAGGC	GTTGTTGGATATGCCCTTGAC

[a] IL-12 je heterodimer sastavljen od podjedinica p35 i p40 slijed oligonukleotida se odnosi na p40.
[b] probe za TNF-α prema literaturnom izvoru: (199)

Određivanje i kvantifikacija proizvoda PCR. PCR proizvod se izložio elektroforezi na *2 % agaroznom gelu*. (na svakih 50 ml dodaje se: 0,5 gr agaroze, 30 ml DEPC H_2O, 10 ml formaldehida, 5 ml 10x pufera MOPS). *Pufer MOPS* u koncentraciji 10x sadrži 10,5 gr MOPS, 1 gr EDTA, 1 gr natrijevog acetata, 250 ml DEPC H_2O, pH do 7,0. Nakon elektroforeze na agarozom gelu cDNK prenesena je na Hybond membranu (Amersham, Velika Britanija) prema tehničkim uputama proizvođača, a u skladu s načelom *Southern blotting*. Specifične oligonukleotidne probe su obilježene s fluorescein-11-dUTP prema uputama proizvođača (Amersham). Dobiveni autoradiografi su kvantificirani pomoću *NIH image* programa. Za svaku razinu mRNK mjerenu tijekom infekcije dana je vrijednost u postotcima u usporedbi s najvećom vrijednošću koja iznosi 100%. Svaka pokusna točka mjerenja je tri puta ponavljana**.**

3.4. Dobivanje limfocitnih T-linija specifičnih za B. pertussis

Limfociti T su izdvojeni iz drenažnih limfnih čvorova traheobronhalnog stabla osam tjedana nakon infekcije ili imunizacije. Limfni čvorovi su radi lakšeg uočavanja, obilježeni intraperitonejski primjenom ugljene prašine uklopljene u lecitinu (Thies Technologies, SAD). Suspenzija stanica se propustila kroz stupac najlonske vune kako bi se odvojile ostale stanične populacije. Najlonska vuna je ekvilibrirana s 10% fetalnim goveđim serumom u RPMI 1640 (GIBCO BRL, Life Technologies). Tako pripremljene stanice inkubirane su sa singeničnim ozračenim stanicama slezene i odgovarajućim antigenom. Nakon nekoliko krugova stimulacije dobije se stanična linija limfocita T. Limfociti T su karakterizirani pomoću protočnog citometra kako bi se odredila ekspresija CD4 i CD8 receptora na površini stanica, uporabom odgovarajućih monoklonskih protutijela obilježenih fluoresceinom (PharMingen, SAD). Postupak dobivanja staničnih linija limfocita T opisan je u prethodnom radu (110).

3.5. Analiza odgovora limfocita T na imunizaciju *B. pertussis*

Miševi su imunizirani intranazalno dva puta u razmaku od 30 dana s 30 μg umrtvljenih klica *B. pertussis* fiksiranih u formalinu. Izolirani limfociti T u broju od $2x10^5$ su inkubirani zajedno sa $4x10^5$ ozračenih stanica slezene u pločicama za stanične kulture s 96 bunarčića (Costar). Ozračene stanice slezene imaju ulogu imunopredočnih stanica, a kao antigen poslužile su u formalinu fiksirane klice *B. pertussis* ili *E. Coli* (koncentracije 30-50 μg/ml), odnosno pojedinačne pročišćene sastavnice klice *B. pertussis* (u koncentracijama od 1-10 μg/ml). Svaki oblik antigenske stimulacije testiran je u triplikatima. Stanice su inkubirane u mediju RPMI 1640 s 10 % fetalnim goveđim serumom (HyClone), a za određivanje proliferacije dva dana nakon započinjanja stimulacije dodano je 0,5 μCi po bunarčiću [^{3}H] timidina (New England Nuclear), 16 sati nakon dodatka radioaktivne tvari stanice su probrane

i određena je ugradnja radioaktivnosti. Rezultati su izraženi kao prosječni cpm ± standardna devijacija.

3.6. Određivanje proizvodnje citokina u uvjetima *in vitro*

Limfociti T dobiveni bilo od inficiranih, bilo od imuniziranih životinja, inkubirani su s odgovarajućim antigenom (opisano u prethodnom poglavlju) te se u nadtalogu standardnim ELISA postupkom (ELISA, engl. *enzyme–linked immunosorbent assay*) odredila razina citokina između dva sloja protucitokinskih protutijela (IFN-γ, IL-2, IL-10, IL-4) (200). Protu-citokinska protutijela (protu-IFN-γ mAb NIB42, protu-IL-2 JES6-1A12, protu-IL-10 JES5-2A5, protu-IL-4 11B11) inkubirana su tijekom noći u bazenčićima ELISA pločica s vezujućim puferom (0,1 M $NaHCO_3$) na 4^0 C. Nakon ispiranja suviška vezujućih protutijela ELISA pločice su inkubirane s blokirajućim puferom (fosfatni pufer i 10% fetalnog goveđeg seruma). Tako pripremljene ELISA pločice inkubirane su sa serijskim razrjeđenjima nadtaloga. Kontrolu predstavlja poznata koncentracija rekombinantnog citokina. Nevezani sadržaj nadtaloga ispran je pomoću fosfatnog pufera i Tween 20 deterdženta. Tako pripremljene pločice inkubirane su s biotiniliranim protucitokinskim protutijelima (protu-IFN-γ mAb 4SB3, protu-IL-2 JES6-5H4, protu-IL-10 JES5-16E3, protu-IL-4 BVD6-24G2). Koncentracija citokina u uzorcima određena je dodatkom avidin perokisdaze i supstratnog pufera (PharMingen,SAD), te mjerenjem apsorbancije na 405 nm uz usporedbu s poznatom koncentracijom citokina. Monoklonska protutijela i rekombinantni citokini su komercijalno dobavljeni (PharMingen,SAD).

3.7. *In vivo* neutralizacija citokina

IFN-γ *in vivo* neutralizirao se pomoću monoklonskog protutijela (monoklonsko protutijelo R46A2, štakorskog podrijetla, izotipa IgG_1). Neutralizacijska djelotvornost protutijela *in vivo* je opisana prije (201). Kao kontrolna skupina protutijela upotrijebljena su protutijela koja neutraliziraju IL-4 (monoklonsko protutijelo 11B11 štakorskog porijekla, izotipa IgG_1). Ta su monoklonska protutijela dobivena u obliku ascitesa. Ascites s monoklonskim protutijelima dobiven je nakon intraperitonejske primjene 2-5 x 10^6 B hibridomskih stanica (American Type Culture Collection, Rockville, SAD) u atimične *nude* miševe prethodno obrađene s 0,5 ml mineralnog ulja

Pristane (Sigma). Upotrebljena su u pročišćenom obliku afinitetnom kromatografijom pomoću bjelančevine A učvršćene na sefarozu (protein A-sepharose, Pharmacia, Švedska). Prema protokolu neutralizacije citokina *in vivo* miševima se injiciralo 1 mg monoklonskih protutijela specifičnih bilo za IFN-γ ili IL-4, 3 dana prije izlaganja bakterijskom aerosolu, u vrijeme izlaganja, te jedanput tjedno u tijeku praćenja infekcije.

3.8. Antigeni

Klice *B. pertussis* sojeva 18323 i Tohama I uzgojene su na Bordet Gengou agaru, nakon čega su prenesene u tekući medij (Steiner Scholte). Nakon što su svojim rastom u tekućem mediju dostigle stacionarnu fazu, fiksirane su tijekom noći u 0,2 % formalinu. Tako pripremljene umrtvljene klice *B. pertussis* fiksirane u formalinu isprane su u sterilnom fosfatnom puferu i zatim su resuspendirane u koncentraciji od 440 μg bjelančevina/ml (koncentracija bjelančevina se odredila pomoću Biorad protein eseja, Pierce Chemicals, SAD), kao nadzor poslužila je na jednaki način pripremljena *E. coli* soj HB 101. Antigenska koncentracija od 10 ili 50 μg umrtvljenih klica u fiksiranih formalinu primijenjena je u obliku intranazalnog staničnog cjepiva. Kao druga skupina antigena upotrijebljeno je bestanično cjepivo u obliku mikrosfera napravljenih od polyDL-lactide-co-glycolide koje sadrže uklopljene bjelančevine *B. pertussis*. Mikrosfere promjera 10 μm s točno određenom koncentracijom bjelančevina su izrađene u drugoj ustanovi (Southern Research Institute, Brirmingham, SAD) (187).

3.9. Imunizacija

Životinje su anestezirane pomoću inhalirajuće anestezije metofanom (Pittman, Moore, Inc., Chicago, SAD) u koncentraciji antigena navedenoj u prikazu pojedinih pokusa. Tako anesteziranim životinjama apliciran je odgovarajući oblik cjepiva u svaku nosnicu što životinje inhaliraju u dišni sustav. Nakon što su miševi inhalirali antigensku suspenziju, ostavljeni su u kavezu za životinje. Jednak postupak imunizacije je ponovljen za mjesec dana. Mjesec dana nakon posljednje imunizacije miševi su upotrijebljeni u pokusima izlaganja areosolu.

3.10. Analiza proizvodnje protutijela

Proizvodnja protutijela određena je u serumu i bronhoalveolarnom ispirku imuniziranih životinja. Serum imuniziranih životinja skupljen je mjesec nakon posljednje imunizacije, anestezijom i uzorkovanjem krvi iz brahijalne arterije. Radi određivanja koncentracije protutijela u dišnom sustavu kod određene skupine anesteziranih životinja, fosfatnim puferom učinjeno je bronhoalveolarno ispiranje (lavaža). Koncentracija serumskih protutijela i protutijela u bronhoalveolarnom ispirku određena je inkubacijom serijskih razrjeđenja tih pripravaka na ELISA pločama s odgovarajućim panelom antigena (cijela bakterija ili pojedinačni antigeni). Kao sekundarna protutijela poslužila su protu-mišja IgG, IgA odnosno IgM protutijela konjugirana s alkalnom fosfatazom (Southern Biotechnology Associates, Inc), koja su nakon inkubacije i ispiranja izložena fosfatazi (Sigma, Aldrich). Specifični titar protutijela izražen je kao recipročna vrijednost završnog razrjeđenja.

3.11. Pokusi prijenosa limfocita B

Limfociti B izdvojeni su iz drenažnih limfnih čvorova miševa. Miševi su imunizirani dva puta intranazalno u razmaku od mjesec dana, te 4 dana prije žrtvovanja. Drenažni limfni čvorovi obilježeni su pomoću intraperitonejskog davanja

ugljene prašine učahurene u mikrosferama. Tako dobivena suspenzija stanica obogaćena je limfocitima B pomoću komplementne lize ostalih stanica nakon inkubacije tijekom 30 minuta sa sljedećim monklonskim protutijelima: protu mišji CD8, CD4, CD90 i protuTCR γ/δ). Takva populacija stanica sadrži 90% limfocita B, što je utvrđeno pomoću protočnog citometra. U repnu venu miševa s B limfopenijom ($B^{-/-}$ KO, od engl. *B cell knock out*), nakon prethodne imunizacije, injicirano je 2,5-4,5 x 10^5 limfocita B. Jedan dan nakon prijenosa miševi su ponovo intranazalno imunizirani, a nakon 2 tjedna izloženi su bakterijskom aerosolu.

3.12. Analiza podataka

Podaci su analizirani statističkim postupcima ispitivanja razlika i povezanosti statističkim programskim paketom (SPSS 10.0 for Windows). Srednje vrijednosti izražene su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom za normalno raspodijeljene varijable. Za utvrđivanje razlika između dva nezavisna uzorka upotrebljavan je Studentov t-test za pravilnu (parametrijsku) raspodjelu podataka. Za utvrđivanje razlika između više zavisnih uzoraka (ponavljana mjerenja) upotrebljavan je Wilcoxonov test.

4. Rezultati

4.1. Infektivna doza *B. pertussis* u mišjem imunokompetentnom modelu aerosolne respiratorne infekcije

U svrhu proučavanja imunopatofiziološkog odgovora na infekciju *B. pertussis* testirana je infektivna doza kojom su pokusne životinje izložene putem aerosola stvorenog u sustavu zatvorene komore. Aerosol se sastoji od čestica promjera 5 μm koje mogu zbog svoje veličine dospjeti do distalnog dijela dišnog sustava. U svrhu određivanja potrebne infektivne doze *B. pertussis*, odrasli miševi BALB/c, u dobi između 5-8 tjedana, izloženi su aerosolu klica. Za stvaranje aerosola rabljene su različite koncentracije klica *B. pertussis* soja 18323. U tablici 10. prikazana je ovisnost smrtnosti pokusnih životinja i broja kolonija u plućnom tkivu o dozi klica u aerosolu. Aerosol koncentracije klica 10^9 CFU/ml, iako uzrokuje porast kolonija, ne predstavlja smrtonosnu infektivnu dozu, smrtnost uzrokovana aerosolom se pojavljuje pri infektivnoj dozi $\geq 10^{10}$ CFU/ ml. (Tablica 10.) Kod izlaganja miševa aerosolu u koncentraciji klica od 10^{10} CFU/ml mortalitet iznosi 40%. Stopostotna smrtnost životinja se postiže pri inhaliranju bakterija od 10^{11} CFU/ml. U svrhu proučavanja imunopatofiziološkog odgovora na infekciju *B. pertussis* u ovoj disertaciji upotrebljena koncentracija klica za stvaranje aerosola je 10^9 CFU/ml.

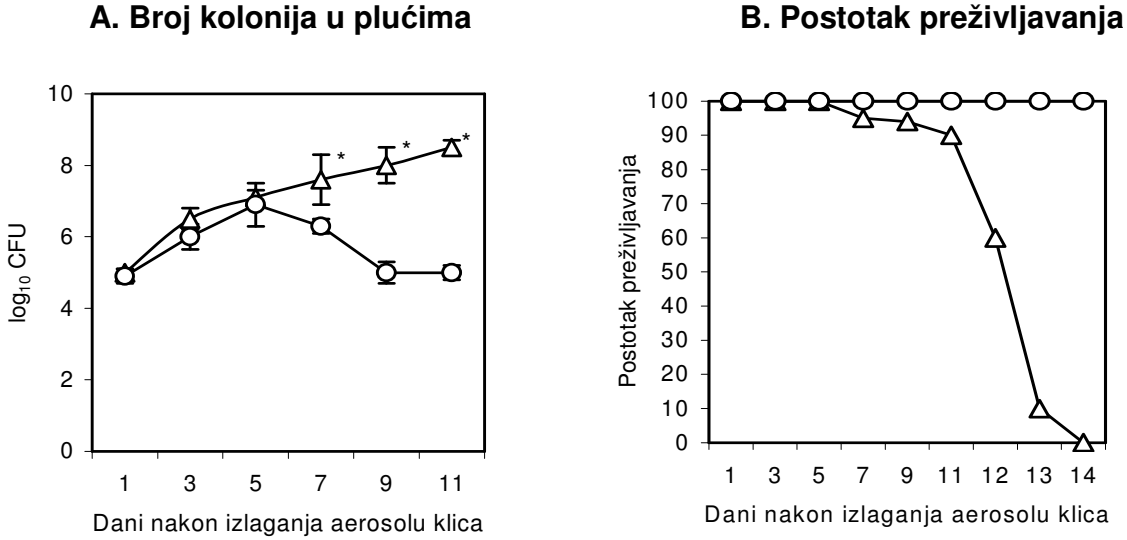
Tablica 10. U normalnih miševa BALB/c patogenetski učinak *B. pertussis* ovisi o dozi

Broj klica u aerosolu [a]	Broj kolonija uzgojenih iz pluća [a]	Smrtnost [b]
10^9	$2{,}2 \pm 0{,}30 \times 10^4$	0
10^{10}	$1{,}1 \pm 0{,}25 \times 10^5$	40
10^{11}	$1{,}2 \pm 0{,}50 \times 10^6$	100

[a] broj kolonija klica (izražen kao CFU/ml), [b] smrtnost izražena u postocima
Miševi BALB/c u skupinama od 5 izlagani su tijekom 30 minuta aerosolu *B. pertussis* u sustavu zatvorene komore s različitom koncentracijom kolonija klica (CFU) po ml otopine upotrebljene za stvaranje aerosola (vidi poglavlje Tvari i postupci).

4.2. Tijek infekcije u odraslih i neonatalnih laboratorijskih miševa BALB/c

U kliničkim istraživanjima naglašena je korelacija dobi bolesnika i težine kliničke slike hripavca, pri čemu se u novorođenčadi i djece razvijaju teže kliničke slike. Takav se nalaz tumači fiziološkom imunonedostatnošću u ranoj životnoj dobi. U našem modelu testiran je tijek infekcije *B. pertussis* s obzirom na dob pokusnih životinja. Uspoređivani su neonatalni miševi (u dobi od 10 do 18 dana) sa skupinom odraslih miševa (starosti između 5-8 tjedana). Navedene skupine miševa izložene su aerosolu klica *B. pertussis.* Životinje su žrtvovane u različitim razdobljima nakon izlaganja aerosolu. Tijek infekcije praćen je uzgojem klica iz plućnog tkiva životinja u određenim vremenskim razdobljima od izlaganja aerosolu. U tim razdobljima dokazan je rast klice *B. pertussis* u uzorcima plućnog tkiva kao što je prikazano na slici 7. Broj klica u tkivu je prikazan kao logaritamska vrijednost broja kolonija dobivenih nakon uzgoja na BG agaru. Pet dana nakon izlaganja aerosolu odrasli miševi BALB/c dostignu maksimalni broj klica u plućima reda veličine od milijun kolonija. Nakon dostizanja maksimalnog broja dokazano je smanjenje broja klica u plućnom tkivu. U imunodostatnim normalnim životinjama u sedmome, devetome i jedanaestom danu dokazano je značajno smanjenje broja klica. (Slika 7A.) Nasuprot tomu, u istom razdoblju kod neonatalnih miševa BALB/c dolazi do rasta broja uzgojenih klica, tako da nakon 11. dana broj kolonija u plućima iznosi sto milijuna. (Slika 7A.) Neonatalni miševi ne uspijevaju kontrolirati infekciju *B. pertussis* te njihovo ugibanje započinje 7. dana nakon infekcije, a 100% smrtnost se postiže u 14. danu. Za razliku od toga odrasli miševi tijekom istog vremena uspješno nadziru infekciju i preživljavaju 100%, kao što je prikazano na slici 7B.

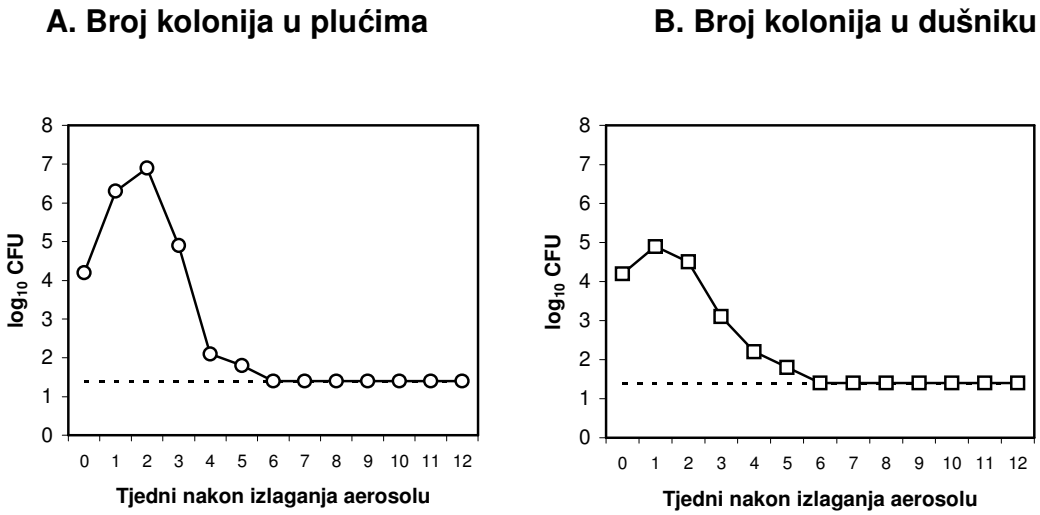


Slika 7A. Utjecaj dobi životinja na broj kolonija uzgojenih iz tkiva pluća tijekom infekcije *B. pertussis*. U danima nakon izlaganja klicama *B. pertussis* (naznačenim na apscisi) plućno tkivo se homogeniziralo i nasadilo na BG pločice. Broj kolonija je označen na ordinati kao $\log_{10}$CFU. Bijelim trokutima označen je broj kolonija uzgojenih iz tkiva pluća neonatalnih miševa BALB/c. Bijeli krugovi predstavljaju broj kolonija uzgojenih iz pluća odraslih miševa BALB/c. Okomite crte predstavljaju standardne devijacije prosječnih vrijednosti broja kolonija dobivenih od 5-6 životinja žrtvovanih u svakoj točki pokusa. Infektivna doza klica *B. pertussis* iznosi 10^9CFU/ml.
* U 7., 9. i 11. danu postoji statistički značajna razlika u broju kolonija između dviju skupina životinja, određeno Studentovim t-testom ($p<0,01$). Ukupan broj testiranih životinja u svakoj skupini je iznosio 35.
Slika 7B. Postotak preživljavanja neonatalnih i odraslih miševa tijekom infekcije *B. pertussis*. Na ordinati je prikazan postotak preživljavanja pojedinih životinja. Neonatalni miševi su označeni bijelim trokutima, a odrasli miševi bijelim krugovima.

4.3. Kinetika odstranjivanja *B. pertussis* iz tkiva nakon aerosolne infekcije imunodostatnih miševa BALB/c

U slici 7A. prikazana je dinamika promjena broja klica u prvih jedanaest dana nakon aerosolnog izlaganja odnosno infekcije *B. pertussis*. U svrhu proučavanja patofiziologije daljnjeg tijeka infekcije odraslih miševa BALB/c rast klica je praćen nekoliko tjedana u uzorcima pluća i dušnika. U slici 8. prikazana je kinetika kolonizacije plućnih struktura klicama. Nakon aerosolne infekcije broj kolonija u plućima miševa poraste od početnog broja od deset tisuća do milijun odnosno deset

milijuna kolonija dva tjedna nakon infekcije, što predstavlja maksimalni broj klica kultiviranih iz plućnog tkiva. Broj kolonija u dušniku poraste do maksimalnog broja od sto tisuća kolonija tjedan dana nakon izlaganja aerosolu. Nakon 6 tjedana od izlaganja aerosolu pluća i dušnik su sterilni odnosno iz tkiva se ne mogu uzgojiti žive klice. Prema tomu, odraslim je miševima BALB/c potrebno više tjedana za uklanjanje *B. pertussis* nakon aerosolne infekcije u ovom pokusnom modelu.

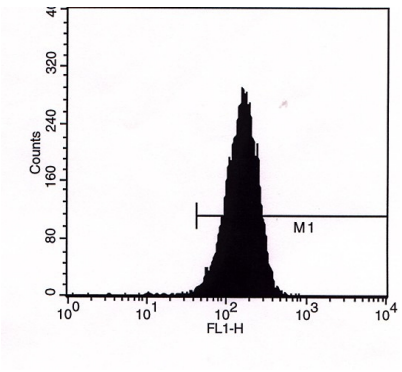


Slika 8A. Kinetika uklanjanja klica praćena analizom broja kolonija *B. pertussis* uzgojenih iz tkiva pluća nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis* u imunodostatnih miševa BALB/c.
U naznačenim tjednima nakon izlaganja klicama *B. pertussis*, označenim na apscisi, homogeniziralo se cijelo tkivo pluća, te se u razrjeđenju kultiviralo na BG pločice. Broj bakterijskih kolonija u plućima (bijeli krugovi) prikazan je na ordinati kao logaritamska vrijednost.
Slika 8B. Kinetika uklanjanja klica iz tkiva dušnika. Bijelim kvadratima prikazan je broj kolonija klica uzgojenih u različitim razdobljima, nakon izlaganja aerosolu, iz tkiva dušnika. U svakoj vremenskoj točki korištena su tkiva dobivena od 3-5 životinja.
Isprekidana horizontalna crta označava prag osjetljivosti testa. Tkivo pluća odnosno dušnika resuspendirano je u 5 ml otopine PBS. Pločicama nasađenim s 100 µl nerazrjeđene suspenzije tkiva na kojima nema rasta kolonija *B. pertussis* arbitrarno pripisujemo broj od 0,5 kolonija klica, što daje 0,5 CFU/100 µl; a to iznosi 1,4 $\log_{10}$CFU.

4.4. Karakterizacija limfocita T dobivenih iz drenažnih traheobronhalnih limfnih čvorova dobivenih nakon infekcije *B. pertussis* imunodostatnih miševa BALB/c

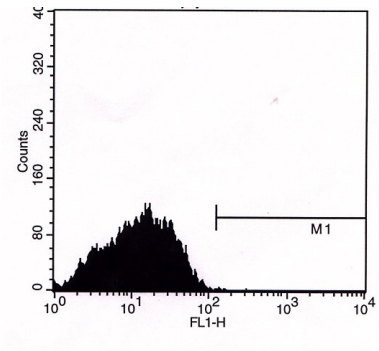
Radi utvrđivanja uloge limfocita T u imunosti miševa BALB/c nakon infekcije *B. pertussis* izolirani su limfociti T iz drenažnih traheobronhalnih limfnih čvorova tjedan dana nakon izlaganja aerosolu. Ovako dobiveni limfociti T mogu se u uvjetima *in vitro* stimulirati pomoću antigenske stimulacije umrtvljenim klicama *B. pertussis* fiksiranim u formalinu (FFBP). Raščlambom staničnih biljega takve populacije limfocita T pomoću protočne citometrije (engl. *flow cytometry*) pokazana je pretežna zastupljenost limfocita T $CD4^+$ $CD8^-$. (Slika 9.)

A. CD4



Log jačine fluorescencije

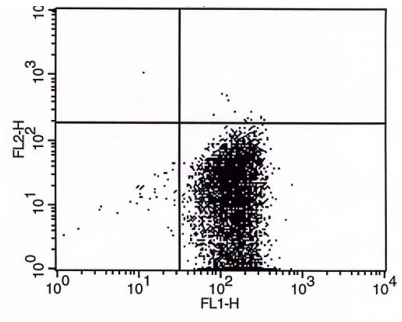
B. CD8



Log jačine fluorescencije

C. Dvostruko bojenje CD4 i CD8

CD8



CD4

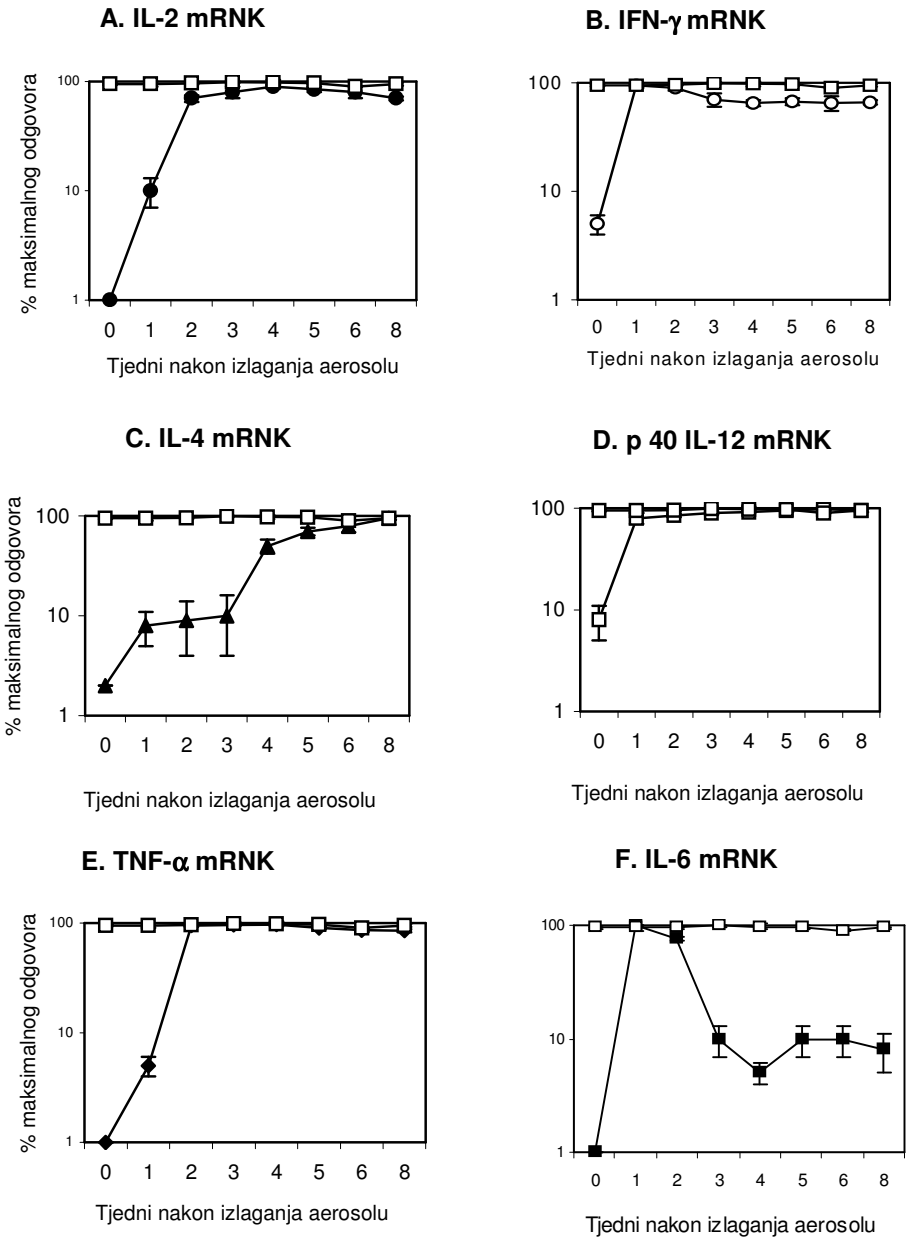
Slika 9. Izražaj receptora CD4 i CD8 na limfocitima T izoliranim iz drenažnih traheobronhalnih limfnih čvorova dobivenih nakon izlaganja miševa BALB/c areosolu *B. pertussis*.
Izražaj receptora CD4 i CD8 na površini limfocita T ispitan je izravnom imunofluorescencijom protočnim citometrom. Stanice su inkubirane FITC obilježenim protutijelima za CD4 (Slika 9A), PE obilježenim protutijelima za CD8 (Slika 9B), odnosno dvostrukim bojenjem (Slika 9C).

4.5. Izražaj mRNK citokina u plućnom tkivu nakon izlaganja miševa BALB/c bakterijskom aerosolu

Radi utvrđivanja mehanizma zaštitne imunosti kod infekcije *B. pertussis* određivana je mRNK pojedinih citokina u plućnom tkivu nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis*. Osnovna pretpostavka ove skupine pokusa je da će izražaj mRNK odražavati lokalne uvjete imunosti pri izlaganju aerosolu. U različitim razdobljima nakon izlaganja bakterijskom aerosolu, postupkom RT PCR izražaj mRNK pojedinih citokina određivan je u 50 mg plućnog tkiva. Određivan je izražaj mRNK citokina koji imaju ulogu u usmjeravanju imunološkog odgovora (Th1/Th2). Nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis* u plućnom tkivu miševa BALB/c, dolazi do proizvodnje mRNK za IL-2, koja ostaje na visokoj razini izražaja najmanje 8 tjedana kao što je prikazano na slici 10A. U istom razdoblju dolazi do proizvodnje mRNK za IFN-γ. U slici 10B. prikazan je izražaj mRNK za IFN-γ koja ostaje povišena sve do 8 tjedna nakon izlaganja aerosolu. Porast izražaja mRNK za IFN-γ nastupa u prvom tjednu nakon izlaganja aerosolu, dakle u razdoblju kada dolazi do znatnog uklanjanja klica iz plućnog tkiva ukazujući na moguću važnost ovog citokina u imunosnom odgovoru na infekciju *B. pertussis*.

Iako tijekom infekcije *B. pertussis* poticanje proizvodnje mRNK za IL-4 nastupa već u prvom tjednu, taj se izražaj održava na niskoj razini (približno 10% maksimalnog mogućeg izražaja) tijekom tri do četiri tjedna. Nakon šest tjedna od izlaganja aerosolu javlja se maksimalni izražaj mRNK za IL-4. (Slika 10C.) Zanimljiva je različitost kinetike pobude proizvodnje mRNK ovih citokina, početna pobuda mRNK za IFN-γ te odložena pobuda mRNK za IL-4. U istom pokusu utvrđen je izražaj mRNK za p40 podjedinicu IL12 i TNF-α. Utvrđen je porast mRNK za p40 podjedinicu IL-12, a

visoka razina ostaje do kraja pokusa (8 tjedana), kao što je prikazano na slici 10D. Gotovo jednaku kinetiku pobude ima mRNK za TNF-α. (Slika 10E.) Upalotvorni citokin IL-6 pokazuje porast mRNK u početnom dijelu infekcije, ali nakon dva tjedna dolazi do smanjivanja razine mRNK ovog citokina. (Slika 10F.) U plućnom tkivu nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis* utvrđen je porast razine mRNK za IL-2, IFN-γ, IL-4, p40 podjedinicu IL12, TNF-α i IL-6. Međutim, kinetika porasta ovih citokina je donekle različita ukazujući na mogućnost da u različitim razdobljima infekcije prevladavaju različiti citokini, odnosno mogući različiti oblici imunosnog odgovora, Th1 odnosno Th2.



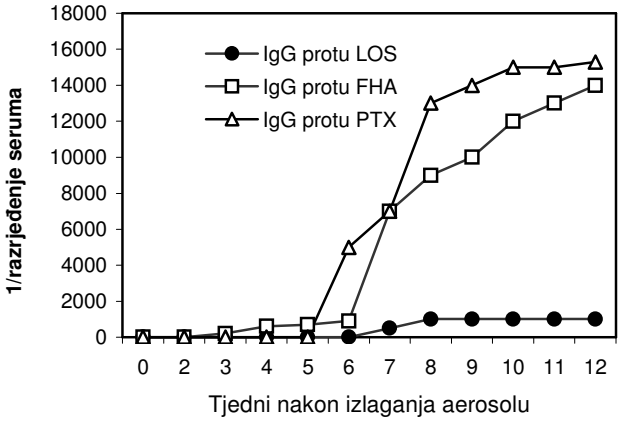
Slika 10. Kinetika izražaja mRNK citokina u plućnom tkivu imunodostatnih miševa BALB/c nakon izlaganja aerosolu klica *B. pertussis*.
Izražaj mRNK citokina prikazan je kao postotak maksimalnog odgovora na ordinati. Maksimalni odgovor označen je kao 100%. U svakom pokusu kao kontrola količine mRNK uporabljena je razina izražaja mRNK za HRPT, čiji se izražaj tijekom infekcije ne mijenja (prikazana je bijelim kvadratima). Izražaj mRNK za IL-2 prikazan je crnim krugovima (Slika 10A.), IFN-γ bijelim krugovima (Slika 10B.), IL-4 crnim trokutima (Slika 10C.), p40 podjedinicu IL-12 bijelim kvadratima (Slika 10D.), TNF-α crnim rombima (Slika 10E.) te
IL-6 crnim kvadratima (Slika 10F.). Na apscisi su prikazani tjedni nakon izlaganja klicama *B. pertussis* . U svakoj točki pokusa upotrijebljene su 3 životinje.

4.5.1. Titar specifičnih protutijela u serumu i bronhoalveolarnom ispirku u miševa BALB/c nakon izlaganja aerosolu

Odrasli miševi BALB/c uspješno nadziru infekciju. (Slika 7.) Pokusi prikazani na slici 10. pokazuju različitu kinetiku izražaja mRNK pojedinih citokina nakon izlaganja klicama. Međutim, izražaj citokina ne govori izravno o izvršnom kraku imunosti i mehanizmu uklanjanja klica. Radi istraživanja izvršnih mehanizama u ovom modelu ELISA testom ispitana je kinetika pojave i rasta titra specifičnih protutijela u serumu i bronhoalveolarnom ispirku pluća (BAL, engl. *bronchoalveolar lavage*) miševa u različitim razdobljima nakon izlaganja aerosolu klica. Istražena su protutijela specifična za virulentne sastavnice *B. pertussis* (FHA, LOS i PTX) s dokazanom ulogom u patogenezi infekcije. (Tablica 3.) Na slici 11. prikazan je blagi porast titra IgG protutijela specifičnih za LOS, koji se javlja 8 tjedana nakon izlaganja aerosolu. IgG protu-FHA i protu-PTX protutijela se prvi puta pokazuju u serumu 5. tjedna nakon infekcije, a ostaju u visokoj koncentraciji sve do 12. tjedna nakon infekcije. (Slika 11.) Zapravo, visoki titar navedenih protutijela specifičnih za virulentne sastavnice *B. pertussis* postoji do 26. tjedna nakon infekcije (rezultati nisu prikazani). Protutijela razreda IgA u BAL-u specifična za FHA utvrđena su 6. tjedna nakon infekcije. (Slika 12.) IgA specifičan za FHA nije bio nazočan u serumu. Specifični IgM odgovor za FHA nije utvrđen niti u jednoj mjerenoj točki tijekom infekcije. U BAL-u nisu utvrđena protu-PTX i LOS protutijela u niti u jednoj vremenskoj točki praćenja tijeka infekcije.

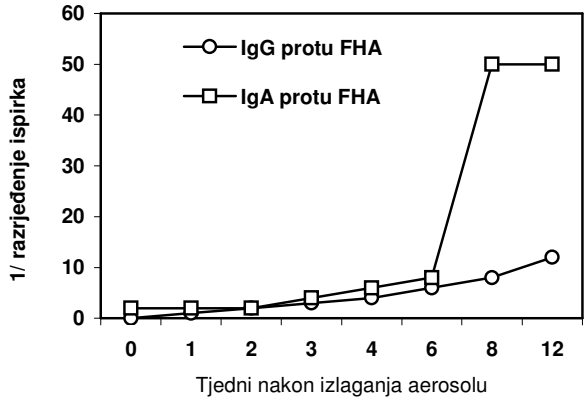
Ovi rezultati ukazuju na zanimljivu pojavu da porast serumskih titrova protutijela nastaje nakon 5. tjedna od izlaganja aerosolu, a kao što je prikazano u slici 8. te iste životinje uklanjaju klice u znatnoj mjeri već do 4. tjedna infekcije, dok se nakon 6. tjedna više ne mogu uzgojiti klice iz tkiva dušnika i pluća. Isto tako, porast titra IgA protutijela u BAL-u se pojavljuje tek nakon šestog tjedna. (Slika 12.) Dakle, značajni porast titra protutijela u tjelesnim tekućinama (serum, ispirak bronha) se u ovom modelu pojavljuje nakon uklanjanja uzročnika iz tkiva (nakon prirodne ″sterilizacije″ tkiva).

Titar protutijela u serumu



Slika 11. Kinetika serumskog titra *B. pertussis* specifičnih protutijela IgG nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis*. U svakoj točki pokusa u serumu dobivenom od 5 miševa analizirana je koncentracija protutijela na ELISA pločicama uporabom odgovarajućih panela antigena specifičnih za *B. pertussis*. Serum je početno razrijeđen u omjeru 1:100. Serumska protutijela specifična za FHA označena su bijelim kvadratima, protutijela specifična za PTX označena su bijelim trokutima, dok su protutijela specifična za LOS označena crnim krugovima. Na apscisi su prikazani tjedni nakon izlaganja aerosolu, ordinata predstavlja titar protutijela.

Titar protutijela u bronhoalveolarnom ispirku



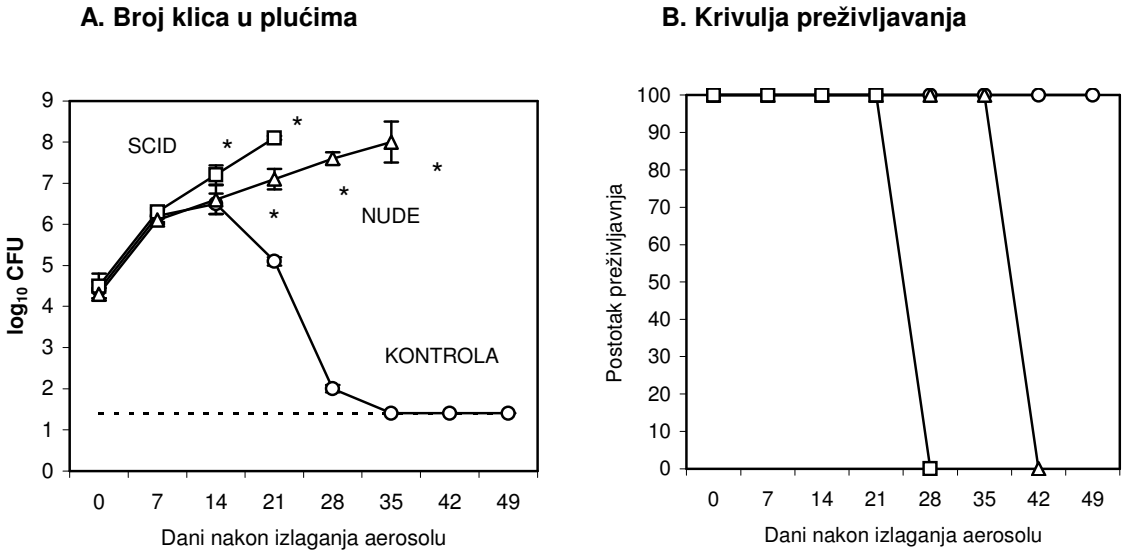
Slika 12. Kinetika protu-FHA protutijela izotipa IgG i IgA u bronhoalveolarnom ispirku (BAL-u) nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis*. U bronhoalveolarnom ispirku dobivenom od 5 miševa određena je koncentracija protutijela specifičnih za *B. pertussis*. Početno razrjeđenje ispirka je 1:2. Bijelim krugovima prikazan je titar protutijela razreda IgG specifičnih

za FHA. Protutijela specifična za FHA razreda IgA su označena bijelim kvadratima. Na apscisi su prikazani tjedni nakon izlaganja aerosolu, ordinata predstavlja titar protutijela.

4.5.2. Uloga staničnog kraka u infekciji *B. pertussis*

Na slikama 7. i 8. prikazano je kako imunodostatni miševi BALB/c uspješno nadziru infekciju nastalu nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis.* Maksimalni broj klica se može utvrditi dva tjedna nakon izlaganja aerosolu. Nakon toga se broj kolonija klica u plućima postupno smanjuje. Nakon 6-8 tjedana klice *B. pertussis* potpuno su uklonjene iz pluća, što se može pokazati nemogućnošću detekcije živih klica *B. pertussis*. Značajni titar protutijela javlja se u razdoblju nakon otklanjanja klica iz pluća. (Slike 11. i 12.) Na slici 10. prikazan je različiti obrazac pobude citokina u plućima nakon infekcije *B. pertussis*, nazočno je početno prevladavanje upalotvornih citokina (IFN-γ, IL-6), te kasnija pojava citokina Th2 (IL-4). (Slika 10.) Kasni porast titra protutijela u ovom modelu se teorijski može promatrati kao epifenomen infekcije koji nije u svezi s uklanjanjem klica i nadzorom infekcije. Ukoliko je takva hipoteza točna moglo bi se očekivati da i imunonedostatni organizmi uspješno nadziru infekciju *B. pertussis*. U svrhu utvrđivanja uloge limfocita T i B korištene su životinje koje imaju točno određen nedostatak limfocita. Miševi *SCID*, atimični *nude* i BALB/c izloženi su aerosolu *B. pertussis*. Radi utvrđivanja broja kolonija *B. pertussis* plućno je tkivo nasađeno na pločice BG agara u različitim razdobljima. U jednakim vremenskim razdobljima manji dio plućnog tkiva (50 mg) je zamrznut (-90^0 C) za kasniju izolaciju mRNK pojedinih citokina (vidi Tvari i postupci i sliku 16.)

Imunonedostatni miševi atimični *nude* i *SCID* ne uspijevaju nadzirati infekciju u usporedbi s imunodostatnim životinjama (miševi BALB/c), što je prikazano na slici 13A. U imunonedostatnih životinja broj kolonija klica u plućima progresivno raste, a imunodostatni miševi uklanjanjaju klice iz pluća prema određenoj dinamici. (Slika 13A.) Zbog porasta broja kolonija miševi *nude* ugibaju 5 tjedana nakon izlaganja aerosolu, dok miševi *SCID* ugibaju 2 tjedna prije. (Slika 13B.) Imunonedostatne životinje (*SCID* i atimični *nude*), dakle, ne nadziru infekciju, što vodi smrtnom ishodu.

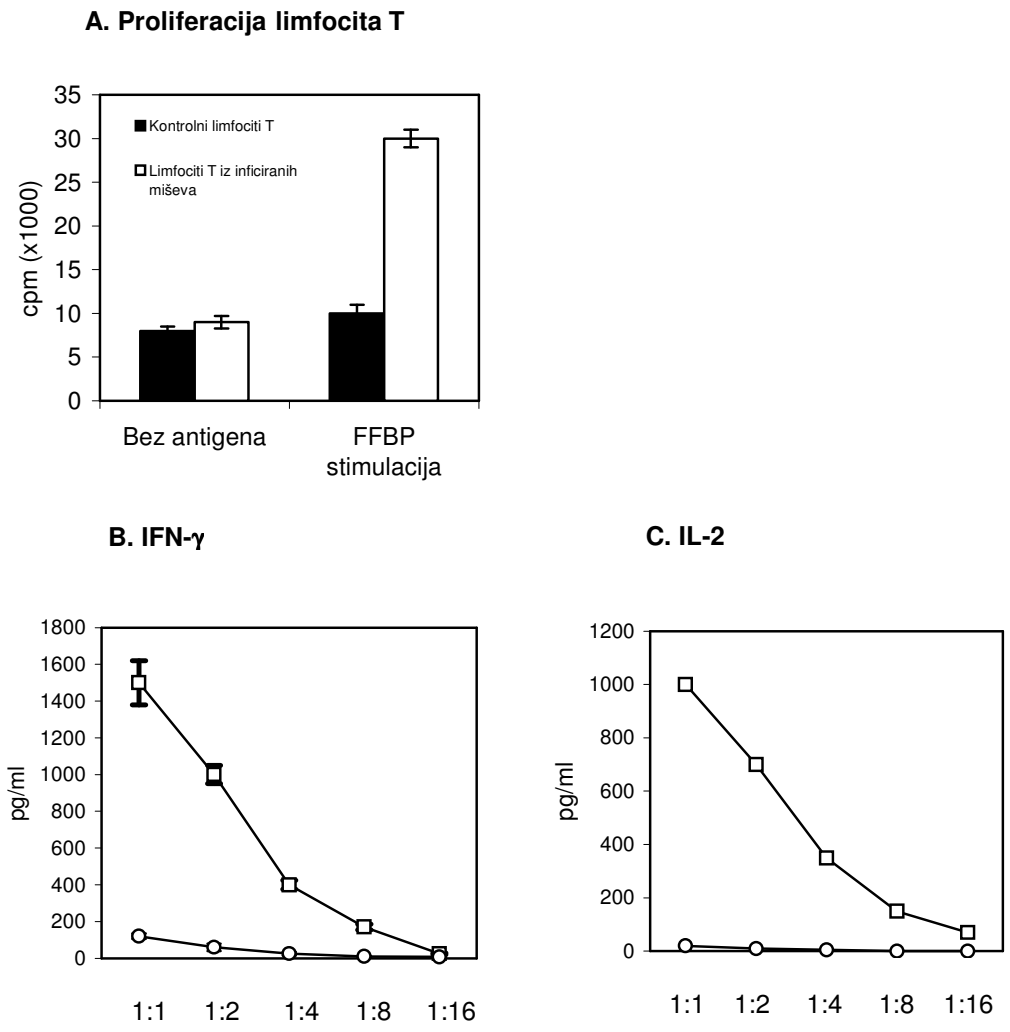


Slika 13A. Kinetika pokazatelja infekcije imunonedostatnih i kontrolnih miševa *BALB/c* u različitim razdobljima nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis*.
A) Broj kolonija. Plućno tkivo je homogenizirano te u razrjeđenju resuspendirano na BG agar pločicama. Broj kolonija označen je na ordinati. Apscisa označava dane nakon izlaganja aerosolu. Miševi BALB/c prikazani su bijelim krugovima. Bijelim trokutima prikazani su miševi *nude*. Bijeli kvadrati predstavljaju miševe *SCID*. * Statistički značajna razlika prisutna je u točkama 21. (nude:BALB/c; $p<0,01$)(*SCID* : BALB/c; $p<0,01$), 28. (*nude* : BALB/c; $p<0,01$) i 35. (*nude* : BALB/c; $p<0,01$). Isprekidana horizontalna crta označava prag osjetljivosti testa.
Slika 13B. Krivulja preživljavanja. Na ordinati je prikazan postotak preživljavanja miševa BALB/c, SCID i nude označenih jednakim simbolima kao na slici 13A.

4.5.3. *In vitro* proliferacija $CD4^+CD8^-$ limfocita T i proizvodnja citokina

U svrhu utvrđivanja izvršne uloge limfocita T u infekciji *B. pertussis* imunodostatnih miševa BALB/c dobiveni su limfociti iz drenažnih traheobronhalnih limfnih čvorova sedam dana nakon izlaganja aerosolu klica. Tako dobivene stanice su *in vitro* inkubirane s ozračenim stanicama slezene i pobuđene umrtvljenim klicama *B. pertussis* fiksiranim u formalinu (FFBP). Ozračene stanice slezene imaju ulogu imunopredočnih stanica (vidi poglavlje Tvari i postupci). Ako se takve stanice karakteriziraju pomoću protočne citometrije one su limfociti T $CD4^+$ $CD8^-$ kao što je prikazano na slici 9. Limfociti T izolirani iz drenažnih limfnih čvorova u nazočnosti imunopredočnih stanica i antigena FFBP proliferiraju u uvjetima *in vitro*. Na slici 14A.

prikazan je standardni proliferacijski pokus u kojem je proliferacija limfocita T mjerena ugradnjom radioaktivnog timidina, a nazočna je samo nakon pobude antigenom FFBP limfocita T dobivenih od miševa sedam dana nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis*. U nadtalogu tako pobuđenih limfocita T dokazana je proizvodnja IFN-γ i IL-2. (Slike 14 B. i C.) Suprotno tome, proizvodnja IL-4 i IL-10 se ne može utvrditi (rezultati nisu prikazani).



Slika 14A. Proliferacija limfocita T nakon stimulacije u uvjetima *in vitro* umrtvljenim klicama *B. pertussis* fiksiranim u formalinu (FFBP). Bijeli stupci označavaju proliferaciju limfocita T dobivenih iz drenažnih limfnih čvorova inficiranih miševa. Crni stupci označavaju proliferaciju kontrolnih limfocita T dobivenih iz limfnih čvorova neinficiranih miševa. Na apscisi je označen način stimulacije. Proliferacija je mjerena ugradnjom [^{3}H] timidina, a označena je na ordinati kao cpm.

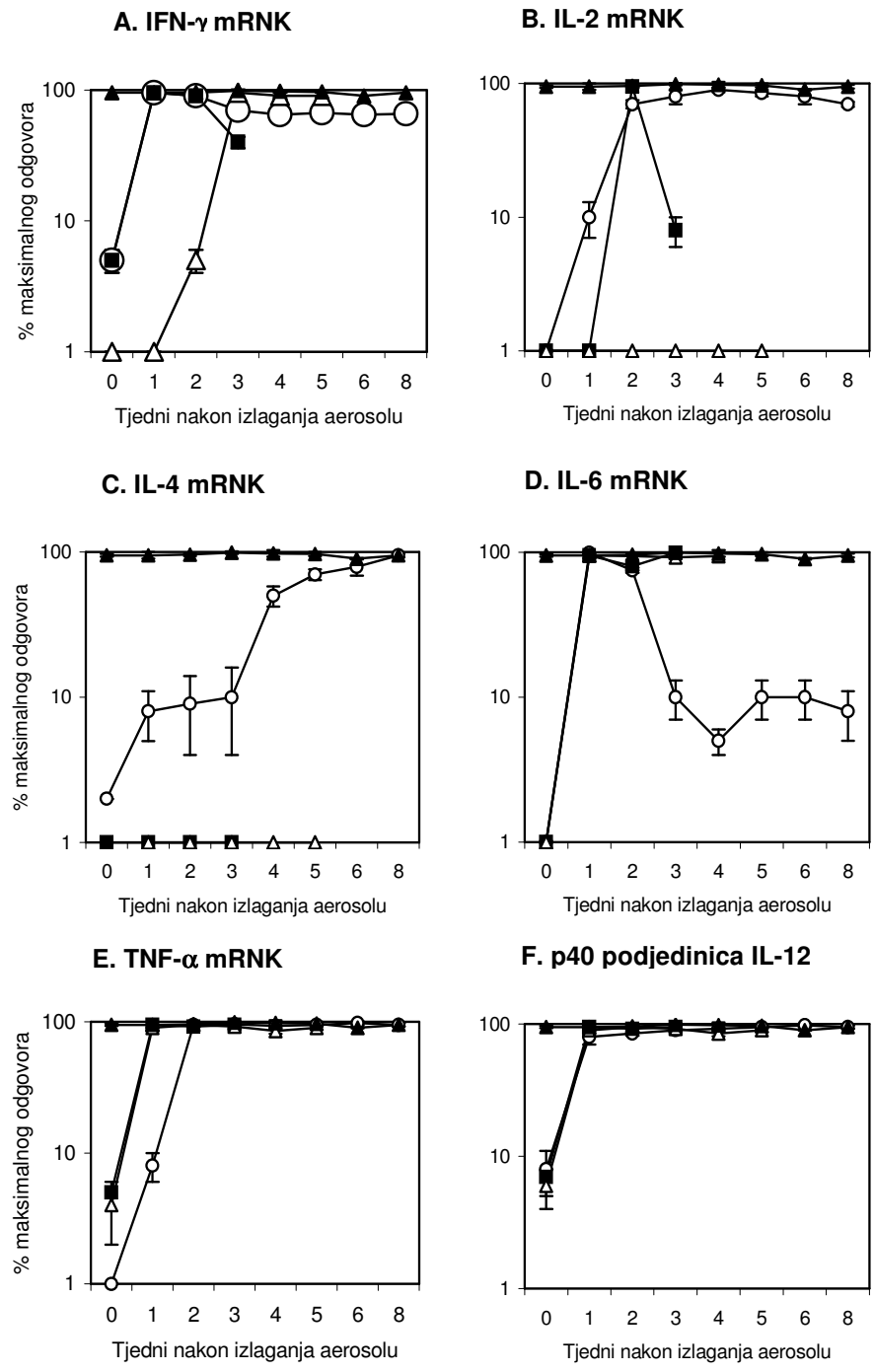
Slike 14B i 14C. Proizvodnja IFN-γ (Slika14B) i IL-2 (Slika 14C) u nadtalogu limfocita T nakon njihove stimulacije u uvjetima *in vitro* umrtvljenim klicama *B. pertussis*

fiksiranim u formalinu (FFBP). Bijeli kvadrati označavaju nadtalog dobiven nakon stimulacije FFBP antigenom limfocita T iz inficiranih životinja. Bijeli krugovi označavaju nadtalog jednako stimuliranih kontrolnih limfocita T. Proizvodnja citokina prikazana je na ordinati, a izražena je u pg/ml. Na apscisi su označena pripadna razrjeđenja nadtaloga.

4.5.4. Usporedba izražaja mRNK citokina u plućnom tkivu miševa *SCID* i atimičnih (*nude)* miševa s imunodostatnim miševima BALB/c

Na slici 13. prikazano je kako miševi *SCID* i atimični *(nude)* ne uspijevaju nadzirati infekciju *B. pertussis* što uzrokuje smrt životinja. Imunonedostatne životinje ugibaju kao rezultat kolonizacije i posljedičnog porasta broja kolonija u plućnom tkivu. Miševi BALB/c pokazuju odgovarajući izražaj mRNK citokina u plućima nakon izlaganja aerosolu klica kao što je prikazano na slici 10. Radi određivanja citokinskog izražaja kod imunonedostatnih miševa uzorkovano je plućno tkivo u različitim razdobljima nakon izlaganja aerosolu. Izražaj citokina je uspoređen s izražajem u normalnih miševa BALB/c. Na slici 15A. prikazan je porast razine mRNK za IFN-γ nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis* koji ostaje na visokoj razini kod miševa BALB/c, a, zanimljivo, jednako tako i u miševa *SCID* i atimičnih *(nude)* sve do trenutka njihovog ugibanja. Poticanje proizvodnje mRNK za IL-2 prisutno je u plućnom tkivu nakon izlaganja aerosolu kod miševa BALB/c, suprotno tomu u plućima miševa *SCID* postoji prolazna proizvodnja mRNK ovog citokina, dok se u atimičnih *(nude)* miševa mRNK za IL-2 ne može utvrditi. (Slika 15B.) Izlaganje aerosolu *B. pertussis* pobuđuje u plućima izražaj mRNK za IL-4 u miševa BALB/c, suprotno tome u plućima miševa *SCID* i *nude* ne može se utvrditi proizvodnja mRNK ovog citokina. (Slika 15C.) mRNK za IL-6 poraste prolazno u plućnom tkivu miševa BALB/c nakon izlaganja aerosolu. Nasuprot tomu, u miševa *SCID* i atimičnih *(nude)* mRNK ovog citokina ostaje na visokoj razini sve do njihovog ugibanja. (Slika 15D.) mRNK za TNF-α i p40 podjedinicu IL-12 se proizvodi u svih vrsta miševa (BALB/c, *SCID* i *nude*). U miševa *SCID* i *nude* visoka razina mRNK za TNF-α, p40 podjedinicu IL-12 i IL-6 nazočna je sve do njihovog ugibanja (Slike 15 od E do F.) Prema tome, imunonedostatni miševi *SCID* i atimični *(nude)* pokazuju drukčiji izražaj mRNK navedenih citokina. Kod njih izostaje indukcija mRNK za IL-4 i djelomično za IL-2, a prevladava izražaj mRNK

upalotvornih citokina (TNF-α, p40 podjedinicu IL-12), te posebice za IL-6 sve do trenutka njihovog ugibanja.



Slika 15. Izražaj mRNK citokina u plućnom tkivu SCID, atimičnih (nude) i kontrolnih miševa BALB/c nakon izlaganja aerosolu klice *B. pertussis*.
Izražaj mRNK citokina prikazan je na ordinati kao postotak maksimalnog odgovora. Apscisa predstavlja tjedne nakon izlaganja aerosolu. U svakom pokusu kao kontrola količine mRNK uporabljen je izražaj mRNK za HRPT (prikazano crnim trokutima u slikama od A do F). Izražaj mRNK citokina prikazan je jednakim simbolima (u slikama od A do F) bijelim krugovima kod kontrolnih miševa BALB/c, crnim kvadratima kod SCID miševa, bijelim trokutima kod nude

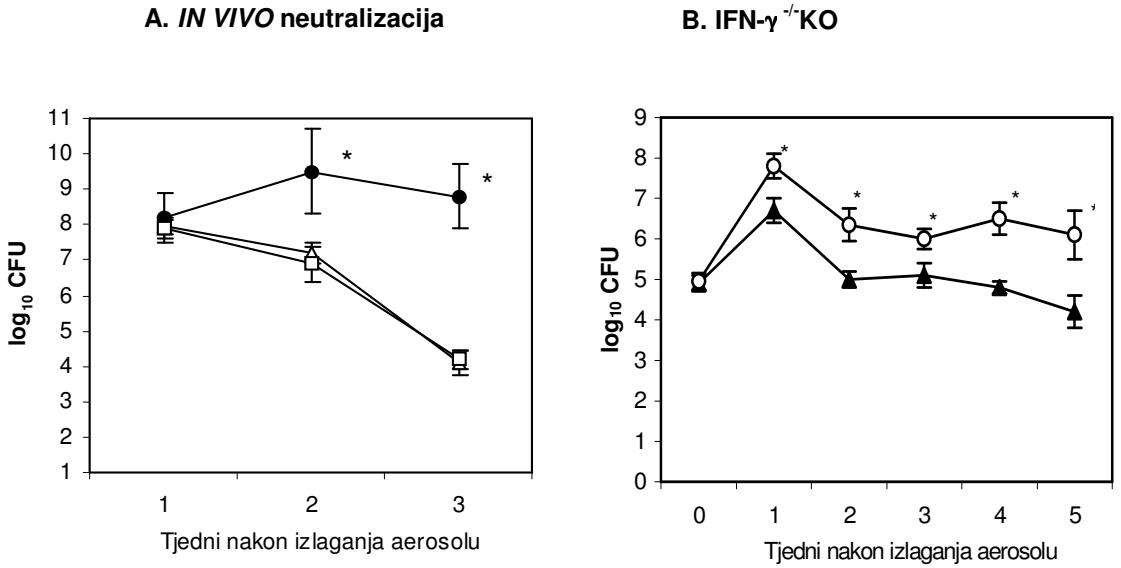
miševa. Slika A. IFN-γ mRNK, Slika B. IL-2 mRNK, Slika C. IL-4 mRNK, Slika D. IL-6 mRNK, Slika E. TNF-α mRNK, Slika F. p40 podjedinicu IL-12 mRNK. U svakoj točki pokusa uporabljene su 3 životinje.

4.5.5. Učinak neutralizacije IFN-γ *in vivo* na tijek infekcije *B. pertussis* kod imunodostatnih miševa BALB/c

Povećani izražaj IFN-γ mRNK u plućnom tkivu miševa nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis* te velika proizvodnja IFN-γ nakon pobude limfocita T u uvjetima *in vitro* ukazuju na moguću ulogu IFN-γ u nadzoru infekcije *B. pertussis*. U svrhu dokazivanja zaštitne uloge IFN-γ u imunosnom odgovoru na klicu u našem modelu je ispitan učinak neutralizacije citokina *in vivo*. Obradom laboratorijskih životinja monoklonskim protutijelima specifičnim za IFN-γ (monoklonsko protutijelo R46A2) moguće je provesti u uvjetima *in vivo* neutralizaciju IFN-γ. Na slici 16A. prikazani su rezultati uzgoja klica iz plućnog tkiva nakon neutralizacije IFN-γ *in vivo.* Miševima BALB/c uštrcan je 1 mg protu-IFN-γ protutijela intraperitonejski, tri i jedan dan prije izlaganja aerosolu *B. pertussis*, te zatim jedanput tjedno nakon izlaganja tijekom sljedeća tri tjedna. Kontrolne životinje nisu dobile ništa, ili su pak dobile jednaku količinu protutijela specifičnih za IL-4 (monoklonsko protutijelo 11B11) u istim vremenima. Ove dvije vrste monoklonskih protutijela su izotipa IgG1, te na taj način predstavljaju dobru izotipnu kontrolu. Miševi BALB/c koji su dobili protu-IFN-γ protutijela pokazuju povećanje broja kolonija klica uzgojenih iz pluća tijekom tri tjedna praćenja infekcije. (Slika 16A.) Nakon dva tjedna ove životinje počinju tek neznatno smanjivati broj klica u plućima za razliku od kontrolnih životinja kod kojih se broj klica smanji za 4 $\log_{10}$CFU. Životinje koje su dobile protu-IL-4 protutijela, ponašale su se kao kontrolne životinje. Prema tomu, neutralizacija IFN-γ smanjuje sposobnost nadzora infekcije kod BALB/c miševa u uvjetima *in vivo*.

S ciljem utvrđivanja fiziološke uloge IFN-γ u nadzoru infekcije *B. pertussis* ispitan je tijek infekcije u miševa u kojih je izbačen gen za ovaj citokin. Važno je napomenuti kako ovi miševi (IFN-γ *knock out,* kratica: *IFN-γ $^{-/-}$KO*) imaju morfološki normalne limfocite T i B i limfoidna tkiva, osim što ne izražavaju IFN-γ. Takve životinje izložene su aerosolu klica *B. pertussis* paralerno s normalnim kontrolnim miševima C57BL6. Na slici 16B. prikazan je uzgoj klica iz pluća kod *IFN-γ $^{-/-}$KO*. Tjedan dana nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis IFN-γ $^{-/-}$KO* životinje imaju

povećan broj kolonija klica uzgojenih u različitim razdobljima iz plućnog tkiva u usporedbi s kontrolnim životinjama.



Slika 16A. Kinetika pokazatelja infekcije *B. pertussis* nakon neutralizacije *in vivo* IL-4 ili IFN-γ (Slika 16A.) i u životinja s izbačenim genom za IFN-γ (Slika 16B).

Slika 16A. Kinetika odstranjivanja klica iz pluća nakon neutralizacije citokina *in vivo*. Crni krugovi predstavljaju broj kolonija *B. pertussis* uzgojenih iz plućnog tkiva miševa BALB/c obrađenih monoklonskim protutijelima specifičnim za IFN-γ; bijeli trokuti predstavljaju broj kolonija u miševa obrađenih s protu-IL-4 protutijelima, bijeli kvadrati predstavljaju kontrolne životinje. Na ordinati je prikazana logaritamska vrijednost broja kolonija. Apscisa označava tjedne nakon izlaganja aerosolu.

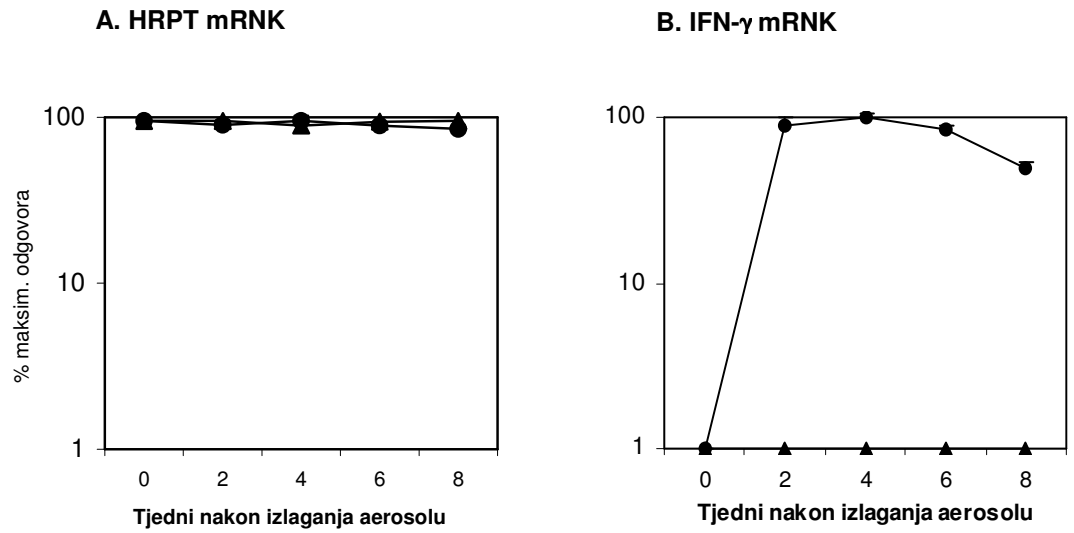
* Statistički značajna razlika određena *Studentovim t testom* postoji u 2. ($p<0,01$) i 3. ($p<0,01$) tjednu između životinja s neutraliziranim IFN-γ i kontrolnih životinja. U svakoj točki pokusa uporabljene su 3 životinje.

Slika 16B. Kinetika odstranjivanja klica iz pluća u IFN-$\gamma^{-/-}$KO. Bijeli krugovi predstavljaju broj kolonija izoliranih iz pluća miševa s izbačenim genom za IFN-γ, crni trokuti predstavljaju broj kolonija u kontrolnih miševa C57BL6.

* Statistički značajna razlika određena *Studentovim t testom* postoji u 1. ($p<0,01$), 2. ($p<0,01$), 3. ($p<0,01$), 4. ($p<0,01$) i 5. ($p<0,01$) tjednu između IFN-$\gamma^{-/-}$KO i kontrolnih životinja. U svakoj točki pokusa uporabljene su 3 životinje.

4.5.6. Izražaj mRNK za IFN-γ u plućnom tkivu miševa C57BL6 i u miševa sa izbačenim genom za IFN-γ nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis*

U svrhu određivanja uloge IFN-γ u nadzoru infekcije *B. pertussis*, ispitan je izražaj mRNK za IFN-γ u plućima miševa C57BL6 te u miševa s izbačenim genom za IFN-γ. Nakon izlaganja aerosolu komadić plućnog tkiva je uporabljen za izolaciju mRNK za IFN-γ, a preostali dio tkiva je uporabljen za određivanje kolonizacije dišnog epitela. (Slika 16B.) Na slici 17B. prikazano je kako nakon izlaganja aerosolu klica *B. pertussis* u plućima miševa C57BL6 dolazi do pobude mRNK za IFN-γ, suprotno tome kao što se može i očekivati ne postoji izražaj mRNK ovog citokina u životinja koje imaju uspješno izbačen gen za IFN-γ . Za usporedbu adekvatnosti mjerenja uporabljen je izražaj mRNK za HRPT. (Slika 17A.)



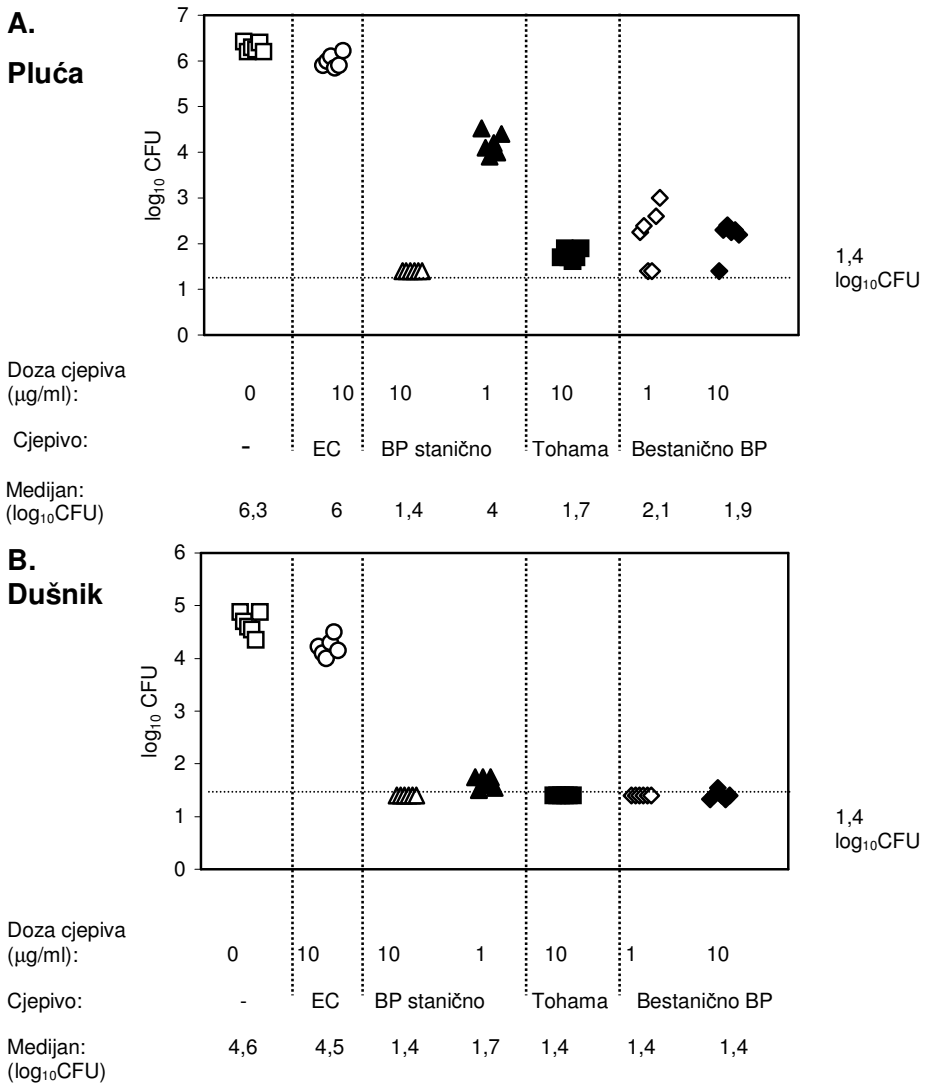
Slika 17. Izražaj mRNK za IFN-γ i HRPT u miševa C57BL6 i u miševa s izbačenim genom za IFN-γ nakon izlaganja aerosolu klica *B. pertussis*.
Slika 17A. Izražaj mRNK za HRPT u miševa C57BL6 označen je crnim krugovima, dok crni trokuti predstavljaju izražaj kod životinja IFN-$\gamma^{-/-}$KO. Slika 17B. Izražaj mRNK za IFN-γ u miševa C57BL6 označena je crnim krugovima, dok crni trokuti predstavljaju izražaj u životinja IFN-$\gamma^{-/-}$KO. Ordinata predstavlja postotak makismalnog odgovora. Apscisa predstavlja tjedne nakon izlaganja aerosolu.

4.6. Mehanizmi imunizacije

4.6.1. Zaštita miševa BALB/c u aerosolnom modelu infekcije *B. pertussis* nakon intranazalne imunizacije različitim antigenskim pripravcima

U svrhu pokretanja mehanizama zaštitne imunosti nakon imunizacije miševa BALB/c uporabljena su dva oblika intranazalnih sluzničkih cjepiva za *B. pertussis*. Jedan oblik je stanično cjepivo, a drugi bestanično. Stanično cjepivo je slično standardnom staničnom cjepivu za *B. pertussis* sastavljenom od umrtvljenih klica *B. pertussis* fiksiranih u formalinu. Drugi oblik cjepiva čini bestanično cjepivo sastavljeno od pojedinačnih antigenskih sastavnica *B. pertussis* uklopljenih u biološki razgradljive mikročestice sastavljene od jednakih dijelova polimeriziranog laktida i glikolida (DL-PLG). U slici 18. prikazan je broj kolonija *B. pertussis* uzgojenih iz dišnog sustava neimuniziranih ili intranazalno imuniziranih životinja s različitim oblicima cjepiva sedam dana nakon njhovog izlaganja aerosolu klica *B. pertussis*. U ovom pokusu miševi BALB/c su intranazalnim putem imunizirani različitim oblicima cjepiva. Izlaganje u pokusnom modelu infekcije soju 18323 *B. pertussis* je učinjeno 30 dana nakon zadnje doze cjepiva. Jedna skupina miševa je imunizirana staničnim cjepivom za *B. pertussis* napravljenim od soja 18323 (antigenske koncentracije od 1 ili 10 μg/ml), druga je skupina imunizirana staničnim cjepivom *B. pertussis* napravljenim od soja Tohama I (antigenske koncentracije 10 μg/ml), treća skupina je dobila bestanično cjepivo *B. pertussis (*antigenske koncentracije 1 ili 10 μg/ml). Osim ovih oblika imunizacije, u svrhu testiranja uloge specifičnosti cjepiva za *B. pertussis* testiran je i zaštitni učinak cijepljenja neovisnom klicom kao što je *E. coli.* Sedam dana nakon izlaganja aerosolu određivan je broj kolonija uzgojenih iz tkiva pluća i dušnika. Na slici 18A. i B. prikazano je kako neimunizirani miševi imaju maksimalni broj uzgojenih kolonija u tkivu pluća i dušnika. Nasuprot tome, miševi koji su imunizirani s 10 μg/m staničnog cjepiva potpuno odstranjuju klicu iz plućnog i trahealnog tkiva. Manja količina (1μg/ml) istog antigena nema jednak zaštitni učinak u plućima. Prema tomu, broj kolonija uzgojenih iz dišnog tkiva nakon imunizacije

staničnim cjepivom *B. pertussis* ovisan je o antigenskoj dozi. U svrhu određivanja specifičnosti zaštite ovim antigenom, ispitana je zaštitna sposobnost staničnih cjepiva ostalih klica. Iako je u ovom pokusu soj *B. pertussis 18323* upotrebljen za stvaranje aerosola, kod imunizacije staničnim cjepivom napravljenim od drugog soja *B. pertussis* Tohama I gotovo jednaki nivo zaštite se postiže kao i kod imunizacije sojem 18323. (Slike 18A. i 18B.) Prema tomu, između cjepiva napravljenih od ova dva soja klica *B. pertussis* ne postoji razlika u stupnju postignute zaštite u aerosolnom modelu ove infekcije. Nasuprot tomu, ukoliko se miševi imuniziraju staničnim cjepivom napravljenim od *E. coli* tada izostaje zaštitni učinak ovog oblika cjepiva. (Slike 18A. i 18B.) Ukoliko se bestanično cjepivo *B. pertussis* uporabi za intranazalnu imunizaciju miševa BALB/c, postiže se znatno smanjenje broja kolonija klica uzgojenih iz pluća i gotovo potpuno smanjenje broja kolonija iz dušnika imuniziranih životinja. (Slike 18A. i 18B.) Prema tomu, i jedan i drugi oblik cjepiva, i to stanično u većoj mjeri a bestanično cjepivo u manjoj mjeri naročito u plućima, imaju zaštitni učinak u pokusnom modelu infekcije *B. pertussis* što se ogleda u smanjenju broja uzgojenih klica u dišnom tkivu izloženih životinja.



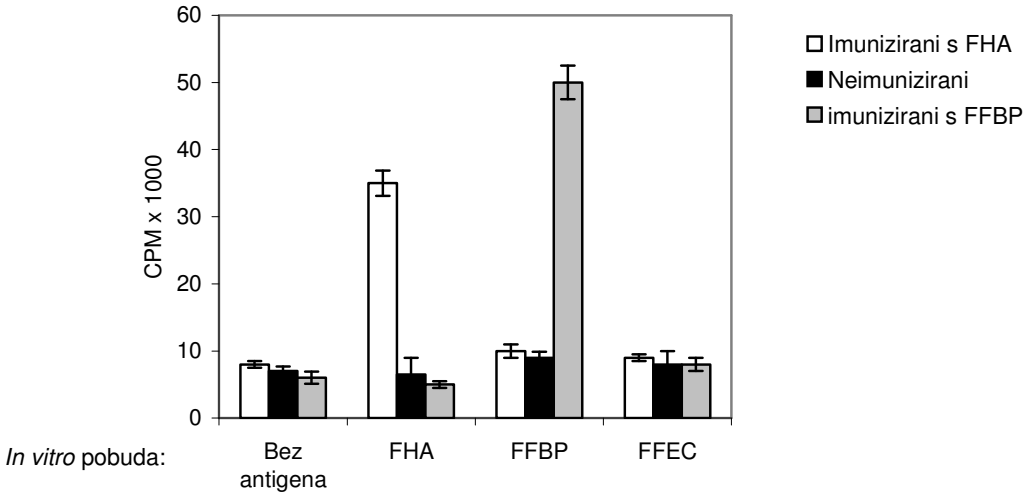
Slika 18. Broj kolonija *B. pertussis* uzgojenih iz pluća (Slika 18A.) i dušnika (Slika 18B.) miševa BALB/c, neimuniziranih i imuniziranih intranazalnim putem različitim pripravcima cjepiva.

Na ordinati je prikazan broj kolonija klica uzgojenih iz pluća (log_{10}CFU) (Slika 18A.) i dušnika (Slika 18B.) miševa BALB/c 7 dana nakon izlaganja klicama *B. pertussis*. Različiti simboli predstavljaju pojedinačne životinje. Bijelim kvadratima označene su neimunizirane životinje, bijeli krugovi označavaju životinje imunizirane staničnim cjepivom *E. coli* (EC), trokuti različitih boja označavaju životinje imunizirane različitim dozama staničnog cjepiva *B. pertussis* napravljenog od soja 18323, crni kvadrati označavaju životinje imunizirane staničnim cjepivom *B. pertussis* napravljenog od soja *Tohama I*, rombovi različitih boja označavaju životinje imunizirane različitim dozama bestaničnog cjepiva *B. pertussis*. Cjepivo i doza cijepljenja označeni su na apscisi. Horizontalne isprekidane crte označavaju prag osjetljivosti testa (1,4 log_{10}CFU). Prema Wilcoxonovoj raščlambi postoji statistički značajna razlika medijana broja uzgojenih kolonija (prikazani na apscisi) između skupina životinja

neimuniziranih i imuniziranih staničnim cjepivom *B. pertussis* sojeva *18323* i *Tohama I* odnosno bestaničnim cjepivom u svim ispitivanim dozama ($p<0,05$). Razlika medijana broja kolonija ne postoji između kontrolnih i onih imuniziranih *E. coli*.

4.6.2. Uloga limfocita T u zaštitnoj imunosti pri cijepljenju različitim pripravcima cjepiva *B. pertussis*

Limfociti T imaju središnju ulogu u nadzoru imunosnog odgovora. *B. pertussis* izaziva pobudu limfocita T, odnosno specifični limfociti T mogu se dokazati nakon imunizacije ili infekcije *B. pertussis*. U svrhu istraživanja postojanja odgovora limfocita T specifičnog za antigene *B. pertussis* nakon intranazalne imunizacije staničnim cjepivom (u antigenskoj koncentraciji od 30 μg/ml) i bestaničnim cjepivom (u antigenskoj koncentraciji od 10 μg/ml) za *B. pertussis*. Pročišćeni limfociti T dobiveni iz traheobronhalnih limfnih čvorova tako imuniziranih miševa C3H/HeJ uporabljeni su u proliferacijskom pokusu. Miševi su imunizirani intranazalno staničnim i bestaničnim cjepivom *B. pertussis* (Vidi poglavlje Tvari i postupci). Tako dobiveni limfociti T su inkubirani s ozračenim imunopredočnim stanicama slezene i odgovarajućim pripravcima cjepiva. Limfociti T dobiveni iz limfnih čvorova miševa imuniziranih staničnim cjepivom pokazuju proliferaciju samo kada se pobuđuju istim antigenom uporabljenim pri imunizaciji, kako je prikazano u slici 19. Jednako tako, limfociti T dobiveni od životinja imuniziranih bestaničnim cjepivom, proliferiraju samo s istim antigenom koji je uporabljen pri pripravci ovog oblika cjepiva. Nasuprot tomu, proliferacija se ne može dobiti ako se tako pripremljeni limfociti T pobuđuju irelevantnim antigenom kao što je stanično cjepivo pripremljeno od *E. coli,* ili pak samo s imunopredočnim stanicama bez dodatka antigena. (Slika 19.)

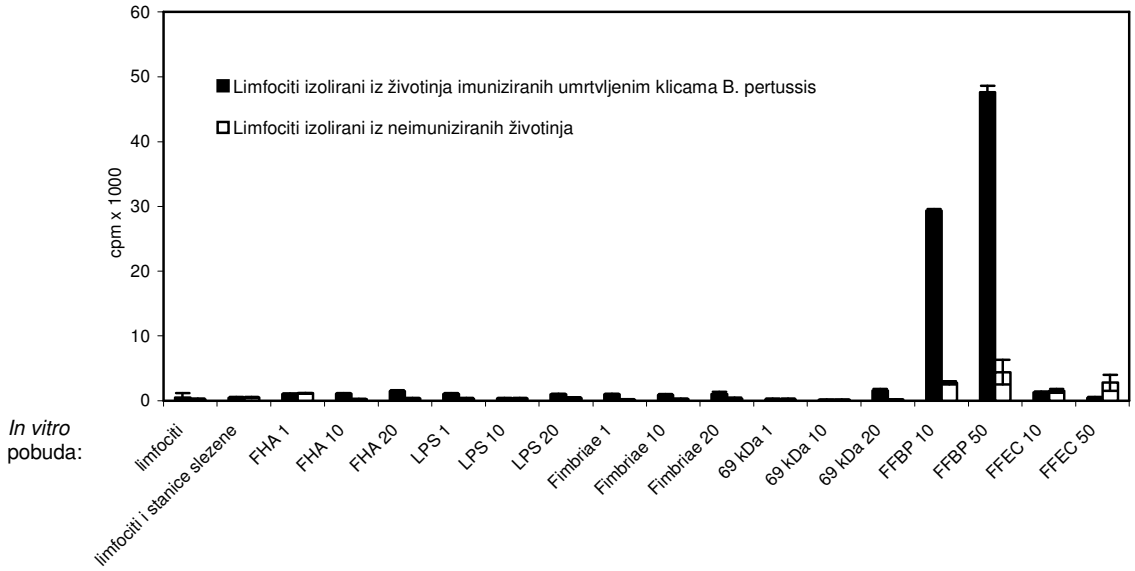


Slika 19. Proliferacija limfocita T iz drenažnih traheobronhalnih limfnih čvorova C3H/HeJ miševa imuniziranih staničnim ili bestaničnim cjepivom *B. pertussis* nakon stimulacije različitim antigenima u uvjetima *in vitro.*
Stanice drenažnih traheobronhalnih limfnih čvorova (2x10 ^{5} stanica/zdenac) dobivenih iz različito imuniziranih odnosno neimuniziranih miševa C3H/HeJ inkubirane su s imunopredočnim stanicama (4x10 ^{5} stanica/zdenac) i različitim antigenima (FHA, *B. pertussis* u antigenskoj dozi od 10 μg/ml), u formalinu fikisirana *B. pertussis* (FFBP, u antigenskoj dozi od 30 μg/ml) ili u formalinu fiksirana *E. coli* (FFEC, u antigenskoj dozi od 30 μg/ml) ili bez antigena. Proliferacija je određena na temelju ugradnje [^{3}H] timidina (CPM). Prosječne vrijednosti proliferacije ± SD označene su bijelim stupcima za stanice dobivene iz miševa imuniziranih bestaničnim cjepivom (FHA), crni stupci predstavljaju proliferaciju neimuniziranih stanica, dok sivi stupci predstavljaju proliferaciju stanica dobivenih nakon imunizacije staničnim cjepivom *B. pertussis* (FFBP).

4.6.3. Određivanje specifičnog antigena odgovornog za proliferaciju limfocita T nakon imunizacije staničnim cjepivom *B. pertussis*

Stanično cjepivo *B. pertussis* sadrži čitav niz antigenskih sastavnica. U pokusu prikazanom na slici 19. pokazano je kako se nakon imunizacije staničnim cjepivom postiže proliferacija specifičnih limfocita T. Osim toga, u pokusu izlaganja aerosolu *B. pertussis* prikazanom na slici 20., pokazano je kako ovaj oblik imunizacije dovodi do potpunog uklanjanja klice iz dišnog sustava. U svrhu određivanja moguće dominantne

antigenske sastavnice staničnog cjepiva testirana je proliferacija limfocita T dobivenih iz drenažnih traheobronhalnih limfnih čvorova nakon njihove pobude s poznatim antigenskim sastavnicama klice u uvjetima *in vitro*. Miševi BALB/c su u razmaku od 30 dana intranazalno imunizirani s 30 μg/ml staničnog cjepiva. Traheobronhalni limfni čvorovi su izolirani 30 dana nakon zadnje imunizacije. Pročišćeni limfociti T sastavljeni od 97% $CD4^+$ $CD8^-$stanica, dobiveni su postupkom odvajanja na staklenoj vuni. Ovakva populacija stanica inkubirana je u uvjetima *in vitro* s imunopredočnim stanicama i antigenskim sastavnicama *B. pertussis,* koje su dostupne u pročišćenom obliku, te kontrolnim antigenom koji predstavlja u formalinu fiksirana *E. coli*. Proliferacija je izmjerena na temelju ugradnje radioaktivnog timidina. Kako je prikazano na slici 20. limfociti T dobiveni od imuniziranih životinja proliferiraju samo sa cijelom klicom *B. pertussis* fiksiranom u formalinu (FFBP). Suprotno tomu, niti jedna uporabljena antigenska sastavnica klice ili kontrolna klica u formalinu fiksirana *E. coli* (FFEC) ne pobuđuje proliferaciju limfocita T.

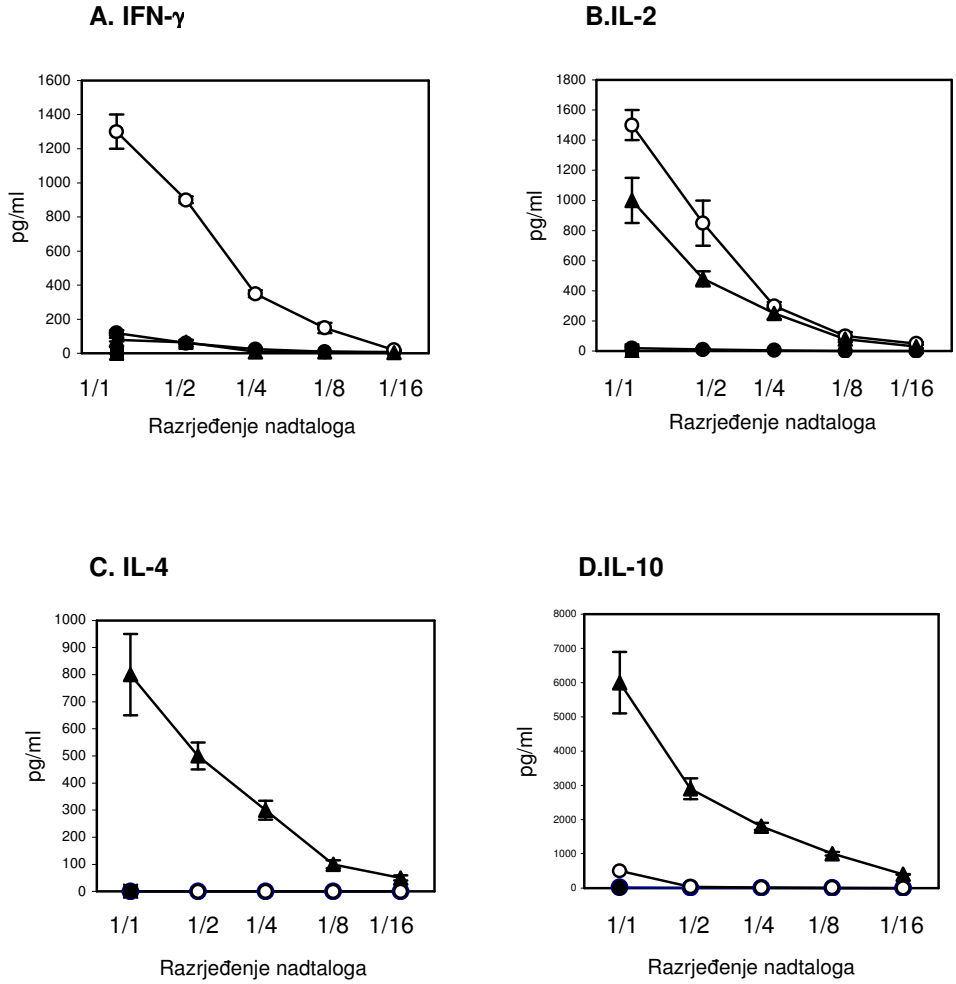


Slika 20. Antigen-specifična proliferacija limfocita T dobivenih iz traheobronhalnih limfnih čvorova miševa BALB/c imuniziranih umrtvljenim klicama *B. pertussis* fiksiranim u formalinu (FFBP).
T-limfociti (2x10 ^{5} stanica/zdenac) dobiveni iz limfnih čvorova imuniziranih i neimuniziranih miševa inkubirani su s imunopredočnim stanicama i odgovarajućim antigenima u različitim

koncentracijama. Vrsta antigena i koncentracija u μg/ml prikazane su na apscisi. Proliferacija je određena mjerenjem ugradnje [^{3}H] timidina, a prikazana je kao cpm na ordinati. Ozračene stanice slezene uporabljene su kao imunopredočne stanice (4x10 ^{5} stanica/zdenac). Prosječna proliferacija ± sd limfocita T izoliranih od imuniziranih životinja označena je crnim stupcima, a bijeli stupci predstavljaju proliferaciju limfocita T dobivenih od neimuniziranih životinja. Pertaktin adhezin *B. pertussis* označen je kao 69 kDa. Umrtvljene klice *E. coli* fiksirane u formalinu označene su kao FFEC.

4.6.4. Proizvodnja citokina nakon pobude u uvjetima *in vitro* limfocita T dobivenih iz drenažnih traheobronhalnih limfnih čvorova različito imuniziranih miševa BALB/c

Proučena je proizvodnja citokina u svrhu utvrđivanja molekulskih mehanizama zaštitne imunosti kod intranazalne imunizacije različitim cjepivima *B. pertussis*. Stanice limfnih čvorova dobivene nakon imunizacije staničnim ili bestaničnim cjepivom su u uvjetima *in vitro* pobuđene odgovarajućim antigenom (istim antigenom uporabljenim za imunizaciju). Nakon ponavljanja antigenske pobude u uvjetima *in vitro* dobiju se $CD4^+$ limfocitne T-linije u čijem nadtalogu je određivana proizvodnja odgovarajućih citokina. Na slici 21A. pokazano je da limfociti T dobiveni nakon imunizacije staničnim pripravkom cjepiva proizvode IFN-γ i IL-2, dok se proizvodnja IL-4 i IL-10 ne može utvrditi. Za razliku od toga, limfociti T dobiveni od miševa imuniziranih bestaničnim cjepivom proizvode IL-4, IL-10 i IL-2, ali ne i IFN-γ. (Slika 21B do D.) Prema tomu, različiti pripravci cjepiva za *B. pertussis* dovode u uvjetima *in vitro* do različite proizvodnje citokina, kod imunizacije staničnim cjepivom dominira Th1 tip citokina, dok je kod bestaničnog cjepiva dominantan tip Th2 citokina.



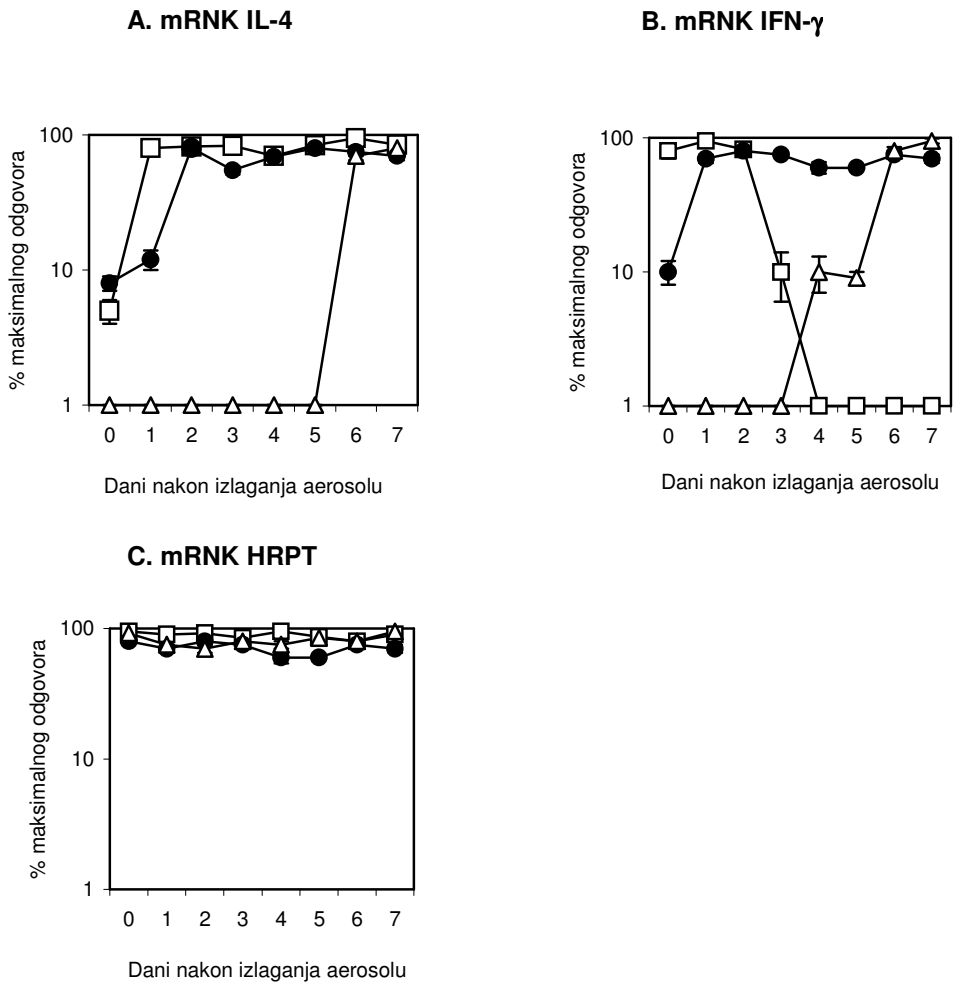
Slika 21. Proizvodnja citokina nakon pobude u uvjetima *in vitro* limfocita T dobivenih iz drenažnih traheobronhalnih limfnih čvorova miševa BALB/c imuniziranih staničnim ili bestaničnim cjepivom *B. pertussis*.

Limfociti T (2x10 ^{5} stanica/zdenac) pobuđeni su odgovarajućim antigenom u uvjetima *in vitro* (FFBP ili FHA) u nazočnosti imunopredočnih stanica (ozračene stanice slezene (4x10^{5} stanica/zdenac). Slika 21A. proizvodnja IFN-γ. Slika 21B. proizvodnja IL-2. Slika 21C. proizvodnja IL-4. Slika 21D. proizvodnja IL-10. Bijelim krugovima su označeni limfociti T dobiveni nakon imunizacije staničnim cjepivom. Crni trokuti označavaju limfocite T dobivene nakon imunizacije bestaničnim cjepivom. Crni krugovi predstavljaju kontrolne limfocite T. Oznake odgovarajućih limfocita T na svim slikama su jednake.

4.6.5. Istraživanje izražaja mRNK za IL-4 i IFN-γ u plućnom tkivu miševa BALB/c imuniziranih staničnim ili bestaničnim cjepivom nakon izlaganja aerosolu klica *B. pertussis*

U svrhu istraživanja važnosti IL-4 i IFN-γ u uvjetima *in vivo* nakon imunizacije i izlaganja klicama u aerosolnom modelu infekcije *B. pertussis* određivana je razina mRNK ovih citokina u plućnom tkivu. U pokusu prikazanom na slici 22. miševi BALB/c su intranazalno imunizirani bilo staničnim ili bestaničnim cjepivom *B. pertussis*, kako je prije opisano. Trideset dana nakon zadnje imunizacije miševi su izloženi u aerosolnom modelu infekcije *B. pertussis.* Neposredno prije izlaganja dio imuniziranih i neimuniziranih miševa je žrtvovan radi određivanja u plućima razine mRNK za citokine IL-4 i IFN-γ. Nakon izlaganja aerosolu i nastanka infekcije svakodnevno kroz 7 dana uziman je uzorak plućnog tkiva radi određivanja razine mRNK navedenih citokina. Imunizacija staničnim i bestaničnim oblikom cjepiva potiče izražaj mRNK za IL-4 u plućima BALB/c miševa u usporedbi s neimuniziranim miševima i prije aerosolne infekcije. (Slika 22A.) Prvog dana nakon aerosolne infekcije javlja se maksimalna proizvodnja mRNK za IL-4 kod miševa imuniziranih bestaničnim cjepivom, miševi imunizirani staničnim cjepivom imaju maksimalni izražaj 2. dana infekcije. Maksimalni izražaj mRNK za IL-4 kod jednog i drugog oblika cijepljenja ostaje do kraja pokusa. (Slika 22A.) Suprotno tomu, izražaj mRNK za IL-4 u plućnom tkivu neimuniziranih i inficiranih životinja javlja se u 5. danu od njihovog izlaganja aerosolu klica *B. pertussis*. Znatni izražaj mRNK za IFN-γ nazočan je u plućnom tkivu kod miševa imuniziranih s bestaničnim cjepivom i u trenutku prije izlaganja klicama u aerosolnom modelu infekcije *B. pertussis*. Na slici 22B. prikazano je kako nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis* u plućima dolazi do smanjenja bestaničnim cjepivom potaknutog izražaja mRNK za IFN-γ. Prema tomu, sama infekcija nastala izlaganjem aerosolu klica *B. pertussis* kod ovako imuniziranih miševa dovodi do smanjenja razine mRNK za IFN-γ. Suprotno tomu, takvu kinetiku izražaja mRNK za IFN-γ ne nalazimo kod imunizacije staničnim cjepivom. Na slici 22B. vidljivo je da se maksimalna razina mRNK za IFN-γ javlja 1. dana nakon izlaganja aerosolu i ostaje do kraja pokusa. Neimunizirane životinje maksimalnu razinu mRNK za IFN-γ

imaju 6. i 7. dana. U svim točkama pokusa razina mRNK za HRPT je približno jednaka. (Slika 22C.) Prema tomu, vrsta cjepiva dovodi do različite kinetike regulacije mRNK u plućnom tkivu inficiranih i imuniziranih životinja. Ipak je važno naglasiti, kako je izražaj mRNK citokina u plućnom tkivu samo donekle u korelaciji s proizvodnjom citokina u uvjetima *in vitro* prikazanima na slici 21.



Slika 22. Tkivni izražaj mRNK za IL-4 i IFN-γ u miševa BALB/c imuniziranih staničnim ili bestaničnim cjepivom *B. pertussis* i neimuniziranih miševa prije i nakon izlaganja aerosolu.

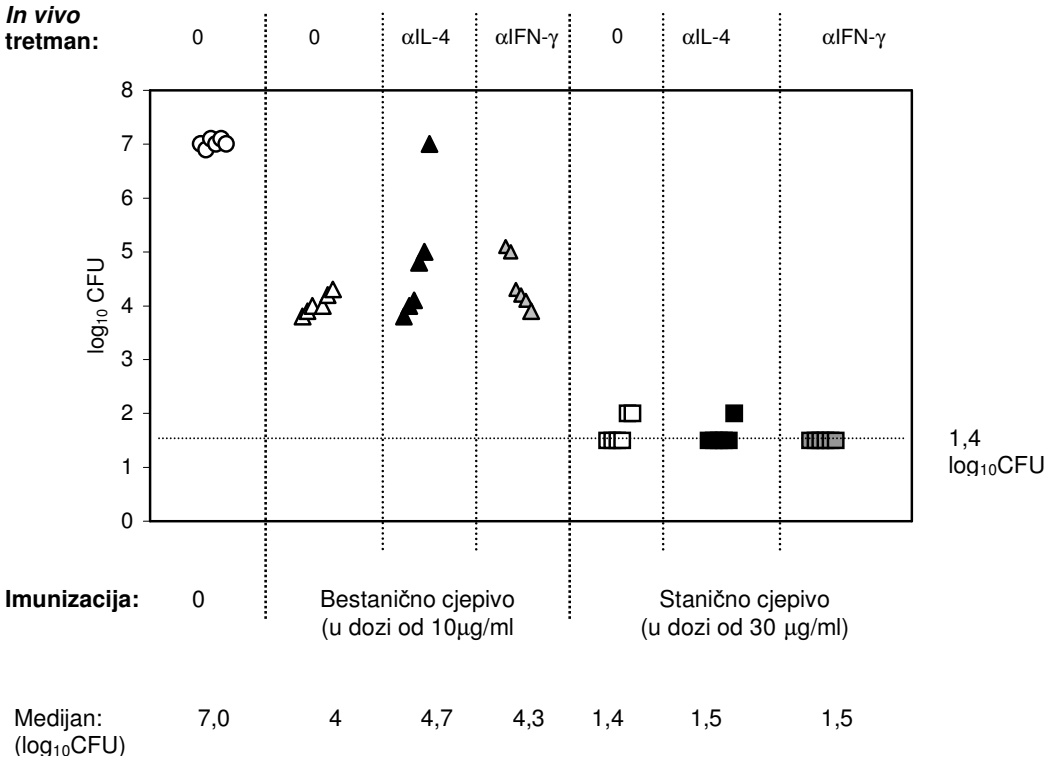
Miševi BALB/c imunizirani su staničnim (30 μg/ml) ili bestaničnim (10 μg/ml) cjepivom *B. pertussis*. Izražaj mRNK u plućnom tkivu određivan je prije izlaganja aerosolu (točka 0 na apscisi) i u danima nakon izlganja klicama *B. pertussis* (od 1. do 7. dana). Ordinata predstavlja postotak maksimalnog odgovora mRNK pojedinih citokina. Slika 22A. pokazuje razinu mRNK za IL-4; bijeli kvadrati označavaju miševe imunizirane bestaničnim cjepivom;

crni krugovi označavaju miševe imunizirane staničnim cjepivom; trokuti označavaju neimunizirane miševe. Jednake oznake odnose se na IFN-γ na slici 22B. te za HRPT na slici 22C. Svaka točka pokusa je srednja vrijednost mjerenja triju životinja.

4.6.6. Učinak *in vivo* neutralizacije IFN-γ i IL-4 na tijek infekcije *B. pertussis* kod BALB/c miševa imuniziranih staničnim ili bestaničnim cjepivom

Na slici 18. prikazano je da u mišjem aerosolnom modelu infekcije *B. pertussis* intranazalno imunizirani (bestaničnim ili staničnim cjepivom) miševi BALB/c uspješno zaustavljaju kolonizaciju dišnog sustava ovom klicom. Limfociti T $CD4^+$ dobiveni od tako imuniziranih životinja pokazuju različitu proizvodnju citokina nakon pobude odgovarajućim antigenom u uvjetima *in vitro*. (Slika 21.) Jednako tako, u uvjetima *in vivo*, plućno tkivo dobiveno nakon imunizacije i izlaganja aerosolu kilca *B. pertussis* miševa BALB/c ima različiti izražaj mRNK za IL-4 i IFN-γ. (Slika 22.) U svrhu testiranja moguće uloge navedenih citokina u uvjetima *in vivo* učinjena je njihova neutralizacija *in vivo* monoklonskim protutijelima specifičnim za IFN-γ i IL-4. Miševi BALB/c su intranazalno imunizirani staničnim ili bestaničnim cjepivom. U plućnom tkivu miševa određivan je broj kolonija klica uzgojenih iz dišnog sustava sedam dana nakon njihovog izlaganja aerosolu klica *B. pertussis.* Skupine miševa u kojih je učinjena neutralizacija *in vivo* dobivali su tri i jedan dan prije, te tri dana poslije izlaganja aerosolu 1 mg odgovarajućih monoklonskih protutijela.

Na slici 23. prikazano je kako miševi imunizirani bestaničnim cjepivom pokazuju smanjenje broja kolonija uzgojenih klica iz plućnog tkiva u usporedbi s neimuniziranim životinjama. Na istoj slici vidljivo je kako neutralizacija IL-4 dovodi kod pojedinih životinja imuniziranih bestaničnim cjepivom do potiskivanja učinka imunizacije, suprotno tomu neutralizacija IFN-γ nema nikakvog učinka na broj kolonija klica *B. pertussis* uzgojenih iz plućnog tkiva. Međutim, navedene razlike između pojedinih tretmana nisu statistički značajne. Suprotno tomu, neutralizacija ovih citokina kod imunizacija staničnim cjepivom ne pokazuje potiskujući učinak na izvanredno veliku razinu zaštite kod ovakvog oblika imunizacije. U ovom pokusu je vidljivo kako je učinak neutralizacije IL-4 i IFN-γ *in vivo* tek djelomično uspješan kod imuniziranih životinja u usporedbi s ranijim pokusom neutralizacije kod neimuniziranih životinja. (Slika 16A.)



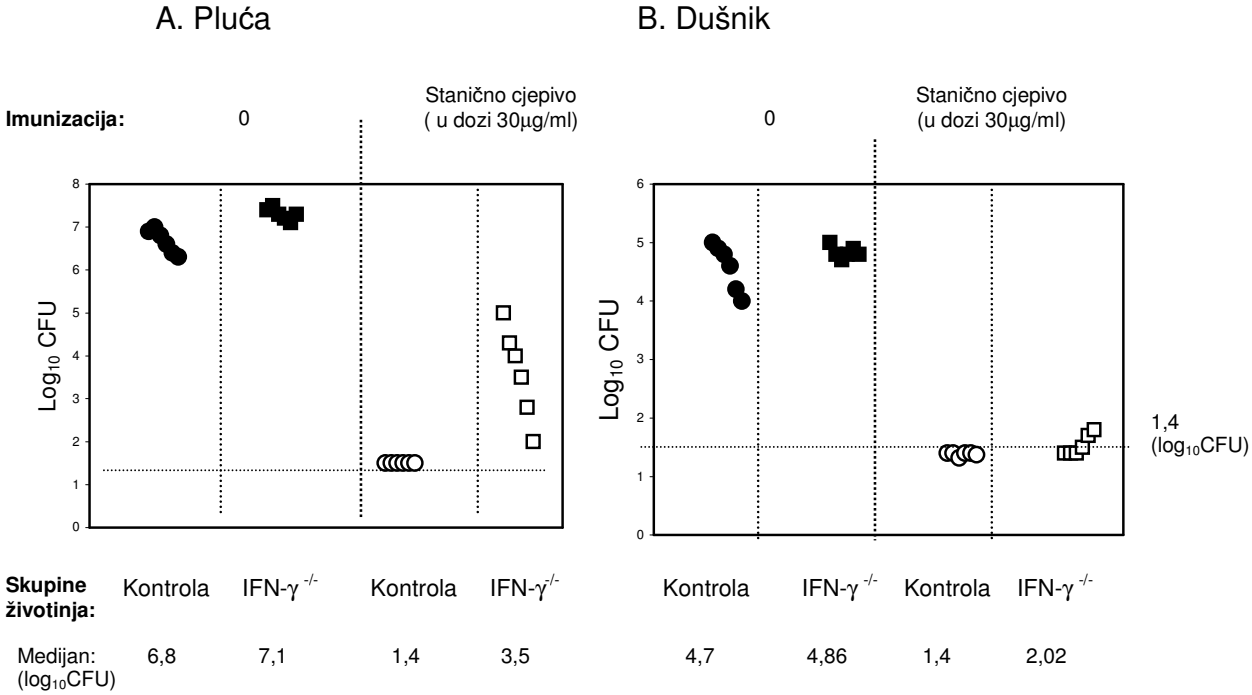
Slika 23. Broj kolonija klica uzgojenih iz plućnog tkiva nakon neutralizacije IL-4 ili IFN-γ monoklonskim protutijelima kod miševa BALB/c imuniziranih staničnim ili bestaničnim cjepivom *B. pertussis.*

Na ordinati je prikazan broj kolonija klica (log_{10}CFU) uzgojenih iz plućnog tkiva miševa dobivenog sedam dana nakon njihovog izlaganja aerosolu klica *B. pertussis*. Na apscisi je prikazan način imunizacije. Oznake predstavljaju pojedinačne životinje. Bijeli krugovi predstavljaju broj kolonija neimuniziranih kontrolnih životinja. Trokuti različitih boja predstavljaju životinje imunizirane bestaničnim cjepivom: bijeli trokuti predstavljaju imunizirane i netretirane životinje, crni trokuti predstavljaju životinje tretirane protu-IL-4 protutijelima, sivi trokuti predstavljaju životinje tretirane protu-IFN-γ protutijelima. Kvadrati različitih boja predstavljaju životinje imunizirane staničnim cjepivom: bijeli kvadrati netretirane životinje, crni kvadrati životinje tretirane protu-IL-4 protutijelima, sivi kvadrati životinje tretirane protu-IFN-γ protutijelima. Horizontalna isprekidana crta označava prag osjetljivosti testa (1,4 log_{10}CFU).

Prema Wilcoxonovoj raščlambi ne postoji statistički značajna razlika broja kolonija uzgojenih klica između tretiranih i netretiranih imuniziranih životinja. Statistički značajna razlika postoji samo između kontrolnih neimuniziranih životinja i imuniziranih bestaničnim cjepivom ($p<0,05$), odnosno staničnim cjepivom *B. pertussis* ($p<0,05$). Vrijednost medijana broja kolonija prikazana je u donjem dijelu slike.

4.6.7. Tijek infekcije u miševa s izbačenim genom za IFN-γ intranazalno imuniziranih staničnim cjepivom *B. pertussis*

Na slici 16. prikazano je kako miševi s izbačenim genom za IFN-γ ne nadziru infekciju jednako dobro kao odrasli kontrolni miševi. Osim toga u plućnom tkivu imunodostatnih miševa nakon izlaganja klicama *B. pertussis* dokazana je proizvodnja mRNK za IFN-γ. Stanično cjepivo za *B. pertussis* u uvjetima *in vitro,* ali isto tako i *in vivo,* pobuđuje proizvodnju ovog citokina odnosno izražaj njegove mRNK u plućnom tkivu imuniziranih životinja. U pokusu prikazanom na slici 23. u miševa prethodno imuniziranih staničnim ili bestaničnim cjepivom učinjena je neutralizacija *in vivo* ovog citokina nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis*. Rezultati ovog pokusa ukazuju kako je upitna uspješnost neutralizacije *in vivo* citokina tijekom infekcije imuniziranih životinja. U svrhu testiranja uloge ovog citokina u uvjetima *in vivo* pri imunizaciji staničnim cjepivom, uporabljen je drugi pristup u kojemu su uporabljene životinje s genetskim manjkom IFN-γ (označeni kao IFN-$\gamma^{-/-}$). Miševi IFN-$\gamma^{-/-}$ i njihove imunodostatne kontrole imunizirane su intranazalnim putom dva puta u razmaku od 30 dana staničnim cjepivom *B. pertussis* u dozi od 30μg/ml, 30 dana nakon zadnje imunizacije izloženi su aerosolu klica *B. pertussis*. Na slici 24. prikazan je broj kolonija *B. pertussis* uzgojenih iz tkiva pluća i dušnika tjedan dana nakon izlaganja aerosolu. Jasno je kako je imunizacija staničnim oblikom cjepiva za *B. pertussis* samo donekle uspješna naročito u plućima miševa s izbačenim genom za IFN-γ.



Slika 24. Broj kolonija *B. pertussis* uzgojenih iz pluća i dušnika miševa s izbačenim genom za IFN-γ (IFN-γ$^{-/-}$) nakon intranazalne imunizacije staničnim cjepivom za *B. pertussis*. Na ordinati je prikazan broj kolonija *B. pertussis* uzgojenih iz plućnog tkiva miševa dobivenog 7 dana nakon njihovog izlaganja aerosolu klica (log_{10}CFU). Na apscisi su prikazane skupine životinja. Oznake predstavljaju pojedinačne životinje. Crni krugovi označavaju broj kolonija u plućima (Slika A) i dušniku (Slika B) kontrolnih neimuniziranih životinja. Bijeli krugovi predstavljaju broj kolonija imuniziranih kontrolnih životinja. Crni kvadrati predstavljaju broj kolonija neimuniziranih miševa IFN-γ$^{-/-}$. Bijeli kvadrati predstavljaju broj kolonija imuniziranih miševa IFN-γ$^{-/-}$. Prag osjetljivosti testa prikazana je horizontalnim isprekidanim crtama (1,4 log $_{10}$CFU). Prema Wilcoxonovoj raščlambi postoji statistički značajna razlika medijana broja kolonija u tkivima (prikazanih na dnu slike) između sljedećih skupina: imuniziranih i neimuniziranih kontrolnih miševa ($p<0,05$) , imuniziranih i neimuniziranih miševa IFN-γ$^{-/-}$ ($p<0,05$) te između imuniziranih kontrolnih i miševa IFN-γ$^{-/-}$ ($p<0,05$).

4.6.8. Titar protutijela nakon imunizacije miševa BALB/c staničnim ili bestaničnim cjepivom *B. pertussis*

U svrhu proučavanja uloge protutijela specifičnih za *B. pertussis* u zaštitnom mehanizmu odgovora na stanično i bestanično cjepivo određivan je serumski titar protutijela specifičnih za antigene *B. pertussis* u serumu imuniziranih miševa. Miševi BALB/c su intranazalno imunizirani dva puta u razmaku od 30 dana staničnim ili

bestaničnim cjepivom za *B. pertussis*. Miševi su 30 dana nakon zadnje imunizacije izloženi aerosolu klica *B. pertussis* u mišjem respiratornom modelu infekcije. U prvom dijelu pokusa neposredno prije izlaganja aerosolu miševima je uziman uzorak seruma, te je u skupnom uzorku (serum prikupljen od 10 životinja) određivana razina protutijela specifičnih za pojedine virulentne sastavnice *B. pertussis*. U tablici 11. prikazano je kako se u serumu miševa imuniziranih staničnim cjepivom ne može utvrditi nazočnost protutijela specifičnih za pojedine virulentne sastavnice *B. pertussis* kao što su filamentozni hemaglutinin (FHA), pertaktin (PRN), pertusisni toksin (PTX), fimbrije (FIM) i lipooligosaharid (LOS). No, nasuprot tomu, u serumu miševa imuniziranih bestaničnim cjepivom nalazi se značajan titar protutijela za antigensku sastavnicu klice koja je uklopljena u bestanično cjepivo *B. pertussis* (u ovom slučaju antigenska sastavnica cjepiva je FHA). Na istoj tablici je prikazana uspješnost imunizacije, koja se ogleda u smanjivanju broja kolonija klica *B. pertussis* uzgojenih iz plućnog tkiva različito imuniziranih ili neimuniziranih miševa sedam dana nakon njihovog izlaganja u pokusnom modelu infekcije. Staničnim cjepivom imunizirani miševi pokazuju potpuno uklanjanje klica iz pluća (smanjenje za 5 $\log_{10}$CFU), dok skupina miševa imuniziranih bestaničnim cjepivom ima nešto slabiji zaštitni odgovor na ovaj oblik imunizacije (smanjenje za 3,2 $\log_{10}$CFU). Zanimljivo je kako životinje imunizirane staničnim cjepivom pokazuju izvanredan stupanj zaštite iako se u njihovom serumu ne mogu dokazati protutijela specifična za virulentne sastavnice *B. pertussis.* Međutim u serumu tako imuniziranih životinja dokazuje se značajni titar protutijela specifičnih za cjelokupni lizat klica *B. pertussis* (razgrađena *B. pertussis* učvršćena na zdence ELISA pločica). Ukoliko se kod pojedinačnih životinja imuniziranih staničnim cjepivom *B. pertussis* prati stupanj zaštite (kroz smanjenje broja kolonija), stupanj zaštite se ne može povezati s razinom titra navedenih protutijela (podatci nisu prikazani). Suprotno tomu, miševi imunizirani bestaničnim cjepivom sadrže značajni titar protutijela specifičnih za antigensku sastavnicu klice koja je uporabljena u pripravci ovog cjepiva, koja je u dobrom suodnosu sa stupnjem zaštite od infekcije *B. pertussis* u ovom pokusnom modelu.

Tablica 11. Odnos između titra protutijela razreda IgG specifičnih za antigene *B. pertussis* i broja klica uzgojenih iz pluća i dušnika miševa imuniziranih staničnim ili bestaničnim cjepivom

	Broj klica (log_{10}CFU)	Titar serumskog IgG protutijela (1/razrjeđenje seruma)					
	Pluća	FHA	PRN	PTX	LOS	FIM	Lizat klice
Kontrola	6,5±0,5	<50	<50	<50	<50	<50	<50
Stanično	1,5±0,5	<50	<50	<50	<50	<50	40000
Bestanično	3,2±0,9	50000	<50	<50	<50	<50	<50

Miševi BALB/c, u skupinama od po 10 intranazalno su imunizirani staničnim (u dozi od 30 μg/ml) ili bestaničnim cjepivom (u dozi od 10 μg/ml FHA antigena). Neposredno prije izlaganja aerosolu iz skupnog seruma je određivan titar protutijela specifičnih za pojedine virulentne sastavnice *B. pertussis*: filamentozni hemaglutinin (FHA), pertaktin (PRN), pertusisni toksin (PTX), lipooligosaharid (LOS) i fimbrije (FIM). Prosječna vrijednost broja kolonija *B. pertussis* uzgojenih iz pluća miševa 7 dana nakon njihovog izlaganja klicama prikazana je kao log_{10}CFU.

4.6.9. Tijek infekcije nakon prijenosa imunog seruma dobivenog od miševa BALB/c poslije imunizacije staničnim ili bestaničnim cjepivom u mišjem respiratornom modelu infekcije *B. pertussis*

U pokusu prikazanome u tablici 11. nije dokazana zaštitna uloga protutijela specifičnih za antigenske sastavnice *B. pertussis* u pokusnom modelu cijepljenja i infekcije ovom klicom. U svrhu istraživanja mehanizama zaštite pri imunizaciji staničnim ili bestaničnim cjepivom *B. pertussis* te uloge protutijela učinjen je pokus u kojemu su neimunizirani miševi prije izlaganja aerosolu klica dobili serum od prethodno imuniziranih životinja. U ovom pokusu miševi BALB/c su imunizirani sljedećim oblicima cjepiva: staničnim (cijela klica *B. pertussis* u dozi od 30μg/ml) ili bestaničnim cjepivom *B. pertussis* (mikrosfere s tri antigenske sastavnice: FHA, PTX i LOS u dozi od 10μg/ml), te staničnim cjepivom za *E. coli* (u dozi od 30 μg/ml). Neimuni serum dobiven je od miševa koji prethodno nisu bili imunizirani. U serumu dobivenome 30 dana nakon zadnje imunizacije određen je titar protutijela specifičnih za *B. pertussis*. U tablici 12. prikazan je titar protutijela u dobivenom serumu prije

davanja miševima i njihovog izlaganja aerosolu klica *B. pertussis*. Kao što je prikazano u tablici 12. serum miševa imuniziranih bestaničnim cjepivom sadrži visoki titar protutijela specifičnih za virulentne sastavnice *B. pertussis* koje su uklopljene u ovaj oblik bestaničnog cjepiva. Suprotno tome, u serumu miševa imuniziranih staničnim cjepivom nema protutijela specifičnih za navedene sastavnice klice, već postoji značajan titar protutijela koja su specifična za cijeli lizat klice *B. pertussis*. Kako je očekivano, u neimunom serumu i onome dobivenom nakon cijepljenja staničnim cjepivom za *E. coli* nema protutijela specifičnih za *B. pertussis*. Uloga protutijela specifičnih za *B. pertussis* testirana je u pokusu u kojemu su neimuniziranim imunodostatnim miševima uštrcavani intraperitonejski pripravci seruma prikazani u tablici 12. Ovim pokusom dokazano je kako samo serum dobiven nakon imunizacije bestaničnim cjepivom ima zaštitini učinak u pokusnom modelu infekcije (smanjenje broja kolonija za 5 $\log_{10}$CFU), dok serum nakon imunizacije staničnim cjepivom nema zaštitni učinak. (Slika 25.)

U tablici 12. prikazan je titar protutijela u serumu životinja nakon uštrcavanja različitih pripravaka seruma. Prema tomu, pri imunizaciji bestaničnim cjepivom može se prenijeti zaštitni učinak ovog cjepiva na neimunizirane životinje prijenosom seruma.

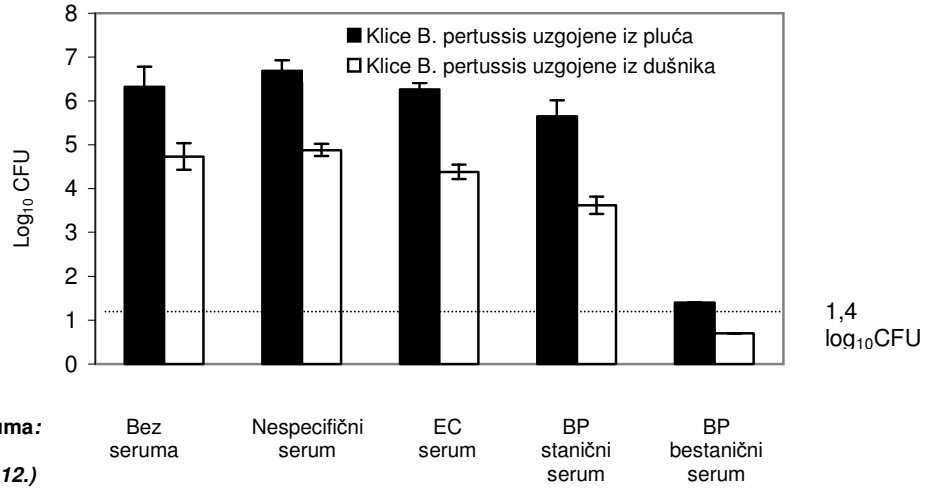
Tablica 12. Titar specifičnih protutijela imunih seruma *in vitro* te u serumu miševa primatelja *in vivo* (1/razrjeđenje seruma)

Vrsta uštrcanog seruma	Titar protutijela specifičnih za *B. pertussis* (1/razrjeđenje seruma)							
	FHA		PTX		PRN		FFBP	
	In vitro	in vivo•	in vitro	in vivo•	In vitro	in vivo•	In vitro	in vivo•
Nespecifični	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
EC	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
BP stanični	<50	<50	<50	<50	<50	<50	40000	36000
BP bestan.	70000	41000	70000	36000	45000	37000	<50	<50

Titar protutijela specifičnih za *B. pertussis* u serumima uštrcanim miševima intraperitonejski čiji je broj uzgojenih klica prikazan na slici 25. Uporabljeni su sljedeći antigeni klice: filamentozni hemaglutinin (FHA), toksin pertusisa (PTX), pertaktin (PRN), lizat klice (FFBP). Serumska razina protutijela određena je ELISA postupkom. Titar protutijela je određivan u

serumima prije prijenosa te u uvjetima *in vivo* u miševima BALB/c nakon prijenosa, neposredno prije izlaganja klicama. Serumi su dobiveni iz skupina od po 10 miševa imuniziranih različitim pripravcima.

- u serumu miševa primaoca imunog seruma.

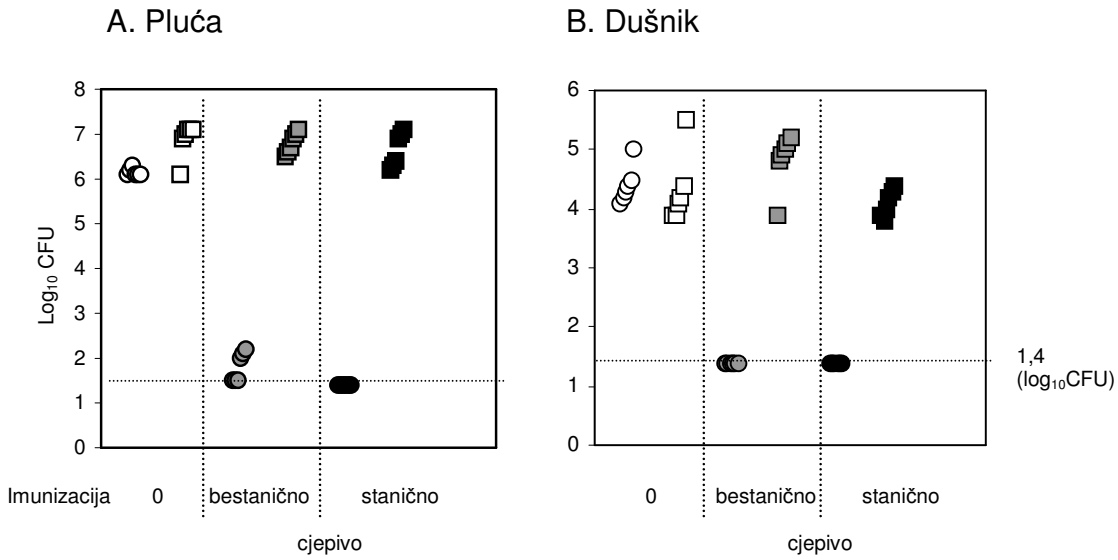


Slika 25. Zaštitni učinak adoptivnog prijenosa imunog seruma protiv rasta klica *B. pertussis*.

Određivan je broj kolonija klica uzgojenih iz tkiva pluća i dušnika miševa BALB/c nakon izlaganja aerosolu klica *B. pertussis* i prethodnog davanja različitih oblika seruma. Ordinata označava broj uzgojenih kolonija (log_{10}CFU) *B. pertussis,* crni stupci označavaju broj kolonija u plućima, a bijeli stupci označavaju broj kolonija u dušniku. Apscisa označava različite skupine seruma koje su uštrcavane miševima BALB/c. Skupine: bez seruma, nespecifični serum, EC serum (dobiven nakon imunizacije *E. coli*), BP stanični serum (dobiven nakon imunizacije staničnim cjepivom za *B. pertussis*), te BP bestanični serum (dobiven nakon imunizacije bestaničnim cjepivom). Prema Studentovom t-testu statistički značajna razlika broja kolonija u plućima i dušniku postoji između kontrolnih miševa i onih koji su dobili serum dobiven nakon cijepljenja bestaničnim cjepivom za *B. pertussis* (pluća: $p<0,05$) (dušnik: $p<0,05$).

4.6.10. Uspješnost intranazalne imunizacije staničnim ili bestaničnim cjepivom *B. pertussis* u limfopeničnih B miševa

Prema prije opisanim rezultatima moglo bi se pretpostaviti da protutijela nisu osnovni mehanizmi zaštite kod imunizacije staničnim cjepivom *B. pertussis*. U svrhu istraživanja uloge limfocita B pri uporabi ovog oblika cjepiva uporabljeni su miševi u kojih je genetskom manipulacijom smanjena razina limfocita B, tj. limfopenični B miševi ($B^{-/-}$KO). Takve životinje razvijaju limfopeniju B stanica. Intranazalno su imunizirani $B^{-/-}$KO i imunodostatni kontrolni miševi C57BL/6 dva puta u razmaku od 30 dana staničnim ili bestaničnim cjepivom za *B. pertussis*. Ovako imunizirani miševi izloženi su aerosolu klica *B. pertussis* 30 dana nakon zadnje doze imunizacije. Broj kolonija uzgojenih u plućima i dušniku određivan je sedam dana nakon njihovog izlaganja aerosolu klica. Na slici 26. prikazano je kako kontrolne životinje uspješno nadziru infekciju ako su imunizirane bilo staničnim odnosno bestaničnim cjepivom. Istovremeno, miševi s limfopenijom B nisu zaštićeni niti jednim navedenim postupkom imunizacije. Kako bi istražili ulogu protutijela, u istom pokusu određivan je titar protutijela u serumu tako imuniziranih životinja. Kao što je prikazano u tablici 11., serum imunodostatnih životinja imuniziranih staničnim cjepivom sadrži visok titar protutijela specifičnih za cijelu klicu *B. pertussis*, ali ne i za pojedine virulentne sastavnice ove klice. Suprotno tomu, serum životinja imuniziranih bestaničnim cjepivom sadrži protutijela specifična za virulentne sastavnice klice uporabljene u ovom obliku cjepiva. Za razliku od imunodostatnih životinja, u serumu životinja $B^{-/-}$KO se ne može nakon jednoga ili drugog postupka imunizacije utvrditi postojanje protutijela specifičnih za *B. pertussis.* (Tablica 13.) Opisani rezultati dokazuju kako su limfociti B nužni za zaštitni učinak bestaničnog, ali i staničnog cjepiva *B. pertussis*.



Slika 26. Uzgoj klica *B. pertussis* iz pluća i dušnika nakon intranazalne imunizacije staničnim ili bestaničnim cjepivom u limfopeničnih B miševa *(B$^{-/-}$KO)* ili imunodostatnih miševa.

Ordinata označava broj kolonija klica uzgojenih iz tkiva pluća ili dušnika 7 dana nakon izlaganja aerosolu *B. pertussis* (log_{10}CFU). Na apscisi su prikazane vrste cjepiva. Oznake predstavljaju pojedinačne životinje. Krugovi predstavljaju imunodostatne životinje; bijeli krugovi su neimunizirane životinje, sivi krugovi imunizirane bestaničnim, a crni krugovi staničnim cjepivom za *B. pertussis*. Kvadrati predstavljaju imunonedostatne životinje B$^{-/-}$KO. Bijeli kvadrati predstavljaju neimunizirane životinje, sivi kvadrati imunizirane bestaničnime, a crni kvadrati imunizirane staničnim cjepivom *B. pertussis*. Slika 26B. se odnosi na tkivo dušnika. Isprekidane horizontalne crte označavaju prag osjetljivosti testa.

Prema Wilcoxonovoj raščlambi statistički značajna razlika *(m prikazano u log$_{10}$CFU)* broja kolonija postoji između imunodostatnih neimuniziranih *(pluća: m= 6; dušnik: m= 4,35)* i imuniziranih bestaničnim cjepivom *(pluća: m= 1,8; dušnik: m= 1,4)* ($p<0,05$), odnosno staničnim cjepivom *(pluća: m= 1,4; dušnik: m= 0,5)* ($p<0,05$). Razlika ne postoji u miševa s nedostatkom limfocita B (B$^{-/-}$KO).

Tablica 13. Titar serumskih protutijela specifičnih za antigene *B. pertussis* u imunodostatnih i limfopeničnih miševa B$^{-/-}$KO intranazalno imuniziranih staničnim ili bestaničnim cjepivom.

Vrste životinja i način imunizacije	Titar serumskog IgG (1/razrjeđenje seruma)			
	FHA	PTX	PRN	Lizat klice
Imunodostatne stan.	-	-	-	47500
Imunodostatne best.	50000	100000	50000	-
B$^{-/-}$KO stan.	-	-	-	-
B$^{-/-}$KO best.	-	-	-	-

Miševi su imunizirani staničnim ili bestaničnim cjepivom *B. pertussis*. Miševi s izbačenim limfocitima B označeni su kao B$^{-/-}$KO. C57BL/6 predstavljaju imunodostatne životinje. U

serumu tako imuniziranih životinja određivan je titar protutijela IgG specifičnih za filamentozni hemaglutinin (FHA), pertusisni toksin (PTX), pertaktin (PRN) ili lizat klice.

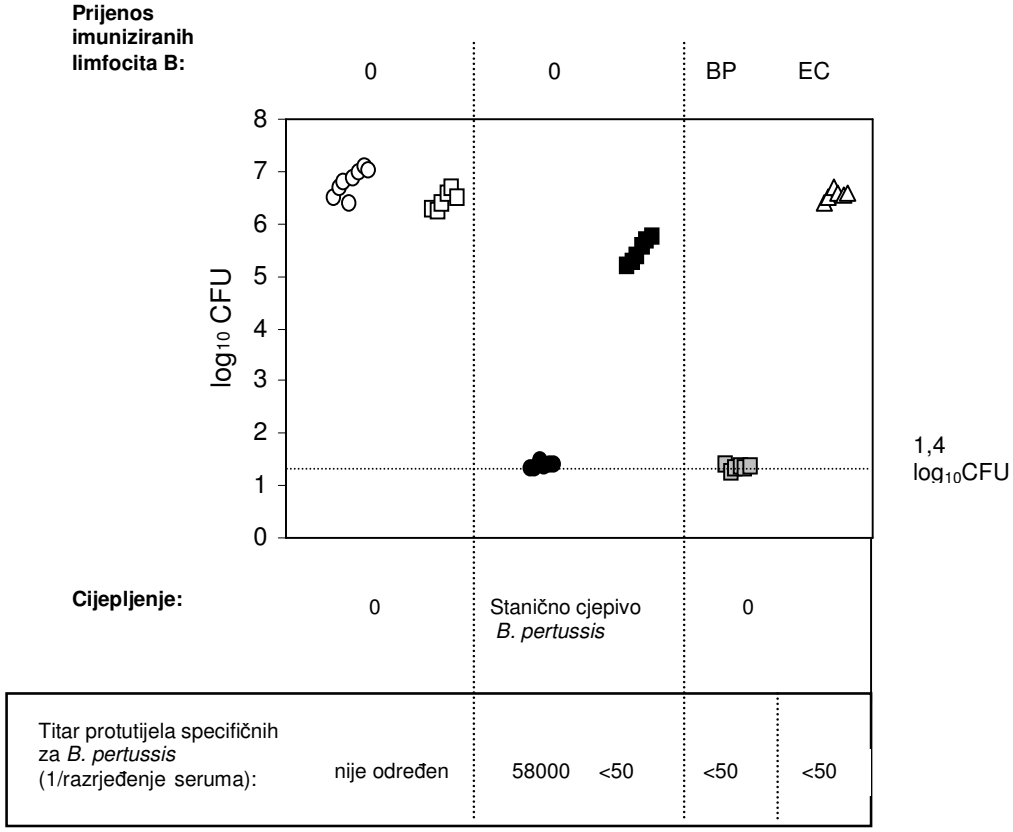
4.6.11. Zaštitni učinak limfocita B dobivenih nakon imunizacije staničnim cjepivom *B. pertussis* u respiracijskom modelu infekcije limfopeničnih B miševa

Na slici 25. prikazano je da serum dobiven nakon imunizacije bestaničnim cjepivom *B. pertussis* ima zaštitni učinak nakon uštrcavanja u limfopenične B miševe. Nasuprot tomu, serum dobiven nakon imunizacije staničnim cjepivom nema zaštitni učinak u respiracijskom modelu infekcije *B. pertussis*. Zanimljivo je da u pokusu prikazanome na slici 26. miševi s limfopenijom B ne mogu biti zaštićeni imunizacijom bilo bestaničnime, bilo staničnim cjepivom. U tablici 11. prikazano je kako se u serumu miševa imuniziranih staničnim cjepivom ne mogu utvrditi protutijela specifična za virulentne sastavnice *B. pertussis* za razliku od bestaničnog cjepiva. Isto tako ne postoji jasna povezanost titra protutijela sa zaštitnim učinkom staničnog cjepiva.

U svrhu testiranja uloge limfocita B učinjen je adoptivni prijenos limfocita B dobivenih iz drenažnih traheobronhalnih limfnih čvorova miševa imuniziranih staničnim cjepivom za *B. pertussis* u limfopenične životinje bez limfocita B. Miševi s limfopenijom B ($B^{-/-}$KO) imunizirani su staničnim cjepivom (u dozi od 30 μg/ml) za *B. pertussis* dva puta u razmaku od 30 dana. Nakon provedenog postupka imunizacije učinjen je adoptivni prijenos navedenih limfocita B. Kako bi potakli primanje presatka limfocita B, miševi $B^{-/-}$KO su još jednom intranazalno imunizirani staničnim cjepivom za *B. pertussis*. Ovako rekonstituirane životinje izložene su aerosolu klica *B. pertussis*, a broj klica uzgojenih iz pluća određivan je 7 dana nakon izlaganja aerosolu. Na slici 27. prikazani su rezultati pokusa rekonstitucije miševa s limfopenijom B. Vidljivo je da u ovom pokusu sama imunizacija miševa $B^{-/-}$KO dovodi do smanjenja broja klica 2 log CFU u plućima imuniziranih životinja $B^{-/-}$KO. Na slici 27. prikazano je da se uštrcavanjem limfocita B dobivenih nakon imunizacije staničnim cjepivom za *B. pertussis* postigne jednak zaštitni učinak kao u imunodostatnih miševa imuniziranih jednakim oblikom cjepiva. Suprotno tomu, limfociti B dobiveni nakon imunizacije staničnim cjepivom za *E. coli* nemaju zaštitni

učinak. Prema tomu, ovi rezultati dokazuju da se zaštitni odgovor može rekonstituirati prijenosom *˝imunih˝* limfocita B dobivenih nakon imunizacije staničnim cjepivom *B. pertussis.*

U svrhu proučavanja uloge prenesenih limfocita B određivan je titar protutijela specifičnih za *B. pertussis* u serumu tretiranih miševa s nedostatkom limfocita B. Na slici 27. u okvirenom dijelu apscise prikazan je titar serumskih protutijela u različitih skupina životinja. Ovi rezultati dokazuju prisutnost protutijela kod imunodostatnih miševa imuniziranih staničnim cjepivom, suprotno tomu ovakva se protutijela specifična za lizat klice ne mogu dokazati u serumu životinja koje su uspješno rekonstituirane imunim limfocitima B. Prema tomu, ovi rezultati ukazuju na važnost limfocita B u zaštitnom učinku staničnog cjepiva *B. pertussis*, iako se u serumu primatelja ovih limfocita B ne može dokazati prisutnost protutijela specifičnih za antigene *B. pertussis.*



Slika 27. Broj kolonija klica *B. pertussis* uzgojenih iz plućnog tkiva i titar serumskih protutijela specifičnih za *B. pertussis* nakon cijepljenja ili adoptivnog prijenosa imunih limfocita B u imunonedostatne miševe s nedostatkom limfocita B.

Na ordinati je prikazan broj kolonija (kao $\log_{10}$CFU). Na apscisi je označen način cijepljenja. Na gornjem dijelu slike označen je prijenos imunih limfocita B (EC kratica za limfocite B dobivene nakon imunizacije staničnim cjepivom *E. coli*, BP kratica za limfocite B dobivene nakon imunizacije staničnim cjepivom za *B. pertussis*). Broj prenesenih limfocita B je $3x10^7$. Krugovi označavaju imunodostatne kontrolne, a kvadrati miševe s nedostatkom limfocita B ($B^{-/-}$KO). Boja simbola označava oblik tretmana: bijeli krugovi označavaju netretiranu kontrolu, crni krugovi imuniziranu kontrolu, bijeli kvadrati netretirane miševe $B^{-/-}$KO, crni kvadrati imunizirane miševe $B^{-/-}$KO, sivi kvadrati miševe
$B^{-/-}$KO u kojih je učinjen prijenos limfocita B specifičnih za *B. pertussis* dok bijeli trokuti označavaju miševe $B^{-/-}$KO u kojih je učinjen prijenos limfocita B specifičnih za *E. coli*. Isprekidana horizontalna crta označava prag osjetljivosti testa.

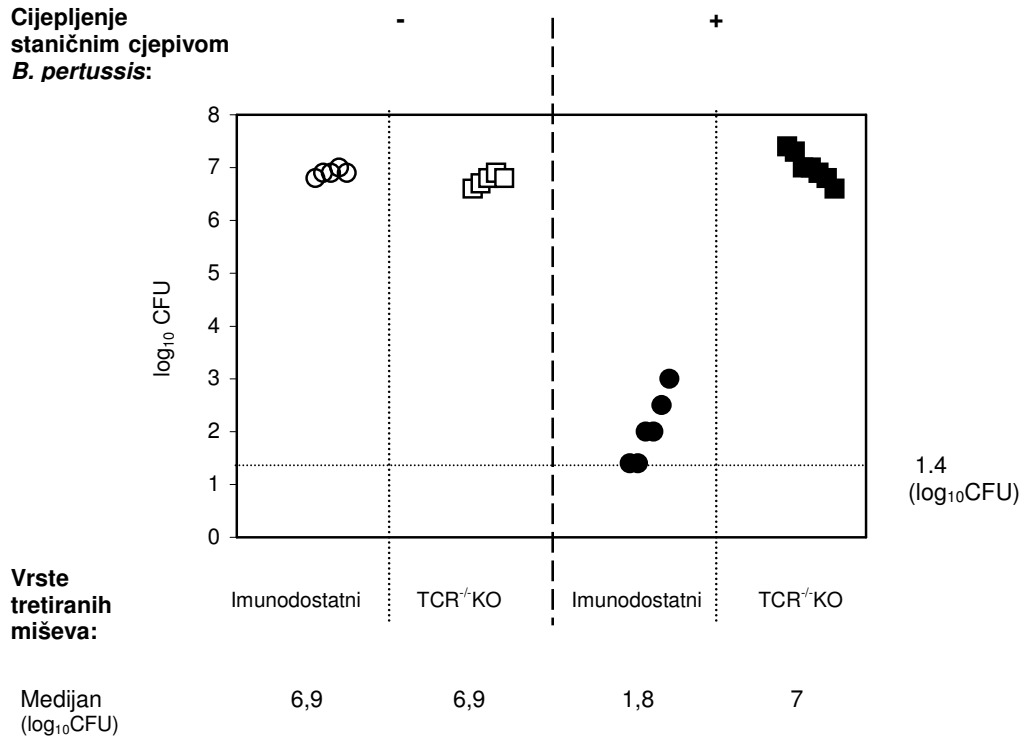
U okvirenom dijelu apscise prikazan je titar serumskih protutijela specifičnih za *B. pertussis* određenih kod pojedinih skupina miševa.

Prema Wilcoxonovoj raščlambi postoji statistički značajna razlika medijana *(m izražen u log_{10}CFU)* broja kolonija između neimuniziranih *(m=6,8)* i imuniziranih *(m=1,4)* imunodostatnih miševa ($p<0,05$), te između neimuniziranih BKO (m=6,5) i rekonstituiranih imunonedostatnih miševa BKO (m=1,4) s limfocitima B dobivenim od životinja imuniziranih

staničnim cjepivom za *B. pertussis* ($p<0,05$). Suprotno tome, pri prijenosu limfoctita B dobivenih nakon imunizacije staničnim cjepivom za *E. coli* nema statistički značajne razlike.

4.6.12. Važnost limfocita T pri imunizaciji staničnim cjepivom *B. pertussis*

U svrhu istraživanja uloge limfocita T pri imunizaciji staničnim cjepivom *B. pertussis* uporabljeni su T limfopenični miševi. U pokusu prikazanome na slici 28. uporabljeni su miševi u kojih je genetskom manipulacijom izbačen antigenski receptor limfocita T. Takvi limfopenični miševi su označeni kao $TCR^{-/-}$ KO. Miševi s limfopenijom T imunizirani su dva puta u razmaku od 30 dana staničnim cjepivom za *B. pertussis*, a 30 dana nakon zadnje imunizacije su izloženi aerosolu klica *B. pertussis*. Broj kolonija klica uzgojenih iz plućnog tkiva određivan je sedam dana nakon izlaganja aerosolu. U ovom pokusu kontrola su bili miševi soja B6129/JF_2 koji imaju normalan broj i funkciju limfocita T. Rezultati prikazani na slici 28. pokazuju kako se miševi s nedostatkom limfocita T ne mogu uspješno imunizirati staničnim cjepivom za *B. pertussis*. U promatranom razdoblju imunonedostatni miševi imunizirani staničnim cjepivom za *B. pertussis* imaju jednak broj klica uzgojenih iz plućnog tkiva kao i neimunizirane kontrolne životinje. Suprotno tomu, imunizirane imunodostatne životinje pokazuju smanjenje medijana broja kolonija za 6 $\log_{10}$CFU. Prema tomu, za uspješnu imunizaciju staničnim cjepivom *B. pertussis* nužna je nazočnost limfocita T.

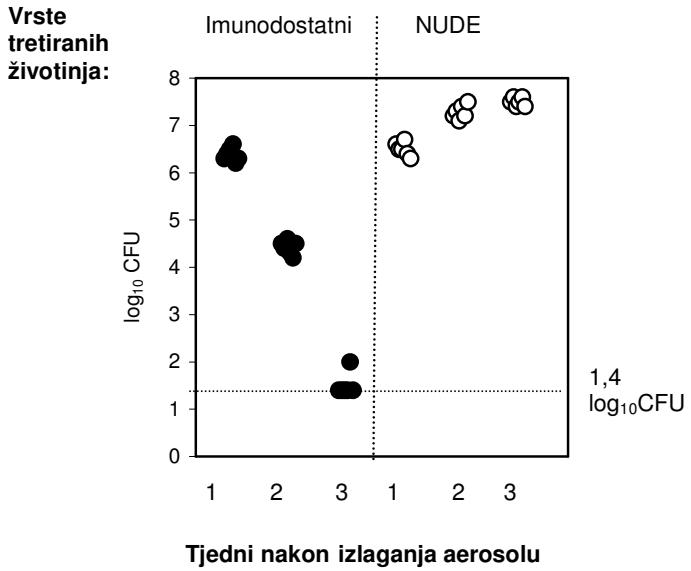


Slika 28. Broj kolonija klica *B. pertussis* uzgojenih iz pluća neimuniziranih i imuniziranih staničnim cjepivom *B. pertussis* imunodostatnih miševa i onih s nedostatkom limfocita T (označeni kao TCR $^{-/-}$ KO).
Ordinata predstavlja broj kolonija u plućima (log_{10}CFU). Apscisa predstavlja skupine životinja. Broj kolonija pojedinačnih životinja označen je različitim simbolima. Bijeli krugovi predstavljaju kontrolne neimunizirane imunodostatne miševe, a crni krugovi kontrolne miševe imunizirane staničnim cjepivom *B. pertussis*. Bijeli kvadrati označavaju neimunizirane imunonedostatne miševe (TCR$^{-/-}$KO), a crni kvadrati imunizirane staničnim cjepivom *B. pertussis* imunonedostatne (TCR$^{-/-}$KO). Isprekidana horizontalna crta označava prag osjetljivosti testa.
Prema Wilcoxonovoj raščlambi statistički značajna razlika broja kolonija (vrijednost medijana prikazana u donjem dijelu slike) postoji između skupina neimuniziranih i imuniziranih kontrolnih životinja ($p<0,05$). Razlika ne postoji između skupina neimuniziranih i imuniziranih imunonedostatnih miševa.

4.6.13. Uloga limfocita T u dugotrajnom nadzoru infekcije nakon imunizacije staničnim cjepivom *B. pertussis*

U svrhu istraživanja uloge limfocita T u dugotrajnom nadzoru (u razdoblju od tri tjedna) infekcije *B. pertussis* pri imunizaciji staničnim cjepivom uporabljeni su atimični miševi s nedostatkom limfocita T (atimični *nude*).

U pokusu prikazanome na slici 13. prikazana je važnost limfocita T u nadzoru infekcije *B. pertussis* kod necijepljenih životinja. Atimični miševi imunizirani su dva puta u razmaku od 30 dana staničnim cjepivom za *B. pertussis*. Tako imunizirani miševi izloženi su aerosolu klica *B. pertussis* 30 dana nakon posljednje doze cijepljenja. Kontrolni miševi su obrađeni istovjetno. Kontrolni imunizirani miševi izvanredno nadziru infekciju što se ogleda u nemogućnosti uzgoja klica iz njihovog plućnog tkiva tri tjedna nakon izlaganja aerosolu klica *B. pertussis* (Slika 29.) Suprotno tomu, kao što je vidljivo na slici 29., kod atimičnih *nude* životinja neovisno o imunizaciji dolazi do porasta broja klica u promatranom razdoblju. Prema tome, za uspješni nadzor infekcije pri imunizaciji, ali isto tako i u prirodnoj imunosti, potrebni su limfociti T.



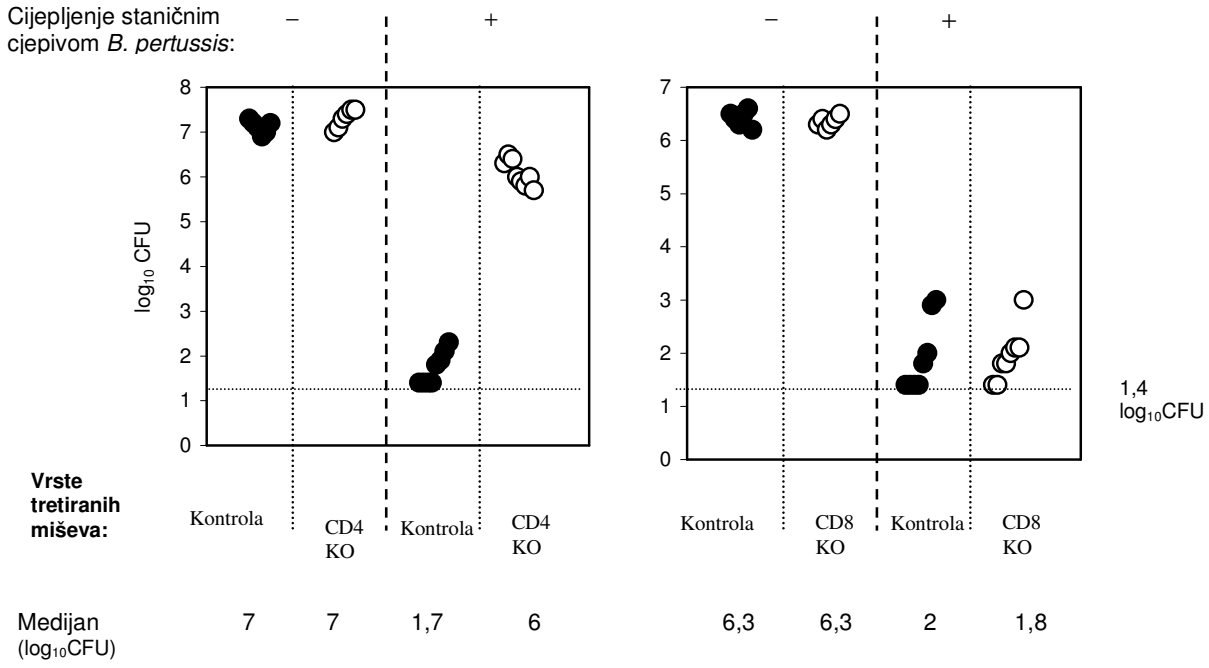
Slika 29. Broj kolonija klica *B. pertussis* uzgojenih iz plućnog tkiva u kontrolnih i atimičnih miševa *nude* imuniziranih staničnim cjepivom.
Ordinata označava broj kolonija (log_{10}CFU). Apscisa označava tjedne nakon izlaganja aerosolu. Simboli predstavljaju pojedinačne životinje. Crni krugovi označavaju imunodostatne staničnim cjepivom imunizirane kontrolne životinje. Bijeli krugovi označavaju staničnim cjepivom imunizirane atimične *nude* miševe.
Isprekidana horizontalna crta označava prag osjetljivosti testa.

4.6.14. Uloga limfocita T $CD4^+$ i $CD8^+$ pri imunizaciji staničnim cjepivom *B. pertussis*

U pokusu prikazanom na slikama 28. i 29. prikazana je važnost limfocita T pri imunizaciji staničnim cjepivom *B. pertussis*. U svrhu ispitivanja uloge subpopulacija limfocita T $CD4^+$ i $CD8^+$ uporabljeni su miševi s limfopenijom T i to $CD4^+$ odnosno $CD8^+$ tipa. Ovakvi miševi označeni su kao CD4KO (limfopenija $CD4^+$ limfocita T) ili CD8KO (limfopenija $CD8^+$ limfocita T). Navedene skupine miševa imunizirane su intranazalno s 30 μg/ml staničnog cjepiva *B. pertussis* dva puta u razmaku od 30 dana. Broj kolonija klica uzgojenih iz pluća određen je 7 dana nakon izlaganja aerosolu klica *B. pertussis*.

Na slici 30. prikazan je broj kolonija u plućima neimuniziranih i imuniziranih imunodostatnih odnosno imunonedostatnih miševa. U ovom pokusu pokazano je kako se miševi $CD8^-$KO (Slika 30B.) mogu uspješno imunizirati staničnim cjepivom *B. pertussis* za razliku od miševa $CD4^-$KO. (Slika 30A.) Prema tomu, za uspješnu imunizaciju staničnim cjepivom za *B. pertussis* nužni su $CD4^+$ limfociti T.

Slika 30A. Slika 30B.



Slika 30. Broj kolonija klica *B. pertussis* uzgojenih iz plućnog tkiva nakon imunizacije staničnim cjepivom *B. pertussis* miševa s nedostatkom CD4 (Slika 30A) i CD8 (Slika 30B) limfocita T.

Ordinata označava broj kolonija *B. pertussis* (log_{10}CFU). Oznake (–) odnosno (+) prikazane iznad grafikona označavaju način tretmana. Vrste tretiranih životinja označene su na apscisi Simboli predstavljaju pojedinačne životinje. Crni krugovi predstavljaju imunodostatne kontrolne životinje, a bijeli krugovi označavaju životinje s nedostatkom $CD4^+$ limfocita T (Slika 30A) ili $CD8^+$ limfocita T (Slika 30B). Isprekidana horizontalna crta označava prag osjetljivosti testa. Prema Wilcoxonovoj raščlambi postoji statistički značajna razlika medijana (prikazani na dnu slike) broja kolonija uzgojenih iz plućnog tkiva samo između imuniziranih CD4KO i imuniziranih imunodostatnih miševa ($p<0,05$).

5. Rasprava

5.1. Mišji model infekcije *B. pertussis*

U razvitku cjepiva za pojedine patogenične klice važno je poznavanje molekulskih i staničnih imunopatofizioloških mehanizama pri infekciji ili imunizaciji. Činjenica da postoje razlike imunobiološkog reagiranja na cijelu klicu, odnosno antigenične sastavnice klice, upućuje na složenost odgovora, te na to da su mehanizmi zaštitne imunosti tek djelomično poznati (10,203). Razvoj cjepiva za indukciju zaštitne imunosti stoga postaje složeniji postupak, posebice u pokušajima korištenja individualnih antigena ili antigeničnih determinanti patogenične klice.

U ovoj disertaciji analizirani su molekulski odnosno stanični mehanizmi zaštitne imunosti u mišjem respiratornom modelu infekcije *B. pertussis*, iako su ljudi zapravo jedini prirodni domaćini. Klice *B. pertussis* mogu kolonizirati respiratorni epitel i uspješno se umnožavati u dišnom sustavu različitih pokusnih životinja (204). Najčešći uporabljivani pokusni model infekcije *B. pertussis* predstavlja infekcija pokusnih sojeva miševa (198, 205). U pokusnim modelima *B. pertussis* dospijeva na sluznicu respiratornog sustava na dva osnovna načina, izravnom intranazalnom primjenom klica, te putem stvaranja aerosola klica. Izravna intranazalna primjena pokazala se nedovoljno reproducibilnim načinom infekcije ovim uzročnikom (206). Zbog toga je u svrhu ispitivanja odgovora na infekciju i imunizaciju cjepivima za *B. pertussis* nekoliko istraživačkih skupina uporabilo aerosolni model infekcije (205, 207).

U ovoj disertaciji uporabljen je aerosolni model infekcije *B. pertussis.* Infektivna doza od 10^9 CFU *B. pertussis* soja 18323 u odraslih miševa BALB/c (u dobi od 5-8 tjedana) dovodi do samoograničavajuće infekcije koja se ogleda u postupnom uklanjanju klice iz tkiva pluća i dušnika inficiranih životinja. Veća doza klica uzrokuje smrt životinja, pri čemu se može dokazati veća kolonizacija tkiva klicama. Miševi mlađi od 18 dana ne mogu nadzirati infekciju i pokazuju 100% smrtnost nakon aerosolne infekcije standardnom infektivnom dozom. Razvoj smrtonosne infekcije neonatalnih i vrlo mladih životinja tumači se fiziološkom imunonedostatnošću. Slično kao u ljudi, miševi nakon rođenja nemaju u potpunosti razvijen imunosni sustav (208).

U drugim pokusnim modelima infekcije prikazani su rezultati koji upućuju na reproducibilnost i jedinstvenost tijeka infekcije *B. pertussis* u mišjem aerosolnom modelu, prema kojima ishod infekcije ovisi o infektivnoj dozi klica, a dokazana je i različitost tijeka infekcije ovisno o soju pokusnih miševa s time što imunodostatni miševi uklanjaju klicu iz plućnog tkiva u razdoblju od 5.-10. tjedna infekcije (205, 209). Vezanost klica *B. pertussis* za cilije plućnog tkiva pokusnih miševa dokazana je elektronskim sitnozorom (205). Unatoč opisanoj kolonizaciji respiratornog epitela potrebno je naglasiti kako mišji aerosolni model infekcije *B. pertussis* ne pokazuje sve osobine infekcije u ljudi. U miševa izostaje karakterističan kašalj koji se javlja pri infekciji ljudi, ali se zato kod njih javljaju slični sustavni učinci klice *B. pertussis,* kao što su leukocitoza i hipoglikemija izazvana PTX potaknutom proizvodnjom inzulina, s jednakom kinetikom javljanja kao u djece (205). U svakom slučaju, mišji model infekcije *B. pertussis* ima značajnu ulogu u razumijevanju imunopatofizioloških mehanizama infekcije i imunizacije *B. pertussis,* posebice ako se uzme u obzir izostanak imunosnih pokazatelja uspješnosti cjepiva za ovu klicu, a kod ostalih cjepiva izraženih kroz titar specifičnih protutijela (9).

5.2 Mehanizmi zaštitne imunosti u infekciji *B. pertussis* imunodostatnih miševa

Uloga protutijela. Pokusi pasivne imunizacije protutijelima specifičnim za virulentne sastavnice *B. pertussis* ukazuju na njihovu moguću ulogu u zaštitnom imunosnom odgovoru na ovu infekciju (210, 211). Mehanizmi zaštitne uloge protutijela potencijalno se ostvaruju putem neutralizacije toksina klice, inhibicije vezivanja klice za receptore na eukariotskim stanicama i aktivacije komplementne kaskade (73, 212). Sličan rezultat pasivne zaštite prijenosom protutijela prikazan je u sklopu istraživanja u ovoj disertaciji. Nasuprot tomu, rezultati prikazani u ovoj disertaciji ukazuju na različitu kinetiku između uklanjanja klica iz pluća i dušnika i pojave protutijela specifičnih za *B. pertussis* u serumu i bronhoalveolarnom ispirku. Značajan titar protutijela javlja se zapravo kada je već došlo do potpunog uklanjanja *B. pertussis* iz dišnog sustava. U svakom slučaju, protutijela nastala u kasnijem tijeku infekcije mogu

neutralizacijom toksina i inhibicijom adhezije *B. pertussis* imati ulogu u dokazanoj dugotrajnoj imunosti nastaloj nakon infekcije (213). Funkcijska uloga protutijela dokazanih u ovoj disertaciji u serumu i BAL-u nakon infekcije *B. pertussis* nije poznata, posebice ako se uzme u obzir kinetika uklanjanja klica iz plućnog tkiva. Postojanje cirkulirajućih serumskih protutijela određenih ELISA testom ne pokazuje njihovu razinu niti moguću funkcijsku ulogu u mikrookolini plućnog tkiva (213). Važno je naglasiti kako na moguću ulogu protutijela ukazuje istraživanje infekcije *B. pertussis* kod limfopeničnih B miševa ($B^{-/-}$KO) u kojemu je dokazana kroničnost infekcije ovih miševa u usporedbi s imunodostatnim miševima (209). Međutim, ne mogu se isključiti druge uloge limfocita B osim proizvodnje protutijela kao što su predočavanje antigena i razvitak sluzničke imunosti.

Stanična imunost i proizvodnja citokina. Prije više od trideset godina razvitkom odgođene reakcije preosjetljivosti na antigene *B. pertussis* posumnjalo se na unutarstaničnu fazu ove klice i time se ukazalo na važnost nastanka stanične imunosti u nadzoru ove infekcije (214). U ovoj disertaciji u mišjem modelu infekcije ispitana je uloga staničnog kraka imunološkog odgovora u tijeku infekcije *B. pertussis* uporabom imunonedostatnih životinja. Važnost staničnog kraka imunosnog odgovora pokazuju pokusi infekcije imunonedostatnih miševa s nedostatkom limfocita T (atimični *nude* miševi) odnosno miševa s nedostatkom limfocita T i B (miševi *SCID*). U pokusima izlaganja aerosolu klica *B. pertussis* miševi koji imaju nedostatak limfocita T ili miševi s nedostatkom limfocita T i B ne nadziru infekciju, te ugibaju 3-5 tjedana nakon infekcije. Važno je istaknuti kako miševi s nedostatkom limfocita B i T ugibaju 2 tjedna prije nego oni samo s nedostatkom limfocita T. U trenutku ugibanja atimični miševi *nude* i *SCID* imaju 10^8 CFU klica u plućima, dok kontrolni imunodostatni miševi nakon maksimalnog broja klica od 10^6 CFU pokazuju postupno uklanjanje klica iz plućnog tkiva. Ovi rezultati dokazuju važnost limfocita B i T u nadzoru infekcije *B. pertussis.* Jednako tako, dokazana je zaštitna uloga prenešenih imunih $CD4^+$ limfocita T izoliranih iz prethodno inficiranih imunodostatnih miševa u infekciji atimičnih nude miševa. Suprotno tomu, $CD8^+$ limfociti T u istom istraživanju nemaju zaštitni učinak (207).

U ovoj disertaciji prikazana je specifična proliferacija limfocita T iz regionalnih limfnih čvorova inficiranih životinja nakon *in vitro* pobude cijelom klicom *B. pertussis.* Osim toga, u nadtalogu tako pobuđenih limfocita dokazana je proizvodnja IFN-γ i IL-2, ali ne IL-4 odnosno IL-10. Proizvodnja IFN-γ od strane *in vitro* potaknutih limfocita T dobivenih iz inficiranih životinja, te porast izražaja mRNK ovog citokina u plućima inficiranih životinja, ukazuje na moguću važnost ovog citokina u nadzoru infekcije *B. pertussis.* U ovoj disertaciji u plućima je dokazana pobuda izražaja mRNK za IFN-γ koja se javlja nekoliko dana nakon izlaganja aerosolu klica i ostaje visoko izražena kroz najmanje četiri tjedna infekcije. Atmični miševi *nude* pokazuju izostanak indukcije mRNK za ovaj citokin do tjedan dana nakon infekcije, a maksimalna razina se postiže tri tjedna nakon infekcije. Zanimljivo je kako imunonedostatni atimični miševi *nude* i *SCID* iako ugibaju 3-5 tjedana nakon infekcije, također pokazuju izražaj mRNK za IFN-γ ukazujući kako IFN-γ može imati ulogu u nadzoru infekcije ali nije jedino dovoljan u zaštitnom imunosnom odgovoru bez nazočnosti stanica specifične imunosti. U svakom slučaju treba naglasiti kako u interpretaciji ovih rezultata treba biti oprezan s obzirom da izražaj mRNK pojedinih citokina ne mora uvijek biti dobar pokazatelj proizvodnje same bjelančevine (161). U ovoj disertaciji središnja uloga IFN-γ u nadzoru infekcije *B. pertussis* dokazana je kod imunodostatnih miševa te kod miševa s genetskim nedostatkom IFN-γ neutralizacijom *in vivo.* Životinje s nedostatkom ili neutralizacijom IFN-γ pokazuju značajno veći broj klica u plućima u tijeku infekcije *B. pertusis* u usporedbi s netretiranim životinjama ili onima tretiranima s protu-IL-4 protutijelima. Rezultati prikazani u ovoj disertaciji u skladu su s prethodnim radovima drugih autora koji su dokazali da limfociti T dobiveni iz miševa nakon infekcije *B. pertussis* te nakon stimulacije *in vitro* proizvode IFN-γ i TNF-α (207). Kroničnost infekcije i proširenost klica *B. pertussis* izvan plućnog tkiva opisana je u miševa s nedostatkom receptora za IFN-γ (209). Osim toga, proizvodnja IFN-γ može se detektirati u ispirku pluća nakon infekcije miševa *B. pertussis* (215). Poznato je da *B. pertussis* ili njezine podjedinice mogu stimulirati proizvodnju dušičnog oksida u makrofagima, uz pojačavajuću ulogu IFN-γ (216). Mehanizmi kojima bi IFN-γ nadzirao infekciju su tek djelomično poznati. Poznato je kako IFN-γ aktivira makrofage i pobuđuje nespecifične mehanizme imunosti kao što su fagocitoza i uništavanje

unutarstaničnih patogeničnih klica (217). Sukladno tomu, IFN-γ može barem djelomično sudjelovati u nadzoru infekcije *B. pertussis* aktivacijom nespecifičnih mehanizama imunosnog odgovora. U ovoj disertaciji dokazana je indukcija izražaja mRNK za TNF-α u plućnom tkivu inficiranih životinja tjedan dana nakon infekcije, a koja ostaje na visokoj razini sve do kraja pokusa kod imunodostatnih miševa (8 tjedana), dok kod imunonedostatnih miševa atimičnih nude i SCID do trenutka njihvog ugibanja. Makrofazi potaknuti LPS proizvode TNF-α koji onda pobuđuje izražaj posrednika akutne upale. TNF-α se smatra jednim od važnih posrednika endotoksičnog urušaja (218)

U ovoj disertaciji ispitana je uloga IL-4, citokina koji potiče odgovor Th2 odnosno proizvodnju protutijela (218). U plućima imunodostatnih miševa tijekom infekcije *B. pertussis* izražaj mRNK za IL-4 počinje se javljati 1-2 tjedna nakon infekcije i dostiže svoj maksimalni izražaj 2-8 tjedana nakon infekcije. Kinetika pobude mRNK za IL-4 u dobroj je korelaciji s kinetikom proizvodnje protutijela specifičnih za *B. pertussis* i kinetike uklanjanja klica iz plućnog tkiva. Suprotno tomu, imunonedostatni miševi atimični *nude* i *SCID* ne pokazuju izražaj mRNK za IL-4 ukazujući kako je proizvodnja IL-4 u potpunosti ovisna o limfocitima T. Suprotno nalazu izražaja mRNK za IL-4 u plućnom tkivu inficiranih životinja u nadtalogu *in vitro* stimuliranih limfocita T u inficiranih životinja nismo bili u mogućnosti utvrditi proizvodnju IL-4. Brojni razlozi mogu uvjetovati navedenu razliku između detekcije izražaja mRNK za IL-4 i njegove proizvodnje *in vitro*. Svakako, tu može važnu ulogu imati različitost populacije limfocita T u plućima i u lokalnim limfnim čvorovima, ili pak to što limfociti T koji proizvode IL-4 čine manjinu u lokalnim limfnim čvorovima onemogućavajući potvrdu proizvodnje navedenog citokina u nadtalogu tako stimuliranih limfocita ELISA postupkom. Slično rezultatima prikazanima u ovoj disertaciji istraživanja *in vitro* odgovora limfocita T kod akutne infekcije ili rekonvalescencije od infekcije *B. pertussis* u djece ukazuju na obrazac Th1 citokinskog odgovora (219). Nasuprot tomu, ako se uporabi RT PCR za određivanje mRNK može se u djece dokazati postojanje i mRNK citokina obrasca Th2 imunosnog odgovora pri infekciji *B. pertussis* (220). Rezultati opisani u ovoj disertaciji neutralizacije IL-4 *in vivo* koji nisu imali učinak na tijek infekcije *B. pertussis* u suglasju

su s rezultatima infekcije miševa koji nemaju IL-4 (IL-4$^{-/-}$KO), a koji mogu uspješno nadzirati infekciju *B. pertussis,* sugerirajući kako ovaj središnji citokin Th2 obrasca nema presudnu ulogu u zaštitnoj imunosti (209).

U ovoj disertaciji dokazana je i proizvodnja IL-2 nakon pobude limfocita T izoliranih iz limfnih čvorova inficiranih životinja *in vitro*. mRNK za IL-2 inducirana je do maksimalnog izražaja 2-4 tjedna nakon izlaganja bakterijskom aerosolu i ostaje na visokoj razini u plućima miševa koji u potpunosti otklanjaju klicu iz plućnog parenhima. mRNK za IL-2 u atimičnih miševa *nude* nije inducirana ili je prolazno inducirana kod miševa *SCID* u drugom tjednu nakon infekcije. Izvor mRNK za IL-2 kod SCID miševa nije poznat, iako su u literaturi opisani ne T-limfocitni izvori proizvodnje ovog citokina (221). Činjenica da je mRNK za IL-2 je inducirana nakon infekcije i ostaje na visokoj razini izražaja u životinja koji uklanjaju klicu iz pluća ukazuje na mogućnost uloge ovog citokina u nadzoru infekcije. Naime, IL-2 je poznati autokrini čimbenik rasta limfocita T (222).

IL-6 ima različite mehanizme djelovanja koji mogu imati središnju ulogu u odgovoru organizma na infekciju (223). Ovi mehanizmi uključuju završno usmjeravanje limfocita B, pobudu rasta limfocita B, te usmjeravnje i / ili pobudu limfocita T i makrofaga. Osim toga, IL-6 ima ulogu u proizvodnji lokalnog IgA (224). U plućima miševa izloženih aerosolu vrlo brzo dolazi do pobude mRNK za IL-6 (unutar dva tjedna). Izražaj mRNK za ovaj citokin dramatično se smanjuje 4 tjedna nakon infekcije u plućima imunodostatnih miševa koji uspješno nadziru infekciju. Imunonedostatni miševi koji ne uspijevaju nadzirati infekciju pokazuju stalnu visoku razinu mRNK za IL-6 tijekom pokusa (*nude*, *SCID* i IFN-$\gamma^{-/-}$ KO). Vjerojatno visoka razina IL-6 predstavlja kompenzacijski mehanizam u situaciji kada se infekcija ne može nadzirati mehanizmima specifične imunosti (223).

IL-12 je regulacijski citokin kojega primarno proizvode makrofagi, a potiče proizvodnju IFN-γ u NK stanicama i limfocitima T, te potiče proliferaciju ovih stanica i usmjeravanje limfocita T u smjeru Th1 (225). U plućima miševa izloženih aerosolu klice *B. pertussis* može se utvrditi indukcija izražaja mRNK za podjedinicu p40 citokina IL-12. Sličnu pojavu opisali su i drugi istraživači koji su pokazali da mišji makrofazi nakon pobude *B. pertussis* proizvode IL-12 (226). Za razliku od toga

pobuda pročišćenim antigenima *B. pertussis* (bestanično cjepivo) ne dovodi do proizvodnje IL-12 u nadtalogu. Jednako tako je dokazano da IL-12 povećava zaštitnu uspješnost bestaničnog cjepiva za *B. pertussis* (226). Prema tomu, IL-12 može imati značajnu ulogu u nadzoru ove infekcije. Zanimljivo je kako filamentozni hemaglutinin (FHA) kao bakterijska adhezijska molekula može potisnuti proizvodnju IL-12, a pobuditi proizvodnju IL-6 i IL-10, te tako sama klica može potisnuti povoljan imunosni odgovor (227)

Profil izražaja mRNK pojedinih citokina tijekom infekcije *B. pertussis* može pružiti sliku imunopatofiziološkog odgovora domaćina na ovu infekciju. Citokinski obrazac detektiran u plućima tijekom infekcije *B. pertussis* ima osobine odgovora Th1 i Th2. Nasuprot tomu, citokinski obrazac nakon *in vitro* pobude antigenima klice je tipa Th1. U literaturi je uobičajen citokinski odgovor tipa 1. karakterističan za unutarstanične patogene (111). *B. pertussis* se isključno smatrala izvanstaničnom patogenom klicom. Međutim, novije spoznaje govore o mogućnosti njezinog ulaska i preživljavanja u stanicama sisavaca (228). U svezi s time je zanimljiva činjenica da su Th klonovi dobiveni od miševa nakon imunizacije cijelom klicom *B. pertussis* dominantno tipa Th1 (229). U našim je rezultatima indukcija mRNK za citokine odgovorne za Th2 odgovor (IL-4 i IL-6) također dokazana u plućima tijekom infekcije ovim uzročnikom. Nedavno završeni klinički pokusi uspješnosti cjepiva za hripavac nisu utvrdili korelaciju između razine protutijela i zaštite od ove infekcije (230-232). U prilog postojanju citokinskog obrasca Th1 i Th2 odgovora govori i pojava protutijela specifičnih za *B. pertussis* razreda IgG i IgA u serumu i bronhoalveolarnom ispirku inficiranih životinja koja su dokazana u ovoj disertaciji. Zanimljiva je kinetika pojave protutijela koja se javljaju tek kada dolazi do potpunog uklanjanja klica iz plućnog tkiva (nakon 5 tjedana infekcije). U ovoj disertaciji neutralizacijskim pokusom i uporabom miševa s nedostatkom IFN-γ dokazana je posebna važnost ovog citokina u nadzoru infekcije *B. pertussis*. U suglasju s time može se protumačiti smanjena sposobnost nadzora i povećana smrtnost od infekcije u mlađim dobnim skupinama djece i neonatalnih životinja u kojih je dokazana smanjena sposobnost proizvodnje IFN-γ (233, 234). Rezultati prikazani u ovoj disertaciji doprinose razumijevanju imunopatofiziološkog odgovora na ovu infekciju, posebice razjašnjavajući važnu

ulogu IFN-γ u zaštitnoj imunosti kod infekcije *B. pertussis,* te ulogu stanica specifične imunosti.

5.3 Imunološki odgovor na imunizaciju staničnim i bestaničnim cjepivom *B. pertussis*

Unatoč dugogodišnje uporabe cjepiva *B. pertussis* tek su djelomično poznati mehanizmi zaštitne imunosti nakon imunizacije cjepivom za ovu klicu. U nedavnim kliničkim pokusima s bestaničnim cjepivom *B. pertussis* nije utvrđena povezanost između razine protutijela i zaštite od ove infekcije (230-232). S druge strane, poznato je da pasivno davanje protutijela specifičnih za antigene *B. pertussis* ima zaštitni učinak u životinjskim modelima infekcije (14, 57, 210, 211). Razumijevanje mehanizma zaštitne imunosti u razvitku cjepiva ima izuzetnu važnost. U ovoj disertaciji istražen je mehanizam zaštite nakon intranazalnog cijepljenja različitim pripravcima cjepiva za *B. pertussis*. Pobuda lokalne imunosti sluznice respiratornog sustava na mjestu ulaska patogenične klice ima značajnu ulogu u zaštiti od infekcije, a najvjerojatnije nastaje kao rezultat potiskivanja kolonizacije klice (11). Parenteralna cjepiva, za razliku od sluzničkih, dovode do porasta serumskih protutijela razreda IgG, no neuspješna su u pobudi nastanka sluzničnog odgovora IgA (212, 235). Ispitivanja uspješnosti intranazalnog cijepljenja pročišćenim antigenima klice *B. pertussis* uklopljenim u biološki razgradljive mikročestice pokazala su kako se ovim postupkom imunizacije postiže stvaranje protutijela specifičnih za *B. pertussis* razreda IgA na respiratornoj sluznici cijepljenih životinja (187).

U ovoj disertaciji utvrđeno je kako intranazalna imunizacija staničnim cjepivom *B. pertussis* ima zaštitni učinak u mišjem aerosolnom modelu infekcije. Ova zaštita je ovisna o dozi antigena uporabljenog pri cijepljenju, specifična je za uzročnika, ali nije ograničena na pojedini uporabljeni soj ove klice. Isti takav, ali ipak nešto slabiji zaštitni učinak postiže se bestaničnim cjepivom. Dokazana je proliferacija limfocita T specifična za antigene klice

nakon njihove *in vitro* pobude. Pobuđeni limfociti T imaju izražaj receptora za CD4. Limfociti T dobiveni iz životinja imuniziranih cijelom klicom proliferiraju samo sa cijelom klicom *B. pertussis* ali ne i u nazočnosti poznatih virulentnih sastavnica ove klice. Istovremeno se u nadtalogu tako pobuđenih limfocita T može dokazati proizvodnja IFN-γ, ali ne i IL-4 ili IL-10. Suprotno tomu, ukoliko se pobuđuju limfociti dobiveni nakon imunizacije bestaničnim cjepivom u nadtalogu se može pokazati proizvodnja IL-4 i IL-10, ali ne IFN-γ odnosno kod ovog oblika cjepiva prevladava obrazac Th2 citokinskog odgovora. Infekcijom *B. pertussis* u životinja imuniziranih staničnim cjepivom inducira se mRNK za IL-4 i IFN-γ. Suprotno tomu, infekcija miševa imuniziranih bestaničnim cjepivom dovodi do smanjenja izražaja mRNK za IFN-γ u plućnom tkivu. Zaštitni učinak imunizacije staničnim cjepivom je samanjen kod IFN-$\gamma^{-/-}$KO miševa. Prevladavajuća proizvodnja IL-4 dokazana u plućima na razini mRNK i nakon stimulacije imunih limfocita T *in vitro* može imati ulogu u usmjeravanju odgovora u smjeru Th2 kod cijepljenja bestaničnim cjepivom (121)

Međutim, u serumu životinja imuniziranih staničnim cjepivom može se ELISA postupkom dokazati nazočnost protutijela koja su specifična za cijelu klicu *B. pertussis* fiksiranu u formalinu. Istovremeno ne postoje protutijela specifična za pojedine virulentne sastavnice klice. Zanimljivo je kako prijenos takvog seruma nema zaštitni učinak na broj klica u plućima imunodostatnih neimuniziranih miševa nakon njihovog izlaganja bakterijskom aerosolu. Suprotno tomu, u serumu se miševa imuniziranih bestaničnim cjepivom može dokazati značajan titar protutijela specifičnih za antigene virulentne sastavnice klice uklopljene u ovaj oblik cjepiva. Jednako tako ovaj oblik seruma ima zaštitni učinak u aerosolnom modelu infekcije *B. pertussis*

nakon pasivnog prijenosa u imunodostatne miševe za razliku od seruma dobivenoga nakon imunizacije staničnim cjepivom. Prethodna istraživanja su dokazala kako pasivno davanje protutijela specifičnih za FHA ima zaštitni učinak u aerosolnom modelu infekcije *B. pertussis* (212). Prema tomu, intranazalna imunizacija staničnim cjepivom na nepoznat način oponaša prirodni način infekcije. Poznato je da sama infekcija pruža zaštitnu imunost pri idućem dodiru s klicom. Ovakav način imunizacije postiže izvanrednu zaštitu od infekcije *B. pertussis*, međutim mehanizam je zaštite tek djelomično poznat.

U svrhu utvrđivanja uloge pojedinih stanica specifične imunosti učinjeni su pokusi sa životinjama koje imaju nedostatak pojedinih stanica specifične imunosti. Nije u potpunosti moguća imunizacija limfopeničnih B miševa ($B^{-/-}$KO) jednim i drugim oblikom cjepiva. Isto tako ove imunizacije nemaju zaštitni učinak u miševa s nedostatkom limfocita T (atimični *nude*). Uloga limfocita T CD4 i CD8 ispitana je uporabom miševa s izbačenim limfocitima CD8 (CD8KO) odnosno onih kod kojih su izbačeni limfociti T CD4 (CD4KO). U pokusima se pokazalo da se može postići zaštita u slučaju nedostatka limfocita CD8. Suprotno tomu, limfociti T CD4 potrebni su za uspješnost imunizacije. Navedeni rezultati su u skladu s drugim istraživanjima koja ukazuju na važnost limfocita T općenito, odnosno posebno limfocita T CD4 u tijeku infekcije *B. pertussis*. Tijekom infekcije neimuniziranih životinja pokazana je važnost limfocita T (pokus s atimičnim miševima *nude*) koji ugibaju 5 tjedana nakon infekcije. Jednako tako miševi s nedostatkom limfocita B i T (pokus sa miševima SCID) ugibaju nakon 3 tjedna. Osim toga drugi su autori pokazali kako prijenos imunih limfocita T CD4 u subletalno ozračene primaoce ima zaštitni učinak za razliku od limfocita T CD8 koji nemaju zaštitni učinak (207). Jednako tako u ovoj disertaciji je dokazano da limfociti T CD4 dobiveni od inficiranih miševa ili od onih imuniziranih staničnim cjepivom za *B. pertussis* proizvode IFN-γ i IL-2, što je u skladu s podacima drugih istraživača (236, 237). Suprotno tome, citokinski obrazac kod miševa imuniziranih bestaničnim cjepivom dominantno je tipa Th2 (236).

Rezultati dobiveni ovom disertacijom ukazuju kako limfociti T CD4 doprinose zaštitnoj imunosti proizvodnjom citokina Th1 (IFN-γ) i pobudom stanične imunosti, a ne samo funkcijom pomagača u proizvodnji specifičnih protutijela. Intranazalna

imunizacija staničnim cjepivom ima zaštitni učinak koji nije u svezi s razinom protutijela specifičnih za *B. pertussis*. Druga istraživanja su pokazala postojanje specifičnih protutijela za klicu nakon imunizacije staničnim cjepivom bilo potkožnim ili intranazalnim putom (237). U serumu miševa imuniziranih staničnim cjepivom pokazano je postojanje protutijela koja su specifična za cijelu klicu *B. pertussis* tretiranu formaldehidom, ali ne i za pojedine virulentne sastavnice klice. Nejasna je funkcionalna uloga navedenih protutijela, budući da prijenos imunog seruma nema učinak na broj klica u plućima neimuniziranih imunodostatnih miševa, nasuprot imunom serumu dobivenom nakon imunizacije bestaničnim cjepivom. Osim toga, u prethodnoj je studiji pokazano kako prijenos seruma inficiranih životinja ima mali učinak na rast klica u plućima i tijek infekcije kod imunodostatnih miševa (207). Međutim, ovdje je važno naglasiti kako antigeni tretirani formaldehidom mogu dovesti do ukriženog vezivanja protutijela i znatne promjene antigenske strukture, što onda može objasniti upitnu funkcijsku ulogu dokazanih protutijela koja reagiraju na cijelu klicu fiksiranu u formaldehidu, a koja nastaju u serumu nakon imunizacije staničnim cjepivom (213). Zanimljivo je kako miševi $B^{-/-}$KO rekonstruirani imunim limfocitima B pokazuju zaštitni učinak uz nepostojeću razinu protutijela specifičnih za klicu u njihovom serumu. Jednako tako, u drugom je istraživanju pokazano kako se prijenosom imunih limfocita T $CD4^{+}$ (dobivenih od imuniziranih životinja) postigne zaštitni učinak bez mjerljive razine protutijela specifičnih za *B. pertussis* (207). Navedeni rezultati samo su djelomično u suprotnosti s istraživanjima koja pokazuju zaštitnu ulogu protutijela specifičnih za virulentne sastavnice klice (14, 57, 210, 211). Svakako se ne može isključiti mogućnost da je zaštitni učinak prijenosa limfocita B rezultat lokalne proizvodnje protutijela koja uporabljenim postupcima nisu utvrđena, ali najvjerojatnije se ovaj razlog može isključiti s obzirom na brzinu uklanjanja klice iz pluća imuniziranih životinja. Istraživanja funkcije limfocita T dokazala su kako imunizirani $B^{-/-}$KO miševi imaju smanjenu pobudu limfocita T (209). Suprotno tomu, prikazani rezultati pokazuju da funkcija limfocita T nije nepovratno nedostatna budući da rekonstitucijski pokus ukazuje na brzo uklanjanje klice iz plućnog tkiva ovakvih životinja. Kod tako rekonstituiranih životinja se ne može utvrditi proizvodnja protutijela. Iako u svijetlu novijih spoznaja iz literaturnih izvora ne može se isključiti i

druga uloga limfocita B, posebice u razvitku M-stanica sluzničke imunosti (238). Osim toga, jednako tako kod unutarstanične klice *Francisellae tularensis* opisana je zaštitna uloga limfocita B koja se ne može pripisati samoj proizvodnji protutijela (239). Slično tomu, rezultati prikazani u ovoj disertaciji ukazuju na zaštitnu funkciju limfocita B koji se ne mogu objasniti proizvodnjom protutijela. Protutijela svakako doprinose zaštitnom mehanizmu kada su prisutna, ali jednako tako postoji zaštitni učinak limfocita B bez nazočnosti protutijela. Opisani rezultati mogu doprinijeti razumijevanju nepostojanja seroloških pokazatelja uspješnosti cijepljenja protiv *B. pertussis* (230-232). U svakom slučaju postoje i druge moguće specifične uloge limfocita B osim proizvodnje protutijela kao što su antigensko predočavanje limfocitima T, zatim međuodnos s drugim stanicama kao što su makrofazi, te proizvodnja upalnih posrednika (240). Svi navedeni mehanizmi mogu imati ulogu u zaštitnoj ulozi limfocita B u imunosti kod *B. pertussis*. Međutim, opisana zaštitna uloga imunih limfocita B u odsutnosti protutijela najviše govori o njihovoj ulozi u optimalnom predočavanju antigena. S druge strane, istraživanja o recirkulaciji limfocita B nakon rekonstitucije koja pokazuju kako ove stanice ne dospijevaju u udaljena tkiva kao što su pluća, ukazuju na njihovu moguću udaljenu ulogu koja bi se najviše očitovala kroz proizvodnju različitih citokinskih posrednika imunosnog odgovora (241-243).

Rezultati koji govore o važnosti citokinskog obrasca Th1 prikazani u ovoj disertaciji govore u prilog kontroverznom konceptu o unutarstaničnoj lokalizaciji *B. pertussis* u makrofazima odnosno u drugim stanicama, tj. da se dio ciklusa infekcije ovom klicom događa unutar stanice a dio izvan stanice (24, 228). Rezultati prikazani u ovoj disertaciji ukazuju na važnost kombinacije protutijela specifičnih za *B. pertussis*, zatim važnost limfocita B i to ne samo u proizvodnji protutijela, te konačno rasvjetljavaju ulogu limfocita T CD4 u smislu odgovora Th1 kroz proizvodnju odgovarajućeg citokinskog obrasca. U literaturi je opisano kako se najveći stupanj zaštite cijepljenjem protiv *B. pertussis* postiže kada se odgovor limfocita T CD4 usmjerava prema odgovoru Th1 (244). Specifična protutijela imaju najvjerojatnije ulogu u ograničavanju infekcije i bolesti kroz zaustavljanje kolonizacije klice na respiratornoj sluznici, te kroz neutralizaciju bakterijskih toksina i uklanjanje klice opsonizacijom i aktivacijom komplementa. Uloga pomoćničkih limfocita T tipa 1

posebno pokazana kroz proizvodnju i potrebu za IFN-γ može se ogledati u pobudi makrofaga i uništavanju klice. Dokazana različitost citokinskog obrasca ovisno o obliku cjepiva ima izvanrednu praktičnu važnost u razvitku novih oblika cjepiva koja bi u svojoj antigenskoj strukturi trebala imati elemente koji bi pobudili u ovoj disertaciji prikazane zaštitne sastavnice imunosnog odgovora na ovu infekciju.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem istraživanja u sklopu ove disertacije mogu se izvesti slijedeći zaključci o obrascima molekulskog i staničnog odgovora na infekciju i imunizaciju B. pertussis.

1. Izlaganje odraslih imunodostatnih miševa aerosolu klica *B. pertussis* uzrokuje infekciju. Tijekom sljedećih pet tjedna nakon izlaganja aerosolu iz tkiva dušnika i pluća mogu se izolirati i uzgojiti klice *B. pertussis*, no ne i nakon tog razdoblja. Međutim, do znatnog porasta titra imunoglobulina IgG specifičnih za virulentne sastavnice *B. pertussis* (protu FHA, protu PTX, protu LOS) dolazi tek u 6. tjednu nakon izlaganja, odnosno u vrijeme kada iz tkiva pluća i dušnika više nije moguće uzgojiti klice *B. pertussis*. Povišeni titar ovih protutijela ostaje najmanje tijekom sljedećih 26 tjedana.
2. Fiziološka imunonedostatnost neonatalnih miševa (miševi mlađi od 18 dana) uzrokuje povećanu smrtnost životinja pri infekciji klicom *B. pertussis*, a u plućima se takvih životinja može uzgojiti veći broj klica u odnosu na odrasle životinje. Odrasli imunonedostatni miševi *SCID* i atimični (*nude*) koji nemaju stanice specifične imunosti ne mogu nadzirati infekciju *B. pertussis* i ugibaju 3 do 5 tjedana nakon infekcije.
3. Porast izražaja mRNK upalotvornih citokina (IFN-γ, TNF-α, IL-12 i IL-6) javlja se u prvim tjednima infekcije i u vremenskoj se kinetici podudara s uklanjanjem klica iz respiratornog tkiva. Značajni izražaj mRNK za IL-4 se javlja u razdoblju poslije znatnog smanjena broja klica u dišnom tkivu. Pobuda tkivnog izražaja mRNK upalotvornih citokina (IFN-γ, TNF-α, IL-12 i IL-6) je prisutna u plućnom tkivu miševa *SCID* i atimičnih miševa (*nude)* u trenutku smrtnog ishoda infekcije *B. pertussis*.
4. Tijekom infekcije *B. pertussis* u regionalnim traheobronhalnim limfnim čvorovima mogu se izolirati limfociti T $CD4^+$ koji u uvjetima *ex vivo* proliferiraju s antigenima u formalinu uklopljene *B. pertussis*. U nadtalogu tako pobuđenih limfocita T dokazana je proizvodnja citokina IFN-γ i IL-2. Neutralizacija IFN-γ *in vivo* u odraslih imunodostatnih miševa uzrokuje veći broj klica *B. pertussis* u

tkivu pri infekciji. Infekcija miševa s izbačenim genom za IFN-γ rezultira manje učinkovitim obrascem otklanjanja klica pri infekciji.

5. Intranazalnom imunizacijom staničnim cjepivom za *B. pertussis* u imunodostatnim životinjama postiže se zaštitni učinak ovisan o dozi, koji rezultira potpunim otklanjanjem klice iz plućnog parenhima u trenutku kada se iz plućnog parenhima može uzgojiti najveći broj klica kod neimuniziranih životinja. Zaštitni, ali nešto slabiji učinak postiže se ako se kao intranazalno cjepivo koristi bestanično cjepivo.
6. Limfociti T izolirani iz područnih traheobronhalnih limfnih čvorova cjepivom imuniziranih životinja proliferiraju u uvjetima *ex vivo* samo ako se pobuđuju antigenom uporabljenim u postupku imunizacije. U nadtalogu limfocita T koji proliferiraju nakon pobude staničnim cjepivom može se dokazati proizvodnja IFN-γ. Limfociti T koji proliferiraju nakon pobude bestaničnim cjepivom proizvode IL-4 i IL-10.
7. mRNK za IFN-γ i IL-4 u plućima različito imuniziranih životinja pokazuje specifičan obrazac izražaja ovisno o pripravku cjepiva. U plućnom tkivu životinja imuniziranih bestaničnim cjepivom utvrđeno je smanjenje izražaja mRNK za IFN-γ tijekom infekcije, Ovo smanjenje izražaja nije prisutno u životinja koje su imunizirane staničnim cjepivom za *B. pertussis*. Izražaj mRNK za IL-4 potaknut je kod jednog i drugog oblika imunizacije.
8. U serumu miševa imuniziranih staničnim cjepivom za *B. pertussis* ne postoji korelacija između razine protutijela i zaštitnog učinka cjepiva. Nasuprot tomu, značajan se porast titra protutijela specifičnih za *B. pertussis* razvija u serumu životinja imuniziranih bestaničnim cjepivom. Pasivno prenošenje seruma dobivenoga iz životinja imuniziranih s bestaničnim cjepivom ima zaštitni učinak pri infekciji *B. pertussis*, a prijenos seruma dobivenoga od životinja imuniziranih cijelom klicom nema zaštitni učinak.
9. Imunizacija staničnim ili bestaničnim cjepivom u životinja s limfopenijom B nema zaštitni učinak. Djelomična zaštita se može postići prijenosom imunih limfocita B dobivenih od normalnih životinja imuniziranih cijelom klicom, bez značajnijeg titra serumskih protutijela u serumu rekonstruiranih životinja.

Imunizacija cijelom klicom *B. pertussis* ovisi o nazočnosti pomoćničkih limfocita T CD4 $^{+}$, a ne ovisi o prisutnosti limfocita T CD8 $^{+}$.

7. SAŽETAK

U ovoj disertaciji analizirana su svojstva staničnog i molekulskog odgovora na infekciju i imunizaciju u mišjem modelu infekcije *B. pertussis*. Dobiveni rezultati pokazuju da klica *B. pertussis* uspješno kolonizira respiratorni epitel, odnosno da se uzročnik može uzgojiti iz tkiva pluća i dušnika nakon aerosolne infekcije eksperimentalnih životinja. Nakon 5 tjedana infekcije odrasli imunodostatni miševi otklanjaju klice iz respiratornog tkiva. Neonatalni miševi ugibaju, jer zbog svoje imunonedostatnosti ne mogu nadzirati infekciju. Kada nastupi uklanjanje klice iz plućnog tkiva, tada se u serumu i bronhoalveolarnom ispirku javljaju protutijela specifična za virulentne sastavnice *B. pertussis*. U područnim traheobronhalnim limfnim čvorovima inficiranih životinja može se dokazati nazočnost limfocita T $CD4^+$ specifičnih za *B. pertussis* koji proliferiraju u uvjetima *ex vivo* pri pobudi s antigenima klice fiksirane u formalinu. U nadtalogu tako pobuđenih limfocita T može se dokazati proizvodnja IFN-γ ali ne i IL-4, odnosno IL-10. U tijeku praćenja infekcije nazočnost serumskih i sluzničkih protutijela specifičnih za *B. pertussis* može se dokazati samo u razdoblju kada dolazi do uklanjanja klica iz respiratornog tkiva. Suprotno tomu, nakon infekcije izražaj mRNK upalotvornih citokina u plućnom tkivu kolerira s količinom klica *B. pertussis* uzgojenih iz tkiva. Imunonedostatne odrasle životinje s nedostatkom limfocita T i B (miševi SCID) i one samo s nedostatkom limfocita T (atimični miševi nude) koje ugibaju 3-5 tjedana nakon infekcije pokazuju važnost stanica specifične imunosti u nadzoru infekcije *B. pertussis*. Ove imunonedostatne životinje u trenutku ugibanja pokazuju pojačani izražaj mRNK za upalotvorne citokine. Nakon tjedan dana infekcije u plućnom tkivu imunodostatnih miševa javlja se izražaj mRNK za IFN-γ. Važnost IFN-γ pokazana je pokusima neutralizacije protutijelima ovog citokina *in vivo*, odnosno tijekom infekcije kod IFN-$\gamma^{-/-}$KO životinja koje pokazuju veći broj uzgojenih klica iz plućnog tkiva. Suprotno tomu, neutralizacija IL-4 nema učinak na broj uzgojenih klica.

Intranazalna imunizacija odraslih miševa staničnim odnosno bestaničnim cjepivom *B. pertussis* ima zaštitni učinak u aerosolnom modelu infekcije. Ova dva oblika imunizacije se razlikuju u zaštitnom mehanizmu što se ogleda u činjenici da se

kod imunizacije cijelim klicama ne može utvrditi korelacija između broja kolonija klica u tkivima s razinom protutijela specifičnih za *B. pertussis*. Limfociti T dobiveni iz područnih limfnih čvorova proizvode IFN-γ ako su dobiveni iz životinja imuniziranih staničnim cjepivom. Suprotno njima, limfociti T dobiveni iz miševa imuniziranih bestaničnim cjepivom proizvode IL-4 i IL-10. Miševi s izbačenim limfocitima B ne mogu se u potpunosti zaštititi imunizacijom staničnim cjepivom. Rekonstitucija imunim limfocitima B ima zaštitni učinak bez postojanja specifičnih protutijela u serumu rekonstituiranih životinja. Imunizacija miševa koji nemaju limfocite T ili samo limfocite T $CD4^+$ nije moguća. Suprotno tomu, miševi s nedostatkom limfocita T $CD8^+$ mogu se uspješno imunizirati staničnim cjepivom za *B. pertussis*. Prema tomu, imunizacija cijelom klicom *B. pertussis* zahtijeva prisutnost limfocita T $CD4^+$ i limfocita B. Ovi rezultati pokazuju kako postoje dva različita mehanizma zaštite kod imunizacije protiv infekcije *B. pertussis*. Jedan oblik imunizacije pokazuje povezanost s razinom protutijela specifičnih za *B. pertussis*, a kod drugoga ova veza nije dokazana. Rezultati prikazani u ovoj disertaciji mogu doprinijeti razumijevanju mehanizma infekcije *B. pertussis* i zaštitnih mehanizama imunizacije za ovu klicu, što može imati praktičnu važnost u stvaranju novih oblika cjepiva protiv ove zarazne bolesti.

8. SUMMARY

Jerko Barbić

Molecular and cellular properties of immunopathophysiologic response to *Bordetella pertussis* bacterium and vaccine in the mouse model

Cellular and molecular response to infection and immunisation in mouse model of *B. pertussis* infection were studied in the disertation. The results show that *B. pertussis* microorganisms successfully colonize respiratory epithelium, i.e. the bacteria could be cultured from the lung and tracheal tissue taken from previously infected experimental animals. Five weeks after infection adult immunocompetent mice clear away microorganisms from respiratory tissue. Neonatal mice die due to immunological incompetence that makes them unable to control infection. When elimination of microorganisms from lung tissue ensues, specific antibodies against virulent components of *B. pertussis* appear in serum and bronchoalveolar lavage fluid. The presence of $CD4^+$ T lymphocytes specific for *B. pertussis* that proliferate after *ex vivo* stimulation by antigens of microorganisms fixated in formalin could be detected in regional tracheobronchal lymph nodes of the infected animals. The production of IFN-γ, but not IL-4 nor IL-10, can be demonstrated in the supernatant of thus stimulated T lymphocytes. During the follow up of the infection, specific serum and mucosal antibodies against *B. pertussis* could be demonstrated only in the period of elimination of the microorganisms from respiratory tissue. Unlike this, the expression of inflammatory cytokines mRNK in lung tissue after infection correlates with the amount of *B. pertussis* bacteria cultured from the tissues. Immunologically defective adult animals lacking in T and B lymphocytes (SCID mice), as well as those lacking only in T lymphocytes (atymic mice, nude) which die 3-5 weeks after infection, show the importance of cells of specific immunity in the control of *B. pertussis* infection. The immunodeficient animals show enhanced expression of inflammatory cytokines mRNK at the death time. The expression of IFN-γ mRNK in lung tissue of immunocompetent mice appear a week after the infection. The importance of IFN-γ has been demonstrated by the *in vivo* neutralization of the cytokines by antibodies

and by the demonstration of more microorganisms bred from lung tissue of infected IFN-$\gamma^{-/-}$KO animals. Unlike this, IL-4 neutralization does not affect the number of bred microorganisms.

Intranasal immunization of adult mice by cellular or acellular *B. pertussis* vaccine has protective effect in the aerosol model of infection. These two forms of immunization differ in the protective mechanism, which reflects in the lack of correlation with titer of antibodies against *B. pertussis* when whole microorganisms are applied. T lymphocytes from regional lymph nodes produce IFN-γ if taken from animals immunized with cellular vaccine. Unlike this, T lymphocytes from mice immunized with acellular vaccine produce IL-4 and IL-10. Mice knocked out for B lymphocytes cannot be completely immunized with cellular vaccine. Reconstitution with immune B lymphocytes has protective effect without presence of specific antibodies in the serum of reconstituted animals. Immunization of mice lacking in T lymphocytes or lacking only in $CD4^+$ T lymphocytes is not possible. Unlike this, mice deficient in $CD8^+$ T lymphocytes can be successfully immunized with cellular *B. pertussis* vaccine. Based on these evidences, immunization with whole *B. pertussis* microorganism requires presence of $CD4^+$ T lymphocytes and B lymphocytes. The results indicate the presence of two different protective mechanisms of immunization against *B. pertussis* infection. One of them demonstrates a correlation with the titer of specific *B. pertussis* antibodies, while the other lacks in that relation. The results presented in the thesis could contribute in comprehension of the mechanisms of *B. pertussis* infection and protective mechanisms of immunisation against that bacterium, which could be practically important for production of new forms of vaccines against that infective disease.

9. LITERATURA

1. http://www.sanger.ac.uk/Projects/B.pertussis, 2002.
2. Pittman M. The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. Pediatr Infect Dis 1984; 3(5): 467-86.
3. Kerr JR, Matthews RC. Bordetella pertussis infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19(2): 77-88.
4. Farizo KM, Cochi SL, Zell ER, Brink EW, Wassilek SG, Patriarca PA. Epidemiological features of pertussis in the United States, 1980-1989. Clin Infect Dis 1992; 14(3):708-1
5. Muller AS, Leeuwenburg J, Pratt DS. Pertussis: epidemiology and control. Bull World Health Organ 1986; 64(2): 321-31.2
6. Edwards KM, Lawrence E, Wright PF. Diphtheria, tetanus, and pertussis vaccine. A comparison of the immune response and adverse reactions to conventional and acellular pertussis components. Am J Dis Child 1986; 140(9):867-71.
7. Miller D, Wadswoth J, Diamond J, Ross E. Pertussis vaccine and whooping cough as risk factors in acute neurological illness and death in young children. Dev Biolo Stand 1985; 61: 389-94.
8. Cherry JD, Baraff LJ, Hewlett E. The past, present, and future of pertussis. The role of adults in epidemiology and future control. West J Med 1989; 150(3): 319-28.
9. Edwards KM. Acellular pertussis vaccines--a solution to the pertussis problem? J Infect Dis 1993; 168(1): 15-20.
10. Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden protective efficacy and adverse events. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. Lancet 1988; 1(8592): 955-60.
11. Shahin RD, Mink C, Wiedermann BL, Meade BD. Laboratory correlates of protection and protective immunity to Bordetella pertussis. U: Ciardi JE, Keith JM ur. Genetically Engineered Vaccines. New York and London: Plenum Press; 1992, str 287-292.

12. Weiss AA, Hewlett EL. Virulence factors of Bordetella pertussis. Annu Rev Microbiol 1986; 40: 661-86.
13. Cookson BT, Cho HL, Herwaldt LA, Goldman WE. Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of Bordetella pertussis. Infect Immun 1989; 57(7): 2223-9.
14. Shahin RD, Brennan MJ, Li ZM, Meade BD, Manclarck CR. Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69-kD outer membrane protein of Bordetella pertussis. J Exp Med 1990; 171(1): 63-73.
15. Locht C, Bertin P, Menozzi FD, Renauld G. The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent Bordetella spp. Mol Microbiol 1993; 9(4): 653-60.
16. Domenighini M, Relman D, Capiau S i sur. Genetic characterization of Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. Mol Microbiol 1990; 4(5): 787-800.
17. Willems RJ, Geuijen C, Van der Heide HG i sur. Isolation of a putative fimbrial adhesin from Bordetella pertussis and the identification of its gene. Mol Microbiol 1993; 9(3): p. 623-34.
18. Guedin S, Willerey E, Tommassen J i sur. Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin. J Biol Chem 2000; 275(39): 30202-10.
19. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62(2): 379-433.
20. Prasad SM, Yin Y, Rodzinski E, Toumanen ER, Masure HR. Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from Bordetella pertussis. Infect Immun 1993; 61(7): 2780-5.
21. Menozzi FD, Mutombo R, Renauld G. i sur. Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of Bordetella pertussis. Infect Immun 1994; 62(3): 769-78.
22. Relman D, Toumanen E, Falkow S, Golnbock DT, Saukkonen K, Wright SD. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M

beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of Bordetella pertussis. Cell 1990; 61(7): 1375-82.

23. Ishibashi Y, Claus S, Relman DA. Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). J Exp Med 1994; 180(4):1225-33.
24. Saukkonen K, Burroughs M, Prasad S, Toumanen E. Integrin-mediated localization of Bordetella pertussis within macrophages: role in pulmonary colonization. J Exp Med 1991; 173(5):1143-9.
25. Finlay, B.B. Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol Mol Biol Rev 1997; 61(2):136-69.
26. Abramson T, Kedem H, Relman D.A. Proinflammatory and proapoptotic activities associated with Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin. Infect Immun 2001; 69(4): 2650-8.
27. Tuomanen E, Weiss A. Characterization of two adhesins of Bordetella pertussis for human ciliated respiratory-epithelial cells. J Infect Dis 1985; 152(1):118-25.
28. Kimura A, Mountzours KT, Relman DA, Falkow S, Cowell JL. Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. Infect Immun 1990; 58(1):7-16.
29. Ashworth LA, Dowsett AB, Irons LI, Robinson A. The location of surface antigens of Bordetella pertussis by immuno-electron microscopy. Dev Biolo Stand 1985; 61:143-51.
30. Preston NW. Essential immunogens in human pertussis: the role of fimbriae. Dev Biolo Stand 1985; 61:137-41.
31. Savelkoul PH, De Kerf DP, Willems RJ, Mooi FR, Van der Zeijst BA, Gaastra W. Characterization of the fim2 and fim3 fimbrial subunit genes of Bordetella bronchiseptica: roles of Fim2 and Fim3 fimbriae and flagella in adhesion. Infect Immun 1996; 64(12):5098-105.

32. Geuijen CA, Willems RJ, Bongaerts M, Top J, Gielen H, Mooi FR. Role of the Bordetella pertussis minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. Infect Immun 1997; 65(10): 4222-8.
33. Hazenbos WL, Van den Berg BM, Van Furth R. Very late antigen-5 and complement receptor type 3 cooperatively mediate the interaction between Bordetella pertussis and human monocytes. J Immunol 1993; 151(11): 6274-82.
34. Leininger E, Roberts M, Kenimer JG i sur. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing Bordetella pertussis surface protein that promotes adherence of mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88(2):345-9.
35. Emsley P, Charles IG, Fairweather NF, Isaacs NW. Structure of Bordetella pertussis virulence factor P.69 pertactin. Nature 1996; 381(6577): 90-2.
36. Van den Berg BM, Beekhuizen H, Willems RJ, Mooi FR, Van Furth R. Role of Bordetella pertussis virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. Infect Immun 1999; 67(3): 1056-62.
37. Locht C, Keith JM, Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. Science 1986; 232(4755):1258-64.
38. Nicosia A, Bartolini A, Perugini M, Rappuoli R. Expression and immunological properties of the five subunits of pertussis toxin. Infect Immun 1987; 55(4): 963-7.
39. Hazes B, Boodhoo A, Cockle A, Read RJ. Crystal structure of the pertussis toxin-ATP complex: a molecular sensor. J Mol Biol 1996; 258(4): 661-71.
40. Sekura RD, Fish F, Manclarck CR, Meade B, Zhang YL. Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. J Biol Chem 1983; 258(23):14647-51.
41. Witvliet MH, Vogel M, Wiertz EJ, Poolman JT. Interaction of pertussis toxin with human T lymphocytes. Infect Immun 1992; 60(12):5085-90.
42. Fernandez R, Weiss A. Cloning and sequencing of a Bordetella pertussis serum resistance locus. Infect Immun 1994; 62(11):4727-4738.

43. Barnes MG, Weiss AA. BrkA protein of Bordetella pertussis inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition. Infect Immun 2001; 69(5):3067-72.
44. Hewlett EL, Gray L, Allietta M, Ehrmann I, Gordon VM, Gray MC. Adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis. Conformational change associated with toxin activity. J Biol Chem 1991; 266(26): 17503-8.
45. Weingart CL, Weiss AA. Bordetella pertussis virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. Infect Immun 2000; 68(3): 1735-9.
46. Khelef N, Zychlinsky A, Guiso N. Bordetella pertussis induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. Infect Immun 1993; 61(10):4064-71.
47. Hewlett EL, Urban MA, Manclarck CR, Wolff J. Extracytoplasmic adenylate cyclase of Bordetella pertussis. Proc Natl Acad Sci U S A 1976; 73(6):1926-30.
48. Rogel A, Hanski E. Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. J Biol Chem 1992; 26**7**(31):22599-605.
49. Osicka R, Osickova A, Basar T i sur. Delivery of CD8(+) T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by Bordetella pertussis adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. Infect Immun 2000; 68(1):247-56.
50. Friedman RL, Nordensson K, Wilson L, Akporiaye ET, Yocum DE. Uptake and intracellular survival of Bordetella pertussis in human macrophages. Infect Immun 1992; 60(11):4578-85.
51. Goldman WE, Herwaldt LA. Bordetella pertussis tracheal cytotoxin. Dev Biolo Stand 1985; 61: 103-11.
52. Strauss E. New clues to whooping cough pathology Science 1999; 285(5429): 811-3.
53. Endoh M, Nagai M, Nakase Y. Effect of Bordetella heat-labile toxin on perfused lung preparations of guinea pigs. Microbiol Immunol 1986; 30(12):1239-46.

54. Schmidt G, Goehring UM, Schirmer J, Lerm M, Aktories K. Identification of the C-terminal part of Bordetella dermonecrotic toxin as a transglutaminase for rho GTPases. J Biol Chem 1999; 274(45):31875-81.
55. Harvill ET, Preston A, Cotter PA, Allen AG, Maskell DJ, Miller JF. Multiple roles for Bordetella lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. Infect Immun 2000; 68(12): 6720-8.
56. Mountzouros KT, Kimura A, Cowell JL. A bactericidal monoclonal antibody specific for the lipooligosaccharide of Bordetella pertussis reduces colonization of the respiratory tract of mice after aerosol infection with B. pertussis. Infect Immun 1992; 60(12): 5316-8.
57. Caroff M, Brisson J, Martin A, Karibian D. Structure of the Bordetella pertussis 1414 endotoxin. FEBS Lett 2000; 477(1-2): 8-14.
58. Pradel E, Guiso N, Menozzi FD, Locht C. Bordetella pertussis TonB, a Bvg-independent virulence determinant. Infect Immun 2000; 68(4): 1919-27.
59. Deitsch KW, Moxon ER, Wellems TE. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. Microbiol Mol Biol Rev 1997; 61(3):281-93.
60. Knapp S, Mekalanos JJ. Two trans-acting regulatory genes (vir and mod) control antigenic modulation in Bordetella pertussis. J Bacteriol 1988; 170(11):5059-66.
61. Merkel TJ, Stibitz S, Keith JM, Leef M, Shahin R. Contribution of regulation by the bvg locus to respiratory infection of mice by Bordetella pertussis. Infect Immun 1998; 66(9): 4367-73.
62. Uhl M, Miller J. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the Bordetella pertussis BvgAS phosphorelay EMBO J 1996; 15(5): 1028-1036.
63. Scarlato V, Arico B, Prugnola A, Rappuoli R. Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in Bordetella pertussis. EMBO J 1991; 10(12):3971-3975.

64. Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. Infect Immun 2000; 68(12):6511-8.
65. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. Annu Rev Immunol 1994; 12:991-1045.
66. Crouch E, Hartshorn K, Ofek I. Collectins and pulmonary innate immunity. Immunol Rev 2000; 173: 52-65.
67. Travis SM, Singh PK, Welsh MJ. Antimicrobial peptides and proteins in the innate defense of the airway surface. Curr Opin Immunol 2001; 13: 89-95.
68. Diamond G, Legarda D, Ryan LK. The innate immune response of the respiratory epithelium. Immunol Rev 2000; 173:27-38.
69. Akinbi HT, Epaud R, Bhatt H, Weaver TE. Bacterial killing is enhanced by expression of lysozyme in the lungs of transgenic mice. J Immunol 2000; 165(10):5760-6.
70. LeVine AM, Whitsett JA, Gvozdz JA. Distinct effects of surfactant protein A or D deficiency during bacterial infection on the lung. J Immunol 2000; 165(7):3934-40.
71. Sato T, Endo Y, Matshushita M, Fujita T. Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose-binding protein. Int Immunol 1994; 6(4):665-9.
72. Thiel S, Vorup Jensen T, Stover CM i sur. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. Nature 1997; 386(6624):506-10.
73. Lachmann PJ, Hughes Jones NC. Initiation of complement activation. Springer Semin Immunopathol 1984; 7(2-3):143-62.
74. Tack BF. The beta-Cys-gamma-Glu thiolester bond in human C3, C4, and alpha 2-macroglobulin. Springer Semin Immunopathol 1983; 6(4): 259-82.
75. Pangburn MK, Schreiber RD, Muller Eberhard HJ. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. J Exp Med 1981; 154(3):856-67.

76. Nicol PA, Lachmann PJ, The alternate pathway of complement activation. The role of C3 and its inactivator (KAF). Immunology 1973; 24(2): 259-75.
77. Pangburn MK, Muller Eberhard HJ. Relation of putative thioester bond in C3 to activation of the alternative pathway and the binding of C3b to biological targets of complement. J Exp Med 1980; 152(4): 1102-14.
78. Medicus RG, Gotze O, Muller Eberhard HJ. Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potentiation of the pathway. J Exp Med 1976; 144(4):1076-93.
79. Kirschfink M. Controlling the complement system in inflammation. Immunopharmacology 1997; 38(1-2):51-62.
80. Tedesco F, Pausa M, Nordon E, Introna M, Mantovani A, Dobrina A. The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. J Exp Med 1997; 185(9):1619-27.
81. Pangburn MK. Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement. Immunopharmacology 2000; 49(1-2):149-57.
82. Szalai AJ, Van Ginkel FW, Wang Y, McGhee JR, Volnakis JE. Complement-dependent acute-phase expression of C-reactive protein and serum amyloid P-component. J Immunol 2000; 165(2): 1030-5.
83. Mold C, Gewurz H, Du Clos TW. Regulation of complement activation by C-reactive protein. Immunopharmacology 1999; 42(1-3):23-30.
84. Kovač Z. Upale. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, ur. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002, str. 471-99.
85. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol 2000; 18:217-42.
86. Jones SA, Moser B, Thelen M. A comparison of post-receptor signal transduction events in Jurkat cells transfected with either IL-8R1 or IL-8R2. Chemokine mediated activation of p42/p44 MAP-kinase (ERK-2). FEBS Lett 1995; 364(2): 211-4.

87. Burns AR, Bowden RA, Abe Y i sur. P-selectin mediates neutrophil adhesion to endothelial cell borders. J Leukoc Biol 1999; 65(3): 299-306.
88. Berton G. Tyrosine kinases in neutrophils. Curr Opin Hematol 1999; 6(1):51-8.
89. Suchard SJ, Hinkovska Galcheva V, Mansfield PJ, Boxer LA, Shaymann JA. Ceramide inhibits IgG-dependent phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. Blood 1997; 89(6):2139-47.
90. Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. J Immunol Methods 1999; 232(1-2):3-14.
91. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. Blood 1997; 89(10):3503-3521.
92. Levy O. Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. Blood 2000; 96(8):2664-2672.
93. Wiese A, Brandenburg K, Carroll SF, Rietschel ET, Seydel U. Mechanisms of action of bactericidal/permeability-increasing protein BPI on reconstituted outer membranes of gram-negative bacteria. Biochemistry 1997; 36(33): 10311-9.
94. Elass Rochard E, Legrand D, Salmon V i sur. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein. Infect Immun 1998; 66(2): 486-91.
95. Gabay JE, Almeida RP. Antibiotic peptides and serine protease homologs in human polymorphonuclear leukocytes: defensins and azurocidin. Curr Opin Immunol 1993; 5(1):97-102.
96. Arima H, Ibrhim HR, Kinoshita T, Kato A. Bactericidal action of lysozymes attached with various sizes of hydrophobic peptides to the C-terminal using genetic modification. FEBS Lett 1997; 415(1):114-8.
97. Sohnle PG, Hunter MJ, Hahn BJ, Chazin WJ. Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). J Infect Dis 2000; 182(4):1272-5.
98. Gallin JI. Inflammation. U: Paul WE, ur. Fundamental Immunology. New York: Raven Press; 1993, str.1015-33.
99. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. Science 1996; 272(5258): 50-3.

100. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Curr Opin Immunol 1997; 9(1): 4-9.
101. Williams MJ. Regulation of antibacterial and antifungal innate immunity in fruitflies and humans. Adv Immunol 2001; 79:225-59.
102. Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. Annu Rev Immunol 1998; 16:201-23.
103. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. Nature 1983; 302(5909):575-81.
104. Babbitt BP, Allen PM, Haber E, Unanue ER. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. Nature 1985; 317(6035):359-61.
105. Crabtree GR. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. Science 1989; 243(4889):355-61.
106. Garcia KC. Molecular interactions between extracellular components of the T-cell receptor signaling complex. Immunol Rev 1999; 172:73-85.
107. Garcia KC, Teyton L, Wilson IA. Structural basis of T cell recognition. Annu Rev Immunol 1999; 17: 369-97.
108. Kaye PM. Costimulation and the regulation of antimicrobial immunity. Immunol Today 1995; 16(9): 423-7.
109. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 1986; 136(7):2348-57.
110. Berkower I, Buckenmeyer GK, Gurd FR, Longo DL, Berzofsky JA. Identification of distinct predominant epitopes recognized by myoglobin-specific T cells under the control of different Ir genes and characterization of representative T cell clones. J Immunol 1984; 132(3): 1370-8.
111. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol 1989; 7:145-73.
112. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. Cell 1994; 76(2): 241-51.

113. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. J Immunol 1990; 145(11):3796-806.
114. Parish CR. The relationship between humoral and cell-mediated immunity. Transplan Rev 1972; 13:35-66.
115. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). Ann Allergy Asthma Immunol 2000; 85(1): 9-18.
116. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today 1996; 17(3): 138-46.
117. Evavold BD, Allen PM. Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. Science 1991; 252(5010):1308-10.
118. Pfeiffer C, Stein J, Southwood S, Ketelaar H, Sette A, Bottomly K. Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. J Exp Med 1995; 181(4):1569-74.
119. Fox BS. Antigen presenting cell-derived co-stimulatory signals can selectively regulate IL-2 and IL-4 production from a Th0 cell hybridoma. Int Immunol 1993; 5(4):323-30.
120. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. N Engl J Med 2000; 343(2):108-17.
121. Launois P, Swihart KG, Milon G, Louis JA. Early production of IL-4 in susceptible mice infected with Leishmania major rapidly induces IL-12 unresponsiveness. J Immunol 1997; 158(7):3317-24.
122. Gagliardi MC, Sallusto F, Marinaro M, Langenkamp A, Lanzavecchia A, De Magistris MT. Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licences them for Th2 priming. Eur J Immunol 2000; 30(8):2394-403.
123. Zhong G, Sousa CR, Germain RN. Antigen-unspecific B cells and lymphoid dendritic cells both show extensive surface expression of processed antigen-major histocompatibility complex class II complexes after soluble protein exposure in vivo or in vitro. J Exp Med 1997; 186(5): 673-82.
124. Pulendran B, Smith JL, Caspray G i sur. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(3):1036-41.

125. Maldonado Lopez R, De Smedt T, Michel P i sur. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. J Exp Med 1999; 189(3): 587-92.
126. d Ostiani CF, Del Sero G, Bacci A i sur. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus Candida albicans. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. J Exp Med 2000; 191(10):1661-74.
127. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. Adv Immunol 1998; 70: 83-243.
128. Heinzel FP, Rerko PM, Ling P, Hakimi J, Schoenhaut DS. Interleukin 12 is produced in vivo during endotoxemia and stimulates synthesis of gamma interferon. Infect Immun 1994; 62(10):4244-9.
129. Corry DB, Reiner SL, Linsley PS, Locksley RM. Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. J Immunol 1994; 153(9):4142-8.
130. Akira S. The role of IL-18 in innate immunity. Curr OpinImmunol 2000; 12(1): 59-63.
131. Monteforte GM, Takeda K, Rodriguez Sosa M, Akira S, David JR, Satoskar AR. Genetically resistant mice lacking IL-18 gene develop Th1 response and control cutaneous Leishmania major infection. J Immunol 2000; 164(11): 5890-3.
132. Farrar JD, Smith JD, Murphy TL, Murphy KM. Recruitment of Stat4 to the human interferon-alpha/beta receptor requires activated Stat2. J Biol Chem 2000; 275(4):2693-7.
133. Agarwal S, Rao A. Long-range transcriptional regulation of cytokine gene expression. Curr Opin Immunol 1998; 10(3):345-52.
134. Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD i sur. Signaling and transcription in T helper development. Annu Rev Immunol 2000; 18:451-94.
135. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zxang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell 2000; 100(6): 655-69.

136. De Wit D, Van Mechelen M, Ryelandt M i sur. The injection of deaggregated gamma globulins in adult mice induces antigen-specific unresponsiveness of T helper type 1 but not type 2 lymphocytes. J Exp Med 1992; 175(1):9-14.
137. Wang M, Saxon A, Diaz Sanchez D. Early IL-4 production driving Th2 differentiation in a human in vivo allergic model is mast cell derived. Clin Immunol 1999; 90(1): 47-54.
138. Singh N, Hong S, Scherer DC i sur. Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. J Immunol 1999; 163(5):2373-7.
139. Finkelman FD, Morris SC, Orekhova T i sur. Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. J Immunol 2000; 164(5):2303-10.
140. Jankovic D, Kullberg MC, Caspar P, Paul WE, Sher A. Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4+ lymphocytes with a Th2 cytokine profile. J Immunol 2000; 164(6): 3047-55.
141 Velupillai P, Harn DA. Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(1): 18-22.
142. Holland MJ, Harcus YM, Riches PL, Maizels RM. Proteins secreted by the parasitic nematode Nippostrongylus brasiliensis act as adjuvants for Th2 responses. Eur J Immunol 2000; 30(7):1977-87.
143. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. Annu Rev Immunol 1996; 14:233-58.
144. Gause WC, Chen SJ, Greenwald RJ i sur. CD28ndependence of T cell differentiation IL-4 production varies with particular type 2 immune response. J Immunol 1997; 158(9):4082-9.
145. Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. Annu Rev Immunol 1997; 15:297-322.

146. Rees W, Bender J, Teague TK i sur. An inverse relationship between T cell receptor affinity and antigen dose during CD4(+) T cell responses in vivo and in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(17):9781-6.
147. Greenwald RJ, Lu P, Halvorson MJ i sur. Effects of blocking B7-1 and B7-2 interactions during a type 2 in vivo immune response. J Immunol 1997; 158(9):4088-96.
148. Shanafelt MC, Kang I, Barthold SW, Bockenstdelt LK. Modulation of murine Lyme borreliosis by interruption of the B7/CD28 T-cell costimulatory pathway. Infect Immun 1998; 66(1):266-71.
149. Schweitzer AN, Sharpe AH. Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. J Immunol 1998; 161(6):2762-71.
150. Guler ML, Gorham DJ, Hsieh CS i sur. Genetic susceptibility to Leishmania: IL-12 responsiveness in TH1 cell development. Science 1996; 271(5251): 984-7.
151. Kubo M, Yamashita M, Abe R i sur. CD28 costimulation accelerates IL-4 receptor sensitivity and IL-4-mediated Th2 differentiation. J Immunol 1999; 163(5):2432-42.
152. Kuchroo VK, Das MP, Brown JA i sur. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. Cell 1995; 80(5):707-18.
153. Tivol EA, Borriello F, Schwitzer AN, Lynch WP, Blustone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. Immunity 1995; 3(5): 541-7.
154. Lu P, Urban JF, Zhou XD i sur. CD40-mediated stimulation contributes to lymphocyte proliferation, antibody production, eosinophilia, and mastocytosis during an in vivo type 2 response, but is not required for T cell IL-4 production. J Immunol 1996; 156(9):3327-33.

155. Akiba H, Miyahira Y, Atsuta M i sur. Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. J Exp Med 2000; 191(2): 375-80.
156. Pippig SD, Penna Rossi C, Long J i sur. Robust B cell immunity but impaired T cell proliferation in the absence of CD134 (OX40). J Immunol 1999; 163(12): 6520-9.
157. Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C i sur. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. Immunity 2000; 13(1):95-105.
158. Rengarajan J, Mittelstadt PR, Mages HW i sur. Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. Immunity 2000; 12(3): 293-300.
159. Ranger AM, Oukka M, Rengarajan J, Glimcher LH. Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. Immunity 1998; 9(5):627-35.
160. Kim JI, Ho IC, Grusby ML, Glimcher LH. The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. Immunity 1999; 10(6): 745-51.
161. Svetić A, Finkelman FD, Jian YC i sur. Cytokine gene expression after in vivo primary immunization with goat antibody to mouse IgD antibody. J Immunol 1991; 147(7):2391-7.
162. Rodriguez Palmero M, Hara T, Thumbs A, Hunig T. Triggering of T cell proliferation through CD28 induces GATA-3 and promotes T helper type 2 differentiation in vitro and in vivo. Eur J Immunol 1999; 29(12): 3914-24.
163. Mestecky J, McGhee JR. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. Adv Immunol 1987; 40:153-245.
164. Czerkinsky C, Anjuere F, McGhee JR i sur. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. Immunol Rev 1999; 170:197-222.

165. Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. Annu Rev Immunol 1996; 14:275-300.
166. Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. Immunol Rev 1997; 156:145-66.
167. Persson CG, Erjefalt JS, Greiff L i sur. Contribution of plasma-derived molecules to mucosal immune defence, disease and repair in the airways. Scand J Immunol 1998; 47(4):302-13.
168. Brandtzaeg P, Farstadt IN, Harladsen G, Jahnsen FL. Cellular and molecular mechanisms for induction of mucosal immunity. Dev Biolo Stand 1998; 92:93-108.
169. Johansen FE, Braathen R, Brandtzaeg P. Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. Scand J Immunol 2000; 52(3): 240-8.
170. Kaetzel CS, Robinson JK, Chintalacharuvu KR, Vaerman JP, Lamm ME. The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88(19):8796-800.
171. Bouvet JP, Fischetti VA. Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. Infect Immun 1999; 67(6):2687-91.
172. Brandtzaeg P, Baekkevald ES, Farstadt IN i sur. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? Immunol Today 1999; 20(3):141-51.
173. Boismenu R, Havran WL. Gammadelta T cells in host defense and epithelial cell biology. Clin Immunol Immunopathol 1998; 86(2): 121-33.
174. Jung HC, Eckmann L, Yang SK i sur. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. J Clin Invest 1995; 95(1):55-65.
175. Ten great public health achievemnts-United States, 1990-1999. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1999; 48(12):241-3.

176. Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben Efraim S, Gupta CK. Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity. Vaccine 1993; 11(3): 293-306.

177 Bachmann MF, Zinkernagel RM, Oxenius A. Immune responses in the absence of costimulation: viruses know the trick. J Immunol 1998; 161(11):5791-4.

178 Gregoriadis G. Immunological adjuvants: a role for liposomes. Immunol Today 1990; 11(3):89-97.

179. Schijns VE. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. Curr Opin Immunol 2000; 12(4):456-63.

180. Iwasaki A, Stiernholm BJ, Chan AK, Berinstein NL, Barber BH. Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines. J Immunol 1997; 158(10):4591-601.

181. Todd CW, Lee E, Balusubramanian M i sur. Systematic development of a block copolymer adjuvant for trivalent influenza virus vaccine. Dev Biolo Stand 1998; 92:341-51.

182. Aldovini A, Young R.. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. Nature 1991; 351(6326): 479-82.

183. Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M i sur. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. FASEB J 1999; 13(13):1796-9.

184. Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ. Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. J Infect Dis 2000; 182(1):302-5.

185. Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. Annu Rev Immunol 1997; 15: 617-48.

186. Mestecky J, McGhee JR. Oral immunization: past and present. Curr Top Microbiol Immunol 1989; 146: 3-11.

187. Shahin R, Leef M, Eldridge J, Hudson M, Gilley R. Adjuvanticity and protective immunity elicited by Bordetella pertussis antigens encapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. Infect Immun 1995; 63(4):1195-200.

188. Eldridge JH, Staas JK, Meulbroek JA, McGhee JR, Tice TR, Gilley RM. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. Mol Immunol 1991; 28(3):287-94.
189. Qureshi ST, Gros P, Malo D. The Lps locus: genetic regulation of host responses to bacterial lipopolysaccharide. Inflamm Res 1999; 48(12): 613-20.
190. Bosma MJ, Carroll AM. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. Annu Rev Immunol 1991; 9: 323-50.
191. Kindred B. Nude mice in immunology. Prog Allergy 1979; 26:137-238.
192. Dalton DK, Pitts Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradlay A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. Science 1993; 259(5102):1739-42.
193. Philpott KL, Viney JL, Kay G i sur. Lymphoid development in mice congenitally lacking T cell receptor alpha beta-expressing cells. Science 1992; 256(5062): 1448-52.
194. Fung Leung WP, Schilhman MW, Rahemtulla A i sur. CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. Cell 1991; 65(3): 443-9.
195. Rahemtulla A, Fung Leung WP, Schilhman MW i sur. Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. Nature 1991; 353(6340):180-4.
196. Kitamura D, Roes J, Kuhn R, Rajewsky K. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. Nature 1991; 350(6317):423-6.
197. Chen J, Trounstine M, Alt FW i sur. Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. Int Immunol 1993; 5(6):647-56.
198. Shahin RD, Cowell JL. Mouse respiratory infection models for pertussis. Methods Enzymol 1994; 235:47-58.
199. Gazzinelli RT, Eltoum I, Wynn TA, Sher A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. J Immunol 1993; 151(7): 3672-81.

200. Perlmann H, Perlamnn P. Enzyme - Linked Immunosorbent Assay, in Cell Biology: A Laboratory Handbook. 1994, Academic Press Inc: San Diego. str. 322-328.
201. Sadick MD, Heinzel FP, Holaday BJ, Pu RT, Dawkins RS, Lockslay RM. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. J Exp Med 1990; 171(1):115-27.
202. Lapin JH. Letter: Recommendation for DTP. N Y State J Med 1974; 74(1): 25-6.
203. Edwards KM, Karzon DT. Pertussis vaccines. Pediatr Clin North Am 1990; 37(3):549-66.
204. Woods DE, Franklin R, Cryz SJ, Ganss M, Peppler M, Ewanowich C. Development of a rat model for respiratory infection with Bordetella pertussis. Infect Immun 1989; 57(4):1018-24.
205. Sato Y, Izumiya K i sur. Aerosol infection of mice with Bordetella pertussis. Infect Immun 1980; 29 (1):261-66.
206. Halperin SA, Heifetz SA, Kasina A. Experimental respiratory infection with Bordetella pertussis in mice: comparison of two methods. Clin Invest Med 1988; 11(4):297-303.
207. Mills KH, Barnard A, Watkins J, Redhead K. Cell-mediated immunity to Bordetella pertussis: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. Infect Immun 1993; 61(2):399-410.
208. Kovarik J, Siegrist C. Immunity in early life**.** Immunol Today *1998; 19 (4) 150-52.*
209. Mahon BP, Sheahan BJ, Griffin F, Murphy G, Mills KH. Atypical disease after Bordetella pertussis respiratory infection of mice with targeted disruptions of interferon-gamma receptor or immunoglobulin mu chain genes. J Exp Med 1997; 186(11):1843-51.
210. Shahin RD, Hamel J, Leef MF, Brodeur BR. Analysis of protective and nonprotective monoclonal antibodies specific for Bordetella pertussis lipooligosaccharide. Infect Immun 1994; 62(2):722-5.

211. Sato H, Sato Y. Bordetella pertussis infection in mice: correlation of specific antibodies against two antigens, pertussis toxin, and filamentous hemagglutinin with mouse protectivity in an intracerebral or aerosol challenge system. Infect Immun 1984; 46(2):415-21.
212. Van den Berg BM, Beekhuizen H, Willems RJ, Mooi FR, Van Furth R. Role of antibodies against Bordetella pertussis virulence factors in adherence of Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis to human bronchial epithelial cells. Infect Immun 1999; 67(3):1050-5.
213. Mills KH. Immunity to Bordetella pertussis. Microb Infect 2001; 3: 655-77.
214. Cheers C, Gray DF. Macrophage behaviour during the complaisant phase of murine pertussis. Immunol 1969; 17: 875-87.
215. Torre D, Pugliese A, Speranza F i sur. Interferon-gamma levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of mice infected with Bordetella pertussis. J Infect Dis 1993; 167: 762-5.
216. Torre D, Ferrario G, Perversi L, Speranza F. In vitro and in vivo induction of nitric oxide by murine macrophages stimulated with Bordetella pertussis. FEMS Immunol Med Microbiol 1996; 13(2):95-9.
217. Celada A, Maki RA. IFN-gamma induces the expression of the genes for MHC class II I-A beta and tumor necrosis factor through a protein kinase C-independent pathway. J Immunol 1991; 146(1): 114-20.
218. Maureen C, Miyajima A, Coffman R. T cell derived cytokines and their rceptors. U: Paul WE. ur. Fundamental immunology. New York: Raven Press: 1993, str 763-801.
219. Ryan M, Murphy G, Gothefors L, Nilsson L, Storsaeter J, Mills KH. Bordetella pertussis respiratory infection in children is associated with preferential activation of type 1 T helper cells. J Infect Dis 1997; 175(5): 1246-50.
220. He Q, Tran Minh NN, Edelman K i sur. Cytokine mRNA expression and proliferative responses induced by pertussis toxin, filamnetous hemagglutinin and pertactin of Bordetella pertussis in the peripheral blood mononuclear cells of infected and immunized schoolchildren and adults. Infect Immun 1998; 66: 3796-801.

221. Wynn TA, Eltoum I, Cheever AW, Lewis FA, Gause WC, Sher A. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of Schistosoma mansoni. J Immunol 1993; 151(3):1430-40.
222. Le Gros G, Ben Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. J Exp Med 1990; 172(3): 921-9.
223. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. Adv Immunol 1993; 54: 1-78.
224. Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA i sur. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. Science 1994; 264(5158):561-3.
225. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. Blood 1994; 84(12):4008-27.
226. Mahon BP, Ryan MS, Griffin F, Mills KH. Interleukin-12 is produced by macrophages in response to live or killed Bordetella pertussis and enhances the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells. Infect Immun1996; 64(12): 5295-301.
227. McGuirk P, Mills KH. Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from Bordetella pertussis. Eur J Immunol 2000; 30(2):415-22.
228. Ewanowich CA, Melton AR, Weiss AA, Sherburne RK, Peppler MS. Invasion of HeLa 229 cells by virulent Bordetella pertussis. Infect Immun 1989; 57(9): 2698-704.
229. Barnard A, Mahon BP, Watkins J, Redhead K, Mills KH. Th1/Th2 cell dichotomy in acquired immunity to Bordetella pertussis: variables in the in vivo priming and in vitro cytokine detection techniques affect the classification of T-cell subsets as Th1, Th2 or Th0. Immunology 1996; 87(3):372-80.
230. Gustafsson L, Olin P, Reizenstein E, Storsaeter J. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. N Engl J Med 1996; 334(6):349-55.

231. Greco D, Salmaso S, Mastrantonio P i sur. A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. N Engl J Med 1996; 334(6):341-8.
232. Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K. A search for serologic correlates of immunity to Bordetella pertussis cough illnesses. Vaccine 1998; 16(20): 1901-6.
233. Saurwein Teissl M, Lung TL, Marx F i sur. Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. J Immunol 2002; 168(11):5893-9.
234. Yen CJ, Lin SL, Huang KT, Lin RH. Age-associated changes in interferon-gamma and interleukin-4 secretion by purified human CD4+ and CD8+ T cells. J Biomed Sci 2000; 7(4):317-21.
235. Thomas MG, Ashworth LA, Miller E, Lambert HP. Serum IgG, IgA, and IgM responses to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and agglutinogens 2 and 3 after infection with Bordetella pertussis and immunization with whole-cell pertussis vaccine. J Infect Dis 1989; 160(5):838-45.
236. Redhead K, Watkins J, Barnard A, Mills KH. Effective immunization against Bordetella pertussis respiratory infection in mice is dependent on induction of cell-mediated immunity. Infect Immun 1993; 61(8):3190-8.
237. Petersen JW, Ibsen PH, Haslov K, Heron I. Proliferative responses and gamma interferon and tumor necrosis factor production by lymphocytes isolated from tracheobroncheal lymph nodes and spleen of mice aerosol infected with Bordetella pertussis. Infect Immun 1992; 60(11):4563-70.
238. Golovkina TV, Sholmchik M, Hannum L, Chervonsky A. Organogenic role of B lymphocytes in mucosal immunity. Science 1999; 286(5446):1965-8.
239. Elkins KL, Bosio CM, Rhinehart Jones TR. Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium Francisella tularensis live vaccine strain. Infect Immun 1999; 67(11): 6002-7.

240. Chan OT, Hannum L, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. J Exp Med 1999; 189(10):1639-48
241. Elkins KL, Stashak PW, Baker PJ. Cell-associated IgM, but not IgD or I-A/E, is important in the activation of suppressor T cells by antigen-primed B cells. J Immunol 1987; 139(3): 695-701.
242. Roth R, Mamula MJ. Trafficking of adoptively transferred B lymphocytes in B-lymphocyte-deficient mice. J Exp Biol 1997; 200 :2057-62.
243. Bosio CM, Gardner D, Elkins KL. Infection of B cell-deficient mice with CDC 1551, a clinical isolate of Mycobacterium tuberculosis: delay in dissemination and development of lung pathology. J Immunol 2000; 164(12): 6417-25.
244. Brady MT, Mahon BP, Mills KH. Pertussis infection and vaccination induces Th1 cells. Immunol Today 1998; 19(11):534.

10. ŽIVOTOPIS

Jerko Barbić, DR. MED.
Centar za hemodijalizu
Klinika za unutarnje bolesti
Klinička bolnica Osijek
Josipa Huttlera 4
31000 Osijek
tel. 031 / 511 437
e-mail: barbic.jerko@kbo.hr

Datum i mjesto rođenja:
24. travnja 1964., Split
Kućna adresa:
Sjenjak 37, 31 000 Osijek
tel. 031 / 570 476

Obrazovanje

1984. – 1990. : Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
od 1998. : Poslijediplomski studij iz biomedicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
1990.-1991.: Liječnički staž u KB Osijek, Osijek.
1995.-1999. : Specijalizacija iz Interne medicine u KB Osijek u Osijeku i KBC Rebro u Zagrebu.
1999.: položen specijalistički ispit.

Akademski naslovi

1990.: doktor medicine; Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Dosadašnja radna mjesta

1990.-1991. Liječnik pripravnik u Kliničkoj bolnici Osijek u Osijeku.
1991.- 1993. Postdoctoral fellow, Department of Rheumatology, School of Medicine, University of Maryland at Baltimore, SAD.
1993. Pripravnik mladi istraživač KB Osijek.

1994.-1995. Fogarthy Visiting fellow, National Institute of Health, FDA, Bethesda, USA.
1995.-1999. Specijalizant Interne medicine KB Osijek.
Od 2000. Specijalist interne medicine Odjel za hemodijalizu, Klinika za unutarnje bolesti KB Osijek.

Jezici: Engleski jezik

Nagrade
1995.: Food and Drug Administration, USA, Public health achievement award.

Ostale aktivnosti
1986. – 1987 demonstrator u Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Znanstveni projekti Ministarstva znanosti Republike Hrvatske
1998 – Regulacija staničnog ciklusa kod karcinoma prostate.
2002 - Destrukcija tumora magnetskim nanočesticama vezanim uz protutijela.

Jerko Barbić – Objavljeni radovi

Izvorni znanstveni radovi (*Current Contents* indeksirani časopisi)

1. Barbic J, Leef MF, Burns DL, Shahin RD. Role of Gamma Interferon in Natural Clearance of Bordetella pertussis Infection. Infect Immun 1997; 65:4904-908.

2. Leef M, Elkins KL**,** Barbic J, Shahin RD. Protective Immunity to Bordetella pertussis Requires Both B Cells and $CD4^+$ T Cells for Key Functions Other than Specific Antibody Production. J Exp Med 2000; 191: 1841-42.

Znanstveni radovi u časopisima indeksiranim u Science citation index *expanded (skraćeno SCI)*

3. Samardžija M, Samardžija G, Barbić J. i sur. Clinical significance of serologic diagnosis of hepatitis C infection in dialysis patients. Periodicum Biologorum 2000; 102: 421-24.

4. Včev A , Barbić J, Včev A. Kovačić D, Vegar M. Obstruction of the doudenum due to a billiary calculus (Bouveret´s syndrome) Radiol Oncol 1998; 32(2):161-63.

Neindeksirani časopisi

5. M. Jakić, D. Mihaljević, J. Milas**,** Barbić J, Jakić M**.** Funkcija peritonejske membrane i starenje Med Vjes 1998; 30:177-181.

Kongresna priopćenja

1. Barbic J, and Fox B.S. Stimulation of Th0 cell with anti-Thy-1 antibody selectively enhances production of IL-4 not IL-2. Clin. Res. 40:270A, Baltimore, USA, 1992.

2. Barbic J, Leef M, Shahin RD. Evidence for more than one Mechanism of Protection to Respiratory *Bordetella pertussis* Infection. 9th International Congress of Immunology. San Francisco, CA 1995

3. Barbic J, Leef M, Shahin RD. Mechanisms Involved in Protective Mucosal Immunity to Respiratory *Bordetella pertussis* Infection. Abstracts of the American Society for Microbiology. New Orleans. 1996.

4. Tucak A, Kuveždić H, Perić N, Barbić J, Prlić D. Behandlung der Urolithiasis bei Kindern. 50 Kongress Der Deutschen Gesellschaft fur Urologie, September 1998, Hamburg, Germany.

5. Jakić M, Barbić J. Does pruritus in hemodialysed patients dissapear only by suplementory treatment? II Slovenian-German-Croatian meeting: International Update Seminar of nephrology and Hypertension. Brdo pri Kranju, Slovenia, 1999.

6. Barbić J. Imunološka terapija karcinoma urogenitalnog sustava. IV Osječki urološki dani, Osijek, Croatia,1999.

7. Barbić J. Erythrocyte osmotic resistance and erythropoeitin therapy in hemodialysed patients. XXXVII ERA-EDTA congress, September 17-20, 2000. Nice, France.

8. Jakić M, Rupčić V, Stipanić S, Samardžija G, Bilandžija M, Zibar L, **Barbić J**, J. Milas i D. Mihaljević. CAPD – neke osobitosti naših bolesnika. IV SIMPOZIJ O PERITONEJSKOJ DIJALIZI I CAPD. Supetar. 1997; S-11.

9. Barbić J, Jakić M, Samardžija G. Serum levels of proinflamatory cytokines and parathyroid horomone in patients undergoing hemodialysis. Nephrology Dialysis Transplantation 2002; Abstract supplement 1: 270. XXXIX Congress of the European Renal Association, European Dialysis and Transplant Association. Copenhagen, July, 14-17. 2002.

10. Samardžija G, Barbić J, Jakić M, Samardžija M, Zibar L, Stipanić S, Bilandžija M, Mihajevic D. Pulse oral calcitriol treatment in HD patients with severe hyperparathyreoidism. Nephrology Dialysis Transplantation 2002; Abstract supplement 1: 66. XXXIX Congress of the European Renal Association, European Dialysis and Transplant Association. Copenhagen, July, 14-17. 2002.

11. Stipanić S, Barbić J, Kuveždić H, Jakić M, Samardžija G, Bilandžija M, Zibar L, Mihajevic D. Transitional cell carcinoma of pyelon and urether in chronic hemodialysis patients with Balkan endemic nephropathy (BEN). Nephrology Dialysis Transplantation 2002; Abstract supplement 1: 106. XXXIX Congress of the European Renal Association, European Dialysis and Transplant Association. Copenhagen, July, 14-17. 2002.

12. Jakić M, Mihaljevic D, Barbic J, Jakic M, Zibar L, Stipanic S, Samardzija G, Bilandzija M. How can an inaccurate estimation of urea distribution volume affect the adequacy of CAPD calculation results? Nephrology Dialysis Transplantation 2002; Abstract supplement 1: 140. XXXIX Congress of the

European Renal Association, European Dialysis and Transplant Association. Copenhagen, July, 14-17. 2002.

13. Jakić M, Mihaljević D, Barbić J**,** Jakić M. Utjecaj učinkovitosti hemodijalize na korekciju anemije eritropoetinom. (prihvaćeno za poster prezentaciju za 2. hrvatski kongres nefrologije, dijalize i transplantacije, Plitvice, 10.-13. 10. 2002. godine)

14. Jakić M, Mihaljević D, Barbić J. i sur. Koliko volumen tjelesne vode utječe na procjenu klirensa ureje peritonejskom dijalizom liječenih bolesnika? (prihvaćeno za poster prezentaciju za 2. hrvatski kongres nefrologije, dijalize i transplantacije, Plitvice, 10.-13. 10. 2002. godine).

15. Mihaljević D, Jakić M, Milas J, Barbić J, Zibar L, Bilandžija M, Samardžija G, Stipanić S. Utjecaj učestalosti peritonitisa na učinkovitost peritonej-ske dijalize i učinkovitosti peritonejske dijalize na učestalost pe-ritonitisa (prihvaćeno za poster prezentaciju za 2. hrvatski kongres nefrologije, dijalize i transplantacije, Plitvice, 10.-13. 10. 2002. godine)

16. Stipanić S, Barbić J, Samardžija G. i sur. Razlike između visokih i niskih transportera na peritonejskoj dijalizi (CAPD). 2. hrvatski kongres nefrologije, dijalize i transplantacije, Plitvice, 10.-13. 10. 2002. godine

17. Barbić J, Zibar L, Jakić M. i sur. Utjecaj dobi i anti-HCV protutijela na uspješnost cijepljenja protiv B hepatitisa u dijaliznih bolesnika. 2. hrvatski kongres nefrologije, dijalize i transplantacije, Plitvice, 10.-13. 10. 2002. godine

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 24. travnja 1964. godine u Splitu. Osnovnu školu sam završio u Jelsi. Srednju školu sam završio u Jelsi i Osijeku. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu Studij medicine u Osijeku upisao sam 1984. godine. Tijekom studija radio sam kao demonstrator u Zavodu za anatomiju. Studij sam završio 1990 godine s prosječnom ocjenom 4,47. Od 1995 godine radim u KB Osijek. Od 1991-1993 godine radio sam kao istraživač na projektu pobude pomoćničkih limfocita T *(postdoctoral fellowship)* u Odjelu za reumatologiju i imunologiju Sveučilišta Maryland u Baltimoreu, SAD. Od 1994 do 1995 godine kao *Fogarthy* stipendista radio sam u Američkoj administraciji za hranu i lijekove pri Nacionalnim instututima Zdravlja u Bethesdi SAD na projektu razvitka cjepiva. Specijalistički ispit iz Interne medicine položio sam 1999 godine. Od 1999 godine radim kao specijalista Interne medicine na Odjelu za dijalizu Interne klinike KB Osijek. Dobitnik sam nagrade za unapređenje javnog zdrastva Američke administracije za hranu i lijekove.